

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

**Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik  
Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und  
Onkologie**

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

**Untersuchungen zur Bedeutung  
aktivierender und inhibierender Rezeptoren  
auf Natürlichen Killerzellen  
bei deren zytotoxischen Aktivität gegenüber  
leukämischen Blasten der B-Zell-Reihe**

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

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

**vorgelegt von  
Ulrike Barbara Bohlmann, geb. Mura  
aus  
Stuttgart**

**2011**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

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

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Stevanovic

**Ich weiß, dass ich nicht weiß –  
und ich will mich bemühen,  
mit Herz und Verstand zu handeln!**

**(Frei nach Platon und Sokrates)**

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>9</b>
1.1	Eigenschaften, Untergruppen und Funktionen von Natürlichen Killerzellen.....	9
1.2	Zytotoxische Aktivität von NK-Zellen des peripheren Blutes .....	11
1.3	Aktivierende NK-Zell-Rezeptoren und ihre Liganden.....	13
1.3.1	Natural Cytotoxicity Receptors (NCR) .....	15
1.3.2	NKG2D .....	15
1.3.3	CD16.....	16
1.3.4	Weitere aktivierende Rezeptoren, sowie Adhäsionsmoleküle .....	17
1.4	Inhibierende NK-Zell-Rezeptoren und ihre Liganden.....	19
1.4.1	Killer-Immunoglobulin-artige Rezeptoren (KIR) .....	20
1.4.2	C-Type-Lectin-artige Rezeptoren .....	23
1.4.3	Leukocyte-Immunoglobulin-artiger Rezeptor 1 (LIR-1) .....	23
1.4.4	CD161 (NKR-P1A).....	24
1.5	Die akuten Leukämien der B-Zell-Reihe im Kindesalter .....	24
1.6	NK-Zell-basierte Therapien der B-Reihen-ALL .....	27
1.6.1	Ansatzpunkt: Liganden von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren auf Blasten .....	29
1.6.2	Ansatzpunkt: Liganden von inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren auf Blasten .....	31
1.6.3	Ansatzpunkt: Aktivierende NK-Zell-Rezeptoren .....	31
1.6.4	Ansatzpunkt: Inhibierende NK-Zell-Rezeptoren .....	32
1.6.5	Ansatzpunkt: Grundaktivität der NK-Zellen .....	33
1.6.6	Ansatzpunkt: Lysemechanismen der NK-Zellen .....	33
1.6.7	Ansatzpunkt: Insgesamt zu wenige NK-Zellen .....	34
1.6.8	Wechselwirkungen.....	34
1.7	Fragestellung .....	35
<b>2</b>	<b>Material.....</b>	<b>36</b>
2.1	Geräte und Software .....	36
2.2	Glas-, Plastik- und Metall-Material .....	38

---

2.3	Stammlösungen .....	39
2.4	Sonstige Reagentien und Substanzen .....	40
2.5	Antikörper und lösliche Rezeptormoleküle .....	41
2.6	Zellen .....	44
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>45</b>
3.1	Gewinnung und Typisierung von Blasten .....	45
3.2	Grundlagen der FACS-Analyse .....	46
3.2.1	Hintergrund .....	46
3.2.2	Markierung gesuchter Strukturen .....	47
3.2.3	Messung am FACS-Gerät .....	50
3.2.4	Auswertung .....	51
3.3	Qualitative FACS-Analyse von NKG2D-Liganden auf Blasten mit Primär- und Sekundärantikörpern .....	58
3.3.1	Durchführung .....	58
3.3.2	Auswertung .....	59
3.4	Quantitative FACS-Analyse von NKG2D-Liganden auf Blasten .....	60
3.4.1	Hintergrund .....	60
3.4.2	Durchführung .....	61
3.4.3	Auswertung .....	63
3.5	Qualitative FACS-Analyse von NCR-Liganden und NKG2D-Liganden auf Blasten mit löslichen Rezeptor-Molekülen und Sekundärantikörpern .....	64
3.5.1	Hintergrund .....	64
3.5.2	Durchführung .....	65
3.6	Quantitative FACS-Analyse von HLA-A + HLA-B + HLA-C sowie HLA-E auf Blasten .....	67
3.7	Qualitative FACS-Analyse weiterer Moleküle mit potentiell NK-Zell-modulierender Funktion auf Blasten .....	68
3.7.1	Adhäsionsmoleküle .....	68
3.7.2	AICL und LLT-1 .....	69
3.7.3	CD48, CD112, CD155 und NG2 .....	70
3.8	Anreicherung, Untersuchung und Stimulation von NK-Zellen für Zytotoxizitätstests .....	71
3.8.1	Isolierung peripherer mononukleärer Zellen mit Ficoll-Hypaque .....	71
3.8.2	Zellanreicherung mit dem MACS-System .....	71

---

3.8.3	T-Zell-Depletion mit Dynabeads .....	72
3.8.4	Untersuchung der angereicherten NK-Zellen .....	73
3.8.5	Stimulation .....	74
3.9	Zytotoxizitätstests mit Blockade von Rezeptoren oder Liganden.....	74
3.9.1	Hintergrund.....	74
3.9.2	Durchführung.....	75
3.9.3	Auswertung.....	79
4	Ergebnisse.....	82
4.1	Qualitative FACS-Analyse von NKG2D-Liganden auf Blasten mit Primär- und Sekundärantikörpern .....	82
4.1.1	Graphische Auswertung und GeoMean-Werte.....	82
4.1.2	Einführung einer neuen Auswertungsmethode der Qualitativen FACS-Analyse (MNF) .	85
4.1.3	Ergebnisse der Auswertung mittels MNF .....	100
4.2	Quantitative FACS-Analyse von NKG2D-Liganden auf Blasten .....	102
4.3	Qualitative FACS-Analyse von NCR-Liganden und NKG2D-Liganden auf Blasten mit löslichen Rezeptor-Molekülen und Sekundärantikörpern .....	107
4.3.1	Messserie mit Flebogamma als Negativkontrolle, GeoMean-Werte .....	107
4.3.2	Kritische Untersuchung der Methode .....	109
4.3.3	Interpretation der Ergebnisse für die NCR-Liganden .....	113
4.3.4	Interpretation der Ergebnisse für die NKG2D-Liganden .....	113
4.3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse von Kapitel 4.3 .....	114
4.4	Vergleich von drei Methoden der FACS-Analyse.....	116
4.5	Quantitative FACS-Analyse von HLA-A + HLA-B + HLA-C sowie HLA-E auf Blasten.....	117
4.6	Qualitative FACS-Analyse weiterer Moleküle mit potentiell NK-Zell-modulierender Funktion auf Blasten .....	119
4.6.1	Adhäsionsmoleküle.....	119
4.6.2	AICL und LLT -1.....	122
4.6.3	CD48, CD112, CD155 und NG2 .....	125
4.7	Zytotoxizitätstests zur funktionellen Bedeutung von Rezeptor-Ligand-Paaren .....	129
4.7.1	Blockade von NKG2D-Rezeptoren oder ihren Liganden.....	131
4.7.2	Blockade von Natural Cytotoxicity Receptors oder ihren Liganden.....	137
4.7.3	Blockade weiterer Moleküle.....	143

---

4.7.4 Funktionelle Bedeutung von HLA-A, -B und -C sowie HLA-E .....	146
<b>4.8 Zusammenfassung der Ergebnisse.....</b>	<b>150</b>
4.8.1 Die Methoden betreffende Ergebnisse .....	150
4.8.2 Liganden von aktivierenden und inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren auf kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten .....	152
4.8.3 Funktionelle Bedeutung verschiedener Rezeptor-Ligand-Paare.....	158
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>160</b>
<b>5.1 Methodenkritik.....</b>	<b>160</b>
5.1.1 Einführung einer neuen Auswertungsmethode der Qualitativen FACS-Analyse (MNF)	160
5.1.2 FACS-Analyse von Blasten – Allgemeines.....	162
5.1.3 Qualitative FACS-Analyse von NKG2D-Liganden auf Blasten mit Primär- und Sekundärantikörpern .....	163
5.1.4 Quantitative FACS-Analyse von NKG2D-Liganden auf Blasten.....	164
5.1.5 Qualitative FACS-Analyse von NCR-Liganden und NKG2D-Liganden auf Blasten mit löslichen Rezeptor-Molekülen und Sekundärantikörpern .....	165
5.1.6 Quantitative FACS-Analyse von HLA-A + HLA-B + HLA-C sowie HLA-E auf Blasten.....	166
5.1.7 Qualitative FACS-Analyse weiterer Moleküle mit potentiell NK-Zell-modulierender Funktion auf Blasten .....	167
5.1.8 Anreicherung, Untersuchung und Stimulation von NK-Zellen für Zytotoxizitätstests ...	169
5.1.9 Zytotoxizitätstests .....	170
<b>5.2 NKG2D-Rezeptoren und ihre Liganden .....</b>	<b>171</b>
<b>5.3 Natural Cytotoxicity Receptors und ihre Liganden .....</b>	<b>172</b>
<b>5.4 Rezeptoren für HLA-A, HLA-B, HLA-C sowie HLA-E .....</b>	<b>174</b>
<b>5.5 Weitere Moleküle mit potentiell NK-Zell-modulierender Funktion .....</b>	<b>177</b>
5.5.1 Adhäsionsmoleküle.....	177
5.5.2 AI1L und LLT-1 .....	178
5.5.3 CD155 und CD112.....	178
5.5.4 CD48.....	179
5.5.5 NG2.....	180
5.5.6 Weitere Moleküle.....	181
<b>5.6 Schlussfolgerungen für die klinische Anwendung .....</b>	<b>181</b>
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>186</b>

7	Abbildungsverzeichnis.....	190
8	Tabellen.....	198
9	Literatur.....	225
10	Anhang.....	238
10.1	Abkürzungsverzeichnis.....	238
10.2	Veröffentlichungen.....	240
10.3	Danksagungen.....	241



# 1 Einleitung

## 1.1 Eigenschaften, Untergruppen und Funktionen von Natürlichen Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind große, granuläre Lymphozyten, die wichtige Bestandteile des Immunsystems darstellen. Sie können viele Arten von Tumorzellen und Virus-infizierten Zellen ohne vorherige Sensibilisierung erkennen und lysieren. Damit beteiligen sie sich entscheidend an der Primären Immunantwort. Diese Funktion der NK-Zellen ist schon seit mehreren Jahrzehnten bekannt.

In den letzten Jahren wurden außerdem viele neue Erkenntnisse über Entwicklung, Aufbau, Funktionsweise und physiologische Aufgaben von NK-Zellen veröffentlicht [29, 70, 25, 32]. So hat eine besondere Untergruppe von NK-Zellen, die in den Lymphknoten dominiert, eine geringe zytotoxische Aktivität, gibt jedoch große Mengen an Zytokinen ab. Außerdem kommunizieren NK-Zellen mit verschiedenen anderen Zellen der Immunabwehr. Durch Interaktionen mit Monozyten und Makrophagen modulieren NK-Zellen die Primäre Immunantwort. Durch Interaktionen insbesondere mit T-Zellen und Dendritischen Zellen beteiligen sie sich aber auch an der antigen-spezifischen Sekundären Immunantwort. So können NK-Zellen die gesamte Immunantwort verstärken oder limitieren.

NK-Zellen stammen von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark ab. Ihre weitere Entwicklung ist bislang jedoch nicht eindeutig geklärt. Lymphknoten

scheinen als Entwicklungsorte eine wichtige Rolle zu spielen. NK-Zellen sind generell durch ihre Expression von CD56 und fehlende Expression von CD3 charakterisiert. Im peripheren Blut finden sich vorwiegend NK-Zellen, die CD56 nur mit geringer Antigendichte exprimieren und zusätzlich CD16 exprimieren (CD56<sup>low</sup>-CD16<sup>+</sup>-NK-Zellen). Sie sind stark zytotoxisch und produzieren nur wenige Zytokine. Im Unterschied dazu finden sich in den Lymphknoten vorwiegend NK-Zellen, die CD56 mit hoher Antigendichte exprimieren und CD16 nicht exprimieren (CD56<sup>high</sup>-CD16<sup>-</sup>-NK-Zellen). Sie sind nur wenig zytotoxisch, produzieren jedoch viele Zytokine. Es wird noch kontrovers diskutiert, ob diese Untergruppen von NK-Zellen verschiedenen Entwicklungsschritten der NK-Zellen entsprechen, sie sich je nach Stimulation ineinander umwandeln, oder ob sich bereits früh die Zugehörigkeit einer NK-Zelle zu einer der beiden Gruppen entscheidet.

2009 veröffentlichten Cooper et al. und Sun et al. Studien, denen zufolge NK-Zellen Eigenschaften aufweisen, die bislang nur Zellen der Spezifischen Immunabwehr zugeschrieben wurden [23, 100]. So zeigten Cooper et al., dass manche NK-Zellen ein Gedächtnis besitzen. Wurden sie einmal von Zytokinen (IL-12 und IL-18) stimuliert und kehrten sie danach in den Ruhezustand zurück, so reagierten sie ausgeprägter auf erneute Interleukin-Stimulation oder auf Stimulierung ihrer aktivierenden Rezeptoren als NK-Zellen, die zuvor nicht stimuliert worden waren. Proliferierten so sensibilisierte NK-Zellen, vererbten sie diese Eigenschaft an ihre Tochterzellen. Es könnte also sein, so ihre Schlussfolgerung, dass eine einzige Aktivierung zu einer ganzen Population von NK-Zellen mit erhöhter Aktivität führt.

Sun et al. schlagen sogar vor, NK-Zellen nicht wie bislang üblich der Unspezifischen Immunabwehr zuzurechnen sondern sie als „Evolutionäre Brücke“ zwischen der Unspezifischen und der Spezifischen Immunabwehr zu betrachten. Sie schreiben den NK-Zellen fast alle Eigenschaften von Zellen der Spezifischen Immunabwehr zu, insbesondere die Bildung von langlebenden

Gedächtniszellen (nachgewiesen im Mausmodell). Eine typische Eigenschaft von B- und T-Lymphozyten fehlt den NK-Zellen jedoch: Die Spezifität ihrer Rezeptoren für bestimmte Antigene, entstanden durch Gen-Rearrangement während ihrer Entwicklung.

## **1.2 Zytotoxische Aktivität von NK-Zellen des peripheren Blutes**

Diese Arbeit beschäftigt sich vorwiegend mit der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen des peripheren Blutes. NK-Zellen machen 10 bis 15 % aller Lymphozyten des peripheren Blutes aus [29], wobei diese Zahl interindividuell, im Tagesverlauf und abhängig von weiteren Einflüssen wie z. B. Stress oder Infektionen stark variiert [12]. Bei Entzündungen, Virusinfektionen oder Tumorwachstum wandern NK-Zellen schnell aus dem Blut in die betroffenen Gewebe. Für diese Einwanderung spielen verschiedene Oberflächenmoleküle der NK-Zellen, sowie verschiedene Zytokine und Chemokine eine Rolle. Die genauen Mechanismen sind noch nicht geklärt, es gibt hierzu jedoch viele neue Erkenntnisse [70].

Im peripheren Blut und in veränderten Geweben werden NK-Zellen von Zytokinen, von Substanzen, die von Pathogenen abstammen, oder durch den Kontakt mit Liganden aktivierender NK-Zell-Rezeptoren auf Zellen aktiviert. Neben verschiedenen aktivierenden Rezeptoren besitzen sie auch verschiedene inhibierende Rezeptoren. Nach heutigem Verständnis entscheidet ein komplex reguliertes Gleichgewicht zwischen der Stimulierung von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren einer NK-Zelle, ob diese NK-Zelle zytotoxisch aktiv wird. Die Rezeptoren einer NK-Zelle werden dabei, im Unterschied zu Antigenrezeptoren von B- und T-Zellen, nicht somatisch rekombiniert. Sie sind damit zwar Liganden-spezifisch, nicht aber spezifisch für einen bestimmten

Krankheitserreger. Auf die verschiedenen Rezeptoren gehen Kapitel 1.3 und 1.4 näher ein.

Zellen, deren Lyse von NK-Zellen induziert wird, bezeichnet man als Target-Zellen. NK-Zellen können die Lyse von Targetzellen durch verschiedene Mechanismen induzieren. Der bekannteste Mechanismus besteht dabei in der Exozytose von Perforinen, Granzymen und weiteren Proteinen, die gemeinsam zur Bildung von Poren in der Zellmembran der Zielzelle und schließlich deren Tod führen [102]. Die lytischen Proteine speichern NK-Zellen in intrazellulären sekretorischen Lysosomen, also spezialisierten, exozytischen Organellen. Wird eine Zelle von einer NK-Zelle als Targetzelle identifiziert und soll lysiert werden, so entsteht eine besondere Synapse zwischen NK- und Targetzelle. Dann entlassen die sekretorischen Lysosomen der NK-Zelle ihre zytotoxischen Inhaltsstoffe in diese Synapse. Dieser Vorgang wird auch als Degranulation bezeichnet.

Ein weiterer Mechanismus, mit dem NK-Zellen die Lyse von Targetzellen induzieren können [73], besteht in der Bindung eines Fas-Liganden (FasL) auf NK-Zellen an den Fas-Rezeptor (Fas, CD95) auf Target-Zellen. Durch diese Bindung werden in der Targetzelle Enzyme aktiviert, die zur Apoptose der Zelle führen.

Des Weiteren können NK-Zellen die Zerstörung von Targetzellen durch die Sekretion des „Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ “ (TNF- $\alpha$ ) induzieren [74, 101].

## 1.3 Aktivierende NK-Zell-Rezeptoren und ihre Liganden

Hier wird nur auf die NK-Zell-Rezeptoren eingegangen, die dem Zell-Zell-Kontakt dienen. Andere aktivierende NK-Zell-Rezeptoren, wie z. B. Zytokinrezeptoren, werden hier nicht behandelt.

Rezeptor	Ligand
<b>C-Type-Lectin-artige Rezeptoren:</b> CD94/NKG2C CD94/NKG2E/H NKG2D	HLA-E unbekannt MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4
<b>Natural-Cytotoxicity-Receptors:</b> NKp30, NKp44, NKp46	unbekannt
<b>Killer-Immunoglobulin-artige Rezeptoren:</b> KIR2DS1 KIR2DS2 KIR2DL4 KIR2DS4 KIR2DS5 KIR3DS1	Cw4-Gruppe unbekannt HLA-G unbekannt unbekannt unbekannt

<b>Weitere aktivierende Rezeptoren:</b>	
CD16	Fc-Teil von IgG-Antikörpern
CD244 (2B4)	CD48
NKp80	AICL
CD69	unbekannt
CD40-Ligand	CD40
CD226 (DNAM-1)	CD112, CD155
NTB-A	NTB-A
<b>Adhäsionsmoleküle:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• LFA-1 (CD11a/CD18).</li> <li>• LFA-2 (CD2)</li> <li>• LFA-3 (CD58)</li> <li>• ICAM-1 (CD54)</li> <li>• ICAM-2 (CD102)</li> <li>• ICAM-3 (CD50)</li> </ul>	ICAM1 (CD54), ICAM2 (CD102), ICAM3 (CD50) CD15, CD48, LFA-3 (CD58), CD59 LFA-2 (CD2) LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1a LFA-1 (CD11a/CD18) LFA-1 (CD11a/CD18)

### 1.3.1 Natural Cytotoxicity Receptors (NCR)

Die Natural Cytotoxicity Receptors (NCR) sind als aktivierende NK-Zell-Rezeptoren schon lange bekannt [68]. Sie gehören zur Gruppe der Immunglobulin-artigen Rezeptoren. Es sind bislang drei verschiedene Arten von NCR bekannt. Zwei davon (NKp30 und NKp46) kommen auf allen NK-Zellen des peripheren Blutes vor, während die dritte, NKp44, nur auf aktivierten NK-Zellen vorkommt [29].

Die Bedeutung der NCR für die Zytotoxizität von NK-Zellen ist unumstritten, während über die Liganden der NCR noch viel Unklarheit herrscht. Zunehmend werden Hinweise auf die Struktur von NCR-Liganden [5, 4, 40] sowie deren Expression auf Tumorzellen [13, 18] und Leukämiezellen [72] publiziert, es herrscht jedoch noch keine Einigkeit darüber, ob es sich bei den aktivierenden NCR-Liganden überhaupt um zellgebundene Strukturen handelt [82].

Die Bedeutung der NCR selbst lässt sich auch ohne Kenntnis ihrer Liganden belegen: Cross-linking von NCR mit künstlich verbundenen spezifischen Antikörpern genügt, um bei aktivierten NK-Zellen die Degranulation auszulösen, und die Blockade von NCR mit spezifischen Antikörpern hemmt die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber Targetzellen [70, 76, 107]. Die Expressionsdichte von NCR auf NK-Zellen ist dabei keine starre Größe, sondern kann abhängig von äußeren Einflüssen wie Kontakt zu Tumorzellen, Medikamenten oder bestimmten Proteinen variieren [63, 44, 108, 62]. So verringern zum Beispiel die NK-Zellen von AML-Patienten die Expression der NCR im Krankheitsverlauf, in der Remission ist dies reversibel [30].

### 1.3.2 NKG2D

NKG2D, einer der am besten untersuchten aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren, kommt auf NK-Zellen, manchen T-Lymphozyten und Makrophagen vor [83].

NKG2D ist ein C-Type-Lectin-artiger, homodimerer Rezeptor, der an die MHC-Klasse-I-verwandten Moleküle MICA und MICB, sowie an UL16-bindende Proteine (ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4) bindet (zu MHC-Klasse-I siehe Kapitel 1.4.1). Dabei korreliert der prozentuale Anteil von NKG2D-exprimierenden NK-Zellen des peripheren Blutes gesunder Spender positiv mit ihrer Zytotoxizität gegenüber der Zelllinie K562, die viele NKG2D-Liganden exprimiert [45]. Chronische Bindung von Liganden an NKG2D-Rezeptoren reguliert ihre Expression jedoch herunter [84]. Außerdem korreliert der Plasmaspiegel von bestimmten Zytokinen (TGF-beta1), die von einigen Karzinomen ausgeschüttet werden, negativ mit der Expression von NKG2D auf den NK-Zellen der Patienten [50]. Die NKG2D-Expression der NK-Zellen eines Menschen ist also keine starre Größe, wenngleich sie bei gesunden Menschen eher wenig zu schwanken scheint [62].

Die NKG2D-Liganden werden insbesondere bei Stress (oxidativer, genotoxischer oder virusbedingter Stress) von Zellen exprimiert [99]. Romanski et al. konnten MICA und MICB auf mehreren NK-Zell-unsensiblen B-Vorläufer-ALL-Zelllinien nicht nachweisen, während MICA und MICB auf einer NK-Zell-sensiblen T-ALL-Zelllinie nachweisbar war [86]. Insgesamt ist über die Expression von NKG2D-Liganden auf B-Reihen-ALL-Blasten noch wenig bekannt.

### 1.3.3 CD16

CD16 (FcγRIII) auf NK-Zellen ist für die Antikörper-abhängige zelluläre Toxizität (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) verantwortlich [29, 70]. CD16 bindet spezifisch an die Fc-Teile von IgG-Antikörpern. Dadurch können sogar zuvor ruhende NK-Zellen so stark stimuliert werden, dass die Degranulation ausgelöst wird [16]. Dadurch werden auch Zellen lysiert, die ohne gebundene Antikörper nicht von den NK-Zellen lysiert worden wären.



### 1.3.4 Weitere aktivierende Rezeptoren, sowie Adhäsionsmoleküle

CD226 spielt einerseits eine wichtige Rolle bei der transendothelialen Wanderung von NK-Zellen [70], andererseits ist es aber auch ein aktivierender NK-Zell-Rezeptor. CD226 bindet an CD155 (Poliovirus-Rezeptor, PVR) und CD112 (Nectin-2, PRR 2). Die experimentelle Blockade von CD226 auf NK-Zellen reduziert deren zytotoxische Aktivität gegenüber AML-Blasten, die entsprechende Liganden exprimieren [77]. Auch der aktivierende NK-Zell-Rezeptor CD96 bindet an CD155 und CD112 [66, 33].

CD244 (2B4) und CD48 gehören zu den Immunglobulin-artigen Rezeptoren [97, 2, 77, 51]. Sie kommen beide auf NK-Zellen vor und binden sich gegenseitig. Dabei scheint CD244 die Funktion eines aktivierenden Rezeptors und CD48 die Funktion seines Liganden zu haben. CD48 kommt außerdem auf T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Monozyten vor.

NKp80 ist, wie NKG2D, ein C-Type-Lectin-artiger, homodimerer Rezeptor [46, 109]. NKp80 kommt auf allen menschlichen NK-Zellen und manchen T-Lymphozyten vor und erhöht die Zytotoxizität von NK-Zellen bei Ligandenkontakt. NKp80 bindet an das „activation-induced C-type lectin“ (AICL, CLEC2B), das auf Monozyten, Makrophagen und Granulozyten bekannt ist.

Zunehmend werden auch Studien über die Bedeutung der aktivierenden Killer-Immunglobulin-artigen Rezeptoren (KIR) publiziert, wenngleich die inhibierenden KIR (siehe auch Kapitel 1.4) wesentlich bekannter und besser untersucht sind als die aktivierenden KIR. KIR2DS1, KIR2DS2, KIR3DS1, KIR2DL4, KIR2DS4 und KIR2DS5 gehören zu dieser Gruppe [75, 29]. KIR2DS1 bindet an HLA-Moleküle der Cw4-Gruppe (zur Cw4-Gruppe siehe Kapitel 1.4). KIR2DL4 bindet an HLA-G, kommt auf allen NK-Zellen vor und ist vorwiegend in der Schwangerschaft von Bedeutung. Die Liganden der anderen Rezeptoren sind jedoch unbekannt.

Heterodimere C-Type-Lectin-artige Rezeptoren bestehen aus zwei Rezeptoranteilen (dem NKG2-Anteil und dem CD94-Anteil), die kovalent miteinander verbunden sind [29]. Während NKG2A und NKG2B zu den inhibierenden Rezeptoren gehören, sind NKG2C, NKG2E und NKG2H aktivierende Rezeptoren. CD94/NKG2C bindet wie CD94/NKG2A und -B an HLA-E, die Liganden der anderen beiden Rezeptoren sind unbekannt.

Der aktivierende NK-Zell-Rezeptor namens CD40-Ligand bindet an CD40 auf Targetzellen. Eine starke Expression von CD40 auf B-Vorläufer-ALL-Blasten korrelierte in einer Studie mit einer starken Expression des Apoptose-induzierenden CD95-Rezeptors und mit einer hohen rückfallfreien Überlebensrate [104].

CD69 ist ein weiterer aktivierender Rezeptor, der bei der Lyse von Tumorzellen durch NK-Zellen von Bedeutung ist [29, 27]. Seine Liganden sind noch unklar.

NTB-A ist ein homophiler aktivierender NK-Zell-Rezeptor, er bindet also an gleichartige Rezeptoren [28].

Mithilfe von Adhäsionsmolekülen [45, 29] halten sich Zellen sozusagen gegenseitig fest. Da viele von ihnen bei Adhäsion auch aktivierende Signale in der Zelle generieren, rechnen sie manche Autoren den aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren zu. Deshalb werden sie hier in diesem Kapitel behandelt.

Nach Stimulierung durch Interleukin 2 vermehren NK-Zellen die Expression der meisten Adhäsionsmoleküle [20].

Das Adhäsionsmolekül CD56 ist eine Isoform des menschlichen Neural-cell-adhesion-molecule. An seiner Expressionsdichte kann man verschiedene Untergruppen von NK-Zellen unterscheiden: Während sich in den Lymphknoten viele vorwiegend Zytokin-produzierende NK-Zellen finden, die CD56 stark exprimieren, exprimieren die meisten NK-Zellen des peripheren Blutes nur wenig CD56 (siehe auch Kapitel 1.1).

Weitere wichtige Adhäsionsmoleküle sind die Gruppe der „intercellular adhesion molecules“ (ICAM) ICAM-1, -2 und -3, sowie die Gruppe der „lymphocyte function-associated antigens“ (LFA) LFA-1, -2 und -3 [20, 57, 43]:

- Zytotoxische NK-Zellen exprimieren LFA-1. LFA-1 besteht aus den zwei assoziierten Untereinheiten CD11a und CD18. LFA-1 bindet an ICAM1 (CD54), ICAM2 (CD102) und ICAM3 (CD50) und polarisiert bei Bindung die Zelle, was dann die Degranulation, z.B. bei Aktivierung von CD16, erst möglich macht [70].
- LFA-2 (CD2) bindet an CD15, CD48, LFA-3 (CD58) und CD59.
- LFA-3 (CD58) bindet an LFA-2.
- ICAM-1 (CD54) bindet an LFA-1 und Mac-1a.
- ICAM-2 (CD102) bindet an LFA-1.
- ICAM-3 (CD50) bindet an LFA-1.

Viele dieser Adhäsionsmoleküle kommen außer auf NK-Zellen auch auf anderen Leukozyten, sowie potentiellen Targetzellen einschließlich Leukämiezellen vor.

## **1.4 Inhibierende NK-Zell-Rezeptoren und ihre Liganden**

Hier wird nur auf die NK-Zell-Rezeptoren eingegangen, die dem Zell-Zell-Kontakt dienen. Andere inhibierende NK-Zell-Rezeptoren, wie z. B. Zytokinrezeptoren, werden hier nicht behandelt.

<b>Killer-Immunglobulin-Like-Receptors:</b> KIR2DL1 KIR2DL2, KIR2DL3 KIR2DL5 KIR3DL1 KIR3DL2 KIR3DL7	HLA-Cw4-Gruppe HLA-Cw3-Gruppe unbekannt HLA-Bw4-Gruppe HLA-A3, HLA-A11 unbekannt
<b>C-Type-Lectin-Receptors:</b> CD94/NKG2A/B	HLA-E
<b>Immunglobulin-like Transcripts:</b> ILT-2 (LIR-1)	Verschiedene HLA-Klasse-I
CD161 (NKR-P1A)	LLT1

#### 1.4.1 Killer-Immunglobulin-artige Rezeptoren (KIR)

Die inhibierenden Killer-Immunglobulin-artigen Rezeptoren (KIR) spielen eine besonders wichtige Rolle bei der Regulation der zytotoxischen NK-Zell-Aktivität.

Die Mehrzahl dieser inhibierenden NK-Zell-Moleküle bindet an verschiedene MHC-Klasse-I-Moleküle. MHC steht für „major histocompatibility complex“ und bezeichnet eine Gruppe von membranösen Glycoproteinen (genaugenommen eigentlich die kodierenden Gene), die Peptide von Pathogenen präsentieren, um die T-Zell-Antwort zu initiieren [43]. Dabei sind MHC-Klasse-I-Moleküle vorwiegend für die Präsentation von viralen Peptiden zuständig. MHC-Moleküle

zeigen eine hohe Variabilität, da sie polygen und polymorph sind, was sie im Kampf gegen Pathogene besonders effektiv macht. Beim Menschen werden die entsprechenden Gene als „human leukocyte antigen“ (HLA) bezeichnet. Beim Menschen gibt es drei verschiedene HLA-Klasse-I- $\alpha$ -Ketten-Gene, die als HLA-A, HLA-B und HLA-C bezeichnet werden.

HLA-Klasse-I-Moleküle werden vermutlich von allen gesunden menschlichen Zellen exprimiert. Dadurch sind diese Zellen vor der Lyse durch NK-Zellen geschützt [70]. Der Verlust der Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen durch Infektion oder maligne Transformation kann zur NK-Zell-Aktivierung führen, wie schon lange bekannt ist („missing self hypothesis“). Heute geht man jedoch davon aus, dass NK-Zellen nur aktiv werden, wenn auch Liganden für aktivierende Rezeptoren auf einer Zelle vorhanden sind („induced self hypothesis“) [110]. Vermutlich werden deshalb nicht-hämatopoetische Zellen von allogenen NK-Zellen nicht angegriffen (siehe unten).

Die Gruppe der inhibierenden KIR umfasst Rezeptoren für HLA-A, -B und -C. Die polymorphen HLA-Klasse-I-kodierten Moleküle kann man dabei in HLA-Gruppen von Molekülen zusammenfassen, die alle an den gleichen Rezeptor binden. Folgende KIR-HLA-Zuordnungen sind bekannt [89, 21, 31]:

- Der NK-Zell-Rezeptor KIR2DL1 (CD158a) bindet Moleküle der HLA-Cw4-Gruppe.
- Die NK-Zell-Rezeptoren KIR2DL2 und KIR2DL3 (CD158b) binden Moleküle der HLA-Cw3-Gruppe.
- Der NK-Zell-Rezeptor KIR3DL1 (CD158e) bindet Moleküle der HLA-Bw4-Gruppe.
- Der NK-Zell-Rezeptor KIR3DL2 bindet HLA-A3 und HLA-A11.

Zwei weitere KIR dieser Gruppe sind KIR2DL5 und KIR3DL7, deren Liganden noch unbekannt sind [29].

Der HLA- und der KIR-Genotyp der NK-Zellen eines Menschen werden getrennt vererbt [29]. Zytotoxische NK-Zellen exprimieren jedoch normalerweise immer mindestens einen inhibierenden KIR für HLA-Moleküle, die auch die gesunden Zellen des eigenen Körpers exprimieren. So sind diese vor der Lyse durch NK-Zellen geschützt. Es gibt zwar bei jedem Menschen auch NK-Zellen, die keinen inhibierenden KIR exprimieren, diese scheinen jedoch deshalb nicht gefährlich zu sein, weil sie nicht zytotoxisch aktiv sind [70].

Erhält nun im Rahmen der HLA-nichtidentischen Stammzelltransplantation (SZT) ein Mensch NK-Zellen eines anderen Menschen, so kann dabei ein sogenanntes KIR-Mismatch auftreten. Von einem KIR-Mismatch in Spender-Empfänger-Richtung spricht man, wenn es allogene (also von einem anderen Menschen stammende) NK-Zellen gibt, die KIR exprimieren, für die die Zellen des Empfängers keine Liganden exprimieren. Diese NK-Zellen können dann also nicht über KIR gehemmt werden und werden als alloreaktiv bezeichnet.

Beim KIR-Mismatch kann man das sogenannte „Ligand-Ligand-Modell“ [89] vom sogenannten „Rezeptor-Ligand-Modell“ [52] unterscheiden. Sie unterscheiden sich, vereinfacht gesagt, dadurch, dass beim Ligand-Ligand-Modell vom HLA-Typ des Spenders auf die KIR geschlossen wird, die seine NK-Zellen exprimieren, während beim Rezeptor-Ligand-Modell die KIR-Expression der NK-Zellen des Spenders direkt untersucht wird. Letzteres Modell erlaubt präzisere Vorhersagen des therapeutischen Nutzens von NK-Zellen (Kapitel 1.6.4).

Alloreaktive NK-Zellen können häufig Leukämiezellen lysieren, die von den autologen (also körpereigenen) NK-Zellen nicht lysiert werden, weil deren HLA-Moleküle über KIR die NK-Zellen hemmen. Lysieren alloreaktive NK-Zellen Leukämiezellen, so wird dies als „Graft-Versus-Leukemia“-Effekt (GVL) bezeichnet. Interessanterweise können bei der HLA-nichtidentischen Stamm-

zelltransplantation NK-Zellen einen GVL aufweisen, ohne jedoch zur sogenannten „Graft Versus Host Disease“ (GVHD) beizutragen [69]. Mit GVHD ist gemeint, dass Spenderzellen Empfängerzellen als fremd erkennen und angreifen. Hierfür sind vor allem T-Lymphozyten verantwortlich, z. B. bei der Abstoßungsreaktion. NK-Zellen erkennen nur hämatopoetische Zellen als „fremd“, diese haben aber nach SZT idealerweise alle den HLA-Typ des Spenders. Alle anderen Körperzellen, die ja dann einen anderen HLA-Typ aufweisen als die NK-Zellen, greifen diese nicht an. Dies liegt am ehesten daran, dass nicht-hämatopoetische Zellen keine Liganden für aktivierende NK-Zell-Rezeptoren exprimieren.

#### **1.4.2 C-Type-Lectin-artige Rezeptoren**

Die heterodimeren C-Type-Lectin-artigen Rezeptoren CD94/NKG2A und CD94/NKG2B binden an HLA-E. HLA-E gehört zu den HLA-Klasse-IB-Molekülen und ist im Vergleich zu den klassischen HLA-Klasse-I-Molekülen (HLA-A, HLA-B, HLA-C) wesentlich weniger polymorph [69]. Bindung von HLA-E an CD94/NKG2A wirkt stark inhibierend auf NK-Zellen. CD94/NKG2A wird insbesondere von NK-Zellen in Lymphknoten stark exprimiert. Dies könnte ein Mechanismus sein, reifende NK-Zellen in Lymphknoten davon abzuhalten, körpereigene gesunde Zellen zu attackieren, während die KIR zur Funktionsfähigkeit entwickelt werden [70].

#### **1.4.3 Leukocyte-Immunoglobulin-artiger Rezeptor 1 (LIR-1)**

Der inhibierende Leukocyte-Immunoglobulin-artige Rezeptor 1 (LIR-1, ILT2) bindet an verschiedene Moleküle der HLA-Klasse I [16, 20]. Er ist mit den KIR verwandt. Er bindet außerdem an das virale Protein „UL18“ des Cytomegalie-

Virus. Für UL18 hat der Rezeptor eine wesentlich größere Affinität als für HLA-Klasse I.

#### **1.4.4 CD161 (NKR-P1A)**

Alle NK-Zellen des peripheren Blutes und manche T-Zellen exprimieren den Rezeptor CD161 (NKR-P1A) [56, 1, 78, 45]. Er wurde lange am ehesten für einen aktivierenden Rezeptor gehalten, dessen genaue Funktion allerdings noch nicht bekannt war. Heute weiß man, dass er an das Lecin-artige Transcript 1 (LLT1) bindet. Dadurch scheint er die Zytotoxizität von NK-Zellen zu hemmen. Seine Funktion bleibt jedoch umstritten.

## **1.5 Die akuten Leukämien der B-Zell-Reihe im Kindesalter**

Die Chronische Lymphatische Leukämie der B-Zell-Reihe ist die beim Menschen insgesamt am weitesten verbreitete Leukämieform. An ihr erkranken vorwiegend Erwachsene jenseits der Lebensmitte, bei Kindern tritt sie sehr selten auf. Die Akute Lymphatische Leukämie (oder Akute Lymphoblastische Leukämie) der B-Zell-Reihe (B-Reihen-ALL) ist die häufigste Leukämieform bei Kindern und Jugendlichen [112]. Diese Arbeit bezieht sich vorwiegend auf die kindliche B-Reihen-ALL, die etwa 85 % der Inzidenz von Kindern an Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL) ausmacht.

Schrappé et al. summieren in dem Standardwerk „Pädiatrische Hämatologie und Onkologie“ [92]:

„Die akute lymphoblastische Leukämie ist die häufigste Krebserkrankung bei Kindern und Jugendlichen. Die Entwicklung der intensiven Polychemotherapie



seit Anfang der 70er Jahre und die konsequente Mitbehandlung der sogenannten Extrakompartimente (in erster Linie des Zentralnervensystems) hat zu der entscheidenden Verbesserung der Heilungsrate geführt. Neue präzise Methoden zur Bestimmung der In-vivo-Therapieresistenz erlauben eine zuverlässigere Aussage zur Prognose als die meisten Parameter zum Zeitpunkt der Diagnose. Das bessere Verständnis der Biologie der Leukämiezelle lässt Rückschlüsse auf die Pathogenese zu, trägt aber auch zur Entwicklung spezifischer Therapieansätze bei. Trotz aller Fortschritte ist die erste Behandlung bei einem Viertel der Kinder nicht erfolgreich. Darüber hinaus ist die derzeit verfügbare Therapie durch die Therapiedauer und durch einzelne, teilweise schwerwiegende und unerwartete Nebenwirkungen sehr belastend.“

B-Reihen-ALL entsteht, wenn sich entartete B-Lymphozyten oder ihre Vorläuferzellen, sogenannte B-Lymphoblasten, unnatürlich stark vermehren. Meist stammen bei einem Patienten alle Leukämiezellen von derselben entarteten Ursprungszelle ab. Wahrscheinlichste Ursachen dafür sind nach heutigem Kenntnisstand spontane somatische Mutationen oder präexistierende Keimbahnmutationen. Kinder mit konstitutionellen chromosomalen Abberationen, wie der Trisomie 21, haben ein erhöhtes Erkrankungsrisiko [92].

Das Erkrankungsrisiko ist im Alter von zwei bis vier Jahren am höchsten. Insgesamt erkranken an der ALL ca. 3,3 von 100.000 Menschen unter 15 Jahren, davon circa 85 % an B-Reihen-ALL. Davon wiederum geht die Leukämie nur in etwa 2 % der Fälle von reifen B-Lymphozyten aus, während sie in etwa 98 % der Fälle von B-Vorläuferzellen ausgehen [112, 92]. Die Zahlen variieren deutlich zwischen einzelnen Bevölkerungsgruppen, die Gründe sind noch nicht abschließend geklärt. In Deutschland werden die meisten Neuerkrankungen im Deutschen Kinderkrebsregister erfasst und können so statistisch ausgewertet werden.

Die B-Reihen-ALL kann entsprechend der sogenannten EGIL-Klassifikation nach dem Reifungsgrad der entarteten Zellen in weitere Untergruppen unterteilt

werden [8]. In der Reihenfolge von der unreifsten zur reifsten Zelle werden unterschieden:

- B I (pro-B-ALL)
- B II (c-ALL)
- B III (prä-B-ALL)
- B IV (B-ALL)

Unbehandelt ist die Prognose der ALL infaust: Sie führt innerhalb weniger Monate zum Tod, da die Leukämiezellen die Blutbildung im Knochenmark und andere Organe zerstören. Während man jedoch noch vor 50 Jahren kaum Behandlungsmöglichkeiten hatte, kann man heute etwa 80 % der erkrankten Kinder remissionsfrei heilen [14].

Die Inhalte der folgenden Abschnitte entstammen der Interdisziplinären Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie [91].

Leitsymptome der ALL-Erkrankung sind Symptome der Knochenmarkinsuffizienz (Blässe, Abgeschlagenheit, Blutungsneigung, Infektzeichen) sowie Hepatosplenomegalie und vergrößerte Lymphknoten. Bei ca. 20 % der Patienten fallen Knochen- oder Gelenkschmerzen auf, weitere Hinweise können indolente, einseitige Hodenschwellung, Hautinfiltrate oder Gingivahyperplasie sein. Kopfschmerzen oder Hirnnervenausfälle können auf Befall des Zentralen Nervensystems (ZNS) hinweisen.

Die Initialdiagnostik dient neben der Diagnosesicherung der möglichst präzisen Abschätzung des Rezidivrisikos. Dafür relevant sind unter anderem die initiale Leukämiezellmasse, das Ausmaß des Organbefalls (insbesondere ZNS), die Morphologie, der Immunphänotyp und zytogenetische Merkmale der Leukämiezellen. Zur Diagnostik werden in der Regel periphere Blutentnahme,

Knochenmarkspunktion und Liquorpunktion in besonders qualifizierten Referenzzentren durchgeführt.

Der Immunphänotyp ist für die Unterscheidung der einzelnen ALL-Subtypen relevant (B I bis B IV, siehe oben). Zytogenetisch relevant sind insbesondere das sogenannte „Philadelphia-Chromosom“ mit der t(9;22)-Translokation, das mit einer besonders ungünstigen Prognose assoziiert ist, oder die t(12;21)-Translokation, die mit einer besonders günstigen Prognose assoziiert ist.

Die Therapie erfolgt in Deutschland nach bestimmten Therapieprotokollen, denen die Patienten unter Berücksichtigung verschiedener prognostischer Faktoren zugeteilt werden. Dabei enthalten alle Therapieprotokolle die Chemotherapie, manche enthalten zusätzlich Bestrahlungen und/oder die Stammzelltransplantation. Zusätzlich sind bei Bedarf supportive Therapien wie Bluttransfusion, Infekttherapie oder Schmerztherapie erforderlich. Außerdem müssen die Patienten nach bestimmten Kriterien engmaschig überwacht werden. Auch die psychosoziale Betreuung ist Bestandteil der Therapie.

Zur Verlaufsdagnostik werden Differentialblutbilder und Knochenmarks-ausstriche erstellt und bewertet. Eine zunehmende Rolle spielen außerdem neue diagnostische Methoden der sogenannten minimalen Resterkrankungen (MRD), da diese ein erhebliches Rückfallrisiko darstellen. Außerdem sind regelmäßige Untersuchungen der Organfunktionen notwendig, um Schädigungen frühzeitig zu entdecken. Akute Notfallsituationen wie z. B. Sepsis können auftreten und müssen adäquat behandelt werden.

## **1.6 NK-Zell-basierte Therapien der B-Reihen-ALL**

Es gehört zu den physiologischen Aufgaben von NK-Zellen, entartete Zellen zu erkennen und zu eliminieren, bevor diese sich unkontrolliert vermehren können.

Potentiell gefährlich entartete Zellen mit Vermehrungspotential entstehen bei jedem Menschen häufig, sie werden jedoch meistens von der körpereigenen Immunabwehr erfolgreich bekämpft. Kommt es zur Erkrankung an Leukämie, so hat diese Immunabwehr bereits versagt. Es liegt dann die Frage nahe, warum die Leukämiezellen von den NK-Zellen nicht eliminiert wurden, und wie man diese Erkenntnisse für die Therapie nutzen kann. Ziele können hier liegen in:

- a) der Prävention: Gibt es Hinweise auf Menschen, deren NK-Zellen besonders unzuverlässig bei der Verhinderung einer Leukämie sind? Kann man vorbeugen oder durch Früherkennung die Behandlung optimieren?
- b) der Therapie: Kann man autologe oder allogene NK-Zellen dafür einsetzen, Leukämiezellen wirksam zu bekämpfen?
- c) der Rückfallprophylaxe: Können NK-Zell-basierte Therapien bei Leukämiepatienten das Rückfallrisiko senken, insbesondere bei Patienten mit besonders hohem Rückfallrisiko, wie bei MRD höherer Ausprägung?

Hierzu wurden in den letzten zehn Jahren bahnbrechende neue Erkenntnisse veröffentlicht, wenngleich noch viele Fragen offen sind.

Es gibt verschiedene Mechanismen, die dazu führen, dass Leukämiezellen von NK-Zellen nicht eliminiert werden. Häufig liegen auch mehrere Mechanismen kombiniert vor. Bei den verschiedenen Leukämieformen scheinen dabei verschiedene Mechanismen besonders relevant. Ihre Kenntnis ist entscheidend, um spezifische Therapien entwickeln zu können.

Wie bereits erwähnt, wird die Aktivität von NK-Zellen durch ein differenziert geregeltes Gleichgewicht aus der Aktivität von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren gesteuert. Dabei variiert sowohl die Expression der Rezeptoren auf den NK-Zellen als auch die Expression ihrer Liganden auf den Targetzellen. Wird eine Leukämiezelle nicht lysiert, so kann dies daran liegen, dass sie

besonders viele Liganden für inhibierende NK-Zell-Rezeptoren exprimiert, oder daran, dass sie besonders wenige oder keine Liganden für aktivierende NK-Zell-Rezeptoren exprimiert. Es kann aber auch daran liegen, dass die NK-Zellen, die mit der Leukämiezelle in Kontakt kommen, besonders viele inhibierende Rezeptoren exprimieren, für die es entsprechende Liganden auf der Leukämiezelle gibt, oder daran, dass diese NK-Zellen besonders wenige aktivierende Rezeptoren exprimieren, für die es Liganden auf der Leukämiezelle gibt. Der Grund kann auch sein, dass die Leukämiezelle bestimmte Adhäsionsmoleküle gering oder gar nicht exprimiert. Da Adhäsionsmoleküle notwendig sind, um eine Verbindung zwischen NK-Zelle und Targetzelle herzustellen, könnte dies ebenfalls die Lyse vermindern. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die betreffenden NK-Zellen eine besonders niedrige Grundaktivität aufweisen, was verschiedene Gründe haben kann. Es besteht auch noch die Möglichkeit, dass die betreffenden NK-Zellen die Leukämiezelle zwar als Targetzelle erkennen und zu lysieren versuchen, dass die Leukämiezelle jedoch immun gegen die Lysemechanismen der NK-Zellen ist. Insbesondere unmittelbar während oder nach Chemotherapie gibt es schließlich zusätzlich die Möglichkeit, dass der betroffene Mensch insgesamt zu wenige zytotoxisch aktive NK-Zellen besitzt.

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick gegeben über aktuelle Ansatzpunkte, die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber B-Reihen-ALL-Blasten zu steigern, um sie für die Leukämie-therapie zu nutzen.

### **1.6.1 Ansatzpunkt: Liganden von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren auf Blasten**

Die Bedeutung der Expressionsdichte von Liganden aktivierender NK-Zell-Rezeptoren auf B-Reihen-ALL-Blasten wird kontrovers diskutiert. Romanski et al. veröffentlichten 2004 eine Studie [86], der zufolge inhibierende NK-Zell-

Rezeptoren und deren Liganden nicht für die häufig geringe Empfindlichkeit der B-Reihen-ALL-Blasten gegenüber NK-Zellen verantwortlich sind. Sie zeigten auch, dass die Moleküle MICA und MICB, die Liganden des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors NKG2D darstellen, von den schlecht lysierbaren Blasten nicht exprimiert wurden. Sie vermuteten deshalb, dass eine geringe oder fehlende Expression von Liganden aktivierender NK-Zell-Rezeptoren für deren geringe NK-Zell-Empfindlichkeit verantwortlich ist. Im Gegensatz dazu stehen mehrere Studien, die zeigen, dass die NK-Zell-Sensibilität von B-Reihen-ALL-Blasten in erster Linie von der Expressionsdichte der Liganden von inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren und der Expression solcher Rezeptoren auf den NK-Zellen abhängt (siehe Kapitel 1.6.2 und 1.6.4).

Verabreicht man Leukämiepatienten spezielle spezifische Antikörper, die an die Leukämiezellen binden, so können diese an den aktivierenden Rezeptor CD16 auf der NK-Zelle binden und zur Aktivierung der NK-Zelle beitragen (ADCC, siehe auch Kapitel 1.3). Ein Beispiel für die klinische Anwendung ist der CD20-Antikörper Rituximab, der bei der Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen bereits erfolgreich eingesetzt wird [71]. Allerdings ist seine Einsatzmöglichkeit bei B-Reihen-Leukämien dadurch begrenzt, dass viele Leukämiezellen CD20 nicht exprimieren. Außerdem entwickeln viele Leukämiezellen Resistenzen gegen den Mechanismus, oder die Therapie ist aus weiteren Gründen nicht wirksam. Einen ähnlichen Ansatz verfolgt der Einsatz von CD19-4G7-chimären Antikörpern, die in vitro die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber B-Reihen-ALL-Blasten deutlich erhöhen [48].

Bislang gibt es nur sehr begrenzte Daten zur Expression von Liganden aktivierender NK-Zell-Rezeptoren auf B-Reihen-ALL-Blasten, vieles ist noch unklar.

### **1.6.2 Ansatzpunkt: Liganden von inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren auf Blasten**

HLA-Klasse-I-Moleküle sind nach heutigem Kenntnisstand die wichtigsten Liganden für inhibierende NK-Zell-Rezeptoren. Ihre Expressionsdichte auf B-Reihen-ALL-Blasten korreliert negativ mit deren Empfindlichkeit gegenüber der Lyse durch NK-Zellen [31, 80]. Durch Blockade der HLA-Klasse-I-Moleküle auf den Blasten kann in vitro die Lyse der Blasten durch die NK-Zellen signifikant gesteigert werden.

Für die Therapie der kindlichen B-Reihen-ALL ist es also wichtig zu wissen, ob die Blasten des betreffenden Patienten eine hohe oder niedrige Expressionsdichte der HLA-Klasse-I-Moleküle zeigen. So kann die Effektivität von zur Therapie eingesetzten NK-Zellen abgeschätzt werden. Die Therapie kann dann gegebenenfalls mit weiteren Methoden optimiert werden.

### **1.6.3 Ansatzpunkt: Aktivierende NK-Zell-Rezeptoren**

Über die Bedeutung aktivierender NK-Zell-Rezeptoren für die Therapie von B-Reihen-ALL ist insgesamt noch wenig bekannt. Fauriat et al. zeigten 2007 [30], dass die zytotoxischen NK-Zellen von Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie (AML) während der Erkrankung die Expression der aktivierenden NCR herunterregulieren, was in der Remission jedoch reversibel ist. Dieser Effekt könnte also von den AML-Blasten induziert werden. Gleichzeitig korrelierte in dieser Studie eine geringe Expression der aktivierenden NCR mit schlechten Überlebensraten. Für die B-Reihen-ALL fehlen bislang entsprechende Untersuchungen.

Pende et al. beschrieben 2009 einen aktivierenden KIR (KIR2DS1) auf NK-Zellen von B-Reihen-ALL-Patienten [75], dessen Blockade die Lyse von bestimmten Blasten deutlich vermindert. Giebel et al. beschrieben 2009 die

Bedeutung mehrerer aktivierender KIR (KIR2DS1, KIR2DS3, KIR2DS5) bei der allogenen Stammzelltransplantation [36]: Exprimierten die NK-Zellen der Spender bestimmte solche Rezeptoren, während die eigenen NK-Zellen des Empfängers diese nicht exprimierten, so bestand ein erhöhtes Risiko für GVHD und Rezidiv. Sie schlagen vor, dies bei der Spenderauswahl zu berücksichtigen.

Altvater et al. beschrieben 2009 die genetische Modifikation von NK-Zellen [2], die von gesunden Spendern und pädiatrischen B-Reihen-ALL-Patienten (B-Vorläufer-Zell-ALL) gewonnen worden waren. Sie integrierten einen chimären Rezeptor mit Anteilen von CD19, CD244 und dem T-Zell-Rezeptor zeta in diese NK-Zellen. Blasten der CD19-positiven ALL-Zelllinie „REH“ wurden von so veränderten NK-Zellen viel besser lysiert als von unveränderten NK-Zellen. Diese Methode könnte in Zukunft bis zur klinischen Anwendbarkeit weiterentwickelt werden.

#### **1.6.4 Ansatzpunkt: Inhibierende NK-Zell-Rezeptoren**

Die wichtigsten inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren sind nach heutigem Kenntnisstand die inhibierenden Killer-immunoglobulin-like receptors (KIR). Ihre große Bedeutung für die NK-Zell-Sensibilität von B-Reihen-ALL-Blasten wurde in mehreren Studien gezeigt [105, 31, 75, 80]. Dabei exprimieren die NK-Zellen verschiedener Menschen nicht alle die gleichen KIR. Besteht bei allogenen NK-Zellen ein sogenanntes „KIR-mismatch“ in Spender-Empfänger-Richtung, (siehe Kapitel 1.4), so gibt es NK-Zellen, die nur KIR exprimieren, für die die betreffenden Blasten keine Liganden aufweisen. Diese NK-Zellen lysieren die entsprechenden Blasten dann besonders gut und werden deshalb als „alloreaktiv“ bezeichnet. Bei der haploidentischen Stammzelltransplantation (SZT) wurde bei bestehendem KIR-Mismatch zwischen Spender und Empfänger ein niedrigeres Rückfallrisiko beobachtet als ohne KIR-Mismatch, wobei



noch lange nach der SZT NK-Zellen mit dem Phänotyp der Spender im Blut der Empfänger nachweisbar waren. Dies ist eine wertvolle Erkenntnis, da Rezidive die häufigste Todesursache nach SZT bei B-Reihen-ALL sind. Bei der haploidentischen SZT werden Spender wenn möglich heute schon entsprechend ausgewählt. Denkbar wäre außerdem eine Anzucht von alloreaktiven NK-Zellen, die dann therapeutisch transfundiert werden könnten.

### **1.6.5 Ansatzpunkt: Grundaktivität der NK-Zellen**

In der Umgebung vieler Tumore liegt eine erhöhte Konzentration von Zytokinen vor, die die Aktivität von NK-Zellen senken [50]. Auch ALL-Blasten könnten diesen Mechanismus anwenden, um der NK-Zell-Lyse zu entkommen, jedoch ist darüber bislang nichts bekannt.

Zur Stimulierung von NK-Zellen wird Interleukin 2 (IL 2) in vitro und in vivo bereits erfolgreich eingesetzt [29, 65].

### **1.6.6 Ansatzpunkt: Lysemechanismen der NK-Zellen**

Es gibt Zellen, die gegen die zytotoxischen Proteine von NK-Zellen resistent sind. So zeigten Hasenkamp et al. 2006 [38], dass Zellen der Zelllinie SupB15, die von kindlichen B-Vorläufer-ALL-Blasten abstammt, zum Teil resistent gegen den Inhalt der zytotoxischen NK-Zell-Lysosomen waren. Außerdem sind Blasten mit MLL-Rearrangement (siehe Kapitel 5.5.5) häufig resistent gegen die Lyse-Induktion mittels Fas-Mechanismus oder TNF [42]. Hier gilt es, Wege zu finden, um diese Resistenzen zu umgehen.

### **1.6.7 Ansatzpunkt: Insgesamt zu wenige NK-Zellen**

Die Immunsuppression ist eine gefährliche Nebenwirkung der Chemotherapie in der Leukämiebehandlung, insbesondere nach der intensivierten Chemotherapie vor Stammzelltransplantation. NK-Zellen spielen hier eine wichtige Rolle, da sie sich vor den B- und T-Lymphozyten erholen und lebensbedrohliche Infektionen verringern. Frühe Regeneration von NK-Zellen korreliert mit besseren Überlebensraten und geringeren Rückfallquoten nach SZT bei Kindern mit hämatologischen Erkrankungen [103]. Werden zur Stammzelltransplantation T- und B-Zell-depletierte Transplantate anstatt positiv-angereicherter Stammzellen verwendet, wird eine große Anzahl von vitalen Spender-NK-Zellen mit transfundiert [49]. Bei geeigneter Spenderauswahl können sie verbliebene Leukämiezellen bekämpfen (siehe auch Kapitel 1.6.4), aber auch die Gefahr einer GVHD reduzieren, zum Engraftment der Stammzellen beitragen und die Infektionsgefahr reduzieren.

Die NK-Zellen von pädiatrischen Patienten mit B-Reihen-ALL können, wie die von gesunden Spendern, effizient angereichert, in vitro angezüchtet, genetisch verändert und/oder stimuliert werden [2, 34, 52]. Auch aus Nabelschnurblut und hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark kann man zytotoxisch aktive NK-Zellen anzüchten [6, 22]. Dies könnte in Zukunft dazu genutzt werden, autologe oder allogene NK-Zellen zu vermehren und so zu verändern oder auszuwählen, dass sie die jeweiligen Blasten besonders gut eliminieren können. Sie könnten dann zu therapeutischen Zwecken genutzt werden.

### **1.6.8 Wechselwirkungen**

Zunehmend werden nun auch Wechselwirkungen publiziert, die beim Einsatz von NK-Zell-basierten Therapien auftreten können. So beeinflussen mesenchymale Stammzellen und NK-Zellen sich gegenseitig [98].

Cyclosporin A, das häufig zur Prophylaxe der GVHD eingesetzt wird, verändert ebenfalls Phänotyp und Funktion von NK-Zellen [108]. Antithymocytin-Globulin (ATG) kann zur Lyse von NK-Zellen führen [52]. Nicht zuletzt können körpereigene NK-Zellen, die die Chemotherapie überlebt haben, nach SZT zur Abstoßung des Transplantates führen [101].

## 1.7 Fragestellung

Ziel der Arbeit war es, neue Erkenntnisse über die Bedeutung zu gewinnen, die verschiedene aktivierende und inhibierende NK-Zell-Rezeptoren für die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen haben, wenn diese NK-Zellen mit leukämischen Blasten der B-Zell-Reihe in Kontakt kommen. Dazu wurden zunächst kryokonservierte B-Reihen-ALL-Blasten von 23 Leukämiepatienten der Universitäts-Kinderklinik Tübingen auf die Expression von verschiedenen Liganden solcher Rezeptoren hin untersucht. Hierfür diente die Analyse mithilfe eines FACS-Gerätes (FACS = fluorescence activated cell sorter). Anschließend wurden Blasten von einem Teil der Patienten in Zytotoxizitätstests mit angereicherter NK-Zellen freiwilliger gesunder Spender zusammengebracht. Dabei sollte der Vergleich der zytotoxischen NK-Zell-Aktivität bei Blockade von Rezeptoren oder Liganden mit der zytotoxischen NK-Zell-Aktivität ohne eine solche Blockade Informationen über die funktionelle Bedeutung von Rezeptor-Ligand-Paaren liefern.

Da sich während der Durchführung der Experimente herausstellte, dass über die Expression von NKG2D-Liganden mithilfe von FACS-Analysen und bislang etablierten Auswertungsmethoden keine zufriedenstellenden Aussagen möglich waren, wurde außerdem eine neue Auswertungsmethode der Qualitativen FACS-Analyse entwickelt.

# 2 Material

## 2.1 Geräte und Software

FACSCalibur Angeschlossene Hardware Auswertungsprogramm CellQuest	Becton Dickinson Apple Becton Dickinson
Victor 1420 Multilabel Counter Angeschlossene Hardware Software Wallac 1420 Workstation	Wallac Compaq Wallac
Blutanalysegerät: Cellcounter Advia 120	Bayer
Brutschrank Hera cell	Heräus
Beheizbares Wasserbad	Köttermann
Sterile Werkbank Hera safe	Heräus
Ultraschallentgaser Sonorex, Super RK 106	Bandelin

Laborzentrifugen: <ul style="list-style-type: none"><li>• Rotixa 50 RS</li><li>• Rotixa RP</li></ul>	Hettich Hettich
Pipettiergerät Pipettboy	Tecnomara
Verstellbare Pipetten (Pipetman) <ul style="list-style-type: none"><li>• Einzel</li><li>• Multi</li></ul>	Gilson Gilson
Vario MACS (Magnetsäule)	Miltenyi Biotec
MLC – 1 Handmagnet	Dynal
Lichtmikroskop	Zeiss
Inversionsmikroskop	Olympus
Neubauer Zählkammer	Brandt
Sonifier Cell Disruptor B-12	Branson Sonic Power
Rüttler Titramax 100	Heidolph
Vortexer VF 2	Janke & Kunkel

## 2.2 Glas-, Plastik- und Metall-Material

Gewebekulturflaschen 250 ml	Costar
PPN-Röhrchen, steril, 15 ml, 50 ml	Greiner
Analyseröhrchen, 5 ml, Rundboden	Becton Dickinson
Reaktionsgefäße, steril 1,5 ml	Eppendorf
Mikrotitrierplatten, U-Form, F-Form	Greiner
Spritzen, steril, 10 ml, 20 ml, 50 ml	Braun
Butterfly-Kanülen	Abbott
Sterile Plastikpipetten (1, 5, 10, 25 ml)	Costar
Pipettenspitzen	Gilson
Separationssäulen	Miltenyi Biotec
Deckgläser	Menzel
Einmal-Handschuhe	Safeskin

## 2.3 Stammlösungen

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

## 2.4 Sonstige Reagentien und Substanzen

QIFIKIT	Dako
BATDA-Ligand	Perkin Elmer
Europium-Lösung	Perkin Elmer
Ficoll	Seromed
Phosphat buffered saline (PBS)	Gibco
Lyse-Puffer	Wallac
Interleukin 2 (IL 2)	Universitätsapotheker
Polyglobin 5 %	Bayer
Heparin: Liquemin	Roche
Trypsin	Biochem
Trypanblau (0,4 %)	Sigma



## 2.5 Antikörper und lösliche Rezeptormoleküle

Antigen	Subtyp	Markierung	Hersteller
Mix (Kontrolle)	IgG1	unmarkiert	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AG Steinle, Tübingen</li> <li>• Becton Dickinson</li> </ul>
Mix (Kontrolle)	IgG2a	unmarkiert	Becton Dickinson
Mix (Kontrolle)	IgG2b	unmarkiert	AG Steinle, Tübingen
Mix (Kontrolle)	IgG1	FITC	Becton Dickinson
Mix (Kontrolle)	IgG2a	PE	Becton Dickinson
Mix (Kontrolle)	IgG2a	PerCP	Becton Dickinson
Mix (Kontrolle)	IgG1	APC	Becton Dickinson
MICA	IgG1	unmarkiert	AG Steinle, Tübingen
MICB	IgG1	unmarkiert	AG Steinle, Tübingen
MICA+B	IgG1	unmarkiert	AG Steinle, Tübingen
ULBP1	IgG1	unmarkiert	AG Steinle, Tübingen

ULBP2	IgG1	unmarkiert	AG Steinle, Tübingen
ULBP3	IgG1	unmarkiert	AG Steinle, Tübingen
NKp30-Molek.	Fc-Chimera	unmarkiert	R&D Systems
NKp44-Molek.	Fc-Chimera	unmarkiert	R&D Systems
NKp46-Molek.	Fc-Chimera	unmarkiert	R&D Systems
NKG2D-Molek.	Fc-Chimera	unmarkiert	R&D Systems
NKp30	IgG1	PE	Beckman Coulter
NKp44	IgG1	PE	Beckman Coulter
NKp46	IgG1	PE	Beckman Coulter
NKG2D	IgG1	APC	R&D Systems
HLA-ABC (W6/32)	IgG2a	unmarkiert	Dako
HLA-E	IgG1	unmarkiert	Biozol

CD11a	IgG2a	FITC	Becton Dickinson
CD50	IgG2b	FITC	Becton Dickinson
CD54	IgG2b	PE	Becton Dickinson
CD58	IgG2a	PE	Becton Dickinson
AICL <ul style="list-style-type: none"> <li>• 7G4.F4</li> <li>• 7F12.D10</li> </ul>	IgG1 IgG1	unmarkiert unmarkiert	AG Steinle, Tübingen AG Steinle, Tübingen
LLT-1 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1B8.B6</li> <li>• 8A6.D4</li> </ul>	IgG2b IgG2b	unmarkiert unmarkiert	AG Steinle, Tübingen AG Steinle, Tübingen
CD48	IgM	FITC	Becton Dickinson
CD112	IgG1	PE	Becton Dickinson
CD155	IgG1	unmarkiert	Acris
NG2	IgG2a	unmarkiert	AG Jung, Tübingen
CD56	IgG1	FITC	Becton Dickinson
CD16	IgG2a	PE	Becton Dickinson

CD3	IgG2a	PerCP	Becton Dickinson
CD19	IgG1	APC	Becton Dickinson
Ziege-anti-Maus	keine Angabe	FITC	Dako
Ziege-anti-Maus	keine Angabe	PE	Dianova
Ziege-anti-Mensch	keine Angabe	PE	Dianova
CD56 Microbeads	IgG1	Eisenoxid	Miltenyi Biotec
Dynabeads CD3	keine Angabe	Polystyren	Dynal

## 2.6 Zellen

B-Reihen-ALL-Blasten	Patienten Uni-Kinderklinik Tübingen
Peripheres Vollblut	Freiwillige gesunde Spender
Zellkulturen <ul style="list-style-type: none"> <li>• K562</li> <li>• 293T</li> <li>• Hela-Zellen</li> </ul>	AG Lang, Tübingen AG Steinle, Tübingen AG Salih, Tübingen

# 3 Methoden

## 3.1 Gewinnung und Typisierung von Blasten

In dieser Arbeit wurden Blasten von 23 Leukämiepatienten der Uni-Kinderklinik Tübingen mittels FACS-Analyse auf die Expression von Liganden aktivierender und inhibierender NK-Zell-Rezeptoren hin untersucht. Später dienten die Blasten eines Teils dieser Patienten als Targetzellen in Zytotoxizitätstests. Die Patienten litten an Common-ALL (cALL), prä-B-ALL, pro-B-ALL oder Mischformen zwischen diesen Formen. Die Blasten waren im Rahmen der Behandlung aus peripherem Blut oder Knochenmark gewonnen und in sogenannten Pilots portioniert und kryokonserviert worden. Zur FACS-Analyse wurden sie möglichst frisch aufgetaut oder in einzelnen Fällen zwischen Auftauen und Markierung einen Tag lang im Kühlschrank aufbewahrt. Für Zytotoxizitätstests wurden sie immer frisch aufgetaut.

Die Leukämieformen der einzelnen Patienten und der jeweilige prozentuale Blastenanteil der Proben waren im Rahmen der Behandlung bereits bestimmt worden. Diese Daten standen in einer hausinternen Datenbank zur Verfügung (Tabelle 3.1).

Die HLA-Typisierung der Blasten führte das HLA-Labor der Uniklinik Tübingen durch (Tabelle 4.19).

Da die Blasten nur in sehr begrenztem Umfang zur Verfügung standen, konnten nicht alle Versuche mit Blasten aller Patienten durchgeführt werden. Auch

konnten Versuche, die aufgrund technischer Probleme nicht verwertbar waren, aus diesem Grund nicht immer wiederholt werden.

## 3.2 Grundlagen der FACS-Analyse

### 3.2.1 Hintergrund

Die Abkürzung FACS steht für „fluorescence activated cell sorter“. Das FACS-Gerät ist eine besondere Art von Durchflusszytometer, das verschiedene Eigenschaften von Einzelzellen einer Zellsuspension simultan messen kann. Neben der Größe und der Granularität der Zellen können auch Fluoreszenzintensitäten in verschiedenen Farben gemessen werden. Dies kann man nutzen, indem man mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Antikörper einsetzt, die an zu untersuchende Strukturen binden. Das FACS-Gerät regt dann durch Laser-Strahlen die Fluoreszenzfarbstoffe an und misst die emittierten Fluoreszenzintensitäten. Je mehr fluoreszierende Antikörper an eine Zelle gebunden haben, desto höhere Fluoreszenzintensitäten treten auf [57].

Mit dem hier verwendeten FACS-Gerät konnten bis zu vier verschiedene Farbstoffe gleichzeitig eingesetzt werden. Folgende Farbstoffe kamen, an Antikörper gekoppelt, zum Einsatz:

- Fluorescein-isothiocyanat (FITC)
- Phycoerythin (PE)
- Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP)
- Allophycocyanin (APC)

Die FACS-Analyse ist eine inzwischen weitverbreitete Methode, die schon häufig genau beschrieben wurde [57, 43]. Auf eine detailliertere Beschreibung der Funktionsweise von FACS-Geräten wird deshalb hier verzichtet.

### **3.2.2 Markierung gesuchter Strukturen**

#### **a) Direkte Markierung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern**

Ein fluoreszenzgekoppelter Antikörper für die FACS-Analyse besteht aus einem Antikörper gegen ein gesuchtes Antigen und aus einem Farbstoff, der direkt an diesen Antikörper gekoppelt ist. Binden so markierte Antikörper an eine Zelle und wird diese Zelle dann im FACS-Gerät untersucht, so senden die Farbstoffmoleküle nach Anregung durch den Laser Licht mit einer bestimmten Wellenlänge und Fluoreszenzintensität aus. Das Gerät misst dieses Licht und schreibt es der Zelle zu, da die Farbstoffmoleküle über die Antikörper direkt an die Zelle gebunden sind.

In dieser Arbeit wurde die Markierung folgendermaßen durchgeführt:

Zunächst suspendiert man die Zellen in Rundboden-Analyseröhrchen in Stammlösung A (Medium), stellt die Zellkonzentration auf 1 Mio. pro ml ein, gibt die gewünschten Antikörper zu, mischt gut (Vortexer) und inkubiert diese Mischung dann für 30 min im Kühlschrank unter Lichtabschluss. Danach wäscht man die Zellen, indem man die Röhrchen mit Stammlösung B auffüllt, sie zentrifugiert (400 g, 10 min, 10 °C) und dekantiert. Dadurch entfernt man ungebundene Antikörper aus der Mischung, während an Zellen gebundene Antikörper gemeinsam mit den Zellen zurückgehalten werden. Die so markierten Zellen werden dann resuspendiert und bis zur Messung unter Lichtabschluss im Kühlschrank aufbewahrt.

### **b) Indirekte Markierung mit Primär- und Sekundärantikörpern**

Stehen gegen ein zu untersuchendes Antigen keine fluoreszenzgekoppelten Antikörper zur Verfügung, kann man es häufig mit Primär- und Sekundärantikörpern markieren. Dazu benötigt man unmarkierte Primärantikörper gegen das betreffende Antigen und fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper, die an die Fc-Teile (Fc = crystalizable Fragment) der Primärantikörper binden. Diese indirekte Markierung bringt eine höhere Gefahr von Messungenauigkeiten und Fehlern mit sich, erspart jedoch die aufwendige Koppelung von Farbstoffmolekülen an spezifische Antikörper. Die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper können in Kombination mit vielen verschiedenen Primärantikörpern eingesetzt werden [57].

In dieser Arbeit wurde die Markierung folgendermaßen durchgeführt:

Man suspendiert die Zellen zunächst in Rundboden-Analyseröhrchen in Medium (Einstellung auf 1 Mio. pro ml), gibt die gewünschten Primärantikörper zu, mischt gut (Vortexer) und inkubiert diese Mischung dann für 45 min im Kühlschrank unter Lichtabschluss. Danach wäscht man die Zellen, indem man die Röhrchen mit Stammlösung B auffüllt, sie zentrifugiert (400 g, 10 min, 10 °C) und dekantiert. Dadurch entfernt man ungebundene Primärantikörper aus der Mischung, während an Zellen gebundene Primärantikörper gemeinsam mit den Zellen zurückgehalten werden. Dann resuspendiert man die Zellen, gibt zu den Primärantikörpern passende Sekundärantikörper zu, mischt gut (Vortexer) und inkubiert diese Mischung für 45 min im Kühlschrank unter Lichtabschluss. Danach wäscht man die Zellen erneut, indem man die Röhrchen mit Stammlösung B auffüllt, sie zentrifugiert (400 g, 10 min, 10 °C) und dekantiert. Dadurch entfernt man nun auch ungebundene Sekundärkörper aus der Mischung, während an Zellen gebundene Antikörper gemeinsam mit den Zellen zurückgehalten werden. Die Zellen werden dann resuspendiert und bis zur Messung unter Lichtabschluss im Kühlschrank aufbewahrt. Die Messung sollte innerhalb von zwei Stunden nach Markierung erfolgen, da sonst zuneh-



mend Ungenauigkeiten durch Lösung von Antigen-Antikörper-Bindungen entstehen.

Bei dieser Methode müssen die Zellen nach der Inkubation mit den Primärantikörpern und vor der Zugabe der Sekundärantikörper gewaschen werden, um freie Primärantikörper zu entfernen. Sind in der Zellsuspension bei Zugabe der Sekundärantikörper nämlich viele freie Primärantikörper vorhanden, besteht die Gefahr, dass viele der zugegebenen Sekundärantikörper an diese freien Primärantikörper binden. Dann stehen eventuell zu wenige Sekundärantikörper zur Verfügung, um die gebundenen Primärantikörper zufriedenstellend zu markieren. Werden die Zellen nach der Inkubation mit den Sekundärantikörpern nicht gewaschen, besteht die Gefahr falsch positiver Ergebnisse durch adhärente Antikörper, sowie eine unnötig hohe störende Hintergrundfluoreszenz.

### **c) Indirekte Markierung mit löslichen Rezeptormolekülen und Sekundärantikörpern**

Diese Methode kann man verwenden, wenn man unbekannte Liganden bekannter Rezeptoren sucht. Sind die Liganden nicht bekannt, kann man gegen sie auch keine spezifischen Antikörper herstellen, um sie zur Markierung einzusetzen. Man kann jedoch lösliche Rezeptormoleküle herstellen, die gegebenenfalls an vorhandene Liganden auf zu untersuchenden Zellen binden. An diese löslichen Rezeptormoleküle werden Fc-Teile von Antikörpern chemisch gekoppelt. Diese Fc-Teile können nun mit entsprechenden fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern markiert werden.

In dieser Arbeit wurden die Markierungsschritte analog zur Markierung mit Primär- und Sekundärantikörpern durchgeführt (siehe Abschnitt b). Anstelle der Primärantikörper wurden lösliche Rezeptormoleküle mit Fc-Teil der Firma R&D zugegeben.

### 3.2.3 Messung am FACS-Gerät

Wenn Zellen wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben markiert wurden, kann man ihre Fluoreszenzintensitäten nach Anregung durch den Laser im FACS-Gerät messen. Um verwertbare Ergebnisse zu erhalten, muss man zunächst Verstärkerspannungen am Gerät einstellen. Hierfür werden sogenannte Isotypkontrollen oder Negativkontrollen benötigt. Sie bestehen aus Zellsuspensionen, die den zu untersuchenden Proben entsprechen, die jedoch anstatt mit spezifischen Antikörpern gegen gesuchte Strukturen mit Antikörpern inkubiert wurden, die von den zu untersuchenden Zellen sicher nicht exprimiert werden. Bei direkter Markierung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern müssen an die Antikörper der Negativkontrollen die gleichen Farbstoffmoleküle gekoppelt sein wie an die Antikörper der Proben. Bei indirekter Markierung mit Primär- und Sekundärantikörpern müssen zu Proben und Negativkontrollen gleiche Sekundärantikörper zugegeben werden. Hier kann es außerdem sinnvoll sein, zusätzlich Kontrollen ohne Primärantikörper, nur mit Sekundärantikörpern, herzustellen. Auch zusätzliche Kontrollen ganz ohne Antikörperzugabe können sinnvoll sein.

Vor der Messung werden zunächst, ausgehend von Routineeinstellungen, die Verstärkerspannungen für Vorwärtsstreulicht (forwardscatter, FSC) und Seitwärtsstreulicht (sidescatter, SSC) so eingestellt, dass die zu untersuchende Zellpopulation gut zur Darstellung kommt. Das Vorwärtsstreulicht ist ein Maß für die Zellgröße, während das Seitwärtsstreulicht von der intrazellulären Granularität beeinflusst wird. Dadurch ergeben sich typische Verteilungsmuster, wenn in einer Negativkontrolle oder Probe verschiedene Zellarten enthalten sind und man die gemessenen Werte für FSC und SSC als Punktdiagramm darstellt.

Danach werden, ebenfalls anhand der oben beschriebenen Negativkontrollen, die Verstärkerspannungen der Messkanäle für die verschiedenen Wellenlängen

so eingestellt, dass für die meisten Zellen eine Fluoreszenzintensität zwischen  $10^0$  und  $10^1$  gemessen wird.

Sind die Verstärkerspannungen eingestellt, werden zunächst die Negativkontrollen und dann die Proben nacheinander gemessen, die Einstellungen dürfen dabei nicht mehr verändert werden. Das Gerät misst nun für jede Zelle einzeln FSC, SSC, sowie emittiertes Licht in vier verschiedenen Wellenlängen entsprechend den vier verschiedenen Farbstoffen (siehe Kapitel 3.2.1). Die Daten werden von einem angeschlossenen Rechner gespeichert und mit geeigneter Software ausgewertet.

### **3.2.4 Auswertung**

Zur Auswertung diene das Programm CellQuest. Es bietet verschiedene Möglichkeiten, die gespeicherten Daten graphisch oder rechnerisch auszuwerten.

#### **a) Graphische Auswertung**

Zur graphischen Auswertung stellt man zunächst FSC und SSC jeder einzelnen Zelle einer Kontrolle oder Probe als Punktdiagramm dar. In dieser Darstellung wählt man die Zellwolke mit überwiegend lebenden Blasten durch Einkreisen aus (Abbildung 3.3, links). Die Umrandung wird als „Gate“ bezeichnet, die so ausgewählten Zellen bilden die ausgewählte Zellgruppe.

Die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Zellen der ausgewählten Zellgruppe stellt man nun, für jeden Farbstoff getrennt, als Histogramm dar. Dann überlagert man das so erstellte Fluoreszenz-Histogramm einer Probe mit dem Fluoreszenz-Histogramm der zugehörigen Negativkontrolle (Abbildung 3.1).

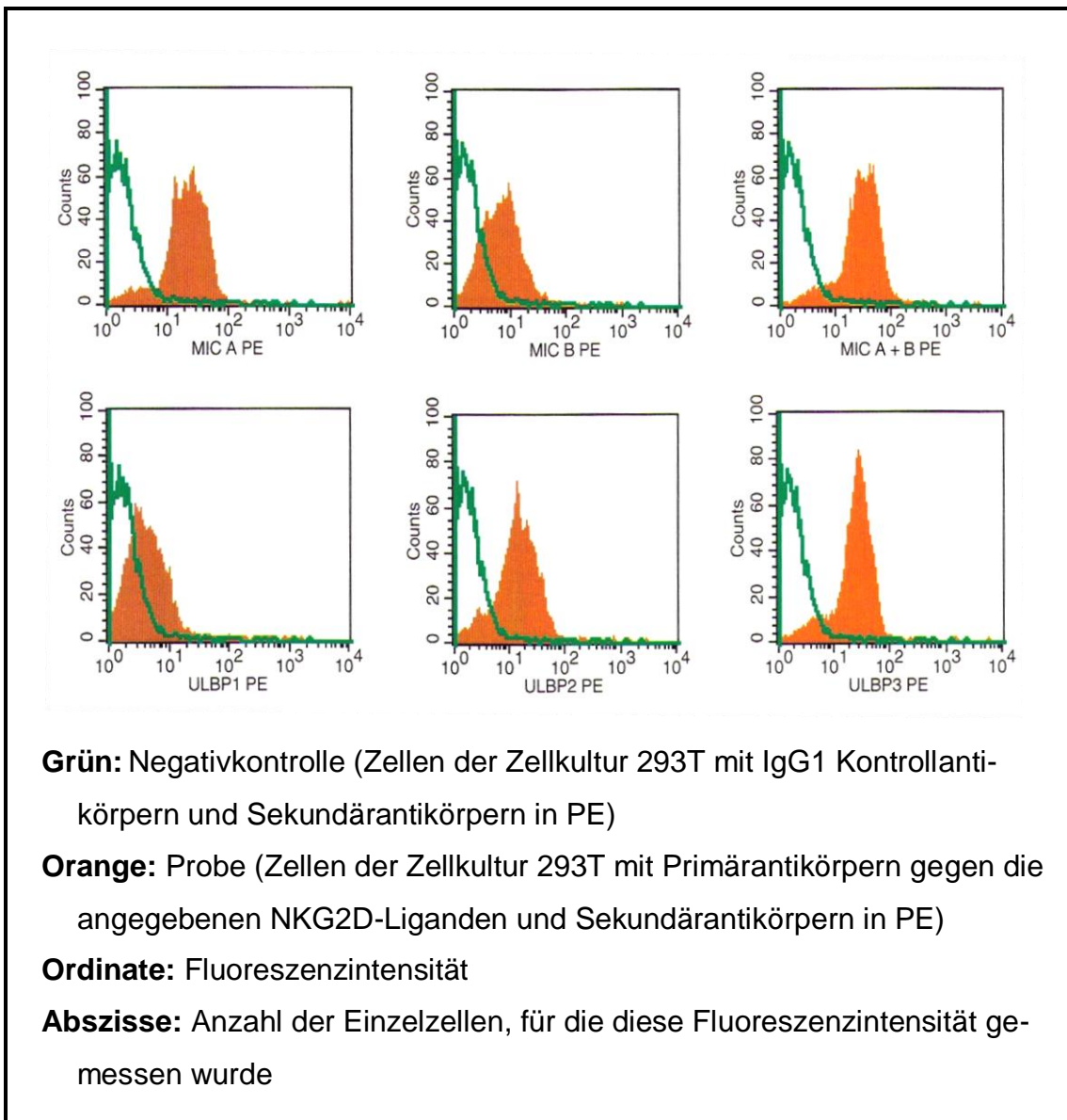


Abbildung 3.1:

Beispiel für Fluoreszenz-Histogramme von positiven Proben und korrespondierenden Negativkontrollen, wie sie mit dem an das FACS-Gerät angeschlossenen Rechner und dem verwendeten Auswertungsprogramm erstellt werden können

Haben die Zellen der ausgewählten Zellgruppe einer Probe viele fluoreszierende Antikörper spezifisch gebunden, während die gleichartigen Zellen der

Negativkontrolle keine fluoreszierenden Antikörper spezifisch gebunden haben, so liegt im Fluoreszenz-Histogramm das Maximum der Probe deutlich weiter rechts als das der Negativkontrolle. In Abbildung 3.1 ist diese Differenz gut zu erkennen.

Enthält eine ausgewählte Zellgruppe zwei Untergruppen von Zellen, an die deutlich verschieden viele Antikörper gebunden haben, so ergibt sich ein doppelgipfliges Histogramm. Bei den FACS-Analysen dieser Arbeit war dies jedoch nur sehr selten zu beobachten.

Abbildung 3.1 zeigte Ergebnisse der FACS-Analyse von Zellen der Zellkultur 293T mit Primärantikörpern gegen verschiedene NKG2D-Liganden. Die Zellkultur exprimiert die NKG2D-Liganden stark, deshalb diente sie in dieser Arbeit als Positivkontrolle für die Funktionstüchtigkeit der entsprechenden Antikörper. Bei der FACS-Analyse mancher Proben dieser Arbeit, zum Beispiel bei der Untersuchung von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten mit Primärantikörpern gegen einzelne NKG2D-Liganden, war der Unterschied zwischen den Fluoreszenzintensitäten der Proben und der Negativkontrollen jedoch deutlich geringer (Abbildung 3.2).

Wenn sich die Fluoreszenzintensitäten von Proben und Negativkontrollen nur wenig unterscheiden, ist es mit der graphischen Auswertungsmethode nicht möglich, die Proben objektiv in positive und negative Proben einzuteilen. Als positiv wird dabei eine Probe definiert, deren Zellen das gesuchte Merkmal exprimieren. Als negativ wird eine Probe definiert, deren Zellen das gesuchte Merkmal nicht exprimieren.

Um die Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität einer Probe gegenüber der Negativkontrolle objektivieren zu können, muss man die gemessenen Fluoreszenzintensitäten rechnerisch auswerten. Darauf wird in Abschnitt b näher eingegangen.

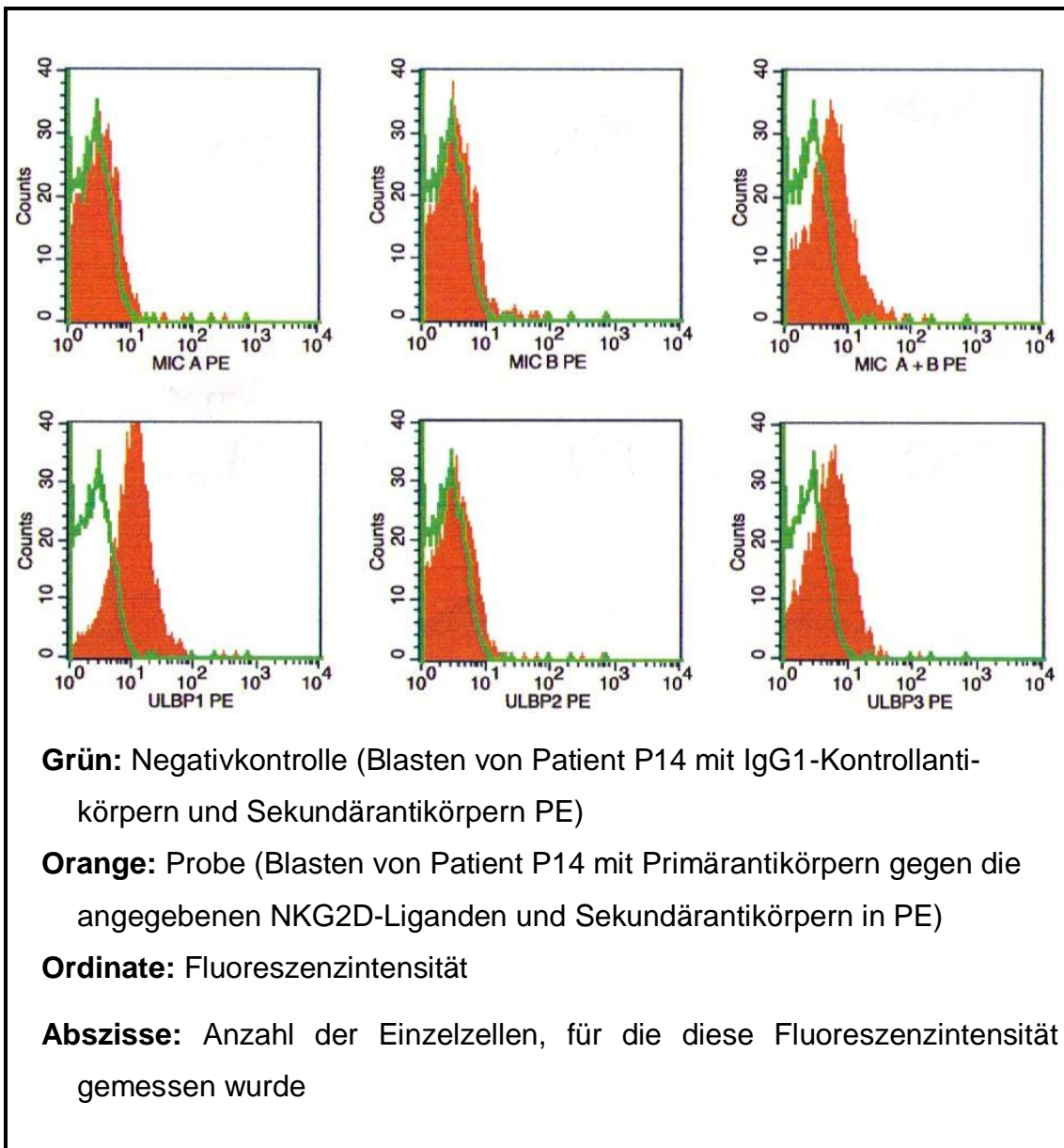


Abbildung 3.2:

Beispiel für Fluoreszenz-Histogramme von Negativkontrollen und graphisch nicht eindeutig positiven oder negativen Proben, wie sie in dieser Arbeit häufig auftraten

### **b) GeoMean-Werte**

Zunächst berechnet man mithilfe des Auswertungsprogrammes sogenannte GeoMean-Werte (GM). Sie werden bei Mehrfachmarkierungen für jeden Fluoreszenz-Farbstoff getrennt ermittelt. Der GM einer ausgewählten Zellgruppe entspricht dem geometrischen Mittelwert der gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Einzelzellen (Abbildung 3.3). Der geometrische Mittelwert (im Gegensatz zum arithmetischen Mittelwert) ist deshalb sinnvoll, weil die Fluoreszenzintensitäten der Einzelzellen einer homogenen Gruppe im logarithmischen (und nicht im linearen) Maßstab annähernd normalverteilt sind.

Der GM einer Zellgruppe ist abhängig von der Anzahl der gebundenen fluoreszierenden Antikörper pro Zelle. Er hängt aber auch davon ab, wie stark die Zellen unspezifisch leuchten. Außerdem wird er von der Einstellung der Verstärkerspannung am Gerät beeinflusst. Zusätzlich variiert er durch zufällige Messfehler.

Möchte man wissen, ob fluoreszierende Antikörper an eine Zelle gebunden haben, muss man eine Probe mit einer geeigneten Negativkontrolle vergleichen. Beide müssen zur selben Messreihe (siehe übernächste Seite) gehören, damit die Unterschiede durch Verstärkerspannung und unspezifische Fluoreszenz möglichst gering sind.

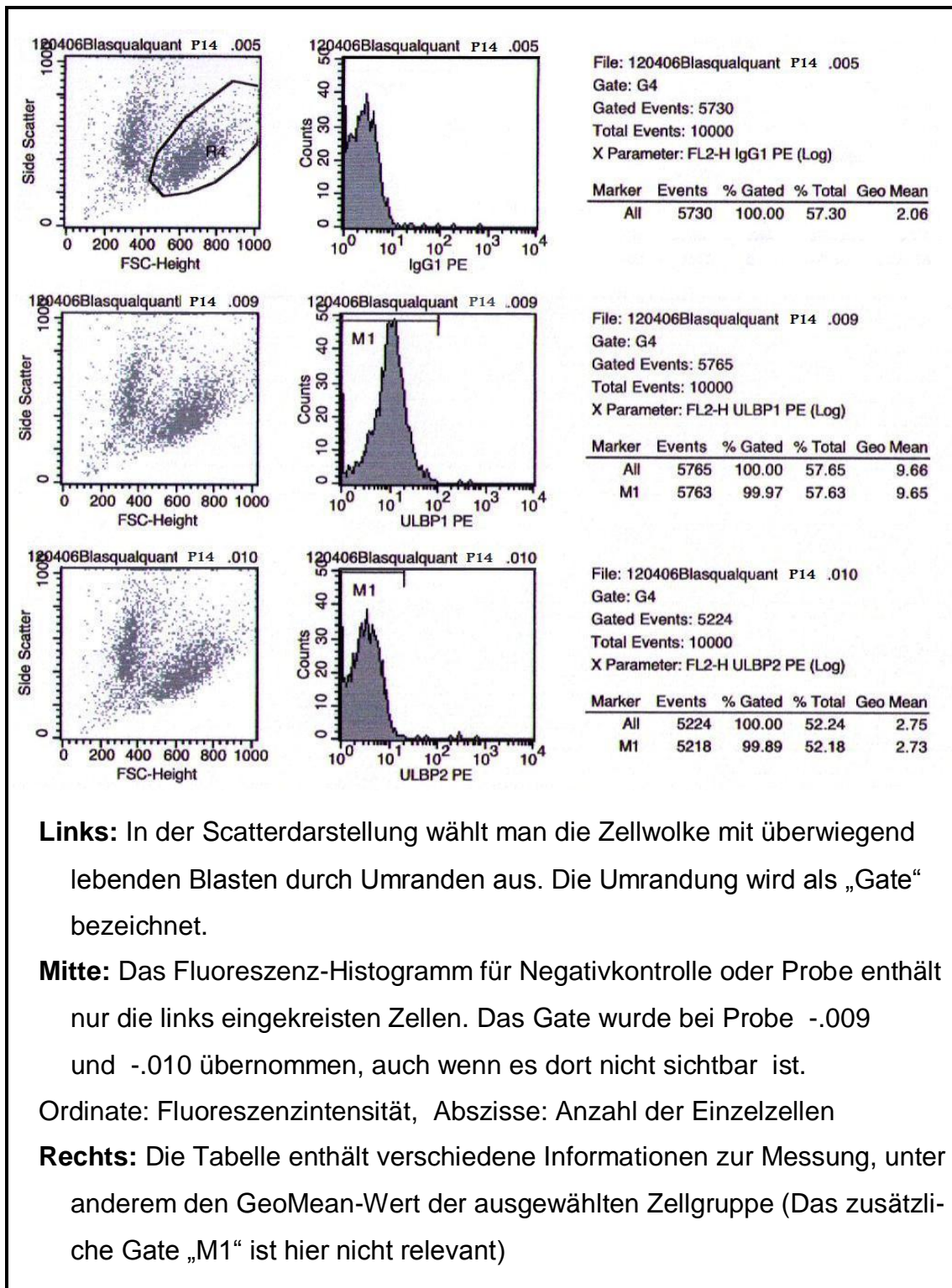


Abbildung 3.3:

Ermittlung des GeoMean-Wertes einer Zellgruppe



Eine **Messreihe** wird hier definiert als Reihe aufeinanderfolgender Messungen unter Einhaltung folgender Bedingungen:

- Zeitlicher Abstand kleiner zwei Stunden
- Messung am selben Messgerät
- Gleiche Einstellung von Verstärkerspannung und Kompensation bei den Einzelmessungen
- Vergleichbare Merkmalsträger, vergleichbarer Färbeablauf und vergleichbare Antikörper

GeoMean-Werte sind ein Maß für die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). GM sind innerhalb einer Messreihe für vergleichbarer Zellgruppen (z. B. lebende B-Reihen-ALL-Blasten aus derselben kryokonservierten Portion desselben Patienten) direkt vergleichbar. Ist hier der GM einer Probe viel größer als der GM einer Negativkontrolle, so haben fluoreszierende Antikörper spezifisch an die Zellen der Probe gebunden (Ausschluss technischer Fehler vorausgesetzt). Ist der GM einer Probe viel größer als der einer anderen Probe, so haben beide Proben unterschiedlich viele Antikörper gebunden.

GM variieren in gewissem Umfang durch zufällige Messfehler. Deshalb ergibt sich selbst bei der Messung von zwei gleich hergestellten Proben in derselben Messreihe nicht zweimal genau der gleiche Wert.

Falls der GM einer Probe viel größer ist als der GM der zugehörigen Negativkontrolle, so sind diese Messfehler unerheblich. Die Probe ist dann mit hoher Wahrscheinlichkeit positiv für das gesuchte Merkmal. Ist der Unterschied zwischen dem GM einer Probe und der Negativkontrolle jedoch nur gering, so kann mit den bisher zur Verfügung stehenden Auswertungsverfahren nicht geklärt werden, ob Antikörper in geringer Anzahl spezifisch gebunden haben, oder ob die Differenz lediglich durch zufällige Messfehler hervorgerufen wurde.

Zur Unterscheidung von gering positiven und negativen Proben wird in Kapitel 4.1 eine neue Auswertungsmethode eingeführt.

### **3.3 Qualitative FACS-Analyse von NKG2D-Liganden auf Blasten mit Primär- und Sekundärantikörpern**

#### **3.3.1 Durchführung**

Ziel dieser Untersuchungen war es herauszufinden, ob kindliche B-Reihen-ALL-Blasten Liganden für den aktivierenden NK-Zell-Rezeptor NKG2D exprimieren.

Die hier verwendeten monoklonalen Maus-Primärantikörper wurden von der Arbeitsgruppe Steinle, Abteilung Immunologie des Instituts für Zellbiologie an der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt. Folgende Primärantikörper kamen zum Einsatz:

- AMO1 gegen MICA
- BMO1 gegen MICB
- BAMO1 gegen MICA und MICB
- AUMO3 gegen ULBP1
- BUMO1 gegen ULBP2
- CUMO4 gegen ULBP3
- N1G9 als Isotypkontrolle
- Alternativ zu N1G9 wurde manchmal eine IgG1-Kontrolle der Firma Becton Dickinson verwendet.

PE-markierte Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörper wurden von der Firma Dianova bezogen. Die Markierung erfolgte wie in Kapitel 3.2.2, Abschnitt b, beschrieben. Während der Inkubation der Zellen mit den Primärantikörpern lagen diese dabei in einer Konzentration von 5 µg/ml bis 15 µg/ml vor. Aufgrund der sehr geringen Mengen eines jeden Antikörpers, die an einem Versuchstag benötigt wurden, sowie der schlechten Haltbarkeit verdünnter Antikörperlösungen mussten stets sehr geringe Mengen von Antikörperlösungen pipettiert werden. Die anfangs verwendete Menge lag bei 1 µl Antikörperlösung, um eine Konzentration von 5 µg/ml Antikörper in der Zellsuspension zu erreichen. Da jedoch bei diesen geringen Mengen die Gefahr von Pipettierungenauigkeiten sehr groß war, wurden später etwas größere Antikörpermengen verwendet.

Die verwendeten Antikörperkonzentrationen wurden mittels Titration überprüft. Im oben genannten Konzentrationsbereich ergaben sich dabei gute Ergebnisse. Die empfohlene Inkubations-Konzentration der AG Steinle lag bei 5 µg/ml bis 10 µg/ml. Die Sekundärantikörper wurden nach Angaben des Herstellers eingesetzt, ihre Inkubationskonzentration wurde durch Titration überprüft. Als Positivkontrollen für die Funktionstüchtigkeit der Antikörper dienten die Zellkulturen 293T und K562, die alle untersuchten NKG2D-Liganden exprimieren. Hier ergaben sich eindeutig positive Ergebnisse (Abbildung 3.1). Die Messung am FACS-Gerät erfolgte wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben.

### **3.3.2 Auswertung**

Zur Auswertung der Daten musste eine neue Auswertungsmethode entwickelt werden, die in Kapitel 4.1 beschrieben ist. Die Abbildungen und Diagramme in Kapitel 4.1 wurden mit Microsoft Office Excel erstellt. Mit diesem Programm wurden auch die beschriebenen Rechenoperationen durchgeführt.

Die statistischen Grundlagen werden im Standardlehrwerk von V. Harms beschrieben [37]. Erster Schritt zur Auswertung war es, die Daten in eine Normalverteilung, oder Gaußverteilung, zu überführen. „Die Gaußverteilung beschreibt die Streuung um den Mittelwert. Eine Gaußverteilung entsteht, wenn die Streuung dadurch bedingt ist, dass sehr viele voneinander unabhängige Abweichungskomponenten additiv aufeinander einwirken.“ Betrachtet man die Histogrammdarstellungen der gemessenen Fluoreszenzintensitäten in Abbildung 3.3, so fällt folgendes auf: Die Verteilungen ähneln Normalverteilungen, jedoch sind die Ordinaten logarithmisch skaliert. Es liegen also offensichtlich logarithmische Normalverteilungen (Lognormalverteilungen) zugrunde, bei der die Logarithmen der Zufallsvariablen normalverteilt sind.

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde sogenanntes Wahrscheinlichkeitspapier eingesetzt, bei dem die Abszisse so verzerrt ist, dass die s-förmige Kurve der Summenhäufigkeitsfunktion einer Normalverteilung in eine Gerade übergeht. Die Prüfung auf Normalverteilung besteht also darin, die relativen Summenhäufigkeiten von Werten in möglichst geringen Intervallen zu berechnen und diese in Wahrscheinlichkeitspapier einzutragen (Abbildung 4.4). Liegen die Summenhäufigkeitswerte annähernd auf einer Geraden, sind die Ausgangswerte annähernd normalverteilt.

## 3.4 Quantitative FACS-Analyse von NKG2D-Liganden auf Blasten

### 3.4.1 Hintergrund

Mit der Qualitativen FACS-Analyse (Kapitel 3.3) kann man untersuchen, ob bestimmte Antigene auf bestimmten Zellen vorkommen. Quantitative Aussagen

über die Anzahl der exprimierten Antigen-Moleküle pro Zelle können jedoch nicht gemacht werden. Die Quantitative FACS-Analyse ist aufwendiger und teurer als die Qualitative FACS-Analyse, erlaubt jedoch solche Aussagen. Deshalb wurde die NKG2D-Liganden-Expression der Blasten von 15 Patienten zusätzlich mittels Quantitativer FACS-Analyse untersucht. Dazu wurde das QIFIKIT von Dako verwendet.

Das QIFIKIT enthält sogenannte „Calibration-Beads“. Es handelt sich dabei um eine Mischung aus fünf verschiedenen künstlichen Populationen, die jeweils eine bestimmte Anzahl an Bindungsstellen für Anti-Maus-Sekundärantikörper aufweisen. Die Bindungsstellen-Anzahlen pro Bead sind in der Produktbeschreibung des Herstellers aufgeführt. Werden diese Beads mit FITC-markierten Sekundärantikörpern sättigend markiert und ihre Fluoreszenzintensitäten im FACS-Gerät gemessen, so ergeben sich steigende Fluoreszenzintensitäten für steigende Anzahlen von Bindungsstellen. Werden zu untersuchende Zellen sättigend mit Maus-Primärantikörpern gegen ein gesuchtes Antigen und dann mit den gleichen Sekundärantikörpern wie die Calibration-Beads markiert und werden dann nacheinander die Fluoreszenzintensitäten der Beads und der Zellen mit dem FACS-Gerät gemessen, so kann durch rechnerischen Vergleich ermittelt werden, wie viele Primärantikörper im Mittel an eine untersuchte Zelle gebunden haben.

### **3.4.2 Durchführung**

Die Markierung erfolgte wie in Kapitel 3.2.2, Abschnitt b beschrieben. Dazu dienten die gleichen Primärantikörper und Inkubations-Konzentrationen der Primärantikörper wie in Kapitel 3.3.1. Kurz vor Ablauf der Inkubationszeit der Primärantikörper wurden in ein leeres Rundboden-Analyseröhrchen 50 µl der gut gemischten Calibration-Beads des QIFIKIT gegeben. In ein weiteres leeres Rundboden-Analyseröhrchen wurden 50 µl der gut gemischten Set-up-Beads

gegeben, die ebenfalls im QIFIKIT enthalten sind. Diese beiden Röhren wurden dann weiterbehandelt wie die Proben und Negativkontrollen nach Ablauf der Inkubationszeit für die Primärantikörper, also mit Stammlösung B aufgefüllt, zentrifugiert, dekantiert, resuspendiert und mit Sekundärantikörpern markiert. Als Sekundärantikörper dienten FITC-markierte Ziege-Anti-Maus-Antikörper der Firma Dako. Sie wurden nach Herstellerangaben eingesetzt. Ihre Inkubations-Konzentration wurde durch Titration überprüft. Als Positivkontrollen dienten wie in Kapitel 3.3 die Zellkulturen K562 und 293T.

Die Messung erfolgte wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben. Die Verstärkerspannung für den Kanal, der das von den FITC-Molekülen emittierte Licht misst, wurde jedoch nicht allein anhand der Negativkontrolle eingestellt. Nach der Einstellung anhand der Negativkontrolle wurden zunächst die Set-Up-Beads gemessen. Es handelt sich dabei um zwei künstliche Eichpopulationen, von denen die eine keine Bindungsstellen für Sekundärantikörper aufweist, die andere weist eine hohe Anzahl von Bindungsstellen auf. In der Histogrammdarstellung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten sollten nun die Beads der Population ohne Bindungsstellen zwischen  $10^0$  und  $10^1$  zur Darstellung kommen, die Beads der Population mit vielen Bindungsstellen sollten noch deutlich dargestellt werden. Dies war nicht immer der Fall, sodass teilweise zwischen den verschiedenen Bedingungen ein Kompromiss gefunden werden musste. Die Probleme sind durch die unspezifische Fluoreszenz der Zellen zu erklären (vergleiche Kapitel 4.1.2, Abschnitt a).

Nach der Einstellung der Verstärkerspannung für den FITC-Kanal wurden die Calibration-Beads, die Negativkontrollen und die Proben im FACS-Gerät gemessen, ohne dass die Einstellung zwischen den Messungen verstellt wurde.

### 3.4.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgte rechnerisch wie vom Hersteller beschrieben. Dazu bestimmt man zunächst für jede Population der Calibration-Beads den GM. Auch der GM jeder Probe und Negativkontrolle wird ermittelt.

Die fünf verschiedenen GM der Eichpopulationen einer Messreihe logarithmiert man und stellt sie ihren bekannten, ebenfalls logarithmierten Bindungsstellen-Anzahlen als Tabelle bzw. Punktdiagramm gegenüber. Dann ermittelt man die Gleichung der Regressionsgeraden durch diese Punkte. Dazu wurde in dieser Arbeit Microsoft Office Excel verwendet. Die ermittelte Regressionsgerade wird künftig als Eichgerade bezeichnet.

Die **Eichgerade** hat die Form

$$\log(ABC) = m \cdot \log(MFI) + c.$$

ABC steht für Antibody Binding Capacity und ist ein Maß für die Summe aus der Anzahl von Primär-Antikörpern, die eine Zelle im Durchschnitt gebunden hat, und einer scheinbaren Anzahl von Antikörpern, die eine Zelle im Durchschnitt durch ihre unspezifische Fluoreszenz gebunden zu haben scheint.

MFI steht für Mean Fluorescence Intensity und entspricht dem GM.

Nun setzt man die GM der Proben und Negativkontrollen einer Messreihe in die Formel der zugehörigen Eichgeraden ein. Man kann dann die ABC der Proben und Negativkontrollen berechnen. Die so ermittelte ABC von Negativkontrollen wird vom Hersteller als Background Antibody Equivalent (BAE) bezeichnet. Da eine Negativkontrolle so hergestellt wird, dass sie keine fluoreszierenden Antikörper spezifisch bindet, entspricht die BAE einer scheinbaren Anzahl von Antikörpern, die eine Zelle im Durchschnitt durch ihre unspezifische Fluoreszenz gebunden zu haben scheint.

Die Anzahl von Primärantikörpern, die EINE Zelle einer Probe im Durchschnitt gebunden hat, bezeichnet der Hersteller als Specific Antibody Binding Capacity (SABC). Sie berechnet sich als Differenz der ABC von Proben und BAE der zugehörigen Negativkontrollen:

$$SABC = ABC - BAE$$

Die weitere Auswertung der so ermittelten SABC-Werte wird in Kapitel 4.2 beschrieben.

## **3.5 Qualitative FACS-Analyse von NCR-Liganden und NKG2D-Liganden auf Blasten mit löslichen Rezeptor-Molekülen und Sekundärantikörpern**

### **3.5.1 Hintergrund**

Die FACS-Analyse von Antigenen auf Zellen mithilfe fluoreszierender Antikörper ist eine weitverbreitete Methode. Zur Suche nach Strukturen, die in ihrem Aufbau noch nicht bekannt sind, oder gegen die aus anderen Gründen keine Antikörper produziert werden können, ist sie jedoch nicht geeignet. Genau dieses Problem stellt sich bei der Suche nach den Liganden der Natural Cytotoxicity Receptors (NCR). Die NCR werden von NK-Zellen exprimiert, ihre NK-Zell-aktivierende Wirkung wurde von verschiedenen Autoren beschrieben (siehe Einleitung). Über ihre Liganden besteht jedoch nach wie vor Unklarheit.



Da sie noch nicht eindeutig identifiziert wurden, können auch keine Antikörper gegen diese Liganden hergestellt werden.

Um herauszufinden, ob kindliche B-Reihen-ALL-Blasten NCR-Liganden exprimieren, wurden die Blasten von 21 Patienten mit löslichen NCR-Molekülen der Firma R&D untersucht. Die Versuche basierten auf der These, dass die löslichen Rezeptormoleküle fest an ihre Liganden auf den Blasten binden. Um sie mittels FACS-Analyse nachweisbar zu machen, hatte der Hersteller Fc-Teile von menschlichen IgG1-Antikörpern chemisch an die Rezeptormoleküle gekoppelt. Ein PE-markierter Ziege-anti-Mensch-Sekundärantikörper sollte nun an die Fc-Teile binden.

### **3.5.2 Durchführung**

Die Moleküle lagen bei Auslieferung in Pulverform vor und wurden zunächst nach Angaben des Herstellers gelöst und gelagert:

Je 25 µg Moleküle wurden in 250 µl steriler Stammlösung C gelöst. Die Lösung wurde dann fraktioniert bei -20 °C eingefroren, eine geringe Menge zum baldigen Gebrauch wurde im Kühlschrank unter sterilen Bedingungen gelagert.

Bei der weiteren Durchführung der FACS-Analysen ergaben sich mehrere Probleme:

- 1.) Die Überprüfung der Funktionstüchtigkeit der Moleküle war schwierig. Da die Liganden, an die die Moleküle binden sollten, noch nicht bekannt waren, stand keine Positivkontrolle zur Verfügung. Deshalb wurde auf Vollblut nach Liganden gesucht. Bei zwei Versuchen konnten jedoch bei keiner Zellpopulation eindeutig positive Ergebnisse erzielt werden (Tabelle 4.10). Auch auf den Zellkulturen K562 und 293T konnten keine Liganden nachgewiesen werden (Tabelle 4.10). Der Hersteller hatte die

Funktionstüchtigkeit geprüft, indem er die Fähigkeit der Moleküle gemessen hatte, die Induktion der Interferon- $\gamma$ -Sekretion von NK-92-Zellen durch anti-hNCR-Antikörper zu blockieren. Den Nachweis an Zellen gebundener Moleküle mittels FACS-Analyse hatte der Hersteller nicht beschrieben.

In Ermangelung einer direkten Positivkontrolle wurden parallel zu den löslichen NCR-Molekülen lösliche NKG2D-Moleküle desselben Herstellers und vergleichbaren Aufbaus eingesetzt. Für sie standen die Zellkulturen K562 und 293T als Positivkontrollen zur Verfügung. Bei der FACS-Analyse ergaben sich hier eindeutig positive Ergebnisse (Tabelle 4.10).

- 2.) Ein weiteres Problem ergab sich bei der Herstellung der Negativkontrollen. Vergleichbare Moleküle, die sicher nicht an die zu untersuchenden Blasten binden, standen nicht zur Verfügung. Deshalb wurde zunächst der Immunglobulin-Mix Flebogamma zur Herstellung der Negativkontrollen eingesetzt. Die Negativkontrollen bestanden also aus Blasten, inkubiert zunächst mit Flebogamma, dann mit dem gleichen Sekundärantikörper wie die Proben.

Im Verlauf kamen Zweifel an der Eignung von Flebogamma zur Herstellung der Negativkontrollen auf. Zum Vergleich dienten dann zusätzliche Kontrollen ganz ohne Antikörper und Kontrollen nur mit Sekundärantikörpern (Kapitel 4.3.2).

- 3.) Da keine Positivkontrolle zur Verfügung stand, konnte die optimale Inkubationskonzentration nicht durch Titration ermittelt werden. Der Hersteller machte zur Konzentration folgende Angaben: Die  $ED_{50}$  bei der Inhibierung der Induktion der Interferon- $\gamma$ -Sekretion von NK-92-Zellen durch anti-hNCR-Antikörper liegt bei 0,03 bis 0,5  $\mu\text{g/ml}$  (je nach Molekül). Da eine möglichst vollständige Besetzung von Liganden mit Rezeptoren

angestrebt wurde, wurden die Moleküle hier in höheren Konzentrationen von 2 µg/ml bis 4 µg/ml eingesetzt. Mit diesen Inkubationskonzentrationen von löslichen NKG2D-Molekülen ergaben sich bei den Positivkontrollen eindeutig positive Ergebnisse.

Die Markierungsschritte wurden analog zur Markierung mit Primär- und Sekundärantikörpern durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.2, Abschnitt b). Anstelle der Primärantikörper wurden die löslichen Rezeptormoleküle mit Fc-Teil zugegeben. Als Sekundärantikörper dienten PE-markierte Ziege-anti-Mensch-Antikörper der Firma Dianova, die nach Herstellerangaben eingesetzt wurden.

### **3.6 Quantitative FACS-Analyse von HLA-A + HLA-B + HLA-C sowie HLA-E auf Blasten**

Die Quantitativen FACS-Analysen der Expression von HLA-A + HLA-B + HLA-C sowie HLA-E auf Blasten wurden genauso durchgeführt und ausgewertet wie die Quantitativen FACS-Analysen der NKG2D-Liganden (siehe Kapitel 3.4), es wurden lediglich andere Primärantikörper verwendet.

Als Primärantikörper gegen HLA-A + HLA-B + HLA-C dienten W6/32-Antikörper der Firma Dako, die nach den Herstellerangaben verwendet wurden. Als Primärantikörper gegen HLA-E dienten Antikörper der Firma Biozol, die ebenfalls entsprechend der Herstellerangaben verwendet wurden.

## 3.7 Qualitative FACS-Analyse weiterer Moleküle mit potentiell NK-Zell-modulierender Funktion auf Blasten

### 3.7.1 Adhäsionsmoleküle

Auch die Expression der Adhäsionsmoleküle CD11a, CD50, CD54 und CD58 durch die Blasten wurde mittels FACS-Analyse untersucht. Zur Markierung dienten fluoreszenzgekoppelte Antikörper der Firma Becton Dickinson. Die Antikörper gegen CD11a und CD50 waren FITC-markiert, die Antikörper gegen CD54 und CD58 waren PE-markiert. Zusätzlich dienten bei allen Proben APC-markierte CD19-Antikörper zur Erkennung von B-Zellen. Nur B-Zellen und dendritische Zellen exprimieren CD19 [57].

Markierung, Messung und Auswertung erfolgten wie in Kapitel 3.2 beschrieben. Die Antikörper wurden dabei in den in der Arbeitsgruppe üblichen Inkubationskonzentrationen eingesetzt (je 4 µl Antikörper-Fertiglösung wurden zu 100 µl Zellsuspension gegeben). In jeweils einer Probe wurden die Blasten mit CD11a-Antikörpern (FITC), CD54-Antikörpern (PE) und CD19-Antikörpern (APC) markiert, in einer zweiten Probe mit CD50-Antikörpern (FITC), CD58-Antikörpern (PE) und CD19-Antikörpern (APC). Zur Auswertung wurden zunächst die lebenden Zellen gated, dann wurden unter diesen durch erneutes Gaten die CD19-positiven Zellen ausgewählt. Die GeoMean-Werte der ausgewählten Zellen in FITC und PE wurden dann bestimmt und mit den GeoMean-Werten der entsprechenden Negativkontrollen verglichen (Tabelle 4.13). Zur weiteren Auswertung der GeoMean-Werte diente die in Kapitel 4.1.2 entwickelte Auswertungsmethode.

### 3.7.2 AICL und LLT-1

Zur Untersuchung der Expression von AICL und LLT-1 auf B-Reihen-ALL-Blasten dienten unmarkierte Maus-Primärantikörper, die die AG Steinle, Abteilung Immunologie des Instituts für Zellbiologie an der Universität Tübingen zur Verfügung stellte. Die Versuche wurden als Blindversuche durchgeführt. Dazu wurden von der AG Steinle vier verschiedene Antikörper-Lösungen zur Verfügung gestellt, die mit Nummern und Isotyp-Angaben versehen waren und von denen zunächst nicht bekannt war, wogegen sich die Antikörper richten. Auch die entsprechenden Isotypkontrollen stellte die AG Steinle zur Verfügung. Folgende Primärantikörper kamen zum Einsatz:

- 7G4.F4 (IgG1) gegen AICL
- 7F12.D10 (IgG1) gegen AICL
- 1B8.B6 (IgG2b) gegen LLT-1
- 8A6.D4 (IgG2b) gegen LLT-1
- N1G9 (IgG1) Isotypkontrolle
- D3-13F1 (IgG2b) Isotypkontrolle
- Alternativ zu N1G9 wurde manchmal eine IgG1-Kontrolle der Firma Becton Dickinson verwendet.

Die Primärantikörper lagen bei der Inkubation, wie die NKG2D-Liganden-Antikörper, in einer Konzentration von 5 µg/ml bis 15 µg/ml vor. Die empfohlene Konzentration der AG Steinle lag auch hier bei 5 µg/ml bis 10 µg/ml.

Mit Ausnahme der verwendeten Primärantikörper wurden die Versuche genauso durchgeführt und ausgewertet wie die Qualitativen FACS-Analysen der NKG2D-Liganden mit Primär- und Sekundärantikörpern (Kapitel 3.3).

Positivkontrollen standen bei diesen Blindversuchen leider nicht zur Verfügung.

### 3.7.3 CD48, CD112, CD155 und NG2

Zur FACS-Analyse von CD48 und CD112 dienten fluoreszenzgekoppelte Antikörper der Firma Becton Dickinson. Die CD48-Antikörper waren FITC-markiert, die CD112-Antikörper waren PE-markiert. Die FACS-Analysen wurden wie die FACS-Analysen der Adhäsionsmoleküle (Kapitel 3.7.1) durchgeführt und ausgewertet. Dabei wurden in jeweils einer Probe die Blasten mit CD48-Antikörpern (FITC), CD112-Antikörpern (PE) und CD19-Antikörpern (APC) markiert. Auf eine Positivkontrolle für die CD48-Antikörper konnte verzichtet werden, da in jeder Probe auch CD48-positive Zellen enthalten waren. Meist waren dies die CD19-negativen Zellen. Als Positivkontrolle für die CD112-Antikörper diente die Zellkultur K562, hier ergaben sich eindeutig positive Ergebnisse.

Zur FACS-Analyse von CD155 und NG2 dienten unmarkierte Primärantikörper. Die CD155-Antikörper wurden von der Firma Acris bezogen. Die verwendete Inkubationskonzentration wurde durch Titration bestimmt, sie lag bei 4 µg/ml bis 6 µg/ml. Als Positivkontrolle diente die Zellkultur K562, hier ergaben sich klar positive Ergebnisse. Die NG2-Antikörper stellte die AG Jung, Abteilung Immunologie des Instituts für Zellbiologie an der Universität Tübingen zur Verfügung. Sie lagen bei der Inkubation in Konzentrationen von 14 µg/ml bis 42 µg/ml vor. Damit wurden bei den als Positivkontrolle dienenden Hela-Zellen klar positive Ergebnisse erzielt. Mit Ausnahme der verwendeten Primärantikörper wurden die Versuche mit CD155- und NG2-Antikörpern genauso durchgeführt und ausgewertet wie die Qualitativen FACS-Analysen der NKG2D-Liganden mit Primär- und Sekundärantikörpern (Kapitel 3.3).

## **3.8 Anreicherung, Untersuchung und Stimulation von NK-Zellen für Zytotoxizitätstests**

Die vorangegangenen Kapitel handelten von Methoden zum Nachweis bestimmter NK-Zell-Rezeptor-Liganden auf der Oberfläche von B-Reihen-ALL-Blasten. Um die Bedeutung der NK-Zell-Rezeptoren auch in funktionellen Tests untersuchen zu können, wurden vitale NK-Zellen benötigt. Sie stammten von freiwilligen, gesunden Spendern. Diesen wurde jeweils am Tag vor der Durchführung des entsprechenden Zytotoxizitätstestes Vollblut abgenommen und heparinisiert. Die im Vollblut enthaltenen NK-Zellen wurden dann am selben Tag angereichert, über Nacht im Brutschrank aufbewahrt und am folgenden Tag im Zytotoxizitätstest eingesetzt.

### **3.8.1 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen mit Ficoll-Hypaque**

Diese Methode erlaubt die Trennung von peripheren mononukleären Zellen (pMNC) und anderen Blutzellen durch Zentrifugation aufgrund von Dichteunterschieden. Die Durchführung erfolgte wie in der Arbeitsgruppe üblich. Da das genaue Vorgehen bereits in einer Dissertation veröffentlicht wurde [78], wird hier auf die erneute Beschreibung verzichtet.

### **3.8.2 Zellanreicherung mit dem MACS-System**

MACS® ist ein Produktname, der für „Magnetic cell sorting“ steht. Bei dieser Methode setzt man zur Anreicherung bestimmter Zellen Antikörper ein, die chemisch mit Eisenoxid-Molekülen gekoppelt wurden. Da die Eisenoxid-Moleküle von Magneten angezogen werden, können damit markierte Zellen in einem

geeigneten magnetischen Feld zurückgehalten werden, während unmarkierte Zellen aus dem magnetischen Feld hinausgespült werden.

Zur Anreicherung von NK-Zellen dienten hier Eisenoxid-markierte CD56-Antikörper der Firma Miltenyi Biotec. CD56-Antikörper eignen sich gut zur NK-Zell-Anreicherung, da das Adhäsionsmolekül CD56 (Neural cell adhesion molecule, NCAM) nur auf NK-Zellen und bestimmten T-Zellen vorkommt.

Die Durchführung erfolgte wie in der Arbeitsgruppe üblich [78]. Die in der zitierten Arbeit als „Stammlösung B“ bezeichnete Lösung wird in dieser Arbeit als „Stammlösung C“ bezeichnet (Kapitel 2.3).

Nach der CD56-Anreicherung stand eine Mischung aus NK-Zellen und CD56-positiven T-Zellen zur Verfügung, wobei die NK-Zellen den Großteil der Zellen ausmachten. Für einzelne Zytotoxizitätstests dieser Arbeit dienten diese gemischten Zellen als Effektoren. Sie werden künftig als „CD56-angereicherte NK-Zellen“ bezeichnet.

### **3.8.3 T-Zell-Depletion mit Dynabeads**

Für die zentralen Zytotoxizitätstests dieser Arbeit wurden die NK-Zellen in einem weiteren Anreicherungsschritt von den T-Zellen getrennt, um Verfälschungen der Ergebnisse durch T-Zellen zu vermeiden. Dazu dienten Polystyren-markierte CD3-Antikörper der Firma Dynal, die als „Dynabeads“ bezeichnet werden. CD3-Antikörper eignen sich gut zur T-Zell-Depletion, da CD3 nur von T-Zellen und Thymozyten, nicht aber von NK-Zellen exprimiert wird [43]. Auch die T-Zell-Depletion mit Dynabeads wurde wie in der Arbeitsgruppe üblich durchgeführt und wird hier nicht beschrieben, da das genaue Vorgehen bereits veröffentlicht wurde [78]. Die mit dieser Methode angereicherten NK-Zellen werden im Folgenden als „CD3-depletierte NK-Zellen“ bezeichnet.



### **3.8.4 Untersuchung der angereicherten NK-Zellen**

#### **a) Reinheit**

Die Reinheit der angereicherten NK-Zellen wurde immer mittels FACS-Analyse überprüft. Dafür wurden sie mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert. Zur Identifikation dienten FITC-markierte CD56-Antikörper, PE-markierte CD16-Antikörper, und PerCP-markierte CD3-Antikörper. CD56-angereicherte NK-Zellen wurden nur im Zytotoxizitätstest eingesetzt, wenn sie eine Reinheit von mindestens 70 % aufwiesen. CD3-depletierte NK-Zellen wurden nur im Zytotoxizitätstest eingesetzt, wenn sie eine Reinheit von mindestens 90 % aufwiesen. In den meisten Fällen wiesen die CD3-depletierten NK-Zellen sogar eine Reinheit von über 95 % auf.

#### **b) Rezeptoren**

NK-Zellen der Spender, die für die Versuchsserien mit NKG2D-Blockade oder NCR-Blockade dienten, wurden nach der IL-2-Stimulation mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern per FACS-Analyse auf die Expression der entsprechenden Rezeptoren hin untersucht. Die NK-Zellen dieser Spender waren eindeutig positiv für NKG2D, NKp30 und NKp46. Sie waren nach IL-2-Stimulation aber vor Blastenkontakt negativ für NKp44 (Tabelle 4.20).

#### **c) HLA-Typ**

Die HLA-Typisierung der Spender führte das HLA-Labor der Uniklinik Tübingen durch (Tabelle 4.19).

### 3.8.5 Stimulation

Ein Teil der NK-Zellen wurde jeweils zwischen Anreicherung und Verwendung im Zytotoxizitätstest über Nacht mit Interleukin 2 (IL 2) stimuliert. IL 2 lag dabei in einer Inkubationskonzentration von 1000 IE/ml vor.

## 3.9 Zytotoxizitätstests mit Blockade von Rezeptoren oder Liganden

### 3.9.1 Hintergrund

In dieser Arbeit dienen Zytotoxizitätstests dazu, zu untersuchen, in welchem Ausmaß Blockaden von NK-Zell-Rezeptoren oder ihren Liganden die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber Blasten beeinflussen. Dazu wurde ein Set aus „BATDA Reagent C136-100“ und „Europium Solution C135-100“ der Firma Delfia eingesetzt. Bei den damit durchgeführten sogenannten „BATDA release assays“ werden Targetzellen (in diesem Fall Blasten oder K562-Zellen) mit BATDA (bis (acetoxymethyl) 2,2':6',2"- terpyridine - 6,6'" – dicarboxylic acid) beladen. BATDA ist hydrophob und kann die Zellmembran leicht durchdringen. Innerhalb der Zelle werden die Esterbindungen hydrolysiert und es entsteht hydrophobes TDA (2,2':6',2"- terpyridine - 6,6'" – dicarboxylic acid), das die Zellmembran nicht mehr durchdringen kann. So beladene, gewaschene Targetzellen bringt man nun mit den Effektoren (hier NK-Zellen) zusammen. Wenn eine Targetzelle lysiert wird, setzt sie TDA frei. Nach einer festgelegten Inkubationszeit gibt man zum Zellüberstand Europiumlösung zu, die in Verbindung mit TDA stark fluoreszierende Verbindungen bildet. Durch Messen der Fluoreszenzintensität lässt sich dann die Menge des freigesetzten TDA bestimmen. Daraus kann man Rückschlüsse auf die Aktivität der Effektoren ziehen.

Die Methode wird in der Produktinformation des Herstellers genau beschrieben [113]. Bereits 1996 wurde sie von K. Blomberg et al. veröffentlicht [10].

In dieser Arbeit wurde meist die Zytotoxizität von NK-Zellen mit blockierten Rezeptoren verglichen mit der Zytotoxizität von NK-Zellen, bei denen keine Rezeptoren blockiert waren. In einzelnen Fällen wurde die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber Blasten, auf deren Oberfläche Liganden blockiert waren, verglichen mit der Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber Blasten, auf deren Oberfläche keine Liganden blockiert waren.

Als Kontrolle für die NK-Zell-Aktivität dienten K562-Zellen als Targetzellen.

### **3.9.2 Durchführung**

Folgende Schritte wurden nacheinander ausgeführt:

- 1.) Am Tag vor dem Zytotoxizitätstest wurden die NK-Zellen angereichert, geprüft und ein Teil der NK-Zellen mit IL 2 stimuliert (Kapitel 3.8).
- 2.) Am Tag der Durchführung wurden zunächst die als Target dienenden Blasten aufgetaut, gewaschen, resuspendiert, auf 1 Mio. Zellen pro ml eingestellt und 4 µl BATDA-Lösung pro ml Zellsuspension zugegeben. Die Mischung wurde dann unter regelmäßigem Schütteln für 60 Minuten im Brutschrank inkubiert.
- 3.) Währenddessen wurden K562-Zellen aus der Kultur entnommen, gewaschen, ebenfalls auf 1 Mio. Zellen pro ml eingestellt und 2,5 µl BATDA-Lösung pro ml Zellsuspension zugegeben. Die Mischung wurde dann unter regelmäßigem Schütteln für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert.
- 4.) Sollten Rezeptoren auf NK-Zellen blockiert werden, wurden nun die betreffenden NK-Zellen auf 8 bis 10 Mio. pro ml eingestellt, auf FACS-

Röhrchen verteilt und mit Antikörpern gegen die betreffenden Rezeptoren versetzt. Es wurden dabei in der Regel die gleichen Antikörper und Antikörper-Konzentrationen eingesetzt, die bei der FACS-Analyse in der Arbeitsgruppe üblich waren (je 5 µl AK-Fertiglösung auf 100 µl Zellsuspension). Abweichungen hiervon sind bei den einzelnen Versuchen im Ergebnisteil angegeben.

Die Antikörperlösungen enthalten Natriumazid als Konservierungsstoff. Natriumazid kann die Aktivität der NK-Zellen möglicherweise beeinflussen. Deshalb wurden (mit einer Ausnahme) immer auch IgG1-Isotypkontrollen hergestellt, in denen Natriumazid immer in mindestens gleich hoher Konzentration vorlag wie in den Proben.

Die NK-Zellen wurden für 30 Minuten mit den Antikörpern inkubiert.

- 5.) Nach Ende ihrer Inkubationszeit wurden die Targetzellen gewaschen (fünfmal Auffüllen mit 37 °C warmem Medium, Zentrifugieren mit 300 g, 7 Minuten, Abnehmen Überstand, Resuspendieren) und auf die gewünschte Zellkonzentration eingestellt. Diese lag bei 50 000 Zellen/ml für Versuche, in denen keine Liganden auf Targetzellen blockiert werden sollten, bei 200 000 Zellen pro ml für Versuche, in denen Liganden auf Targetzellen blockiert werden sollten.
- 6.) Nach Ende ihrer Inkubationszeit wurden aus den NK-Zell-Suspensionen Verdünnungsreihen hergestellt. Jeder Ansatz wurde zunächst auf eine Konzentration von 1 Mio. Zellen pro ml verdünnt, entsprechend einem Effektor-zu-Target-Verhältnis (E : T) von 20 : 1 im späteren Testansatz. Daraus wurde jeweils eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1 : 2 über vier Stufen hergestellt, die den späteren E : T von 10 : 1, 5 : 1 und 2,5 : 1 entsprach.

- 7.) Für den Testansatz wurden aus der Target-Zell-Suspension nun der sogenannte „Background“-Ansatz und „Ultraschalllyse“-Ansatz hergestellt. Für den „Background“-Ansatz wurde ein Teil der Target-Zell-Suspension erneut zentrifugiert und der Überstand gewonnen. In diesem Überstand waren nun keine BATDA-beladenen Targetzellen mehr enthalten. Für den „Ultraschalllyse“-Ansatz wurden in einem anderen Teil der Target-Zell-Suspension die Targetzellen mithilfe eines Ultraschall-Stabes zertrümmert, sodass in ihnen enthaltenes BATDA in die Lösung überging.
- 8.) Nun konnte der Testansatz in Mikropipettierplatten (U-Form, Rundbodenplatten) zusammengestellt werden. Dabei wurden „Background“, „Spontanlyse“, „Ultraschalllyse“ und „Maximallyse“ jeweils vierfach bestimmt, die Proben wurden jeweils dreifach angesetzt.
- a) „Background“: 100 µl Überstand (s. Schritt 7) + 100 µl Medium (bei Versuchen mit Blockade von Liganden auf Targetzellen 25 µl Überstand + 175 µl Medium)
  - b) „Spontanlyse“: 100 µl Target-Zell-Suspension + 100 µl Medium (bei Versuchen mit Blockade von Liganden auf Targetzellen 25 µl Target-Zell-Suspension + 175 µl Medium)
  - c) „Ultraschalllyse“: 100 µl der entsprechenden Suspension aus Schritt 7 + 100 µl Medium (bei Versuchen mit Blockade von Liganden auf Targetzellen 25 µl der Suspension + 175 µl Medium)
  - d) „Maximallyse“: 100 µl Target-Zell-Suspension + 20 µl Lysepuffer + 80 µl Medium (bei Versuchen mit Blockade von Liganden auf Targetzellen 25 µl Target-Zell-Suspension + 20 µl Lysepuffer + 155 µl Medium)

- e) „Proben“: 100 µl Target-Zell-Suspension (bei Versuchen mit Blockade von Liganden auf Targetzellen 25 µl Target-Zell-Suspension)
- f) Bei Versuchen mit Blockade von Liganden auf Targetzellen wurden nun die entsprechenden Blockade-Moleküle zu den Targetzellen gegeben. Lösliche Rezeptormoleküle mit Fc-Teil der Firma R&D Systems lagen dann in einer Konzentration von 1 µg/ml vor. Antikörper lagen dann in der gleichen Konzentration vor wie bei den entsprechenden FACS-Analysen (s. vorangegangene Kapitel). Diese Ansätze wurden dann für 30 bis 45 min (je nach Blockademolekül) inkubiert und danach mit Medium auf eine Gesamtmenge von je 100 µl/Ansatz gestreckt.
- g) Zu jeder Probe wurden nun 100 µl NK-Zell-Suspension pipettiert. So entstanden Ansätze in verschiedenen Kombinationen von Rezeptor-blockierten oder unblockierten, IL-2-stimulierten oder unstimulierten NK-Zellen in verschiedenen Verdünnungsstufen mit verschiedenen Targetzellen (K562 oder Blasten), mit oder ohne Blockade von Liganden.
- 9.) Die Platten wurden nun an zentrifugiert (100 g, 2 min) und zwei Stunden lang im Brutschrank inkubiert.
- 10.) Nach einer Stunde wurde in eine entsprechende Anzahl von Wells von Mikropipettierplatten (F-Form, Flachbodenplatte) je 200 µl Europiumlösung gegeben und diese abgedeckt auf Raumtemperatur erwärmt.
- 11.) Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Rundbodenplatten mit Proben und Kontrollen nochmals zentrifugiert (200 g, 5 min), da zur weiteren Durchführung nur der Überstand benötigt wurde.

- 12.) Aus jedem Well der Rundbodenplatten wurden nun 20 µl Überstand in je ein mit 200 µl Europium befülltes Well der Flachbodenplatten überführt. Die Flachbodenplatten wurden dann für 20 Minuten unter Lichtabschluss auf einem Rüttler inkubiert.
- 13.) Nun wurden die Platten nacheinander im sogenannten „Multilabel-Counter“ analysiert. Dieses Gerät misst die Fluoreszenzintensitäten, die die einzelnen Wells nach Anregung aussenden. Sie werden dann in Form von Punktwerten gespeichert und als Tabelle ausgegeben.

### **3.9.3 Auswertung**

#### **a) Auswertung der einzelnen Zytotoxizitätstests**

Die Fluoreszenzintensitäten von „Background“, „Spontanlyse“, „Ultraschallyse“ und „Maximallyse“ wurden im Test jeweils vierfach bestimmt, die der „Proben“ wurden jeweils dreifach bestimmt (vergleiche Kapitel 3.9.2, Schritt 8). Zur Auswertung bildet man nun zunächst jeweils den Mittelwert dieser mehrfach bestimmten Werte und verwendet diesen zur weiteren Auswertung. Dadurch werden Ungenauigkeiten minimiert.

„Ultraschallyse“ und „Maximallyse“ geben idealerweise beide die Fluoreszenzintensität wieder, die erreicht wird, wenn alle Targetzellen lysiert wurden. Die Ansätze hatten sich lediglich dadurch unterschieden, wie die Targetzellen im Ansatz zerstört wurden. Bei der „Ultraschallyse“ wurden sie durch Ultraschallwellen zerstört, bei der „Maximallyse“ chemisch durch Lysepuffer. Im Idealfall ergeben sich sehr ähnliche Werte. Ergaben sich deutlich verschiedene Mittelwerte, so wurde in dieser Arbeit jeweils der größere der beiden Werte zur weiteren Auswertung eingesetzt, da angenommen wurde, dass bei der Ermittlung des kleineren Wertes technische Probleme aufgetreten

waren. Im Folgenden ist mit „Maximallyse\*\*“ der größere dieser beiden Werte gemeint.

Während des Tests sterben immer auch Targetzellen spontan ab, also ohne von NK-Zellen lysiert zu werden. „Spontanlyse“ ist ein Maß für diejenige Fluoreszenzintensität, die dadurch entsteht, dass Targetzellen spontan absterben.

„Background“ ist ein Maß für diejenige Fluoreszenzintensität, die allein durch den Zellüberstand im Testansatz erzeugt wird.

Nun kann man folgende Werte berechnen:

1.) Prozentuale Spontanlyse des Zytotoxizitätstests (PSpoL):

$$PSpoL = \frac{Spontanlyse - Background}{Maximallyse * - Background} \cdot 100\%$$

Die PSpoL gibt an, welcher Prozentanteil der Targetzellen während des Tests spontan abgestorben ist. Die PSpoL sollte nicht mehr als 30 % betragen, da sonst ein zu großer Anteil der gemessenen Fluoreszenzintensitäten von der spontanen Targetzelllyse stammt und ein zu geringen Anteil von der Lyse durch die NK-Zellen. Die Ergebnisse sind dann wenig aussagekräftig. Tests mit einer PSpoL von mehr als 30 % wurden deshalb in dieser Arbeit für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt, alle im Ergebnisteil erwähnten Zytotoxizitätstests hatten eine geringere PSpoL.

2.) Prozentuale spezifische Lyse (PSL) einer Probe:

$$PSL = \frac{Probe - Spontanlyse}{Maximallyse * - Spontanlyse} \cdot 100 \%$$



Die PSL gibt an, welcher Prozentanteil der Targetzellen in einem Well von den zugegebenen NK-Zellen lysiert wurde. Sie ist damit ein Maß für die Zytotoxizität der entsprechenden NK-Zellen gegenüber den jeweiligen Target-Zellen.

### **b) Statistische Auswertung der Ergebnisse**

In Kapitel 4.7.1 und 4.7.2 wird die PSL von Blasten durch Rezeptor-blockierte NK-Zellen mit der PSL gleicher Blasten durch unblockierte NK-Zellen verglichen. Dazu werden die jeweiligen PSL-Wertepaare aus sechs bzw. sieben Zytotoxizitätstests mittels Student-t-Test und Wilcoxon-Test für Paardifferenzen auf signifikante Differenzen geprüft. Die Berechnungen wurden mithilfe von Microsoft Office Excel wie von V. Harms [37] beschrieben durchgeführt.

# 4 Ergebnisse

## 4.1 Qualitative FACS-Analyse von NKG2D-Liganden auf Blasten mit Primär- und Sekundärantikörpern

Ziel der FACS-Analysen in diesem Kapitel war es herauszufinden, ob Liganden für den aktivierenden NK-Zell-Rezeptor NKG2D auf kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten vorkommen. Es wurden Blasten von 23 pädiatrischen Patienten mit akuten Leukämien der B-Zellreihe (cALL, prä-B-ALL, pro-B-ALL oder Mischform zwischen diesen Formen) untersucht.

Sechs verschiedene Primärantikörper gegen fünf verschiedene bekannte NKG2D-Liganden kamen zum Einsatz. Sie wurden mit PE-markierten Sekundärantikörpern sichtbar gemacht. Die verwendeten Primärantikörper richteten sich gegen die NKG2D-Liganden MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 und ULBP3. Ein zusätzlicher Antikörper band an MICA und MICB und lieferte somit Informationen darüber, ob untersuchte Blasten MICA und/oder MICB exprimierten.

### 4.1.1 Graphische Auswertung und GeoMean-Werte

Die Auswertung erfolgte zunächst graphisch (siehe auch Kapitel 3.2.4.a). Die Histogramm-Darstellungen der Fluoreszenzintensitäten der Einzelzellen jeder Probe waren dabei bis auf einen Patienten (s. u.) eingipflig. Deshalb erschien

es nicht sinnvoll, für diese einheitlichen Proben Prozentzahlen positiver und negativer Zellen für ein Merkmal anzugeben.

Die Fluoreszenzintensitäten der Proben und Negativkontrollen unterschieden sich bei den Blasten deutlich weniger als bei den als Positivkontrolle dienenden Zellkulturen. Dies weist auf eine geringere Expressionsdichte der NKG2D-Liganden hin.

Aufgrund der geringen Unterschiede der Fluoreszenzintensitäten von Proben und Negativkontrollen konnte mithilfe der graphischen Auswertungsmethode nicht eindeutig zwischen gering positiven und negativen Proben differenziert werden. Deshalb wurden in einem nächsten Schritt die GeoMean-Werte aller Proben und Negativkontrollen ermittelt (s. auch Kapitel 3.2.4.b). Die GeoMean-Werte sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Bei Patient P2 (cALL, erstes Rezidiv) waren die Blasten bereits in der Scatterdarstellung uneinheitlich. Auch die Fluoreszenzhistogramme für die NKG2D-Liganden waren vergleichsweise flach bis sogar doppelgipflig. Auf eine genauere Differenzierung wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet, aus der weiteren, statistischen Auswertung wurde P2 ausgeschlossen.

Ausgeschlossen aus der statistischen Auswertung wurde außerdem:

- P5, da er als einziger Patient eine Blastenkonzentration  $< 70\%$  aufwies
- Ein Wiederholungsversuch (ULBP1 auf Blasten von P23)
- MICB auf Blasten von P6 (wegen einer Verunreinigung konnte die Probe nicht ausgewertet werden, ein Messwert fehlt in der Tabelle)

21 Patienten sind in die weitere statistische Auswertung einbezogen (Tabelle 4.1.A, Abbildung 4.1).

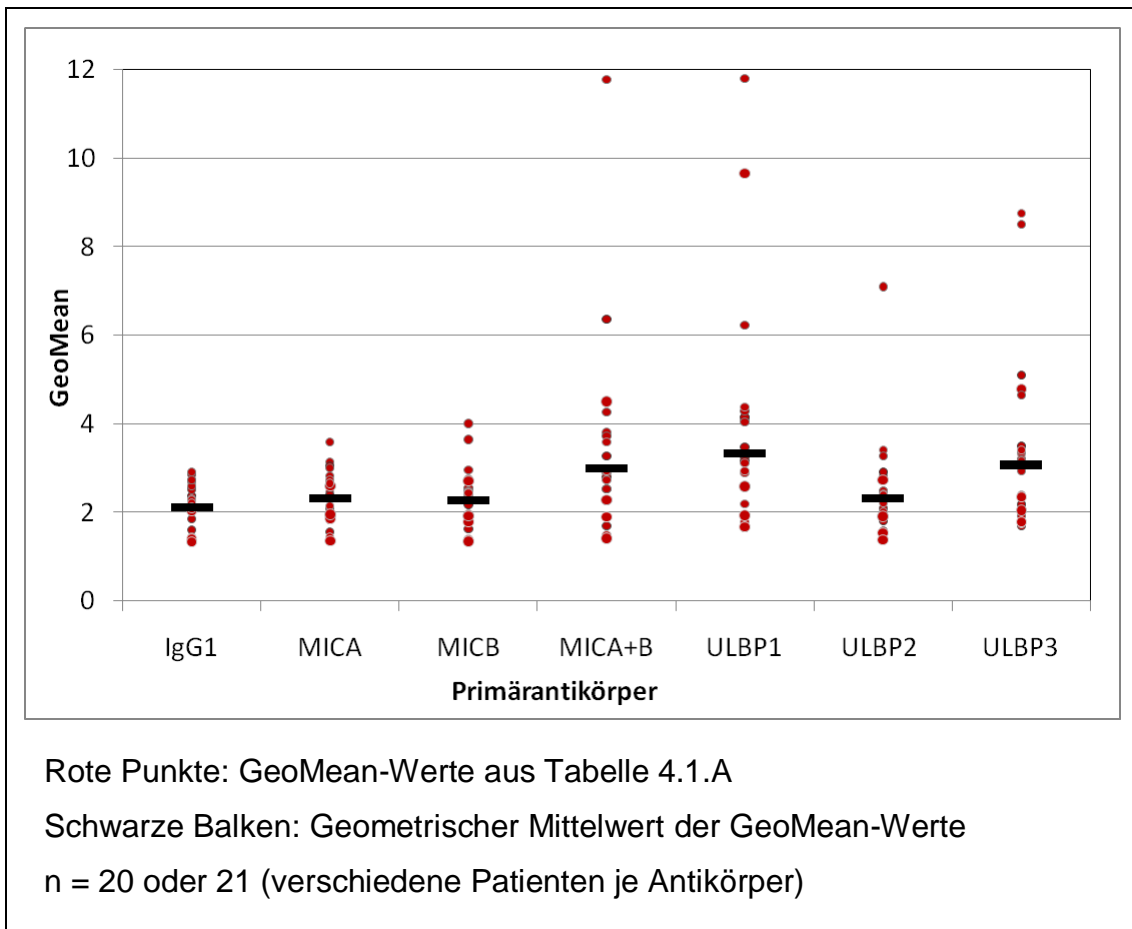


Abbildung 4.1:

*GeoMean-Werte der Qualitativen FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Antikörpern gegen MICA, MICB, MICA+B, ULBP1, ULBP2, ULBP3 und IgG1 als Negativkontrolle (Tabelle 4.1.A)*

Die mittleren GeoMean-Werte liegen für MICA+B, ULBP1 und ULBP3 deutlich, für MICA, MICB und ULBP2 leicht über dem mittleren GeoMean-Wert der Negativkontrolle IgG1. Dies weist bereits darauf hin, dass die entsprechenden Primärantikörper an die Blasten mancher Patienten spezifisch binden. Die mittleren GeoMean-Werte zeigen jedoch nicht, ob die Blasten aller oder nur mancher Patienten spezifische Bindungsstellen aufweisen.

Da bislang kein geeignetes Auswertungsverfahren zur Unterscheidung gering positiver und negativer Proben zur Verfügung steht, wird nun ein entsprechendes neues Auswertungsverfahren entwickelt (Kapitel 4.1.2).

#### **4.1.2 Einführung einer neuen Auswertungsmethode der Qualitativen FACS-Analyse (MNF)**

Die Qualitative FACS-Analyse erlaubte bisher nur eine Unterscheidung deutlich verschiedener Expressionsdichten gesuchter Merkmale auf Zellen oder Proben. Üblicherweise werden Proben mit korrespondierenden Negativkontrollen verglichen, wobei die Verstärkerspannung so eingestellt wird, dass der Großteil der Einzelzellen der Negativkontrolle eine Fluoreszenzintensität zwischen  $10^0$  und  $10^1$  aufweist. Als positiv werden dann Zellen oder Proben gewertet, deren Fluoreszenzintensität oder mittlere Fluoreszenzintensität größer ist als  $10^1$ .

Der Nachweis gering exprimierter Merkmale ist mit dieser Methode nicht möglich, denn der Unterschied der mittleren Fluoreszenz von Probe und Negativkontrolle ist dabei so gering, dass auch der Großteil der niedrig-positiven Zellen eine Fluoreszenz kleiner  $10^1$  aufweist. Dennoch gibt es bei ausreichend großer Stichprobe deutliche Hinweise darauf, ob Antikörper gegen ein gesuchtes Merkmal spezifisch gebunden werden. Darauf wird im Folgenden näher eingegangen.

##### **a) Grundlagen und Definitionen**

Um GeoMean-Werte detailliert statistisch auswerten zu können, muss man sie in Werte umrechnen, die zwischen verschiedenen Patienten und Messreihen vergleichbar sind (zur Definition der Messreihe siehe Kapitel 3.2.4.b). Dazu muss man zunächst wissen, welche Einflussgrößen zu messende GeoMean-Werte beeinflussen und wie GM von diesen Einflussgrößen abhängen.

Folgende Einflussgrößen erweisen sich hier als relevant:

- Verstärkerspannung
- Mittlere unspezifische Fluoreszenzkraft ( $\text{MFK}_u$ ) der untersuchten Zellgruppe
- Mittlere spezifische Fluoreszenzkraft ( $\text{MFK}_s$ ) der untersuchten Zellgruppe
- Zufällige Messfehler

Im Folgenden wird auf die einzelnen Einflussgrößen näher eingegangen:

- **Verstärkerspannung:** Die Verstärkerspannung wird vom Untersucher manuell eingestellt. Ihren Einfluss zeigt Abschnitt b).
- **Mittlere Fluoreszenzkraft (MFK):** Die MFK einer untersuchten Zellgruppe wird hier als theoretische neue Größe eingeführt. Sie wird definiert als eine von der Verstärkerspannung unabhängige, mittlere Fähigkeit einer Zellgruppe, bei Anregung durch den Laser zu leuchten. Für Zellgruppen, an deren Zellen fluoreszierende Antikörper spezifisch gebunden haben, setzt sie sich zusammen aus der mittleren spezifischen Fluoreszenzkraft ( $\text{MFK}_s$ ) und der mittleren unspezifischen Fluoreszenzkraft ( $\text{MFK}_u$ ).

Die MFK selbst kann nicht gemessen oder berechnet werden. Sie wird jedoch als Rechenwert zur Verdeutlichung weiterer Überlegungen benötigt.

- **Mittlere unspezifische Fluoreszenzkraft ( $\text{MFK}_u$ ):** Die  $\text{MFK}_u$  wird durch verschiedene Eigenschaften der untersuchten Zellen bedingt. Beispiele sind die Zellgröße, die Oberflächenbeschaffenheit und die Fähigkeit, fluoreszierende Antikörper unspezifisch zu binden. Idealerweise ist die  $\text{MFK}_u$  einer Probe ( $\text{MFK}_{p,u}$ ) gleich der MFK der zugehörigen Negativkontrolle ( $\text{MFK}_n$ ).

- **Mittlere spezifische Fluoreszenzkraft (MFK<sub>s</sub>):** Die MFK<sub>s</sub> einer untersuchten Zellgruppe hängt ab von der Anzahl der spezifisch gebundenen fluoreszierenden Antikörper pro Zelle und von der Beschaffenheit dieser Antikörper.
- **Zufällige Messfehler:** Beim Färbevorgang der Proben und beim Messen selbst sind Ungenauigkeiten nicht völlig auszuschließen. Systematische Fehler sind statistisch rückwirkend nicht zu erfassen. Für zufällige Fehler wird eine gängige statistische Verteilung angenommen.

#### **b) Einfluss der Verstärkerspannung des FACS-Gerätes auf die gemessenen Fluoreszenzintensitäten**

Der Einfluss der Verstärkerspannung auf gemessene GM ist gut anhand der Eichpopulationen zu beobachten, die bei der Quantitativen FACS-Analyse mit dem QIFIKIT von DAKO gemessen werden (Kapitel 4.2):

Jede Messreihe enthält GeoMean-Werte von fünf verschiedenen Eichpopulationen. Die Eichpopulationen bestehen jeweils aus künstlichen Zellen mit bekannter Bindungskapazität für einen fluoreszierenden Antikörper. Die fünf einzelnen Eichpopulationen weisen dabei deutlich voneinander verschiedene Antikörper-Bindungskapazitäten auf.

Verwendet man gleiche Eichpopulationen in verschiedenen Messreihen, so ist die Anzahl gebundener Antikörper pro Zelle für die einzelnen Populationen immer nahezu identisch. Die GM der einzelnen Populationen variieren dann annähernd nur in Abhängigkeit von der Verstärkerspannung und von zufälligen Messfehlern. Dabei sind die Abweichungen der gemessenen GM durch Messfehler gering im Vergleich zu den Unterschieden der MFI zwischen den einzelnen Populationen.

In Tabelle 4.4 sind die gemessenen GeoMean-Werte aus 16 verschiedenen Messreihen solch gleicher Eichpopulationen aufgeführt. Um zu belegen, dass alle fünf Populationen einer Messreihe denselben Faktor enthalten, wurde folgende Rechnung durchgeführt:

Als Bezugsgröße wurde für jede Population der geometrische Mittelwert der 16 GM aus den verschiedenen Messreihen berechnet. Dann wurden alle gemessenen GM durch den jeweils zugehörigen Mittelwert geteilt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.5 aufgeführt. Man erhält innerhalb einer Messreihe für alle fünf Populationen annähernd denselben Wert (geringe Abweichungen sind durch zufällige Messfehler erklärbar). Umgekehrt gilt nun auch: Multipliziert man für jede Messreihe die gemessenen GM (Tabelle 4.4) mit dem für die Messreihe ermittelten Faktor (Tabelle 4.5), erhält man für jede Population den als Bezugsgröße dienenden Mittelwert.

Die Messreihen hatten sich annähernd nur durch die Einstellung der Verstärkerspannung unterschieden. Die Ergebnisse unterscheiden sich annähernd nur durch einen Faktor, der innerhalb einer Messreihe konstant ist.

Somit gilt:

Die GeoMean-Werte derselben Messreihe enthalten alle den gleichen Faktor  $v$ , der durch die Einstellung der Verstärkerspannung bedingt ist.

$$MFI = MFK \cdot v$$

### c) Einführung der „Mittleren Normal-Fluoreszenz“ (MNF)

Wie im vorigen Kapitel gezeigt, enthält jeder gemessene GeoMean-Wert einen Faktor  $v$ , der von der Verstärkerspannung abhängig ist. Die Größe dieses



Faktors ist jedoch bei den üblichen Messverfahren nicht bekannt. Er ist innerhalb einer Messreihe konstant, variiert jedoch zwischen verschiedenen Messreihen. Um GeoMean-Werte verschiedener Messreihen miteinander vergleichen zu können, muss man sie deshalb zunächst so umrechnen, dass sie den unbekanntem Faktor  $v$  nicht mehr enthalten.

Am einfachsten erreicht man die Unabhängigkeit der Ergebnisse von  $v$ , indem man zwei Werte derselben Messreihe dividiert. Sinnvoll erscheint dabei die Division des GM einer Probe durch den GM der zugehörigen Negativkontrolle:

$$\frac{MFI_p}{MFI_n}$$

Mit

$$MFI = MFK \cdot v$$

(s. Abschnitt b), gilt auch:

$$\frac{MFI_p}{MFI_n} = \frac{MFK_p \cdot v}{MFK_n \cdot v} = \frac{MFK_p}{MFK_n}$$

Damit ist der Quotient der GM von Probe und zugehöriger Negativkontrolle tatsächlich unabhängig von  $v$ .

Mit diesem Quotienten haben schon verschiedene Arbeitsgruppen gearbeitet. Seine Eignung zur Auswertung, sowie die Grenze zwischen als negativ und positiv gewerteten Proben, wurden jedoch bislang nicht begründet.

Eine statistische Begründung der Grenze zwischen positiv und negativ ist nun Ziel der folgenden Überlegungen:

Der Quotient

$$\frac{MFI_p}{MFI_n}$$

ist zwar unabhängig von  $v$  und somit für verschiedene Messreihen besser vergleichbar als die GeoMean-Werte selbst. Dennoch ist er zur weiteren statistischen Auswertung ungeeignet, da die verschiedenen Quotienten aus einer Messserie nicht normalverteilt sind.

Eine **Messserie** wird hier, im Gegensatz zur Messreihe, definiert als Serie von vergleichbaren Messungen des gleichen Merkmals in verschiedenen Messreihen.

In dieser Arbeit besteht eine Messserie z. B. aus der FACS-Analyse von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten verschiedener Patienten, die in verschiedenen Messreihen (z. B. an verschiedenen Tagen) mit gleicher Methode und gleichen Antikörpern angefärbt wurden.

Eine Normalverteilung der Ergebnisse erleichtert die statistische Auswertung enorm, da die Ergebnisse durch zufällige Messfehler variieren. Sind die Ergebnisse normalverteilt, kann auch von einer Normalverteilung der zufälligen Fehler ausgegangen werden.

Nun wird eine neue Größe eingeführt, nämlich die **Mittlere Normal-Fluoreszenz (MNF)**:

$$MNF = \log_{10} \left( \frac{MFI_p}{MFI_n} \right)$$

Die MNF hat folgende Vorteile:

- Die MNF-Werte sind bei vielen Messserien insgesamt annähernd normalverteilt. Ausserdem sind bei manchen Messserien die Ergebnisse zwar insgesamt nicht normalverteilt, jedoch sind dort die MNF bis zu einer gewissen Maximalgröße annähernd normalverteilt. Falls der Mittelwert dieser Gruppe von MNF-Werten nahe bei null liegt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um negative Proben handelt, während die größeren MNF-Werte von positiven Proben stammen (siehe Abschnitt d).
- Ungenauigkeiten durch Messfehler sowie durch die natürliche Variabilität nicht untersuchter Merkmale der einzelnen Zellen werden minimiert (siehe Abschnitt e).
- Die MNF korreliert gut mit der Spezifischen Antikörper-Bindungskapazität (SABC) und ist damit annähernd proportional zur Anzahl spezifisch gebundener Antikörper pro Zelle (siehe Abschnitt f).

#### **d) Normalverteilung der MNF-Werte und Abgrenzung von positiven gegenüber negativen Proben**

Im vorigen Abschnitt wurde die Rechengröße MNF definiert. Dieser Abschnitt zeigt, dass MNF-Werte aus Serien von Qualitativen FACS-Analysen annähernd normalverteilt sind oder sich annähernd in Normalverteilungen zerlegen lassen. Außerdem erklärt er, wie man dadurch positive gegenüber negativen Proben abgrenzen kann.

In Tabelle 4.2 sind die MNF-Werte aufgeführt, die sich aus den GeoMean-Werten der Qualitativen FACS-Analyse aus Kapitel 4.1 ermitteln lassen. Abbildung 4.2 zeigt die Häufigkeitsverteilung der MNF-Werte:

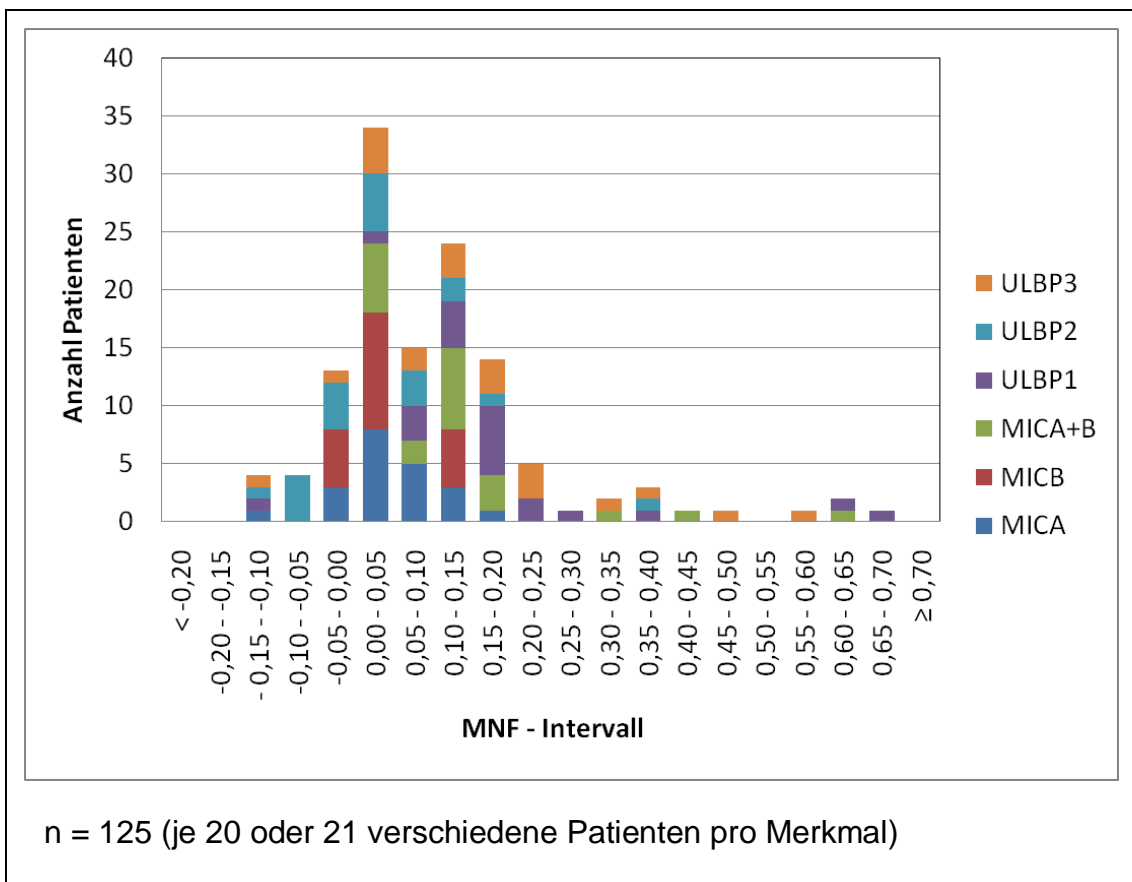


Abbildung 4.2:

Häufigkeitsverteilung der MNF-Werte aus Tabelle 4.2.A (Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Primärantikörpern gegen MICA, MICB, MICA+B, ULBP1, ULBP2 und ULBP3)

Es hat den Anschein, dass die Verteilung mehrgipflig ist, mit Maxima in den beiden Intervallen 0,00 bis 0,05 und 0,10 bis 0,15. Um dies zu erhärten, wurde der Bereich von  $MNF = -0,04$  bis  $MNF = 0,18$  in Abbildung 4.3 noch einmal dargestellt. Dabei sind die Einzelintervalle noch enger gewählt. Aus dieser Darstellung ist zu ersehen, dass sich tatsächlich Maxima in den Intervallen 0,02 bis 0,04 und 0,12 bis 0,14 befinden. Dazwischen liegen vier Intervalle mit niedrigeren Patientenzahlen. Dies macht es sehr wahrscheinlich, dass es sich tatsächlich um einen Tiefpunkt handelt, der durch die unterschiedlich starke

Expression des untersuchten Merkmals zustande kommt. Das Minimum liegt im Intervall 0,08 bis 0,10.

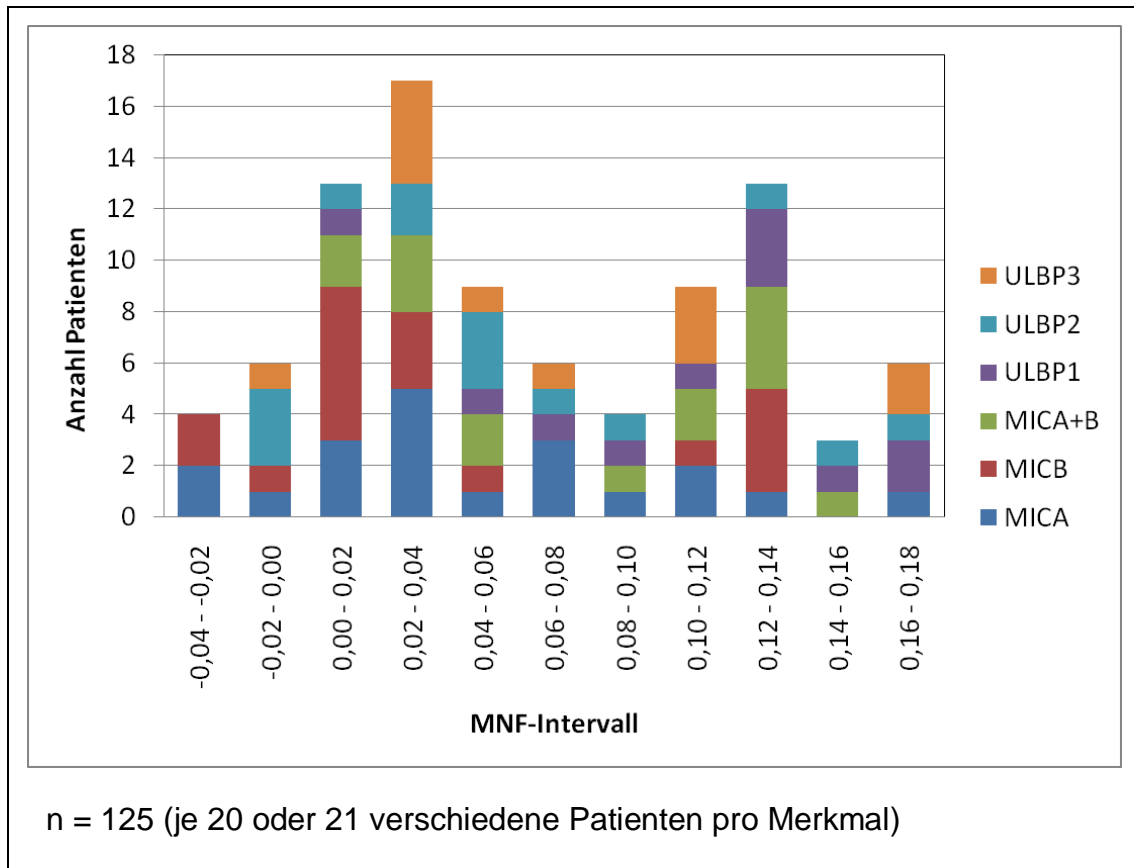


Abbildung 4.3:

Ausschnitt der Häufigkeitsverteilung der MNF-Werte aus Tabelle 4.2.A (Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Primärantikörpern gegen MICA, MICB, MICA+B, ULBP1, ULBP2 und ULBP3)

Die MNF-Werte wurden nun in zwei Gruppen eingeteilt, nämlich in Werte  $< 0,1$  und Werte  $\geq 0,1$ . Die Grenze zwischen beiden Gruppen liegt hier also im Intervall des Minimums der Häufigkeitsverteilung. Zur Einteilung der Proben in positive und negative Proben ist besonders interessant, ob die MNF-Werte  $< 0,1$  annähernd normalverteilt sind und ob ihr Mittelwert signifikant von null abweicht. Um das zu prüfen, wurden die relativen Summenhäufigkeiten der Werte  $< 0,1$  in

sogenanntes Wahrscheinlichkeitspapier eingetragen (Abbildung 4.4). Bei dieser Darstellung ist der Maßstab der Abszisse so verzerrt, dass die relative Summenhäufigkeitskurve einer Normalverteilung eine Gerade ergibt.

Die Punkte in Abbildung 4.4 liegen annähernd auf einer Geraden. Somit sind die zugrundeliegenden MNF-Werte annähernd normalverteilt.

Aus der Darstellung kann man für die MNF-Werte  $< 0,1$  einen Mittelwert von 0,017 und eine Standardabweichung von 0,047 ablesen. Daraus ergibt sich bei  $n = 70$  Werten ein Standardfehler von 0,006. Das 95 %-Konfidenzintervall für den Mittelwert Null liegt damit bei -0,006 bis 0,006. Es ist somit unwahrscheinlich, dass die MNF-Werte  $< 0,1$  von negativen Proben stammen und allein durch die zufällige Varianz zustande kommen.

In dieser Arbeit wird dennoch davon ausgegangen, dass hier die allermeisten Proben mit MNF-Werten  $< 0,1$  in Tabelle 4.2.A negativ für das jeweils untersuchte Merkmal waren, denn eine leichte Anhebung des Mittelwertes gegenüber null könnte auch dadurch zustande kommen, dass die Antikörper gegen die NKG2D-Liganden geringfügig stärker unspezifisch gebunden haben als IgG1. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auf allen Zellen mit sehr geringer Antigendichte alle NKG2D-Liganden exprimiert wurden. Dies kann jedoch auch nicht eindeutig belegt werden. Geht man davon aus, dass die Proben mit MNF-Werten  $< 0,1$  negativ waren, so stammten größere MNF-Werte umso sicherer von positiven Proben. Proben mit  $\text{MNF} < 0,1$  wurden also im folgenden als negativ, Proben mit  $\text{MNF} \geq 0,1$  als positiv gewertet.

Ergänzend zeigt Abbildung 4.5 die relativen Summenhäufigkeiten aller MNF-Werte für ULBP1 und ULBP2 aus Tabelle 4.2.A, eingetragen in Wahrscheinlichkeitspapier.

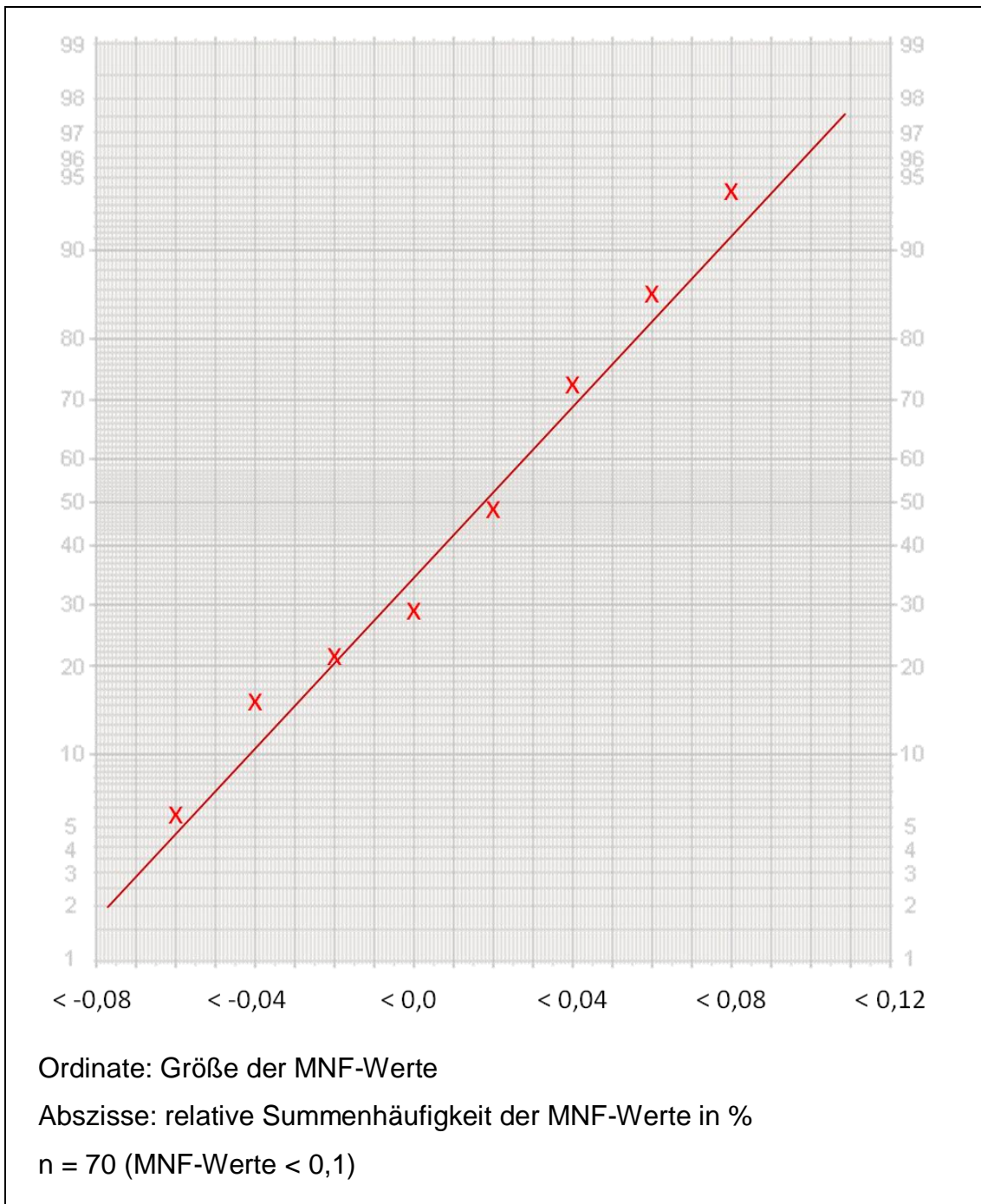


Abbildung 4.4:

Relative Summenhäufigkeitsverteilung aller MNF-Werte < 0,1 aus Tabelle 4.2.A (qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten, je 20 oder 21 verschiedene Patienten, mit Primärantikörpern gegen MICA, MICB, MICA+B, ULBP1, ULBP2, ULB3), eingetragen in Wahrscheinlichkeitspapier

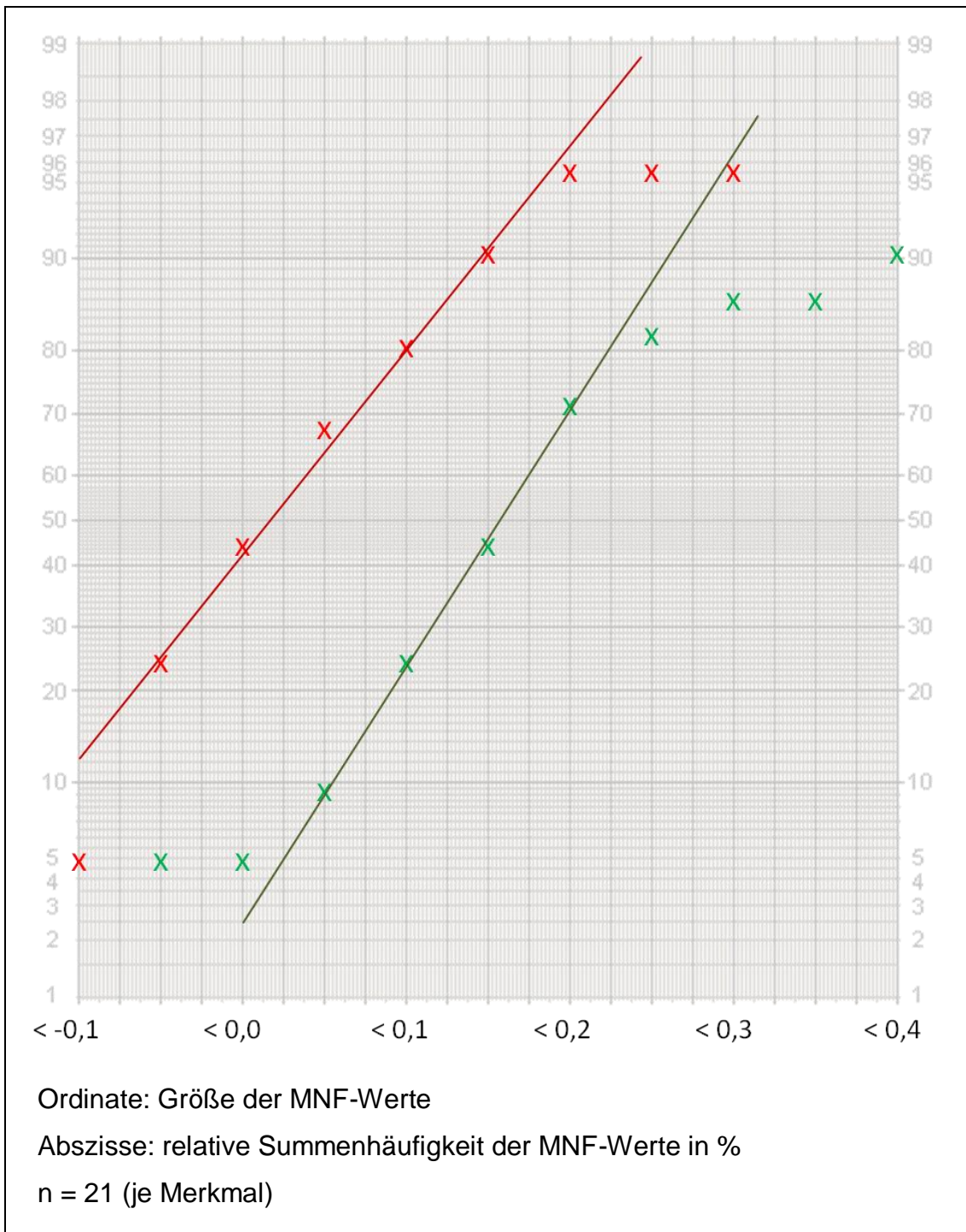


Abbildung 4.5:

Relative Summenhäufigkeit der MNF-Werte von ULBP1 (grün) und ULBP2 (rot) aus Tabelle 4.2.A (qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten), eingetragen in Wahrscheinlichkeitspapier



Beide Verteilungen sind im zentralen Bereich nahezu normalverteilt. Dies ist damit vereinbar, dass die Blasten der meisten Patienten eine untereinander ähnliche, normalverteilte Expressionsdichte des jeweiligen Merkmals aufweisen, und damit, dass MNF-Werte normalverteilter Merkmale eine Normalverteilung ergeben. Der Mittelwert der MNF-Werte von ULBP2 lässt sich mit 0,020 ablesen und liegt damit nahe beim Mittelwert der negativen Proben in Abbildung 4.4. Dies deutet darauf hin, dass ULBP2 von den meisten untersuchten Zellgruppen nicht oder nur mit minimaler Antigendichte exprimiert wurde. Der Mittelwert für ULBP1 ist mit 0,155 deutlich größer als der der negativen Proben. Dies deutet darauf hin, dass die meisten Proben für ULBP1 positiv waren. Die Verteilung der MNF-Werte für ULBP1 entfernt sich für die oberen 30 % der Werte von der Geraden. Hier kann davon ausgegangen werden, dass es sich um Werte von Zellgruppen handelt, die das gesuchte Merkmal in besonders hoher Antigendichte exprimierten.

#### **e) Minimierung von Ungenauigkeiten durch Rechnung mit der MNF**

Jeder einzelne MNF-Wert ist gleich der Differenz der Logarithmen von zwei GeoMean-Werten und damit gleich der Differenz der Mittelwerte zweier Normalverteilungen, nämlich der logarithmierten Fluoreszenzintensitäten der Einzelzellen der Probe und der Negativkontrolle. Schon dadurch werden Ungenauigkeiten durch zufällige Messfehler und die natürliche Variabilität nicht untersuchter Eigenschaften der Einzelzellen reduziert. Erfolgt nun die weitere Auswertung vieler MNF-Werte wie in Abschnitt d) beschrieben, so werden zusätzlich Ungenauigkeiten durch die natürliche Variabilität nicht untersuchter Merkmale zwischen den einzelnen Patienten minimiert und Ungenauigkeiten durch Messfehler noch weiter reduziert.

### **f) Korrelation von MNF mit SABC**

Wir haben nun gesehen, wie sich mit den MNF-Werten rechnen lässt. Aber was kann man sich eigentlich darunter vorstellen?

Aufgrund ihrer Definition ist klar, dass die MNF desto größer wird, je größer die Differenz der mittleren Fluoreszenzintensität einer Probe und der zugehörigen Negativkontrolle ist. Die Differenz ist durchschnittlich desto größer, je mehr fluoreszierende Antikörper bei der Probe spezifisch gebunden haben. Wie viele Antikörper das sind, lässt sich jedoch mit der qualitativen FACS-Analyse allein nicht herausfinden, da nicht bekannt ist, in welchem Verhältnis die Eigenfluoreszenz einer Zelle zur Fluoreszenz des markierten Antikörpers steht.

Wie im Methodenteil geschildert, lassen sich bei der Quantitativen FACS-Analyse mithilfe der Eichpopulationen des QIFIKIT SABC-Werte berechnen. Die SABC einer Probe gibt idealerweise die Anzahl der spezifisch an eine Zelle gebundenen Primärantikörper an. Dabei wirkten sich Messungenauigkeiten bei geringen Antigendichten deutlicher aus als bei hohen Antigendichten. Nur dadurch sind auch Werte kleiner null zu erklären, während in Wirklichkeit keine negative Anzahl von Antikörpern gebunden werden kann.

Abbildung 4.6 zeigt die Korrelation von MNF und SABC für die Werte aus den Tabellen 4.7.A und 4.8.A. Auf der Ordinate ist dabei jeweils die SABC aufgetragen, auf der Abszisse die MNF, wobei beide Werte jeweils aus denselben GeoMean-Werten errechnet wurden (je Probe und Negativkontrolle aus Tabelle 4.6.A). Die Regressionsgerade für die 13 · 6 Punkte und das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  sind im Diagramm angegeben.

(Zur Korrelation von mittels Qualitativer und Quantitativer FACS-Analyse als positiv bzw. negativ gewerteten Proben siehe auch Kapitel 4.2.)

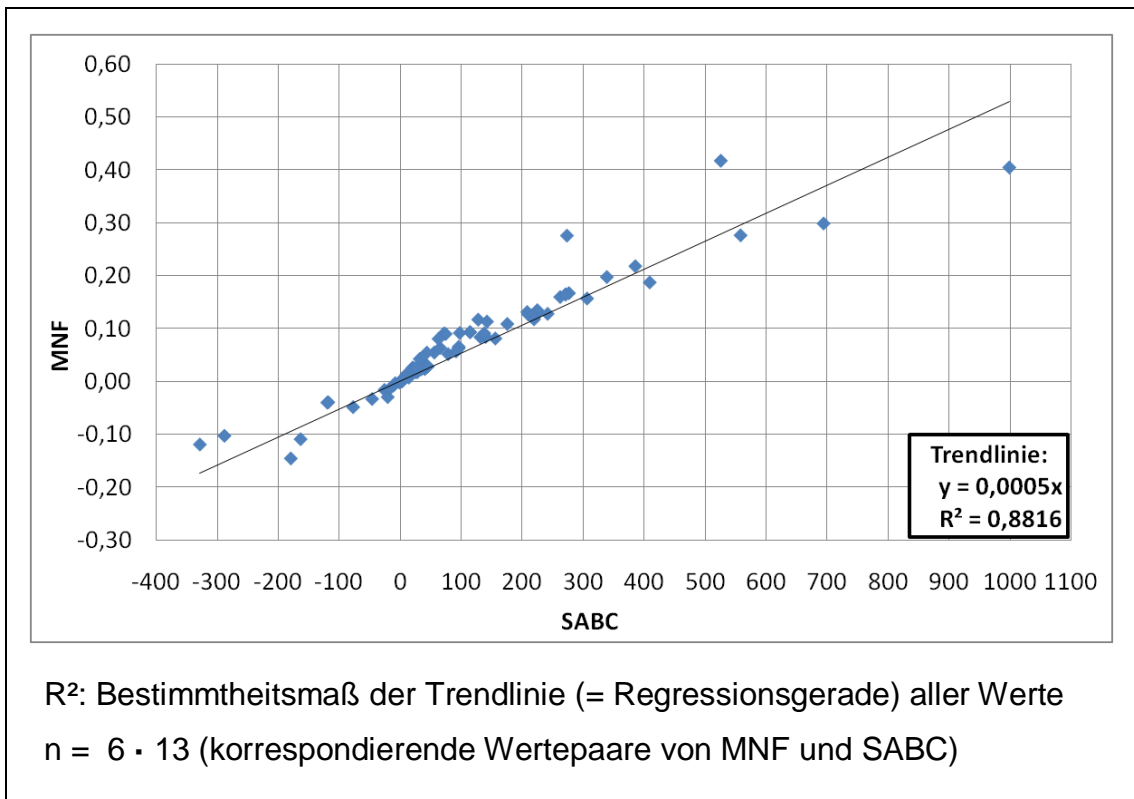


Abbildung 4.6:

Korrelation von MNF- und SABC-Werten (Quantitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit sechs verschiedenen Primärantikörpern gegen NKG2D-Liganden und Blasten von 13 verschiedenen Patienten, Werte siehe Tabelle 4.7 und 4.8)

Für ähnliche Merkmalsträger (B-Reihen-ALL-Blasten), ähnliche Primärantikörper, gleiche Sekundärantikörper, vergleichbare Versuchsdurchführung und Merkmale mit geringer Expressionsdichte korrelieren die Werte mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,8816$  gut.

### g) Zusammenfassung von Kapitel 4.1.2

Die „Mittlere Normal-Fluoreszenz“ (MNF) erscheint hier als sinnvoller und aussagekräftiger Wert zur Auswertung der qualitativen FACS-Analyse. Betracht-

tet wurde sie für Messserien mit einander ähnlichen Merkmalsträgern und Merkmalen mit geringer Expressionsdichte.

Mithilfe der MNF lassen sich Messwerte aus verschiedenen Messreihen direkt miteinander vergleichen, Ungenauigkeiten werden minimiert und Ergebnisse sind meist annähernd normalverteilt oder annähernd in Normalverteilungen zerlegbar. Dadurch kann mithilfe der MNF-Werte auch für Merkmale von geringer Expressionsdichte mit hoher Wahrscheinlichkeit angegeben werden, ob das Merkmal von einer untersuchten Zellgruppe exprimiert wird oder nicht.

Die MNF-Werte korrelieren außerdem gut mit der Spezifischen Antikörper-Bindungskapazität.

Somit erlaubt die in dieser Arbeit entwickelte Auswertungsmethode der qualitativen FACS-Analyse deutlich differenziertere Aussagen als die bislang üblichen Auswertungsmethoden.

### **4.1.3 Ergebnisse der Auswertung mittels MNF**

Kapitel 4.1.1 hat gezeigt, dass bei der Qualitativen FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Antikörpern gegen verschiedene NKG2D-Liganden die mittleren GeoMean-Werte der Proben über dem mittleren GeoMean-Wert der Negativkontrolle liegen (Abbildung 4.1). Um untersuchen zu können, welcher Anteil der Patienten die jeweiligen NKG2D-Liganden auf seinen Blasten exprimiert, wurde in Kapitel 4.1.2 eine neue Auswertungsmethode eingeführt. Ihre Anwendung zur Auswertung der FACS-Analysen aus Kapitel 4.1.1 führt nun zu folgenden Ergebnissen:

Man kann die Proben in Abhängigkeit von ihrem MNF-Wert in positive und negative Proben einteilen (Tabelle 4.3, Abbildung 4.7). Positiv bedeutet dabei, dass die Blasten einer Probe das gesuchte Merkmal mit hoher Wahrscheinlich-

keit exprimieren, negativ bedeutet, dass sie es wahrscheinlich nicht exprimieren. Als Grenze zwischen positiven und negativen Proben wurde hier  $MNF = 0,1$  gewählt. Positiv waren damit 19 % der Proben für MICA, 25 % für MICB, 62 % für MICA und/oder MICB, 76 % für ULBP1, 19 % für ULBP2 und 62 % für ULBP3.

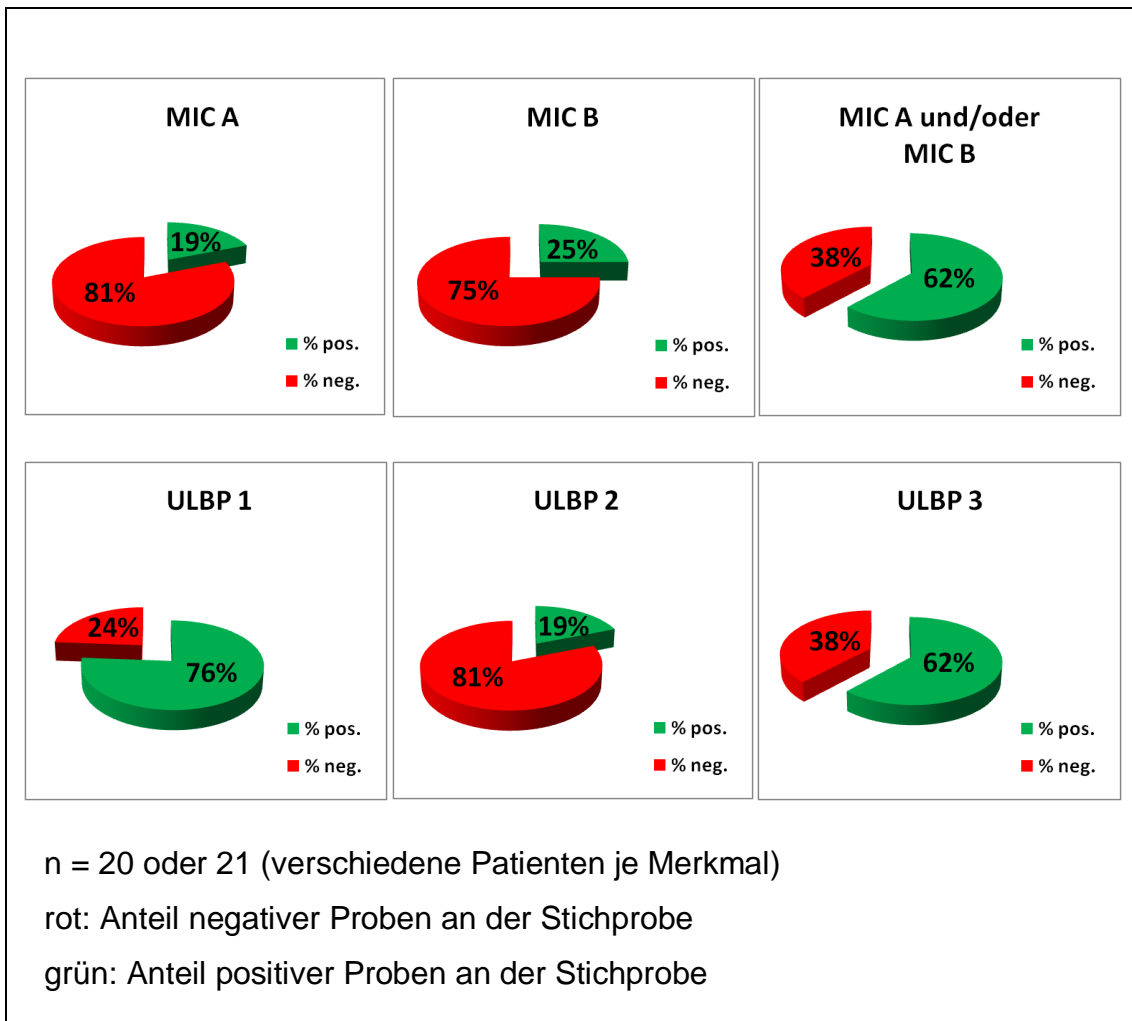


Abbildung 4.7:

Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Antikörpern gegen MICA, MICB, MICA+B, ULBP1, ULBP2 und ULBP3: Anteil derjenigen Patienten an der Stichprobe, deren Blasten positiv für das jeweilige Merkmal waren

## 4.2 Quantitative FACS-Analyse von NKG2D-Liganden auf Blasten

In Kapitel 4.1 wurden die Blasten von kindlichen B-Reihen-ALL-Patienten mittels Qualitativer FACS-Analyse auf das Vorkommen verschiedener NKG2D-Liganden untersucht. Dabei waren NKG2D-Liganden auf den Blasten der meisten Patienten nachweisbar.

Zur Beurteilung der Bedeutung der NKG2D-Rezeptoren auf NK-Zellen für deren zytotoxische Aktivität gegenüber B-Reihen-ALL-Blasten ist nun weiterhin interessant, wie viele solcher Liganden im Vergleich zu anderen Molekülen, wie z.B. HLA-Molekülen, exprimiert werden. Quantitative Aussagen über die Anzahl der vorkommenden Liganden-Moleküle pro Zelle konnten mit der Qualitativen FACS-Analyse jedoch nicht gemacht werden. Deshalb wurden die Blasten von 15 Patienten zusätzlich mittels Quantitativer FACS-Analyse untersucht.

Auch hier wurden Wiederholungsversuche, sowie P2 und P5, aus der statistischen Auswertung ausgeschlossen (zur Begründung siehe Kapitel 4.1.1). Damit verbleiben 13 Patienten zur weiteren Auswertung (gemessene GeoMean-Werte siehe Tabelle 4.6).

Die Spezifische Antikörper-Bindungskapazität (SABC) einer Zellpopulation berechnet man mithilfe von Eichpopulationen aus den gemessenen GeoMean-Werten. Sie bezeichnet diejenige Anzahl von Primärantikörpern, die im Mittel von EINER Zelle spezifisch gebunden werden. Sie ist idealerweise gleich der oder proportional zur Anzahl der gesuchten Merkmale auf der Zelloberfläche. Die ermittelten SABC-Werte sind in Tabelle 4.8 und Abbildung 4.8 dargestellt.

Der maximal ermittelte SABC-Wert für eine Art von NKG2D-Liganden lag hier bei rund 1 000 gebundenen Primärantikörpern pro Zelle, für die Summe aller

fünf untersuchten NKG2D-Liganden ergaben sich maximal rund 1 500 spezifisch gebundene Primärantikörper pro Zelle. Damit lag die Expressionsdichte der Liganden des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors NKG2D auf den untersuchten Blasten deutlich unter der Expressionsdichte der HLA-Klasse-I-Moleküle, die auf NK-Zellen inhibierend wirken. Für diese ergaben sich Werte von rund 50 000 – 370 000 gebundenen Antikörpern pro Zelle (Kapitel 4.5).

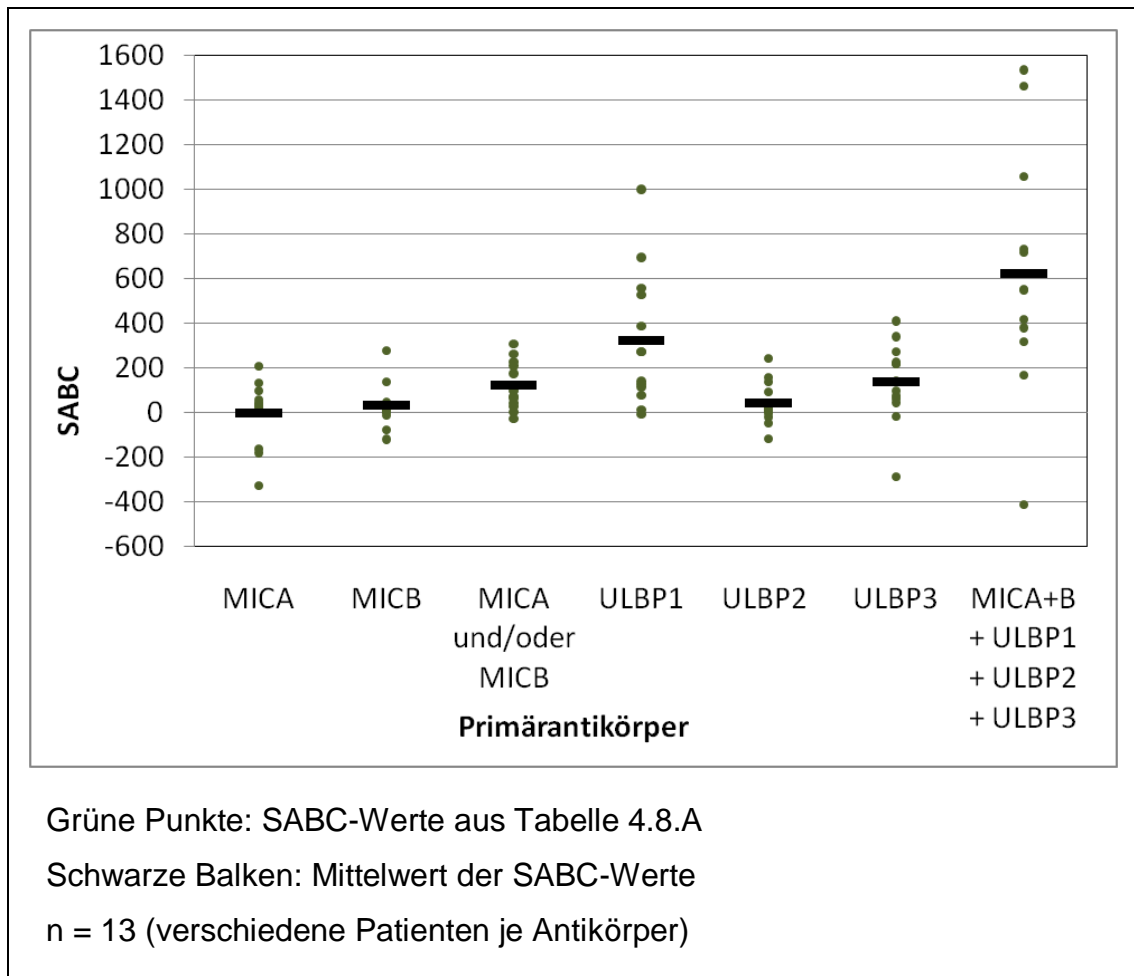


Abbildung 4.8:

Spezifische Antikörper-Bindungskapazität (SABC) kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten für Antikörpern gegen MICA, MICB, MICA+B, ULBP1, ULBP2 und ULBP3 bei der Quantitativen FACS-Analyse

Auch ermittelte SABC-Werte variieren durch zufällige Fehler. Zufällige Fehler sind dabei desto relevanter, je kleiner die Expressionsdichte eines untersuchten Merkmals ist. Sie sind z. B. bei der Quantitativen FACS-Analyse von HLA-Klasse-I-Molekülen auf kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten wenig relevant. Für die Antikörper gegen NKG2D-Liganden wurden teilweise negative SABC-Werte ermittelt, obwohl natürlich in Wirklichkeit keine negative Anzahl von Antikörpern binden kann. Einzelergebnisse müssen deshalb für gering exprimierte Merkmale als Näherungswerte betrachtet und statistisch weiter ausgewertet werden. Stellt man die Häufigkeitsverteilung aller 6 · 13 ermittelten SABC-Werte als Stabdiagramm dar, ergibt sich Abbildung 4.9.

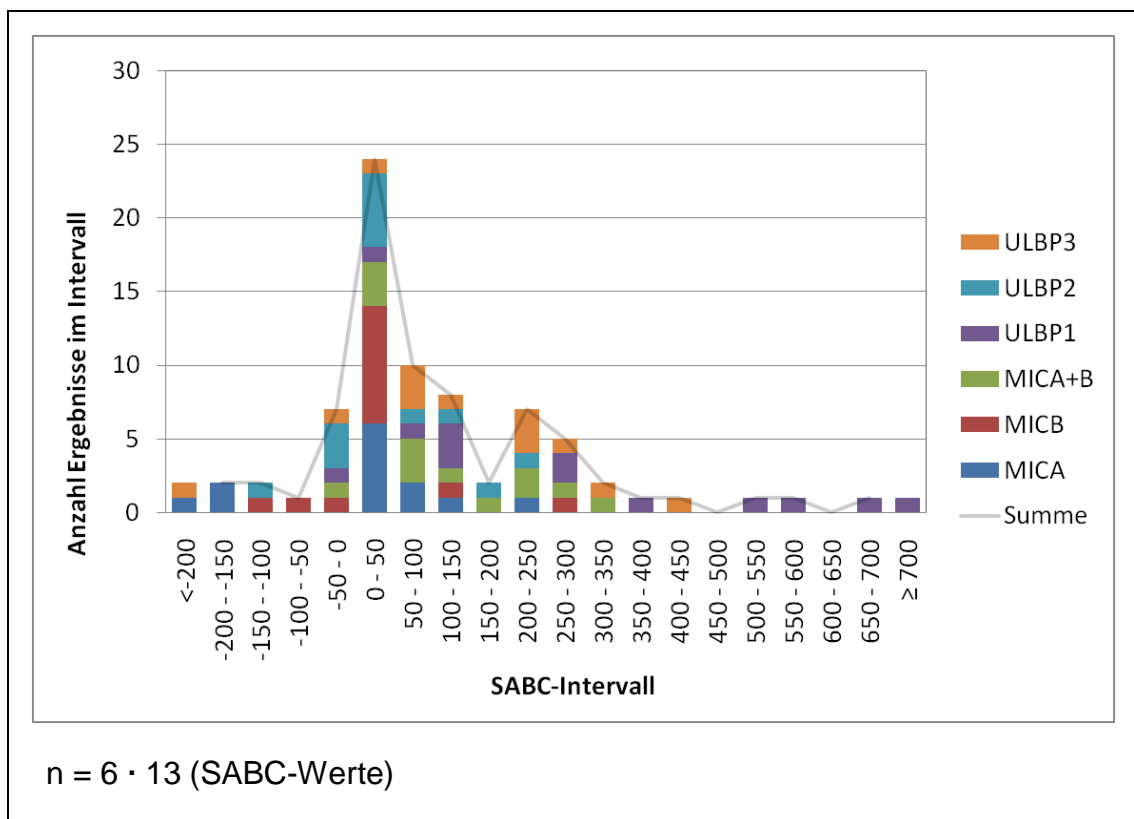


Abbildung 4.9:

Häufigkeitsverteilung der SABC-Werte aus Tabelle 4.8.A (Quantitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Primärantikörpern gegen MICA, MICB, MICA+B, ULBP1, ULBP2 und ULBP3)



Ein deutlicher erster Peak lag in Abbildung 4.9 im Intervall 0 bis 50. Eine annähernde Normalverteilung der SABC-Werte links eines Minimums wie in Abbildung 4.2 und 4.3 war hier nicht ersichtlich.

Ein sehr interessantes Bild ergibt sich, wenn man die Ergebnisse aus Tabelle 4.8.A folgendermaßen in zwei Gruppen einteilt: Der einen Gruppe werden die SABC-Werte derjenigen Patienten und Merkmale zugeordnet, die in Kapitel 4.1.3 als negativ gewertet wurden, also MNF-Werte  $< 0,1$  ergaben. Der anderen Gruppe ordnet man die restlichen SABC-Werte zu. Die Häufigkeitsverteilung der SABC-Werte beider Gruppen ist in Abbildung 4.10 dargestellt.

Die Werte der rot dargestellten Gruppe sind nun annähernd normalverteilt, das Maximum liegt im Bereich 0 bis 50 und somit nahe bei null. Nur zwei SABC-Werte dieser Gruppe sind größer als 200. Eine Überprüfung des größeren dieser beiden Werte ergab in einem unabhängigen Wiederholungsversuch eine SABC von -6 (P17, ULBP1). Die Verteilung ist somit gut vereinbar mit der Annahme, dass die SABC-Werte von Proben stammen, die das gesuchte Merkmal nicht exprimieren.

Die Werte der grün dargestellten Gruppe ergeben eine zweigipflige Verteilung. Diese ist damit vereinbar, dass die Blasten tatsächlich verschiedene Expressionsdichten der untersuchten Merkmale aufweisen. Die SABC-Werte  $< 200$  stammen dann von Proben mit sehr niedriger Expressionsdichte des untersuchten Merkmals, während die SABC-Werte  $\geq 200$  von Proben mit höherer Expressionsdichte stammen.

Der Bereich, in dem sich die Verteilung der positiven mit der der negativen Proben überschneidet, ist hier wesentlich größer als er es bei der Qualitativen FACS-Analyse war. Für Proben mit einem SABC-Wert unter 200 besteht dadurch eine große Unsicherheit, ob die Blasten das jeweilige Merkmal exprimiert haben. Blasten, die SABC-Werte  $> 200$  lieferten, haben mit hoher Wahrscheinlichkeit Antikörper spezifisch gebunden.

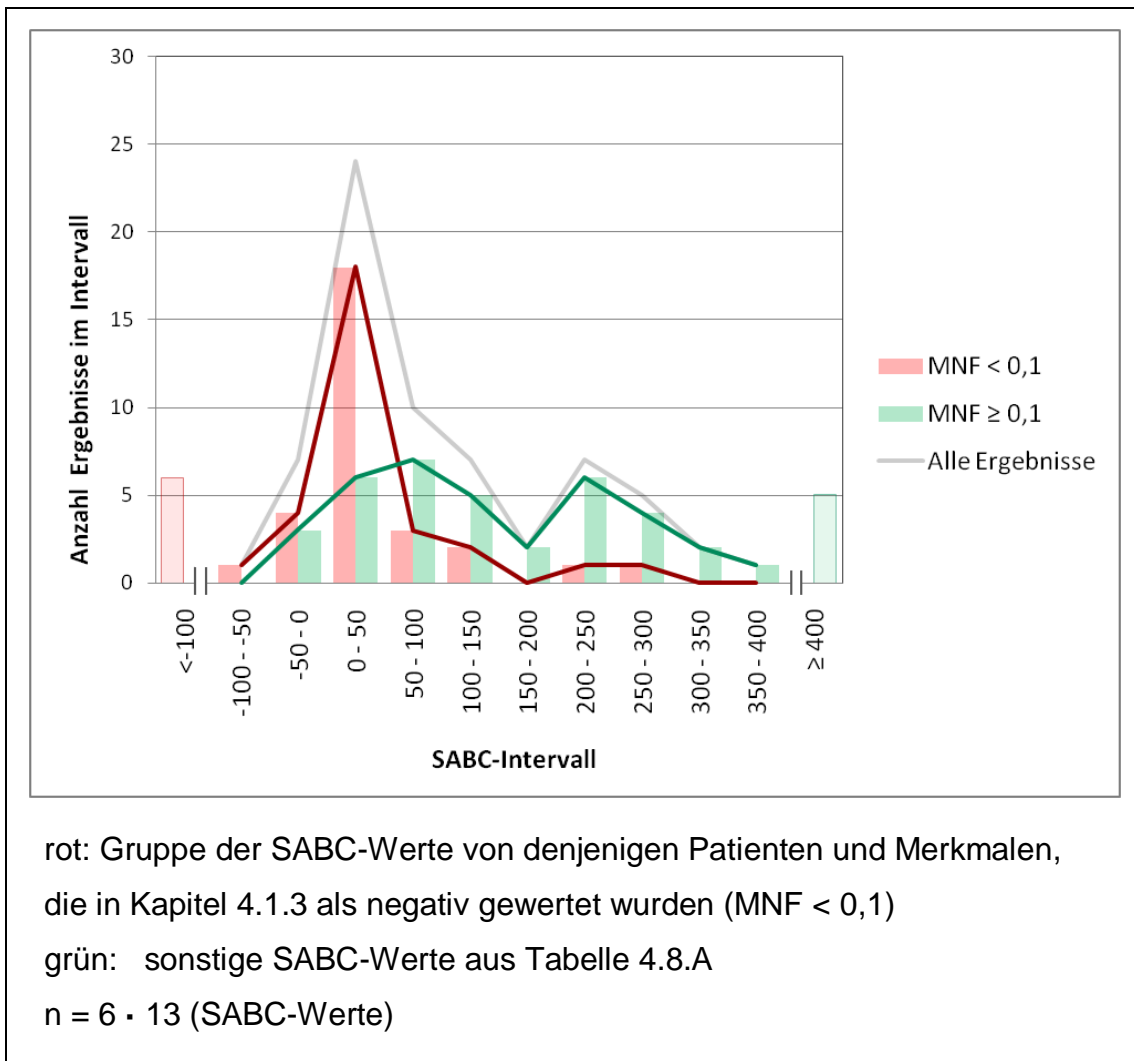


Abbildung 4.10

Häufigkeitsverteilung der in zwei Gruppen eingeteilten SABC-Werte aus Tabelle 4.8.A (Quantitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Primärantikörpern gegen MICA, MICB, MICA+B, ULBP1, ULBP2 und ULBP3)

Zum Nachweis sehr gering exprimierter Merkmale war die Quantitative FACS-Analyse mit dem QIFIKIT von Dako und einem Sekundärantikörper in FITC hier demnach der Qualitativen FACS-Analyse mit einem Sekundärantikörper in PE unterlegen. Für Antikörper-Bindungskapazitäten ab etwa 200 lieferte die Quantitative FACS-Analyse jedoch aussagekräftige Ergebnisse.

## 4.3 Qualitative FACS-Analyse von NCR-Liganden und NKG2D-Liganden auf Blasten mit löslichen Rezeptor-Molekülen und Sekundärantikörpern

### 4.3.1 Messserie mit Flebogamma als Negativkontrolle, GeoMean-Werte

Mit dem Nachweis von NKG2D-Liganden auf kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten beschäftigten sich bereits Kapitel 4.1 und 4.2. Eine weitere bekannte Gruppe von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren sind die Natural Cytotoxicity Receptors (NCR), deren Liganden bis heute nicht bekannt sind. Spezifische Antikörper gegen diese Liganden stehen damit nicht zur Verfügung, die Firma R&D Systems bietet jedoch lösliche NCR-Moleküle mit Fc-Teil an. Solche NCR-Moleküle wurden hier zum Nachweis von Liganden mit den Blasten inkubiert. Sie sollten an vorhandene NCR-Liganden auf der Zelloberfläche binden und mit einem PE-markierten, antihumanen Sekundärantikörper in der FACS-Analyse sichtbar gemacht werden.

Zusätzlich wurden FACS-Analysen mit entsprechenden löslichen NKG2D-Molekülen derselben Firma und mit demselben Sekundärantikörper durchgeführt. So konnten die Ergebnisse sowohl innerhalb der Methode (NCR-Liganden vs. NKG2D-Liganden), als auch zwischen den Methoden (indirekte Antikörper vs. lösliche Rezeptormoleküle bei NKG2D-Liganden) verglichen werden.

Als Negativkontrolle dienten hier zunächst Blasten, die mit dem humanen Immunglobulin-Mix Flebogamma und demselben Sekundärantikörper wie die Proben inkubiert wurden.

Als Positivkontrolle für den Nachweis von NKG2D-Liganden dienten Zellen der Zellkulturen K562 und 293T, die NKG2D-Liganden in hoher Antigendichte exprimieren. Für die NCR-Liganden stand keine Positivkontrolle zur Verfügung.

Wie in Kapitel 4.1 begründet, wurden P2 und P5 sowie Wiederholungsversuche aus der statistischen Auswertung ausgeschlossen.

Die Auswertung erfolgte zunächst mittels GM (Tabelle 4.9, Abbildung 4.11).

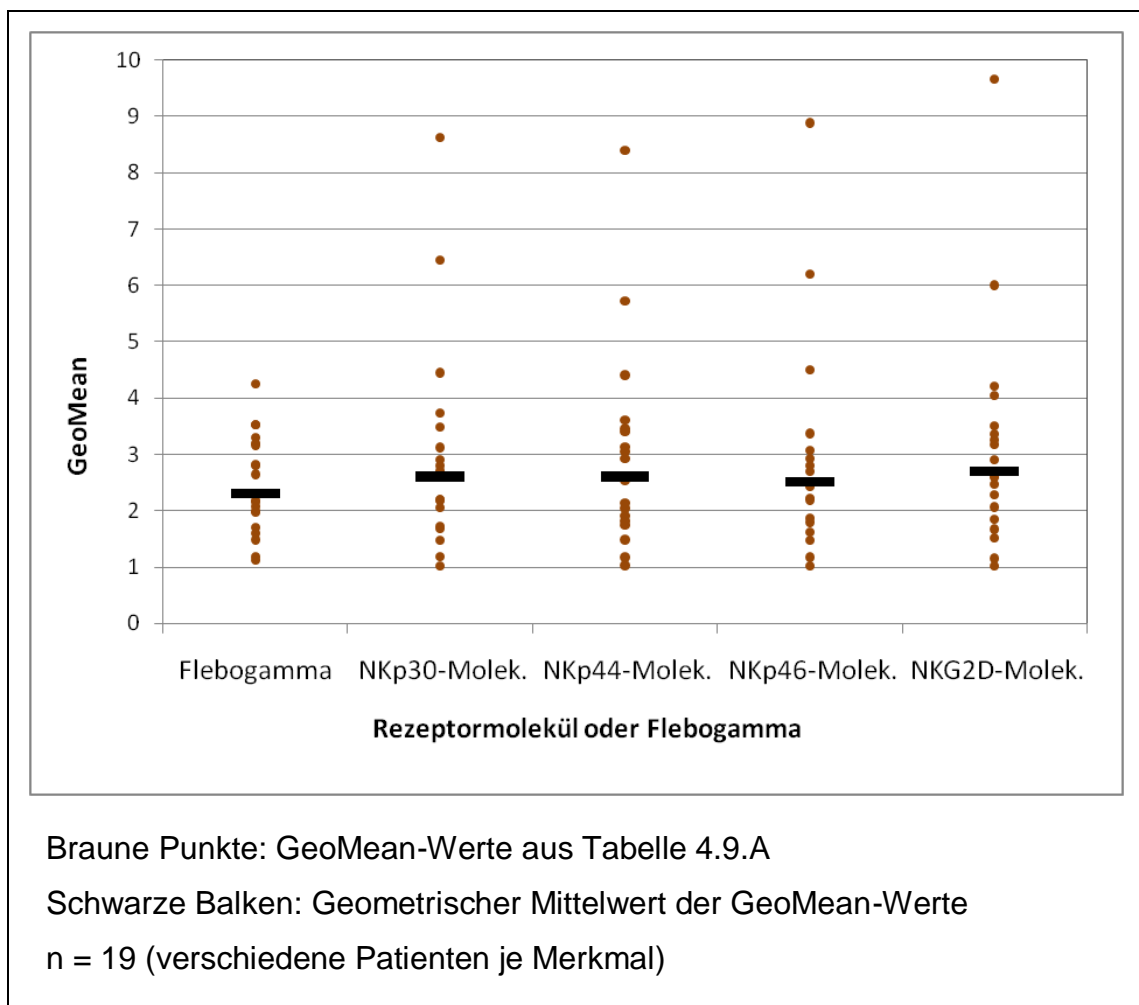


Abbildung 4.11:

GeoMean-Werte der Qualitativen FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit löslichen Rezeptormolekülen und Flebogamma als Negativkontrolle

Die mittleren GeoMean-Werte lagen hier sowohl für die NCR-Moleküle als auch für die NKG2D-Moleküle leicht über dem mittleren GeoMean-Wert der mit Flebogamma hergestellten Negativkontrollen. Der mittlere GM der NKG2D-Moleküle war dabei am größten.

### **4.3.2 Kritische Untersuchung der Methode**

#### **a) Überprüfung der Negativkontrollen**

Im Verlauf kamen Zweifel am Einsatz von Flebogamma zur Herstellung der Negativkontrollen auf. Deshalb wurden einige zusätzliche Messungen durchgeführt.

Für die Blasten einzelner Patienten und für Zellen der als Positivkontrolle für NKG2D-Liganden dienenden Zellkulturen wurden jeweils folgende Ansätze verglichen: Ungefärbte Zellen, nur mit Sekundärantikörpern inkubierte Zellen, Zellen mit Flebogamma und Sekundärantikörpern (entsprechend den Negativkontrollen in Kapitel 4.3.1), Zellen mit löslichen Rezeptormolekülen und Sekundärantikörpern (entsprechend den Proben in Kapitel 4.3.1), sowie Zellen mit Flebogamma, löslichen Rezeptormolekülen und Sekundärantikörpern.

Folgendes fällt bei Betrachtung der GeoMean-Werte (Tabelle 4.10, Abbildung 4.12 auf):

- Die GM der Ansätze aus Blasten ohne Flebogamma sind größer als die GM vergleichbarer Ansätze mit Flebogamma.
- Die GM von Blasten mit löslichen Rezeptormolekülen unterscheiden sich kaum von den zugehörigen Negativkontrollen, wenn man Proben mit Negativkontrollen vergleicht, die entweder beide mit oder beide ohne Flebogamma hergestellt wurden.

- Die GM-Unterschiede durch Flebogamma sind viel größer als die GM-Unterschiede durch die löslichen Rezeptormoleküle.

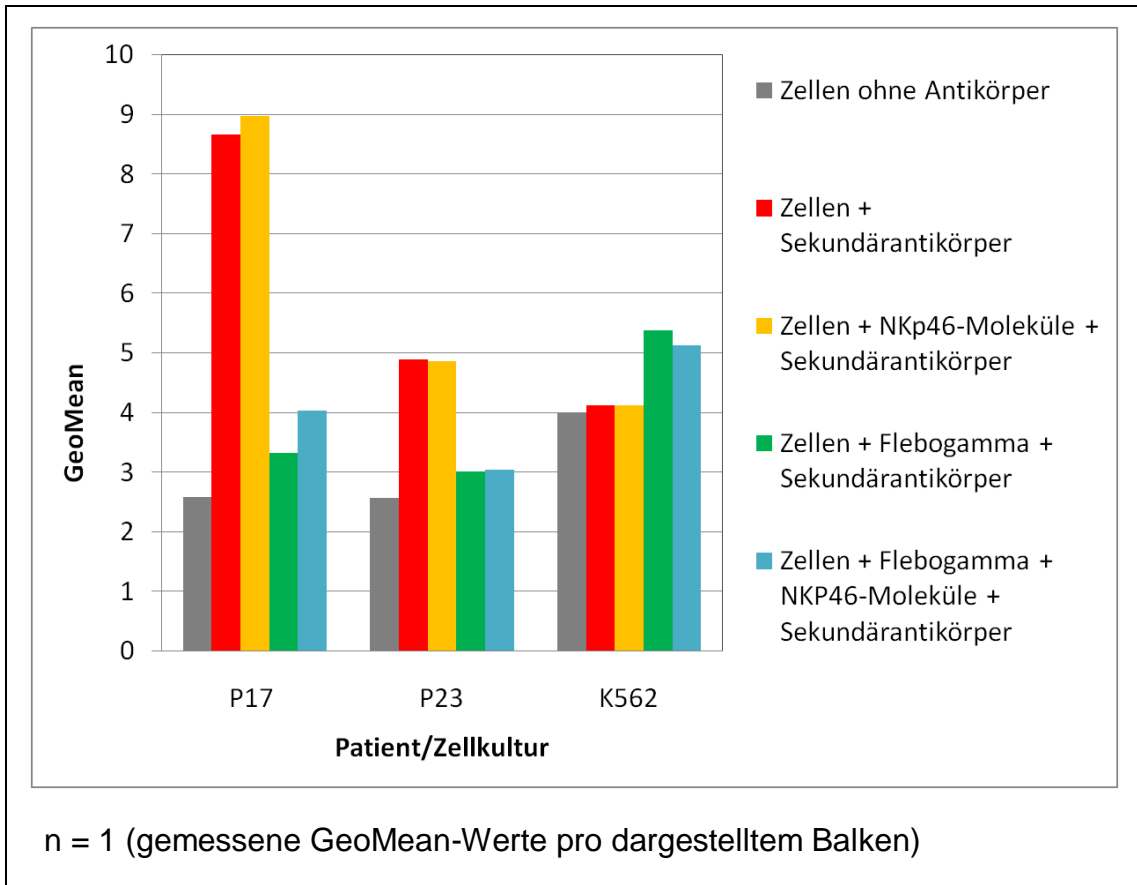


Abbildung 4.12:

Beispielhafte Darstellung einiger GeoMean-Werte aus Tabelle 4.10 (Qualitative FACS-Analyse, Überprüfung der Eignung von Flebogamma zur Herstellung von Negativkontrollen für die Qualitative FACS-Analyse von Blasten mit löslichen Rezeptormolekülen und antihumanen Sekundärantikörpern)

Somit können KEINE Aussagen über spezifische Bindung löslicher Rezeptormoleküle an Zellen getroffen werden, wenn bei der Qualitativen FACS-Analyse Negativkontrollen aus Zellen mit Flebogamma mit Proben aus Zellen ohne Flebogamma verglichen werden. Die mit Flebogamma hergestellten Ansätze in Kapitel 4.3.1 dürfen nicht als Negativkontrolle für die mit den lösli-

chen Rezeptormolekülen ohne Flebogamma hergestellten Proben interpretiert werden.

Aufgrund des knappen Patientenmaterials wurde auf eine Wiederholung der Versuche mit geeigneteren Negativkontrollen verzichtet.

### **b) Positivkontrollen**

Die Zellkulturen K562 und 293T exprimieren NKG2D-Liganden bekanntermaßen in hoher Antigendichte. Sie dienen deshalb in dieser Arbeit als Positivkontrolle zum Nachweis von NKG2D-Liganden.

Unter Berücksichtigung der Erkenntnisse aus Abschnitt a) wurden nun für die Zellkultur K562 Negativkontrollen und Proben je ohne Flebogamma, sowie Negativkontrollen und Proben je mit Flebogamma verglichen (Tabelle 4.10, Abbildung 4.13). Proben mit NCR-Molekülen aus denselben Messserien ermöglichen außerdem einen Vergleich der Proben untereinander.

Folgendes fällt auf:

- Die GM der Proben mit löslichen NKG2D-Molekülen sind hier deutlich größer als die der Negativkontrollen.
- Die GM von ungefärbten Zellen, Negativkontrollen mit und Negativkontrollen ohne Flebogamma unterscheiden sich hier nur wenig.
- Die GM von Proben mit NKG2D-Molekülen sind deutlich größer als die GM von Proben mit NCR-Molekülen.

Die Ergebnisse sind nur damit erklärbar, dass lösliche NKG2D-Rezeptormoleküle spezifisch an K562-Zellen gebunden haben. Der Nachweis von NKG2D-Liganden war hier mit dieser Methode also möglich. Sie scheint damit zumindest zum Nachweis hoher Antigendichten prinzipiell geeignet.

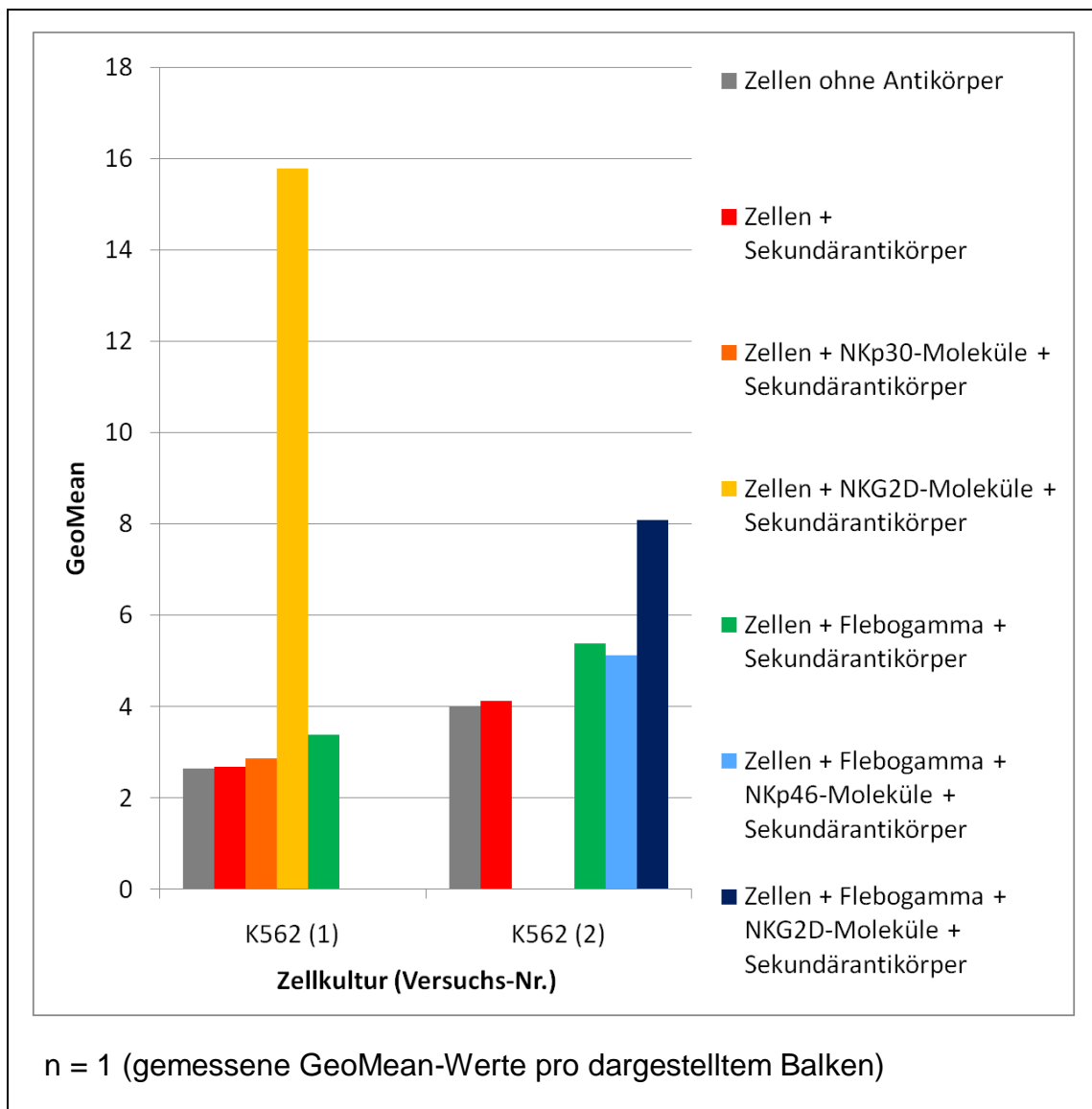


Abbildung 4.13:

Beispielhafte Darstellung einiger GeoMean-Werte aus Tabelle 4.10 (Qualitative FACS-Analyse von NKG2D-Liganden mithilfe von löslichen NKG2D-Molekülen und antihumanen Sekundäranantikörpern, Positivkontrollen)

Für NCR-Liganden stand keine Positivkontrolle zur Verfügung. Deshalb wurde der Nachweis auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten gesunder Spender versucht (Tabelle 4.10). Es konnten jedoch keine spezifischen Zell-NCR-Molekül-Bindungen nachgewiesen werden. Somit konnte kein Beleg dafür



gefunden werden, dass die Methode zum Nachweis von NCR-Liganden geeignet ist.

### **4.3.3 Interpretation der Ergebnisse für die NCR-Liganden**

Ein Nachweis von NCR-Liganden war durch die durchgeführten Experimente nicht möglich. Jedoch konnte auch nicht gezeigt werden, ob die verwendeten löslichen Rezeptormoleküle wirklich spezifisch an NCR-Liganden binden. Es bleibt also unklar, ob solche Liganden überhaupt existieren, ob sie, falls sie existieren, von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten exprimiert werden, und ob die verwendete Methode zum Nachweis geeignet gewesen wäre, wenn es solche Liganden auf untersuchten Zellen gegeben hätte.

### **4.3.4 Interpretation der Ergebnisse für die NKG2D-Liganden**

Wie in Kapitel 4.3.2 gezeigt, waren die in Kapitel 4.3.1 zunächst verwendeten Negativkontrollen nicht als Negativkontrollen zu den dort verwendeten Proben geeignet. Zur Auswertung der Messergebnisse mittels MNF fehlen hier also die Negativkontrollen. Dennoch können die Messergebnisse in folgender Hinsicht ausgewertet werden:

Anstatt aus den GM von Proben und Negativkontrollen die MNF zu berechnen, berechnet man nun die  $MNF^*$  aus den GM der Proben mit NKG2D-Molekülen (Zähler) und den jeweiligen Mittelwerten der GM der Proben mit NCR-Molekülen (Nenner) aus derselben Messreihe. Je größer dabei die  $MNF^*$  für eine Messreihe wird, desto größer war der Unterschied zwischen der Fluoreszenz der Probe mit NKG2D-Molekülen und den Proben mit NCR-Molekülen. Je größer also die  $MNF^*$  für einen Patienten ist, desto wahrscheinlicher haben seine Blasten NKG2D-Moleküle spezifisch gebunden. Falsch-negative Ergeb-

nisse sind hierbei natürlich möglich, nämlich falls auch NCR-Moleküle spezifisch gebunden haben.

Die Häufigkeitsverteilung der so berechneten MNF\*-Werte (Abbildung 4.14) lässt sich, bei einer geringen Probenzahl von  $n = 19$ , nicht in Normalverteilungen zerlegen. Eine Grenze zwischen positiven und negativen Proben ist somit nicht plausibel.

Es fällt jedoch auf, dass die Probe mit dem größten MNF\*-Wert von P14 stammt – dem Patienten, für den auch die größte SABC für NKG2D-Liganden-Antikörper ermittelt wurde (Kapitel 4.2). Geringere MNF\*-Werte hier korrelieren jedoch nicht gut mit den entsprechenden SABC-Werten in Kapitel 4.2.

Die Methode scheint so also zum Nachweis von NKG2D-Liganden mit einer Expressionsdichte ab ca. 1 500 Molekülen pro Blast gut geeignet. Für geringere Expressionsdichten scheint sie in dieser Form nicht geeignet.

#### **4.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse von Kapitel 4.3**

- NCR-Liganden auf kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten konnten nicht nachgewiesen werden.
- Auch konnte nicht gezeigt werden, ob die zum Nachweis verwendeten löslichen NCR-Moleküle überhaupt spezifisch an NCR-Liganden binden, ob die Methode also zum Nachweis überhaupt geeignet ist.
- Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von NKG2D-Liganden mit einer vergleichbaren Methode möglich ist.
- Insgesamt erwies sich die angewandte Methode als noch nicht ausgereift. Eine Wiederholung der Versuche mit besser geeigneten Negativkontrollen könnte eventuell zusätzliche Ergebnisse liefern

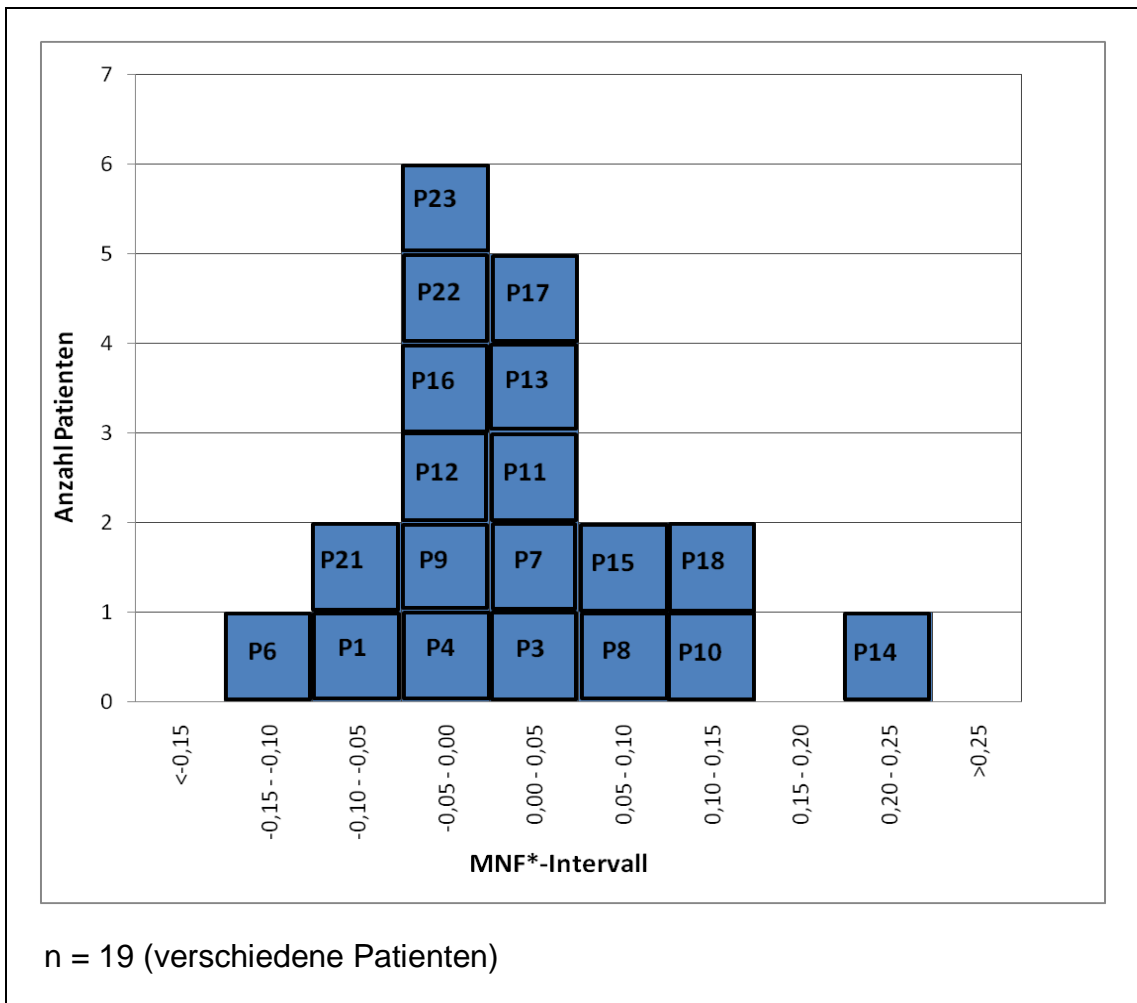


Abbildung 4.14:

Häufigkeitsverteilung der MNF\*-Werte, die aus den GM in Tabelle 4.9 folgendermassen berechnet werden: Logarithmus zu Basis 10 des Quotienten aus dem GM der Probe mit NKG2D-Molekülen und dem geometrischen Mittelwert der GM der drei Proben mit NCR-Molekülen des jeweiligen Patienten (Qualitative FACS-Analyse von NCR-Liganden und NKG2D-Liganden auf kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten mit löslichen Rezeptormolekülen)

## 4.4 Vergleich von drei Methoden der FACS-Analyse

In Kapitel 4.1 bis 4.3 wurden drei verschiedene Methoden der FACS-Analyse zum Nachweis von NKG2D-Liganden bzw. NCR-Liganden verwendet. Dieses Kapitel fasst die beobachteten Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden noch einmal zusammen:

### 4.1: Qualitative FACS-Analyse mit spezifischen Primärantikörpern gegen gesuchte Merkmale und Sekundärantikörpern in PE:

- + Mit dieser Methode ließen sich im Vergleich zu den anderen beiden Methoden die geringsten Expressionsdichten untersuchter Merkmale noch nachweisen.
- Voraussetzung waren spezifische Primärantikörper gegen die gesuchten Merkmale.
- Quantitative Aussagen über die Anzahl der gebundenen Antikörper pro Zelle waren nicht möglich.

### 4.2: Quantitative FACS-Analyse mit spezifischen Primärantikörpern gegen gesuchte Merkmale und Sekundärantikörpern in FITC:

- + Hier waren quantitative Aussagen über die Anzahl der gebundenen Primärantikörper pro Zelle möglich.
- Für Merkmale mit geringer Expressionsdichte ergaben sich nur sehr ungenaue Ergebnisse.
- Voraussetzung waren spezifische Primärantikörper gegen die gesuchten Merkmale.
- Die benötigten Eichpopulationen verursachten erhebliche zusätzliche Kosten.

### **4.3: Qualitative FACS-Analyse mit löslichen Rezeptor-Molekülen und antihumanen Sekundärantikörpern in PE:**

- + Mit dieser Methode konnte man prinzipiell Zellen auch auf nicht bekannte Liganden zu bekannten Rezeptoren hin untersuchen, denn es waren keine spezifischen Primärantikörper gegen gesuchte Liganden notwendig.
- Probleme machte hier das Finden einer geeigneten Positivkontrolle für den Nachweis nicht identifizierter Merkmale.
- Die starke unspezifische Bindung des antihumanen Sekundärantikörpers bereitete weitere Probleme.
- Hier waren nur Merkmale mit hoher Antigendichte mit dieser Methode nachweisbar.

## **4.5 Quantitative FACS-Analyse von HLA-A + HLA-B + HLA-C sowie HLA-E auf Blasten**

Kapitel 4.1 bis 4.3 haben sich mit Liganden von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren beschäftigt. Gegenspieler der aktivierenden Rezeptoren auf NK-Zellen sind, nach heutigem Kenntnisstand, die inhibierenden Rezeptoren. Zu den bekanntesten inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren gehören die verschiedenen Rezeptoren für HLA-A, HLA-B und HLA-C aus der HLA-Klasse I. Auch für den HLA-E-Rezeptor wurde mehrfach inhibierende Wirkung postuliert.

Um quantitative Aussagen über die Expressionsdichte der HLA-Moleküle auf den Blasten der betrachteten Patienten machen zu können, wurden Quantitative FACS-Analysen durchgeführt. Die verwendeten Primärantikörper richteten sich entweder gegen HLA-A + HLA-B + HLA-C (W6/32) oder gegen HLA-E (MEM-E/07).

Die SABC-Werte für den Antikörper gegen HLA-E liegen etwa im Bereich der Summe der SABC-Werte der Antikörper gegen die 5 NKG2D-Liganden. Die SABC-Werte für den Antikörper gegen HLA-A+B+C sind dagegen um Potenzen größer, im Durchschnitt sind sie rund 400-mal so groß (Abb. 4.15, Tab. 4.12).

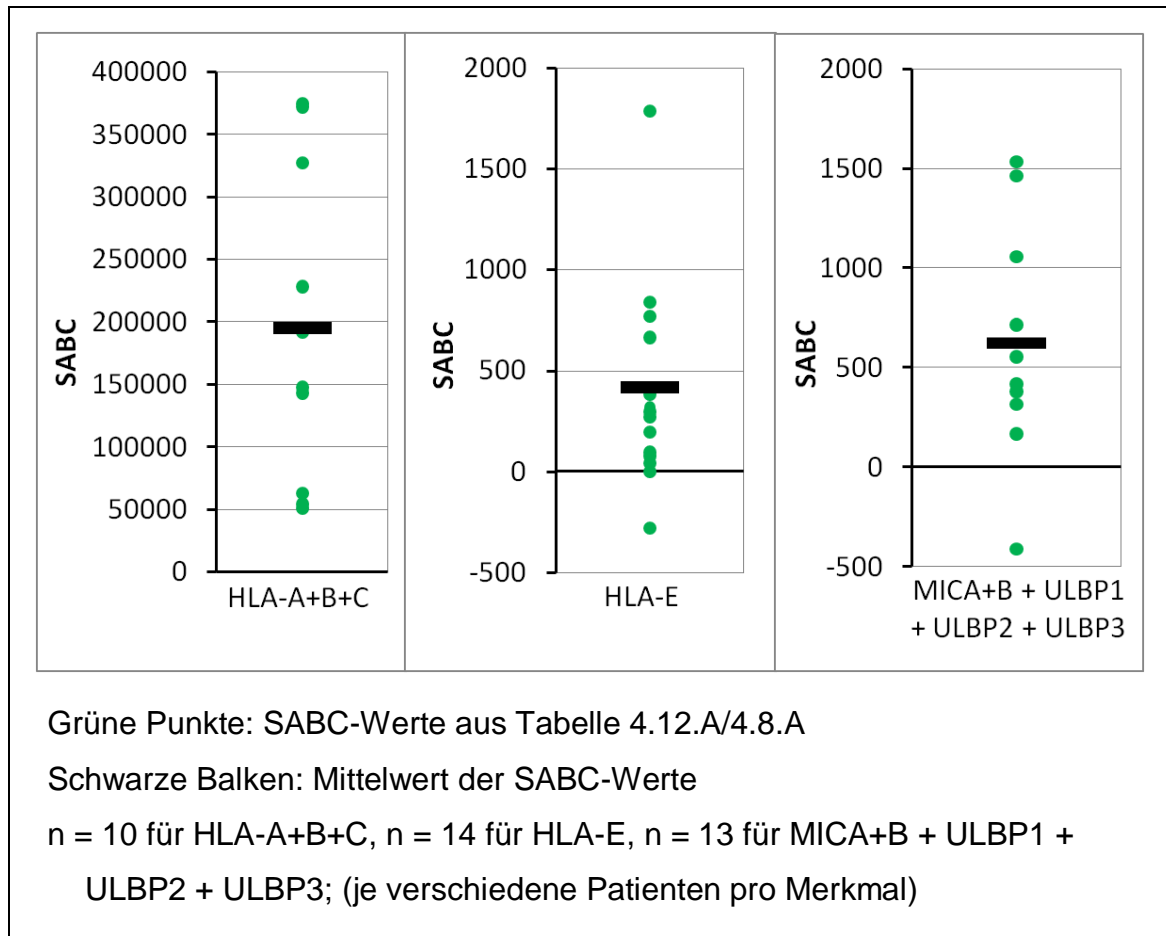


Abbildung 4.15:

*Spezifische Antikörper-Bindungskapazität (SABC) kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten für Antikörper gegen HLA-A+B+C, HLA-E und MICA+B + ULBP1 + ULBP2 + ULBP3 bei der Quantitativen FACS-Analyse (im Vergleich)*

Die SABC-Werte von HLA-A+B+C und HLA-E korrelierten hier nur gering, lediglich 3,15 % der Varianz der SABC von HLA-E waren durch die Abhängigkeit von der SABC von HLA-A+B+C zu erklären (vgl. Werte Tabelle 4.12).

## 4.6 Qualitative FACS-Analyse weiterer Moleküle mit potentiell NK-Zell-modulierender Funktion auf Blasten

### 4.6.1 Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmoleküle dienen der temporären Verbindung von NK- und Zielzelle. Auch ihre verminderte Expression könnte ein Mechanismus der Blasten sein, der Lyse durch NK-Zellen zu entgehen. Deshalb wurden die Blasten der vorn betrachteten Patienten auch auf die Adhäsionsmoleküle LFA-1 und LFA-3 (CD11a und CD58), sowie ICAM-1 und ICAM-3 (CD54 und CD50) hin untersucht.

Die hier zur Qualitativen FACS-Analyse verwendeten direkten Antikörper waren FITC- oder PE-markiert und lieferten eine große Spannbreite an GeoMean-Werten (Tabelle 4.13). Da es sich um andersartige Antikörper handelt als in Kapitel 4.1 bis 4.5, muss die Grenze zur Einteilung der Proben in „positiv“ und „negativ“ mittels MNF neu ermittelt werden. Bei der Häufigkeitsverteilung der MNF-Werte (Tabelle 4.14, Abbildung 4.16) fällt folgendes auf:

Es gibt viele Proben mit  $MNF < 0,1$  und viele Proben mit  $MNF \geq 0,3$ . In den Intervallen von 0,1 bis 0,3 liegt jedoch nur ein einziger MNF-Wert. Dies ist gut damit erklärbar, dass Proben mit  $MNF < 0,1$  das gesuchte Merkmal sehr wahrscheinlich nicht exprimiert haben. Sie werden deshalb hier als „negativ“ gewertet. Proben  $\geq 0,3$  haben sehr wahrscheinlich das gesuchte Merkmal exprimiert und werden deshalb als „positiv“ gewertet. Ob die Probe mit dem MNF-Wert im Intervall 0,2 bis 0,3 das gesuchte Merkmal exprimiert hat, kann nicht entschieden werden. Sie wird deshalb hier als „fraglich positiv“ gewertet (Abb. 4.17).

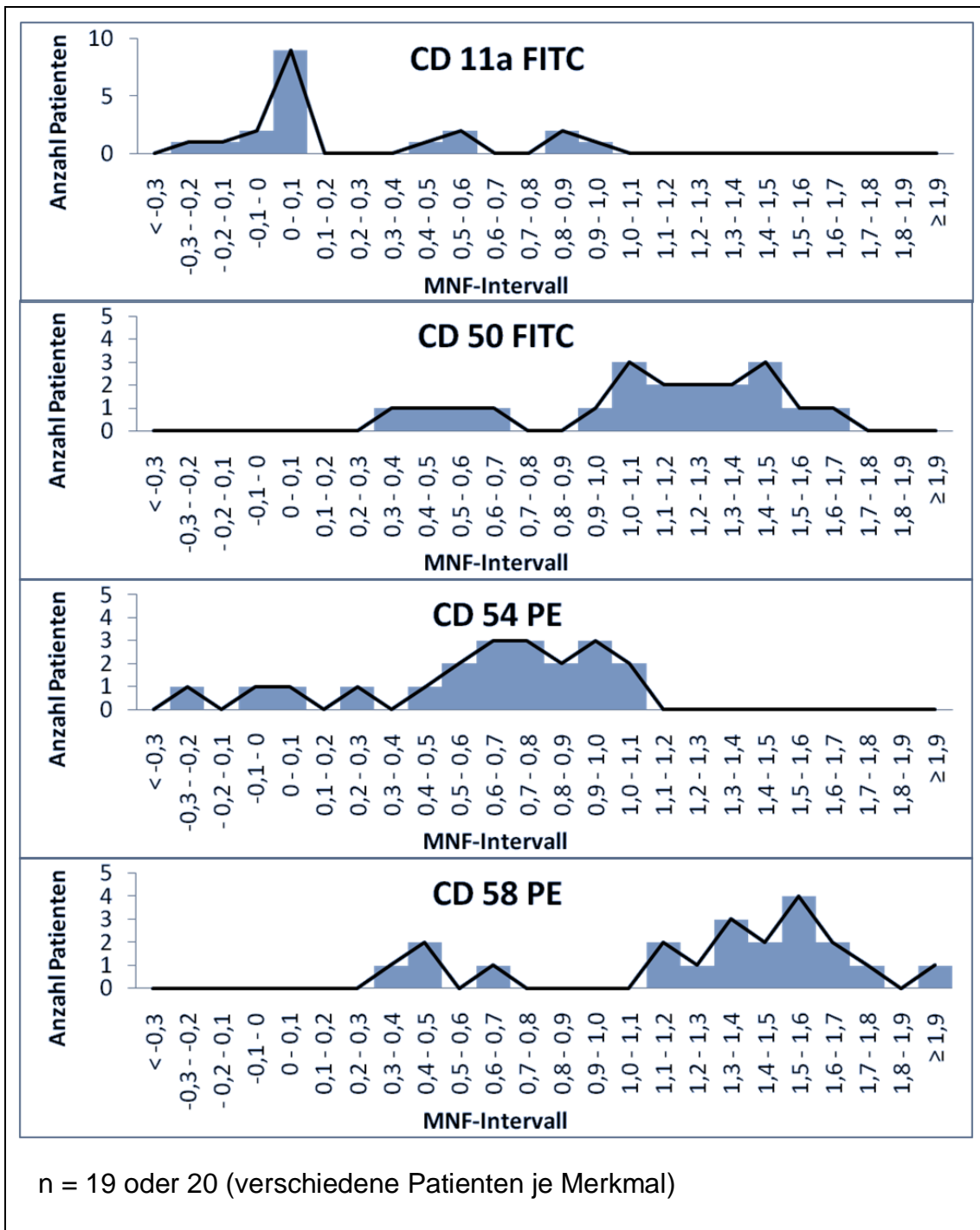


Abbildung 4.16:

Häufigkeitsverteilung der MNF-Werte aus Tabelle 4.14.A (Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Antikörpern gegen CD11a, CD50, CD54 und CD58)



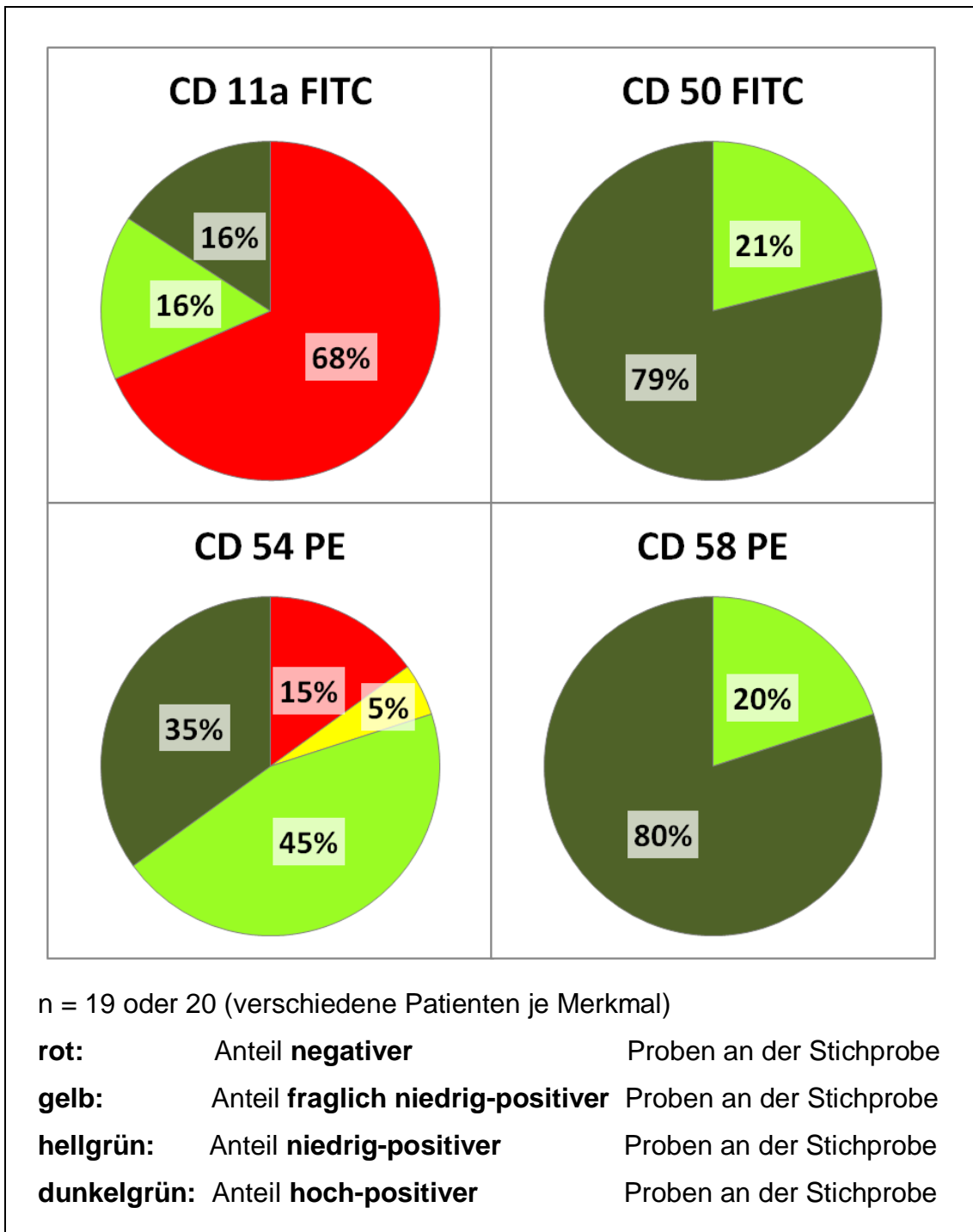


Abbildung 4.17:

Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Antikörpern gegen CD11a, -50, -54, -58: je Anteil derjenigen Patienten an der Stichprobe, die negativ, niedrig positiv und hoch-positiv für das jeweilige Merkmal waren

Alle vier Antikörper hatten für die positiven Proben eine mindestens zweigipflige Verteilung geliefert, wobei immer mindestens ein wertefreies Intervall oder das Intervall eines Minimums an 0,8 angrenzte. Deshalb wurden die positiven Proben in Abbildung 4.17 weiter unterteilt in niedrig positive Proben mit MNF < 0,8 und hoch positive Proben mit MNF  $\geq$  0,8.

Damit waren alle Proben positiv für CD50 und CD58, je rund 20 % davon waren niedrig-positiv und rund 80 % waren hoch-positiv. Für CD54 waren 15 % der Proben negativ, 45 % niedrig-positiv und 35 % hoch-positiv, für eine Probe (entspr. 5 %) konnte nicht entschieden werden, ob sie als niedrig-positiv oder als negativ zu werten ist. Für CD11a waren 68 % der Proben negativ, 16 % waren niedrig-positiv und 16% waren hoch-positiv.

#### **4.6.2 AICL und LLT -1**

Zwei weitere Rezeptoren, über die möglicherweise Blasten die NK-Zell-Aktivität modulieren, sind der aktivierende NK-Zell-Rezeptor NKp80 und der inhibierende NK-Zell-Rezeptor NKR-P1A (= CD161). Das Activation-Induced C-type Lectin (AICL, auch CLEC2B genannt), bindet an NKp80, das Lectin-Like Transcript-1 (LLT-1) bindet an NKR-P1A.

Die Primärantikörper 7F12.D10 und 7G4.F4 richten sich gegen AICL, die Primärantikörper 1B8.B6 und 8A6.D4 richten sich gegen LLT-1. Auch sie wurden, zusammen mit Sekundärantikörpern in PE, zur Qualitativen FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten eingesetzt.

Da keine Positivkontrollen zur Verfügung standen, wurden außerdem Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten gesunder Spender untersucht. Dies ergab jedoch keine eindeutig positiven Ergebnisse. Die Versuche wurden also ohne Positivkontrollen durchgeführt.

Zur Bewertung der aus den gemessenen GM (Tabelle 4.15) berechneten MNF (Tabelle 4.16) muss man auch hier ihre Häufigkeitsverteilung (Abbildung 4.18) betrachten.

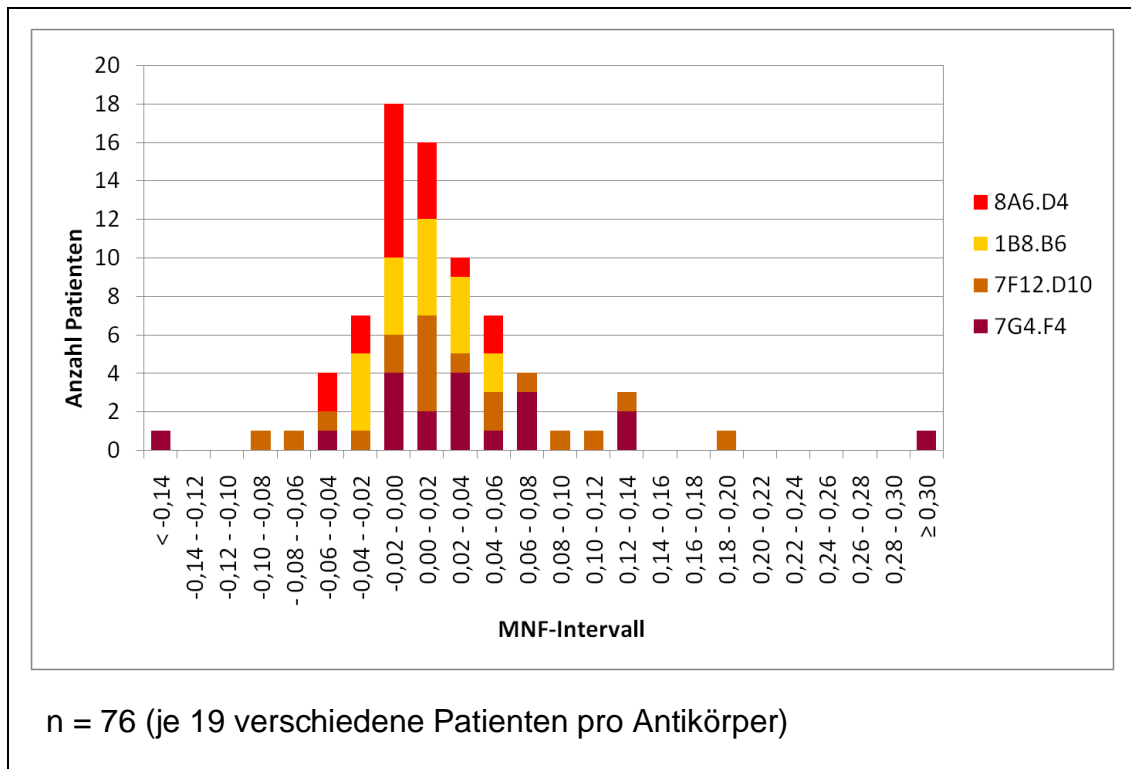


Abbildung 4.18:

Häufigkeitsverteilung der MNF-Werte aus Tabelle 4.16.A (Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Primärantikörpern gegen AICL und LLT-1)

Die meisten MNF-Werte in Abbildung 4.18 waren kleiner als 0,10, mit einem Peak im Intervall - 0,02 bis 0,00. Sie waren annähernd normalverteilt. Somit hatten die Blasten sehr wahrscheinlich keine Antikörper spezifisch gebunden, sie können also als „negativ“ für spezifische Antikörperbindung gewertet werden. Die beiden Proben mit den größten MNF-Werten stammten jeweils von demselben Patienten und wurden mit den beiden verschiedenen Antikörpern gegen AICL hergestellt. Einer der MNF-Werte war mit 0,52 deutlich größer als

die MNF-Werte der als negativ gewerteten Proben. Die Blasten dieses Patienten werden als „positiv“ für spezifische Bindung der Antikörper gegen AICL gewertet. Als „fraglich positiv“ werden die Blasten der übrigen Patienten gewertet, bei denen der Mittelwert der beiden MNF-Werte für AICL oder LLT-1 einen Wert  $\geq 0,1$  ergab (Abbildung 4.19).

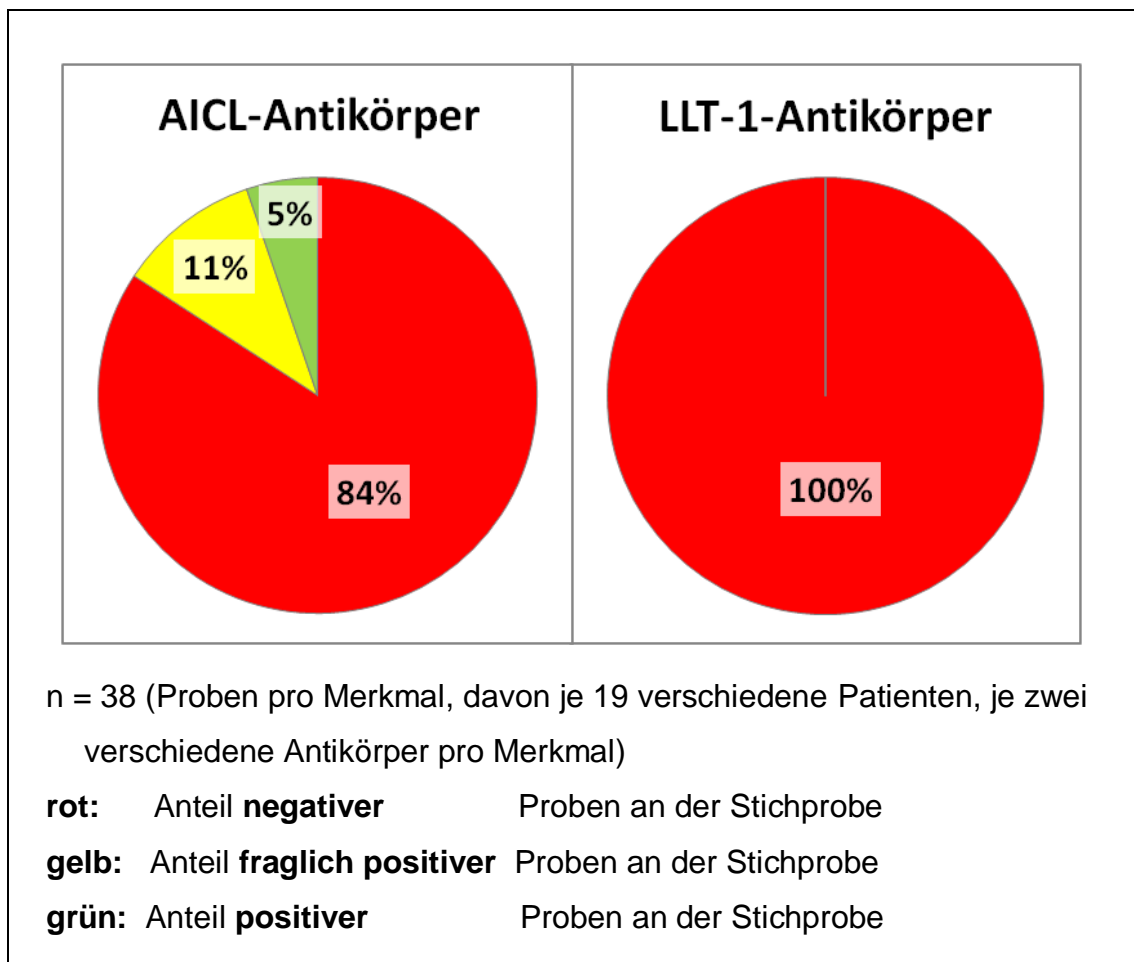


Abbildung 4.19:

Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Antikörpern gegen AICL und LLT-1: Je Anteil derjenigen Patienten an der Stichprobe, die negativ, fraglich positiv und positiv für spezifische Bindung der Antikörper gegen das jeweilige Merkmal waren

Somit waren die Blasten von 5 % der Patienten positiv für spezifische Bindung von Antikörpern gegen AICL, 11 % waren hierfür fraglich positiv und 84 % waren negativ. Die Blasten aller Patienten waren negativ für die spezifische Bindung der Antikörper gegen LLT-1. Da keine Positivkontrollen zur Verfügung standen, kann die Tatsache, dass die Blasten keine Antikörper spezifisch gebunden haben, jedoch nicht damit gleichgesetzt werden, dass sie LLT-1 nicht exprimiert haben.

#### **4.6.3 CD48, CD112, CD155 und NG2**

Auch die Moleküle CD48 (= Blast-1), CD112 (= PRR2) und CD155 (= Poliovirus-Rezeptor (PVR)) könnten, falls sie auf Blasten vorkommen, beim Kontakt mit NK-Zellen deren Aktivität beeinflussen (siehe Kapitel 1.3.4). Für das Vorkommen von NG2 auf kindlichen ALL-Blasten wurde ein Zusammenhang mit den Translationen  $t(4;11)(q21;q23)$  und  $t(11;19)(p13;q23)$  beschrieben. Bei betroffenen Patienten war die Rückfallquote deutlich höher als bei NG2-negativen Patienten. Deshalb wurden kindliche B-Reihen-ALL-Blasten auch auf das Vorkommen dieser Moleküle hin untersucht.

Zum Nachweis von CD48 kamen direkte, FITC-markierte Antikörper zum Einsatz, zum Nachweis von CD112 dienten direkte, PE-markierte Antikörper. Zur FACS-Analyse von CD155 und NG2 wurden Primärantikörper zusammen mit PE-markierten Sekundärantikörpern eingesetzt.

Betrachtet man die Häufigkeitsverteilungen (Abbildung 4.20) der aus den gemessenen GM (Tab. 4.17) berechneten MNF (Tab. 4.18) fällt folgendes auf:

- Für CD48 sind die meisten MNF  $< 0,1$  und nahezu normalverteilt. In den Intervallen 0,1 bis 0,3 gibt es keine MNF-Werte, während es einige MNF-Werte  $> 0,3$  gibt. Die verwendeten Antikörper ähnelten den in Kapitel 4.6.1 verwendeten Antikörpern. Die MNF-Grenzwerte zur Einteilung der

Proben in negativ, niedrig positiv und hoch positiv aus Kapitel 4.6.1 scheinen auch hier sinnvoll und werden übernommen.

- Auch die zum Nachweis von CD112 verwendeten Antikörper ähnelten denen in Kapitel 4.6.1. Hier können jedoch die MNF-Grenzwerte zur Einteilung der Proben in „positiv“ und „negativ“ NICHT übernommen werden, denn im Intervall 0,1 bis 0,2 befindet sich hier nicht wie dort ein Minimum, sondern ein Maximum.

Bei der hier untersuchten geringen Proben-Anzahl von  $n = 19$  kann die Verteilung nicht in mindestens zwei Normalverteilungen zerlegt werden. Auch ist der Peak nicht weit genug von null entfernt, um davon ausgehen zu können, dass alle Proben niedrig positiv für das gesuchte Merkmal waren. Deshalb werden hier alle Proben als „fraglich niedrig-positiv“ gewertet.

- Für CD155 sind die meisten MNF-Werte kleiner als 0,1, im Intervall 0,0 bis 0,1 befindet sich ein Maximum. Wie bei den NKG2D-Liganden in Kapitel 4.1 gibt es auch hier einige Werte in den Intervallen von 0,1 bis 0,3. Bei  $n = 19$  ist jedoch in diesem Bereich kein Minimum abgrenzbar, somit stellt sich auch keine Grenze zwischen positiven und negativen Proben dar. Alle Proben mit  $MNF < 0,3$  werden deshalb hier als „negativ“ gewertet. Die zwei MNF-Werte zwischen 0,3 und 0,8 werden als „niedrig-positiv“ gewertet.
- Für NG2 sind alle MNF-Werte  $< 0,1$ . Sie werden als negativ gewertet.

65 % der Proben sind somit negativ für CD48, 20 % sind niedrig- und 15 % sind hoch-positiv. Für CD112 ist bei allen Proben unklar, ob sie in geringem Umfang spezifisch oder unspezifisch Antikörper gebunden haben, 100 % der Proben sind deshalb fraglich niedrig-positiv. Für CD155 sind 90 % der Proben negativ und 10 % sind niedrig-positiv. Für NG2 sind alle Proben negativ (Abb. 4.21).

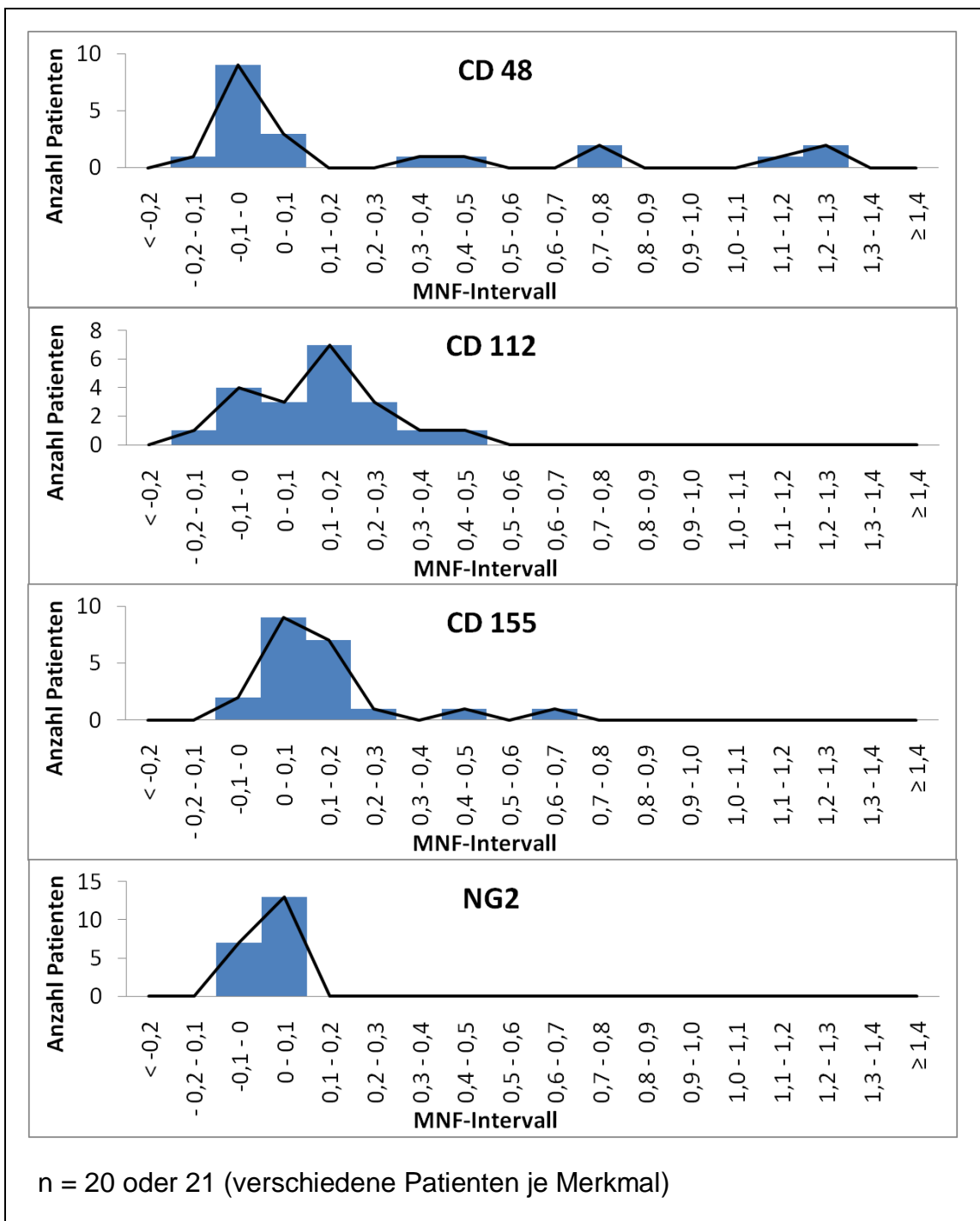


Abbildung 4.20:

Häufigkeitsverteilung der MNF-Werte aus Tabelle 4.18.A (Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Antikörpern gegen CD48, CD112, CD155 und NG2)

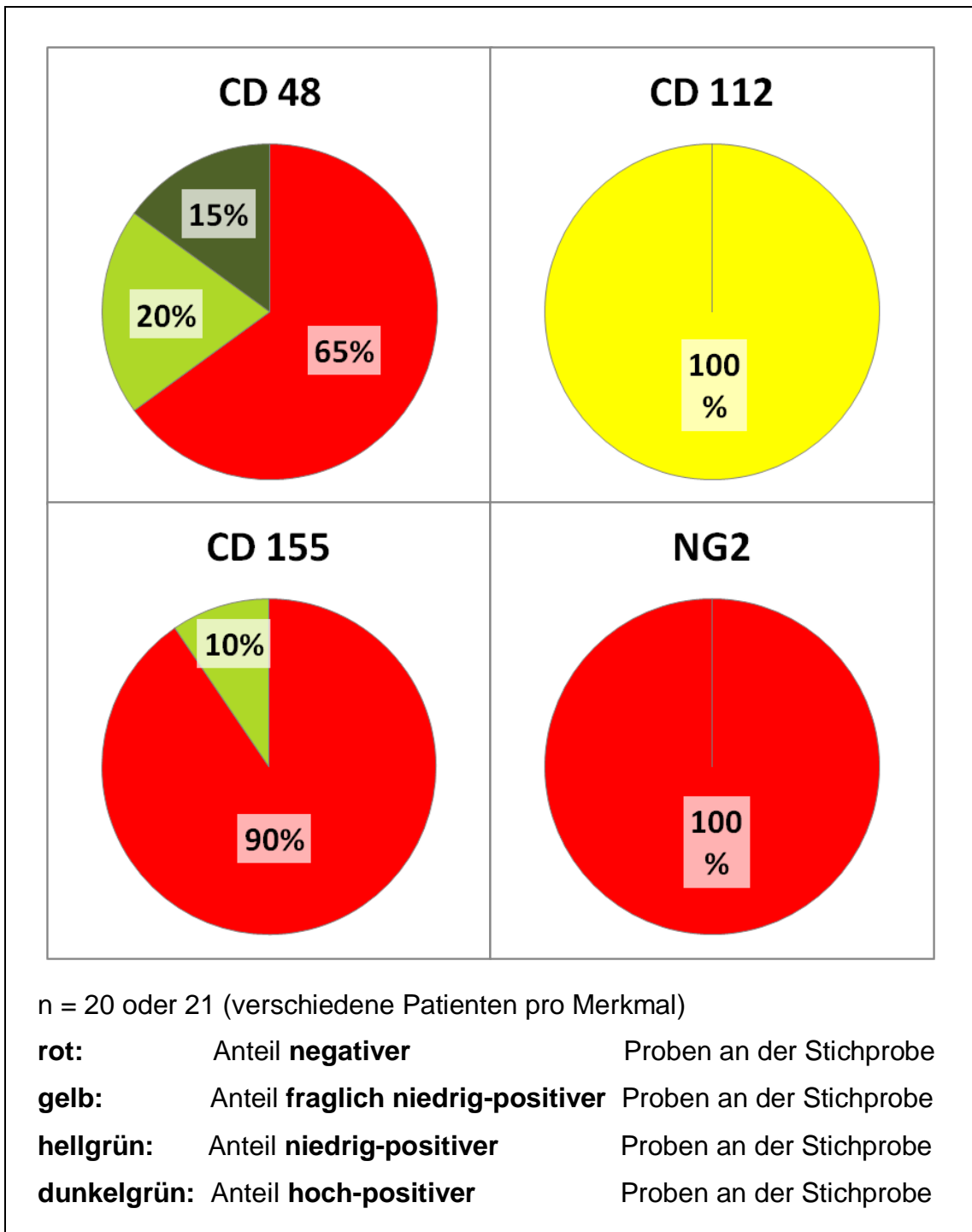


Abbildung 4.21:

Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Antikörpern gegen CD48, -112, -155 und NG2: je Anteil derjenigen Patienten an der Stichprobe, die negativ, niedrig- und hoch-positiv für das jeweilige Merkmal waren



## 4.7 Zytotoxizitätstests zur funktionellen Bedeutung von Rezeptor-Ligand-Paaren

Um Aussagen über die Bedeutung aktivierender und inhibierender Rezeptoren auf NK-Zellen für deren zytotoxische Aktivität gegenüber B-Reihen-ALL-Blasten machen zu können, ist zunächst interessant, für welche dieser Rezeptoren überhaupt Liganden auf den Blasten vorkommen (Kapitel 4.1 bis 4.6). Dieses Kapitel zeigt nun, welchen Einfluss die Blockade verschiedener Rezeptoren oder Liganden auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber den Blasten in sogenannten Zytotoxizitätsassays (= Zytotoxizitätstests) hat, und welcher Zusammenhang dabei mit der Expressionsdichte von HLA-Klasse-I-Molekülen und HLA-E-Molekülen sowie dem Vorliegen eines KIR-Mismatches besteht.

Aufgrund des unerwartet großen Aufwandes, der durch die komplizierte Auswertbarkeit der FACS-Analysen bereits entstanden war, wurden die Zytotoxizitätsassays auf wenige, gezielte Versuche reduziert.

Die angereicherten NK-Zellen für die Assays stammten von freiwilligen gesunden Spendern. Die Blasten stammten von Patienten, deren Blasten in Kapitel 4.1 bis 4.6 untersucht worden waren. Die Auswahl der Spender und Patienten erfolgte nach folgenden Kriterien:

- **Liganden für NK-Zell-Rezeptoren:**  
Es sollten Blasten als Zielzellen dienen, die Liganden für NK-Zell-Rezeptoren exprimierten.
- **Blastenanteil:**  
Ein hoher Blastenanteil (> 75 %) war Voraussetzung für blastenspezifische Ergebnisse.

- **HLA-Klasse-I-Expressionsdichte der Blasten:**

Die HLA-Klasse-I-Expressionsdichte auf Zielzellen beeinflusst die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen. Leider war es nicht möglich, Blasten mit etwa gleich starker HLA-Expression auszuwählen, ohne die anderen Auswahlkriterien zu verletzen. Die SABC der Blasten für HLA-A+B+C-Antikörper war aber in Kapitel 4.5 bestimmt worden und kann bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

- **KIR-Mismatch:**

Es sollten Spender-Patient-Konstellationen mit und ohne sogenanntes „KIR-Mismatch“ verwendet werden (zur Erklärung des KIR-Mismatches siehe Kapitel 1.4.1). Dazu wurden die HLA-Typen von möglichen Patienten und Spendern, soweit noch nicht bekannt, im HLA-Labor der Uniklinik Tübingen bestimmt (HLA-Gruppen siehe Tabelle 4.19).

Da die Aktivität von NK-Zellen zwischen verschiedenen Spendern sowie beim selben Spender zwischen verschiedenen Tagen stark schwanken kann, dienten Zellen der Zelllinie K562 (myeloische Leukämie-Zelllinie) als Kontrolle für die NK-Zell-Aktivität.

Zur Auswertung der Zytotoxizitätsassays berechnet man, wie in Kapitel 3.9.3 beschrieben, die prozentuale spezifische Lyse (PSL) eines jeden Ansatzes. Sie entspricht dem Anteil der Zielzellen, der in einer bestimmten Zeit (hier zwei Stunden) von den zugegebenen NK-Zellen lysiert wurde. Je höher dieser Anteil ist, desto aktiver waren also die NK-Zellen bei der Lyse der Zielzellen.

Da B-Reihen-ALL-Blasten als wenig NK-empfindlich gelten, wurde hier bei allen Versuchen ein Teil der NK-Zellen nach der Anreicherung über Nacht mit Interleukin 2 (IL 2) stimuliert. Erwartungsgemäß lysierten die unstimulierten NK-Zellen die verwendeten Blasten bereits bei den ersten Versuchen so schlecht, dass im Assay kein Unterschied zwischen den PSL mit und ohne Blockaden

erkennbar war. Deshalb wurden in der Folge nur noch auf IL-2-stimulierten NK-Zellen Rezeptoren blockiert.

#### **4.7.1 Blockade von NKG2D-Rezeptoren oder ihren Liganden**

NKG2D-Rezeptoren gehören zu den aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren. In Kapitel 4.1 bis 4.3 wurde gezeigt, dass die meisten kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten NKG2D-Liganden exprimieren, dass ihre Expressionsdichte jedoch im Vergleich zu den inhibierenden HLA-Klasse-I-Molekülen sehr gering ist. Nun wurde die Bedeutung der NKG2D-Rezeptoren für die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber den Blasten in sieben vergleichbaren Zytotoxizitätsassays untersucht.

Es kamen CD3-depletierte NK-Zellen von zwei verschiedenen Spendern und Blasten von vier verschiedenen Patienten zum Einsatz. Dabei bestand für die Patienten P17, P21 und P23 gegenüber Spender 2 (S2) ein KIR-Mismatch, gegenüber Spender 1 (S1) bestand bei diesen Patienten kein KIR-Mismatch (Ligand-Ligand-Modell). Ergänzend wurden Blasten von P14 verwendet, da hier gegenüber NK-Zellen von S2 kein KIR-Mismatch bestand. Außerdem waren für P14 die höchsten Antigendichten der NKG2D-Liganden auf den Blasten bestimmt worden.

Zunächst wurden IL-2-stimulierte NK-Zellen beider Spender mittels FACS-Analyse auf die Expression von NKG2D-Rezeptoren hin überprüft (Tabelle 4.20). Die NK-Zellen beider Spender waren eindeutig positiv für NKG2D (graphische Auswertung), zwischen den beiden Spendern bestand kein wesentlicher Unterschied hinsichtlich der Expressionsdichte der NKG2D-Rezeptoren.

Bei den sieben Zytotoxizitätsassays liegt nun die mittlere PSL der Blasten durch NKG2D-blockierte NK-Zellen bei allen verwendeten Verhältnissen von NK-

Zellen zu Blasten (Effektor-Target-Verhältnisse (E:T)) leicht unter der der Kontrolle mit IgG1 (Abbildung 4.22, Tabelle 4.21).

Die Reduktion der PSL ist hier jedoch nach dem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen und dem Student-t-Test (je  $\alpha = 0,05$ ) NICHT signifikant. Außerdem fällt auf, dass für P14, auf dessen Blasten die höchste Antigendichte der NKG2D-Liganden bestimmt worden war, keine Reduktion der Lyse durch NKG2D-Blockade auftrat. Ein offensichtlicher Zusammenhang des Blockadeeffektes mit anderen Merkmalen von NK- und Zielzellen, wie HLA-Klasse-I-Expressionsdichte oder KIR-Mismatch, ist ebenfalls nicht zu beobachten (wobei die Aussagekraft der Versuche diesbezüglich bei dieser kleinen Stichprobe natürlich gering ist).

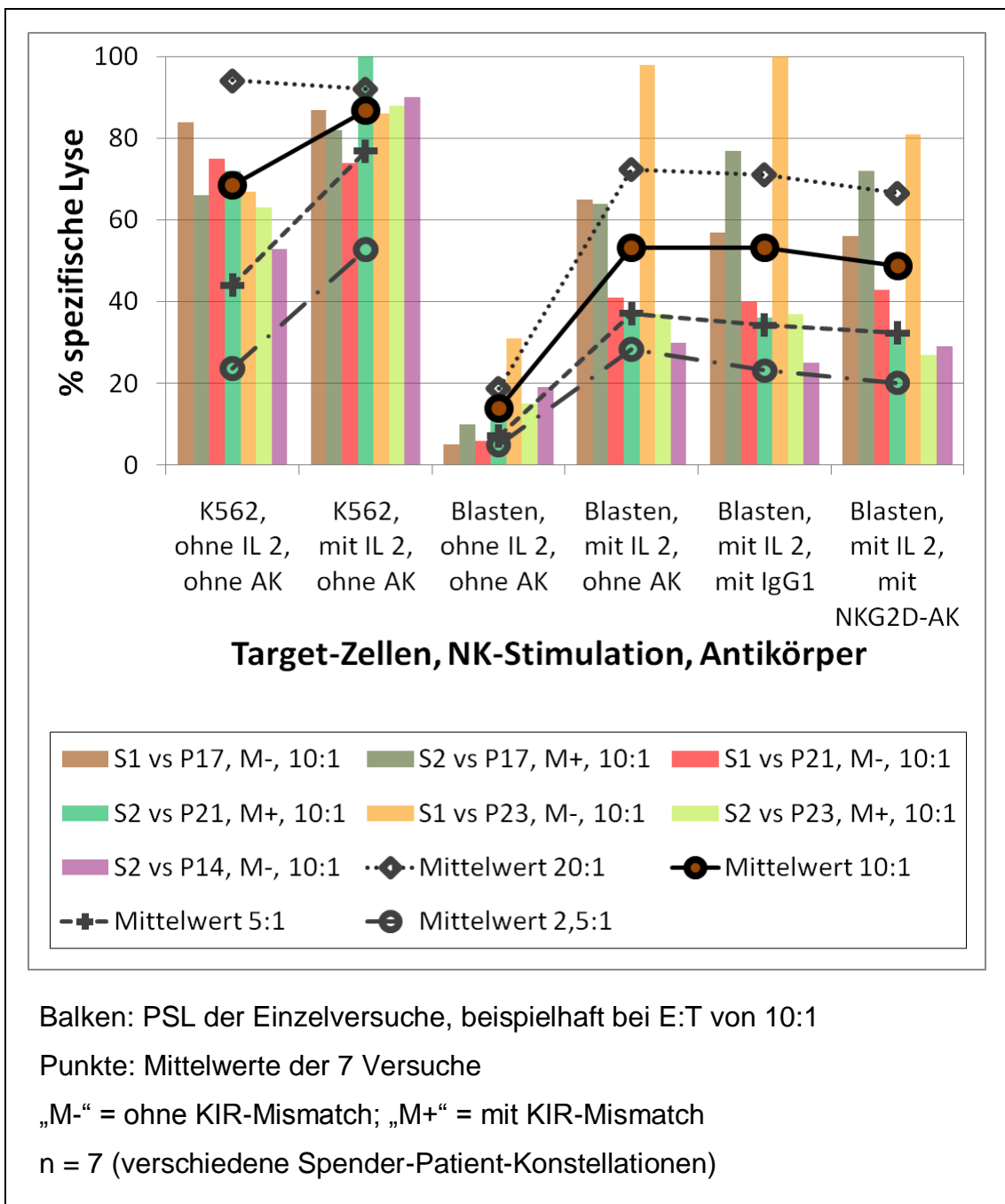


Abbildung 4.22:

Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Blockade von NKG2D-Rezeptoren auf NK-Zellen

Ergänzend wurden folgende weiteren Versuche durchgeführt:

- Um zu prüfen, ob sich die Auswirkung der Blockade durch höhere Antikörperkonzentrationen steigern lässt, etwa weil die oben verwendeten Konzentrationen zur Blockade ausreichend vieler Rezeptoren nicht genügt hatten, wurden in zwei Versuchen (mit CD3-depletierten NK-Zellen) zusätzlich Ansätze mit höheren Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Reduktion der PSL von Ansätzen mit höheren Antikörperkonzentrationen gegenüber der PSL von Ansätzen mit den oben verwendeten Antikörperkonzentrationen ist dabei jedoch nur gering (Abbildung 4.23, Tabelle 4.22).

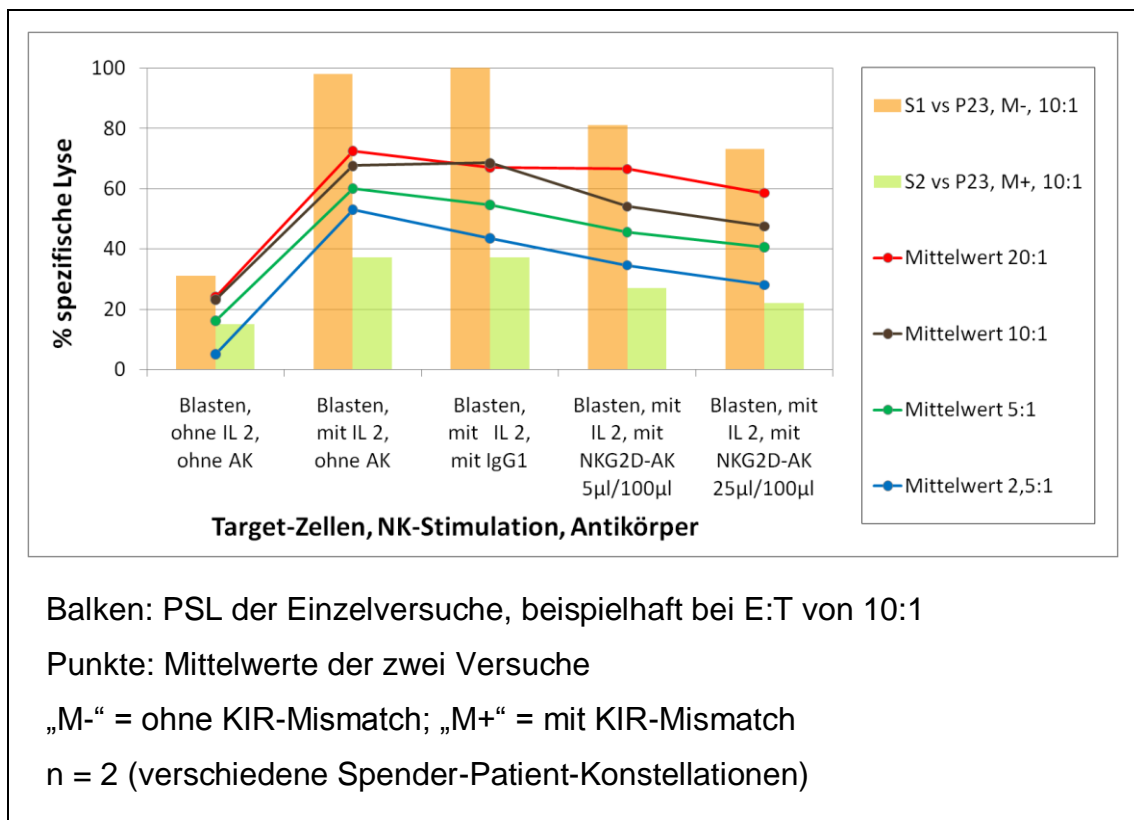


Abbildung 4.23:

Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Blockade von NKG2D-Rezeptoren auf NK-Zellen, verschiedene Antikörperkonzentrationen

- In zwei Versuchen wurden anstatt der NKG2D-Rezeptoren auf NK-Zellen ihre Liganden auf den Blasten blockiert (Abbildung 4.24, Tabelle 4.23). Hier wurden CD56-angereicherte NK-Zellen verwendet. Als Zielzellen dienten Blasten von P23, bei diesem Patienten wurde oben die größte Differenz zwischen den PSL mit und ohne NKG2D-Blockade beobachtet. Sowohl durch Inkubation der Blasten mit löslichen NKG2D-Molekülen zur Blockade der NKG2D-Liganden (vergleiche Kapitel 4.3) als auch mit spezifischen ULBP1-Antikörpern reduzierte sich die PSL gegenüber unblockierten Blasten nicht.

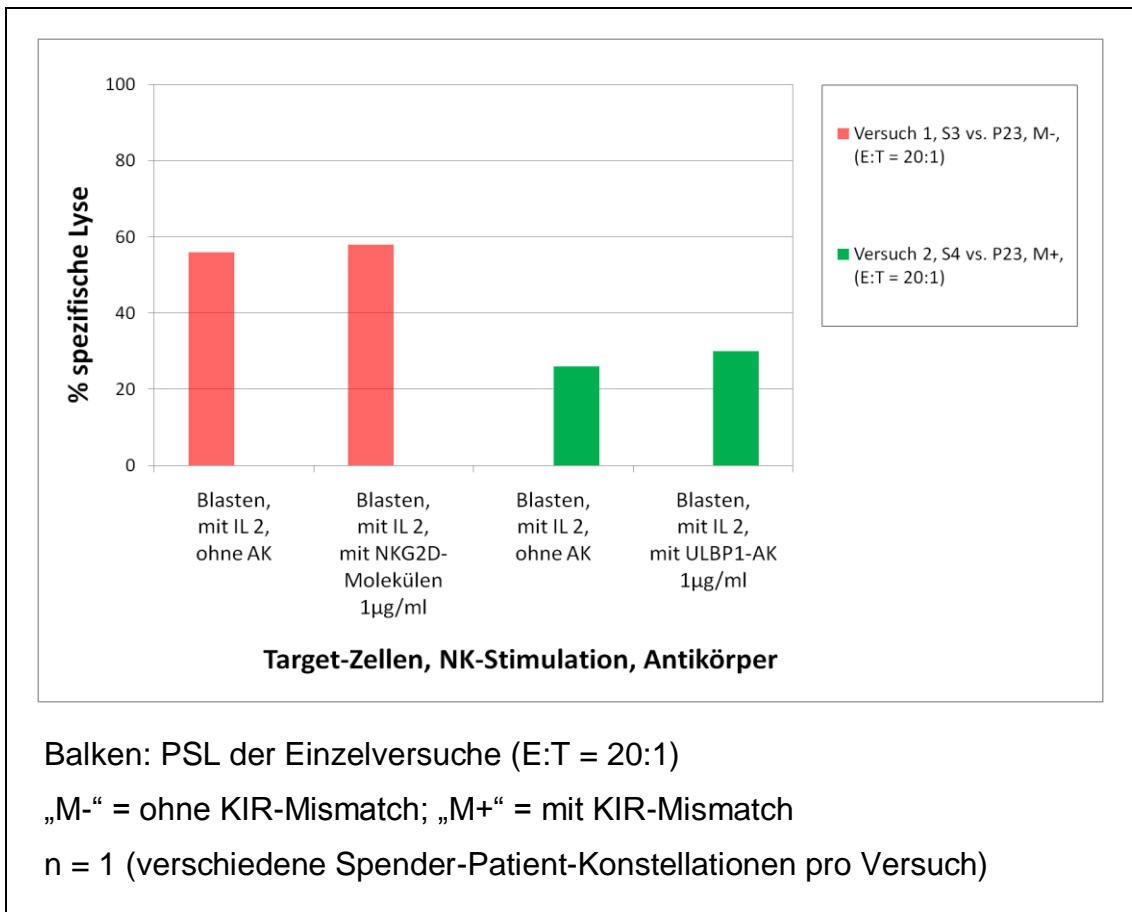


Abbildung 4.24:

Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Blockade von NKG2D-Liganden auf Blasten

- Da Zellen der Zellkultur K562 NKG2D-Liganden in hoher Antigendichte exprimieren, und da diese Zellen von NK-Zellen gut lysiert werden, wurden schließlich in zwei Versuchen CD56-angereicherte, NKG2D-blockierte NK-Zellen von zwei verschiedenen Spendern mit K562-Zellen zusammengebracht (Abbildung 4.25, Tabelle 4.24). Auch hier verringerte sich die PSL mit NKG2D-Rezeptor-Blockade nur gering bis gar nicht.

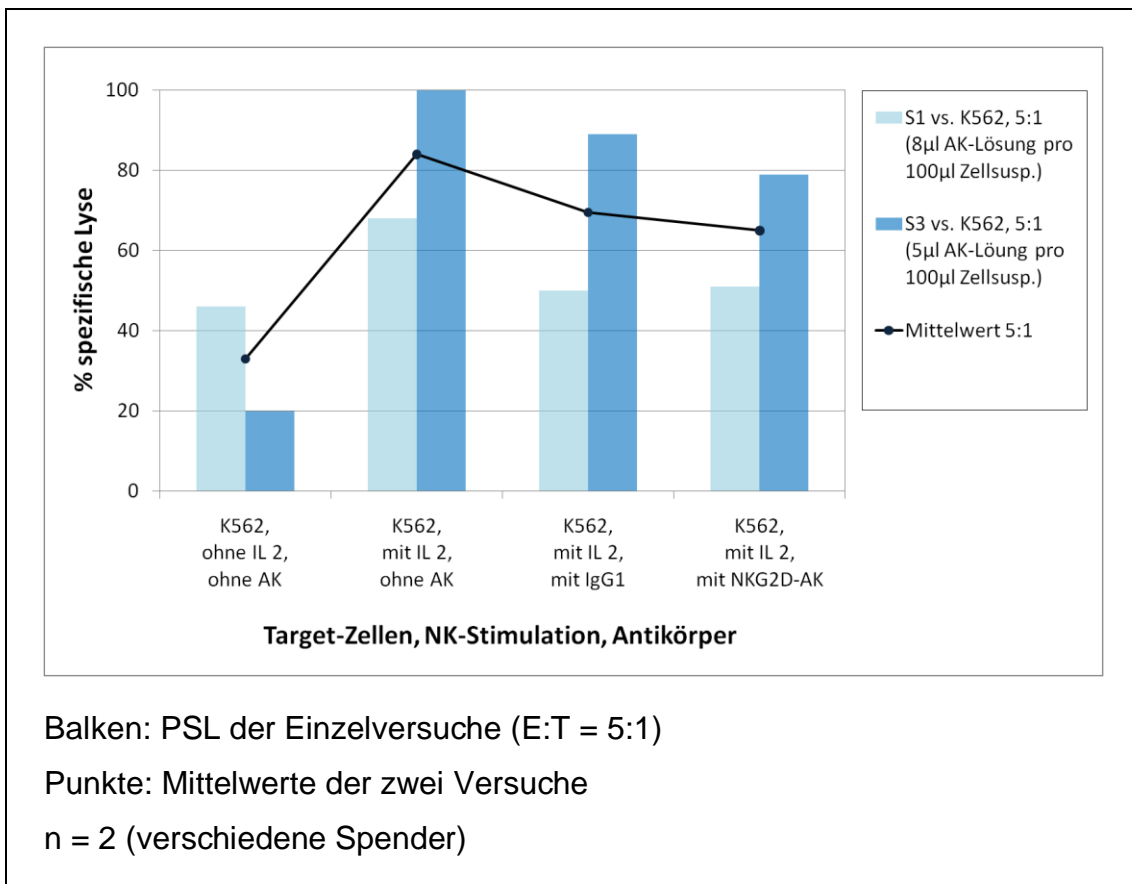


Abbildung 4.25:

Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von K562-Zellen durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Blockade von NKG2D-Rezeptoren auf NK-Zellen



Zusammenfassend weisen die hier durchgeführten Versuche darauf hin, dass die aktivierenden NKG2D-Rezeptoren auf NK-Zellen für deren zytotoxische Aktivität gegenüber kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten keine oder nur geringe Bedeutung haben.

#### **4.7.2 Blockade von Natural Cytotoxicity Receptors oder ihren Liganden**

Die Natural Cytotoxicity Receptors (NCR) gehören ebenfalls zu den aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren. Die Subtypen NKp30 und NKp46 kommen auf stimulierten und ruhenden NK-Zellen vor, während der Subtyp NKp44 vorwiegend auf stimulierten NK-Zellen vorkommt.

In Kapitel 4.3 war es nicht gelungen, mittels FACS-Analyse die Expression von NCR-Liganden auf kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten zu zeigen oder zu widerlegen. NCR auf NK-Zellen können dagegen mit spezifischen Antikörpern mittels FACS-Analyse nachgewiesen werden (s. u.).

Anhand von sechs vergleichbaren Zytotoxizitätsassays wird nun untersucht, ob NCR-Blockaden sich auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten auswirken.

Bei allen Versuchen wurde ein Teil der CD3-depletierten, IL-2-stimulierten NK-Zellen mittels FACS-Analyse auf ihre Expression von NCR hin untersucht (Tabelle 4.20). Sie waren jeweils eindeutig positiv für NKp30 und NKp46, bezüglich der Expressionsdichte der Rezeptoren bestand zwischen beiden Spendern kein wesentlicher Unterschied (graphische Auswertung). Für NKp44 waren die NK-Zellen negativ (graphische Auswertung). Die Expression von NCR, insbesondere von NKp44, kann jedoch je nach Aktivität der NK-Zellen variieren. Da für die FACS-Analysen NK-Zellen verwendet wurden, die noch nicht mit den Blasten in Kontakt gekommen waren, sind die Ergebnisse der FACS-Analysen nicht zwingend mit der NCR-Expression der NK-Zellen

während der Durchführung der Zytotoxizitätsassays gleichzusetzen. In den Assays wurden deshalb alle drei NCR auf den betreffenden NK-Zellen blockiert.

Es kamen CD3-depletierte NK-Zellen von denselben Spendern und Blasten von denselben Patienten wie in Kapitel 4.7.1 zum Einsatz. Der Ansatz „S1 vs. P17“ (Spender 1, Patient 17) musste aufgrund einer Verunreinigung verworfen werden, somit verblieben sechs vergleichbare Assays zur Auswertung (Abbildung 4.26, Tabelle 4.25).

Die Reduktion der PSL beim Einsatz NCR-blockierter NK-Zellen gegenüber der Negativkontrolle mit IgG1 ist hier für alle vier Verhältnisse von NK-Zellen zu Blasten (E:T) sowohl nach dem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen als auch dem Student-t-Test (je  $\alpha = 0,05$ ) signifikant.

Folgendes fällt bei Betrachtung von Abbildung 4.26 außerdem auf:

- Der Unterschied zwischen den PSL mit und ohne NCR-Blockade ist hier zwar signifikant, dennoch ist er geringer als die Unterschiede der PSL zwischen manchen Spender-Patient-Konstellationen, sowie zwischen IL-2-stimulierten und unstimulierten NK-Zellen.
- Eine Reduktion der PSL tritt bei Konstellationen mit und ohne KIR-Mismatch, bei Blasten mit hohen und niedrigen HLA-Expressionsdichten, sowie bei insgesamt hoher und insgesamt niedriger zytotoxischer Aktivität der NK-Zellen gegenüber den Blasten auf.

Diese Beobachtungen passen zu der Theorie, dass die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen durch vielerlei verschiedene Mechanismen reguliert wird, die sich gegenseitig nicht ausschließen. Die NCR scheinen an den Regelmechanismen als ein Faktor unter anderen beteiligt zu sein.

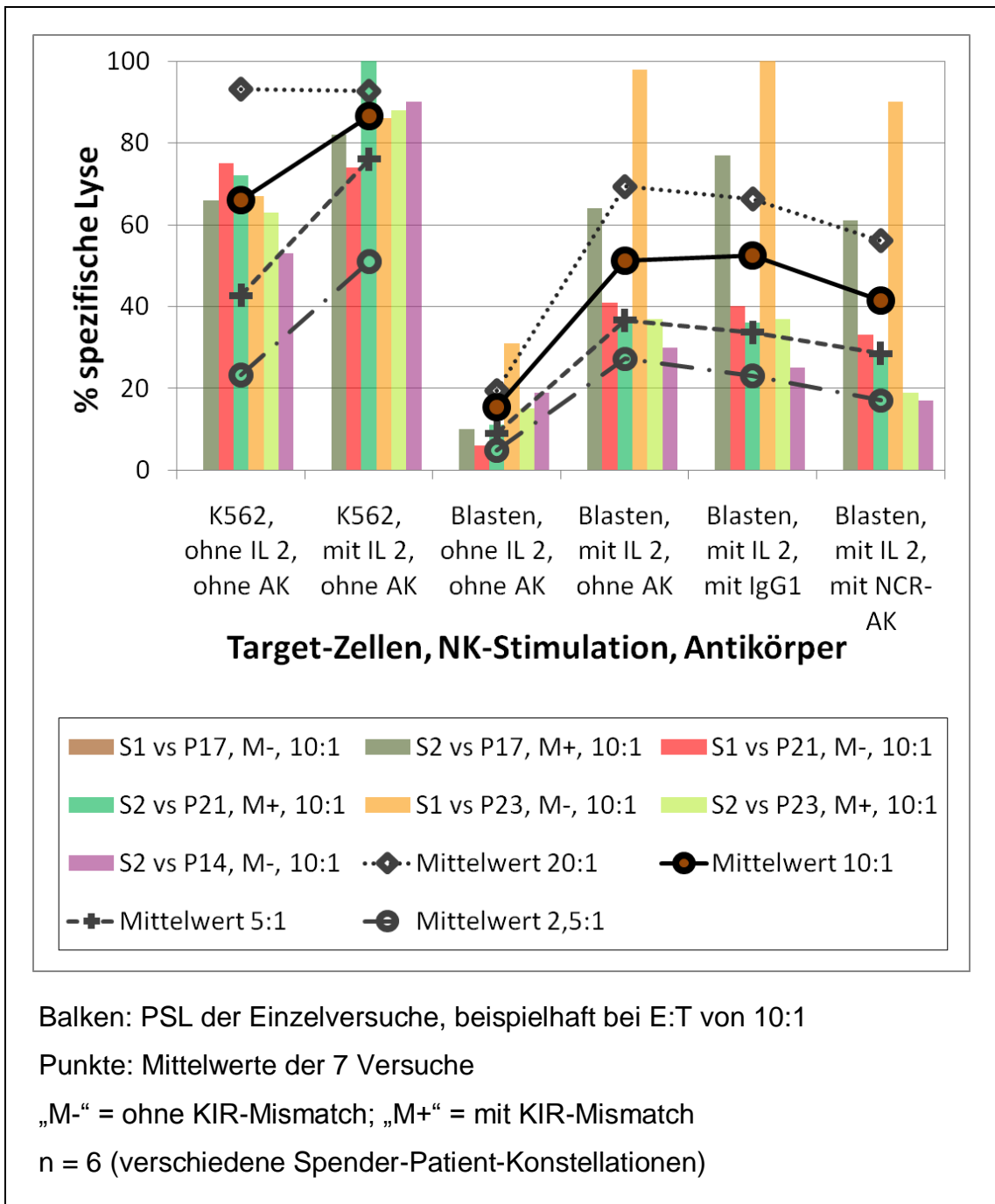


Abbildung 4.26:

Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Blockade von NCR

Folgende Versuche wurden hier ergänzend durchgeführt:

- Durch Steigerung der Antikörperkonzentrationen bei der Blockade der Rezeptoren auf CD3-depletierten NK-Zellen wird in zwei bzw. drei Versuchen die PSL bei den meisten E:T weiter reduziert (Abbildung 4.27, Tabelle 4.26).

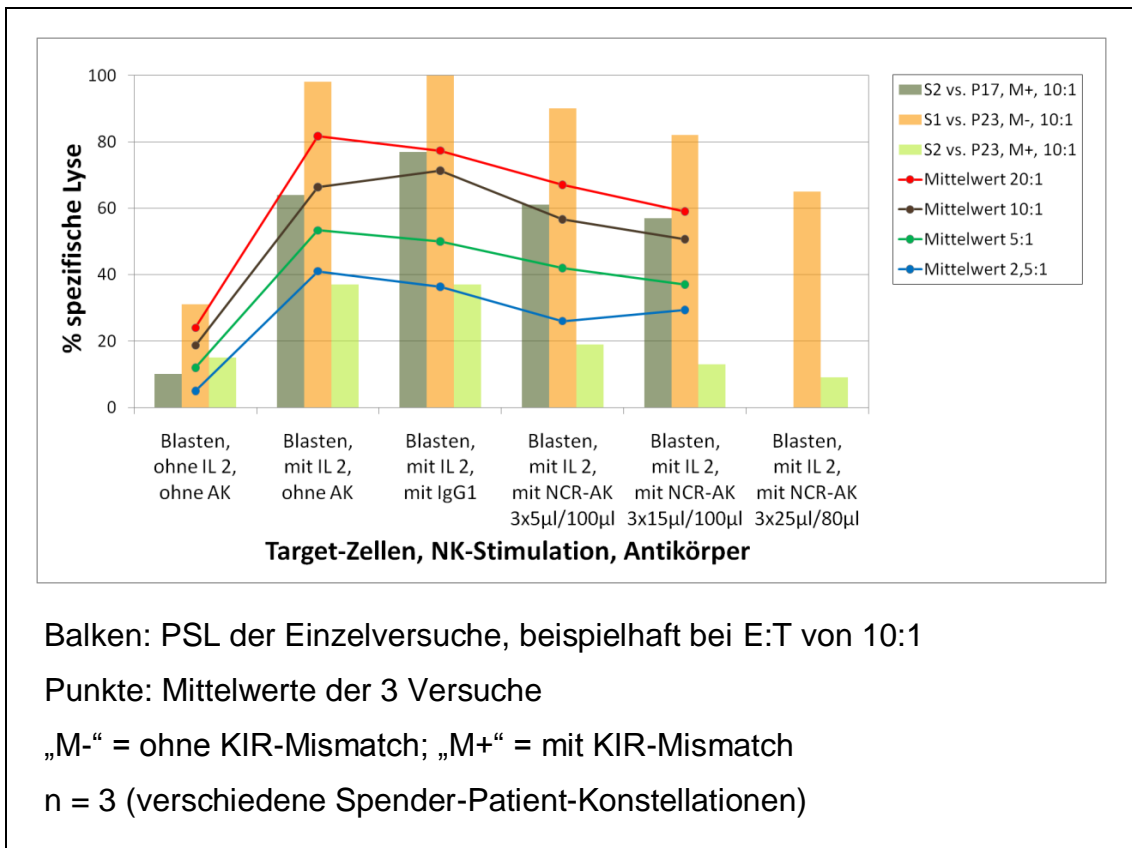


Abbildung 4.27:

Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Blockade von NCR auf NK-Zellen, verschiedene Antikörperkonzentrationen

- In einem Versuch (S3 vs. P23, CD56-angereicherte NK-Zellen) wurden in verschiedenen Ansätzen vergleichend entweder NK-Zellen mit NKp30- oder NKp46-Antikörpern inkubiert, oder es wurden Blasten mit löslichen NKp30- oder NKp46-Molekülen inkubiert, um potentiell vorhandene NCR-Liganden auf den Blasten zu blockieren (Abbildung 4.28, Tabelle 4.27). Dabei ist im Vergleich zu unblockierten Rezeptoren und Liganden die PSL mit löslichen NCR-Molekülen nur gering vermindert, bei blockierten Rezeptoren auf NK-Zellen ist sie deutlich reduziert. Dies wirft erneut die Frage auf, ob die verwendeten löslichen Rezeptormoleküle schlecht an vorhandene Liganden auf den Blasten binden, oder ob es keine solchen Liganden auf den Blasten gibt, sondern die NCR über einen anderen Mechanismus wirken.

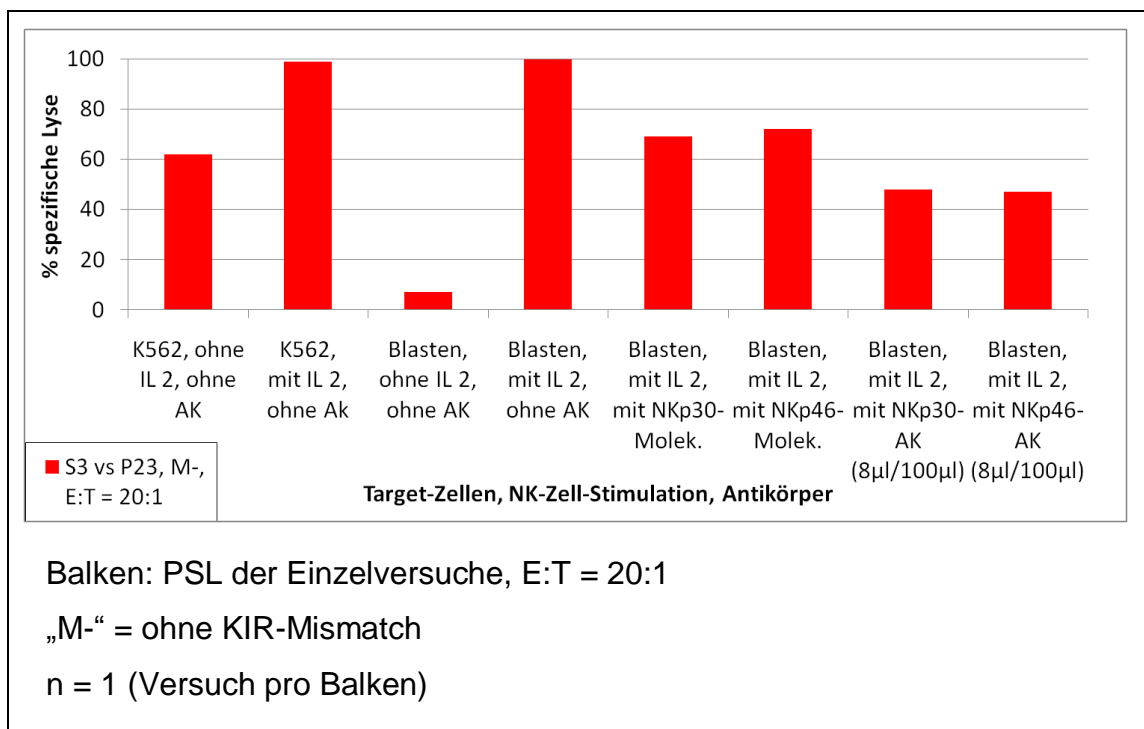


Abbildung 4.28:

Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Blockade von NCR auf NK-Zellen und potentiell von NCR-Liganden auf Blasten (Vergleich)

- Schließlich wurden in zwei Assays auch CD3-depletierte, NCR-blockierte NK-Zellen zur Lyse von K562-Zellen eingesetzt. Zwar ist dies hier nicht unmittelbar von Bedeutung, es könnte aber im Hinblick auf weitere Untersuchungen interessant werden. Da K562-Zellen ohne großen Aufwand zu züchten sind, Patientenmaterial jedoch stets nur sehr begrenzt zur Verfügung steht, könnten zunächst K562 zur weiteren Untersuchung der NCR-Funktion eingesetzt werden, falls NCR auch bei der K562-Lyse von Bedeutung sind. In den zwei hier durchgeführten Versuchen trat im Vergleich zur Negativkontrolle mit IgG1 eine nur leicht reduzierte PSL der K562-Zellen durch NCR-blockierte NK-Zellen auf (Abbildung 4.29, Tabelle 4.28).

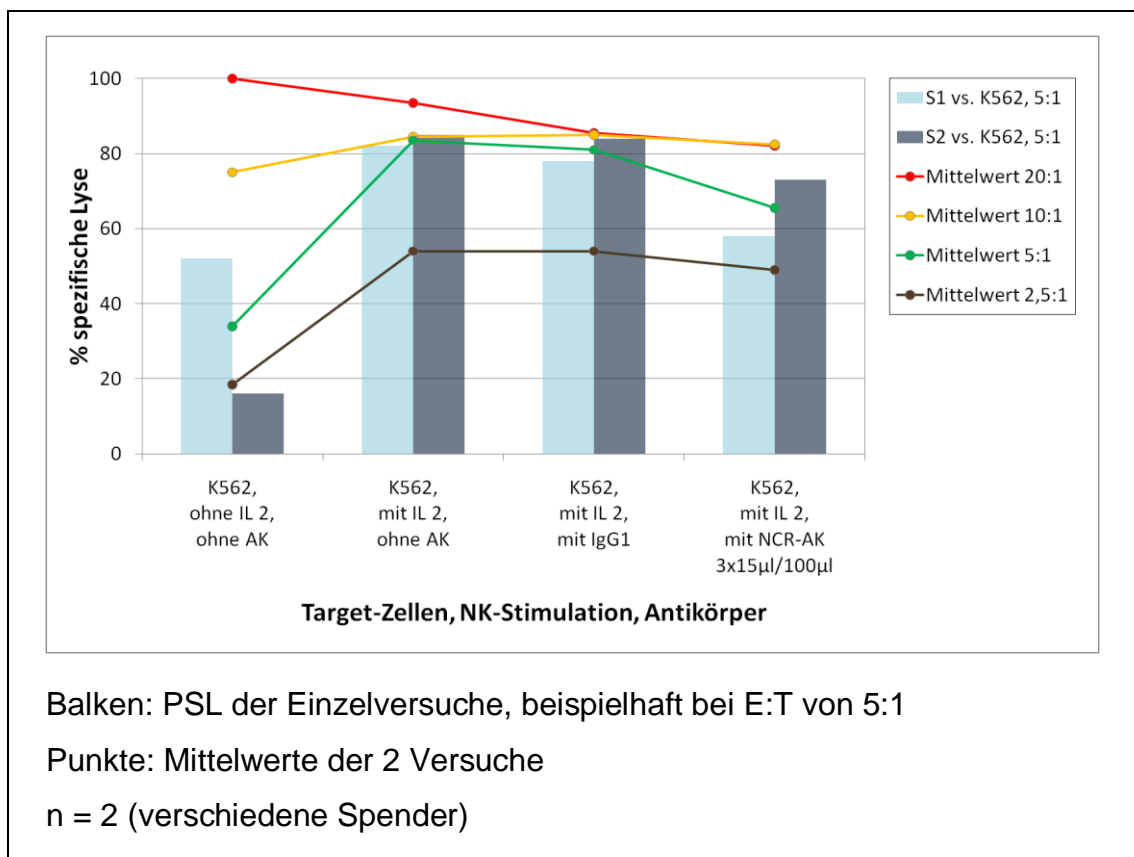


Abbildung 4.29:

Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von K562-Zellen durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Blockade von NCR auf NK-Zellen

Zusammenfassend bestätigen die hier durchgeführten Versuche die aktivierende Wirkung von Natural Cytotoxicity Receptors auf NK-Zellen bei deren zytotoxischen Aktivität gegenüber kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten. Sie scheinen als ein Faktor unter anderen an der Regulierung der NK-Zell-Aktivität beteiligt zu sein. Ob es allerdings auf den Blasten spezifische Liganden für NCR gibt, oder ob sie über einen anderen Mechanismus wirken, konnte nicht geklärt werden.

### **4.7.3 Blockade weiterer Moleküle**

#### **a) Adhäsionsmoleküle**

Adhäsionsmoleküle dienen der temporären Verbindung von NK-Zellen und potentiell zu lysierenden Zellen. In Kapitel 4.6.1 wurden die Adhäsionsmoleküle CD58, CD50 und CD54 auf den Blasten der meisten, CD11a nur auf denen mancher Patienten nachgewiesen.

In je einem Zytotoxizitätsassay mit CD56-angereicherten NK-Zellen und Blasten (P23), die alle vier Adhäsionsmoleküle exprimierten, war die PSL bei Blockade je eines Adhäsionsmoleküls auf den Blasten um maximal 26 % geringer als ohne Blockade (Abbildung 4.30, Tabelle 4.29). Inwieweit diese Ergebnisse verallgemeinert werden können, müsste jedoch durch weitere Versuche getestet werden.

#### **b) CD48, CD112, CD155 und NG2**

Auch die Moleküle CD48, CD112 und CD155 könnten möglicherweise beim NK-Zell-Blasten-Kontakt über aktivierende NK-Zell-Rezeptoren die Zytotoxizität der NK-Zellen steigern. In Kapitel 4.6.3 wurde CD48 auf den Blasten von 35 % der Patienten nachgewiesen. Für CD155 wurden nur die Blasten von 10 % der

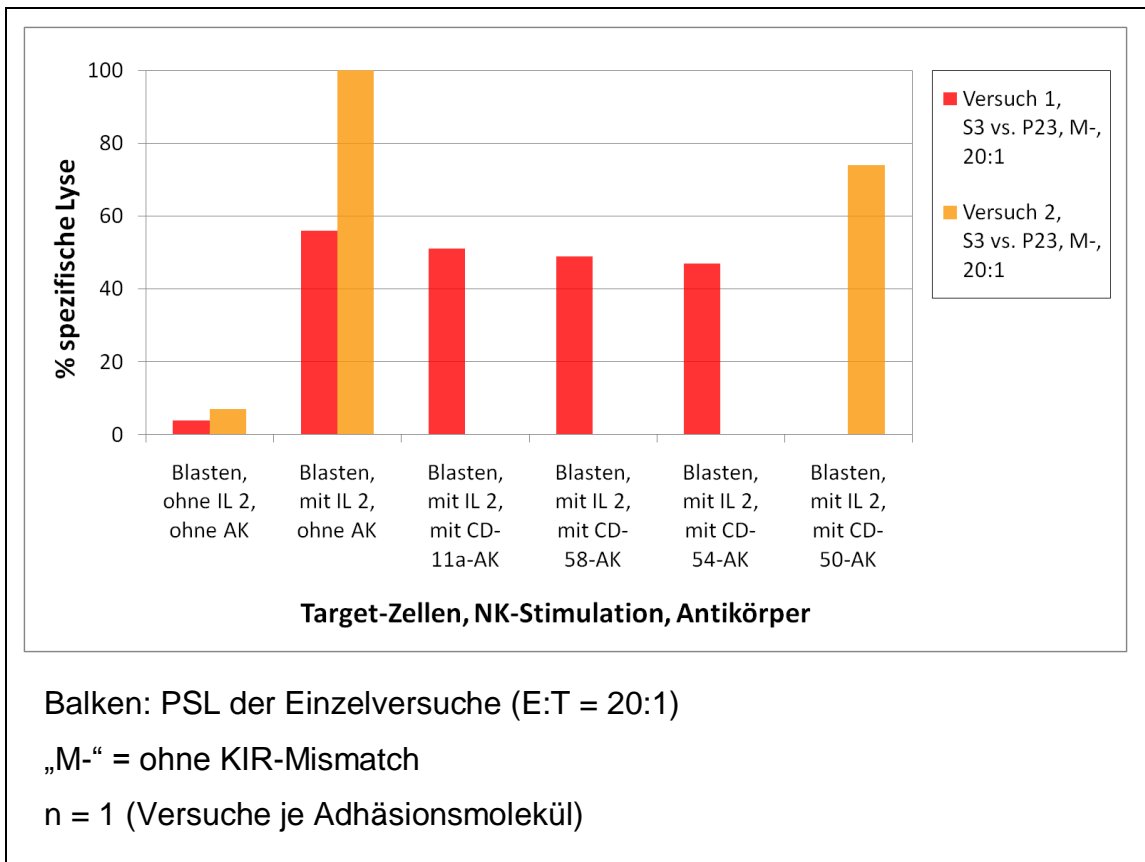


Abbildung 4.30:

Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Blockade von Adhäsionsmolekülen

Patienten als positiv gewertet, die anderen hatten CD155 nicht oder nur mit einer Antigendichte unterhalb der Nachweisgrenze exprimiert. Für CD112 konnte nicht entschieden werden, ob es von den Blasten nicht oder nur mit geringer Antigendichte exprimiert wurde. Die Blasten aller Patienten waren negativ für NG2.

In je zwei Zytotoxizitätsassays (Abbildung 4.31, Tabelle 4.30, je S3 vs. P23, CD56-angereicherte NK-Zellen) wurden Blasten mit Antikörpern gegen CD48 oder CD112 inkubiert. Die Blasten von P23 waren in Kapitel 4.6.3 positiv für



CD48, für CD112 lag die MNF mit 0,36 im oberen Bereich. In einem Versuch wurden zum Vergleich auch Blasten mit CD155-Antikörpern inkubiert. CD155 war auf den Blasten dieses Patienten in Kapitel 4.6.3 nicht nachgewiesen worden. Auf eine Blockade von NG2 wurde verzichtet.

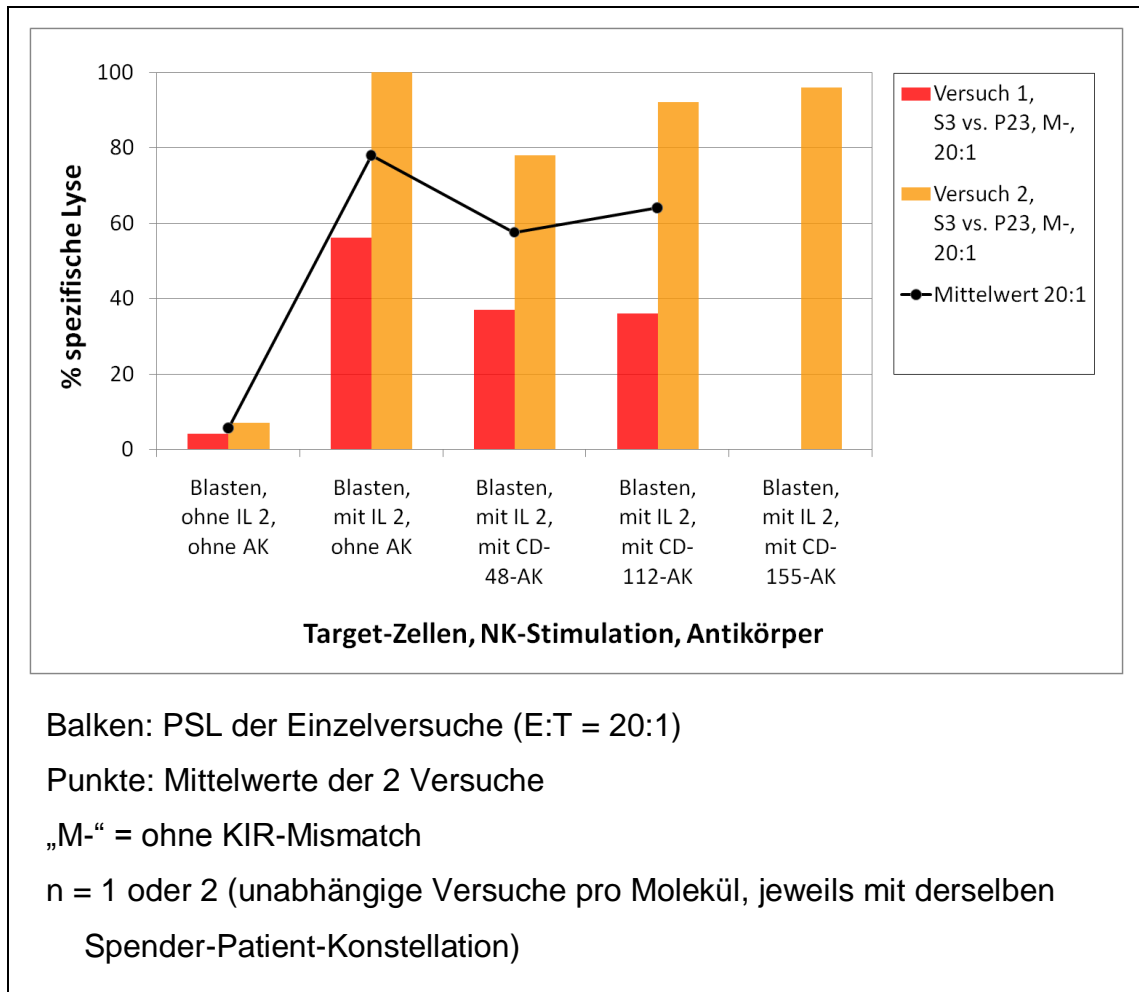


Abbildung 4.31:

Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Blockade von CD48, CD112 und CD155

Die PSL bei CD48-blockierten Blasten war jeweils um rund 20 % geringer als bei unblockierten Blasten, bei CD-112-blockierten Blasten war sie um

durchschnittlich 14 % geringer. Bei der CD155-Blockade war der Unterschied zur PSL mit unblockierten Blasten so gering, dass er nicht als Effekt der Blockade gewertet werden konnte.

Zwar fehlt hier eine Negativkontrolle mit gleich hoher Natriumazid-Konzentration wie bei den Proben, die Versuche wurden aber in einer Versuchsreihe gemeinsam mit der Blockade der Adhäsionsmoleküle (Abschnitt a)) durchgeführt. Bei diesen Proben lag die gleiche Natriumazid-Konzentration vor. Dort trat eine deutlich geringere Reduktion der PSL auf.

Wie in Abschnitt a) gilt natürlich auch hier, dass eine höhere Anzahl von Versuchen notwendig ist, um verallgemeinernde Schlüsse aus den Ergebnissen ziehen zu können.

#### **4.7.4 Funktionelle Bedeutung von HLA-A, -B und -C sowie HLA-E**

Es ist unumstritten, dass die inhibierenden Killer-Immunglobulin-artigen Rezeptoren (KIR) eine besonders wichtige Rolle bei der Regulation der zytotoxischen NK-Zell-Aktivität spielen. Die HLA-Klasse-I-Moleküle HLA-A, HLA-B und HLA-C binden an diese Rezeptoren. Sie wurden hier auf den kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten in verschiedener, aber immer hoher Dichte nachgewiesen (siehe Kapitel 4.5). Frühere Veröffentlichungen belegen eine negative Korrelation der Expressionsdichte dieser Moleküle mit der PSL in Zytotoxizitätstests (siehe auch Diskussion). Bei den vergleichbaren Versuchen dieser Arbeit ist eine solche Korrelation zwar nicht zu beobachten (Abbildung 4.32, Tabellen 4.12 und 4.21), bei einer geringen Anzahl von maximal  $n = 4$  vergleichbaren Versuchen sind die Ergebnisse jedoch nicht sehr aussagekräftig und stehen mit früheren Veröffentlichungen auch nicht im Widerspruch. Blockadeversuche wurden hier nicht durchgeführt, denn auch dazu gab es bereits aussagekräftige Veröffentlichungen.

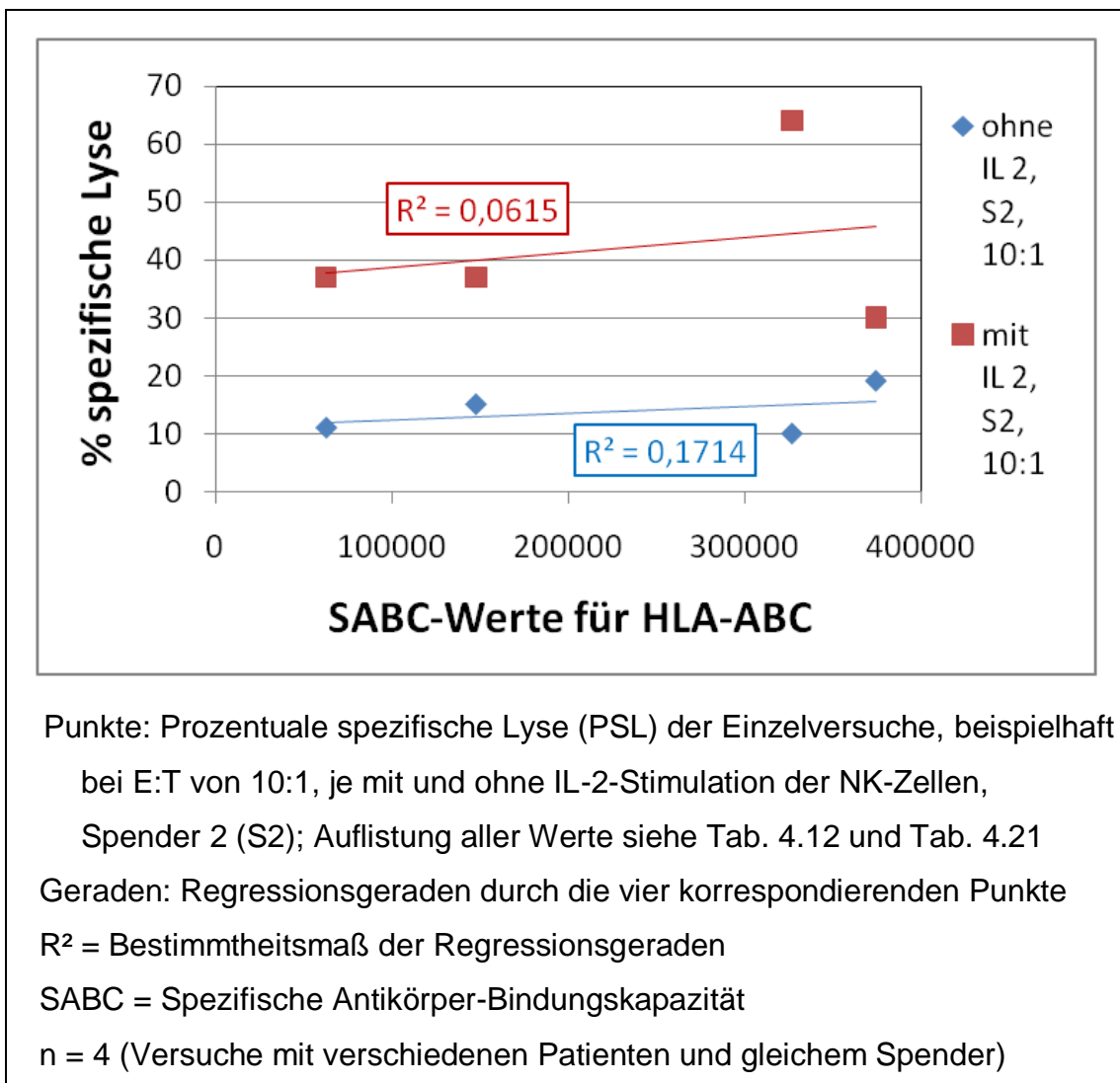


Abbildung 4.32:

Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Korrelation der PSL mit der HLA-Klasse-I-Expressionsdichte (HLA-A + HLA-B + HLA-C) auf Blasten

Die funktionelle Bedeutung eines KIR-Mismatches (siehe Kapitel 1.4.1) konnte hier ebenfalls nicht belegt werden (Abbildung 4.33, Tabelle 4.21). Auch dabei gilt jedoch, dass mit drei vergleichbaren Versuchspaaren keine sinnvolle statistische Aussage möglich ist. Hinzu kommt, dass bei allen drei Versuchspaaren jeweils NK-Zellen derselben beiden Spender zum Einsatz kamen. Da die NK-

Zell-Aktivität interindividuell sehr stark variiert, können spenderspezifische Faktoren die Ergebnisse beeinflusst haben.

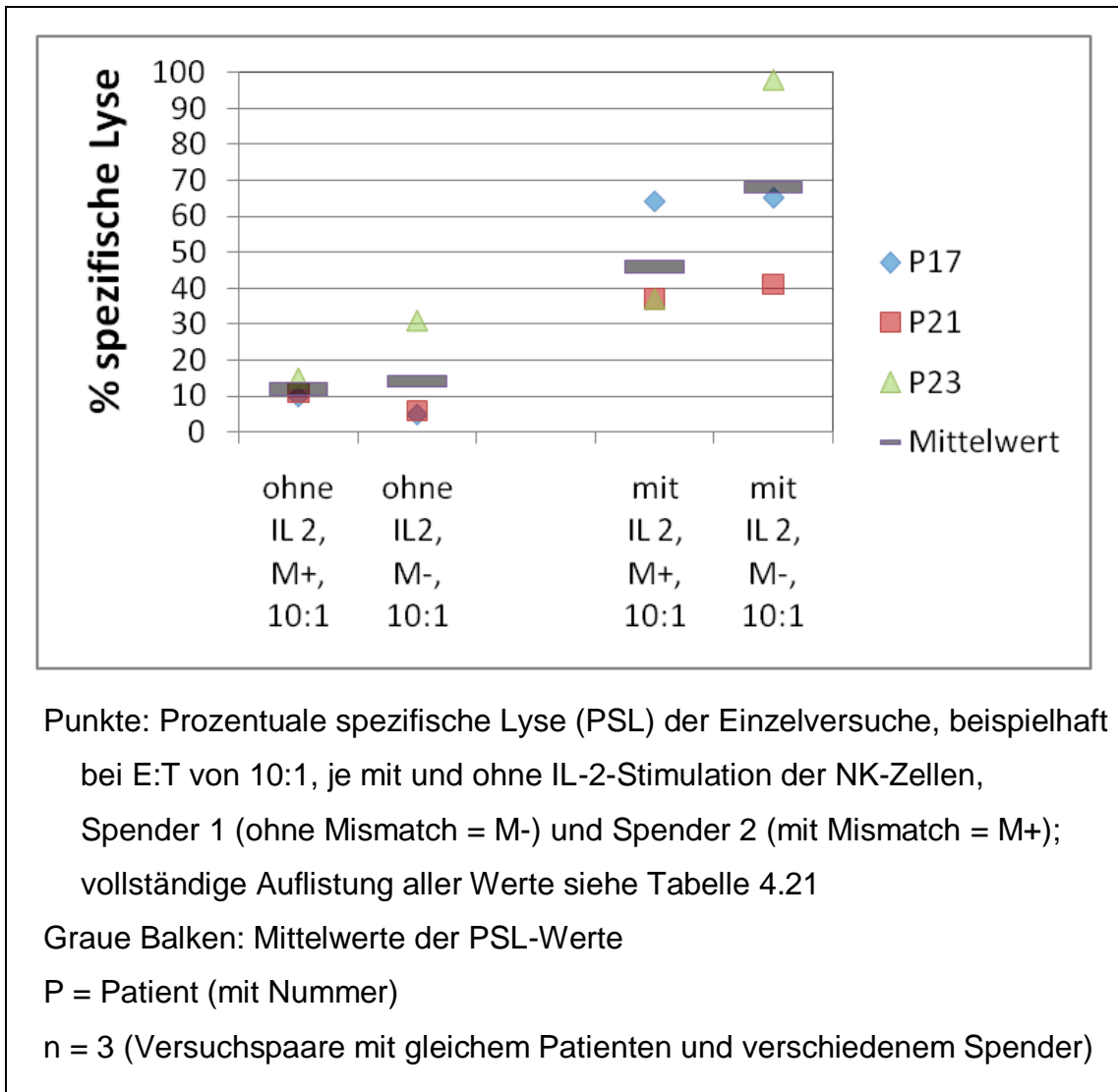


Abbildung 4.33:

Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: PSL mit und ohne KIR-Mismatch im Vergleich

HLA-E gehört zu den HLA-Klasse-IB-Molekülen. Die Bindung von HLA-E an CD94/NKG2A wirkt bekanntermaßen stark NK-Zell-inhibierend. Neueren Er-

kenntnissen zufolge bindet HLA-E aber auch an aktivierende NK-Zell-Rezeptoren und ist insgesamt auf komplexe Weise an der Regulation der NK-Zell-Aktivität beteiligt. Bei den vier vergleichbaren Versuchen dieser Arbeit konnte für IL-2-stimulierte NK-Zellen eine mäßige negative Korrelation der PSL mit der Expressionsdichte von HLA-E auf Blasten beobachtet werden (Abbildung 4.34).

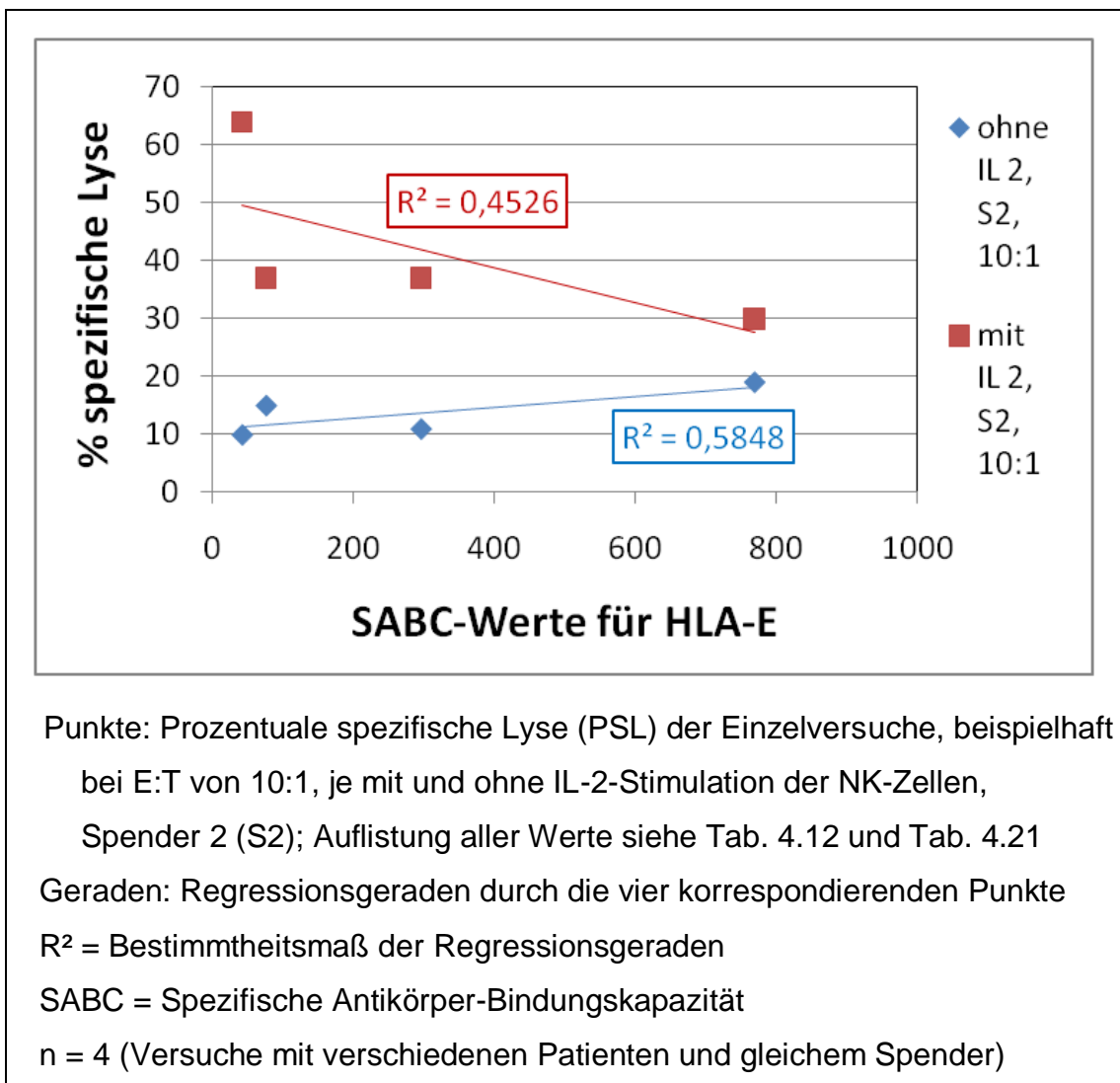


Abbildung 4.34:

Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Korrelation der PSL mit der HLA-E-Expressionsdichte auf Blasten

Wie für die HLA-Klasse-I-Moleküle gilt aber auch für die HLA-E-Moleküle, dass bei der geringen Anzahl von  $n = 4$  vergleichbaren Versuchen die Ergebnisse nicht sehr aussagekräftig sind. Eine größere Anzahl vergleichbarer Versuche sowie Versuche mit Blockade von HLA-E oder zugehörigen Rezeptoren auf NK-Zellen wären hier interessant.

## 4.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

### 4.8.1 Die Methoden betreffende Ergebnisse

Ziel der qualitativen FACS-Analysen in Kapitel 4.1 war es herauszufinden, ob Liganden des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors NKG2D auf kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten vorkommen. Die dabei gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Proben unterschieden sich jedoch zu wenig von denen der Negativkontrollen, um mit den üblichen Auswertungsmethoden entscheiden zu können, ob die Blasten einer Probe die untersuchten Merkmale in geringer Dichte exprimiert hatten oder gar nicht. Da die mittleren GeoMean-Werte der Proben jedoch deutlich größer waren als die der Negativkontrollen (Abbildung 4.1, Tabelle 4.1.A) konnte angenommen werden, dass zumindest die Blasten mancher Patienten NKG2D-Liganden exprimiert hatten. Um herauszufinden, welche Blasten NKG2D-Liganden exprimiert hatten, wurde eine neue Auswertungsmethode entwickelt (Kapitel 4.1.2).

Zentrale Bedeutung hatte bei der Auswertung mithilfe der neuen Methode die Berechnung sogenannter MNF-Werte (MNF = Mittlere Normal-Fluoreszenz):

$$MNF = \log_{10} \left( \frac{MFI_p}{MFI_n} \right)$$

Es konnte gezeigt werden: MNF-Werte sind, bei ausreichend großer Stichprobe, normalverteilt, wenn die untersuchten Merkmale normalverteilt sind und sich die untersuchten Zellen in ihrer unspezifischen Fluoreszenz ähneln. MNF-Werte korrelieren außerdem gut mit den SABC-Werten (SABC = Spezifische Antikörper-Bindungs Kapazität), die mit der Quantitativen FACS-Analyse, einer etablierten Methode, bestimmbar sind. Damit sind MNF-Werte annähernd proportional zur Anzahl spezifisch gebundener Primär-Antikörper pro Zelle.

Mithilfe der Häufigkeitsverteilungen der MNF-Werte konnte in Kapitel 4.1 bestimmt werden, welche Blasten mit hoher Wahrscheinlichkeit NKG2D-Liganden exprimiert hatten. Außerdem konnten so in weiteren Kapiteln dieser Arbeit Proben in Gruppen mit niedriger, hoher oder sehr hoher Expressionsdichte untersuchter Merkmale eingeteilt werden. Mit der neuen Auswertungsmethode waren also viel differenziertere Aussagen möglich als mit bislang bekannten Auswertungsmethoden der Qualitativen FACS-Analyse.

In Kapitel 4.3 wurde versucht, die noch nicht bekannten NCR-Liganden auf Blasten nachzuweisen, indem zur FACS-Analyse lösliche NCR-Moleküle mit Fc-Teil zusammen mit PE-markierten, antihumanen Sekundärantikörpern eingesetzt wurden. Hier konnte letztlich nur gezeigt werden, dass die Herstellung von Proben und Negativkontrollen nicht in sinnvoller Form geschehen war, somit blieben die Versuche im Hinblick auf die NCR-Liganden ohne Ergebnis. Dagegen konnte gezeigt werden, dass lösliche NKG2D-Moleküle zum Nachweis von NKG2D-Liganden in hoher Antigendichte geeignet sind.

In Kapitel 4.4 wurden drei Methoden der FACS-Analyse verglichen, die in dieser Arbeit jeweils zum Nachweis von NKG2D-Liganden eingesetzt worden waren: Die Qualitative FACS-Analyse mit spezifischen Primärantikörpern gegen einzelne NKG2D-Liganden und PE-markierten Sekundärantikörpern (a), die Quantitative FACS-Analyse mit spezifischen Primärantikörpern gegen einzelne NKG2D-Liganden, FITC-markierten Sekundärantikörpern und dem QIFIKIT von

Dako (b), und die Qualitative FACS-Analyse mit löslichen NKG2D-Molekülen mit Fc-Teil und antihumanen, PE-markierten Sekundärantikörpern (c). Dabei konnten mit (a), mithilfe der neuen Auswertungsmethode, die geringsten Antigendichten (SABC < 200) noch nachgewiesen werden. Mit (b) konnten Moleküle mit SABC-Werten ab etwa 200, mit (c) ab etwa 1 500 nachgewiesen werden. Nur mit (b) können allein mit einer Methode auch für einzelne Proben quantitative Aussagen über Antikörper-BindungsKapazitäten getroffen werden. Nur mit (c) ist der Nachweis von Molekülen möglich, gegen die keine spezifischen Antikörper zur Verfügung stehen.

#### **4.8.2 Liganden von aktivierenden und inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren auf kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten**

Um Aussagen über die Bedeutung verschiedener aktivierender und inhibierender NK-Zell-Rezeptoren bei der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen gegenüber leukämischen Blasten der B-Zell-Reihe machen zu können, wurden zunächst kindliche B-Reihen-ALL-Blasten auf die Expression von Liganden dieser Rezeptoren hin untersucht. Abbildung 4.35 gibt einen Überblick über die Ergebnisse. Blasten erwachsener Patienten wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Sie müssen getrennt betrachtet werden.

In Abbildung 4.35 werden die Proben nach folgenden Kriterien in negativ, fraglich niedrig-positiv, niedrig-positiv, hoch-positiv, sehr-hoch-positiv und methodisch unklar eingeteilt:

Negativ sind hier Proben, bei denen aufgrund der Häufigkeitsverteilung der MNF-Werte bei der Qualitativen FACS-Analyse mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden kann, dass die Blasten das untersuchte Merkmal nicht exprimiert haben. Dies entspricht meist MNF-Werten von < 0,1. Positiv sind Proben, bei denen aufgrund der Häufigkeitsverteilung der MNF-Werte oder



der SABC-Werte mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden kann, dass die Blasten das gesuchte Merkmal exprimiert haben. Dies entspricht hier MNF-Werten von  $\geq 0,1$  (meist bei Primärantikörpern und Sekundärantikörpern in PE) oder  $\geq 0,3$  (meist bei direkten Antikörpern) oder SABC-Werten  $\geq 200$  (ein MNF-Wert von 0,1, der mit Primärantikörpern und Sekundärantikörpern in PE ermittelt wurde, entspricht hier in etwa einem SABC-Wert von 125, jedoch war die Quantitative FACS-Analyse bei SABC-Werten unter 200 sehr unzuverlässig bei der Unterscheidung positiver und negativer Proben).

Die positiven Proben werden nun weiter in Gruppen mit verschiedenen Expressionsdichten der untersuchten Merkmale eingeteilt. Als niedrig-positiv werden Proben mit  $\text{MNF} < 0,8$  oder  $\text{SABC} < 1\,000$  gewertet (ein MNF-Wert von 0,8, der mit Primärantikörpern und Sekundärantikörpern in PE ermittelt wurde, entspricht hier in etwa einem SABC-Wert von 1 000). Als hoch-positiv werden Proben mit  $0,8 \leq \text{MNF} < 80$  oder  $1\,000 \leq \text{SABC} < 100\,000$  gewertet, sehr hoch positiv sind dann Proben mit  $\text{MNF} \geq 80$  oder  $\text{SABC} \geq 100\,000$ . Als fraglich niedrig-positiv werden Proben gewertet, bei denen aufgrund der MNF- oder SABC-Werte nicht entschieden werden kann, ob die Blasten das untersuchte Merkmal nicht oder in geringer Dichte exprimiert haben. Als methodisch unklar werden Proben gewertet, bei denen die FACS-Analysen aufgrund methodischer Probleme nicht zu einem eindeutigen Ergebnis geführt haben.

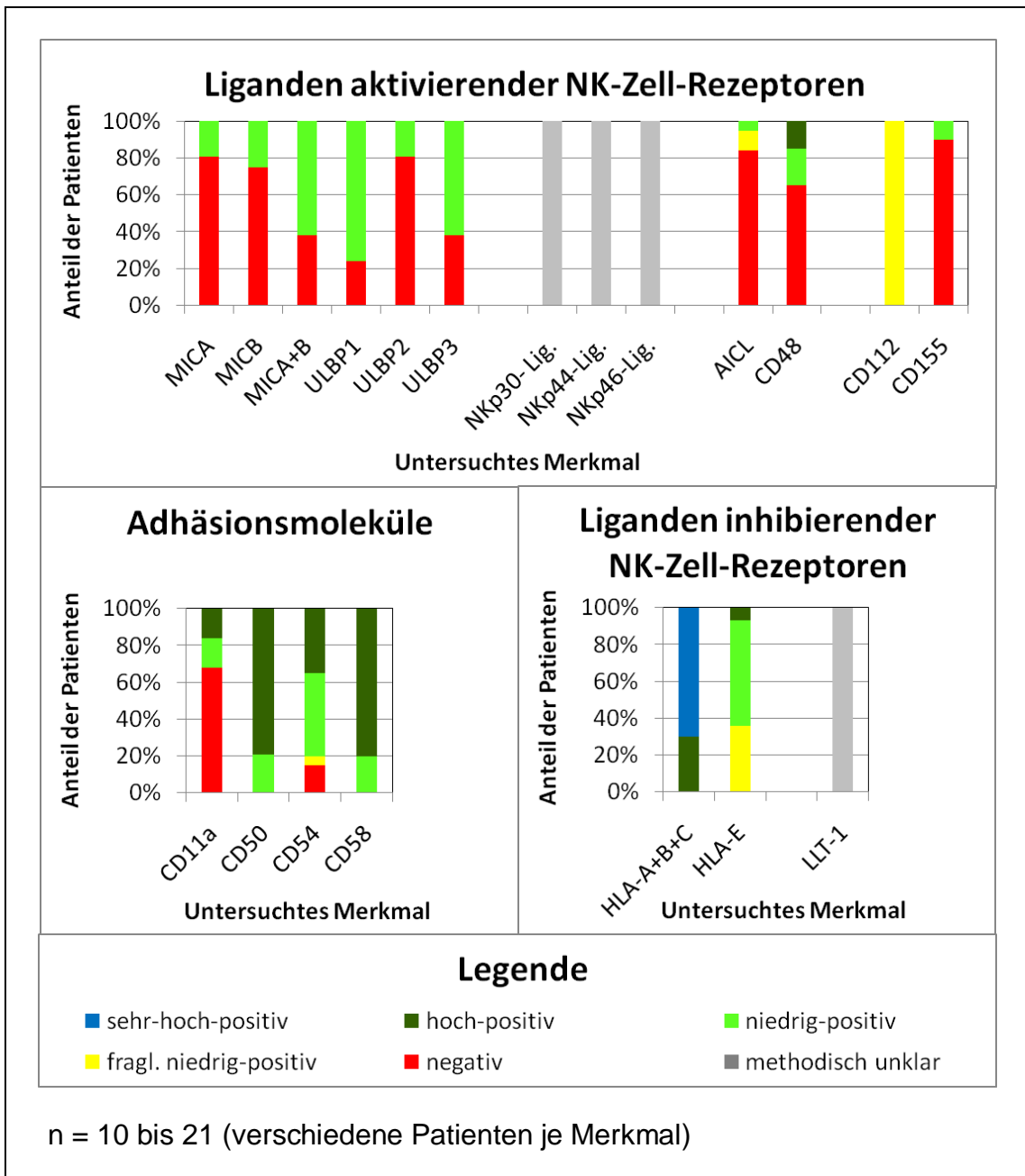


Abbildung 4.35:

FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Antikörpern gegen verschiedene Liganden von NK-Zell-Rezeptoren oder Adhäsionsmoleküle: Anteil derjenigen Patienten an der Stichprobe, deren Blasten die jeweiligen Merkmale nicht, fraglich, in niedriger, hoher oder sehr hoher Dichte exprimiert haben (Zusammenfassung)

### a) Liganden aktivierender NK-Zell-Rezeptoren

Die NKG2D-Rezeptoren gehören zu den am besten untersuchten aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren. NKG2D-Liganden konnten hier auf den Blasten der meisten Patienten nachgewiesen werden, jedoch stets nur in geringer Antigendichte. Niedrig positiv waren 19 % der Proben für MICA, 25 % für MICB, 62 % für MICA und/oder MICB, 76 % für ULBP1, 19 % für ULBP2 und 62 % für ULBP3 (zur Unstimmigkeit zwischen den Ergebnissen mit dem MICA-, dem MICB- und dem MICA+B-Antikörper siehe Kapitel 5.1.3). Quantitativ wurden Antikörper-Bindungskapazitäten bis maximal rund 1 000 für Primärantikörper gegen eine Art von NKG2D-Liganden (ULBP1) gemessen, für die Summe der fünf untersuchten NKG2D-Liganden lag der maximale SABC-Wert bei rund 1 500.

Bei den NCR handelt es sich um aktivierende NK-Zell-Rezeptoren, deren Liganden bis heute nicht identifiziert wurden. NCR-Liganden konnten hier aufgrund methodischer Probleme weder nachgewiesen noch ihre Expression widerlegt werden.

An weiteren Liganden von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren konnten AICL, CD48 und CD155 nur auf den Blasten von einer Minderheit der Patienten nachgewiesen werden: Die Blasten von einem von 19 Patienten waren niedrig positiv für AICL, die von zwei weiteren waren fraglich niedrig positiv, die übrigen waren negativ für AICL. Die Blasten von 15 % der Patienten waren hoch-positiv für CD48, die von 20 % waren niedrig-positiv und die von 65 % waren negativ für CD48. Für CD155 waren die Blasten von 10 % (2 von 21) der Patienten niedrig-positiv, 90 % waren negativ. CD112 war fraglich in geringer Expressionsdichte auf den Blasten mancher oder aller Patienten vorhanden.

## **b) Adhäsionsmoleküle**

Die Adhäsionsmoleküle werden von manchen Autoren zu den aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren gerechnet. Sie dienen dem Zell-Zell-Kontakt, induzieren aber teilweise auch aktivierende Signale in NK-Zellen. Adhäsionsmoleküle kommen auf NK-Zellen und Blasten vor.

Die Adhäsionsmoleküle CD50, CD54 und CD58 konnten auf den Blasten der meisten Patienten nachgewiesen werden: Die Blasten von 79 % der Patienten exprimierten CD50 in hoher Expressionsdichte, die von 21 % in niedriger Expressionsdichte. Die Blasten von 35 % der Patienten exprimierten CD54 in hoher und von 45 % in niedriger Expressionsdichte, die von 5 % (1 Patient) waren fraglich niedrig positiv und nur die von 15 % waren negativ für CD54. Für CD58 waren die Blasten von 80 % der Patienten hoch-positiv und die von 20 % waren niedrig-positiv. Lediglich für CD11a waren die Blasten von 68 % der Patienten negativ, jeweils 16 % waren niedrig- und hoch-positiv.

## **c) Liganden inhibierender NK-Zell-Rezeptoren**

Zu den bekanntesten und nach heutigem Kenntnisstand wichtigsten Liganden inhibierender NK-Zell-Rezeptoren gehören die HLA-Klasse-I-Moleküle HLA-A, HLA-B und HLA-C. Ihre Expression auf kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten wurde hier mittels Quantitativer FACS-Analyse untersucht. Als Primärantikörper dienten W6/32-Antikörper, die an alle drei Moleküle binden. Damit wurden für HLA-A+B+C SABC-Werte von rund 50 000 bis rund 370 000 ermittelt. Die Proben waren somit alle hoch- oder sehr-hoch-positiv für HLA-Klasse-I-Moleküle. Selbst der kleinste bestimmte SABC-Wert für HLA-Klasse-I-Moleküle war noch etwa 250-mal so groß wie der größte bestimmte SABC-Wert für die Summe aller untersuchten NKG2D-Liganden (vergleiche Abschnitt a)). Sehr-hoch-positive Proben gab es in dieser Arbeit insgesamt nur für HLA-Klasse-I-Moleküle. Die Expressionsdichte der HLA-Klasse-I-Moleküle variierte dabei

zwischen den Blasten der verschiedenen Patienten stark, zwischen den einzelnen Blasten eines jeden Patienten variierte sie dagegen kaum.

HLA-E gehört zu den HLA-Klasse-IB-Molekülen und bindet ebenfalls an inhibierende NK-Zell-Rezeptoren, neueren Erkenntnissen zufolge aber auch an aktivierende NK-Zell-Rezeptoren. Die Expression von HLA-E auf den Blasten wurde hier ebenfalls mittels Quantitativer FACS-Analyse untersucht. Dabei wurden SABC-Werte von -281 bis 1 787 ermittelt. Für die Proben mit  $SABC < 200$  konnte nicht entschieden werden, ob sie HLA-E exprimiert haben, da die Quantitative FACS-Analyse in diesem Bereich zu ungenau ist. Diese Proben wurden also als fraglich niedrig-positiv gewertet (36 % der Proben). 57 % der Proben waren niedrig-positiv ( $200 \leq SABC < 1\ 000$ ) und 7 % (eine Probe) waren hoch-positiv. Eine Korrelation der Expressionsdichten von HLA-A+B+C und HLA-E war hier kaum zu beobachten (Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,0315$ ), was jedoch nicht zwingend auf eine entsprechend geringe Korrelation der Merkmale selbst schließen lässt, da die Quantitative FACS-Analyse für niedrig-positive und negative Merkmale nur ungenaue Ergebnisse liefert.

LLT-1, der Ligand des inhibierenden NK-Zell-Rezeptors NKR-P1A, konnte auf den Blasten keines Patienten nachgewiesen werden. Da keine Positivkontrolle zur Verfügung stand, kann daraus jedoch nicht sicher geschlossen werden, dass LLT-1 von den Blasten nicht exprimiert wurde.

#### **d) Sonstige Moleküle**

Für das Vorkommen von NG2 auf kindlichen ALL-Blasten wurde ein Zusammenhang mit den Translationen  $t(4;11)(q21;q23)$  und  $t(11;19)(p13;q23)$  beschrieben. Bei betroffenen Patienten war die Rückfallquote deutlich höher als bei NG2-negativen Patienten. Deshalb wurden hier kindliche B-Reihen-ALL-Blasten auch auf das Vorkommen dieser Moleküle hin untersucht. Alle

untersuchten Proben waren jedoch negativ für NG2, wobei Blasten mit bekanntem MLL-Rearrangement nicht zur Verfügung standen. Somit konnten auch eine eventuelle funktionelle Bedeutung von NG2 oder eine Korrelation mit der Expression weiterer Oberflächenmoleküle leider nicht untersucht werden.

#### **4.8.3 Funktionelle Bedeutung verschiedener Rezeptor-Ligand-Paare**

Zur Untersuchung der zytotoxischen Aktivität natürlicher Killerzellen gegenüber Blasten mit und ohne Blockade von Rezeptoren oder Liganden wurden BATDA-release-assays (Zytotoxizitätstests) durchgeführt. Diese sollten Hinweise auf die funktionelle Bedeutung verschiedener Rezeptor-Ligand-Paare liefern. Da es zur Bedeutung inhibierender Rezeptoren bei der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen gegenüber kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten schon mehr veröffentlichte Ergebnisse gab als zur Bedeutung der aktivierenden Rezeptoren, wurden hier nur Versuche mit Blockade von aktivierenden Rezeptoren oder ihren Liganden sowie Adhäsionsmolekülen durchgeführt. Durch den Vergleich der verschiedenen Tests untereinander sollten zusätzlich Erkenntnisse über die funktionelle Bedeutung inhibierender Rezeptor-Ligand-Paare gewonnen werden.

Da unstimulierte NK-Zellen die kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten zu schlecht lysiert haben, um einen Effekt von Blockaden aktivierender Rezeptoren beobachten zu können, wurden Blockadeversuche mit IL-2-stimulierten NK-Zellen durchgeführt.

Zur Auswertung der Zytotoxizitätstests wurde jeweils die Prozentuale Spezifische Lyse (PSL) von Ansätzen mit und ohne Blockade verglichen. Sie gibt an, welcher Anteil der Zielzellen im Testzeitraum von den NK-Zellen lysiert worden ist. Damit ist die PSL ein Maß für die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen unter den gegebenen Testbedingungen. Je größer die PSL, desto aktiver waren die NK-Zellen.

Die Blockade von NKG2D-Rezeptoren führte in sieben vergleichbaren Zytotoxizitätstests (drei Tests mit, vier Tests ohne KIR-Mismatch zwischen NK-Zellen und Blasten) nicht zu einer signifikanten Reduktion der PSL. Durch eine Steigerung der Konzentration der verwendeten Antikörper konnte die PSL nur geringfügig weiter reduziert werden. In zwei ergänzenden Zytotoxizitätstests mit NK-Zellen und K562-Zellen als Targetzellen (diese Zellen exprimieren NKG2D-Liganden in hoher Dichte) wurde die PSL durch Blockade von NKG2D-Rezeptoren ebenfalls nur gering reduziert.

Die Blockade von NCR (NKp30+44+46) führte dagegen in sechs vergleichbaren Zytotoxizitätstests (drei Tests mit, drei Tests ohne KIR-Mismatch zwischen NK-Zellen und Blasten) zu einer geringen aber signifikanten Reduktion der PSL. Die PSL konnte durch eine Steigerung der Konzentration der verwendeten Antikörper weiter reduziert werden.

In je zwei Zytotoxizitätstests war unter Zugabe von CD48- oder CD112-Antikörpern die PSL deutlich vermindert (zur Negativkontrolle siehe Kapitel 4.7.3, Abschnitt b)). In einem Test war die PSL bei Blockade eines Adhäsionsmoleküls (CD50) um 26 % vermindert, bei den anderen drei untersuchten Adhäsionsmolekülen war sie in je einem Test kaum vermindert. Eine größere Anzahl von Versuchen wäre hier interessant.

Eine negative Korrelation zwischen der Expressionsdichte von HLA-Klasse-I-Molekülen und der PSL, sowie eine größere PSL bei Versuchen mit KIR-Mismatch im Vergleich zu Versuchen ohne KIR-Mismatch, waren bei den vergleichbaren Versuchen dieser Arbeit zwar nicht zu beobachten, aufgrund der geringen Anzahl vergleichbarer Versuche waren diese Ergebnisse jedoch nicht statistisch aussagekräftig und standen mit entsprechenden Thesen nicht im Widerspruch. Für IL-2-stimulierte NK-Zellen konnte eine mäßige negative Korrelation der PSL mit der Expressionsdichte von HLA-E auf Blasten beobachtet werden, auch hier war die Aussagekraft aufgrund der geringen Anzahl vergleichbarer Tests jedoch gering. Weitere Versuche wären hier sicher lohnend.

# 5 Diskussion

## 5.1 Methodenkritik

### 5.1.1 Einführung einer neuen Auswertungsmethode der Qualitativen FACS-Analyse (MNF)

Mit den bislang etablierten Auswertungsmethoden der Qualitativen FACS-Analyse war es nicht möglich, gering exprimierte Merkmale gegen nicht exprimierte Merkmale abzugrenzen. Diese Unterscheidung kann von großer Bedeutung sein, denn auch gering exprimierte Merkmale können für die Zellfunktion wichtige Aufgaben erfüllen. In dieser Arbeit wurde eine neue Auswertungsmethode entwickelt, die eine solche Unterscheidung in vielen Fällen möglich macht. Voraussetzung hierfür ist jedoch eine statistisch auswertbare Anzahl von vergleichbaren Einzelwerten (ab etwa 20 Werte). Für die Bewertung einzelner Proben bietet die Methode dagegen keine Vorteile.

Zentrale Bedeutung für die neue Auswertungsmethode hat die Berechnung von sog. MNF-Werten (siehe Kapitel 4.1.2). Die Aussagekraft der MNF-Werte wurde experimentell durch den Vergleich mit den Ergebnissen einer etablierten quantitativen Methode [59] belegt. Dabei korrelierten die MNF-Werte gut mit den Werten der Spezifischen Antikörper-Bindungskapazität (SABC), die mit Quantitativer FACS-Analyse ermittelt wurden. Das Bestimmtheitsmaß lag bei  $R^2 = 0,8816$  ( $n = 78$  Wertepaare).



Die Varianz der MNF-Werte in Abhängigkeit von den SABC-Werten ist dadurch zu erklären, dass die unspezifische Fluoreszenz der untersuchten Zellen in die Berechnung der MNF eingeht. Da die unspezifische Fluoreszenz zwischen den Proben einer Messserie nur gering variiert, sind die MNF-Werte einer Messserie dennoch untereinander vergleichbar. Die SABC dagegen ist idealerweise unabhängig von der unspezifischen Fluoreszenz der Zellen. Das Bestimmtheitsmaß der Korrelation von MNF und SABC wird also hauptsächlich bestimmt durch die Varianz der unspezifischen Fluoreszenz der Proben. Eine geringere Rolle spielen außerdem Messungenauigkeiten beim Bestimmen der Eichgeraden bei der Quantitativen FACS-Analyse. MNF und SABC sind unabhängig von der Verstärkerspannung und machen damit Proben aus verschiedenen Messreihen direkt vergleichbar.

Die MNF allein kann, im Gegensatz zur SABC, keine Aussage über die absolute Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen auf untersuchten Zellen liefern. Sie erreichte hier für ähnliche Merkmalsträger, ähnliche Primärantikörper, gleiche Sekundärantikörper und vergleichbare Versuchsdurchführungen jedoch Verhältnisskalenniveau, denn die MNF war (mit  $R = 0,94$ ) das Produkt aus SABC und einer Konstanten. Bei Kenntnis von MNF und SABC von mindestens einer Probe einer Messserie kann man somit die SABC-Werte der übrigen Proben aus den MNF-Werten abschätzen. Dieses Vorgehen bietet die Möglichkeit, bei nur geringer Zunahme der Messungenauigkeit die SABC großer Probenmengen mit vergleichsweise geringem Aufwand zu ermitteln.

Untersucht wurde hier nicht, wie gut die MNF-Werte von Proben aus verschiedenen Messserien vergleichbar sind. Aus den theoretischen Überlegungen im vorletzten Abschnitt lässt sich jedoch ableiten, dass die MNF-Werte, die für verschiedene Zellarten oder mit verschiedenartigen Antikörpern ermittelt wurden, nicht aussagekräftig miteinander verglichen werden können. Möglich wird der Vergleich jedoch wieder, wenn man die SABC-Werte aus den MNF-Werten abschätzt wie im vorigen Abschnitt beschrieben.

Der experimentelle Vergleich von SABC und MNF wurde hier für nur eine Zellart (Blasten) durchgeführt. Vor der Anwendung der Methode zur Auswertung der FACS-Analysen anderer Zellarten sollte überprüft werden, wie stark die unspezifische Fluoreszenz der Zellen der verschiedenen Proben einer geplanten Messserie variiert.

### **5.1.2 FACS-Analyse von Blasten - Allgemeines**

Die FACS-Analyse bietet die Möglichkeit, eine große Anzahl von Zellen in kurzer Zeit einzeln auf das Vorkommen bestimmter Merkmale hin zu untersuchen. Die Ergebnisse können dann statistisch weiter ausgewertet werden. Das eingesetzte Datenverarbeitungsprogramm „CellQuest“ kann aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Einzelzellen Geometrische Mittelwerte (GeoMean-Werte) berechnen, die dann für jede Probe und Negativkontrolle zur weiteren Berechnung zur Verfügung stehen. Da der GeoMean-Wert jeder Probe einen Mittelwert aus den Messwerten vieler Einzelzellen darstellt, werden schon auf dieser Stufe der Auswertung Ungenauigkeiten durch die natürliche Varianz der Einzelzellen minimiert. Durch die weitere statistische Auswertung vieler so gewonnener GeoMean-Werte werden insgesamt noch größere Zellzahlen evaluiert.

Manche Autoren sind der Meinung, dass Zellen bei der FACS-Analyse nach Zugabe der Antikörper mehrfach gewaschen werden müssen [57]. In dieser Arbeit wurden die Zellen nach der Inkubation mit Antikörpern jeweils nur einmal gewaschen. Dies barg ein höheres Risiko für Messungenauigkeiten, ging jedoch auch mit einem deutlich geringeren Zellverlust einher. Da kindliche Blasten nur in sehr begrenztem Umfang zur Verfügung standen und eine Vielzahl an Oberflächenmerkmalen untersucht werden sollte, wurde dieses höhere Risiko für Messungenauigkeiten in Kauf genommen. Wie im Ergebnisteil

gezeigt, ergaben sich dennoch auch für gering exprimierte Merkmale aussagekräftige Ergebnisse.

Die untersuchten Blasten waren nach der Gewinnung zunächst kryokonserviert worden. Zur FACS-Analyse wurden sie möglichst frisch aufgetaut oder in einzelnen Fällen maximal einen Tag lang im Kühlschrank aufbewahrt. Die Kryokonservierung von Zellen stellt heute eine etablierte Methode dar. Dennoch sind Veränderungen der Zellen nicht auszuschließen. So werden z. B. NKG2D-Liganden von vielen Zellen bei Stress vermehrt exprimiert [99]. Wie der Stress des Einfrierens, Auftauens und der Markierung der Blasten sich auf die Expression der untersuchten Moleküle ausgewirkt hatte, bleibt unklar.

### **5.1.3 Qualitative FACS-Analyse von NKG2D-Liganden auf Blasten mit Primär- und Sekundärantikörpern**

Die FACS-Analyse mit Primär- und Sekundärantikörpern birgt immer ein höheres Risiko von Messungenauigkeiten als die Verwendung von direkten (fluoreszenzgekoppelten) Antikörpern. Da aber direkte Antikörper gegen die NKG2D-Liganden nicht zur Verfügung standen, dienten unmarkierte Primärantikörper und PE-markierte Sekundärantikörper zum Nachweis. PE-markierte Antikörper eignen sich besonders gut zum Nachweis von Antigenen mit geringer Expressionsdichte, da die PE-Moleküle vergleichsweise stark leuchten.

Bei der Auswertung fiel auf, dass der MNF-Wert für MICA+B (ermittelt mit einem Antikörper gegen beide Moleküle) häufig deutlich größer war als die Summe der MNF-Werte für MICA und MICB. Dies ist entweder dadurch zu erklären, dass die Antikörper gegen MICA und MICB schlechter an die gesuchten Strukturen gebunden haben als der Antikörper gegen beide Strukturen, oder aber dadurch, dass der Antikörper gegen MICA+MICB stärker unspezifisch an

die Blasten gebunden hat. Die Erklärung einer schlechten spezifischen Bindung der Antikörper gegen MICA und MICB erscheint hier plausibler.

#### **5.1.4 Quantitative FACS-Analyse von NKG2D-Liganden auf Blasten**

Es gibt verschiedene Methoden der Quantitativen Durchflusszytometrie [59, 96, 94]. Dabei gelten das hier verwendete QIFIKIT und vergleichbare Methoden als am genauesten. Dennoch ist die Methode fehleranfällig. Das National Institute of Standards and Technology (NIST) der USA hat sich deshalb immer wieder um die Standardisierung der Quantitativen Durchflusszytometrie bemüht [93].

Das QIFIKIT ist eigentlich für den quantitativen Nachweis hoher Antigendichten konzipiert, wie sie in dieser Arbeit für HLA-A+B+C vorlagen. Daneben wurde in dieser Arbeit auch ein quantitativer Nachweis der gering exprimierten NKG2D-Liganden versucht. Wie in Kapitel 4.2 gezeigt wurde, eignete sich die Methode zum Nachweis von Antikörper-Bindungskapazitäten ab etwa 200 Antikörpern pro Zelle, darunter war sie zu ungenau. Dies ist immer noch eine erstaunlich hohe Genauigkeit, denn die Eichpopulation mit der geringsten Antigendichte im QIFIKIT weist eine SABC von etwa 3000 Bindungsstellen (je nach Charge) auf. Die SABC für NKG2D-Liganden-Antikörper auf Blasten lag damit weit darunter. Hinzu kommt, dass FITC-markierte Antikörper zum Nachweis von geringen Antigendichten nicht so gut geeignet sind, da sie weniger stark fluoreszieren als PE-markierte Antikörper.

Wie bei der MNF bei der Qualitativen FACS-Analyse stimmte hier häufig die Summe der SABC für den MICA-Antikörper und den MICB-Antikörper nicht überein mit der SABC für den MICA+B-Antikörper (siehe Kapitel 5.1.3).

### **5.1.5 Qualitative FACS-Analyse von NCR-Liganden und NKG2D-Liganden auf Blasten mit löslichen Rezeptor-Molekülen und Sekundärantikörpern**

Die Liganden der NCR sind bis heute nicht identifiziert. Auch sind keine spezifischen Antikörper gegen sie auf dem Markt. Deshalb wurde versucht, NCR-Liganden mithilfe von löslichen NCR-Molekülen nachzuweisen. Diese sollten fest an gegebenenfalls vorhandene NCR-Liganden binden und mittels FACS-Analyse nach Markierung mit einem Sekundärantikörper sichtbar gemacht werden.

Probleme ergaben sich hier bei der Suche nach einer geeigneten Positivkontrolle. Der Hersteller hatte die Funktionstüchtigkeit der Moleküle durch funktionelle Tests belegt (siehe Kapitel 3.5.2), eine feste Bindung der Moleküle an Zellen hatte er jedoch nicht beschrieben. Arnon et al. [4] beschrieben eine deutliche Verminderung des Wachstums von menschlichen Prostata-Karzinom-Zellen durch eine Behandlung mit vergleichbaren löslichen NKp30-Molekülen. Esin et al. [26] setzten lösliche NCR-Moleküle mit Fc-Teil ein, um Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) mittels FACS-Analyse auf das Vorkommen von NCR-Liganden hin zu untersuchen. Dabei wurde für mit NKp44-Molekülen und Sekundärantikörpern inkubierte BCG-Zellen durchschnittlich eine höhere Fluoreszenz nachgewiesen als für BCG-Zellen, die mit NKp30- oder NKp46-Molekülen und Sekundärantikörpern inkubiert worden waren. Die Bindung von NKp44-Fc-Molekülen an BCG wurde elektronenmikroskopisch bestätigt. Nowbakht et al. [72] setzten lösliche NCR-Moleküle zur FACS-Analyse ein, an die FITC-konjugierte Ziege-anti-Maus-Antikörper spezifisch banden. Sie zeigten, dass diese Moleküle spezifisch an THP-1-Zellen banden, nicht aber an K562. Der Nachweis einer spezifischen Bindung der löslichen NCR-Moleküle an BCG oder THP-1 wurde in dieser Arbeit nicht versucht. Stattdessen wurde der Nachweis einer spezifischen Bindung an Granulozyten, Monozyten oder Lymphozyten gesunder Spender

versucht, was jedoch kein positives Ergebnis brachte. Vergleichend wurden NKG2D-Moleküle desselben Herstellers und vergleichbaren Aufbaus eingesetzt. Eine spezifische Bindung dieser Moleküle an K562 konnte gezeigt werden.

Weitere Probleme bereitete die Herstellung geeigneter Negativkontrollen. Das zunächst dafür eingesetzte Flebogamma erwies sich als nicht geeignet, denn Negativkontrollen aus Zellen und Sekundärantikörpern wiesen eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität auf als Negativkontrollen aus Zellen, Flebogamma und Sekundärantikörpern. Dies ist am ehesten dadurch zu erklären, dass Flebogamma eine starke unspezifische Bindung der antihumanen Sekundärantikörper an die Blasten verhinderte. Da zu den Proben mit löslichen Rezeptormolekülen kein Flebogamma zugegeben worden war, waren Proben und Negativkontrollen nicht aussagekräftig vergleichbar.

Aus dem vorigen Abschnitt lässt sich ableiten, dass vermutlich auch eine starke unspezifische Bindung des antihumanen Sekundärantikörpers zumindest beim Nachweis von Liganden mit geringer Expressionsdichte ein Problem darstellte. Hier waren Nowbakht et al. (s. o.) im Vorteil, da sie lösliche Rezeptormoleküle hergestellt hatten, die mit Anti-Maus-Antikörpern markierbar waren.

#### **5.1.6 Quantitative FACS-Analyse von HLA-A + HLA-B + HLA-C sowie HLA-E auf Blasten**

Die Quantitativen FACS-Analysen der Expression von HLA-A+B+C sowie von HLA-E auf Blasten wurden genauso durchgeführt und ausgewertet wie die Quantitativen FACS-Analysen der NKG2D-Liganden, es wurden lediglich andere Primärantikörper verwendet (siehe auch Kapitel 5.1.4).

Die SABC-Werte von HLA-A+B+C und von HLA-E korrelierten hier mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,0315 nur gering. Die geringe Korrelation in dieser

Arbeit kann darauf zurückzuführen sein, dass HLA-E von den Blasten nur mit geringen Antigendichten exprimiert wurde und dass die Quantitative FACS-Analyse für solch geringe Antigendichten sehr ungenaue Ergebnisse lieferte. Auf eine entsprechend geringe Korrelation der Antigendichten der Moleküle selbst kann also nicht geschlossen werden.

### **5.1.7 Qualitative FACS-Analyse weiterer Moleküle mit potentiell NK-Zell-modulierender Funktion auf Blasten**

Zum Nachweis der untersuchten Adhäsionsmoleküle standen direkte Antikörper zur Verfügung. Die Verwendung von direkten Antikörpern birgt ein geringeres Risiko von Messungenauigkeiten als die Verwendung von Primär- und Sekundärantikörpern. Da die meisten Adhäsionsmoleküle von den Blasten der meisten Patienten in hoher Dichte exprimiert wurden, konnten die meisten Proben bereits mit der graphischen Auswertungsmethode als positiv eingestuft werden. Die Expressionsdichte der Moleküle variierte jedoch sehr stark. Durch die Ermittlung von MNF-Werten und deren Häufigkeitsverteilungen konnten die Proben statistisch begründbar in negative, niedrig positive und hoch positive Proben eingeteilt werden. Lediglich für eine Probe konnte nicht entschieden werden, ob sie die untersuchten Adhäsionsmoleküle (CD54) nicht oder nur in geringer Dichte exprimierte. Damit ermöglichte die Auswertung mittels MNF auch hier präzisere Aussagen als bisher übliche Auswertungsmethoden der Qualitativen FACS-Analyse.

Die Qualitativen FACS-Analysen der Expression von AICL und LLT-1 wurden genauso durchgeführt wie die Qualitativen FACS-Analysen der NKG2D-Liganden, es wurden lediglich andere Primärantikörper verwendet (siehe auch Kapitel 5.1.3). Die Versuche wurden zunächst als Blindversuche durchgeführt, um bei der ursprünglich geplanten graphischen Auswertung, bei der Proben mit gering exprimierten Merkmalen nicht objektiv eindeutig in positive oder negative

Proben einzuteilen sind, eine möglichst geringe Beeinflussung der Ergebnisse durch die Untersuchererwartung zu erhalten. Je zwei verschiedene Antikörperarten richteten sich dabei gegen dasselbe Merkmal, wobei zunächst nicht bekannt war, welche das waren. Die Ergebnisse der graphischen „blinden“ Auswertung wurden jedoch im Ergebnisteil nicht weiter berücksichtigt, da die statistische Auswertung errechneter MNF-Werte eine objektivere Auswertungsmethode darstellte. Positivkontrollen standen für diesen „Blindversuch“ leider nicht zur Verfügung, weshalb insbesondere die zu 100 % negativen Ergebnisse für LLT-1 in Frage gestellt werden können.

Die Qualitativen FACS-Analysen der Expression von CD48 und CD112 wurden genauso durchgeführt und ausgewertet wie die Qualitativen FACS-Analysen der Adhäsionsmoleküle, es wurden lediglich andere direkte Antikörper verwendet (siehe oben). Bei CD48 konnten so alle Proben in negative, niedrig-positive und hoch-positive Proben eingeteilt werden. Für CD112 konnte jedoch objektiv kein Grenzwert zur Einteilung in negative und niedrig-positive Proben festgelegt werden. Die Häufigkeitsverteilung der MNF-Werte legt die Vermutung nahe, dass die Expressionsdichte von CD112 zwischen den Blasten der verschiedenen Patienten variierte, die einzelnen Proben konnten hier jedoch alle nur als „fraglich niedrig-positiv“ gewertet werden. Dies zeigt, dass die Einteilung in positive und negative Proben mithilfe der Häufigkeitsverteilung von MNF-Werten schwierig wird, wenn zwischen negativen und positiven Proben kein eindeutiges Minimum auftritt, was durch die Häufigkeitsverteilung der untersuchten Merkmale selbst bedingt sein kann.

Die Qualitativen FACS-Analysen der Expression von CD155 und NG2 wurden genauso durchgeführt und ausgewertet wie die Qualitativen FACS-Analysen der NKG2D-Liganden, es wurden lediglich andere Primärantikörper verwendet (siehe auch Kapitel 5.1.3).



### **5.1.8 Anreicherung, Untersuchung und Stimulation von NK-Zellen für Zytotoxizitätstests**

Die NK-Zellen für diese Arbeit stammten von freiwilligen gesunden Spendern, die unter Berücksichtigung ihres HLA-Typs ausgewählt wurden. So wurde sichergestellt, dass bei den zentralen Versuchsserien etwa gleich viele Versuche mit und ohne Vorliegen eines sogenannten KIR-Mismatches durchgeführt wurden.

Die Anreicherung von NK-Zellen mithilfe von magnetisch markierten Antikörpern, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, ist eine etablierte Methode, die sich auf Vitalität, Proliferationsverhalten und KIR-Expression der NK-Zellen nicht relevant auswirkt [35, 67, 78, 52]. Dennoch ist eine Veränderung der Expression von NK-Zell-Rezeptoren durch die Anreicherung nicht auszuschließen, da die Expressionsdichte der Rezeptoren durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden kann (siehe Kapitel 1.3.1 und 1.3.2). In dieser Arbeit wurden angereicherte NK-Zellen beider Spender für die zentralen Versuchsserien auf die Expression von NKG2D-Rezeptoren und NCR hin untersucht. Über die Verhältnisse in vivo kann dadurch jedoch keine zuverlässige Aussage gemacht werden.

Für die Zytotoxizitätstests mit Blockade von Rezeptoren oder Liganden wurden NK-Zellen mit IL 2 stimuliert, denn unstimulierte NK-Zellen zeigten eine so geringe zytotoxische Aktivität gegenüber den Blasten, dass dadurch in Blockadeversuchen keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielt werden konnten. Die IL-2-Stimulation von NK-Zellen wird schon lange in vitro und in vivo eingesetzt und beforscht [58, 24, 55, 29, 65], die NK-Zell-stimulierende Wirkung von IL 2 ist unumstritten. Auch hier konnte damit die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber Blasten deutlich erhöht werden. Allerdings muss hinterfragt werden, inwieweit die Ergebnisse der Blockadeversuche mit IL-2-stimulierten NK-Zellen zu verallgemeinern sind.

### 5.1.9 Zytotoxizitätstests

Zur Untersuchung der zytotoxischen Aktivität natürlicher Killerzellen mit und ohne Blockade von Rezeptoren oder Liganden wurden BATDA-release-assays (Zytotoxizitätstests) durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine etablierte Methode [10, 78].

Die zur Blockade zugegebenen Antikörpersuspensionen enthielten Natriumazid, das die Aktivität der NK-Zellen möglicherweise beeinflusst haben könnte. Deshalb wurden bei den zentralen Versuchen immer Kontrollansätze hergestellt, zu denen IgG1-Antikörper-Suspension zugegeben wurde, sodass die Azidkonzentration der Kontrollen immer mindestens so hoch war wie die der Proben. Zur Auswertung wurden dann diese Kontrollen mit den Proben verglichen.

NK-Zellen interagieren in vivo mit einer Vielzahl anderer Zellen des Immunsystems, in den Zytotoxizitätstests wurden jedoch angereicherte NK-Zellen untersucht. Somit kann keine Aussage darüber gemacht werden, wie sich die NK-Zellen gegenüber den Blasten in Gegenwart anderer Zellarten verhalten hätten. Dafür kann die jeweils ermittelte prozentuale spezifische Lyse aber eindeutig den NK-Zellen zugeschrieben werden, eine Überlagerung mit T-Zell-Effekten spielte keine relevante Rolle.

Aufgrund des bereits großen Umfangs dieser Arbeit wurden nur wenige Zytotoxizitätstests durchgeführt. Um die Ergebnisse zu überprüfen, sollten entsprechende Versuche mit einer großen Anzahl von Blasten verschiedener Patienten und NK-Zellen verschiedener Spender durchgeführt werden.

## 5.2 NKG2D-Rezeptoren und ihre Liganden

NKG2D-Rezeptoren und ihre Liganden spielen bei der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen gegenüber vielerlei Tumorzellen eine wichtige Rolle [47, 50, 62]. NKG2D-Liganden werden von vielen Zellarten bei zellulärem Stress verstärkt exprimiert [72, 83], die Zellen werden dadurch empfänglicher für die Lyse durch NK-Zellen. Andererseits regulieren einige Tumorzellarten die Expression der NKG2D-Liganden herunter und entkommen so der Lyse durch NK-Zellen [54, 64].

Über die Expression von NKG2D-Liganden auf kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten ist noch wenig bekannt. In dieser Arbeit konnten NKG2D-Liganden auf den meisten untersuchten kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten nachgewiesen werden, es wurden jedoch sehr geringe Antigendichten gemessen. Salih et al. [90] wiesen NKG2D-Liganden auf den Blasten von erwachsenen ALL-Patienten nach. Romanski et al. [86] konnten auf verschiedenen B-Vorläufer-ALL-Zelllinien keine Expression von MICA/B nachweisen. Sie vertraten die These, dass die geringe NK-Zell-Sensibilität dieser Zelllinien auf die fehlende Expression aktivierender Rezeptoren zurückzuführen war, da die Zellen auch durch die KIR-arme NK-Zelllinie NK-92 schlecht lysiert wurden. In dieser Arbeit wurden kindliche B-Reihen-ALL-Blasten in sieben Zytotoxizitätstests mit und ohne KIR-Mismatch von unstimulierten NK-Zellen schlecht lysiert, was zur These von Romanski et al. passt. Durch die Stimulation mit IL 2 konnten jedoch gute Lysen erreicht werden. Die Blockade von NKG2D-Rezeptoren auf IL-2-stimulierten NK-Zellen hatte keine signifikante Auswirkung auf deren Zytotoxizität gegenüber den Blasten, was dafür spricht, dass NKG2D-Rezeptoren hier zumindest keine große Rolle spielten. Dies passt wiederum dazu, dass NKG2D-Liganden auf den Blasten nur in sehr geringen Antigendichten nachgewiesen wurden. Interessant ist hier die Frage, ob die Blasten bei stärkerer Expression der NKG2D-Liganden vermehrt lysiert worden wären. Da die Liganden meist

immerhin in geringer Antigendichte exprimiert wurden, könnte es möglich sein, die Blasten zur vermehrten Expression anzuregen, wie dies bei AML-Blasten bereits gelungen ist [72, 85]. Gelänge dies, so böte sich ein interessanter Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Therapien der kindlichen B-Reihen-ALL.

### 5.3 Natural Cytotoxicity Receptors und ihre Liganden

NCR sind aktivierende NK-Zell-Rezeptoren, deren Liganden bis heute nicht identifiziert sind. Die Bedeutung der NCR für die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber vielerlei Targetzellen ist jedoch unumstritten [4, 9, 111]. Über die Bedeutung von NCR und ihren Liganden für die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten ist noch wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurde versucht, NCR-Liganden auf Blasten mithilfe löslicher NCR-Moleküle nachzuweisen. Aufgrund verschiedener methodischer Probleme konnten sie hier jedoch weder nachgewiesen noch ihr Vorkommen widerlegt werden. Mehrere Autoren haben inzwischen eine Bindung ähnlicher löslicher Rezeptormoleküle an verschiedene Zellarten beschrieben [4, 17, 18, 26], was für die Existenz zellgebundener NCR-Liganden spricht. Arnon et al. beschrieben die aktivierende Bindung viraler Hämagglutinine an NKp44 und NKp46 [3] sowie die inhibierende Bindung des viralen Proteins pp65 an NKp30 [5]. Mehrere Autoren zeigten, dass verschiedene Heparansulfate auf der Oberfläche von Targetzellen an NCR binden [11, 39, 40, 41]. Brandt et al. [13] beschrieben ein Molekül namens B7-H6, das von Tumorzellen exprimiert wird und an NKp30 bindet. Pogge von Strandmann et al. [82] zeigten schließlich, dass ein Molekül namens BAT3 von Tumorzellen sezerniert wird, das aktivierend als extrazellulärer Faktor an NKp30 bindet. Sie stellten die These auf, dass

kein direkter Zell-Zell-Kontakt notwendig ist, um NK-Zellen über NCR zu stimulieren.

Um die Bedeutung der NCR für die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten auch ohne Kenntnis ihrer Liganden untersuchen zu können, wurden in dieser Arbeit Zytotoxizitätstests durchgeführt. In sechs vergleichbaren Tests, je drei mit und ohne Vorliegen eines KIR-Mismatches, wurden auf IL-2-stimulierten NK-Zellen NCR mit NCR-Antikörpern blockiert. Die prozentuale spezifische Lyse war dabei bei den Proben mit blockierten NCR signifikant geringer als bei den zugehörigen Negativkontrollen ohne NCR-Blockade. Durch eine Steigerung der Antikörperkonzentrationen konnte die prozentuale spezifische Lyse weiter reduziert werden. Dies zeigte, dass NCR für die NK-Zell-Empfindlichkeit kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten von Bedeutung sind. Pende et al. [77] hatten für die Blasten von zwei cALL-Patienten ebenfalls eine Reduktion der spezifischen Lyse durch NK-Zellen bei Blockade von NCR beobachtet. Verhindert wurde die Lyse durch NCR-Blockade in beiden Untersuchungen nicht, was dafür spricht, dass NCR zusammen mit anderen Regelmechanismen das Ausmaß der Targetzelllyse bestimmen.

Die Lyse von K562-Zellen wurde in dieser Arbeit durch die Blockade von NCR nur gering reduziert. Nowbakht et al. [72] hatten die Bindung von löslichen NCR-Molekülen an THP-1-Zellen, nicht aber an K562-Zellen beschrieben, was dafür spricht, dass die K562-Zellen NCR-Liganden nicht oder nur mit sehr geringer Antigendichte exprimierten. Im Gegensatz dazu beschrieben Mavoungou et al. [63], dass die NK-Zell-Empfindlichkeit von K562-Zellen vom Ausmaß der NCR-Expression auf NK-Zellen abhing.

B-Reihen-ALL-Blasten gelten generell als wenig NK-Zell-sensibel. Auch in dieser Arbeit lysierten unstimulierte NK-Zellen die Blasten nur schlecht. Die Kenntnis der Bedeutung von NCR und ihren Liganden könnte genutzt werden, um neue Therapien zu entwickeln. So beschrieben Nowbakht et al. [72]

Hinweise darauf, dass bei AML-Blasten eine verstärkte NCR-Liganden-Expression induzierbar war. Fauriat et al. [30] zeigten, dass die NK-Zellen von AML-Patienten die NCR-Expression reduzierten, was durch direkten Blastenkontakt induziert wurde und in der Remission reversibel war. Kim et al. [44] zeigten, dass ein Molekül namens Go6983 die verstärkte Expression von NCR auf NK-Zellen induzierte. Die Expression von NCR kann außerdem durch Prolactin, Cortisol und Cyclosporin A (CSA) beeinflusst werden [63, 108]. Gegenstand weiterer Untersuchungen sollte nun sein, ob es möglich ist, entweder B-Reihen-ALL-Blasten zu verstärkter NCR-Liganden-Expression anzuregen oder aber allogene oder autologe NK-Zellen therapeutisch einzusetzen, die NCR verstärkt exprimieren. Beide Ansätze könnten dazu beitragen, das Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen bei NK-Zellen in Richtung Aktivierung zu verschieben und B-Reihen-ALL-Blasten lysierbarer zu machen.

## **5.4 Rezeptoren für HLA-A, HLA-B, HLA-C sowie HLA-E**

HLA-Klasse-I-Moleküle sind nach heutigem Kenntnisstand die wichtigsten Liganden für inhibierende NK-Zell-Rezeptoren (siehe auch Kapitel 1.4). Dabei binden die klassischen HLA-Klasse-I-Moleküle HLA-A, HLA-B und HLA-C an verschiedene Rezeptoren aus der Gruppe der Killer-Immunoglobulin-Like-Receptors (KIR), HLA-E, das zu den HLA-Klasse-IB-Molekülen gehört, bindet an den C-Type-Lectin-artigen Rezeptor CD94/NKG2A. Diese Rezeptoren spielen eine besonders wichtige Rolle bei der Regulation der zytotoxischen NK-Zell-Aktivität, da NK-Zellen mit ihrer Hilfe körpereigene gesunde Zellen an deren HLA-Expression erkennen können und dann nicht lysieren. Kranke oder körperfremde Zellen werden häufig von NK-Zellen an einer veränderten oder fehlenden HLA-Expression erkannt.

In dieser Arbeit wurden für die HLA-A+B+C-Expression von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten SABC-Werte von etwa 50 000 bis etwa 370 000 bestimmt. Dies bestätigt die große Variabilität ihrer Expressionsdichte auf den Blasten, wie sie bereits in früheren Veröffentlichungen beschrieben wurde [78, 80, 31]. Dort wurde auch bereits gezeigt, dass die HLA-A+B+C-Expression der meisten B-Reihen-ALL-Blasten niedriger ist als die gesunder ausgereifter B-Zellen und als die CD34-positiver Stammzellen. Die Expressionsdichte von HLA-A+B+C auf den Blasten korrelierte negativ mit ihrer Prozentualen Spezifischen Lyse durch NK-Zellen. Die Blockade von HLA-Klasse-I-Molekülen auf Blasten mit W6/32-Antikörpern führte zu einer deutlichen Steigerung der PSL insbesondere bei Blasten mit hoher HLA-A+B+C-Expression. Das Ausmaß der Lyse war jedoch durch die Expressionsdichte der HLA-Klasse-I-Moleküle allein nicht erklärbar. Dies bestätigt die These, dass das Ausmaß der HLA-Klasse-I-Expression als ein wichtiger Faktor zusammen mit anderen an der Regulation der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen gegenüber den Blasten beteiligt ist.

Bei der HLA-nichtidentischen Stammzelltransplantation kann ein sog. KIR-Mismatch vorliegen (siehe auch Kapitel 1.4.1 und 1.6.4). Zu den Vor- und Nachteilen eines KIR-Mismatches bei der Stammzelltransplantation von verwandten und nicht-verwandten Spendern bei verschiedenen Leukämieformen wurde inzwischen eine ganze Reihe von Studien publiziert [106]. Vieles spricht dafür, dass kindliche B-Reihen-ALL-Blasten von NK-Zellen bei Vorliegen eines KIR-Mismatches besser lysiert werden als ohne KIR-Mismatch [80, 31]. Während Ruggeri et al. bei erwachsenen Patienten keinen GVL-Effekt alloreaktiver NK-Zellen beobachteten [88, 89], beschrieben Leung et al. [53] ein signifikant geringeres Rückfallrisiko bei Vorliegen eines KIR-Mismatches nach dem Rezeptor-Ligand-Modell für pädiatrische Patienten mit lymphatischen Leukämien, die Stammzellen von HLA-haploidentischen verwandten Spendern erhielten.

All dies zeigt die große Bedeutung der KIR und ihrer Liganden für die NK-Zell-Empfindlichkeit kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten. Bei den Zytotoxizitätstests dieser Arbeit war der Zusammenhang zwischen der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen gegenüber den Blasten und der Expressionsdichte von HLA-Klasse-I-Molekülen oder dem Vorliegen eines KIR-Mismatches zwar nicht offensichtlich, was jedoch bei der Vielzahl der Faktoren, die an der Regulation der NK-Zell-Aktivität beteiligt sind, und der geringen Anzahl an Versuchen in dieser Arbeit mit obengenannten Ergebnissen auch nicht im Widerspruch steht.

Neben den klassischen HLA-Klasse-I-Molekülen (HLA-A, HLA-B und HLA-C) sind auch nicht-klassische HLA-Klasse-I-Moleküle an der NK-Zell-Regulation beteiligt [15, 19, 106]. Auch ihre abweichende Expression könnte Leukämiezellen helfen, der Lyse durch NK-Zellen zu entkommen. Die NK-Zell-inhibierende Wirkung von HLA-E hängt von der Bindung verschiedener HLA-Klasse-I-Sequenz-Peptide ab [60]. Neueren Studien zufolge kann HLA-E je nach präsentierten Peptiden sogar aktivierend wirken, indem es an CD94/NKG2C bindet [81]. Die Expressionsdichte von HLA-E sagt allein also nichts über seine NK-Zell-inhibierende Wirkung aus, ein Zusammenhang der Expressionsdichten von HLA-Klasse-I-Molekülen und HLA-E wird jedoch zumindest für gesunde Zellen vermutet. Eine solche Korrelation war hier nicht zu beobachten, was jedoch methodisch bedingt gewesen sein könnte (siehe Kapitel 5.1.6). Majumder et al. [61] zufolge wird HLA-E von verschiedenen Leukämiezellen nicht exprimiert. Hier war HLA-E auf den meisten kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten nachweisbar, jedoch in geringer Expressionsdichte. Für IL-2-stimulierte NK-Zellen konnte in Zytotoxizitätstests eine mäßige negative Korrelation der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen mit der Expressionsdichte von HLA-E auf Blasten beobachtet werden, aufgrund der geringen Anzahl vergleichbarer Versuche war die Aussagekraft dieses Ergebnisses jedoch gering. Um die Bedeutung von HLA-E weiter zu untersuchen, wären Blockadeversuche interessant. Dabei sollte auch ein Zusammenhang der Expressionsdichte und der Auswirkung von Blockaden mit dem HLA-Klasse-I-Typ untersucht werden.



## 5.5 Weitere Moleküle mit potentiell NK-Zell-modulierender Funktion

### 5.5.1 Adhäsionsmoleküle

Die Bindung von NK-Zellen an Targetzellen durch Adhäsionsmoleküle ist eine wichtige Voraussetzung für deren Lyse [86]. Zur Bedeutung der einzelnen Adhäsionsmoleküle gibt es eine Vielzahl jedoch zum Teil widersprüchlicher Veröffentlichungen [78]. So korrelierte zum Beispiel die Expressionsdichte des Adhäsionsmoleküls CD54 auf leukämischen Blasten in einer Studie von Romanski et al. [86] nicht mit dem Ausmaß der Lyse der Blasten durch die NK-Zellen. Blockadeversuche in geringem Umfang ergaben uneindeutige Ergebnisse. Durch IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  konnte eine Steigerung der CD54-Expression von B-Reihen-ALL-Blasten induziert werden, was jedoch nicht zu einer gesteigerten NK-Zell-Empfindlichkeit führte. Insgesamt weisen die verschiedenen Studien darauf hin, dass für verschiedene Targetzellen verschiedene Adhäsionsmoleküle von Bedeutung sind.

Im Gegensatz zu ALL-Blasten von erwachsenen Patienten, die häufig keine Adhäsionsmoleküle exprimieren [88], konnten hier die meisten untersuchten Adhäsionsmoleküle auf den Blasten der meisten Patienten nachgewiesen werden, teils sogar in hoher Expressionsdichte. Lediglich CD11a wurde von den Blasten von 68 % der Patienten nicht exprimiert. Das Adhäsionsmolekül ICAM-2 (CD102) wurde zwar in dieser Arbeit nicht untersucht, konnte jedoch schon früher in unserer Arbeitsgruppe auf 100 % der kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten nachgewiesen werden [78]. In ergänzenden Blockadeversuchen wurde die PSL durch Blockade jeweils eines Adhäsionsmoleküls nur gering vermindert. Auch die Blockade von CD11a auf Blasten, die CD11a stark exprimierten, zeigte nur einen sehr geringen Effekt. Somit scheint die

verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen kein Mechanismus der kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten zu sein, der NK-Zell-Lyse zu entkommen.

### **5.5.2 AICL und LLT-1**

Der aktivierende NK-Zell-Rezeptor NKp80 bindet an das Molekül AICL [46]. Dadurch wird die Lyse maligner myeloischer Zellen durch NK-Zellen gefördert [109]. Außerdem dient es dem Interzellulärkontakt zwischen NK-Zellen und Monozyten und ist so an Entzündungsreaktionen beteiligt.

Hier waren die Blasten von einem Patienten positiv für AICL, bei zwei weiteren Patienten war das Ergebnis der FACS-Analyse fraglich positiv. Interessant wäre es, in weiteren Versuchen diese Ergebnisse zu überprüfen sowie eine größere Anzahl von Blasten verschiedener Patienten und normalen B-Zellen auf das Vorkommen von AICL zu untersuchen.

Der inhibierende NK-Zell-Rezeptor CD161 bindet an das Molekül LLT1 [1, 87]. LLT1 wird von Monozyten und B-Zellen des peripheren Blutes exprimiert. LLT1 konnte in dieser Arbeit auf kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten nicht nachgewiesen werden. Auch die verstärkte Expression dieses Moleküls scheint also nicht für die häufig geringe NK-Zell-Sensibilität der Blasten verantwortlich zu sein. Jedoch müssen die negativen Ergebnisse für LLT1 in dieser Arbeit hinterfragt werden (siehe Kapitel 5.1.7).

### **5.5.3 CD155 und CD112**

Die NK-Zell-Rezeptoren CD226 und CD96 binden aktivierend an CD155 [33]. Die Bindung von CD155 und CD112 an CD226 dient einerseits der transendothelialen Wanderung von NK-Zellen [70], andererseits fördert sie die Lyse veränderter Zellen. CD155 wird von vielen Tumorzellen stark exprimiert

[33]. CD155 und CD112 werden von myeloischen Blasten häufig exprimiert, weniger häufig jedoch von lymphatischen Blasten [77].

Hier waren die Blasten von zwei der 21 Patienten positiv für CD155, der Effekt einer Blockade von CD155 bei den Blasten dieser Patienten wurde allerdings nicht untersucht.

Für CD112 mussten hier alle Blasten als fraglich positiv gewertet werden (siehe Kapitel 4.6.3), da eine Unterteilung in positive und negative Proben nicht sinnvoll möglich war. Die Ergebnisse wiesen jedoch darauf hin, dass zumindest manche Blasten CD112 exprimierten, wenn auch in geringer Expressionsdichte. Eine Blockade von CD112 führte in zwei Versuchen zu einer geringen bis mäßigen Reduktion der PSL.

Die vergleichsweise geringe Expression von CD155 und CD112 durch kindliche B-Reihen-ALL-Blasten könnte zu ihrer geringen NK-Zell-Sensibilität beitragen. Hier sollten weitere Studien durchgeführt werden.

#### **5.5.4 CD48**

Der NK-Zell-Rezeptor CD244 (2B4) bindet aktivierend an CD48 [15, 97]. Die Bindung kann zwar nicht allein, jedoch in Kombination mit Aktivierung des NKG2D-Rezeptors zur Degranulation führen. Diese wird durch zusätzliche Bindung von Adhäsionsmolekülen weiter verstärkt.

Die meisten leukämischen Blastenarten zeigen eine verminderte Expression von CD48 [77]. Auch hier konnte CD48 nur auf den Blasten von 35 % der Patienten nachgewiesen werden, davon bei über der Hälfte nur in geringer Expressionsdichte. In zwei Versuchen mit Blasten, die CD48 in geringer Expressionsdichte exprimierten, war die PSL bei Blockade von CD48 um rund 20 % reduziert. Dies weist darauf hin, dass die Expression von CD48 auf kindli-

chen B-Reihen-ALL-Blasten für ihre NK-Zell-Sensibilität von Bedeutung ist. Weitere Versuche sollten folgen, um ihre Bedeutung weiter aufzuklären.

Da CD48 von manchen Blasten hier exprimiert wurde, und CD48 außerdem auf gesunden B-Lymphozyten vorkommt, könnte hier eventuell ein Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer NK-Zell-basierter Therapien liegen. So könnte versucht werden, eine stärkere Expression von CD48 auf den Blasten zu induzieren. Außerdem könnten bei CD48-positiven Blasten eventuell NK-Zellen mit starker CD244-Expression Erfolge beschieren.

### 5.5.5 NG2

Gesunde hämatopoetische Zellen exprimieren kein NG2. Behm et al. [7] wiesen NG2 jedoch bereits 1996 auf den Blasten von 8,6 % (neun Patienten) der 104 untersuchten pädiatrischen ALL-Patienten nach. Davon litten acht Patienten an B-Reihen-ALL. Diese Patienten zeigten entweder eine Translokation  $t(4;11)(q21;q23)$  oder  $t(11;19)(p13;q23)$ , während die übrigen Patienten keine Translokation aufwiesen. Diese Translokationen des MLL-Gens korrelierten mit einem höheren Rückfallrisiko. Schwartz et al. [95] bestätigten die Assoziation von NG2-Expression und MLL-Rearrangement für Blasten von erwachsenen B-Vorläufer-ALL-Patienten. Inukai et al. [42] zeigten einen Zusammenhang auf zwischen MLL-Rearrangement und der Resistenz von Blasten gegen die Lyse-Induktion mittels Fas-Mechanismus oder TNF. Für die Bekämpfung dieser Blasten kommt also den anderen Lysemechanismen eine besondere Bedeutung zu.

Hier konnte auf den Blasten von 20 kindlichen B-Reihen-ALL-Patienten kein NG2 nachgewiesen werden. Kindliche B-Reihen-ALL-Blasten mit bekanntem MLL-Rearrangement standen allerdings nicht zur Verfügung. Somit konnten

auch eine eventuelle funktionelle Bedeutung von NG2 oder eine Korrelation mit der Expression weiterer Oberflächenmoleküle leider nicht untersucht werden.

### 5.5.6 Weitere Moleküle

Viele weitere Moleküle könnten die NK-Zell-Empfindlichkeit von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten mitbestimmen. Troeger et al. [104] untersuchten zum Beispiel die Expression von CD40, einem Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie, auf kindlichen B-Vorläufer-ALL-Blasten. Dabei war die Expressionsdichte bei Hochrisikopatienten signifikant geringer als bei Patienten mit geringem Krankheitsrisiko. Das Rückfallrisiko war bei starker CD-40-Expression niedriger als bei geringer Expression.

Aufgrund der großen Vielfalt von Molekülen, die an der Regulation der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen gegenüber B-Reihen-ALL-Blasten potentiell beteiligt sind, konnte hier nicht auf alle solchen Moleküle eingegangen werden. Es werden noch viele Untersuchungen notwendig sein, um die Zusammenhänge aufzuklären.

## 5.6 Schlussfolgerungen für die klinische Anwendung

Es gehört zu den natürlichen Aufgaben von Natürlichen Killerzellen, entartete Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Erkrankt ein Mensch an Leukämie, hat dieser Abwehrmechanismus bereits versagt. Da jedoch NK-Zellen prinzipiell dazu in der Lage sind, veränderte Zellen ohne vorherige Sensibilisierung zu erkennen und abzutöten, kommt man an ihnen bei der Suche nach Waffen im Kampf gegen die Leukämie nicht vorbei.

Möchte man NK-Zellen gezielt zur Leukämitherapie einsetzen, so fragt man sich unweigerlich, wovon es abhängt, ob eine NK-Zelle eine andere Körperzelle lysiert oder nicht. Man fragt sich, welche Mechanismen dafür verantwortlich sind, wenn eine neu entstandene Leukämiezelle von den körpereigenen NK-Zellen nicht abgetötet wird, und man fragt sich, ob man dennoch NK-Zellen dazu bringen kann, gegen die entstandenen Blasten vorzugehen. Für letzteres ist eine genaue Untersuchung der betreffenden Blasten notwendig. Die hier entwickelte neue Auswertungsmethode der Qualitativen FACS-Analyse ermöglicht dabei viel genauere Aussagen über die Expression untersuchter Moleküle auf der Zelloberfläche als bislang veröffentlichte Auswertungsmethoden. Der Mehraufwand ist dabei vernachlässigbar gering.

Heute gehen viele Bestrebungen dahin, NK-Zellen in vitro anzuzüchten und so auszuwählen oder zu manipulieren, dass sie die Blasten eines Patienten besonders gut bekämpfen können. Prinzipiell muss man dabei unterscheiden zwischen Bestrebungen, patienteneigene NK-Zellen zum Kampf gegen Leukämiezellen zu befähigen und den Versuchen, allogene NK-Zellen (Spender-NK-Zellen oder in Kulturen angezüchtete NK-Zellen/NK-Zell-Linien) dazu zu nutzen. Insbesondere nach der allogenen SZT können Spender-NK-Zellen im Vergleich zu Spender-T-Zellen unkompliziert eingesetzt werden, da NK-Zellen im Gegensatz zu T-Zellen nicht-hämatopoetische Zellen des Empfängers nicht angreifen. Hämatopoetische Zellen des Empfängers, die die Chemotherapie überlebt haben, können von den Spender-NK-Zellen jedoch abgetötet werden. Dadurch können allogene NK-Zellen das Rückfallrisiko und das Risiko einer Abstoßungsreaktion senken, ohne eine GVHD zu erzeugen. Nebenbei senken sie auch noch das Risiko, an lebensgefährlichen Infektionskrankheiten zu erkranken.

Egal ob man patienteneigene oder allogene NK-Zellen therapeutisch einsetzen möchte – zur gezielten Entwicklung effektiver Therapien ist es unerlässlich, die Mechanismen zu erforschen, über die die Aktivität von NK-Zellen gesteuert

wird. Wenngleich hier in den letzten Jahren bahnbrechende neue Erkenntnisse veröffentlicht wurden, so ist doch noch immer vieles unklar. Es zeichnet sich aber immer mehr ab, dass eine Vielzahl verschiedener Regelmechanismen hierbei komplex zusammenspielt, und dass verschiedene Regelmechanismen für die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber verschiedenen Targetzellen von besonderer Bedeutung sind. Wenngleich die Vielzahl an Regelmechanismen unübersehbar scheint und ihre Erforschung verkompliziert, so bietet sie dennoch auch eine große Chance: Erweist sich ein Regelmechanismus als Ansatzpunkt zur Entwicklung effektiver Therapien gegen eine Leukämieform als nicht geeignet, so kann auf viele weitere Mechanismen zurückgegriffen werden.

Kindliche B-Reihen-ALL-Blasten sind meist wenig NK-Zell-sensibel. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise darauf, welche Bedeutung einige wichtige aktivierende und inhibierende NK-Zell-Rezeptoren und deren Liganden bei der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen gegenüber diesen Blasten haben. Wenngleich viele weitere Regelmechanismen existieren, die hier nicht behandelt wurden, so können die hier gewonnenen Erkenntnisse doch vielversprechende Ansatzpunkte zur Entwicklung effektiverer NK-Zell-basierter Therapien liefern:

Viele Arten von Liganden aktivierender NK-Zell-Rezeptoren werden von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten entweder nicht oder nur in geringer Antigendichte exprimiert. Insbesondere die NKG2D-Liganden konnten zwar auf den meisten Blasten nachgewiesen werden, jedoch nur in geringer Antigendichte. AICL, CD155 und CD112 wurden nur auf den Blasten weniger Patienten und in geringer Antigendichte nachgewiesen. CD48 wurde nur auf den Blasten einer Minderheit der Patienten in höherer Expressionsdichte nachgewiesen. Die funktionellen Versuche in dieser Arbeit zeigen, dass NCR zwar eine nachweisbare, aber dennoch eine geringe Rolle für die Lyse der Blasten spielen. Diese Ergebnisse passen zur These von Romanski et al. [86], derzufolge eine geringe

oder fehlende Expression von Liganden aktivierender NK-Zell-Rezeptoren für die geringe NK-Zell-Sensibilität von B-Reihen-ALL-Blasten verantwortlich ist. Therapeutisch kann diese Erkenntnis von Nutzen sein, wenn es gelingt, die Blasten *in vivo* zu einer verstärkten Expression dieser Liganden anzuregen. Auch kann man versuchen, die mangelnde Aktivierung von NK-Zellen dadurch zu überwinden, dass man die NK-Zellen mithilfe aktivierender Antikörper gegen aktivierende NK-Zell-Rezeptoren, oder durch lösliche Ligandenmoleküle aktiviert. Durch einen bispezifischen NKp46/CD19-Antikörper konnte in unserer Arbeitsgruppe die NK-Zell-Sensibilität von ALL-Blasten *in vitro* signifikant gesteigert werden [79].

Untersucht wurde hier nicht, ob die NK-Zell-Empfindlichkeit der Blasten mit der Expressionsdichte der NCR oder anderer aktivierender NK-Zell-Rezeptoren korreliert. Es wäre aber denkbar, dass eine verstärkte Expression aktivierender Rezeptoren auf NK-Zellen zu einer verstärkten Lyse von Blasten führt, wenn diese die entsprechenden Liganden immerhin in geringer Dichte exprimieren. Ist dies der Fall, so könnte man zur Therapie allogene oder autologe NK-Zellen erzeugen, die besonders viele entsprechende Rezeptoren exprimieren.

Hinweise darauf, dass eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen zur geringen NK-Zell-Sensibilität der Blasten beiträgt, fanden sich hier nicht.

NK-Zellen werden bereits heute klinisch zur Bekämpfung von leukämischen Blasten eingesetzt. Dabei wird meist im Rahmen der SZT auf angereicherte Spender-NK-Zellen zurückgegriffen bzw. die NK-Zellen werden bei der SZT selbst im Transplantat belassen. Dabei konnte der antileukämische Effekt der NK-Zellen auch bei pädiatrischen B-Reihen-ALL-Patienten gezeigt werden.

Die NK-Zell-Empfindlichkeit der Blasten hängt stark vom Ausmaß ihrer HLA-Expression ab. Insbesondere Blasten mit starker HLA-Klasse-I-Expression sind meist wenig NK-Zell-sensibel, da die HLA-Moleküle an die inhibierenden KIR binden. Hier kann der Einsatz allogener NK-Zellen mit KIR-Mismatch die



therapeutischen Erfolge verbessern. Im Rahmen der SZT werden Spender heute schon nach Möglichkeit entsprechend ausgewählt. Die Blockade von HLA-Klasse-I auf Blasten oder KIR auf NK-Zellen wird hingegen noch nicht klinisch eingesetzt.

Zwei weitere therapeutische Ansätze von klinischer Relevanz helfen bereits heute dabei, die Escape-Mechanismen der Blasten zu umgehen: Durch Stimulation mit Interleukinen und durch Gabe von Antikörpern gegen blastenspezifische Antigene (ADCC) kann die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gegenüber Blasten gesteigert werden. Vielen Patienten kann jedoch leider trotzdem noch nicht zufriedenstellend geholfen werden.

Die Bemühungen, NK-Zellen zu erzeugen, die eine verstärkte Zytotoxizität gegenüber wenig NK-Zell-sensiblen Blasten aufweisen, dauern an. Mit der Zelllinie NK-92 wurde eine NK-Zell-Linie etabliert, die die Anzucht von NK-Zellen mit spezifischen Eigenschaften zur klinischen Anwendung möglich erscheinen lässt. Die NK-92-Zellen exprimieren sehr wenige inhibierende Rezeptoren, gegen B-Reihen-ALL-Blasten zeigen sie eine variable zytotoxische Aktivität [106]. Solche NK-Zell-Kulturen könnten genetisch manipuliert werden und so zu hochpotenten Waffen im Kampf gegen leukämische Blasten werden. Insbesondere die Kombination verschiedener Möglichkeiten zur Erhöhung der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen gegenüber den jeweiligen Blasten mit ihren besonderen Merkmalen scheint dabei vielversprechend. Die Beschäftigung mit der Bedeutung verschiedener Mechanismen der NK-Zell-Aktivierung und -Inhibierung bleibt also spannend.

## 6 Zusammenfassung

Im Körper eines jeden Menschen entstehen häufig maligne veränderte Zellen mit Vermehrungspotential. Meist werden sie jedoch von körpereigenen Abwehrmechanismen schnell unschädlich gemacht. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) spielen dabei eine wichtige Rolle, da sie veränderte Körperzellen häufig ohne vorherige Sensibilisierung erkennen können und dann entweder direkt lysieren oder die Eliminierung durch andere Körperzellen unterstützen. Wie die NK-Zellen letztlich unterscheiden, welche Zellen beseitigt werden sollen und welche nicht, ist bis heute nicht vollständig geklärt. Nach heutigem Kenntnisstand werden sie am ehesten durch ein Gleichgewicht aus Signalen gesteuert, die über aktivierende und inhibierende Rezeptoren vermittelt werden.

Erkrankt ein Mensch an Leukämie, so haben die NK-Zellen dieses Menschen die Stamm-Leukämiezelle und die abstammenden Leukämiezellen nicht erfolgreich bekämpft. Leukämische Blasten der B-Zell-Reihe scheinen besonders resistent gegen NK-Zellen zu sein.

Diese Arbeit handelte davon, welche Bedeutung verschiedene aktivierende und inhibierende Rezeptoren auf natürlichen Killerzellen bei deren zytotoxischen Aktivität gegenüber leukämischen Blasten der B-Zell-Reihe haben. Zunächst wurden hier kryokonservierte kindliche B-Reihen-ALL-Blasten von 23 pädiatrischen Patienten der Universitätsklinik Tübingen mittels FACS-Analyse auf das Vorkommen vieler verschiedener Liganden solcher Rezeptoren hin untersucht. Zur Auswertung von Qualitativen FACS-Analysen wurde eine Auswertungsmethode neu entwickelt, die genauere Aussagen über die Expressionsdichte von Molekülen ermöglichte als bisher beschriebene Auswertungsmethoden. Dann

wurden Zytotoxizitätstests mit NK-Zellen freiwilliger gesunder Spender und Blasten der obengenannten Patienten durchgeführt. Der Vergleich von Tests mit und ohne Blockade von Liganden oder Rezeptoren, sowie verschiedener Tests ohne Blockade untereinander, ermöglichte Aussagen über die Bedeutung vorhandener Rezeptor-Ligand-Paare.

Die Blasten der meisten Patienten exprimierten Liganden des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors NKG2D, allerdings nur in geringer Expressionsdichte. In sieben vergleichbaren Zytotoxizitätstests konnte kein signifikanter Einfluss einer Blockade von NKG2D-Rezeptoren festgestellt werden. Durch Steigerung der Konzentration der zur Blockade verwendeten NKG2D-Antikörper verminderte sich in zwei ergänzenden Versuchen die Prozentuale Spezifische Lyse (PSL) nur geringfügig weiter. Dies wies darauf hin, dass NKG2D-Rezeptoren und ihre Liganden nur eine geringe oder keine Bedeutung für die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gegenüber B-Reihen-ALL-Blasten haben, was ein Grund für deren geringe NK-Zell-Sensibilität sein könnte.

Liganden der aktivierenden NCR konnten hier aufgrund methodischer Probleme weder eindeutig nachgewiesen werden, noch konnte ihr Vorkommen auf den Blasten widerlegt werden. Die Liganden der NCR sind bis heute nicht identifiziert. In sechs vergleichbaren Zytotoxizitätstests reduzierte sich durch Blockade von NCR die PSL gering aber signifikant, was darauf hinwies, dass NCR als ein Faktor unter anderen an der Steuerung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen gegenüber B-Reihen-ALL-Blasten beteiligt sind.

An weiteren Liganden aktivierender NK-Zell-Rezeptoren wurden AICL, CD48 und CD155 nur auf den Blasten einzelner Patienten nachgewiesen, CD112 war fraglich mit geringer Expressionsdichte auf den Blasten mancher oder aller Patienten vorhanden. Die Blockade von CD48 und CD112 führte in zwei Zytotoxizitätstests zu einer Verringerung der PSL.

Somit wurde die These bestärkt, dass eine geringe Expression von Liganden aktivierender NK-Zell-Rezeptoren zur geringen NK-Zell-Sensibilität der kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten beiträgt.

Die Adhäsionsmoleküle CD50, CD54 und CD58 waren auf den Blasten der meisten Patienten nachweisbar, meist sogar in hoher Expressionsdichte. Lediglich das Adhäsionsmolekül CD11a wurde nur von den Blasten von 32 % der Patienten exprimiert. Eine Blockade jeweils eines Adhäsionsmoleküls zeigte meist kaum einen Effekt. Insgesamt ergaben sich dadurch hier keine Hinweise darauf, dass eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen für die geringe NK-Zell-Sensibilität der Blasten verantwortlich ist.

Die Liganden der inhibierenden KIR, HLA-A, HLA-B und HLA-C, waren auf den Blasten der verschiedenen Patienten in sehr unterschiedlicher Expressionsdichte nachweisbar. Alle Proben waren hierfür jedoch hoch- oder sehr-hoch-positiv. HLA-E war meist nur in geringer Expressionsdichte auf den Blasten vorhanden. Der Ligand LLT-1 des inhibierenden Rezeptors NKR-P1A (=CD161) konnte auf den Blasten nicht nachgewiesen werden.

Bislang gibt es nur vereinzelte veröffentlichte Untersuchungen zur Bedeutung aktivierender Rezeptoren auf natürlichen Killerzellen bei deren zytotoxischen Aktivität gegenüber B-Reihen-ALL-Blasten. Ihre Ergebnisse sind im wesentlichen mit den hiesigen Ergebnissen vereinbar. Insgesamt weisen die verfügbaren Daten darauf hin, dass eine geringe Expression von Liganden aktivierender NK-Zell-Rezeptoren zu der geringen NK-Zell-Sensibilität der B-Reihen-ALL-Blasten beiträgt. Eine veränderte Expression von Adhäsionsmolekülen kann hierfür hingegen eher nicht verantwortlich gemacht werden.

Die Bedeutung der inhibierenden KIR und ihrer Liganden ist etwas besser untersucht. Die Expressionsdichte der HLA-Klasse-I-Moleküle spielt nach heutigem Kenntnisstand eine entscheidende Rolle für die NK-Zell-Sensibilität der B-Reihen-ALL-Blasten. Sie kann die unterschiedliche Lysierbarkeit der Blasten

allein jedoch nicht erklären. HLA-E scheint auf komplexe Weise an den Regelmechanismen beteiligt zu sein, diese gilt es noch genauer zu erforschen.

Die Kenntnis der Bedeutung aktivierender und inhibierender Rezeptoren auf natürlichen Killerzellen bei deren zytotoxischen Aktivität gegenüber B-Reihen-ALL-Blasten ist klinisch insbesondere dann von Nutzen, wenn sie zur Entwicklung effektiverer Leukämie-Therapien beitragen kann. NK-Zellen scheinen zur Leukämietherapie prinzipiell gut geeignet, da sie sich in vitro anzüchten lassen, und da allogene NK-Zellen nach SZT keine GVHD verursachen. Insbesondere gegen AML-Blasten werden sie heute schon erfolgreich eingesetzt. Auch Hinweise auf ihren erfolgreichen Einsatz zur Bekämpfung von B-Reihen-ALL-Blasten wurden bereits publiziert.

Eine Therapieoption könnte im Kampf gegen B-Reihen-ALL-Blasten darin liegen, diese zu einer verstärkten Expression von Liganden aktivierender NK-Zell-Rezeptoren anzuregen. Bei AML-Blasten ist dies bereits gelungen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, das Zusammenspiel inhibierender NK-Zell-Rezeptoren und ihrer Liganden zu stören, wie dies beim Vorliegen eines sogenannten KIR-Mismatches beim Einsatz allogener NK-Zellen bereits heute geschieht. Auch verschiedene suspendierbare Substanzen können zur NK-Zell-Aktivierung beitragen, so z. B. Interleukine oder verschiedene spezielle Antikörper. Schließlich kann man NK-Zellen anzüchten, die gegenüber Blasten mit spezifischen Eigenschaften besonders aktiv sind, z. B. indem man gentechnisch neuartige aktivierende Rezeptoren integriert. Die Beschäftigung mit der Bedeutung verschiedener Mechanismen der NK-Zell-Aktivierung und -Inhibierung bleibt also spannend.

# 7 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung</b>	<b>Seite</b>
Abbildung 3.1: Beispiel für Fluoreszenz-Histogramme von positiven Proben und korrespondierenden Negativkontrollen, wie sie mit dem an das FACS-Gerät angeschlossenen Rechner und dem verwendeten Auswertungsprogramm erstellt werden können	52
Abbildung 3.2: Beispiel für Fluoreszenz-Histogramme von Negativkontrollen und graphisch nicht eindeutig positiven oder negativen Proben, wie sie in dieser Arbeit häufig auftraten	54
Abbildung 3.3: Ermittlung des GeoMean-Wertes einer Zellgruppe	56
Abbildung 4.1: GeoMean-Werte der Qualitativen FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Antikörpern gegen MICA, MICB, MICA+B, ULBP1, ULBP2, ULBP3 und IgG1 als Negativkontrolle (Tabelle 4.1.A)	84

Abbildung 4.2: Häufigkeitsverteilung der MNF-Werte aus Tabelle 4.2.A (Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Primärantikörpern gegen MICA, MICB, MICA+B, ULBP1, ULBP2 und ULBP3)	92
Abbildung 4.3: Ausschnitt der Häufigkeitsverteilung der MNF-Werte aus Tabelle 4.2.A (Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Primärantikörpern gegen MICA, MICB, MICA+B, ULBP1, ULBP2 und ULBP3)	93
Abbildung 4.4: Relative Summenhäufigkeitsverteilung aller MNF-Werte $< 0,1$ aus Tabelle 4.2.A (qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten, je 20 oder 21 verschiedene Patienten, mit Primärantikörpern gegen MICA, MICB, MICA+B, ULBP1, ULBP2, ULBP3), eingetragen in Wahrscheinlichkeitspapier	95
Abbildung 4.5: Relative Summenhäufigkeit der MNF-Werte von ULBP1 (grün) und ULBP2 (rot) aus Tabelle 4.2.A (qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten), eingetragen in Wahrscheinlichkeitspapier	96
Abbildung 4.6: Korrelation von MNF- und SABC-Werten (Quantitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit sechs verschiedenen Primärantikörpern gegen NKG2D-Liganden und Blasten von 13 verschiedenen Patienten, Werte siehe Tabelle 4.7 und 4.8)	99

Abbildung 4.7: Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Antikörpern gegen MICA, MICB, MICA+B, ULBP1, ULBP2 und ULBP3: Anteil derjenigen Patienten an der Stichprobe, deren Blasten positiv für das jeweilige Merkmal waren	101
Abbildung 4.8: Spezifische Antikörper-Bindungskapazität (SABC) kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten für Antikörpern gegen MICA, MICB, MICA+B, ULBP1, ULBP2 und ULBP3 bei der Quantitativen FACS-Analyse	103
Abbildung 4.9: Häufigkeitsverteilung der SABC-Werte aus Tabelle 4.8.A (Quantitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Primärantikörpern gegen MICA, MICB, MICA+B, ULBP1, ULBP2 und ULBP3)	104
Abbildung 4.10 Häufigkeitsverteilung der in zwei Gruppen eingeteilten SABC-Werte aus Tabelle 4.8.A (Quantitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Primärantikörpern gegen MICA, MICB, MICA+B, ULBP1, ULBP2 und ULBP3)	106
Abbildung 4.11: GeoMean-Werte der Qualitativen FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit löslichen Rezeptormolekülen und Flebogamma als Negativkontrolle	108



Abbildung 4.12: Beispielhafte Darstellung einiger GeoMean-Werte aus Tabelle 4.10 (Qualitative FACS-Analyse, Überprüfung der Eignung von Flebo-gamma zur Herstellung von Negativkontrollen für die Qualitative FACS-Analyse von Blasten mit löslichen Rezeptormolekülen und antihumanen Sekundärantikörpern)	110
Abbildung 4.13: Beispielhafte Darstellung einiger GeoMean-Werte aus Tabelle 4.10 (Qualitative FACS-Analyse von NKG2D-Liganden mithilfe von löslichen NKG2D-Molekülen und antihumanen Sekundärantikörpern, Positivkontrollen)	112
Abbildung 4.14: Häufigkeitsverteilung der MNF*-Werte, die aus den GM in Tabelle 4.9 folgendermassen berechnet werden: Logarithmus zu Basis 10 des Quotienten aus dem GM der Probe mit NKG2D-Molekülen und dem geometrischen Mittelwert der GM der drei Proben mit NCR-Molekülen des jeweiligen Patienten (Qualitative FACS-Analyse von NCR-Liganden und NKG2D-Liganden auf kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten mit löslichen Rezeptormolekülen)	115
Abbildung 4.15: Spezifische Antikörper-Bindungskapazität (SABC) kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten für Antikörper gegen HLA-A+B+C, HLA-E und MICA+B + ULBP1 + ULBP2 + ULBP3 bei der Quantitativen FACS-Analyse (im Vergleich)	118

Abbildung 4.16: Häufigkeitsverteilung der MNF-Werte aus Tabelle 4.14.A (Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Antikörpern gegen CD11a, CD50, CD54 und CD58)	120
Abbildung 4.17: Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Antikörpern gegen CD11a, -50, -54, -58: je Anteil derjenigen Patienten an der Stichprobe, die negativ, niedrig positiv und hoch-positiv für das jeweilige Merkmal waren	121
Abbildung 4.18: Häufigkeitsverteilung der MNF-Werte aus Tabelle 4.16.A (Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Primärantikörpern gegen AICL und LLT-1)	123
Abbildung 4.19: Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Antikörpern gegen AICL und LLT-1: Je Anteil derjenigen Patienten an der Stichprobe, die negativ, fraglich positiv und positiv für spezifische Bindung der Antikörper gegen das jeweilige Merkmal waren	124
Abbildung 4.20: Häufigkeitsverteilung der MNF-Werte aus Tabelle 4.18.A (Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Antikörpern gegen CD48, CD112, CD155 und NG2)	127

Abbildung 4.21: Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Antikörpern gegen CD48, -112, -155 und NG2: je Anteil derjenigen Patienten an der Stichprobe, die negativ, niedrig- und hoch-positiv für das jeweilige Merkmal waren	128
Abbildung 4.22: Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Blockade von NKG2D-Rezeptoren auf NK-Zellen	133
Abbildung 4.23: Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Blockade von NKG2D-Rezeptoren auf NK-Zellen, verschiedene Antikörperkonzentrationen	134
Abbildung 4.24: Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Blockade von NKG2D-Liganden auf Blasten	135
Abbildung 4.25: Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von K562-Zellen durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Blockade von NKG2D-Rezeptoren auf NK-Zellen	136

Abbildung 4.26: Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Blockade von NCR	139
Abbildung 4.27: Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Blockade von NCR auf NK-Zellen, verschiedene Antikörperkonzentrationen	140
Abbildung 4.28: Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Blockade von NCR auf NK-Zellen und potentiell von NCR-Liganden auf Blasten (Vergleich)	141
Abbildung 4.29: Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von K562-Zellen durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Blockade von NCR auf NK-Zellen	142
Abbildung 4.30: Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Blockade von Adhäsionsmolekülen	144

Abbildung 4.31: Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Blockade von CD48, CD112 und CD155	145
Abbildung 4.32: Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Korrelation der PSL mit der HLA-Klasse-I-Expressionsdichte (HLA-A + HLA-B + HLA-C) auf Blasten	147
Abbildung 4.33: Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: PSL mit und ohne KIR-Mismatch im Vergleich	148
Abbildung 4.34: Prozentuale spezifische Lyse (PSL) von kindlichen B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender im Zytotoxizitätsassay: Korrelation der PSL mit der HLA-E-Expressionsdichte auf Blasten	149
Abbildung 4.35: FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit Antikörpern gegen verschiedene Liganden von NK-Zell-Rezeptoren oder Adhäsionsmoleküle: Anteil derjenigen Patienten an der Stichprobe, deren Blasten die jeweiligen Merkmale nicht, fraglich, in niedriger, hoher oder sehr hoher Dichte exprimiert haben (Zusammenfassung)	154

## 8 Tabellen

<b>Tab. 3.1</b>		
<b>Kindliche B-Reihen-ALL-Blasten: Diagnosen der Patienten und prozentuale Blastenanteile der Proben</b>		
<b>Pat.-Nr.</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Prozentualer Blastenanteil der Proben</b>
P1	cALL	70
P2	cALL, 1. Rez.	unklar
P3	cALL	88
P4	cALL	80
P5	cALL	62
P6	cALL	76
P7	cALL	93
P8	cALL	82
P9	prä-/pro-B-ALL	90
P10	cALL	96
P11	cALL	85
P12	cALL	90
P13	cALL/prä-B-ALL	70
P14	cALL	80
P15	cALL	96
P16	cALL	80
P17	cALL	78
P18	cALL	95
P19	cALL	85
P20	cALL	81
P21	cALL	85
P22	cALL	95
P23	pro-B-ALL/cALL	85

Tab. 4.1	Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten: Gemessene GeoMean-Werte						
Pat.-Nr.	IgG1	MICA	MICB	MICA+B	ULBP1	ULBP2	ULBP3
<b>A - In statistische Auswertung einbezogene Versuche</b>							
P1	2,55	2,58	2,43	3,28	3,49	2,25	5,11
P3	2,70	3,14	2,96	3,81	4,09	2,83	2,94
P4	1,85	2,08	1,92	2,52	3,24	2,08	2,02
P6	2,39	3,06	-	6,37	4,17	2,93	3,52
P7	2,86	2,69	2,56	3,72	4,28	2,50	3,21
P8	2,30	2,42	2,39	2,89	4,38	2,22	3,33
P9	1,60	1,56	1,62	1,70	1,65	1,59	1,69
P10	2,29	2,47	2,38	3,60	2,89	3,42	8,75
P11	2,51	1,84	2,48	2,52	1,92	1,97	1,92
P12	2,07	2,39	2,19	2,81	3,16	1,82	2,19
P13	2,60	2,82	2,75	2,92	4,05	2,49	3,38
P14	2,05	2,61	2,72	4,51	9,66	2,75	4,80
P15	2,91	3,58	4,00	11,79	11,81	7,10	8,51
P16	1,34	1,44	1,40	1,49	1,79	1,47	1,76
P17	2,73	2,73	2,46	2,74	3,13	2,42	3,17
P18	2,74	3,00	3,65	4,27	6,22	3,28	4,65
P19	1,45	2,16	1,96	2,27	2,19	2,01	2,40
P20	1,40	1,87	1,78	1,90	1,68	1,54	1,78
P21	2,22	2,66	2,44	2,95	2,94	2,40	3,41
P22	1,35	1,37	1,36	1,42	1,94	1,39	2,35
P23	2,10	1,96	1,93	2,28	2,59	1,91	2,05
<b>Anzahl</b>	21	21	20	21	21	21	21
<b>Geom.Mittelw.</b>	2,13	2,33	2,28	3,00	3,33	2,32	3,08
<b>Stand.abw.</b>	0,52	0,59	0,67	2,23	2,57	1,20	1,99
<b>Min</b>	1,34	1,37	1,36	1,42	1,65	1,39	1,69
<b>Max</b>	2,91	3,58	4,00	11,79	11,81	7,10	8,75
<b>B - Aus statistischer Auswertung ausgeschlossene Versuche</b>							
P2	3,11	2,93	1,76	2,95	2,63	2,40	4,53
P5	4,39	5,73	4,46	13,09	10,13	5,15	6,43
P23 (2)	2,61				5,74		

<b>Tab. 4.2</b>		<b>Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten: MNF (berechnet aus den GeoMean-Werten in Tabelle 4.1)</b>				
<b>Pat.-Nr.</b>	<b>MICA</b>	<b>MICB</b>	<b>MICA+B</b>	<b>ULBP1</b>	<b>ULBP2</b>	<b>ULBP3</b>
<b>A - In statistische Auswertung einbezogene Versuche</b>						
P1	0,01	-0,02	0,11	0,14	-0,05	0,30
P3	0,07	0,04	0,15	0,18	0,02	0,04
P4	0,05	0,02	0,13	0,24	0,05	0,04
P6	0,11		0,43	0,24	0,09	0,17
P7	-0,03	-0,05	0,11	0,18	-0,06	0,05
P8	0,02	0,02	0,10	0,28	-0,02	0,16
P9	-0,01	0,01	0,03	0,01	0,00	0,02
P10	0,03	0,02	0,20	0,10	0,17	0,58
P11	-0,13	-0,01	0,00	-0,12	-0,11	-0,12
P12	0,06	0,02	0,13	0,18	-0,06	0,02
P13	0,04	0,02	0,05	0,19	-0,02	0,11
P14	0,10	0,12	0,34	0,67	0,13	0,37
P15	0,09	0,14	0,61	0,61	0,39	0,47
P16	0,03	0,02	0,05	0,13	0,04	0,12
P17	0,00	-0,05	0,00	0,06	-0,05	0,06
P18	0,04	0,12	0,19	0,36	0,08	0,23
P19	0,17	0,13	0,19	0,18	0,14	0,22
P20	0,13	0,10	0,13	0,08	0,04	0,10
P21	0,08	0,04	0,12	0,12	0,03	0,19
P22	0,01	0,00	0,02	0,16	0,01	0,24
P23	-0,03	-0,04	0,04	0,09	-0,04	-0,01
<b>Anzahl</b>	21	20	21	21	21	21
<b>Mittelwert</b>	0,04	0,03	0,15	0,19	0,04	0,16
<b>Stand.abw.</b>	0,07	0,06	0,15	0,18	0,11	0,17
<b>Min</b>	-0,13	-0,05	0,00	-0,12	-0,11	-0,12
<b>Max</b>	0,17	0,14	0,61	0,67	0,39	0,58
<b>B - Aus statistischer Auswertung ausgeschlossene Versuche</b>						
P2	-0,03	-0,25	-0,02	-0,07	-0,11	0,16
P5	0,12	0,01	0,47	0,36	0,07	0,17
P23 (2)				0,34		



Pat.-Nr.	MICA	MICB	MICA+B	ULBP1	ULBP2	ULBP3
<b>Tab. 4.3</b>						
<b>Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten: Einteilung der Proben in positive (1) und negative (0) Proben (positiv: MNF in Tab. 4.2 <math>\geq 0,1</math>; negativ: MNF in Tab. 4.2 <math>&lt; 0,1</math>)</b>						
<b>A - In statistische Auswertung einbezogene Versuche</b>						
P1	0	0	1	1	0	1
P3	0	0	1	1	0	0
P4	0	0	1	1	0	0
P6	1	-	1	1	0	1
P7	0	0	1	1	0	0
P8	0	0	0	1	0	1
P9	0	0	0	0	0	0
P10	0	0	1	1	1	1
P11	0	0	0	0	0	0
P12	0	0	1	1	0	0
P13	0	0	0	1	0	1
P14	1	1	1	1	1	1
P15	0	1	1	1	1	1
P16	0	0	0	1	0	1
P17	0	0	0	0	0	0
P18	0	1	1	1	0	1
P19	1	1	1	1	1	1
P20	1	1	1	0	0	1
P21	0	0	1	1	0	1
P22	0	0	0	1	0	1
P23	0	0	0	0	0	0
Anzahl	21	20	21	21	21	21
Anzahl pos.	4	5	13	16	4	13
% pos.	19,05%	25,00%	61,90%	76,19%	19,05%	61,90%
<b>B - Aus statistischer Auswertung ausgeschlossene Versuche</b>						
P2	0	0	0	0	0	1
P5	1	0	1	1	0	1
P23 (2)				1		

<b>Tab. 4.4</b>		<b>FACS-Analyse: Gemessene GeoMean-Werte fünf untereinander verschiedener, in verschiedenen Messreihen jeweils gleicher Eichpopulationen (QIFIKIT)</b>				
<b>Versuchs-Nr.</b>	<b>Pop. 1</b>	<b>Pop. 2</b>	<b>Pop. 3</b>	<b>Pop. 4</b>	<b>Pop. 5</b>	
V1	13,9	53,0	241,2	736,9	2042,9	
V2	15,6	63,6	277,9	859,0	2292,6	
V3	20,5	71,1	321,5	977,0	2491,3	
V4	10,2	41,0	188,3	579,9	1627,1	
V5	20,8	87,1	392,7	1329,3	3333,8	
V6	29,2	115,4	540,1	1672,9	4456,9	
V7	37,5	170,2	689,6	2144,5	5699,6	
V8	33,5	131,6	681,0	2023,2	5014,5	
V9	25,0	101,4	453,4	1471,7	4441,1	
V10	19,8	75,2	362,1	1217,4	3704,0	
V11	15,0	59,6	316,0	1093,8	2955,8	
V12	32,8	126,3	638,5	1974,5	5425,2	
V13	29,0	112,9	539,1	1678,6	4449,8	
V14	19,7	82,4	369,5	1203,9	3417,5	
V15	19,9	76,0	377,7	1280,0	3921,7	
V16	22,9	90,5	442,9	1411,8	3680,3	
<b>Anzahl</b>	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	
<b>Geom.Mittelw.</b>	21,6	85,5	401,0	1275,2	3481,9	

<b>Tab. 4.5</b>		<b>Quotient von Wert aus Tab. 4.4 und geometrischem Mittelwert der jeweiligen Population aus Tab. 4.4</b>					
<b>Versuchs-Nr.</b>	<b>Pop. 1</b>	<b>Pop. 2</b>	<b>Pop. 3</b>	<b>Pop. 4</b>	<b>Pop. 5</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Stand.-abw.</b>
V1	0,64	0,62	0,60	0,58	0,59	0,61	0,02
V2	0,72	0,74	0,69	0,67	0,66	0,70	0,03
V3	0,95	0,83	0,80	0,77	0,72	0,81	0,09
V4	0,47	0,48	0,47	0,45	0,47	0,47	0,01
V5	0,96	1,02	0,98	1,04	0,96	0,99	0,04
V6	1,36	1,35	1,35	1,31	1,28	1,33	0,03
V7	1,74	1,99	1,72	1,68	1,64	1,75	0,14
V8	1,56	1,54	1,70	1,59	1,44	1,56	0,09
V9	1,16	1,19	1,13	1,15	1,28	1,18	0,06
V10	0,92	0,88	0,90	0,95	1,06	0,94	0,07
V11	0,69	0,70	0,79	0,86	0,85	0,78	0,08
V12	1,52	1,48	1,59	1,55	1,56	1,54	0,04
V13	1,35	1,32	1,34	1,32	1,28	1,32	0,03
V14	0,92	0,96	0,92	0,94	0,98	0,95	0,03
V15	0,92	0,89	0,94	1,00	1,13	0,98	0,09
V16	1,06	1,06	1,10	1,11	1,06	1,08	0,03

<b>Tab. 4.6</b>	<b>Quantitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten: Gemessene GeoMean-Werte</b>						
<b>Pat.-Nr.</b>	<b>IgG1</b>	<b>MICA</b>	<b>MICB</b>	<b>MICA+B</b>	<b>ULBP1</b>	<b>ULBP2</b>	<b>ULBP3</b>
<b>A - In statistische Auswertung einbezogene Versuche</b>							
<b>P1</b>	2,54	2,69	2,73	2,96	3,72	2,65	4,01
<b>P6</b>	5,67	6,89	6,93	7,61	6,4	5,99	7,75
<b>P7</b>	8,46	6,44	7,73	8,48	8,41	7,74	6,69
<b>P10</b>	3,17	2,47	2,84	3,06	3,23	3,83	4,89
<b>P12</b>	3,94	4,56	4,2	5,07	7,46	3,93	3,83
<b>P13</b>	2,5	2,66	2,66	2,84	6,55	2,34	3,08
<b>P14</b>	3,73	3,96	3,99	5,04	9,49	4,26	4,98
<b>P15</b>	3,13	3,31	3,08	4,5	6,24	4,21	4,11
<b>P17</b>	2,38	2,63	2,42	2,94	4,5	2,46	2,87
<b>P18</b>	5,34	7,24	7,86	7,73	8,84	6,6	7,81
<b>P19</b>	2,57	2,92	2,73	2,98	3,37	2,73	3,18
<b>P21</b>	2,73	2,75	2,84	3,39	3,39	2,78	3,55
<b>P23</b>	4,16	2,98	4,17	4,34	5,06	3,86	4,45
<b>Anzahl</b>	13	13	13	13	13	13	13
<b>Geom.Mittelw.</b>	3,59	3,66	3,81	4,33	5,51	3,82	4,46
<b>Stand.abw.</b>	1,74	1,76	2,00	2,03	2,20	1,70	1,69
<b>Min</b>	2,38	2,47	2,42	2,84	3,23	2,34	2,87
<b>Max</b>	8,46	7,24	7,86	8,48	9,49	7,74	7,81
<b>B - Aus statistischer Auswertung ausgeschlossene Versuche</b>							
<b>P2</b>	3,98	3,46	3,39	3,84	12,74	4,96	5,17
<b>P5</b>	6,57	4,5	5,82	6,91	6,33	5,63	6,05
<b>P5 (2)</b>	2,91	3,41	3,16	4,89	2,73	3,03	3,27
<b>P17 (2)</b>	2				1,94		

Pat.-Nr.	MICA	MICB	MICA+B	ULBP1	ULBP2	ULBP3
<b>Tab. 4.7 Quantitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten: MNF (berechnet aus den GeoMean-Werten in Tabelle 4.6)</b>						
<b>A - In statistische Auswertung einbezogene Versuche</b>						
P1	0,02	0,03	0,07	0,17	0,02	0,20
P6	0,08	0,09	0,13	0,05	0,02	0,14
P7	-0,12	-0,04	0,00	0,00	-0,04	-0,10
P10	-0,11	-0,05	-0,02	0,01	0,08	0,19
P12	0,06	0,03	0,11	0,28	0,00	-0,01
P13	0,03	0,03	0,06	0,42	-0,03	0,09
P14	0,03	0,03	0,13	0,41	0,06	0,13
P15	0,02	-0,01	0,16	0,30	0,13	0,12
P17	0,04	0,01	0,09	0,28	0,01	0,08
P18	0,13	0,17	0,16	0,22	0,09	0,17
P19	0,06	0,03	0,06	0,12	0,03	0,09
P21	0,00	0,02	0,09	0,09	0,01	0,11
P23	-0,14	0,00	0,02	0,09	-0,03	0,03
Anzahl	13	13	13	13	13	13
Mittelwert	0,01	0,03	0,08	0,19	0,03	0,09
Stand.abw.	0,08	0,05	0,06	0,14	0,05	0,08
Min	-0,14	-0,05	-0,02	0,00	-0,04	-0,10
Max	0,13	0,17	0,16	0,42	0,13	0,20
<b>B - Aus statistischer Auswertung ausgeschlossene Versuche</b>						
P2	-0,06	-0,07	-0,02	0,51	0,10	0,11
P5	-0,16	-0,05	0,02	-0,02	-0,07	-0,04
P5 (2)	0,07	0,04	0,23	-0,03	0,02	0,05
P17 (2)				-0,01		

Tab. 4.8	Quantitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten: Spezifische Antikörper-Bindungskapazität (SABC)							
Pat.-Nr.	SABC (=ABC <sub>Probe</sub> – ABC <sub>IgG1</sub> , berechnet mithilfe der Eichgeraden, aus GM aus Tab. 4.6)						Eichgerade	
	MICA	MICB	MICA+B	ULBP1	ULBP2	ULBP3	m	c
<b>A - In statistische Auswertung einbezogene Versuche</b>								
P1	34	43	96	271	25	339	1,06	2,31
P6	131	136	210	78	34	225	1,05	1,97
P7	-329	-120	3	-8	-118	-289	1,09	2,09
P10	-160	-76	-25	14	153	401	1,06	2,31
P12	96	40	176	559	-2	-17	1,09	2,09
P13	20	20	44	526	-20	74	1,02	2,09
P14	40	45	226	999	92	216	1,01	2,23
P15	40	-11	306	694	242	219	0,99	2,36
P17	32	5	72	273	10	63	1,02	2,09
P18	208	277	262	385	138	271	1,04	1,99
P19	56	26	65	128	26	97	1,03	2,18
P21	3	19	114	114	9	142	1,00	2,24
P23	-180	2	28	140	-46	45	1,09	2,09
Anzahl	13	13	13	13	13	13		
Mittelwert	-1	31	121	321	42	137		
Stand.abw.	143	96	105	300	94	176		
Min	-329	-120	-25	-8	-118	-289		
Max	208	277	306	999	242	401		
<b>B - Aus statistischer Auswertung ausgeschlossene Versuche</b>								
P2	-103	-117	-28	1821	197	239	1,06	2,24
P5	-328	-120	55	-39	-150	-83	1,09	2,09
P5 (2)	74	37	296	-27	18	53	1,03	2,14
P17 (2)				-6			1,03	1,96

<b>Tab. 4.9</b>					
<b>Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten mit löslichen Rezeptormolekülen: Gemessene GeoMean-Werte</b>					
<b>Pat.-Nr.</b>	<b>Flebo-gamma</b>	<b>NKp30-Molek.</b>	<b>NKp44-Molek.</b>	<b>NKp46-Molek.</b>	<b>NKG2D-Molek.</b>
<b>A - In statistische Auswertung einbezogene Versuche</b>					
<b>P1</b>	2,82	2,80	2,93	2,81	2,47
<b>P3</b>	3,17	3,13	3,05	2,93	3,37
<b>P4</b>	2,08	2,06	2,05	2,19	2,07
<b>P6</b>	3,53	3,74	3,46	2,45	2,29
<b>P7</b>	4,26	8,62	8,39	8,88	9,65
<b>P8</b>	2,19	2,68	3,41	2,70	3,27
<b>P9</b>	1,71	1,69	1,75	1,63	1,68
<b>P10</b>	2,00	2,19	2,14	2,22	2,90
<b>P11</b>	1,49	1,48	1,49	1,48	1,52
<b>P12</b>	3,21	4,45	4,41	4,50	4,21
<b>P13</b>	1,60	1,72	1,81	1,79	1,84
<b>P14</b>	1,97	2,19	1,91	1,87	3,18
<b>P15</b>	3,31	2,92	3,62	3,38	4,05
<b>P16</b>	1,12	1,18	1,17	1,17	1,15
<b>P17</b>	2,80	2,71	2,62	2,52	2,62
<b>P18</b>	2,17	2,66	2,55	2,43	3,51
<b>P21</b>	2,65	3,49	3,14	3,07	2,60
<b>P22</b>	1,19	1,03	1,04	1,03	1,03
<b>P23</b>	3,53	6,44	5,72	6,19	6,00
<b>Anzahl</b>	19	19	19	19	19
<b>Geom.Mittelw.</b>	2,31	2,61	2,61	2,51	2,70
<b>Stand.abw.</b>	0,88	1,85	1,75	1,88	1,98
<b>Min</b>	1,12	1,03	1,04	1,03	1,03
<b>Max</b>	4,26	8,62	8,39	8,88	9,65
<b>B - Aus statistischer Auswertung ausgeschlossene Versuche</b>					
<b>P2</b>	3,63	4,41	4,44	4,52	5,31
<b>P5</b>	3,55	5,52	4,59	6,05	5,44
<b>P23 (2)</b>	2,25	3,00	3,14	3,63	3,74

Tab. 4.10		Qualitative FACS-Analyse verschiedener Zellen mit löslichen Rezeptormolekülen: Gemessene GeoMean-Werte									
Pat.-Nr./ Zellart	Zellen ohne Antikörper	Zellen + Sekundärintikörper	Zellen + Flebogamma + Sekundärintikörper	Zellen + NKp30-Moleküle + Sekundärintikörper	Zellen + NKp44-Moleküle + Sekundärintikörper	Zellen + NKp46-Moleküle + Sekundärintikörper	Zellen + NKG2D-Moleküle + Sekundärintikörper	Zellen + Flebogamma + NKp30-Moleküle + Sekundärintikörper	Zellen + Flebogamma + NKp44-Moleküle + Sekundärintikörper	Zellen + Flebogamma + NKp46-Moleküle + Sekundärintikörper	Zellen + Flebogamma + NKG2D-Moleküle + Sekundärintikörper
P2 (2)	2,1	6,2	3,3	6,6	6,1	6,1	5,2				
P5 (2)		3,0		2,9	2,2	3,9	2,6				
P17 (2)	2,6	8,7	3,3	9,1	9,1	9,0		3,9	4,0	4,0	
P21 (2)			3,0	10,6	7,1	10,9	9,3				
P21 (3)		3,2		3,8	2,6	3,2	3,3				
P23 (3)	2,6	4,9	3,0	4,9		4,9		3,1	2,9	3,0	
P23 (4)	5,4	10,0	7,2			10,3		6,9	6,5	9,3	6,3
K562	2,6	2,7	3,4	2,9	2,9		15,8				
K562 (2)	4,0	4,1	5,4			4,1				5,1	8,1
293T			1,7	1,6	1,5	1,5	6,9				
Vollblut - Granulozytengate (1)	1,5	15,2	20,1					19,6	19,5	18,5	17,1
Vollblut - Granulozytengate(2)	4,4	7,6	8,1	7,5	7,8	8,1	7,8				
Vollblut - Monozytengate (1)	9,4	12,8	12,5					12,7	12,5	12,2	11,3
Vollblut - Monozytengate (2)	3,5	6,9	5,9	6,5	6,9	7,1	7,0				
Vollblut - Lymphozytengate (1)	4,5	5,3	5,4					5,5	5,4	5,2	5,0
Vollblut - Lymphozytengate (2)	1,8	2,4	2,3	2,3	2,3	2,4	2,4				

<b>Tab. 4.11</b>	<b>Quantitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten: Gemessene GeoMean-Werte</b>		
<b>Pat.-Nr.</b>	<b>IgG1</b>	<b>HLA-E</b>	<b>HLA-A+B+C</b>
<b>A - In statistische Auswertung einbezogene Versuche</b>			
<b>P1</b>	2,54	4,23	
<b>P6</b>	5,67	9,19	
<b>P7</b>	8,46	6,74	269,00
<b>P8</b>	2,16	5,74	2207,77
<b>P9</b>	3,41		1479,56
<b>P10</b>	2,09	3,16	3212,41
<b>P12</b>	3,94	5,20	641,71
<b>P13</b>	2,50	4,97	
<b>P14</b>	3,73	8,17	
<b>P14 (2)</b>	2,91		2873,85
<b>P15</b>	3,13	11,17	
<b>P17</b>	2,00	2,44	2871,24
<b>P18</b>	5,34	11,34	
<b>P19</b>	2,57	7,74	290,66
<b>P21</b>	2,73	4,44	369,30
<b>P23</b>	4,16	4,65	660,09
<b>Anzahl</b>	15	14	10
<b>Geom. Mittelw.</b>	3,33	5,81	1005,75
<b>Stand.abw.</b>	1,75	2,80	1197,14
<b>B - Aus statistischer Auswertung ausgeschlossene Versuche</b>			
<b>P2</b>	3,98	4,55	2049,96
<b>P5</b>	6,57	7,10	817,42



Tab. 4.12	Quantitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten: Spezifische Antikörper-Bindungskapazität (SABC)			
Pat.-Nr.	SABC (=ABC <sub>Probe</sub> – ABC <sub>IgG1</sub> , berechnet mithilfe der Eichgeraden, aus GM aus Tabelle 4.11)		Eichgerade	
	HLA-E	HLA-A+B+C	m	c
<b>A - in statistische Auswertung einbezogene Versuche</b>				
P1	390		1,06	2,31
P6	382		1,05	1,97
P7	-281	54421	1,09	2,09
P8	270	228402	1,06	1,82
P9		191656	1,01	2,09
P10	95	371851	1,04	1,91
P12	196	143281	1,09	2,09
P13	319		1,02	2,09
P14	769		1,01	2,23
P14 (2)		374688	1,01	2,09
P15	1787		0,99	2,36
P17	42	327117	1,03	1,96
P18	665		1,04	1,99
P19	838	50915	1,03	2,18
P21	296	62850	1,00	2,24
P23	76	147749	1,09	2,09
Anzahl	14	10		
Mittelwert	418	195293		
Stand.abw.	495	126947		
Min	-281	50915		
Max	1787	374688		
<b>B - Aus statistischer Auswertung ausgeschlossene Versuche</b>				
P2	114	559468	1,06	2,24
P5	86	186340	1,09	2,09

Tab. 4.13	Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten: Gemessene GeoMean-Werte					
Pat.-Nr.	IgG1 FITC	IgG2a PE	CD11a FITC	CD58 PE	CD54 PE	CD50 FITC
<b>A - In statistische Auswertung einbezogene Versuche</b>						
P1	3,79	3,23	2,98	165,76	1,85	8,19
P3	3,31	2,68	3,67	63,82	21,04	106,77
P4	2,53	2,03	2,99	77,83	17,44	78,34
P6	2,90	2,30	3,12	33,23	16,58	50,83
P7	4,33	3,02	4,77	81,41	13,39	
P7 (2)	3,09					12,79
P8	2,18	2,18	2,53	199,74	10,18	7,98
P9	4,24	1,04	3,59	2,79	9,24	48,59
P10	3,48	3,08	3,98	58,23	10,48	92,43
P11	2,01	1,69	16,79	5,09	1,54	28,28
P12	2,82	2,42	7,84	36,95	25,79	
P13	3,02	3,16	3,30	66,46	5,12	8,73
P14	3,46	2,58	11,91	86,72	6,98	38,34
P16	2,19	2,75	2,51	134,90	12,32	24,68
P17	3,15	3,18	10,71	73,31	11,98	83,87
P18	4,73	3,70	4,23	15,39	20,25	80,39
P19	2,40	2,21	2,46	5,25	20,60	52,18
P20	1,74	1,74	1,04	58,74	19,83	23,85
P21	2,49	2,08	17,89	91,79	2,49	22,02
P22	2,00	1,46		54,81	8,85	85,00
P23	2,89	2,13	21,15	58,04	10,87	59,60
Anzahl	20	20	19	20	20	19
Geom. Mittelw.	2,88	2,33	4,83	44,83	9,76	35,88
Stand.abw.	0,84	0,68	6,02	51,38	6,98	32,03
<b>B - Aus statistischer Auswertung ausgeschlossene Versuche</b>						
P2	3,43	3,90	3,69	2,56	14,28	3,54
P5	2,71	2,18	7,58	86,82	23,31	
P5 (2)	3,89					15,68
P23 (2)	3,07	3,39	26,27	62,54	12,08	

<b>Tab. 4.14</b>		<b>Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten: MNF (berechnet aus den GeoMean-Werten in Tabelle 4.13)</b>		
<b>Pat.-Nr.</b>	<b>CD11a FITC</b>	<b>CD58 PE</b>	<b>CD54 PE</b>	<b>CD50 FITC</b>
<b>A - In statistische Auswertung einbezogene Versuche</b>				
P1	-0,10	1,71	-0,24	0,33
P3	0,04	1,38	0,89	1,51
P4	0,07	1,58	0,93	1,49
P6	0,03	1,16	0,86	1,24
P7	0,04	1,43	0,65	0,62
P8	0,06	1,96	0,67	0,56
P9	-0,07	0,43	0,95	1,06
P10	0,06	1,28	0,53	1,42
P11	0,92	0,48	-0,04	1,15
P12	0,44	1,18	1,03	
P13	0,04	1,32	0,21	0,46
P14	0,54	1,53	0,43	1,04
P16	0,06	1,69	0,65	1,05
P17	0,53	1,36	0,58	1,43
P18	-0,05	0,62	0,74	1,23
P19	0,01	0,38	0,97	1,34
P20	-0,22	1,53	1,06	1,14
P21	0,86	1,64	0,08	0,95
P22		1,57	0,78	1,63
P23	0,86	1,44	0,71	1,31
<b>Anzahl</b>	19	20	20	19
<b>Mittelwert</b>	0,22	1,28	0,62	1,10
<b>Stand.abw.</b>	0,36	0,46	0,37	0,37
<b>B - Aus statistischer Auswertung ausgeschlossene Versuche</b>				
P2	0,03	-0,18	0,56	0,01
P5	0,45	1,60	1,03	0,61
P23 (2)	0,93	1,27	0,55	

<b>Tab. 4.15</b>	<b>Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten: Gemessene GeoMean-Werte</b>					
<b>Pat.-Nr.</b>	<b>IgG1</b>	<b>IgG2b</b>	<b>7G4.F4</b>	<b>7F12.D10</b>	<b>1B8.B6</b>	<b>8A6.D4</b>
<b>A - In statistische Auswertung einbezogene Versuche</b>						
<b>P1</b>	2,31	2,10	2,23	1,98	2,09	1,86
<b>P4</b>	1,86	1,84	2,04	1,90	1,87	1,80
<b>P7</b>	2,89	3,23	3,07	2,77	3,05	2,91
<b>P8</b>	2,30	2,33	2,46	2,40	2,14	2,20
<b>P9</b>	1,60	1,57	1,53	1,61	1,64	1,63
<b>P10</b>	2,23	2,22	2,25	2,30	2,14	2,19
<b>P11</b>	2,51	2,08	1,74	2,01	2,31	1,94
<b>P12</b>	1,87	2,08	2,15	2,07	1,97	2,05
<b>P13</b>	2,60	2,50	2,59	2,73	2,70	2,43
<b>P14</b>	2,05	2,42	2,45	2,60	2,50	2,47
<b>P15</b>	2,91	2,52	9,63	4,47	2,76	2,78
<b>P16</b>	1,34	1,50	1,44	1,32	1,63	1,54
<b>P17</b>	2,73	2,71	2,65	2,47	2,59	2,59
<b>P18</b>	2,74	3,62	3,74	3,33	4,03	3,57
<b>P19</b>	1,45	1,98	1,98	2,00	2,05	1,96
<b>P20</b>	1,40	1,37	1,25	1,32	1,37	1,54
<b>P21</b>	2,22	2,33	2,61	2,46	2,53	2,41
<b>P22</b>	1,35	1,37	1,38	1,35	1,36	1,44
<b>P23</b>	2,43	2,75	2,59	2,86	2,53	2,68
<b>Anzahl</b>	19	19	19	19	19	19
<b>Geom. Mittelw.</b>	2,08	2,16	2,32	2,20	2,20	2,15
<b>Stand.abw.</b>	0,53	0,59	1,81	0,76	0,63	0,55
<b>B - Aus statistischer Auswertung ausgeschlossene Versuche</b>						
<b>P2</b>	3,05	1,97	3,64	2,34	2,40	2,36

<b>Tab. 4.16</b>	<b>Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten: MNF (berechnet aus den GeoMean-Werten in Tabelle 4.15)</b>			
<b>Pat.-Nr.</b>	<b>7G4.F4</b>	<b>7F12.D10</b>	<b>1B8.B6</b>	<b>8A6.D4</b>
<b>A - In statistische Auswertung einbezogene Versuche</b>				
<b>P1</b>	-0,02	-0,07	0,00	-0,05
<b>P4</b>	0,04	0,01	0,01	-0,01
<b>P7</b>	0,03	-0,02	-0,02	-0,05
<b>P8</b>	0,03	0,02	-0,04	-0,02
<b>P9</b>	-0,02	0,00	0,02	0,02
<b>P10</b>	0,00	0,01	-0,02	-0,01
<b>P11</b>	-0,16	-0,10	0,05	-0,03
<b>P12</b>	0,06	0,04	-0,02	-0,01
<b>P13</b>	0,00	0,02	0,03	-0,01
<b>P14</b>	0,08	0,10	0,01	0,01
<b>P15</b>	0,52	0,19	0,04	0,04
<b>P16</b>	0,03	-0,01	0,04	0,01
<b>P17</b>	-0,01	-0,04	-0,02	-0,02
<b>P18</b>	0,14	0,08	0,05	-0,01
<b>P19</b>	0,14	0,14	0,02	0,00
<b>P20</b>	-0,05	-0,03	0,00	0,05
<b>P21</b>	0,07	0,04	0,04	0,01
<b>P22</b>	0,01	0,00	0,00	0,02
<b>P23</b>	0,03	0,07	-0,04	-0,01
<b>Anzahl</b>	19	19	19	19
<b>Mittelwert</b>	0,05	0,03	0,01	0,00
<b>Stand.abw.</b>	0,13	0,07	0,03	0,03
<b>B - Aus statistischer Auswertung ausgeschlossene Versuche</b>				
<b>P2</b>	0,08	-0,12	0,09	0,08

<b>Tab. 4.17 Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten: Gemessene GeoMean-Werte</b>								
<b>Pat.-Nr.</b>	<b>IgG1 FITC</b>	<b>CD48 FITC</b>	<b>IgG2a PE</b>	<b>CD112 PE</b>	<b>IgG1 PE</b>	<b>CD155 PE</b>	<b>IgG2a PE</b>	<b>NG2 PE</b>
<b>A - In statistische Auswertung einbezogene Versuche</b>								
P1	3,79	11,37	3,23	2,72	2,31	6,79	2,77	3,07
P3	3,31	3,62	2,68	2,84	2,70	3,39	2,64	2,86
P4	2,53	2,47	2,03	2,80	1,86	2,74	1,88	1,86
P6	2,90	2,22	2,30	2,55	2,43	12,10		
P7	4,33	3,76	3,02	3,99	2,89	5,54	2,94	2,86
P8	2,18	42,75	2,18	6,47	2,30	2,79	2,21	2,45
P9	4,24	4,55	1,04	1,30	1,60	2,41	1,61	1,43
P10	3,48	3,27	3,08	3,02	2,23	2,22	2,22	2,37
P11	2,01	11,35	1,69	1,55	2,51	2,10	1,86	2,02
P12	2,82	3,02	2,42	4,15	1,87	2,14	2,04	2,03
P13	3,02	38,11	3,16	5,94	2,60	3,27	2,73	2,98
P14	3,46	3,10	2,58	3,32	2,05	2,64	2,63	2,62
P15					2,91	3,84	2,40	2,34
P16	2,19	39,81	2,75	1,92	1,34	1,64	1,37	1,56
P17	3,15	2,91	3,18	3,01	2,73	2,79	2,64	2,93
P18	4,73	4,46	3,70	5,82	2,74	3,82	2,93	3,05
P19	2,40	2,13	2,21	2,95	1,45	2,00	1,94	2,07
P20	1,74	1,50	1,74	2,74	1,40	1,67	1,31	1,45
P21	2,49	2,30	2,08	3,45	2,22	2,94	2,55	2,74
P22	2,00	11,16	1,46	1,98	1,35	1,47	1,43	1,51
P23	3,07	6,63	3,39	7,77	2,43	2,85	2,74	2,71
Anzahl	20	20	20	20	21	21	20	20
Geom. Mittelw.	2,88	5,49	2,39	3,17	2,12	2,94	2,18	2,27
Stand- abw.	0,84	13,40	0,71	1,72	0,52	2,36	0,53	0,57
<b>B - Aus statistischer Auswertung ausgeschlossene Versuche</b>								
P2	3,43	3,62	3,90	5,20	3,05	3,33	1,71	1,70
P5	2,71	3,44	2,18	5,16	2,92	9,50		
P23 (2)	2,89	6,33	2,13	2,59	2,42	2,85		

Tab. 4.18	Qualitative FACS-Analyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten: MNF (berechnet aus den GeoMean-Werten in Tabelle 4.17)			
Pat.-Nr.	CD48 FITC	CD112 PE	CD155 PE	NG2 PE
<b>A - In statistische Auswertung einbezogene Versuche</b>				
P1	0,48	-0,07	0,47	0,04
P3	0,04	0,03	0,10	0,03
P4	-0,01	0,14	0,17	0,00
P6	-0,12	0,04	0,70	
P7	-0,06	0,12	0,28	-0,01
P8	1,29	0,47	0,08	0,04
P9	0,03	0,10	0,18	-0,05
P10	-0,03	-0,01	0,00	0,03
P11	0,75	-0,04	-0,08	0,04
P12	0,03	0,23	0,06	0,00
P13	1,10	0,27	0,10	0,04
P14	-0,05	0,11	0,11	0,00
P15			0,12	-0,01
P16	1,26	-0,16	0,09	0,06
P17	-0,03	-0,02	0,01	0,05
P18	-0,03	0,20	0,14	0,02
P19	-0,05	0,13	0,14	0,03
P20	-0,06	0,20	0,08	0,04
P21	-0,03	0,22	0,12	0,03
P22	0,75	0,13	0,04	0,02
P23	0,33	0,36	0,07	0,00
Anzahl	20	20	21	20
Mittelwert	0,28	0,12	0,14	0,02
Stand.abw.	0,48	0,15	0,17	0,03
<b>B - Aus statistischer Auswertung ausgeschlossene Versuche</b>				
P2	0,02	0,12	0,04	0,00
P5	0,10	0,37	0,51	
P23 (2)	0,34	0,08	0,07	

<b>Tab. 4.19</b>				
<b>HLA-Typen der Patienten, deren Blasten untersucht wurden, und der gesunden Spender, deren NK-Zellen in Zytotoxizitätstests eingesetzt wurden (x = unbekannt)</b>				
<b>Pat.-Nr., Spender-Nr.</b>	<b>HLA-Typ HLA-A</b>	<b>HLA-Typ HLA-B</b>	<b>HLA-Typ HLA-C</b>	<b>Zusammenfassung HLA-B + HLA-C</b>
<b>P1</b>	xxxx xxxx	xxxx xxxx	xxxx xxxx	
<b>P2</b>	2301 2501	4403 4403	0401 1601	Bw4++/CwMix
<b>P3</b>	0301 3101	0702 4402	0702 0501	Bw4-/CwMix
<b>P4</b>	02xx 01xx	40xx 38xx	0304 1203	Bw4-/CW4-
<b>P5</b>	0101 0201	0801 3501	0401 0701	Bw4-/CwMix
<b>P6</b>	3101 6802	1402 5101	0802 1502	Bw4-/CwMix
<b>P7</b>	xxxx xxxx	xxxx xxxx	xxxx xxxx	
<b>P8</b>	24xx 30xx	18xx 40xx	0501 0202	Bw4-/Cw3-
<b>P9</b>	0201 0301	3501 5101	0401 1502	Bw4-/Cw3-
<b>P10</b>	24xx 23xx	35xx 44xx	0401 0401	Bw4-/Cw3-
<b>P11</b>	xxxx xxxx	xxxx xxxx	xxxx xxxx	
<b>P12</b>	xxxx xxxx	xxxx xxxx	xxxx xxxx	
<b>P13</b>	xxxx xxxx	xxxx xxxx	xxxx xxxx	
<b>P14</b>	01xx 02xx	35xx 38xx	0401 1203	BW4-/CwMix
<b>P15</b>	02xx 24xx	35xx 51xx	xxxx xxxx	
<b>P16</b>	0201 6801	3501 4402	0401 0704	BW4-/CwMix
<b>P17</b>	01xx 24xx	08xx 55xx	0303 0701	Bw4-/Cw4-
<b>P18</b>	xxxx xxxx	xxxx xxxx	xxxx xxxx	
<b>P19</b>	23xx 26xx	49xx 38xx	07xx 12xx	
<b>P20</b>	3201 3201	0702 4402	0702 0501	Bw4-/CwMix
<b>P21</b>	03xx 03xx	40xx 56xx	0102 0304	Bw4-/Cw4-
<b>P22</b>	xxxx xxxx	xxxx xxxx	xxxx xxxx	
<b>P23</b>	0201 1101	3501 4001	0304 0401	Bw4-/CwMix
<b>S1</b>	0201 3201	0702 4001	0304 0702	Bw4-/Cw4-
<b>S2</b>	03xx 33xx	35xx 58xx	0401 0302	Bw4-/CwMix
<b>S3</b>	0101 1101	4002 5501	0202 0303	Bw4-/CwMix
<b>S4</b>	xxxx xxxx	xxxx xxxx	xxxx xxxx	Bw4+x/CwMix



<b>Tab. 4.20</b>		<b>Qualitative FACS-Analyse CD3-depletierter, IL-2-stimulierter NK-Zellen gesunder Spender für Zytotoxizitätstests: Einteilung in positive und negative Proben (graphische Auswertung)</b>			
<b>Spender</b>	<b>Versuchs-Nr.</b>	<b>NKG2D</b>	<b>NKp30</b>	<b>NKp44</b>	<b>NKp46</b>
<b>S1</b>	V1	positiv	positiv	negativ	positiv
<b>S1</b>	V2	positiv	positiv	negativ	positiv
<b>S1</b>	V3	positiv	positiv	negativ	positiv
<b>S2</b>	V1	positiv	positiv	negativ	positiv
<b>S2</b>	V2	positiv	positiv	negativ	positiv
<b>S2</b>	V3	positiv	positiv	negativ	positiv

Tab. 4.21		Prozentuale Spezifische Lyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender in Zytotoxizitätstests: Blockade von NKG2D-Rezeptoren auf NK-Zellen (E:T = Effektorzellen:Targetzellen, hier NK-Zellen:Blasten)						
E:T	KIR-Mismatch ja(+), nein(-)	Spender vs Patient (vs = versus)	K562, ohne IL 2, ohne AK	K562, mit IL 2, ohne AK	Blasten, ohne IL 2, ohne AK	Blasten, mit IL 2, ohne AK	Blasten, mit IL 2, mit IgG1	Blasten, mit IL 2, mit NKG2D-AK
			<b>Prozentuale Spezifische Lyse</b>					
20:1	-	<b>S1 vs P17</b>	100	89	14	91	100	72
20:1	+	<b>S2 vs P17</b>	100	98	24	100	98	96
20:1	-	<b>S1 vs P21</b>	88	76	13	56	56	57
20:1	+	<b>S2 vs P21</b>	95	97	12	51	54	47
20:1	-	<b>S1 vs P23</b>	99	93	31	89	95	91
20:1	+	<b>S2 vs P23</b>	87	92	17	56	39	42
20:1	-	<b>S2 vs P14</b>	90	100	20	64	56	61
<b>20:1</b>		<b>Mittelwert</b>	<b>94</b>	<b>92</b>	<b>19</b>	<b>72</b>	<b>71</b>	<b>67</b>
10:1	-	<b>S1 vs P17</b>	84	87	5	65	57	56
10:1	+	<b>S2 vs P17</b>	66	82	10	64	77	72
10:1	-	<b>S1 vs P21</b>	75	74	6	41	40	43
10:1	+	<b>S2 vs P21</b>	72	100	11	37	36	33
10:1	-	<b>S1 vs P23</b>	67	86	31	98	100	81
10:1	+	<b>S2 vs P23</b>	63	88	15	37	37	27
10:1	-	<b>S2 vs P14</b>	53	90	19	30	25	29
<b>10:1</b>		<b>Mittelwert</b>	<b>69</b>	<b>87</b>	<b>14</b>	<b>53</b>	<b>53</b>	<b>49</b>
5:1	-	<b>S1 vs P17</b>	52	82	-4	40	38	40
5:1	+	<b>S2 vs P17</b>	16	85	4	40	41	36
5:1	-	<b>S1 vs P21</b>	41	66	5	28	28	33
5:1	+	<b>S2 vs P21</b>	63	79	3	20	22	16
5:1	-	<b>S1 vs P23</b>	60	84	23	90	85	65
5:1	+	<b>S2 vs P23</b>	50	88	9	30	24	26
5:1	-	<b>S2 vs P14</b>	26	54	10	12	2	10
<b>5:1</b>		<b>Mittelwert</b>	<b>44</b>	<b>77</b>	<b>7</b>	<b>37</b>	<b>34</b>	<b>32</b>
2,5:1	-	<b>S1 vs P17</b>	27	64	6	35	24	24
2,5:1	+	<b>S2 vs P17</b>	10	44	5	17	22	19
2,5:1	-	<b>S1 vs P21</b>	18	54		21	18	18
2,5:1	+	<b>S2 vs P21</b>	46	65		13	12	12
2,5:1	-	<b>S1 vs P23</b>	33	54	12	78	67	55
2,5:1	+	<b>S2 vs P23</b>	21	56	-2	28	20	14
2,5:1	-	<b>S2 vs P14</b>	11	33	4	6	-1	-1
<b>2,5:1</b>		<b>Mittelwert</b>	<b>24</b>	<b>53</b>	<b>5</b>	<b>28</b>	<b>23</b>	<b>20</b>

Tab. 4.22		Prozentuale Spezifische Lyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender in Zytotoxizitätstests: Blockade von NKG2D-Rezeptoren auf NK-Zellen, verschiedene Antikörperkonzentrationen (E:T = Effektorzellen:Targetzellen, hier NK-Zellen:Blasten)					
E:T	KIR-Mismatch ja(+), nein(-)	Spender vs Patient (vs = versus)	Blasten, ohne IL 2, ohne AK	Blasten, mit IL 2, ohne AK	Blasten, mit IL 2, mit IgG1	Blasten, mit IL 2, mit NKG2D-AK 5µl/100µl	Blasten, mit IL 2, mit NKG2D-AK 25µl/100µl
			<b>Prozentuale Spezifische Lyse</b>				
20:1	-	S1 vs P23	31	89	95	91	81
20:1	+	S2 vs P23	17	56	39	42	36
<b>20:1</b>		<b>Mittelwert</b>	<b>24</b>	<b>73</b>	<b>67</b>	<b>67</b>	<b>59</b>
10:1	-	S1 vs P23	31	98	100	81	73
10:1	+	S2 vs P23	15	37	37	27	22
<b>10:1</b>		<b>Mittelwert</b>	<b>23</b>	<b>68</b>	<b>69</b>	<b>54</b>	<b>48</b>
05:1	-	S1 vs P23	23	90	85	65	63
05:1	+	S2 vs P23	9	30	24	26	18
<b>05:1</b>		<b>Mittelwert</b>	<b>16</b>	<b>60</b>	<b>55</b>	<b>46</b>	<b>41</b>
2,5:1	-	S1 vs P23	12	78	67	55	45
2,5:1	+	S2 vs P23	-2	28	20	14	11
<b>2,5:1</b>		<b>Mittelwert</b>	<b>5</b>	<b>53</b>	<b>44</b>	<b>35</b>	<b>28</b>

Tab. 4.23		Prozentuale Spezifische Lyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender in Zytotoxizitätstests: Blockade von NKG2D-Liganden auf Blasten (E:T = Effektorzellen:Targetzellen, hier NK-Zellen:Blasten)				
E:T	KIR-Mismatch ja(+), nein(-)	Spender vs Patient (vs = versus)	Blasten, mit IL 2, ohne AK	Blasten, mit IL 2, mit NKG2D-Molekülen	Blasten, mit IL 2, ohne AK	Blasten, mit IL 2, mit ULBP1-AK
			<b>Prozentuale Spezifische Lyse</b>			
20:1	-	S3 vs P23	56	58		
20:1	+	S4 vs P23			26	30

<b>Tab. 4.24</b>					
<b>Prozentuale Spezifische Lyse von K562-Zellen durch NK-Zellen gesunder Spender in Zytotoxizitätstests: Blockade von NKG2D-Rezeptoren auf NK-Zellen (E:T = Effektorzellen:Targetzellen, hier NK-Zellen:Blasten)</b>					
<b>E:T</b>	<b>Spender vs Targetzellen (vs = versus)</b>	<b>K562, ohne IL 2, ohne AK</b>	<b>K562, mit IL 2, ohne AK</b>	<b>K562, mit IL 2, mit IgG1</b>	<b>K562, mit IL 2, mit NKG2D-AK</b>
<b>Prozentuale Spezifische Lyse</b>					
5:1	<b>S1 vs. K562,</b> (je 8µl AK/ 100µl Zellsusp.)	46	68	50	51
5:1	<b>S3 vs. K562,</b> (je 5µl AK/ 100µl Zellsusp.)	20	100	89	79
<b>5:1</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>33</b>	<b>84</b>	<b>70</b>	<b>65</b>

<b>Tab. 4.25</b>		<b>Prozentuale Spezifische Lyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender in Zytotoxizitätstests: Blockade von NCR auf NK-Zellen (E:T = Effektorzellen:Targetzellen, hier NK-Zellen:Blasten)</b>						
<b>E:T</b>	<b>KIR-Mismatch ja(+), nein(-)</b>	<b>Spender vs Patient (vs = versus)</b>	<b>K562, ohne IL 2, ohne AK</b>	<b>K562, mit IL 2, ohne AK</b>	<b>Blasten, ohne IL 2, ohne AK</b>	<b>Blasten, mit IL 2, ohne AK</b>	<b>Blasten, mit IL 2, mit IgG1</b>	<b>Blasten, mit IL 2, mit NCR-AK</b>
			<b>Prozentuale Spezifische Lyse</b>					
20:1	-	<b>S1 vs P17</b>						
20:1	+	<b>S2 vs P17</b>	100	98	24	100	98	93
20:1	-	<b>S1 vs P21</b>	88	76	13	56	56	57
20:1	+	<b>S2 vs P21</b>	95	97	12	51	54	47
20:1	-	<b>S1 vs P23</b>	99	93	31	89	95	82
20:1	+	<b>S2 vs P23</b>	87	92	17	56	39	26
20:1	-	<b>S2 vs P14</b>	90	100	20	64	56	32
<b>20:1</b>		<b>Mittelwert</b>	<b>93</b>	<b>93</b>	<b>20</b>	<b>69</b>	<b>66</b>	<b>56</b>
10:1	-	<b>S1 vs P17</b>						
10:1	+	<b>S2 vs P17</b>	66	82	10	64	77	61
10:1	-	<b>S1 vs P21</b>	75	74	6	41	40	33
10:1	+	<b>S2 vs P21</b>	72	100	11	37	36	29
10:1	-	<b>S1 vs P23</b>	67	86	31	98	100	90
10:1	+	<b>S2 vs P23</b>	63	88	15	37	37	19
10:1	-	<b>S2 vs P14</b>	53	90	19	30	25	17
<b>10:1</b>		<b>Mittelwert</b>	<b>66</b>	<b>87</b>	<b>15</b>	<b>51</b>	<b>53</b>	<b>42</b>
5:1	-	<b>S1 vs P17</b>						
5:1	+	<b>S2 vs P17</b>	16	85	4	40	41	39
5:1	-	<b>S1 vs P21</b>	41	66	5	28	28	24
5:1	+	<b>S2 vs P21</b>	63	79	3	20	22	18
5:1	-	<b>S1 vs P23</b>	60	84	23	90	85	71
5:1	+	<b>S2 vs P23</b>	50	88	9	30	24	16
5:1	-	<b>S2 vs P14</b>	26	54	10	12	2	3
<b>5:1</b>		<b>Mittelwert</b>	<b>43</b>	<b>76</b>	<b>9</b>	<b>37</b>	<b>34</b>	<b>29</b>
2,5:1	-	<b>S1 vs P17</b>						
2,5:1	+	<b>S2 vs P17</b>	10	44	5	17	22	17
2,5:1	-	<b>S1 vs P21</b>	18	54		21	18	15
2,5:1	+	<b>S2 vs P21</b>	46	65		13	12	12
2,5:1	-	<b>S1 vs P23</b>	33	54	12	78	67	52
2,5:1	+	<b>S2 vs P23</b>	21	56	-2	28	20	9
2,5:1	-	<b>S2 vs P14</b>	11	33	4	6	-1	-3
<b>2,5:1</b>		<b>Mittelwert</b>	<b>23</b>	<b>51</b>	<b>5</b>	<b>27</b>	<b>23</b>	<b>17</b>

Tab. 4.26		Prozentuale Spezifische Lyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender in Zytotoxizitätstests: Blockade von NCR auf NK-Zellen, verschiedene Antikörperkonzentrationen (E:T = Effektorzellen:Targetzellen, hier NK-Zellen:Blasten)						
E:T	KIR-Mismatch ja(+), nein(-)	Spender vs Patient (vs = versus)	Blasten, ohne IL 2, ohne AK	Blasten, mit IL 2, ohne AK	Blasten, mit IL 2, mit IgG1	Blasten, mit IL 2, mit NCR-AK 3x5µl/100µl	Blasten, mit IL 2, mit NCR-AK 3x15µl/100µl	Blasten, mit IL 2, mit NCR-AK 3x25µl/80µl
			Prozentuale Spezifische Lyse					
20:1	+	S2 vs P17	24	100	98	93	79	
20:1	-	S1 vs P23	31	89	95	82	83	74
20:1	+	S2 vs P23	17	56	39	26	15	15
<b>20:1</b>		<b>Mittelwert</b>	<b>24</b>	<b>82</b>	<b>77</b>	<b>67</b>	<b>59</b>	
10:1	+	S2 vs P17	10	64	77	61	57	
10:1	-	S1 vs P23	31	98	100	90	82	65
10:1	+	S2 vs P23	15	37	37	19	13	9
<b>10:1</b>		<b>Mittelwert</b>	<b>19</b>	<b>66</b>	<b>71</b>	<b>57</b>	<b>51</b>	
5:1	+	S2 vs P17	4	40	41	39	31	
5:1	-	S1 vs P23	23	90	85	71	69	61
5:1	+	S2 vs P23	9	30	24	16	11	9
<b>5:1</b>		<b>Mittelwert</b>	<b>12</b>	<b>53</b>	<b>50</b>	<b>42</b>	<b>37</b>	
2,5:1	+	S2 vs P17	5	17	22	17	22	
2,5:1	-	S1 vs P23	12	78	67	52	60	46
2,5:1	+	S2 vs P23	-2	28	20	9	6	5
<b>2,5:1</b>		<b>Mittelwert</b>	<b>5</b>	<b>41</b>	<b>36</b>	<b>26</b>	<b>29</b>	

Tab. 4.27		Prozentuale Spezifische Lyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender in Zytotoxizitätstests: Blockade von NCR auf NK-Zellen und potentiell von NCR-Liganden auf Blasten (Vergleich); Spender S3 versus Patient P23 (E:T = Effektorzellen:Targetzellen, hier NK-Zellen:Blasten)							
E:T	KIR-Mismatch ja(+), nein(-)	K562, ohne IL2	K562, mit IL2	Blasten, ohne IL2	Blasten, mit IL2, ohne AK	Blasten, mit IL2, mit NKp30-Molekülen	Blasten, mit IL2, mit NKp46-Molekülen	Blasten, mit IL2, mit NKp30-AK (8µl/100µl)	Blasten, mit IL2, mit NKp46-AK (8µl/100µl)
20:1	-	62	99	7	100	69	72	48	47
10:1	-	67	102	2	68				
5:1	-	41	98	1	58				
2,5:1	-	28	100	3	46				

Tab. 4.28		Prozentuale Spezifische Lyse von K562-Zellen durch NK-Zellen gesunder Spender in Zytotoxizitätstests: Blockade von NCR auf NK-Zellen (E:T = Effektorzellen:Targetzellen, hier NK-Zellen:Blasten)			
E:T	Spender vs Targetzellen (vs = versus)	K562, ohne IL 2, ohne AK	K562, mit IL 2, ohne AK	K562, mit IL 2, mit IgG1	K562, mit IL 2, mit NCR-AK
		<b>Prozentuale Spezifische Lyse</b>			
20:1	<b>S1 vs. K562</b>	100	89	84	85
20:1	<b>S2 vs. K562</b>	100	98	87	79
20:1	<b>Mittelwert</b>	<b>100</b>	<b>94</b>	<b>86</b>	<b>82</b>
10:1	<b>S1 vs. K562</b>	84	87	83	84
10:1	<b>S2 vs. K562</b>	66	82	87	81
10:1	<b>Mittelwert</b>	<b>75</b>	<b>85</b>	<b>85</b>	<b>83</b>
5:1	<b>S1 vs. K562</b>	52	82	78	58
5:1	<b>S2 vs. K562</b>	16	85	84	73
5:1	<b>Mittelwert</b>	<b>34</b>	<b>84</b>	<b>81</b>	<b>66</b>
2,5:1	<b>S1 vs. K562</b>	27	64	54	47
2,5:1	<b>S2 vs. K562</b>	10	44	54	51
2,5:1	<b>Mittelwert</b>	<b>19</b>	<b>54</b>	<b>54</b>	<b>49</b>

Tab. 4.29		Prozentuale Spezifische Lyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender in Zytotoxizitätstests: Blockade von Adhäsionsmolekülen (E:T = Effektorzellen:Targetzellen, hier NK-Zellen:Blasten)						
E:T	KIR-Mismatch ja(+), nein(-)	Spender vs Patient (vs = versus)	Blasten, ohne IL 2, ohne AK	Blasten, mit IL 2, ohne AK	Blasten, mit IL 2, mit CD11a-AK	Blasten, mit IL 2, mit CD58-AK	Blasten, mit IL 2, mit CD54-AK	Blasten, mit IL 2, mit CD50-AK
			Prozentuale Spezifische Lyse					
20:1	-	S3 vs P23 (1)	4	56	51	49	47	
20:1	-	S3 vs P23 (2)	7	100				74

Tab. 4.30		Prozentuale Spezifische Lyse kindlicher B-Reihen-ALL-Blasten durch NK-Zellen gesunder Spender in Zytotoxizitätstests: Blockade von CD48, CD112 und CD155 (E:T = Effektorzellen:Targetzellen, hier NK-Zellen:Blasten)						
E:T	KIR-Mismatch ja(+), nein(-)	Spender vs Patient (vs = versus)	Blasten, ohne IL 2, ohne AK	Blasten, mit IL 2, ohne AK	Blasten, mit IL 2, mit CD48-AK	Blasten, mit IL 2, mit CD112-AK	Blasten, mit IL 2, mit CD155-AK	
			Prozentuale Spezifische Lyse					
20:1	-	S3 vs P23 (1)	4	56	37	36		
20:1	-	S3 vs P23 (2)	7	100	78	92	96	
20:1		Mittelwert	6	78	58	64		



## 9 Literatur

1. Aldemir, H., Prod'homme, V., Dumaurier, M.-J., Retiere, C., Poupon, G., Cazareth, J., Bihl, F., and Braud, V. M. 2005. Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor. *J Immunol* 175:7791–7795.
2. Altvater, B., Landmeier, S., Pscherer, S., Temme, J., Schweer, K., Kailayangiri, S., Campana, D., Juergens, H., Pule, M., and Rossig, C. 2009. 2B4 (CD244) signaling by recombinant antigen-specific chimeric receptors costimulates natural killer cell activation to leukemia and neuroblastoma cells. *Clin Cancer Res* 15:4857–4866.
3. Arnon, T. I., Achdout, H., Lieberman, N., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Katz, G., Bar-Ilan, A., Bloushtain, N., Lev, M., Joseph, A., Kedar, E., Porgador, A., and Mandelboim, O. 2004. The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46. *Blood* 103:664–672.
4. Arnon, T. I., Markel, G., Bar-Ilan, A., Hanna, J., Fima, E., Benchetrit, F., Galili, R., Cerwenka, A., Benharroch, D., Sion-Vardy, N., Porgador, A., and Mandelboim, O. 2008. Harnessing soluble NK cell killer receptors for the generation of novel cancer immune therapy. *PLoS One* 3:e2150.
5. Arnon, T. I., Markel, G., and Mandelboim, O. 2006. Tumor and viral recognition by natural killer cells receptors. *Semin Cancer Biol* 16:348–358.
6. Ayello, J. zu, Ven, C. van de, Cairo, E., Hochberg, J., Baxi, L., Satwani, P., and Cairo, M. S. 2009. Characterization of natural killer and natural killer-like T cells derived from ex vivo expanded and activated cord blood mononuclear cells: implications for adoptive cellular immunotherapy. *Exp Hematol* 37:1216–1229.
7. Behm, F. G., Smith, F. O., Raimondi, S. C., Pui, C. H., and Bernstein, I. D. 1996. Human homologue of the rat chondroitin sulfate proteoglycan, NG2, detected by monoclonal antibody 7.1, identifies childhood acute lymphoblastic leukemias with t(4;11)(q21;q23) or t(11;19)(q23;p13) and MLL gene rearrangements. *Blood* 87:1134–1139.

8. Bene, M. C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W. D., Matutes, E., Orfao, A., and Veer, M. B. van't. 1995. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 9:1783-1786.
9. Biassoni, R., Bottino, C., Cantoni, C., and Moretta, A. 2002. Human natural killer receptors and their ligands. *Curr Protoc Immunol* Chapter 14: Unit 14.10.
10. Blomberg, K., Hautala, R., Lovgren, J., Mukkala, V. M., Lindqvist, C., and 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.
11. Bloushtain, N., Qimron, U., Bar-Ilan, A., Hershkovitz, O., Gazit, R., Fima, E., Korc, M., Vlodaysky, I., Bovin, N. V., and Porgador, A. 2004. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46. *J Immunol* 173:2392–2401.
12. Bourin, P., Mansour, I., Doinel, C., Roué, R., Rouger, P., and Levi, F. 1993. Circadian rhythms of circulating NK cells in healthy and human immunodeficiency virus-infected men. *Chronobiol Int* 10:298–305.
13. Brandt, C. S., Baratin, M., Yi, E. C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C. D., Kaifu, T., Chabannon, C., Moretta, A., West, R., Xu, W., Vivier, E., and Levin, S. D. 2009. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med* 206:1495–1503.
14. Brenner, H., Kaatsch, P., Burkhardt-Hammer, T., Harms, D. O., Schrappe, M., and Michaelis, J. 2001. Long-term survival of children with leukemia achieved by the end of the second millennium. *Cancer* 92:1977-1983.
15. Bryceson, Y. T., Ljunggren, H. G., and Long, E. O. 2009. Minimal requirement for induction of natural cytotoxicity and intersection of activation signals by inhibitory receptors. *Blood* 114:2657–2666.
16. Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G., and Long, E. O. 2006. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev* 214:73–91.
17. Byrd, A., Hoffmann, S. C., Jarahian, M., Momburg, F., and Watzl, C. 2007. Expression analysis of the ligands for the Natural Killer cell receptors NKp30 and NKp44. *PLoS One* 2:e1339.

18. Cagnano, E., Hershkovitz, O., Zilka, A., Bar-Ilan, A., Golder, A., Sion-Vardy, N., Bogdanov-Berezovsky, A., Mandelboim, O., Benharroch, D., and Porgador, A. 2008. Expression of ligands to NKp46 in benign and malignant melanocytes. *J Invest Dermatol* 128:972–979.
19. Carosella, E. D., Khalil-Daher, I., Dausset, J., and Rouas-Freiss, N. 1999. HLA-G mediates protection from natural killer cytotoxicity: implications in immune tolerance. *Transplant Proc* 31:1192–1193.
20. Chapman, T. L., Heikeman, A. P., and Bjorkman, P. J. 1999. The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity* 11:603–613.
21. Colonna, M., and Samaridis, J. 1995. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science* 268:405–408.
22. Colucci, F., Caligiuri, M. A., and Di Santo, J. P. 2003. What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol* 3:413–425.
23. Cooper, M. A., Colonna, M., and Yokoyama, W. M. 2009. Hidden talents of natural killers: NK cells in innate and adaptive immunity. *EMBO Rep* 10:1103–1110.
24. Dunne, J., Lynch, S., O'Farrelly, C., Todryk, S., Hegarty, J. E., Feighery, C., and Doherty, D. G. 2001. Selective expansion and partial activation of human NK cells and NK receptor-positive T cells by IL-2 and IL-15. *J Immunol* 167:3129–3138.
25. Empson, V. G., McQueen, F. M., and Dalbeth, N. 2010. The natural killer cell: a further innate mediator of gouty inflammation? *Immunol Cell Biol* 88:24–31.
26. Esin, S., Batoni, G., Counoupas, C., Stringaro, A., Brancatisano, F. L., Colone, M., Maisetta, G., Florio, W., Arancia, G., and Campa, M. 2008. Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor NKp44 to the surfaces of mycobacteria and other bacteria. *Infect Immun* 76:1719–1727.
27. Esplugues, E., Vega-Ramos, J., Cartoixà, D., Vazquez, B. N., Salaet, I., Engel, P., and Lauzurica, P. 2005. Induction of tumor NK-cell immunity by anti-CD69 antibody therapy. *Blood* 105:4399–4406.
28. Falco, M., Marcenaro, E., Romeo, E., Bellora, F., Marras, D., Vély, F., Ferracci, G., Moretta, L., Moretta, A., and Bottino, C. 2004. Homophilic

- interaction of NTBA, a member of the CD2 molecular family: induction of cytotoxicity and cytokine release in human NK cells. *Eur J Immunol* 34:1663–1672.
29. Farag, S. S., and Caligiuri, M. A. 2006. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev* 20:123–137.
  30. Fauriat, C., Just-Landi, S., Mallet, F., Arnoulet, C., Sainty, D., Olive, D., and Costello, R. T. 2007. Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood* 109:323–330.
  31. Feuchtinger, T., Pfeiffer, M., Pfaffle, A., Teltschik, H. M., Wernet, D., Schumm, M., Lotfi, R., Handgretinger, R., and Lang, P. 2009. Cytolytic activity of NK cell clones against acute childhood precursor-B-cell leukaemia is influenced by HLA class I expression on blasts and the differential KIR phenotype of NK clones. *Bone Marrow Transplant* 43:875–881.
  32. Flodstrom-Tullberg, M., Bryceson, Y. T., Shi, F. D., Hoglund, P., and Ljunggren, H. G. 2009. Natural killer cells in human autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 21:634–640.
  33. Fuchs, A., Cella, M., Giurisato, E., Shaw, A. S., and Colonna, M. 2004. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *J Immunol* 172:3994–3998.
  34. Fujisaki, H., Kakuda, H., Shimasaki, N., Imai, C., Ma, J., Lockey, T., Eldridge, P., Leung, W. H., and Campana, D. 2009. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res* 69:4010–4017.
  35. Geiselhart, A., Neu, S., Buchholz, F., Lang, P., Niethammer, D., and Handgretinger, R. 1996. Positive selection of CD56+ lymphocytes by magnetic cell sorting. *Nat Immun* 15:227–233.
  36. Giebel, S., Nowak, I., Dziaczkowska, J., Czerw, T., Wojnar, J., Krawczyk-Kulis, M., Holowiecki, J., Holowiecka-Goral, A., Markiewicz, M., Kopera, M., Karolczyk, A., Kyrzcz-Krzemien, S., and Kusnierczyk, P. 2009. Activating killer immunoglobulin-like receptor incompatibilities enhance graft-versus-host disease and affect survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol* 83:343–356.
  37. Harms, V. 1998. *Biomathematik, Statistik und Dokumentation*. 7. überarbeitete Auflage. Harms Verlag, Kiel. ISBN 3-86026-4.

38. Hasenkamp, J., Borgerding, A., Wulf, G., Uhrberg, M., Jung, W., Dingeldein, S., Truemper, L., and Glass, B. 2006. Resistance against natural killer cell cytotoxicity: analysis of mechanisms. *Scand J Immunol* 64:444–449.
39. Hecht, M. L., Rosental, B., Horlacher, T., Hershkovitz, O., Paz, J. L. de, Noti, C., Schauer, S., Porgador, A., and Seeberger, P. H. 2009. Natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 bind to different heparan sulfate/heparin sequences. *J Proteome Res* 8:712–720.
40. Hershkovitz, O., Jarahian, M., Zilka, A., Bar-Ilan, A., Landau, G., Jivov, S., Tekoah, Y., Glicklis, R., Gallagher, J. T., Hoffmann, S. C., Zer, H., Mandelboim, O., Watzl, C., Momburg, F., and Porgador, A. 2008. Altered glycosylation of recombinant NKp30 hampers binding to heparan sulfate: a lesson for the use of recombinant immunoreceptors as an immunological tool. *Glycobiology* 18:28–41.
41. Hershkovitz, O., Jivov, S., Bloushtain, N., Zilka, A., Landau, G., Bar-Ilan, A., Lichtenstein, R. G., Campbell, K. S., Kuppevelt, T. H. van, and Porgador, A. 2007. Characterization of the recognition of tumor cells by the natural cytotoxicity receptor, NKp44. *Biochemistry* 46:7426–7436.
42. Inukai, T., Zhang, X., Goto, M., Hirose, K., Uno, K., Akahane, K., Nemoto, A., Goi, K., Sato, H., Takahashi, K., Honna, H., Kagami, K., Nakamoto, K., Yagita, H., Okumura, K., Koyama-Okazaki, T., Nakazawa, S., and Sugita, K. 2006. Resistance of infant leukemia with MLL rearrangement to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: a possible mechanism for poor sensitivity to antitumor immunity. *Leukemia* 20:2119–2129.
43. Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J. 2005. *Immunobiology. The immune system in health and disease*. 6th ed. Garland Science Publishing, New York. ISBN 0 8153 4101 6.
44. Kim, H. R., Lee, K. H., Park, S. J., Kim, S. Y., Yang, Y. K., Tae, J., and Kim, J. 2009. Anti-cancer activity and mechanistic features of a NK cell activating molecule. *Cancer Immunol Immunother* 58:1691–1700.
45. Konjevic, G., Mirjagic, M. K., Vuletic, A., Jurisic, V., and Spuzic, I. 2009. Distribution of several activating and inhibitory receptors on CD3-CD16+ NK cells and their correlation with NK cell function in healthy individuals. *J Membr Biol* 230:113–123.
46. Kuttruff, S., Koch, S., Kelp, A., Pawelec, G., Rammensee, H.-G., and Steinle, A. 2009. NKp80 defines and stimulates a reactive subset of CD8 T cells. *Blood* 113:358–369.

47. Kwong, K. Y., Baskar, S., Zhang, H., Mackall, C. L., and Rader, C. 2008. Generation, affinity maturation, and characterization of a human anti-human NKG2D monoclonal antibody with dual antagonistic and agonistic activity. *J Mol Biol* 384:1143–1156.
48. Lang, P., Barbin, K., Feuchtinger, T., Greil, J., Peipp, M., Zunino, S. J., Pfeiffer, M., Handgretinger, R., Niethammer, D., and Fey, G. H. 2004. Chimeric CD19 antibody mediates cytotoxic activity against leukemic blasts with effector cells from pediatric patients who received T-cell-depleted allografts. *Blood* 103:3982–3985.
49. Lang, P., and Handgretinger, R. 2008. Haploidentical SCT in children: an update and future perspectives. *Bone Marrow Transplant* 42:54–59.
50. Lee, J. C., Lee, K. M., Kim, D. W., and Heo, D. S. 2004. Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *J Immunol* 172:7335–7340.
51. Lee, K.-M., Forman, J. P., McNerney, M. E., Stepp, S., Kuppireddi, S., Guzior, D., Latchman, Y. E., Sayegh, M. H., Yagita, H., Park, C.-K., Oh, S. B., Wülfing, C., Schatzle, J., Mathew, P. A., Sharpe, A. H., and Kumar, V. 2006. Requirement of homotypic NK-cell interactions through 2B4(CD244)/CD48 in the generation of NK effector functions. *Blood* 107:3181–3188.
52. Leung, W., Iyengar, R., Leimig, T., Holladay, M. S., Houston, J., and Handgretinger, R. 2005. Phenotype and function of human natural killer cells purified by using a clinical-scale immunomagnetic method. *Cancer Immunol Immunother* 54:389–394.
53. Leung, W., Iyengar, R., Turner, V., Lang, P., Bader, P., Conn, P., Niethammer, D., and Handgretinger, R. 2004. Determinants of anti-leukemia effects of allogeneic NK cells. *J Immunol* 172:644–650.
54. Lopez-Soto, A., Folgueras, A. R., Seto, E., and Gonzalez, S. 2009. HDAC3 represses the expression of NKG2D ligands ULBPs in epithelial tumour cells: potential implications for the immunosurveillance of cancer. *Oncogene* 28:2370–2382.
55. Lotzova, E., Savary, C. A., Schachner, J. R., Huh, J. O., and McCredie, K. 1991. Generation of cytotoxic NK cells in peripheral blood and bone marrow of patients with acute myelogenous leukemia after continuous infusion with recombinant interleukin-2. *Am J Hematol* 37:88–99.

56. Loza, M. J., Peters, S. P., Zangrilli, J. G., and Perussia, B. 2002. Distinction between IL-13+ and IFN-Gamma+ natural killer cells and regulation of their pool size by IL-4. *Eur J Immunol* 32:413–423.
57. Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., and Myrtek, D. 2006. *Der Experimentator Immunologie*. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. ISBN 978-3-8274-1730-5.
58. Mageed, A. A., Findley, H. W. J., Franco, C., Singhapakdi, S., Alvarado, C., Chan, W. C., and Ragab, A. H. 1987. Natural killer cells in children with acute leukemia. The effect of interleukin-2. *Cancer* 60:2913–2918.
59. Maher, K. J., and Fletcher, M. A. 2005. Quantitative flow cytometry in the clinical laboratory. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 5:353–372.
60. Maier, S., Grzeschik, M., Weiss, E. H., and Ulbrecht, M. 2000. Implications of HLA-E allele expression and different HLA-E ligand diversity for the regulation of NK cells. *Hum Immunol*. 61:1059–1065.
61. Majumder, D., Bandyopadhyay, D., Chandra, S., Mukherjee, N., and Banerjee, S. 2006. Lack of HLA-E surface expression is due to deficiency of HLA-E transcripts in the malignant hematopoietic cells of leukemic patients. *Leuk Res* 30:242–245.
62. Markel, G., Seidman, R., Besser, M. J., Zabari, N., Ortenberg, R., Shapira, R., Treves, A. J., Loewenthal, R., Orenstein, A., Nagler, A., and Schachter, J. 2009. Natural killer lysis receptor (NKLR)/NKLR-ligand matching as a novel approach for enhancing anti-tumor activity of allogeneic NK cells. *PLoS One* 4:e5597.
63. Mavoungou, E., Bouyou-Akotet, M. K., and Kremsner, P. G. 2005. Effects of prolactin and cortisol on natural killer (NK) cell surface expression and function of human natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp44 and NKp30). *Clin Exp Immunol* 139:287–296.
64. McGilvray, R. W., Eagle, R. A., Watson, N. F. S., Al-Attar, A., Ball, G., Jafferji, I., Trowsdale, J., and Durrant, L. G. 2009. NKG2D ligand expression in human colorectal cancer reveals associations with prognosis and evidence for immunoediting. *Clin Cancer Res* 15:6993–7002.
65. Meropol, N. J., Barresi, G. M., Fehniger, T. A., Hitt, J., Franklin, M., and 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.

66. Meyer, D., Seth, S., Albrecht, J., Maier, M. K., Du Pasquier, L., Ravens, I., Dreyer, L., Burger, R., Gramatzki, M., Schwinzer, R., Kremmer, E., Foerster, R., and Bernhardt, G. 2009. CD96 interaction with CD155 via its first Ig-like domain is modulated by alternative splicing or mutations in distal Ig-like domains. *J Biol Chem* 284:2235–2244.
67. Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., and Radbruch, A. 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11:231–238.
68. Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M. C., and Moretta, L. 2000. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* 21:228–234.
69. Moretta, A., Locatelli, F., and Moretta, L. 2008. Human NK cells: from HLA class I-specific killer Ig-like receptors to the therapy of acute leukemias. *Immunol Rev* 224:58–69.
70. Moretta, A., Marcenaro, E., Parolini, S., Ferlazzo, G., and Moretta, L. 2008. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ* 15:226–233.
71. Muller, T., Uherek, C., Maki, G., Chow, K. U., Schimpf, A., Klingemann, H. G., Tonn, T., and Wels, W. S. 2008. Expression of a CD20-specific chimeric antigen receptor enhances cytotoxic activity of NK cells and overcomes NK-resistance of lymphoma and leukemia cells. *Cancer Immunol Immunother* 57:411–423.
72. Nowbakht, P., Ionescu, M. C., Rohner, A., Kalberer, C. P., Rossy, E., Mori, L., Cosman, D., Libero, G. de, and Wodnar-Filipowicz, A. 2005. Ligands for natural killer cell-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias. *Blood* 105:3615–3622.
73. Oshimi, Y., Oda, S., Honda, Y., Nagata, S., and Miyazaki, S. 1996. Involvement of Fas Ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human Natural Killer cells. *J Immunol* 157:2909–2915.
74. Paya, C. V., Kenmotsu, N., Schoon, R. A., and Leibson, P. J. 1988. Tumor necrosis factor and lymphotoxin secretion by human natural killer cells leads to antiviral cytotoxicity. *J Immunol* 141:1989–1995.
75. Pende, D., Marcenaro, S., Falco, M., Martini, S., Bernardo, M. E., Montagna, D., Romeo, E., Cognet, C., Martinetti, M., Maccario, R., Mingari, M. C., Vivier, E., Moretta, L., Locatelli, F., and Moretta, A. 2009. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional



- role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood* 113:3119–3129.
76. Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. 1999. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 190:1505–1516.
  77. Pende, D., Spaggiari, G. M., Marcenaro, S., Martini, S., Rivera, P., Capobianco, A., Falco, M., Lanino, E., Pierri, I., Zambello, R., Bacigalupo, A., Mingari, M. C., Moretta, A., and Moretta, L. 2005. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood* 105:2066–2073.
  78. Pfeiffer, M. M. 2004. Anreicherung von T-Zell-depletierten NK-Zellen und deren zytotoxische Aktivität gegenüber ALL-Blasten in Abhängigkeit der HLA-Klasse-I-Expression. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen.
  79. Pfeiffer, M., Mura, U., Bolzhauser, M., Jung, G., Handgretinger, R., and Lang, P. 2007. Low expression of ligands for activating Nk receptors on paediatric ALL blasts: targeting of NKp46 on Nk cells with a bispecific antibody leads to an enhanced lysis of leukaemic blasts. *Bone Marrow Transplant* 39:11-11.
  80. Pfeiffer, M., Schumm, M., Feuchtinger, T., Dietz, K., Handgretinger, R., and Lang, P. 2007. Intensity of HLA class I expression and KIR-mismatch determine NK-cell mediated lysis of leukaemic blasts from children with acute lymphatic leukaemia. *Br J Haematol* 138:97–100.
  81. Pietra, G., Romagnani, C., Moretta, L., and Mingari, M. C. 2009. HLA-E and HLA-E-bound peptides: recognition by subsets of NK and T cells. *Curr Pharm Des* 15:3336–3344.
  82. Pogge von Strandmann, E., Simhadri, V. R., Tresckow, B. von, Sasse, S., Reiners, K. S., Hansen, H. P., Rothe, A., Boll, B., Simhadri, V. L., Borchmann, P., McKinnon, P. J., Hallek, M., and Engert, A. 2007. Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity* 27:965–974.

83. Raulet, D. H. 2003. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 3:781–790.
84. Roda-Navarro, P., and Reyburn, H. T. 2009. The traffic of the NKG2D/Dap10 receptor complex during natural killer (NK) cell activation. *J Biol Chem* 284:16463–16472.
85. Rohner, A., Langenkamp, U., Siegler, U., Kalberer, C. P., and Wodnar-Filipowicz, A. 2007. Differentiation-promoting drugs up-regulate NKG2D ligand expression and enhance the susceptibility of acute myeloid leukemia cells to natural killer cell-mediated lysis. *Leuk Res* 31:1393–1402.
86. Romanski, A., Bug, G., Becker, S., Kampfmann, M., Seifried, E., Hoelzer, D., Ottmann, O. G., and Tonn, T. 2005. Mechanisms of resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity in acute lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol* 33:344–352.
87. Rosen, D. B., Bettadapura, J., Alsharifi, M., Mathew, P. A., Warren, H. S., and Lanier, L. L. 2005. Cutting edge: lectin-like transcript-1 is a ligand for the inhibitory human NKR-P1A receptor. *J Immunol* 175:7796–7799.
88. Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R. S., Martelli, M. F., and Velardi, A. 1999. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 94:333–339.
89. Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., Martelli, M. F., and Velardi, A. 2002. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295:2097–2100.
90. Salih, H. R., Antropius, H., Gieseke, F., Lutz, S. Z., Kanz, L., Rammensee, H. G., and Steinle, A. 2003. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 102:1389–1396.
91. Schrappe, M., and Creutzig, U. 2008. AWMF online - Leitlinie Pädiatrische Onkologie/Hämatologie: Akute Leukämien. Akute lymphoblastische (ALL) und akute myeloische (AML) Leukämie im Kindesalter. <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/025-014.htm>.
92. Schrappe, M., Harbott, J., and Riehm, H. 2006. Akute lymphoblastische Leukämien. In: Gadner, H., Gaedicke, G., Niemeyer, C., and Ritter, J.

- Pädiatrische Hämatologie und Onkologie (656–674). Springer Medizin Verlag, Heidelberg. ISBN 978-3-540-03702-6.
93. Schwartz, A., Gaigalas, A. K., Wang, L., Marti, G. E., and Vogt, R. F. 2004. Formalization of the MESF unit of fluorescence intensity. *Cytometry B Clin Cytom* 57B: 1-6.
  94. Schwartz, A., Marti, G., Poon, R., Gratama, J. W., and Fernandez-Repollet, E. E. 1998. Standardizing flow cytometry: a classification system of fluorescence standards used for flow cytometry. *Cytometry* 33:106–114.
  95. Schwartz, S., Rieder, H., Schlager, B., Burmeister, T., Fischer, L., and Thiel, E. 2003. Expression of the human homologue of rat NG2 in adult acute lymphoblastic leukemia: close association with MLL rearrangement and a CD10(-)/CD24(-)/CD65s(+)/CD15(+) B-cell phenotype. *Leukemia* 17:1589–1595.
  96. Serke, S., Lessen, A. van, and Huhn, D. 1998. Quantitative fluorescence flow cytometry: a comparison of the three techniques for direct and indirect immunofluorescence. *Cytometry* 33:179–187.
  97. Sivori, S., Parolini, S., Falco, M., Marcenaro, E., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. 2000. 2B4 functions as a co-receptor in human natural killer cell activation. *Eur J Immunol* 30:787–793.
  98. Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M. C., and Moretta, L. 2006. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 107:1484–1490.
  99. Stern-Ginossar, N., and Mandelboim, O. 2009. An integrated view of the regulation of NKG2D ligands. *Immunology* 128:1–6.
  100. Sun, J. C., and Lanier, L. L. 2009. Natural killer cells remember: an evolutionary bridge between innate and adaptive immunity? *Eur J Immunol* 39:2059–2064.
  101. Taylor, M. A., Ward, B., Schatzle, J. D., and Bennett, M. 2002. Perforin- and Fas-dependent mechanisms of natural killer cell-mediated rejection of incompatible bone marrow cell grafts. *Eur J Immunol* 32:793–799.
  102. Topham, N. J., and Hewitt, E. W. 2009. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology* 128:7–15.

103. Triplett, B. M., Horwitz, E. M., Iyengar, R., Turner, V., Holladay, M. S., Gan, K., Behm, F. G., and Leung, W. 2009. Effects of activating NK cell receptor expression and NK cell reconstitution on the outcomes of unrelated donor hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancies. *Leukemia* 23:1278–1287.
104. Troeger, A., Glouchkova, L., Ackermann, B., Escherich, G., Meisel, R., Hanenberg, H., Boer, M. L. den, Pieters, R., Janka-Schaub, G. E., Goebel, U., Laws, H.-J., and Dilloo, D. 2008. High expression of CD40 on B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia blasts is an independent risk factor associated with improved survival and enhanced capacity to up-regulate the death receptor CD95. *Blood* 112:1028–1034.
105. Velardi, A., Ruggeri, L., Mancusi, A., Aversa, F., and Christiansen, F. T. 2009. Natural killer cell allorecognition of missing self in allogeneic hematopoietic transplantation: a tool for immunotherapy of leukemia. *Curr Opin Immunol* 21:525–530.
106. Verheyden, S., and Demanet, C. 2008. NK cell receptors and their ligands in leukemia. *Leukemia* 22:249–257.
107. Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L., and Moretta, A. 1998. Nkp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 187:2065–2072.
108. Wang, H., Grzywacz, B., Sukovich, D., McCullar, V., Cao, Q., Lee, A. B., Blazar, B. R., Cornfield, D. N., Miller, J. S., and Verneris, M. R. 2007. The unexpected effect of cyclosporin A on CD56+CD16- and CD56+CD16+ natural killer cell subpopulations. *Blood* 110:1530–1539.
109. Welte, S., Kuttruff, S., Waldhauer, I., and Steinle, A. 2006. Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by Nkp80-AICL interaction. *Nat Immunol* 7:1334–1342.
110. Wiemann, K., and Steinle, A. 2005. Danger-detector NKG2D: immunosurveillance of Induced Self and modulation by cytokines and soluble ligands. *Curr Med Chem Anti Inflamm Anti Allergy Agents* 4:141–152.
111. Wodnar-Filipowicz, A., and Kalberer, C. P. 2006. Function of natural killer cells in immune defence against human leukaemia. *Swiss Med Wkly* 136:359–364.

**Internet-Seiten (Autoren nicht bekannt):**

112. American Cancer Society. 2010. ACS: What are the key statistics about acute lymphocytic leukemia? [http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI\\_2\\_4\\_1X\\_What\\_Are\\_the\\_Key\\_Statistics\\_About\\_Acute\\_Lymphocytic\\_Leukemia.asp?rnav=cri](http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_4_1X_What_Are_the_Key_Statistics_About_Acute_Lymphocytic_Leukemia.asp?rnav=cri).
113. Perkin Elmer. 2010. <http://www.perkinelmer.de/?gclid=CPmDjIGt4J8CFcwWzAodHlgBG>.

# 10 Anhang

## 10.1 Abkürzungsverzeichnis

ABC	Antikörper-Bindungskapazität (Antibody Binding Capacity)
ADCC	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
AICL	Activation-Included C-type Lectin
AK	Antikörper
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
APC	AlloPhycoCyanin
ATG	AntiThymocyten-Globulin
BAE	Background Antibody Equivalent
BATDA	Bis Acetoxymethyl Terpyridine Dicarboxylic Acid
BCG	Bovis bacillus Calmette-Guerin
cALL	common ALL
CSA	CycloSporin A
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FasL	Fas-Ligand
Fc	crystalizable Fragment
FITC	Fluorescein-IsoThioCyanat
FSC	ForwardSCatter

---

GVL	Graft Versus Leukemia
GM	GeoMean-Wert (geometrischer Mittelwert)
GVHD	Graft Versus Host Disease
HLA	Human Leukocyte Antigen
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
KIR	Killer-Immunoglobulin-artiger Rezeptor
LFA	Lymphocyte Function-associated Antigen
LLT	Lectin-artiges Transcript (Lectin-Like Transcript)
MACS	MAgnetic Cell Sorting
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity)
MFK	Mittlere Fluoreszenzkraft
MHC	Major Histocompatibility Complex
MLL	Mixed Lineage Leukemia
MNF	Mittlere Normal-Fluoreszenz
MRD	Minimale Resterkrankung (Minimal Residual Disease)
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NCR	Natural Cytotoxicity Receptor
NIST	National Institute of Standards and Technology
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PBS	Phosphat Buffered Saline
PE	PhycoErythin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
pMNC	periphere Mononukleäre Zellen (peripheral MonoNuclear Cells)

PSL	Prozentuale Spezifische Lyse
PSpol	Prozentuale SpontanLyse
PVR	PolioVirus-Rezeptor
SABC	Spezifische Antikörper-Bindungskapazität (Specific Antibody Binding Capacity)
SSC	SideSCatter
SZT	StammZellTransplantation
TDA	Terpyridine Discarboxylic Acid
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
ZNS	Zentrales NervenSystem

## 10.2 Veröffentlichungen

Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

- Mura, U., Pfeiffer, M., Handgretinger, R., and Lang, P. 2006. Expression of Activating Natural Killer Cell Receptor Ligands in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 108:4478 - 4478.
- Pfeiffer, M., Mura, U., Bolzhauser, M., Jung, G., Handgretinger, R., and Lang, P. 2007. Low expression of ligands for activating Nk receptors on paediatric ALL blasts: targeting of NKp46 on Nk cells with a bispecific antibody leads to an enhanced lysis of leukaemic blasts. Bone Marrow Transplant 39:11-11.



## 10.3 Danksagungen

Bei Prof. Dr. P. Lang und Dr. M. Pfeiffer bedanke ich mich recht herzlich für die Überlassung des Themas, die vielfältigen Experimentiermöglichkeiten und die gute Betreuung. Mein Dank gilt außerdem Prof. Dr. A. Steinle, Prof. Dr. G. Jung und Prof. Dr. H. Salih für Antikörper, Zellkulturen und wertvolle Ratschläge, die entscheidend zur Arbeit beigetragen haben. Nicht vergessen werden sollen hier auch die Spender der Blasten und die gesunden Zellspender. Dem gesamten Team des KMT-Labors bin ich von Herzen dankbar für die große Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre.