

**Aus der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
Tübingen**

**Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger**

**Untersuchungen zur antikörper-abhängigen
zellvermittelten antileukämischen Aktivität (ADCC) bei
Kindern nach allogener Stammzelltransplantation**

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

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

**vorgelegt von
Stanoje Stanojevic
aus
Solbad Hall/Österreich**

2005

Dekan: Professor Dr. C.D. Claussen
1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Niethammer
2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Pawelec

Für meine Großeltern, meine Eltern und meine Ehefrau

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Stammzelltransplantation	1
1.2.	Komplikationen der allogenen Stammzelltransplantation	3
1.3.	Allgemeines zum Immunsystem	4
1.4.	Natürliche Killerzellen	6
1.5.	Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC)	8
1.6.	Interleukin-2 (IL-2)	10
1.7.	Fragestellung	11
2.	Material	12
2.1.	Geräte	12
2.2.	Reagenzien	13
2.3.	Stammlösungen	14
2.4.	Einmalmaterial	15
2.5.	Probenmaterial (Effektoren)	15
2.6.	Zellreihen (Targets)	17
2.7.	Antikörper und Bindungsmoleküle	17
3.	Methoden	18
3.1.	Isolierung peripherer mononukleärer Zellen (PBMNC)	18
3.2.	Zellzählung	19
3.3.	Zellanreicherung mit dem MACS-System (magnetic activated cell sorter)	19
3.3.1.	Prinzip eines MACS	19
3.3.2.	Durchführung der Zellanreicherung	20
3.4.	Zytotoxizitätstest bzw. antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC)	21

3.4.1. Prinzip des BATDA-Release (Zytotoxizitätstest)	21
3.4.2. Durchführung des Zytotoxizitätstests bzw. der ADCC	22
3.5. Messungen mit dem FACSCalibur-Flowcytometer	26
3.5.1. Prinzip eines Durchflußzytometers	26
3.5.2. Durchführung der Zellmarkierung für die FACS-Analyse	28
3.6. Quantitative Zelloberflächenantigenbestimmung	28
3.6.1. Prinzip der Bestimmung	28
3.6.2. Durchführung der HLA-Klasse I Bestimmung	30
3.7. Zellkultivierung	31
3.8. Statistische Methoden	32
4. Ergebnisse	33
4.1. Normwerte (ADCC von gesunden Spendern)	33
4.1.1. Aktivität gegen die Tumorzelllinie MHH-CALL-4	33
4.1.2. Aktivität gegen die Tumorzelllinie Raji	36
4.2. ADCC von Patienten	38
4.2.1. Aktivität gegen die Tumorzelllinie MHH-CALL-4	38
4.2.2. Aktivität gegen die Tumorzelllinie Raji	41
4.3. Korrelation zwischen antikörper-unabhängiger Zytotoxizität und antikörper-abhängiger zellvermittelter Zytotoxizität (=ADCC)	44
4.4. FACS-Analysen	52
4.5. ADCC von Patienten im Verlauf	60
4.5.1. ADCC von Patienten gegen MHH-CALL-4 im zeitlichen Verlauf	60
4.5.2. ADCC von Patienten gegen Raji im zeitlichen Verlauf	62
4.6. Aktivität allogener transplantierten Patienten gegen die Tumorzelllinie K562	64
4.7. Abhängigkeit der spontanen Lyse gegen K562 von den NK-Zellen	66
4.8. Antigene im Verlauf	67
4.9. ADCC gegen Blasten	69
4.10. CD158b-positive PBMNC gegen Raji	71

4.11.	Bestimmung der Zelloberflächenantigendichte	74
5.	Diskussion	77
5.1.	ADCC nach allogener Stammzelltransplantation	77
5.2.	ADCC im zeitlichen Verlauf nach allogener Stammzelltransplantation	82
5.3.	Korrelation zwischen antikörper-unabhängiger Zytotoxizität und ADCC	83
5.4.	ADCC gegen Blasten	84
5.5.	CD158b-angereicherte PBMNC	86
5.6.	Schlußfolgerung und Perspektiven	89
6.	Zusammenfassung	91
7.	Anhang	93
7.1.	Abkürzungsverzeichnis	93
7.2.	Literaturverzeichnis	95
7.3.	Danksagungen	109
7.4.	Lebenslauf	110

1. Einleitung

1.1. Stammzelltransplantation

Die erste erfolgreiche Knochenmarktransplantation erfolgte 1968. Damals wurden erstmals drei Kinder mit angeborenen schweren Immundefekten erfolgreich mit dem Knochenmark eines HLA-identischen Geschwisters transplantiert (8, 22, 30).

Die myeloablative Therapie mit allogener Transplantation hämatopoetischer und lymphopoetischer Stammzellen ist heute für viele maligne und nicht maligne Erkrankungen die einzige mögliche Behandlung mit Aussicht auf Heilung (5). Neben der Therapie der akuten lymphatischen Leukämie, der akuten myeloischen Leukämie sowie des myelodysplastischen Syndroms, wird die Knochenmarktransplantation heute auch in der Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie, des Non-Hodgkin-Lymphoms, des Neuroblastoms, der Osteopetrosis, der Hämoglobinopathien, sowie solider Tumoren eingesetzt.

In zunehmendem Maße wird nun anstatt einer Knochenmarktransplantation eine Stammzelltransplantation durchgeführt. Die CD34-positiven Stammzellen können aus Knochenmark, aus Nabelvenenblut oder aus Peripherblut des passenden Spenders gewonnen werden. Die Ausbeute an Stammzellen aus Peripherblut wird verbessert, wenn zuvor eine Behandlung des Spenders mit Granulozyten Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF) erfolgt. Die so gewonnenen Stammzellen werden dann dem Empfänger nach einer Hochdosischemotherapie und zum Teil in Kombination mit einer Ganzkörperbestrahlung transfundiert.

Es gibt verschiedene Spender-Empfänger-Kombinationen. Sind Spender und Empfänger identisch, spricht man von einer autologen Transplantation. Findet die Transplantation zwischen zwei genetisch identischen Individuen (eineiige Zwillinge) statt, bezeichnet man das als syngene Transplantation. Sind Spender und Empfänger zwei genetisch unterschiedliche Individuen, nennt man dies

eine allogene Transplantation. Die Transplantation zwischen Individuen verschiedener Spezies wird xenogene Transplantation genannt (1, 5).

In dieser Arbeit steht die Betrachtung der allogenen Transplantation im Vordergrund.

Werden Transplantate allogenen übertragen, kann dies zu einer spezifischen Immunantwort, welche Abstoßungsreaktion genannt wird, führen. Die molekularen Hauptzielstrukturen der Transplantatabstoßung sind körperfremde, alle Formen von MHC-Klasse I und MHC-Klasse II Molekülen. Transplantationsrelevant sind vor allem die drei HLA-Merkmale A, B, und DR. Da jeder Mensch von Vater und Mutter je ein Merkmal erbt, sind insgesamt zwölf HLA-Merkmale bei der Spenderauswahl zu berücksichtigen. Die Antigene, die man von einem Elternteil erhält, bezeichnet man als Haplotyp (1, 17).

Grundsätzlich erfolgt eine Transplantation HLA-identisch. Für Geschwister besteht eine Wahrscheinlichkeit von 1:4, daß alle HLA-Allele übereinstimmen (17). Bei nicht vorhandenem Geschwisterspender versucht man, einen HLA-identischen Fremdspender zu finden. Etwa 30 % der Kinder haben ein HLA-identisches Geschwister, das für die Stammzelltransplantation in Frage kommt (5, 49). Trotz ständig wachsender Spenderdateien gelingt es für Patienten mit seltenen HLA-Typen häufig nicht, einen passenden Fremdspender innerhalb einer bestimmten Zeitspanne zu finden (10).

Daher wurde schon seit längerem versucht, noch weitere Personen zur Stammzellspende heranzuziehen. Eine Möglichkeit besteht darin, von der Mutter oder dem Vater des Kindes Stammzellen zu gewinnen, die allerdings nur je einen HLA-Haplotyp mit ihrem Kind gemeinsam haben und damit in der Regel ein Mismatch in sechs HLA-Antigenen aufweisen, so daß eine T-Zell-Depletion unerlässlich ist. Problematisch erwiesen sich jedoch anfangs das unzureichende Engraftment und die trotz T-Zell-Depletion auftretende schwere GvHD (4, 9).

Eine deutliche Verbesserung wurde erzielt, indem die Menge an transplantierten Stammzellen erhöht und die Depletion der T-Zellen mittels

Erythrozyten-Rosettierung und Sojabohnenagglutination noch intensiviert wurde (6).

Durch die Positiv-Anreicherung von CD34-positiven Stammzellen ist es in den letzten Jahren möglich geworden, die Stammzellmenge im Vergleich zu direkten T-Zell-Depletionsverfahren nochmals zu steigern bei gleichzeitig minimalen, noch verbleibenden T-Zellen. In Verbindung mit intensivierten Konditionierungsprotokollen kann damit ein sicheres Engraftment erreicht und eine GvHD wirkungsvoll verhindert werden (7, 23, 36).

Das Konzept der Positiv-Anreicherung von CD34-positiven Stammzellen ist auch erfolgreich auf Kinder mit (teil-)identischen Fremd Spendern (komplett HLA-identisch oder 1-2 minor mismatches) ausgedehnt worden (56).

1.2. Komplikationen der allogenen Stammzelltransplantation

Für Patienten nach allogener Stammzelltransplantation bestehen mehrere Risiken (5, 21, 23, 95).

Es wird die Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) gefürchtet, bei der es zu einer Reaktion immunkompetenter Zellen des Spenders gegen Zellen des Empfängers kommt. Daher erfolgt in der Regel eine prophylaktische Gabe von Immunsuppressiva über drei bis sechs Monate.

Bei den Patienten, die in dieser Arbeit untersucht wurden, konnte durch die Transplantation mit positiv-angereicherten CD34-positiven Stammzellen eine GvHD > Grad I ohne jegliche medikamentöse Prophylaxe wirkungsvoll verhindert werden (36, 38, 56).

Gefürchtet werden auch Infektionen, die aufgrund der Immunsuppression häufig auftreten können. Deren Erreger sind Bakterien, Viren und Pilze.

Weiter kommt es zu Abstoßungsreaktionen mit Verlust des Transplantats. Schließlich sind noch die Venenverschlusskrankheit und die Toxizität, die auf der Konditionierung vor der Transplantation beruht, zu nennen.

Die Haupttodesursache nach allogener Stammzelltransplantation stellt jedoch das Rezidiv dar (7, 23, 36, 37, 39, 53, 56, 75).

Hochdosischemotherapie und Ganzkörperbestrahlung führen zwar zu einer Zellreduktion des Tumors, jedoch treten Rezidive sogar nach myeloablativer Konditionierung auf. Eine Dosissteigerung der myeloablativen Konditionierung reduziert zwar die Anzahl der Rezidive, verbessert aber nicht aufgrund der Toxizität der Hochdosischemotherapie und der Ganzkörperbestrahlung das Überleben. Somit kann man die Ergebnisse der allogenen Transplantation durch Verstärkung der Konditionierungsprogramme nicht verbessern (19).

Nach einer Knochenmarkstransplantation besteht immer das Risiko, daß trotz der vorherigen starken Konditionierungstherapie, noch Tumorzellen im Körper des Empfängers vorhanden sind, die zum Rezidiv führen können. Auch wenn nach den Kriterien der kompletten Remission alle objektiven Krankheitsbefunde zurückgebildet sind, lassen sich mittels Polymerasekettenreaktion oft noch residuale Tumorzellen nachweisen. Diese sogenannte "Minimal Residual Disease" (MRD) oder "Minimale Resterkrankung" ist eine Indikation für immuntherapeutische Strategien nach allogener Stammzelltransplantation (24, 43).

1.3. Allgemeines zum Immunsystem

Das Immunsystem wird in das angeborene, unspezifische und das erworbene, spezifische Immunsystem unterteilt.

Das Immunsystem kann zwischen eigen und fremd unterscheiden. Es kann Bakterien, Viren, Parasiten und Pilze, die in den Organismus eingedrungen sind, erkennen und eliminieren. Auch körpereigene Zellen, die den Organismus bedrohen, wie zum Beispiel Tumorzellen, können erkannt und zerstört werden (1).

Das angeborene, unspezifische Immunsystem besteht aus Haut, Schleimhäute, Lysozym, Komplement, den zur Phagozytose befähigten Makrophagen und Granulozyten und den Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Die Zellen der unspezifischen Abwehr benötigen keine Aktivierung durch vorausgehendem Antigenkontakt und sind so nicht auf eine MHC-gekoppelte Antigenpräsentation

angewiesen. Weil sie schnell reagieren können, stellen sie den ersten Schritt der Immunabwehr dar (1).

Das erworbene, spezifische Immunsystem besteht aus T- und B- Lymphozyten. Diese sind in der Lage, jede als körperfremd angesehene Struktur zu erkennen und zu bekämpfen. Darüber hinaus bildet dieser Teil des Immunsystems nach erfolgter Antigenexposition Gedächtniszellen aus, die bei einer erneuten Reinfektion eine schnellere und wirkungsvollere Immunantwort auslösen können (1).

B-Lymphozyten, die aus pluripotenten Vorläuferzellen im Knochenmark heranreifen und vor allem für die Abwehr von Bakterien verantwortlich sind, sind für die humorale Immunabwehr zuständig. B-Lymphozyten können nach Bindung eines Antigens an ihren Oberflächenrezeptor zu Plasmazellen differenzieren und Antikörper synthetisieren und sezernieren, welche eine spezifische Affinität zu dem Antigen aufweisen, das ihre Synthese ausgelöst hat. So entstehen monoklonale Immunglobuline (Ig), die für die Abwehr extrazellulär vorkommender Fremdkörper verantwortlich sind (1).

T-Lymphozyten bilden die spezifische zelluläre Immunabwehr. T-Lymphozyten reifen im Knochenmark heran und vollziehen ihre endgültige Ausdifferenzierung im Thymus. Sie werden in CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), CD8-positive T-Suppressorzellen und CD4-positive T-Helferzellen unterteilt. T-Lymphozyten sind für die Kontrolle von virusbefallenen Körperzellen, für die Abwehr von Pilzen und Parasiten und für die Zerstörung von entarteten Körperzellen zuständig. Sie spielen auch eine entscheidende Rolle bei der Abstoßung von fremden Geweben. Die T-Zell-Immunantwort wird durch Rezeptoren auf ihrer Oberfläche ausgelöst. Das Peptid muss der T-Zelle von einer antigenpräsentierenden Zelle zusammen mit einem MHC-Molekül präsentiert werden. Nur dann ist die T-Zelle in der Lage, ein Antigen zu erkennen. Im Gegensatz dazu erkennen Antikörper Fremdmoleküle in Lösung und auf Zellen unabhängig von ihrer Umgebung. Durch den Antigenkontakt wird die T-Zelle aktiviert und es findet eine klonale Expansion statt. Alle T-Zellen tragen sowohl einen CD3-Rezeptor als auch einen T-Zellrezeptor (1).

Beim Menschen wird der "major histocompatibility complex" (MHC) "humanes Leukozyten Antigen", kurz HLA, genannt. Die HLA-Gensequenzen liegen auf einer einzigen Region des kurzen Armes von Chromosom 6. Das HLA-Gen ist eines der Gene mit dem größten Polymorphismus. Für jede Klasse der HLA-Moleküle gibt es verschiedene Gene und jedes dieser Gene hat viele Allele. Man unterscheidet zwei Gruppen von HLA-Genprodukten:

- HLA-Klasse I Moleküle, die auf der Oberfläche fast aller zellkernhaltiger Körperzellen vorkommen: HLA-A, HLA-B und HLA-C. Sie sind unter anderem für die Abstoßung von Gewebe nach Transplantation verantwortlich. Peptide, gebunden an MHC-Klasse I Moleküle, werden von CD8-positiven T-Zellen erkannt und zerstört.
- HLA-Klasse II Moleküle, die nur auf B-Lymphozyten, dendritischen Zellen, Monozyten und aktivierten T-Lymphozyten vorkommen: HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ. HLA-Klasse II gebundene Peptide werden von CD4-positiven T-Zellen erkannt, die wiederum je nach Untergruppe Makrophagen aktivieren oder B-Zellen zur Antikörperbildung induzieren können (1).

1.4. Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) entstehen im Knochenmark aus CD34-positiven Vorläuferzellen und machen etwa 10%-15% aller zirkulierenden Lymphozyten im peripheren Blut gesunder Menschen aus (26, 57, 86).

Der Anteil an zirkulierenden NK-Zellen im peripheren Blut und der NK-Aktivierungszustand scheint jedoch zwischen den einzelnen Individuen zu schwanken. Es gibt Berichte, daß eine erniedrigte NK-Aktivität zur Entstehung von Tumoren, wie zum Beispiel die akute myeloische Leukämie beitragen kann (96, 106).

NK-Zellen sind neben T- und B-Lymphozyten eine dritte eigenständige Lymphozytenpopulation. Sie werden aufgrund ihrer Morphologie auch als Large Granular Lymphocytes (LGL) bezeichnet. NK-Zellen werden durch das Antigenmuster CD3-negativ, CD56-positiv und CD16-positiv charakterisiert. Im

Gegensatz zu T-Zellen unterliegen NK-Zellen keiner MHC-Restriktion und können Tumorzellen oder Virus-infizierte Zellen ohne vorherige Aktivierung und Immunisierung zerstören (1, 17, 60, 107).

Zytolytische Mechanismen von NK-Zellen sind der Perforin-Granzym-Mechanismus, die antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) und die Induktion der Apoptose (1, 17).

Ein besonderes Merkmal von NK-Zellen sind inhibierende Rezeptoren für MHC-Klasse I Moleküle (Killer-cell-inhibitory-receptor = KIR). Diese sorgen dafür, daß normale Zellen mit ungestörter MHC-Klasse I Molekülexpression nicht von NK-Zellen angegriffen werden. Die NK-Zelle bindet mit ihrem Rezeptor an das MHC-Klasse I Molekül, erhält ein inhibierendes Signal und leitet somit keine Zerstörung der kontaktierten Zelle ein (1, 17).

Inhibierende Rezeptoren für MHC-Klasse I Moleküle gibt es auch auf kleinen Populationen von zytotoxischen T-Zellen. In der Regel haben weniger als 5 % der T-Lymphozyten im peripheren Blut gesunder Menschen KIR (3, 69, 71).

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß NK-Zellen sowohl inhibierende als auch aktivierende Rezeptoren haben. Der inhibierende Rezeptor dominiert jedoch über den aktivierenden Rezeptor. Die Vermutung liegt nun nahe, daß die zytotoxische Funktion von NK-Zellen durch das Gleichgewicht der Interaktion zwischen inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren und ihren spezifischen Liganden reguliert wird. Folglich lysieren NK-Zellen jene Zellen, welche entweder keine oder aber eine erniedrigte Anzahl an MHC-Klasse I Molekülen exprimieren (16, 58, 70, 72).

Während also T-Zellen fremde Antigene in Verbindung mit MHC-Klasse I Molekülen erkennen und zerstören, sind NK-Zellen vor allem effektiv gegen Tumorzellen mit stark erniedrigter oder fehlender MHC-Klasse I Molekülexpression, entsprechend der "missing self" Hypothese (60).

Da NK-Zellen einen graft-versus-Tumoreffekt zeigen, das Engraftment fördern und keine GvHD verursachen, wäre die Verwendung von NK-Zellen für die adoptive Immuntherapie nach allogener Transplantation sinnvoll (74, 106).

1.5. Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC)

Eine der wichtigsten Entwicklungen zur Erforschung von menschlichen Tumorantigenen war die von Köhler und Milstein entwickelte Methode in den siebziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts zur Produktion von monoklonalen Antikörpern (50). Heute können aufgrund gentechnischer Verfahren monoklonale Antikörper (MoAk) in so großen Mengen hergestellt werden, daß sie sowohl zur Diagnose als auch zur Therapie eingesetzt werden können (46).

Es gibt verschiedene Antikörper-Typen. Grundsätzlich kann der monoklonale Antikörper als muriner Antikörper, chimärer Antikörper oder humanisierter Antikörper verwendet werden. Murine Antikörper haben den Nachteil, daß sie ein immunogenes Fremdeiweiß darstellen. Durch die Bildung von sogenannten "humanen anti-Maus Antikörpern" (HAMA) kommt es bei wiederholter Gabe zu einer raschen Neutralisation und Elimination des Antikörpers. Weiterhin ist die Aktivierung der antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität bei murinen Antikörpern eingeschränkt (18, 35). Chimäre Antikörper reduzieren den murinen Anteil des Konstruktes, indem sie die murinen variablen Regionen des Immunglobulins mit der humanen konstanten Region kombinieren (73).

Bei den humanisierten Antikörpern wird der murine Anteil bis auf die murinen hypervariablen Regionen weiter reduziert (48). Bei den Immunkonjugaten und Radiokonjugaten wird die Effektivität des Konstruktes durch die Wirkung des Pflanzen- oder Bakterientoxins oder des Radionuklids gesteigert (76, 104).

In dieser Arbeit wurde für die ADCC der chimäre anti-CD20 Antikörper IDEC-C2B8 verwendet. Er besteht aus der variablen Region der schweren und leichten Kette des Maus IgG₁ anti-CD20 MoAk und der humanen IgG₁ κ konstanten Region (87).

Die ADCC ist ein zellulär-humoraler Abwehrmechanismus des Immunsystems mit drei konstituierenden Elementen: einer Zielzelle (Target), die im Rahmen dieses Geschehens zerstört wird, einer Effektorzelle, welche die Zerstörung der Zielzelle induziert und einem Antikörper, über den der Lyse-Mechanismus ausgelöst wird. Die Effektorzelle braucht keinen vorherigen Kontakt mit der

Zielzelle zu haben, um diese zu zerstören. Die Spezifität der ADCC erfolgt über den Antikörper, der an das Antigen der Zielzelle bindet. Wesentliches Element des ADCC-Mechanismus ist der Fc-Rezeptor (CD16) der Effektorzelle, welcher das Fc-Stück des Membran-gebundenen Antikörpers auf der Zielzelle bindet. Die Vernetzung von Fc-Rezeptoren signalisiert dann der Effektorzelle, die Zielzelle zu töten. Die Zielzelle stirbt aufgrund der Schädigung ihrer Membran (Perforin, Granzyme) und durch Apoptose (1, 17).

Zur ADCC sind Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen fähig (1, 13, 17). Jedoch sind die Haupteffektorzellen der ADCC, vor allem was die Lyse von Tumorzellen betrifft, CD56/CD16 positive Zellen, also NK-Zellen (13, 40, 77, 78, 81, 97).

Zytokine wie Interleukin-2, Interleukin-12, Interferon- α und Interferon- γ steigern die ADCC und Zytokine wie Interleukin-4 und Interleukin-6 senken die ADCC (28).

Einige Autoren befürchten, daß die Funktion der Natürlichen Killerzellen für eine längere Zeit nach allogener Stammzelltransplantation beeinträchtigt sein könnte (23, 67, 80). Somit wären auch Patienten, die allogene Stammzelltransplantation bekommen sind, zur Ausübung der ADCC eingeschränkt oder überhaupt nicht fähig.

1.6. Interleukin-2 (IL-2)

Interleukin-2 ist ein 14 bis 17 kD schweres Glykoprotein, das beim Menschen von einem einzelnen Gen auf Chromosom 4 kodiert wird. IL-2 wird von CD4-positiven T-Zellen und in etwas geringeren Mengen von CD8-positiven T-Zellen produziert. Normalerweise wird IL-2 nur nach einer Antigenaktivierung der T-Zellen transkribiert, synthetisiert und sezerniert. Interleukin-2 ist der wichtigste autokrine Wachstumsfaktor für die T-Lymphozyten und die Menge von IL-2 ist bestimmend für das Ausmaß der T-Zell-abhängigen Immunantwort. IL-2 wirkt auf menschliche B-Zellen sowohl als Wachstumsfaktor als auch als Stimulus für die Antikörpersynthese. Schließlich stimuliert IL-2 das Wachstum der NK-Zellen und erhöht ihre zytotoxische Fähigkeit, so daß sogenannte Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK) entstehen (1).

Die systemische Applikation von Interleukin-2 ist bei wenigen Tumoren wie zum Beispiel beim Nierenzellkarzinom oder beim Melanom etabliert (17).

Zwar kann die Interleukin-2 Therapie bei Patienten zu Fieber, Myalgie, Schüttelfrost, zur Abnahme des Allgemeinzustandes und weiteren Nebenwirkungen führen, aber die tägliche low-dose Interleukin-2 Applikation über mehrere Wochen bei Patienten mit bösartigen Erkrankungen wurde relativ gut vertragen (2, 65, 66).

Die Applikation von IL-2 bei Patienten nach Knochenmarktransplantation, wurde ebenfalls von den meisten Patienten relativ gut vertragen (37, 85, 92, 94).

Werden jedoch hohe Dosen von Interleukin-2 verabreicht, so ist dies mit einer beträchtlichen Toxizität verbunden (100). Deshalb wäre die Kombination aus der Verabreichung einer niedrigen Dosis Interleukin-2 und monoklonalem Antikörper sinnvoll.

1.7. Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, das ausschließlich aus reinen CD34-positiven Stammzellen neu etablierte Immunsystem bei Kindern nach allogener Transplantation auf seine Funktionsfähigkeit zu untersuchen und Strategien zur Steigerung der antileukämischen Aktivität gegenüber einer eventuell noch bestehenden Minimal Residual Disease zu entwickeln.

Mittels in vitro Untersuchungen sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Können PBMNC allogen stammzelltransplantierter Kinder Tumorzelllinien spontan lysieren ?
2. Läßt sich die antileukämische Aktivität PBMNC mittels Interleukin-2 nach allogener Stammzelltransplantation steigern ?
3. Ist eine ADCC nach allogener Transplantation mit CD34-positiven Stammzellen möglich ?
4. Läßt sich die antikörper-abhängige zellvermittelte Aktivität mittels Interleukin-2 nach allogener Stammzelltransplantation steigern ?
5. Wie verhält es sich mit der ADCC im zeitlichen Verlauf nach allogener Stammzelltransplantation ?
6. Besteht eine Korrelation zwischen der antikörper-unabhängigen Zytotoxizität und der ADCC nach allogener Stammzelltransplantation ?
7. Ist die ADCC auch gegen Blasten nach allogener Stammzelltransplantation möglich ?
8. Haben CD158b-angereicherte PBMNC eine zytotoxische Aktivität und sind sie zur ADCC fähig ?

2. Material

2.1. Geräte

Laborzentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich
Sterile Werkbank Hera Safe	Heraeus
CO ₂ Begasungsbrutschrank	Heraeus
Kühlschrank, Gefrierschrank	Liebherr
Beheizbares Wasserbad	Memmert
Ultraschallentgaser Sonorex, Super RK 100	Bandelin
Schüttler Titramax 100	Heidolph
Vortexer	Janke & Kunert
Lichtmikroskop CX 40	Olympus
Inversionsmikroskop IM	Olympus
Zähluhr	IVO
Neubauer Zählkammer	Assistent
Deckglas	Menzel
Pipettiergerät Pipetboy plus	Integra Biosciences
Multipipette	Eppendorf
Verstellbare Pipetten (Pipetman)	Gilson
Vario Macs Permanentmagnet	Miltenyi Biotec
Eismaschine	Scotsman
Sonifier B-12 Cell Disruptor	Branson Sonic
Blutanalysegerät Cellcounter Advia 120	Bayer
FACSCalibur:	Becton Dickinson
Angeschlossen Hardware	Apple
Auswertungsprogramm Cellquest	Becton Dickinson
Victor 1420 Multilabel Counter	Wallac
Hardware	Compaq
Meßprogramm Wallac 1420 software	Wallac

2.2. Reagenzien

RPMI 1640 Medium (1x)	Biochrom
L-Glutamin 200 mM	Biochrom
Penicillin (10000 U) / Streptomycin (10 mg/ml)	Biochrom
Hepes-Buffer 1M	Biochrom
Fetales Kälberserum (FBS)	Biochrom
Humanalbumin 20 %	DRK Baden-Württ.
EDTA 0,25M	Uni-Apotheke
Phosphat buffered saline (PBS)	Gibco
Natriumazid 10 %	Uni-Apotheke
Bovin serum albumin 30 %	Sigma
Polyglobin 5 % (0,5g/ml)	Bayer Vital
Facs Flow	Becton Dickinson
Quifikit	Dako
Ficoll Separating Solution (Density 1,077)	Biochrom
BATDA Reagent 8mmol/l (Ligand)	Wallac
Europium Solution	Wallac
Lysis buffer	Wallac
Trypanblau 0,4 %	Sigma
Liquemin N 25000 (Heparin-Natrium)	Roche
Mäuseserum	Sigma
DMSO Cryoserv	WAC Chemie
Proleukin (Rekombinantes Interleukin-2)	Chiron

2.3. Stammlösungen

Stammlösung A : Medium für Zellkultivierung und Zytotoxizitäts-Assay :

- 500 ml RPMI 1640
 - + 50 ml fetales Kälberserum (FBS), für 30 Minuten bei 56 °C im Wasserbad inaktiviert.
 - + 10 ml HEPES-Buffer 1M.
 - + 5 ml Penicillin (10000U) / Streptomycin (10mg/ml).
 - + 5 ml L-Glutamin (200mM).

Stammlösung B : Medium für Zellkulturen und Zytotoxizitäts-Assay :

- 400 ml RPMI 1640
 - + 100 ml fetales Kälberserum (FBS), für 30 Minuten bei 56 °C im Wasserbad inaktiviert.
 - + 10 ml HEPES-Buffer 1M.
 - + 5 ml Penicillin (10000U) / Streptomycin (10mg/ml).
 - + 5 ml L-Glutamin (200mM).

Stammlösung C : FACS-Puffer :

- 500 ml Phosphat buffered saline (PBS).
 - + 5 ml Natriumazid 10 %.
 - + 1,66 ml Bovin serum albumin 30 %.

Stammlösung D : MACS-Puffer :

- 500 ml Phosphat buffered saline (PBS).
 - + 10 ml EDTA 0,25M.
 - + 10 ml Humanalbumin 20 %.

2.4. Einmalmaterial

Polystyrol-Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml (Falcon)	Greiner
96-Loch-Mikrotiterplatten (Rundboden)	Greiner
96-Loch-Mikrotiterplatten (Flachboden)	Greiner
Zellkulturflaschen 250 ml	Greiner
Facs-Analyseröhrchen 5 ml (Rundboden)	Becton-Dickinson
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Greiner
Sterile Plastikpipetten 1, 2, 5, 10 und 25 ml	Costar
Pipettenspitzen	Diamond
Combitips 2,5 ml	Eppendorf
Sterile Spritzen 5 ml, 10 ml, 50 ml	Braun
Kanülen	Braun
Butterfly-21	Abbott
Handschuhe	Safeskin
MACS-Separation Columns (LS+)	Miltenyi Biotec

2.5. Probenmaterial (Effektoren)

Peripheres Vollblut von:

- a) Allogen transplantierten Kindern mit positiv-angereicherten CD34 positiven Stammzellen von haploidentischen Familienspendern oder unverwandten (teil-) identischen Fremdspendern:

Hochangereicherte CD34-positive Stammzellen ($10\text{-}20 \times 10^6/\text{kg KG}$). Die Reinheit betrug im Durchschnitt 98,5 %. Keine medikamentöse Immunsuppression nach Transplantation.

Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Versuche im Alter von 2 bis 16 Jahren.

Tabelle 1:

Aufgeführt sind die Diagnosen der Patienten, deren PBMNC als Effektoren dienten. Gezeigt ist auch, ob es sich bei den Spendern um haploidente oder unverwandte (teil-) identische Fremdspender handelt.

Diagnose	Haploidente Familienspender	Unverwandte (teil-)identische Fremdspender
Akute Lymphatische Leukämie	4	8
Akute Myeloische Leukämie	1	1
Chronische Myeloische Leukämie	1	3
Myelodysplastisches Syndrom	1	
Osteopetrose	2	
Wiskott-Aldrich-Syndrom		1
Histiozytose	1	1
Schwere aplastische Anämie	1	1

b) freiwillige Spender.

2.6. Zellreihen (Targets)

- K562 (menschliche chronische myeloische Leukämie-Zelllinie), Referenz (61).
- Raji (menschliche Burkitt-Lymphom-Zelllinie), Referenz (83).
- MHH-CALL-4 (menschliche akute B-Zell Präleukämie-Zelllinie).
- Blasten (Zellen von Kindern in leukämischer Phase gewonnen).

2.7. Antikörper und Bindungsmoleküle

von Harlan :

anti-HLA Class I (A, B, C), clone W6/32, unkonjugiert.

von Immunotech :

anti-CD158b (unkonjugiert), anti-CD158b (PE-konjugiert).

von Miltenyi Biotec :

rat-anti-mouse IgG1 Microbeads.

von Becton Dickinson :

anti-CD3 (FITC-konjugiert), anti-CD3 (PE-konjugiert), anti-CD3 (PerCP-konjugiert), anti-CD16 (FITC-konjugiert), anti-CD16 (PE-konjugiert), anti-CD19 (FITC-konjugiert), anti-CD19 (PE-konjugiert), anti-CD20 (FITC-konjugiert), anti-CD20 (PE-konjugiert), anti-CD56 (FITC-konjugiert), anti-CD56 (PE-konjugiert), Goat-Anti-Mouse IgG1 (FITC-konjugiert), Mouse IgG1 (PerCP-konjugiert), TriTest anti-CD3/anti-CD16+CD56 (FITC-konjugiert/PE-konjugiert), Simultest Control $\gamma 1/\gamma 2a$ (FITC-konjugiert/PE-konjugiert).

von Dako :

Dako Qifikit,

F(ab')₂ Fragment of FITC-Conjugated Goat Anti-Mouse Immunoglobulins.

Antikörper für die ADCC :

Anti-CD20 chimeric humanisiert (IDEC C2 B8, Rituximab, La Roche).

3. Methoden

3.1. Isolierung peripherer mononukleärer Zellen (PBMNC)

Für die Isolierung von peripheren mononukleären Zellen aus Vollblut (PBMNC) wird die Methode der Dichtegradientenzentrifugation nach Böyum angewandt (15).

Hierzu wird heparinisiertes Vollblut (10 I.E./ml) im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt. Zwei Teile dieser Lösung werden auf ein Teil Ficoll (Trennlösung, Dichte $d=1,077$ g/ml) vorsichtig aufgeschichtet und bei RZB=400g, $T=20^{\circ}\text{C}$, $r/\text{mm}=175$, für 30 Minuten bei ungebremsten Auslauf zentrifugiert. Auf diese Weise entsteht eine Interphase, welche Lymphozyten und Monozyten enthält (PBMNC). Über der Interphase befindet sich ein Gemisch aus Plasma und PBS, unter der Interphase Ficoll. Das Sediment besteht aus Erythrozyten und Granulozyten. Die Interphase wird nun mit einer Pipette abgesaugt und in ein neues Röhrchen umpipettiert. Die PBMNC werden einmal mit PBS bei RZB=500g, $T=20^{\circ}\text{C}$, $r/\text{mm}=208$ für zehn Minuten gewaschen.

Anschließend werden die peripheren mononukleären Zellen für den Zytotoxizitätstest noch einmal mit PBS bei RZB=400g, $T=20^{\circ}\text{C}$, $r/\text{mm}=208$ für zehn Minuten gewaschen. Die PBMNC werden dann in Stammlösung A in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml aufgenommen und entweder mit oder ohne Interleukin-2 im Brutschrank über Nacht inkubiert.

Für die Isolierung im MACS aber werden die peripheren mononukleären Zellen ein zweites Mal bei RZB=400g, $T=4^{\circ}\text{C}$, $r/\text{mm}=208$ für zehn Minuten gewaschen. Dazu wird Stammlösung D verwendet.

Alle Arbeitsschritte erfolgen unter sterilen Bedingungen.

3.2. Zellzählung

Die PBMNC werden mit dem Advia Gerät gezählt. Die Tumorzelllinien werden mit der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Vitalität der Zellen wird unter dem Lichtmikroskop mittels der Trypanblau-Ausschlußmethode bestimmt.

3.3. Zellanreicherung mit dem MACS-System (magnetic activated cell sorter)

3.3.1. Prinzip eines MACS

Das Prinzip einer Zellanreicherung mit dem MACS-System beruht auf der Verbindung physikalischer Gegebenheiten mit immunologischen Methoden (68).

Ein Primärantikörper (Mouse IgG1 Isotyp) bindet an die zu isolierenden Zellen. An diesen Primärantikörper, der gegen ein bestimmtes Antigen der Zellen gerichtet ist, binden nun mit kleinen Eisenoxidpartikeln konjugierte Sekundärantikörper (Rat-anti-Mouse IgG1 Microbeads). Das Zellgemisch wird dann auf eine Trennsäule gegeben.

Die Trennsäule ist mit einer paramagnetischen Eisenmatrix gefüllt und befindet sich in einem starken Magnetfeld. Zellen, die mit Microbeads gekoppelt sind, bleiben in der Trennsäule hängen, während die Negativfraktion ungehindert durchfließt. Nach Entfernen der Trennsäule aus dem Magnetfeld, können jetzt die vorher magnetisch zurückgehaltenen Zellen als Positivfraktion leicht aus dieser eluiert werden.

3.3.2. Durchführung der Zellanreicherung

Sämtliche Arbeitsschritte erfolgen unter sterilen Bedingungen. Alle Materialien und Reagenzien müssen kühl sein (ca.4°C). Die Waschvorgänge werden alle bei 400g für 10 Minuten durchgeführt. Es ist wichtig, daß man nach jeder Zugabe einer Reagenz gründlich mischt.

1. Isolierung peripherer mononukleärer Zellen (PBMNC) wie unter 3.1. beschrieben.
2. Einstellen der PBMNC mit Stammlösung D auf 200 Millionen Zellen/ml und Zugabe von Polyglobulin (100 µl/ml), um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen. Ansatz auf einem Schüttler für 10 Minuten bei 4° C inkubieren. Ansatz zusätzlich per Hand alle 5 Minuten schütteln.
3. Nun wird monoklonaler anti-CD158b Antikörper in einem Verhältnis von 1:5 zu der Zellsuspension zugegeben (200 µl Antikörper + 800 µl Zellsuspension). Inkubation auf dem Schüttler bei 4° C für 30 Minuten. Alle 10 Minuten Ansatz zusätzlich per Hand schütteln.
4. Zweimal mit entgastem Puffer (Stammlösung D) waschen.
5. Resuspension des Zellpellets und einstellen mit entgastem Puffer auf 200 Millionen Zellen/ml.
6. Zugabe von rat-anti-mouse IgG1 Microbeads in einer Konzentration von 20 µl Microbeads/10⁷ Zellen. Ansatz auf dem Schüttler für 30 min bei 4° C inkubieren. Falcon mit Ansatz alle 10 min zusätzlich per Hand schütteln.
7. Einmal mit entgastem Puffer waschen.
8. Resuspension des Zellpellets mit 7 ml entgastem Puffer.
9. Installieren einer MACS-Separation Column (LS+) im Vario Macs Permanentmagneten.
10. Spülen der Säule mit 8 ml entgastem Puffer.
11. Auftragen der Zellsuspension auf die Säule.
12. Den Durchlauf nochmals auf die Säule geben, um möglichst viele Zellen gewinnen zu können.

13. Spülen der Säule mit 4 mal 2 ml entgastem Puffer, um die Reinheit der Zellen zu erhöhen.
14. Die Säule wird aus dem Magnetfeld entfernt und auf ein 15 ml Zentrifugenröhrchen aufgesetzt. Zügig 8 ml entgasten Puffer auf die Säule geben und diesen dann mit einem Stempel schnell und kräftig durch die Säule drücken.
15. Die gewonnene Zellsuspension mit angereicherten CD158b-positiven Zellen wird am Blutanalysegerät Cellcounter Advia 120 ausgezählt.
16. Die Zellsuspension wird zentrifugiert. Das Zellpellet wird mit Stammlösung A resuspendiert. Die Zellen werden auf 1 Million pro ml mit Stammlösung A eingestellt und über Nacht mit oder ohne Interleukin-2 im Brutschrank inkubiert.

3.4. Zytotoxizitätstest bzw. antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC)

3.4.1. Prinzip des BATDA-Release (Zytotoxizitätstest)

Der BATDA-Release dient zur Messung der spezifischen Zytotoxizität (Aktivität) der peripheren mononukleären Zellen (PBMNC) und wird als nicht radioaktive Alternative zum klassischen ^{51}Cr -Release verwendet. Die Methode entspricht weitgehend der Veröffentlichung von K. Blomberg et al. (14).

Zu lysierende Zellen (Target-Zellen) werden mit dem fluoreszierenden BATDA-Liganden (bis-acetoxymethyl 2,2':6',2"-terpyridine-6,6"dicarboxylate) inkubiert. Dieser hydrophobe Ligand penetriert schnell die Zellmembran. BATDA wird dann durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert und es entsteht ein hydrophiler TDA-Ligand (2,2':6',2"-terpyridine-6,6"dicarboxylic acid), welcher nicht mehr die Zellmembran passieren kann. Dieses TDA-Molekül wird aber aus der Target-Zelle freigesetzt, wenn diese durch eine Effektor-Zelle (PBMNC) lysiert wird. Wird ein solches TDA-Molekül zur Europium Solution (Eu) zugegeben, so

entsteht ein stark fluoreszierendes und stabiles Chelat (EuTDA). Dieser fluoreszierende Komplex wird im Fluorometer (Victor 1420 Multilabel Counter) gemessen. Die Höhe des Messsignals korreliert direkt mit der Anzahl lysierter Target-Zellen.

3.4.2. Durchführung des Zytotoxizitätstests bzw. der ADCC

1. Zentrifugierprogramme (Waschprogramme) für die verschiedenen Target-Zelllinien, wobei jedes Programm langsam hoch- und heruntergefahren wird. Die Zentrifuge wird auf 37 °C aufgeheizt :

	RZB	Dauer
a. K562:	200g	5min.
b. Raji:	200g	5min.
c. MHH-CALL-4:	200g	5min.
d. Blasten:	300g	5min.

Diese Programme gelten, wenn nichts anderes angegeben wird. Als Medium wird für MHH-CALL-4 Stammlösung B und für alle andern Zellen Stammlösung A verwendet.

2. Alle verwendeten Reagenzien und Zellen werden vor Beginn des Tests auf 37 °C erwärmt.
3. Ein Vielfaches der benötigten Target-Zellmenge wird in ein 15 ml Röhrchen überführt, zentrifugiert und mit Stammlösung A oder B resuspendiert. MHH-CALL-4 wird auf 2 Millionen Zellen pro ml und alle anderen Target-Zelllinien auf 1 Million Zellen pro ml eingestellt. Die Einstellung erfolgt mit Hilfe der Neubauer-Kammer und der Trypanblau-Ausschlußmethode, wobei auch die toten (blauen) Zellen mitgezählt werden, da auch diese den BATDA-Liganden aufnehmen. Trypanblau wird nur von toten Zellen aufgenommen. Solche Zellen sind dann im Lichtmikroskop blau gefärbt.

4. 2,5 µl BATDA-Ligand pro ml Target-Zellsuspension zugeben und vermischen. Inkubation im Brutschrank bei 37 °C:
 - a. K562: 30 Minuten.
 - b. Raji: 30 Minuten.
 - c. MHH-CALL-4: 45 Minuten.
 - d. Blasten: 60 Minuten.

Alle 10 Minuten Ansatz schütteln.

5. Ab jetzt müssen die Zellen vorsichtig behandelt werden, da sie wegen der Ligandaufnahme leicht zugrunde gehen können.
6. Nach Inkubation der Zellen mit dem Liganden wird das 15 ml Röhrchen mit Stammlösung A oder B aufgefüllt und zentrifugiert. Der Überstand wird dann verworfen, das Zellpellet resuspendiert und der Waschvorgang 4 mal wiederholt, um den nicht gebundenen Liganden möglichst vollständig aus der Zellsuspension zu entfernen.
7. Nach dem letzten Waschen werden die Zellen wieder in Stammlösung A oder B aufgenommen und in der Neubauer-Kammer gezählt. Dieses mal werden mit Hilfe der Trypanblau-Ausschlußmethode nur lebende Zellen ausgezählt. Tote Zellen können nicht mehr lysiert werden. Für die ADCC werden die Zellen auf 200 000 pro ml und für den antikörper-unabhängigen Zytotoxizitätstest auf 50 000 pro ml eingestellt. Aus der Zellsuspension werden 2 Proben a 1 ml entnommen.
8. Probe 1 wird mit Ultraschall behandelt. Dabei werden alle Zellen zerstört und der Ligand wird freigesetzt. So kann die Maximallyse bestimmt werden.
9. Probe 2 wird zentrifugiert. Der Überstand kann nun für die Bestimmung des Backgroundes benutzt werden.
10. Jetzt werden Effektorzellverdünnungsreihen (PBMNC) hergestellt. Die Standardverdünnungsreihe hat das Effektor : Target Verhältnis (E : T) :

20:1; 10:1; 5:1; 2,5:1.

11. Der Versuchsansatz wird in einer 96er Lochplatte mit Rundboden pipettiert. Für die Ermittlung des Backgroundes, der Spontanlyse und der Maximallyse werden Vierfachbestimmungen ansonsten Dreifachbestimmungen durchgeführt.
12. In den ersten 4 Löchern wird der Background, der in Schritt 8 hergestellt wurde, pipettiert. Das heißt 25 µl des Überstandes bei einer vorherigen Einstellung von 200 000 Target-Zellen pro ml bzw. 100 µl bei einer vorherigen Einstellung von 50 000 Target-Zellen pro ml.
13. In den nächsten 4 Löchern kommen 25 µl Target-Zellsuspension bei einer Einstellung von 200 000/ml bzw. 100µl Targetzellsuspension bei einer Einstellung von 50 000/ml zur Bestimmung der Spontanlyse.
14. Die nächsten 4 Löcher dienen zur Bestimmung der Maximallyse mit Hilfe des Lysis buffer. Es werden 20 µl Lysis buffer in jedes Loch vorgelegt. Dazu werden 25 µl Target-Zellsuspension (200 000/ml) bzw. 100 µl Targetzellsuspension (50 000/ml) pipettiert und gut vermischt.
15. In den weiteren 4 Löchern kommen 25 µl bei einer Target-Zelleinstellung von 200 000/ml bzw. 100 µl bei einer Target-Zelleinstellung von 50000/ml von der in Schritt 7 hergestellten Probe zur Ermittlung der Maximallyse mittels Ultraschall. Man hat nun 2 Werte für die Maximallyse. Ein Wert wurde mittels Lysis-buffer und der andere mittels Ultraschall bestimmt. Für die spätere Ermittlung der Maximallyse wird im Regelfall der mittels Lysis-buffer ermittelte Wert verwendet. Nur wenn der Wert, der mittels Lysis-buffer bestimmt wurde von dem Wert der mittels Ultraschall bestimmt wurde, stark abweicht, wird der durch Ultraschall gewonnene Wert genommen.
16. Für den antikörper-unabhängigen Zytotoxizitätstest werden nun in den restlichen Löchern 100 µl der Target-Zellsuspension (50 000/ml) pipettiert. Für die ADCC werden in den restlichen Löchern 25 µl der Target-Zellsuspension (200 000/ml) pipettiert. Zu diesen 25 µl kommt der für die ADCC notwendige Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/ml hinzu. Dieser Ansatz wird vermischt und für 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

17. Zu den Target-Zellen kommen jetzt jeweils 100 µl Dreifachansätze der Effektor-Zellverdünnungsreihen (PBMNC) hinzu.
Für die ADCC werden in 3 Löcher, in denen sich Target-Zellen und Antikörper befinden, nur jeweils Stammlösung A oder B zugegeben. Diese Löcher dienen als Kontrolle zur Erfassung einer evtl. Toxizität (Antikörper-abhängige komplementvermittelte Zytotoxizität) des Antikörpers.
18. Nun werden alle Löcher auf ein Endvolumen von 200 µl mit Stammlösung A oder B aufgefüllt.
19. Der fertige Ansatz wird für 2 Minuten bei 100 g anzentrifugiert und für 2 Stunden in den Brutschrank gestellt (37 °C, 5% CO₂).
20. Eine halbe Stunde vor Inkubationsende werden 200 µl Europium-Solution in eine 96er Lochplatte mit Flachboden vorpipettiert.
21. Nach abgelaufener Inkubationszeit wird der Ansatz für 5 min bei 200 g zentrifugiert und aus jedem Loch werden 20 µl des Überstandes in die vorbereitete 96er Lochplatte mit Flachboden übertragen.
22. Die 96er Lochplatte mit Flachboden wird jetzt bei Raumtemperatur in den Schüttler für 15-30 Minuten gespannt.
23. Die Fluoreszenz des EuTDA-Chelats wird schließlich am Fluorometer (Victor 1420 Multilabel Counter) gemessen.
24. Die Lyse in Prozent wird anhand folgender Formeln berechnet, wobei bei der Auswertung der Testergebnisse 1 Durchschnittswert aus drei bzw. vier verschiedenen Meßwerten gebildet wird :

Spezifische Lyse in % =

$$\frac{\text{Experimentelle Lyse (Einheit)} - \text{Spontane Lyse(Einheit)}}{\text{Maximale Lyse (Einheit)} - \text{Spontane Lyse (Einheit)}} \times 100$$

Spontane Lyse in % =

$$\frac{\text{Spontane Lyse (Einheit)} - \text{Background (Einheit)}}{\text{Maximale Lyse (Einheit)} - \text{Background (Einheit)}} \times 100$$

Die spontane Lyse für die Tumorzelllinie MHH-CALL-4 lag zwischen 5 und 62 Prozent. Die spezifische Lyse für die Kontrolle MHH-CALL-4 plus anti-CD20 Antikörper lag zwischen 0 und 20 Prozent.

Die spontane Lyse für die Tumorzelllinie Raji lag zwischen 25 und 70 Prozent. Die spezifische Lyse für die Kontrolle Raji plus anti-CD20 Antikörper lag zwischen -5 und 29 Prozent.

Die spontane Lyse für die Tumorzelllinie K562 lag zwischen 5 und 39 Prozent.

25. Mit Hilfe dieser Formeln läßt sich eine Kurve ermitteln, aus der sich die Zytotoxizität (Aktivität) der Effektor-Zellen (PBMNC) in ihren verschiedenen Verdünnungen ablesen läßt.

Die Targets wurden dann als zerstört betrachtet, wenn die spezifische Lyse größer als 10 Prozent war.

3.5. Messungen mit dem FACSCalibur-Flowcytometer

3.5.1. Prinzip eines Durchflußzytometers

Mit der Durchflußzytometrie (englisch: FACS = fluorescence activated cell scanning) können Einzelzellen in Suspension anhand von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften analysiert werden. Simultan können so an einer Zelle die relative Zellgröße, die Granularität sowie drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe bestimmt werden (84).

Die in einem Probenröhrchen vorgegebene Zellsuspension wird über eine Stahlkapillare mittels Überdruck in den Messbereich des FACS eingeführt und nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung in Tröpfchen von Einzelzellen zerlegt. Am Analysepunkt trifft ein Laserstrahl der Wellenlänge 488 nm die durchströmende Zelle. Es entsteht Streulicht, welches je nach Zellgröße, Struktur der Zellmembran und intrazellulären Bestandteilen unterschiedlich ist. Das in Vorwärtsrichtung gestreute Licht (englisch: forward light scatter, FSC) ist

hauptsächlich ein Maß für die Zellgröße, während das im rechten Winkel zum einfallenden Laserstrahl gestreute Licht (englisch: side scatter, SSC) vor allem von der intrazellulären Granularität abhängt. Die ausgesandten Lichtstrahlen werden von Detektoren empfangen und über elektronische Schaltungen gemessen und quantifiziert. Schließlich erhält der angeschlossene Computer vom Durchflusszytometer digitalisierte Werte.

Um Oberflächenantigene auf Zellen bestimmen zu können, müssen solche Zellen mit monoklonalen Antikörpern markiert werden, die ihrerseits mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt sind. Diese Farbstoffe absorbieren, wenn sie vom Laser des Durchflusszytometers getroffen werden, Lichtenergie, wodurch Elektronen in ein höheres Energieniveau angehoben werden. Beim Rücksprung emittieren die Elektronen eine definierte langwellige Strahlung, welche wiederum von Detektoren empfangen werden kann. Hier wurden die Farbstoffe:

Fluorescein-isothiocyanat (=FITC) dargestellt auf FL1

Phycoerythrin (=PE) dargestellt auf FL2 und

Peridinchlorophyllprotein (=PerCP) dargestellt auf FL3

verwendet, welche aufgrund von verschiedenen Emissionsmaxima gut voneinander unterschieden werden können. Je höher die emittierte Fluoreszenzintensität ist, desto mehr an Zellen gebundener Farbstoff wird erkannt. Die Fluoreszenzintensität ist somit ein direkt proportionales Maß für die relative Anzahl von Bindungsstellen auf einer Zelle.

Die Datenauswertung erfolgt mit dem Programm Cellquest von Becton Dickinson. Zur Auswertung stehen eine Einparameterdarstellung (Histogramm) und eine korrelierte Zweiparameterdarstellung (DOT-PLOT-Analyse) zur Verfügung. Bei der DOT-PLOT-Analyse werden zwei Parameter miteinander korreliert. So kann z.B. CD3 (FITC-markiert) mit CD4 (PE-markiert) korreliert werden. Das Histogramm stellt eine reine Häufigkeitsverteilung dar.

3.5.2. Durchführung der Zellmarkierung für die FACS-Analyse

Alle Reagenzien und Antikörper müssen auf 4°C gekühlt sein. Sämtliche Waschvorgänge erfolgen bei 400g für 10 Minuten.

1. Die zu messenden Zellen werden mit Stammlösung C gewaschen und anschließend mit dieser auf eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml eingestellt.
2. Zu je 100 µl Zellsuspension wird je 10 µl eines direkt markierten Antikörpers zugegeben und vermischt.
3. 30 Minuten Dunkelinkubation bei 4°C im Kühlschrank.
4. Waschen mit Stammlösung C.
5. Resuspension des Pellets in ca. 100 µl Stammlösung C.
6. Messen am Durchflußzytometer.

Zellen, die einen nicht farbkonjugierten monoklonalen Antikörper gebunden haben, werden mit 10 µl FITC-konjugiertem Goat-anti-Mouse IgG1 Antikörper für 15 Minuten bei 4°C im Kühlschrank inkubiert (indirekte Färbung), nachdem die Zellen auf 10^6 pro ml mit Stammlösung C eingestellt worden sind. Nach 1 mal Waschen kann dann weiter wie bei der direkten Färbung verfahren werden (ab Punkt 4).

3.6. Quantitative Zelloberflächenantigenbestimmung

3.6.1. Prinzip der Bestimmung

Für die quantitative Bestimmung der Zelloberflächenantigene wird Dako Qifikit benutzt. Das Prinzip beruht auf der Verwendung eines indirekten Immunfluoreszenz-Assays (82). Dako Qifikit enthält eine Serie von Kugeln, die einen Durchmesser von 10 µm haben und die mit unterschiedlichen aber genau definierten Mengen (5 verschiedene Mengen) an Maus Monoklonalen Antikörpermolekülen überzogen sind. Die Kugeln ahmen Zellen mit

unterschiedlichen Antigendichten nach, welche mit einem primären Maus Monoklonalen Antikörper, Isotyp IgG, gekennzeichnet wurden.

Die zu untersuchende Zellprobe wird nun mit einem primären Maus Monoklonalen Antikörper, der gegen das Antigen gerichtet ist, welches interessiert, markiert. Der Primärantikörper wird in gesättigter Konzentration verwendet. Somit entspricht die Anzahl gebundener Primärantikörpermolekülen der Anzahl der Antigene, die auf der Zelloberfläche präsentiert wird. Der Primärantikörper kann jedem Maus IgG Isotyp angehören. Eine weitere Zellprobe, die als Kontrolle dient wird in einem separaten Test-Röhrchen mit einem irrelevanten Maus Monoklonalen Antikörper markiert. Dann werden die beiden Zellproben, die Set-Up Kugeln und die Kalibrierungskugeln gleichzeitig mit einem fluorescein konjugierten anti-Maus sekundären Antikörper markiert. Der Sekundärantikörper wird ebenfalls in gesättigter Konzentration verwendet. Folglich korreliert die Fluoreszenz mit der Anzahl an gebundenen Primärantikörpermolekülen auf den Zellen und auf den Kugeln. Da die Kugeln eine genau definierte Menge an Maus Monoklonalen Antikörpermolekülen haben, welche man dem Beipackzettel entnehmen kann, kann so über die unterschiedliche Fluoreszenz die Antigendichte auf den untersuchten Zellen ermittelt werden. Die Set-Up Kugeln werden mit dem FACS-Gerät analysiert und mit deren Hilfe das Analysefenster erstellt. Die Set-Up Kugeln entsprechen zwei Populationen von Kugeln, nackten Kugeln und Kugeln mit einer hohen Anzahl von Monoklonalen Antikörpermolekülen. Die Kalibrierungskugeln werden mit dem FACS-Gerät analysiert. Die ermittelten Daten werden für die Konstruktion einer Kalibrierungskurve bzw. einer Regressionsgeraden (Durchschnittsfluoreszenzintensität) gegenüber der Antigendichte verwendet. Die zu untersuchende Zellprobe wird nun mit dem FACS-Gerät analysiert und die Antigendichte wird durch Interpolation bzw. Verwendung der Regressionsgeraden auf der Kalibrierungskurve ermittelt

3.6.2. Durchführung der HLA-Klasse I Bestimmung

1. Einstellen der zu untersuchenden Zellen mit Stammlösung C auf 1-2 Millionen Zellen pro ml.
2. 10 µl anti-HLA Class I + 100 µl der in Punkt 1 eingestellten Zellsuspension in ein Teströhrchen geben und vortexen.
10 µl Simultest Control $\gamma 1/\gamma 2a$ + 100 µl der in Punkt 1 eingestellten Zellsuspension in ein Teströhrchen (Kontrolle) geben und vortexen.
3. Beide Ansätze für 45 Minuten bei 4 °C in der Dunkelheit inkubieren.
4. Beide Teströhrchen mit Stammlösung C auffüllen und bei 300 g für 3 Minuten waschen und Überstand verwerfen.
5. 100 µl aus dem Qifikit Vial No. 1 in ein Teströhrchen geben und mit Set-Up Beads beschriften.
100 µl aus dem Qifikit Vial No. 2 in ein Teströhrchen geben und mit Calibration Beads beschriften.
Beide Teströhrchen mit Stammlösung C auffüllen und bei 400g für 8 Minuten waschen. Der Überstand wird dann verworfen.
6. Sekundärantikörper (F(ab')₂ Fragment of FITC-Conjugated Goat Anti-Mouse Immunoglobulin) mit Stammlösung C im Verhältnis 1:10 verdünnen.
7. 100 µL des verdünnten Sekundärantikörpers in alle 4 Teströhrchen geben und vortexen.
8. Alle Ansätze für 45 Minuten bei 4 °C in der Dunkelheit inkubieren.
9. Alle Teströhrchen mit Stammlösung C auffüllen und bei 400g für 10 Minuten waschen. Der Überstand wird dann verworfen.
10. Alle Teströhrchen werden nun für 2 Stunden in den Kühlschrank bei 4 °C gestellt. Danach erfolgt die Analyse am FACS-Gerät.

3.7. Zellkultivierung

Bei sämtlichen Arbeitsschritten muss unbedingt steril gearbeitet werden.

MHH-CALL-4 wird mit Stammlösung B und alle anderen Zelllinien mit Stammlösung A versorgt.

Die Zelllinien werden in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 5 % feuchter CO₂-Atmosphäre und 37 °C in Kultur gehalten. Vor Versorgung der Zellen, die etwa alle 2-3 Tage notwendig ist, beurteilt man ihren Zustand durch Betrachtung der Kultur unter dem Mikroskop. Sehen die einzelnen Zellen unrund und ausgefranst aus, sind die Zellen stark granuliert, zeigt das Kulturmedium durch rotvioletten oder gelblichen Farbumschlag eine Veränderung des pH-Wertes an, oder erscheint die Zelldichte zu groß, so muss ein Teil des alten Mediums samt Zellen aus der Kulturflasche verworfen und neues Medium zugegeben werden, um wieder optimale Wachstumsbedingungen zu haben. Auf diese Weise werden nämlich toxische Stoffwechselprodukte entfernt und gleichzeitig Nährstoffe zugeführt.

Blasten von Patienten, die für den Zytotoxizitätstest verwendet werden, sind in laboreigenen Stickstofftanks eingefroren gelagert. Blasten, die im Versuch eingesetzt werden sollen, werden am selben Tag, an dem ein Zytotoxizitätstest durchgeführt wird, aus dem Stickstofftank entnommen und aufgetaut. Nach dem Auftauen werden die Blasten zwei mal mit Stammlösung A bei 300g 7 Minuten lang gewaschen und können dann für den Zytotoxizitätstest eingesetzt werden.

3.8. Statistische Methoden

Für die Überprüfung des Zusammenhangs von Messwerten wurde die lineare Regression und der Korrelationskoeffizient r berechnet. Die Gleichung der linearen Regression und der Korrelationskoeffizient r wurden mit dem Programm Microsoft Excel berechnet. Der Korrelationskoeffizient r wurde mit Hilfe des Programms Prism Version 3,0 auf Signifikanz überprüft. Es wurde also überprüft, ob der Korrelationskoeffizient r von Null signifikant verschieden ist (105):

Hypothesen : $H_0 : r = 0$
 $H_1 : r \neq 0$
Signifikanzniveau : $\alpha = 0,05$

Prüfgröße:

$$t^2 = r^2 \frac{n-2}{1-r^2}$$

Freiheitsgrad: $f = n-2$
Quantil (zweiseitig) : $t_{f,1-\alpha/2}$

Es wurde eine Student-Verteilung (t-Verteilung) zugrundegelegt. r wurde als signifikant von 0 verschieden angenommen, wenn

$$|t| > t_{f,1-\alpha/2}.$$

4. Ergebnisse

4.1. Normwerte (ADCC von gesunden Spendern)

Es wurden periphere mononukleäre Zellen (PBMNC) von gesunden Spendern isoliert und deren zytotoxische Fähigkeit gegenüber Tumorzellen untersucht.

Vier verschiedene Versuchsansätze wurden aufgestellt:

1. Zytotoxische Aktivität nicht stimulierter PBMNC.
2. ADCC unstimulierter PBMNC mittels anti-CD20 Antikörper.
3. Zytotoxische Aktivität mit 40 Units Interleukin-2 stimulierter PBMNC.
4. ADCC mit 40 Units Interleukin-2 stimulierter PBMNC mittels anti-CD20 Antikörper.

4.1.1. Aktivität gegen die Tumorzelllinie MHH-CALL-4

Tabelle 2:

Zytotoxische Aktivität (spezifische Lyse) nicht stimulierter PBMNC gesunder Spender (n=5) gegenüber MHH-CALL-4 bei vier verschiedenen Effektor : Target Verhältnissen.

Anti-CD20 = Anti-CD20 Antikörper, E : T = Effektor : Target Verhältnis.

E:T	Mittelwert		Standardab- weichung		Median		Minimum		Maximum	
	mit anti-CD20	ohne anti- CD20	mit anti-CD20	ohne anti- CD20	mit anti-CD20	ohne anti- CD20	mit anti-CD20	ohne anti- CD20	mit anti-CD20	ohne anti- CD20
20:1	25	-1	9	5	28	-3	8	-6	33	8
10:1	19	-2	7	5	21	-3	8	-8	28	5
5:1	12	-2	3	3	11	-1	8	-6	16	2
2,5:1	8	-2	3	6	8	-1	4	-10	13	7

Tabelle 3:

Zytotoxische Aktivität (spezifische Lyse) mit 40 Units Interleukin-2 stimulierter PBMNC gesunder Spender (n=5) gegenüber der Tumorzelllinie MHH- CALL-4 bei vier verschiedenen Effektor : Target Verhältnissen.

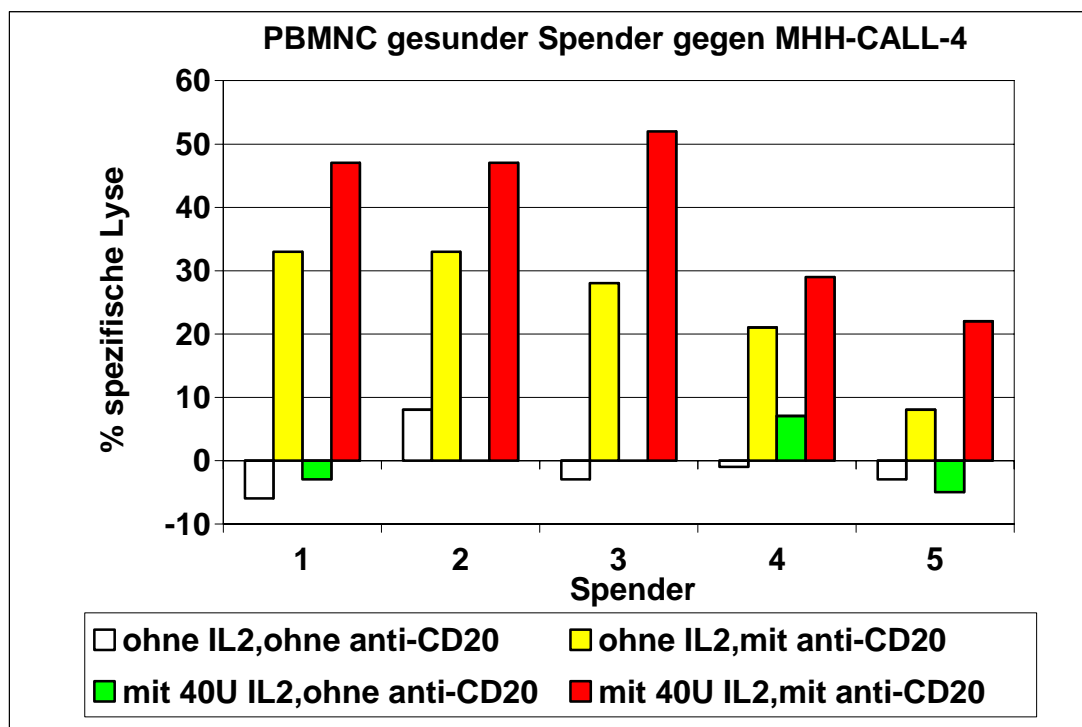
Anti-CD20 = Anti-CD20 Antikörper, E : T = Effektor : Target Verhältnis.

E:T	Mittelwert		Standardabweichung		Median		Minimum		Maximum	
	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20
20:1	39	0	12	4	47	-3	22	-5	52	7
10:1	28	-1	9	5	25	-3	19	-8	41	5
5:1	16	-4	2	4	15	-5	14	-8	20	3
2,5:1	13	-5	4	5	12	-3	7	-13	19	2

Abbildung 1:

Spezifische Lyse PBMNC von den einzelnen vorher genannten 5 gesunden Spendern gegen die Tumorzelllinie MHH-CALL-4 bei dem Effektor : Target Verhältnis 20:1. Auf der Abszisse sind die Spender aufgetragen. Auf der Ordinate ist die spezifische Lyse in Prozent angegeben.

Anti-CD20 = Anti-CD20 Antikörper, IL2 = Interleukin-2, U = Units, PBMNC = Peripheral Blood Mononuclear Cells.



Es wurde gezeigt, daß alle gesunden Spender in der Lage sind, die Tumorzelllinie MHH-CALL-4 zu lysieren. Die Lyse ist aber nur mit Hilfe des Antikörpers anti-CD20 möglich. Unstimulierte PBMNC können allein durch anti-CD20 Antikörper die Tumorzelllinie MHH-CALL-4 lysieren. Ohne Antikörper sind weder unstimulierte noch stimulierte PBMNC gesunder Spender in der Lage, die Tumorzelllinie MHH-CALL-4 zu zerstören. Die Kombination von Antikörper und Interleukin-2 ergibt die höchste Lyse. Ein einziger Spender war nur durch die Kombination aus Interleukin-2 und anti-CD20 Antikörper fähig, die Tumorzelllinie MHH-CALL-4 zu lysieren (Spender Nummer 5).

4.1.2. Aktivität gegen die Tumorzelllinie Raji

Tabelle 4:

Zytotoxische Aktivität (spezifische Lyse) nicht stimulierter PBMNC gesunder Spender (n=4) gegenüber der Tumorzelllinie Raji bei vier verschiedenen Effektor : Target Verhältnissen (= E :T). Anti-CD20 = Anti-CD20 Antikörper.

E:T	Mittelwert				Standardabweichung				Median				Minimum				Maximum			
	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20		
20:1	27	-2	12	3	21	-1	7	-8	39	1										
10:1	22	-1	11	3	25	-1	5	-4	34	3										
5:1	16	1	7	3	18	1	7	-4	23	5										
2,5:1	13	1	11	5	18	0	-5	-5	23	7										

Tabelle 5:

Zytotoxische Aktivität (spezifische Lyse) mit 40 Units Interleukin-2 stimulierter PBMNC gesunder Spender (n=4) gegenüber der Tumorzelllinie Raji bei vier verschiedenen Effektor : Target Verhältnissen.

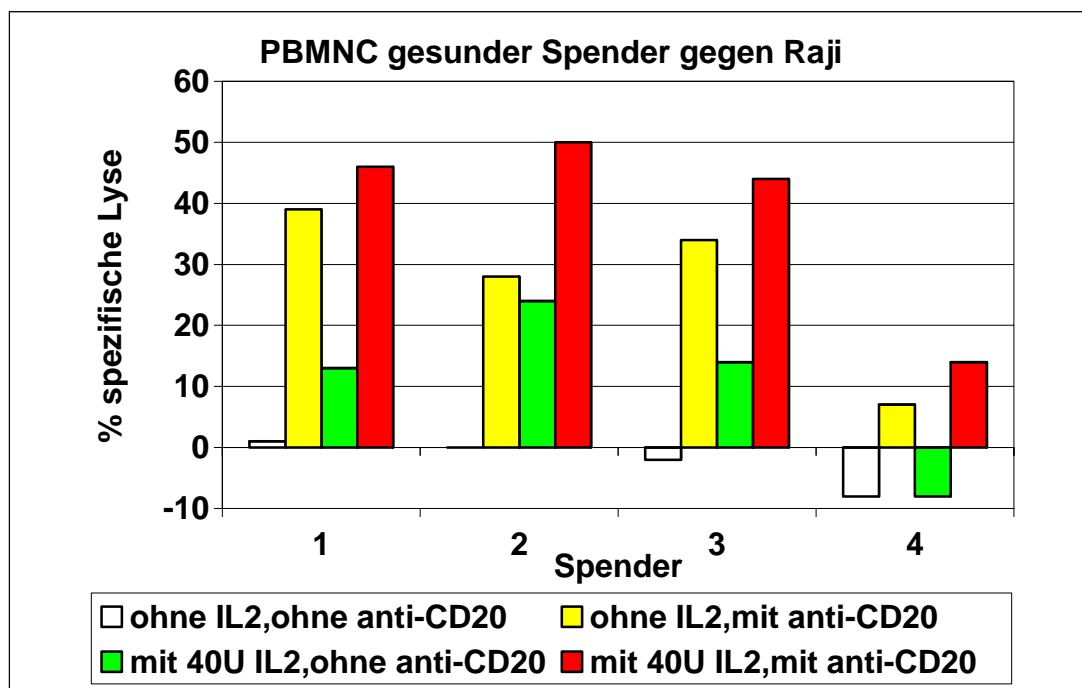
Anti-CD20 = Anti-CD20 Antikörper, E : T = Effektor : Target Verhältnis.

E:T	Mittelwert				Standardabweichung				Median				Minimum				Maximum			
	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20		
20:1	39	11	14	12	45	14	14	-8	50	24										
10:1	26	5	8	8	30	8	13	-9	32	13										
5:1	15	6	13	9	21	6	-8	-13	25	8										
2,5:1	13	2	9	7	16	5	-2	-9	20	8										

Abbildung 2:

Spezifische Lyse PBMNC von den einzelnen oben genannten 4 gesunden Spendern gegen die Tumorzelllinie Raji bei dem Effektor : Target Verhältnis 20:1. Auf der Abszisse sind die Spender aufgetragen. Auf der Ordinate ist die spezifische Lyse in Prozent angegeben.

Anti-CD20 = Anti-CD20 Antikörper, IL2 = Interleukin-2, U = Units, PBMNC = Peripheral Blood Mononuclear Cells.



Es wurde gezeigt, daß gesunde Spender in der Lage sind, die Tumorzelllinie Raji zu lysieren. Die Kombination von Antikörper und Interleukin-2 ergibt die höchste Lyse. Unstimulierte PBMNC haben durch den Einsatz von anti-CD20 Antikörper eine höhere spezifische Lyse als stimulierte PBMNC ohne Einsatz von anti-CD20 Antikörper. Nicht stimulierte PBMNC sind nur durch anti-CD20 Antikörper fähig, die Tumorzelllinie Raji zu lysieren. Drei von vier Spendern waren allein durch IL-2 Stimulation und ohne Antikörpereinsatz in der Lage, die Tumorzelllinie Raji zu zerstören.

Ein Spender war nur durch Kombination aus IL-2 und Antikörper fähig, die Tumorzelllinie Raji zu lysieren (Spender Nummer 4).

4.2. ADCC von Patienten

Nun wurden periphere mononukleäre Zellen (PBMNC) von allogenen stammzell-transplantierten Patienten isoliert und deren zytotoxische Fähigkeit untersucht. Es wurden wieder vier verschiedene Versuchsansätze aufgestellt:

1. Zytotoxische Aktivität nicht stimulierter PBMNC.
2. ADCC unstimulierter PBMNC mittels anti-CD20 Antikörper.
3. Zytotoxische Aktivität mit 40 Units Interleukin-2 stimulierter PBMNC.
4. ADCC mit 40 Units Interleukin-2 stimulierter PBMNC mittels anti-CD20 Antikörper.

4.2.1. Aktivität gegen die Tumorzelllinie MHH-CALL-4

Tabelle 6:

Zytotoxische Aktivität (spezifische Lyse) nicht stimulierter PBMNC allogener transplantierten Patienten (n=11) gegenüber der Tumorzelllinie MHH-CALL-4 bei vier verschiedenen Effektor : Target Verhältnissen. Bei einem Patienten konnten zwei Versuche gemacht werden. Um verlässlichere Werte zu haben, wurde aus diesen zwei Versuchen der Mittelwert gebildet und dieser wurde dann für die weiteren Berechnungen verwendet.

Anti-CD20 = Anti-CD20 Antikörper, E : T = Effektor : Target Verhältnis.

E:T	Mittelwert		Standardabweichung		Median		Minimum		Maximum	
	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20
20:1	29	-4	18	7	28	-4	8	-17	66	8
10:1	14	-6	13	6	10	-7	0	-16	41	8
5:1	8	-5	11	5	3	-6	-6	-11	28	8
2,5:1	3	-6	7	3	1	-6	-7	-12	12	1

Tabelle 7:

Zytotoxische Aktivität (spezifische Lyse) mit 40 Units Interleukin-2 stimulierter PBMNC allogenen stammzelltransplantierten Patienten (n=11) gegenüber der Tumorzelllinie MHH-CALL-4 bei vier verschiedenen Effektor : Target Verhältnissen. Bei einem Patienten konnten zwei Versuche gemacht werden. Um verlässlichere Werte zu haben, wurde aus diesen zwei Versuchen der Mittelwert gebildet und dieser wurde dann für die weiteren Berechnungen verwendet.

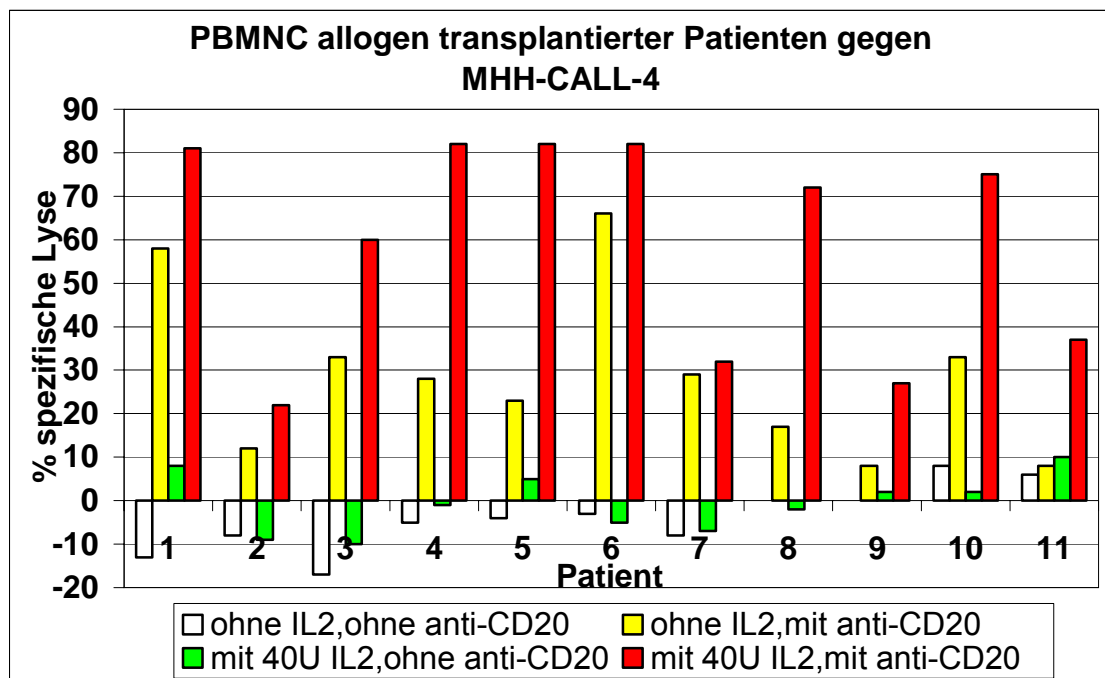
Anti-CD20 = Anti-CD20 Antikörper, E : T = Effektor : Target Verhältnis.

E:T	Mittelwert		Standardabweichung		Median		Minimum		Maximum	
	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20
20:1	59	-1	24	6	72	-1	22	-10	82	10
10:1	35	-7	20	5	37	-8	7	-14	63	0
5:1	21	-9	15	4	28	-9	0	-17	37	-3
2,5:1	13	-7	12	2	14	-7	-4	-9	27	-3

Abbildung 3:

Spezifische Lyse PBMNC von den einzelnen oben genannten 11 allogenen stammzelltransplantierten Patienten gegen die Tumorzelllinie MHH-CALL-4 bei dem Effektor : Target Verhältnis 20:1. Bei Patient Nummer 1 konnten zwei Versuche gemacht werden. Um verlässlichere Werte zu haben, wurde aus diesen zwei Versuchen der Mittelwert gebildet. Auf der Abszisse sind die einzelnen Patienten und auf der Ordinate die spezifische Lyse in Prozent aufgetragen.

Anti-CD20 = Anti-CD20 Antikörper, IL2 = Interleukin-2, U = Units, PBMNC = Peripheral Blood Mononuclear Cells.



Es wurde gezeigt, daß alle Patienten nach allogener Stammzelltransplantation ebenfalls wie gesunde Spender in der Lage sind, die Tumorzelllinie MHH-CALL-4 zu lysieren. Die Lyse ist wie bei gesunden Spendern aber nur mit Hilfe des Antikörpers anti-CD20 möglich. Ohne Antikörper sind weder unstimulierte noch stimulierte PBMNC allogene stammzelltransplantierte Patienten in der Lage, die Tumorzelllinie MHH-CALL-4 zu lysieren. Die Kombination von Antikörper und Interleukin-2 ergibt die höchste Lyse. Zwei von 11 Patienten waren nur durch die Kombination aus Interleukin-2 und anti-CD20 Antikörper in der Lage, die Tumorzelllinie MHH-CALL-4 zu zerstören (Patient 9 und 11).

4.2.2. Aktivität gegen die Tumorzelllinie Raji

Tabelle 8:

Zytotoxische Aktivität (spezifische Lyse) nicht stimulierter PBMNC allogener Stammzelltransplantierten Patienten (n=14) gegenüber der Tumorzelllinie Raji bei vier verschiedenen Effektor : Target Verhältnissen. Bei fünf Patienten konnten jeweils zwei Versuche gemacht werden. Um verlässlichere Werte zu haben, wurde aus diesen zwei Versuchen jeweils der Mittelwert gebildet und dieser wurde dann für die weiteren Berechnungen verwendet.

Anti-CD20 = Anti-CD20 Antikörper, E : T = Effektor : Target Verhältnis.

E:T	Mittelwert		Standardabweichung		Median		Minimum		Maximum	
	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20
20:1	15	-3	13	11	15	-4	1	-21	54	19
10:1	12	-4	12	10	10	-4	0	-20	46	25
5:1	9	-3	7	9	8	-4	-3	-12	24	28
2,5:1	12	1	8	9	11	-3	2	-8	32	26

Tabelle 9:

Zytotoxische Aktivität (spezifische Lyse) mit 40 Units Interleukin-2 stimulierter PBMNC allogenen stammzelltransplantierter Patienten (n=14) gegenüber der Tumorzelllinie Raji bei vier verschiedenen Effektor : Target Verhältnissen. Bei fünf Patienten konnten jeweils zwei Versuche gemacht werden. Um verlässlichere Werte zu haben, wurde aus diesen zwei Versuchen jeweils der Mittelwert gebildet und dieser wurde dann für die weiteren Berechnungen verwendet.

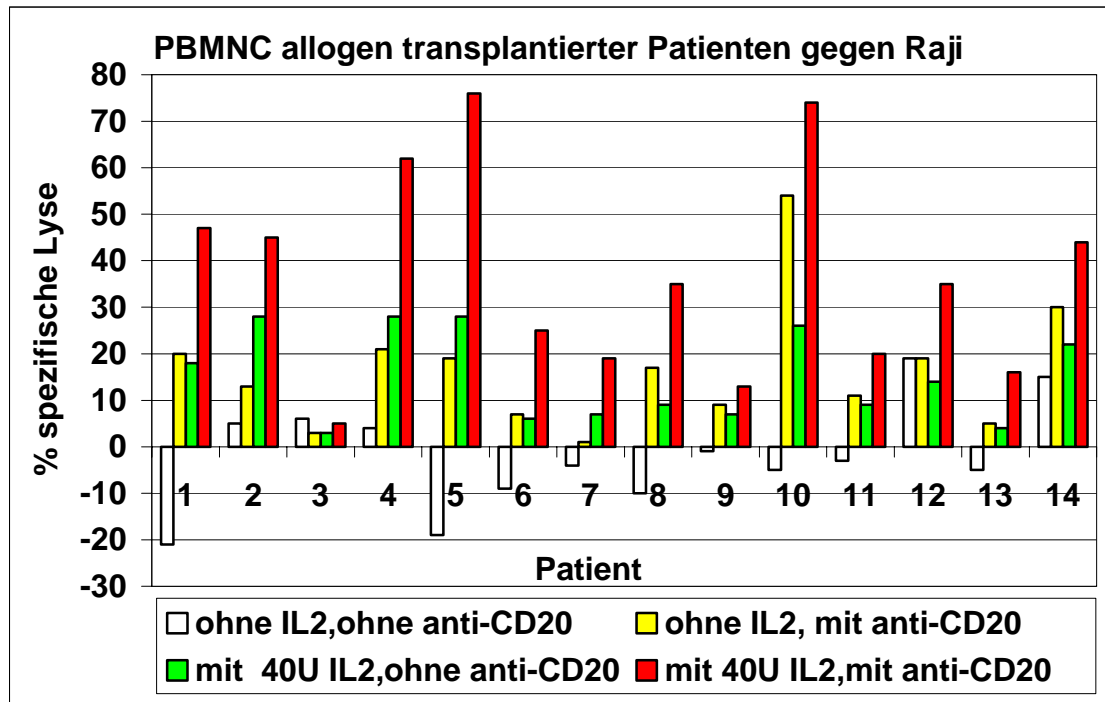
Anti-CD20 = Anti-CD20 Antikörper, E : T = Effektor : Target Verhältnis.

E:T	Mittelwert		Standardabweichung		Median		Minimum		Maximum	
	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20	mit anti-CD20	ohne anti-CD20
20:1	36	14	22	9	35	12	5	3	76	28
10:1	25	9	15	7	27	8	4	-4	51	24
5:1	18	6	11	6	13	6	3	-2	36	18
2,5:1	17	9	10	6	17	7	0	1	29	19

Abbildung 4:

Spezifische Lyse PBMNC allogenen stammzelltransplantierter Patienten gegen die Tumorzelllinie Raji bei dem Effektor : Target Verhältnis 20:1 (n=14). Bei Patient Nummer 1, 2, 6, 8 und 10 konnten jeweils zwei Versuche gemacht werden. Um verlässlichere Werte zu haben, wurde aus diesen zwei Versuchen

jeweils der Mittelwert gebildet. Auf der Abszisse sind die einzelnen Patienten und auf der Ordinate die spezifische Lyse in Prozent aufgetragen. Anti-CD20 = Anti-CD20 Antikörper, IL2 = Interleukin-2, U = Units, PBMNC = Peripheral Blood Mononuclear Cells.



Es wurde gezeigt, daß die meisten Patienten in der Lage sind, die Tumorzelllinie Raji zu lysieren. Jedoch war einer von 14 Patienten weder durch Interleukin-2 oder anti-CD20 Antikörper noch durch die Kombination aus beidem fähig, die Tumorzelllinie Raji zu lysieren (Patient 3). Bei den anderen 13 Patienten ergibt die Kombination von Antikörper und Interleukin-2 die höchste Lyse. Bei den meisten Patienten haben unstimulierte PBMNC durch den Einsatz von anti-CD20 Antikörper eine höhere spezifische Lyse als stimulierte PBMNC ohne Einsatz von anti-CD20 Antikörper. Nur 2 von 14 Patienten konnten ohne Interleukin-2 oder anti-CD20 Antikörper, die Tumorzelllinie Raji spontan lysieren (Patient 12 und 14). 7 von 14 Patienten waren nur durch IL-2 Stimulation und ohne Antikörpereinsatz in der Lage, die Tumorzelllinie Raji zu lysieren. 4 von 14 Patienten waren nur durch Kombination aus IL-2 und Antikörper fähig, die Tumorzelllinie Raji zu zerstören (Patient 6, 7, 9 und 13).

4.3. Korrelation zwischen antikörper-unabhängiger Zytotoxizität und antikörper-abhängiger zellvermittelter Zytotoxizität (=ADCC)

Untersucht wurde, ob Patienten mit niedriger Spontanaktivität (antikörper-unabhängige Lyse gegen K562) auch eine niedrige ADCC haben.

Tabelle 10:

Korrelation zwischen antikörper-unabhängiger Zytotoxizität gegen die Tumorzelllinie K562 und ADCC gegen die Tumorzelllinie MHH-CALL-4 bei einem Effektor : Target Verhältnis = 20:1 von allogenen stammzelltransplantierten Patienten. Aufgeführt ist die spezifische Lyse in Prozent nicht stimulierter und mit 40 Units Interleukin-2 stimulierter PBMNC allogenen stammzelltransplantierten Patienten. Untersucht wurden sieben Patienten. Die Anzahl der Versuche beträgt bei den stimulierten PBMNC n=8 und bei den nicht stimulierten PBMNC n=7.

Für die ADCC wurde anti-CD20 Antikörper verwendet.

IL2 = Interleukin-2, U = Units, ADCC = Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität.

Versuch	ohne IL2		mit 40 U IL2	
	Zytotoxizität gegen K562	ADCC gegen MHH-CALL-4	Zytotoxizität gegen K562	ADCC gegen MHH-CALL-4
1	10	12	19	22
2	30	33	72	60
3	83	28	100	82
4	24	23	81	82
5	88	66	100	82
6	14	29	32	32
7	56	17	86	72
8	88	64		

Abbildung 5:

Korrelation antikörper-unabhängiger Lyse und ADCC nicht stimulierter PBMNC allogener transplantierten Patienten bei einem Effektor : Target Verhältnis = 20 : 1. Auf der Abszisse ist die spezifische Lyse in Prozent von nicht stimulierten PBMNC gegen K562 und auf der Ordinate die spezifische Lyse (ADCC) derselben nicht stimulierten PBMNC gegen MHH-CALL-4 in Prozent aufgetragen. Für die ADCC wurde anti-CD20 Antikörper verwendet.

Effektoren: Nicht stimulierte PBMNC von sieben allogenen transplantierten Patienten. Die Anzahl der Versuche beträgt n=8

Target: Für antikörper-unabhängige Lyse: Die Tumorzelllinie K562

Für ADCC: Die Tumorzelllinie MHH-CALL-4

Statistik: Lineare Regression: $y = 0,43x + 12,9$;

$r = 0,71$ (Korrelationskoeffizient)

Signifikanz: Signifikante Korrelation

ADCC = Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität,

PBMNC = Peripheral Blood Mononuclear Cells.

Die genauen Werte können der Tabelle 10 entnommen werden.

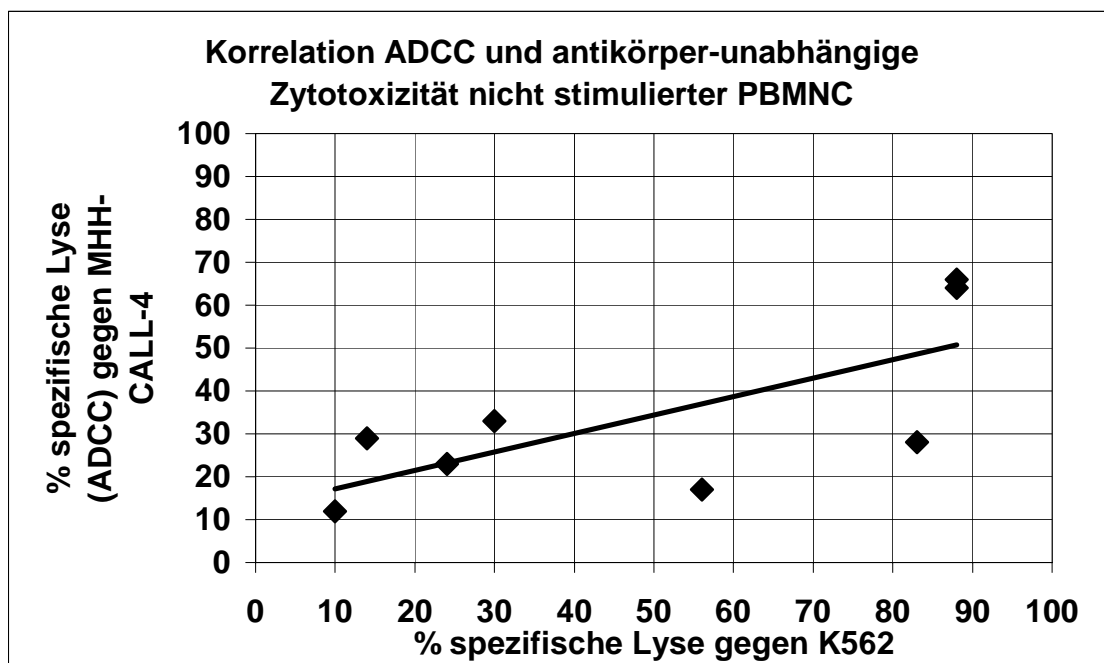


Abbildung 6:

Korrelation antikörper-unabhängiger Lyse und ADCC mit 40 Units Interleukin-2 stimulierter PBMNC allogener transplantierten Patienten bei einem Effektor : Target Verhältnis = 20 : 1. Auf der Abszisse ist die spezifische Lyse in Prozent von stimulierten PBMNC gegen K562 und auf der Ordinate die spezifische Lyse (ADCC) derselben stimulierten PBMNC gegen MHH-CALL-4 in Prozent aufgetragen. Für die ADCC wurde anti-CD20 Antikörper verwendet.

Effektoren: Stimulierte PBMNC von sieben allogenen transplantierten Patienten.
Die Anzahl der Versuche beträgt n=7.

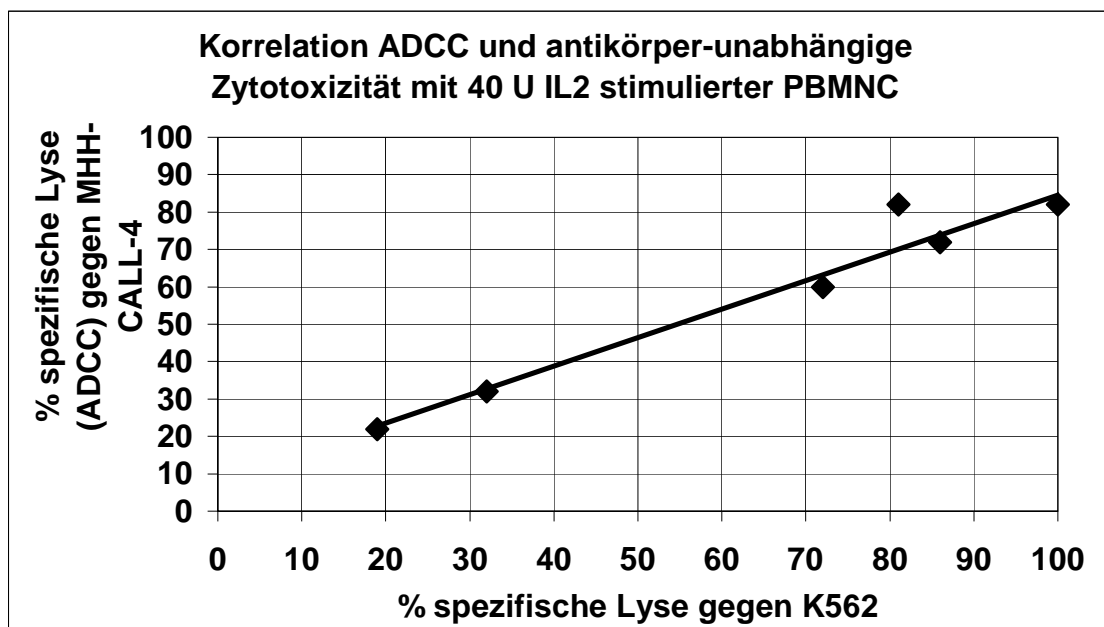
Target: Für antikörper-unabhängige Lyse: Die Tumorzelllinie K562
Für ADCC: Die Tumorzelllinie MHH-CALL-4

Statistik: Lineare Regression: $y = 0,76x + 8,24$;
 $r = 0,98$ (Korrelationskoeffizient)

Signifikanz: Signifikante Korrelation

ADCC = Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität, IL2 = Interleukin-2,
PBMNC = Peripheral Blood Mononuclear Cells, U = Units.

Die genauen Werte können der Tabelle 10 entnommen werden.



Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen der ADCC gegen MHH-CALL-4 und der antikörper-unabhängigen Lyse gegen K562. Diese Korrelation gilt sowohl für mit 40 Units stimulierte als auch für unstimulierte PBMNC.

Das bedeutet, daß Patienten mit niedriger Spontanaktivität auch eine niedrige ADCC haben und Patienten mit hoher Spontanaktivität eine hohe ADCC haben. Die Korrelation ist bei stimulierten PBMNC stärker.

Tabelle 11:

Korrelation zwischen antikörper-unabhängiger Zytotoxizität gegen die Tumorzelllinie K562 und ADCC gegen die Tumorzelllinie Raji bei einem Effektor : Target Verhältnis = 20:1 von allogenen stammzelltransplantierten Patienten. Aufgeführt sind nicht stimulierte und mit 40 Units Interleukin-2 stimulierte PBMNC allogenen stammzelltransplantiertes Patienten. Untersucht wurden 11 Patienten. Die Anzahl der Versuche beträgt n=13.

Für die ADCC wurde anti-CD20 Antikörper verwendet.

IL2 = Interleukin-2, U = Units, ADCC = Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität.

Versuch	ohne IL2		mit 40 U IL2	
	Zytotoxizität gegen K562	ADCC gegen Raji	Zytotoxizität gegen K562	ADCC gegen Raji
1	1	-19	47	31
2	72	4	101	44
3	1	3	6	5
4	24	21	81	62
5	66	1	79	19
6	20	22	32	35
7	90	54	93	75
8	14	11	48	34
9	29	11	48	20
10	88	54	100	73
11	43	19	59	35
12	29	5	37	16
13	14	30	32	44

Abbildung 7:

Korrelation antikörper-unabhängiger Lyse und ADCC nicht stimulierter PBMNC allogener transplantierten Patienten bei einem Effektor : Target Verhältnis = 20 : 1. Auf der Abszisse ist die spezifische Lyse in Prozent von nicht stimulierten PBMNC gegen K562 und auf der Ordinate die spezifische Lyse (ADCC) derselben nicht stimulierten PBMNC gegen Raji in Prozent aufgetragen. Für die ADCC wurde anti-CD20 Antikörper verwendet.

Effektoren: Nicht stimulierte PBMNC von 11 allogenen transplantierten Patienten. Die Anzahl der Versuche beträgt n=13.

Target: Für antikörper-unabhängige Lyse: Die Tumorzelllinie K562

Für ADCC: Die Tumorzelllinie Raji

Statistik: Lineare Regression: $y = 0,39x + 1,85$;

$r = 0,59$ (Korrelationskoeffizient)

Signifikanz: Signifikante Korrelation

ADCC = Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität,

PBMNC = Peripheral Blood Mononuclear Cells.

Die genauen Werte können der Tabelle 11 entnommen werden.

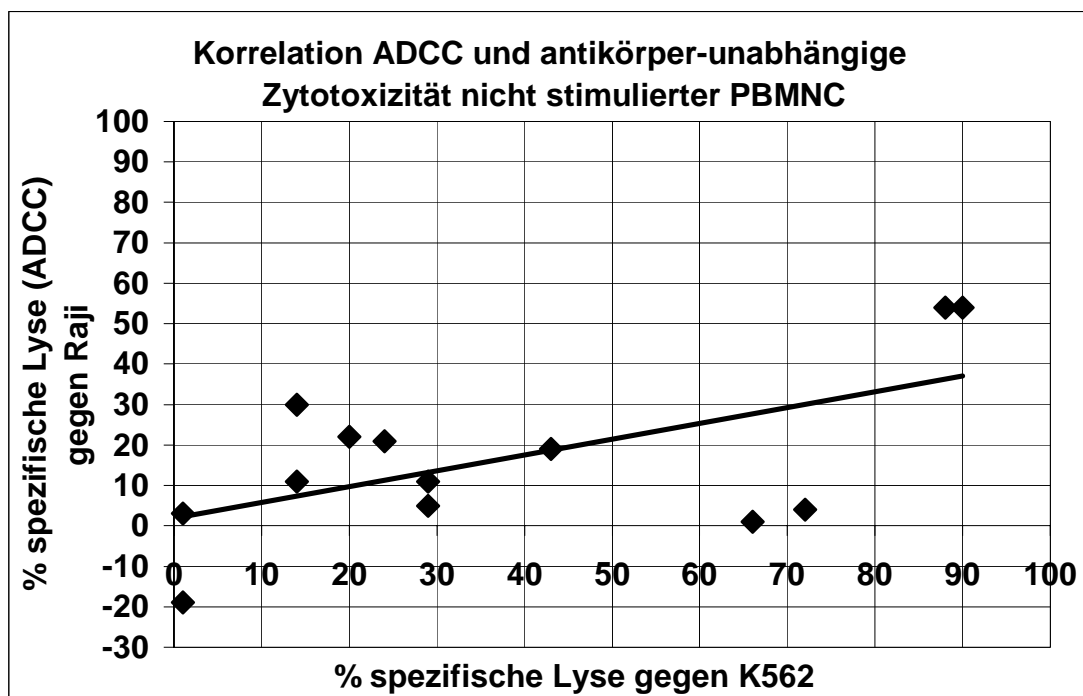


Abbildung 8:

Korrelation antikörper-unabhängiger Lyse und ADCC mit 40 Units Interleukin-2 stimulierter PBMNC allogener transplantierten Patienten bei einem Effektor : Target Verhältnis = 20 : 1. Auf der Abszisse ist die spezifische Lyse in Prozent von stimulierten PBMNC gegen K562 und auf der Ordinate die spezifische Lyse (ADCC) derselben stimulierten PBMNC gegen Raji in Prozent aufgetragen. Für die ADCC wurde anti-CD20 Antikörper verwendet.

Effektoren: Stimulierte PBMNC von 11 allogenen transplantierten Patienten. Die Anzahl der Versuche beträgt n=13.

Target: Für antikörper-unabhängige Lyse: Die Tumorzelllinie K562
Für ADCC: Die Tumorzelllinie Raji

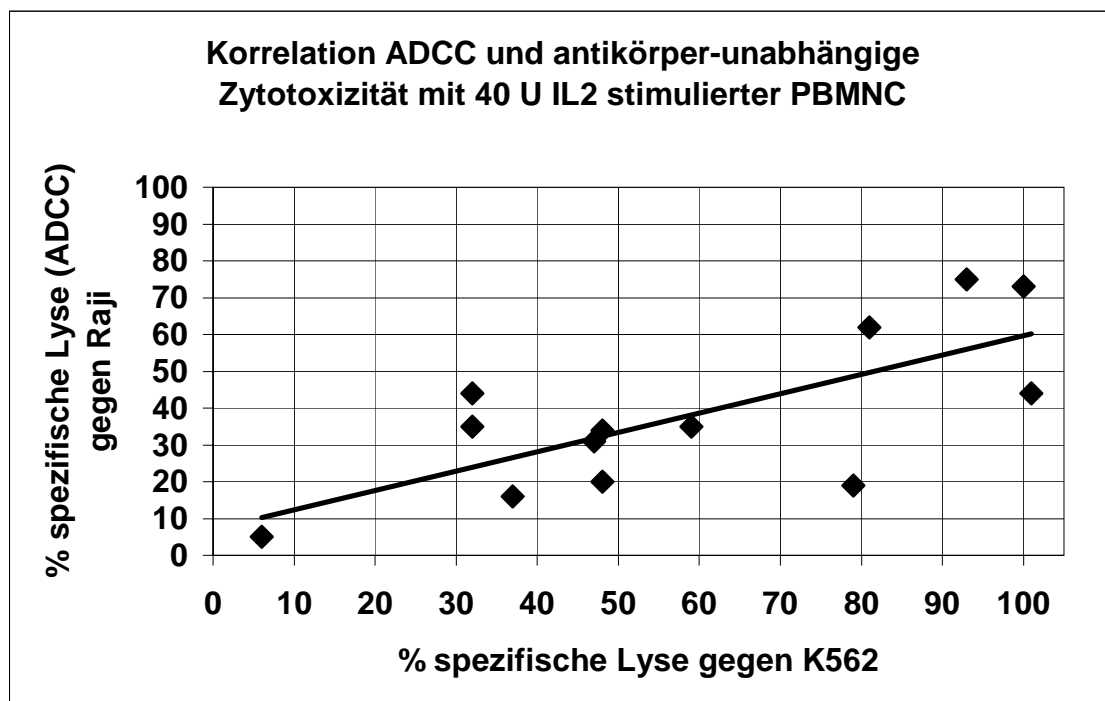
Statistik: Lineare Regression: $y = 0,52x + 7,14$;
 $r = 0,72$ (Korrelationskoeffizient)

Signifikanz: Signifikante Korrelation

ADCC = Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität, U = Units,

PBMNC = Peripheral Blood Mononuclear Cells, IL2 = Interleukin-2.

Die genauen Werte können der Tabelle 11 entnommen werden.



Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen der ADCC gegen Raji und der antikörper-unabhängigen Lyse gegen K562. Diese Korrelation gilt sowohl für mit 40 Units stimulierte als auch für unstimulierte PBMNC. Das bedeutet, daß Patienten mit niedriger Spontanaktivität auch eine niedrige ADCC haben und Patienten mit hoher Spontanaktivität eine hohe ADCC haben.

Die Korrelation ist bei stimulierten PBMNC stärker.

Zusammengefaßt konnte also eine signifikante Korrelation zwischen der antikörper-unabhängigen Lyse gegen die Tumorzelllinie K562 und der ADCC sowohl gegen die Tumorzelllinie Raji als auch gegen die Tumorzelllinie MHH-CALL-4 gefunden werden.

Das heißt, daß Patienten mit niedriger Spontanaktivität auch eine niedrige ADCC haben und Patienten mit hoher Spontanaktivität eine hohe ADCC haben.

4.4. FACS-Analysen

Es wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Höhe der spezifischen Lyse der ADCC und der Menge an bestimmten Oberflächenantigenen gibt.

Tabelle 12:

Abhängigkeit der Höhe einer ADCC gegen MHH-CALL-4 von den Oberflächenantigenen. Dargestellt ist jeweils die ADCC in Prozent von unstimulierten PBMNC eines allogenen stammzelltransplantierten Patienten und der dazugehörige Prozentanteil der Oberflächenantigene CD16, CD56, CD3, CD19 und CD56/CD16, welcher bei dem jeweiligen Zytotoxizitätstest mit Hilfe der FACS-Analyse gemessen wurde. Das Effektor : Target Verhältnis beträgt 20:1. Es wurden 11 Patienten untersucht. Die Anzahl der Versuche beträgt n=12, da die Versuche 2 und 9 vom selben Patienten sind.

ADCC = Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität,

CD56/CD16 = Doppelt positive CD56 und CD16 Zellen.

Versuch	% spezifische Lyse (ADCC)	% CD16	%CD56	%CD3	%CD19	% CD56/CD16
1	33	6	7	30	11	19
2	56	16	17	5	10	18
3	12	1	1	74	11	6
4	28	3	53	0	3	30
5	23	25	12	7	4	13
6	66	5	2	33	13	43
7	29	3	1	65	23	4
8	17	5	6	17	6	19
9	60	9	5	45	8	24
10	8	8	4	85	0	6
11	33	12	9	11	14	29
12	8	2	3	52	14	13

Statistik :

n=12					
Abhängigkeit % spezifische Lyse (ADCC)					
Und					
	% CD16	%CD56	%CD3	%CD19	%CD56/ CD16
Lineare Regression	y = 0,63x + 26,12	y = 0,06x + 30,46	y = -0,26x + 40,16	y = 0,66x + 24,64	y = 1,17x + 9,18
r (Korrelationskoeffizient)	0,22 (nicht signifikant)	0,04 (nicht signifikant)	-0,37(nicht signifikant)	0,20 (nicht signifikant)	0,68 (signifikant)

Es besteht eine positive signifikante Korrelation zwischen der ADCC und dem Anteil an doppelt positiven CD56/CD16-Zellen der unstimulierten PBMNC der Patienten.

Eine Korrelation zwischen der ADCC und den anderen Oberflächenantigenen besteht nicht. Das heißt, die ADCC ist um so höher, je größer der Anteil an doppelt positiven CD56/CD16 Zellen ist.

Tabelle 13:

Abhängigkeit der Höhe einer ADCC gegen MHH-CALL-4 von den Oberflächenantigenen. Dargestellt ist jeweils die ADCC in Prozent von mit 40 Units Interleukin-2 stimulierten PBMNC eines allogenen stammzelltransplantierten Patienten und der dazugehörige Prozentanteil der Oberflächenantigene CD16, CD56, CD3, CD19 und CD56/CD16, welcher bei dem jeweiligen Zytotoxizitätstest mit Hilfe der FACS-Analyse gemessen wurde. Das Effektor : Target Verhältnis beträgt 20:1. Es wurden 11 Patienten untersucht. Die Anzahl der Versuche beträgt n=12, da die Versuche 2 und 9 vom selben Patienten sind.

ADCC = Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität, CD56/CD16 = Doppelt positive CD56 und CD16 Zellen.

Versuch	% spezifische Lyse (ADCC)	% CD16	%CD56	%CD3	%CD19	% CD56/CD16
1	60	4	7	32	12	21
2	89	16	19	6	9	26
3	22	1	1	74	10	7
4	82	2	57	0	3	34
5	82	26	21	8	2	26
6	82	3	2	33	12	46
7	32	2	0	65	23	5
8	72	3	8	19	6	29
9	73	11	4	44	7	27
10	27	9	4	84	0	6
11	75	11	13	12	12	34
12	37	4	4	54	10	15

Statistik :

n=12					
Abhängigkeit % spezifische Lyse (ADCC)					
Und					
	% CD16	%CD56	%CD3	%CD19	%CD56/ CD16
lineare Regression	y = 1,49x + 49,66	y = 0,81x + 51,59	y = -0,80x + 89,73	y = -0,97x + 69,64	y = 1,71x +21,67
r (Korrelationskoeffizient)	0,45 (nicht signifikant)	0,52 (nicht signifikant)	-0,92 (signifikant)	0,24 (nicht signifikant)	0,89 (signifikant)

Es besteht eine positive signifikante Korrelation zwischen der ADCC und dem Anteil an doppelt positiven CD56/CD16-Zellen der stimulierten PBMNC der Patienten.

Es besteht eine signifikante negative Korrelation zwischen der ADCC und dem Anteil an CD3-positiven Zellen der PBMNC der Patienten.

Eine Korrelation zwischen der ADCC und den anderen Oberflächenantigenen besteht nicht

Das heißt, die ADCC ist um so höher, je größer der Anteil an doppelt positiven CD56/CD16-Zellen ist.

Tabelle 14:

Abhängigkeit der Höhe einer ADCC gegen Raji von den Oberflächenantigenen. Dargestellt ist jeweils die ADCC in Prozent von unstimulierten PBMNC eines allogenen stammzelltransplantierten Patienten und der dazugehörige Prozentanteil der Oberflächenantigene CD16, CD56, CD3, CD19 und CD56/CD16, welcher bei dem jeweiligen Zytotoxizitätstest mit Hilfe der FACS-Analyse gemessen wurde. Das Effektor : Target Verhältnis beträgt 20:1. Es wurden 13 Patienten untersucht. Die Anzahl der Versuche beträgt n=18, da die Versuche 1 und 12, 6 und 15, 2 und 14, 10 und 16 und 3 und 11 jeweils vom selben Patienten sind.

CD56/CD16 = Doppelt positive CD56 und CD16 Zellen, ADCC = Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität.

Versuch	% spezifische Lyse (ADCC)	% CD16	% CD56	% CD3	% CD19	% CD56/CD16
1	4	2	31	0	1	20
2	-11	16	17	5	10	18
3	-19	10	7	8	8	13
4	3	3	0	77	1	1
5	21	25	12	7	4	13
6	54	5	2	33	13	43
7	30	3	1	65	23	4
8	19	2	8	2	3	12
9	1	0	0	1	1	1
10	22	2	8	27	8	9
11	58	12	9	11	14	29
12	22	2	8	1	4	22
13	9	1	2	7	37	9
14	24	19	6	38	8	25
15	54	6	2	20	13	40
16	11	1	3	66	10	3
17	11	3	6	67	10	12
18	5	0	1	75	14	3

Statistik :

n=18					
Abhängigkeit % spezifische Lyse (ADCC)					
Und					
	% CD16	%CD56	%CD3	%CD19	%CD56/ CD16
Lineare Regression	$Y = 0,24x + 16,2$	$y = -0,6x + 21,74$	$y = 0,01x + 17,51$	$y = 0,5x + 12,65$	$y = 1,14x + 0,05$
r (Korrelationskoeffizient)	0,08 (nicht signifikant)	-0,21(nicht signifikant)	0,01(nicht signifikant)	0,21 (nicht signifikant)	0,68 (signifikant)

Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen der ADCC und dem Anteil an doppelt positiven CD56/CD16 der unstimulierten PBMNC der Patienten.

Eine Korrelation zwischen der ADCC und den anderen Oberflächenantigenen besteht nicht. Das heißt, die ADCC ist um so höher, je größer der Anteil an doppelt positiven CD56/CD16 Zellen ist.

Tabelle 15:

Abhängigkeit der Höhe einer ADCC gegen Raji von den Oberflächenantigenen. Dargestellt ist jeweils die ADCC in Prozent von mit 40 Units Interleukin-2 stimulierten PBMNC eines allogenen stammzelltransplantierten Patienten und der dazugehörige Prozentanteil der Oberflächenantigene CD16, CD56, CD3, CD19 und CD56/CD16, welcher bei dem jeweiligen Zytotoxizitätstest mit Hilfe der FACS-Analyse gemessen wurde. Das Effektor : Target Verhältnis beträgt 20:1. Es wurden 13 Patienten untersucht. Die Anzahl der Versuche beträgt n=18, da die Versuche 1 und 12, 6 und 15, 2 und 14, 10 und 16 und 3 und 11 jeweils vom selben Patienten sind.

ADCC = Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität, CD56/CD16 = Doppelt positive CD56/CD16 Zellen.

Versuch	% spezifische Lyse (ADCC)	% CD16	% CD56	% CD3	% CD19	% CD56/CD16
1	44	1	31	0	2	29
2	7	16	19	6	9	26
3	31	11	13	9	8	28
4	5	2	1	84	1	2
5	62	26	21	8	2	26
6	73	3	2	33	12	46
7	44	2	0	65	23	5
8	76	1	10	5	4	23
9	19	0	0	1	1	1
10	35	2	7	31	8	8
11	63	11	13	12	12	34
12	45	1	11	2	2	23
13	13	1	4	8	29	13
14	43	15	6	38	6	34
15	75	4	2	23	11	44
16	34	1	3	68	12	4
17	20	4	6	67	10	12
18	16	1	2	69	19	5

Statistik :

n=18					
Abhängigkeit % spezifische Lyse (ADCC)					
Und					
	% CD16	%CD56	%CD3	%CD19	%CD56/ CD16
Lineare Regression	y = 0,46x + 36,57	y = 0,39x + 35,91	y = -0,26x + 46,83	y = -0,45x + 43,4	y = 1,11x + 16,75
r (Korrelationskoeffizient)	0,14 (nicht signifikant)	0,14(nicht signifikant)	-0,32(nicht signifikant)	-0,15 (nicht signifikant)	0,69 (signifikant)

Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen der ADCC und dem Anteil an doppelt positiven CD56/CD16 der PBMNC der Patienten.

Eine Korrelation zwischen der ADCC und den anderen Oberflächenantigenen besteht nicht. Das heißt, die ADCC ist um so höher, je größer der Anteil an doppelt positiven CD56/CD16 Zellen ist.

Zusammengefaßt besteht also eine signifikante Korrelation zwischen der antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität und dem Anteil an doppelt positiven CD56/CD16 Zellen an den PBMNC der Patienten.

Diese Abhängigkeit besteht sowohl gegen die Tumorzelllinie Raji als auch gegen die Tumorzelllinie MHH-CALL-4.

Das heißt die ADCC ist um so höher, je größer der Anteil an doppelt positiven CD56/CD16 Zellen an den PBMNC der allogenen stammzelltransplantierten Patienten ist.

4.5. ADCC von Patienten im Verlauf

4.5.1 ADCC von Patienten gegen MHH-CALL-4 im zeitlichen Verlauf

Tabelle 16:

ADCC von PBMNC allogenen stammzelltransplantierter Patienten in einem zeitlichen Verlauf von 1-4 Monate, 5-11 Monate, 12-24 Monate und länger als 24 Monate nach allogener Stammzelltransplantation. Das Effektor : Target Verhältnis beträgt 20:1. Die Anzahl der untersuchten Patienten pro Zeitintervall ist mit n angegeben. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der spezifischen Lyse der im jeweiligen Zeitintervall befindlichen Patienten. Als Target diente die Tumorzelllinie MHH-CALL-4.

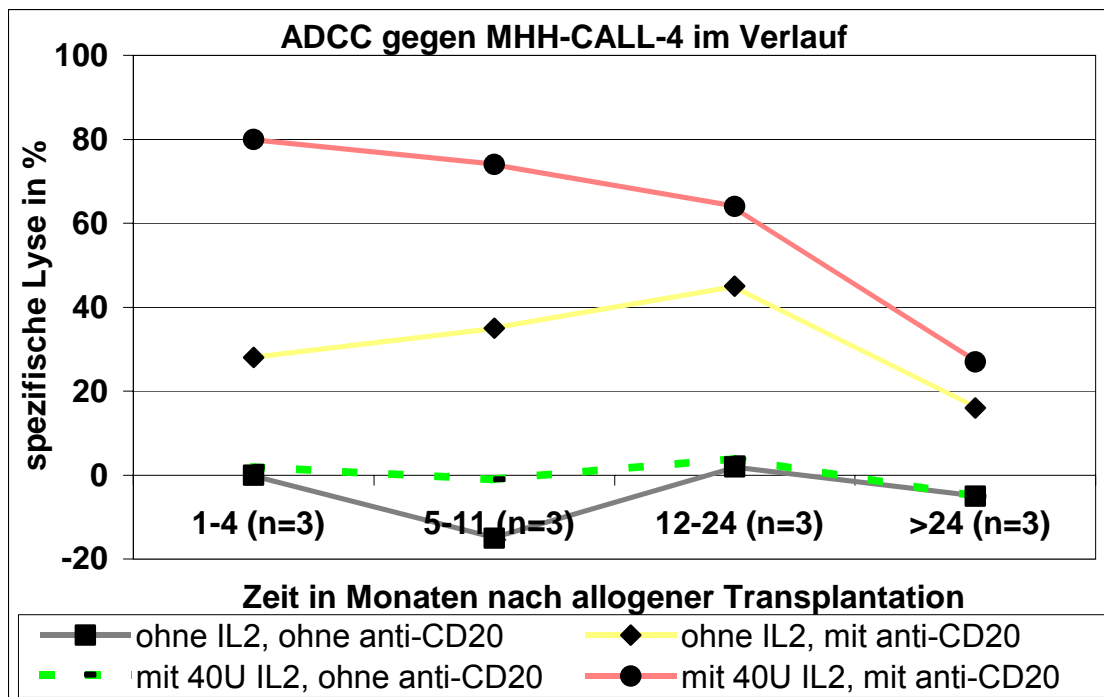
ADCC = Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität, IL2 = Interleukin-2, U = Units, anti-CD20 = anti-CD20 Antikörper.

Monate nach Transplantation	ohne IL2, ohne anti-CD20	ohne IL2, mit anti-CD20	mit 40U IL2, ohne anti-CD20	mit 40U IL2, mit anti-CD20
1-4 (n=3)	0	28	2	80
5-11 (n=3)	-15	35	-1	74
12-24 (n=3)	2	45	4	64
>24 (n=3)	-5	16	-5	27

Abbildung 9:

Darstellung der ADCC PBMNC allogenen stammzelltransplantierten Patienten gegen die Tumorzelllinie MHH-CALL-4 im zeitlichen Abstand von 1-4 Monate, 5-11 Monate, 12-24 Monate und länger als 24 Monate nach allogener Stammzelltransplantation. Das Effektor : Target Verhältnis beträgt 20:1. Die Anzahl der untersuchten Patienten pro Zeitintervall ist mit n angegeben. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der spezifischen Lyse der im jeweiligen Zeitintervall befindlichen Patienten. Die genauen Werte können der Tabelle 16 entnommen werden.

ADCC = Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität, IL2 = Interleukin-2, U = Units, anti-CD20 = anti-CD20 Antikörper.



Die Lyse gegen die Tumorzelllinie MHH-CALL-4 ist ohne anti-CD20 Antikörper zu keinem Zeitpunkt nach allogener Stammzelltransplantation möglich. Eine ADCC ist zu jedem Zeitpunkt nach allogener Stammzelltransplantation möglich. Die maximale Lyse liegt im Intervall 1 bis 4 Monate nach Transplantation. Ab > 24 Monate nach allogener Stammzelltransplantation existiert die kleinste ADCC.

4.5.2. ADCC von Patienten gegen Raji im zeitlichen Verlauf

Tabelle 17:

ADCC von PBMNC allogenen stammzelltransplantierten Patienten in einem zeitlichen Verlauf von 1-4 Monate, 5-11 Monate, 12-24 Monate und länger als 24 Monate nach allogener Stammzelltransplantation. Das Effektor : Target Verhältnis beträgt 20:1. Die Anzahl der untersuchten Patienten pro Zeitperiode und Ansatz ist mit n angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte der spezifischen Lyse der im jeweiligen Zeitintervall befindlichen Patienten. Im Zeitintervall 1-4 Monate und 5-11 Monate nach Transplantation gab es jeweils einen Patienten, von dem zwei Versuche gemacht werden konnte. Um verlässlichere Werte zu haben, wurde zunächst aus diesen zwei Versuchen jeweils der Mittelwert gebildet und dieser dann für die weiteren Berechnungen verwendet. Als Target diente die Tumorzelllinie Raji.

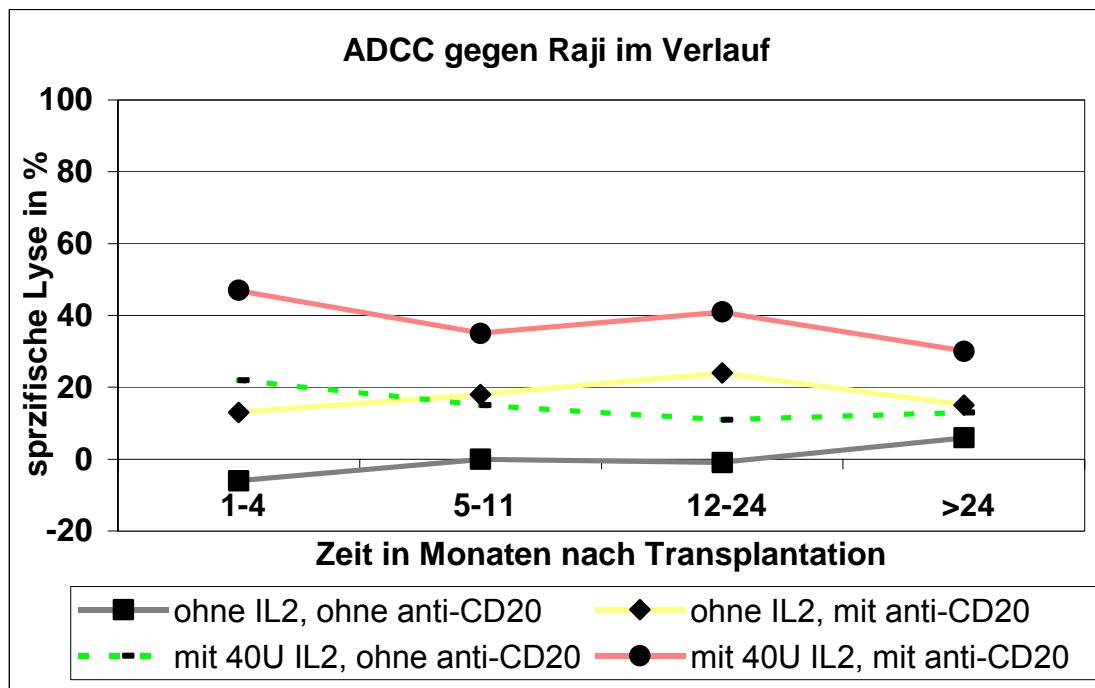
ADCC = Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität, IL2 = Interleukin-2, U = Units, anti-CD20 = anti-CD20 Antikörper.

Monate nach Transplantation	ohne IL2, ohne anti-CD20	ohne IL2, mit anti-CD20	mit 40U IL2, ohne anti-CD20	mit 40U IL2, mit anti-CD20
1-4	-6 (n=5)	13 (n=5)	22 (n=5)	47 (n=5)
5-11	0 (n=7)	18 (n=7)	15 (n=6)	35 (n=6)
12-24	-1 (n=4)	24 (n=4)	11(n=4)	41 (n=4)
>24	6 (n=3)	15 (n=3)	13 (n=2)	30 (n=2)

Abbildung 10:

Darstellung der ADCC von PBMC allogener stammzelltransplantierten Patienten gegen die Tumorzelllinie Raji im zeitlichen Abstand von 1-4 Monate, 5-11 Monate, 12-24 Monate und länger als 24 Monate nach allogener Stammzelltransplantation. Das E:T Verhältnis beträgt 20:1. Dargestellt sind die Mittelwerte der spezifischen Lyse der im jeweiligen Zeitintervall befindlichen Patienten. Die genauen Werte können der Tabelle 17 entnommen werden. Die Anzahl der untersuchten Patienten pro Zeitperiode und Ansatz ist mit n in oben aufgeführter Tabelle 17 angegeben.

ADCC = Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität, IL2 = Interleukin-2, U = Units, anti-CD20 = anti-CD20 Antikörper.



Nicht stimulierte PBMC können ohne anti-CD20 zu keinem Zeitpunkt nach allogener Stammzelltransplantation die Tumorzelllinie Raji lysieren. Eine ADCC ist zu jedem Zeitpunkt nach allogener Stammzelltransplantation möglich. Die maximale Lyse liegt im Intervall 1 bis 4 Monate nach Transplantation.

Ab > 24 Monate nach allogener Stammzelltransplantation haben stimulierte PBMC die kleinste ADCC.

4.6. Aktivität allogener transplantierten Patienten gegen die Tumorzelllinie K562

Untersucht wurde neben der ADCC auch die antikörper-unabhängige Lyse PBMNC allogener stammzelltransplantierten Patienten gegen K562 im zeitlichen Verlauf nach Transplantation.

Tabelle 18:

Aufgeführt ist die antikörper-unabhängige Lyse PBMNC allogener stammzelltransplantierten Patienten gegen die Tumorzelllinie K562 im zeitlichen Verlauf nach Transplantation. Das Effektor : Target Verhältnis beträgt 20 : 1. Es sind die Mittelwerte der antikörper-unabhängigen Lyse gegen die Zeit nach Transplantation aufgetragen. Die Anzahl der untersuchten Patienten pro Zeitperiode und Ansatz ist mit n angegeben. Im Zeitintervall 1-4 Monate und 5-11 Monate nach Transplantation gab es jeweils vier Patienten, von denen mehrere Versuche gemacht werden konnten. Um verlässlichere Werte zu haben, wurde zunächst aus diesen Versuchen jeweils der Mittelwert gebildet und dieser dann für die weiteren Berechnungen verwendet.

U = Units, IL2 = Interleukin-2.

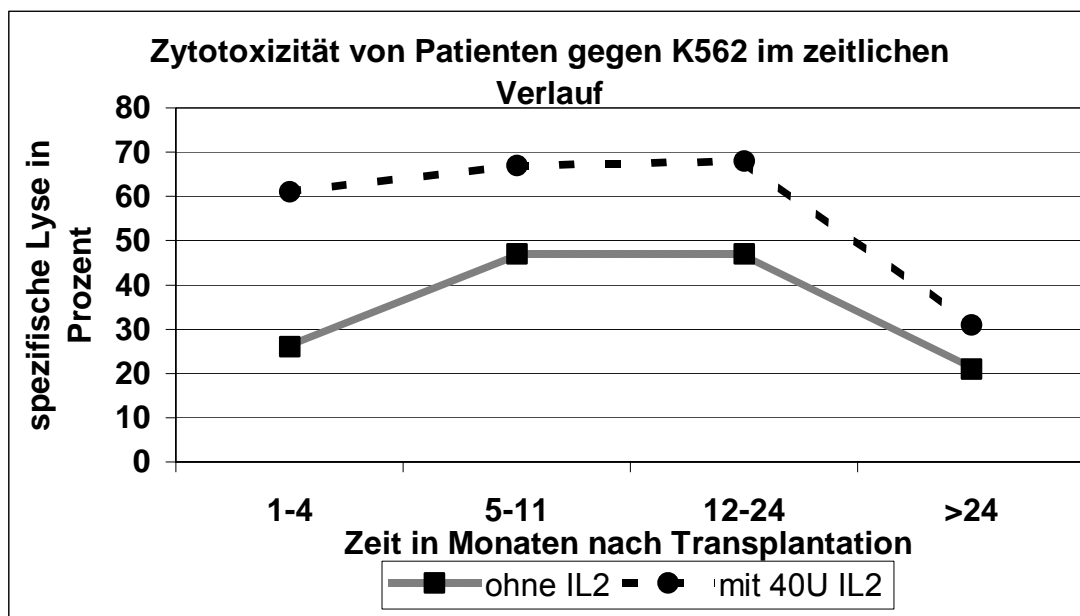
Monate nach Transplantation	ohne IL2	mit 40U IL2
1-4	26 (n=11)	61 (n=6)
5-11	47 (n=8)	67 (n=8)
12-24	47 (n=5)	68 (n=5)
>24	21 (n=7)	31 (n=6)

Abbildung 11:

Darstellung der antikörper-unabhängigen Lyse gegen die Zeit nach Transplantation. Auf der Abszisse ist die Zeit in Monaten nach allogener Stammzelltransplantation aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Mittelwerte der antikörper-unabhängigen Lyse von unstimulierten und mit 40 Units Interleukin-2 stimulierten PBMNC allogener transplantierten Patienten gegen die Tumorzelllinie K562 aufgetragen. Die genauen Werte können der Tabelle 18 entnommen werden. Die Anzahl der untersuchten Patienten pro Zeitintervall und Ansatz ist mit n in obiger Tabelle 18 aufgeführt.

Das Effektor : Target Verhältnis beträgt 20 : 1.

PBMNC = Peripheral Blood Mononuclear Cells, IL2 = Interleukin-2, U = Units.



Patienten sind zu jedem Zeitpunkt nach allogener Stammzelltransplantation in der Lage, die Tumorzelllinie K562 zu lysieren.

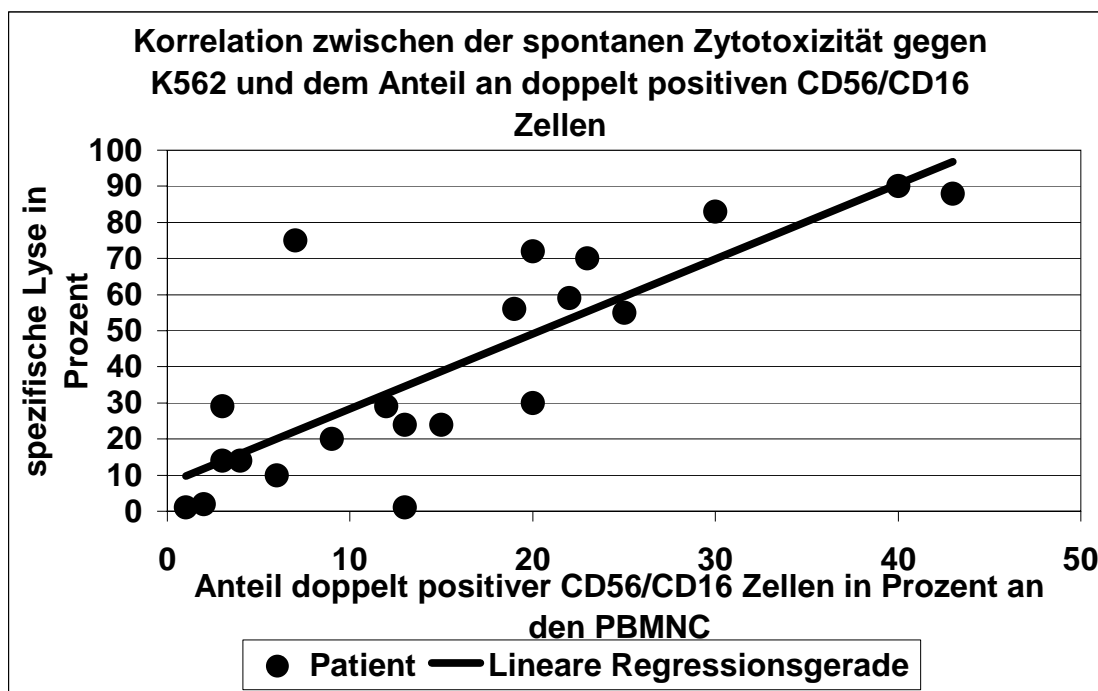
Die maximale Lyse befindet sich im Intervall 1-24 Monate nach Transplantation. In diesem Zeitintervall ist eine Stimulation mit Interleukin-2 besonders effektiv. Später als 24 Monate nach allogener Stammzelltransplantation existiert die kleinste spezifische Lyse. Später als 24 Monaten nach Transplantation spielt eine Stimulation mit Interleukin-2 praktisch keine Rolle mehr.

4.7. Abhängigkeit der spontanen Lyse gegen K562 von den NK-Zellen

Es wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Höhe der antikörper-unabhängigen Lyse gegen die Tumorzelllinie K562 und dem Anteil an CD56/CD16 positiven Zellen (NK-Zellen) an den jeweils im Versuch eingesetzten PBMNC allogenen stammzelltransplantierter Patienten gibt.

Abbildung 12:

Abhängigkeit der Höhe der spontanen Lyse gegen K562 von den doppelt CD56/CD16 positiven Zellen. Dargestellt ist jeweils die spezifische Lyse in Prozent von unstimulierten PBMNC eines Patienten und der dazugehörige Prozentanteil der doppelt positiven CD56/CD16 Zellen, welcher bei dem jeweiligen Zytotoxizitätstest mit Hilfe der FACS-Analyse gemessen wurde. Das Effektor : Target Verhältnis beträgt 20:1. Es wurden 15 Patienten untersucht. Die Anzahl der Versuche beträgt n=21.



Die Gleichung der dazugehörigen Regressionsgeraden lautet: $y=2,1x + 7,7$. Der Korrelationskoeffizient lautet: $r=0,81$ und ist signifikant. Somit besteht eine Korrelation zwischen der Höhe der spontanen Lyse gegen K562 und dem Anteil doppelt positiver CD56/CD16 Zellen an den PBMNC.

Das heißt je höher der NK-Zellanteil an den PBMNC ist, desto höher ist die zytotoxische Aktivität der PBMNC des allogenen stammzelltransplantierten Patienten und umgekehrt.

4.8. Antigene im Verlauf

Es wurde mittels FACS-Analyse die Antigenverteilung auf den PBMNC allogener stammzelltransplantierten Patienten, die auch für die Zytotoxizitätstests eingesetzt wurden, ermittelt. Untersucht wurden die Antigene CD16, CD56, CD3, CD19, und CD56/16 zu einer bestimmten Periode nach Stammzelltransplantation. So konnte der Anteil dieser Antigene in Abhängigkeit der Zeit nach Transplantation bestimmt werden.

Tabelle 19:

Aufgeführt ist der Anteil bestimmter Antigene in Prozent auf den PBMNC eines Patienten zu einer bestimmten Zeitperiode nach allogener Stammzelltransplantation. Dargestellt sind die Mittelwerte. Die Anzahl der untersuchten Patienten pro Zeitperiode ist mit n angegeben. Im Zeitintervall 1-4 Monate und 5-11 Monate nach Transplantation gab es jeweils zwei Patienten, von denen mehrere Versuche gemacht werden konnten. Um verlässlichere Werte zu haben, wurde zunächst aus diesen Versuchen jeweils der Mittelwert gebildet und dieser dann für die weiteren Berechnungen verwendet.

CD56/CD16 = Doppelt positive CD56 und CD16 Zellen.

Zeit nach allogener Stammzell- transplantation	%CD16- Antigene	%CD56- Antigene	%CD3- Antigene	%CD19- Antigene	%CD56/16- Antigene
1-4 Monate (n=6)	7	13	16	3	12
5-11 Monate (n=8)	5	6	17	12	17
12-24 Monate (n=4)	3	6	55	12	15
>24 Monate (n=6)	2	3	74	13	4

Der Anteil an CD16-positiven und CD56-positiven Zellen an den PBMNC nach allogener Stammzelltransplantation nimmt kontinuierlich ab.

Der Anteil an CD3-positiven und CD19-positiven Zellen an den PBMNC nach allogener Stammzelltransplantation nimmt kontinuierlich zu.

Der Anteil an CD56/CD16 doppelt positiven Zellen an den PBMNC nach allogener Stammzelltransplantation bleibt zunächst konstant und nimmt dann ab >24 Monate nach allogener Stammzelltransplantation ab.

4.9. ADCC gegen Blasten

Es wurde untersucht, ob Patienten auch in der Lage sind, Blasten zu lysieren. Die Blasten wurden von einem Kind in leukämischer Phase bei uns im Labor gewonnen.

Tabelle20 :

Tabelle 20 zeigt die ADCC PBMNC eines Patienten gegen Blasten. Die spezifische Lyse ist in Prozent angegeben. Das Effektor zu Target Verhältnis reicht von 20:1 bis 2,5:1. Die Spontane Lyse lag bei 21 Prozent.

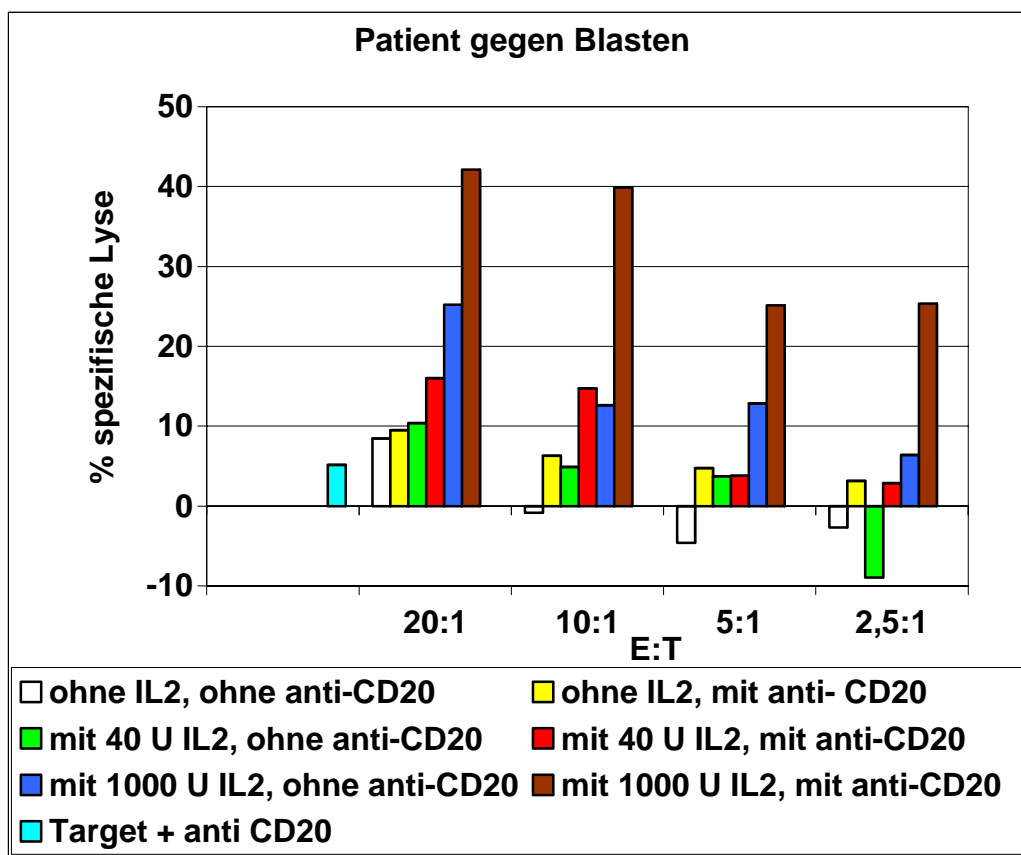
ADCC = Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität, IL2 = Interleukin-2, U= Units, anti-CD20 = anti-CD20 Antikörper, E : T = Effektor : Target Verhältnis.

E:T	spezifische Lyse in Prozent						Target + anti-CD20
	ohne IL2, ohne anti-CD20	ohne IL2, mit anti-CD20	mit 40 U IL2, ohne anti-CD20	mit 40 U IL2, mit anti-CD20	mit 1000 U IL2, ohne anti-CD20	mit 1000 U IL2, mit anti-CD20	
							5
20:1	8	10	10	16	25	42	
10:1	-1	6	5	15	13	40	
5:1	-5	5	4	4	13	25	
2,5:1	-3	3	-9	3	6	25	

Abbildung 13 :

Dargestellt ist die ADCC des oben in Tabelle 20 genannten Patienten (PBMNC) gegen Blasten.

Auf der Abszisse ist das Effektor zu Target Verhältnis (= E : T) von 20:1 bis 2,5:1 aufgetragen. Auf der Ordinate ist die spezifische Lyse in Prozent angegeben. Anzahl der Versuche n=1. Die Spontane Lyse lag bei 21 Prozent. ADCC = Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität, IL2 = Interleukin-2, U = Units, anti-CD20 = anti-CD20 Antikörper.



Der Patient ist ohne Interleukin-2 Stimulation und auch mit 40 Units Interleukin-2 Stimulation nicht in der Lage, die Blasten zu lysieren. Erst durch Stimulation mit 1000 Units Interleukin-2 lassen sich die Blasten zerstören. Auch durch einen alleinigen Antikörpereinsatz lassen sich die Blasten nicht vernichten. Aber schon bei einer Aktivierung mit 40 Units Interleukin-2 reicht dann der Antikörpereinsatz aus, um die Blasten zu lysieren. Die ADCC ist mit 1000 Units Interleukin-2 höher als mit 40 Units Interleukin-2.

4.10. CD158b-positive PBMNC gegen Raji

Mit dem MACS-System wurden wie im Methodenteil beschrieben CD158b-positive Zellen aus dem peripheren Blut von zwei freiwilligen Spendern angereichert. Mit diesen CD158b-positiven PBMNC wurde nun die ADCC gegen die Tumorzelllinie Raji durchgeführt.

Die CD158b-positiven Zellen wurden als Effektoren für die ADCC sowohl unstimuliert als auch mit 1000 Units Interleukin-2 stimuliert eingesetzt.

Tabelle 21 :

Aufgeführt sind die Ergebnisse vor und nach MACS-Anreicherung bei zwei freiwilligen Spendern. Die Werte sind in Prozent an dem Anteil der PBMNC des Spenders angegeben.

	CD56/ CD16 positiv	CD3 positiv/ CD158b negativ	CD3 positiv/ CD 158b positiv	CD158b positiv	CD16 positiv/ CD158b positiv
Spender 1 vor Macs- Anreicherung	18	74	1	4	3
Spender 1 nach MACS- Anreicherung	75	3	31	83	61
Spender 2 vor MACS- Anreicherung	19	78	2	6	4
Spender 2 nach MACS- Anreicherung	44	2	38	76	36

Tabelle 22 :

ADCC CD158b-angereicherter PBMNC gegen die Tumorzelllinie Raji. Anzahl der Versuche n=2. Die spezifische Lyse ist in Prozent angegeben. Angegeben sind die Mittelwerte von PBMNC zweier gesunder freiwilliger Spender gegen Raji. Das Effektor zu Target Verhältnis reicht von 20:1 bis 2,5:1. Die spontane Lyse lag bei 36 Prozent.

ADCC = Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität, PBMNC = Peripheral Blood Mononuclear Cells, IL2 = Interleukin-2, U = Units, anti-CD20 = anti-CD20 Antikörper, E : T = Effektor : Target Verhältnis, anti-HLA = anti-Human Leucocyte Antigen Antikörper.

Die spezifische Lyse der Kontrollen waren:

Target + anti-CD20 : 3 %.

Target+anti-HLA : 8 %.

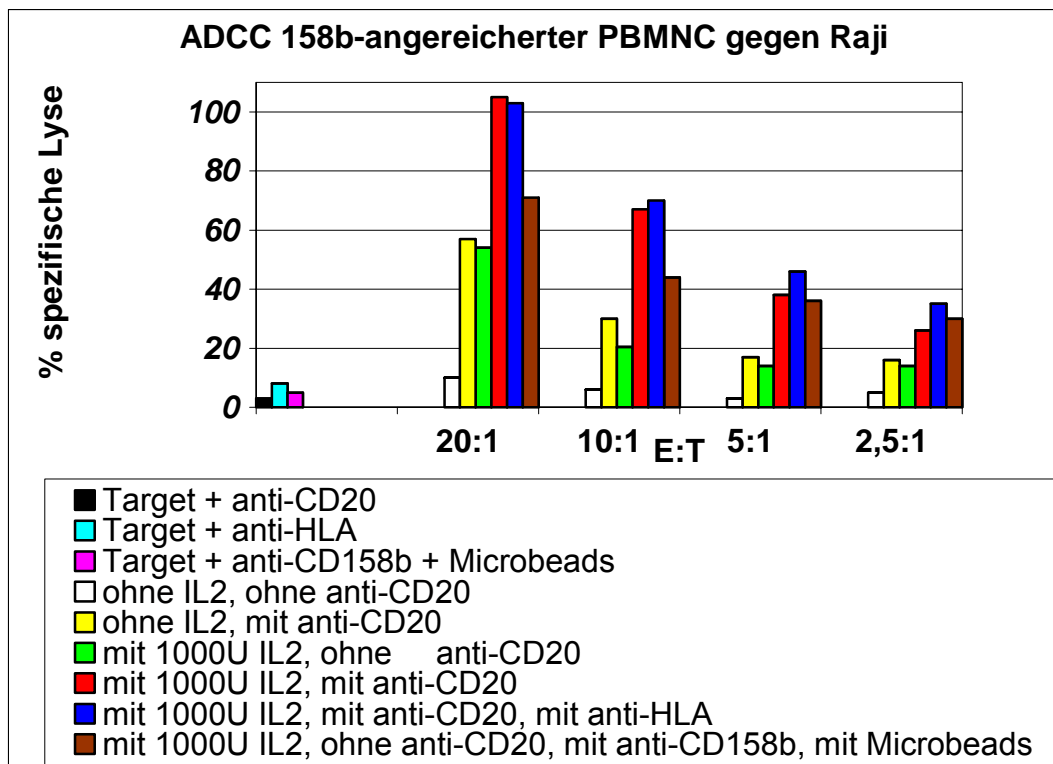
Target+anti-CD158b+Microbeads : 5 %.

E :T	ohne IL2, ohne anti-CD20	ohne IL2, mit anti-CD20	mit 1000U IL2, ohne anti-CD20	mit 1000U IL2, mit anti-CD20	mit 1000U IL2, mit anti- CD20, mit anti- HLA	mit 1000U IL2, ohne anti-CD20, mit anti- CD158b,mit Microbeads
20:1	10	57	54	105	103	71
10:1	6	30	20	67	70	44
5:1	3	17	14	38	46	36
2,5:1	5	16	14	26	35	30

Abbildung 14:

Graphische Darstellung der ADCC CD158b-angereicherter PBMNC jener gesunder freiwilliger Spender (n=2), die in Tabelle 22 aufgeführt sind. Die spezifische Lyse ist in Prozent angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei Versuchen. Als Target diente die Tumorzelllinie Raji. Auf der Abszisse reicht das Effektor : Target Verhältnis von 20:1 bis 2,5:1. Auf der Ordinate ist die spezifische Lyse in Prozent angegeben.

ADCC = Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität, PBMNC = Peripheral Blood Mononuclear Cells, U = Units, IL2 = Interleukin-2, anti-CD20 = anti-CD20 Antikörper, E : T = Effektor : Target Verhältnis, anti-HLA = anti-Human Leucocyte Antigen Antikörper.



CD158b-angereicherte PBMNC sind sowohl zur antikörper-unabhängigen Lyse als auch zur ADCC fähig. Unstimuliert können sie ohne anti-CD20 Antikörper die Tumorzelllinie Raji nicht lysieren. Eine Stimulation mit 1000 Units IL-2 reicht aus, um die Tumorzellen Raji antikörper-unabhängig zu zerstören. Die höchste Lyse erhält man jedoch durch Kombination aus Interleukin-2 und anti-CD20 Antikörper.

Eine zusätzliche HLA-Blockade mit dem anti-HLA Antikörper beeinflusst praktisch nicht die ADCC.

Eine KIR-Blockade mit dem anti-CD158b Antikörper und Microbeads führt zu einer höheren antikörper-unabhängigen Lyse.

4.11. Bestimmung der Zelloberflächenantigendichte

Wie im Methodenteil aufgeführt wurde die HLA-Klasse I Antigendichte auf der Zelloberfläche von den verwendeten Tumorzelllinien (Targets) K562, MHH-CALL-4 und Raji bestimmt.

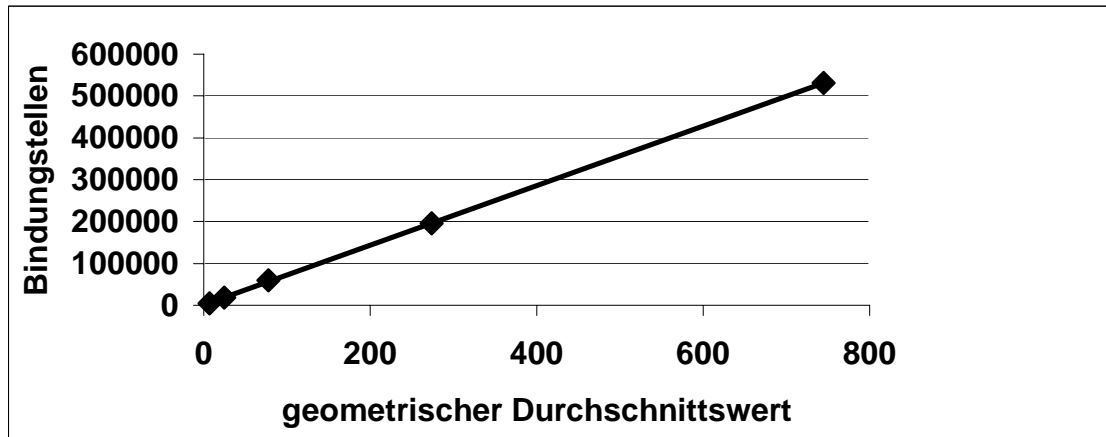
Tabelle 23 :

Angegeben sind die geometrischen Durchschnittswerte der Beads, welche mit dem FACS-Gerät ermittelt wurden und die Anzahl der Bindungsstellen auf den Beads, die dem Beipackzettel des Dako Qifikit entnommen wurde. Die Anzahl der Versuche beträgt n=1.

geometrischer Durchschnittswert der Beads	Anzahl der Bindungsstellen
7.22	4000
24.44	18000
77.95	60000
273.95	196000
744.65	531000

Abbildung 15 :

Aufgetragen ist der geometrische Wert der Beads gegen die Anzahl der Bindungsstellen. Die Anzahl der Versuche beträgt n=1.



Die aus Abbildung 13 ermittelte Regressionsgerade lautet:

$$y = 711,82 x + 1184,3$$

Dabei beträgt der Korrelationskoeffizient : $r = 0,9999$ und ist signifikant.

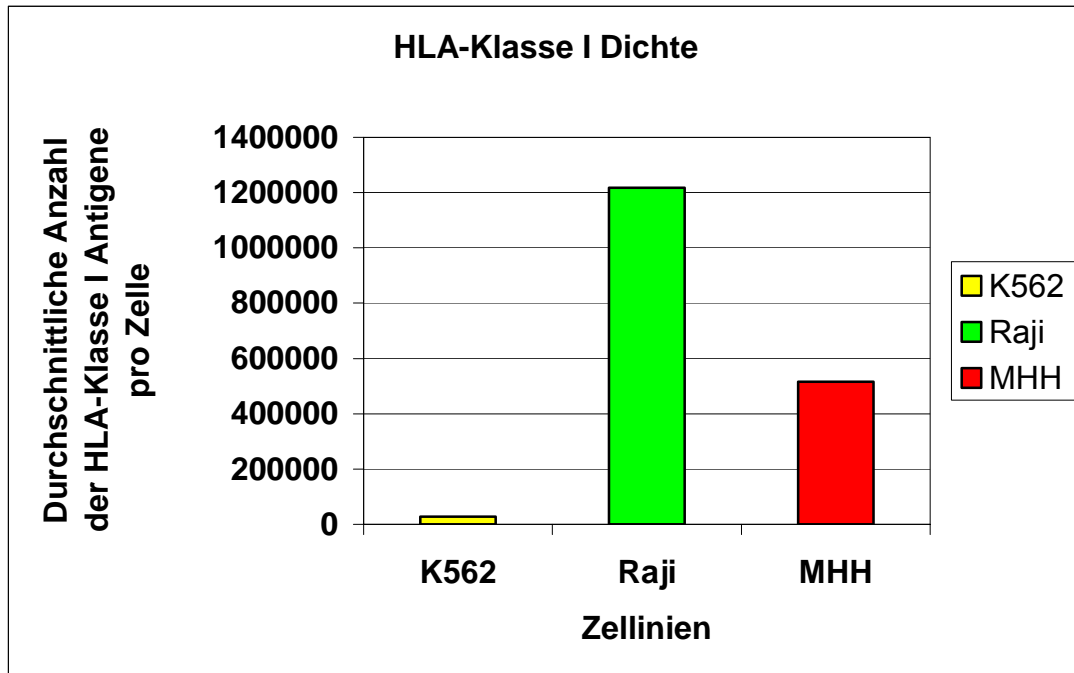
Tabelle 24 :

Aufgeführt sind die mit dem FACS-Gerät, wie im Methodenteil beschrieben, ermittelten Werte für die Targets K562, MHH-CALL-4 und Raji. Die Anzahl der Versuche beträgt n=1. Anti-HLA-class-I=Anti-human-leucocyte-antigen-class-I.

Name der Zelllinie	geometrischer Durchschnittswert der Kontrolle	unspezifische Bindung (geometrischer Durchschnittswert, Kontrolle in Formel eingesetzt)	geometrischer Durchschnittswert mit anti-HLA-class-I	Gesamtbindung (geometrischer Durchschnitt mit anti-HLA-class-I in Formel eingesetzt)	spezifische Bindung (Gesamtbindung - unspezifische Bindung)
K562	12.7	10224.414	51.85	38092.167	27867.753
Raji	14.49	11498.572	1723.9	1228290.8	1216792.23
MHH	4.11	4109.8802	728.2	519531.624	515421.744

Abbildung 16 :

Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl der HLA-Klasse I Antigene pro Zelle. Untersucht wurden die Tumorzelllinien K562, MHH-CALL-4 und Raji. Anti-HLA = anti-Human Leucocyte Antigen.



Die verwendeten Targets haben eine unterschiedliche HLA-Klasse I Antigendichte.

K562 hat mit etwa 28000 Antigenen pro Zelle die niedrigste Dichte. Die Tumorzelllinie Raji hat mit etwa 1200000 Antigenen pro Zelle die höchste Dichte. MHH-CALL-4 liegt mit etwa 500000 Antigenen pro Zelle in der Mitte der drei Tumorzelllinien.

Die Tumorzelllinie MHH-CALL-4 hat somit im Durchschnitt 16 mal mehr HLA-Klasse I Antigene auf ihrer Zelloberfläche als die Tumorzelllinie K562.

Die Tumorzelllinie Raji hat sogar im Durchschnitt 40 mal mehr HLA-Klasse I Antigene auf ihrer Zelloberfläche als die Tumorzelllinie K562.

Schließlich hat die Tumorzelllinie Raji nur im Durchschnitt 2 mal mehr HLA-Klasse I Antigene auf ihrer Zelloberfläche als die Tumorzelllinie MHH-CALL-4.

5. Diskussion

5.1. ADCC nach allogener Stammzelltransplantation

Wie schon im Einführungsteil erwähnt worden ist, wird heutzutage in zunehmendem Maße anstatt einer Knochenmarktransplantation eine Stammzelltransplantation zur Behandlung verschiedener bösartiger und nicht bösartiger Erkrankungen eingesetzt. Die allogene Transplantation mit CD34-positiv angereicherten Stammzellen bietet in Verbindung mit intensivierten Konditionierungsprotokollen ein sicheres Engraftment und eine GvHD kann wirkungsvoll verhindert werden (7, 23, 36, 103).

Die Haupttodesursache nach allogener Stammzelltransplantation ist, wie in der Einleitung angesprochen, das Rezidiv (7, 23, 36, 37, 39, 53, 56, 75).

Die Transplantation der in dieser Arbeit untersuchten Kinder mit CD34-positiv angereicherten Stammzellen ist gleichbedeutend mit einer massiven T-Zell-Depletion. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, daß die T-Zell-Depletion zwar zu einer Senkung der GvHD führt, jedoch führte die T-Zell-Depletion gleichzeitig zum Verlust des "Graft versus Tumor" Effektes und damit zu einer höheren Rezidivrate (32, 101). Das gleiche konnte klinisch auch für Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie nachgewiesen werden. Die T-Zell-Depletion des Transplantats beugte einer GvHD effektiv vor, aber sie führte gleichzeitig zum Verlust des "Graft versus Leukemia" Effektes (GvL) und damit zum Anstieg der Rezidive (33, 45, 51, 99). Nicht eindeutig gesichert ist der T-Zell vermittelte GvL- Effekt bei akuten Leukämien (45, 51).

Da also nicht nur die Hochdosischemotherapie und die Ganzkörperbestrahlung nach allogener Knochenmarkstransplantation die einzigen antileukämischen Prinzipien sind, sondern auch Spenderlymphozyten einen sehr potenten antileukämische Effekt ausüben, wurde seit längerem versucht, durch die Transfusion von Spender T-Zellen nach allogener Stammzelltransplantation die Rezidivrate zu senken (90). Dabei zeigte sich jedoch, daß die Transfusion von T-Zellen nach allogener Stammzelltransplantation zu einer schweren GvHD,

die tödlich verlaufen kann, führen kann (11, 36, 37, 53, 99). Es scheint sogar keine sichere Schwelle zu geben, unter der man T-Zellen transfundieren kann, ohne daß es zu einer GvHD kommt (38, 56, 94, 99).

Da kurz nach allogener Stammzelltransplantation eine Lymphozytose von Natürlichen Killerzellen auftritt, bietet sich das schnell regenerierende NK-System als Träger potentieller antileukämischer Aktivität an (7, 23, 25, 37, 54, 56, 106). Man kann nun nach allogener Transplantation versuchen, die antileukämische Aktivität der NK-Zellen mittels Interleukin-2 Stimulation zu steigern oder man nutzt mittels Antikörpergabe die Fähigkeit der NK-Zellen zur ADCC aus, um so eine Steigerung der antileukämischen Aktivität der NK-Zellen zu erzielen.

Interleukin-2 verstärkt in vitro die zytotoxische Aktivität der Natürlichen Killerzellen (42). Nach allogener Knochenmarktransplantation können IL-2 aktivierte PBMNC in vitro sogar vor der Transplantation isolierte autologe Tumorzellen des Patienten lysieren. Dabei geht die zytotoxische Aktivität von den Natürlichen Killerzellen aus (41, 44, 62). Die in vivo low-dose Interleukin-2 Gabe bei Patienten nach allogener Knochenmarkstransplantation oder Stammzelltransplantation kann selektiv NK-Zellen expandieren und aktivieren (37, 54, 93, 94). Soiffer et al. konnten sogar zeigen, daß die Gabe von Interleukin-2 nach allogener Knochenmarkstransplantation die Rezidivrate senken kann, ohne daß es zu einer schweren GvHD kommt (94). Diese Beobachtung wird unterstützt durch die Annahme, daß Menschen mit einer erniedrigten zytotoxischen Aktivität ihrer NK-Zellen ein größeres Risiko für die Entwicklung einer bösartigen Erkrankung haben, als Menschen mit einer normalen oder hohen zytotoxischen Aktivität ihrer NK-Zellen (47, 106).

In der vorliegenden Arbeit war unter Punkt 4.2. bei einem Effektor zu Target Verhältnis von 20 : 1 kaum ein einziger allogener Stammzelltransplantierte Patient in der Lage in vitro spontan ohne Interleukin-2 Stimulation, die Tumorzelllinie Raji oder MHH-CALL-4 zu lysieren. Lediglich 2 von 14 Patienten zeigten eine minimale Lyse der Tumorzelllinie Raji. Die Tumorzelllinie MHH-CALL-4 konnte keiner von den 11 untersuchten Patienten zerstören. Insgesamt waren so nur 2 von 18 untersuchten Patienten in der Lage ohne IL-2

Stimulation, die Tumorzelllinien Raji oder MHH-CALL-4 zu zerstören. Es sind 18 und nicht 25 Patienten, da von den selben 7 Patienten jeweils ein Versuch gegen die Tumorzelllinie Raji und ein Versuch gegen die Tumorzelllinie MHH-CALL-4 gemacht worden ist.

Weiter konnte gezeigt werden, daß eine Aktivierung der PBMNC von allogenen Stammzelltransplantierten Patienten mittels 40 Units Interleukin-2 möglich ist. Diese Aktivierung ist aber nur für die Lyse der Tumorzelllinie Raji ausreichend. Durch Stimulation mit Interleukin-2, wurden von 14 Patienten nur 7 Patienten in die Lage versetzt, die Tumorzelllinie Raji zu lysieren. Die Höhe der spezifischen Lyse war dabei ziemlich niedrig. Trotz Stimulation der PBMNC mit 40 Units Interleukin-2 konnte die Tumorzelllinie MHH-CALL-4 weder durch keinen der 11 untersuchten Patienten lysiert werden. Insgesamt waren also nur 7 von den 18 untersuchten Patienten in der Lage, die Tumorzelllinien Raji oder MHH-CALL-4 nach IL-2 Aktivierung zu zerstören.

Der in dieser Arbeit verwendete chimäre gegen das CD20 Antigen gerichtete Antikörper IDEC-C2B8 (Rituximab) wurde vor einigen Jahren für die Therapie follikulärer Lymphome zugelassen (18). Rituximab hat eine hohe anti-Lymphomaktivität. Die Behandlung wird gut toleriert. An Nebenwirkungen können vor allem Fieber, Gelenkschmerzen, Übelkeit und Kopfschmerzen auftreten. Dabei tritt die Mehrzahl der Nebenwirkungen während den ersten Infusionen auf und wird dann immer seltener. Im peripheren Blut nimmt der B-Zellanteil mit Behandlungsbeginn ab und erreicht 9-12 Monate nach Behandlungsende wieder normale Werte. Die IgG-Serumwerte bleiben während der Therapie im Normalbereich und vermehrte Infektionen kommen während der Behandlung auch nicht vor. Auch die T- und NK-Zellen im peripheren Blut bleiben unverändert. Da Rituximab ein chimärer Antikörper ist, werden keine humane gegen chimäre Antikörper gebildet und der Antikörper zeigt auch bei einer Mehrfachapplikation eine gute Verträglichkeit (27, 34, 63, 64).

Neben Rituximab haben auch andere Antikörper klinisch ihre Wirksamkeit bewiesen. So zeigte die Behandlung in einer Phase I Studie mit dem Humanen/Maus Antigangliosid GD2 Antikörper ch14.18 bei Patienten mit Neuroblastom eine teilweise oder komplette Remission (35).

In vitro ist gezeigt worden, daß PBMNC gesunder Spender mit Hilfe eines geeigneten humanisierten Antikörpers durch Ausnutzung der ADCC Myelomzellen beziehungsweise Plattenepithelkarzinomzellen zerstören können (78, 96). Blut, das nach chimären Antikörperinfusionen bei Patienten mit Melanom entnommen wurde, war zur Ausübung der ADCC fähig (2).

In dieser Arbeit konnte in vitro gezeigt werden, daß sogar ohne Interleukin-2 Stimulation fast alle untersuchten allogenen stammzelltransplantierten Patienten zur Ausübung der ADCC mittels anti-CD20 Antikörper fähig sind. Sowohl die Tumorzelllinie Raji als auch die Tumorzelllinie MHH-CALL-4 konnte mittels ADCC effektiv lysiert werden. 5 von 14 Patienten konnten die Tumorzelllinie Raji mittels ADCC nicht lysieren und nur 2 von 11 Patienten konnten mittels ADCC die Tumorzelllinie MHH-CALL-4 nicht lysieren. Ohne zusätzliche Interleukin-2 Stimulation konnten insgesamt nur 6 von 18 Patienten keine ADCC gegen die Tumorzellen Raji oder MHH-CALL-4 ausüben.

Die Kombination von Interleukin-2 mit monoklonalem Antikörper ist im Mausmodell vielversprechend. Mäuse mit malignen Erkrankungen, die mit Interleukin-2 und monoklonalem Antikörper behandelt wurden, zeigten einen Überlebensvorteil (12, 31).

In vitro konnte gezeigt werden, daß Interleukin-2 die Fähigkeit PBMNC gesunder Spendern zur Ausübung der ADCC steigern konnte. Dabei wurden Nierenkarzinomzellen, Myelomzellen und Kolonkarzinomzellen in vitro lysiert (59, 78, 81).

In einer anderen Studie wurden PBMNC von Tumorpatienten vor und nach in vivo Therapie mit Interleukin-2 isoliert. In vitro zeigten dann die PBMNC, die nach der Interleukin-2 Therapie isoliert worden waren, eine signifikant höhere ADCC als die PBMNC, welche vor der Interleukin-2 Therapie isoliert worden waren (40).

Friedberg et al. führten eine Studie durch, in der Patienten mit Non-Hodkin-Lymphom mit Rituximab in Kombination mit Interleukin-2 behandelt wurden. 11 von 20 Patienten sprachen auf diese Therapie an. Die kombinierte Behandlung wurde gut toleriert. Interleukin-2 verschlimmerte die antikörperbedingten Nebenwirkungen nicht (29).

In unseren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß mit Interleukin-2 Stimulation fast alle untersuchten allogenen stammzelltransplantierten Patienten zur Ausübung der ADCC mittels anti-CD20 Antikörper fähig sind. Sowohl die Tumorzelllinie Raji als auch die Tumorzelllinie MHH-CALL-4 konnte mittels Interleukin-2 stimulierter ADCC effektiv lysiert werden. Mit 40 Units Interleukin-2 stimulierte PBMNC zeigten eine deutlich höhere ADCC als nicht stimulierte PBMNC. Nur 1 von 14 Patienten konnte die Tumorzelllinie Raji mittels Interleukin-2 stimulierter ADCC nicht lysieren und alle 11 Patienten konnten mittels Interleukin-2 stimulierter ADCC die Tumorzelllinie MHH-CALL-4 zerstören. Mit zusätzlicher Interleukin-2 Stimulation konnte insgesamt nur 1 von 18 Patienten keine ADCC gegen die Tumorzellen Raji oder MHH-CALL-4 ausüben.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit in Punkt 4.2. folgendes festgestellt werden :

Von den 18 untersuchten allogenen mit CD34-positiven stammzelltransplantierten Kindern konnten nur 2 die Tumorzelllinien Raji oder MHH-CALL-4 spontan lysieren.

Die antileukämische Aktivität PBMNC läßt sich mittels Interleukin-2 nach allogener Stammzelltransplantation steigern. Insgesamt waren dann 7 von den 18 untersuchten Patienten in der Lage, die Tumorzelllinien Raji oder MHH-CALL-4 nach IL-2 Aktivierung zu zerstören.

Eine ADCC nach allogener Transplantation mit CD34-positiven Stammzellen ist möglich. Unstimuliert konnten insgesamt 12 von den 18 Patienten eine ADCC ausüben und die Tumorzellen Raji oder MHH-CALL-4 zerstören.

Die antikörper-abhängige zellvermittelte antileukämische Aktivität läßt sich mittels Interleukin-2 nach allogener Stammzelltransplantation steigern. Mit Interleukin-2 Stimulation konnten insgesamt 17 von 18 Patienten eine ADCC ausüben. Dabei hatten mit 40 Units Interleukin-2 stimulierte PBMNC eine deutlich höhere ADCC als nicht stimulierte PBMNC.

5.2. ADCC im zeitlichen Verlauf nach allogener Stammzelltransplantation

Es gibt Publikationen in denen befürchtet wird, daß die NK-Zellfunktion für eine längere Zeit nach Transplantation beeinträchtigt sein könnte (23, 67, 80). Die Haupteffektorzellen der ADCC sind, vor allem was die Lyse von Tumorzellen betrifft, CD56/CD16 positive Zellen, also NK-Zellen (13, 40, 77, 78, 81, 97). Somit wären demnach Patienten, die allogene Stammzelltransplantation erhalten haben, zur Ausübung der ADCC eingeschränkt oder überhaupt nicht fähig.

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob eine ADCC zu jedem Zeitpunkt nach allogener Stammzelltransplantation möglich ist.

In unserer Arbeit ist in Punkt 4.5. gezeigt worden, daß eine ADCC gegen die Tumorzelllinie Raji und die Tumorzelllinie MHH-CALL-4 zu jedem Zeitpunkt nach allogener Stammzelltransplantation möglich ist. Die maximale ADCC liegt für beide Tumorzelllinien im Zeitintervall 1-4 Monate nach Transplantation. Wiederum für beide Tumorzelllinien existiert nach 24 Monaten nach allogener Transplantation die kleinste ADCC.

Diese Feststellung stimmt auch mit der in Punkt 4.8. unserer Untersuchung gemachten Beobachtung überein, daß der Anteil an CD56/CD16 doppel positivem Zellen an den PBMC nach allogener Stammzelltransplantation zunächst konstant bleibt und dann nach länger als 24 Monate nach allogener Stammzelltransplantation abnimmt.

Daß kurz nach allogener Stammzelltransplantation eine Lymphozytose von NK-Zellen auftritt, ist schon seit längerem bekannt (7, 23, 25, 37, 54, 56).

Slavin et al. (91) konnten im Mausmodell zeigen, daß immuntherapeutische Strategien wie die IL-2- und die Zelltherapie bei einer hohen Tumormasse im Gegensatz zu einer niedrigen Tumormasse des Tieres keine Wirksamkeit haben. Demnach wäre die ADCC, weil sie schon früh nach Transplantation die höchste Lyse aufweist, geeignet eine noch eventuell bestehende "Minimal Residual Disease" nach allogener Stammzelltransplantation zu beseitigen. Schließlich sprechen auch die unter Punkt 4.6. der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse für den frühen Einsatz immuntherapeutischer Strategien. Dort

wurde gezeigt, daß eine Aktivierung der NK-Zellen mit Interleukin-2 nach allogener Stammzelltransplantation besonders effektiv im Zeitraum 1-24 Monate nach Transplantation ist. Später als 24 Monate nach Transplantation spielt eine Interleukin-2 Stimulation praktisch keine Rolle mehr.

Auch Murphy und Longo (74) meinen, daß die Vorteile der NK-Zellen am besten früh nach Transplantation ausgenutzt werden sollten.

5.3. Korrelation zwischen antikörper-unabhängiger Zytotoxizität und ADCC

In dieser Arbeit sollte auch untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der spontanen Zytotoxizität gegen K562 und der antikörper-abhängigen Zytotoxizität gegen die Tumorzelllinien Raji und MHH-CALL-4 nach allogener Stammzelltransplantation gibt.

Es zeigte sich in Punkt 4.3. eine signifikante Korrelation zwischen der antikörper-unabhängigen Zytotoxizität gegen K562 und der ADCC sowohl gegen die Tumorzelllinie Raji als auch gegen die Tumorzelllinie MHH-CALL-4. Diese Korrelation existiert für unstimulierte und auch für mit 40 Units Interleukin-2 stimulierte PBMNC. Daraus läßt sich schließen, daß Patienten mit niedriger Spontanaktivität auch eine niedrige ADCC haben und Patienten mit einer hohen Spontanaktivität eine hohe ADCC haben.

Diese Korrelation läßt sich durch die in dieser Arbeit unter Punkt 4.4. und Punkt 4.7. erzielten Ergebnisse erklären. Dort wurde nämlich zum einen festgestellt, daß die ADCC abhängig von dem Anteil an doppelt positiven CD56/CD16 Zellen an den PBMNC der Patienten ist. Die ADCC eines Patienten war um so höher, je größer der Anteil an NK-Zellen an den PBMNC war. Und es wurde zum anderen gezeigt, daß eine Korrelation zwischen der Höhe der spontanen Lyse gegen K562 und dem Anteil an doppelt positiven CD56/CD16 Zellen existiert. Daß heißt je höher der NK-Zellanteil an den PBMNC ist, desto höher ist die spontane zytotoxische Aktivität der PBMNC des allogenen stammzelltransplantierten Patienten und umgekehrt.

Zudem bestätigt unsere unter Punkt 4.4. gemachte Beobachtung der Korrelation zwischen der ADCC und den doppelt positiven CD56/CD16 Zellen auch die Aussage, daß die ADCC, was vor allem die Lyse von Tumorzellen betrifft, hauptsächlich von NK-Zellen ausgeübt wird (13, 40, 77, 78, 81, 97).

5.4. ADCC gegen Blasten

Nicht alle Arten leukämischer Zellen lassen sich durch Stimulation mit Zytokinen wie Interleukin-2 lysieren (100).

So sind weder unstimulierte noch mit Interleukin-2 stimulierte NK-Zellen gesunder Spender in der Lage, Blasten mit einer hohen HLA-Klasse I Expression zu lysieren. Es konnte auch eine umgekehrte Korrelation zwischen der Anzahl von HLA-Klasse I Antigenen auf den Blasten und der Empfindlichkeit gegenüber NK-Zellen gefunden werden. Jedoch gelang dann die Lyse solcher nicht NK-sensitiver Blasten mit einer hohen HLA-Klasse I Expression über die ADCC mittels eines humanisierten anti-CD19 Antikörpers (37, 55).

In der vorliegenden Arbeit wurde in Punkt 4.9. ein allogentstammzelltransplantiertes Patient untersucht, ob er in der Lage ist, Blasten zu lysieren. Der Patient war zur spontanen Lyse der Blasten nicht in der Lage. Eine ADCC ohne IL-2 Aktivierung war nicht möglich. Eine antikörper-unabhängige Lyse war mit 40 Units Interleukin-2 nicht möglich. Erst mit 1000 Units Interleukin-2 war eine antikörper-unabhängige Lyse möglich. Wie für die Zerstörung der Tumorzelllinien Raji und MHH-CALL-4 war die Kombination aus anti-CD20 Antikörper und Interleukin-2 zur Lyse der Blasten am besten geeignet.

NK-Zellen vernichten diejenigen Zellen, die entweder keine oder aber eine erniedrigte Anzahl an MHC-Klasse I Molekülen exprimieren (16, 58, 70, 72).

Somit schützt die Expression von HLA-Klasse I Antigenen durch Tumorzellen diese vor einer Zerstörung durch NK-Zellen (79). Komatsu und Tamiya konnten aber in vitro zeigen, daß die Expression von HLA-Klasse I Antigenen durch Tumorzellen keinen Einfluss auf deren Lyse mittels ADCC hat (52).

Das heißt, obwohl sich eine Tumorzelle durch eine HLA-Klasse I Expression vor der Zerstörung durch eine NK-Zelle schützen kann, kann diese Tumorzelle trotzdem durch Ausnutzung der ADCC, spätestens in Kombination mit Interleukin-2, durch die NK-Zelle lysiert werden.

Diese Aussage wird durch unsere Untersuchungen gestützt. In Punkt 4.11. wurde die Zelloberflächenantigendichte bestimmt. Die verwendeten Targets haben eine unterschiedliche HLA-Klasse I Antigendichte.

Die Zelllinie Raji hat mit etwa 1200000 Antigenen pro Zelle die höchste Dichte. MHH-CALL-4 liegt mit etwa 500000 Antigenen pro Zelle in der Mitte der drei Zelllinien. K562 hat mit etwa 28000 Antigenen pro Zelle die niedrigste Dichte. So konnten die Tumorzellen Raji und MHH-CaLL-4, die eine hohe HLA-Klasse I Antigendichte haben, im Gegensatz zu K562 erst durch Antikörpereinsatz effektiv lysiert werden. Die ADCC ist somit ein geeignetes Mittel, um auch solche Zellen zu zerstören, die sich durch eine hohe HLA-Klasse I Expression schützen.

5.5. CD158b-angereicherte PBMNC

In unserer Arbeit wurden wie im Methodenteil beschrieben CD158b-positive PBMNC von gesunden Spendern angereichert. Die zytotoxische Aktivität und die Fähigkeit zur ADCC dieser CD158b-angereicherten Zellen sollte untersucht werden. Es wurde eine Zellanreicherung nach CD158b deshalb vorgenommen, weil nach allogener Stammzelltransplantation ein ausgeprägter Anstieg an CD158b-positiven Zellen im peripheren Blut zu beobachten ist (37, 98).

Mehrere KIR (Killer-cell-inhibitory-receptor) sind in der Zwischenzeit charakterisiert. Der in dieser Arbeit untersuchte Rezeptor gehört zu denen der Molekulargewichtsklasse 58 kD (KIR 2D bzw. p58). KIR 2DL1 bzw. p58.2 wird durch anti-CD158b charakterisiert und ist spezifisch für HLA- Cw 1, 3, 7, und 8 (71, 72).

Wie in der Einleitung schon dargelegt, führt die Bindung an den inhibierenden Rezeptor durch MHC-Klasse I Moleküle auf der Targetzelle zum Abbruch des lytischen Prozesses (88). KIR sind vor allem auf NK-Zellen zu finden. Jedoch gibt es inhibierende Rezeptoren für MHC-Klasse I Moleküle auch auf einer kleinen Population von zytotoxischen T-Zellen. In der Regel haben weniger als 5 % der T-Lymphozyten im peripheren Blut gesunder Menschen KIR (3, 69, 71). Diese T-Zellen haben ähnliche Funktionen wie NK-Zellen, da sie HLA-Klasse I negative Zellen lysieren und HLA-Klasse I positive Zellen nicht lysieren. Bei diesen T-Zellen ist also das inhibierende Signal über den NK-Rezeptor stärker als das zytotoxische Signal über den T-Zellrezeptor. Somit wären diese T-Zellen vielleicht für die Ausnutzung eines GvL-Effektes ohne eine GvHD auszulösen geeignet, da sie normale Zellen von entarteten Zellen unterscheiden können (3).

Es existiert ein alleler Polymorphismus für die KIR Gene. Die Expression der KIR Gene und Genprodukte ist individuell unterschiedlich ausgeprägt (102).

In vitro konnte gezeigt werden, daß Spender-NK-Zellen alloreaktiv werden können, wenn ihr KIR-Rezeptorbesatz den HLA-Typ des Empfängers nach allogener Transplantation nicht erkennen kann (20).

Auch nach haploidentischer Transplantation konnten bei einigen Patienten einzelne alloreaktive NK-Zell Klone gefunden werden, die aufgrund fehlender KIR-Hemmung vor der Transplantation eingefrorene Empfänger-Blasten lysierten. Klinisch wurde jedoch keine GvHD beobachtet (89). Bei der haploidentischen Transplantation kann es also aufgrund fehlender KIR-Hemmung zu einem GvL-Effekt kommen.

Die an den einzelnen NK-Zell Klonen nachgewiesene Alloreaktivität könnte dazu benutzt werden, eine noch eventuell bestehende "Minimal Residual Disease" nach allogener Stammzelltransplantation zu beseitigen. Vom Spender könnten solche NK-Zellen immunomagnetisch und durchflußzytometrisch isoliert werden, die aufgrund ihres KIR-Besatzes vom Empfänger-HLA Typ nicht gehemmt werden, also potentielle Träger eines GvL-Effektes sind und zur Zelltherapie nach allogener Stammzelltransplantation eingesetzt werden.

Wie unter Punkt 4.10. der vorliegenden Arbeit zu entnehmen ist, waren unter den CD158b-angereicherten Zellen nicht nur NK-Zellen. 31% bzw. 38% der PBMNC waren nach der Anreicherung KIR tragende T-Zellen. Unter den PBMNC waren nach der Anreicherung nur 3 % bzw. 2 % der PBMNC T-Zellen, die keinen KIR hatten. Wie weiter oben beschrieben, verhalten sich KIR tragende T-Zellen wie NK-Zellen, weshalb Ihre Anwesenheit nach der Anreicherung für eine Zelltherapie bezüglich der Entwicklung einer GvHD nicht befürchtet werden müsste. Da solche T-Zellen einen GvL-Effekt ausüben können, sind sie sogar vielleicht von Vorteil.

In unserer Arbeit konnte gezeigt werden, daß die CD158b-angereicherten PBMNC sowohl zur antikörper-unabhängigen Lyse als auch zur ADCC fähig waren. Jedoch können die CD158b-angereicherten PBMNC ohne IL-2 Stimulation die Tumorzelllinie Raji antikörper-unabhängig nicht lysieren.

Eine Stimulation mit 1000 Units IL-2 reicht aber aus, um die Tumorzelllinie Raji antikörper-unabhängig zu zerstören. Die höchste Lyse erhält man jedoch durch Kombination aus Interleukin-2 und anti-CD20 Antikörper.

Eine KIR-Blockade mit dem anti-CD158b Antikörper und Microbeads führt zu einer höheren antikörper-unabhängigen Lyse. Das zeigt, daß nach der

Anreicherung der KIR noch funktioniert und Zellen zerstört werden, die über den KIR nicht gehemmt werden.

Wie in Punkt 5.1. der vorliegenden Arbeit dargelegt worden ist, sind mittels Kombination aus Interleukin-2 und Antikörper fast alle Patienten nach allogener Stammzelltransplantation in der Lage, Tumorzellen zu lysieren. Für die wenigen Patienten, die dazu nicht in der Lage sind, könnten CD158b-positive PBMNC vom Spender transfundiert werden. Zusätzlich könnten die CD158b-positiven PBMNC mit Interleukin-2 stimuliert werden und Ihre Fähigkeit zur ADCC könnte auch ausgenutzt werden.

5.6. Schlußfolgerung und Perspektiven

In vitro konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß 67 Prozent der untersuchten Patienten nach allogener Transplantation mit positiv-angereicherten CD34-positiven Stammzellen in der Lage sind, ohne IL-2 Aktivierung eine ADCC gegen die Tumorzellen Raji oder MHH-CALL-4 auszuüben. Demgegenüber waren nur 11 Prozent von diesen untersuchten Patienten zur spontanen Lyse der selben Tumorzellen fähig.

Auch wurde gezeigt, daß die zytotoxische Aktivität von den untersuchten Patienten mittels Interleukin-2 Stimulation erhöht werden kann.

Schließlich waren 94 Prozent der untersuchten Patienten nach IL-2 Stimulation in der Lage, mittels ADCC die Tumorzellen Raji oder MHH-CALL-4 zu zerstören.

Es stellte sich auch heraus, daß eine ADCC zu jedem Zeitpunkt nach allogener Stammzelltransplantation möglich ist. Dabei existiert die maximal mögliche ADCC 1-4 Monate nach allogener Stammzelltransplantation.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Blasten, die sich vor der spontanen NK-Lyse durch eine hohe HLA-Klasse I Expression schützen, mittels Ausnutzung einer Interleukin-2 stimulierten ADCC zerstört werden können.

Schließlich ist gezeigt worden, daß CD158b-angereicherte Zellen sowohl eine antikörper-unabhängige Lyse als auch eine effektive ADCC ausüben können.

Insgesamt deuten die vorliegenden in vitro Untersuchungen darauf hin, daß die Ausnutzung der ADCC mit einer eventuellen Interleukin-2 Kombination nach allogener Stammzelltransplantation geeignet ist, eine eventuell noch vorhandene "Minimal Residual Disease" auszulöschen und damit die Rezidivrate zu senken. Für Kinder mit einer ALL der B-Zellreihe, welche die größte Patientengruppe darstellen, wäre es sinnvoll neben dem anti-CD20 Antikörper, Antikörper gegen die Markerantigene CD10, und CD19 zu screenen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur ADCC.

Da, wie in vitro gezeigt wurde, nicht alle Patienten zur ADCC fähig waren, könnte man diesen Patienten CD158b-positive Spender-KIR-Zellen nach einer allogenen Stammzelltransplantation transfundieren und eventuell deren

zytotoxische Fähigkeit weiter mittels Antikörper- und Interleukin-2-Applikation erhöhen.

Ob die in vitro gewonnen Erkenntnisse auch in vivo umsetzbar sind, müsste klinisch noch überprüft werden.

6. Zusammenfassung

Die Haupttodesursache nach allogener Stammzelltransplantation stellt das Rezidiv dar. Ursache hierfür ist das Persistieren von residuellen Leukämiezellen im Knochenmark, der sogenannten "Minimal Residual Disease" (MRD).

Ziel immuntherapeutischer Ansätze ist es, derartige "Minimal Residual Disease"-Zellen nach allogener Stammzelltransplantation spezifisch zu eliminieren.

Eine Möglichkeit um dieses Ziel zu erreichen, ist die Ausnutzung der antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC). Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde untersucht, ob Kinder, die allogenen mit positiv-angereicherten CD34-positiven Stammzellen transplantiert worden sind, zur Ausübung der ADCC fähig sind. Dazu wurden mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMNC) allogenen transplantierten Kinder isoliert und deren zytotoxische Fähigkeit beziehungsweise ADCC in vitro mittels des BATDA-Release-Assays überprüft. Für die ADCC wurde ein gegen das CD20 Antigen gerichteter chimärer Antikörper (Rituximab) verwendet. Außerdem wurde versucht, die ADCC mittels Interleukin-2 Stimulation (IL-2) zu steigern.

In vitro konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß 12 von 18 untersuchten Patienten (67 Prozent) in der Lage waren, ohne Interleukin-2 Aktivierung eine ADCC gegen die Tumorzelllinien Raji oder MHH-CALL-4 auszuüben.

Darüber hinaus wurden dann 94 Prozent der selben untersuchten Patienten durch Stimulation mit Interleukin-2 in die Lage versetzt, mittels ADCC die Tumorzellen Raji oder MHH-CALL-4 zu zerstören.

Es stellte sich heraus, daß eine ADCC zu jedem Zeitpunkt nach allogener Stammzelltransplantation möglich ist. Dabei existiert die maximal mögliche ADCC 1-4 Monate nach allogener Stammzelltransplantation.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Blasten, die sich vor der spontanen NK-Lyse durch eine hohe HLA-Klasse I Expression schützen, mittels Ausnutzung der ADCC in Kombination mit einer Interleukin-2 Stimulation zerstört werden können.

Schließlich wurden mit dem MACS-System KIR-tragende PBMNC (CD158b-positive PBMNC) von freiwilligen Spendern isoliert und deren zytotoxische Fähigkeit beziehungsweise ADCC untersucht. Von solchen Zellen wird angenommen, daß sie eine antileukämische Aktivität besitzen, ohne eine GvHD zu verursachen. Es konnte gezeigt werden, daß diese CD158b-positiven Zellen, sowohl eine antikörper-unabhängige Lyse als auch eine effektive ADCC ausüben können. Somit könnten solche CD158b-positiven Spenderzellen für eine alleinige Zelltherapie oder in Kombination mit einem Antikörper und Interleukin-2 bei Kindern nach allogener Stammzelltransplantation zur Beseitigung einer eventuell noch vorhandenen MRD eingesetzt werden.

Diese in vitro gewonnenen Erkenntnisse müssten nun klinisch überprüft werden, ob sie geeignet sind, um die Rezidive nach allogener Transplantation zu senken.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität
ALL	Akute lymphatische Leukämie
Anti-CD20	Anti-CD20 Antikörper
CD	Cluster of differentiation
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
E : T	Effektor : Target Verhältnis
FACS	Fluorescence activated cell scanning
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
G-CSF	Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor
GvHD	Graft-versus-host-disease
GvL	Graft versus Leukemia
HAMA	Humaner anti-Maus Antikörper
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IgG	Immunoglobulin G
IL-2	Interleukin-2
KD	Kilo Dalton
KIR	Killer-cell-inhibitory-receptor
LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzelle
LGL	Large Granular Lymphocyte
MACS	Magnetic activated cell sorter
MHC	Major histocompatibility complex
MoAk	Monoklonale Antikörper
MRD	Minimal Residual Disease
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBMNC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphat buffered saline
PE	Phycoerythrin

PerCP Peridinchlorophyllprotein
U Units

7.2. Literaturverzeichnis

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. (1994)
Cellular and Molecular Immunology
2. Aufl., W.B. Saunders, Philadelphia
2. Albertini, M.R., Hank, J.A., Schiller, J.H., Khorsand, M., Borchert, A.A., Gan, J., Bechhofer, R., Storer, B., Reisfeld, R.A., Sondel, P.M. (1997)
Phase IB trial of chimeric antidisialoganglioside antibody plus Interleukin 2 for Melanoma Patients
Clin Cancer Res, 3, 1277-1288
3. Albi, N., Ruggeri, L., Aversa, F., Merigiola, C., Tosti, A., Tognellini, R., Grossi, C.E., Martelli, M.F., Velardi, A. (1996)
Natural killer (NK)-cell function and antileukemic activity of a large population of CD3⁺/CD8⁺ T cells expressing NK receptors for major histocompatibility complex class I after "Three-Loci" HLA-incompatible bone marrow transplantation
Blood, 87, 3993-4000
4. Anasetti, C., Amos, D., Beatty, P.G., Appelbaum, F.R., Bensinger, W., Buckner, D., Clift, R., Doney, K., Martin, P.J., Mickelson, E., Nisperos, B., O'Quigley, J., Ramberg, R., Sanders, J.E., Stewart, P., Storb, R., Sullivan, K.M., Witherspoon, R.P., Thomas, E.D., Hansen, J.A. (1989)
Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with Leukemia or Lymphoma
N Engl J Med, 320, 197-204
5. Armitage, J.O. (1994)
Bone Marrow Transplantation
N Engl J Med, 330, 827-838
6. Aversa, F., Tabilio, A., Terenzi, A., Velardi, A., Falzetti, F., Giannoni, C., Iacucci, R., Zei, T., Martelli, M.P., Gambelunghe, C., Rossetti, M., Caputo, P., Latini, P., Aristei, C., Raymond, C., Reisner, Y., Martelli, M.F. (1994)
Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "Three-Loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum
Blood, 84, 3948-3955

7. Aversa, F., Tabilio, A., Velardi, A., Cunningham, I., Terenzi, A., Falzetti, F., Ruggeri, L., Barbabietola, G., Aristei, C., Latini, P., Reisner, Y., Martelli, M.F. (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, 1186-1193
8. Bach, F.A., Albertini, R.J., Joo, P., Anderson, J.L., Bortin, M.M. (1968)
Bone-Marrow Transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich Syndrome
Lancet, 28, 1364-1366
9. Beatty, P.G., Clift, R.A., Mickelson, E.M., Nisperos, B.B., Flournoy, N., Martin, P.J., Sanders, J.E., Stewart, P., Buckner, C.D., Storb, R., Thomas, E.D., Hansen, J.A. (1985)
Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings
N Engl J Med, 313, 765-771
10. Beatty, P.G., Mori, M., Milford, E. (1995)
Impact of racial genetic polymorphism on the probability of finding an HLA-Matched donor
Transplantation, 60, 778-783
11. Beck, J.F., Klingebiel, T., Kreyenberg, H., Schaudt, A., Wölle, W., Niethammer, D., Bader, P. (2002)
Rezidivprophylaxe bei Kindern mit ALL-, AML-, und MDS nach allogener Stammzelltransplantation durch interventionelle Immuntherapie im kritischen Stadium eines ansteigenden gemischten Chimärismus
Klin Padiatr, 214, 201-205
12. Berinstein, N., Levy, R. (1987)
Treatment of a murine B cell Lymphoma with monoclonal antibodies and IL 2
J Immunol, 139, 971-976
13. Bier, H., Hoffmann, T., Haas, I., Lierop van, A. (1998)
Anti-(epidermal growth factor) receptor monoclonal antibodies for the induction of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against squamous cell carcinoma lines of the head and neck
Cancer Immunol Immunother, 46, 167-173
14. Blomberg, K., Hautala, R., Lövgren, J., Mukkala, V.-M., Lindqvist, C., Akerman, K. (1996)
Time-resolved fluorometric assay for natural killer activity using target cells labelled with a fluorescence enhancing ligand
J Immunol Methods, 193, 199-206

15. Böyum, A. (1968)
Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood
Scand J Clin Lab Invest Suppl 7 ,97, 77-89
16. Bottino, C., Biassoni, R., Millo, R., Moretta, L., Moretta, A. (2000)
The human natural cytotoxicity receptors (NCR) that induce HLA class I-independent NK cell triggering
Hum Immunol, 61, 1-6
17. Burmester, G.-R., Pezzutto, A., Ulrichs, T., Aicher, A. (1998)
Taschenatlas der Immunologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
18. Buske, C., Engert, A., Schnell, R., Diehl, V., Hiddemann, W. (1998)
Monoklonale Antikörper in der Therapie maligner Lymphome
Internist, 39, 1205-1214
19. Cliff, R.A., Buckner, C.D., Appelbaum, F.R., Bearman, S.I., Petersen, F.B., Fisher, L.D., Anasetti, C., Beatty, P., Bensinger, W.I., Doney, K., Hill, R.S., McDonald, G.B., Martin, P., Sanders, J., Singer, J., Stewart, P., Sullivan, K.M., Witherspoon, R., Storb, R., Hansen, J.A., Thomas, E.D. (1990)
Allogeneic marrow transplantation in patients with acute Myeloid Leukemia in first remission: A randomized trial of two irradiation regimens
Blood, 76, 1867-1871
20. Colonna, M., Brooks, E.G., Falco, M., Ferrara, G.B., Strominger, J.L. (1993)
Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C
Science, 260, 1121-1124
21. Cutler, C., Antin, J.H. (2001)
Peripheral blood stem cells for allogeneic transplantation: A review
Stem Cells, 19, 108-117
22. Delbrück, H. (2000)
Knochenmark- und Stammzelltransplantation nach Krebs
W. Kohlhammer, Stuttgart Berlin Köln
23. Dreger, P., Schmitz, N. (1999)
Allogeneic transplantation of peripheral blood stem cells
Baillieres Clini Haematol, 12, 261-278

24. Esteve, J., Villamor, N., Colomer, D., Cervantes, F., Campo, E., Carreras, E., Montserrat, E. (2001)
Stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: different outcome after autologous and allogeneic transplantation and correlation with minimal residual disease status
Leukemia, 15, 445-451

25. Eyrich, M., Leiler, C., Lang, P., Schilbach, K., Schumm, M., Bader, P., Greil, J., Klingebiel, T., Handgretinger, R., Niethammer, D., Schlegel, P.G. (2003)
A prospective comparison of immune reconstitution in pediatric recipients of positively selected CD34⁺ peripheral blood stem cells from unrelated donors vs recipients of unmanipulated bone marrow from related donors
Bone Marrow Transplant, 32, 379-390

26. Farag, S.S., Fehninger, T.A., Becknell, B., Blaser, B.W., Caligiuri, M.A. (2003)
New directions in natural killer cell-based immunotherapy of human cancer
Expert Opin Biol Ther, 3, 237-250

27. Feuring-Buske, M., Buske, C., Hiddemann, W. (1998)
Rituximab in der Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen
Arzneimitteltherapie, 334-338

28. Flieger, D., Spengler, U., Beier, I., Kleinschmidt, R., Hoff, A., Varvenne, M., Sauerbruch, T., Schmidt-Wolf, I. (1999)
Enhancement of Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) by combination of cytokines
Hybridoma, 18, 63-68

29. Friedberg, J.W., Neuberg, D., Gribben, J.G., Fisher, D.C., Canning, C., Koval, M., Poor, C.M., Green, L.M., Daley, J., Soiffer, R., Ritz, J., Freedman, A.S. (2002)
Combination immunotherapy with rituximab and Interleukin 2 in patients with relapsed or refractory follicular non-Hodgkin's lymphoma
Br J Haematol, 117, 828-834

30. Gatti, R.A., Meuwissen, H.J., Allen, H.D., Hong, R., Good, R.A. (1968)
Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency
Lancet, 28, 1366-1369

31. Gill, I., Agah, R., Hu, E., Mazumder, A. (1989)
Synergistic antitumor effects of Interleukin 2 and the monoclonal Lym-1 against Human Burkitt Lymphoma cells in vitro and in vivo
Cancer Res, 49, 5377-5379

32. Glass, B., Uharek, L., Hartung, G., Zeis, M., Steinmann, J., Dreger, P., Krönke, M., Schmitz, N. (1998)
Immunotherapeutic aspects of allogeneic peripheral progenitor cells
Bone Marrow Transplant Suppl 3, 21, 3-8

33. Goldman, J.M., Gale, R.P., Horowitz, M.M., Biggs, J.C., Champlin, R.E., Gluckman, E., Hoffmann, R.G., Jacobsen, S.J., Marmont, A.M., McGlave, P.B., Messner, H.A., Rimm, A.A., Rozman, C., Speck, B., Tura, S., Weiner, R.S., Bortin, M.M. (1988)
Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase
Ann Intern Med, 108, 806-814

34. Grillo-Lopez, A.J., White, C.A., Varns, C., Shen, D., Wei, A., McClure, A., Dallaire, B.K. (1999)
Overview of the clinical development of Rituximab: First monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma
Semin Oncol Suppl 14, 26, 66-73

35. Handgretinger, R., Anderson, K., Lang, P., Dopfer, R., Klingebiel, T., Schrappe, M., Reuland, P., Gillies, S.D., Reisfeld, R.A., Niethammer, D. (1995)
A phase I study of human/mouse chimeric anti-ganglioside GD2 antibody ch14.18 in patients with Neuroblastoma
Eur J Cancer, 31A, 261-267

36. Handgretinger, R., Schumm, M., Lang, P., Greil, J., Reiter, A., Bader, P., Niethammer, D., Klingebiel, T. (1999)
Transplantation of Megadoses of purified haploidentical stem cells
Ann N Y Acad of Sci, 872, 351-362

37. Handgretinger, R., Lang, P., Schumm, M., Pfeiffer, M., Gottschling, S., Demirdelen, B., Bader, P., Kuci, S., Klingebiel, T., Niethammer, D. (2001)
Immunological aspects of haploidentical stem cell transplantation in children
Ann N Y Acad Sci, 938, 340-358

38. Handgretinger, R., Klingebiel, T., Lang, P., Schumm, M., Neu, S., Geiselhart, A., Bader, P., Schlegel, P.G., Greil, J., Stachel, D., Herzog, R.J., Niethammer, D. (2001)
Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34⁺ progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children
Bone Marrow Transplant, 27, 777-783

39. Handgretinger, R., Klingebiel, T., Lang, P., Gordon, P., Niethammer, D. (2003)
Megadose transplantation of highly purified haploidentical stem cells: current results and future prospects
Pediatr Transplant Suppl 3, 7, 51-55
40. Hank, J.A., Robinson, R.R., Surfus, J., Mueller, B.M., Reisfeld, R.A., Cheung, N.-K., Sondel, P.M. (1990)
Augmentation of antibody dependent cell mediated cytotoxicity following in vivo therapy with recombinant Interleukin 2
Cancer Res, 50, 5234-5239
41. Hauch, M., Gazzola, M.V., Small, T., Bordignon, C., Barnett, L., Cunningham, I., Castro-Malaspina, H., O'Reilly, R.J., Keever, C.A. (1990)
Anti-Leukemia potential of Interleukin-2 activated Natural Killer Cells after bone marrow transplantation for Chronic Myelogenous Leukemia
Blood, 75, 2250-2262
42. Henney, C.S., Kuribayashi, K., Kern, D.E., Gillis, S. (1981)
Interleukin-2 augments natural killer cell activity
Nature, 291, 335-338
43. Herold, G. (2002)
Innere Medizin
Gerd Herold, Köln
44. Higuchi, C.M., Thompson, J.A., Cox, T., Lindgren, C.G., Buckner, C.D., Fefer, A. (1989)
Lymphokine-activated killer function following Autologous Bone Marrow Transplantation for refractory hematological malignancies
Cancer Res, 49, 5509-5513
45. Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sondel, P.M., Goldman, J.M., Kersey, J., Kolb, H.-J., Rimm, A.A., Ringden, O., Rozman, C., Speck, B., Truitt, R.L., Zwaan, F.E., Bortin, M.M. (1990)
Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation
Blood, 75, 555-562
46. Houghton, A.N., Scheinberg, D.A. (1986)
Monoclonal antibodies: Potential applications to the treatment of cancer
Semin Oncol, 13, 165-179
47. Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., Nakachi, K. (2000)
Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population
Lancet, 356, 1795-1799

48. Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S., Winter, G. (1986)
Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse
Nature, 321, 522-525

49. Kernan, N.A., Bartsch, G., Ash, R.C., Beatty, P.G., Champlin, R., Filipovich, A., Gajewski, J., Hansen, J.A., Henslee-Downey, J., McCullough, J., McGlave, P., Perkins, H.A., Phillips, G.L., Sanders, J., Stroncek, D., Thomas, E.D., Blume, K.G. (1993)
Analysis of 462 transplantations from unrelated donors facilitated by the National Marrow Donor Program
N Engl J Med, 328, 593-602

50. Köhler, G., Milstein, C. (1975)
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity
Nature, 256, 495-497

51. Kolb, H.-J., Schattenberg, A., Goldman, J.M., Hertenstein, B., Jacobsen, N., Arcese, W., Ljungman, P., Ferrant, A., Verdonck, L., Niederwieser, D., Rhee van, F., Mittermueller, J., Witte de, T., Holler, E., Ansari, H. (1995)
Graft-versus-Leukemia effect of donor lymphocyte transfusion in marrow grafted patients
Blood, 86, 2041-2050

52. Komatsu, F., Tamiya, H. (1998)
Relationship between antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity due to anti-HTLV-1 and negative signal of major histocompatibility complex class I antigens on adult T-cell Leukemia cell lines
Oncol Res, 10, 59-67

53. Lang, P., Klingebiel, T., Schumm, M., Greil, J., Stachel, D., Führer, M., Schwinger, G., Reiter, A., Bader, P., Niethammer, D., Handgretinger, R. (1999)
Transplantation of highly purified allogeneic CD34+ stem cells in pediatric malignancies
Med Pediatr Oncol, 33, 214

54. Lang, P., Schumm, M., Gonzalez-Ramella, O., Geiselhart, A., Eyrych, M., Klingebiel, T., Niethammer, D., Handgretinger, R. (1999)
Nk-cell cytotoxicity and Interleukin 2 application after transplantation with highly purified CD34+ stem-cells from mismatched parental donors
Bone Marrow Transplant Suppl 1, 23, 176

55. Lang, P., Pfeiffer, M., Handgretinger, R., Schumm, M., Demirdelen, B., Stanojevic, S., Klingebiel, Th., Köhl, U., Kuci, S., Niethammer, D. (2002)
Clinical scale isolation of T cell-depleted CD56⁺ donor lymphocytes in children
Bone Marrow Transplant, 29, 497-502

56. Lang, P., Handgretinger, R., Niethammer, D., Schlegel, P.G., Schumm, M., Greil, J., Bader, P., Engel, C., Scheel-Walter, H., Eyrich, M., Klingebiel, T. (2003)
Transplantation of highly purified CD34⁺ progenitor cells from unrelated donors in pediatric leukemia
Blood, 101, 1630-1636

57. Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.I., Loken, M.R., Phillips, J.H. (1986)
The relationship of CD16 (LEU-11) and LEU-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes
J Immunol, 136, 4480-4486

58. Lanier, L.L. (2001)
On guard-activating NK cell receptors
Nature Immunology, 2, 23-27

59. Liu, Z., Smyth, F.E., Renner, C., Lee, F.-T., Oosterwijk, E., Scott, A.M. (2002)
Anti-renal cell carcinoma chimeric antibody G250: cytokine enhancement of in vitro antibody-dependent cellular cytotoxicity
Cancer Immunol Immunother, 51, 171-177

60. Ljunggren, H.-G., Kärre, K. (1990)
In search of the 'missing self' : MHC molecules and NK cell recognition
Immunol Today, 11, 237-244

61. Lozzio, C.B., Lozzio, B.B. (1975)
Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome
Blood, 45, 321-334

62. Mackinnon, S., Hows, J.M., Goldman, J.M. (1990)
Induction of in vitro Graft-versus-Leukemia activity following Bone Marrow Transplantation for Chronic Myeloid Leukemia
Blood, 76, 2037-2045

63. Maloney, D.G., Grillo-Lopez, A.J., White, C.A., Bodkin, D., Schilder, R.J., Neidhart, J.A., Janakiraman, N., Foon, K.A., Liles, T.-M., Dallaire, B.K., Wey, K., Royston, I., Davis, T., Levy, R. (1997)
IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade Non-Hodgkin's Lymphoma
Blood, 90, 2188-2195
64. McLaughlin, P., Grillo-Lopez, A.J., Link, B.K., Levy, R., Czuczman, M.S., Williams, M.E., Heyman, M.R., Bence-Bruckler, I., White, C.A., Cabanillas, F., Jain, V., Ho, A.D., Lister, J., Wey, K., Shen, D., Dallaire, B.K. (1998)
Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent Lymphoma: Half of patients respond to a four-dose treatment program
J Clin Oncol, 16, 2825-2833
65. Meropol, N.J., Porter, M., Blumenson, L.E., Lindemann, M.J., Perez, R.P., Vaickus, L., Loewen, G.M., Creaven, P.J., Wilkes, K.A., Giedlin, M.A., Caligiuri, M.A. (1996)
Daily subcutaneous injection of low-dose Interleukin 2 expands Natural Killer cells in vivo without significant toxicity
Clin Cancer Res, 2, 669-677
66. Meropol, N.J., Barresi, G.M., Fehninger, T.A., Hitt, J., Franklin, M., Caligiuri, M.A. (1998)
Evaluation of natural killer cell expansion and activation in vivo with daily subcutaneous low-dose Interleukin-2 plus periodic intermediate-dose pulsing
Cancer Immunol Immunother, 46, 318-326
67. Miller, J.S., Prosper, F., McCullar, V. (1997)
Natural Killer (NK) Cells Are Functionally Abnormal and NK Cell Progenitors are diminished in Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Mobilized peripheral blood progenitor cell collections
Blood, 90, 3098-3105
68. Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., Radbruch, A. (1990)
High gradient magnetic cell separation with MACS Cytometry, 11, 231-238
69. Mingari, M.C., Ponte, M., Cantoni, C., Vitale, C., Schiavetti, F., Bertone, S., Bellomo, R., Cappai, A.T., Biassoni, R. (1997)
HLA-class I-specific inhibitory receptors in human cotolytic T lymphocytes: molecular characterization, distribution in lymphoid tissues and co-expression by individual T cells
Int Immunol, 9, 485-491

70. Moretta, A., Sivori, S., Vitale, M., Pende, D., Morelli, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L. (1995)
Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) Receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells
J Exp Med, 182, 875-884

71. Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Pende, D., Vitale, M., Poggi, A., Mingari, M.C., Moretta, L. (1997)
Major histocompatibility complex class I-specific receptors on human natural killer and T lymphocyte
Immunol Rev, 155, 105-117

72. Moretta, L., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M.C., Moretta, A. (2000)
Human NK-cell receptors
Immunol Today, 21, 420-422

73. Morrison, S.L. (1985)
Transfectomas provide novel chimeric antibodies
Science, 229, 1202-1207

74. Murphy, W.J., Longo, D.L. (1997)
The potential role of NK cells in the separation of graft-versus-tumor effects from graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation
Immunol Rev, 157, 167-176

75. Niethammer, D., Dopfer, R., Ehninger, G., Schäfer, U.W., Stollmann, B., Rister, M., Schmitz, N., Bender-Götze, Ch., Haas, R.J., Kolb, H., Blütters-Sawatzki, R., Ebell, W., Friedrich, W., Kleihauer, E. (1989)
Bone Marrow Transplantation In Childhood Leukemia
Experience and Strategies in the Federal Republic of Germany
Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch, 116, 361-366

76. Order, S.E., Sleeper, A.M., Stillwagon, G.B., Klein, J.L., Leichner, P.K. (1990)
Radiolabeled antibodies: Results and potential in cancer therapy
Cancer Res Suppl, 50, 1011-1013

77. Ortaldo, J.R., Woodhouse, C., Morgan, A.C., Herberman, R.B., Cheresch, D.A., Reisfeld, R. (1987)
Analysis of effector cells in human antibody-dependent cellular cytotoxicity with murine monoclonal antibodies
J Immunol, 138, 3566-3572

78. Ozaki, S., Kosaka, M., Wakahara, Y., Ozaki, Y., Tsuchiya, M., Koishihara, Y., Goto, T., Matsumoto, T. (1999)
Humanized anti-HM1.24 antibody mediates myeloma cell cytotoxicity that is enhanced by cytokine stimulation of effector cells
Blood, 93, 3922-3930

79. Palucka, K.A., Reizenstein, P., Öst, A., Porwitt-Macdonald, A. (1998)
Blocking of mhc class I antigens on leukemic B-cells enhances their conjugate formation with cytotoxic lymphocytes and their susceptibility to lysis
Leuk Lymphoma, 28, 573-581

80. Pavletic, Z.S., Joshi, S.S., Pirruccello, S.J., Tarantolo, S.R., Kollath, J., Reed, E.C., Bierman, P.J., Vose, J.M., Warkentin, P.I., Gross, T.G., Nasrati, K., Armitage, J.O., Kessinger, A., Bishop, M.R. (1998)
Lymphocyte reconstitution after allogeneic blood stem cell transplantation for hematologic malignancies
Bone Marrow Transplant, 21, 33-41

81. Pendurthi, T.K., Parker, R., Schlom, J., Primus, F.J. (1990)
Lymphokine-activated killer cell cytotoxicity against human colon carcinomas enhanced by monoclonal antibody D612
Int J Cancer, 46, 1021-1028

82. Poncelet, P., Carayon, P. (1985)
Cytofluorometric Quantification of cell-surface antigens by indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies
J Immunol Methods, 85, 65-74

83. Pulvertaft, R.J.V. (1964)
Cytology of Burkitt's Tumor (African Lymphoma)
Lancet, 1, 238-240

84. Raffael, A. (1988)
Grundlagen der analytischen Durchflußzytometrie
Labor Medizin, 11, 89-97

85. Raspadori, D., Lauria, F., Ventura, M.A., Tazzari, P.L., Ferrini, S., Miggiano, M.C., Rondelli, D., Tura, S. (1995)
Low doses of rIL2 after autologous bone marrow transplantation induce a "prolonged" immunostimulation of NK compartment in high-grade non-Hodgkin's lymphomas
Ann Hematol, 71, 175-179

86. Raulet, D.H. (1999)
Development and tolerance of natural killer cells
Curr Opin Immunol, 11, 129-134

87. Reff, M.E., Carner, K., Chambers, K.S., Chinn, P.C., Leonard, J.E., Raab, R., Newman, R.A., Hanna, N., Anderson, D.R. (1994)
Depletion of B cells In vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20
Blood, 83, 435-445

88. Reyburn, H., Mandelboim, O., Vales-Gomez, M., Sheu, E.G., Pazmany, L., Davis, D.M., Strominger, J.L. (1997)
Human NK cells: their ligands, receptors and functions
Immunol Rev, 155, 119-125

89. Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R.S., Martelli, M.F., Velardi, A. (1999)
Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation
Blood, 94, 333-339

90. Schleuning, M. (2000)
Adoptive allogeneic immunotherapy – history and future perspectives
Trasfusión Science, 23, 133-150

91. Slavin, S., Ackerstein, A., Kedar, E., Weiss, L. (1990)
IL-2 activated cell-mediated immunotherapy: Control of minimal residual disease in malignant disorders by allogeneic lymphocytes and IL-2
Bone Marrow Transplant Suppl 1 , 6, 86-90

92. Slavin, S., Naparstek, E., Nagler, A., Ackerstein, A., Samuel, S., Kapelushnik, J., Brautbar, C., Or, R. (1996)
Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and recombinant human Interleukin-2 to treat Leukemia relapse after allogeneic Bone Marrow Transplantation
Blood, 87, 2195-2204

93. Soiffer, R.J., Murray, C., Cochran, K., Cameron, C., Wang, E., Schow, P.W., Daley, J.F., Ritz, J. (1992)
Clinical and immunologic effects of prolonged infusion of low-dose recombinant Interleukin-2 after autologous and T-cell-depleted allogeneic Bone marrow Transplantation
Blood, 79, 517-526

94. Soiffer, R.J., Murray, C., Gonin, R., Ritz, J. (1994)
Effect of low-dose Interleukin-2 on disease relapse after T-cell-depleted allogeneic Bone Marrow Transplantation
Blood, 84, 964-971

95. Storb, R. (1983)
Human Bone marrow transplantation
Transplant Proc, 15, 1379-1384

96. Stupp, Y., Rosenkovitch, E., Izak, G. (1978)
Natural killer activity in patients with acute myelocytic leukemia
Isr J Med Sci, 14, 1212-1215

97. Sung, M.-W., Yasumura, S., Johnson, J.T., Dongen van, G.A.M.S., Whiteside, T.L. (1995)
Natural killer (NK) cells as effectors of antibody-dependent cytotoxicity with chimeric antibodies reactive with human squamous-cell carcinomas of the head and neck
Int J Cancer, 61, 864-872

98. Tanaka, J., Mori, A., Ohta, S., Yamamoto, Y., Kobayashi, S., Hashino, S., Kobayashi, M., Asaka, M., Imamura, M. (2000)
Expression of HLA-C-specific natural killer cell receptors (CD158a and CD158b) on peripheral blood mononuclear cells after allogeneic bone marrow transplantation
Br J Haematol, 108, 778-783

99. Toit du, C., Novitzky, N. (1999)
GVL and GVHD following the infusion of a limited number of donor CD3 cells in the therapy of leukemia relapse after bone marrow transplantation
Eur J Haematol, 62, 68-69

100. Uharek, L., Zeis, M., Glass, B., Steinmann, J., Dreger, P., Gassmann, W., Schmitz, N., Müller-Ruchholtz, W. (1996)
High lytic activity against human leukemia cells after activation of allogeneic cells by IL-12 and IL-2
Leukemia, 10, 1758-1764

101. Uharek, L., Glass, B., Zeis, M., Dreger, P., Steinmann, J., Löffler, H., Schmitz, N. (1998)
Abrogation of graft-vs.-leukemia activity after depletion of CD3⁺ T cells in a murine model of MHC-matched peripheral blood progenitor cell transplantation (PBPCT)
Exp Hematol, 26, 93-99

102. Uhrberg, M., Valiante, N.M., Shum, B.P., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyan, D., Lanier, L.L., Parham, P. (1997)
Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes
Immunity, 7, 753-763

103. Urbano-Ispizua, A., Solano, C., Brunet, S., Rubia de la, J., Odriozola, J., Zuazu, J., Figuera, A., Caballero, D., Martinez, C., Garcia, J., Sanz, G., Torrabadella, M., Alegre, A., Perez-Oteiza, J., Jurado, M., Oyonarte, S., Sierra, S., Garcia-Conde, J., Rozman, C. (1998)
Allogeneic transplantation of selected CD34⁺ cells from peripheral blood: experience of 62 cases using immunoadsorption or immunomagnetic technique
Bone Marrow Transplant, 22, 519-525
104. Vitetta, E.S., Fulton, R.J., May, R.D., Till, M., Uhr, J.W. (1987)
Redesigning Nature's Poisons to create anti-Tumor reagents
Science, 238, 1098-1104
105. Werner, J. (1992)
Biometrik und Medizinische Statistik
2. Aufl., Urban & Schwarzenberg, Wien-München-Baltimore
106. Whiteside, T.L., Herberman, R.B. (1989)
The role of natural killer cells in human disease
Clin Immunol Immunopathol, 53, 1-23
107. Whiteside, T.L., Herberman, R.B. (1995)
The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer
Cur Opin in Immunol, 7, 704-710

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bedanken, bei

Herrn Professor Dr. med D. Niethammer, meinem Doktorvater, für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes.

Herrn Dr. med P. Lang, meinem Betreuer, für seine Unterstützung und seine Hilfestellungen.

Herrn Dr. M. Schumm für seine Unterstützung und seine Hilfestellungen.

Herrn Dr. Matthias Pfeiffer für die Einarbeitung und Hilfestellungen.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern des KMT-Labors, besonders Olga Bartulli und Ulrike Junker, für die Hilfsbereitschaft und die Einarbeitung.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Stanojevic
Vorname: Stanoje
Geburtsdatum: 12.01.1975
Geburtsort: Solbad Hall, Österreich

Schulbildung:

1983-1987: Kirchgraben Grundschule Ebingen, Albstadt
Grundschulabschluß
1987-1996: Gymnasium Ebingen, Albstadt
Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

Oktober 1996: Beginn des Humanmedizinstudiums an der
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
September 1998: Ärztliche Vorprüfung
August 1999: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2002: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
14.Mai 2003: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit 01.06.2004 Assistenzarzt in der Chirurgie im
Kreiskrankenhaus Hechingen