

**Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin
(Department) Tübingen
Abteilung I
(Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger**

**Einfluss des Lym-2 Antigens auf die zytotoxische
Aktivität natürlicher Killerzellen gegenüber
Leukämien der B-Zellreihe**

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

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

vorgelegt von

Imke Sütterlin

aus Emmendingen

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Stevanovic

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	6
1.1	Akute Leukämien im Kindesalter	6
1.1.1	Therapie der akuten lymphatischen Leukämie	6
1.1.2	Stammzelltransplantation	7
1.2	Natürliche Killerzellen	9
1.2.1	Zytotoxische Mechanismen	12
1.2.2	Erkennungsmechanismen	13
1.2.3	Regulation der zytotoxischen Aktivität	14
1.2.4	Mediatoren	19
1.2.5	Rolle von NK-Zellen in der Stammzelltransplantation	20
1.3	Monoklonale Antikörper	21
1.3.1	Lym-2	25
1.4	Fragestellung	26
2	<u>MATERIAL</u>	27
2.1	Allgemeine Materialien	27
2.2	Material für die Zellzählung	29
2.3	Material für die Durchflusszytometrie	29
2.4	Material für die Isolierung peripherer mononukleärer Zellen	30
2.5	Material für die Anreicherung von NK-Zellen	31
2.6	Material für den Zytotoxizitätstest	31
3	<u>METHODEN</u>	32
3.1	Studienaufbau	32
3.2	Quantitative Durchflusszytometrie	32
3.2.1	Methodischer Hintergrund	32
3.2.2	Proben	36
3.2.3	Durchführung	36
3.2.4	Auswertung	40
3.3	Isolierung peripherer mononukleärer Zellen	41

3.3.1	Methodischer Hintergrund	41
3.3.2	Proben	41
3.3.3	Durchführung	41
3.4	Anreicherung von NK-Zellen	42
3.4.1	Methodischer Hintergrund	42
3.4.2	Proben	43
3.4.3	Durchführung	43
3.5	Test auf natürliche und Antikörper-vermittelte Zytotoxizität	44
3.5.1	Methodischer Hintergrund	44
3.5.2	Proben	45
3.5.3	Durchführung	45
3.5.4	Auswertung	47
4	ERGEBNISSE	49
4.1	Quantitative Durchflusszytometrie	49
4.1.1	Expressionsanalyse mit W6/32	50
4.1.2	Expressionsanalyse mit CD19	52
4.1.3	Expressionsanalyse mit Lym-2	55
4.2	Zytotoxische Aktivität von NK-Zellen	59
4.2.1	Zytotoxizität von CD16 x CD19 und CD19	60
4.2.2	CD19 Expression auf Blasten und Lysierbarkeit	63
4.2.3	Zytotoxizität von Lym-2	65
4.2.4	Lym-2 Expression auf Blasten und Lysierbarkeit	69
4.2.5	Vergleich der Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität	71
5	DISKUSSION	75
5.1	Methodenkritik	76
5.1.1	Quantitative Durchflusszytometrie	76
5.1.2	Anreicherung von NK-Zellen	77
5.1.3	Test auf natürliche und Antikörper-vermittelte Zytotoxizität	78
5.2	Diskussion der Ergebnisse	79
5.2.1	Quantitative Durchflusszytometrie	79
5.2.2	Expressionsanalyse mit Lym-2	82
5.2.3	Aktivität angereicherter NK-Zellen gegenüber Blasten	84
5.2.4	Literatur zur Zytotoxizität von CD19 Antikörpern	85

5.2.5	Zytotoxizität von Lym-2 x CD16	89
5.2.6	Literatur zur Zytotoxizität von Lym-2 und HLA-Klasse-II Antikörpern	90
5.3	Schlussfolgerung	95
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	96
7	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	98
8	<u>ANHANG</u>	106
8.1	Verzeichnis der Tabellen	106
8.2	Verzeichnis der Abbildungen	107

1 Einleitung

1.1 Akute Leukämien im Kindesalter

Die akuten Leukämien sind die häufigsten Malignome im Kindesalter. In Deutschland erkranken jährlich vier bis fünf pro 100.000 Kinder (Kaatsch et al. 1995). Grundsätzlich werden Leukämien der lymphatischen und der myeloischen Reihe unterschieden. 80% der akuten Leukämien im Kindesalter können der lymphatischen Reihe zugeordnet werden (akute lymphatische Leukämie, ALL). Diese werden weiter nach dem Typ der genetisch transformierten hämatopoetischen Vorläuferzelle der B- oder T-Zellreihe zugeordnet, wobei B-Zell-Leukämien mit 76% weitaus häufiger sind. Die mit 51% häufigste Form der ALL im Kindesalter ist die common-ALL (c-ALL).

1.1.1 Therapie der akuten lymphatischen Leukämie

Derzeit werden Kinder mit ALL nach den Plänen der BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) –Studiengruppe behandelt. Die Therapie besteht zum einen in einer hochdosierten Polychemotherapie (Prednisolon, Vincristin, Daunorubicin und 1-Asparaginase), sowie der präventiven Behandlung des Zentralnervensystems durch intrathekale und systemische Verabreichung von Methotrexat, da ZNS-Rezidive beispielsweise in Form einer Meningeosis leucaemica früher die Haupttodesursache erkrankter Kinder darstellten. Mit dieser Therapie überleben im Durchschnitt 80% der erkrankten Kinder.

Prognose

Nach einmaliger Behandlung bleiben 75% der Kinder rückfallfrei. Zudem ist bei einem Drittel der Kinder mit Rezidiv eine Heilung noch möglich. Insbesondere bei früh eintretenden Knochenmarkrezidiven oder einem hohem Risikoprofil auch schon in der ersten Remission können akute Leukämien im Kindesalter erfolgreich mit einer Stammzelltransplantation behandelt werden.

1.1.2 Stammzelltransplantation

Für viele maligne und nichtmaligne hämatologische Erkrankungen stellt eine Stammzelltransplantation die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit dar.

Der Grundgedanke der Stammzelltransplantation war zunächst, malignes, entartetes Knochenmark durch hochdosierte Chemo-Radiotherapie (Konditionierung) zu zerstören, um es anschließend durch gesundes Knochenmark eines Spenders zu ersetzen. So konnten vor einer geplanten Stammzelltransplantation Behandlungsregimes durchgeführt werden, die weitaus toxischer als gängige Chemotherapien für das Knochenmark waren (Appelbaum 2001). Hierbei zeigte sich, dass Rezidive bei Patienten mit Leukämien nach einer Stammzelltransplantation weniger häufig auftraten, wenn diese Patienten eine Graft-versus-Host Reaktion (GvHD) entwickelten (Weiden et al. 1979). Aus dieser Beobachtung weiß man inzwischen, dass das kurative Potential einer Stammzelltransplantation zu großen Teilen auf immunkompetente Spenderlymphozyten zurückzuführen ist, welche nicht nur eine GvHD, sondern auch eine Graft-versus-Leukemia Reaktion (GvL) vermitteln können. Dabei sind immunkompetente Zellen des Spenders (vor allem zytotoxische T-Lymphozyten, aber auch Natürliche Killer (NK)-Zellen) in der Lage, verbliebene Leukämiezellen und andere Knochenmarkszellen des Empfängers, die das myeloablative Konditionierungsregime überlebt haben und zu einer Abstoßungsreaktion oder zu einem „non-engraftment“ führen könnten, zu eliminieren (Horowitz et al. 1990). Allerdings greifen diese zytotoxischen T-Zellen auch andere Zellen des Empfängers an, insbesondere die Schleimhäute, das Lebergewebe und das Darmepithel und können so eine akute oder chronische GvHD verursachen.

Während früher unmanipuliertes Knochenmark transplantiert wurde, können inzwischen hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark des Spenders durch Verabreichung von G-CSF (Granulozyte-Colony Stimulating Factor) ins zirkulierende Blut mobilisiert werden und daraus mittels Leukapheresen gewonnen werden. Aus diesen Leukozyten können dann CD34-positive Stammzellen und andere immunkompetente Zellen des Spenders extrahiert werden, so dass, im Gegensatz zur unmanipulierten

Knochenmarkspende, gezielt verschiedene Blutbestandteile transplantiert werden können.

Die Auswahl eines geeigneten Knochenmarkspenders richtet sich nach dem Grad der genetischen Verwandtschaft des Spenders zum Empfänger sowie deren Übereinstimmung in den Merkmalen des Human-Leukocyte-Antigen (HLA)-Systems. Man unterscheidet genetisch identische, syngene Spender (eineiige Zwillinge) und allogene Spender (HLA-identische Geschwister oder Fremdspender).

Da nur für 30% der betroffenen Kinder ein verwandter oder fremder HLA-identischer Spender gefunden werden kann (Kernan et al. 1993), nimmt die Stammzelltransplantation von haploidentischen Spendern eine immer größere Rolle ein. Diese Spender sind meist Elternteile, die die Hälfte der HLA-Merkmale mit dem Kind teilen. Ein großes Problem hierbei war zunächst das hohe Risiko des Auftretens von Abstoßungsreaktionen, sowie des Auftretens einer GvHD und Komplikationen durch schwere Infektionen (Handgretinger et al. 2003). Dies führte zu einer hohen Transplantations-assoziierten Mortalität haploidenter Stammzelltransplantationen. Inzwischen kann das Risiko einer GvHD durch die Verwendung von hochaufgereinigten, positiv selektierten CD34-positiven Stammzellen und durch die zusätzliche Depletion alloreaktiver Spender T-Zellen auf ein Minimum reduziert werden (Mitsuyasu et al. 1986; Urbano-Ispizua et al. 2002; Handgretinger et al. 2003; Lang et al. 2003). Auch das Konditionierungsregime kann somit weniger intensiv, und dadurch weniger toxisch, durchgeführt werden. Allerdings ist mit einer T-Zell-Depletion eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Rezidiven und „non-engraftments“ assoziiert, da ohne T-Zellen auch der GvL-Effekt geringer ist (Apperley et al. 1986; Cavazzana-Calvo et al. 1996; Green et al. 1999; Handgretinger et al. 2001). Des Weiteren treten durch eine verzögerte Immunrekonstitution häufiger Komplikationen in Form von schweren Infektionen auf (Handgretinger et al. 2003).

Einen neuen Ansatz, diese Schwierigkeiten zu überwinden, stellt die Immuntherapie mit allogenen NK-Zellen nach haploidenter Stammzelltransplantation dar (siehe 1.2.5).

1.2 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind relativ große, granuläre und zytotoxische Lymphozyten, deren Hauptaufgabe die Eliminierung infizierter oder anderweitig aberranter Körperzellen ist. Sie sind Teil des angeborenen Immunsystems, stehen aber auch mit dem adaptiven Immunsystem in Wechselwirkung. NK-Zellen stellen circa 10% der im Blut zirkulierenden Lymphozyten dar (Gardiner 1999). Die Zahl der NK-Zellen unterliegt großen individuellen Schwankungen, sowie einer Tagesrhythmik und korreliert positiv mit einer Anzahl weiterer Faktoren, wie zum Beispiel Sport, Stress, Entzündung und Infektion.

Morphologie

NK-Zellen sind größer als B- und T-Zellen und weisen eine Vielzahl charakteristischer azurophiler Granula (Perforin und Granzyme) in ihrem Zytoplasma auf. Sie werden deshalb auch als „*large granular lymphocytes*“ bezeichnet. Sie zirkulieren größtenteils im peripheren Blut, können in den Lymphknoten aktiviert werden und kommen auch in vorwiegend lymphatischem Gewebe vor.

Entwicklung

Aus einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle entwickeln sich im Knochenmark aus CD7-positiven Vorläuferzellen T-Zellen und NK-Zellen (Spits et al. 1995), während sich aus CD10/IL-7R α -positiven Vorläufern B-Zellen entwickeln (Blom et al. 2006) (siehe Abbildung 1). NK-Zellen reifen daher nicht nur im Knochenmark, sondern auch im Thymus. Im Knochenmarkstroma spielen die Zytokine Interleukin (IL) -2 und -15 die größte Rolle bei der Entwicklung, beziehungsweise Reifung von NK-Zellen (Farag et al. 2002). NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen sind im Hinblick auf ihre zytotoxischen Mechanismen, auf die Produktion von Zytokinen wie zum Beispiel Interferon- γ (IFN- γ) und auf einige ihrer Oberflächenrezeptoren ähnlich oder gleich. Außerdem erkennen beide Zelltypen MHC (major-histocompatibility-complex) - Klasse-I-Moleküle.

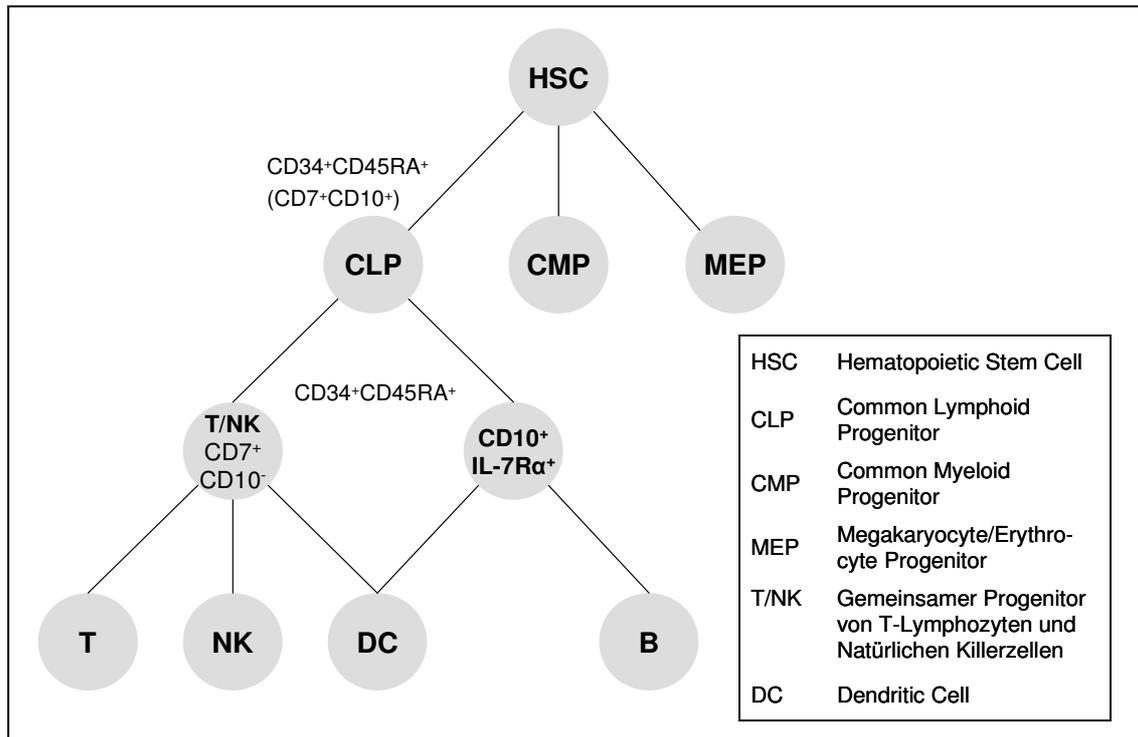


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Hämatopoese von Lymphozyten, modifiziert nach Blom et al. (Blom et al. 2006).

Funktion

Funktionell klassifiziert wurden NK-Zellen als Lymphozyten, die dazu fähig sind, bestimmte lymphoide Tumorzellen *in vitro* zu eliminieren ohne zuvor - im Gegensatz zu den zytotoxischen T-Zellen - aktiviert oder immunisiert worden zu sein (Trinchieri 1989). Sie besitzen, ebenfalls im Gegensatz zu den zytotoxischen T-Zellen, keine Antigen-spezifischen, adaptierten Rezeptoren und unterliegen keiner MHC-Restriktion. Während B- und T-Zellen die zellulären Komponenten des adaptiven Immunsystems sind, zählen NK-Zellen aufgrund ihrer Fähigkeit zur spontanen, unspezifischen Erregerabwehr zum angeborenen Immunsystem.

NK-Zellen sind hauptsächlich in die frühe Phase der Immunreaktion involviert. Sie erreichen ihren maximalen Aktivitätszustand innerhalb von ein bis zwei Tagen nach Infektion. Ihre Zielzellen sind dabei vor allem durch Viren oder

andere intrazelluläre Pathogene infizierte Zellen, sowie bestimmte Tumorzellen, die ihre MHC-Klasse-I-Expression verloren oder verändert haben (Karre 2002). In Geweben üben NK-Zellen eine kontinuierliche Kontrolle über aberrante Zellen aus, die beispielsweise Tumorantigene exprimieren oder ihre MHC-Klasse-I-Expression eingestellt haben. Sie spielen aber auch im Blut eine Rolle bei der Eindämmung von hämatogener Metastasierung.

Neben ihrer zytotoxischen Funktion sezernieren NK-Zellen auch Zytokine wie IFN- α , - β und - γ , Tumornekrosefaktor (TNF) - α und - β , Tumor-Growth-Factor (TGF)- β , G-CSF und die Interleukine 1, 3, 4 und 6 (Sinkovics et al. 2005). Im Falle einer Infektion triggern NK-Zellen so weitere Immunreaktionen wie die Aktivierung von T-Helferzellen, Monozyten und Granulozyten und sind dadurch an der Auslösung der adaptiven Immunabwehr durch B- und T-Zellen beteiligt. Außerdem potenziert die NK-Zelle mit der Sekretion dieser Zytokine ihre eigenen lytischen Fähigkeiten und stimuliert die Proliferation von weiteren NK-Zellen.

Klassifikation

Immunphänotypisch zeichnen sich NK-Zellen prinzipiell durch folgendes Expressionsprofil von Oberflächenmolekülen aus: CD3-negativ, CD16-positiv, CD56-positiv. NK-Zellen lassen sich weiter klassifizieren hinsichtlich der Expressionsdichte von CD56, einer Isoform des „neural cell adhesion molecule“ (NCAM). Man unterscheidet zwei Subpopulationen von NK-Zellen, „CD56dim, CD16pos“ und „CD56bright, CD16dim/neg“. Die „CD56dim, CD16pos“ NK-Zellen exprimieren nur sehr wenig CD56. Sie stellen 90% der NK-Zellen dar und dienen vor allem der Zytotoxizität (Romero et al. 2006). Die „CD56bright, CD16dim/neg“ NK-Zellen exprimieren vor allem CD56 und nur sehr wenig oder gar kein CD16. Sie stellen 10% der NK-Zellen dar und dienen eher der Zytokinproduktion (Romero et al. 2006). Allerdings sind diese Zellen leicht über hochaffine IL-2 Rezeptoren mit IL-2 stimulierbar und können mindestens das gleiche zytotoxische Potential wie die „CD56dim, CD16pos“ NK-Zellen entfalten (Farag et al. 2002).

1.2.1 Zytotoxische Mechanismen

NK-Zellen wurden zunächst als eine eigenständige, dritte Population von Lymphozyten mit dem höchsten zytolytischen Potential gegenüber transformierten Zellen charakterisiert (Bottino et al. 2004). Grundsätzlich lysieren NK-Zellen Zielzellen über den Perforin/Granzyme-Mechanismus, das heißt durch die Ausschüttung ihrer zytotoxischen Granula, sowie durch die Induktion von Apoptose in der Zielzelle durch Expression ihres Fas-Liganden (Sinkovics et al. 2005). Dies sind die gleichen lytischen Mechanismen derer sich auch die zytotoxischen T-Zellen bedienen.

Perforin/Granzym-Mechanismus

Wenn eine NK-Zelle eine Zielzelle über verminderte oder veränderte MHC-I-Expression erkennt und bindet, setzt sie Calciumionen in den Interzellularspalt frei. Die intrazellulären Vesikel (Granula) wandern an die zur Zielzelle gerichtete Membran, verschmelzen mit dieser Membran und setzen die enthaltenen Proteine (Perforine, Granzyme) in den Interzellularspalt frei. Die Perforine verbinden sich dann mit den Calciumionen zu Polymeren, die in der Membran der Zielzelle Poren bilden. Wasser und Ionen können so in die Zelle einströmen. In der Folge schwillt die Zelle an und es kommt zur Lyse. Außerdem gelangen durch die Poren Granzyme in die Zielzelle. Hierbei handelt es sich um Serinproteasen, die durch eine Signalkaskade aus Kaspasen Apoptose induzieren können.

Fas/FasL-Mechanismus

NK-Zellen exprimieren wie auch zytotoxische T-Zellen den Fas-Liganden (CD95). Ist die NK-Zelle maximal aktiviert, steigert sie die Expression von akzessorischen Oberflächenmolekülen, exprimiert den Fas-Liganden und sezerniert Zytokine. Der Fas-Ligand wird vom Fas-Rezeptor, der zur Superfamilie der TNF-Rezeptoren gehört, auf den Zielzellen gebunden (Zamai et al. 1998). Dies führt über eine intrazelluläre Signalsequenz zur Induktion von Apoptose und zur Aktivierung von Kaspasen, die die Zielzelle zerstören. NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen werden auch selbst über diesen Mechanismus

eliminiert, um Immunreaktionen, zum Beispiel nach erfolgreicher Immunabwehr, einzudämmen.

1.2.2 Erkennungsmechanismen

Die NK-Zelle bedient sich dreier verschiedener Mechanismen zur Erkennung von Zielzellen. Sie hat zum einen das Potential zur direkten, natürlichen Zytotoxizität über erstens die Erkennung von herunterregulierter, aberranter MHC-Klasse-I-Expression auf Zielzellen und zum zweiten über ihren Fas-Liganden (siehe oben). Zum anderen sind NK-Zellen zur Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) über ihren FcγRIIIa (CD16) Rezeptor fähig (Robertson et al. 1990). Damit ist die NK-Zelle nicht nur an der initialen Immunabwehr beteiligt, sondern auch an der späteren adaptiven Immunantwort.

Erkennung von aberranter MHC-Klasse-I-Expression

NK-Zellen besitzen genetisch kodierte, invariable Rezeptoren, die häufig vorkommende Merkmale von Pathogenen erkennen können und daher infizierte von gesunden Zellen unterscheiden können. Die entscheidende Rolle bei der Erkennung solcher Zellen spielen MHC-Klasse-I-Moleküle. Die Funktion der klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle besteht darin, Peptidfragmente von phagozytiertem pathogenem Material an der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen, zum Beispiel Makrophagen, zu präsentieren, um damit T-Zellen zu aktivieren. Die NK-Zelle erkennt hingegen direkt quantitative und qualitative Veränderungen der MHC-Klasse-I-Expression und lysiert Zellen deren MHC-I-Expression verringert oder verändert ist (Karre 2002). Mit Viren infizierte oder maligne transformierte Zellen regulieren ihre MHC-Klasse-I-Expression herunter, um dem Angriff von zytotoxischen T-Zellen zu entgehen. Dies macht sie jedoch zu Zielzellen für NK-Zellen. NK-Zellen töten somit in der Regel keine Zellen mit normaler MHC-Klasse-I-Expression. Auch die vom MHC-Komplex präsentierten Peptide sind in den Erkennungsmechanismus der NK-Zelle involviert: Nur wenn korrekte Eigenpeptide nach Kopplung an MHC-

Klasse-I Moleküle auf der Oberfläche präsentiert werden, wird die Zelle sicher als 'eigen' erkannt und nicht eliminiert. Ein sogenannter maskierter MHC-Komplex entsteht, wenn Fremdprotein infolge einer Infektion inkorporiert wird oder Eigenpeptid beispielsweise in Tumoren transformiert vorliegt. Dies führt zum Angriff der NK-Zelle.

Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC)

NK-Zellen besitzen im Unterschied zu B- und T-Lymphozyten keine antigenspezifischen Rezeptoren. Als Komponenten des angeborenen Immunsystems sind sie daher weniger spezifisch in der Erregerabwehr und sind vor allem an der frühen Phase der Immunabwehr beteiligt. Eine Ausnahme hierzu stellt der ADCC-Mechanismus der NK-Zellen dar. Dabei steigert die Bindung von Antikörpern an die Zielzelle die Fähigkeit der NK-Zelle, diese zu lysieren. Ein an ein Antigen gebundenes IgG1 Molekül auf einer Zielzelle kann durch den transmembranären IgG-Rezeptor der NK-Zelle, den niedrigaffinen FcγRIIIa (CD16) Rezeptor, erkannt und gebunden werden. Damit wird die Freisetzung der lytischen Granula, sowie weiterer Mediatoren getriggert, und Apoptose oder Nekrose der Zielzelle induziert. Über den aktivierten Fc-Rezeptor der NK-Zelle kann also durch den ADCC-Mechanismus eine antigenspezifische Eliminierung von Zielzellen erfolgen, obwohl die NK-Zelle über keine direkten antigenspezifischen Rezeptoren verfügt. Diese Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität ist wesentlich effizienter als die natürliche Zytotoxizität der NK-Zelle, wobei der Mechanismus der Lyse über die zytotoxischen Granula gleich bleibt.

1.2.3 Regulation der zytotoxischen Aktivität

NK-Zellen besitzen grundsätzlich inhibierende und aktivierende Rezeptoren. Da NK-Zellen vorwiegend eine fehlende oder aberrante MHC-Klasse-I-Expression erkennen, muss ihre natürliche Zytotoxizität im gesunden Zustand, also bei normaler MHC-Expression, inhibiert sein. Die meisten NK-Zellrezeptoren wirken daher inhibitorisch. Im Allgemeinen haben diese inhibitorischen Rezeptoren

zudem eine höhere Affinität zu ihren Liganden und überwiegen in ihrer Wirkung deshalb unter physiologischen Bedingungen.

Nahezu alle inhibitorischen Rezeptoren gehören entweder zur Proteinfamilie der „killer-cell ig-like receptors“ (KIRs) oder der Ly49- ähnlichen C-Typ-Lektine und erkennen spezifisch MHC-Klasse-I Moleküle (siehe Tabelle 1). Die aktivierenden Rezeptoren der NK-Zellen können unterteilt werden in MHC-Klasse-I spezifische und nicht-MHC-Klasse-I spezifische (siehe Tabelle 2). Die Hauptgruppen MHC-Klasse-I spezifischer Rezeptoren stellen wie bei den inhibitorischen Rezeptoren KIRs und C-Typ-Lektine dar. Nicht-MHC-Klasse-I spezifische Rezeptoren sind beispielsweise „natural cytotoxicity receptors“ (NCRs) und der zu den C-Typ-Lektinen gehörende NKG2D Rezeptor. Weitere nicht-MHC-Klasse-I spezifische aktivierende Korezeptoren sind CD2, CD16, CD 40, CD69, LFA1, 2B4 und NKp80.

Die Rezeptorklassen der Ig-ähnlichen KIRs und der Ly49-ähnlichen C-Typ-Lektine beinhalten also inhibierende und aktivierende Rezeptoren und agieren komplementär mit wenigen Überlappungen bezüglich ihrer Spezifität für bestimmte MHC-Moleküle (O'Connor et al. 2006). Nur wenige NK-Zellklone exprimieren aktivierende und inhibierende Rezeptoren derselben Isoform, die dieselben MHC-Allotypen erkennen.

Killer-cell ig-like receptors (KIRs)

KIRs sind Rezeptoren aus der Immunglobulin-Superfamilie. Diese Rezeptor-Monomere besitzen entweder zwei oder drei extrazelluläre, Ig-ähnliche Domänen (KIR2D, KIR3D), die spezifisch die HLA -A, -B und -C -Allele des MHC-Klasse-I-Komplexes erkennen. HLA-C ist dabei der entscheidende Ligand sowohl für inhibitorische, als auch für aktivierende KIRs.

Aufgrund von Unterschieden in ihren Transmembran- oder zytoplasmatischen Domänen wirken diese Rezeptoren entweder inhibierend oder aktivierend, so dass dieselben Liganden inhibitorische wie auch aktivierende Reaktionen hervorrufen können (Farag et al. 2002). Inhibierende KIRs besitzen lange zytoplasmatische Ketten, die ITIM-Motive (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs) enthalten (Farag et al. 2002). Aktivierende KIRs hingegen

besitzen kurze zytoplasmatische Ketten, die assoziiert sind mit ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activatory motif)-haltigen Adaptorproteinen (Farag et al. 2002).

C-Typ-Lektine

C-Typ-Lektine gehören zum NK-Rezeptor-Komplex. Ihre extrazellulären Domänen, bestehen aus Heterodimeren von CD94 und NKG2. Diese treten mit HLA-E in Verbindung, das an andere MHC-Klasse-I-Moleküle bindet. So kann der CD94/NKG2-Rezeptor auf verschiedene MHC-Klasse-I-Moleküle reagieren. C-Typ-Lektine erkennen eine veränderte MHC-I-Expression und induzieren, nach eventueller Aktivierung, die Freisetzung von IFN- γ , Perforin und Granzyme aus den zytotoxischen Granula der NK-Zelle. Auch hier wirken die inhibitorischen Signale stärker als die dazu korrespondierenden aktivierenden. Eine Sonderform stellt der NKG2D-Rezeptor dar. Dieser aktivierende, nicht-MHC-Klasse-I spezifische Rezeptor gehört zu den C-Typ-Lektinen, obwohl er nicht mit CD49 assoziiert ist und keine ITAM-haltigen Ketten enthält. Strukturell stellt er ein Homodimer dar, das mit DAP10 assoziiert ist, um auf der Zelloberfläche exprimiert werden zu können. Spezifische Liganden für NKG2D sind die MHC-Klasse-Ib-Moleküle MIC A und B, deren Expression hinsichtlich Menge und Verteilung in Geweben variabel ist und die beispielsweise bei maligner Transformation von Zellen induziert werden (O'Connor et al. 2006). Andere Liganden des NKG2D-Rezeptors sind UL16-bindende Proteine (ULBP 1, 2 und 3), die zum Beispiel auf Cytomegalievirus-infizierten Zellen exprimiert werden (Romero et al. 2006).

Natural cytotoxicity receptors (NCRs)

NCRs stellen eine heterogene Gruppe von aktivierenden, nicht-MHC-Klasse-I spezifische Rezeptoren dar, deren Liganden größtenteils nicht identifiziert sind. Die meisten Rezeptoren dieser Gruppe sind Korezeptoren, deren Signale über ITAM-haltige CD3- ζ -Ketten (z.B. DAP10 und 12) oder Fc ϵ R1 γ -Adaptorproteine weitergeleitet werden (Vivier et al. 2004). NKp46 und 30 werden ausschließlich

und von allen NK-Zellen exprimiert (Pende et al. 1999; Sivori et al. 1999), wohingegen NKp44 bei IL-2 Stimulation hochreguliert wird (Cantoni et al. 1999).

Tabelle 1 und 2 zeigen eine Übersicht der inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren nach Farag et al. (Farag et al. 2002).

<i>Inhibitorische Rezeptoren</i>		<i>Liganden</i>
<i>killer-cell ig-like receptors (KIRs)</i>	KIR2DL1, CD158a	Gruppe 2 HLA-C Asn77 Lys80 (w2,4,5,6)
	KIR2DL2, CD158b	Gruppe 1 HLA-C Ser77 Asn80 (w1,3,7,8)
	KIR2DL3, CD158b	Gruppe 1 HLA-C Ser77 Asn80 (w1,3,7,8)
	KIR2 DL5	unbekannt
	KIR3 DL1	HLA-Bw4
	KIR3 DL2	HLA-A3, -A11
	KIR3 DL7	unbekannt
<i>C-Typ- Lektine</i>	CD94/NKG2 A/B	HLA-E, gekoppelt an A;B;C;G
<i>Ig-like transcripts</i>	ILT-2	unbekannt
<i>Andere</i>	P75/AIRM	unbekannt
	Irp60	unbekannt
	LAIR-1	Ep-CAM

Tabelle 1 Inhibitorische Rezeptoren der NK-Zelle.

		<i>Aktivierende Rezeptoren</i>	<i>Liganden</i>	
<i>MHC-Klasse-I-spezifisch</i>	<i>killer-cell ig-like receptors (KIRs)</i>	KIR2DS1	Gruppe 2 HLA-C Asn77 Lys80 (w2,4,5,6)	
		KIR2DS2	Gruppe 1 HLA-C Ser77 Asn80 (w1,3,7,8)	
		KIR2DL4	HLA-G	
		KIR2DS4	unbekannt	
		KIR2DS5	unbekannt	
		KIR3DS1	unbekannt	
	<i>C-Typ-Lektine</i>	CD94/NKG2 C	HLA-E, gekoppelt an A;B;C;G	
		CD94/NKG2 E/H	unbekannt	
	<i>nicht-MHC-Klasse-I-spezifisch</i>	<i>NCR</i>	NKp46	unbekannt
			NKp44	unbekannt
NKp30			unbekannt	
<i>C-Typ-Lektine</i>		NKG2 D	MIC A/B, ULBP 1,2,3	
<i>andere</i>		CD16 (FcγRIII)	IgG Fc-Teil	
		CD2	CD58 (LFA-3)	
		LFA-1	ICAM-1	
		2B4	CD48	
		NKp80	unbekannt	
		CD69	unbekannt	
CD40ligand		CD40		

Tabelle 2

Aktivierende Rezeptoren der NK-Zelle.

1.2.4 Mediatoren

Neben inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren können NK-Zellen durch eine Vielzahl von Mediatoren beeinflusst werden.

Interferone

IFN- α und - β sind antivirale Effektormoleküle, die bei einer viralen Infektion von den betroffenen Zellen freigesetzt werden. Sie aktivieren NK-Zellen zur Lyse von Zielzellen und zur Freisetzung von Effektorzytokinen. Des Weiteren hemmen sie direkt die Virusreplikation und steigern gleichzeitig die MHC-Expression auf Antigen-präsentierenden Zellen zur Präsentation von Antigenen an die T-Zellen.

Zytokine und Chemokine

Der Aktivierung von NK-Zellen dient vor allem IL-12, das in der Frühphase vieler Infektionen von Makrophagen sezerniert wird, sowie Chemokine aus Phagozyten, dendritischen Zellen und Epithelzellen. Die Stimulation zum Beispiel mit IL-12 oder auch IL-2 steigert das zytotoxische Potential von NK-Zellen und führt zur Lyse von Zielzellen, die die NK-Zelle unter unstimulierten Bedingungen nicht angegriffen hätte (Torelli et al. 2005).

IFN- α und - β und IL-12 können das zytotoxische Potential von NK-Zellen um das 20 bis 100fache verstärken.

Aktivierungsmoleküle und akzessorische Oberflächenmoleküle

Aktivierungsmoleküle wie CD2, CD16, CD25 und CD69 dienen der Feinregulation der NK-Zellaktivität.

Akzessorische Oberflächenmoleküle erleichtern die Adhäsion der NK-Zelle an Zielzellen und den Eintritt in solides Gewebe. Zu den akzessorische Oberflächenmoleküle gehören: „intercellular adhesion molecules“ (ICAM), „lymphocyte function antigen“ (LFA) und „very late antigen“ (VLA). Adhäsionsmoleküle werden, wie auch CD25, HLA-DR, CD69, CD71 und CD38, vermehrt von NK-Zellen im aktivierten Zustand exprimiert.

1.2.5 Rolle von NK-Zellen in der Stammzelltransplantation

Zelluläre Therapien mit NK-Zellen stellen eine vielversprechende Möglichkeit dar, die Rezidivrate nach haploidenten Stammzelltransplantationen bei akuten lymphatischen Leukämien zu senken (Farag et al. 2002; Koehl et al. 2004). Wie bereits erwähnt, stellt die Entstehung eines Rezidivs aus einer Minimalen Resterkrankung ein Hauptproblem nach einer haploidenten Stammzelltransplantation dar. Die potentielle Heilung von Leukämien durch eine Stammzelltransplantation ist demnach zu einem großen Teil auf den Austausch des malignen Knochenmarkes durch gesunde, immunkompetente Spenderzellen zurückzuführen, die residuale Tumorzellen im Sinne einer verbliebenen Minimalen Resterkrankung erkennen und eliminieren können (Sykes et al. 2005). Dieser antileukämische Effekt kann durch zytotoxische T-Zellen, aber auch durch NK-Zellen vermittelt werden (Glass et al. 1996; Fauriat et al. 2003; Guimaraes et al. 2006). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine negative Korrelation zwischen dem Entstehen eines Rezidivs nach einer Stammzelltransplantation und der NK-Zellzahl, beziehungsweise der NK-Zellaktivität im Blut des Empfängers besteht (Fauriat et al. 2003; Lang et al. 2004). Des Weiteren besitzen NK-Zellen im Vergleich zu zytotoxischen T-Zellen mehrere Vorteile. Zum einen können sie eine GvL-Reaktion, jedoch keine GvHD vermitteln, da ihre Alloreaktivität sich nur auf lymphohämatopoietisches Gewebe zu beziehen scheint (Asai et al. 1998; Murphy et al. 2001; Farag et al. 2002; Leung et al. 2004; Leung et al. 2005). NK-Zellen waren sogar in der Lage, eine GvHD aktiv zu verhindern (Ruggeri et al. 2002). Zum anderen konstituieren sich NK-Zellen nach einer T-Zell-depletierten Stammzelltransplantation schneller aus den transplantierten hämatopoetischen Stammzellen als zytotoxische T-Zellen (Kook et al. 1996; Eyrich et al. 2001; Handgretinger et al. 2001). Deshalb stehen sie zur Immuntherapie nach Transplantation schneller zur Verfügung, was einen frühzeitigen Effekt bei noch kleinen Mengen an residualen Leukämiezellen, also ein hohes Effektor-Targetzellverhältnis, ermöglicht. Frühere technische Schwierigkeiten in der Anreicherung von NK-Zellen zu klinischen Zwecken konnten inzwischen überwunden werden. NK-Zellen können mittlerweile in hoher Anzahl, Reinheit

und mit erhaltener Funktion angereichert werden (Leung et al. 2005). Die Immuntherapie mit alloreaktiven NK-Zellen stellt nach haploidenter Transplantation somit eine Möglichkeit dar, das Risiko der Entwicklung eines Rezidivs aus einer Minimalen Restkrankheit oder einem sinkenden Spenderchimerismus zu senken (Velardi et al. 2002; Koehl et al. 2005), die „engraftment“-Rate zu erhöhen (Ruggeri et al. 2002) und gleichzeitig auch die hohe Mortalität durch eine GvHD oder durch schwere Infektionen zu verringern (Caligiuri et al. 2004)

Allerdings zeigten Therapieversuche mit stimulierten NK-Zellen bei akuten lymphatischen Leukämien im Gegensatz zu myeloischen Leukämien bisher nicht den erwarteten klinischen Erfolg (Aversa et al. 1998; Farag et al. 2002; Amrolia et al. 2003; Miller et al. 2005; Siegler et al. 2005). Das größte Problem scheint dabei zu sein, dass ALL-Blasten aufgrund ihrer hohen Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen einem Angriff durch NK-Zellen entgehen (Ruggeri et al. 1999; Farag et al. 2002). So konnte gezeigt werden, dass ein sogenanntes HLA-mismatch im Sinne einer Inkompatibilität zwischen KIR-Rezeptoren und -Liganden auf den Spender- und Empfängerzellen die Zytotoxizität allogener NK-Zellen gegenüber den Zielzellen fördert und die Überlebensrate nach haploidenter Stammzelltransplantation verbessert (Davies et al. 2002; Ruggeri et al. 2002; Giebel et al. 2003; Leung et al. 2004; Leung et al. 2005; Schattenberg et al. 2005). Auch eine Blockade von inhibitorischen NK-Zellrezeptoren konnte die Antitumoraktivität von NK-Zellen gegenüber malignen Zelllinien *in vitro* und im Mausmodell steigern (Koh et al. 2001) Die Resistenz gegenüber durch NK-Zellen ausgelöster, alloreaktiver Lyse kann des Weiteren durch den Einsatz spezifischer monoklonaler Antikörper zur Induktion einer ADCC-abhängigen Tumorzelllyse umgangen werden (Lang et al. 2004).

1.3 Monoklonale Antikörper

Antikörper sind zu den Gammaglobulinen gehörende Glykoproteine und bilden einen Hauptbestandteil des spezifischen Immunsystems. Sie werden nach einem Antigenkontakt des Organismus von B-Lymphozyten, beziehungsweise

Plasmazellen gebildet und vermitteln spezifisch Zytotoxizität gegenüber dem jeweiligen Antigen.

Definition und Herstellung

Als monoklonale Antikörper werden Antikörper bezeichnet, die von einem aus einer einzigen Plasmazelle hervorgegangenen Zellklon produziert werden. Monoklonale Antikörper sind demnach gegen ein einziges, bestimmtes Epitop gerichtet. Jerne, Milstein und Köhler erhielten 1984 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin für die Entdeckung der Prinzipien zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern (Alkan 2004). Die Technik zur Produktion von monoklonalen Antikörpern beruht prinzipiell auf der Verschmelzung von Antikörper-produzierenden Plasmazellen mit Zellen einer Myelomzelllinie. Dabei entstehen hybride Zellen, die zum einen Antikörper einer bestimmten Spezifität produzieren können und zum anderen die Eigenschaft von entarteten Myelomzellen besitzen, dies unbegrenzt zu tun. Durch die Möglichkeit Antikörper einer bestimmten Spezifität in entsprechend hoher Anzahl herstellen zu können sind monoklonale Antikörper für den klinischen Gebrauch verfügbar geworden. Inzwischen finden sie hauptsächlich Anwendung in der Therapie von Malignomen und von entzündlichen, beziehungsweise autoimmunogen bedingten Erkrankungen.

Wirkmechanismen

Monoklonale Antikörper vermitteln Antitumoreffekte entweder direkt oder über Immuneffektor-Mechanismen wie die Antikörper-, beziehungsweise die Komplement-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (Wurflein et al. 1998; Schaedel et al. 2006). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine positive Korrelation zwischen der Fähigkeit eines monoklonalen Antikörpers, ADCC in vitro zu vermitteln und seiner therapeutischen Effektivität in vivo besteht (Dyer et al. 1989). Die ADCC stellt somit einen wichtigen Mechanismus in der Vermittlung von Antitumoreffekten über monoklonale Antikörper dar (Bowles et al. 2006). Antikörper können aber auch direkt auf die Wachstumsregulation der Zelle wirken. Sie besitzen zum Teil die Fähigkeit, Wachstumsfaktoren zu

blockieren, Proliferationssignale zu inhibieren oder Apoptose zu induzieren (Durandy et al. 1992; Ghetie et al. 1994).

Darüber hinaus können monoklonale Antikörper an Radioisotope, bakterielle Toxine, inflammatorische Zytokine oder Chemotherapeutika gekoppelt werden und so synergistische Effekte in Verbindung mit anderen therapeutischen Ansätzen erzeugen (Kufer et al. 2004).

Klinischer Einsatz

Klinische Erfolge in der Behandlung von malignen hämatologischen Erkrankungen mit monoklonalen Antikörpern konnten bisher hauptsächlich mit dem chimären CD20 Antikörper „Rituximab“ in der Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen erreicht werden (Horowitz et al. 1990). Pädiatrische ALL-Blasten exprimieren hingegen nur zu einem geringen Prozentsatz CD20 auf ihrer Oberfläche, folglich kann „Rituximab“ nur bei wenigen dieser Patienten erfolgreich eingesetzt werden (Corbacioglu et al. 2003; Pfeiffer et al. 2005). Im Gegensatz dazu exprimieren fast alle Leukämien der B-Zelllinie CD19. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein chimärer CD19 Antikörper in der Therapie der ALL im Stadium einer Minimalen Resterkrankung nach Stammzelltransplantation effizient Antitumoreffekte vermitteln kann (Lang et al. 2004).

Allerdings sind konventionelle monoklonale Antikörper aus verschiedenen Gründen in ihrem erfolgreichen klinischen Einsatz limitiert. Ein Hauptproblem stellen Interaktionen der konstanten Region des Antikörpers, dem sogenannten Fc-Teil, dar. Klassische Antikörper vom IgG-Typ bestehen aus zwei identischen variablen Fab-Fragmenten, den Antigenbindungsstellen, und einem konstanten Fc-Teil. Dieser Fc-Teil ermöglicht zum einen die Rekrutierung von Immuneffektorzellen die Fc-Rezeptoren besitzen, aber auch die Aktivierung von Komplement und verbessert somit das zytotoxische Potential des Antikörpers (Kufer et al. 2004; Fischer et al. 2006). Zum anderen führt der Fc-Teil aber zu unspezifischen Bindungen des Antikörpers mit gesunden Zellen des Organismus und damit zu einer hohen in-vivo Toxizität (Kufer et al. 2004). Des Weiteren kann durch Bindung an inhibitorische Fc-Domänen auf zum Beispiel

Granulozyten, Monozyten und Makrophagen das zytotoxische Potential des monoklonalen Antikörpers abgeschwächt werden (Clynes et al. 2000; Peipp et al. 2002).

Bispezifische monoklonale Antikörper

Bispezifische monoklonale Antikörper besitzen prinzipiell zwei Antigen-Bindungsstellen unterschiedlicher Spezifität. Zum einen können sie damit beispielsweise an tumorassoziierte Antigene binden, zum anderen an bestimmte Oberflächenmoleküle auf zytotoxischen Immunzellen. So können bispezifische monoklonale Antikörper effektiv zytotoxische Zellen zur Tumorzelllyse rekrutieren und ADCC auslösen. Neuere bispezifische monoklonale Antikörper besitzen darüber hinaus keine Fc-Domäne und lösen somit eine geringere systemische Toxizität durch unspezifische Bindungen aus als klassische monoklonale Antikörper (Kufer et al. 2004; Bruenke et al. 2005).

Die Induktion einer ADCC setzt allerdings voraus, dass der bispezifische Antikörper an sogenannte zytotoxische Triggermoleküle auf den Effektorzellen bindet. Erste Versuche hierzu wurden mit bispezifischen Antikörpern unternommen die zum einen gegen bestimmte Tumorantigene und zum anderen gegen das T-Zellrezeptormolekül CD3 gerichtet waren (Perez et al. 1985; Staerz et al. 1985). So konnte eine gegen bestimmte Tumorzellen gerichtete polyklonale T-Zellantwort ausgelöst werden und damit Zytotoxizität vermittelt werden. Auf NK-Zellen stellt das FcγRIII-Rezeptormolekül CD16 ein zytotoxisches Triggermolekül dar. In mehreren Studien konnte bereits ein erfolgreicher Einsatz von bispezifischen CD16 Antikörpern gegenüber verschiedenen tumorassoziierten Antigenen gezeigt werden (Hombach et al. 1993; Hartmann et al. 1997; Lefterova et al. 2000; Hartmann et al. 2001; Kipriyanov et al. 2002; Bruenke et al. 2004; Schlenzka et al. 2004; Bruenke et al. 2005).

Monoklonale Antikörper stellen insgesamt einen vielversprechenden Therapieansatz in der Behandlungen von Lymphomen und Leukämien dar. Sie besitzen im Vergleich zu Zytostatika den großen Vorteil, spezifisch für

bestimmte Oberflächeneigenschaften der Tumorzellen zu sein. Außerdem zeichnen sie sich durch eine hohe Bindungsaffinität gegenüber den entsprechenden Zielantigenen aus und weisen in ihrem klinischen Gebrauch ein vergleichsweise niedriges Nebenwirkungsprofil auf (Alkan 2004). Im Allgemeinen hängt der klinische Erfolg des Einsatzes eines monoklonalen Antikörpers von folgenden Faktoren ab (Hainsworth 2000; Kufer et al. 2004):

- Der Antikörper sollte mit einem für den jeweiligen Tumorzellklon spezifischen Antigen reagieren, das sich in homogener und hoher Expressionsdichte auf den Tumorzellen befindet und das nicht oder kaum frei im Plasma zirkuliert.
- Der Antikörper sollte eine irreversible Bindung mit dem entsprechenden Antigen eingehen und nicht von zirkulierenden Tumorzellen neutralisiert werden können.
- Die Bindung des monoklonalen Antikörpers an die Tumorzelle sollte Zelltod induzieren oder zumindest antiproliferative Signale übermitteln.
- Der Antikörper sollten die Fähigkeit zur Invasion in das Tumorgewebe besitzen.
- Die Produktion des entsprechenden Antikörpers sollte für klinische Zwecke in großen Mengen möglich sein.
- Rekrutierte Immuneffektorzellen sollten eine hohe biologische Aktivität aufweisen und sich in hoher Anzahl in der Peripherie und im Tumorgewebe befinden.

1.3.1 Lym-2

Der in dieser Arbeit verwendete bispezifische Lym-2 x CD16 Antikörper bindet einerseits an das Lym-2 Antigen, einer Variante des HLA-Klasse-II-Komplexes, das sich auf der Oberfläche von B-Lymphozyten befindet. Andererseits bindet Lym-2 x CD16 über seinen CD16-Teil an den FcγRIII-Rezeptor auf NK-Zellen und kann so ADCC vermitteln.

Wie bereits dargestellt sollten monoklonale Antikörper idealerweise gegen Antigene gerichtet sein, die ausschließlich oder hauptsächlich auf dem jeweiligen malignen Zellklon exprimiert werden und sich allenfalls in geringer Anzahl auf gesunden Zellen beziehungsweise ungebunden im Plasma befinden. Für das Lym-2 Antigen wurde eine starke Expression auf malignen B-Zellen, im Gegensatz zu einer schwachen Expression auf gesunden B-Zellen beschrieben (Wurflein et al. 1998). Des Weiteren wies Lym-2 eine relativ große Antikörper-Bindungskapazität pro Tumorzelle auf, was auf eine hohe Expressionsdichte des Antigens auf den malignen Zellen hinweist (Epstein et al. 1987). In dieser Hinsicht stellt das Lym-2 Epitop einen vielversprechenden Angriffspunkt in der Therapie von B-Zellmalignomen mit monoklonalen Antikörpern dar.

1.4 Fragestellung

Um die Effizienz einer NK-Zell vermittelten Graft-versus-Leukemia Reaktion gegenüber pädiatrischen ALL-Blasten zu erhöhen, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob ein bispezifischer, monoklonaler Lym-2 x CD16 Antikörper in Verbindung mit gesunden Spender-NK-Zellen effizient ADCC vermitteln kann. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die durch Lym-2 x CD16 vermittelte Spezifische Lyse von leukämischen Blasten einen Vorteil gegenüber der über einen bispezifischen CD16 x CD19 Antikörper vermittelten Lyse bringt.

Dazu wurde in einem ersten Schritt mittels quantitativer Durchflusszytometrie die Expressionsdichte des Lym-2 Antigens auf pädiatrischen leukämischen Blasten mit der auf gesunden pädiatrischen B-Zellen verglichen. Danach sollte die zytotoxische Aktivität angereicherter NK-Zellen von gesunden, freiwilligen Spendern gegenüber kryokonservierten pädiatrischen ALL-Blasten, welche zuvor mit Lym-2 x CD16, beziehungsweise CD16 x CD19 inkubiert wurden, bestimmt werden.

2 Material

2.1 Allgemeine Materialien

<i>Geräte, Glas und Plastik</i>	<i>Firma</i>
Sterile Werkbank Hera safe	Heräus
Brutschrank Hera cell	Heräus
Zentrifugen: Rotixa 50 RS Rotanta 46 RSC	Hettich
Beheizbares Wasserbad	Köttermann
Ultraschallentgaser Sonorex, Super RK 106	Bandelin
Vortexer VF2	Janke & Kunkel
Schüttler, Titramax 100	Heidolph
Pipettiergerät Pipettboy	Tecnomara
Sterile Plastikpipetten: 5, 10, 25ml	Costar
Verstellbare Pipetten (Pipetman)	Gilson
Pipettenspitzen	Gilson
Reaktionsgefäße: 1,5ml	Eppendorf
Falcon-Röhrchen: 15ml, 50ml	Greiner
FACS-Analyseröhrchen, 5ml, Rundboden	Becton Dickinson
Mikrotiterplatte, U- und F-Form	Greiner
Handschuhe	Safeskin
Spritzen: 20ml, 50ml	Braun
Butterfly 21	Abbott
Kanülen, 22G	Braun

<i>Stammlösungen</i>	<i>Firma</i>
Medium: - 500ml RPMI 1640 - 50ml Fetales Kälberserum (FCS) - 5ml L-Glutamin (200mM) - 12,5ml Hepes-Buffer 1M - 5ml Penicillin(10000U) / Streptomycin (10mg/ml)	Biochrom PAA Laboratories Biochrom Biochrom Biochrom
Phosphat buffered saline (PBS)	Gibco
MACS-Puffer: - 500ml Phosphat buffered saline (PBS) - 10,6ml EDTA (250mM) - 10ml Humanalbumin 20%	Gibco Universitätsapotheke DRK Baden-Württemberg
FACS-Puffer: - 500ml Phosphat buffered saline (PBS) - 1,66ml Bovine serum albumin (BSA), 30% - 5ml Natriumazid, 10%	Gibco Sigma Sigma
Lyse-Puffer	Wallac

2.2 Material für die Zellzählung

<i>Material</i>	<i>Firma</i>
Cellcounter Advia 120	Bayer
Neubauer Zählkammer	Brandt
Deckglas	Menzel
Trypanblau (0,4%)	Sigma
Lichtmikroskop	Zeiss

2.3 Material für die Durchflusszytometrie

<i>Allgemeines Material</i>	<i>Firma</i>
FACSCalibur	Becton Dickinson
Hardware	Apple
Auswertungsprogramm CellQuest	Becton Dickinson
Auswertungsprogramm Excel	Microsoft
Quifikit: - Set-Up-Beads - Calibration-Beads - FITC-markierter Ziege-anti-Maus-Ak (Sekundär-Ak)	Dako
Propidiumjodid	Universitätsapotheke
Mouse Serum	Becton Dickinson
FACS Lysing Solution	Becton Dickinson

<i>Antikörper</i>	<i>Firma</i>
Mouse IgG1 Pure	Becton Dickinson
Mouse IgG2a Pure	Becton Dickinson
Mouse IgG1 APC	Becton Dickinson
Anti-HLA ABC-Antikörper (Clone W6/32, SubtypIgG2a)	Dako
Lym-2	Prof. Dr. G. Fey, Universität Erlangen
CD19 Pure	Becton Dickinson
CD19 APC	Becton Dickinson

2.4 Material für die Isolierung peripherer mononukleärer Zellen

<i>Material</i>	<i>Firma</i>
Peripheres Vollblut	Freiwillige Spender
Heparin, Liquemin	Roche
Ficoll	Seromed

2.5 Material für die Anreicherung von NK-Zellen

<i>Material</i>	<i>Firma</i>
Vario MACS (Magnet)	Miltenyi Biotec
Separationssäule LS	Miltenyi Biotec
Polyglobin 5%	Bayer
CD56 Microbeads	Miltenyi Biotec
Rekombinantes Interleukin-2	Universitätsapotheke

2.6 Material für den Zytotoxizitätstest

<i>Material</i>	<i>Firma</i>
Victor 1420 Multilabel Counter	Wallac
Hardware	Compaq
Software Wallac 1420 Workstation	Wallac
BATDA-Ligand	Wallac
Europium-Lösung	Wallac
Lyse-Puffer	Wallac
Lym-2 x CD16	Prof. Dr. G. Fey, Universität Erlangen
CD16 x CD19	Prof. Dr. G. Fey, Universität Erlangen
CD19	Prof. Dr. G. Fey, Universität Erlangen

3 Methoden

3.1 Studienaufbau

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob sich die Zytotoxizität von gesunden Spender-NK-Zellen gegenüber kryokonservierten pädiatrischen ALL-Blasten verschiedener Patienten mithilfe des Lym-2 x CD16 Antikörpers im Vergleich zu einem CD16 x CD19 Antikörper verbessern lässt.

Um zu testen, inwieweit die Lym-2 Expression spezifisch für maligne B-Zellen ist, wurde die Expressionsdichte des Lym-2 Antigens auf pädiatrischen B-ALL-Blasten mit der auf gesunden B-Zellen einer pädiatrischen Vergleichsgruppe durchflusszytometrisch verglichen. Des Weiteren wurden für dieselben Zelltypen die Expressionsdichten der Oberflächenantigene CD19 und W6/32 bestimmt.

In einem nächsten Schritt wurden die natürliche und die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität von NK-Zellen, angereichert aus Vollblut gesunder Spender, gegenüber leukämischen Blasten untersucht. Zur Vermittlung von ADCC wurden die Blasten mit folgenden monoklonalen Antikörpern inkubiert: Lym-2 x CD16, CD16 x CD19 und CD19. Die Zytotoxizität wurde mit der BATDA-release assay-Methode bestimmt.

Ein statistischer Vergleich der in den einzelnen Testansätzen ermittelten Expressionsdichten und spezifischen Lyseraten wurde mit der Durchführung von „Student`s t-Tests“ objektiviert.

3.2 Quantitative Durchflusszytometrie

3.2.1 Methodischer Hintergrund

Mit der quantitativen Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) kann eine Aussage über die Expressionsdichte eines bestimmten Antigens pro Zelle gemacht werden.

Das Prinzip der FACS (Fluorescence activated cell sorting)-Analyse beruht auf dem differentiellen Sortieren von Zellen je nach Stärke eines von der Zelle emittierten Lichtsignals. Das Lichtsignal kommt durch einen mit einem Fluorophor konjugierten Antikörper zustande, so dass Zellen, die das dem jeweiligen Antikörper entsprechende Antigen tragen, selektiv markiert werden. Die Fluoreszenz wird während des Durchflusses der Zellen durch eine Kapillare von einem Laser angeregt. Dazu wird die Zellsuspension vom Messgerät mit Überdruck in die Kapillare angesaugt. Dabei entsteht eine starke Beschleunigung der Zellen, was dazu führt, dass die Zellen einzeln durch den Laserstrahl geführt werden. Je nach der Menge an gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern wird Licht in einer bestimmten Intensität emittiert, die gemessen werden kann. Zudem werden Streuungseffekte der Zellen gemessen, wobei zwei Parameter von entscheidender Bedeutung sind: Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) wird durch die Beugung des Lichtes hervorgerufen und hängt von der Größe der passierenden Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) wird durch Brechung des Lichts an subzellulären Strukturen hervorgerufen und ist somit ein Maß für die Granularität und damit die Morphologie der Zelle. Trägt man die beiden Werte gegeneinander auf, ergibt sich für die untersuchte Zellpopulation ein charakteristisches Verteilungsmuster (scatter plot), das die Verteilung der Zellen in der Population hinsichtlich der beiden Parameter widerspiegelt.

Zur Immunphänotypisierung mittels FACS-Analyse werden Zellen mit monoklonalen Antikörpern markiert, an die fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt sind. Die Fluoreszenzintensität entspricht dabei der Anzahl der gebundenen Antikörpern pro Zelle, und ist somit ein Maß für das Expressionsniveau des jeweiligen Antigens. Um die Fluoreszenz der Zellen auch wirklich auf den gebundenen Antikörper zurückführen zu können, müssen immer auch Negativkontrollen gemessen werden, da die meisten Zellen ein gewisses Maß an Autofluoreszenz zeigen.

Mit der quantitativen FACS-Analyse können also Zellpopulationen hinsichtlich der Expressionsdichte verschiedener Antigene miteinander verglichen werden. Um mehrere, aufeinander folgende Messungen vergleichen zu können, müssen

die zu untersuchenden Zellen zuvor jedoch gegen Zellpopulationen gemessen werden, deren Antigen-Dichte bekannt ist. Anhand der daraus ermittelten Kalibrationswerte kann die Einstellung der Verstärkungen des FACS-Gerätes erfolgen. Hierzu wurde in dieser Arbeit das Qifikit von Dako verwendet. Es enthält zum einen mit einer definierten Menge eines Maus-Antikörpers markierte Beads (Set-Up- und Calibration-Beads), zum anderen einen FITC (Fluorescein-isothiocyanat)-markierten Ziege-anti-Maus-Antikörper, der als Sekundärantikörper eingesetzt wird. Die Set-Up-Beads enthalten einen unmarkierten Anteil und einen mit einer hohen Anzahl an Maus-Antikörper markierten Anteil. Sie dienen der Verstärkereinstellung des FITC-Kanals. Dabei wird der FITC-Kanal so eingestellt, dass die unmarkierte Population zwischen 10^0 und 10^1 Antigenen pro Zelle liegt, und die hochmarkierte Population noch deutlich dargestellt wird (siehe Abbildung 2a und b). Die Einstellung dieser Verstärkung im FITC-Kanal darf nun während der gesamten Messung nicht mehr verändert werden. Die Calibration-Beads bestehen aus 5 verschiedenen Gruppen, die mit jeweils bekannter, chargenspezifischer Antikörperdichte markiert sind (siehe Abbildung 3a und b) und dienen zur Erstellung einer Eichgeraden, anhand derer aus der gemessenen Lichtemission die Antigendichte auf Zellen ermittelt werden kann. Die Zellen, deren Antigendichte bestimmt werden soll, werden zunächst mit einem gegen dieses Antigen gerichteten unmarkierten Maus-Antikörper inkubiert und danach mit demselben Sekundärantikörper, mit dem auch die Beads markiert und gemessen werden.

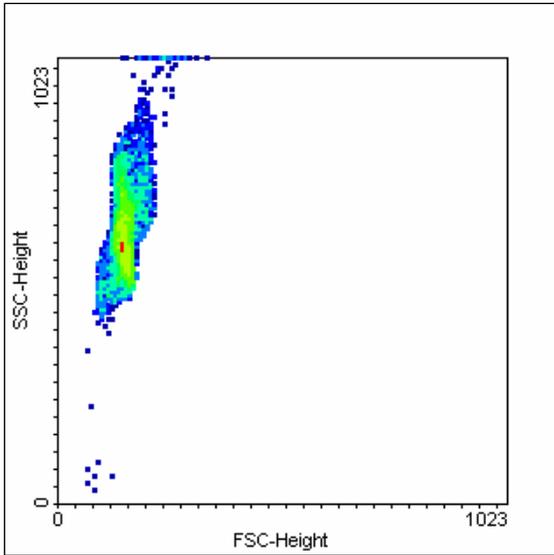


Abbildung 2a
Set-Up-Beads im Density Plot

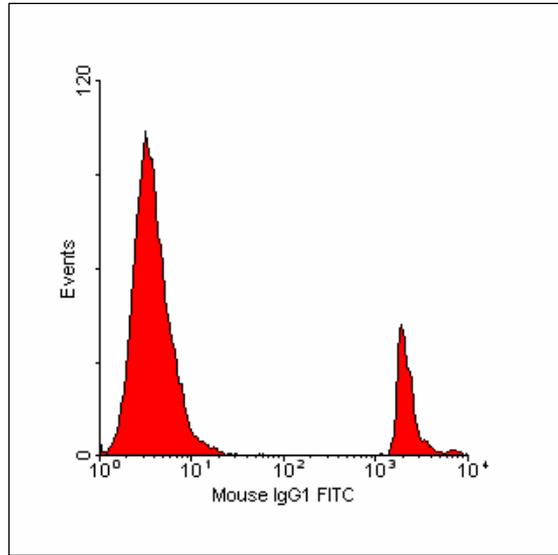


Abbildung 2b
Set-Up-Beads im Histogramm

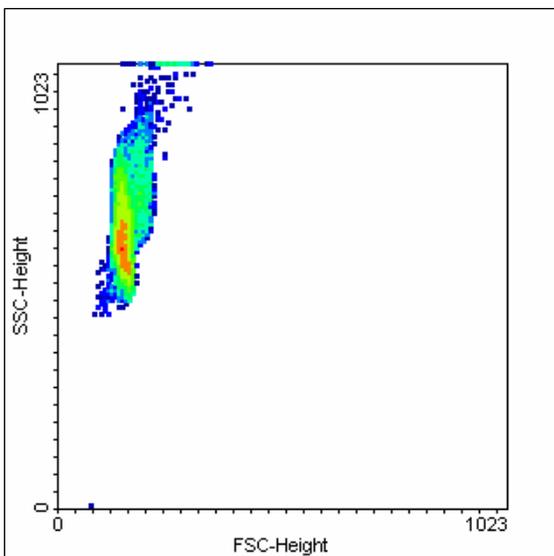


Abbildung 3a
Calibration-Beads im Density Plot

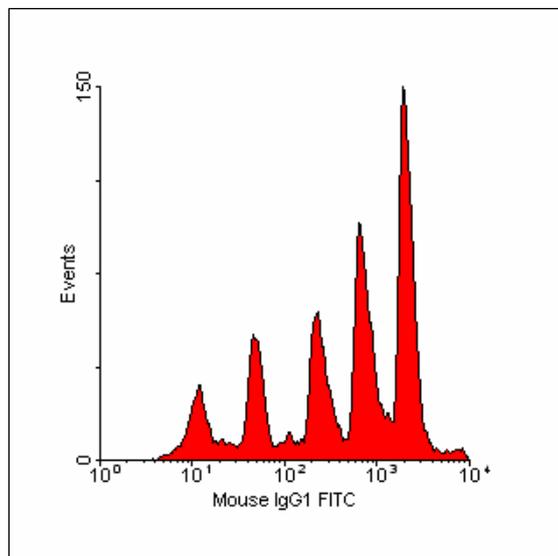


Abbildung 3b
Calibration-Beads im Histogramm

3.2.2 Proben

Zur quantitativen Analyse der Lym-2, W6/32 und CD19 Expression wurden kryokonservierte Blasten von in der Kinderklinik Tübingen diagnostizierten pädiatrischen Patienten mit akuten Leukämien verwendet. Als Vergleichsprobe diente Vollblut, beziehungsweise nach Lyse der Erythrozyten mittels CD19 APC (Allophycocyanin) markierte B-Zellen einer gesunden pädiatrischen Vergleichsgruppe aus dem hämatologischen Routinelabor der Kinderklinik Tübingen.

Von den 24 Patienten war bei 21 eine common-ALL diagnostiziert, sowie bei jeweils einem Patienten eine AML-M4, AML-M5, beziehungsweise prä-T-ALL. Die Oberflächeneigenschaften dieser Blasten wurden aus Knochenmarkaspiraten mittels Immunphänotypisierung bei Erstdiagnose charakterisiert. Dabei waren die Blasten der 21 Patienten mit einer common-ALL für CD10 und CD19 positiv. Die Blasten von 13 dieser Patienten waren zudem für CD22 positiv und die Blasten von vier weiteren Patienten waren für CD20 positiv. Die Blasten von 18 der Patienten exprimierten TdT (Terminale Deoxynucleotidyl Transferase).

Nicht für alle Proben wurden die Expressionsdichten aller Antikörper bestimmt. Die Lym-2 Expressionsdichte wurde auf 23 der Blasten (n=23) und auf 38 der gesunden B-Zellen (n=38) durchflusszytometrisch bestimmt und verglichen. Analog zu Lym-2 wurden die Expressionsdichten von CD19 auf 14 der Blasten (n=14) und auf 27 der gesunden B-Zellen (n=27) bestimmt. Die W6/32 Bestimmung erfolgte auf acht der Blasten (n=8), beziehungsweise auf neun der gesunden B-Zellen (n=9).

3.2.3 Durchführung

Markierung der Blasten

- Die Blasten werden 3x in Medium gewaschen (Zentrifugation jeweils 10 min bei 400g, 10°C), danach wird die Zellzahl in der Neubauer Zählkammer bestimmt und auf 1 Million Zellen pro ml Medium eingestellt.

- Für die fünf verschiedenen Ansätze werden die folgenden unmarkierten Antikörper verwendet :
 - 5µl Mouse IgG1 Pure
 - 5µl Mouse IgG2a Pure
 - 10µl HLA-ABC-Ag Clone W6/32
 - 5µl Lym-2
 - 10µl CD19 Pure

- Dazu werden jeweils 100µl Zellsuspension (Blasten) hinzugegeben und gemischt (Vortexer).
- Die Proben werden nun 30 min bei 4 °C unter Lichtabschluss inkubiert.
- In 2 weitere Probenröhrchen werden jeweils 100µl der Set-Up-Beads und Calibration-Beads pipettiert.
- Alle Röhrchen werden mit FACS-Puffer auf 5 ml aufgefüllt und bei 400g, 10 min lang bei 10 °C zentrifugiert.
- Es werden je 100µl des zuvor im Verhältnis 1:50 mit FACS-Puffer verdünnten Sekundärantikörpers in jedes Röhrchen gegeben und 30 min bei 4 °C inkubiert.
- Alle Röhrchen werden mit FACS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (400g, 10 min, 10 °C).

Die Proben werden resuspendiert. Zu den Blasten werden vor der Messung jeweils 5µl Propidiumjodid (zum Anfärben toter Zellen) dazugegeben.

Markierung der B-Zellen

- In 5 Probenröhrchen wird jeweils ein unmarkierter monoklonaler Antikörper (Primärantikörper) wie folgt pipettiert:
 - 5µl Mouse IgG1 APC
 - 10µl HLA-ABC-Ag Clone W6/32

- 5µl Lym-2
- 10µl CD19 Pure

- Dazu werden jeweils 100µl Vollblut gegeben und gemischt (Vortexer).
- Die Proben werden nun 15 min bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert.
- Die Probenröhrchen werden mit Lysepuffer zur Lyse der Erythrozyten aufgefüllt und weitere 15 min bei 4 °C inkubiert.
- Es werden in 2 weitere Probenröhrchen jeweils 100µl der Set-Up-Beads und Calibration-Beads pipettiert.
- Alle Röhrchen werden mit FACS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (400g, 10 min, 10 °C).
- Es werden je 100µl des zuvor im Verhältnis 1:50 mit FACS-Puffer verdünnten Sekundärantikörpers in jedes Röhrchen gegeben und 30 min im Kühlschrank inkubiert.
- Die Röhrchen werden zweimal bei 400g, 10 min lang, bei 10 °C mit FACS-Puffer zentrifugiert und danach 15 min mit je 10µl Mouse Serum zum Absättigen nicht besetzter Bindungen inkubiert.
- Nun werden die Proben 30 min mit je 5µl CD19 APC inkubiert und danach mit FACS-Puffer zentrifugiert (400g, 10 min, 10 °C).
- Die Proben werden resuspendiert und im Durchflusszytometer gemessen.

Messung

Im Durchflusszytometer werden zuerst die Set-Up-Beads gemessen und damit die Verstärkung des FITC-Kanals eingestellt (siehe oben). Danach werden die Calibration-Beads und die Blasten, beziehungsweise die gesunden B-Zellen gemessen. Die Abbildungen 2 und 3 zeigen beispielhaft Set-Up- und Calibration-Beads im „Density Plot“ (Abbildungen 2a und 3a) und im „Histogramm“ (Abbildungen 2b und 3b). Die Abbildungen 4a, b und c zeigen für eine ausgewählte, repräsentative Probe die Darstellung der Lym-2 Expressionsdichte auf gesunden B-Zellen im „Histogramm“ (4c) nach Markierung, beziehungsweise selektiver Darstellung CD19-positiver B-Zellen im „Density Plot“ (4a und b).

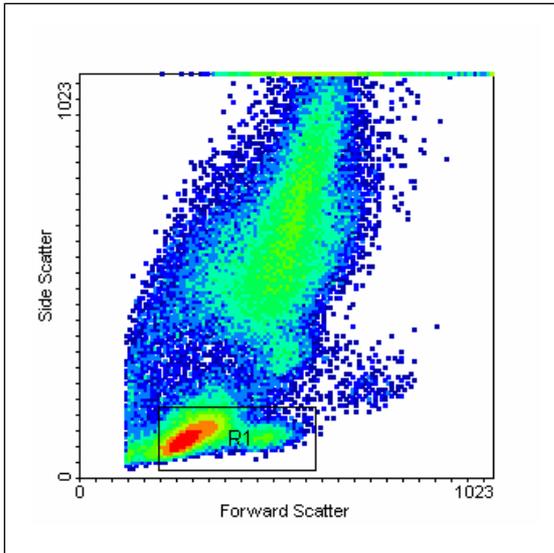


Abbildung 4a
 Vollblut nach Lyse der Erythrozyten
 im Density Plot,
 R1 = Lymphozyten

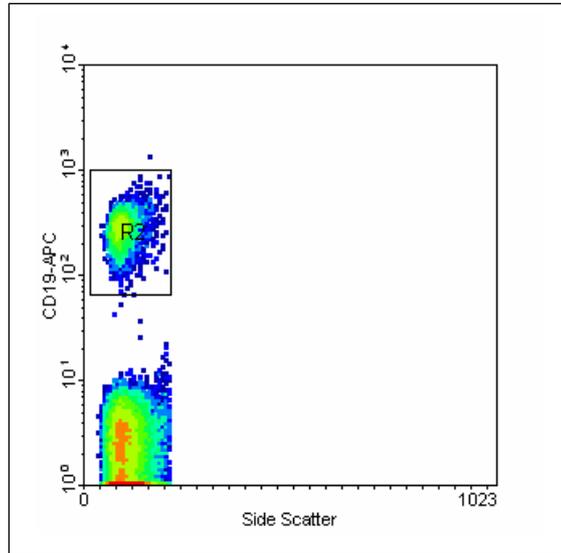


Abbildung 4b
 Lymphozyten (R1), getrennt nach
 CD19 Expression im Density Plot,
 R2 = B-Zellen

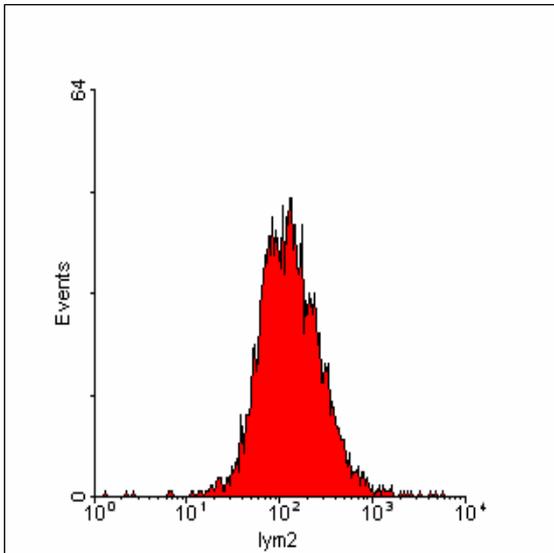


Abbildung 4c
 Lym-2 Expressionsdichte auf CD19-
 positiven B-Zellen (R2) im Histogramm

3.2.4 Auswertung

Zunächst werden die Set-Up-Beads und die 5 verschiedenen Populationen der Calibration-Beads im Histogramm dargestellt (siehe Abbildungen 2b und 3b), einzeln markiert und somit das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität in der Histogramm-Statistik dargestellt. Die Messergebnisse der einzelnen zu messenden Zellsuspensionen werden ebenfalls im Histogramm dargestellt. Das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität kann auch hier der jeweiligen Histogramm-Statistik entnommen werden.

Zur Auswertung werden nun die geometrischen Mittel der Set-Up- und Calibration-Beads gegen die chargenspezifische Antigen-Dichte der jeweiligen Beads in einem Punktediagramm gegeneinander aufgetragen. In die Gleichung der sich aus den Punkten ergebenden Geraden werden dann die Messergebnisse der zu untersuchenden Zellen eingesetzt und somit die Antigendichte (ABC, Antibody-Binding Capacity) berechnet. Die Anzahl der Moleküle auf der entsprechenden Negativkontrolle (BAE, Background Antibody Equivalent) muss allerdings von der Antigenanzahl der Probe abgezogen werden, um die spezifische Antikörperbindung der jeweiligen Population (SABC, Specific Antibody-Binding Capacity) zu erhalten (siehe Formel 3.1).

$$\text{SABC} = \text{ABC} - \text{BAE}$$

Formel 3.1

Um die Signifikanz von Expressionsunterschieden zu testen, werden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Expressionsintensitäten für die einzelnen Antikörper bestimmt und in einer statistischen Analyse „Student’s t-Tests“ durchgeführt. Dazu wurde das Statistik-Computerprogramm „Prism“ verwendet.

3.3 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen

3.3.1 Methodischer Hintergrund

Aus Vollblut können durch Dichtegradientenzentrifugation periphere mononukleäre Zellen (pMNC) isoliert werden. Die Dichtegradientenzentrifugation ist ein physikalisches Trennverfahren, mit dem Partikel (z.B. Makromoleküle, Zellbestandteile oder wie hier ganze Zellen) anhand ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit unter dem Einfluss starker Zentrifugalkräfte aufgetrennt werden können.

In den vorliegenden Experimenten wurde ein Gradient aus Ficoll-Hypaque verwendet, ein synthetisches Polymer aus Saccharose. Die pMNC lagern sich hierbei aufgrund ihrer geringeren Dichte über der Ficoll-Hypaque-Schicht ab, wohingegen sich Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte darunter ansammeln. Die oberste Schicht über dem pMNC-Ring enthält dann das Plasma und die Thrombozyten.

3.3.2 Proben

Es wurde je 60ml Vollblut von fünf gesunden, freiwilligen Spendern verwendet.

3.3.3 Durchführung

- Heparinisiertes Vollblut (hier jeweils 60ml) und PBS (Phosphat buffered saline) werden im Verhältnis 1:1 gemischt und auf halb so viel Ficoll aufgeschichtet: In vier 50ml-Falconröhrchen werden also je 30ml von dem Blut/PBS-Gemisch auf 15ml Ficoll vorsichtig aufgetragen.
- Die Falconröhrchen werden sofort 30 min lang bei Raumtemperatur mit 400g, Anlaufzeit: 100s, Bremse: 0 zentrifugiert.
- Der entstandene pMNC-Ring wird dann mit einer sterilen Pipette aufgezogen, in ein neues Falconröhrchen gegeben, welches mit PBS aufgefüllt und danach 10 min lang bei 300g zentrifugiert wird.

- Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in PBS resuspendiert und bei 400g, 10 min lang, bei 10°C zentrifugiert. Dieser Schritt wird insgesamt zweimal durchgeführt.
- Die Zellzahl wird mit 300µl der Suspension im Eppendorf-Gefäß mit dem Cellcounter Advia bestimmt, und danach auf 100 Millionen Zellen pro ml Puffer (PBS) eingestellt.

3.4 Anreicherung von NK-Zellen

3.4.1 Methodischer Hintergrund

Das Prinzip des magnet-activated cell-sorting (MACS) beruht darauf, dass in einer Zellpopulation bestimmte Zellen selektiv magnetisiert und aufgrund dieser Magnetisierung von den restlichen Zellen abgetrennt werden können. Die anzureichernden Zellen werden hierfür mit monoklonalen Antikörpern gegen das für die jeweilige Zellpopulation charakteristische Oberflächenantigen markiert. Diese Antikörper sind mit magnetischen Metallpartikeln aus Eisenoxid (microbeads) konjugiert. Lässt man die Zellsuspension über eine Trennsäule laufen, die mit einer paramagnetischen Eisenmatrix gefüllt ist und sich zudem in einem starken Magnetfeld befindet, so werden die magnetisch markierten Zellen angezogen und zurückgehalten. Aus dem ursprünglichen Zellgemisch wird so die markierte Zellpopulation abgetrennt und kann aus der Säule isoliert werden.

In dieser Arbeit wurden Natürliche Killer (NK)-Zellen mit Hilfe von CD56 Microbeads angereichert. CD56 ist ein Adhäsionsmolekül (NCAM, neural cell adhesion molecule), das nahezu ausschließlich auf NK-Zellen exprimiert wird.

3.4.2 Proben

Die verwendeten NK-Zellen wurden aus den zuvor mittels Dichtegradientenzentrifugation (aus je 60ml Vollblut von fünf freiwilligen, gesunden Spendern) isolierten pMNCs angereichert.

3.4.3 Durchführung

- Die zuvor auf 100 Millionen Zellen pro ml Puffer (PBS) eingestellte Zellsuspension (pMNCs) wird für 10 min mit 50µl/ml Polyglobulin auf Eis inkubiert. Dies dient dem Absättigen unspezifischer Bindungsstellen.
- Danach folgt die Inkubation mit CD56 Microbeads für 30 min in Eis auf einem Schüttler, wobei die Beads in einer Konzentration von 200µl/ml Zellsuspension vorliegen, das heißt 20µl Beads pro 10^7 Zellen.
- Danach wird die markierte Zellsuspension mit zuvor entgastem MACS-Puffer bei 300g 10 min lang gewaschen. Das Zellpellet wird dann in 7ml entgastem Puffer resuspendiert.
- Die gekühlte Trennsäule (LS-Säule) wird im VarioMACS installiert und mit 10ml entgastem Puffer gespült.
- Die Zellsuspension wird dann durch die Säule laufen gelassen.
- Danach wird die Säule mit 5 x 2ml entgastem Puffer zum Entfernen unmarkierter Zellen gespült.
- Die Säule wird aus dem Magnet genommen, auf ein 15ml Falcon aufgesetzt, das mit 7ml Puffer aufgefüllt wird, um so mit einem Stempel die zuvor am Magnet hängengebliebenen, mit CD56 Microbeads markierten Zellen durchzudrücken.
- Diese Zellsuspension wird mit Puffer bei 300g 10 min lang gewaschen, in 5ml Medium resuspendiert und in der Neubauer Zählkammer gezählt.
- Danach werden die isolierten NK-Zellen für den am nächsten Tag folgenden Zytotoxizitätstest auf eine Million pro ml Medium eingestellt.

3.5 Test auf natürliche und Antikörper-vermittelte Zytotoxizität

3.5.1 Methodischer Hintergrund

Mit der hier angewandten Methode des BATDA-release assay kann das zytotoxische Potential von Lymphozyten gegenüber verschiedenen Zielzellen bestimmt werden (Blomberg et al. 1996). BATDA (bis(acetoxymethyl) 2,2':6',2''-terpyridine-6,6''-dicarboxylate) ist ein intrazellulärer Marker, der die hydrophobe Zellmembran passieren kann und im Zytoplasma von intrazellulären Esterasen zu TDA hydrolysiert wird. TDA kann aufgrund seiner Hydrophilie nicht mehr über die intakte Zellmembran nach aussen diffundieren. Daher kann TDA nur im Falle der Lyse der Targetzelle wieder freigesetzt werden. Hierzu werden die mit TDA markierten Zielzellen mit den Effektoren (zytotoxische T-Zellen oder hier NK-Zellen) inkubiert. Nach der Lyse, kann TDA im Überstand mit Europiumlösung (Eu³⁺), wobei ein stabiler fluoreszierender Chelatkomplex entsteht (EuTDA), im Fluorometer nachgewiesen werden.

Anhand der Fluoreszenz kann die Menge an lysierten Zellen und damit die Zytotoxizität bestimmt werden. Hierzu setzt man die gemessene Lyse in Relation zur zuvor bestimmten Maximalzahl lysierbarer Zellen, abzüglich der ohne Effektorzellen erfolgten Spontanlyse (siehe Formel 3.2). Die Maximallyse wird dabei doppelt bestimmt. Zum einen, indem man zu einem Teil der Targetzellen einen Lysepuffer hinzugibt, mit dem alle Zellen lysiert werden, zum anderen wird ein Teil der Targetzellen mittels Ultraschallwellen zertrümmert. Die Spontanlyse ergibt sich aus Targetzellen, die ohne Zugabe von Effektorzellen absterben und so den Liganden freisetzen.

Zur Berechnung der spezifischen Lyse in Prozent dient folgende Formel:

$$\text{Spezifische Lyse [\%]} = \frac{\text{Messwert} - \text{Spontanlyse}}{\text{Maximallyse} - \text{Spontanlyse}} \times 100$$

Formel 3.2

ADCC

NK-Zellen zeigen außer ihrer natürlichen Fähigkeit zur Zytotoxizität auch eine antikörperabhängige Zytotoxizität, die vor allem über deren CD16-Rezeptor (FcγRIIIa-Rezeptor) vermittelt wird. ADCC ist einer der wichtigsten Mechanismen in der über monoklonale Antikörper vermittelten Tumorzelllyse (Bowles et al. 2006).

Zur Vermittlung von ADCC *in vitro* werden die Zielzellen vor Zugabe der Effektorzellen (NK-Zellen) mit bestimmten, zu untersuchenden monoklonalen Antikörpern markiert. Zusätzlich wird zur Bestimmung der ADCC eine Kontrolle mit den jeweiligen Antikörpern und Targetzellen ohne Effektoren durchgeführt, um eine Komplement-vermittelte Lyse auszuschließen.

In dieser Arbeit wurde das über drei verschiedene Antikörper vermittelte zytotoxische Potential von NK-Zellen gegenüber pädiatrischen ALL-Blasten ermittelt. Folgende Antikörper wurden hierzu verwendet: Lym-2 x CD16, CD16 x CD19 und CD19. Die über die jeweiligen Antikörper vermittelten spezifischen Lyseraten von unstimulierten, beziehungsweise IL-2 stimulierten NK-Zellen wurden für verschiedene Effektor-Targetzell (E:T) -Verhältnisse bestimmt und miteinander verglichen.

3.5.2 Proben

Es wurden insgesamt acht Zytotoxizitätstests durchgeführt. Dafür wurden kryokonservierte Blasten von sechs Patienten mit akuten Leukämien (common-ALL: n=5, prä-T-ALL: n=1) verwendet. Zwei der Patienten mit common-ALL wurden doppelt mit NK-Zellen unterschiedlicher Spender verwendet. Isolierte NK-Zellen von fünf verschiedenen gesunden Spendern dienten als Effektoren.

3.5.3 Durchführung

Markierung der Targetzellen (Blasten)

- Die Targetzellen werden auf eine Million pro ml Medium eingestellt.

- Hinzugegeben wird das BATDA-Reagens in einer Konzentration von 4µl/ml Zellsuspension.
- Die Zellen werden für 60 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert und in Abständen von je 10 min geschüttelt.
- Die Zellsuspension wird mit 37°C warmem Medium aufgefüllt und 7 min bei 300g zentrifugiert. Dieser Schritt wird fünfmal durchgeführt.
- Danach werden die Zellen in der Neubauer Zählkammer gezählt und auf 200.000 pro ml Medium eingestellt.
- 1ml der Zellsuspension wird nochmals 5 min bei 200g und 37°C zentrifugiert, der Überstand wird dann zur Bestimmung des Backgrounds herangezogen (siehe unten).
- Die Ultraschalllyse wird ebenso mit 1ml der Zellsuspension durchgeführt.

Herstellen einer Verdünnungsreihe der Effektoren (NK-Zellen)

Die angereicherten NK-Zellen vom Vortag (siehe Kapitel 3.3 und 3.4) liegen in einer Konzentration von einer Million Zellen pro ml Medium vor. Die Hälfte der so vorliegenden Zellsuspension wurde über Nacht mit IL-2 (1000IE/ml) im Brutschrank bei 37°C inkubiert, beziehungsweise stimuliert. Mit den unstimulierten, beziehungsweise IL-2 stimulierten NK-Zellen wird nun eine 1:2 Verdünnungsreihe über 4 Stufen mit Medium hergestellt. Es ergeben sich folgende abnehmende E:T -Verhältnisse bei gleichbleibender Anzahl der Targetzellen: 20:1, 10:1, 5:1 und 2,5:1. Ist später auch in den gemessenen Lysewerten eine entsprechende Abstufung der Lysekapazität hinsichtlich des E:T -Verhältnisses erkennbar, kann von einer tatsächlich von den Effektoren abhängigen Lyse der Zielzellen ausgegangen werden.

Testansatz

Der Testansatz erfolgt in einer U-förmigen Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten. Background, Spontanlyse und Maximallyse, beziehungsweise Ultraschalllyse werden je dreifach bestimmt, alle anderen Werte vierfach.

- Es werden wie folgt pipettiert:
 - Background: 25µl Überstand und 175ml Medium
 - Spontanlyse: 25µl Targetzellen und 175ml Medium
 - Maximallyse: 25µl Targetzellen, 20µl Lysepuffer, 155ml Medium
 - Ultraschallyse: 25µl zertrümmerte Targetzellen und 175ml Medium

- Für die ADCC werden die jeweiligen Antikörper in einer Konzentration von 1µg/ml zu je 25µl Targetzellen pipettiert.
- Für die Antikörperkontrolle werden 25µl Targetzellen und die entsprechenden Antikörper pipettiert.
- Die Targetzellen werden nun mit den Antikörpern 30 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert.
- Zu den Antikörpern und Targetzellen werden die Kavitäten je nach der Menge der gelösten Antikörper mit Medium auf 100µl aufgefüllt.
- Von den Effektoren werden nun 100µl pro Kavität in entsprechender Verdünnung pipettiert.
- Die Testansatzplatten werden bei 100g, Bremse:3, 2 min lang zentrifugiert und anschließend 2h im Brutschrank inkubiert.
- Danach werden die Platten nochmals bei 200g 5 min lang zentrifugiert, da für den Nachweis von TDA nur der Überstand verwendet wird.
- Es werden jeweils 200µl Europium in Flachbodenplatten pipettiert und dazu jeweils 20µl Überstand der Testansätze gegeben und für 20 min im Dunkeln auf einem Schüttler inkubiert.
- Nun erfolgt die Messung im Multilabel-Counter.

3.5.4 Auswertung

Aus den Messwerten für den Background (Überstand), die Spontanlyse und die Maximallyse, beziehungsweise deren Mittelwerte aus der Dreifachbestimmung, kann dann die Spontanlyse in Prozent berechnet werden (siehe Formel 3.3).

$$\text{Spontanlyse [\%]} = \frac{\text{Spontanlyse} - \text{Background}}{\text{Maximallyse} - \text{Background}} \times 100$$

Formel 3.3

Um die Validität der Zytotoxizitätstests zu gewährleisten sollten nur Tests mit einer Spontanlyse kleiner 30% in die Auswertung eingehen.

Die spezifische Lyse kann dann mit Hilfe der Formel 3.2 für jeden der gemessenen Werte berechnet werden. So können die Lysekapazitäten von unstimulierten, beziehungsweise IL-2 stimulierten Effektorzellen in Abhängigkeit der mit verschiedenen Antikörpern markierten Zielzellen miteinander verglichen werden, und mittels „Student´s t-Tests“ eine Aussage über die Signifikanz der Unterschiede gemacht werden.

4 Ergebnisse

4.1 Quantitative Durchflusszytometrie

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob der bispezifische Lym-2 x CD16 Antikörper effizient Zytotoxizität gesunder Spender-NK-Zellen gegenüber kryokonservierten pädiatrischen ALL-Blasten vermitteln kann. Der Lym-2 Antikörper erkennt das Lym-2 Antigen, eine Variante des HLA-Klasse-II-Komplexes auf B-Zellen. Es wurde eine deutlich höhere Lym-2 Expression auf malignen B-Zellen als auf gesunden B-Zellen vermutet. Diese Beobachtung sollte zunächst verifiziert werden. Mit quantitativen FACS-Analysen wurde hierzu die Expressionsdichte des Lym-2 Antigens auf leukämischen Blasten pädiatrischer Patienten im Vergleich zu gesunden, pädiatrischen B-Zellen ermittelt.

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Expressionsdichte des Lym-2 Antigens wurden kryokonservierte Blasten von in der Kinderklinik Tübingen mit akuten Leukämien diagnostizierten pädiatrischen Patienten mit einem Lym-2 Antikörper (Isotyp IgG1) inkubiert. Als Vergleichsprobe diente Vollblut, beziehungsweise nach Lyse der Erythrozyten mit CD19 APC (Allophycocyanin) markierte B-Zellen einer gesunden pädiatrischen Vergleichsgruppe aus dem hämatologischen Routinelabor der Kinderklinik Tübingen.

Zusätzlich wurden für dasselbe Probenmaterial jeweils die Expressionsdichten der Oberflächenantigene W6/32 und CD19 bestimmt. Der hierfür verwendete W6/32 Antikörper bindet an HLA-Klasse-I-Moleküle der Gruppen A, B und C und maskiert diese, so dass zum Beispiel inhibitorische Rezeptoren der NK-Zellen nicht mehr durch MHC-Klasse-I-Moleküle auf Zielzellen aktiviert werden können. Zielzellen verlieren so die Fähigkeit, einem Angriff durch NK-Zellen zu entgehen. Anhand der Menge an gebundenem W6/32 Antikörper kann somit eine Aussage über die HLA-Expressionsdichte auf verschiedenen Zellen getroffen werden. Das CD19 Protein ist ein allgemeiner B-Zellmarker. Um die Expressionsdichte von CD19 auf den Blasten und den gesunden Zellen mit der durch einen CD16 x CD19 Antikörper vermittelten Zytotoxizität zu korrelieren, wurde analog zu Lym-2 auch die CD19-Expression quantifiziert.

4.1.1 Expressionsanalyse mit W6/32

Expression auf gesunden B-Zellen

Die Expressionsdichte von HLA-Klasse-I-Molekülen der Gruppen A, B und C wird mit Hilfe des W6/32 Antikörpers auf 9 Proben gesunder B-Zellen bestimmt (n=9). Die durchflusszytometrische Analyse liefert Werte zwischen 127757 und 370542 Antigenen pro Zelle. Der Mittelwert liegt bei 228222 Antigenen pro Zelle, der Median bei 235923 Antigenen pro Zelle mit einer Standardabweichung von 80696 (siehe Tabelle 3).

Expression auf leukämischen Blasten

Zum Vergleich werden kryokonservierte Leukämiezellen von 8 Patienten auf ihre Expressionsdichte von HLA-Klasse-I-Molekülen der Gruppen A, B und C mit dem W6/32 Antikörper untersucht (n=8). 7 der Patienten sind mit einer common-ALL diagnostiziert worden, ein Patient mit einer AML-M4. Die durchflusszytometrische Analyse mit dem W6/32 Antikörper liefert Werte zwischen 148459 und 220633 Antigenen pro Zelle. Der Mittelwert liegt bei 196109 Antigenen pro Zelle, der Median bei 203579 Antigenen pro Zelle mit einer Standardabweichung von 25846 (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3 zeigt die Rohdaten aus 8 durchgeführten FACS-Analysen für die W6/32 Expressionsdichte auf gesunden B-Zellen und leukämischen Blasten.

	<i>Blasten</i>	<i>B-Zellen</i>
<i>W6/32 [Ag/Zelle]</i>	216297	139922
	187074	370542
	170497	127757
	220633	167147
	199427	194248
	218757	260808
	207730	241257
	148459	235923
	-	316391
<i>Mittelwert</i>	196109	228222
<i>Median</i>	203579	235923
<i>SD</i>	25846	80696

Tabelle 3 Expressionsdichten [Antigen pro Zelle] von W6/32 auf pädiatrischen leukämischen Blasten und gesunden B-Zellen mit entsprechenden Mittelwerten, Medianen und Standardabweichungen (SD).

Vergleich der Expressionsdichten zwischen B-Zellen und Blasten

Hinsichtlich ihrer W6/32 Expressionsdichte zeigen gesunde B-Zellen und leukämische Blasten keinen signifikanten Unterschied. Mit Hilfe des Computerprogramms „Prism“ wurde ein „Student`s t-Test“ durchgeführt. Es wurde hierfür ein p-Wert von 0,2997 bei einem t-Wert von 1,0742 ermittelt. Von einem signifikanten Unterschied kann definitionsgemäß bei einem p-Wert kleiner 0,05 ausgegangen werden. Für die beiden untersuchten Populationen ergibt sich hier also hinsichtlich ihrer Expressionsdichte von W6/32 kein signifikanter Unterschied, bei relativ großen Varianzen, insbesondere bei den B-Zellen (siehe Abbildung 5).

Abbildung 5 zeigt die Verteilung der einzelnen gemessenen Werte mit den jeweiligen Mittelwerten für die Expressionsdichte von W6/32 auf den

untersuchten B-Zellen (n=9) und den Blasten (n=8) im Vergleich, sowie den dazugehörigen p-, beziehungsweise t-Wert.

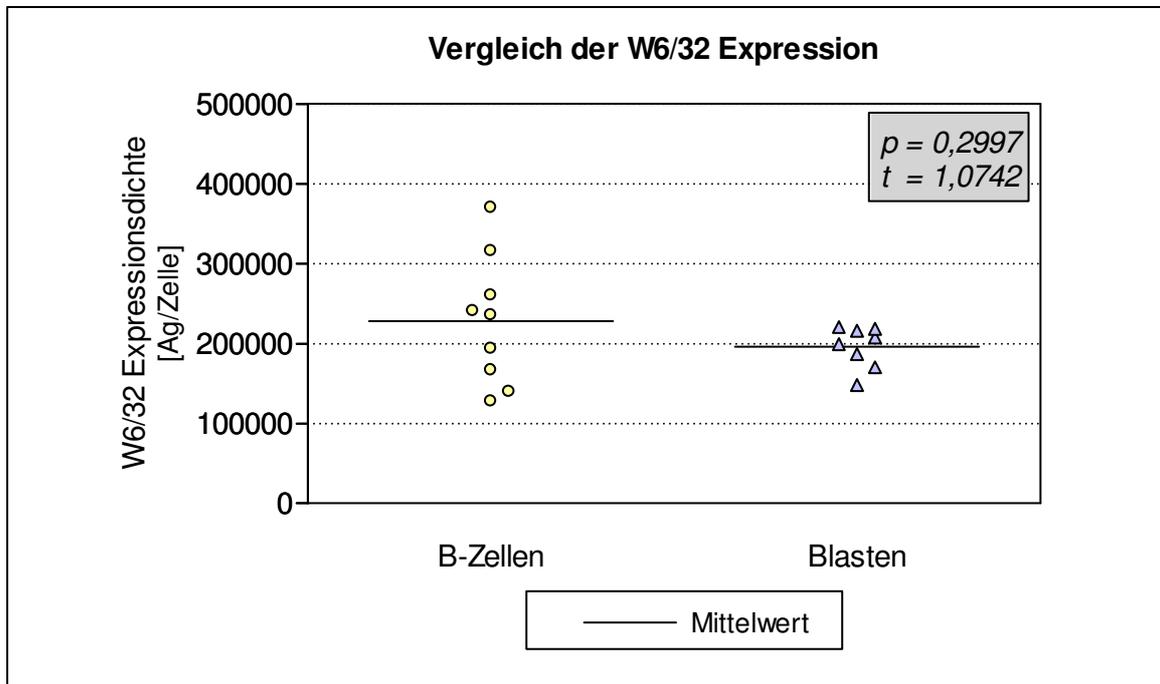


Abbildung 5 Verteilung und Mittelwerte der Expressionsdichten von W6/32 auf B-Zellen und Blasten mit dazugehörigem p-, beziehungsweise t-Wert.

4.1.2 Expressionsanalyse mit CD19

Expression auf gesunden B-Zellen

Die CD19 Expressionsdichte wird auf 27 Proben der gesunden B-Zellen bestimmt (n=27). Die ermittelten Werte schwanken hier zwischen 5100 und 12914 Antigenen pro Zelle, bei einem Mittelwert von 8317 Antigenen pro Zelle, einem Median von 8236 Antigenen pro Zelle und einer Standardabweichung von 1917 (siehe Tabelle 4).

Expression auf leukämischen Blasten

Die Expressionsdichte von CD19 wird zum Vergleich für 14 Proben der leukämischen Blasten bestimmt (n=14). Bei allen gemessenen Patientenproben ist eine common-ALL diagnostiziert worden. Die ermittelten Werte schwanken hier zwischen 7 und 17360 Antigenen pro Zelle, bei einem Mittelwert von 10519 Antigenen pro Zelle, einem Median von 10171 Antigenen pro Zelle und einer Standardabweichung von 4533 (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4 zeigt die Rohdaten aus 11 durchgeführten FACS-Analysen für die CD19 Expressionsdichte auf gesunden B-Zellen und leukämischen Blasten.

	<i>Blasten</i>	<i>B-Zellen</i>	
<i>CD19 [Ag/Zelle]</i>	6886	8593	7966
	10460	8652	5100
	7772	8176	8594
	8890	9992	8955
	9882	8236	8276
	7868	12041	6843
	8787	11418	7483
	10782	9336	7222
	16728	9136	5645
	14066	6719	12914
	13828	8014	10686
	17630	7265	8351
	7	5749	7619
	13687	5571	-
<i>Mittelwert</i>	10519	8317	
<i>Median</i>	10171	8236	
<i>SD</i>	4533	1917	

Tabelle 4

Expressionsdichten [Antigen pro Zelle] von CD19 auf pädiatrischen leukämischen Blasten und gesunden B-Zellen mit entsprechenden Mittelwerten, Medianen und Standardabweichungen (SD).

Vergleich der Expressionsdichten zwischen B-Zellen und Blasten

Der statistische Unterschied der CD19 Expressionsdichte auf gesunden B-Zellen und auf leukämischen Blasten ist signifikant. Es ergab sich hierfür ein p-Wert von 0,0343 bei einem t-Wert von 2,1935. Damit ist der Unterschied der Expressionsdichten von CD19 zwischen den beiden gemessenen Populationen definitionsgemäß signifikant ($p < 0,05$), bei relativ großen Varianzen, insbesondere bei den Blasten (siehe Abbildung 6).

Abbildung 6 zeigt die Verteilung der einzelnen gemessenen Werte mit dem jeweiligen Mittelwert für die Expressionsdichten von CD19 auf den untersuchten B-Zellen ($n=27$) und den Blasten ($n=14$) im Vergleich, sowie den dazugehörigen p-, beziehungsweise t-Wert.

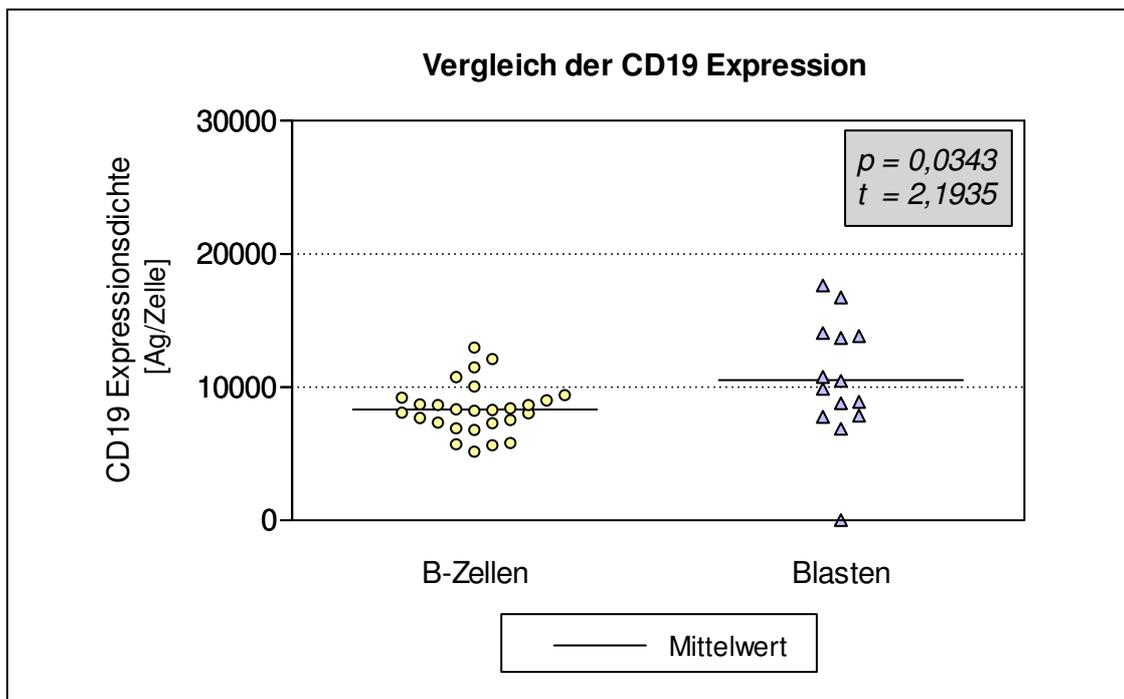


Abbildung 6 Verteilung und Mittelwerte der Expressionsdichten von CD19 auf B-Zellen und Blasten mit dazugehörigem p-, beziehungsweise t-Wert.

4.1.3 Expressionsanalyse mit Lym-2

Expression auf gesunden B-Zellen

Die Lym-2 Expressionsdichte wird auf 38 Proben gesunder B-Zellen bestimmt (n=38). Es ergeben sich hierfür Werte zwischen 0 und 47870 Antigenen pro Zelle, bei einem Mittelwert von 10283 Antigenen pro Zelle, einem Median von 7382 Antigenen pro Zelle und einer Standardabweichung von 10518 (siehe Tabelle 5).

Expression auf leukämischen Blasten

Die Lym-2 Expressionsdichte wird zum Vergleich auf 23 Proben leukämischer Blasten bestimmt. Von den 23 Patienten ist bei 21 eine common-ALL diagnostiziert worden, sowie bei jeweils einem Patienten eine AML-M4, beziehungsweise eine AML-M5. Es ergeben sich hier Werte zwischen 0 und 7360 Antigenen pro Zelle, bei einem Mittelwert von 1931 Antigenen pro Zelle, einem Median von 412 Antigenen pro Zelle und einer Standardabweichung von 2476 (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5 zeigt die Rohdaten aus 13 durchgeführten FACS-Analysen für die Lym-2 Expressionsdichte auf gesunden B-Zellen und leukämischen Blasten.

	<i>Blasten</i>	<i>B-Zellen</i>	
<i>Lym-2 [Ag/Zelle]</i>	161	2894	22
	399	11439	8189
	601	14750	6420
	412	1941	20140
	4	7211	9399
	7360	12889	12383
	5838	7218	3410
	5750	12491	3715
	636	47870	2596
	161	22608	5353
	144	5629	3315
	305	1833	7545
	4214	7155	6966
	570	11570	6531
	185	10760	7757
	4220	4010	-
	347	11329	-
	3989	31410	-
	6208	0	-
	2743	9167	-
0	43180	-	
134	8319	-	
32	1342	-	
<i>Mittelwert</i>	1931	10283	
<i>Median</i>	412	7382	
<i>SD</i>	2476	10518	

Tabelle 5

Expressionsdichten [Antigen pro Zelle] von Lym-2 auf pädiatrischen leukämischen Blasten und gesunden B-Zellen mit entsprechenden Mittelwerten, Medianen und Standardabweichungen (SD).

Vergleich der Expressionsdichten zwischen B-Zellen und Blasten

Die Lym-2 Expressionsdichte ist auf den untersuchten gesunden B-Zellen signifikant höher als auf den leukämischen Blasten. Der „Student`s t-Test“ ergab hierfür einen p-Wert von 0,0004 bei einem t-Wert von 3,7345 und damit

definitionsgemäß einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) bei jeweils großen Varianzen (siehe Abbildung 7).

Abbildung 7 zeigt die Verteilung der einzelnen gemessenen Werte mit dem jeweiligen Mittelwert für die Expressionsdichten von Lym-2 auf den untersuchten B-Zellen ($n=38$) und den Blasten ($n=23$) im Vergleich, sowie den dazugehörigen p-, beziehungsweise t-Wert.

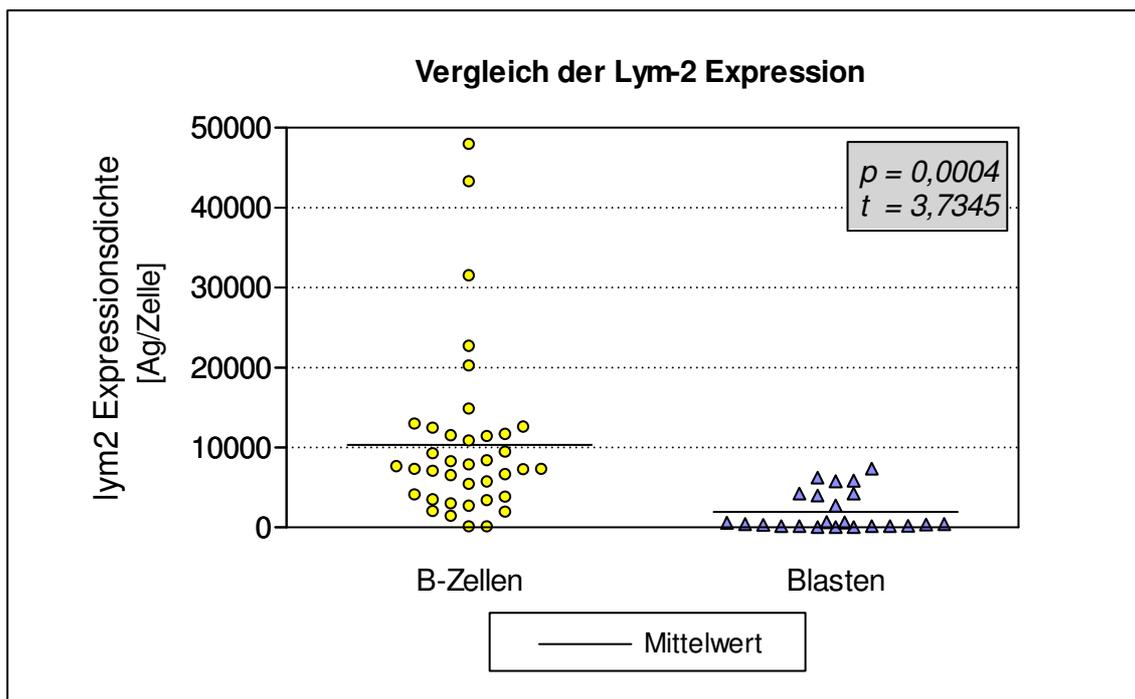


Abbildung 7 Verteilung und Mittelwerte der Expressionsdichten von Lym-2 auf B-Zellen und Blasten mit dazugehörigem p-, beziehungsweise t-Wert.

Die folgenden Abbildungen 8a und 8b zeigen exemplarisch die Darstellung der Lym-2 Expressionsdichten auf repräsentativen Proben der B-Zellen (Abbildung 8a), beziehungsweise Blasten (Abbildung 8b) im „Histogramm“. Zu sehen ist die deutlich höhere Lym-2 Expressionsdichte auf den gesunden B-Zellen wie sie sich auf der Mehrzahl der untersuchten Zellproben zeigte. In Abbildung 8a weisen beispielsweise die Mehrzahl der einzelnen gemessenen Zellen eine

Lym-2 Expressionsdichte von $>10^2$ Antigene/Zelle auf. Im Vergleich dazu zeigt die Abbildung 8b beispielhaft die meist sehr geringen Expressionsdichte von Lym-2 auf den untersuchten Blasten. Hier weist die Mehrzahl der einzelnen gemessenen Zellen eine Lym-2 Expressionsdichte von $<10^1$ Antigene/Zelle auf.

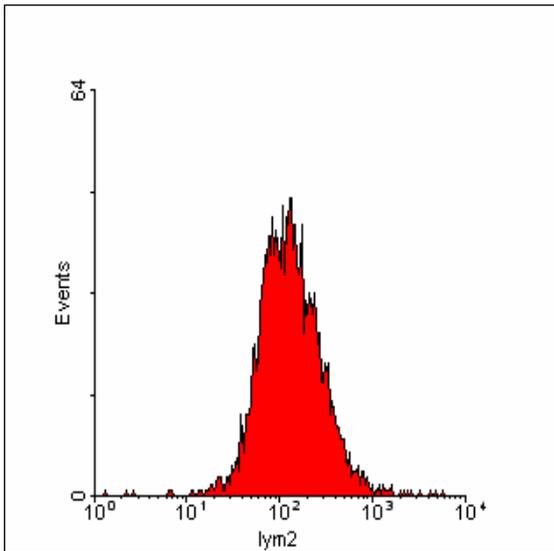


Abbildung 8a
Lym-2 Expressionsdichte auf B-Zellen
im „Histogramm“

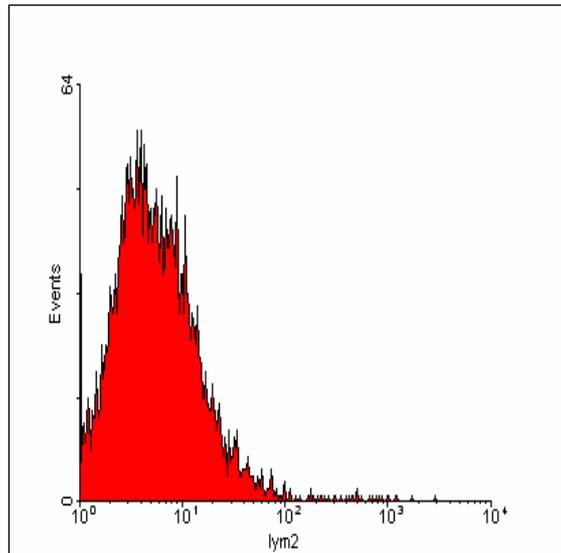


Abbildung 8b
Lym-2 Expressionsdichte auf Blasten
im „Histogramm“

4.2 Zytotoxische Aktivität von NK-Zellen

Die Zytotoxizität von NK-Zellen gesunder Spender gegenüber leukämischen Blasten sollte in Abhängigkeit von verschiedenen Antikörpern, insbesondere dem bispezifischen Lym-2 x CD16 Antikörper zur Vermittlung von ADCC bestimmt werden.

Die NK-Zellen wurden hierzu aus Vollblut von fünf verschiedenen gesunden Spendern durch Ficoll-Dichtezentrifugation und anschließender Anreicherung CD56-positiver Zellen durch MACS gewonnen. Die Blasten stammen von sechs verschiedenen Patienten, deren Lym-2 und CD19 Expressionsdichten zuvor quantifiziert wurden. Bei fünf der Patienten war eine common-ALL diagnostiziert, bei einem Patienten eine prä-T-ALL. Zwei der Proben mit common-ALL stammen von dem gleichen Patienten und wurden doppelt mit NK-Zellen unterschiedlicher Spender verwendet. Insgesamt wurden acht Zytotoxizitätstests mittels des BATDA-release assay durchgeführt. Es wurden nur Tests mit einer Spontanlyse von weniger oder gleich 30% ausgewertet, um von validen Testergebnissen ausgehen zu können. Eine ADCC-Testung wurde mit folgenden Antikörpern durchgeführt: Lym-2 x CD16, CD16 x CD19 und einem murinen CD19 Antikörper. Als Kontrolle diente jeweils ein Testansatz ohne Zugabe eines Antikörpers. Die Zytotoxizität der NK-Zellen wurde des Weiteren jeweils mit und ohne vorherige IL-2 Stimulation der Effektoren bestimmt. Außerdem wurden die Tests mit je vier verschiedenen Verhältnissen zwischen Effektorzellen (NK-Zellen) und Targetzellen (Blasten) durchgeführt. Daraus ergaben sich folgende E:T -Verhältnisse: 20:1, 10:1, 5:1 und 2,5:1. Die spezifische Lyse der einzelnen Testansätze wurde mit der folgenden Formel errechnet:

$$\text{Spezifische Lyse [\%]} = \frac{\text{Messwert} - \text{Spontanlyse}}{\text{Maximallyse} - \text{Spontanlyse}} \times 100$$

Formel 4.1

4.2.1 Zytotoxizität von CD16 x CD19 und CD19

CD16 x CD19 ist ein bispezifischer Antikörper, der zum einen an den FcγRIII-Rezeptor der NK-Zelle und zum anderen an das CD19 Antigen auf der Oberfläche CD19-positiver Zellen bindet. Des Weiteren wird hier ein muriner CD19 Antikörper verwendet. CD19 ist ein allgemeiner B-Zellmarker, der auch auf unreifen gesunden, sowie malignen B-Zellen wie zum Beispiel der common-ALL in hoher Dichte exprimiert wird. Dadurch kann mit CD19 Antikörpern effektiv ADCC gegenüber CD19-positiven Zellen vermittelt werden.

Es werden mit den beiden beschriebenen Antikörpern insgesamt fünf Zytotoxizitätstests durchgeführt. Die verwendeten NK-Zellen stammen von zwei verschiedenen, gesunden Spendern. Als Targetzellen dienen Blasten von vier verschiedenen Patienten, drei der Patienten sind mit einer common-ALL diagnostiziert worden (in Tabelle 6 gelb hinterlegt), ein Patient mit einer prä-T-ALL (in Tabelle 6 blau hinterlegt).

Für die über CD16 x CD19, beziehungsweise CD19 vermittelte Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität von unstimulierten (n=5), beziehungsweise IL-2 stimulierten (n=5) NK-Zellen ergeben sich die in Tabelle 6 dargestellten Werte für die jeweiligen spezifischen Lysen. Zum Vergleich sind des Weiteren die spezifischen Lyseraten der Testansätze ohne Antikörpervermittlung dargestellt, sowie die jeweiligen Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen je nach E:T -Verhältnis (siehe Tabelle 6).

Für ein E:T -Verhältnis von 20:1 ergibt sich für die über CD16 x CD19 vermittelte Zytotoxizität von unstimulierten, beziehungsweise stimulierten NK-Zellen im Mittel eine spezifische Lyse von 58,0%, beziehungsweise 66,8%, bei Medianen von 49,0% und 60,0%, mit Standardabweichungen von 30,0% und 13,7%. Die Werte schwanken hierbei zwischen 28 und 100%, beziehungsweise 52 und 85%. Für die über CD19 vermittelte Zytotoxizität von unstimulierten, beziehungsweise stimulierten NK-Zellen ergibt sich für ein E:T -Verhältnis von 20:1 im Mittel eine spezifische Lyse von 29,8%, beziehungsweise 33,8%, bei Medianen von 36,0% und 28,0%, mit Standardabweichungen von 11,3% und 11,7%. Die Werte schwanken hier zwischen 17 und 39%, beziehungsweise 25 und 52%.

		ohne Antikörper		CD16 x CD19		CD19	
		NK-Zellen					
		un-stimuliert	stimuliert	un-stimuliert	stimuliert	un-stimuliert	stimuliert
E:T -Verhältnis	20:1	24	45	49	60	36	25
		33	46	28	52	39	52
		20	26	77	77	18	28
		40	26	100	85	39	25
		23	100	36	60	17	39
	Mittelwert	28,0	48,6	58,0	66,8	29,8	33,8
	Median	24,0	45,0	49,0	60,0	36,0	28,0
	SD	8,3	30,3	30,0	13,7	11,3	11,7
	10:1	15	33	23	40	22	14
		23	38	25	36	31	43
		13	20	29	56	4	8
		0	6	41	77	18	19
		20	42	24	29	13	25
	Mittelwert	14,2	27,8	28,4	47,6	17,6	21,8
	Median	15,0	33,0	25,0	40,0	18,0	19,0
	SD	8,9	14,7	7,4	19,2	10,1	13,4
	5:1	15	23	12	22	10	4
		24	30	18	28	25	56
		7	4	16	38	7	10
		0	1	38	42	13	11
		5	33	0	20	0	17
	Mittelwert	10,2	18,2	16,8	30,0	11,0	19,6
	Median	7,0	23,0	16,0	28,0	10,0	11,0
	SD	9,4	14,8	13,8	9,7	9,2	20,9
	2,5:1	27	16	25	12	17	6
		17	27	18	12	16	23
		3	1	7	24	4	0
		3	17	12	22	13	1
0		0	0	2	0	0	
Mittelwert	10,0	12,2	12,4	14,4	10,0	6,0	
Median	3,0	16,0	12,0	12,0	13,0	1,0	
SD	11,6	11,5	9,7	8,9	7,6	9,8	

Tabelle 6 Über ohne Antikörper, CD16 x CD19 und CD19 vermittelte Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber c-ALL- (gelb), bzw. prä-T-ALL-Blasten (blau), Rohwerte der spezifischen Lyse in Prozent mit entsprechenden Mittelwerten, Medianen und Standardabweichungen (SD).

Insgesamt führt der CD16 x CD19 Antikörper im Vergleich zu der natürlichen Zytotoxizität der NK-Zellen in nahezu allen Testansätzen zu einer deutlich effizienteren Lyse der Targetzellen (siehe Abbildung 9). Jedoch ergibt sich nur

für ein E:T -Verhältnis von 10:1 ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zytotoxizität von unstimulierten NK-Zellen ohne Antikörpervermittlung und mit dem CD16 x CD19 Antikörper (p-Wert von 0,025 bei einem t-Wert von 2,748). Für ein E:T -Verhältnis von 20:1 ergeben sich beispielsweise für den Vergleich der Zytotoxizität von unstimulierten, beziehungsweise stimulierten NK-Zellen ohne Antikörpervermittlung und mit dem CD16 x CD19 Antikörper p-Werte von 0,06 (bei einem t-Wert von 2,158), beziehungsweise 0,26 (bei einem t-Wert von 1,223) und damit definitionsgemäß nicht-signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Der murine CD19 Antikörper vermittelt keine gesteigerte Zytotoxizität.

Abbildung 9 zeigt den Vergleich der Zytotoxizität von unstimulierten (blau), beziehungsweise stimulierten NK-Zellen (gelb) ohne Antikörpervermittlung und mit dem CD16 x CD19 Antikörper für alle vier E:T -Verhältnisse anhand der jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen im Säulendiagramm. Die jeweils entsprechenden Unterschiede in der über unstimulierte, beziehungsweise mittels IL-2 stimulierte NK-Zellen vermittelten spezifischen Lyseraten sind für kein E:T -Verhältnis signifikant.

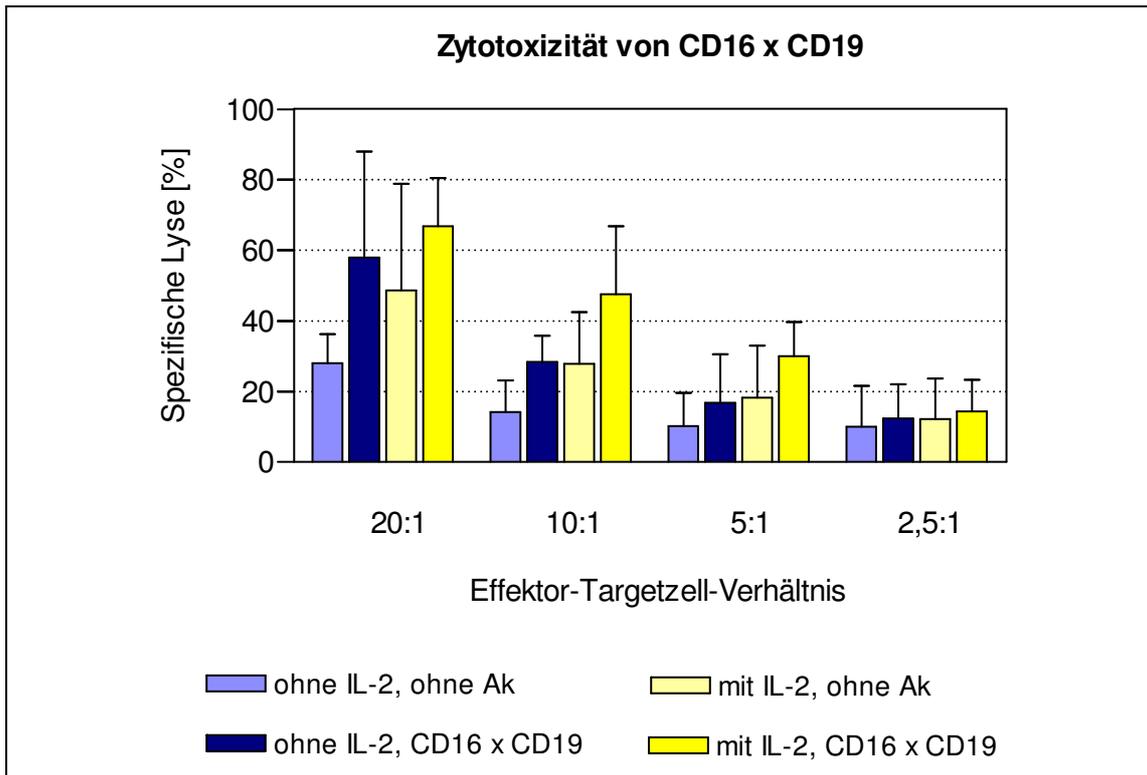


Abbildung 9 Mittelwerte und Standardabweichungen der spezifischen Lyseraten von unstimulierten (blau), beziehungsweise stimulierten NK-Zellen (gelb) ohne Antikörpervermittlung und mit CD16 x CD19.

4.2.2 CD19 Expression auf Blasten und Lysierbarkeit

Um zu überprüfen, inwieweit die Höhe der CD19 Expressionsdichte auf den Blasten der durch CD16 x CD19 vermittelten Zytotoxizität zugrunde liegt, wurden Zytotoxizitätstests mit Blasten von drei verschiedenen Patienten mit der Diagnose common-ALL durchgeführt, deren CD19 Expressionsdichten zuvor bestimmt worden waren. Die Werte der CD19 Expressionsdichten schwanken hier zwischen 7868 und 10782 Antigenen pro Zelle.

Tabelle 7 zeigt die Diagnose und die Expressionsdichte von CD19 auf den verwendeten Blasten und die jeweiligen Mittelwerte der spezifischen Lysen mit unstimulierten, beziehungsweise stimulierten NK-Zellen je nach E:T -Verhältnis.

	CD19 Ex- pression [Ag/Zelle]	ADCC, CD16 x CD19, Spez. Lyse [%]								
		ohne IL-2				mit IL-2				
		20:1	10:1	5:1	2,5:1	20:1	10:1	5:1	2,5:1	
Diagnose	c- ALL	7868	36	24	0	0	60	29	20	2
	c- ALL	8787	75	32	25	19	73	59	32	17
	c- ALL	10782	77	29	16	7	77	56	38	24

Tabelle 7 Diagnose und Expressionsdichte von CD19 auf den Blasten und deren Lysierbarkeit mittels CD16 x CD19 markierter unstimulierter, beziehungsweise IL-2 stimulierter NK-Zellen für verschiedenen E:T -Verhältnisse.

Hier zeigt sich, insbesondere für ein E:T -Verhältnis von 20:1, dass eine starke Expression von CD19 auf den Blasten zu einer entsprechend höheren über CD16 x CD19 vermittelten Lysierbarkeit führt (siehe Abbildung 10). Die CD19 Expressionsdichte und die über CD16 x CD19 vermittelte Lysierbarkeit derselben Blasten weisen hier also eine positive Korrelation auf.

In Abbildung 10 werden auf der Abszisse aufsteigend die Expressionsdichten von CD19 auf den drei verschiedenen Blastenproben dargestellt. Die Ordinate gibt die über IL-2 stimulierte NK-Zellen vermittelten spezifischen Lyseraten für die vier verschiedenen E:T -Verhältnisse wieder.

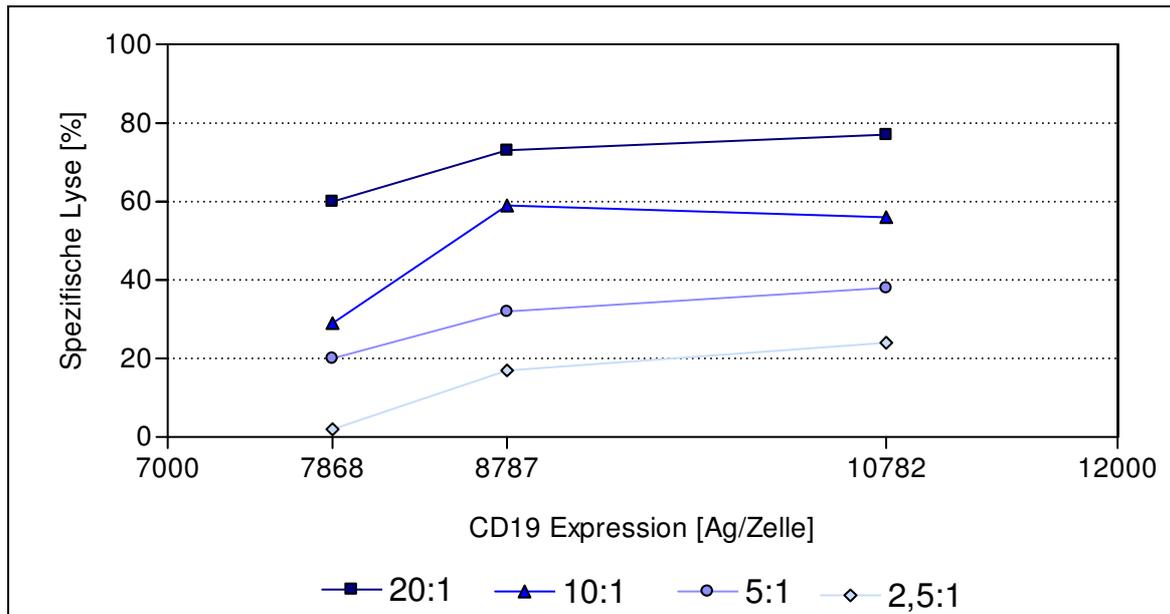


Abbildung 10 Korrelation der CD19 Expression auf c-ALL-Blasten und deren über CD16 x CD19 vermittelten Lysierbarkeit mittels stimulierter NK-Zellen für verschiedene E:T-Verhältnisse.

4.2.3 Zytotoxizität von Lym-2

Der Lym-2 x CD16 Antikörper ist ein bispezifischer monoklonaler Antikörper, der zum einen an den FcγRIII-Rezeptor der NK-Zelle, zum anderen an das Lym-2 Antigen auf B-Zellen bindet und so ADCC vermitteln kann.

Es werden mit dem beschriebenen Antikörper insgesamt acht Zytotoxizitätstests durchgeführt. Die verwendeten NK-Zellen stammen von fünf verschiedenen, gesunden Spendern. Als Targetzellen dienen Blasten von sechs verschiedenen Patienten, fünf der Patienten sind mit einer common-ALL diagnostiziert worden, ein Patient mit einer prä-T-ALL.

Für die über Lym-2 x CD16 vermittelte Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität von unstimulierten (n=8), beziehungsweise IL-2 stimulierten (n=6) NK-Zellen ergeben sich die in Tabelle 8 dargestellten Werte für die jeweilige spezifische Lyseraten. Zum Vergleich sind des Weiteren die spezifischen Lyseraten der Testansätze ohne Antikörpervermittlung dargestellt, sowie die

jeweiligen Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen je nach E:T – Verhältnis (siehe Tabelle 8).

Für ein E:T -Verhältnis von 20:1 ergibt sich für die über Lym-2 x CD16 vermittelte Zytotoxizität von unstimulierten, beziehungsweise stimulierten NK-Zellen im Mittel eine spezifische Lyse von 35,5%, beziehungsweise 51,7%, bei Medianen von 30,5% und 43,0%, mit Standardabweichungen von 16,0% und 17,6%. Die Werte liegen hierbei zwischen 14 und 57%, beziehungsweise 40 und 84%.

Für die natürliche Zytotoxizität von unstimulierten, beziehungsweise stimulierten NK-Zellen ergibt sich für ein E:T -Verhältnis von 20:1 im Mittel eine spezifische Lyse von 27,1%, beziehungsweise 50,8%, bei Medianen von 23,5% und 45,5%, mit Standardabweichungen von 17,7% und 27,7%. Die Werte liegen hierbei zwischen 0 und 60%, beziehungsweise 26 und 100%.

		ohne Antikörper		Lym-2 x CD16	
		NK-Zellen			
		unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert
E:T-Verhältnis	20:1	24	45	31	41
		33	46	25	40
		20	26	46	40
		40	26	57	45
		23	100	30	60
		0	-	14	-
		60	-	57	-
		17	62	24	84
	Mittelwert	27,1	50,8	35,5	51,7
	Median	23,5	45,5	30,5	43,0
	SD	17,7	27,7	16,0	17,6
	10:1	15	33	21	23
		23	38	22	26
		13	20	19	24
		0	6	1	30
		20	42	21	42
		0	-	4	-
		30	-	49	-
		21	51	25	58
	Mittelwert	15,3	31,7	20,3	33,8
Median	17,5	35,5	21,0	28,0	
SD	10,7	16,2	14,6	13,7	
5:1	15	23	12	20	
	24	30	19	19	
	7	4	18	13	
	0	1	3	11	
	5	33	3	0	
	0	-	0	-	
	8	-	18	-	
	10	33	21	39	
Mittelwert	8,6	20,7	11,8	17,0	
Median	7,5	26,5	15,0	16,0	
SD	8,0	14,6	8,5	13,0	
2,5:1	27	16	26	9	
	17	27	24	19	
	3	1	12	7	
	3	17	3	0	
	0	0	0	8	
	0	-	0	-	
	0	-	0	-	
	6	18	6	88	
Mittelwert	7,0	13,2	8,9	21,8	
Median	3,0	16,5	4,5	8,5	
SD	9,9	10,6	10,8	33,0	

Tabelle 8

Über ohne Antikörper und über Lym-2 x CD16 vermittelte Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber c-ALL- (gelb), bzw. prä-T-ALL-Blasten (blau), Rohdaten der spezifischen Lyse in Prozent mit entsprechenden Mittelwerten, Medianen und Standardabweichungen (SD).

Insgesamt führt der Lym-2 x CD16 Antikörper im Vergleich zu der natürlichen Zytotoxizität der NK-Zellen in nahezu allen Testansätzen zu einer effizienteren Lyse der Targetzellen (siehe Abbildung 11). Jedoch ergeben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zytotoxizität der NK-Zellen ohne Antikörpervermittlung und mit dem Lym-2 x CD16 Antikörper.

Abbildung 11 zeigt den Vergleich der Zytotoxizität von unstimulierten (blau), beziehungsweise stimulierten NK-Zellen (gelb) ohne Antikörpervermittlung und mit Lym-2 x CD16 für alle vier E:T –Verhältnisse im Säulendiagramm. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für die aus den insgesamt acht durchgeführten Zytotoxizitätstests ermittelte spezifischen Lyseraten in Prozent. Die jeweiligen Unterschiede in der über unstimulierte, beziehungsweise mittels IL-2 stimulierte NK-Zellen vermittelten spezifischen Lyseraten sind für die Lyse ohne Antikörpervermittlung für das E:T –Verhältnis von 10:1 signifikant.

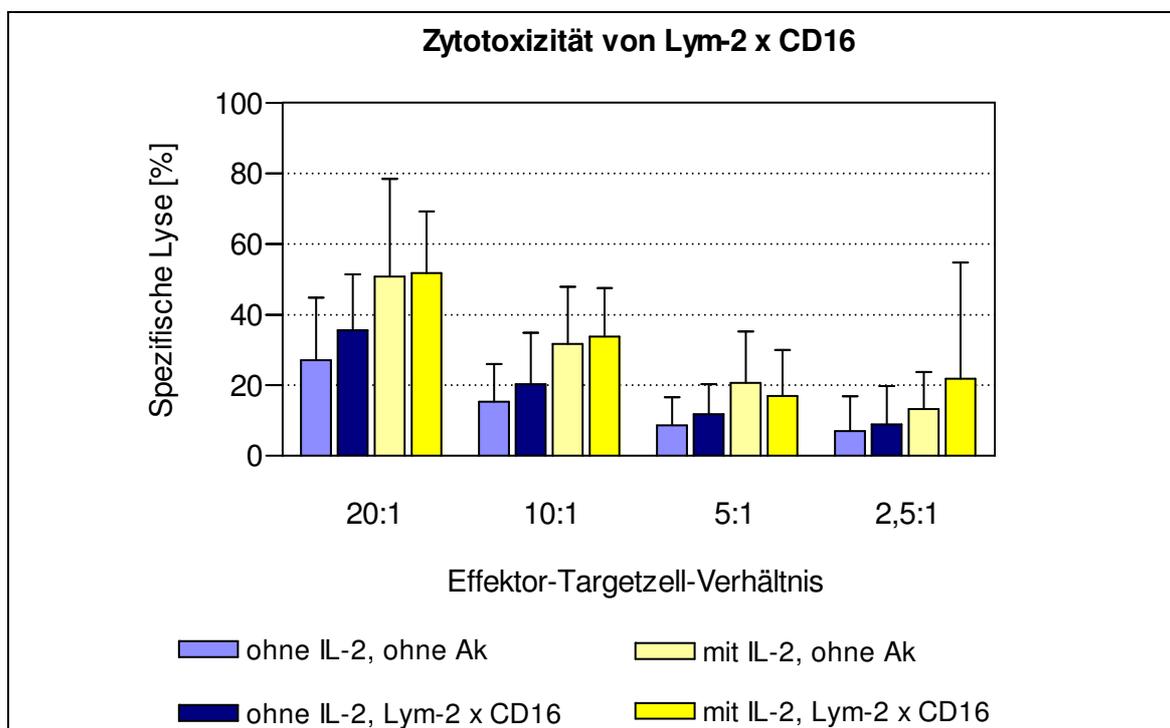


Abbildung 11 *Mittelwerte und Standardabweichungen der spezifischen Lyseraten von unstimulierten (blau), beziehungsweise stimulierten NK-Zellen (gelb) ohne Antikörpervermittlung und mit Lym-2 x CD16.*

4.2.4 Lym-2 Expression auf Blasten und Lysierbarkeit

Um zu überprüfen, inwiefern die Lym-2 Expressionsdichte auf den Blasten der durch Lym-2 vermittelten Zytotoxizität zugrunde liegt, wurden Zytotoxizitätstests mit Blasten von fünf verschiedenen Patienten durchgeführt, deren Lym-2 Expressionsdichte parallel bestimmt worden war. Alle Proben zeigen eine common-ALL. Die Werte der Lym-2 Expressionsdichten schwanken hier zwischen 3989 und 7360 Antigenen pro Zelle.

Tabelle 9 zeigt die Diagnose und die Expressionsdichte von Lym-2 auf den verwendeten Blasten und deren Lysierbarkeit mittels Lym-2 x CD16 markierter unstimulierter (n=5), beziehungsweise IL-2 stimulierter NK-Zellen (n=4) für die jeweils vier verschiedenen E:T –Verhältnisse anhand der errechneten Mittelwerte.

		Lym-2 Ex- pression [Ag/Zelle]	ADCC, Lym-2 x CD16, Spez. Lyse [%]							
			ohne IL-2				mit IL-2			
			20:1	10:1	5:1	2,5:1	20:1	10:1	5:1	2,5:1
Diagnose	c- ALL	3989	36	27	9	0	-	-	-	-
	c- ALL	4220	24	25	21	6	84	58	39	88
	c- ALL	4982	46	19	18	12	40	24	13	7
	c- ALL	5838	44	11	8	5	43	27	16	5
	c- ALL	7360	30	21	3	0	60	42	0	8

Tabelle 9

Diagnose und Expressionsdichte von Lym-2 auf den Blasten und deren Lysierbarkeit mittels Lym-2 x CD16 markierter unstimulierter, beziehungsweise IL-2 stimulierter NK-Zellen für verschiedenen E:T –Verhältnisse.

In der über stimulierte NK-Zellen vermittelten Zytotoxizität zeigt sich insbesondere für drei der Proben (für alle E:T -Verhältnisse), dass eine starke Expression von Lym-2 auf den Blasten zu einer entsprechend höheren über Lym-2 x CD16 vermittelten Lysierbarkeit führt (siehe Abbildung 12). Die Lym-2 Expressionsdichte und die über Lym-2 x CD16 vermittelte Lysierbarkeit derselben Blasten weisen hier also eine positive Korrelation auf.

In Abbildung 12 werden auf der Abszisse aufsteigend die Expressionsdichten von Lym-2 x CD16 auf vier verschiedenen Blastenproben dargestellt. Die Ordinate gibt die über IL-2 stimulierte NK-Zellen vermittelten spezifischen Lyseraten für die vier verschiedenen E:T -Verhältnisse wieder.

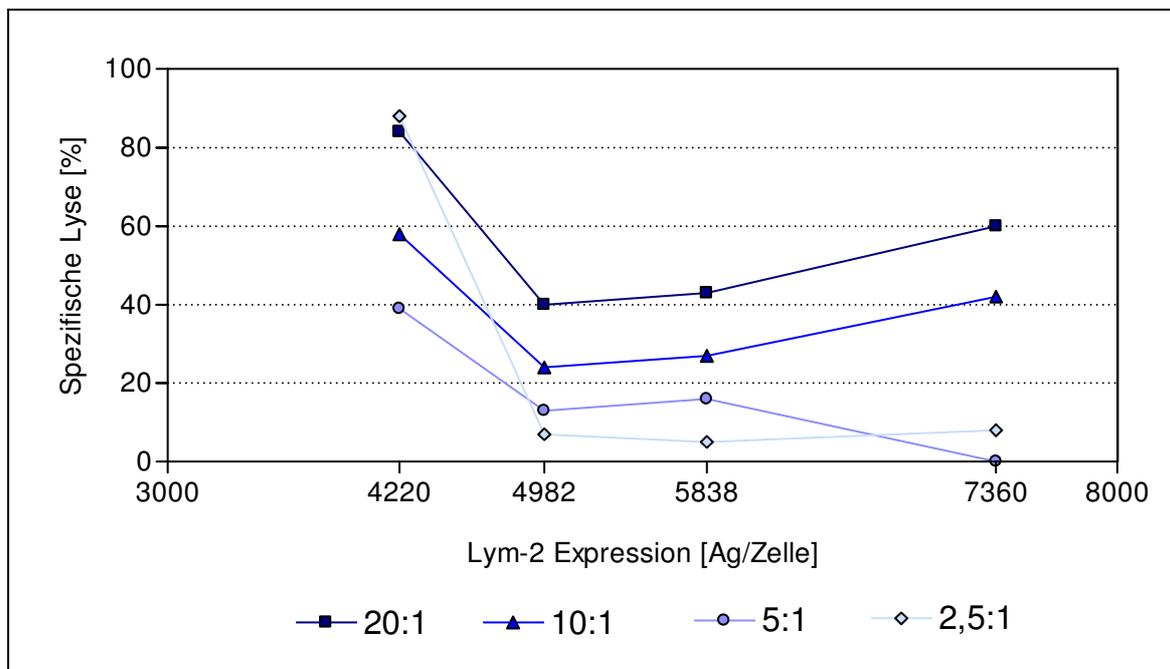


Abbildung 12

Korrelation der Lym-2 Expression auf c-ALL-Blasten und deren über Lym-2 x CD16 vermittelten Lysierbarkeit mittels stimulierter NK-Zellen für verschiedene E:T -Verhältnisse.

4.2.5 Vergleich der Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität

Aus den acht ohne die Zugabe eines Antikörpers und mit den beschriebenen drei Antikörpern durchgeführten Zytotoxizitätstests ergeben sich insgesamt die in Tabelle 10 dargestellten Mittelwerte für die spezifischen Lysen in Prozent. Abbildung 13 verdeutlicht die Unterschiede, welche sich einerseits in der maximalen Lysierfähigkeit der einzelnen Antikörper insgesamt und je nach E:T - Verhältnis ergeben. Dargestellt sind die Mittelwerte der spezifischen Lyseraten mit den dazugehörigen Standardabweichungen im Säulendiagramm. Zudem werden hier die Unterschiede für unstimulierte, beziehungsweise IL-2 stimulierte Effektorzellen (NK-Zellen) dargestellt.

		NK-Zellen							
		ohne IL-2 Stimulation				mit IL-2 Stimulation			
		ohne Anti- körper	Lym-2 x CD16	CD16 x CD19	CD 19	ohne Anti- körper	Lym-2 x CD16	CD16 x CD19	CD 19
E:T - Verhältnis	20:1	27,1	35,5	58,0	29,8	50,8	51,7	66,8	33,8
	10:1	15,3	20,3	28,4	17,6	31,7	33,8	47,6	21,8
	5:1	8,6	11,8	16,8	11,0	20,7	17,0	30,0	19,6
	2,5:1	7,0	8,9	12,4	10,0	13,2	21,8	14,4	6,0

Tabelle 10 Mittelwerte der spezifischen Lyse in Prozent aus acht Zytotoxizitätstests.

Hieraus wird zum einen ersichtlich, dass die Stimulation der NK-Zellen mittels IL-2 deren Lysekapazität insgesamt deutlich verbessert. Vergleicht man die Lysefähigkeit unstimulierter, beziehungsweise IL-2 stimulierter NK-Zellen für die jeweiligen Testansätze mit verschiedenen Antikörpern, beziehungsweise ohne Antikörper miteinander ergeben sich jedoch nur teilweise signifikante Unterschiede (siehe 4.2.1 und 4.2.3). Des Weiteren sieht man, dass die

Lysefähigkeit der NK-Zellen wie erwartet mit sinkendem E:T -Verhältnis deutlich abnimmt (siehe Abbildung 13).

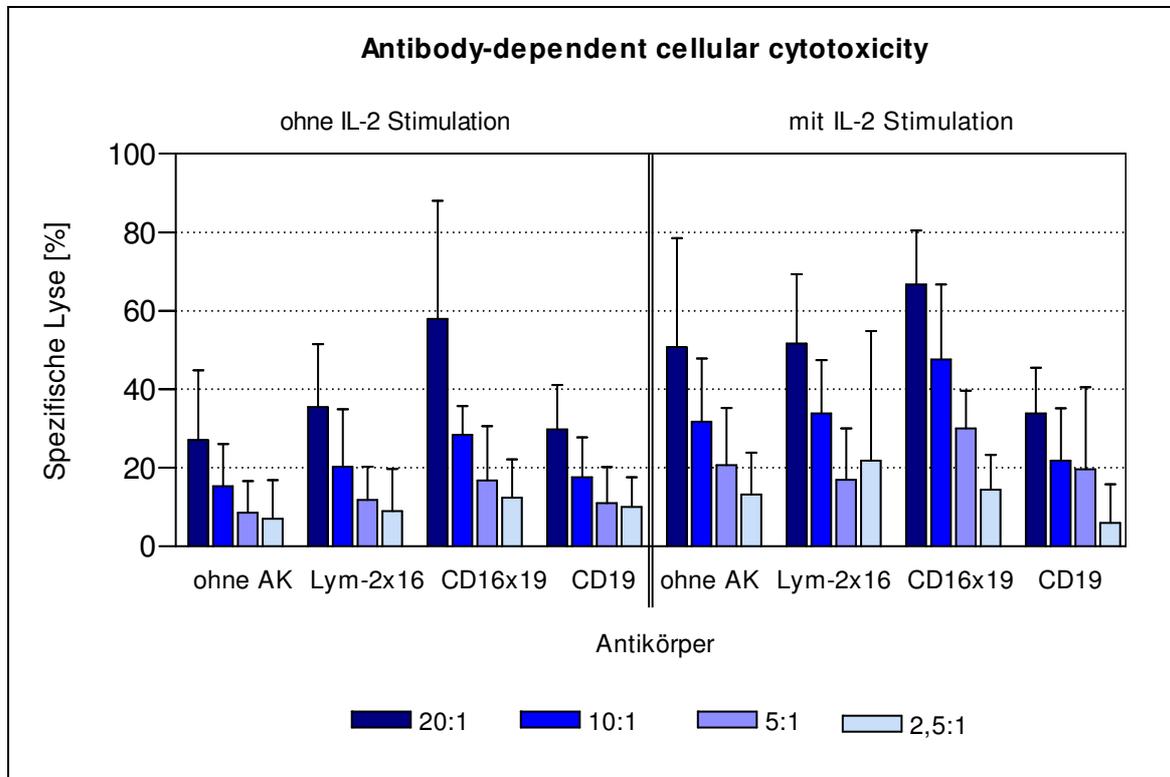


Abbildung 13 Säulendiagramm der Mittelwerte und Standardabweichungen der spezifischen Lyse in Prozent aus acht Zytotoxizitätstests.

Insgesamt fällt hier auf, dass der Lym-2 x CD16 Antikörper die Lyse der leukämischen Blasten durch NK-Zellen im Vergleich zu deren Zytotoxizität ohne Antikörpervermittlung deutlich verbessert (siehe 4.2.3). Allerdings zeigt der Lym-2 x CD16 Antikörper keinen Vorteil gegenüber dem bispezifischen CD16 x CD19 Antikörper; im Gegenteil, die Lyse ist deutlich ineffizienter. Die über Lym - 2 x CD16 vermittelte Lysekapazität der IL-2 stimulierten NK-Zellen erreicht dabei Werte in der Höhe entsprechend der Lysekapazität unstimulierter NK-Zellen in Verbindung mit dem CD16 x CD19 Antikörper.

In Tabelle 11 sind beispielhaft für ein E:T -Verhältnis von 20:1 die Rohwerte für die spezifischen Lyseraten von unstimulierten, beziehungsweise stimulierten NK-Zellen für die Testansätze ohne Antikörpervermittlung, beziehungsweise Lym-2 x CD16 und CD16 x CD19 dargestellt. Als Targetzellen dienen wie bereits dargestellt Blasten von sechs verschiedenen Patienten, fünf der Patienten sind mit einer common-ALL (gelb hinterlegt) diagnostiziert worden, ein Patient mit einer prä-T-ALL (blau hinterlegt). Zwei Proben der common-ALL Blasten wurden doppelt gemessen.

		NK-Zellen					
		ohne IL-2 Stimulation			mit IL-2 Stimulation		
		ohne Anti- körper	Lym-2 x CD16	CD16 x CD19	ohne Anti- körper	Lym-2 x CD16	CD16 x CD19
ADCC	Test 1	24	31	49	45	41	60
	Test 2	33	25	28	46	40	52
	Test 3	20	46	77	26	40	77
	Test 4	40	57	100	26	45	85
	Test 5	23	30	36	100	60	60
	Test 6	0	14	-	-	-	-
	Test 7	60	57	-	-	-	-
	Test 8	17	24	-	62	84	-

Tabelle 11

Über ohne Antikörper, Lym-2 x CD16 und CD16 x CD19 vermittelte Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber c-ALL- (gelb), bzw. prä-T-ALL-Blasten (blau), Rohdaten der spezifischen Lyse in Prozent für ein E:T -Verhältnis von 20:1.

Für den Vergleich der über Lym-2 x CD16, beziehungsweise CD16 x CD19 vermittelten Zytotoxizität zeigt sich, dass der CD16 x CD19 Antikörper in nahezu allen Testansätzen zu einer deutlich effizienteren Lyse der Zielzellen

führt (siehe Abbildung 14). Es ergibt sich hierfür allerdings nur für die E:T - Verhältnisse von 20:1, beziehungsweise 5:1 und eine über stimulierte NK-Zellen vermittelte Lyse der Zielzellen ein statistisch signifikanter Vorteil von CD16 x CD19 gegenüber Lym-2 x CD16 ($p= 0,0171$ bei $t= 2,999$, beziehungsweise $p= 0,0148$ bei $t= 3,092$).

Abbildung 14 zeigt den Vergleich der über Lym-2 x CD16 und CD16 x CD19 vermittelten Zytotoxizität von unstimulierten (blau), beziehungsweise stimulierten NK-Zellen (gelb) für alle E:T -Verhältnisse. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen im Säulendiagramm.

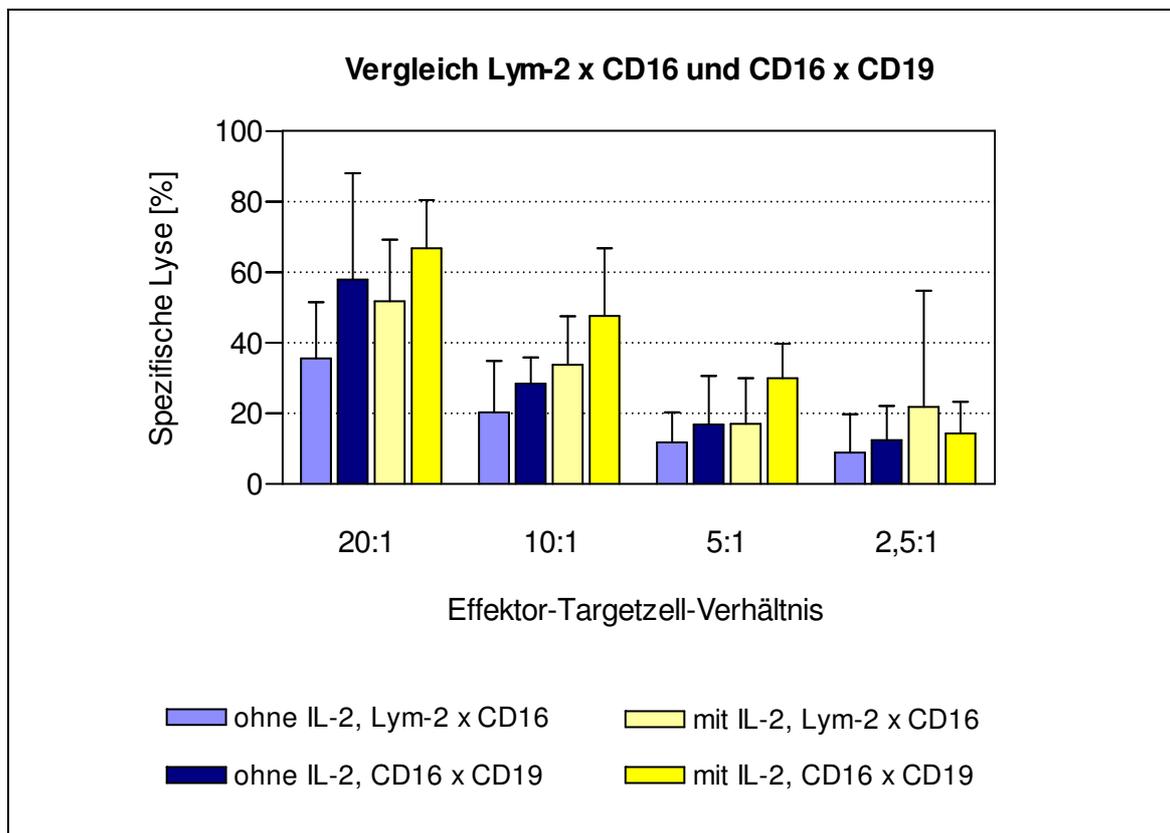


Abbildung 14 Vergleich der über Lym-2 x CD16, beziehungsweise CD16 x CD19 vermittelten Zytotoxizität von unstimulierten und stimulierten NK-Zellen anhand von Mittelwerten und Standardabweichungen.

5 Diskussion

Akute Leukämien im Kindesalter können erfolgreich mit Stammzelltransplantationen behandelt werden. Eine Transplantation ist vor allem bei Leukämien mit hohem Risikoprofil die einzig kurative Behandlungsmöglichkeit. Ein Hauptproblem stellt dabei jedoch die Entstehung eines Rezidivs aus einer Minimalen Resterkrankung dar (Blair et al. 2005).

Neue Ansätze, die Rezidivrate nach einer Stammzelltransplantation zu senken, bilden unter anderem zelluläre Immuntherapien mit NK-Zellen. NK-Zellen stellen vor allem nach haploidenten Stammzelltransplantationen im Stadium einer Minimalen Resterkrankung einen vielversprechenden Therapieansatz dar. Sie besitzen gegenüber zytotoxischen T-Zellen den großen Vorteil, eine Graft-versus-Leukemia Reaktion, jedoch keine Graft-versus-Host Disease zu vermitteln (Zeis et al. 1997; Farag et al. 2002; Ruggeri et al. 2002). Die Fähigkeit der NK-Zellen leukämisch transformierte Zellen zu erkennen und zu lysieren kann durch den Einsatz spezifischer monoklonaler Antikörper zur Induktion einer ADCC-abhängigen Tumorzellyse noch potenziert werden (Lang et al. 2004; Iannello et al. 2005). Monoklonale Antikörper sollten hierzu gegen Antigene gerichtet sein, die möglichst tumorspezifisch sind und somit hauptsächlich oder sogar ausschließlich von Tumorzellen exprimiert werden (Piccaluga et al. 2006). Zudem sollten diese Antigene in stabiler und möglichst hoher Expressionsdichte auf den entsprechenden Tumorzellen vorhanden sein (Iannello et al. 2005). Des Weiteren muss ein monoklonaler Antikörper zur Vermittlung von ADCC eine hohe Affinität zur Effektorzelle, im Falle der NK-Zelle zu deren FcγRIII-Rezeptor (CD16), aufweisen, um eine hohe Anti-Tumor Aktivität vermitteln zu können (Bowles et al. 2006).

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob ein bispezifischer, monoklonaler Lym-2 x CD16 Antikörper die Effizienz einer NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität gegenüber pädiatrischen ALL-Blasten erhöhen kann. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die durch diesen Antikörper vermittelte spezifische Lyse von leukämischen Blasten einen Vorteil gegenüber der Lysefähigkeit eines bispezifischen CD16 x CD19 Antikörpers bringt.

Dazu wurde zunächst mittels quantitativer Durchflusszytometrie die Expressionsdichte des Lym-2 Antigens auf pädiatrischen leukämischen Blasten mit der auf gesunden pädiatrischen B-Zellen verglichen. Analog hierzu wurden zudem die Expressionsdichten der Oberflächenantigene W6/32 und CD19 bestimmt. Danach sollte die zytotoxische Aktivität angereicherter NK-Zellen von gesunden Spendern gegenüber kryokonservierten Blasten, welche zuvor mit Lym-2 x CD16 inkubiert wurden, bestimmt werden. Zudem wurde die über einen bispezifischen CD16 x CD19 und einen murinen CD19 Antikörper vermittelte Zytotoxizität bestimmt.

5.1 Methodenkritik

5.1.1 Quantitative Durchflusszytometrie

Die quantitative Durchflusszytometrie erlaubt die Bestimmung der Expressionsdichte eines bestimmten Antigens pro Zelle. So können Zellpopulationen hinsichtlich der Expressionsdichte verschiedener Oberflächenantigene miteinander verglichen werden. Dabei wird die Antikörperbindungskapazität des zu untersuchenden Antigens als Surrogatparameter für die jeweilige quantitative Antigenexpression herangezogen (Gratama et al. 1998).

In dieser Arbeit wurden die Expressionsdichten der Oberflächenantigene Lym-2, W6/32 und CD19 auf leukämischen Blasten und auf gesunden B-Zellen verglichen. Zur Durchführung der Expressionsanalysen wurde das Quifikit von Dako verwendet. Die Verwendung sogenannter Calibration Beads mit bestimmter, chargenspezifischer Antikörperdichte erlaubt eine vom Fluorochromgehalt der einzelnen, zu untersuchenden Antikörper unabhängige Berechnung der Fluoreszenzintensität (Gratama et al. 1998). Allerdings wurde bereits in mehreren Studien ein Einfluss verschiedener Antikörper auf die jeweils ermittelten Antigendichten beschrieben. Dafür scheint eine unterschiedliche Kinetik der Interaktion des Antikörpers mit dem zu

untersuchenden Antigen verantwortlich zu sein (Gratama et al. 1998; Lenkei et al. 1998; Smith et al. 1999). Lenkei et al. beschrieben beispielsweise signifikante Unterschiede in der Antikörper-Bindungskapazität desselben Antigens in Abhängigkeit von verschiedenen verwendeten Antikörpern. Als Einflussfaktoren wurden dabei unterschiedliche Hersteller, eine Markierung der Antikörper mit unterschiedlichen Farbstoffen und deren mögliche Epitop-Erkennung beschrieben. Die ermittelten Antikörper-Bindungskapazitäten einzelner, untersuchter Antigene unterschieden sich hierbei signifikant um 20 bis 40% (Lenkei et al. 1998). Barnett et al. beschrieben des Weiteren eine Abhängigkeit der ermittelten Antigenexpressionsdichten von dem pH-Wert der Testansätze, der Inkubationszeit und -temperatur, der Antikörperkonzentration, der Färbemethode und der verwendeten Lyseagenzien (Barnett et al. 1998). Ein direkter interlaborärer Vergleich von Ergebnissen scheint daher schwer möglich.

Alle hier durchgeführten Tests wurden mit den gleichen Reagenzien und in gleicher Abfolge und Methode durchgeführt. Durch die Einstellung der zu untersuchenden Zellen auf eine bestimmte Zellzahl und die Hinzugabe des Antikörpers in einer bestimmten Konzentration konnte das Vorliegen der Antikörper im Überschuss gewährleistet werden. Smith et al. beschrieben dies als eine weitere Voraussetzung für standardisierte Ergebnisse (Smith et al. 1999).

5.1.2 Anreicherung von NK-Zellen

Mit der Methode des magnet-activated cell-sorting (MACS) können bestimmte Zellen in einer Zellpopulation selektiv magnetisiert und so von den restlichen Zellen abgetrennt werden. In dieser Arbeit erfolgte eine positive Anreicherung von NK-Zellen mit CD56 Microbeads.

Der therapeutische Einsatz von NK-Zellen war lange Zeit unter anderem dadurch limitiert, dass NK-Zellen nur schwer und nicht in genügend großer Anzahl gewonnen werden konnten. In mehreren Studien konnte inzwischen gezeigt werden, dass mittels MACS bestimmte Zellen in großer Reinheit und

Anzahl, schnell und mit erhaltener Zellfunktion für klinische Zwecke angereichert werden können (Lang et al. 2002; Koehl et al. 2005). Klingemann et al. konnten beispielsweise mit CD56 Microbeads aus pMNCs CD56-positive Zellen in einer Reinheit von über 90% isolieren. Dabei betrug der Anteil CD56-positiver / CD3-negativer NK-Zellen 60,6 +/-10,8% und der Anteil CD56-positiver / CD3-positiver NKT-Zellen 30,4 +/-8,6% (Klingemann et al. 2004). Auch Geiselhart et al. konnten mit dieser Methode CD56-positive Zellen in einer Reinheit von 98% isolieren (Geiselhart et al. 1996). Hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens, Phänotyps und zytotoxischen Potentials zeigten so angereicherte Zellen keine Beeinträchtigungen (Geiselhart et al. 1996; Klingemann et al. 2004). Miltenyi et al. konnten zudem zeigen, dass auch das Lichtstreuungs- und Fluoreszenzverhalten der Zellen durch eine Anreicherung mit Microbeads nicht beeinflusst werden (Miltenyi et al. 1990).

Ein Problem in der Anreicherung von NK-Zellen mit CD56 Microbeads besteht in einer Mitanreicherung CD56-positiver NKT-Zellen. Mit einer zusätzlichen T-Zelldepletion kann eine deutlich reinere Zellfraktion gewonnen werden, gleichzeitig gehen dabei jedoch nochmals ca. 15% der Zellen verloren (Pfeiffer 2004). In den hier durchgeführten Experimenten wurden deshalb die mitangereicherten NKT-Zellen vernachlässigt.

5.1.3 Test auf natürliche und Antikörper-vermittelte Zytotoxizität

Mit der hier angewendeten und 1996 von Blomberg et al. beschriebenen Methode des BATDA-release assays kann das zytotoxische Potential von Lymphozyten gegenüber verschiedenen Zielzellen bestimmt werden (Blomberg et al. 1996). Als Markierung für die aus lysierten Zellen freigesetzten TDA-Moleküle diente hierbei fluoreszierendes Europium.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die Zytotoxizität von gesunden Spender-NK-Zellen gegenüber kryokonservierten pädiatrischen ALL-Blasten mithilfe des Lym-2 x CD16 Antikörpers gegenüber der natürlichen Zytotoxizität von NK-Zellen verbessern lässt. Zudem sollte untersucht werden, ob der Lym-2

x CD16 Antikörper einen Vorteil gegenüber einem CD16 x CD19 Antikörper bringt.

Für die in vitro Bestimmung der zellulären Zytotoxizität verschiedener Lymphozyten stellt die Methode des BATDA-release assays mit fluoreszierendem Europium eine gute Alternative zum weitverbreiteten, radioaktiven ⁵¹Chrom-Freisetzungstest dar. Blomberg et al. beschrieben die Methode als sensitiver, spezifischer und schneller: Eine hohe Sensitivität des Testverfahrens kann durch die proportionale Beziehung der Anzahl des aufgenommenen Europiums zur TDA-Konzentration erreicht werden. So können selbst einzelne Zellen detektiert werden. Des Weiteren erfolgt die Freisetzung von TDA nach erfolgter Lyse spezifischer als von ⁵¹Chrom. Das Markieren der Zielzellen mit TDA, die Freisetzung des Markers und dessen anschließende Detektion mit Europium gelingen zudem schneller (Blomberg et al. 1986).

Eine Schwierigkeit hinsichtlich der Auswertung der in dieser Arbeit ermittelten Testwerte ergab sich durch die teils hohe Spontanlyse der Blasten. Der Unterschied von Maximal- zu Spontanlyse war damit teilweise zu gering, um valide Testergebnisse zu erzielen (siehe 3.5.4). Die Tests wurden in diesem Fall wiederholt.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Quantitative Durchflusszytometrie

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob ein bispezifischer Lym-2 x CD16 Antikörper effizient Zytotoxizität gesunder Spender-NK-Zellen gegenüber kryokonservierten pädiatrischen ALL-Blasten vermitteln kann. Mit quantitativen FACS-Analysen wurde zunächst die Lym-2 Expressionsdichte auf leukämischen Blasten pädiatrischer Patienten im Vergleich zu gesunden, pädiatrischen B-Zellen ermittelt. Zusätzlich wurde für dasselbe Probenmaterial

jeweils die Expressionsdichte der Oberflächenantigene W6/32 und CD19 bestimmt.

Expressionsanalyse mit W6/32

Hinsichtlich ihrer W6/32 Expressionsdichte zeigten gesunde B-Zellen und leukämische Blasten keinen signifikanten Unterschied (p-Wert von 0,2997 bei einem t-Wert von 1,0742). Die ermittelten Werte wiesen insbesondere für die B-Zellen eine große Streubreite auf.

Bei den B-Zellen (n=9) lagen die Werte zwischen 127757 und 370542. Bei den Blasten (n=8) schwankten die Werte zwischen 148459 und 220633 Antigenen pro Zelle.

Der W6/32 Antikörper bindet an HLA-Klasse-I-Moleküle. HLA-Klasse-I-Moleküle finden sich auf der Oberfläche aller kernhaltigen Körperzellen. Auf virusinfizierten oder maligne transformierten Zellen wird ihre Expression meist herunterreguliert (Verheyden et al. 2004). Wie bereits dargestellt erkennen NK-Zellen eine aberrante, beziehungsweise eine verminderte HLA-Klasse-I Expression und können so veränderte körpereigene Zellen erkennen und lysieren. Es konnte gezeigt werden, dass eine Blockierung von HLA-Klasse-I-Epitopen auf entsprechenden Zielzellen mit dem W6/32 Antikörper deren Lyse durch NK-Zellen potenzieren kann (Lang et al. 2004).

Insgesamt zeigte sich auch hier, dass die gesunden B-Zellen zu einem großen Teil eher mehr HLA-Klasse-I-Moleküle exprimierten als die untersuchten leukämischen Blasten, allerdings war der Unterschied nur gering. Eine hohe HLA-Klasse-I Expression auf pädiatrischen B-ALL-Blasten im Gegensatz zu AML-Blasten wurde bereits beschrieben (Ruggeri et al. 1999; Farag et al. 2002). Dies erklärt zum Teil den bisher ineffektiven Einsatz von NK-Zellen zur Immuntherapie bei akuten B-Zellleukämien. Im Gegensatz dazu konnten bei akuten myeloischen Leukämien bereits Erfolge mit NK-Zelltherapien erzielt werden (Aversa et al. 1998; Farag et al. 2002; Amrolia et al. 2003; Miller et al. 2005).

Expressionsanalyse mit CD19

Für den Vergleich der CD19 Expressionsdichte konnte hier gezeigt werden, dass die untersuchten c-ALL-Blasten signifikant mehr Lym-2 exprimierten als die gesunden B-Zellen (p-Wert von 0,0343 bei einem t-Wert von 2,1935). Die ermittelten Werte wiesen insbesondere für die Blasten eine große Streubreite auf.

Für die gesunden B-Zellen (n=27) schwankten die Werte zwischen 5100 und 12914 Antigenen pro Zelle. Für die Blasten der B-Zellreihe (n=14) ergaben sich hauptsächlich Werte zwischen 6886 und 17630 Antigenen pro Zelle. Für eine der Proben ergab sich ein deutlich geringerer Wert (siehe 4.1.2, Abbildung 5).

CD19 stellt hinsichtlich seiner hohen Expression auf der Oberfläche nahezu aller B-Zellmalignome ein ideales Zielmolekül in der Vermittlung von Antitumoreffekten über monoklonale Antikörper dar. Gudowius et al. bestimmten das Expressionsprofil von 181 Proben pädiatrischer akuter lymphatischer Leukämien. Darin enthalten waren 9 pro-B-ALL-, 110 common-ALL- und 62 prä-B-ALL-Proben. 99% der untersuchten akuten lymphatischen Leukämien exprimierten CD19 auf über 90% der Blasten (Gudowius et al. 2006). Allerdings findet sich das CD19 Antigen auch auf gesunden reifen und unreifen B-Zellen und ist damit nicht spezifisch für maligne B-Zellen. Insgesamt ergeben sich jedoch quantitative Unterschiede zwischen malignen und gesunden B-Zellen hinsichtlich deren Expressionsdichte von CD19. Farahat et al. konnten in quantitativen FACS-Analysen eine signifikant niedrigere Expressionsdichte von CD19 auf normalen B-Zell-Vorläuferzellen im Vergleich zu B-ALL-Blasten zeigen. Dabei exprimierten normale B-Zellen im Mittel unter 10000 CD19-Antigene pro Zelle, B-ALL-Blasten über 10000 Antigene pro Zelle (Farahat et al. 1995). Auch in dieser Arbeit zeigte sich analog zu der zitierten Studie eine insgesamt eher niedrigere CD19 Expression auf den gesunden B-Zellen im Vergleich zu den c-ALL-Blasten.

5.2.2 Expressionsanalyse mit Lym-2

Für den Vergleich der Lym-2 Expressionsdichte konnte hier gezeigt werden, dass gesunde B-Zellen signifikant mehr Lym-2 exprimierten als die untersuchten leukämischen Blasten (p-Wert von 0,0004 bei einem t-Wert von 3,7345). Allerdings wiesen die Expressionsdichten von Lym-2 insbesondere auf den B-Zellen große Variationsbreiten auf.

Auf den untersuchten gesunden B-Zellen (n=38) schwankten die Werte hauptsächlich zwischen 1342 und 14750 Antigenen pro Zelle. Für fünf der Proben ergaben sich Werte zwischen 20000 und 50000 Antigenen pro Zelle. Zwei der Proben wiesen eine sehr geringe, beziehungsweise keine Lym-2 Expression auf (siehe 4.1.3, Abbildung 7). Auf den Blasten (n=23) schwankten die Werte vor allem zwischen 134 und 7360 Antigenen pro Zelle. Für drei der Proben ergaben sich auch hier deutlich geringere, beziehungsweise keine Lym-2 Expressionen (siehe 4.1.3, Abbildung 7). Die Lym-2 Expressionsdichte wurde hier auf Blasten von 23 verschiedenen Patienten getestet. Darunter befanden sich 21 common-ALL-Proben und jeweils eine AML-M4-, beziehungsweise eine AML-M5-Probe. Die AML-M4-Probe exprimierte 32 Antigene pro Zelle, wohingegen die AML-M5-Probe 6208 Antigene pro Zelle exprimierte. Dabei muss die hohe Expression auf der AML-M5-Probe als Fehler angesehen werden. In der Vergangenheit konnte eine eindeutige B-Zellspezifität für Lym-2 gezeigt werden (Epstein et al. 1987).

Epstein et al. konnten zeigen, dass der monoklonale Antikörper Lym-2 spezifisch mit der Oberfläche von normalen und maligne transformierten B-Zellen reagiert. Lym-2 reagierte im Gegensatz dazu nicht mit T-Lymphozyten, Zellen der myeloischen und erythrozytären Reihe und soliden Tumor-Zelllinien diversen Ursprungs. Die B-Zellspezifität wurde zum einen in qualitativen FACS-Analysen von Vollblut gesunder Spender gezeigt, wobei 86% der B-Zellen für Lym-2 positiv waren. Zum anderen wurden 36 Lymphom- und 15 Leukämie-Biopsien hinsichtlich ihrer Expression von Lym-2 untersucht. Gewebeproben von chronischen B-Zelleukämien waren beispielsweise zu 80% für Lym-2 positiv. Dabei waren zudem einzelne Populationen zu einem hohen Prozentsatz

positiv angefärbt. Des Weiteren ergab sich für Lym-2 eine relativ große Antikörper-Bindungskapazität pro Tumorzelle, was auf eine hohe Expressionsdichte des Antigens auf malignen B-Zellen hinweist (Epstein et al. 1987). Zunächst wurde also davon ausgegangen, dass Lym-2 auf malignen B-Zellen stärker exprimiert wird als auf gesunden B-Zellen (Epstein et al. 1987).

Diese Annahme ließ sich in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen. Es konnte im Gegenteil eine signifikant höhere Expressiondichte auf gesunden B-Zellen bei einer nur schwachen Expression von Lym-2 auf den getesteten Blasten gezeigt werden. Allerdings gibt es bisher keine Studien, die analog zur vorliegenden Arbeit eine Aussage zum direkten quantitativen Vergleich von Antikörperbindungsstellen für Lym-2 auf gesunden und malignen B-Zellen treffen. Epstein et al. konnten lediglich eine doppelt so hohe Affinität des Lym-2 Antikörpers für die Lymphom-Zelllinien Raji und ARH-77 im Gegensatz zu B-Zellen aus Tonsillen gesunder Spender nachweisen. Zudem war die Antikörper-Bindungskapazität für Lym-2 auf Raji- und ARH-77-Zellen höher und konstanter. Gesunde B-Zellen zeigten in Abhängigkeit von ihrem Reifungsgrad ein inhomogenes Muster hinsichtlich ihrer Lym-2 Antikörper-Bindungskapazität (Epstein et al. 1987).

Das Antigen auf den B-Zellen an das der Lym-2 Antikörper bindet war zunächst unbekannt. Würflein et al. konnten schließlich zeigen, dass der Lym-2 Antikörper mit einer Variante des HLA-Klasse-II-Komplexes auf der Oberfläche von B-Lymphozyten reagiert (Würflein et al. 1998). HLA-Klasse-II Moleküle werden auf den Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems exprimiert. Mehrere Studien konnten zeigen, dass maligne entartete Zellen eine veränderte Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen aufweisen (Guy et al. 1986; Pesando et al. 1986). Pesando et al. verglichen beispielsweise die HLA-Klasse-II Expression auf CALLA-positiven, malignen B-Zellpopulationen und gesunden B-Zellen. Sie zeigten, dass maligne B-Zellen häufig einen oder mehrere Subtypen der HLA-Klasse-II-Antigene nicht exprimieren (Pesando et al. 1986). Dies unterstützt die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der schwachen Antikörper-Bindungskapazität für Lym-2 auf den untersuchten B-ALL-Blasten. Eine aberrante Expression von HLA-Antigenen auf Tumorzellen

führt dazu, dass der maligne Klon nicht von immunkompetenten Zellen erkannt werden kann und somit ungehindert proliferiert. Auch Guy et al. untersuchten periphere Blutzellen von Patienten mit chronischer B-Zell-Leukämie und akuter lymphatischer Leukämie hinsichtlich deren Expression von HLA-Klasse-II Antigenen. Dabei unterlag die HLA-Klasse-II Expression auf den Blutzellen von Patienten mit chronischer B-Zell-Leukämie einer großen inter-, beziehungsweise intraindividuellen Variation. Die Zellen von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie exprimierten allerdings zu nahezu 100% HLA-Klasse-II Moleküle (Guy et al. 1986).

5.2.3 Aktivität angereicherter NK-Zellen gegenüber Blasten

In dieser Arbeit sollte die Zytotoxizität von NK-Zellen gesunder Spender gegenüber leukämischen Blasten in Abhängigkeit eines bispezifischen Lym-2 x CD16 Antikörpers zur Vermittlung von ADCC bestimmt werden. Zum Vergleich wurden zusätzlich Zytotoxizitätstests mit einem bispezifischen CD16 x CD19 und einem murinen CD19 Antikörper durchgeführt. Die Blasten stammten von sechs verschiedenen Patienten. Bei fünf der Patienten war eine common-ALL und bei einem Patienten eine prä-T-ALL diagnostiziert. Als Effektoren dienten NK-Zellen von fünf verschiedenen gesunden Spendern.

Zytotoxizität von CD16 x CD19 und CD19

CD16 x CD19 ist ein bispezifischer Antikörper, der zum einen an den FcγRIII-Rezeptor der NK-Zelle und zum anderen an das CD19 Antigen auf B-Zellen bindet und so effizient ADCC vermitteln kann. Ein muriner CD19 Antikörper für den keine Effektivität in der Vermittlung von ADCC gezeigt werden konnte diente als Kontrolle (Lang et al. 2004; Bruenke et al. 2005).

Insgesamt konnte das zytotoxische Potential unstimulierter, beziehungsweise IL-2 stimulierter NK-Zellen durch den Einsatz des CD16 x CD19 Antikörpers gegenüber der natürlichen Zytotoxizität deutlich gesteigert werden. Der murine CD19 Antikörper vermittelte wie erwartet keine effiziente ADCC und verbesserte somit die Zytotoxizität der NK-Zellen nicht. Für die über CD16 x

CD19 vermittelte Zytotoxizität von unstimulierten, beziehungsweise IL-2 stimulierten NK-Zellen (für ein E:T -Verhältnis von 20:1) ergab sich im Mittel eine spezifische Lyse von 58,0 +/-30,0%, beziehungsweise 66,8 +/-13,7% (n=5). Dabei schwankten die Werte zwischen 28 und 100% bei einem Median von 49,0%, beziehungsweise zwischen 52 und 85% bei einem Median von 60%. Für die über einen murinen CD19 Antikörper vermittelte Zytotoxizität von unstimulierten, beziehungsweise stimulierten NK-Zellen (für ein E:T -Verhältnis von 20:1) ergab sich im Mittel eine spezifische Lyse von 29,8 +/-11,3%, beziehungsweise 33,8 +/-11,7% (n=5). Hier schwankten die Werte zwischen 17 und 39% bei einem Median von 36%, beziehungsweise 25 und 52% bei einem Median von 28%. Die Werte für die über CD16 x CD19 und CD19 vermittelten spezifischen Lysen unterlagen also großen interindividuellen Schwankungen. Diese Variabilität lässt sich eventuell auf eine unterschiedlich große Übereinstimmung von HLA-Klasse-I Merkmalen auf Effektor- und Zielzellen zurückführen. Wie bereits dargestellt fördert ein sogenanntes HLA-mismatch die Zytotoxizität allogener NK-Zellen gegenüber Zielzellen (Ruggeri et al. 2002; Giebel et al. 2003; Leung et al. 2004). Auch variable Expressionsmuster hinsichtlich aktivierender Rezeptoren auf NK-Zellen unterschiedlicher Spender können für die große Variationsbreite verantwortlich sein. Die CD19 Expressionsdichte auf den verschiedenen Blastenproben korreliert zudem mit der über CD16 x CD19 vermittelten Lysierbarkeit derselben Blasten (siehe 4.2.2). Die geringe Anzahl der Tests limitiert allerdings die statistische Aussagekraft zur Korrelation von Expressionsdichte und Lysierbarkeit.

5.2.4 Literatur zur Zytotoxizität von CD19 Antikörpern

CD19 ist ein universaler B-Zellmarker. Wie bereits dargestellt exprimieren nahezu alle Leukämien und Lymphome der B-Zellreihe CD19 auf ihrer Oberfläche (Gudowius et al. 2006). Des Weiteren finden sich CD19 Moleküle nur auf entsprechenden Zelloberflächen und nicht ungebunden im peripheren Blut (Bruenke et al. 2005). CD19 stellt damit einen vielversprechenden

Angriffspunkt für die Therapie von B-Zellmalignomen mit monoklonalen Antikörpern dar.

In mehreren Studien wurde bereits über den erfolgreichen Einsatz von monoklonalen CD19 Antikörpern *in vitro* und *in vivo* berichtet (Vuist et al. 1989; Pietersz et al. 1995; Lang et al. 2004). So konnten beispielsweise Lang et al. zeigen, dass ein chimärer CD19 Antikörper effizient ADCC gegenüber B-ALL-Blasten und MHH-Zellen vermitteln kann. Die Zytotoxizität von IL-2 stimulierten NK-Zellen gesunder Spender gegenüber kryokonservierten B-ALL-Blasten konnte mit dem CD19 Antikörper nahezu auf das Doppelte gegenüber der natürlichen Lysefähigkeit gesteigert werden: Für die über CD19 vermittelte Zytotoxizität der Spender-NK-Zellen konnten Lyseraten von mehr als 90% erzielt werden, die natürliche Zytotoxizität der NK-Zellen erreichte dagegen Lyseraten von unter 50%. Zudem konnten mit pMNC von Patienten nach einer Stammzelltransplantation signifikante Lyseraten gegenüber MHH-Zellen erreicht werden. Ein muriner CD19 Antikörper konnte im Gegensatz dazu keine effiziente Lyse der Zielzellen vermitteln (Lang et al. 2004).

Studien am Mausmodell zeigten, dass monoklonale CD19 Antikörper das Wachstum von B-Zelltumor-Zelllinien über die Induktion von Zellzyklusarresten inhibieren können (Vuist et al. 1989). So konnten immunkompetente Zellen aus peritonealem Mäuseexsudat über einen CD19 Antikörper effektiv ADCC gegenüber zuvor subkutan in die Mäuse injizierte Daudi-Zellen vermitteln. Eine weitere Tumorzellproliferation konnte so effektiv verhindert werden (Vuist et al. 1989). Auch Pietersz et al. stellten einen chimären CD19 Antikörper her, der das Tumorstadium von in SCID-Mäuse subkutan injizierten Sultan-Zellen inhibieren konnte (Pietersz et al. 1995).

Klinische Studien zur Therapie von B-Zellmalignomen mit CD19 Antikörpern zeigten jedoch bisher nicht den erhofften Erfolg (Hekman et al. 1991). Konventionelle monoklonale Antikörper sind aus mehreren Gründen in ihrem erfolgreichen klinischen Einsatz limitiert. Dafür scheint vor allem der Fc-Teil klassischer Antikörper verantwortlich zu sein (Peipp et al. 2002; Kufer et al. 2004). Zum einen können unspezifische Bindungen des Fc-Fragments an potente Effektorzellen zu einer hohen *in-vivo* Toxizität monoklonaler Antikörper

führen. Zum anderen kann eine Interaktion der Fc-Domäne des Antikörpers mit Fc-Rezeptoren auf nicht-zytotoxischen Zellen (Thrombozyten und B-Zellen) oder eine Interaktion mit nicht-aktivierenden (Granulozyten), beziehungsweise inhibitorischen Fc-Rezeptoren (Monozyten und Makrophagen) in-vivo zu einer Reduktion der zytotoxischen Aktivität von monoklonalen Antikörpern führen (Peipp et al. 2002). Des Weiteren spielen auch mögliche Fc-Rezeptorpolymorphismen auf den Zielzellen des Empfängers eine entscheidende Rolle für den erfolgreichen klinischen Einsatz von Antikörpern.

Neuere bispezifische Antikörper haben unter anderem den Vorteil, zum einen an tumorassoziierte Antigene binden zu können und zum anderen selektiv an bestimmte zytotoxische Triggermoleküle auf Effektorzellen zu binden. So können zytotoxische Zellen effektiv zur Tumorzelllyse rekrutiert werden. Des Weiteren besitzen neuere bispezifische Antikörper keine Fc-Domäne und lösen damit weniger unerwünschte Effekte aus (Kufer et al. 2004). Erste Versuche mit bispezifischen CD19 Antikörpern wurden mit der Kopplung an CD3 zur Rekrutierung von zytotoxischen T-Zellen unternommen (Haagen et al. 1994; Lefterova et al. 2000; Manzke et al. 2001; Reusch et al. 2004). Zytotoxische T-Zellen besitzen als potenteste Immuneffektoren keine Fc-Rezeptoren und konnten somit bis dahin keine zytotoxischen Effekte über monoklonale Antikörper vermitteln (Kufer et al. 2004). Obwohl mit bispezifischen CD19 x3 Antikörpern eine signifikante lytische Aktivität gegenüber B-Zellmalignomen erreicht werden konnte, ergaben sich dabei Probleme durch eine unspezifische T-Zellaktivierung und damit eine hohe in-vivo Toxizität der Antikörper (Segal et al. 1999; Reusch et al. 2004).

Auch mit der Kopplung von Antikörpern an CD16 zur Rekrutierung von NK-Zellen konnten bereits Erfolge verzeichnet werden. Ein bispezifischer CD30 x16 Antikörper ohne Fc-Teil befindet sich bereits zur Therapie von Hodgkin-Lymphomen in klinischer Erprobung (Hombach et al. 1993; Hartmann et al. 1997; Hartmann et al. 2001). In einer ersten Studie konnte damit bei zwei von 15 Patienten eine komplette, beziehungsweise partielle Remission beobachtet werden (Hartmann et al. 1997). In einer zweiten klinischen Erprobung konnte

für CD30 x16 eine relevante Antitumoraktivität in 25% der Fälle gezeigt werden (Hartmann et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit sollte ein bispezifischer CD16 x CD19 Antikörper die über CD19 vermittelte Lysekapazität von NK-Zellen gegenüber B-Zellmalignomen durch die Kopplung an CD16 verbessern. Der CD16-Teil des bispezifischen monoklonalen Antikörpers bindet dabei an den FcγRIII-Rezeptor der NK-Zelle. Mit seiner zweiten Antigen-Bindungsstelle, dem CD19-Teil, reagiert der Antikörper mit dem CD19 Epitop der Zielzelle. In mehreren Studien konnte bereits analog zu dieser Arbeit ein erfolgreicher Einsatz von bispezifischen CD16 x CD19 Antikörpern in der über NK-Zellen vermittelten Zytotoxizität gegenüber malignen B-Zellklonen gezeigt werden (Kipriyanov et al. 2002; Schlenzka et al. 2004; Bruenke et al. 2005). Bruenke et al. verglichen beispielsweise das zytotoxische Potential eines bispezifischen CD16 x CD19 Antikörpers gegenüber dem eines chimären CD19 Antikörpers. In der Vermittlung von ADCC gegenüber B-CLL-, beziehungsweise B-ALL-Blasten war der bispezifische CD16 x CD19 Antikörper einem chimären CD19 Antikörper überlegen. Als Effektoren dienten hier pMNCs gesunder Spender, beziehungsweise pMNCs von Patienten nach allogener Stammzelltransplantation. Für die Zytotoxizität von pMNCs (von Patienten nach allogener Stammzelltransplantation) gegenüber B-ALL-Blasten (bei ein E:T -Verhältnis von 20:1) ergab sich in Verbindung mit dem bispezifischen CD16 x CD19 Antikörper eine spezifische Lyse von über 40%, der chimäre CD19 Antikörper hingegen vermittelte nur eine spezifische Lyserate von über 20% (Bruenke et al. 2005). Im Vergleich dazu konnten in der vorliegenden Arbeit mit dem CD16 x CD19 Antikörper und unstimulierten NK-Zellen gesunder Spender gegenüber kryokonservierten B-ALL-Blasten (auch bei einem E:T -Verhältnis von 20:1) Lyseraten von im Mittel 58% erreicht werden.

Weitere Studien untersuchten den kombinierten Einsatz eines bispezifischen CD16 x CD19 Antikörpers zur Vermittlung von ADCC mit anderen Mechanismen zur Tumorzelllyse (Kipriyanov et al. 2002; Schlenzka et al. 2004). Kipriyanov et al. konnten den Antitumoreffekt von NK-Zellen gegenüber Non-Hodgkin-Lymphomzellen mit einem bispezifischen CD16 x CD19 Antikörper

potenzieren. In Kombination mit einem bispezifischen CD19 x3 Antikörper und einer Kostimulation der zytotoxischen T-Zellen über CD28 konnte die Zytotoxizität von Lymphozyten noch gesteigert werden. Im SCID-Mausmodell mit zuvor injizierten Burkitt-Lymphom-Zellen konnte mit dieser Kombinationstherapie in 80% der Fälle eine komplette Remission erreicht werden. Wurde nur einer der beiden Antikörper verwendet, konnte hingegen nur ein partieller Tumorregress beobachtet werden. Mit dem Einsatz verschiedener Antikörper, die über ihre unterschiedliche Spezifität verschiedene Effektorzellen zum gleichen Zielzellklon rekrutieren, können somit entstehende Synergieeffekte ausgenutzt werden (Kipriyanov et al. 2002). Schlenzka et al. untersuchten eine Kombinationstherapie aus einem bispezifischen CD19 x16 Antikörper und dem Angiogeneseinhibitor Thalidomid. Der alleinige Einsatz von CD16 x CD19 reduzierte die Tumorstadiumsrate von humanen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomzellen in SCID-Mäusen um 50%. Die Kombinationstherapie mit Thalidomid konnte die Tumorstadiumsrate um 74% senken. Bei zwei von fünf Mäusen konnte sogar eine komplette Remission erreicht werden (Schlenzka et al. 2004).

5.2.5 Zytotoxizität von Lym-2 x CD16

Lym-2 x CD16 ist ein bispezifischer monoklonaler Antikörper der zum einen analog zu CD16 x CD19 an den FcγRIII-Rezeptor der NK-Zelle und zum anderen an das Lym-2 Antigen auf B-Zellen bindet und so ADCC vermitteln kann. Hier sollte die über Lym-2 x CD16 vermittelte Zytotoxizität gesunder Spender-NK-Zellen mit der natürlichen und der über CD16 x CD19 vermittelten Zytotoxizität verglichen werden.

Der Lym-2 x CD16 Antikörper verbesserte das zytotoxische Potential von NK-Zellen gegenüber leukämischen Blasten im Vergleich zu deren natürlicher Zytotoxizität deutlich. Allerdings zeigte Lym-2 x CD16 keinen Vorteil gegenüber dem CD16 x CD19 Antikörper. Die über Lym-2 x CD16 vermittelte Lysefähigkeit der NK-Zellen war im Gegenteil deutlich ineffizienter. Für die über Lym-2 x

CD16 vermittelte Zytotoxizität von unstimulierten, beziehungsweise stimulierten NK-Zellen ergab sich (jeweils für ein E:T -Verhältnis von 20:1) im Mittel eine spezifische Lyse von 35,5 +/-16,0% (n=8), beziehungsweise 51,7 +/-17,6% (n=6). Für den Testansatz mit unstimulierten NK-Zellen schwankten die Werte hierbei zwischen 14 und 57% bei einem Median von 30,5%. Für die Tests mit stimulierten NK-Zellen schwankten die Werte zwischen 40 und 84% bei einem Median von 43%. Auch die über Lym-2 x CD16 vermittelten spezifischen Lyseraten unterlagen also großen interindividuellen Schwankungen. Diese Variationen könnten auch hier auf eine unterschiedlich große Übereinstimmung von HLA-Klasse-I Merkmalen auf Effektor- und Zielzellen zurückzuführen sein. Die Kopplung des Lym-2 Antikörpers an das CD16 Epitop auf NK-Zellen und die damit verbundene effektive Vermittlung von ADCC kann diese inhibitorischen Effekte womöglich nur teilweise umgehen. Auch ein unterschiedliches Expressionsniveau aktivierender Rezeptoren auf den verwendeten NK-Zellen könnte eine Erklärung für die hohe Varianz der Ergebnisse sein. Ein Grund für die höhere Effizienz des CD16 x CD19 Antikörpers gegenüber dem Lym-2 x CD16 Antikörper kann die im Vergleich zu CD19 deutlich geringere Expressionsdichte von Lym-2 auf den Zielzellen sein (siehe 4.1.2 und 4.1.3). Auf den Zielzellen stehen somit weniger Angriffsepitope für den Lym-2 x CD16 Antikörper zur Verfügung. Zudem korreliert auch die Lym-2 Expressionsdichte auf den verschiedenen Blastenproben (n=5) in dieser Arbeit mit der über Lym-2 vermittelten Lysierbarkeit derselben Blasten (siehe 4.2.4). Die geringe Anzahl der Tests limitiert allerdings die statistische Aussagekraft zur Korrelation von Expressionsdichte und Lysierbarkeit.

5.2.6 Literatur zur Zytotoxizität von Lym-2 und HLA-Klasse-II Antikörpern

Der Lym-2 Antikörper bindet an eine Variante eines HLA-Klasse-II Moleküls auf normalen und transformierten B-Zellen. HLA-Klasse-II Moleküle stellen vielversprechende Angriffspunkte zur Antikörpertherapie von B-Zellmalignomen dar. Zum einen werden sie auf den Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems wie beispielsweise auf gesunden, aber auch auf der Oberfläche

von maligne transformierten B-Zellen in hoher Anzahl exprimiert (Gudowius et al. 2006). Zum anderen fehlen sie auf hämatopoietischen Stammzellen und kommen nur in geringer Anzahl gelöst im peripheren Blut vor. Allerdings weisen maligne B-Zellen ein teilweise verändertes Expressionsmuster von HLA-Klasse-II-Molekülen auf (Guy et al. 1986; Pesando et al. 1986). Dies führt dazu, dass der maligne Klon nicht von immunkompetenten Zellen erkannt wird und somit ungehindert proliferieren kann. Diese Resistenz gegenüber alloreaktiver Lyse kann durch den Einsatz spezifischer monoklonaler Antikörper zur Induktion einer ADCC-abhängigen Tumorzellyse und zur Aktivierung anderer zytotoxischer Mechanismen umgangen werden.

So konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden, dass gegen HLA-Klasse-II gerichtete Antikörper effizient Antitumoreffekte vermitteln können (Elsasser et al. 1996; Ottonello et al. 1996; Funakoshi et al. 1997; Truman et al. 1997; Bruenke et al. 2004). Ottonello et al. untersuchten beispielsweise einen murinen Lym-1 Antikörper, der mit einem modifizierten HLA-DR Antigen auf malignen B-Zellen reagiert. Zum einen induzierte der Lym-1 Antikörper effizient Komplement-vermittelte Zytotoxizität. Zum anderen führte die Vermittlung von ADCC zu einer effektiven Tumorzellyse (Ottonello et al. 1996). Auch Elsasser et al. konnten mit Hilfe verschiedener, gegen HLA-Klasse-II gerichteter Antikörper eine effektive Vermittlung von ADCC gegenüber vielen B-Zellmalignomen erreichen. Insbesondere G-CSF-stimulierte neutrophile Granulozyten konnten über die Expression ihres FcγRI-Rezeptors ein hohes zytotoxisches Potential, vor allem in Kombination mit einem bispezifischer HLA-Klasse-II xFcγRI Antikörper, entwickeln (Elsasser et al. 1996). Bruenke et al. generierten einen bispezifischen HLA-Klasse-II xCD16 Antikörper analog zu dem hier verwendeten Lym-2 x CD16 Antikörper zur Rekrutierung von NK-Zellen. Mit Hilfe von pMNC gesunder Spender konnte hiermit eine spezifische Lyse von malignen B-Zelllinien, aber auch von aus Patienten isolierten B-CLL-Blasten erreicht werden. Es wurden dabei spezifische Lyseraten von über 50% gegenüber den Zelllinien, beziehungsweise Lyseraten zwischen 15 und 30% gegenüber den B-CLL-Blasten (jeweils für ein E:T –Verhältnis von 40:1) erreicht (Bruenke et al. 2004).

Neben dem Mechanismus der Komplement-, beziehungsweise Antikörper-abhängigen Tumorzelllyse können gegen HLA-Klasse-II gerichtete Antikörper zudem direkte antiproliferative Effekte und die Induktion von Apoptose vermitteln (Funakoshi et al. 1997; Truman et al. 1997). Es konnte gezeigt werden, dass über HLA-Klasse-II vermittelte Signale, die normale Lymphozyten hinsichtlich ihrer Proliferationsfähigkeit stimulieren, das Wachstum von B-Zellmalignomen inhibiert und Zelltod induziert werden kann (Funakoshi et al. 1997; Truman et al. 1997). Des Weiteren führen über HLA-Klasse-II vermittelte Signale allgemein zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Apoptosesignalen (Truman et al. 1997). B-Lymphozyten können beispielsweise nach Stimulation mit HLA-Klasse-II Antikörpern Fas-Rezeptoren exprimieren. An diese Rezeptoren binden dann Fas-Liganden auf zytotoxischen Effektorzellen. Dies führt über eine intrazelluläre Signalkaskade zur Induktion von Apoptose und zur Aktivierung von Kaspasen, die die Zielzelle zerstören.

So stellen HLA-Klasse-II Moleküle insgesamt vielversprechende Zielepitope in der Antikörpertherapie von B-Zellmalignomen dar. Aufgrund der hohen Expression von HLA-Klasse-II auf allen Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems wurde allerdings eine erhebliche Toxizität von gegen HLA-Klasse-II Moleküle gerichteten Antikörpern beschrieben (Wurflein et al. 1998; Bruenke et al. 2004).

Der Lym-2 Antikörper reagiert hingegen spezifisch mit einem HLA-Klasse-II Epitop, das ausschließlich von B-Zellen exprimiert wird. In der Vergangenheit wurde die Expression von Lym-2 auf verschiedenen B-Zell-Malignomzellen nachgewiesen und zudem angenommen, dass Lym-2 für maligne B-Zellen spezifisch ist oder darauf zumindest höher exprimiert wird (Epstein et al. 1987). Lym-2 wäre somit ein ideales Zielmolekül in der Antikörpertherapie von B-Zellmalignomen. Außerdem wurde neben einer hohen Bindungsreaktivität und einer hohen Affinität zu den meisten B-Zellmalignomen eine hohe Anzahl an Antikörperbindungsstellen auf malignen B-Zellen als Eigenschaft postuliert, die einen erfolgreichen therapeutischen Einsatz eines Lym-2 Antikörpers möglich machen können (Epstein et al. 1987).

In mehreren Studien wurde daraufhin die Effektivität eines über Lym-2 vermittelten Antitumoreffektes gegenüber B-Zellmalignomen untersucht (Funakoshi et al. 1997; Hornick et al. 1997; Wurflein et al. 1998). Dabei konnte gezeigt werden, dass der Lym-2 Antikörper wie auch andere gegen HLA-Klasse-II gerichtete Antikörper nicht nur über die Vermittlung von ADCC, sondern auch über andere Wirkmechanismen von monoklonalen Antikörpern Zytotoxizität vermitteln kann (Funakoshi et al. 1997). Funakoshi et al. testeten beispielsweise einen murinen und einen chimären Lym-2 Antikörper hinsichtlich der Fähigkeit, Zytotoxizität gegenüber verschiedenen humanen B-Lymphomzelllinien zu vermitteln. Für das Lym-2 Epitop auf normalen B-Zellen konnte eine Interaktion mit intrazellulären Signalkaskaden zur Signaltransduktion von Wachstumsvorgängen gefunden werden. Gegenüber malignen B-Zellen induzierten beide Lym-2 Antikörper allerdings direkte antiproliferative Effekte und Apoptose. Des Weiteren konnten beide Antikörper das Überleben von SCID-Mäusen mit verschiedenen humanen B-Zelllymphomen durch die Induktion von Apoptose oder anderen, noch unklaren zytotoxischen Mechanismen signifikant verbessern (Funakoshi et al. 1997).

In weiteren Studien konnte für gegen Lym-2 gerichtete Antikörper auch die Fähigkeit zur Vermittlung von ADCC gezeigt werden. Hornick et al. verglichen einen murinen und einen chimären Lym-2 Antikörper bezüglich ihres zytotoxischen Potentials, mit Hilfe von pMNC gesunder Spender ADCC gegenüber ARH-77-Zellen zu vermitteln. Hinsichtlich des lytischen Potentials konnte ein signifikanter Vorteil des chimären Lym-2 Antikörpers gezeigt werden. Bei einem E:T -Verhältnis von 50:1 vermittelte der chimäre Lym-2 Antikörper eine spezifische Lyse von 65%. Der murine Lym-2 Antikörper vermittelte hingegen eine spezifische Lyse von nur 10%. Des Weiteren konnten Hornick et al. mit der Kopplung des chimären Lym-2 Antikörpers an Fusionsproteine eine noch höhere Tumorzelllyse im Mausmodell erreichen. Mit dem an GM-CSF, beziehungsweise IL-2 gebundenen Lym-2 Antikörper konnte hierbei eine spezifische Lyse von nahezu 100% erreicht werden (Hornick et al. 1997). Die Zytokine beeinflussten die Bindungskapazität von Antikörpern an die Zielzellen dabei nicht und auch die Bioaktivität der Zytokine blieb erhalten (Hornick et al.

1997). Allgemein können mit der Kopplung von Zytokinen an monoklonale Antikörper hohe Zytokinkonzentrationen im Tumor im Gegensatz zu gesundem Gewebe erreicht werden. So kann eine spezifische Anreicherung von Antikörpern und Zytokinen im Tumor erreicht werden. Dies minimiert zum einen die systemische Zytotoxizität der Zytokine. Zum anderen steigert die Kopplung an beispielsweise IL-2 oder GM-CSF das immunotherapeutische Potential von monoklonalen Antikörpern (Bianchi et al. 1989; Vuist et al. 1989).

Neben dem in dieser Arbeit getesteten bispezifischen Lym-2 x CD16 Antikörper zur Rekrutierung von NK-Zellen wurde bereits das zytotoxische Potential eines bispezifischer Lym-2 x22 Antikörper untersucht (Wurflein et al. 1998). CD22 (FcγRI) wird auf neutrophilen Granulozyten exprimiert. In der zitierten Studie wurde das über Lym-2 x22, beziehungsweise über einen chimären Lym-2 Antikörper vermittelte zytotoxische Potential entsprechender Effektorzellen gegenüber ARH-77-Zellen verglichen. Als Effektoren dienten Vollblut, pMNCs und neutrophile Granulozyten jeweils von gesunden Spendern, beziehungsweise von Patienten, die mit G-CSF behandelt wurden. Der bispezifische Lym-2 x22 Antikörper konnte mithilfe von G-CSF stimulierten neutrophilen Granulozyten, beziehungsweise Vollblut eine höhere Zytotoxizität als der chimärer Lym-2 Antikörper vermitteln (spezifische Lyse von 50% gegenüber 30%, beziehungsweise nahezu 100% gegenüber 40%). Umgekehrt vermittelte der chimäre Antikörper eine höhere Zytotoxizität in Verbindung mit CD22 negativen pMNCs (spezifische Lyse von 80% gegenüber 40%). Allerdings konnte insgesamt über Lym-2 kein entsprechend hohes zytotoxisches Potential erreicht werden wie über klassische HLA-Klasse-II Epitope auf den Zielzellen (Wurflein et al. 1998). Im Vergleich dazu ergab sich in dieser Arbeit für die über Lym-2 x CD16 vermittelte Zytotoxizität von unstimulierten, beziehungsweise stimulierten NK-Zellen gegenüber B-ALL-Blasten im Mittel eine spezifische Lyse von 35,5%, beziehungsweise 51,7% (für ein E:T -Verhältnis von 20:1).

5.3 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen mit Hilfe von bispezifischen monoklonalen Antikörpern die zum einen an den FcγRIII-Rezeptor der NK-Zelle und zum anderen an Epitope wie Lym-2 oder CD19 auf B-ALL-Blasten binden effektiv ADCC vermitteln können. Die Zytotoxizität von Spender-NK-Zellen konnte so gegenüber der natürlichen Zytotoxizität deutlich gesteigert werden. Außerdem führte eine zusätzliche Stimulation der NK-Zellen mit IL-2 zu noch höheren Lyseraten. Der Einsatz des neueren bispezifischen Lym-2 x CD16 Antikörpers führte allerdings zu keinem Vorteil gegenüber dem schon erprobten CD16 x CD19 Antikörper. Zudem konnte die Annahme einer gegenüber gesunden B-Zellen gesteigerten Expressionsdichte von Lym-2 auf malignen B-Zellen nicht bestätigt werden.

Insgesamt stellen bispezifische monoklonale Antikörper, die über einen CD16-Teil NK-Zellen rekrutieren und gleichzeitig an HLA-Klasse-II Epitope oder klassische B-Zell-Oberflächenantigene binden eine interessante Möglichkeit dar, die NK-Zelltherapie in der Behandlung von akuten lymphatischen Leukämien der B-Zellreihe im Kindesalter nach haploidenten Stammzelltransplantationen erfolgreich einzusetzen.

6 Zusammenfassung

Die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) ist ein wesentlicher Mechanismus mit dem NK-Zellen aberrante Zellen eliminieren. Das Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob ein bispezifischer, monoklonaler Lym-2 x CD16 Antikörper in Verbindung mit gesunden Spender-NK-Zellen effizient ADCC gegenüber kryokonservierten pädiatrischen B-ALL-Blasten vermitteln kann. Zudem sollte untersucht werden, ob die durch diesen Antikörper vermittelte Zytotoxizität eine höhere Effizienz zeigt als die durch einen schon erprobten bispezifischen CD16 x CD19 Antikörper vermittelte.

Für das Antigen Lym-2, einer Variante des HLA-Klasse-II-Komplexes auf der Oberfläche von B-Lymphozyten, wurde in der Vergangenheit eine starke Expression auf malignen B-Zellen, im Gegensatz zu einer schwachen Expression auf gesunden B-Zellen beschrieben. Um diese Annahme zu verifizieren wurde hier in einem ersten Schritt die Lym-2 Expressionsdichte auf B-ALL-Blasten pädiatrischer Patienten im Vergleich zu gesunden, pädiatrischen B-Zellen ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass die gesunden B-Zellen (n=38) im Vergleich zu den leukämischen Blasten (n=22) signifikant mehr Lym-2 exprimieren ($p=0,0004$), was im Gegensatz zur bisher angenommenen erhöhten Expressionsdichte von Lym-2 auf malignen B-Zellen steht.

In einem zweiten Schritt konnte gezeigt werden, dass die Lyseeffizienz von Spender-NK-Zellen mit Hilfe beider bispezifischer monoklonaler Antikörper Lym-2 x CD16 und CD16 x CD19 jeweils gegenüber der natürlichen Zytotoxizität der NK-Zellen deutlich gesteigert werden kann. Allerdings bringt der Lym-2 x CD16 Antikörper keinen Vorteil gegenüber dem CD16 x CD19 Antikörper. Für die über den CD16 x CD19 Antikörper vermittelte ADCC von unstimulierten, beziehungsweise IL-2 stimulierten NK-Zellen ergaben sich im Mittel spezifische Lyseraten von 58,0 +/-30,0%, beziehungsweise 66,8 +/-13,7%. Für die über den bispezifischen Lym-2 x CD16 Antikörper vermittelte ADCC von unstimulierten, beziehungsweise IL-2 stimulierten NK-Zellen ergaben sich im Mittel spezifische Lyseraten von 35,5 +/-16,0%, beziehungsweise 51,7 +/-17,6% (jeweils für ein E:T -Verhältnis von 20:1).

Insgesamt stellen bispezifische monoklonale Antikörper, die über das CD16 Oberflächenmolekül NK-Zellen rekrutieren und gleichzeitig an B-Zell-Oberflächenantigene binden, eine interessante Möglichkeit dar, die NK-Zelltherapie in der Behandlung von akuten lymphatischen Leukämien nach Stammzelltransplantationen zu etablieren und damit die Rezidivrate zu senken.

7 Literaturverzeichnis

- Alkan, S. S. (2004). "Monoclonal antibodies: the story of a discovery that revolutionized science and medicine." Nat Rev Immunol **4**(2): 153-6.
- Amrolia, P. J., G. Muccioli-Casadei, et al. (2003). "Selective depletion of donor alloreactive T cells without loss of antiviral or antileukemic responses." Blood **102**(6): 2292-9.
- Appelbaum, F. R. (2001). "Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy." Nature **411**(6835): 385-9.
- Apperley, J. F., L. Jones, et al. (1986). "Bone marrow transplantation for patients with chronic myeloid leukaemia: T-cell depletion with Campath-1 reduces the incidence of graft-versus-host disease but may increase the risk of leukaemic relapse." Bone Marrow Transplant **1**(1): 53-66.
- Asai, O., D. L. Longo, et al. (1998). "Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation." J Clin Invest **101**(9): 1835-42.
- Aversa, F., A. Tabilio, et al. (1998). "Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype." N Engl J Med **339**(17): 1186-93.
- Barnett, D., I. Storie, et al. (1998). "Determination of leucocyte antibody binding capacity (ABC): the need for standardization." Clin Lab Haematol **20**(3): 155-64.
- Bianchi, A. C., H. E. Heslop, et al. (1989). "Enhancement of monoclonal antibody dependent cell mediated cytotoxicity by IL2 and GM-CSF." Br J Haematol **73**(4): 468-74.
- Blair, A., N. J. Goulden, et al. (2005). "Immunotherapeutic strategies in acute lymphoblastic leukaemia relapsing after stem cell transplantation." Blood Rev **19**(6): 289-300.
- Blom, B. and H. Spits (2006). "Development of human lymphoid cells." Annu Rev Immunol **24**: 287-320.
- Blomberg, K., C. Granberg, et al. (1986). "Europium-labelled target cells in an assay of natural killer cell activity. II. A novel non-radioactive method based on time-resolved fluorescence. significance and specificity of the method." J Immunol Methods **92**(1): 117-23.
- Blomberg, K., R. Hautala, et al. (1996). "Time-resolved fluorometric assay for natural killer activity using target cells labelled with a fluorescence enhancing ligand." J Immunol Methods **193**(2): 199-206.
- Bottino, C., L. Moretta, et al. (2004). "Learning how to discriminate between friends and enemies, a lesson from Natural Killer cells." Mol Immunol **41**(6-7): 569-75.
- Bowles, J. A., S. Y. Wang, et al. (2006). "Anti-CD20 monoclonal antibody with enhanced affinity for CD16 activates NK cells at lower concentrations and more effectively than rituximab." Blood.
- Bruenke, J., K. Barbin, et al. (2005). "Effective lysis of lymphoma cells with a stabilised bispecific single-chain Fv antibody against CD19 and FcgammaRIII (CD16)." Br J Haematol **130**(2): 218-28.

- Bruenke, J., B. Fischer, et al. (2004). "A recombinant bispecific single-chain Fv antibody against HLA class II and FcγRIII (CD16) triggers effective lysis of lymphoma cells." Br J Haematol **125**(2): 167-79.
- Caligiuri, M. A., A. Velardi, et al. (2004). "Immunotherapeutic approaches for hematologic malignancies." Hematology (Am Soc Hematol Educ Program): 337-53.
- Cantoni, C., C. Bottino, et al. (1999). "NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily." J Exp Med **189**(5): 787-96.
- Cavazzana-Calvo, M., P. Bordigoni, et al. (1996). "A phase II trial of partially incompatible bone marrow transplantation for high-risk acute lymphoblastic leukaemia in children: prevention of graft rejection with anti-LFA-1 and anti-CD2 antibodies. Societe Francaise de Greffe de Moelle Osseuse." Br J Haematol **93**(1): 131-8.
- Clynes, R. A., T. L. Towers, et al. (2000). "Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets." Nat Med **6**(4): 443-6.
- Corbacioglu, S., S. Eber, et al. (2003). "Induction of long-term remission of a relapsed childhood B-acute lymphoblastic leukemia with rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and autologous stem cell transplantation." J Pediatr Hematol Oncol **25**(4): 327-9.
- Davies, S. M., L. Ruggieri, et al. (2002). "Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor." Blood **100**(10): 3825-7.
- Durandy, A., N. Brousse, et al. (1992). "Control of human B cell tumor growth in severe combined immunodeficiency mice by monoclonal anti-B cell antibodies." J Clin Invest **90**(3): 945-52.
- Dyer, M. J., G. Hale, et al. (1989). "Effects of CAMPATH-1 antibodies in vivo in patients with lymphoid malignancies: influence of antibody isotype." Blood **73**(6): 1431-9.
- Elsasser, D., T. Valerius, et al. (1996). "HLA class II as potential target antigen on malignant B cells for therapy with bispecific antibodies in combination with granulocyte colony-stimulating factor." Blood **87**(9): 3803-12.
- Epstein, A. L., R. J. Marder, et al. (1987). "Two new monoclonal antibodies, Lym-1 and Lym-2, reactive with human B-lymphocytes and derived tumors, with immunodiagnostic and immunotherapeutic potential." Cancer Res **47**(3): 830-40.
- Eyrich, M., P. Lang, et al. (2001). "A prospective analysis of the pattern of immune reconstitution in a paediatric cohort following transplantation of positively selected human leucocyte antigen-disparate haematopoietic stem cells from parental donors." Br J Haematol **114**(2): 422-32.
- Farag, S. S., T. Fehniger, et al. (2002). "Natural killer cells: biology and application in stem-cell transplantation." Cytotherapy **4**(5): 445-6.
- Farag, S. S., T. A. Fehniger, et al. (2002). "Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect." Blood **100**(6): 1935-47.
- Farahat, N., D. Lens, et al. (1995). "Quantitative flow cytometry can distinguish between normal and leukaemic B-cell precursors." Br J Haematol **91**(3): 640-6.

- Fauriat, C., E. Marcenaro, et al. (2003). "Natural killer cell-triggering receptors in patients with acute leukaemia." Leuk Lymphoma **44**(10): 1683-9.
- Fischer, L., O. Penack, et al. (2006). "The anti-lymphoma effect of antibody-mediated immunotherapy is based on an increased degranulation of peripheral blood natural killer (NK) cells." Exp Hematol **34**(6): 753-9.
- Funakoshi, S., A. Hirano, et al. (1997). "Antitumor effects of nonconjugated murine Lym-2 and human-mouse chimeric CLL-1 monoclonal antibodies against various human lymphoma cell lines in vitro and in vivo." Blood **90**(8): 3160-6.
- Gardiner, C. M. (1999). "Natural killer cells." Curr Biol **9**(19): R716.
- Geiselhart, A., S. Neu, et al. (1996). "Positive selection of CD56+ lymphocytes by magnetic cell sorting." Nat Immun **15**(5): 227-33.
- Ghetie, M. A., L. J. Picker, et al. (1994). "Anti-CD19 inhibits the growth of human B-cell tumor lines in vitro and of Daudi cells in SCID mice by inducing cell cycle arrest." Blood **83**(5): 1329-36.
- Giebel, S., F. Locatelli, et al. (2003). "Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors." Blood **102**(3): 814-9.
- Glass, B., L. Uharek, et al. (1996). "Graft-versus-leukaemia activity can be predicted by natural cytotoxicity against leukaemia cells." Br J Haematol **93**(2): 412-20.
- Gratama, J. W., L. D'Hautcourt J, et al. (1998). "Flow cytometric quantitation of immunofluorescence intensity: problems and perspectives. European Working Group on Clinical Cell Analysis." Cytometry **33**(2): 166-78.
- Green, A., E. Clarke, et al. (1999). "Children with acute lymphoblastic leukemia who receive T-cell-depleted HLA mismatched marrow allografts from unrelated donors have an increased incidence of primary graft failure but a similar overall transplant outcome." Blood **94**(7): 2236-46.
- Gudowius, S., K. Recker, et al. (2006). "Identification of candidate target antigens for antibody-based immunotherapy in childhood B-cell precursor ALL." Klin Padiatr **218**(6): 327-33.
- Guimaraes, F., H. Guven, et al. (2006). "Evaluation of ex vivo expanded human NK cells on antileukemia activity in SCID-beige mice." Leukemia.
- Guy, K., L. J. Docherty, et al. (1986). "Deficient expression of MHC class II antigens in some cases of human B cell leukaemia." Clin Exp Immunol **63**(2): 290-7.
- Haagen, I. A., A. J. Geerars, et al. (1994). "Killing of autologous B-lineage malignancy using CD3 x CD19 bispecific monoclonal antibody in end stage leukemia and lymphoma." Blood **84**(2): 556-63.
- Hainsworth, J. D. (2000). "Monoclonal antibody therapy in lymphoid malignancies." Oncologist **5**(5): 376-84.
- Handgretinger, R., T. Klingebiel, et al. (2003). "Megadose transplantation of highly purified haploidentical stem cells: current results and future prospects." Pediatr Transplant **7 Suppl 3**: 51-5.
- Handgretinger, R., P. Lang, et al. (2001). "Immunological aspects of haploidentical stem cell transplantation in children." Ann N Y Acad Sci **938**: 340-57; discussion 357-8.

- Hartmann, F., C. Renner, et al. (2001). "Anti-CD16/CD30 bispecific antibody treatment for Hodgkin's disease: role of infusion schedule and costimulation with cytokines." Clin Cancer Res **7**(7): 1873-81.
- Hartmann, F., C. Renner, et al. (1997). "Treatment of refractory Hodgkin's disease with an anti-CD16/CD30 bispecific antibody." Blood **89**(6): 2042-7.
- Hekman, A., A. Honselaar, et al. (1991). "Initial experience with treatment of human B cell lymphoma with anti-CD19 monoclonal antibody." Cancer Immunol Immunother **32**(6): 364-72.
- Hombach, A., W. Jung, et al. (1993). "A CD16/CD30 bispecific monoclonal antibody induces lysis of Hodgkin's cells by unstimulated natural killer cells in vitro and in vivo." Int J Cancer **55**(5): 830-6.
- Hornick, J. L., L. A. Khawli, et al. (1997). "Chimeric CLL-1 antibody fusion proteins containing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or interleukin-2 with specificity for B-cell malignancies exhibit enhanced effector functions while retaining tumor targeting properties." Blood **89**(12): 4437-47.
- Horowitz, M. M., R. P. Gale, et al. (1990). "Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation." Blood **75**(3): 555-62.
- Iannello, A. and A. Ahmad (2005). "Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies." Cancer Metastasis Rev **24**(4): 487-99.
- Kaatsch, P., G. Haaf, et al. (1995). "Childhood malignancies in Germany--methods and results of a nationwide registry." Eur J Cancer **31A**(6): 993-9.
- Karre, K. (2002). "NK cells, MHC class I molecules and the missing self." Scand J Immunol **55**(3): 221-8.
- Kernan, N. A., G. Bartsch, et al. (1993). "Analysis of 462 transplantations from unrelated donors facilitated by the National Marrow Donor Program." N Engl J Med **328**(9): 593-602.
- Kipriyanov, S. M., B. Cochlovius, et al. (2002). "Synergistic antitumor effect of bispecific CD19 x CD3 and CD19 x CD16 diabodies in a preclinical model of non-Hodgkin's lymphoma." J Immunol **169**(1): 137-44.
- Klingemann, H. G. and J. Martinson (2004). "Ex vivo expansion of natural killer cells for clinical applications." Cytotherapy **6**(1): 15-22.
- Koehl, U., R. Esser, et al. (2005). "Ex vivo expansion of highly purified NK cells for immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation in children." Klin Padiatr **217**(6): 345-50.
- Koehl, U., J. Sorensen, et al. (2004). "IL-2 activated NK cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation." Blood Cells Mol Dis **33**(3): 261-6.
- Koh, C. Y., B. R. Blazar, et al. (2001). "Augmentation of antitumor effects by NK cell inhibitory receptor blockade in vitro and in vivo." Blood **97**(10): 3132-7.
- Kook, H., F. Goldman, et al. (1996). "Reconstruction of the immune system after unrelated or partially matched T-cell-depleted bone marrow transplantation in children: immunophenotypic analysis and factors affecting the speed of recovery." Blood **88**(3): 1089-97.

- Kufer, P., R. Lutterbuse, et al. (2004). "A revival of bispecific antibodies." Trends Biotechnol **22**(5): 238-44.
- Lang, P., K. Barbin, et al. (2004). "Chimeric CD19 antibody mediates cytotoxic activity against leukemic blasts with effector cells from pediatric patients who received T-cell-depleted allografts." Blood **103**(10): 3982-5.
- Lang, P., J. Greil, et al. (2004). "Long-term outcome after haploidentical stem cell transplantation in children." Blood Cells Mol Dis **33**(3): 281-7.
- Lang, P., R. Handgretinger, et al. (2003). "Transplantation of highly purified CD34+ progenitor cells from unrelated donors in pediatric leukemia." Blood **101**(4): 1630-6.
- Lang, P., M. Pfeiffer, et al. (2002). "Clinical scale isolation of T cell-depleted CD56+ donor lymphocytes in children." Bone Marrow Transplant **29**(6): 497-502.
- Lefterova, P., A. Marten, et al. (2000). "Targeting of natural killer-like T immunologic effector cells against leukemia and lymphoma cells by reverse antibody-dependent cellular cytotoxicity." J Immunother **23**(3): 304-10.
- Lenkei, R., J. W. Gratama, et al. (1998). "Performance of calibration standards for antigen quantitation with flow cytometry." Cytometry **33**(2): 188-96.
- Leung, W., R. Iyengar, et al. (2005). "Phenotype and function of human natural killer cells purified by using a clinical-scale immunomagnetic method." Cancer Immunol Immunother **54**(4): 389-94.
- Leung, W., R. Iyengar, et al. (2005). "Comparison of killer Ig-like receptor genotyping and phenotyping for selection of allogeneic blood stem cell donors." J Immunol **174**(10): 6540-5.
- Leung, W., R. Iyengar, et al. (2004). "Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells." J Immunol **172**(1): 644-50.
- Manzke, O., H. Tesch, et al. (2001). "Locoregional treatment of low-grade B-cell lymphoma with CD3xCD19 bispecific antibodies and CD28 costimulation. I. Clinical phase I evaluation." Int J Cancer **91**(4): 508-15.
- Miller, J. S., Y. Soignier, et al. (2005). "Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer." Blood **105**(8): 3051-7.
- Miltenyi, S., W. Muller, et al. (1990). "High gradient magnetic cell separation with MACS." Cytometry **11**(2): 231-8.
- Mitsuyasu, R. T., R. E. Champlin, et al. (1986). "Treatment of donor bone marrow with monoclonal anti-T-cell antibody and complement for the prevention of graft-versus-host disease. A prospective, randomized, double-blind trial." Ann Intern Med **105**(1): 20-6.
- Murphy, W. J., C. Y. Koh, et al. (2001). "Immunobiology of natural killer cells and bone marrow transplantation: merging of basic and preclinical studies." Immunol Rev **181**: 279-89.
- O'Connor, G. M., O. M. Hart, et al. (2006). "Putting the natural killer cell in its place." Immunology **117**(1): 1-10.
- Ottonello, L., P. Morone, et al. (1996). "Monoclonal Lym-1 antibody-dependent lysis of B-lymphoblastoid tumor targets by human complement and cytokine-exposed mononuclear and neutrophilic polymorphonuclear leukocytes." Blood **87**(12): 5171-8.

- Peipp, M. and T. Valerius (2002). "Bispecific antibodies targeting cancer cells." Biochem Soc Trans **30**(4): 507-11.
- Pende, D., S. Parolini, et al. (1999). "Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells." J Exp Med **190**(10): 1505-16.
- Perez, P., R. W. Hoffman, et al. (1985). "Specific targeting of cytotoxic T cells by anti-T3 linked to anti-target cell antibody." Nature **316**(6026): 354-6.
- Pesando, J. M. and L. Graf (1986). "Differential expression of HLA-DR, -DQ, and -DP antigens on malignant B cells." J Immunol **136**(11): 4311-8.
- Pfeiffer, M. (2004). Anreicherung von T-Zell-depletierten NK-Zellen und deren zytotoxische Aktivität gegenüber ALL-Blasten in Abhängigkeit der HLA-Klasse-I-Expression. Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin Tübingen, Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik. Tübingen, Eberhard Karls Universität. Med Diss: 1-104.
- Pfeiffer, M., S. Stanojevic, et al. (2005). "Rituximab mediates in vitro antileukemic activity in pediatric patients after allogeneic transplantation." Bone Marrow Transplant **36**(2): 91-7.
- Piccaluga, P. P., G. Martinelli, et al. (2006). "Advances in the treatment for haematological malignancies." Expert Opin Pharmacother **7**(6): 721-32.
- Pietersz, G. A., L. Wenjun, et al. (1995). "In vitro and in vivo antitumor activity of a chimeric anti-CD19 antibody." Cancer Immunol Immunother **41**(1): 53-60.
- Reusch, U., F. Le Gall, et al. (2004). "Effect of tetravalent bispecific CD19xCD3 recombinant antibody construct and CD28 costimulation on lysis of malignant B cells from patients with chronic lymphocytic leukemia by autologous T cells." Int J Cancer **112**(3): 509-18.
- Robertson, M. J. and J. Ritz (1990). "Biology and clinical relevance of human natural killer cells." Blood **76**(12): 2421-38.
- Romero, A. I., F. B. Thoren, et al. (2006). "NKp46 and NKG2D receptor expression in NK cells with CD56 and CD56 phenotype: regulation by histamine and reactive oxygen species." Br J Haematol **132**(1): 91-8.
- Ruggeri, L., M. Capanni, et al. (1999). "Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation." Blood **94**(1): 333-9.
- Ruggeri, L., M. Capanni, et al. (2002). "Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants." Science **295**(5562): 2097-100.
- Schaedel, O. and Y. Reiter (2006). "Antibodies and their fragments as anti-cancer agents." Curr Pharm Des **12**(3): 363-78.
- Schattenberg, A. V. and H. Dolstra (2005). "Cellular adoptive immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation." Curr Opin Oncol **17**(6): 617-21.
- Schlenzka, J., T. M. Moehler, et al. (2004). "Combined effect of recombinant CD19 x CD16 diabody and thalidomide in a preclinical model of human B cell lymphoma." Anticancer Drugs **15**(9): 915-9.
- Segal, D. M., G. J. Weiner, et al. (1999). "Bispecific antibodies in cancer therapy." Curr Opin Immunol **11**(5): 558-62.

- Siegler, U., C. P. Kalberer, et al. (2005). "Activated natural killer cells from patients with acute myeloid leukemia are cytotoxic against autologous leukemic blasts in NOD/SCID mice." Leukemia **19**(12): 2215-22.
- Sinkovics, J. G. and J. C. Horvath (2005). "Human natural killer cells: a comprehensive review." Int J Oncol **27**(1): 5-47.
- Sivori, S., D. Pende, et al. (1999). "NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells." Eur J Immunol **29**(5): 1656-66.
- Smith, K. B. and S. A. Ellis (1999). "Standardisation of a procedure for quantifying surface antigens by indirect immunofluorescence." J Immunol Methods **228**(1-2): 29-36.
- Spits, H., L. L. Lanier, et al. (1995). "Development of human T and natural killer cells." Blood **85**(10): 2654-70.
- Staerz, U. D., O. Kanagawa, et al. (1985). "Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells." Nature **314**(6012): 628-31.
- Sykes, M. and T. R. Spitzer (2005). "Protecting the host naturally." Nat Med **11**(11): 1164-5.
- Torelli, G. F., A. Guarini, et al. (2005). "Expansion of natural killer cells with lytic activity against autologous blasts from adult and pediatric acute lymphoid leukemia patients in complete hematologic remission." Haematologica **90**(6): 785-92.
- Trinchieri, G. (1989). "Biology of natural killer cells." Adv Immunol **47**: 187-376.
- Truman, J. P., C. Choqueux, et al. (1997). "HLA class II-mediated death is induced via Fas/Fas ligand interactions in human splenic B lymphocytes." Blood **89**(6): 1996-2007.
- Urbano-Ispizua, A., C. Rozman, et al. (2002). "Risk factors for acute graft-versus-host disease in patients undergoing transplantation with CD34+ selected blood cells from HLA-identical siblings." Blood **100**(2): 724-7.
- Velardi, A., L. Ruggeri, et al. (2002). "NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation." Trends Immunol **23**(9): 438-44.
- Verheyden, S., M. Bernier, et al. (2004). "Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia." Leukemia **18**(12): 2002-7.
- Vivier, E., J. A. Nunes, et al. (2004). "Natural killer cell signaling pathways." Science **306**(5701): 1517-9.
- Vuist, W. M., F. v Buitenen, et al. (1989). "Potentiation by interleukin 2 of Burkitt's lymphoma therapy with anti-pan B (anti-CD19) monoclonal antibodies in a mouse xenotransplantation model." Cancer Res **49**(14): 3783-8.
- Weiden, P. L., N. Flournoy, et al. (1979). "Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts." N Engl J Med **300**(19): 1068-73.
- Wurflein, D., M. Dechant, et al. (1998). "Evaluating antibodies for their capacity to induce cell-mediated lysis of malignant B cells." Cancer Res **58**(14): 3051-8.

- Zamai, L., M. Ahmad, et al. (1998). "Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells." J Exp Med **188**(12): 2375-80.
- Zeis, M., L. Uharek, et al. (1997). "Allogeneic MHC-mismatched activated natural killer cells administered after bone marrow transplantation provide a strong graft-versus-leukaemia effect in mice." Br J Haematol **96**(4): 757-61.

8 Anhang

8.1 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1	Inhibitorische Rezeptoren der NK-Zelle
Tabelle 2	Aktivierende Rezeptoren der NK-Zelle
Tabelle 3	Expressionsdichten [Antigen pro Zelle] von W6/32 auf pädiatrischen leukämischen Blasten und gesunden B-Zellen mit entsprechenden Mittelwerten, Medianen und Standardabweichungen.
Tabelle 4	Expressionsdichten [Antigen pro Zelle] von CD19 auf pädiatrischen leukämischen Blasten und gesunden B-Zellen mit entsprechenden Mittelwerten, Medianen und Standardabweichungen.
Tabelle 5	Expressionsdichten [Antigen pro Zelle] von Lym2 auf pädiatrischen leukämischen Blasten und gesunden B-Zellen mit entsprechenden Mittelwerten, Medianen und Standardabweichungen.
Tabelle 6	Über ohne Antikörper, CD16 x CD19 und CD19 vermittelte Zytotoxizität von NK-Zellen, Rohwerte der spezifischen Lyse in Prozent mit entsprechenden Mittelwerten, Medianen und Standardabweichungen (SD).
Tabelle 7	Diagnose und Expressionsdichte von CD19 auf den Blasten und deren Lysierbarkeit mittels CD16 x CD19 markierter unstimulierter, beziehungsweise IL-2 stimulierter NK-Zellen für verschiedenen E:T -Verhältnisse.
Tabelle 8	Über ohne Antikörper und Lym-2 x CD16 vermittelte Zytotoxizität von NK-Zellen, Rohdaten der spezifischen Lyse in Prozent mit entsprechenden Mittelwerten, Medianen und Standardabweichungen (SD).
Tabelle 9	Diagnose und Expressionsdichte von Lym-2 auf den Blasten und deren Lysierbarkeit mittels Lym-2 x CD16 markierter unstimulierter, beziehungsweise IL-2 stimulierter NK-Zellen für verschiedenen E:T –Verhältnisse.
Tabelle 10	Mittelwerte der spezifischen Lyse in Prozent aus acht Zytotoxizitätstests.

Tabelle 11 Über ohne Antikörper, Lym -2 x CD16 und CD16 x CD19 vermittelte Zytotoxizität von NK-Zellen, Rohdaten der spezifischen Lyse in Prozent für ein E:T -Verhältnis von 20:1.

8.2 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1	Schematische Darstellung der Hämatopoese von Lymphozyten, modifiziert nach Blom et al. (Blom et al. 2006)
Abbildung 2a	Set-up-Beads im Density Plot
Abbildung 2b	Set-up-Beads im Histogramm
Abbildung 3a	Calibration-Beads im Density Plot
Abbildung 3b	Calibration-Beads im Histogramm
Abbildung 4a	Vollblut nach Lyse der Erythrozyten im Density Plot, R1 = Lymphozyten
Abbildung 4b	Lymphozyten (R1), getrennt nach CD19 Expression im Density Plot, R2 = B-Zellen
Abbildung 4c	Lym-2 Expressionsdichte auf CD19 positiven B-Zellen (R2) im Histogramm
Abbildung 5	Verteilung und Mittelwerte der Expressionsdichten von W6/32 auf B-Zellen und Blasten mit dazugehörigem p-, beziehungsweise t-Wert.
Abbildung 6	Verteilung und Mittelwerte der Expressionsdichten von CD19 auf B-Zellen und Blasten mit dazugehörigem p-, beziehungsweise t-Wert.
Abbildung 7	Verteilung und Mittelwerte der Expressionsdichten von Lym-2 auf B-Zellen und Blasten mit dazugehörigem p-, beziehungsweise t-Wert.
Abbildung 8a	Lym-2 Expressionsdichte auf B-Zellen im Histogramm
Abbildung 8b	Lym-2 Expressionsdichte auf Blasten im Histogramm

- Abbildung 9 Mittelwerte und Standardabweichungen der spezifischen Lyseraten von unstimulierten, beziehungsweise stimulierten NK-Zellen ohne Antikörpervermittlung und mit CD16 x CD19.
- Abbildung 10 Korrelation der CD19 Expression auf Blasten und deren über CD16 x CD19 vermittelten Lysierbarkeit mittels stimulierter NK-Zellen für verschiedene E:T -Verhältnisse.
- Abbildung 11 Mittelwerte und Standardabweichungen der spezifischen Lyseraten von unstimulierten, beziehungsweise stimulierten NK-Zellen ohne Antikörpervermittlung und mit Lym-2 x CD16.
- Abbildung 12 Korrelation der Lym-2 Expression auf Blasten und deren über Lym-2 x CD16 vermittelten Lysierbarkeit mittels stimulierter NK-Zellen für verschiedene E:T -Verhältnisse.
- Abbildung 13 Säulendiagramm der Mittelwerte und Standardabweichungen der spezifischen Lyse in Prozent aus acht Zytotoxizitätstests.
- Abbildung 14 Vergleich der über Lym-2 x CD16, beziehungsweise CD16 x CD19 vermittelten Zytotoxizität von unstimulierten und stimulierten NK-Zellen anhand von Mittelwerten und Standardabweichungen.

Danksagung

Ich danke Peter Lang für die Überlassung des Themas und die Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit.

Insbesondere danke ich Matthias Pfeiffer für die zu jeder Zeit vorhandene, große Hilfsbereitschaft während der Durchführung der Experimente und der Auswertung der Ergebnisse.

Ich danke zudem allen Mitarbeitern des KMT-Labors für die zahlreichen Hilfestellungen bei der Ausführung der Experimente.

Lebenslauf

Name: Imke Sütterlin

Geburtsdatum: 26. Mai 1981

Geburtsort: Emmendingen

Schulbildung: 1987 –1991 Grundschule Köndringen

1991 – 2000 Gymnasium Kenzingen

29.06.2000 Allgemeine Hochschulreife
Gymnasium Kenzingen

Studium: 2001 –2008 Studium der Humanmedizin
Eberhardt-Karls-Universität Tübingen

17.09.2003 Ärztliche Vorprüfung

30.05.2008 Ärztliche Prüfung

seit 01.09.2008: Assistenzärztin am Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin,
Universitätsklinikum Freiburg,
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. A. Superti-Furga