

Kontrolle von Leukämien des Kindesalters durch Natürliche Killerzellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sarah Reusing
aus Gelnhausen

Düsseldorf, Februar 2020

aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Markus Uhrberg

2. Prof. Sebastian Wesselborg

Tag der mündlichen Prüfung: 21.08.2020

Für alle, die nicht aufhören zu träumen!

Positivity is a superpower

– don't settle for grey if you dream in torch red & electric blue

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	VIII
Summary	X
1. Einleitung	1
1.1 Die humane Hämatopoese	1
1.2 Das humane Immunsystem - ein Überblick.....	2
1.3 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen).....	5
1.3.1 Entwicklung, NK-Phänotyp und Reifungsstadien/Subpopulationen	5
1.3.2 Wie NK-Zellen zwischen Freund & Feind unterscheiden: „ <i>missing-self</i> “ Hypothese	6
1.4 Immunologische Kontrolle durch NK-Zellen: Effektormechanismen	8
1.4.1 Sekretorische Lyse: Die zytotoxischen Moleküle Granzym B und Perforin.....	8
1.4.2 FAS/FAS-Ligand-Mechanismus: „der Todeskuss“	10
1.4.3 Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität	10
1.5 Rezeptoren der NK-Zelle.....	11
1.5.1 Die Natürlichen Zytotoxizitäts Rezeptoren (NCR)	11
1.5.2 Rezeptoren der NKG2 Familie	11
1.5.3 Killerzell Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIR) und ihre Liganden	12
1.6 Der Haupthistokompatibilitätskomplex	14
1.6.1 HLA Klasse I: Molekülstruktur, Biosynthese und Funktion.....	16
1.6.2 Die klassischen HLA Klasse I Moleküle: HLA-A/B und -C	18
1.6.3 HLA-E: Das nicht-klassische HLA-Klasse I Molekül.....	19
1.6.4 Natürliche Killerzellen & ihre klinische Relevanz in hämatologischen Erkrankungen.....	21
1.7 Die akute lymphatische und myeloische Leukämie im Kindesalter	22
1.7.1 Pathogenese und Klassifikation	23
1.8 Immuntherapien.....	26
1.8.1 Bispezifische `killer-cell-engager`: BiKE und TriKE.....	26
1.9 Ziele der Arbeit	28
2. Material und Methoden	29
2.1 Material	29
2.1.1 Antikörper.....	29
2.1.2 Medien und Puffer.....	30
2.1.3 Zelllinien	30

2.1.4 Chemikalien	31
2.1.5 Kits	31
2.1.6 Geräte und Softwareprogramme	32
2.2 Methoden.....	32
2.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut	32
2.2.2 Einfrieren und Auftauen von mononukleären Zellen	33
2.2.3 Durchflusszytometrische Analysen.....	33
2.2.3.1 Indirekte, intra- und extrazelluläre Antikörperfärbung	33
2.2.4 Magnetische und durchflusszytometrische Zellsortierung	34
2.2.5 Funktionale Analysen der NK-Zellen.....	35
2.2.5.1 CD107a-Degranulationsassay und Zytokin-Produktion	35
2.2.5.2 NK- Zell Stimulation via CD16xCD33 BiKE und CD16xIL15xCD33 TriKE Antikörper	36
2.2.5.3 Blockierung via α HLA-E (3D12) und α HLA-ABC (W6/32)	36
2.2.5.4 CFSE-Zytotoxizitätsassay.....	36
2.2.5.5 HLA-E Stimulation	37
2.2.6 DNA und RNA Extraktion	37
2.2.7 KIR Typisierung	38
2.2.8 HLA-C und -E Typisierung	39
2.2.9 Gelelektrophorese	40
2.2.10 Reverse Transkription und Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR ABI Step one plus).....	41
2.2.11 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)	42
3. Ergebnisse	43
3.1 Patientencharakteristika	44
3.2 Durchflusszytometrische Analyse: HLA-Klasse I Expression auf Lymphozyten	44
3.3 Analyse der HLA-Klasse I Expression in pädiatrischen B-ALL Patienten	47
3.4 Expressionsanalyse von HLA-C und –E auf transkriptioneller Ebene	51
3.5 HLA-E Polymorphismus	53
3.6 HLA-E als früher prognostischer Marker in Patienten mit Rezidiv	55
3.7 HLA-E als geeignete Zielstruktur für Therapieansätze?	62
3.8 HLA-E Herunterregulation korreliert mit der Anwesenheit der klonalen genetischen Aberration	64
3.9 Suszeptibilität der kindlichen ALL gegenüber NK-Zellen	67
3.9.1 Phänotypisierung leukämischer NK-Zellen.....	67
3.10 Stimulation der antileukämischen NK-Zellantwort durch spezifische Antikörper	71
3.10.1 Antileukämische Effektor Funktion von allogenen NK-Zellen	74

3.10.2 Antileukämische Effektor Funktion von autologen NK-Zellen.....	78
4. Diskussion	81
4.1. HLA-Klasse I Oberflächenexpression auf den T-Zellen pädiatrischer B-ALL Blasten	83
4.2 Selektiv veränderte HLA-Klasse I Oberflächenexpression auf pädiatrischen B-ALL Blasten	83
4.3 HLA-E als früher prognostischer Rezidiv Marker und Zielstruktur für antikörper-basierte Immuntherapien	86
4.4 HLA-E als Marker des malignen Klons	88
4.5 Identifikation von phänotypischen Unterschieden zwischen gesunden und leukämischen NK-Zellen: Ursachen für die beobachteten Defekte in der NK-Zellfunktion	89
4.6 Verminderte Expression von CD16, Granzym B und Perforin	90
4.7 Defiziente Expression von NKp30 und NKp46 in AML und ALL Patienten	92
4.8 Antileukämische Effektorfunktion von autologen und allogenen NK-Zellen	93
4.9 Zusammenfassung und Ausblick	98
Literaturverzeichnis	100
Danksagung	114
Eidesstattliche Erklärung	116

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>)
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloide Leukämie
APC	Allophycocyanin
bp	Basenpaar
BiKE	<i>bispecific killer engager</i>
CAR	<i>Chimeric Antigen Receptor</i>
CD	Differenzierungsgruppe (<i>cluster of differentiation</i>)
CFDA-SE	<i>Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CLP	gemeinsamer lymphoider Vorläufer (<i>common lymphoid progenitor</i>)
CMP	gemeinsamer myeloider Vorläufer (<i>common myeloid progenitor</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DC	Dendritische Zellen (<i>dendritic cells</i>)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphate

DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatischen Retikulum
FBS	Fötales Bovines Serum
Fc-Fragment	<i>crystallisable fragment</i>
FcγRIII	Fc-gamma-Rezeptor III
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Koloniestimulierender Faktor (<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
HCMV	humanes Zytomegalievirus (<i>human cytomegalovirus</i>)
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
HSC	hämatopoetische Stammzellen (<i>hematopoietic stem cells</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
KIR	Killer-Immunoglobulin-ähnliche Rezeptoren
KM	Knochenmark
LAMP-1	lysosomale Membranglykoprotein-1 (<i>lysosomal associated membrane protein 1</i>)

LRC	Leukozyten-Rezeptor-Komplex (<i>leukocyte receptor complex</i>)
MACS	<i>magnetic cell separation</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität (<i>mean fluorescence intensity</i>)
MIC	<i>Major histocompatibility complex class I chain-related</i>
MNC	mononukleäre Zellen (<i>mononuclear cells</i>)
NCAM	neurales Zelladhäsionsmolekül (<i>neural cell adhesion molecule</i>)
NCR	natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren (<i>natural cytotoxicity receptor</i>)
NK	Natürliche Killerzellen
NKG2	<i>natural killer cell group antigen 2</i>
NKT	NK-ähnliche T-Zellen
PB	peripheres Blut
PBMC	mononukleäre periphere Blutzellen (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PI	Propidium Iodid
PS	Phosphatidylserin
SCF	Stammzellfaktor (<i>stem cell factor</i>)
SZT	Stammzelltransplantation
TNF	Tumornekrosefaktor

TRAIL	TNF-verwandter Apoptose-induzierender Ligand (<i>TNF-related apoptosis-inducing Ligand</i>)
TRAILR	TRAIL Rezeptor
TriKE	<i>trispesific killer engager</i>
U	Unit
ULBP	UL16-bindendes Protein
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organisation</i>)

Zusammenfassung

Die Akute Lymphoblastische Leukämie (ALL) geht als maligne Erkrankung des blutbildenden Systems aus dem Knochenmark hervor und ist durch eine ineffektive Hämatopoese der Vorläuferzellen der Lymphozyten gekennzeichnet und geht oft mit einer unkontrollierten Proliferation unreifer, weißer Blutzellen einher. Laut des deutschen Kinderkrebsregisters erkranken pro Jahr ca. 500 Kinder und Jugendliche im Alter von 0-14 Jahren an einer akuten Leukämie, welche somit die häufigste Krebserkrankung im Kindes- und Jugendalter ist. Es wird stetig an neuen Therapieansätzen gearbeitet, um die pädiatrische ALL noch besser therapieren zu können. Zahlreiche Studien belegen immer wieder die essentielle Rolle der NK-Zellen, in der Kontrolle und Bekämpfung maligner Erkrankungen des Blutsystems. Es ist allgemein bekannt, dass entartete oder virusinfizierte Zellen im Laufe der Zeit Mechanismen entwickelt haben, um der Lyse und somit der zytotoxischen Immunantwort zu entgehen. Diese so genannten *immune-escape* Mechanismen ermöglichen es den Tumorzellen dem Radar der Immunzellen zu entgehen und sich somit der Kontrolle des Immunsystems zu entziehen. Ein gängiger Mechanismus ist die Reduktion der HLA-Klasse I Moleküle. In diesem Zusammenhang spielen Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) eine essentielle Rolle, da sie über spezifische inhibitorische Rezeptoren in der Lage sind, die Expression der hochpolymorphen HLA-Klasse I Moleküle zu kontrollieren. Unklar ist, wie sich entartete Zellen trotzdem vor der Erkennung durch NK-Zellen schützen können.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit liegt daher auf der Analyse der HLA-Klasse I Expression, im speziellen der NK-Zell-spezifischen Liganden HLA-C und -E. Weitere Analysen beschäftigen sich mit der phänotypischen Charakterisierung von NK-Zellen in ALL-Patienten, sowie der Stimulation der antileukämischen Antwort, autologer und allogener NK-Zellen, via therapeutischer Antikörperkonstrukte. Die Analyse der HLA-Klasse I Expression pädiatrischer ALL Patienten zeigte keine signifikante Reduktion der Oberflächenexpression mit spezifischen Antikörpern gegen HLA-ABC, -Bw4 und Bw6. Im Gegensatz dazu wurde eine starke Verminderung der Oberflächenexpression von HLA-C und -E beobachtet, die sich jedoch nur partiell auf mRNA Niveau widerspiegelte. Weiterhin zeigten DNA-basierte Analysen, dass keine genetische Assoziation zwischen dem HLA-E Polymorphismus (HLA-E*01:03 und HLA-E*01:01) und der Entstehung einer akuten Leukämie besteht. Tieferegehende Analysen bestätigten, dass die Repression von HLA-E ein sensibler und sehr

dynamischer Prozess in der Entstehung einer ALL ist und HLA-E als prognostischer Marker für die frühzeitige Erkennung eines rezidivierenden Patienten prospektiv eingesetzt werden kann: alle Patienten, die nach KMT oder Chemotherapie rezidierten zeigten eine dynamische und graduelle Herunterregulation von HLA-E. Mittels Blockierungsexperimente der NKG2A/HLA-E Interaktion war es möglich, NK-Zellen, die exklusiv den Rezeptor NKG2A tragen, erfolgreich zu stimulieren. Die Antikörper vermittelte HLA-E Blockade auf den Blasten der ALL Patienten führte zu einer signifikant erhöhten NK-Zell Degranulation, was die Schlussfolgerung zulässt, dass der leukämische Blast die HLA-E Oberflächenexpression zwar auf ein niedriges, aber von der NK-Zelle toleriertes Level herunterreguliert und so der NK-Zell Lyse, aber auch der Lyse durch HLA-E spezifische, zytotoxische T-Zellen entgeht.

Ein weiterer Fokus der Arbeit lag auf der phänotypischen Charakterisierung der autologen NK-Zellen, um mögliche Funktionsdefizite zu erkennen und therapeutische Möglichkeiten zu etablieren, diese Funktionsdefizite aufzuheben. Funktionale NK-Zell Defekte könnten eine Erklärung für die Resistenz pädiatrischer ALL-Blasten sein. Die Analyse der Moleküle CD16, Perforin, Granzym B, NKp30 und NKp46 ergab eine signifikante Reduktion auf den NK-Zellen der ALL-Patienten, welche mit einer schlechteren Zytotoxizität korrelierten. Um diese Funktionsdefizite aufzuheben, folgte die Stimulation autologer aber auch allogener ALL NK-Zellen über zwei vollständig humanisierte Antikörperkonstrukte: CD16xCD33 (BiKE) und CD16IL15CD33 (TriKE). CD33, welches ein myeloides und tumorassoziertes Differenzierungsantigen darstellt wurde als Ziel-Molekül auf den Blasten der Leukämiepatienten verwendet. ALL-Patienten, die eine CD33 Expression aufweisen gelten als eine schwer therapierbare Risikogruppe, mit oftmals gravierendem Krankheitsverlauf. Die Analysen zeigten, dass der Einsatz der beiden therapeutischen Antikörper zu einer gesteigerten autologen aber auch allogenen NK-Zell Degranulation sowie Zytokin-Produktion führte.

In dieser Arbeit wird die Expression von HLA-E erstmals als wichtiger Marker für die frühzeitige Rezidiv-Erkennung in ALL etabliert. Darüberhinaus tragen die Ergebnisse zu einem besseren Verständnis der vielseitigen *tumor-escape* Mechanismen pädiatrischer ALL-Blasten bei. Die hier gezeigten Ergebnisse könnten schließlich auch zur Entwicklung neuer zellulärer und Antikörper-basierter Therapiemöglichkeiten beitragen.

Summary

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a disorder of the lymphoid line of blood cells, characterized by ineffective hematopoiesis and the uncontrolled proliferation of large numbers of immature lymphocytes. Numerous studies prove that the clinical application of natural killer cells (NK cells) against leukemia is an essential and promising area of investigation. HLA molecules are mandatory for the immune recognition, as impaired or altered HLA-I expression prevents the activation of cytotoxic immune mechanisms and therefore serves as a tumor driven/mediated immune evasion mechanism to escape NK- and T-cell mediated immune surveillance. Modulation or down-regulation of HLA expression has been reported as a frequent but also reversible incidence. So far only scanty information is available regarding loss or down-regulation of HLA-class I expression in hematologic malignancies and the anti-leukemic potential of NK-cells in pediatric ALL patients. Therefore in the present study, taking advantage of non-commercial (HLA-C (DT9), HLA-Bw4 (MUS4H4) and HLA-Bw6 (OUW4F11), HLA-class I specific human monoclonal antibodies (mAbs), we have compared HLA class I antigen expression levels on ALL blasts with that on autologous B-cells from healthy donors. Down-regulation did not affect overall levels of HLA-class I (HLA-ABC, W6/32). Whereas panHLA class I and HLA-Bw4/Bw6 expression remained unchanged, down-regulation was exclusively restricted to HLA-C and HLA-E. To this end, we followed expression of the non-classical HLA-E molecule on leukemic blasts through serial time-points during the disease history of pediatric ALL patients undergoing chemotherapy or HSCT. A strong and consistent down-regulation could be found in all patients at the time of diagnosis. Upon complete remission, HLA-E levels restored to normal and stable ranges, while in all cases of relapse HLA-E levels dropped significantly. Additional transcriptional analysis revealed a moderate reduction of mRNA levels, pointing to additional post-transcriptional mechanisms. Blocking the HLA-E/NKG2A interaction significantly increased CD107 degranulation, leading us to the hypothesis, that ALL blasts downregulate HLA-E surface expression to a specific, but tolerogenic low level that still enables full inhibition by NK cells.

Further analysis focused on the phenotypical characterization of patients NK-cells to better understand the diverse resistance mechanisms of leukemic cells, showing a clear down-regulation of NK-specific molecules as CD16, granzyme B, perforin, NKp30 and NKp46. This phenotype correlated with suppressed function of NK cells. The development of new cancer therapies based on NK-cell activation must consider these immune evasion mechanisms and thereby creating the basis for a successful therapy/treatment of high risk patients. In the context of limited antigen specificity and in addition to monoclonal antibodies, bispecific and trispecific antibodies hold potential in augmenting the antineoplastic effect via direct linking of target and effector cells. For instance, manipulating NK cell function specifically via CD16 signaling appears to be promising in enhancing NK cell activity and target recognition. To address these issues NK cells from either ALL/AML patients or NK cells from healthy donors were stimulated with BIKE/TriKE. Stimulation with both humanized antibodies potently restored NK cell function (cytotoxicity and cytokine production) in ALL and AML patients and stimulated NK cell mediated lysis of ALL and AML blasts derived from pediatric patients. Most importantly, the application of bi- and trispecific antibodies provides an eclectic platform to further improve endogenous and allogenic NK cell stimulation, incorporating/linking/including alternative immunotherapies for high-risk subgroups/entities with poor prognosis.

In summary, the present study suggests that down-regulation of HLA-E is a necessary happening for the establishment of pediatric B-ALL, pointing to a crucial role of NK cells and to HLA-E as a novel and highly reliable marker for monitoring of minimal residual disease in peripheral blood of ALL patients.

1. Einleitung

1.1 Die humane Hämatopoese

Im menschlichen Organismus zirkulieren je nach Größe und Gewicht zwischen vier und sechs Liter Blut, welches sich aus dem Blutplasma (wässrige Lösung aus Eiweißen, Salzen, Nährstoffen, etc.) und den zellulären Bestandteilen (rote Blutkörperchen (Erythrozyten), Blutplättchen (Thrombozyten) und weiße Blutkörperchen (Leukozyten)) zusammensetzt. Täglich werden, auf Grund der geringen Halbwertszeit der im Blut zirkulierenden Zellen, mehrere Milliarden Blutzellen neugebildet – durchschnittlich 2×10^6 pro Sekunde. Die als Hämatopoese bezeichnete Neubildung und Entwicklung von Blutzellen leitet sich aus den beiden altgriechischen Begriffen „haima“ (Blut) und „poesis“ (bilden, hervorbringen) ab und erfolgt weitestgehend im Knochenmark (Leukämien 2014),(Abbildung 1).

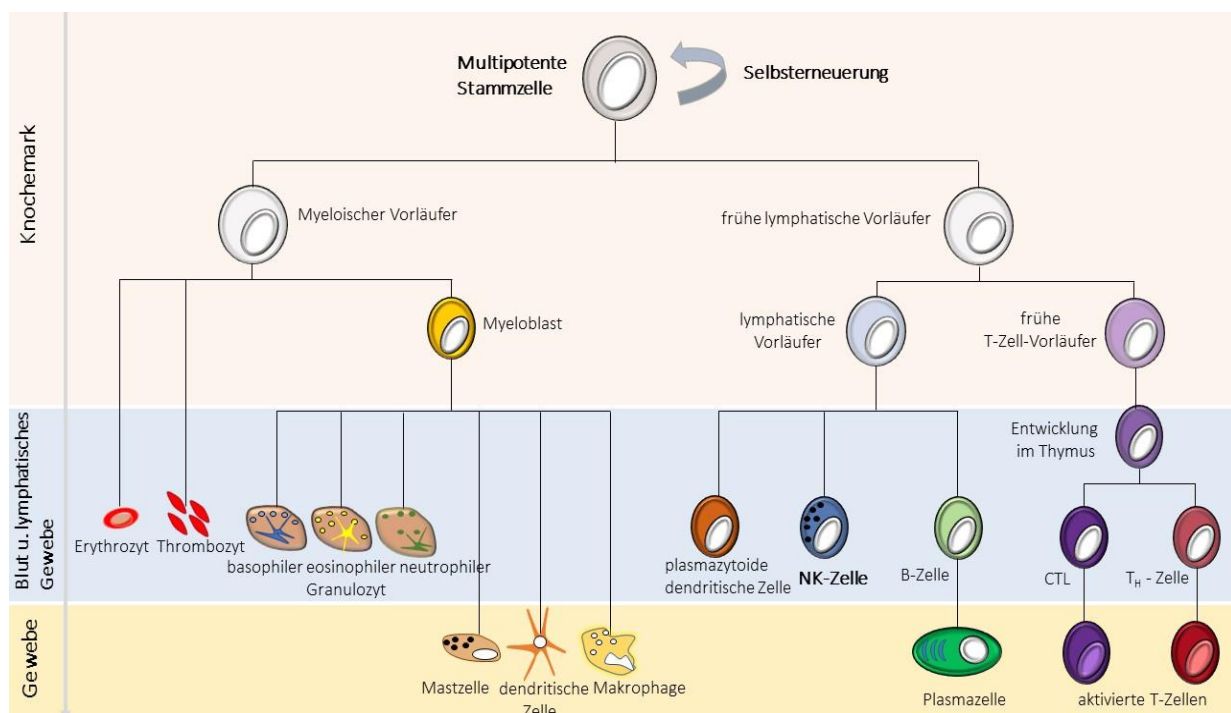


Abbildung 1: Schematische Darstellung der humanen Hämatopoese (verändert nach Rink et al., 2012).

Der Ursprung einer jeden Blutzelle ist die hämatopoetische Stammzelle (*hematopoietic stem cell*, HSC) im Knochenmark, in der sogenannten Knochenmarksnische. Dort hat die HSC zwei Möglichkeiten der Zellteilung: die symmetrische und die asymmetrische Zellteilung. Die symmetrische Zellteilung, bei der zwei identische Tochterzellen mit Stammzellcharakter entstehen, dient der Selbsterhaltung. Über diese Art der Teilung wird die Gesamtmenge der HSC konstant gehalten. Bei der asymmetrischen Zellteilung entsteht eine Tochterzelle mit

Stammzeleigenschaften, sowie eine hämatopoetische Vorläuferzelle (*hematopoietic progenitor cell*, HPC). Aus dieser kann entweder eine myeloische (*common myeloid progenitor*, CMP) oder eine lymphatische (*common lymphoid progenitor*, CLP) Vorläuferzelle entstehen (Morrison and Kimble 2006, Siminovitch, *et al* 1963). In weiteren Differenzierungsschritten und unter Anwesenheit verschiedener Zytokine/Botenstoffe und Transkriptionsfaktoren gehen aus den CLPs reife lymphoide Zellen wie B-, T-Zellen (adaptives Immunsystem) und NK-Zellen (angeborenes Immunsystem) hervor. Die CMPs hingegen bilden die an der Blutgerinnung beteiligten Thrombozyten, die sauerstofftransportierenden Erythrozyten, sowie Zellen des angeborenen Immunsystems (Granulozyten, Mastzellen, dendritische Zellen und Makrophagen). Je weiter eine Zelle entwickelt ist, desto geringer ist ihr Differenzierungspotenzial, (Akashi, *et al* 2000, Kondo, *et al* 2001), (Abbildung 1).

1.2 Das humane Immunsystem - ein Überblick

Um die Integrität des menschlichen Organismus gegen pathologisch entartete (körpereigene) Zellen, sowie Krankheitserreger und körperfremde Stoffe (Bakterien, Viren etc.) zu schützen und eine effiziente, sowie zielgerichtete Immunantwort zu generieren, hat sich das menschliche Immunsystem im Laufe der Evolution fortlaufend weiterentwickelt. Es stellt ein komplexes System aus zwei, sich überlappenden und interagierenden Abwehrsystemen dar: die angeborene und die erworbene/adaptive Immunität. Die angeborene Immunantwort, oft auch als erste Verteidigungslinie des Körpers beschrieben, bietet über physikalische (Haut) und chemische (Schleimhäute, Speichel, Magen-Darm-Trakt) Barrieren, sowie dem Komplementsystem einen ersten Schutz vor pathogenen Erregern. Durchdringt ein Pathogen die äußeren Schutzbarrieren, beginnen zelluläre Komponenten zu greifen. Neben den Phagozyten (Monozyten/Makrophagen, Granulozyten und Dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs)) sind insbesondere die **Natürlichen Killerzellen** (NK-Zellen) dazu in der Lage, ohne vorherige Stimulation, körperfremde von körpereigenen Peptiden und Strukturen zu unterscheiden und diese zielgerichtet zu lysieren. Über die Freisetzung von Zytokinen können indes weitere Effektorzellen der angeborenen, als auch erworbenen Immunantwort zum Infektionsort rekrutiert werden. Als Bindeglied zwischen der angeborenen und erworbenen Immunantwort fungieren die NK-Zellen, da sie die Funktion beider Immunsysteme vermitteln, indem sie die Zellen der erworbenen Immunantwort stimulieren und rekrutieren.

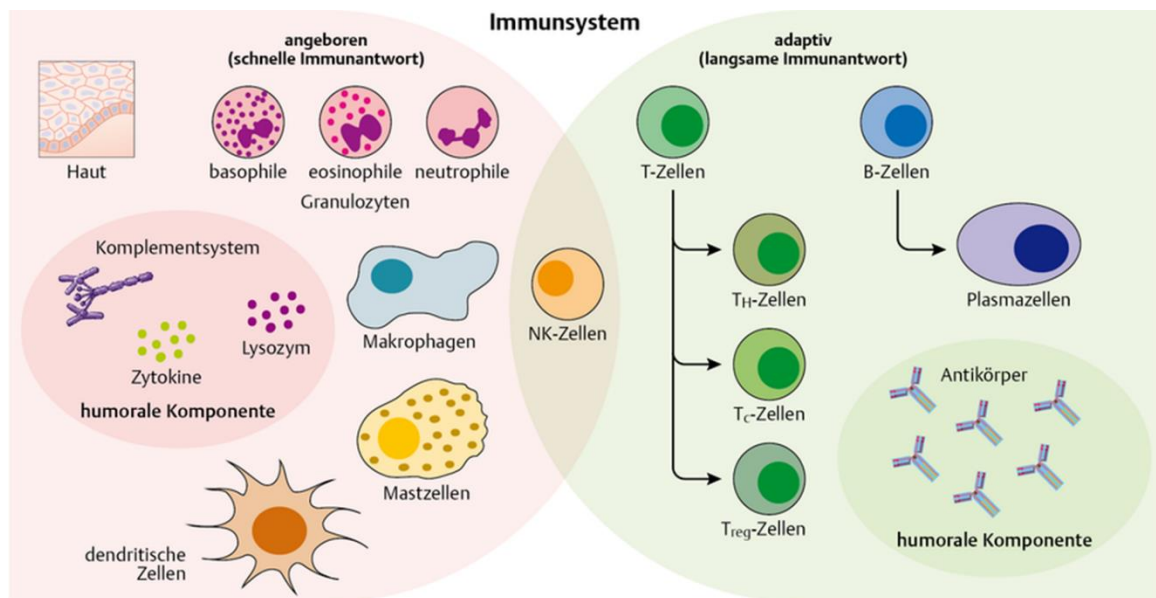


Abbildung 2: Angeborene und erworbene Immunität. Die angeborene Immunantwort reagiert innerhalb weniger Stunden auf eine Infektion sowie pathogene Erreger. Vermittelt wird diese schnelle Reaktion des Immunsystems vorwiegend über lösliche Faktoren (Komplement-Proteine), sowie zelluläre Komponenten (Granulozyten, Mastzellen, dendritische Zellen, Monozyten/Makrophagen). Nach einem Zeitraum von vier bis sieben Tagen greift die spezifisch erworbene Immunantwort, die bei erneutem Kontakt mit einem bekannten Antigen, durch ihre langlebige Gedächtnisfunktion, effizienter und schneller als die angeborene Immunantwort reagieren kann. Vermittelt wird diese durch Antikörper-produzierende B-Zellen, T-Zellen und den NK-Zellen. Letztere fungieren als Bindeglied, da sie Funktionen beider Arme des Immunsystems vermitteln (<https://viamedici.thieme.de/lernmodule/biochemie/angeborene+und+adaptive+immunantwort+%C3%BCberblick>).

Die Immunzellen der angeborenen Immunantwort sind jedoch meist nicht in der Lage, Pathogene spezifisch zu erkennen und ein immunologisches Gedächtnis auszubilden. Die Aktivierung der erworbenen (adaptiven) Immunität erfolgt erst dann, wenn eine Infektion nicht vollständig durch die angeborene Immunität kontrolliert werden kann. Die adaptive Immunantwort zeigt eine klare Spezifität für das Pathogen und beruht auf dem Prinzip der Erkennung von Fremdanthigenen über antigenspezifische Rezeptoren. Außerdem ist sie dazu in der Lage, über erhalten gebliebene spezifische Antikörper und Gedächtniszellen, ein immunologisches Gedächtnis auszubilden, welches eine effizientere und gezieltere Reaktion bei einer erneuten Infektion gewährleistet. Vermittelt wird die erworbene Immunantwort durch zelluläre Abwehrmechanismen der T- Zellen und über antikörpervermittelte, humorale Mechanismen der B-Zellen.

Die spezifische, erworbene Immunantwort erfordert die klonale Aktivierung von B- und T-Lymphozyten als Effektorzellen, sowie eine große Vielfalt antigenspezifischer Rezeptoren. Letztere entstehen durch den Prozess der somatischen Rekombination und bilden die Grundlage der erworbenen Immunantwort. T-Zellen definieren sich über die Expression des

Markers CD3 (*cluster of differentiation*, CD), der mit dem polymorphen T-Zell-Rezeptor (*T cell receptor*, TCR) assoziiert ist und die Signaltransduktion innerhalb der Zelle reguliert (Brenner, *et al* 1985, Kung, *et al* 1979, Oettgen, *et al* 1985). T-Zellen können hinsichtlich der Expression ihrer Oberflächenrezeptoren, als auch ihrer Funktion weiterhin in CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen unterteilt werden. Im Zuge der Immunantwort werden nur diejenigen T-Zellen aktiviert, deren TCR einen Komplex bestehend aus Peptid und humanem Leukozyten Antigen (*human leukocyte antigen*, HLA) spezifisch erkennt (HLA Restriktion), (Doherty and Zinkernagel 1975). CD8⁺ zytotoxische T-Zellen werden hauptsächlich durch zytoplasmatische Fremdantigene aktiviert, welche über HLA-Klasse I Moleküle präsentiert werden. Extrazelluläre, phagozytierte Antigene hingegen, werden über HLA-Klasse II Moleküle an CD4⁺ T-Helferzellen präsentiert (Janeway 1992). Nach erfolgreicher Präsentation des Fremdantigens über das jeweilige HLA-Klasse I oder II Molekül, setzen CD4⁺ T-Helferzellen verschiedene Interleukine frei, die weitere Immunzellen stimulieren, wohingegen bei den CD8⁺ zytotoxische T-Zellen ihre zytotoxische Funktion initialisiert wird. Die humorale Immunantwort wird von den B-Zellen vermittelt, deren Diversität auf löslichen und membrangebundenen Antikörpern (Immunglobuline, Ig) beruht. Aktivierte T-Helfer-Zellen sind dabei in der Lage über Zell-Zell Kontakt und Zytokin-Produktion die B-Zellen zur Proliferation und Differenzierung zu B-Plasmazellen und B-Gedächtniszellen anzuregen. Die spezialisierten Plasmazellen produzieren und sezernieren lösliche Igs, die dazu dienen, das Pathogen zu eliminieren und es für andere Zellen des Immunsystems (Phagozyten, NK-Zellen) zu markieren. Auf der anderen Seite ist die B-Zelle als antigenpräsentierende Zelle ihrerseits dazu in der Lage über HLA-Klasse II Moleküle das Fremdpeptid der T-Zelle zu präsentieren. Für eine schnellere und zielgerichtetere Immunantwort - nach sekundärem Antigenkontakt- sorgen dann in letzter Instanz die langlebigen Gedächtniszellen (Munk 2010, Murphy 2009).

1.3 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

Neben den T- und B-Zellen stellen die NK-Zellen mit einer Frequenz von 5-10% die dritte eigenständige Lymphozytenpopulation der zellulären Immunabwehr im Blut, sowie im lymphatischen Gewebe dar. Erstmals wurden NK-Zellen, auf Grund ihrer Fähigkeit bestimmte Tumorzellen *in vitro* zu eliminieren, beschrieben und klassifiziert (Ferlazzo and Munz 2004, Kiessling, *et al* 1975a, Kiessling, *et al* 1975b). NK-Zellen sind vorwiegend im peripherem Blut, Knochenmark, Lymphknoten, in der Lunge, Leber, Milz, und dem Uterus lokalisiert. In den letzten Jahren ist ein gesteigertes Interesse an der Rolle der NK-Zellen in der Bekämpfung von Virusinfektionen, Tumoren, sowie am klinischen Effekt der NK-Zellen in der hämatopoetischen Stammzelltransplantation (*hematopoietic stem cell transplantation*, HSZT) zu beobachten. NK-Zellen sind eine wichtige Komponente der frühen Immunantwort und sind maßgeblich an der Kontrolle und Bekämpfung maligner Erkrankungen des Blutsystems beteiligt. Als erste Verteidigungslinie sind NK-Zellen dazu in der Lage, durch die Sekretion von Chemokinen und Zytokinen andere Immunzellen zu rekrutieren, als auch selbst zytotoxisch aktiv zu werden.

1.3.1 Entwicklung, NK-Phänotyp und Reifungsstadien/Subpopulationen

Wie jede Zelle des blutbildenden Systems gehen auch NK-Zellen während der Hämatopoese aus einer gemeinsamen CD34⁺ hämatopoetischen Stammzelle (HSZ) und im Verlauf einer lymphoiden Vorläuferzelle hervor (Galy, *et al* 1995, Miller, *et al* 1994). Umstritten hingegen ist der Ort des Reifungsprozesses, -einst im Knochenmark beschrieben, weisen neueste Studien auf eine Entwicklung der NK-Zellen im Thymus, sowie auf eine Entstehung in den sekundären lymphatischen Organen (wie z.B. den Lymphknoten) hin (Freud, *et al* 2006). Verschiedene Differenzierungsstadien der NK-Zellen konnten unter anderem aus dem Lymphknoten, der Leber, der Plazenta und dem Thymus isoliert werden (Di Santo and Vosshenrich 2006, Freud and Caligiuri 2006, Yokoyama, *et al* 2004). Morphologisch handelt es sich bei NK-Zellen um große (~ 15µm) granuläre, zirkulierende Zellen (*large granular lymphocytes*, LGL), deren durchschnittliche Lebensdauer sieben bis zehn Tage beträgt (Pezutto, 2007).

Das bezeichnende, phänotypische Merkmal reifer NK-Zellen ist die Expression des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (*Neural Cell Adhesion Molecule*, NCAM) CD56 und/ oder CD16 bei gleichzeitiger Abwesenheit des T-Zell Rezeptormoleküls CD3 (Farag, *et al* 2002, Hercend, *et al* 1985, Lanier, *et al* 1991, Lanier, *et al* 1986, Lanier, *et al* 1989). CD16, auch als FcγRIII bezeichnet, vermittelt und induziert als niedrigaffiner IgG Rezeptor die sogenannte Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC). Die Lyse der Zielzelle wird über die Bindung von CD16 an das Fc-Fragment von IgG Antikörpern eingeleitet (Brumbaugh, *et al* 1997, Leibson 1997, Mandelboim, *et al* 1999). Innerhalb der CD56⁺ NK-Zellen, lassen sich basierend auf der Expressionsdichte des CD56 Rezeptors zwei Subpopulationen definieren, die sich in ihrem Phänotyp und ihrer Funktion differentiell entwickelt haben: CD16^{-/low}CD56^{bright} NK-Zellen (ca. 5-10% der im peripheren Blut zirkulierenden NK-Zellen) beschreiben unreifere NK-Zell Vorläufer, die vorwiegend immunregulatorische Funktionen, wie die potente Produktion von Zytokinen/Chemokinen (u.a. Interferon (IFN-γ), Tumornekrosefaktor (TNF-β), so wie die Interleukine IL-3, IL-10, IL-13) übernehmen (Cooper, *et al* 2001, Nagler, *et al* 1990). NK-Zellen mit dem reifen Phänotyp CD16⁺CD56^{dim} stellen mit ca. 90% die Mehrheit, der im Blut zirkulierenden NK-Zellen dar (Jacobs, *et al* 2001, Lanier, *et al* 1991, Nagler, *et al* 1990). Dieser zytotoxische Zelltyp vermittelt mit Hilfe, der in den intrazellulären Granula eingelagerten Moleküle Granzym B und Perforin die unmittelbare Zytotoxizität gegenüber entarteten und potentiellen *target* Zellen (Cooper, *et al* 2001, Jacobs, *et al* 2001).

1.3.2 Wie NK-Zellen zwischen Freund & Feind unterscheiden: „*missing-self*“ Hypothese

Über die Wirkweise von NK-Zellen gibt es verschiedene, sich zum Teil ergänzende Hypothesen. 1986 postulierte Klas Kärre erstmals die Hypothese, dass NK-Zellen das Vorhandensein, aber auch die Abwesenheit von körpereigenen Strukturen („selbst“) erkennen und so zwischen selbst und fremd differenzieren (sog. Selbsttoleranz). Dieser als „*missing-self*“ Hypothese beschriebene Mechanismus, bildet bis heute die Grundlage für das Verständnis der Selbsttoleranz von NK-Zellen gegenüber körpereigenen, gesunden Zellen (Hoglund, *et al* 1990, Karre, *et al* 1986, Ljunggren and Karre 1990).

Wenig später konnte Kärre aufzeigen, dass es sich bei den „Selbst“- Strukturen um Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC; im humanen System: *human leukocyte antigen*, HLA) Klasse I Moleküle handelt. Bei intakter HLA-Klasse I Expression, wird die NK-Zelle über die Bindung eines inhibitorischen Rezeptors inhibiert – die NK-Zelle bleibt zytotoxisch inaktiv. Bei Tumorzellen oder Virus-infizierten Zellen hingegen, kann es zu einem Verlust oder einer Herunterregulation der HLA-Klasse I Expression kommen, was zur Folge hat, dass die Zielzelle auf Grund der schwachen inhibitorischen Signale lysiert wird. Zeitgleich muss jedoch ein stimulatorisches Signal erfolgen, um die Aktivierung der NK-Zelle auszulösen (Lanier 2005). Die Reaktivität einer NK-Zelle wird hierbei maßgeblich durch die Balance aus verschiedenen aktivierenden und inhibierenden NK-Zell Rezeptoren reguliert (Abbildung 2), (Ljunggren and Karre 1990, Ljunggren and Malmberg 2007). Wenige Jahre später postulierten Nicholas Valiante und Markus Uhrberg die als „*at least one*“ bekannte Hypothese (Uhrberg, *et al* 1997, Valiante, *et al* 1997). Diese besagt, dass jede NK-Zelle mindestens einen, für das eigene HLA-Klasse I Molekül spezifischen Rezeptor exprimieren muss, um eine gesunde, autologe Körperzelle, mit intakter HLA-Klasse I Expression zu verschonen. Weitere zehn Jahre später brachten die Analysen von Fernandez, Anfossi als auch Cooley hervor, dass entgegen der zuvor postulierten „*at least one*“ Theorie es durchaus NK-Zellen gibt, die über keinen inhibitorischen Rezeptor für HLA Klasse I verfügen. Diese NK-Zellen werden als hyporesponsiv bezeichnet, da sie eine verringerte Zytotoxizität aufweisen (Anfossi, *et al* 2006, Cooley, *et al* 2007, Fernandez, *et al* 2005). In einem, als Lizenzierung bezeichneten Prozess, erlangt die NK-Zelle durch den Erwerb eines inhibitorischen Rezeptors für „selbst“ ihre funktionale Reife (Kim, *et al* 2005).

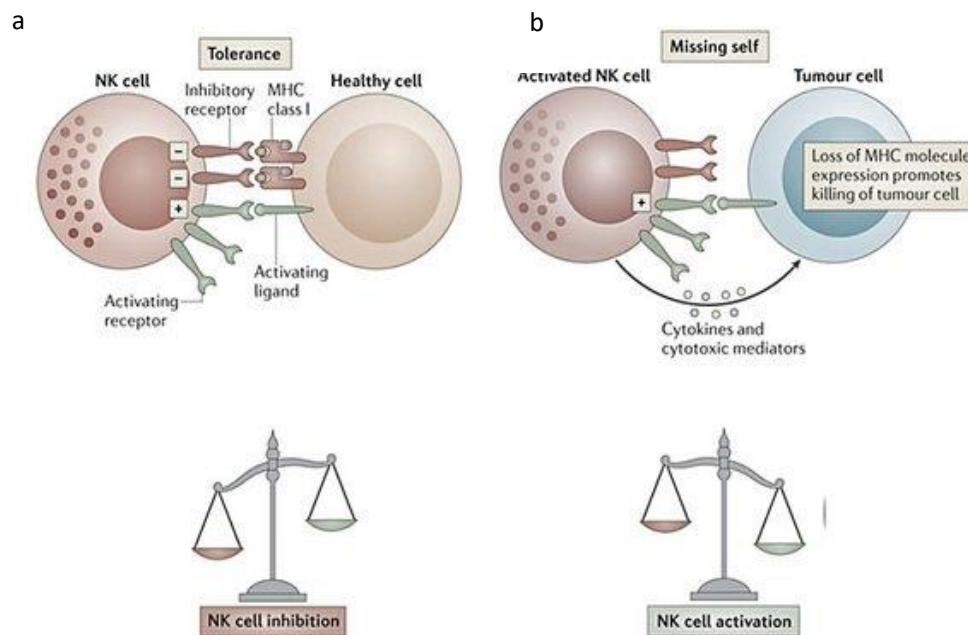


Abbildung 3: Missing-self: NK-Zell Aktivierung und Inhibition- eine Frage der Balance. NK-Zellen weisen gegenüber gesunden Zellen, bei denen eine ausgewogene Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen herrscht, eine Art Selbsttoleranz auf- es kommt nicht zur Lyse der Zelle (a). Bei Tumorzellen hingegen kann es zu einem Verlust oder einer Herunterregulation der MHC-Klasse I Expression kommen, was zur Folge hat, dass die Zielzelle auf Grund der schwachen oder fehlenden inhibitorischen Signale lysiert wird (b). Weiterhin kann es durch die Überexpression von aktivierenden Signalen, in Folge einer Infektion oder Modifikation, zur Zielzellyse kommen, modifiziert nach (Vivier, et al 2012).

1.4 Immunologische Kontrolle durch NK-Zellen: Effektormechanismen

NK-Zellen sind im Wesentlichen dazu in der Lage, über drei unterschiedliche Effektor-mechanismen, in Tumor- oder Virus- infizierten Zellen Apoptose und Nekrose auszulösen.

1.4.1 Sekretorische Lyse: Die zytotoxischen Moleküle Granzym B und Perforin

Spezialisierte sekretorische Lysosomen innerhalb der NK-Zell Granula enthalten eine Reihe von Lysosom-spezifischen Enzymen und die zytotoxischen Moleküle Granzym B und Perforin (Burkhardt, *et al* 1990, Peters, *et al* 1991). Innerhalb der Granula herrscht ein saures Milieu, welches die vorzeitige Aktivierung von Perforin (ein Ca^{2+} -abhängiges, porenformendes Protein) in den potenziell zytotoxischen Granula, bis zu der Entlassung in die immunologische Synapse inaktiviert (Diefenbach and Raulet 2001, Rink, *et al* 2012, Smyth, *et al* 2001, van den Brink and Burakoff 2002).

Die Annahme, dass Perforin an seinen Inhibitor Serglycin gebunden ist und es erst zu einer Spaltung dieser Verbindung und Aktivierung von Perforin nach der Freisetzung in die Synapse

kommt (Masson, *et al* 1990), wurde durch die Beobachtung, dass NK-Zellen von Serglycin-defizienten Mäusen funktional sind, entkräftet (Grujic, *et al* 2005). Durch die Bildung der immunologischen Synapse zwischen NK- und Zielzelle werden die Granula in Richtung der Bindungsstelle polarisiert (Bryceson, *et al* 2006). Bereits im Jahre 2002 postulierte Balaji *et al.* die Hypothese, dass Cathepsin B (ein Protein in der Granulamembran) Perforin Moleküle, die nach Degranulation in Richtung NK-Zelle wandern, durch Proteolyse inaktiviert (Balaji, *et al* 2002, Pipkin and Lieberman 2007). Ein weiteres Molekül, welches vermutlich am Schutz der NK-Zelle vor der Selbstzerstörung durch Perforin beteiligt ist, sind die sich auf der Innenmembran der Granula befindlichen CD107 Moleküle (das lysosomale Membranglykoprotein-1, LAMP-1), welche nach Aktivierung der NK-Zelle auf die Zelloberfläche gelangen. Cohnen *et al.* konnte in diesem Zusammenhang 2013 zeigen, dass die CD107 Moleküle auf der NK-Zell Oberfläche nach Degranulation die Bindung von Perforin an die NK-Zellmembran verhindern können und diese somit schützen (Alter, *et al* 2004, Cohnen, *et al* 2013). Es gibt verschiedene Theorien, die kontrovers die Rolle von Perforin im Eintrittsmechanismus von Granzym B in die Zielzelle diskutieren. Die erste Theorie besagt, dass Perforin die Zellmembran der Zielzelle permeabilisiert, wodurch Granzym B in die Zielzelle gelangen kann. Zweitere geht davon aus, dass sowohl Perforin als auch Granzym B endozytotisch von der Zielzelle aufgenommen werden und Perforin die endosomale Membran perforiert, wodurch Granzym B ins Zytosol entlassen werden kann (Cullen and Martin 2008, Voskoboinik, *et al* 2010). Als Serinprotease initiiert Granzym B den Caspase-Signalweg, der den programmierten Zelltod, die Apoptose, einleiten kann (Krzewski and Strominger 2008, Lieberman 2003). Im Menschen bekannt sind bisher die fünf Granzyme A, B, H, K und M, wobei Granzym B am effektivsten die Apoptose in den *target* Zellen zu induzieren scheint. Die fünf Granzyme unterscheiden sich in ihrer Chromosomen-Position als auch Substratspezifität, weisen jedoch ein ähnliches Strukturmuster auf (Lopez, *et al* 2013, Sutton, *et al* 2000).

1.4.2 FAS/FAS-Ligand-Mechanismus: „der Todeskuss“

Ein weiterer Mechanismus, der die Elimination der Zielzelle auslöst, wird über die zur Tumornekrose-Faktor-Superfamilie (TNF-Superfamilie) zählenden Fas-Rezeptoren (auch CD95 oder *apoptosis antigen 1*, APO-1) und seine zugehörigen Liganden FasL (*Fas death factor*, Todesfaktor) realisiert. Die Fas-Rezeptoren der Zielzelle binden an die Fas-Liganden der NK-Zelle und lösen den Caspase-Signalweg aus, welcher die Apoptose einleitet (Suda, *et al* 1995). NK-Zellen exprimieren weiterhin den Tumornekrosefaktor-verwandten-Apoptose-induzierenden Ligand (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) TRAIL. Bindet TRAIL an die Zielzelle, wird ebenfalls die Apoptose dieser eingeleitet (Pezutto 2007, Rink, *et al* 2012, Trapani and Smyth 2002, van den Brink and Burakoff 2002).

1.4.3 Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität

Der Mechanismus, bei dem antikörperbeladene Zielzellen durch Effektorzellen, wie NK-Zellen eliminiert werden, wird als antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität bezeichnet. Ca. 90% der im Blut zirkulierenden zytotoxisch aktiven NK-Zellen (CD56^{dim}-Zellen) exprimieren CD16, einen Fc-Rezeptor (FcγRIIIa) mit niedriger Affinität zu Immunglobulin-G (IgG) (Lanier, *et al* 1988). Der Fc-Teil, der an die Zielzelle gebundenen Antikörper dient als Bindungsstelle für den niedrigaffinen Fc-Rezeptor (FcγRIIIa) CD16. Bindet CD16 an den Komplex aus Antikörper und Zielzelle, kommt es ohne die Transduktion eines weiteren aktivierenden Signals zur Degranulation der zytotoxischen Granula und/oder zur Ausschüttung von Zytokinen und zur Lyse der *target* Zellen (Mandelboim, *et al* 1999, Murphy, *et al* 2009, Pezutto 2007). Dem Mechanismus der antikörperabhängigen, zellvermittelten Zytotoxizität liegen derzeit viele Therapiestudien mit monoklonalen und bispezifischen Antikörpern zu Grunde.

1.5 Rezeptoren der NK-Zelle

1.5.1 Die Natürlichen Zytotoxizitäts Rezeptoren (NCR)

Die Natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (*natural cytotoxicity receptor*, NCR) NKp30, NKp44 und NKp46 stellen die drei aktivierenden Rezeptoren der NCRs dar und gehören der Immunoglobulin Superfamilie an (Moretta, *et al* 2001). Die NCRs sind die einzig bekannten Rezeptoren, deren Expression vollständig auf NK-Zellen beschränkt ist (Cantoni, *et al* 1999). Ihnen wird eine essentielle Rolle bei der Erkennung und Eliminierung von Tumor- sowie Virusinfizierten Zellen zugeschrieben (Arnon, *et al* 2004). NKp30 und NKp46 werden bereits auf ruhenden NK-Zellen exprimiert, wohingegen NKp44 erst nach Stimulation mit Interleukinen auf der Oberfläche detektierbar ist (Pende, *et al* 1999, Sivori, *et al* 1999, Sivori, *et al* 1997). Eine Induktion der Liganden der NCRs basiert oft auf Infektionen, zellulärem Stress oder der tumorösen Transformation der Zelle. NKp44 und Nkp46 binden an verschiedene virale Hämagglutinine (Mandelboim, *et al* 2001), wohingegen für NKp30 bisher drei Liganden bekannt sind: B7-H6 (wird auf der Oberfläche verschiedener Tumorzellen exprimiert), das HLA-B assoziierte Transkript 3 (BAT3, stressinduziertes Tumorantigen), sowie pp65, ein Protein des humanen Zytomegalie Virus (*human cytomegalovirus*, HCMV), (Arnon, *et al* 2005, Brandt, *et al* 2009, Mandelboim, *et al* 2001, Pogge von Strandmann, *et al* 2007, Sivori, *et al* 1997). BAT3 stellt ein stressinduziertes Tumorantigen dar, welches die NK-Zell Zytotoxizität fördert (Brandt, *et al* 2009, Pogge von Strandmann, *et al* 2007), wohingegen das HCMV spezifische Protein pp65 die NK-Zell Zytotoxizität supprimiert (Arnon, *et al* 2005).

1.5.2 Rezeptoren der NKG2 Familie

Die NKG2 Familie gliedert sich im Wesentlichen im humanen System in den inhibitorischen NKG2A Rezeptor und die stimulatorischen NKG2C, -D und -E Rezeptoren, welche zu den MHC abhängigen Rezeptoren (den C-Typ-Lektin-Antigen Rezeptoren) gehören und auf Chromosom 12 kodiert werden (Glienke, *et al* 1998, Houchins, *et al* 1991). Exprimiert werden die Rezeptoren auf NK-Zellen und einer Subpopulation der T-Zellen. Mit Ausnahme von NKG2D bilden die NKG2 Rezeptoren mit CD94 Heterodimere, wobei NKG2E nur intrazellulär exprimiert wird (Orbelyan, *et al* 2014). NKG2D bildet als einziger Rezeptor der NKG2 Familie, durch die

Assoziation mit dem Adaptorprotein DAP10, Homodimere und übernimmt bei der Erkennung von stress-induzierten Liganden wie z.B. MICA und MICB (*MHC class I chain-related protein A/B*) und den virusinduzierten ULBPs (*UL16 binding proteins*) eine tragende Rolle (Cerwenka and Lanier 2003, Cosman, *et al* 2001, Diefenbach, *et al* 2002, Garrity, *et al* 2005, Lanier 2015, Steinle, *et al* 2001). Der mit CD94 ein Heterodimer bildende inhibitorische Rezeptor NKG2A, besitzt ebenso wie NKG2C als Liganden das nicht klassische HLA-E Molekül, welches ubiquitär exprimiert wird (Borrego, *et al* 1998, Braud, *et al* 1998, Wada, *et al* 2004). HLA-E präsentiert die Signalpeptide der klassischen HLA-Moleküle A, B und C und vermittelt so den gesamten HLA- Klasse I Status der Zelle - kann jedoch nicht spezifisch zwischen ihnen unterscheiden. Die inhibitorische Signalkaskade wird über zwei ITIM Motive (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*) im zytoplasmatischen Teil von NKG2A vermittelt (Houchins, *et al* 1991). Als Gegenspieler assoziiert NKG2C mit DAP12, dessen ITAM Motive (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) ein stimulatorisches Signal erzeugen und mit einer geringeren Affinität an HLA-E binden (Vales-Gomez, *et al* 1999).

1.5.3 Killerzell Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIR) und ihre Liganden

Das polygene System der KIR Gene wurde erstmalig in den frühen 90er Jahren beschrieben. Die KIR Gene gehören der Immunglobulin Superfamilie an und sind auf dem langen Arm von Chromosom 19 im sogenannten Leukozyten Rezeptor Komplex (*leukocyte receptor complex*, LCR) lokalisiert (Torkar, *et al* 1998). Der Komplex variiert je nach genetischer Zusammensetzung zwischen 150 und 200 Kilobasen (Kb) (Uhrberg 2005b, Uhrberg 2005c). NK-Zellen und kleine Subpopulationen von T-Zellen können KIR exprimieren (Moretta, *et al* 1996, Moretta, *et al* 2000b). Bis heute konnten 17 funktionale KIR-Gene identifiziert werden, darunter zwei nicht exprimierte Pseudogene (*KIR2DP1* und *KIR3DP1*). Jede NK-Zelle bildet ein individuelles klonales KIR-Repertoire mit einem einzigen KIR bis hin zu neun unterschiedlichen KIR aus – im Schnitt jedoch drei bis fünf KIR pro Zelle (Uhrberg, *et al* 1997, Valiante, *et al* 1997). Bekannt sind derzeit acht inhibitorische (KIR2DL1-3, KIR2DL5A/B, KIR3DL1-3) und sechs stimulatorische KIR (KIR2DS1-5, KIR3DS1). KIR2DL4 besitzt als einziger KIR sowohl inhibitorische, als auch stimulatorische Merkmale. KIR gehören zu der Gruppe der Typ I Transmembranproteine und definieren sich über die strukturellen Eigenschaften der extrazellulären Domänen, sowie über die Länge ihrer zytoplasmatischen Kette. Erstere definieren sich über zwei (KIR2D) oder drei

(KIR3D) Immunglobulin (Ig)-ähnliche Domänen. Die intrazellulären, zytoplasmatischen Anteile werden anhand ihrer Länge mit L (*long cytoplasmic tail*) oder S (*short cytoplasmic tail*) gekennzeichnet - stimulatorische KIR besitzen eine kurze, inhibitorische hingegen eine lange zytoplasmatische Kette. 1999 postulierte Long, dass in der langen zytoplasmatischen Kette der inhibitorischen KIR zwei ITIM-Sequenzen enthalten sind, die sobald der Ligand gebunden hat, phosphoryliert werden und so die inhibitorische Signalkaskade induzieren (Long 1999). Stimulatorische KIR hingegen besitzen nur eine kurze zytoplasmatische Kette, sowie eine positiv geladene Aminosäure (Arginin/Lysin), die mit dem negativ geladenen Adaptermolekül DAP12 interagiert. Dieses enthält die ITAM- Motive, die nach Bindung des KIR Liganden das stimulatorische Signal weiterleiten (Lanier, *et al* 1998, Olcese, *et al* 1997). Als membranständige Liganden der KIR Rezeptoren wurden bis heute nur die hochpolymorphen klassischen HLA-Klasse I Moleküle (HLA-A, -B und -C) definiert. HLA-C zeichnet sich durch einen Dimorphismus an Position 77 (C1: Serin, C2 Asparagin) und 80 (C1: Asparagin, C2: Lysin) aus. HLA-C1 stellt den Liganden für KIR2DL3, KIR2DS2 und KIR2DL2, wobei KIR2DL2 mit niedriger Affinität auch an HLA-C2 binden kann. KIR2DL1/S1 besitzen beide HLA-C2 als Liganden. Bei gleichem Liganden und gleicher Spezifität der strukturell homologen Rezeptorpaar KIR2DL1/S1 und KIR2DL2/3/S2 für ihren Liganden, besitzen die inhibitorischen Rezeptoren eine höhere Affinität zum Liganden, als ihr stimulatorisches *Pendant* (Stewart, *et al* 2005, Vales-Gomez, *et al* 2001). Somit überwiegt das inhibitorische Signal und verhindert die Lyse körpereigener Zellen. HLA-B, welches in zwei Epitope (HLA-Bw4 und – Bw6) unterteilt werden kann, interagiert mit KIR3DL1/S1 (Cella, *et al* 2009, Katz, *et al* 2004). Die beiden Epitope unterscheiden sich in ihren Sequenzmotiven an Position 77-83. Für HLA-Bw6 ist derzeit kein entsprechender KIR-Rezeptor bekannt (Gumperz, *et al* 1995).

1.6 Der Haupthistokompatibilitätskomplex

Den ersten Meilenstein in der Beschreibung des HLA-Systems setzte der englische Pathologe Peter A. Gorer, der 1936 entdeckte, dass körpereigene Zellen auf ihrer Oberfläche eine Art molekulare Selbstsignatur präsentieren, die sie von körperfremden Strukturen/Molekülen abgrenzen. In murinen Transplantationsstudien fand er heraus, dass ein Transplantat umso langsamer abgestoßen wurde, je enger die Tiere miteinander verwandt waren (Thorsby 2009). George Davis Snell erhielt 1980 für seine herausragenden Studien zur Gewebekompatibilität und der Identifizierung der genetischen Ordnung des HLA-Systems (1950er Jahre) den Nobelpreis für Medizin und Physiologie. In den folgenden Jahren forschte unter anderem Dausset (1954) am Phänomen des homologen menschlichen Genkomplexes. So beschrieb Dausset 1954, dass Empfänger von Fremdbluttransfusionen Antikörper gegen HLA-Antigene auf Leukozyten der Spender bildeten. Das erste menschliche Leukozyten-Antigen wurde von Dausset 1958 als Mac-2, heute HLA-A2 definiert (Dausset 1958). Die HLA-Antigene werden auf einem vier Megabasen (Mb) umfassenden Locus auf dem kurzen Arm des menschlichen Chromosom 6 (6p21.3) mit einer außerordentlich hohen Dichte exprimiert/kodiert. Da dieser Genlocus eine wichtige Rolle bei der Gewebeverträglichkeit (Abstoßung oder Akzeptanz) im Rahmen einer Transplantation spielt wird er als Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC), häufig auch als humaner Leukozyten-Antigen (HLA-Komplex) bezeichnet. Die am besten charakterisierten Gene des MHCs sind die HLA-Klasse I und II Gene. Anhand ihrer Lokalisation, sowie Struktur und den vorhandenen Funktionsunterschieden unterteilen sich die HLA-Moleküle in zwei Klassen: HLA-Klasse I und HLA-Klasse II. Im Wesentlichen spielen die HLA-Klasse I und II Moleküle eine entscheidende Rolle während der spezifischen Immunantwort, in der Transplantations-Histokompatibilität und übernehmen eine essentielle Rolle in der Suszeptibilität für unterschiedliche Autoimmunerkrankungen (Nepom 2012). Die HLA-Klasse I-Region umfasst ca. 1.800 Kb und die HLA-Klasse II-Region ca. 1.000 Kb (Wassmuth 2010), (Abbildung 4). Die in diesem Genlocus kodierten HLA-Moleküle gehören zur Immunglobulinsuperfamilie (Abbildung 4).

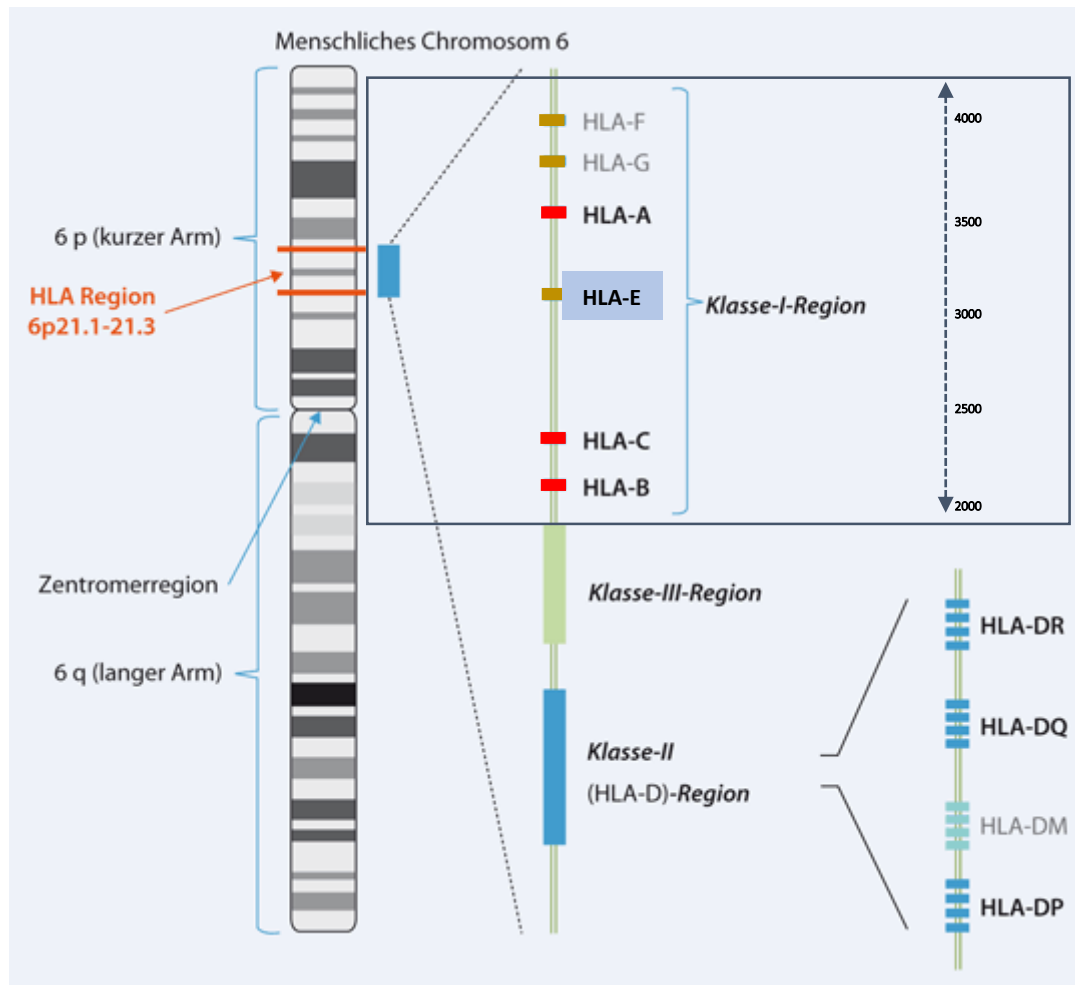


Abbildung 4: Genomische Organisation des HLA Komplexes im Bereich 6p21.1-6p21.3 des kurzen Arms von Chromosom 6. Anordnung der HLA- Klasse I, II und III Loci, sowie deren Genprodukte (abgeändert nach (T. Lapp 2013b).

Am telomeren Ende der HLA-Klasse I Region werden die Gene für die α -Ketten (schwere Kette) der klassischen HLA-Klasse I Loci A, B und C sowie die Gene der nichtklassischen (HLA-E, -F und -G) HLA-Klasse Moleküle kodiert. Das auf Chromosom 15 kodierte, monomorphe β -2-Mikroglobulin bildet die β -Kette (leichte Kette) der HLA-Klasse I Moleküle. Weiter zentromer gelegen, folgen die Gene der HLA-Klasse III. Diese kodieren unter anderem immunregulatorische Proteine wie Komplementfaktoren und Zytokine. Am zentromeren Ende befinden sich die HLA-Klasse II Gene. HLA-Moleküle werden kodominant exprimiert, was bedeutet, dass ein Mensch maximal sechs verschiedene klassische HLA-Klasse I Moleküle (jeweils 3 des mütterlichen und väterlichen Haplotyps) gleichzeitig auf der Oberfläche der Zelle exprimiert. Die Polygenie der HLA-Merkmale kann durch Homozygotie für einzelne Loci oder den ganzen Haplotyp entsprechend verringert ausfallen (Janeway 1992, Wassmuth 2010), (Abbildung 4).

1.6.1 HLA Klasse I: Molekülstruktur, Biosynthese und Funktion

Die charakteristische Struktur der HLA-Klasse I Moleküle definiert sich über spezialisierte funktionelle Domänen, welche für die immunologischen Eigenschaften des HLA-Komplexes verantwortlich sind (Suttorp 2016).

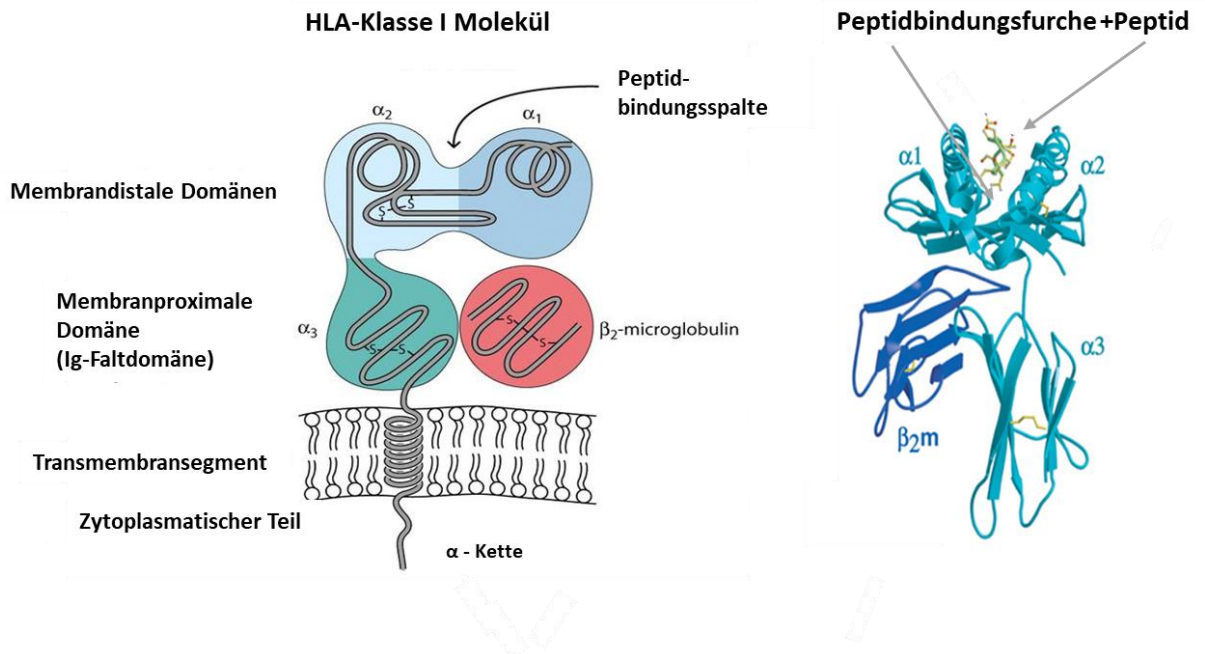


Abbildung 5: Struktur der HLA-Klasse I Moleküle. Beim HLA-Klasse I Molekül formt die α -Kette allein eine Peptidbindungsfurche. Verändert nach (Lichtman 2005).

Das HLA-Klasse I Molekül zeichnet sich durch einen heterodimeren Aufbau aus. Es besteht aus einer schweren, im MHC kodierten 45-Kilodalton (kDa) und hochpolymorphen α -Kette und einer nichtkovalent gebundenen, leichteren β -Kette, die nicht vom MHC kodiert wird und ca. 12kD groß ist – dem monomorphen β_2 -Mikroglobulin. Die schwere α -Kette untergliedert sich in 3 Subdomänen, die sich von N-terminal bis C-terminal erstrecken und als α_1 -3 definiert sind. Die α_1 - und α_2 - Domäne bildet eine β -Faltblattstruktur, die den Boden der Peptidbindungsfurche bildet- hier bindet das zu präsentierende Peptid. Auch der allelische Polymorphismus der HLA-Moleküle ist dort lokalisiert. Die in der Zellmembran verankerte und hochkonservierte α_3 - Domäne hingegen vermittelt im Zusammenspiel mit der β_2 -Domäne die Bindung und Interaktion mit den Co-Rezeptoren der T-Zellen (CD8 oder CD4). Sie ist weiterhin für die Signaltransduktion ins Zellinnere verantwortlich (Janeway 1992). Das antigene Peptid weist eine Länge von 8-11 Aminosäuren auf und entsteht durch die proteolytische Spaltung und Prozessierung von zytosolischen Peptiden endogenen Ursprungs

(zellulär, viral als auch mikrobiell) im Proteasom (Ehring, *et al* 1996). Im Proteasom werden nicht gefaltete Proteine mittels Adenosin-Triphosphat-(ATP)-abhängiger Proteolyse degradiert. Die im Proteasom degradierten Proteine werden von einem Antigenpeptid-Transporter (*transporter associated with Antigen Processing*, TAP) ins Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Dort werden sie von einer Aminopeptidase (ER Aminopeptidase *associated with antigen processing*, ERAAP) weiterverarbeitet, um die Anlagerung mit einer komplementären Sequenz an die HLA-Moleküle zu gewährleisten. Gleichzeitig formt TAP mit den Chaperonen Calnexin, und ETP57 den sogenannten „*peptide loading complex*“ (PLC), welcher mit der schweren α -Kette assoziiert. Die Chaperone Tapasin und Calreticulin lagern sich mit dem β 2-Mikroglobulin zu einem Komplex zusammen. Durch den PLC erfolgt die Stabilisierung und Faltung des aus der α -Kette und dem β 2m bestehenden MHC-I Komplexes, welche die Beladung mit Peptiden ermöglicht. Der trimolekulare Komplex, bestehend aus der schweren α -Kette, β 2-Mikroglobulin und Peptid wird im Golgi-Apparat glykosyliert und auf die Zelloberfläche transportiert. Dort kann er den entsprechenden T-Zell Rezeptor $CD8^+$ zytotoxischer T-Zellen erkennen und ihm das prozessierte Peptid präsentieren (Androlewicz and Cresswell 1994, Cresswell, *et al* 1999). Im immunologischen Kontext besteht die Hauptaufgabe der HLA-Klasse I Moleküle darin, eine Toleranz des Immunsystems gegenüber körpereigenen Zellen zu vermitteln, sowie die adaptive Immunantwort zu initiieren. Letzteres geschieht über die Präsentation von Fremdpeptiden an $CD8^+$ T-Zellen, die dann zu zytotoxischen T-Zellen ausreifen, um dann Effektorfunktionen (Zytotoxizität, Zytokin-Produktion *Fas/CD95* etc) auszuüben. Man schätzt, dass auf einer Zelle zwischen $0,1 \times 10^5$ - $0,2 \times 10^5$ HLA-Klasse I Moleküle exprimiert werden, die bis zu 1000 verschiedene Peptide gebunden haben und diese präsentieren. Ein Großteil der präsentierten Peptide sind Selbstpeptide. Virale Peptide stellen die häufigste Quelle an präsentierten Fremdpeptiden dar. Eine Besonderheit in diesem Abwehrsystem stellt die **MHC-Restriktion** dar. Diese besagt, dass T-Zellen Fremdantigene nur dann erkennen, wenn diese im MHC-Molekül Komplex prozessiert und präsentiert werden (Zinkernagel and Doherty 1974).

1.6.2 Die klassischen HLA Klasse I Moleküle: HLA-A/B und -C

Die auf der Zellmembran lokalisierten klassischen HLA-Klasse I Moleküle (HLA-A, -B und -C) werden mit einer unterschiedlichen Quantität auf allen kernhaltigen somatischen Zellen exprimiert. Die Expressionsstärke dieser Antigene ist stark vom Zelltyp abhängig. Unter den Lymphozyten exprimieren die antigenpräsentierenden B-Lymphozyten höhere Level an HLA-A, -B und -C Antigene als T-Lymphozyten. Weiterhin exprimieren unreife T-Zellen geringere Mengen der klassischen Moleküle als ausgereifte T-Lymphozyten. Die Expressionsstärke variiert auch zwischen den drei verschiedenen Loci innerhalb eines gleichen Zelltyps. Durchflusszytometrische Analysen von Lymphozyten aus dem peripheren Blut gesunder Spender zeigten auf, dass die Proteinmengen von HLA-A und -B annähernd gleich sind, wohingegen HLA-C ca. 10fach geringer auf der Oberfläche exprimiert wird (Apps, *et al* 2015, Thomas, *et al* 2009). Wie das KIR System ist auch der menschliche HLA-Komplex hochgradig polymorph, sowie polygen. Dies resultiert aus einer allelischen Vielfalt von über 5200 Allelen für HLA-A, 6500 Allelen für HLA-B und mehr als 5100 Allelen HLA-C. Zum jetzigen Zeitpunkt sind über 17000 HLA-Klasse I Allele und 6700 HLA-Klasse II Allele bekannt, was die HLA-Klasse I Region zum polymorphsten Segment im humanen Genom macht. Die Zahl serologisch definierter HLA-Antigene liegt ca. bei 155 (Robinson J. 2015). Als „treibende Kraft der allelischen Diversifikation“ wird die Diversität der Pathogene angesehen, die einen starken Selektionsdruck auf die HLA-Gene ausübt. Allgemein bekannt ist, dass es diverse Assoziationen bestimmter HLA-Allele mit verschiedenen Krankheitstypen gibt- diese können entweder protektiv sein, oder einen Risikofaktor darstellen. Dennoch sind bis heute die zugrundeliegenden Pathomechanismen für viele HLA-Assoziationen nicht eindeutig geklärt, es scheint jedoch so, als würde das Vorliegen eines „Suszeptibilitäts- Allels“ zumeist zwar die Erkrankung begünstigen, jedoch nicht eine vollständige Penetranz hervorrufen. Diese wird erst im Zusammenspiel mit weiteren genetischen, sowie Umweltfaktoren hervorgerufen (Altenburg, *et al* 2012, Hanna and Etzioni 2014, T. Lapp 2013a). Bekannte/prominente Allelspezifische Assoziationen sind u.a. HLA-B8 und Myasthenia gravis, HLA-B27 und die Spondylarthropathie, HLA-Cw6 mit Psoriasis vulgaris und HLA-B51 mit der Behcet Krankheit (Chen and Tsai 2018, Jeanty, *et al* 2014, Naeim, *et al* 1978, Nepom 2012, Yamamoto, *et al* 2005).

1.6.3 HLA-E: Das nicht-klassische HLA-Klasse I Molekül

HLA-E ist ein heterodimeres Molekül, das sich aus einer α -Kette des HLA-E Moleküls (42 kDa) und der leichteren β 2-Mikroglobulin Untereinheit (12 kDa) zusammensetzt (Lo Monaco, *et al* 2008) und in allen untersuchten Geweben und Zelllinien transkribiert wird (Borrego, *et al* 1998, Ulbrecht, *et al* 1999). Im Kontrast zu den klassischen HLA-Klasse I Molekülen, weist HLA-E einen sehr geringen Polymorphismus, mit nur zwei nicht synonymen funktionalen HLA-E Allelen, HLA-E*01:01 und HLA-E*01:03 auf. Die beiden beschriebenen Allele unterschieden sich in einer einzigen Aminosäureposition. Hierbei handelt es sich um eine Substitution an Position 107: HLA-E*0101 (HLA-E^R) weist an Aminosäureposition 107 ein Arginin auf, - HLA-E*0103 (HLA-E^G) hingegen ein Glycin. Obwohl die beiden Allele in einer vergleichbaren Häufigkeit in der kaukasischen Bevölkerung vorkommen, unterscheiden sie sich in ihrer quantitativen Oberflächenexpression (Geraghty, *et al* 1992). HLA-E*0103 ist hierbei das stärker exprimierte Allel. Obwohl die Transkriptmenge und das intrazelluläre Proteinlevel hoch sind, ist die Oberflächenexpression hingegen eher schwach, teilweise um das fünf bis Zehnfache geringer als HLA-C (PE Posch 2011). Die Oberflächenexpression des HLA-E Moleküls ist von der Bindung hydrophober, nonamerer Signalsequenzen (Peptide), zumeist aus der Signalsequenz von HLA-Klasse I-Molekülen (As 3-11) abhängig. Hierbei sind die Positionen 2 (Methionin), 7 und 9 (Leucin) entscheidend (Lo Monaco et al., Braud et al., Lanier et al.). Die bekannten Rezeptoren für HLA-E sind die beiden C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CD94 /NKG2A und CD94/NKG2C), die auf NK-Zellen exprimiert werden, sowie der T-Zellrezeptor der zytolytischen T-Zellen (CD8⁺), (Abbildung 6).

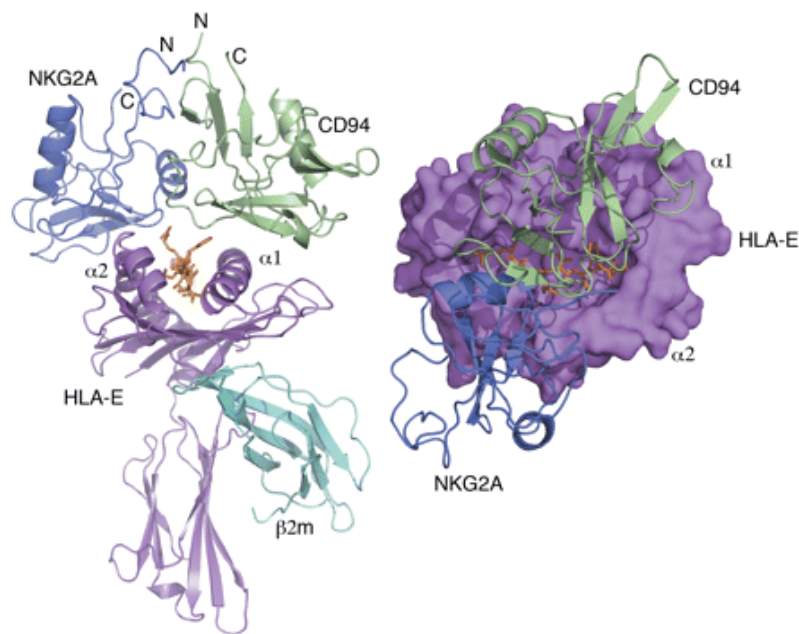


Abbildung 6: Molekülstruktur der miteinander agierenden Moleküle NKG2A (Rezeptor) und HLA-E (Ligand), (Petrie, *et al* 2008).

In verschiedenen Forschungsarbeiten konnte aufgezeigt werden, dass der HLA-E Polymorphismus mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert ist. Beispielfhaft publizierte Lajoie *et al.* 2006, dass das HLA-E^G Allel (in einer afrikanischen Kohorte) mit einem vierfach verringerten Risiko einer HIV-1 (Humanes Immundefizienz-Virus) Infektion assoziiert ist (Lajoie, *et al* 2006). Bekannt ist, dass unter anderem das humane Zytomegalievirus (HCMV), das HI-Virus (HIV), sowie das Hepatitis C Virus (HCV) für ein Peptid kodieren, welches die HLA-E Expression stabilisiert und somit durch die Interaktion mit dem inhibierenden NKG2A Rezeptor der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität entgehen. Beispielsweise kodiert HCMV für ein Peptid, welches homolog zur Signalsequenz VMAPRTLIL des klassischen MHC-Klasse I Moleküls HLA-Cw03 ist und somit infizierte Zellen vor der Lyse durch NK-Zellen schützt (Nattermann, *et al* 2005). Verschiedene Studien beschrieben weiterhin eine protektive Rolle des stärker exprimierten Allels HLA-E*0103 (HLA-E^G) im Rahmen einer allogenen, hämatopoetischen Stammzelltransplantation. Patienten mit einem homozygoten Phänotyp für HLA-E*0103 wiesen eine geringere Frequenz an *Graft-versus-host* Erkrankungen (akut und chronisch), als auch eine gesteigerte Gesamtüberlebensrate auf (Hosseini, *et al* 2012, Mossallam, *et al* 2015).

1.6.4 Natürliche Killerzellen & ihre klinische Relevanz in hämatologischen Erkrankungen

Als maligne hämatologische Erkrankung wird eine bösartige Erkrankung des blutbildenden Systems mit Ursprung in den unreifen Vorläuferzellen (im Blut, Knochenmark oder Lymphknoten) definiert. An einem hämatologischem Malignom erkranken durchschnittlich 20 von 100000 Einwohnern pro Jahr. Zu den wichtigsten Formen des Blutkrebses zählen die **akuten** (ALL und AML), als auch **chronischen** (CML und CLL) Leukämien, das Non-/Hodgkin-Lymphom (NHL/ HL), sowie das Myelodysplastische Syndrome (MDS), Myelo-proliferative Neoplasien (MPN) und das Multiple Myelom (Leukämien 2014). Zahlreiche Studien belegen immer wieder die essentielle Rolle der NK-Zellen, in der Kontrolle und Bekämpfung maligner Erkrankungen des Blutsystems. Es ist allgemein bekannt, dass entartete oder virusinfizierte Zellen im Laufe der Zeit einen Mechanismus entwickelt haben, um der Lyse und somit der zytotoxischen Immunantwort zu entgehen. Diese so genannten *immune-escape* Mechanismen ermöglichen es den Tumorzellen dem Radar der Immunzellen zu entgehen und sich somit der Kontrolle des Immunsystems zu entziehen. Tumorzellen sind unter anderem dazu in der Lage ihre HLA-Klasse I Expression zu vermindern und somit der T-Zell Kontrolle zu entgehen (Demanet, *et al* 2004b, Verheyden, *et al* 2009). Dieser Mechanismus macht die malignen Zellen jedoch für die NK-Zell abhängige Lyse anfälliger. Um auch den NK-Zellen zu entgehen, sind diverse Entitäten dazu übergegangen unter anderem die Liganden stimulatorischer Rezeptoren auf der Oberfläche zu reduzieren. Pende und Romanski publizierten den Verlust der stimulatorischen Rezeptoren MICA/B und ULBPs (Rezeptoren für den Ligand NKG2D), sowie eine Reduktion der aktivierenden NK Liganden PVR, Nectin-2, CD48 und NK-T-B. Beides verhindert die Aktivierung der NK-Zellen (Pende, *et al* 2005, Romanski, *et al* 2005, Verheyden and Demanet 2008). Eine weitere Methode, sich effektiv vor der NK-Zell Lyse zu schützen, ist die Blockierung stimulatorischer Rezeptoren. So zeigten verschiedene Forschungsgruppen, dass Tumorzellen lösliches MICA und ULBPs sezernieren, um die NKG2D Rezeptoren der NK-Zelle zu blockieren. Die künstlich herbeigeführte Blockade führt zum Ausbleiben des stimulatorischen Signals (Groh, *et al* 2002, Raffaghello, *et al* 2004, Salih, *et al* 2003).

Um die Komplexität der vielseitigen *immune-escape* Mechanismen der Tumoren zu verstehen, ist es von Nöten, einen Blick auf die autologen NK-Zellen von hämatologisch erkrankten Patienten zu werfen. Neben der Reduktion, der Überexpression von Liganden und der Blockade

von Rezeptoren weisen autologe NK-Zellen erkrankter Patienten selbst oft einen veränderten Phänotyp, sowie gravierende funktionale Defekte auf. Diverse Studien weisen auf eine verminderte Expression von NKp30 und NKp46, sowie eine Überexpression des inhibitorischen Rezeptors NKG2A hin (Costello, *et al* 2002, Fauriat, *et al* 2007, Stringaris, *et al* 2014). Diese phänotypischen Veränderungen gingen mit funktionalen Defiziten, wie einer verminderten CD107a Degranulation, Zytokin-Produktion (IFN- γ und TNF- α), sowie Zytotoxizität, einher (Costello, *et al* 2004, Fauriat, *et al* 2007, Stringaris, *et al* 2014). In MDS Patienten konnte Hejazi *et. al* drei verschiedene Gruppen von NK-Zellen definieren: Die Erste bestand aus Patienten mit einer normalen NK-Zellzahl, sowie Funktion, die Zweite aus Patienten mit normaler NK-Zellzahl, jedoch eingeschränkter Funktion (verminderte Granzym B und Perforin Expression) und die Letzte aus einer kleinen Gruppe Patienten, die sich durch das fast vollständige Fehlen von NK-Zellen kennzeichneten (Hejazi, *et al* 2015).

1.7 Die akute lymphatische und myeloische Leukämie im Kindesalter

Jährlich wird in Deutschland bei etwa 1800 Kindern eine maligne Krebserkrankung diagnostiziert- rund 600 Neuerkrankungen (31%) davon sind **Leukämien** und somit die häufigste Krebserkrankung im Kindes- und Jugendalter. Das Wort Leukämie setzt sich aus den beiden griechischen Wörtern „leukós“, weiß, und „haïma“, Blut, zusammen und wurde Mitte des 19. Jahrhunderts von dem Berliner Mediziner Rudolf Virchow und dem Schotten John Bennett beschrieben. Die Inzidenz einer Leukämie-Diagnose liegt jährlich bei 13/100.000 Kindern weltweit. Der Ursprung einer Leukämie liegt am Ort der Blutbildung- im Knochenmark und geht oft mit einer unkontrollierten Proliferation unreifer, weißer Blutzellen einher. Bei Leukämien wird die **akute** von der **chronischen** Form unterschieden, wobei Letztere im Kindesalter sehr selten ist und die Mehrheit an der akuten Form der Leukämie leidet. Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist eine maligne, klonale Transformation einer frühen lymphatischen Vorläuferzelle und mit einer Inzidenz von 80% die häufigste Form der Leukämie bei Kindern. Laut des deutschen Kinderkrebsregisters erkranken pro Jahr ca. 500 Kinder und Jugendliche im Alter von 0-14 Jahren neu an einer akuten lymphatischen Leukämie. Am häufigsten tritt sie bei Kindern unter 5 Jahren auf (5,3/10.000 Einwohner pro Jahr). Die akute myeloische Leukämie (AML) entsteht im Gegensatz zur ALL aus einer frühen myeloischen Vorläuferzelle und macht einen Großteil der akuten Leukämien im Erwachsenenalter aus. Obwohl die AML die deutlich

seltenerer Erkrankung (zweithäufigste Leukämie, 10-15%) im Kindesalter ist, stellt sie die prognostisch wesentlich schlechtere Leukämieform bei Kindern dar (Blutbildung, Leukämien 2014). Ca. 15% der ALL Patienten erleiden einen Krankheitsrückfall (Rezidiv). Über die Rolle der NK-Zellen bei der Entstehung, aber auch möglichen Bekämpfung akuter lymphatischer Leukämien, insbesondere im Kindesalter, gibt es nur wenige Publikationen. Es wird postuliert, dass die Interaktion zwischen NK-Zelle und ALL-Zelle weniger effizient ist, als die zwischen NK-Zelle und AML-Zelle, allerdings liegen nur wenige Funktionsuntersuchungen der NK-Zellen selbst, wie sie bei Diagnosestellung im peripheren Blut von pädiatrischen Leukämiepatienten vorzufinden sind, vor. Die ALL scheint sich bezüglich der Suszeptibilität gegenüber alloreaktiven NK-Zellen deutlich von anderen Leukämiearten (AML, CML und CLL) abzugrenzen. Dies zeigten Untersuchungen im Rahmen hämatopoetischer Stammzelltransplantationen (HSZT) mit KIR-Rezeptor-Liganden-Inkompatibilität. Ruggeri et al. zeigte, dass bei Patienten mit AML nach einer haploidentischen HSZT mit KIR-Liganden Inkompatibilität eine signifikant höhere Überlebensrate, eine verringerte Rezidivhäufigkeit und eine verringerte Abstoßungsrate zu verzeichnen war (Ruggeri, et al 2002, Velardi, et al 2002). Eine bereits 1999 ebenfalls von Ruggeri veröffentlichte Studie zeigte, dass der antileukämische Effekt (*graft versus leukaemia*, GVL) von alloreaktiven NK-Zellklonen ausschließlich in CML und AML Patienten zu beobachten war. In derselben Studie wurde die Lysefähigkeit von NK-Zellen *in vitro* analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die alloreaktiven NK-Zellen dazu in der Lage waren AML-, CLL- und Non-Hodgkin-Zellen effizient zu eliminieren, nicht aber ALL-Zellen (Ruggeri, et al 1999).

1.7.1 Pathogenese und Klassifikation

Über die Mechanismen, die zur Entstehung einer akuten Leukämie führen ist nach wie vor wenig bekannt. Ausgehend von einer einzelnen transformierten Zelle, kommt es zu einer unkontrollierten Vermehrung funktionsuntüchtiger Zellen- dem sogenannten malignen Klon. Diese Zellen tragen alle dieselben Merkmale und verdrängen im Ort der Blutneubildung die gesunden Zellen, was eine erhöhte Infektionsgefahr, ein erhöhtes Blutungsrisiko und eine Blutanämie mit sich führen kann. Die transformierten Zellen (leukämische Blasten) können nun aus dem Knochenmark in den normalen Blutkreislauf gelangen und so andere Organe „befallen“. In den meisten Fällen ist die tatsächliche Ursache der akuten Leukämien weitgehend unbekannt. Einzig allein bestimmte vererbte und erworbene Immundefekte oder

Chromosomen Anomalien (genetische Aberrationen) sind mit einem deutlich erhöhtem Risiko, an einer Leukämie zu erkranken, assoziiert. Auch hier müssen die diagnostizierten genetischen Genveränderungen nicht zwangsläufig zu einer Erkrankung führen- manche Kinder erkranken erst Jahre später oder gar nicht an einer akuten Leukämie. Dies deutet daraufhin, dass neben den immunologischen und genetischen Faktoren auch äußere Einflüsse in die Krankheitsentstehung mit einfließen (Virusinfektionen, radioaktive Strahlen, chemische Substanzen und Medikamente, (Buffler, *et al* 2005, Creutzig U 2006, G 2004, Pui, *et al* 2004). Bei der als sekundäre Leukämie bezeichneten AML, kommt es im früheren Stadium der Grunderkrankung (Myelodysplastisches Syndrom (MDS)) zu einer gesteigerten Apoptoserate in HSZ und gleichzeitig zu einer gesteigerten Expression der TRAIL-Rezeptoren und Fas- es kommt zur Reifungsstörung der HSC, was die periphere Zytopenie zur Folge hat. Den Übergang in eine AML bedingen eine verminderte Apoptoserate, eine unkontrollierte Proliferation (Reifungsstörung) der HSZ, sowie ein Überschuss an Blasten (Bouscary, *et al* 1997, Kerbauy and Deeg 2007, Zang, *et al* 2001). Das erste Klassifikationssystem wurde von der FAB (*French-American-British Cooperation Group*) vorgeschlagen und galt fast 20 Jahre lang als standardisiertes Diagnosesystem in der Leukämie Diagnostik. Die FAB Diagnostik beruft sich auf zytomorphologische Eigenschaften, sowie auf den Monozyten- und Blastenanteil im Blut. 1999 gelang es der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ein überarbeitetes Klassifikationssystem zu etablieren, welches weitere Faktoren, wie die Anzahl der betroffenen Zellreihen, die mikroskopischen Befunde aus Blut und Knochenmark, sowie chromosomale Aberrationen berücksichtigt (Jaffe, *et al* 1999). Die akuten Leukämien werden im Vergleich zu ähnlichen lymphoblastischen Lymphomen durch einen Knochenmarkbefall von über 25 % (ALL) und 20% (AML) charakterisiert. Die FAB Klassifikation unterteilt ALL in drei und AML in sieben morphologische Subtypen (Tabelle 1 und 2).

Tabelle 1: FAB Klassifikation der ALL

FAB Klassifikation	Morphologie
ALL L1	kleine, homogene Zellen; sehr wenig Zytoplasma; gleichförmiger Zellkern; Nukleoli unscharf oder nicht sichtbar; leichte bis mäßige Basophilie
ALL L2	Große, heterogene Zellen; relativ viel Zytoplasma; unregelmäßiger und ungleichförmiger Zellkern; ein oder mehrere große und klar erkennbare Nukleoli; mäßige bis starke Basophilie
ALL L3	Burkitt-Typ: große Zellen mit wenig Heterogenität; relativ viel Zytoplasma; gleichmäßiger, ovaler bis runder Zellkern; ein oder mehrere klar erkennbare Nukleoli; sehr starke Basophilie; klar erkennbare zytoplasmatische Vakuolen

Tabelle 2: FAB Klassifikation der AML

Subtyp	Morphologie	Häufigkeit	Zytogenetische Aberration
M0	Myeloblasten ohne Granula	< 5 %	
M1	Myeloblasten +/- Granula	15-20%	t(9;22)
M2	Myeloblasten mit Granula, einzelne Myelozyten	25-30%	t(8;21)
M3	Promyelozyten, deutlich granuliert	5-10%	t(15;17)
M4	Myeloblasten und Promyelozyten > 20%	20-30%	inv/del(16) bei M4eo
M5a	Große Monoblasten	5%	t/del(11)
M5b	Monoblasten, Promonozyten und Monozyten; Monozytose im peripheren Blu	5-10%	t(8;16)
M6	Megaloblastäre Erythropoese > 50%, Myeloblasten > 30%	5%	
M7	Megakaryoblasten	5%	

Neben den gängigen Klassifikationen gibt es für die **akute lymphatische Leukämie** noch die EGIL- (*European Group for the Immunological Characterization of Leukemias*) und die GMALL (*German Multicenter Study Group on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia*) Studiengruppen Klassifikationen. Erstere definiert durchflusszytometrisch den Immunophänotyp der ALL-Blasten, und kann so eine Zuordnung zur B- oder T-Zellreihe gewährleisten, sowie den Differenzierungsgrad der leukämischen Zellen bestimmen. Die GMALL Studiengruppe nimmt eine Unterteilung anhand der verschiedenen gängigen Systematiken und Klassifikationen vor.

1.8 Immuntherapien

In den letzten Jahren ist ein gesteigertes Interesse an der Rolle der Natürliche Killer (NK)-Zellen in der Bekämpfung von Virusinfektionen, Tumoren (zelluläre Immuntherapien), sowie am klinischen Effekt der NK-Zellen im Rahmen der hämatopoetischen Stammzelltransplantation zu beobachten. Gerade da, wo multimodale Therapieansätze der Chemotherapie und hämatopoetischen Stammzelltransplantation scheitern, werden neue immuntherapeutische Strategien benötigt, um Hochrisikopatienten besser ansprechen und therapieren zu können. In der modernen Krebsbehandlung gewinnt die Immunbiologie und -therapie, sowie das Potenzial der klassischen Immunzellen immer mehr an Bedeutung. Zu den erfolgreichsten neuen Entwicklungen im Feld der Immuntherapie gehören die CAR-T-Zelltherapie (chimäre Antigenrezeptor-T-Zellen) und bispezifische T-Zell Antikörper, wie beispielsweise Blinatumomab (CD19xCD3). Berücksichtigt man die Hochrisikopatienten mit einem refraktären Krankheitsverlauf, scheinen NK-Zell basierte Therapien eine vielversprechende Alternative zu den bisher standardisierten therapeutischen Möglichkeiten zu bieten. Diese Therapien stützen sich auf die Analyse und Charakterisierung neuer, krankheitsspezifischer Marker, die eine kritische Rolle in der Entwicklung neoplastischer Zell-Veränderungen spielen und/oder von der malignen Zellpopulation exprimiert werden.

1.8.1 Bispezifische `killer-cell-engager`: BiKE und TriKE

Erst kürzlich konnte ein vollständig humanisierter bispezifischer CD16xCD33 (*bispecific Killer Cell Engager, BiKE*) Antikörper entwickelt werden. Dieser verfügt jeweils über ein scFv Fragment (*single chain variable fragment*) gegen CD16 (FcγRIII) sowie gegen CD33, welches ein myeloides und tumorassoziertes Differenzierungsantigen darstellt (Gleason, *et al* 2014, Wiernik, *et al* 2013). Dies bedeutet, dass der BiKE Antikörper eine direkte Verbindung zwischen der malignen CD33⁺ Zielzelle und der NK-Zelle herbeiführt, sowie eine direkte Aktivierung der NK-Zelle über CD16 bewerkstelligt. Dies resultiert in einer erhöhten Zytotoxizität sowie der vermehrten Ausschüttung von NK-Zell relevanten Zytokinen. Gleason *et al.*, konnte in diesem Zuge eine verbesserte Zytotoxizität gegenüber AML-Blasten aus Erwachsenen zeigen (Gleason, *et al* 2014). In weiteren Experimenten konnte die Gruppe um Jeffrey S. Miller eine modifizierte Version des bisher existierenden BiKE-Antikörpers entwickeln. Dieser trägt Interleukin-15 - ein für die NK-Zellentwicklung sowie die Homöostase und Proliferation wichtiges Interleukin, als

intra-molekularen Linker zwischen CD16 und CD33 (Abbildung 7). Mittels TriKE (*trispesific Killer Cell engager*, CD16xIL15xCD33) konnte die NK-Zell Viabilität, sowie Proliferation verbessert, aber auch die NK-Zell vermittelte Zytotoxizität, Degranulation und Zytokin-Produktion im Vergleich zu unbehandelten und mit BiKE Antikörper behandelten gesunden Spenderzellen potent induziert werden (Gleason, *et al* 2014, Vallera, *et al* 2016). CD33 wird von annähernd 90% aller AML Blasten exprimiert, wohingegen nur eine Hochrisiko-Subgruppe der pädiatrischen ALL eine geringe Oberflächenexpression des myeloischen Markers aufweist. Aufgrund der hohen Spezifität der bispezifischen Antikörper stellen genau diese Risikogruppen die idealen *target* Zellen für neue, innovative antikörperbasierte Therapien dar. In diesem Kontext untermauern bereits publizierte Studien in adulten AML/MDS Kohorten sowohl die Notwendigkeit, als auch das Potenzial dieser vielversprechenden Immunglobulin-basierten bispezifischen Antikörper (Gleason, *et al* 2014, Vallera, *et al* 2016, Wiernik, *et al* 2013).

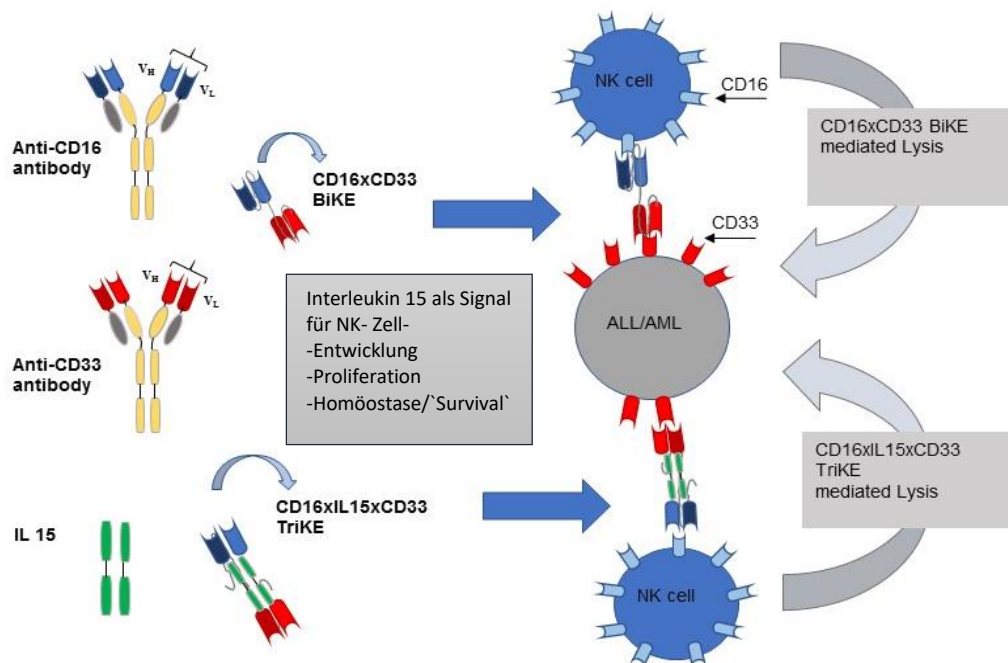


Abbildung 7: CD16xCD33 BiKE und CD16xIL15xCD33 TriKE vermittelte NK-Zell 'targeting' an das tumor-assoziierte CD33 Antigen. Die CD16 Komponente des bispezifischen Antikörpers bindet an das NK-Zell Oberflächenantigen CD16 (FcγRIII) und realisiert über die CD33 Komponente, mittels Bindung an das myeloide CD33 auf der Zielzelle, die immunologische Synapse. IL-15 agiert als Verbindungselement zwischen CD16 und CD33 und verbessert die NK-Zell Proliferation, sowie Viabilität (modifiziert nach (Miller 2013)).

1.9 Ziele der Arbeit

Die akute Leukämie stellt die häufigste Krebserkrankung im Kindes- und Jugendalter dar und wird durch die Proliferation und Akkumulation von Blasten, maligne entarteter, unreifer Zellen des blutbildenden Systems (der Hämatopoese) charakterisiert. Die ineffektive Hämatopoese der Vorläuferzellen der Lymphozyten geht oftmals mit einer unkontrollierten Proliferation unreifer, weißer Blutzellen einher. Analysen von diversen Forschungsgruppen (Demanet, *et al* 2004a, Verheyden, *et al* 2009) zeigten auf, dass ein möglicher *immune escape* Mechanismus der Blasten die Herunterregulation der klassischen HLA-Klasse I Moleküle darstellt. Die bisherigen Analysen betrafen weitestgehend erwachsene ALL Patienten, sowie einzelne HLA-A, -B und -C Allele. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Oberflächenexpression der klassischen HLA-Klasse I Moleküle, sowie des nicht-klassischen HLA-Klasse I Moleküls HLA-E auf Blasten von ausschließlich pädiatrischen B-ALL Patienten, sowie deren Auswirkung auf die Erkennung durch autologe und allogene NK-Zellen charakterisiert werden.

Im Falle von Veränderungen in der Expressionsstärke sollte geklärt werden, ob dies das Resultat einer veränderten Transkriptionsrate ist, auf möglichen posttranskriptionellen Mechanismen beruht, oder ob es durch eine veränderte genetische Verteilung der Allele (mögliche neue Suszeptibilitäts Faktoren) zustande kommt. Da die Vermutung naheliegt, dass die NK-Zellen in pädiatrischen ALL-Patienten funktional beeinträchtigt sind, es bisher jedoch wenige Studien gibt, die sich mit der phänotypischen Charakterisierung der NK-Zellen und den biologischen Mechanismen beschäftigen, sollten in einem weiteren Teil der Arbeit phänotypische und funktionale Unterschiede, sowie deren Ursache, zwischen NK-Zellen aus gesunden Spendern und pädiatrischen ALL-Patienten identifiziert werden. Dabei sollte die NK-Zellfunktion durch Analysen der zytotoxischen Moleküle Perforin und Granzym B, der natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren NKp30 und NKp46 und dem niedrigaffinen Fc-Rezeptor (FcγRIIIa) CD16 bestimmt werden. Des Weiteren sollten *in vitro* Experimente zum Degranulationspotential, zur Zytotoxizität und zur Zytokin-Produktion zeigen, ob die Stimulation der antileukämischen NK-Zellantwort durch spezifische therapeutisch einsetzbare Antikörper, die antileukämische Effektorfunktion von autologen und/oder allogenen NK-Zellen wiederherstellen kann, was einen wichtigen Fortschritt in der Therapie darstellen könnte.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Tabelle 3: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für durchflusszytometrische Messungen

Antikörper	Konjugat	Klon	Isotyp	Firma
CD3	BV510	UCHT1	IgG1	Biolegend
CD10	PE-Cy7	HI10a	IgG1	Biolegend
CD13	PE-Cy7, BV421	WM15	IgG1	Biolegend
CD14	PE	13B8.2	IgG1	Biolegend
CD16	FITC, APC-Cy7	3G8	IgG1	Biolegend
CD19	APC, BV650	HIB19	IgG1	Biolegend
CD20	BV421, PE-Cy7	2H7	IgG2b	Biolegend
CD22	APC	HIB22	IgG1	Biolegend
CD33	PE-Cy5	WM53	IgG1	Biolegend
CD45	APC-Cy7	HI30	IgG1	Biolegend
CD56	PE-Dazzle/594	HDC56	IgG1	Biolegend
CD66b	FITC, APC	G10F5	IgM	Biolegend
CD107	BV785, FITC, APC-Cy7, BV510	H4A3	IgG1	Biolegend
CD117	BV421, PE	104D2	IgG1	Biolegend
HLA-ABC	AF700, PE	W6/32	Ig2a	Biolegend
HLA-Bw4	unkonjugiert	MUS4H4	IgG1	Arend Mulder
HLA-Bw6	unkonjugiert	OUW4F11	IgG1	Arend Mulder
HLA-C	unkonjugiert	DT9	IgG1	Mary Carrington
HLA-E	unkonjugiert	3D12	IgG1	Biolegend
HLA-DR	BV605	L243	IgG2a	Biolegend
NKp30 (CD337)	PE, APC	P30-15	IgG1	Biolegend
NKp46 (CD335)	PE, BV510	29A1.4	IgG2a	Biolegend
Granzyme B	PacificBlue, FITC	GB11	IgG1	Biolegend
Perforin	PE	dG9	IgG1	Biolegend
IFN- γ	AF700, PE-Cy7	B27	IgG1	Biolegend
TNF- α	APC-Cy7	MAB11	IgG1	Biolegend
Goat anti mouse IgG	FITC		sekundär	Biolegend
Rabbit anti human IgG	FITC		sekundär	Dako
CD158a (KIR2DL1)	FITC, APC	143211	IgG1	R&D systems
CD158a,h (KIR2DL1/S1)	VioBlue	11PB6	IgG1	Miltenyi Biotec
CD158b2 (KIR2DL3)	FITC, APC	180701	IgG1	R&D systems
CD158b1,b2,j (KIR2DL2/3/S2)	PE-Cy5.5	GL183	IgG1	Beckman Coulter
CD158e1 (KIR3DL1)	BV421, PE-Cy7	DX9	IgG1	Biolegend
CD158e1, e2 (KIR3DL1/S1)	APC	Z27	IgG1	Beckman Coulter
CD159a (NKG2A)	PE, PE-Cy7, APC	Z199	IgG2b	Beckman Coulter

2.1.2 Medien und Puffer

Tabelle 4: Verwendete Medien in der Zellkultur

Medium	Zusammensetzung
Kultivierungsmedium für HL60, RAJI, SEM	RPMI1640 [25mM Hapes, L-Glutamin] 10%FCS, 1%Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml/10.000 µg/ml)
Kultivierungsmedium für K562	DMEM [Dulbeccos Modified Eagles Medium High Glucose] 10%FCS 1% Pen/Strep 1% L-Glutamin
NK-Zellmedium [IL2 Medium]	RPMI 1640 10% FCS 5% Humanes AB Serum (hitzeinaktiviert) 1% Penicillin/Streptomycin 1000U/mL rh IL-2
Einfriermedium	RPMI 1640 50% FCS 10% DMSO
MACS Puffer	500 ml DPBS 2 mM EDTA 1% Humanes Albumin
Färbepuffer für Durchflusszytometrie	DPBS 2 mM EDTA 0,5% BSA (Albumin Fraktion V)

2.1.3 Zelllinien

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zelllinienart
Nalm6	Humane ALL
MonoMac6	Humane AML
ML2	Humane AML
K562	Humane CML
721.221 WT	EBV transfizierte B-Zelllinie
HL60	Humane AML
SEM	Humane ALL

2.1.4 Chemikalien

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Zytokine

Produkt	Bezugsquelle
Agarose	Peqlab
Ammoniumchlorid-Lösung	Apotheke der Uniklinik Düsseldorf
Aqua destilliert	Braun
Biocoll separating solution (Ficoll)	Merck Millipore
Brefeldin A	
Dimethylsulphoxid (DMSO)	Sigma
DPBS	Lonza
dNTPs [10nmol/μl]	Peqlab
DNA Leiter, 100 bp (0,5 mg DNA/ml)	Peqlab
DNA Leiter, 1kb (20 ng DNA/μl)	Invitrogen
Ethanol 70%, 100%	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Fötales Bovines Serum (FBS)	Merck
Fixation Solution	Biolegend
HotstarTaq DNA-Polymerase [5U/μl]	Qiagen
Human Serum Type AB	Merck
Intracellular Staining Perm Wash	Biolegend
Interleukin 2 (Proleukin)	Novartis
Interleukin 15	Miltenyi Biotec
Ladepuffer (10x)	Thermo scientific
Lyse-Puffer (isotone Ammoniumchlorid Lösung)	Uniklinik Düsseldorf
Monensin (Protein Transport Inhibitor)	BD
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Polymerase-Puffer (10x)	Qiagen
Propidium Iodid	Biolegend
Trypsin 0,5%	Gibco
Trypan Blau	Sigma
β-Mercaptoethanol (24 μM)	Gibco

2.1.5 Kits

Tabelle 7: Verwendete Kits

Kit	Firma
CD14 und CD33 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Vybrant® CFDA SE Cell Tracer Kit	Thermo Fisher Scientific

2.1.6 Geräte und Softwareprogramme

Tabelle 8: Verwendete Geräte und Programme zur Auswertung

Gerät/Programm	Firma
Binokular Mikroskop	Zeiss
Brutschrank	Binder
Cell Dyn 3500R	Abbott Laboratories
Durchflusszytometer FACS Canto I	BD
Durchflusszytometer CyAn ADP	Beckman Coulter
Durchflusszytometer CytoFlex	Beckman Coulter
Sorter MoFlo XDP	Beckman Coulter
Thermocycler GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems
BD FACS Diva	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Endnote X7	Thomson Reuters, USA
GraphPad Prism 5	Graphpad Software, USA
Kaluza Analysis Software 2.0	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
StepOne Software v2.1	Applied Biosystems

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut

Die mononukleären Zellen wurden sowohl aus peripherem Blut von Patientenproben und Fremdspendern (zur Verfügung gestellt von der Blutspendezentrale, Düsseldorf) mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Alle Proben wurden nach dem folgenden Protokoll auf- und verarbeitet:

- 1) Blut 1:2 mit PBS verdünnen, auf 15ml Trennmedium (Bicoll Separating Solution) schichten
- 2) 20min, bei 900g ohne Bremse zentrifugieren (21°C)
- 3) Interphase (enthält mononukleäre Zellen, liegt zwischen Plasma und Ficollschicht) mittels Pasteurpipette ernten, mit PBS/EDTA bei 1900rpm bei 4° für sieben Minuten zentrifugieren
- 4) Überstand verwerfen, Pellet resuspendieren, erneut waschen und abzentrifugieren
- 5) 20µl für Zellzahlbestimmung (in einer Neubauer *improved*-Zählkammer) entnehmen, 1:1 mit Trypanblau mischen und zählen.
- 6) Berechnung der Zellzahl anhand folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{mittlere Zahl pro Quadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.2.2 Einfrieren und Auftauen von mononukleären Zellen

Die frisch isolierten mononukleären Zellen (MNCs) wurden mit einer maximalen Zellzahl von 5×10^6 Zellen in 2ml Cryogefäßen eingefroren. Dazu wurden 500µl der Zellsuspension in Einfrierröhrchen überführt und mit 500µl Einfriermedium mit 20% DMSO versetzt (Endkonzentration von 10% DMSO). Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert und nach ca. einer Woche in flüssigen Stickstoff überführt. Das toxische DMSO verhindert, dass sich im Wasser Eiskristalle bilden und schützt die Zelle somit vor Zellschäden, erfordert jedoch ein zügiges Arbeiten auf Eis. Zum Auftauen wurden Die Einfrierröhrchen in einem 37° warmen Wasserbad angetaut und dann in ein 15ml Reaktionsgefäß überführt, indem 10ml PBS/EDTA oder warmes Medium vorgelegt wurden. Es folgte die Zentrifugation (7min bei 1900rpm und 4°C) und die Resuspension des Zellpellets in einem geeigneten Medium/Puffer.

2.2.3 Durchflusszytometrische Analysen

Die charakteristischen sowie morphologischen Merkmale und Eigenschaften einer Zelle lassen sich mittels Durchflusszytometrie ermitteln. Die beiden wichtigsten Parameter – Größe & Granularität einer Zelle werden über das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*, FSC, Größe) und durch das Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*, SSC, Granularität) bestimmt. Um spezifische Fluoreszenzeigenschaften einer Zelle zu bestimmen, werden diese mit Antikörpern markiert, die mit einem Fluorophor gekoppelt sind. Dieser Antikörper richtet sich gegen ein spezifisches Oberflächenantigen der Zelle. Bei der Messung wird jede Zelle einzeln durch die Flusskapillare gesaugt und von Lasern mit verschiedenen Anregungswellenlängen angeregt. In den Zellen, an die der fluoreszierende Antikörper gebunden hat, können die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes angeregt werden und auf ein höheres Energieniveau gelangen. Die messbare Fluoreszenz (Emission von Photonen) erfolgt erst, wenn die angeregten Elektronen unter Wärmeverlust auf ihr ursprüngliches (energieärmeres) Energieniveau zurückkehren.

2.2.3.1 Indirekte, intra- und extrazelluläre Antikörperfärbung

2×10^5 Zellen wurden in 100µl Färbepuffer in einem Polypropylen-Röhrchen aufgenommen und mit dem primären Antikörper (unkonjugiert, AK) für 20min bei 4°C inkubiert und anschließend mit MACS Puffer gewaschen (1-2ml). Das Zellpellet wurde resuspendiert und mit dem

Sekundärantikörper (mit Fluorophor gekoppelt) erneut für 20min bei 4°C inkubiert und im Anschluss wie bereits beschrieben gewaschen und zentrifugiert. Im letzten Schritt folgten die Hinzugabe und Inkubation der direkt konjugierten AK für erneute 20 min bei 4°C. Nach der extrazellulären Färbung der Oberflächenproteine folgte je nach Fragestellung die intrazelluläre Färbung. Hierfür wurden die Zellen mit Fixationspuffer versetzt und für 20 min bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen mit dem *Intracellular Staining Perm Wash* Puffer (1x, mit aqua dest. verdünnt) wurden die Antikörper für die intrazellulären Proteine hinzugegeben und 30 min, bei 4°C inkubiert. Es folgten zwei letzte Waschschrte - erneut mit dem *Intracellular Staining Perm Wash* Puffer (1x) und zuletzt mit PBS (300g, 7 min, 4°C).

2.2.4 Magnetische und durchflusszytometrische Zellsortierung

Die von der Firma Miltenyi Biotec entwickelte MACS Technologie (*Magnetic Activated Cell Sorting*) ist eine Methode zur Isolation einer bestimmten Zellpopulation aus einem Zellgemisch. Die Sortierung beruht auf kleinen magnetischen Kügelchen, die an monoklonale Antikörper, spezifisch für ein Antigen, gebunden sind, so wie ferromagnetischen Trennsäulen. Je nach Säule (Separations- und Depletionssäulen) unterscheidet man zwischen der Positiv- und Negativselektion. Erstere markiert die gewünschten Zellen via Microbeads, wohingegen bei der Negativselektion/Depletion die markierten Zellen in der Säule zurückgehalten werden und die aufgereinigten, unmarkierten Zellen (von Interesse) die Säule passieren können. Das bedeutet, dass bei der Übertragung des Zellgemisches diejenigen Zellen in der Säule verbleiben, die zuvor mit *Microbeads* markiert wurden. Die unmarkierten Zellen passieren die Trennsäule und befinden sich im Durchfluss. In dieser Arbeit wurden CD33 und CD14 *Microbeads* verwendet, um CD33⁺CD14⁺ Zellen (Granulozyten, Monozyten, myeloide Progenitoren) aus dem Zellgemisch zu entfernen und ausschließlich CD33⁻ Zellen für funktionale Analysen zu verwenden. Um eine möglichst effiziente Aufreinigung des Zellgemisches zu gewährleisten, wurden für alle Analysen Depletionssäulen (LD) verwendet. Die magnetische Sortierung erfolgte angelehnt an das CD33 und CD14 Isolationskitprotokoll von Miltenyi Biotec. Die durchflusszytometrische Sortierung wurde am MoFlo XDP Zellsortierer der Firma Beckman Coulter durchgeführt.

2.2.5 Funktionale Analysen der NK-Zellen

2.2.5.1 CD107a-Degranulationsassay und Zytokin-Produktion

Um die Aktivität einer NK-Zelle zu bestimmen führt man diese mit einer HLA-Klasse I negativen Zielzelllinie zusammen und misst CD107a (LAMP-1, Lysosomen assoziiertes Membran-Protein 1), ein Protein, welches bei Aktivierung der NK-Zelle auf die Oberfläche gelangt. Normalerweise befindet sich dieses Molekül bei einer ruhenden NK-Zelle auf der Innenseite der Granula. Durch die Aktivierung verschmilzt die Granula mit der Plasmamembran, woraufhin die CD107a Moleküle auf die Zelloberfläche gelangen und dort über spezifische Antikörper markiert und durchflusszytometrisch analysiert werden können. Das folgende standardisierte Protokoll wurde für die durchgeführten Analysen verwendet:

- 1) PBMCs 14-16 Stunden über Nacht in NK Medium (IL2 haltig) kultivieren (siehe 2.1.2)
- 2) NK-Zellen (Effektorzellen) und *target* Zellen (Bsp. K562 od. HL60) ernten und beide auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml mit NK-Medium einstellen.
- 3) Effektor: *target* (E: T) Verhältnis von 10:1 wählen, bei aufgereinigten NK-Zellen eine E: T von 1:1 wählen.

Folgende Ansätze wurden pipettiert (96 Rundboden Platte):

- Ungefärbte Kontrolle: enthält nur die Effektorzellen
- Negativkontrolle: Effektorzellen ohne *target* Zellen (Detektion der zielzell-unspezifischen Degranulation der NK-Zelle)
- Positivkontrolle: Effektorzellen und *target* Zellen

Zu allen Ansätzen, exklusive der ungefärbten Kontrolle, CD107 Antikörper hinzufügen und auf 200µl mit NK-Medium auffüllen, eine Stunde bei 37°C, 5% CO₂ inkubieren und Monensin hinzufügen. Monensin blockiert den Golgi-Proteintransport und verhindert dadurch die Wiederinternalisierung der CD107 Moleküle. Für die spätere Messung der Zytokin-Produktion, wie IFN- γ und TNF- α , wurde Brefeldin A hinzugefügt. Brefeldin A inhibiert die Protein-Sekretion zwischen dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat.

Nach weiteren vier Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet und mit den extrazellulären Antikörpern gefärbt. Nach der Oberflächenfärbung folgte die intrazelluläre Färbung der Zytokine IFN- γ und TNF- α (siehe 2.2.3.1).

2.2.5.2 NK- Zell Stimulation via CD16xCD33 BiKE und CD16xIL15xCD33 TriKE Antikörper

Die NK-Zellen wurden wie unter 2.2.5.1 beschrieben in Kultur genommen und stimuliert. Es erfolgte eine 30minütige Präinkubation der NK-Zellen mit BiKE oder TriKE Antikörper. Danach wurden die NK-Zellen in einem Verhältnis von 10:1 mit den Ziel-Zellen zusammengeführt, abzentrifugiert und weitere 4 Stunden inkubiert. Es wurde weiterhin analog zu 2.2.5.1 verfahren.

2.2.5.3 Blockierung via α HLA-E (3D12) und α HLA-ABC (W6/32)

Analog zu 2.2.5.1 wurden PBMCs mit B-ALL Blasten in einem Verhältnis von 10:1 zusammengeführt und 5Std. co-inkubiert. Es erfolgte eine Präinkubation der Blasten mit 10 μ g/ml eines HLA-E (3D12) oder HLA-ABC (W6/32) spezifischem Antikörpers. Nach 5h wurde die CD107 Frequenz auf KIR^{neg}NKG2A⁺CD56^{dim} NK-Zellen gemessen und mit einem Kontrollansatz ohne blockierendem Antikörper verglichen.

2.2.5.4 CFSE-Zytotoxizitätsassay

Im Gegensatz zum CD107 Assay bestimmt man mit dem CFSE Assay nicht die Degranulationsaktivität einer stimulierten NK-Zelle, sondern die Effizienz der NK-Zelle die Zielzelle zu lysieren und abzutöten. Im ersten Schritt inkubiert man die *target* Zellen (HLA-Klasse I negativ) mit CFDA-SE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) für 15 min bei 37°C. CFDA-SE wird von der Zelle aufgenommen. In der Zelle wird die Acetat Gruppe von intrazellulären Esterasen gefaltet und zu fluoreszierendem CFSE (Carboxyfluorescein succinimidylester) prozessiert. Nach der Inkubation folgte ein Waschschriff mit PBS + 20% FBS (300g, 7 min, 21°C). Weiterhin wurde analog zum CD107 Assay verfahren. Jedoch erfolgte anstatt der extra- sowie intrazellulären Markierung der Zellen die Markierung mit Propidium Iodid (PI). PI ist ein fluoreszierender DNA-Farbstoff, der die perforierte Membran toter Zellen durchdringen kann. Folgende Ansätze werden benötigt:

- 1) Ungefärbte *target* Zellen (Überprüfung der CFSE Färbung)
- 2) CFSE markierte *target* Zellen
- 3) CFSE+PI markierte *target* Zellen (Spontane Lyse)
- 4) CFSE+PI markierte *target* Zellen und Effektorzellen (E: T *ratio* 1:1, spezifische Lyse)

Die Ansätze wurden anschließend im Durchflusszytometer analysiert und die spezifische Lyse nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{spezifische Lyse (\%)} = \text{experimentelle Lyse} - \text{spontane Lyse}$$

2.2.5.5 HLA-E Stimulation

PBMCs von gesunden Spendern und ALL Patienten wurden über Nacht (24h) oder für 48h mit IFN- γ (100 U/mL) in einer 24well Platte a 0.5×10^6 Zellen stimuliert. Als Kontrollansatz wurden die PBMCs beider Gruppen nur in Medium kultiviert. Anschließend wurde die HLA-E Oberflächenexpression zu den jeweiligen Zeitpunkten gemessen und miteinander verglichen.

2.2.6 DNA und RNA Extraktion

Die DNA-Extraktion wurde mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit von Qiagen durchgeführt. Die RNA-Extraktion erfolgte analog des RNeasy Kits von Qiagen. Über den RLT Puffer ($0,5-5 \times 10^6$ Zellen in 350 μ l RLT Puffer oder $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Zellen in 600 μ l), der zuvor mit β -Mercaptoethanol versetzt wurde (10 μ l β -Mercaptoethanol auf 1 ml Puffer), wurden die Zellen aufgeschlossen und Ribonukleasen inhibiert. Die Aufreinigung erfolgte über eine Silica-Membran-Säule (Elution in 30 μ l RNase-freiem Wasser). Anschließend wurde am Spektrophotometer (Nanodrop, Qiagen) die Konzentration der DNA oder RNA gemessen. Nach der Isolierung wurde die DNA oder RNA bei -80 °C gelagert.

2.2.7 KIR Typisierung

Die KIR Primer müssen auf Grund der hohen Homologie, die unter den KIR Genen herrscht, ein sehr spezifisches Design aufweisen. Die KIR-Typisierung wurde mittels SSP-PCR (*Polymerase chain reaction, sequence specific primer*) durchgeführt (Uhrberg, *et al* 2002).

Tabelle 9: Oligonukleotide für die KIR-Typisierung (Uhrberg et al. 2002)

KIR-GEN	Sense Primer	Antisense Primer	Länge (bp)
KIR2DL1	ACT CAC TCC CCC TAT CAG G	AGG GCC CAG AGG AAA GTC A AGG GCC CAG AGG AAA GTT	1750
KIR2DL2	CCA TGA TGG GGT CTC CAA A	GCC CTG CAG AGA ACC TAC A	1800
KIR2DL3	CCT TCA TCG CTG GTG CTG	CAG GAG ACA ACT TTG GAT CA	798
KIR2DL5	TGC CTC GAG GAG GAC AT	GGT CTG ACC ACT CAT AGG GT	1600
KIR3DL1	TAC AAA GAA GAC AGA ATC CAC ATCC CAT CTT CCA TGG CAG AT	TAG GTC CCT GCA AGG GCA A	1600
KIR3DL2	CGG TCC CTT GAT GCC TGT	GAC CAC ACG CAG GGC AG	1900
KIR2DS1	TCT CCA TCA GTC GCA TGA A/G	AGG GCC CAG AGG AAA GTT	1800
KIR2DS2	TGC ACA GAGAGG GGA AGT A	CAC GCT CTC TCC TGC CAA	1750
KIR2DS3	TCA CTC CCC CTA TCA GTT T	GCA TCT GTA GGT TCC TCC T	1800
KIR2DS4	CTG GCC CTC CCA GGT CA	GGA ATG TTC CGT TGA TGC	1950
KIR2DS5	AGA GAG GGG ACG TTT AAC C	GGA ATG TTC CGT TGA TGC	1950
KIR3DS1	GGC AGA ATA TTC CAG GAG G	AGG GGT CCT TAG AGA TCC A	1750

Es wurde der folgende PCR Ansatz, sowie das folgende PCR Programm verwendet.

Tabelle 10: PCR Ansatz wurde für eine KIR Typisierung

PCR Mix	Volumen in μ l
Aqua dest	Ad 25
10xPuffer	2,5
DNA (50-200ng/ μ l)	2
dNTPs (10 nmol/ μ l)	0,55
Primer Sense (2,5 pmol/ μ l)	2,5
Primer Antisense(2,5 pmol/ μ l)	2,5
HotStar Taq DNA Polymerase (5U/ μ l<)	0,17

Für die PCR wurde die HotstarTaq-Polymerase verwendet, die erst nach der Initiation bei 95°C aktiviert wird. Das folgende PCR-Programm wurde für die KIR-Typisierung verwendet:

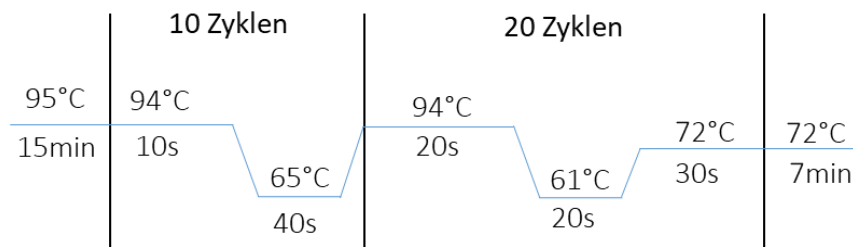


Abbildung 8: Ablauf des PCR-Programms einer KIR-Typisierung.

2.2.8 HLA-C und -E Typisierung

Die HLA-C und -E Typisierung wurde mittels PCR-SSP durchgeführt. Die HLA-A und HLA-B Typisierungen wurden durch das HLA-Labor des Instituts für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika mittels Luminex-Technologie durchgeführt.

Tabelle 11: Oligonukleotide für die Bestimmung der HLA-C und –E kodierten KIR Liganden (Frohn, et al 1998, Grimsley, et al 2002)

HLA-C/E	Sense	Antisense	Länge (bp)
C1	CGC CGC GAG TCC RAG AGG	GTT GTA GTA GCC GCG CAG G	142
C2		GTT GTA GTA GCC GCG CAG T	142
HLA-E*0103	CCG CCT CAG AGG CAT CAT TTG	TGC GAG CTG GGG CCC GAC G	149
HLA-E*0101	CCG CCT CAG AGG CAT CAT TTG	GCG AGC TGG GGC CCC GTC A	149

Tabelle 12: PCR Ansatz HLA-C-Typisierung (n=1)

PCR Mix	Volumen in µl
Aqua dest	Ad 25
10xPuffer	2,5
DNA (50-200ng/µl)	1
dNTPs (10 nmol/µl)	1
Primer Sense (10 pmol/µl)	1
Primer Antisense(10 pmol/µl) C1 oder Primer Antisense(10 pmol/µl) C2	1
HotStarTaq DNA Polymerase (5U/µl<)	0,125
Σ	25

Das folgende Programm wurde für die HLA-C Typisierung verwendet:

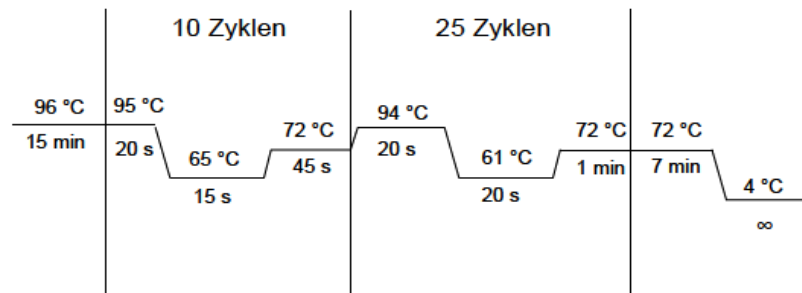


Abbildung 9: Ablauf des PCR-Programms einer HLA-C1/C2-Typisierung

Die HLA-E Typisierung wurde mittels SSP-PCR durchgeführt, das folgende Programm wurde für die Typisierung verwendet:

Tabelle 13: Ablauf des PCR-Programms zur HLA-E^{G/R} Typisierung

PCR Schritt	Dauer	Temperatur in ° C
Denaturierung	15min	95 °C
Amplifikation (32Zyklen)	20s	95 °C
	30s	63 °C
	20s	72 °C
Endpolymerisation	7 min	72 °C
Aufbewahrung	∞	4 °C

2.2.9 Gelelektrophorese

Die Auswertung der PCR-Produkte der KIR- sowie HLA-C/E-Typisierung wurde mittels Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Für beide Typisierungen wurde ein 1%iges Agarosegel gegossen, 5µl Blaumarker pro well hinzupipettiert und letztendlich 18µl davon aufgetragen. Das gegossene Gel wurde zuvor mit Ethidiumbromid versetzt. Für die HLA-C und –E Typisierung wurde jedoch auf Grund der kleinen Fragmente (ca. 140bp) ein 2%iges Gel gegossen. Die Gele liefen bei 180V ca. 50-60min. Für die HLA-C- sowie E-Typisierung wurde die 100bp Leiter, für die KIR-Typisierung (mit Produkten von 789bp-1950bp) wurde die 1kb DNA Leiter als Marker aufgetragen.

2.2.10 Reverse Transkription und Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR ABI Step one plus)

Für das Umschreiben der RNA in cDNA wurde die Reverse Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) verwendet. Je nach Größe des umzuschreibenden Template wurden entweder Oligo-dT-Nukleotide (15mere) oder Random Primers benutzt. Für die cDNA Synthese von kleineren Templates wurden Oligo dT Primer verwendet

Tabelle 14: PCR Ansatz der Reversen Transkription (cDNA-Synthese)

PCR MIX	Volumen in μl
Aqua dest	Ad 25
RNA (2 μg)	x
H ₂ O	to 14,85
Oligo dT (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2
Denaturierung bei 70°C um vorhandene Sekundärstrukturen der RNA zu lösen und eine effektive Hybridisierung der Oligo-dT-Primer zu gewährleisten. Danach wurde die Probe sofort auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die folgenden Reagenzien hinzugefügt:	
dNTPs (10 nmol/ μl)	1,5
RNasin (40U/ μl)	0,65
5xPuffer	5 μl
M-MLV-RT (200U/ μl)	0,125

Die Reverse Transkription erfolgte für 100 min bei 42°C. Ein Abstoppen der Reaktion erfolgte bei 72°C für 15min. Während einer Echtzeit PCR können die entstehenden PCR Produkte im Moment der Synthese über interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe (hier SYBR GreenTM) detektiert und quantifiziert werden. Der Anstieg der Konzentration des doppelsträngigen Amplifikationsproduktes ist proportional zum Anstieg der emittierten Fluoreszenz. Artefakte wie Primer Dimere können über eine Schmelzpunktanalyse ermittelt und ausgeschlossen werden- hierbei wird das Reaktionsgemisch in 1 °C-Schritten von 50 °C auf 95 °C erhitzt und kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Der Zeitpunkt, an dem das DNA Produkt schmilzt, ist durch einen Abfall der Fluoreszenz gekennzeichnet, da der interkalierende Farbstoff von der nun einzelsträngig vorliegenden DNA dissoziiert. Der Grenzyklus (*cycle threshold* = Ct) gibt die Zyklenzahl an, bei der die Probe die erste größere Steigung erfährt und das erste Mal deutlich zu detektieren ist. Über den Ct-Wert können zwei Proben miteinander verglichen werden und

Aussagen über die Konzentrationen der Proben getroffen werden. Je kleiner der Ct-Wert, desto höher die Konzentration des amplifizierten Produktes.

Tabelle 15: SYBR-Green Ansatz pro *well*

SYBR-Green Ansatz pro Well	Volumen in μl
SYBR Green	7
cDNA (40-50ng)	1,5
3` Primer C1 und C2	0,5
5` Primer C1	0,5
5`Primer C2	0,5
Die cDNA wird vorgelegt, für die restlichen Ansätze wird ein Mastermix erstellt	
H2O	Ad 13,5 μ l
Σ	15

2.2.11 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

Mittels FISH lassen sich Nukleinsäure-Sequenzen in einzelnen Zellen, auf Chromosomen oder im Zellkern abbilden. Durch sequenzspezifische Nukleinsäure-Sonden findet die Hybridisierung (doppelsträngig) zur komplementären Zielsequenz statt. Die Markierung findet meistens über fluoreszierende Sonden statt. Diese Analysen wurden im Institut für Humangenetik und Anthropologie unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Dagmar Wieczorek durchgeführt.

Die PBMC der ALL-Patienten wurden aufgetaut und mit Antikörpern gefärbt. Die relevanten Populationen wurden am MoFlo XDP Zellsortierer sortiert und für die FISH-Analysen vorbereitet. Es wurden die folgenden Sonden verwendet: Lokus 9p21//9q11 (CDKN2A) sowie Lokus 9q34//22q11 (*bcr-abl*). Insgesamt wurden vier ALL-Proben für diese Analysen verwendet.

3. Ergebnisse

Es ist allgemein bekannt, dass entartete oder virusinfizierte Zellen im Laufe der Zeit verschiedene Mechanismen entwickelt haben, um der Lyse und somit zytotoxischen Immunantwort der Immunzellen zu entgehen. Sie sind unter anderem dazu in der Lage die Oberflächenexpression bestimmter HLA-Klasse I Moleküle zu reduzieren (u.a. HLA-C und HLA-E) und auf der anderen Seite die Reduktion spezifisch aktivierender Antigene (MICA/MICB, ULBP's) (Diefenbach, *et al* 2001, Lanier 1997, Reusing, *et al* 2016, Verheyden, *et al* 2004) zu initiieren. Dies führt in vielen Fällen dazu, dass die Blasten nicht effektiv von den Immunzellen erkannt und lysiert werden können. Um phänotypische Unterschiede zwischen gesunden und leukämischen B-, T- und NK-Zellen zu identifizieren, erfolgte eine Analyse der Oberflächenexpression der HLA-Klasse I Moleküle, sowie von spezifischen aktivierenden NK-Rezeptoren (NKps), zytotoxischen Molekülen (Granzym B und Perforin) und dem für ADCC entscheidenden Molekül CD16. Die aufgeführten Moleküle spielen eine essentielle Rolle in der Erkennung, sowie Eliminierung von entarteten Zellen im autologen und allogenen Rahmen. Es folgten funktionale Untersuchungen der antileukämischen Effektorfunktion (Degranulation, Zytokin-Produktion) und der spezifischen Lyse von autologen und allogenen NK-Zellen ohne und mit Stimulation zweier bispezifischer Antikörper (CD16xCD33 BiKE und CD16xIL15xCD33 TriKE), beide nicht kommerziell erhältlich, freundlicherweise von Jeffrey S. Miller zur Verfügung gestellt). Aufgrund des limitierten Probenmaterials und einer begrenzten Zellzahl innerhalb der Patientenproben konnte nicht jede Analyse mit allen Patienten durchgeführt werden.

3.1 Patientencharakteristika

Insgesamt wurden 54 pädiatrische ALL (Altersdurchschnitt 7,3 Jahre), 10 pädiatrische AML Patienten (Altersdurchschnitt 14,4 Jahre) und 48 gesunde Spender in diese Arbeit eingeschlossen. Im Rahmen einer Kooperation mit der Klinik für Kinder- Onkologie, Hämatologie und Klinische Immunologie, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Arndt Borkhardt, wurden die Proben der kindlichen ALL- und AML-Patienten für diese Arbeit bereitgestellt. Die Einwilligung wurde gemäß der Deklaration von Helsinki von allen Patienten eingeholt. Die akute lymphatische Leukämie (ALL) stellt mit einem Anteil von 80% die häufigste Form der Leukämie bei Kindern dar. Laut des deutschen Kinderkrebsregisters erkranken pro Jahr ca. 500 Kinder und Jugendliche im Alter von 0-14 Jahren neu an einer akuten lymphatischen Leukämie. Die AML (akute myeloische Leukämie), ist nach der ALL die zweithäufigste Leukämie bei Kindern und Jugendlichen -beinahe ein Drittel aller Krebserkrankungen im Kindes- und Jugendalter sind akute Leukämien (Blutbildung , Leukämien 2014).

3.2 Durchflusszytometrische Analyse: HLA-Klasse I Expression auf Lymphozyten

Mittels Durchflusszytometrie und basierend auf der Expression der Marker CD19, CD45, CD3 wurde die HLA-Klasse I Oberflächenexpression der klassischen HLA Moleküle HLA-ABC, -B, -C und des nicht-klassischen HLA-Moleküls HLA-E für 29 ALL Proben sowie 32 Proben von gesunden Spendern auf B- und T-Zellen analysiert. Für die durchflusszytometrischen Analysen wurde der für HLA-ABC spezifische pan HLA-Klasse I Antikörper W6/32 verwendet. Weiterhin wurde der für HLA-Bw4/A24/A32/A25 spezifische MUS4H4, sowie für HLA-Bw6 spezifische OUW4F11 Antikörper verwendet. Bei den Antikörpern handelt es sich um nicht kommerziell erhältliche Antikörper (dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von A. Mulder, Leiden University Medical Center). Ebenso wurde der nicht kommerzielle Antikörper DT9 verwendet- dieser erkennt sämtliche HLA-C Allele (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M.Carrington, National Cancer Institute). Für das nicht klassische HLA-Molekül HLA-E wurde der kommerziell erhältliche 3D12 Antikörper verwendet. Dieser erkennt beide exprimierten HLA-E Allelvarianten (HLA-E^{G/R}). Bei den leukämischen Proben handelte es sich um Proben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des jeweiligen Patienten. Zunächst wurde über das Vorwärts- (*forward scatter*, FSC), sowie Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC), also basierend auf Größe

und Granularität, die Lymphozyten-Population von den restlichen Zellen abgegrenzt und definiert. Die B-Zellen wurden innerhalb der Lymphozyten-Population als $CD19^+CD3^-$ und $CD45^+$, die T-Zellen als $CD3^+CD56^-$ und $CD45^+$ definiert. CD45 (Pan-Leukozytenmarker) wird in der Literatur häufig als Diskriminierungsfaktor zwischen gesunden und entarten Zellen verwendet- letztere weisen in der Regel eine verminderte oder fehlende Expression von CD45 auf. Über den Quotienten aus der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI), sowie dem Vorwärtstreulicht der jeweiligen Zellpopulation, wurde die HLA Oberflächenexpression für jedes Individuum ermittelt. Diese Vorgehensweise schließt Unterschiede auf Grund der Zellgröße aus (Abbildung 10).

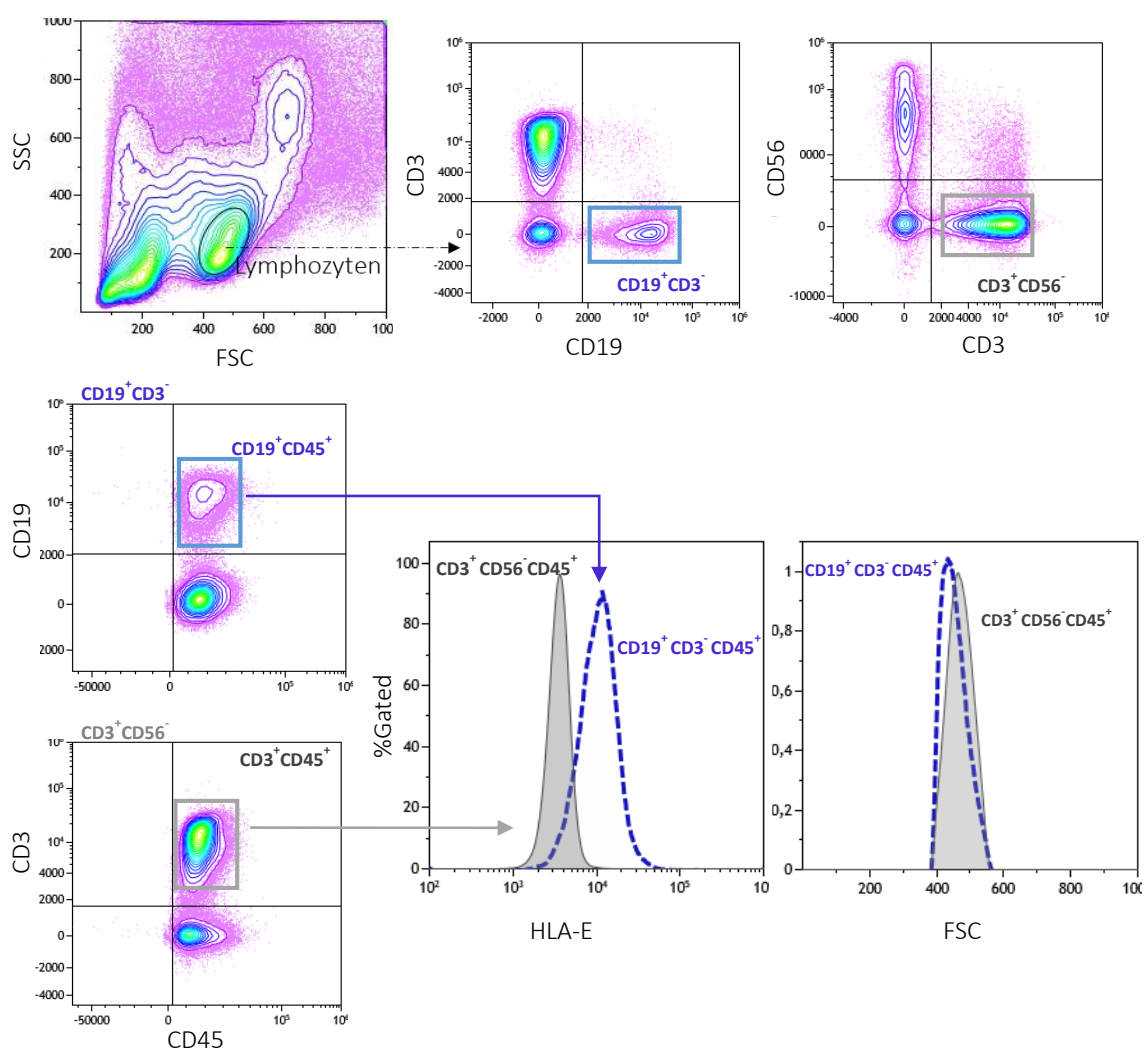


Abbildung 10: Durchflusszytometrische Analyse der HLA-Klasse I Expression auf den Lymphozyten Subpopulationen ($CD3^+$ T- und $CD19^+$ B-Zellen) eines gesunden Spenders. Aufgetaute PBMC wurden nach der Antikörperfärbung am Durchflusszytometer analysiert. Die Lymphozyten wurden anhand ihrer Größe (*Forward-Scatter*, FSC) sowie Granularität (*Side-Scatter*, SSC) bestimmt. Danach wurden innerhalb der Lymphozyten-Population die B-Zellen ($CD19^+CD3^-CD45^+$) und die T-Zellen ($CD3^+CD56^-CD45^+$) definiert und in einem Histogramm für das jeweilige HLA-Molekül sowie den FSC aufgetragen.

Die folgenden *plots* zeigen exemplarisch die HLA-Klasse I Oberflächenexpression auf den B- und T-Zellen eines gesunden Spenders (Abbildung 11).

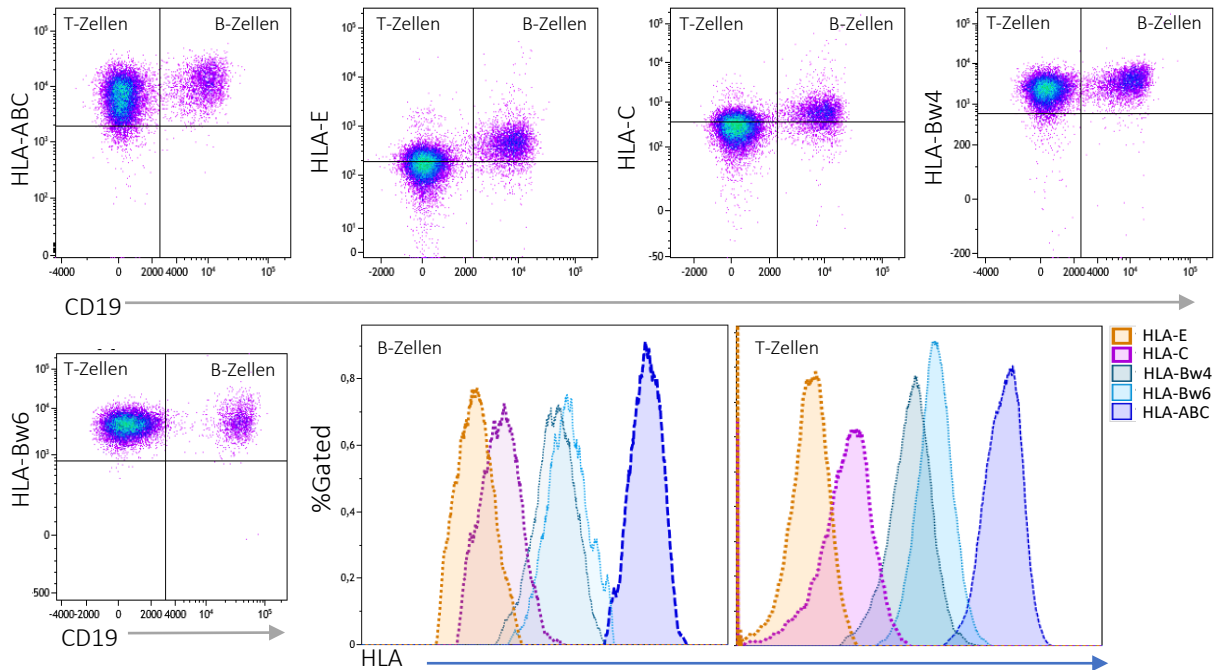


Abbildung 11: HLA-Klasse I Expression von HLA-ABC, -C, -E, -Bw4 und -Bw6 auf B- und T-Lymphozyten eines gesunden Spenders. In den *density-plots* werden T- und B-Zellen aus dem Lymphozyten *gate* dargestellt. CD56⁺ Lymphozyten (NK-Zellen) wurden zuvor ausgeschlossen. Aufgetragen wurde das entsprechende HLA-Molekül gegen CD19. Die Histogramme stellen eine Überlagerung (*overlay histogramme*) der Expressionslevel der einzelnen HLA Moleküle auf B- und T-Zellen dar - über diese lässt sich die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der HLA-Klasse I Oberflächenexpression definieren.

Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten, dass B- und T-Lymphozyten annähernd gleiche Level an HLA-ABC, HLA-Bw4 und -Bw6 exprimieren. Ein anderes Bild ergab sich für die Oberflächenexpression von HLA-C und -E. Hier zeigten die B-Zellen eine deutlich stärkere Oberflächenexpression der beiden Moleküle.

Abbildung 12 spiegelt die Ergebnisse der HLA-Expression von 32 gesunden Spendern wieder. Da nicht jedes Individuum die Epitope Bw6 bzw. Bw4 besitzt, kam es hier zu unterschiedlichen Probenzahlen (HLA-Bw6, n= 26, HLA-Bw4, n= 29), (Abbildung 12).

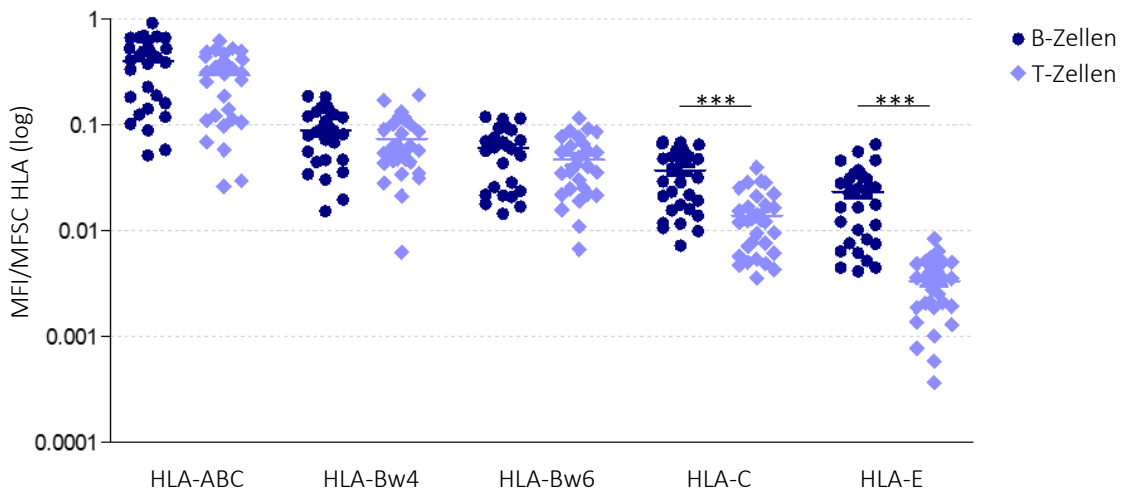


Abbildung 12: HLA-Klasse I Oberflächenexpression auf den B- und T-Lymphozyten gesunder Spender. Jeder Punkt repräsentiert den Quotienten aus MFI/MFSC für die B- und T-Zellpopulation eines gesunden Individuums, die horizontalen Linien stellen Mittelwerte da (n= 32, statistische Signifikanz wurde mittels gepaartem T-test oder Wilcoxon Test berechnet, ***p<0,0001).

Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten signifikante Unterschiede hinsichtlich der HLA-Klasse I Expression zwischen den B- und T-Lymphozyten gesunder Individuen. Die antigenpräsentierenden B- Zellen exprimierten ähnlich viel Gesamt-HLA-Klasse I, sowie HLA-Bw4, - Bw6, im Vergleich zu den T- Zellen. Allerdings ergaben sich deutliche Unterschiede bezüglich der HLA-C und –E Expression. B-Lymphozyten exprimierten signifikant mehr HLA-C, vor allem aber HLA-E auf ihrer Oberfläche im Vergleich zu den T-Lymphozyten.

3.3 Analyse der HLA-Klasse I Expression in pädiatrischen B-ALL Patienten

In der Literatur ist beschrieben, dass erwachsene AML, CML sowie ALL Patienten eine abweichende oder veränderte HLA-Klasse I Expression im Vergleich zu gesunden Individuen zeigen. Der totale Verlust von HLA-Klasse I Molekülen hingegen scheint ein äußerst seltenes Ereignis darzustellen. Die folgenden Analysen beziehen sich ausschließlich auf **pädiatrische B-ALL** Patienten mit einem Altersdurchschnitt von fünfeneinhalb Jahren. Es wurden 29 ALL Proben auf die Oberflächenexpression von HLA-ABC, -Bw4, -Bw6, -C und –E auf B- und T-Zellen untersucht. Die Analyse der HLA-Klasse I Oberflächenexpression der T-Zellen der leukämischen Proben ergab keine Unterschiede zu den T-Zellen der gesunden Kontrollkohorte. Die Expressionslevel der HLA-Klasse I Moleküle auf den T-Zellen beider Kohorten war nahezu identisch (Abbildung 13).

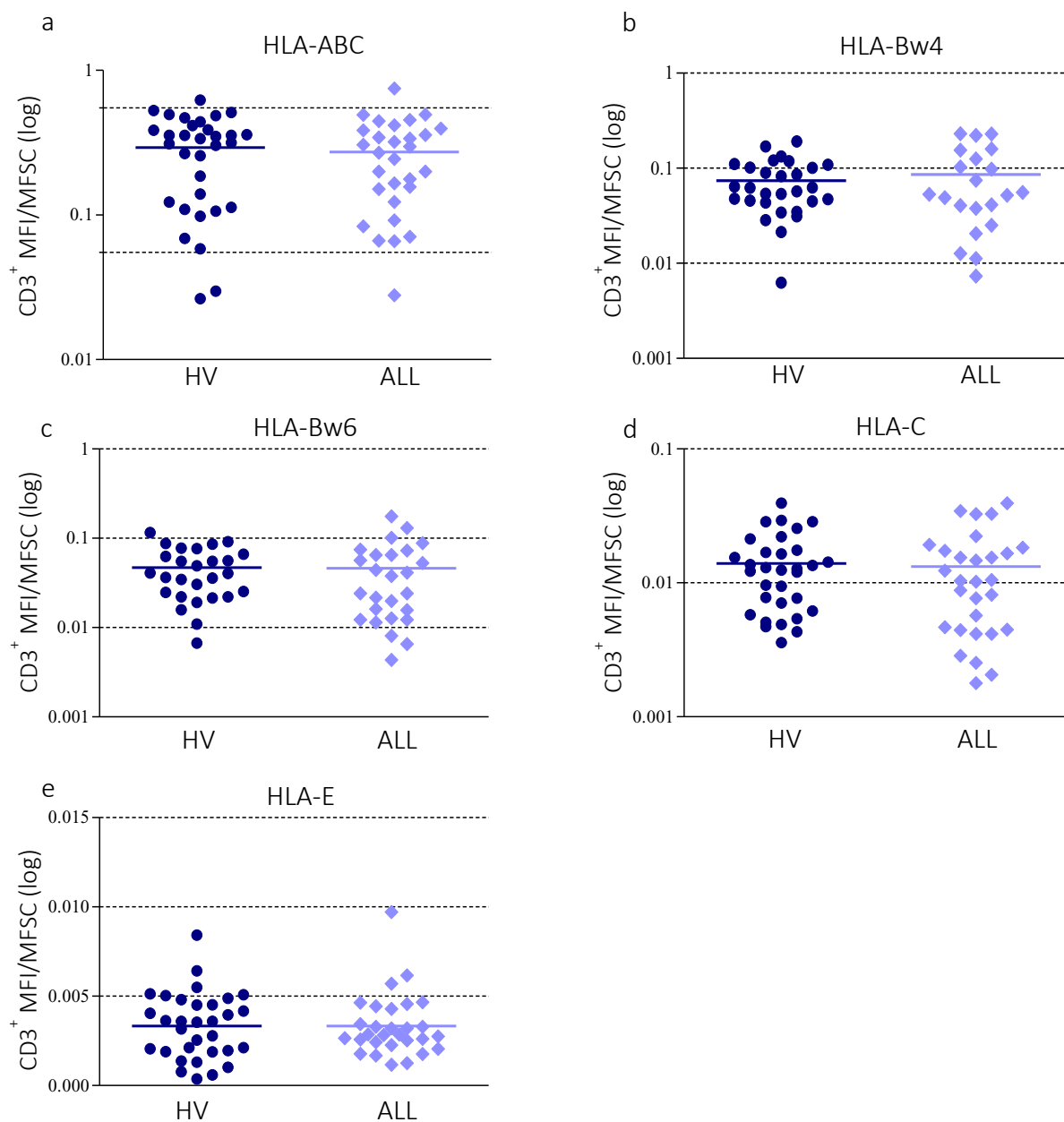


Abbildung 13: Vergleich der HLA-Klasse I Oberflächenexpression auf den T-Lymphozyten (CD3⁺) gesunder Spender (healthy volunteers, HV) und ALL Patienten. Jeder Punkt repräsentiert den Quotienten aus MFI/MFSC für die T-Zellpopulation eines gesunden Individuums oder ALL Patienten, die horizontalen Linien stellen deren Mittelwerte dar, **(a)** HLA-ABC: HV (n=32), ALL (n=29); **(b)** HLA-Bw4: HV (n=29), ALL (n=23); **(c)** HLA-Bw6: HV (n=26), ALL (n=26); **(d)** HLA-C: HV (n=32), ALL (n=29); **(e)** HLA-E: HV (n=32), ALL (n=29). Statistische Signifikanz wurde mittels *Mann-Whitney U test* berechnet.

Da es sich bei dem analysierten Patientenkollektiv ausschließlich um B-Zell Leukämien (B-ALL) handelte, wurde ebenfalls die HLA-Klasse I Oberflächenexpression auf den endogenen B-Zellen bzw. den entarteten B-Zellen (Blasten) analysiert und mit der HLA Oberflächenexpression gesunder B-Zellen (HV) verglichen (Abbildung 14).

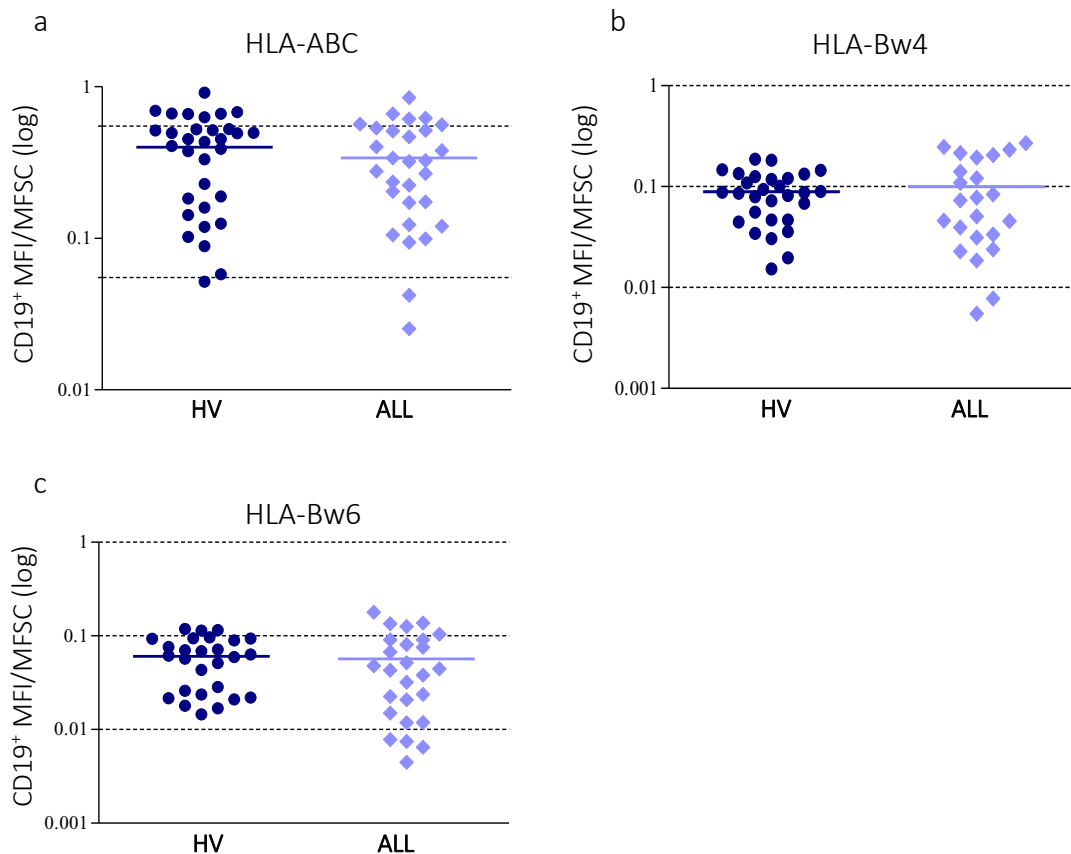


Abbildung 14: Vergleich der HLA-Klasse I Oberflächenexpression auf den B-Lymphozyten (CD19⁺) gesunder Spender (*healthy volunteers*, HV) und den Blasten/B-Zellen der ALL Patienten. Jeder Punkt repräsentiert den Quotienten aus MFI/MFSC für die CD19⁺-Zellpopulation eines gesunden Individuums oder ALL Patienten, die horizontalen Linien stellen deren Mittelwerte dar, ((a) HLA-ABC: HV (n=32), ALL (n=29); (b) HLA-Bw4: HV (n=29), ALL (n=23); (c) HLA-Bw6: HV (n=26), ALL (n=26). Statistische Signifikanz wurde mittels *Mann-Whitney U test* berechnet.

Die Oberflächenexpression der drei Moleküle HLA-ABC, -Bw4 und -Bw6 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den CD19⁺ Zellen der leukämischen Patienten und den gesunden Spendern. Ein anderes Bild hingegen ergab sich für die Oberflächenexpression von HLA-C sowie -E. Anhand der Oberflächenexpression von HLA-C und -E ließen sich innerhalb des Patientenkollektivs drei unterschiedliche Gruppen definieren:

- Gruppe 1:** Patienten mit einem **Blastenanteil von >80%**
- Gruppe 2:** Patienten mit einem **Blastenanteil von 25-80%**
- Gruppe 3:** Patienten mit einem **Blastenanteil von <25%**

In den folgenden *plots* und Histogrammen sind exemplarisch drei leukämische Proben für ihre HLA-E Expression dargestellt, die sich in ihrem prozentualen Blastenanteil in die drei benannten Gruppen untergliedern (Abbildung 15).

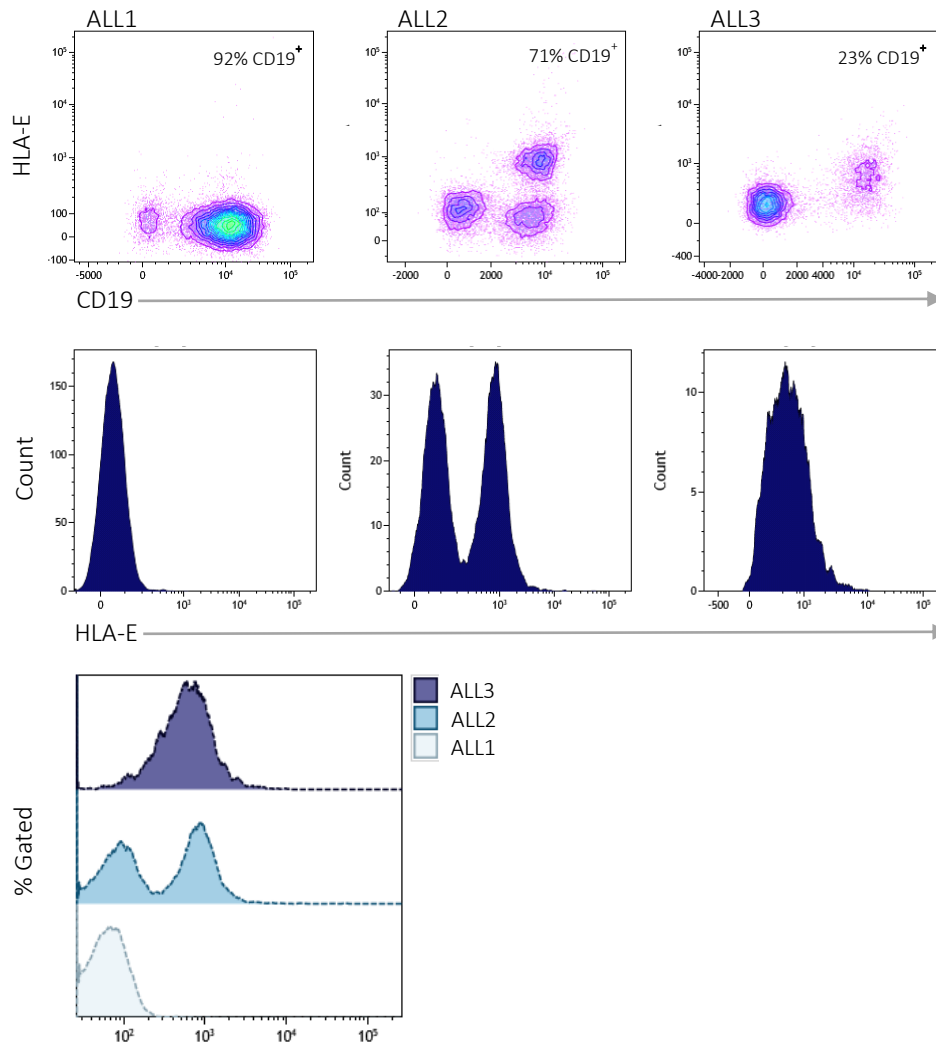


Abbildung 15: Unterschiedliche HLA-E Expression in ALL Patienten mit unterschiedlichem prozentualen Anteil an CD19⁺ Zellen (Blasten und B-Zellen). ALL1: Patientenprobe mit 92% CD19⁺ Zellen (Blasten und B-Zellen) und einer für HLA-E negativen CD19⁺ Population. ALL2: Patientenprobe mit 71% CD19⁺ Zellen (Blasten und B-Zellen) und einer für HLA-E negativen sowie positiven CD19⁺ Population. ALL3: Patientenprobe mit 22% CD19⁺ Zellen (Blasten und B-Zellen) und einer für HLA-E positiven CD19⁺ Population.

Wie in Abbildung 15 sichtbar, fiel auf, dass je höher der Blastenanteil innerhalb der Probe war, desto geringer fiel die HLA-E Oberflächenexpression auf der CD19⁺ Population aus. Dasselbe Muster ergab sich analog für HLA-C (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren ließen sich die leukämischen Proben über ihre HLA-C und -E Expression und über CD45 in gesunde CD19⁺CD45⁺HLA-E^{high} B-Zellen sowie CD19⁺CD45⁻HLA-E^{low} Blasten untergliedern und hinsichtlich ihrer HLA Expression getrennt voneinander analysieren (Abbildung 16).

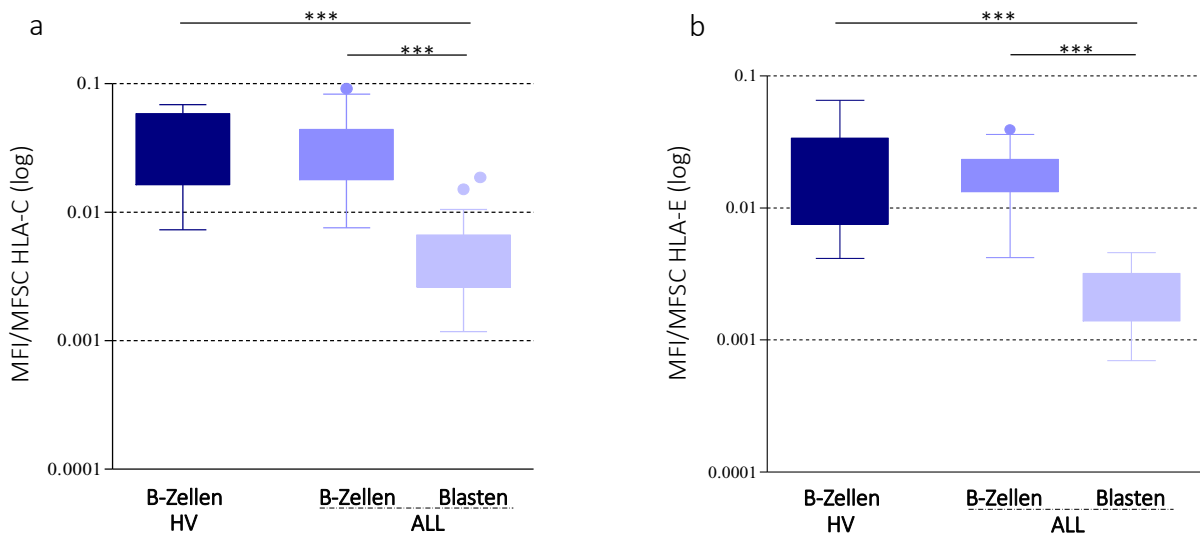


Abbildung 16: Stark verminderte Oberflächenexpression von HLA-C und -E auf den Blasten der leukämischen Patienten. Die Tukey Box Plots repräsentieren die Oberflächenexpression von HLA-C (a) und -E (b) für nicht leukämische B-Zellen (mittelblau) und leukämische Blasten (hellblau) des Patientenkollektivs (n=29), im Vergleich zu den B-Zellen (dunkelblau) der Kontrollkohorte (n=32, HV). Die Ergebnisse wurden über den Mann-Whitney U test miteinander verglichen, ***p<0.001).

Die B-Lymphozyten der Kontrollkohorte und die endogenen „gesunden“ B-Zellen der ALL Kohorte zeigten annähernd gleiche Expressionslevel für HLA-C und -E. Im Kontrast dazu zeigten die Blasten der leukämischen Proben eine hoch signifikante Reduktion von HLA-C und -E auf der Zelloberfläche.

3.4 Expressionsanalyse von HLA-C und -E auf transkriptioneller Ebene

Um herauszufinden, ob sich die durchflusszytometrisch beobachteten Expressionsunterschiede von HLA-C und -E ausschließlich auf das Niveau der Oberflächenexpression beziehen, wurde im nächsten Schritt mittels quantitativer Echtzeit-PCR (*real-time* PCR) das Expressionsniveau auf transkriptioneller Ebene analysiert. Hierbei wurde selektiv zwischen den KIR-Liganden HLA-C1 und HLA-C2 unterschieden, um herauszufinden, ob eines der beiden Allele einen Risikofaktor für die Entstehung einer pädiatrischen ALL darstellt. Für die Analysen wurden vier gesunde Spenderproben sowie drei pädiatrische ALL Proben am Hochgeschwindigkeitssortier MoFlo XDP in verschiedene Zellpopulationen sortiert. Bei den gesunden Spenderproben wurde in CD3⁺CD56⁻ T-Zellen und CD19⁺CD3⁻ B-Zellen unterschieden. Da es sich bei den drei Leukämien um CD34⁺ Leukämieproben handelte, wurde CD34 als Blasten-Marker verwendet.

Dadurch wurden die leukämischen Proben in drei Fraktionen unterteilt: CD19⁺CD34⁺ Blasten, CD19⁺CD34⁻ endogene B-Zellen und CD3⁺CD56⁻ T-Zellen. Für die Berechnung des Expressionsunterschiedes wurde für jede untersuchte Probe der Ct-Wert des Referenzgens (β -Aktin) vom Ct-Wert des zu untersuchenden Zielgens subtrahiert ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen}$, Abbildung 17).

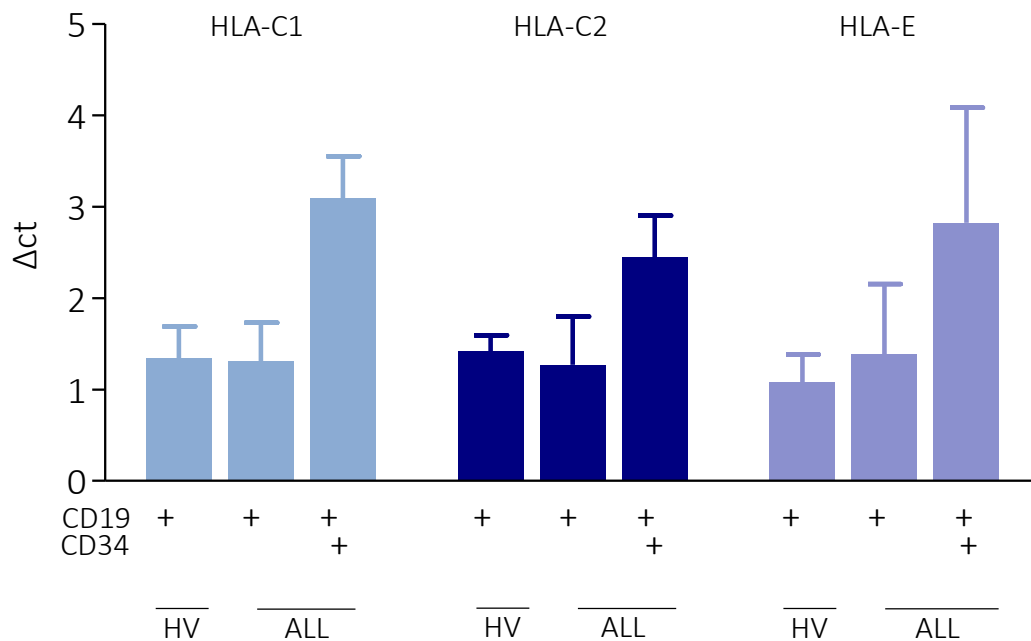


Abbildung 17: Vergleich der ΔCt Werte für HLA-C1, -C2 und -E. Vergleich zwischen B-Zellen (HV CD19⁺CD34⁻) gesunder Spender (n=4), sowie B-Zellen (ALL: CD19⁺CD34⁻) und Blasten (ALL: CD19⁺CD34⁺) leukämischer Patienten (n=3). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

Obwohl die mRNA Level für HLA-C1, -C2 und -E in den CD34⁺ leukämischen Blasten geringer als in den residualen nicht-leukämischen B-Zellen waren, konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden, was wahrscheinlich auf die geringe Probenanzahl zurückzuführen ist. Die mRNA Level der B-Zellen aus gesunden Spendern und die der residualen, nicht-leukämischen B-Zellen waren annähernd identisch. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass posttranskriptionelle Mechanismen in der Herunterregulation der beiden Moleküle ebenfalls eine Rolle spielen könnten.

3.5 HLA-E Polymorphismus

Die Blasten der ALL Kohorte wiesen eine starke Oberflächenreduktion für HLA-C und –E auf, wohingegen die endogenen B-Zellen und die B-Zellen der Kontrollkohorte eine annähernd gleich starke Expression der beiden Moleküle aufwiesen. Insgesamt stellte sich die Oberflächenexpression von HLA-C homogener als die von HLA-E dar. Hieraus ergab sich die Fragestellung, ob die heterogene HLA-E Oberflächenexpression auf die verschieden stark exprimierten Allele zurückzuführen sei und, ob eine Assoziation zwischen einem bestimmtem HLA-E Genotyp bzw. einem bestimmten HLA-E Allel (HLA-E*01:01 (HLA-E^R) und HLA-E*01:03 (HLA-E^G)) und einer B-ALL besteht. Beide Allele kommen zwar in einer vergleichbaren Häufigkeit in der kaukasischen Bevölkerung vor, unterscheiden sich jedoch deutlich in ihrer Expressionsstärke: HLA-E*01:03 wird im Gegensatz zu HLA-E*01:01 signifikant stärker auf der Oberfläche exprimiert (Borrego, *et al* 1998, Grimsley, *et al* 2002, Sullivan, *et al* 2008). In der Kontrollkohorte zeigte sich eine klare Korrelation zwischen dem Genotyp bzw. den unterschiedlichen HLA-E Allelen und der Oberflächenexpression. Die beobachtete Korrelation spiegelte sich aber nicht im Patientenkollektiv wider. In der leukämischen Kohorte war sowohl in den endogenen B-Zellen, als auch den Blasten keine Korrelation zwischen Oberflächenexpression und exprimiertem Allel ersichtlich, was auf die sehr geringen HLA-E Levels auf den Blasten zurückzuführen ist (Abbildung 18).

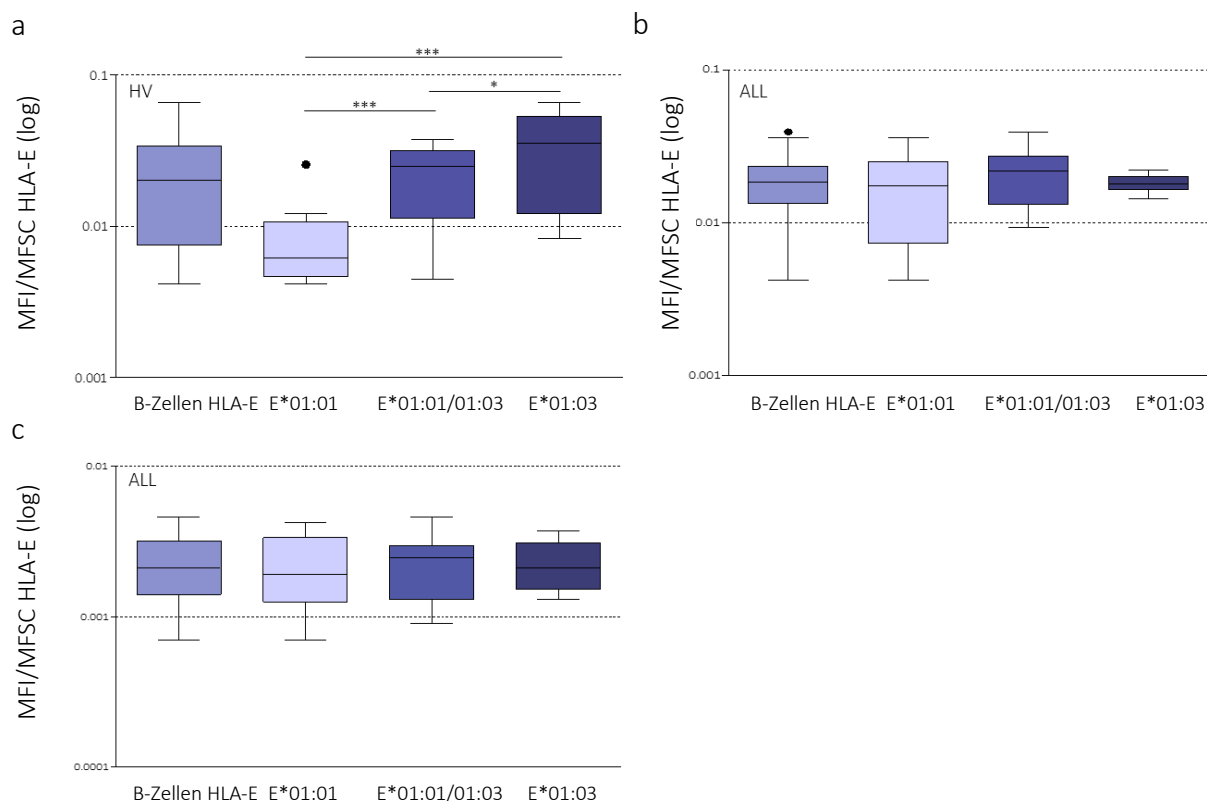


Abbildung 18: Korrelation zwischen der HLA-E Oberflächenexpression und dem HLA-E Genotyp in der Kontroll-, nicht aber in der ALL-Kohorte. Die Tukey Box Plots repräsentieren die Oberflächenexpression von HLA-E (graublau), HLA-E*01:01 (hellblau), HLA-E*01:01/01:03 (mittelblau) und HLA-E*01:03 (dunkelblau) für (a) die Kontrollkohorte (n=32), (b) die nicht leukämischen B-Zellen der ALL Kohorte (n=29) und (c) die Blasten der ALL Kohorte (n=29). Die Ergebnisse wurden über den Mann-Whitney U test miteinander verglichen, ***p<0.001, *p<0,01). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (SD).

Um einen genetischen Allel-spezifischen Zusammenhang zwischen der Entstehung einer pädiatrischen ALL und den beiden unterschiedlichen HLA-E Allelen zu überprüfen wurden 291 pädiatrische ALL Proben und 261 gesunde Spender für HLA-E subtypisiert. Die Analysen ergaben keine Assoziation zwischen einem bestimmten HLA-E Genotyp bzw. einer Allelvariante (HLA-E*01:01 (HLA-E^R) und HLA-E*01:03 (HLA-E^G)) und einer B-ALL. Beide Allele scheinen weder einen protektiven Einfluss zu nehmen, noch die Entstehung einer ALL zu begünstigen. Die in dieser Arbeit analysierten Allel- und Genotypfrequenzen stimmen mit den von Geraghty et al. publizierten Frequenzen überein (Geraghty, *et al* 1992), (Tabelle 16).

Tabelle 16: HLA-E Allel- und Genotypfrequenzen

HLA-E Allelfrequenz	HLA-E*01:03	HLA-E*01:01	HLA-E Genotypfrequenz	E*01:03/E*01:03	E*01:03/E*01:01	E*01:01/E*01:01
HV (n=261)	45,60%	54,40%		18%	51,70%	31,40%
ALL (n=291)	44,80%	55,20%		21,30%	47,10%	31,60%
Geraghty et al. (n=90)	44%	56%		19%	49%	31%

3.6 HLA-E als früher prognostischer Marker in Patienten mit Rezidiv

Zusammenfassend konnte man in **allen** analysierten pädiatrischen ALL Proben eine drastische Reduktion der Oberflächenexpression der beiden HLA Klasse I Moleküle HLA-C und –E, nicht aber für HLA-Bw4 und HLA-Bw6 beobachten. Basierend auf diesen Ergebnissen, ergab sich die Fragestellung, ob es einen zeitlichen Zusammenhang zwischen der HLA-C/E Oberflächenreduktion und der Pathogenese bzw. Entstehung einer rezidivierenden ALL gibt und HLA-E als prognostischer Marker prospektiv eingesetzt werden kann. Um dieser Hypothese nachzugehen wurden kryokonservierte pädiatrische ALL Proben zu verschiedenen Zeitpunkten bezüglich ihrer HLA-Klasse I – im Speziellen die HLA–E Expression analysiert. Das Patientenkollektiv unterteilte sich in zwei Gruppen: Patienten mit Chemotherapie ohne Rezidiv (Abbildung 19a) und Patienten mit Chemotherapie und Rezidiv (Abbildung 19b) bildeten Gruppe 1. In Gruppe 2 befanden sich Patienten mit einer Knochenmarkstransplantation ohne Rezidiv (Abbildung 20a), mit Rezidiv nach kompletter Remission (Abbildung 20b) und mit Rezidiv nach partieller Remission (Abbildung 20c).

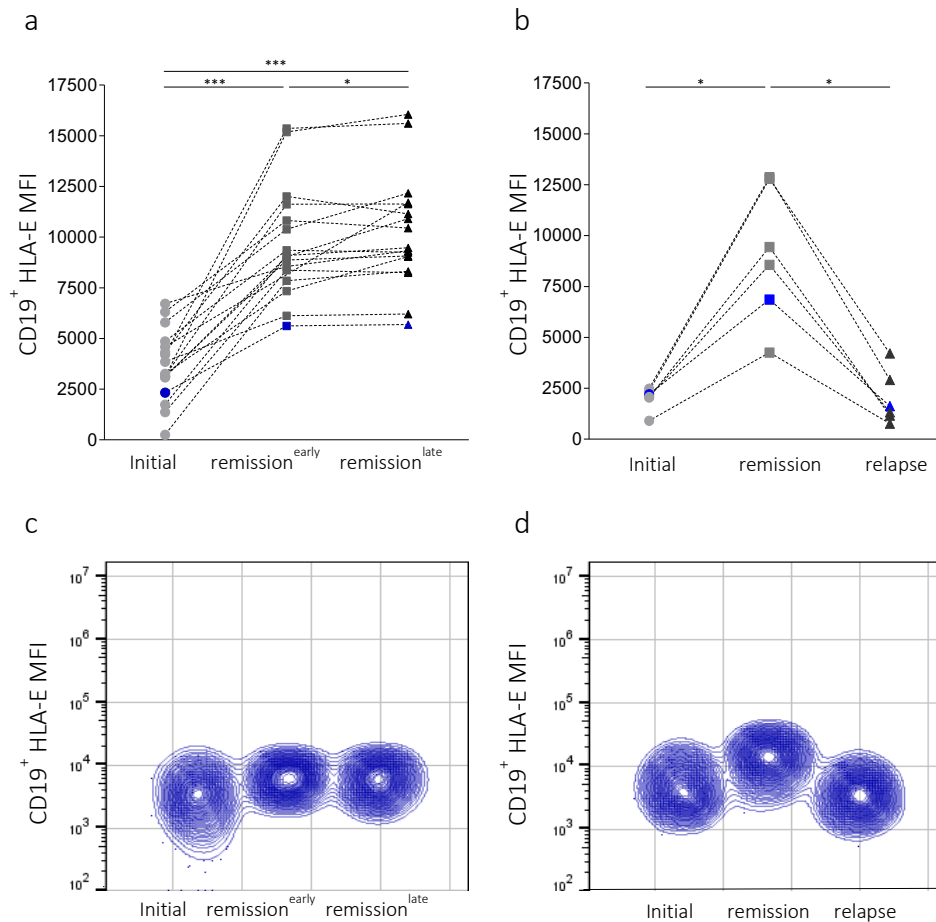


Abbildung 19: Systematische Herunterregulation von HLA-E in ALL Patienten mit Rezidiv, nach Chemotherapie. (a) ALL Patienten, die nach Chemotherapie in eine komplette Remission übergangen und als gesund gelten (n=17), zeigten eine konstant bleibende HLA-E Expression. (b) ALL Patienten (n=6) mit Rezidiv. (c-d) Exemplarischer HLA-E Verlauf von je einem ALL Patienten ohne Rezidiv (c), sowie mit Rezidiv nach kompletter Remission (d). Statistische Signifikanzen wurden über eine one-way-ANOVA oder einen gepaarten t-Test berechnet (*p<0.05, ***p<0.001).

Patienten, die kein Rezidiv erlitten, zeigten über Jahre hinweg eine konstante HLA-E Expression, wohingegen Patienten mit Rezidiv eine Herunterregulation von HLA-E aufwiesen. Es stellte sich die Frage, ob dieses Phänomen auch bei Patienten mit einer Knochenmarkstransplantation auftritt. Hierfür wurden insgesamt 19 ALL Patienten hinsichtlich ihrer HLA-E Expression untersucht. Acht der analysierten Patienten blieben nach erfolgter Transplantation Rezidiv-frei. Sechs Patienten erlitten nach kompletter Remission ein Rezidiv und fünf Patienten erlitten innerhalb eines kurzen Zeitraums (t<6 Monate, partielle Remission) ein Rezidiv. In den beiden Kohorten mit Rezidiv konnte eine signifikante HLA-E Herunterregulation beobachtet werden. In der Rezidiv-freien Kohorte blieben die HLA-E Expressionslevel nach Transplantation auf einem gleichbleibenden Niveau (Abbildung 20).

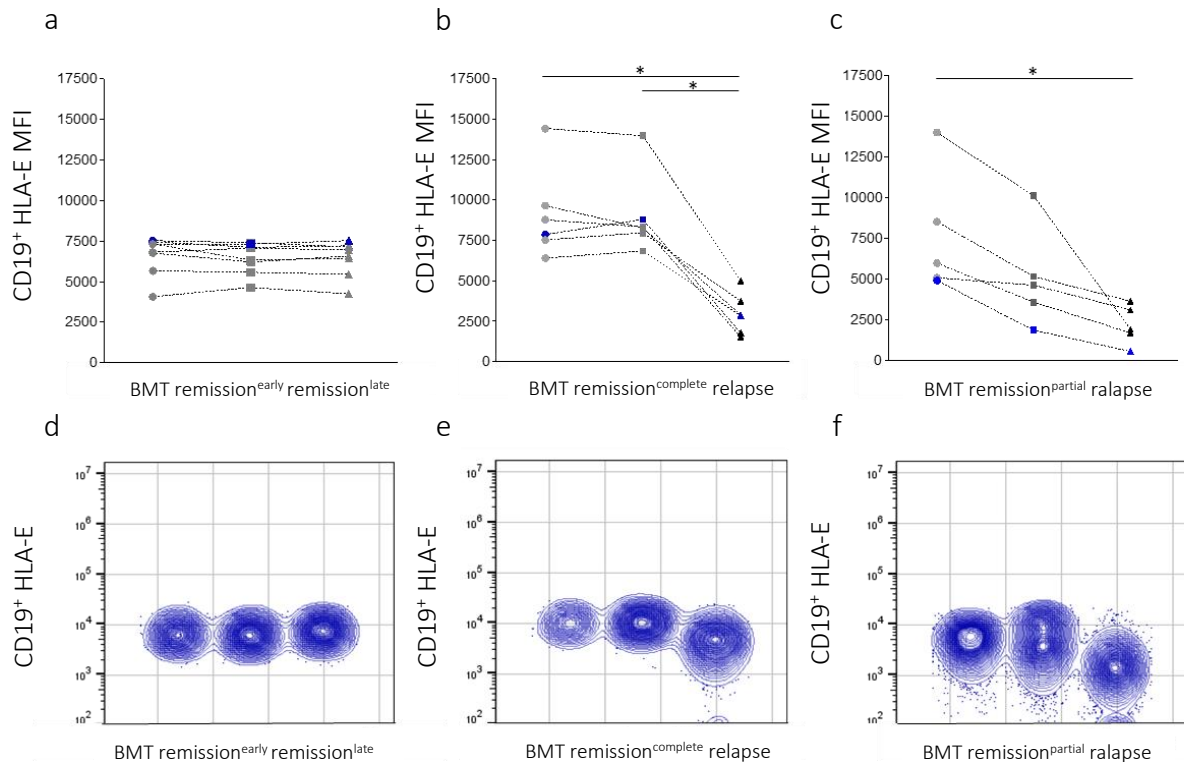


Abbildung 20: Systematische Herunterregulation von HLA-E in ALL Patienten mit Rezidiv, nach Knochenmarkstransplantation. (a) ALL Patienten, die nach KMT in eine komplette Remission übergingen und als gesund gelten (n=8). Ein Teil dieser Patienten konnte über 3-5 Jahre bezüglich ihrer HLA-E Expression analysiert werden. Dem gegenüber steht eine Gruppe an ALL Patienten (n=11), die ein Rezidiv, entweder nach kompletter **(b)** oder partieller **(c)** Remission erlitten. **(d-f)** Exemplarischer HLA-E Verlauf von je einem ALL Patienten, ohne Rezidiv **(d)**, mit Rezidiv nach kompletter Remission **(e)** und einem Patienten mit Rezidiv nach partieller Remission **(f)**. Statistische Signifikanzen wurden über eine one-way-ANOVA oder einen gepaarten t-Test berechnet (*p<0.05).

Ähnlich wie in der Patientenkohorte, die als Therapieform eine Chemotherapie durchlaufen hatte, zeigten Rezidiv-freie Patienten nach KMT eine stabile HLA-E Oberflächenexpression (Abbildung 20a und 20d). Rezidivierende Patienten hingegen, zeigten eine Reduktion der HLA-E Oberflächenexpression, welche in den meisten Fällen temporär früher, als das eigentlich diagnostizierte Rezidiv auftrat (Daten nicht gezeigt). Bei Patienten, die innerhalb eines kurzen Zeitabstandes nach erfolgter KMT ein Rezidiv erlitten (innerhalb der ersten sechs Monate), konnte man in kürzester Zeit eine Veränderung in der HLA-E Oberflächenexpression beobachten. Dank jahrelanger Kryo-Konservierung zahlreicher pädiatrischer Studienproben in der Kinderklinik Düsseldorf, war es möglich Verlaufspuren dreier Patienten in einem Zeitrahmen von bis zu zweieinhalb Jahren engmaschig für ihre HLA-E Expression zu analysieren. Der schwerwiegende Krankheitsverlauf dieser Patienten resultierte in jeweils zwei KMTs mit wiederkehrendem Rezidiv. Um einen Eindruck zu erhalten, wie sich die HLA-E Expression nach

erfolgter KMT verhält, wurde zusätzlich die Oberflächenexpression des Spenders durchflusszytometrisch ermittelt und als Basislinie definiert. Als Tag null wurde der Tag der ersten KMT definiert- von diesem ausgehend, erfolgte die zeitliche Berechnung der weiteren analysierten Proben. Der in Abbildung 21 dargestellte Patient (Patient 1) rezidierte nach beiden KMT, die zweite KMT erfolgte an Tag 413. Die grau hinterlegte Fläche kennzeichnet einen Therapiezeitraum, in dem der Patient auf Grund von diversen Antikörpertherapien- u.a. Blinatumomab über eine sehr geringe Frequenz an B-Zellen verfügte, so dass diese Zeitpunkte nicht analysiert werden konnten. Diese Phase resultierte in einer für die zweite KMT notwendigen Remission.

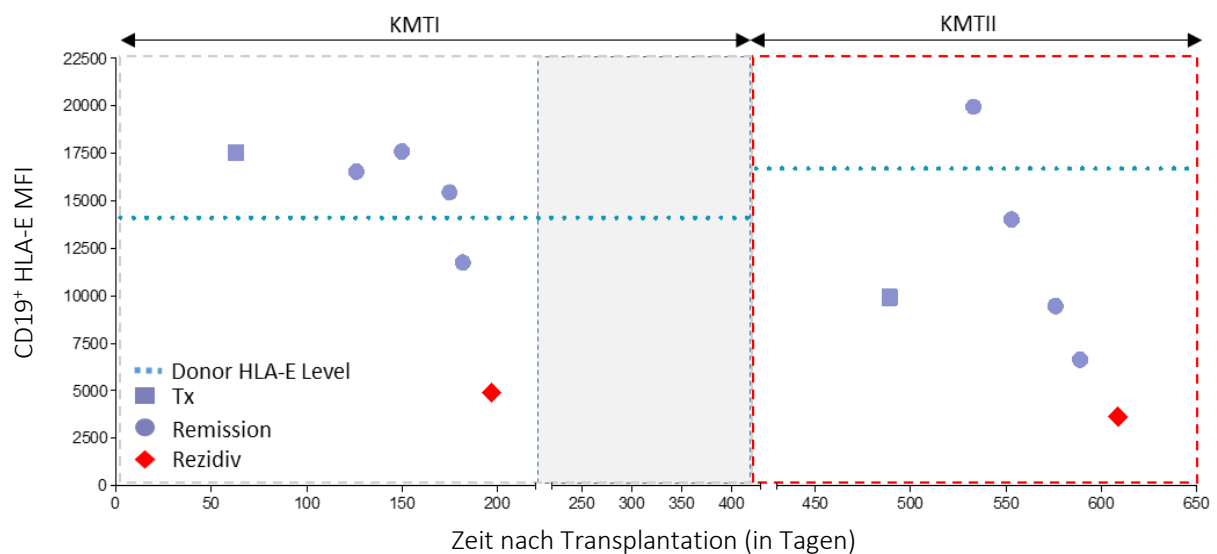


Abbildung 21: HLA-E als früher prognostischer Rezidiv-Marker. Exemplarischer Verlauf der HLA-E Expression auf den B-Zellen des Patienten nach erfolgter KMT mit Rezidiv. Der Patient wurde an Tag 0 und Tag 413 transplantiert (quadratisches Symbol) und rezidierte an Tag 197 und 609 (rautenförmiges Symbol). Der grau hinterlegte Bereich kennzeichnet einen Therapiezeitraum mit therapeutischen Antikörpern, die u.a. gegen CD19 auf den B-Zellen gerichtet waren. Der Patient wies in diesem Zeitraum einen sehr geringen prozentualen Anteil an CD19+ Zellen auf. Eine Auswertung von HLA-E über den MFI war in diesem Zeitraum nicht möglich. Das HLA-E Expressionsniveau des jeweiligen Spenders ist in Form einer gepunkteten Linie dargestellt. Die Zeiträume der beiden KMTs sind durch zwei Kästen voneinander abgetrennt (KMTI grau, KMTII rot).

Nach beiden KMTs war bis zur Rezidiv-Diagnose eine klare Reduktion der HLA-E Oberflächenexpression zu verzeichnen. Die MRD Daten, die zur routinemäßigen Überprüfung des Patientenstatus im ChariteCentrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin in Berlin erhoben wurden, wiesen einen kongruenten Verlauf zum Abfall der HLA-E Oberflächenexpression auf, was die Sensitivität des Markers widerspiegelt (Daten nicht gezeigt). Abbildung 22 zeigt im Detail die HLA-E Expression nach erfolgter zweiter KMT. Von Tag 533 bis hin zu Tag 609 fand eine kontinuierliche Reduktion von HLA-E auf der Oberfläche statt. Tag 609 stellt den

Zeitpunkt der Diagnose des erneuten Rezidivs dar (Abbildung 22a-b). Zu diesem Zeitpunkt erreichte die HLA-E Oberflächenexpression ihr Minimum.

Um die graduelle Reduktion von HLA-E besser zu verdeutlichen wurde ein *Overlay* (*dot-plots* (c), Histogramme (d)) der HLA-E Expression auf den B-Zellen/Blasten des Patienten von Tag 533 bis Tag 609 angefertigt (Abbildung 22a-d).

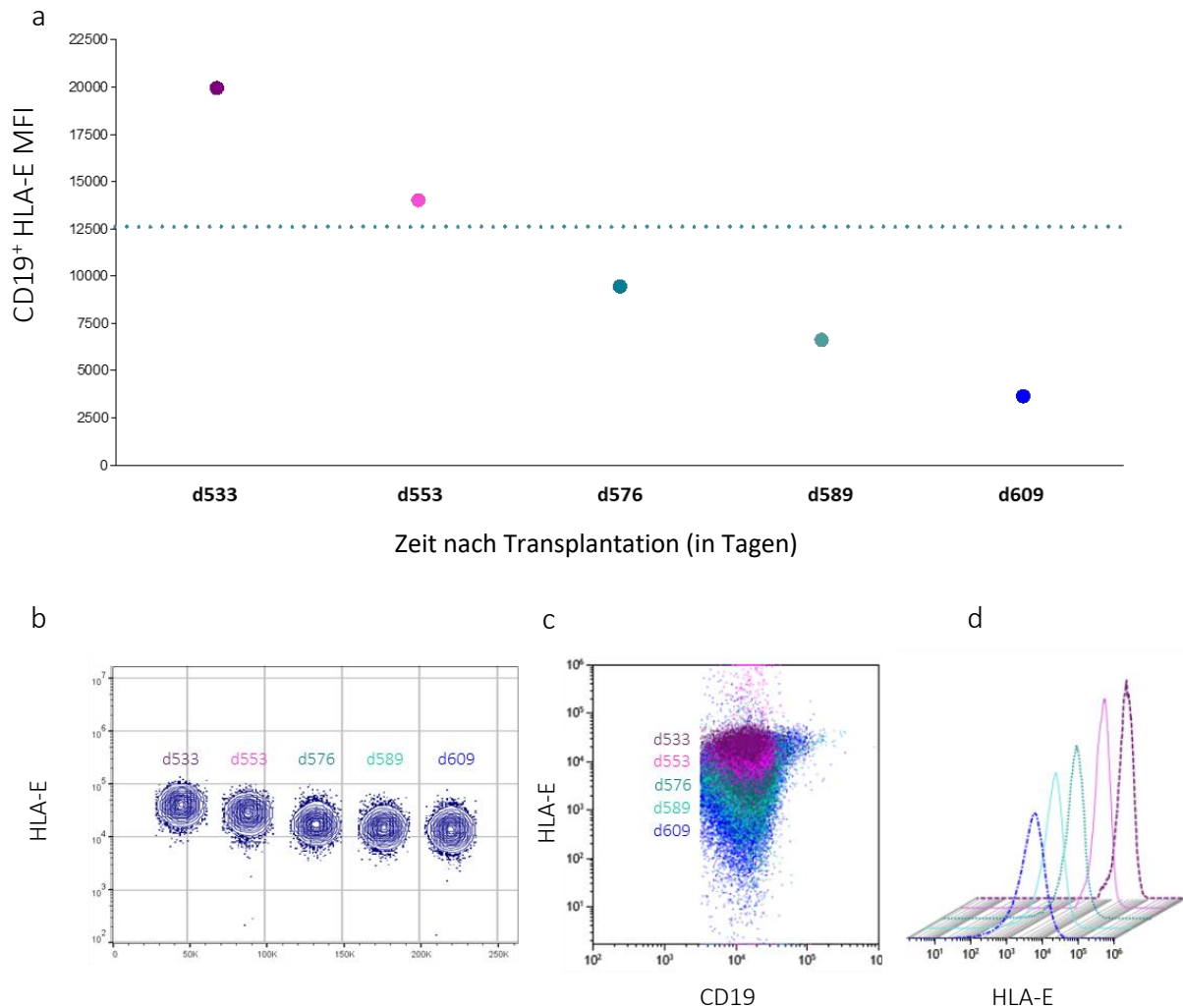


Abbildung 22: Kontinuierliche Herunterregulation von HLA-E. (a+b) Exemplarischer Verlauf der HLA-E Expression auf den B-Zellen/Blasten des Patienten nach erfolgter zweiter KMT mit Rezidiv. Der Patient wurde an Tag 413 zum zweiten Mal transplantiert und rezidierte an Tag 609. Das HLA-E Expressionsniveau des Spenders ist in Form einer gepunkteten Linie dargestellt. **(c+d)** *Overlay* (*dot-plots* (c), Histogramme (d)) der HLA-E Expression auf den B-Zellen des Patienten von Tag 533 bis Tag 609.

Die weiteren *plots* resultierten aus t-SNE (*T-distributed Stochastic Neighbor Embedding*) Berechnungen via Flowjo Software. T-SNE errechnet über einen definierten Algorithmus aus allen analysierten Parametern, von Proben unterschiedlicher Zeitpunkte, ein bestimmtes

Expressionsmuster für beliebige Zellpopulationen und stellt diese in einem 2-dimensionalen-Konstrukt graphisch dar.

Bei der analysierten Zellpopulation handelte es sich ausschließlich um die B-Zellen/Blasten des Spenders zu den angegebenen Zeitpunkten (Tag 533-609). Die graue Fläche beschreibt das Expressionsmuster für die Marker CD19, CD10, CD20, CD22, CD45 und CD34, welches aus allen angegebenen Zeitpunkten (d553-d609) errechnet wurde. Die farblich markierte Fläche, beschreibt die HLA-E Expression zu dem jeweilig angegebenen Zeitpunkt. In den t-SNE *plots* war eine starke Dynamik von HLA-E auf den B-Zellen erkennbar. Diese konnte ebenso in dem jeweils zugehörigen Histogramm dargestellt werden (Abbildung 23).

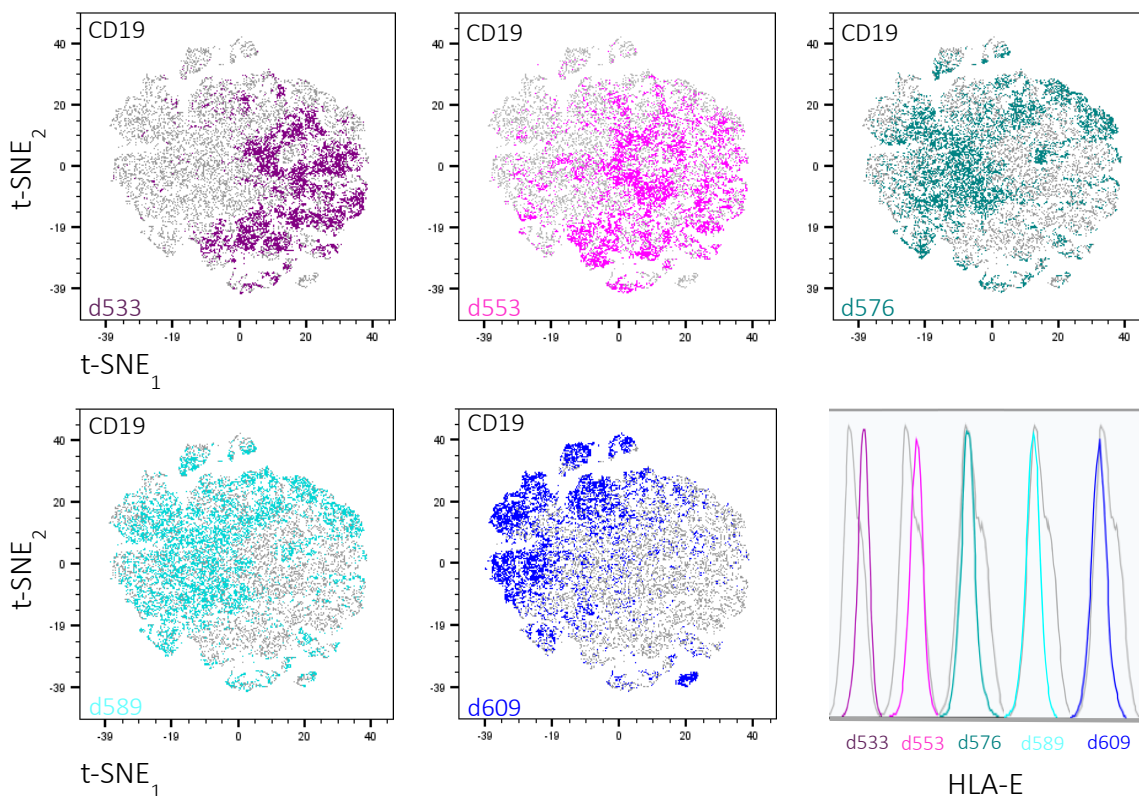


Abbildung 23: Dynamische Herunterregulation von HLA-E im Krankheitsverlauf. Die graue Fläche beschreibt das Expressionsmuster für CD19, CD10, CD20, CD22, CD45 und CD34, welches aus allen angegebenen Zeitpunkten (d553-d609) errechnet wurde. Die farblich markierte Fläche, beschreibt die HLA-E Expression zu dem jeweilig angegebenen Zeitpunkt. Die Histogramme beschreiben den zeitlichen Verlauf der HLA-E Herunterregulation von Tag 533 bis hin zu Tag 609, (Tag 533 lila, Tag 553 pink, Tag 576 grün, Tag 589 türkis, Tag 609 blau).

Zwischen Tag 533 und 609 war eine kontinuierliche Verschiebung der HLA-E Expression zu beobachten, die sich in einer Herunterregulation widerspiegelte. Die Herunterregulation lässt sich anhand der Histogramme gut nachvollziehen: hier war eine deutliche Reduktion der HLA-E Oberflächenexpression zwischen Tag 533 und Tag 609 ersichtlich.

Die oben beschriebenen Analysen konnten mit zwei weiteren Patienten durchgeführt werden. Diese konnten ähnlich engmaschig auf Ihre HLA-E Oberflächenexpression während ihres Krankheits- und Therapieverlaufs analysiert werden.

Der untersuchte Zeitraum umfasste erneut zwei KMT, zwei Rezidive (Patient 2 und 3), sowie zwei molekulare Rezidive (als molekulares Rezidiv wird ein Wert von $<10^{-3}$ auf MRD Niveau definiert) bei Patient 3 (Abbildung 24).

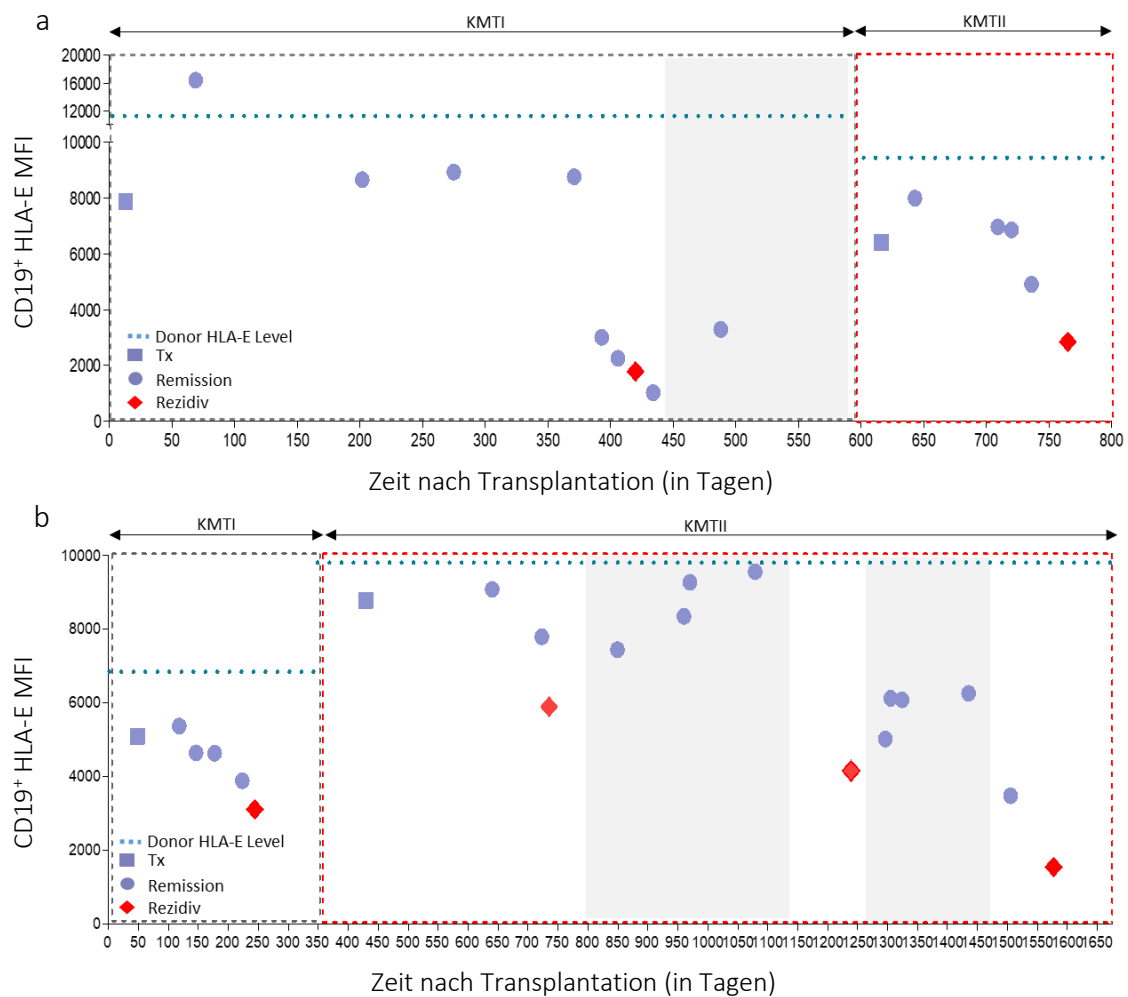


Abbildung 24: HLA-E als prognostischer Rezidiv-Marker. (a+b) Exemplarischer Verlauf der HLA-E Expression auf den B-Zellen/Blasten zweier Patienten nach zweimaliger KMT (quadratisches blaues Symbol) mit Rezidiv (rautenförmiges rotes Symbol). Der grau hinterlegte Bereich kennzeichnet einen Zeitraum von zellulären (Zytokin-induzierte-Killerzellen (cytokine-induced killer cell, CIK)) und Antikörperbasierten- (Blinatumomab CD19xCD3, anti-CD19 Antikörper (4G7)) Therapien, (Patient a: anti-CD19 Antikörper (4G7) und Blinatumomab, Patient b: Therapieblock I: Blinatumomab und CIK-Zellgabe, Therapieblock II: CIK-Zellgabe). Das HLA-E Expressionsniveau des jeweiligen Knochenmarkspenders wird in Form einer gepunkteten blauen Linie dargestellt. Die Zeiträume der beiden KMTs werden durch zwei Kästen voneinander abgetrennt (KMTI grau, KMTII rot).

Beide Patienten wiesen eine starke HLA-E Oberflächenreduktion im zeitlichen Verlauf des auftretenden Rezidives nach der jeweiligen KMT auf. Auch hier verhielten sich die MRD Analysen adäquat zu den HLA-E Oberflächenexpressionsdaten (Daten nicht gezeigt).

Selbst bei Patient 3, der nach der zweiten KMT zwei molekulare Rezidive aufwies und verschiedene Therapien durchlief, war HLA-E ein verlässlicher prognostischer Indikator, der frühzeitig das Rezidiv anzeigte (Abbildung 24).

3.7 HLA-E als geeignete Zielstruktur für Therapieansätze?

Es ist allgemein bekannt, dass die kindliche ALL verschiedene Mechanismen entwickelt hat, um der Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen. Der leukämische Klon ist dazu in der Lage die Expression verschiedener HLA-Klasse I Allele herunter zu regulieren, womit er der Erkennung durch T-Zellen entgeht (Demanet, *et al* 2004b, Verheyden, *et al* 2009). Das Ereignis der Herunterregulation stellt zwar einen *immune-escape* Mechanismus vor einer T-Zellantwort dar, sollte jedoch bei den NK-spezifischen Liganden HLA-E und –C zur einer klassischen „*missing-self*“ Situation und somit zur NK-Zell Aktivierung und Lyse des Blasts führen. Verschiedene Studien beschreiben jedoch Resistenzen der kindlichen ALL gegenüber der NK-Zell Lyse. Ein Mechanismus könnte die Expression der stimulatorischen Rezeptoren der NK-Zellen betreffen. Pende *et al.*, konnte 2005 zeigen, dass ein Teil der Liganden für stimulatorische Rezeptoren (u.a. MICA/B) durch den leukämischen Klon herunter reguliert werden können und dadurch eine Aktivierung verhindern (Pende, *et al* 2005). Die nächsten Analysen zielten darauf ab zu klären, warum der leukämische Klon dazu in der Lage ist, HLA-E stark herunter zu regulieren, ohne sich selbst zu einem NK-Zell *target* zu machen. Die Hypothese der folgenden funktionalen Analysen war, dass der leukämische Klon die HLA-E Oberflächenexpression zwar bis auf ein Minimum herunterreguliert, das verbleibende HLA-E jedoch noch ausreicht, um eine Interaktion mit dem inhibitorischen NK-Rezeptor NKG2A einzugehen, von dem bekannt ist, dass er eine sehr starke Affinität für seinen exklusiven Liganden HLA-E hat und somit die NK-Zelle inhibiert. Im Folgenden wurde die NKG2A-HLA-E Interaktion zwischen gesunden NK-Zellen und primären ALL Blasten über einen anti-HLA-E Antikörper (3D12) sowie über anti-HLA-ABC (W6/32) blockiert und CD107 auf NKG2A⁺KIR⁻ NK-Zellen analysiert (Abbildung 25).

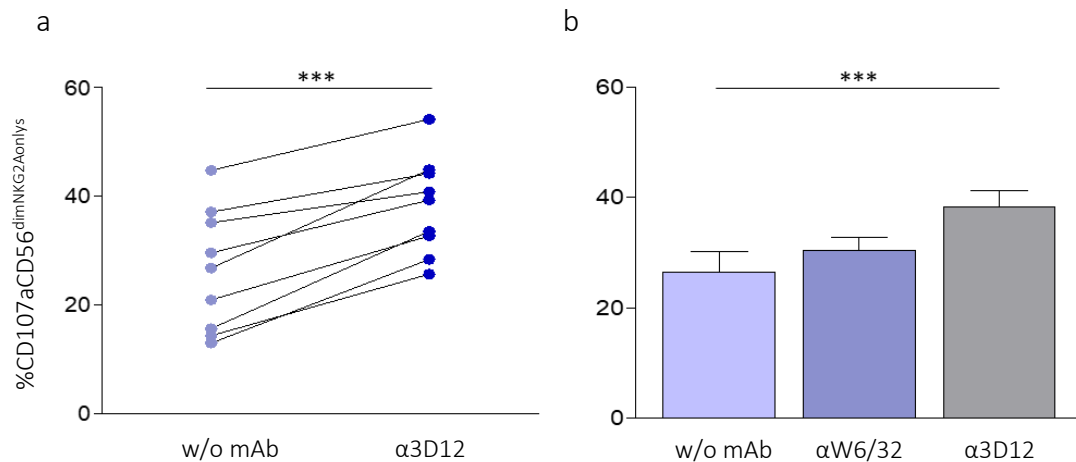


Abbildung 25: HLA-E Blockade überwindet Tumorresistenz gegenüber NK-Zellen. (a+b) CD107 Expression auf NKG2A⁺KIR⁺CD56^{dim} NK-Zellen von drei gesunden Spender (n=3), nach über-Nacht Stimulation mit IL-2 (500U/mL) und vierstündiger ko-Kultur mit den Blasten von drei ALL Patienten (n=3, mit einer Blasten Frequenz >80%), in Ab- oder Anwesenheit von anti-HLA-E (3D12) oder anti-HLA-ABC (W6/32) Antikörper. Der Inkubation mit Effektorzellen (E: T, 10:1) ging eine 30-minütige Präinkubation der Blasten mit den blockierenden Antikörpern (10µg/mL) voraus. Statistische Signifikanzen wurden über einen gepaarten t-Test berechnet (***p<0.001). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

Über die Antikörper-vermittelte HLA-E-NKG2A Blockade war es möglich, NK-Zellen, die exklusiv den Rezeptor NKG2A tragen, erfolgreich zu stimulieren. Die Antikörper-vermittelte HLA-E Blockade auf den Blasten der ALL Patienten führte zu einer signifikant erhöhten NK-Zell Degranulation. Die Blockade über den anti-HLA-ABC Antikörper zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Kontrollansatz.

Um nachzuvollziehen ob es sich bei der Herunterregulation von HLA-E auf den Blasten um ein reversibles Ereignis handelt, wurden primäre Leukämieproben über 24 und 48 Stunden mit IFN- γ stimuliert. Frühere Publikation von Brouwer und Masuda deuten bereits darauf hin, dass es sich bei der HLA Reduktion um ein reversibles Ereignis handelt, welches durch geeignete Stimuli - wie Interferon- α/γ aufgehoben werden kann (Brouwer, *et al* 2002a, Masuda, *et al* 2007). Für die Analyse wurden drei ALL Proben und die PBMCs von drei gesunden Spendern in Kulturmedium in An- oder Abwesenheit von IFN- γ für 24h und 48h kultiviert. Im Vergleich zu der HLA-E Expression auf den B-Zellen der gesunden Spender kam es bei den ALL Patienten zu einem starken Anstieg der HLA-E Expression auf den Blasten. Nach 48h IFN- γ Stimulation entsprach das Level der HLA-E Expression auf den Blasten, dem mittleren HLA-Expressionsniveau der gesunden Kontrollgruppe (Daten nicht gezeigt), (Abbildung 26).

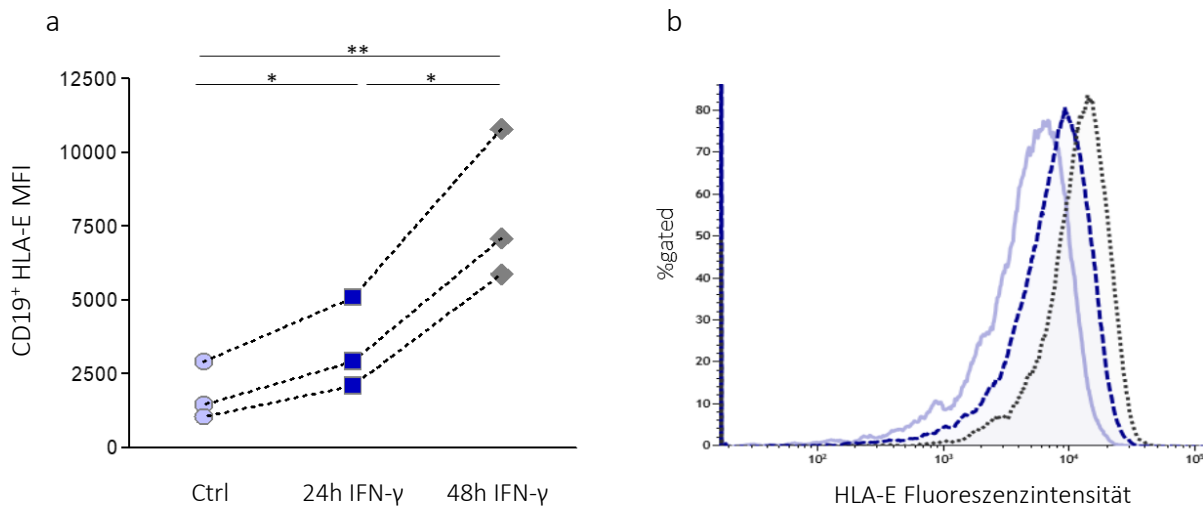


Abbildung 26: Wiederherstellung der HLA-E Expression via IFN- γ . (a) Drei pädiatrische ALL Proben wurden über 24 und 48h in Kulturmedium +/- IFN- γ (100U/mL) kultiviert. Die HLA-E Expressionslevel wurden zu den verschiedenen Zeitpunkten analysiert. (b) Exemplarisches Overlay der drei unterschiedlichen Konditionen und Zeitpunkte einer ALL Probe (Kulturmedium: hellblaues Histogramm, 24h IFN- γ : dunkelblau gestricheltes Histogramm und 48h IFN- γ : schwarz gepunktetes Histogramm). Die statistische Signifikanz wurde über einen gepaarten t-Test berechnet (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3.8 HLA-E Herunterregulation korreliert mit der Anwesenheit der klonalen genetischen Aberration

Das geeignete Standard-Verfahren, um das Ausmaß der klonalen genetischen Aberrationen in ALL-Patienten zu betrachten, ist die FISH-Methode. Diese Technik beruht auf der Hybridisierung von DNA-Sonden, die spezifische chromosomale Strukturen identifizieren. Die FISH-Analysen wurden mit den aufgereinigten Zellen im Institut für Humangenetik und Anthropologie der Uniklinik Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Univ.-Prof. Dr. Dagmar Wiczorek und Dr. Barbara Hildebrandt durchgeführt. Im gesamten Patientenkollektiv konnte man in den Rezidiv-, sowie Initialproben eine konsistente Herunterregulation von HLA-E beobachten. Je nach fortgeschrittener Pathogenese der Leukämie waren in individuellen pädiatrischen Proben mehrere Populationen bezüglich des HLA-E Expressionslevel zu erkennen. Diese wurden als HLA-E^{high}, und HLA-E^{low} definiert (Daten nicht gezeigt). Um zu analysieren in welcher Phase der maligne Klon bereits vorhanden ist, und um die Hypothese zu überprüfen, ob es sich bei den HLA-E^{high} exprimierenden Zellen um endogene „gesunde“ B-Zellen handelte, wurden die CD19⁺ Zellen von zwei ALL Patienten mit genetischer Aberration mittels FISH analysiert. Bei den Proben handelte es sich um jeweils eine Initial-, sowie Rezidiv-Probe von zwei unterschiedlichen Patienten. Patient 3 wies eine genetische Veränderung im *p16*-Gen, auch als CDKN2A (*cyclin dependent kinase inhibitor 2A*, p16) bekannt, auf. Bei CDKN2A handelt es sich um ein Tumorsuppressor-Gen, welches eine entscheidende Rolle in der

Überwachung des Zellzyklus einnimmt. Als genetische Aberration lag bei Patient 4 das sogenannte Philadelphia Chromosom, also eine reziproke Translokation zwischen Chromosom 9 und 22 (t (9;22) (q34; q11)) vor. Das dadurch entstandene Produkt wird als *bcr-abl*-Gen beschrieben und kommt in ca. 5% der kindlichen ALL vor. Das Fusionsprotein bewirkt eine veränderte Tyrosinkinase-Aktivität und verhilft der Tumorzelle so zu unkontrolliertem Wachstum. Es folgte eine durchflusszytometrische Sortierung der CD19⁺ Fraktion in mindestens 2 Populationen: HLA-E^{high} und HLA-E^{low}, wenn möglich wurde eine dritte Population (HLA-E^{intermediate}) definiert und sortiert. Abbildung 27 zeigt exemplarisch die *gating*-Strategie für die Sortierung der ALL Proben.

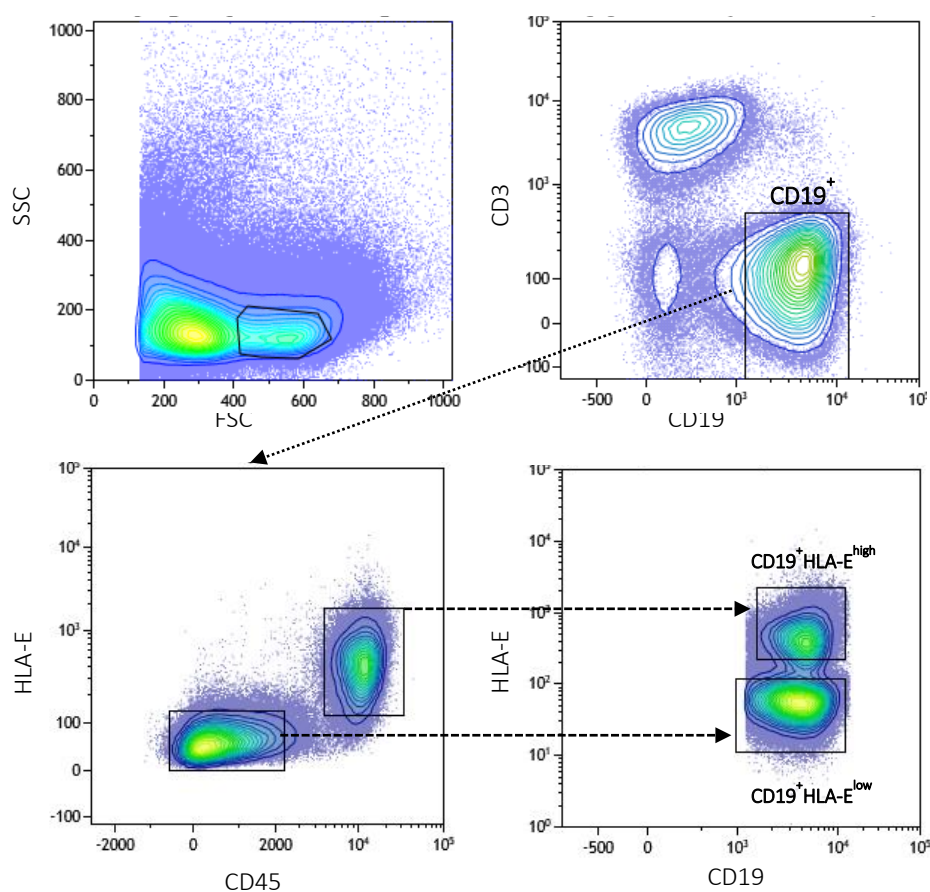


Abbildung 27: Exemplarische Darstellung der *gating*-Strategie für die Sortierung der Zellen eines ALL Patienten anhand seiner HLA-E Oberflächenexpression. Die Lymphozyten wurden anhand ihrer Größe (*Forward-Scatter*, FSC) sowie Granularität (*Side-Scatter*, SSC) bestimmt. Danach wurden innerhalb der Lymphozyten-Population die B-Zellen/Blasten (CD19⁺CD3⁺) definiert, gegen CD45 und HLA-E aufgetragen und in eine CD45⁺CD19⁺HLA-E^{high} und CD45⁻CD19⁺HLA-E^{low} sortiert.

Die Ergebnisse der FISH-Analysen der zwei Patienten (Patient 3 und 4) sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Bei Patient 3 (CDKN2A Aberration) wurde überraschenderweise sowohl in der HLA-E^{high}, als auch in der HLA-E^{low} eine Beteiligung der genetischen Aberration festgestellt werden. In der HLA-E^{low} Population war diese jedoch um ein Vielfaches stärker. Bei Patient 4 (BCR/ABL) konnte sowohl in der Initial- als auch Rezidiv-Probe ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der HLA-E Herunterregulation und Anwesenheit der klonalen genetischen Aberration nachgewiesen werden. In der Rezidiv Probe wurde ein zusätzliches Fusionssignal aufgefunden. Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um ein zusätzliches Philadelphia (Ph) Chromosom (Tabelle 17).

Tabelle 17: FISH-Analysen bei zwei ALL Patienten mit CDKN2A und Philadelphia Chromosom

Patient	Mutation/Aberration	Population	Frequenz aberranter Zellen
3 Initial	CDKN2A	CD19 ⁺ HLA-E ^{high}	25,4% 9p-
		CD19 ⁺ HLA-E ^{low}	98,8% 9p-
3 Rezidiv		CD19 ⁺ HLA-E ^{high}	6,7% 9p-
		CD19 ⁺ HLA-E ^{low}	93,3% 9p-
4 Initial	BCR-ABL	CD19 ⁺ HLA-E ^{high}	1,6% Ph
		CD19 ⁺ HLA-E ^{low}	23,7% Ph
4 Rezidiv		CD19 ⁺ HLA-E ^{high}	1,8% Ph
		CD19 ⁺ HLA-E ^{low}	49,4% Ph, 49,1% Ph+Ph

Zusammenfassend konnte anhand der FISH-Analysen festgestellt werden, dass das HLA-E Expressionsniveau und dessen Herunterregulation mit der Anwesenheit der klonalen genetischen Aberration korreliert. Patient 4 wies zeitgleich eine Deletion im *ikzf1* Gen auf. In 52% der Philadelphia-Chromosom (Ph)-positiven ALLs, liegt eine Deletion im *ikzf1* Gen vor, welches mit einem erhöhtem Rezidiv Risiko korreliert (Ribera, *et al* 2015).

3.9 Suszeptibilität der kindlichen ALL gegenüber NK-Zellen

Bedauerlicherweise zeigen gerade kindliche akute lymphatische Leukämien ein hohes Maß an Resistenz gegenüber allo-genen, reaktiven NK-Zellen und unterscheiden sich deutlich in ihrer Suszeptibilität gegenüber NK-zellen von anderen Leukämieformen (AML, CML und CLL). Erschwerend kommt hinzu, dass auch die autologen NK-Zellen verschiedene Funktionsdefizite aufweisen können, die eine zytotoxische Eliminierung der leukämischen Zellen zusätzlich beeinträchtigen.

3.9.1 Phänotypisierung leukämischer NK-Zellen

Bisher gibt es nicht viele Daten, die sich mit der phänotypischen Charakterisierung von NK-Zellen in akuten Leukämien (ALL und AML) beschäftigen. Basierend auf der Fragestellung, ob NK-Zellen der Patienten eine veränderte Oberflächenexpression der NK-Zell-spezifischen Moleküle CD16, Granzym B, Perforin, NKp30 und NKp46 aufweisen, wurden diese mittels Durchflusszytometrie analysiert und mit den NK-Zellen gesunder Spender verglichen. Abbildung 28 und Abbildung 29 stellt eine repräsentative durchflusszytometrische Messung der genannten Moleküle eines gesunden Spenders und eines ALL Patienten dar. Zunächst wurde über das Vorwärts-, sowie Seitwärtsstreulicht, also basierend auf Größe und Granularität, die Lymphozyten-Population von den restlichen Zellen abgegrenzt und definiert. Diese Zellen wurden im nächsten Schritt in einem *density plot* für die verschiedenen Marker gegeneinander aufgetragen. Die NK-Zellen wurden innerhalb der Lymphozyten-Population als CD56⁺CD3⁻ und CD45⁺ definiert. Über CD45 lassen sich auch Blasten, die eine Ko-Expression von CD56 aufweisen, von den tatsächlichen NK-Zellen des Patienten differenzieren (Abbildung 28 und Abbildung 29).

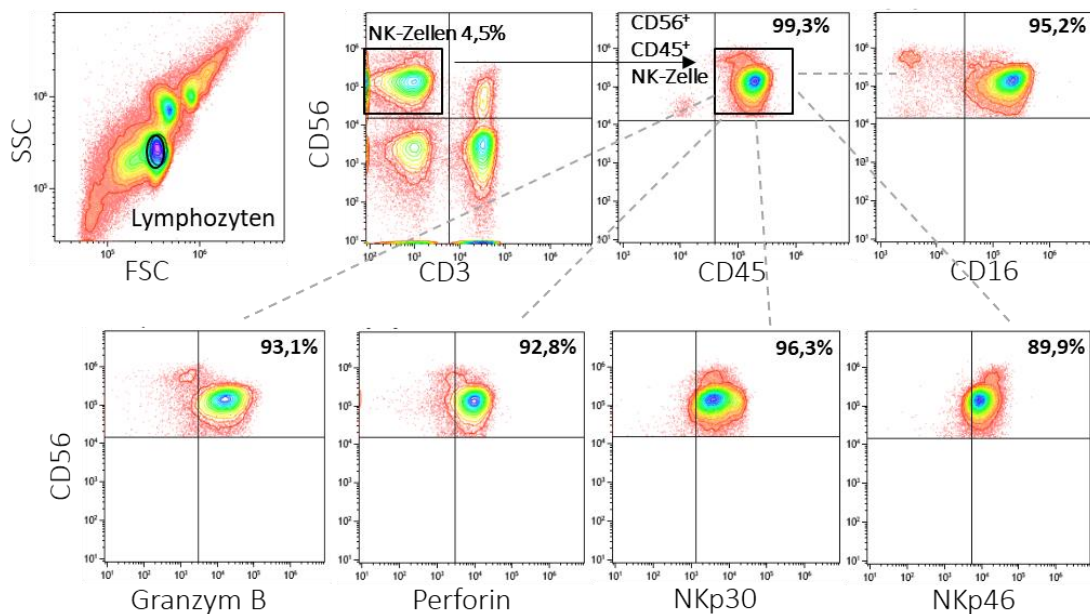


Abbildung 28: Durchflusszytometrische NK-Zell Phänotypisierung eines gesunden Spenders. Aufgetaute PBMC wurden nach der Antikörperfärbung am Durchflusszytometer analysiert. Die Lymphozyten wurden anhand ihrer Größe (Forward-Scatter, FSC) sowie Granularität (Side-Scatter, SSC) bestimmt. Danach wurden innerhalb der Lymphozyten-Population die NK-Zellen als CD56+CD3-CD45+ definiert. Die NK-Zell Population wurde dann in weiteren density-plots gegen die Marker CD16, Granzym B, Perforin sowie NKp30 und NKp46 aufgetragen.

Die Phänotypisierung erfolgte von 17 gesunden Spendern, sowie von je acht pädiatrischen AML und ALL Patienten. Bei dem Material handelte es sich um kryokonservierte Proben aus peripherem Blut. Ein Vergleich von frischen und aufgetauten Proben (kryokonserviert) zeigte keine signifikanten Unterschiede in den phänotypischen Analysen der genannten Oberflächenmoleküle (Daten nicht gezeigt). Abbildung 29 zeigt die beispielhafte Analyse der genannten Moleküle in einem ALL Patienten. Die durchflusszytometrischen Messungen wurden immer mit gleichbleibenden Einstellungen gemessen.

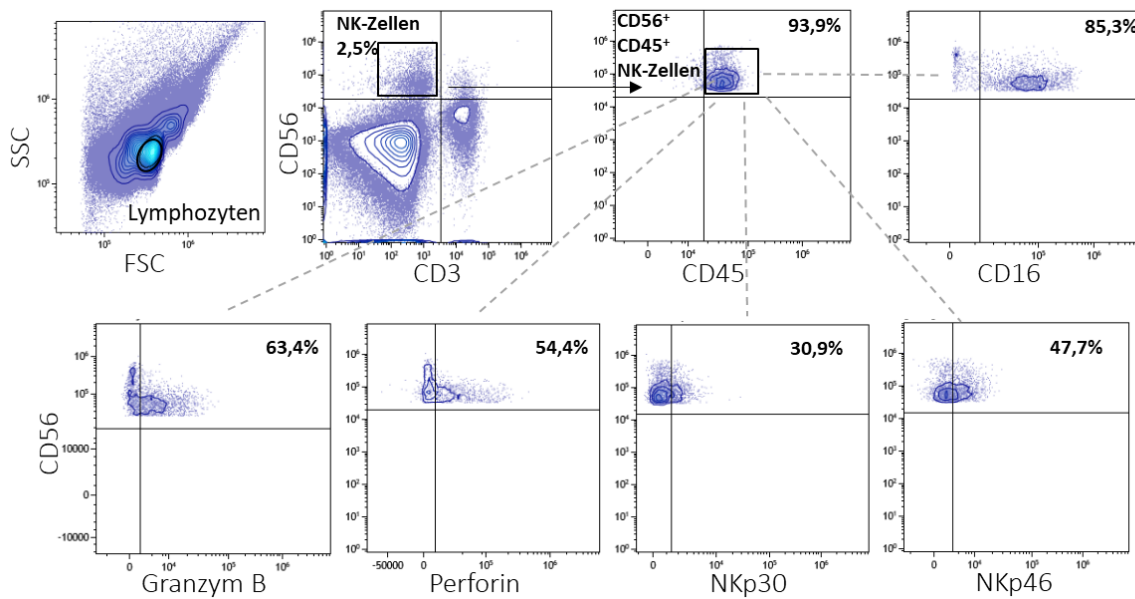


Abbildung 29: NK-Zell Phänotypisierung eines pädiatrischen ALL Patienten. Aufgetaute mononukleäre Zellen einer ALL Probe wurden nach der Antikörperfärbung am Durchflusszytometer analysiert. Die Lymphozyten wurden anhand ihrer Größe (*Forward-Scatter*, FSC) sowie Granularität (*Side-Scatter*, SSC) bestimmt. Danach wurden innerhalb der Lymphozyten-Population die NK-Zellen als CD56⁺CD3⁻CD45⁺definiert. Die NK-Zell Population wurde dann in weiteren *density-plots* gegen die Marker CD16, Granzym B, Perforin sowie NKp30 und NKp46 aufgetragen.

Abbildung 30 stellt den prozentualen Vergleich der Oberflächenexpression von CD16, Granzym B, Perforin auf NK-Zellen gesunder Spender und leukämischer Patienten dar. Die Analysen der Oberflächenexpression von CD16, Granzym B und Perforin zeigte signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollkohorte und den beiden Patienten Kohorten. Auffallend war, dass auch der Vergleich der beiden leukämischen Kohorten Unterschiede offenbarte (Abbildung 30).

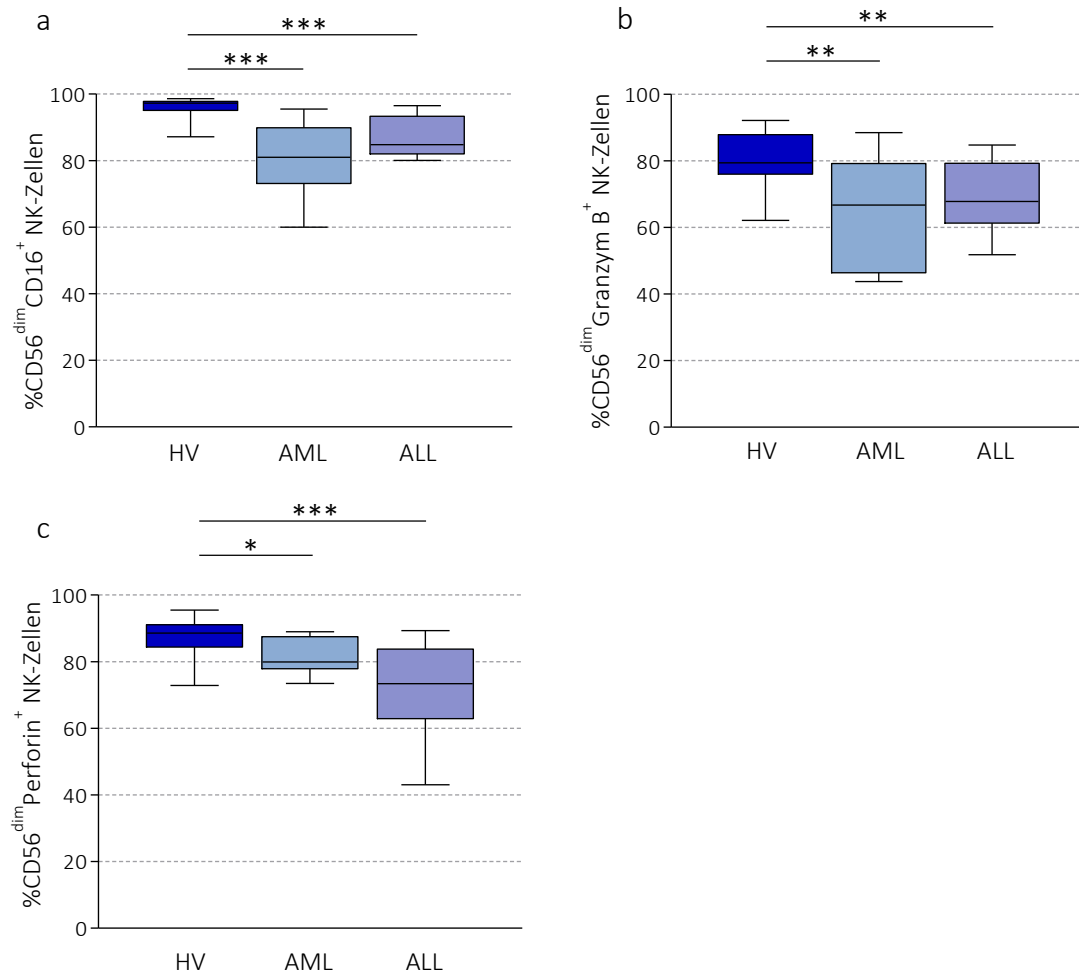


Abbildung 30: Verminderte Expression von CD16, Granzym B und Perforin auf den NK-Zellen von ALL und AML Patienten. Die Box plots repräsentieren die Expression von **(a)** CD16, **(b)** Granzym B und **(c)** Perforin auf den NK-Zellen von gesunden Spendern (HV, n=17) und pädiatrischen AML/ALL Patienten (je n=8). Die horizontale Linie repräsentiert den Median der einzelnen Werte. Die Ergebnisse wurden über einen ungepaarten t-Test miteinander verglichen, (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0,001).

Die Analysen ergaben, dass eine deutliche Verringerung für alle analysierten Moleküle auf der Zelloberfläche der leukämischen NK-Zellen vorlag (CD16: gesunde Spender: 96%±0,78; AML: 80%±4,0 ALL: 86%±1,9; Granzym B: gesunde Spender: 83%±1,5; AML: 65%±6,0; ALL:67%±4,9 und Perforin: gesunde Spender: 88%±1,1; AML:76%±2,9; ALL:65%±5,6), (Abbildung 31). Weitere Messungen umfassten die beiden natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren NKp30 und NKp46 (Abbildung 31).

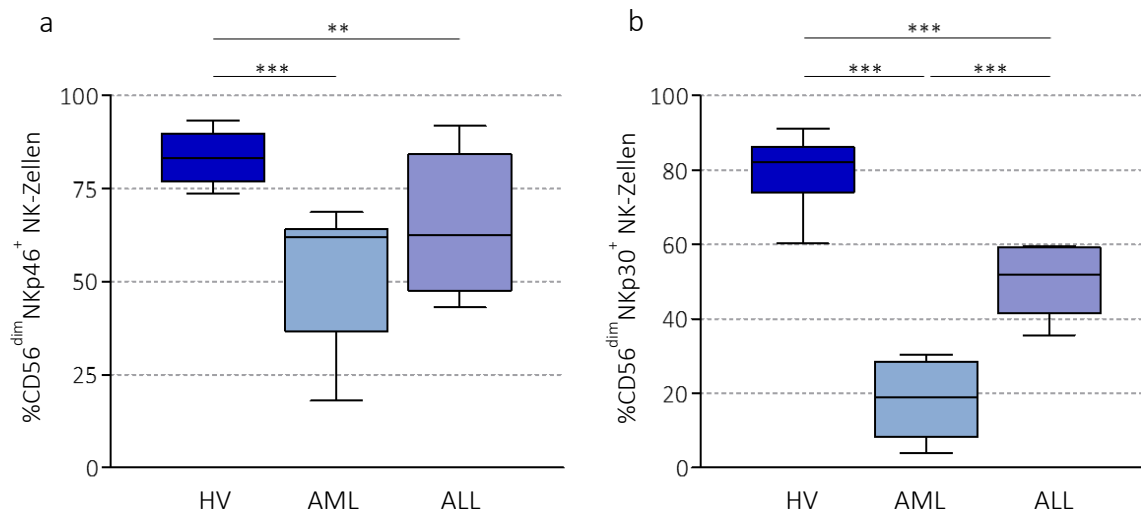


Abbildung 31: Stark verminderte Expression von NKp30 und NKp46 auf den NK-Zellen der ALL und AML Patienten. Die *Box plots* repräsentieren die Expression von (a) NKp30 und (b) NKp46 auf den NK-Zellen von gesunden Spendern (n=17), pädiatrischen AML Patienten (n=8) und ebenso vielen pädiatrischen ALL Patienten. Die horizontale Linie präsentiert den Median der einzelnen Werte. Die Ergebnisse wurden über einen ungepaarten t-Test miteinander verglichen, (**p<0,01, ***p<0,001).

NKp30 und NKp46 zeigten die stärkste Reduktion auf den NK-Zellen der AML und ALL Patienten (NKp30: gesunde Spender: 81%±2,2; AML:18%±3,8; ALL:51%±3,2 und Nkp46: gesunde Spender: 84%±1,6; AML: 52%±6,3; ALL:66%±6,4). Hinzuzufügen ist, dass im AML Patientenkollektiv die Oberflächenreduktion von CD16, Granzym B, NKp30, so wie NKp46 noch stärker war als in der ALL Kohorte. Lediglich Perforin wies im ALL Patientenkollektiv eine geringere Oberflächenexpression als in der AML Kohorte auf (Abbildung 30 und Abbildung 31). Die reduzierte Oberflächenexpression der Marker konnte nicht nur in der Frequenz, sondern auch im MFI nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.10 Stimulation der antileukämischen NK-Zellantwort durch spezifische Antikörper

Eine der wichtigsten Funktionen und Aufgaben der NK-Zellen ist die Eliminierung von Tumorzellen (Smyth, *et al* 2001). Diese haben im Laufe der Jahre die unterschiedlichsten *immune escape* Varianten entwickelt, um der NK-Zell Lyse zu entgehen. Die *immune escape* Varianten betreffen eine Vielzahl an NK-Zell-spezifischen Rezeptoren, Liganden, zytotoxischen Molekülen, Bindungsproteinen sowie Adhäsionsmolekülen (Epling-Burnette, *et al* 2007, Ruggeri, *et al* 1999, Verheyden, *et al* 2004).

Gerade Risikopatienten sind oft von den flexiblen Strategien der malignen Zellen betroffen. So weisen auf der einen Seite die autologen NK-Zellen unter anderem eine verminderte Zytotoxizität und Zytokin-Produktion auf, auf der anderen Seite sind die Blasten dazu in der Lage ihre Suszeptibilität gegenüber allogenen NK-Zellen zu verringern. Dies führt in vielen Fällen dazu, dass die Blasten nicht effektiv von den Immunzellen erkannt und lysiert werden können. Um diese Hochrisikopatienten besser therapieren zu können, werden neue immuntherapeutische Strategien benötigt. Für die kommenden Analysen standen zwei bispezifische Antikörper (CD16xCD33 (*bispecific killer cell engager*, BiKE) und CD16xIL15xCD33 (*trispecific killer cell engager*, TriKE)) zur Verfügung. Beide Antikörper konnten in früheren Studien von Gleason, sowie Vallera et al. das natürliche Potenzial der Immunzellen in MDS sowie adulter AML steigern bzw. reaktivieren (Gleason, *et al* 2014, Vallera, *et al* 2016, Wiernik, *et al* 2013). An den beiden CD33⁺ Zelllinien HL60 (CD33⁺, humane AML Zelllinie) und SEM (CD33^{+/-}, humane pädiatrische ALL-Zelllinie), sowie der CD33⁻ Zelllinie RAJI (humane Burkitt Lymphom Zelllinie) wurde zunächst die Stärke der CD33 Oberflächenexpression analysiert und die Spezifität des BiKE Konstruktes funktional (CD107-, IFN- γ - und TNF- α Produktion) getestet. Als Effektorzellen fungierten CD33-depletierte PBMCs von gesunden Spendern. Um den ausschließlichen Effekt auf das *target* zu untersuchen, war es notwendig CD33⁺ Zellen wie endogene Monozyten und Granulozyten zu depletieren. Anschließend wurden verschiedene NK-Zell-spezifische Interleukine in Kombination mit BiKE getestet. In den Experimenten wurde eine Konzentration von 10 μ g/mL BiKE Antikörper verwendet, da mit dieser Konzentration in Titrationsversuchen eine Sättigung erzielt wurde (Daten nicht gezeigt). Die Kombination IL2 + IL15 + BiKE wurde gewählt um den möglichen Effekt von IL15 des TriKE Antikörpers zu simulieren (Abbildung 32).

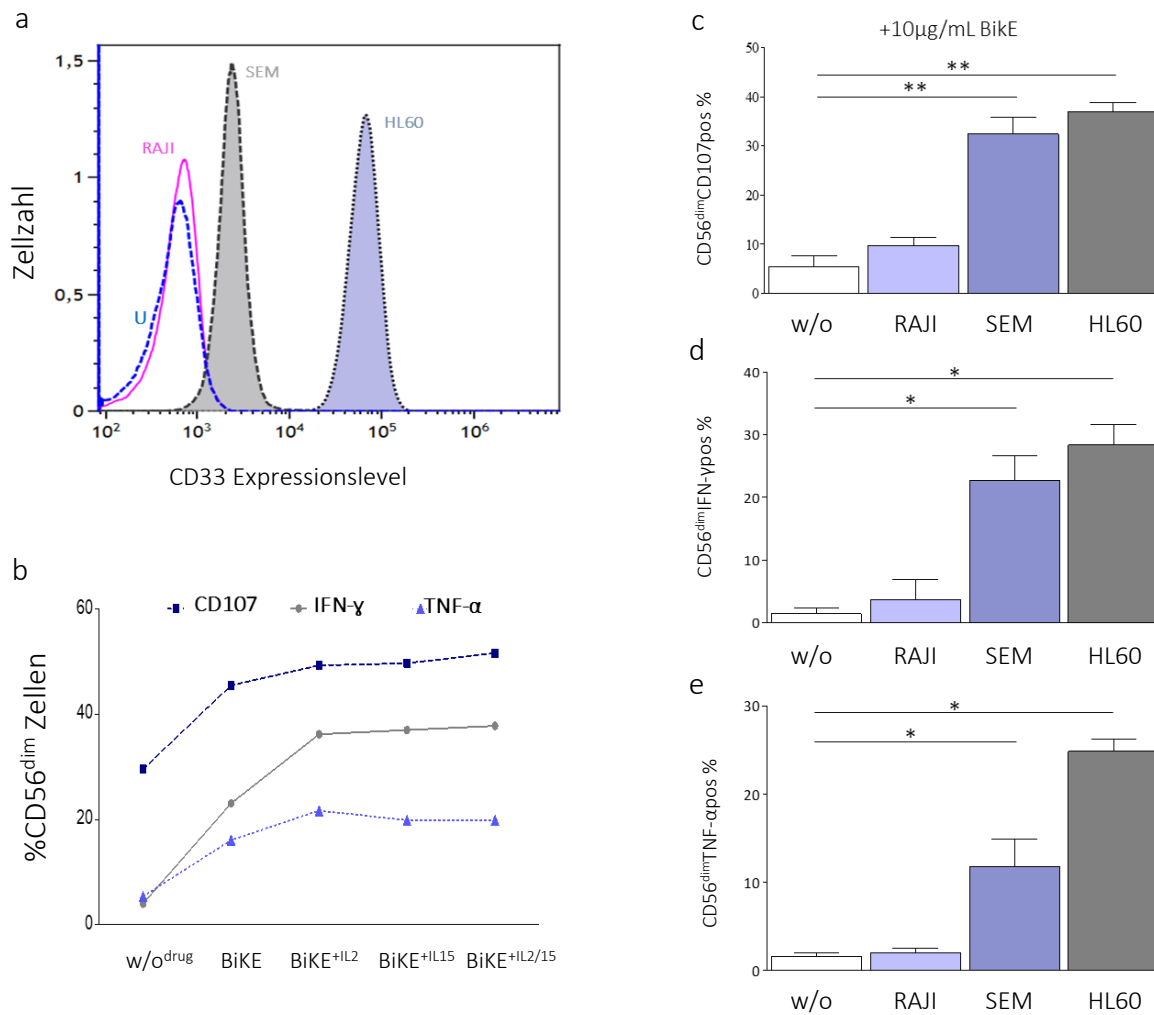


Abbildung 32: BiKE vermittelte NK-Zell Aktivierung gegen Zelllinien mit unterschiedlicher CD33 Expression. (a) CD33 Expressionslevel der verschiedenen Zelllinien HL60 (AML), SEM (ALL) und RAJI (Burkitt Lymphom), (U=Kontrolle, ungefärbt). **(b)** Effekt des bispezifischen Antikörpers (CD16xCD33) in Kombination mit NK-Zell-spezifischen Interleukinen auf die Degranulation und Zytokin-Produktion (CD107, IFN- γ und TNF- α) CD33 depletierter PBMCs, nach Koinkubation mit der Zelllinie HL60 als *target*. **(c-e)** Degranulationsassay sowie intrazelluläre IFN- γ und TNF- α Produktion. CD33 depletierte PBMCs wurden über Nacht mit IL2 stimuliert und am nächsten Morgen für 5h mit den *target* Zelllinien und 10 μ g/mL BiKE ko-kultiviert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Säulen repräsentieren die gemittelte, sowie auf einen Negativwert (ohne *target*) normalisierte Expression zweier gesunder Individuen. Die Ergebnisse wurden über einen gepaarten t-Test miteinander verglichen (n=2, *p<0,01; **p<0,001; E: T, 10:1, w/o=without *target*).

Die CD33⁻ Zelllinie RAJI diente in diesem Experiment als Negativkontrolle. Die beiden Zelllinien HL60 und SEM wiesen eine stark unterschiedliche CD33 Oberflächenexpression auf. Die promyeloische Zelllinie HL60 zeigte im Vergleich zu der lymphoiden Zelllinie SEM eine starke (CD33^{high}), die Zelllinie SEM eine schwache CD33 Expression (CD33^{low}), (Abbildung 32a). Die Behandlung mit unterschiedlichen NK-Zell-spezifischen Interleukinen zeigte, dass eine Kombination aus IL-2 und IL-15 die Degranulation und die Zytokin-Produktion am effektivsten induzierte, die einzelne Verwendung der Interleukine erzielte jedoch vergleichbare Ergebnisse (Abbildung 32b).

Um die Spezifität des Konstruktes zu überprüfen wurde im nächsten Schritt die Degranulation sowie Zytokin-Produktion von gesunden Spender-NK-Zellen gegen die drei unterschiedlichen *target* Zelllinien mit und ohne CD16xCD33 BiKE Antikörper analysiert (Abbildung 32c-e). Unter Verwendung des BiKE Antikörpers war eine deutlich gesteigerte CD107a sowie IFN- γ und TNF- α Expression gegen die beiden CD33⁺ Zelllinien HL60 und SEM zu erkennen. Anzumerken ist, dass die Zelllinie HL60 stärker auf die Stimulation mit CD16xCD33 BiKE ansprach. Die CD33⁻ Zelllinie RAJI sprach kaum auf den bispezifischen CD16xCD33 Antikörper an, was die Spezifität des Konstruktes bestätigt. Neben dem bispezifischen BiKE Antikörper, konnte die Gruppe um Jeffrey S. Miller eine modifizierte Version des bisher existierenden BiKE-Antikörpers entwickeln. Dieser trägt Interleukin-15 – ein für die NK-Zellentwicklung sowie die Homöostase und Proliferation wichtiges Interleukin, als intramolekularen Linker zwischen CD16 und CD33 und wird als TriKE Antikörper bezeichnet. Studien von Vallera et al. und Gleason et al. deuten daraufhin, dass der TriKE Antikörper die NK-Zellaktivität noch potenter als der BiKE Antikörper induzieren kann. Im nächsten Schritt wurden deshalb funktionale Analysen durchgeführt, in denen der Effekt der beiden Antikörper Konstrukte BiKE und TriKE (10 μ g/mL) miteinander verglichen wurde.

3.10.1 Antileukämische Effektor Funktion von allogenen NK-Zellen

Um die antileukämische Funktion von autologen, sowie allogenen NK-Zellen zu analysieren wurden weiterhin funktionale Analysen bezüglich der Degranulation, Zytokin-Produktion und Zytotoxizität durchgeführt. Der CD107-Assay spiegelt lediglich das Aktivierungspotential der NK-Zellen wider, wohingegen der Zytotoxizitätsassay (CFSE-Assay) Aufschluss darüber gibt, ob die NK-Zellen die *target* Zellen tatsächlich lysieren können. Für die Analyse mit allogenen NK-Zellen wurden aus *Buffy Coats* isolierte PBMCs einer CD33 Depletion unterzogen und über Nacht in IL2-haltigem Medium kultiviert. Am nächsten Morgen wurden diese mit einer Effektor: *target* (E: T) *ratio* von 10:1 für 5h mit ALL (Abbildung 33), sowie AML Blasten ko-kultiviert (Abbildung 34).

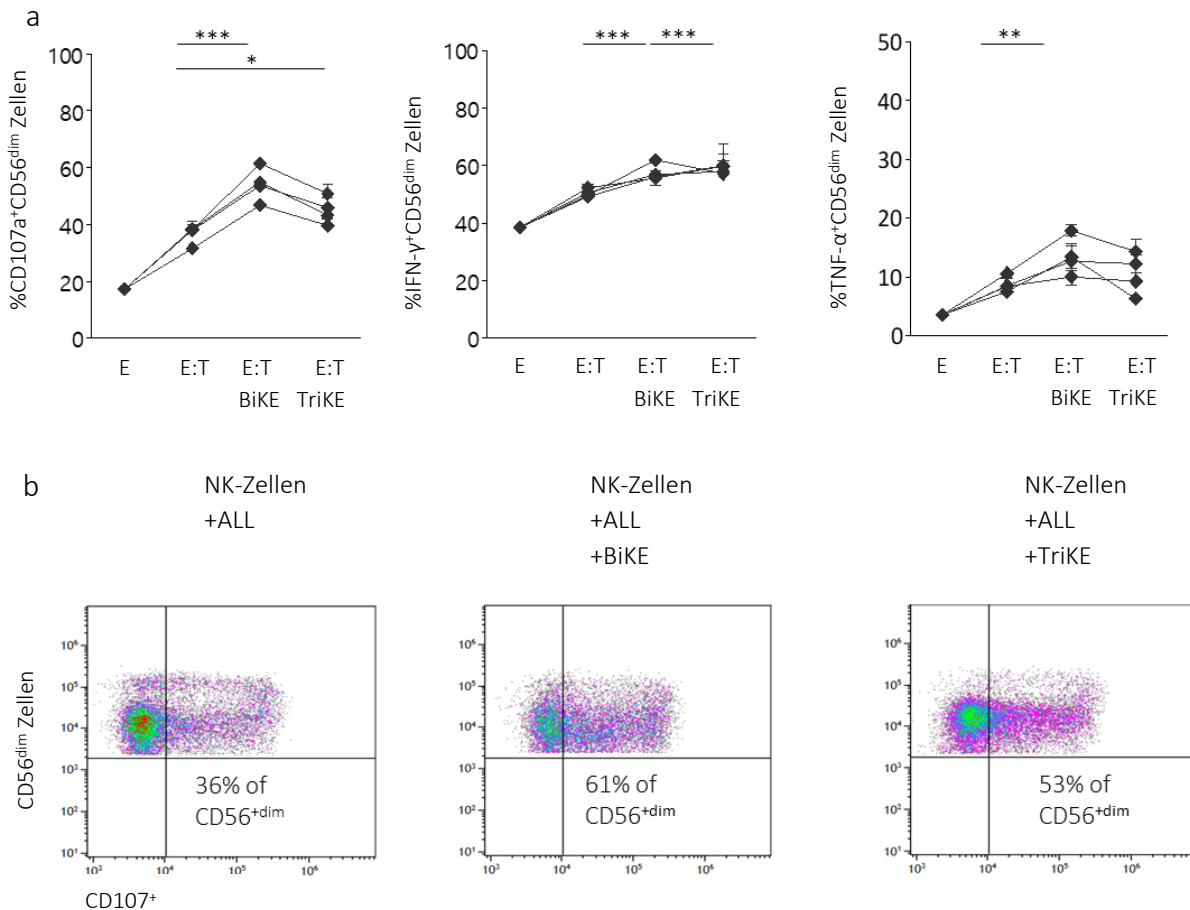


Abbildung 33: BiKE und TriKE vermittelte NK-Zell Aktivierung gegen ALL Blasten. (a) Degranulationsassay, sowie intrazelluläre IFN- γ und TNF- α Produktion. CD33 depletierte PBMCs wurden über Nacht mit IL2 stimuliert und am nächsten Morgen für 5h mit den *target* Zellen (pädiatrische ALL Blasten) und +/- 10 μ g/mL BiKE oder TriKE ko-kultiviert, sowie durchflusszytometrisch analysiert. Die Messung bestand aus vier Konditionen: In der ersten Kondition (E) wurde die spontane Degranulation und Zytokin-Ausschüttung des Effektors gemessen. In der zweiten (E: T) führte man die Effektorzellen (n=2) mit den ALL Blasten zusammen (n=4). Erst in Kondition 3 (E: T+ BiKE) und 4 (E: T+ TriKE) wurden die therapeutischen Antikörper zu der Kokultur aus Blasten und gesunden Effektorzellen hinzugegeben. Die verbundenen Punkte symbolisieren den Verlauf für je eine Patientenprobe. Die Ergebnisse wurden über einen gepaarten t-Test miteinander verglichen (*p<0,01; **p<0,001; ***p<0,0001, E: T, 10:1). (b) Exemplarische Darstellung der CD107a Degranulation der NK-Zellen eines gesunden Spenders gegen die leukämischen Zellen einer ALL Patientenprobe +/- BiKE/TriKE.

Die Zugabe des bispezifischen CD16xCD33 BiKE Antikörpers führte zu einer signifikanten Steigerung der NK-Zell Degranulation, sowie zu einer erhöhten Zytokin-Produktion im Vergleich zu den nur mit Effektorzellen kokultivierten *target* Zellen. Die Zugabe des TriKE Antikörpers CD16xIL15xCD33 führte zwar auch zu einer Induktion der Degranulation und IFN- γ Produktion, übertraf die Potenz des bispezifischen Antikörpers jedoch nicht (Abbildung 33). In der folgenden Analyse wurden primäre leukämische Zellen von pädiatrischen AML Patienten als *target* Zellen verwendet. Der Versuchsablauf entsprach dem des ALL Protokolls. Auch hier übertraf die Wirkungsweise des TriKE Antikörpers nicht die des bispezifischen Konstruktes (Daten nicht gezeigt), (Abbildung 34).

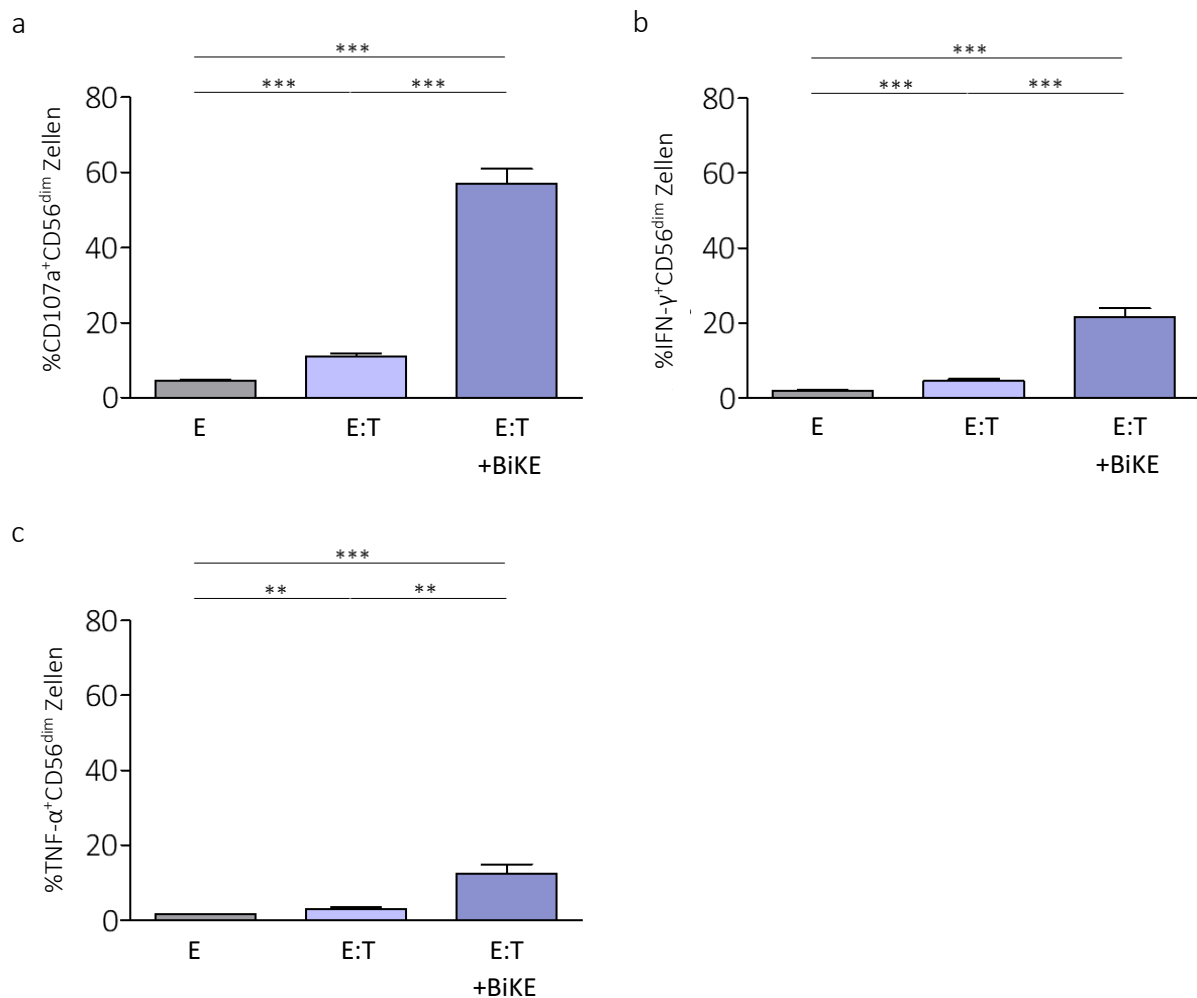


Abbildung 34: BiKE vermittelte NK-Zell Aktivierung gegen AML Blasten. (a) Degranulationsassay sowie (b) intrazelluläre IFN- γ und (c) TNF- α Produktion. CD33 depletierte PBMCs wurden über Nacht mit IL2 stimuliert und am nächsten Morgen für 5h mit den *target* Zellen (pädiatrische AML Blasten) und +/- 10 μ g/mL BiKE ko-kultiviert, sowie durchflusszytometrisch analysiert. Die Messung bestand aus vier Konditionen: In der ersten Kondition (E) wurde die spontane Degranulation und Zytokin Ausschüttung des Effektors gemessen. In der zweiten (E: T) führte man die Effektorzellen (n=2) mit den AML Blasten zusammen (n=4). Erst in Kondition 3 (E: T+ BiKE) wurde der therapeutische Antikörper zu der Kokultur aus Blasten und gesunden Effektorzellen hinzugegeben. Die Ergebnisse wurden über einen gepaarten t-Test miteinander verglichen (**, p<0,001; ***, p<0,0001, E: T, 10:1).

Der funktionale Assay mit den leukämischen Zellen der AML Patienten lieferte vergleichbare Ergebnisse. Die Zugabe des bispezifischen CD16xCD33 BiKE Antikörpers führte zu einer signifikanten Steigerung der NK-Zell Degranulation, sowie zu einer erhöhten Zytokin-Produktion im Vergleich zu den nur mit Effektorzellen kokultivierten *target* Zellen. Die Zugabe des TriKE Antikörpers übertraf auch hier die Potenz des bispezifischen Antikörpers nicht (Abbildung 34), (Daten nicht gezeigt).

Im nächsten Schritt wurde die natürliche, sowie antikörperabhängige Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber den Blasten mittels CFSE Assay analysiert. Die *target* Zellen wurden mit 5-(6)-carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE) behandelt. Dieser Stoff fluoresziert

nicht und kann durch die Zellmembran in die Zelle eindringen. Innerhalb der Zelle werden die Acetyl-Reste durch das Enzym Esterase entfernt. So entsteht 5-(6)-Carboxy-fluorescein succinimidyl ester (CFSE), welches fluoresziert und über die Succinimidyl-Ester kovalent an Proteine bindet und dadurch in der Zelle bleibt (De Clerck, *et al* 1994). Propidium-Iodid (PI) interkaliert zwischen die Basen von Nukleinsäuren. Daher wird PI zur Unterscheidung von toten und lebenden Zellen eingesetzt (tote Zellen: PI⁺; lysierte Zellen, die zu Beginn vital waren: CFSE⁺PI⁺ und lebende Zellen: CFSE⁺), (Abbildung 35).

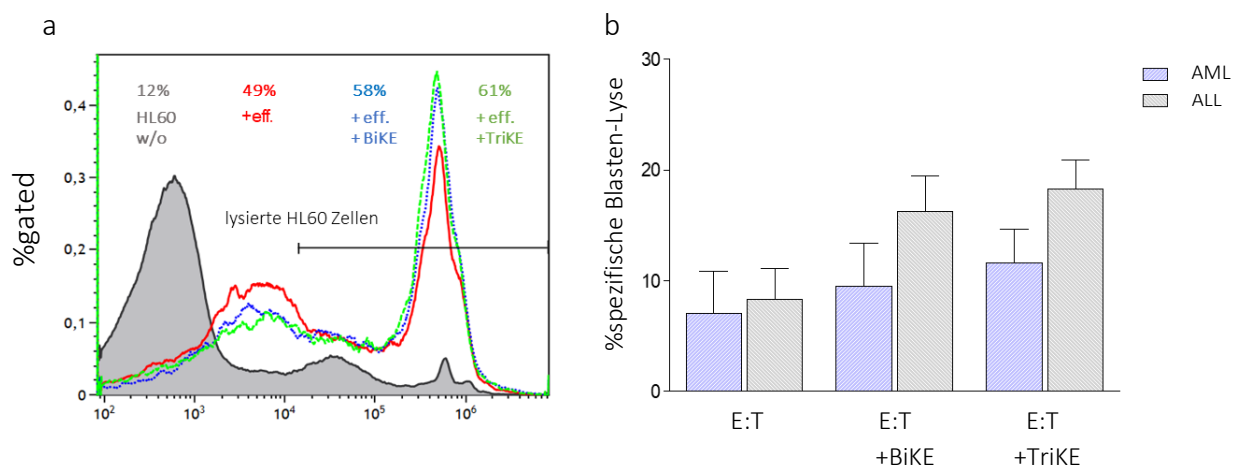


Abbildung 35: BiKE und TriKE vermittelte NK-Zell Zytotoxizität. (a) Exemplarische Darstellung der NK-Zell-vermittelten Lyse der CD33⁺ Zelllinie HL60. Das graue Histogramm stellt die spontane Lyse der HL60 Zellen dar, das rote Histogramm stellt den Ansatz mit Effektorzellen (PBMCs eines gesunden Spenders), das blaue bzw. grüne Histogramm die Ansätze mit Effektorzellen sowie BiKE bzw. TriKE dar. **(b)** Als *target* Zellen wurden je vier AML sowie ALL Patientenproben verwendet und mit den NK-Zellen gesunder Spender (Effektorzellen) +/- BiKE/TriKE ko-kultiviert. Die Säulen repräsentieren die gemittelte sowie auf die spontane Lyse der AML/ALL Blasten (n=4) normalisierte Zytotoxizität zweier gesunder Individuen (n=2). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

Die beiden therapeutischen Antikörper waren in der Lage, die Zytotoxizität der NK-Zellen gesunder Spender gegenüber der CD33⁺ Zelllinie HL-60 potent zu steigern. Jedoch konnte nur eine geringfügige Steigerung der Zytotoxizität der gesunden NK-Zellen gegenüber den AML (7% w/o Antikörper, 9% +BiKE, 11,6% +TriKE) sowie ALL (8,5% w/o Antikörper, 16% +BiKE, 18,5%+TriKE) Blasten erzielt werden. Die ALL Blasten ließen sich im Vergleich zu den AML Blasten stärker lysieren, wobei dieser Effekt nicht signifikant war (Abbildung 35).

3.10.2 Antileukämische Effektor Funktion von autologen NK-Zellen

Es ist bekannt, dass NK-Zellen von Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen ausgeprägte phänotypische Veränderungen sowie Funktionsdefizite aufweisen. So publizierten bereits mehrere Arbeitsgruppen, dass NK-Zellen von AML Patienten eine reduzierte Expression der Natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren NKp30 sowie NKp46 aufweisen. Der inhibitorische Rezeptor NKG2A hingegen wies eine erhöhte Frequenz auf. Diese phänotypischen Veränderungen gingen mit funktionalen Defiziten, wie einer verminderten Degranulation, Zytokin-Produktion (IFN- γ und TNF- α) sowie Zytotoxizität, einher (Costello, *et al* 2004, Fauriat, *et al* 2007, Stringaris, *et al* 2014). In MDS Patienten konnte Hejazi *et al.* drei verschiedene Gruppe von NK-Zellen definieren: Die Erste bestand aus Patienten mit einer normalen NK-Zellzahl sowie Funktion, die Zweite aus Patienten mit normaler NK-Zellzahl jedoch eingeschränkter Funktion, und die letzte aus einer kleinen Gruppe Patienten die sich durch das fast vollständige Fehlen von NK-Zellen kennzeichneten (Hejazi, *et al* 2015). In den folgenden Analysen lag der Fokus nunmehr darauf, die immunstimulierenden Fähigkeiten der beiden therapeutischen Antikörper auf die **autologen NK-Zellen** der pädiatrischen AML und ALL Patienten zu beleuchten. Wie in den vorhergehenden Experimenten wurden funktionale Analysen bezüglich Degranulation, Zytokin-Produktion und Zytotoxizität durchgeführt. Auf Grund des limitierten Probenmaterials konnten einige funktionale Analysen (CD107 und Zytokin-Produktion) nur mit BiKE Antikörper sowie AML Patientenmaterial durchgeführt werden (Abbildung 36).

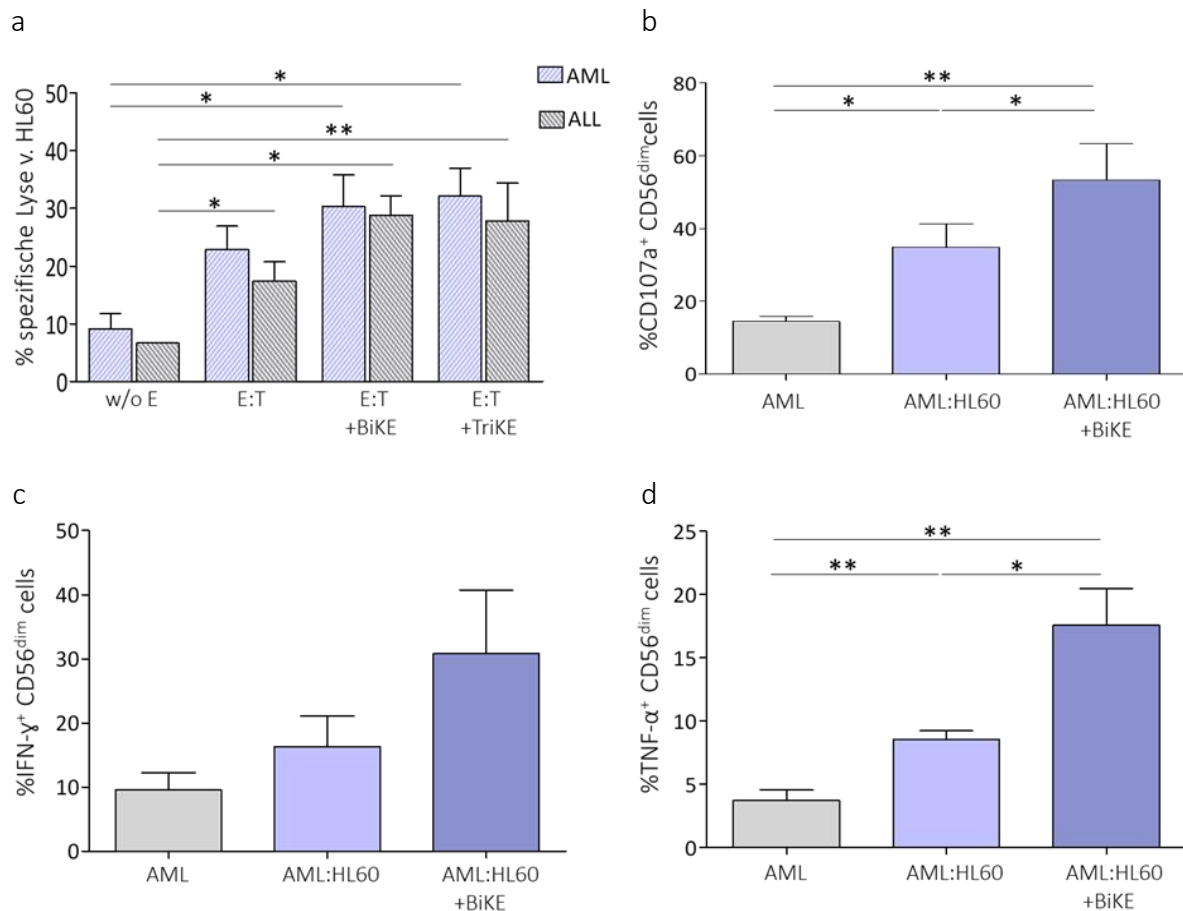


Abbildung 36: BiKE und TriKE vermittelte NK-Zell Aktivierung autologer AML/ALL NK-Zellen gegen die CD33⁺Zelllinie HL60. (a) NK-Zell Zytotoxizität autologer AML sowie ALL Proben gegenüber der CD33⁺ Zelllinie HL60 in Kombination +/- BiKE/TriKE (n=4). Im ersten Ansatz (w/o E) wurde die spontane Lyse der *target* Zellen ermittelt. Es folgten weitere Ansätze mit Effektor und *target* Zellen (E: T), sowie in Kombination mit BiKE oder TriKE (E: T+ BiKE/TriKE). (b-d) Degranulationsassay sowie intrazelluläre IFN-γ und TNF-α Produktion. Die Zellen von vier AML Patienten wurden über Nacht mit IL2 stimuliert und am nächsten Morgen für 5h mit den *target* Zellen (HL60) und +/- 10μg/ml BiKE ko-kultiviert sowie durchflusszytometrisch analysiert. Die Messung bestand aus 4 Konditionen: In der ersten Kondition (AML) wurde die spontane Degranulation und Zytokin-Ausschüttung des Effektors (AML) gemessen. In der zweiten (AML: HL60) führte man die Effektorzellen (n=4) mit der HL60 Zelllinie zusammen. Erst in Kondition drei (AML: HL60 + BiKE) wurde der therapeutische Antikörper zur Kokultur aus AML Effektorzellen und HL60 hinzugegeben. Die Säulen repräsentieren die gemittelte Werte von vier AML Patienten gegen HL60. Die Ergebnisse wurden über einen ungepaarten t-Test miteinander verglichen (n=4, *p<0,01; **p<0,001, E: T, 10:1).

Im zytotoxischen Assay konnte die Effektor Funktion der AML und ALL Patienten in den Ansätzen mit BiKE und TriKE gegenüber der CD33⁺ Zelllinie HL60 signifikant gesteigert werden. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Behandlung der Patienten NK-Zellen mit den beiden therapeutischen Antikörpern eine Reaktivierung der Funktionalität (Zytotoxizität, Degranulation und Zytokin-Produktion) mit sich führte. In den AML Patienten konnte die Lyse von 23% (ohne BiKE) auf 31% mit BiKE und 32% mit TriKE gegenüber HL60 gesteigert werden. Ein ähnliches Bild ergab sich für die ALL Patienten: Ohne die therapeutischen Antikörper betrug die Lyse der HL60 Zellen 17%, mit BiKE Antikörper 29% und mit TriKE Antikörper 28%. Anhand

vorhergehender Analysen mit gesunden Spendern (Daten nicht gezeigt) wurde eine 25%ige spezifische Lyse als Grenzwert für eine gesunde NK-Zell Funktionalität festgelegt (Abbildung **36**). Neben der zytotoxischen Funktion konnte eine signifikante Steigerung der Zytokin- Sekretion, sowie Degranulation beobachtet werden. Normwerte wurden erneut anhand von Analysen mit gesunden Spendern wie folgt definiert: >40% (CD107), >15% (IFN- γ) und >10% (TNF- α). Die Degranulation der NK-Zellen der AML-Kohorte konnte mit BiKE Antikörper von 34,5% auf 53,5%, die IFN- γ Sekretion von 16,5% auf 31%, sowie die TNF- α Produktion von 9% auf 17% gesteigert werden. Bei der IFN- γ Produktion konnten zwei Patientenproben nicht erfolgreich stimuliert werden.

4. Diskussion

Die pädiatrische ALL ist durch eine gestörte Hämatopoese, in Form von einer Überproduktion unreifer weißer Blutzellen, im peripheren Blut gekennzeichnet. Die ALL ist hierbei nicht auf eine bestimmte Stelle im Körper beschränkt, sondern kann vom Knochenmark ausgehend das Blut, das lymphatische System und weitere Organe befallen. Mit einem Anteil von ca. 80%, stellt die akute Leukämie die häufigste Form der Leukämie bei Jugendlichen zwischen null und 14 Jahren dar und macht in etwa ein Drittel aller Krebserkrankungen im Kindes- und Jugendalter aus. Obwohl ein nachhaltiger Therapieerfolg mittlerweile in ca. 80% der Fälle erzielt werden kann, konnten bisher nur mäßige Erfolge bezüglich des Langzeitüberlebens von kindlichen Patienten mit einer Hochrisiko ALL erzielt werden. Verschiedene zelluläre und Antikörper-basierte Immuntherapien stellen vielversprechende Ansätze dar, um das Langzeitüberleben, die Rezidiv-Raten nach Transplantation und das Therapieansprechen zu verbessern und zu optimieren. Bedauerlicherweise zeigen gerade akute Leukämien vielfältige *immune-escape* Mechanismen und darin resultierend ein hohes Maß an Resistenzen gegenüber Immunzellen und Immuntherapien. Ziel dieser Arbeit war es, die Resistenz- und *immune-escape* Mechanismen der pädiatrischen akuten Leukämien besser zu charakterisieren und methodische Ansätze zu entwickeln, um Therapiemöglichkeiten aufzuzeigen. Ein besonderes Augenmerk lag hierbei auf der HLA-Klasse I Oberflächenexpression der Leukämiezellen. Gesunde Zellen exprimieren eine definierte Auswahl an HLA-Klasse I Molekülen. Diese Selbstsignatur schützt körpereigene Zellen vor der Lyse durch autologen NK-Zellen. Bekannt ist, dass verschiedene Leukämieformen eine Modifikation ihrer HLA-Klasse I Expression auf u.a. allelischen, aber reversiblen Niveau vorgenommen haben (Brouwer, *et al* 2002b, Verheyden, *et al* 2009). Das bedeutet, dass maligne Zellen oft eine reduzierte Expression und nur in seltenen Fällen einen totalen Verlust an HLA-Klasse I Allelen aufweisen. Erste Analysen offenbarten eine gesonderte und zugleich zentrale Rolle des nicht klassischen HLA-Klasse I Moleküls HLA-E, weswegen der Fokus der weiteren Analysen auf HLA-E lag. In den bisherigen Arbeiten lag das Hauptaugenmerk auf der Analyse der klassischen HLA-Klasse I Moleküle, jedoch nicht auf HLA-E. Weiterhin beschäftigten sich die wenigen publizierten Studien bisher weitestgehend mit adulten akuten Leukämien, wohingegen das in dieser Arbeit analysierte Patientenkollektiv ausschließlich aus pädiatrischen ALL Patienten bestand.

Um die Komplexität der vielseitigen *immune-escape* Mechanismen der Tumoren zu verstehen, ist es von Nöten, einen Blick auf die autologen NK-Zellen von hämatologisch erkrankten Patienten zu werfen. Neben der Reduktion stimulatorischer und der Überexpression inhibitorischer Liganden auf der Leukämiezelle sowie der Blockade von Rezeptor/Liganden Interaktionen durch Tumor-sezernierte Moleküle weisen autologe NK-Zellen erkrankter Patienten selbst oft einen veränderten Phänotyp sowie gravierende funktionale Defekte auf. Ein wichtiger Analyseaspekt galt daher der Charakterisierung phänotypischer, sowie funktionaler Unterschiede der NK-Zellen von ALL- und AML-Patienten. Als Vergleichskohorte dienten gesunde Spender. Hierfür wurden NK-Zell spezifische Oberflächenmoleküle wie das hauptsächlich für ADCC verantwortliche Oberflächenantigen CD16 untersucht. Des Weiteren wurden die zytotoxischen Moleküle Granzym B und Perforin, sowie die beiden Natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren NKp30 und NKp46 analysiert. Die zuletzt genannten Moleküle spielen alle eine essentielle Rolle in der Erkennung und Eliminierung von Tumor- sowie Virusinfizierten Zellen. Vor allem im Feld der Leukämien sind sowohl Funktionsdefizite der autologen NK-Zellen, als auch Resistenzen gegenüber der Lyse von alloreaktiven NK-Zellen bekannt (Fauriat, *et al* 2007, Hejazi, *et al* 2015, Ruggeri, *et al* 1999). Diese Hochrisikogruppen erfordern immuntherapeutische Alternativen zu den bisher praktizierten Therapiemöglichkeiten. Eine Strategie ist die Stimulation der antileukämischen NK-Zellantwort durch humanisierte, therapeutische Antikörper. Der Fokus der weiteren Analysen lag daher auf der Stimulation der antileukämischen Effektorfunktion von autologen und allogenen NK-Zellen mittels bispezifischem CD16xCD33 BiKE, sowie CD16xIL15xCD33 TriKE Antikörper. Die beiden Konstrukte sind nicht kommerziell erhältlich und wurden dankenswerterweise von Prof. Dr. Jeffrey S. Miller (Department of Medicine, University of Minnesota) zur Verfügung gestellt.

4.1. HLA-Klasse I Oberflächenexpression auf den T-Zellen pädiatrischer B-ALL Blasten

Im ersten Teil der Arbeit wurde die HLA-Klasse I Expression auf pädiatrischen B-ALL Blasten analysiert und mit der Oberflächenexpression auf Zellen gesunder Spender verglichen. Der Fokus lag hierbei auf den Liganden HLA-Bw4, -Bw6 und -C sowie den für NKG2A und -C spezifischen Liganden HLA-E. Das pädiatrische Patientenkollektiv umfasste 29 initiale Proben (Altersdurchschnitt: fünfeinhalb Jahre), dem gegenüber standen 32 gesunde Spenderproben. Es folgte die durchflusszytometrische Analyse von PBMCs beider Kohorten, mittels spezifischer, monoklonaler Antikörper. In Abhängigkeit vom Zelltyp, in der die maligne Veränderung stattgefunden hat, lässt sich die ALL in verschiedenen Subtypen u.a. in T-Zell- und B-Zell-Leukämien aufgliedern. Ca. 85% aller Fälle von ALL sind auf B-Zellleukämien zurückzuführen (Bunin, et al 2008, Schrappe, et al 2000). Eine Analyse der HLA Klasse I-Expression auf der T-Zellpopulation der B-ALL Patienten zeigte im Vergleich mit der T-Zellpopulation gesunder Spender keine signifikanten Unterschiede. Dieses Ergebnis legitimiert auf der einen Seite die T-Zellpopulation als gesunde Kontrollpopulation und bestätigt die maligne Klonalität in den B-Zellen der B-ALL Patienten.

4.2 Selektiv veränderte HLA-Klasse I Oberflächenexpression auf pädiatrischen B-ALL Blasten

Bei der B-ALL handelt es sich um eine maligne, klonale Neoplasie, die von lymphatischen B-Vorläuferzellen ausgeht. Das analysierte Patientenkollektiv bestand ausschließlich aus pädiatrischen B-ALL Patienten, weshalb im nächsten Schritt die HLA-Klasse I Expression auf den endogenen B-Zellen bzw. den entarteten Zellen (Blasten) analysiert wurde. Bisher gibt es nur wenige Studien, die sich mit der Rolle der HLA-Gene in der Pathogenese von Leukämien beschäftigen. Allgemein bekannt ist, dass maligne Zellen oftmals eine reduzierte Expression und in wenigen Fällen einen Verlust von spezifischen HLA-Klasse I Allelen aufweisen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen der HLA-Klasse I Oberflächenexpression auf pädiatrischen B-ALL Blasten bringen neue und interessante Kenntnisse hervor: in durchflusszytometrischen Analysen konnten für HLA-ABC (gesamt HLA-Klasse I) und die beiden vorwiegend auf HLA-B Allotypen exprimierten Epitope HLA-Bw4 und -Bw6 keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Oberflächenexpression zwischen den leukämischen B-Zellen

(Blasten) und den B-Zellen gesunder Spender gefunden werden (Reusing, *et al* 2016). Diese Ergebnisse stehen teilweise im Widerspruch zu einer bereits 2004 publizierten Studie von Demanet (Demanet, *et al* 2004b). In dieser Studie beschreibt Demanet, eine partielle Reduktion von HLA-Bw4 (14%, drei aus 36) und eine stark ausgeprägte Reduktion von HLA-Bw6 (44%, 16 aus 36) in AML und CML Patienten. Diese Erkenntnisse deuten auf einen HLA Phänotyp hin, der es den Tumorzellen erlaubt einerseits der zytotoxischen T-Zell Antwort, als auch der NK-Zell Antwort zu entgehen. In einer späteren Studie von Verheyden und Demanet, konnte die oben beschriebene Reduktion jedoch in einer Kohorte von 16 B-ALL Patienten nicht beobachtet werden (Verheyden, *et al* 2009). Beide Studien deuten auf einen selektiven und krankheitsspezifischen Mechanismus hin, der sich zwischen den verschiedenen Leukämieformen stark zu unterscheiden scheint. Weitere Studien berichten von Allel-spezifischen Herunterregulationen, die jedoch unregelmäßig und nicht in jedem analysierten Fall zu beobachten waren (Brouwer, *et al* 2002a, Elkins, *et al* 1984, Wetzler, *et al* 2001). Der Verlust der HLA-Klasse I Expression wurde auch in lymphoblastischen Zelllinien (Imreh MP *et al.* 1995, Nooij-van Dalen AG. *et al.* 1999), sowie im B-Zell-Lymphom (Amiot L. *et al.* 1998) beschrieben.

Im Vergleich zu den Expressionsveränderungen von HLA-A und -B, den primären Restriktionselementen der T-Zellen, ergab sich in dieser Arbeit ein sehr viel klareres Bild für die leukämiespezifischen Veränderungen der **HLA-C** und **-E** Expression. Im analysierten Patientenkollektiv war eine signifikante Herunterregulation der beiden Liganden zu beobachten, die vorwiegend von NK-Zellen erkannt werden. HLA-C und -E spezifische T-Zellen kommen im Gegensatz zu HLA-A und -B-restringierten T-Zellen eher selten vor. Bemerkenswerterweise war die Herunterregulation der beiden, im Vergleich zu HLA-A und -B vergleichsweise schwach exprimierten, HLA-C und -E Moleküle in jedem einzelnen Patienten konsequent nachvollziehbar. Das beschriebene Phänomen der HLA-C Herunterregulation ist im Einklang mit einer bereits 2009 von Verheyden veröffentlichten Studie. In dieser beschreibt Verheyden eine signifikante Reduktion von HLA-C in CLL, AML und auch ALL Patienten. Allerdings wurde in dieser Studie ein anderes Patientenkollektiv (Durchschnittsalter 23,5) und nur 33% der bekannten C-Allele analysiert. Interessanterweise schien die HLA-C Expression mit fortschreitender Pathogenese und somit steigender Blastenzahl zu korrelieren. So zeigten Patienten mit einer geringen Blastenzahl (<25%) annähernd ähnliche Level wie die gesunden Spender. Patienten mit einer mittleren Blastenzahl (25-80%) zeigten eine HLA-C^{low} und eine HLA-C^{high} (endogene B-Zellen) exprimierende Population, wohingegen Patienten mit einer

Blastenzahl >80% nur noch eine HLA-C^{low} Population mit einer sehr geringen HLA-C Expression aufwiesen (analog zu Abbildung 15). Eine noch konsequentere Herunterregulation konnte nur für **HLA-E** beobachtet werden. Das nicht klassische HLA-Klasse I Molekül wird ubiquitär in allen humanen Geweben transkribiert und weist eine hohe Homologie zwischen den Spezies auf. HLA-E ist mit 2 nicht synonymen funktionalen HLA-E Allelen, (HLA-E*01:01 und HLA-E*01:03) das am wenigsten polymorphe HLA-Mitglied. Beide Allele kommen mit einer vergleichbaren Häufigkeit in der kaukasischen Bevölkerung vor, unterscheiden sich jedoch in ihrer quantitativen Oberflächenexpression (Geraghty et al. 1992). HLA-E*01:03 ist das stärker exprimierte Allel. Trotz hohem intrazellulären Proteinlevel, ist die Oberflächenexpression hingegen eher schwach, teilweise um das 5-10fache geringer als HLA-C. Die Erkenntnis, dass HLA-E in jedem einzelnen Patienten eine Herunterregulation erfuhr, steht in einem starken Widerspruch zu vielen anderen malignen Krankheitsbildern. So stabilisieren bestimmte Virusformen die HLA-E Oberflächenexpression, indem sie für Peptide codieren, die die HLA-E Oberflächenexpression erhöhen, um so der NK-Immunantwort zu entkommen (Tomasec, *et al* 2000). In vielen tumorösen Entitäten (Mamma- und Ovarialkarzinom, Kolorektalem Karzinom etc.) wird HLA-E als negativer prognostischer Faktor beschrieben, der durch eine Überexpression in den entsprechenden Tumorarten gekennzeichnet ist (Andersson, *et al* 2016, de Kruijf, *et al* 2010, Levy, *et al* 2008, Lo Monaco, *et al* 2008). Gestützt wird die Beobachtung der konsequenten HLA-E Herunterregulation von einer Studie von Majumder et. al. Dieser analysierte 18 ALL Patienten auf ihre HLA-E Oberflächenexpression sowie die HLA-E Transkription in den malignen Zellen der leukämischen Patienten (AML, CML, CLL und ALL). Weder auf Transkriptebene noch auf der Zelloberfläche der malignen Zellen konnte eine HLA-E Expression nachgewiesen werden (Majumder, *et al* 2006). In der vorliegenden Arbeit zeigten Expressionsanalysen von HLA-C und HLA-E mittels quantitativer *real-time* PCR eine moderate Reduktion von HLA-E auf mRNA Level. Die von Majumder postulierte Abwesenheit von HLA-E auf Transkript-Ebene konnte nicht bestätigt werden. Anhand der Ergebnisse dieser Studie lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei der HLA-C und -E Herunterregulation um einen Mechanismus handelt, der sich auch posttranskriptionell abspielt. Die beschriebene Herunterregulation von HLA-E konnte unabhängig von der Allel Variante beobachtet werden. Auch die Hypothese, dass eine Assoziation zwischen einem bestimmtem HLA-E Genotyp bzw. einem bestimmten HLA-E Allel (HLA-E*01:01 (HLA-E^R) und HLA-E*01:03 (HLA-E^G)) und einer B-ALL besteht, konnte nicht bestätigt werden.

4.3 HLA-E als früher prognostischer Rezidiv Marker und Zielstruktur für antikörper-basierte Immuntherapien

Auf Grund der in allen untersuchten Fällen beobachteten HLA-E Herunterregulation entstand die Frage, ob HLA-E eine Rolle in der Pathogenese der Leukämie spielt und ob HLA-E ein frühzeitiger Indikator für ein Rezidiv ist. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden 34 B-ALL Patienten zu verschiedenen Therapiezeitpunkten hinsichtlich ihrer HLA-E Expression durchflusszytometrisch analysiert. Teilweise war es möglich einzelne Patienten über einen Zeitraum von bis zu fünf Jahren zu analysieren. Acht Patienten wurden doppelt in die Analysen eingeschlossen, da sie entweder mehrere KMT unterliefen und/oder mehrfach rezidierten. Es wurde eine Unterteilung in Patienten mit Chemotherapie (n=23) oder Knochenmarkstransplantation (n=19) vorgenommen. Innerhalb der Gruppe der Patienten, die eine Chemotherapie erhielten rezidierten sechs Patienten, innerhalb der Gruppe der Patienten mit einer KMT rezidierten elf Patienten. Bemerkenswerterweise zeigten alle Patienten, die ein Rezidiv erlitten, unabhängig von der Therapieform einen signifikanten Abfall ihrer HLA-E Oberflächenexpression, wohingegen die Patienten ohne Rezidiv über mehrere Jahre hinweg ein stetig konstante HLA-E Oberflächenexpression zeigten (Abbildung 19 und Abbildung 20). In dieser Arbeit war es möglich, engmaschig die HLA-E Oberflächenexpression dreier Patienten zu analysieren, die in einem Zeitraum von eineinhalb-zwei Jahren zwei Mal transplantiert wurden und anschließend rezidierten. Als Basislinie wurden das HLA-E Expressionsniveau des jeweiligen Spenders definiert. Bei allen drei Patienten war nach KMT im Verlauf der Zeit eine klare und kontinuierliche Reduktion der HLA-E Oberflächenexpression bis hin zum Rezidiv zu verzeichnen. Eine anerkannte und sensitive Methode zur frühzeitigen Erkennung eines Rezidives ist die Bestimmung der „Minimale Resterkrankung“ (*minimal residual disease, MRD*). Bei der molekulargenetischen Bestimmung der MRD werden Leukämie-spezifische DNA Sequenzvarianten, chromosomale Translokationen und genomische *Rearrangements* mit einer Nachweisgrenze von 0,01-0,001% (1 Zelle aus 10.000- 1 Zelle aus 100.000) detektiert. Das gewonnene Probenmaterial stammt aus dem Knochenmark des Patienten. Erfreulicherweise zeigte ein Abgleich mit den vorliegenden MRD Daten, dass das Expressionsniveau von HLA-E mit den MRD Daten korrelierte. Nicht zuletzt dieses Erkenntnis deutet auf die überraschend hohe Sensitivität und Exklusivität von HLA-E hin. HLA-E scheint ein geeigneter prognostischer Marker für die frühe Erkennung eines Rezidives darzustellen. Da es sich bei dem analysierten Material ausschließlich um Proben aus dem peripheren Blutkreislauf handelte, scheint die

durchflusszytometrische HLA-E Analyse eine geeignete Methode zu sein, um gängige Analyseverfahren zur Leukämietypisierung zu unterstützen.

Eine Frage, die sich auf Grund dieser Ergebnisse beinahe schon zwingend aufdrängt, ist die Frage nach der biologischen Relevanz dieser Beobachtungen. Durch die Reduktion der HLA-E Oberflächenexpression kommt es zu keiner oder höchstens zu einer geringen Interaktion mit dem inhibitorischen Rezeptor NKG2A. Die fehlende Inhibition sollte die leukämische Zelle im Normalfall für die NK-Zellen angreifbar machen. Die beschriebenen Resistenzen deuten jedoch vielmehr daraufhin, dass auf der einen Seite trotz geringer HLA-E Level die Inhibition der NK-Zelle erfolgt und auf der anderen Seite noch weitere *immune-escape* Mechanismen parallel dazu die leukämische Zelle vor der Lyse schützen. So konnte Verheyden zeigen, dass ALL Patienten mit einer erhöhten Frequenz im Vergleich zu einer gesunden Kontrollkohorte für den aktivierenden Rezeptor NKG2C negativ waren. Weiterhin publizierte Verheyden, dass B-ALL Zellen für die Liganden MICA/B negativ sind und ebenso ein sehr geringes Level an anderen NK-Zell aktivierenden Liganden (Nectin-2, CD48, unique long 16-binding proteins= ULBPs, polivirus receptor=PVR etc.) exprimieren (Verheyden and Demanet 2008). Um die Frage zu klären, ob das geringe HLA-E Level auf den Blasten ausreicht, um die NK-Zelle zu inhibieren wurden in der vorliegenden Arbeit entsprechende funktionale Analysen durchgeführt. Im Folgenden wurde die NKG2A-HLA-E Interaktion zwischen gesunden NK-Zellen und primären ALL Blasten über einen anti-HLA-E Antikörper (3D12) sowie über anti-HLA-ABC (W6/32) blockiert und CD107 auf CD56^{NKG2A+KIR}- Zellen analysiert. Die Antikörper vermittelte HLA-E-NKG2A Blockade führte zu einer signifikant erhöhten NK-Zell Degranulation, was die Schlussfolgerung zulässt, dass die HLA-E Level auf den Blasten ausreichen um die NK-Zelle erfolgreich zu inhibieren. Erst kürzlich publizierte Studien unterstreichen die tragende Rolle der Rezeptor-Liganden-Interaktion zwischen HLA-E und NKG2A. So publizierte die Gruppe um Eric Vivier, dass die Blockade von NKG2A als Immuncheckpoint-Inhibitor, ein neuer Ansatzpunkt sei, um die anti-Tumor-Immunität von NK-, sowie T-Zellen zu fördern. In der Studie kam ein humanisierter anti-NKG2A Antikörper (Monalizumab) zum Einsatz. Die Blockade des inhibitorischen NKG2A Rezeptors führte zu einer gesteigerten NK-Zell Aktivität gegen verschiedene Tumorzellen und zur Funktionserhaltung von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (Andre, *et al* 2018). Weitere Studien, die sich mit der Blockade des inhibitorischen Rezeptors NKG2A beschäftigen, weisen auf das große immuntherapeutische Potential hin. So beschrieb unter anderem Kamiya *et al.* eine wesentlich gesteigerte NK-Zell Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen, nach retroviraler Transduktion

humaner NK-Zellen mit einem NKG2A *Protein-Expression-Inhibitor* (Kamiya, *et al* 2019, Muntasell, *et al* 2017, Ruggeri, *et al* 2016). Diese Studien unterstreichen das klinische Potenzial der NKG2A-HLA-E Interaktion und die immunmodulierenden Möglichkeiten, die diese beiden Moleküle bieten.

4.4 HLA-E als Marker des malignen Klons

Die Hämatopoese in Leukämiepatienten verläuft klonal- das bedeutet, dass die malignen Zellen auf eine oder wenige entartete hämatopoetische Stammzellen zurückgehen. Bei Jugendlichen mit einer B-ALL gehen Deletionen wie IKZF1 (*Ikaros family zinc finger protein 1*), CDKN2A/B (cyclin-dependant kinase inhibitor 2A/B) oder auch EBF1 (*early B cell factor 1*) mit einer ungünstigen Prognose einher. Die genannten genetischen Deletionen korrelieren mit einem erhöhtem Rezidiv-Risiko, schlechterem Therapieansprechen und einem negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben (Neumaier 2016). Im Rahmen dieser Arbeit wurde HLA-E als möglicher Marker des malignen Klons in zwei ALL Patienten mit CDKN2A/B Deletion oder Philadelphia-Chromosom analysiert. Ca. 52% der Philadelphia-Chromosom positiven ALL Patienten tragen zusätzlich eine Deletion im *ikzf1*-Gen (Neumaier 2016). Für die Analysen wurden die B-Zellen/Blasten der beiden Patienten über CD45 und HLA-E in zwei Populationen (CD19⁺CD45⁺HLA-E^{high} und CD19⁺CD45⁻HLA-E^{low}) unterteilt, durchflusszytometrisch sortiert und via FISH-Analysen analysiert. Von beiden Patienten wurden jeweils die Initialprobe und die Probe zum Zeitpunkt des Rezidives analysiert. In Patient 3 mit CDKN2A Deletion zeigten 25,4% bzw. 6,7% in der CD19⁺CD45⁺HLA-E^{high} und 98,8% bzw. 93,3% in der CD19⁺CD45⁻HLA-E^{low} Population die genetische Aberration. Hinzuzufügen ist, dass nach der Sortierung der Initialprobe die beiden Populationen engmaschiger eingegrenzt wurden, um ein besseres Sortierungsergebnis zu erzielen. Der zweite analysierte Patient (Patient 4) wies das Philadelphia-Chromosom auf. In der Initialen Probe zeigten 1,6% der high Population und 23,7% der low Population das Philadelphia Chromosom. Ähnlich verhielt es sich mit der Rezidiv-Probe, hier zeigten 1,8% in der CD19⁺CD45⁺HLA-E^{high} Population und 49,4% CD19⁺CD45⁻HLA-E^{low} Population die genetische Translokation. In der CD19⁺CD45⁻HLA-E^{low} Population wurde ein zusätzliches Fusionssignal aufgefunden: 49,1% der Zellen zeigten ein zusätzliches Signal (49,1% Ph+Ph), wobei es sich wahrscheinlich um ein zusätzliches Philadelphia Chromosom handelt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es sich bei der Entstehung des malignen Klons um ein

dynamisches Kontinuum handelt, was auch die kontinuierliche HLA-E Herunterregulation widerspiegelt. Die Analysen deuten darauf hin, dass die Herunterregulation von HLA-E weitestgehend mit der Etablierung bzw. dem Wiederauftreten der klonalen genetischen Aberration übereinstimmt. Die erlangten Ergebnisse stützen die Rolle von HLA-E als frühzeitiger prognostischer Marker in der Erkennung eines entstehenden Rezidivs.

4.5 Identifikation von phänotypischen Unterschieden zwischen gesunden und leukämischen NK-Zellen: Ursachen für die beobachteten Defekte in der NK-Zellfunktion

Die Leukämien unterscheiden sich in myeloische und lymphatische Leukämien, die entweder chronisch oder akut verlaufen können. Mit rund 80% stellt die ALL die häufigste, die AML mit 15-20% die zweithäufigste Leukämieform im Kindesalter dar. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen der NK-Zellen lieferten die folgenden Ergebnisse: In den durchflusszytometrischen Analysen wurden die NK-Zellen als CD56⁺CD3⁻CD45⁺ definiert. Da einige Leukämien eine CD56 Expression auf ihren Blasten aufweisen, konnte über CD45, ein Antigen, welches schwach bis kaum auf den unreifen Blasten exprimiert wird, eine Differenzierung zwischen Blasten und endogenen NK-Zellen erfolgen. Dazu wurden andere NK-Zellmarker, wie CD16, Granzym B, Perforin, NKp30 sowie NKp46 in 8 pädiatrischen AML und ALL Patienten, sowie in 17 gesunden Spendern analysiert. Ein Vergleich der Frequenzen ergab, dass gesunde Spender signifikant mehr CD16, Granzym B, Perforin, NKp30 sowie NKp46 als ALL und AML Patienten exprimieren. Aus logistischen Gründen erfolgten die Analysen aus kryokonserviertem Material. Um auszuschließen, dass die reduzierten Frequenzen eine Folge der Kryokonservierung waren, wurden Analysen aus frisch-isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes und eingefrorenem Material, von den selben Spendern vorgenommen. Die durchgeführten Analysen der unterschiedlich behandelten Zellen stimmten in ihrer Frequenz miteinander überein. Somit konnte sichergestellt werden, dass es sich um absolut vergleichbare Ergebnisse handelt.

4.6 Verminderte Expression von CD16, Granzym B und Perforin

Eine Besonderheit der NK-Zellen ist ihre Fähigkeit neben der natürlichen Zytotoxizität die sogenannte antikörper-abhängige Zytotoxizität (ADCC) auszuführen. Diese Reaktion beruht auf der Interaktion zwischen dem aktivierenden NK-Zell Rezeptor Fc γ RIII (CD16) und spezifischen IgG Antikörpern auf der Oberfläche der Zielzelle. Infizierte Zellen präsentieren erregerspezifische Antigene auf ihrer Oberfläche, die von spezifischen Antikörpern des Immunsystems gebunden werden können. Der Fc-Teil dieser Immunglobuline dient als Bindungsstelle für den zur Ig-Superfamilie gehörenden, niedrigaffinen Fc-Rezeptor (Fc γ RIIIa) CD16. Ca. 90% der im Blut zirkulierenden zytotoxisch aktiven NK-Zellen (CD56^{dim}-Zellen) exprimieren CD16 (Lanier, *et al* 1988). Bindet CD16 an den Komplex aus Antikörper und Zielzelle, kommt es ohne die Transduktion eines weiteren aktivierenden Signals zur Degranulation der zytotoxischen Granula und zur Lyse der *target* Zellen (Mandelboim, *et al* 1999). Die Analyse der CD16 Frequenz auf CD56^{dim}-Zellen in ALL und AML Patienten ergab eine signifikante Reduktion des NK-Zell Rezeptors. Die CD16 Frequenz der AML Patienten betrug im Mittel 80%, die der ALL Kohorte 87%, wohingegen die Frequenz der gesunden Spender 96% betrug. Frühere Expressionsstudien in MDS (Myelodysplastisches Syndrom, Vorstufe einer sekundären AML (Leukämie)) Patienten stützen diese Beobachtungen. Das analysierte MDS Patientenkollektiv zeigte eine signifikant reduzierte CD16 Expression. In den MDS Patienten war eine Reduktion der CD16 Expression auf 63% im Vergleich zu 89% in gesunden Spendern zu verzeichnen (Gleason, *et al* 2014). Da es sich bei dem analysierten Patientenkollektiv um initiale, sowie pädiatrische Proben handelt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine weitere Reduktion von CD16 im Verlauf der Pathogenese der Leukämie erfolgt (Abbildung 3a).

Ein anderer Mechanismus, der die Zytotoxizität der NK-Zellen vermittelt ist die Ausschüttung der zytotoxischen Moleküle Granzym B und Perforin aus der NK-Zell-Granula. Nach der Degranulation werden die zytotoxischen Moleküle in die immunologische Synapse entlassen (Diefenbach and Raulet 2001). Es gibt verschiedene Theorien, die kontrovers die Rolle von Perforin im Eintrittsmechanismus von Granzym B in die Zielzelle diskutieren. Die erste Theorie besagt, dass Perforin die Zellmembran permeabilisiert, wodurch Granzym B in die Zielzelle gelangen kann. Zweite geht davon aus, dass sowohl Perforin als auch Granzym B endozytotisch von der Zielzelle aufgenommen werden und Perforin die endosomale Membran perforiert, wodurch Granzym B ins Zytosol entlassen werden kann (Cullen and Martin 2008, Voskoboinik,

et al 2010). Bisher liegen nur wenige Daten über die Expression von Granzym B und Perforin in pädiatrischen ALL sowie AML Patienten vor. Um zu überprüfen ob die Granula der NK-Zellen der AML und ALL Patienten mit Perforin und Granzym B beladen sind, wurde die Expression der beiden Moleküle mittels intrazellulärer Antikörperfärbung analysiert. Beide Moleküle wiesen in beiden Patientengruppen eine signifikant geringere Expression im Vergleich zur Kontrollkohorte auf. Granzym B wies in AML und ALL Patienten eine ähnlich starke Reduktion auf. Perforin hingegen wies in der ALL Kohorte eine signifikant reduzierte Oberflächenexpression im Vergleich zu der AML Kohorte auf. In der gesunden Kontrollkohorte betrug die gemittelte Expression von Granzym B 82%, die von Perforin 89% während nur 64% (AML) und 65% (ALL), sowie 80% (AML) und 65% (ALL) der NK-Zellen in Patienten Granzym B und Perforin exprimierten. 3 von 8 (37,5%) pädiatrischen ALL Patienten wiesen eine normale Granzym B sowie Perforin Expression auf. Hingegen wiesen sogar 50% der 8 pädiatrischen AML Patienten eine normale Granzym B und 62,5% (5 aus 8) eine normale Perforin Expression auf (Abbildung 3c). In beiden Kohorten wurde eine eindeutig signifikante Korrelation zwischen der Expression von Granzym B und Perforin beobachtet (Daten nicht gezeigt). Patienten mit einer verminderten Granzym B sowie Perforin Expression wiesen ebenfalls eine verminderte Zytotoxizität auf. Wohingegen MDS Patienten eine normale Degranulation, aber verminderte Zytotoxizität aufwiesen, so wurde in den pädiatrischen AML und ALL Patienten auch eine verminderte Degranulation beobachtet (Daten nicht gezeigt), (Hejazi, *et al* 2015). Dies spricht dafür, dass zum einen eine verminderte CD107a Mobilisierung, als auch die verminderte Expression der beiden Moleküle Granzym B sowie Perforin zu einer schwachen Zytotoxizität führen können. Eine weitere von Lehmann publizierte Studie belegt, dass es eine hohe Korrelation zwischen der Bindung von Perforin an die *target* Zelle und der Lyse-Effizienz (der *target* Zelle) durch NK-Zell Lysate existiert. Dies bedeutet, dass Tumorzellen, die eine Perforin Resistenz aufweisen, sich schlechter bis gar nicht lysieren lassen und eine geringere Suszeptibilität gegenüber NK-Zell-basierter Zytotoxizität zeigen (Lehmann, *et al* 2000, Uhrberg 2005a). Die Ergebnisse dieser Arbeit und bereits publizierte Analysen legen nahe, dass es eine Vielzahl an spezifischen Mechanismen gibt, die entweder auf autonome oder synergistische Weise die Tumorzelle vor der NK-Zell Lyse schützen.

4.7 Defiziente Expression von NKp30 und NKp46 in AML und ALL Patienten

Die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren NKp30, NKp44 und NKp46 weisen eine koordinierte und miteinander verknüpfte Expression auf. NKp44 stellt einen Spezialfall dar, da das Molekül erst nach *in vivo* oder *in vitro* Stimulation auf der Oberfläche zu detektieren ist. Die Analysen beschränkten sich daher auf die beiden Moleküle NKp30 sowie NKp46. Bisher wurden ausschließlich adulte AML, nicht jedoch pädiatrische, Patienten hinsichtlich ihrer NCR Expression analysiert. Für die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren NKp30 sowie NKp46 wurde eine signifikant unterschiedliche Oberflächenexpression in den pädiatrischen AML und ALL Patienten festgestellt. Die Oberflächenexpression der Kontrollkohorte betrug 80%, die der AML Patienten 18,5% und die der ALL Patienten 51%. Ein ähnliches Bild ergab sich für NKp46, wenn auch nicht ganz so drastisch wie für NKp30 (Abbildung 3b). In der Literatur werden 3 Typen anhand ihrer NCR Oberflächenexpression unterschieden: NCR^{bright} (hohe Dichte an Nkp30 und NKp46 Molekülen auf der Oberfläche), NCR^{dull} (geringe Dichte an Nkp30 und NKp46 Molekülen auf der Oberfläche), sowie NCR^{discordant} (hohe Dichte von NKp30 oder NKp46 bei zeitgleicher geringen Dichte des jeweiligen anderen Moleküls: NKp30^{bright}/NKp46^{dull} oder NKp30^{dull}/NKp46^{bright}). Ca. 80-90% der gesunden Spender weisen einen NCR^{bright} Phänotyp auf, wohingegen die restlichen 10-20% über einen NCR^{dull} Phänotyp charakterisiert werden. Ein gemischter Phänotyp (NCR^{discordant}) konnte bisher in gesunden Spendern nicht beobachtet werden, was bedeutet, dass die Expressionsdichte von NKp30 und NKp46 in gesunden Spendern korreliert (Costello, *et al* 2004, Fauriat, *et al* 2007, Sivori, *et al* 1997). Fauriat *et al.* analysierte in einer Studie 71 Erwachsene AML Patienten. 66% der Kohorte exprimierten einen NCR^{dull} Phänotyp, wohingegen nur 18% einen normalen NCR^{bright} Phänotyp aufwiesen. Die restlichen 16% wiesen einen NCR^{discordant} Phänotyp auf (Fauriat, *et al* 2007). In einer Studie von Venton *et al.*, wurde ausschließlich der NCR^{dull} Phänotyp in AML Patienten (Durchschnittsalter von 75 Jahren) aufgefunden. In dem hier analysierten pädiatrischen Patientenkollektiv, bestehend aus acht AML sowie acht ALL Proben, konnte eine ähnliche Verteilung festgestellt werden (Abbildung 31). Die `cut-off points` um den NCR^{dull} Phänotyp zu definieren lagen bei einer Oberflächenexpression von NKp30<60% und NKp46<70%. Sechs (75%) der ALL Patienten wiesen einen NCR^{dull} Phänotyp, zwei (25%) einen NCR^{discordant} Phänotyp auf. Keiner der acht ALL Proben wies einen NCR^{bright} Phänotyp auf. In den AML Patienten ergab sich ein ähnliches Bild, obwohl hier alle Proben einen NCR^{dull} Phänotyp aufwiesen. Im NCR^{discordant} Phänotyp war

auffällig, dass ausschließlich NKp46, nicht aber NKp30, eine normale Oberflächenexpression aufwies. Verschiedene Kokulturen, bestehend aus gesunden peripheren, reifen NCR^{bright} NK-Zellen und leukämischen Zellen (AML Blasten) führten zu reiner Reduktion der NKp30 Oberflächenexpression, nicht aber zu einer Reduktion der Oberflächenexpression von NKp46 (Fauriat, *et al* 2007, Moretta, *et al* 2000a). Die Ergebnisse von Fauriat *et al.* und Moretta *et al.* legen den Schluss nahe, dass leukämische Zellen bereits die Ontogenese der NK-Zellen beeinträchtigen, um effektiv die Regulation sowie Expression der NCRs zu verändern bzw. zu reduzieren (Fauriat, *et al* 2007, Moretta, *et al* 2000a). Weiterhin konnte in vielen Patienten nur eine partielle NKp30, jedoch eine vollständige NKp46 Wiederherstellung der Oberflächenexpression verzeichnet werden, wenn diese die komplette Remission erreichten. Diese und bereits publizierte Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Reduktion sowie Funktion von NKp30 und NKp46 auf unterschiedliche Regulationsmechanismen zurückzuführen ist. So publizierte Pende *et al.*, dass NKp30 bei der Eliminierung diverser Tumor *target* Zellen eine essentielle Rolle spielt, wohingegen Nkp46 sowie NKp44 kaum in die Eliminierung dieser *target* Zellen involviert waren (Pende, *et al* 1999). Verschiedene Blockierungsversuche (*mAb-mediated masking*) zeigten deutlich, dass die Blockierung von NKp30 eine deutliche Inhibition der *target* Zell-Lyse herbeiführte, wohingegen die Blockierung von NKp46 und NKp44 einen moderaten inhibitorischen Effekt mit sich brachte (Pende, *et al* 1999). Eine Blockierung von NKp30 und NKp46 in Kombination führte zu einer gesteigerten Inhibition der Zytotoxizität, was auf einen synergistischen Effekt der beiden Rezeptoren schließen lässt.

4.8 Antileukämische Effektorfunktion von autologen und allogenen NK-Zellen

Die Funktionalität der NK-Zellen kann auf unterschiedliche Weise analysiert werden. Der Standard Test, um die Degranulation der NK-Zellen nachzuvollziehen ist der CD107a Assay. In diesem Assay wird nachvollzogen, ob und wie stark die NK-Zellen in Gegenwart von potenziellen *target* Zellen aktiviert werden. CD107 stellt hierbei das zentrale Molekül für die durchflusszytometrischen Analysen der NK-Zell-Degranulation dar. 2005 publizierte Uhrberg *et al.*, ein bis heute gängiges Protokoll, welches in vielen Laboren als Standard Assay verwendet wird (Uhrberg 2005a). Der CD107 Assay gibt jedoch keinen Aufschluss darüber, wie effektiv die *target* Zellen lysiert wurden. Diese Frage kann mittels eines Zytotoxizitätassays geklärt werden. Anstatt eines *Chrom-Release-Assays*, wurde der Durchflusszytometrie basierte CFSE Assay verwendet. Dieser besitzt den Vorteil, dass man die *target* Zellen nicht mit radioaktiven

Cr⁵¹ Isotopen markieren muss. In dieser Arbeit wurde ein signifikanter Unterschied in der Degranulation der NK-Zellen zwischen den pädiatrischen AML und ALL Patienten und den gesunden Spendern festgestellt. Sie wiesen eine homogen schlechtere CD107a Expression als die gesunde Spenderkohorte auf. Hinsichtlich der Zytotoxizität ergab sich ein heterogenes Bild in Bezug auf die Granzym B und Perforin Expression. Obwohl ein nicht zu vernachlässigender Teil der AML Kohorte eine normale Expression der beiden zytotoxischen Moleküle aufwies, waren diese nicht effektiv dazu in der Lage, die HLA-Klasse I-defiziente Zelllinie HL60 zu lysieren. Dies ist möglicherweise auf die Beobachtung zurückzuführen, dass eine verminderte Degranulation und CD107 Mobilisierung der autologen NK-Zellen vorlag. Gleichzeitig ist bekannt, dass leukämische Zellen diverse Resistenz-Mechanismen sowie *immune-escape* Strategien entwickelt haben um der Lyse alloreaktiver NK-Zellen zu entgehen. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass trotz Reduktion der HLA-C sowie HLA-E Moleküle auf den Blasten, gesunde allogene NK-Zellen nicht in der Lage waren die leukämischen Zellen als fremd zu erkennen (*missing self*), (Reusing, *et al* 2016). Dies könnte unter anderem darauf zurückzuführen sein, dass neben der Reduktion inhibitorischer Liganden ebenso aktivierende NK-Zell Liganden und Rezeptoren betroffen sind. In diesem Zusammenhang gibt es diverse Arbeitsgruppen, die eine Reduktion oder sogar Abwesenheit der aktivierenden Liganden sowie Rezeptoren – u.a. MICA/B, ULBPs, PVR sowie die NCRs und NKG2D in erwachsenen AML und ALL Patienten beobachteten (Epling-Burnette, *et al* 2007, Pende, *et al* 2005, Romanski, *et al* 2005).

Eine Alternative zu den bisher gängigen Therapiemöglichkeiten ist der Einsatz von bi- und trispezifischen Antikörpern. In den vorliegenden Analysen wurden zwei bispezifische (CD16xCD33 und CD16xIL15xCD33) Antikörperkonstrukte verwendet. Beide Antikörper nutzen CD33 als Zielmolekül auf der Oberfläche der Blasten und bringen die Zielzelle über das CD16 Molekül auf den NK-Zellen in räumlichen Kontakt (immunologische Synapse). Allerdings wird CD33 nur von einer kleinen Hoch-Risiko Gruppe der ALL Patienten exprimiert. Diese weisen oft einen schweren Krankheitsverlauf mit eingeschränkten Therapiemöglichkeiten auf. Im Gegensatz dazu exprimieren fast alle AML Blasten CD33. Die folgenden Analysen beschäftigten sich mit dem Potenzial der beiden therapeutischen Antikörper, eine gezieltere und effizientere Immunantwort allogener gesunder NK-Zellen zu generieren und auf der anderen Seite auch die Funktionalität autologer NK-Zellen mit Funktionsdefiziten wiederherzustellen. In ersten Versuchen wurde die CD33 Spezifität der bei Antikörper analysiert. Hierfür wurde eine CD33-

Zelllinie (RAJI) und zwei CD33⁺ Zelllinien (SEM, HL60) mit unterschiedlich starker CD33 Expression verwendet. Die funktionalen CD107 Degranulations Assays wurden mit CD33 depletierten mononukleären Zellen von gesunden Spendern durchgeführt. Diese wurden über Nacht mit IL2 stimuliert und am nächsten Morgen für 5 Stunden mit den *target*-Zelllinien in An- oder Abwesenheit des BiKE Antikörpers ko-kultiviert. Des Weiteren wurde die Produktion der beiden Zytokine IFN- γ und TNF- α über eine intrazelluläre Färbung durchflusszytometrisch analysiert. IFN- γ und TNF- α stellen die wichtigsten Zytokine der NK-Zelle dar. Ihre Produktion kann durch die Interleukine IL2, IL12 sowie IL18 angeregt werden (Abbildung 4). In den ersten funktionalen Analysen konnte die Spezifität der beiden Antikörper bestätigt werden. So war die Degranulation sowie Zytokin-Produktion in den Ansätzen mit der CD33^{high} Zelllinie HL60 am stärksten. Die CD33⁻ Zelllinie RAJI war vergleichbar mit der Negativkontrolle, in der nur die Effektorzellen enthalten waren. Es folgte die BiKE und TriKE vermittelte NK-Zell Aktivierung gegenüber pädiatrischen ALL und AML Blasten (Abbildung 5). Hier zeigte sich eine signifikant gesteigerte CD107 Degranulation, sowie Zytokin-Produktion in den Ansätzen mit bispezifischem Antikörper. Jedoch konnte keine weitere Verbesserung mit dem TriKE Antikörper im Vergleich zu den Ansätzen mit bispezifischem Antikörper erzielt werden. Im nächsten Schritt wurde die BiKE und TriKE vermittelte NK-Zell Zytotoxizität überprüft. Mittels CFSE Assay wurde überprüft, wie viele der Blasten tatsächlich von den NK-Zellen lysiert werden (Abbildung 6). Hierfür wurden erneut mononukleäre Zellen gesunder Spender über Nacht in IL2 haltigem Medium kultiviert und am nächsten Morgen für 5h mit den Blasten der ALL und AML Patienten in Kombination mit den therapeutischen Antikörpern kokultiviert. Um die spontane Lyse der Blasten zu überprüfen, bestand ein Kontrollansatz nur aus den Blasten. Diese wurden mit CFSE und später mit PI behandelt, um die Unterscheidung zwischen lysierten und lebenden Zellen zu gewährleisten. In den Ansätzen mit BiKE, sowie TriKE Antikörper konnte eine leichte Steigerung der spezifischen Lyse der ALL und AML Blasten beobachtet werden. BiKE und TriKE Antikörper zeigten erneut ähnliche Werte. Zu Berücksichtigung ist jedoch, dass die AML sowie ALL Proben bereits eine sehr hohe Autolyse von 50-60% aufwiesen. Die normale Autolyse von vitalen Zellen liegt im Schnitt zwischen 0-10%. Das bedeutet, dass der geringe Effekt der therapeutischen Antikörper vermutlich auf die geringe Vitalität der Blasten zurückzuführen ist. Befindet sich eine Zelle bereits in Apoptose, ist es naheliegend, dass dies durch die rekrutierten Immunzellen erkannt wird. Die Zellen weisen einerseits eine morphologische Veränderung auf, auf der anderen Seite werden diverse Apoptose Moleküle bzw. Todesrezeptoren auf der

Oberfläche der apoptotischen Zelle exprimiert, die den Immunstatus der Zelle an die Immunzellen weitervermitteln. Dies spricht dafür, dass die Aktivität der NK-Zellen in einem starken Zusammenhang mit der Vitalität der Zielzelle steht. Es stellte sich nun die Frage, ob die Funktionsdefizite der NK-Zellen durch Stimulation mittels BiKE oder TriKE Antikörper wiederhergestellt werden können. Die alleinige Kurzzeit-Stimulation mit IL2 reichte hierfür nicht aus (Abbildung 7). Bei der Analyse der Zytotoxizitäts- sowie Degranulations-Daten muss berücksichtigt werden, dass die Frequenz der NK-Zellpopulation innerhalb der AML und ALL Patienten stark schwankte. Im ersten Teil konnte die Zytotoxizität der autologen NK-Zellen gegen die CD33⁺ Zelllinie HL60 in den Ansätzen mit den therapeutischen Antikörpern im Vergleich zum Ansatz ohne Antikörper signifikant gesteigert werden. Die beiden bispezifischen Antikörper zeigten ein vergleichbares Ergebnis. Im nächsten Schritt wurde die Degranulation sowie Zytokin-Produktion der autologen NK-Zellen überprüft. Aufgrund der limitierten Zellzahl wurden die Experimente nur mit BiKE Antikörper durchgeführt, da das TriKE Konstrukt in allen vorherigen Experimenten vergleichbare Ergebnisse erzielte.

Des Weiteren konnten für den Versuch nur initiale pädiatrische AML Proben verwendet werden, da das kryokonservierte Material der initialen pädiatrischen ALL Proben nicht für alle Versuche ausreichend zur Verfügung stand. Die Ergebnisse zeigen eine gesteigerte CD107 Degranulation, sowie Zytokin-Produktion in den Ansätzen mit BiKE Antikörper. Im Vergleich zu dem unbehandelten Kontrollansatz waren diese zwar nicht signifikant unterschiedlich, jedoch ist dies wahrscheinlich auf die geringe Anzahl an analysierten Proben zurückzuführen. Zwei der vier analysierten Proben zeigten selbst unter Stimulation mit dem bispezifischen Antikörper nur eine geringe IFN- γ Produktion. Dies könnte unter anderem auf eine Störung im IFN- γ oder IL12 Signalweg hindeuten. Darüber hinaus muss man konstatieren, dass die meisten leukämischen Proben über eine geringere CD16 Oberflächenexpression auf ihren NK-Zellen verfügten und der Einsatz von Interleukinen (IL2, IL12, IL15, IL18) sowie BiKE und TriKE zu einer weiteren Reduktion von CD16 auf der Oberfläche führt. In der Literatur wird dieses gängige Ereignis als „shedding“ bezeichnet- ein Ereignis, welches auf die Aktivierung von Matrix Metalloproteinasen zurückzuführen ist und die NK-Zell Aktivierung voraussetzt. Es ist bekannt, dass die Funktion und Expression von CD16 auf NK-Zellen durch die Metalloprotease ADAM17 (*a disintegrin and metalloproetase-17*) reguliert wird. Nach Aktivierung der NK-Zelle wird CD16 proteolytisch durch die Metalloprotease ADAM17 abgespalten und ist im Zellüberstand nachweisbar (Grzywacz, *et al* 2007, Harrison, *et al* 1991, Romee, *et al* 2013). In diesem

Zusammenhang zeigte Wiernik et al., dass die reduzierte CD16 Oberflächenexpression zu einer verminderten CD107 Degranulation sowie Zytokin-Produktion führte, welche durch die Inhibition von ADAM17 mittels spezifischem Inhibitor wieder gesteigert werden konnte. Die vorliegenden Daten zeigen, dass sowohl die allogene als auch autologe NK-Zell Antwort via CD16xCD33 und CD16xIL15xCD33 Antikörper stimuliert und potent induzieren werden konnte. Sowohl die Degranulation, Zytokin-Produktion als auch Zytotoxizität konnte in beiden Versuchsansätzen merklich gesteigert werden. Hierbei wurden jedoch keine Unterschiede zwischen dem BiKE und TriKE Antikörper beobachtet. Dies könnte unter anderem auf die Dauer der Stimulation und dem Ausgangspatientenmaterial zurückzuführen sein. In der Originalstudie beschreibt Vallera einen Stimulationsansatz, der sogar eine 24h Präinkubation der Effektorzellen mit den therapeutischen Antikörpern beinhaltet. Bei dem eingesetzten Patientenmaterial handelte es sich um defekte Empfänger NK-Zellen nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation. In der vorliegenden Arbeit hingegen wurden die NK-Zellen über Nacht stimuliert (12-16h). IL15 ist ein Interleukin, welches die NK-Zellentwicklung, Proliferation, Homöostase sowie die Vitalität positiv beeinflusst und reguliert (Bachanova, *et al* 2014, Munger, *et al* 1995, Steel, *et al* 2012). Denkbar ist, dass NK-Zellen im Zuge der Kurzzeitstimulation nicht auf IL15 ansprechen und das eine längere Inkubationszeit mit dem TriKE notwendig ist. Leider steht das Molekül für weitere Studien nicht mehr zur Verfügung.

4.9 Zusammenfassung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die selektive Herunterregulation von **HLA-E** und **-C** in ALL Patienten, eine weitere Strategie der Immunevasion der leukämischen Zellen vor der Immunkontrolle zytotoxischer NK- und T-Zellen darstellt. Die vorliegende Arbeit liefert eindeutige Hinweise darauf, dass HLA-E ein exklusiver prognostischer Marker für die frühe Erkennung eines Rezidives darstellt. Die Herunterregulation von HLA-E, respektive HLA-C scheint ein notwendiges Ereignis darzustellen, um der immunologischen Kontrolle der NK-Zellen entgehen zu können. Dabei scheint der Blast im Laufe der Pathogenese der Leukämie HLA-E auf ein Expressionslevel herunter zu regulieren, welches dem der T-Zellen entspricht (Toleranzlevel), und somit eine ausreichende Inhibition über den Rezeptor NKG2A erzeugt. Dabei korreliert die Herunterregulation von HLA-E in höchstem Maße mit den erhobenen MRD Daten und dem Krankheitsverlauf der Patienten. Die Analysen ergaben keine Assoziation zwischen einem bestimmten HLA-E Genotyp bzw. einer Allel-Variante (HLA-E*01:01 (HLA-E^R) und HLA-E*01:03 (HLA-E^G)) und scheinen deshalb für alle B-ALL Patienten gleichermaßen relevant zu sein. Eine interessante Frage, die sich aus der vorliegenden Arbeit ergibt ist, inwiefern es sich bei der reversiblen HLA-E Herunterregulation um epigenetische Mechanismen handelt, die einen Ansatzpunkt für weitere Therapiemöglichkeiten bieten könnten. Phänotypische Analysen der autologen Patienten NK-Zellen (AML und ALL) zeigten eine signifikante Reduktion der Expression für die Moleküle **CD16**, **Granzym B**, **Perforin**, **Nkp30** und **Nkp46**. Diese phänotypischen Analysen stützen die Annahme, dass die leukämischen Zellen sich vor der NK-Zell-Lyse schützen, indem sie auf der einen Seite eine Modifikation der HLA-Klasse I Expression herbeiführen und auf der anderen Seite für die NK-Zell-Zytotoxizität wichtige Moleküle in ihrer Expression beeinträchtigen. In diesem Zusammenhang wurde bereits ein NKp30, sowie NKp46 defizienter Phänotyp in adulten AML Patienten (Fauriat, *et al* 2007), sowie eine vermindert CD16 Expression in MDS Patienten (Gleason, *et al* 2014) beschrieben. Ebenfalls gezeigt werden konnte, dass durch eine geeignete Stimulation via therapeutischer Antikörperkonstrukte (**BiKE** und **TriKE**) die Funktionalität autologer und allogener NK-Zellen annähernd wiederhergestellt werden kann. Es stellt sich die Frage, ob der Einsatz bi- oder tri-spezifischer therapeutischer Antikörperkonstrukte eine geeignete alternative Therapiemöglichkeit zu den vor kurzem entwickelten CAR-T-Zellen darstellt, die mit chimären Antigenrezeptoren gegen leukämische Zielstrukturen transfiziert sind. Bei der CAR-T-Zell-

Therapie wird der T-Zell Rezeptor gentechnisch so verändert, dass er entartet Zellen erkennen kann, obwohl sie körpereigene Zellen sind. Jüngste Ergebnisse von Maude et al., deuten auf das große Potential der CAR-T-Zell Konstrukte in der Leukämietherapie hin (Maude, *et al* 2014). Es stellt sich weiterhin die Frage, inwiefern kombinierte NK-Zell Stimulationsansätze, z.B zelluläre Therapie plus Antikörper oder/und stimulatorischen Interleukinen sich positiv auf die Funktionalität der NK-Zellen auswirken könnten.

Literaturverzeichnis

- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. & Weissman, I.L. (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, **404**, 193-197.
- Altenburg, A., Mahr, A., Maldini, C., Kneifel, C.E., Krause, L., Kotter, I., Stache, T., Bonitsis, N.G. & Zouboulis, C.C. (2012) [Epidemiology and clinical aspects of Adamantiades-Behcet disease in Gemany. Current data]. *Ophthalmologe*, **109**, 531-541.
- Alter, G., Malenfant, J.M. & Altfeld, M. (2004) CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*, **294**, 15-22.
- Andersson, E., Poschke, I., Villabona, L., Carlson, J.W., Lundqvist, A., Kiessling, R., Seliger, B. & Masucci, G.V. (2016) Non-classical HLA-class I expression in serous ovarian carcinoma: Correlation with the HLA-genotype, tumor infiltrating immune cells and prognosis. *Oncoimmunology*, **5**, e1052213.
- Andre, P., Denis, C., Soulas, C., Bourbon-Caillet, C., Lopez, J., Arnoux, T., Blery, M., Bonnafous, C., Gauthier, L., Morel, A., Rossi, B., Remark, R., Bresó, V., Bonnet, E., Habif, G., Guia, S., Lalanne, A.I., Hoffmann, C., Lantz, O., Fayette, J., Boyer-Chammard, A., Zerbib, R., Dodion, P., Ghadially, H., Jure-Kunkel, M., Morel, Y., Herbst, R., Narni-Mancinelli, E., Cohen, R.B. & Vivier, E. (2018) Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells. *Cell*, **175**, 1731-1743.e1713.
- Androlewicz, M.J. & Cresswell, P. (1994) Human transporters associated with antigen processing possess a promiscuous peptide-binding site. *Immunity*, **1**, 7-14.
- Anfossi, N., Andre, P., Guia, S., Falk, C.S., Roetynck, S., Stewart, C.A., Bresó, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., Romagne, F., Ugolini, S. & Vivier, E. (2006) Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*, **25**, 331-342.
- Apps, R., Meng, Z., Del Prete, G.Q., Lifson, J.D., Zhou, M. & Carrington, M. (2015) Relative expression levels of the HLA class-I proteins in normal and HIV-infected cells. *J Immunol*, **194**, 3594-3600.
- Arnon, T.I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., Porgador, A., Honigman, A., Plachter, B., Mevorach, D., Wolf, D.G. & Mandelboim, O. (2005) Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol*, **6**, 515-523.
- 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. & Mandelboim, O. (2004) The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46. *Blood*, **103**, 664-672.
- Bachanova, V., Cooley, S., Defor, T.E., Verneris, M.R., Zhang, B., McKenna, D.H., Curtsinger, J., Panoskaltsis-Mortari, A., Lewis, D., Hippen, K., McGlave, P., Weisdorf, D.J., Blazar, B.R. & Miller, J.S. (2014) Clearance of acute myeloid leukemia by haploidentical natural killer cells is improved using IL-2 diphtheria toxin fusion protein. *Blood*, **123**, 3855-3863.
- Balaji, K.N., Schaschke, N., Machleidt, W., Catalfamo, M. & Henkart, P.A. (2002) Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med*, **196**, 493-503.
- Blutbildung, K.-L.B.u. Akute Lymphatische Leukämie (ALL). <https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/patienten/leukaemien/all/>.

- Borrego, F., Ulbrecht, M., Weiss, E.H., Coligan, J.E. & Brooks, A.G. (1998) Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med*, **187**, 813-818.
- Bouscary, D., De Vos, J., Guesnu, M., Jondeau, K., Viguier, F., Melle, J., Picard, F., Dreyfus, F. & Fontenay-Roupie, M. (1997) Fas/Apo-1 (CD95) expression and apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, **11**, 839-845.
- 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. & 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.
- Braud, V.M., Allan, D.S., O'Callaghan, C.A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G.S., Lazetic, S., Young, N.T., Bell, J.I., Phillips, J.H., Lanier, L.L. & McMichael, A.J. (1998) HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*, **391**, 795-799.
- Brenner, M.B., Trowbridge, I.S. & Strominger, J.L. (1985) Cross-linking of human T cell receptor proteins: association between the T cell idiotype beta subunit and the T3 glycoprotein heavy subunit. *Cell*, **40**, 183-190.
- Brouwer, R.E., van der Heiden, P., Schreuder, G.M., Mulder, A., Datema, G. & Anholts, J.D. (2002a) Loss or downregulation of HLA class I expression at the allelic level in acute leukemia is infrequent but functionally relevant, and can be restored by interferon. *Hum Immunol*, **63**, 200-210.
- Brouwer, R.E., van der Heiden, P., Schreuder, G.M., Mulder, A., Datema, G., Anholts, J.D., Willemze, R., Claas, F.H. & Falkenburg, J.H. (2002b) Loss or downregulation of HLA class I expression at the allelic level in acute leukemia is infrequent but functionally relevant, and can be restored by interferon. *Hum Immunol*, **63**, 200-210.
- Brumbaugh, K.M., Binstadt, B.A., Billadeau, D.D., Schoon, R.A., Dick, C.J., Ten, R.M. & Leibson, P.J. (1997) Functional role for Syk tyrosine kinase in natural killer cell-mediated natural cytotoxicity. *J Exp Med*, **186**, 1965-1974.
- Bryceson, Y.T., March, M.E., Ljunggren, H.G. & Long, E.O. (2006) Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev*, **214**, 73-91.
- Buffler, P.A., Kwan, M.L., Reynolds, P. & Urayama, K.Y. (2005) Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence. *Cancer Invest*, **23**, 60-75.
- Bunin, N.J., Davies, S.M., Aplenc, R., Camitta, B.M., DeSantes, K.B., Goyal, R.K., Kapoor, N., Kernan, N.A., Rosenthal, J., Smith, F.O. & Eapen, M. (2008) Unrelated donor bone marrow transplantation for children with acute myeloid leukemia beyond first remission or refractory to chemotherapy. *J Clin Oncol*, **26**, 4326-4332.
- Burkhardt, J.K., Hester, S., Lapham, C.K. & Argon, Y. (1990) The lytic granules of natural killer cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments. *J Cell Biol*, **111**, 2327-2340.
- Cantoni, C., Bottino, C., Vitale, M., Pessino, A., Augugliaro, R., Malaspina, A., Parolini, S., Moretta, L., Moretta, A. & Biassoni, R. (1999) Nkp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med*, **189**, 787-796.
- Cella, M., Fuchs, A., Vermi, W., Facchetti, F., Otero, K., Lennerz, J.K., Doherty, J.M., Mills, J.C. & Colonna, M. (2009) A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature*, **457**, 722-725.
- Cerwenka, A. & Lanier, L.L. (2003) NKG2D ligands: unconventional MHC class I-like molecules exploited by viruses and cancer. *Tissue Antigens*, **61**, 335-343.

- Chen, L. & Tsai, T.F. (2018) HLA-Cw6 and psoriasis. *Br J Dermatol*, **178**, 854-862.
- Cohnen, A., Chiang, S.C., Stojanovic, A., Schmidt, H., Claus, M., Saftig, P., Janssen, O., Cerwenka, A., Bryceson, Y.T. & Watzl, C. (2013) Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood*, **122**, 1411-1418.
- Cooley, S., Xiao, F., Pitt, M., Gleason, M., McCullar, V., Bergemann, T.L., McQueen, K.L., Guethlein, L.A., Parham, P. & Miller, J.S. (2007) A subpopulation of human peripheral blood NK cells that lacks inhibitory receptors for self-MHC is developmentally immature. *Blood*, **110**, 578-586.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A. & Caligiuri, M.A. (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, **22**, 633-640.
- Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M. & Chalupny, N.J. (2001) ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*, **14**, 123-133.
- Costello, R.T., Fauriat, C., Rey, J., Gastaut, J.A. & Olive, D. (2004) Immunobiology of haematological malignant disorders: the basis for novel immunotherapy protocols. *Lancet Oncol*, **5**, 47-55.
- Costello, R.T., Sivori, S., Marcenaro, E., Lafage-Pochitaloff, M., Mozziconacci, M.J. & Reviron, D. (2002) Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, **99**, 3661-3667.
- Cresswell, P., Bangia, N., Dick, T. & Diedrich, G. (1999) The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol Rev*, **172**, 21-28.
- Creutzig U, R.D. (2006) Pädiatrische Hämatologie und Onkologie Berlin. *New York: Springer Verlag*, **690-714**.
- Cullen, S.P. & Martin, S.J. (2008) Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ*, **15**, 251-262.
- Dausset, J. (1958) [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol*, **20**, 156-166.
- De Clerck, L.S., Bridts, C.H., Mertens, A.M., Moens, M.M. & Stevens, W.J. (1994) Use of fluorescent dyes in the determination of adherence of human leucocytes to endothelial cells and the effect of fluorochromes on cellular function. *J Immunol Methods*, **172**, 115-124.
- de Kruijf, E.M., Sajet, A., van Nes, J.G., Natanov, R., Putter, H., Smit, V.T., Liefers, G.J., van den Elsen, P.J., van de Velde, C.J. & Kuppen, P.J. (2010) HLA-E and HLA-G expression in classical HLA class I-negative tumors is of prognostic value for clinical outcome of early breast cancer patients. *J Immunol*, **185**, 7452-7459.
- Demant, C., Mulder, A., Deneys, V., Worsham, M.J., Maes, P. & Claas, F.H. (2004a) Down-regulation of HLA-A and HLA-Bw6, but not HLA-Bw4, allospecificities in leukemic cells: an escape mechanism from CTL and NK attack? *Blood*, **103**, 3122-3130.
- Demant, C., Mulder, A., Deneys, V., Worsham, M.J., Maes, P., Claas, F.H. & Ferrone, S. (2004b) Down-regulation of HLA-A and HLA-Bw6, but not HLA-Bw4, allospecificities in leukemic cells: an escape mechanism from CTL and NK attack? *Blood*, **103**, 3122-3130.
- Di Santo, J.P. & Vosshenrich, C.A. (2006) Bone marrow versus thymic pathways of natural killer cell development. *Immunol Rev*, **214**, 35-46.
- Diefenbach, A., Jensen, E.R., Jamieson, A.M. & Raulet, D.H. (2001) Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature*, **413**, 165-171.
- Diefenbach, A. & Raulet, D.H. (2001) Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunol Rev*, **181**, 170-184.

- Diefenbach, A., Tomasello, E., Lucas, M., Jamieson, A.M., Hsia, J.K., Vivier, E. & Raulet, D.H. (2002) Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol*, **3**, 1142-1149.
- Doherty, P.C. & Zinkernagel, R.M. (1975) A biological role for the major histocompatibility antigens. *Lancet*, **1**, 1406-1409.
- Ehring, B., Meyer, T.H., Eckerskorn, C., Lottspeich, F. & Tampe, R. (1996) Effects of major-histocompatibility-complex-encoded subunits on the peptidase and proteolytic activities of human 20S proteasomes. Cleavage of proteins and antigenic peptides. *Eur J Biochem*, **235**, 404-415.
- Elkins, W.L., Pickard, A. & Pierson, G.R. (1984) Deficient expression of class-I HLA in some cases of acute leukemia. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, **18**, 91-100.
- Epling-Burnette, P.K., Bai, F., Painter, J.S., Rollison, D.E., Salih, H.R., Krusch, M., Zou, J., Ku, E., Zhong, B., Boulware, D., Moscinski, L., Wei, S., Djeu, J.Y. & List, A.F. (2007) Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors. *Blood*, **109**, 4816-4824.
- Farag, S.S., Fehniger, T.A., Ruggeri, L., Velardi, A. & Caligiuri, M.A. (2002) Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood*, **100**, 1935-1947.
- Fauriat, C., Just-Landi, S., Mallet, F., Arnoulet, C., Sainty, D., Olive, D. & 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.
- Ferlazzo, G. & Munz, C. (2004) NK cell compartments and their activation by dendritic cells. *J Immunol*, **172**, 1333-1339.
- Fernandez, N.C., Treiner, E., Vance, R.E., Jamieson, A.M., Lemieux, S. & Raulet, D.H. (2005) A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood*, **105**, 4416-4423.
- Freud, A.G. & Caligiuri, M.A. (2006) Human natural killer cell development. *Immunol Rev*, **214**, 56-72.
- Freud, A.G., Yokohama, A., Becknell, B., Lee, M.T., Mao, H.C., Ferketich, A.K. & Caligiuri, M.A. (2006) Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med*, **203**, 1033-1043.
- Frohn, C., Schlenke, P., Ebel, B., Dannenberg, C., Bein, G. & Kirchner, H. (1998) DNA typing for natural killer cell inhibiting HLA-Cw groups NK1 and NK2 by PCR-SSP. *J Immunol Methods*, **218**, 155-160.
- G, H. (2004) Krebs bei Kindern und Jugendlichen. *Deutscher Ärzte-Verlag*, **5. Aufl.**
- Galy, A., Travis, M., Cen, D. & Chen, B. (1995) Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity*, **3**, 459-473.
- Garrity, D., Call, M.E., Feng, J. & Wucherpfennig, K.W. (2005) The activating NKG2D receptor assembles in the membrane with two signaling dimers into a hexameric structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 7641-7646.
- Geraghty, D.E., Stockschleider, M., Ishitani, A. & Hansen, J.A. (1992) Polymorphism at the HLA-E locus predates most HLA-A and -B polymorphism. *Hum Immunol*, **33**, 174-184.
- Gleason, M.K., Ross, J.A., Warlick, E.D., Lund, T.C., Verneris, M.R., Wiernik, A., Spellman, S., Haagenson, M.D., Lenvik, A.J., Litzow, M.R., Epling-Burnette, P.K., Blazar, B.R., Weiner, L.M., Weisdorf, D.J., Vallera, D.A. & Miller, J.S. (2014) CD16xCD33 bispecific killer cell engager (BiKE) activates NK cells against primary MDS and MDSC CD33+ targets. *Blood*, **123**, 3016-3026.

- Glienke, J., Sobanov, Y., Brostjan, C., Steffens, C., Nguyen, C., Lehrach, H., Hofer, E. & Francis, F. (1998) The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex. *Immunogenetics*, **48**, 163-173.
- Grimsley, C., Kawasaki, A., Gassner, C., Sageshima, N., Nose, Y., Hatake, K., Geraghty, D.E. & Ishitani, A. (2002) Definitive high resolution typing of HLA-E allelic polymorphisms: Identifying potential errors in existing allele data. *Tissue Antigens*, **60**, 206-212.
- Groh, V., Wu, J., Yee, C. & Spies, T. (2002) Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*, **419**, 734-738.
- Grujic, M., Braga, T., Lukinius, A., Eloranta, M.L., Knight, S.D., Pejler, G. & Abrink, M. (2005) Serglycin-deficient cytotoxic T lymphocytes display defective secretory granule maturation and granzyme B storage. *J Biol Chem*, **280**, 33411-33418.
- Grzywacz, B., Kataria, N. & Verneris, M.R. (2007) CD56(dim)CD16(+) NK cells downregulate CD16 following target cell induced activation of matrix metalloproteinases. *Leukemia*, **21**, 356-359; author reply 359.
- Gumperz, J.E., Litwin, V., Phillips, J.H., Lanier, L.L. & Parham, P. (1995) The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *J Exp Med*, **181**, 1133-1144.
- Hanna, S. & Etzioni, A. (2014) MHC class I and II deficiencies. *J Allergy Clin Immunol*, **134**, 269-275.
- Harrison, D., Phillips, J.H. & Lanier, L.L. (1991) Involvement of a metalloprotease in spontaneous and phorbol ester-induced release of natural killer cell-associated Fc gamma RIII (CD16-II). *J Immunol*, **147**, 3459-3465.
- Hejazi, M., Manser, A.R., Frobel, J., Kundgen, A., Zhao, X., Schonberg, K., Germing, U., Haas, R., Gattermann, N. & Uhrberg, M. (2015) Impaired cytotoxicity associated with defective natural killer cell differentiation in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, **100**, 643-652.
- Hercend, T., Griffin, J.D., Bensussan, A., Schmidt, R.E., Edson, M.A., Brennan, A., Murray, C., Daley, J.F., Schlossman, S.F. & Ritz, J. (1985) Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone. Characterization of two natural killer-associated antigens, NKH1A and NKH2, expressed on subsets of large granular lymphocytes. *J Clin Invest*, **75**, 932-943.
- Hoglund, P., Ljunggren, H.G., Karre, K. & Jay, G. (1990) Role of major histocompatibility complex class-I molecules in tumor rejection. New insights from studies with synthetic peptides and transgenic mice. *Immunol Res*, **9**, 298-313.
- Hosseini, E., Schwarzer, A.P. & Ghasemzadeh, M. (2012) The impact of HLA-E polymorphisms in graft-versus-host disease following HLA-E matched allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, **11**, 15-21.
- Houchins, J.P., Yabe, T., McSherry, C. & Bach, F.H. (1991) DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med*, **173**, 1017-1020.
- Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., Sykora, K.W. & Schmidt, R.E. (2001) CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol*, **31**, 3121-3127.
- Jaffe, E.S., Harris, N.L., Diebold, J. & Muller-Hermelink, H.K. (1999) World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. A progress report. *Am J Clin Pathol*, **111**, S8-12.
- Janeway, C.A., Jr. (1992) The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today*, **13**, 11-16.

- Jeanty, C., Sourisce, A., Noteuil, A., Jah, N., Wielgosik, A., Fert, I., Breban, M. & Andre, C. (2014) HLA-B27 subtype oligomerization and intracellular accumulation patterns correlate with predisposition to spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol*, **66**, 2113-2123.
- Kamiya, T., Seow, S.V., Wong, D., Robinson, M. & Campana, D. (2019) Blocking expression of inhibitory receptor NKG2A overcomes tumor resistance to NK cells. *J Clin Invest*, **129**, 2094-2106.
- Karre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G. & Kiessling, R. (1986) Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*, **319**, 675-678.
- Katz, G., Gazit, R., Arnon, T.I., Gonen-Gross, T., Tarcic, G., Markel, G., Gruda, R., Achdout, H., Drize, O., Merims, S. & Mandelboim, O. (2004) MHC class I-independent recognition of NK-activating receptor KIR2DS4. *J Immunol*, **173**, 1819-1825.
- Kerbauy, D.B. & Deeg, H.J. (2007) Apoptosis and antiapoptotic mechanisms in the progression of myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol*, **35**, 1739-1746.
- Kiessling, R., Klein, E., Pross, H. & Wigzell, H. (1975a) "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol*, **5**, 117-121.
- Kiessling, R., Klein, E. & Wigzell, H. (1975b) "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*, **5**, 112-117.
- Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S.M., Lybarger, L., Song, Y.J., Yang, L., French, A.R., Sunwoo, J.B., Lemieux, S., Hansen, T.H. & Yokoyama, W.M. (2005) Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*, **436**, 709-713.
- Kondo, M., Scherer, D.C., King, A.G., Manz, M.G. & Weissman, I.L. (2001) Lymphocyte development from hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev*, **11**, 520-526.
- Krzewski, K. & Strominger, J.L. (2008) The killer's kiss: the many functions of NK cell immunological synapses. *Curr Opin Cell Biol*, **20**, 597-605.
- Kung, P., Goldstein, G., Reinherz, E.L. & Schlossman, S.F. (1979) Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science*, **206**, 347-349.
- Lajoie, J., Hargrove, J., Zijenah, L.S., Humphrey, J.H., Ward, B.J. & Roger, M. (2006) Genetic variants in nonclassical major histocompatibility complex class I human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-G molecules are associated with susceptibility to heterosexual acquisition of HIV-1. *J Infect Dis*, **193**, 298-301.
- Lanier, L.L. (1997) Natural killer cell receptors and MHC class I interactions. *Curr Opin Immunol*, **9**, 126-131.
- Lanier, L.L. (2005) NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*, **23**, 225-274.
- Lanier, L.L. (2015) NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol Res*, **3**, 575-582.
- Lanier, L.L., Chang, C., Azuma, M., Ruitenberg, J.J., Hemperly, J.J. & Phillips, J.H. (1991) Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol*, **146**, 4421-4426.
- Lanier, L.L., Corliss, B.C., Wu, J., Leong, C. & Phillips, J.H. (1998) Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature*, **391**, 703-707.
- Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.I., Loken, M.R. & Phillips, J.H. (1986) The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*, **136**, 4480-4486.

- Lanier, L.L., Ruitenberg, J.J. & Phillips, J.H. (1988) Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *J Immunol*, **141**, 3478-3485.
- Lanier, L.L., Testi, R., Bindl, J. & Phillips, J.H. (1989) Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med*, **169**, 2233-2238.
- Lehmann, C., Zeis, M., Schmitz, N. & Uharek, L. (2000) Impaired binding of perforin on the surface of tumor cells is a cause of target cell resistance against cytotoxic effector cells. *Blood*, **96**, 594-600.
- Leibson, P.J. (1997) Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity*, **6**, 655-661.
- Leukämie, I.z.m.S.u.a.m. MDS- Was ist das
<http://www.myelodysplastischesyndrome.de/mds/definition/>.
- Leukämien, K.a.u.c. (2014) Blut und Blutbildung. In: https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/patienten/leukaemien/blut_und_blutbildung/, Kompetenznetz: akute und chronische Leukämien.
- Levy, E.M., Bianchini, M., Von Euw, E.M., Barrio, M.M., Bravo, A.I., Furman, D., Domenichini, E., Macagno, C., Pinsky, V., Zucchini, C., Valvassori, L. & Mordoh, J. (2008) Human leukocyte antigen-E protein is overexpressed in primary human colorectal cancer. *Int J Oncol*, **32**, 633-641.
- Lichtman, A.a. (2005) Cellular and Molecular Immunology. *Elsevier*.
- Lieberman, J. (2003) The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol*, **3**, 361-370.
- Ljunggren, H.G. & Karre, K. (1990) In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*, **11**, 237-244.
- Ljunggren, H.G. & Malmberg, K.J. (2007) Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol*, **7**, 329-339.
- Lo Monaco, E., Sibilio, L., Melucci, E., Tremante, E., Suchanek, M., Horejsi, V., Martayan, A. & Giacomini, P. (2008) HLA-E: strong association with beta2-microglobulin and surface expression in the absence of HLA class I signal sequence-derived peptides. *J Immunol*, **181**, 5442-5450.
- Long, E.O. (1999) Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol*, **17**, 875-904.
- Lopez, J.A., Susanto, O., Jenkins, M.R., Lukyanova, N., Sutton, V.R., Law, R.H., Johnston, A., Bird, C.H., Bird, P.I., Whisstock, J.C., Trapani, J.A., Saibil, H.R. & Voskoboinik, I. (2013) Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood*, **121**, 2659-2668.
- Majumder, D., Bandyopadhyay, D., Chandra, S., Mukherjee, N. & 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.
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T.I., Bushkin, Y., Davis, D.M., Strominger, J.L., Yewdell, J.W. & Porgador, A. (2001) Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature*, **409**, 1055-1060.
- Mandelboim, O., Malik, P., Davis, D.M., Jo, C.H., Boyson, J.E. & Strominger, J.L. (1999) Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5640-5644.
- Masson, D., Peters, P.J., Geuze, H.J., Borst, J. & Tschopp, J. (1990) Interaction of chondroitin sulfate with perforin and granzymes of cytolytic T-cells is dependent on pH. *Biochemistry*, **29**, 11229-11235.

- Masuda, K., Hiraki, A., Fujii, N., Watanabe, T., Tanaka, M., Matsue, K., Ogama, Y., Ouchida, M., Shimizu, K., Ikeda, K. & Tanimoto, M. (2007) Loss or down-regulation of HLA class I expression at the allelic level in freshly isolated leukemic blasts. *Cancer Sci*, **98**, 102-108.
- Maude, S.L., Frey, N., Shaw, P.A., Aplenc, R., Barrett, D.M., Bunin, N.J., Chew, A., Gonzalez, V.E., Zheng, Z., Lacey, S.F., Mahnke, Y.D., Melenhorst, J.J., Rheingold, S.R., Shen, A., Teachey, D.T., Levine, B.L., June, C.H., Porter, D.L. & Grupp, S.A. (2014) Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*, **371**, 1507-1517.
- Miller, J.S. (2013) Therapeutic applications: natural killer cells in the clinic. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, **2013**, 247-253.
- Miller, J.S., Alley, K.A. & McGlave, P. (1994) Differentiation of natural killer (NK) cells from human primitive marrow progenitors in a stroma-based long-term culture system: identification of a CD34+7+ NK progenitor. *Blood*, **83**, 2594-2601.
- Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M.C. & Moretta, L. (2000a) Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today*, **21**, 228-234.
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Biassoni, R., Mingari, M.C. & Moretta, L. (1996) Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol*, **14**, 619-648.
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M.C., Biassoni, R. & Moretta, L. (2001) Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*, **19**, 197-223.
- Moretta, L., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M.C. & Moretta, A. (2000b) Human NK-cell receptors. *Immunol Today*, **21**, 420-422.
- Morrison, S.J. & Kimble, J. (2006) Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, **441**, 1068-1074.
- Mossallam, G.I., Fattah, R.A., El-Haddad, A. & Mahmoud, H.K. (2015) HLA-E polymorphism and clinical outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in Egyptian patients. *Hum Immunol*, **76**, 161-165.
- Munger, W., DeJoy, S.Q., Jeyaseelan, R., Sr., Torley, L.W., Grabstein, K.H., Eisenmann, J., Paxton, R., Cox, T., Wick, M.M. & Kerwar, S.S. (1995) Studies evaluating the antitumor activity and toxicity of interleukin-15, a new T cell growth factor: comparison with interleukin-2. *Cell Immunol*, **165**, 289-293.
- Munk (2010) Taschenlehrbuch Biologie Zoologie :. *Thieme.*, (Vol. 1).
- Muntasell, A., Ochoa, M.C., Cordeiro, L., Berraondo, P., Lopez-Diaz de Cerio, A., Cabo, M., Lopez-Botet, M. & Melero, I. (2017) Targeting NK-cell checkpoints for cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*, **45**, 73-81.
- Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. (2009) *Janeway Immunologie*. Springer Spektrum.
- Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (2009) *Janeway Immunologie*. *Springer Spektrum*, Vol. **7. Auflage**.
- Naeim, F., Keeseey, J.C., Herrmann, C., Jr., Lindstrom, J., Zeller, E. & Walford, R.L. (1978) Association of HLA-B8, DRw3, and anti-acetylcholine receptor antibodies in myasthenia gravis. *Tissue Antigens*, **12**, 381-386.
- Nagler, A., Binet, C., Mackichan, M.L., Negrin, R., Bangs, C., Donlon, T. & Greenberg, P. (1990) Impact of marrow cytogenetics and morphology on in vitro hematopoiesis in the myelodysplastic syndromes: comparison between recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (CSF) and granulocyte-monocyte CSF. *Blood*, **76**, 1299-1307.

- Nattermann, J., Nischalke, H.D., Hofmeister, V., Ahlenstiel, G., Zimmermann, H., Leifeld, L., Weiss, E.H., Sauerbruch, T. & Spengler, U. (2005) The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytotoxicity mediated by natural killer cells. *Am J Pathol*, **166**, 443-453.
- Nepom, G.T. (2012) MHC class II tetramers. *J Immunol*, **188**, 2477-2482.
- Neumaier, J. (2016) Mutationen mit prognostischem Einfluss. *Info Onkologie*, **19**, 30-30.
- Oettgen, H.C., Terhorst, C., Cantley, L.C. & Rosoff, P.M. (1985) Stimulation of the T3-T cell receptor complex induces a membrane-potential-sensitive calcium influx. *Cell*, **40**, 583-590.
- Olcese, L., Cambiaggi, A., Semenzato, G., Bottino, C., Moretta, A. & Vivier, E. (1997) Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells. *J Immunol*, **158**, 5083-5086.
- Orbelyan, G.A., Tang, F., Sally, B., Solus, J., Meresse, B., Ciszewski, C., Grenier, J.C., Barreiro, L.B., Lanier, L.L. & Jabri, B. (2014) Human NKG2E is expressed and forms an intracytoplasmic complex with CD94 and DAP12. *J Immunol*, **193**, 610-616.
- PE Posch, C.H. (2011) Histocompatibility. in *Blood and Bone Marrow Pathology (Second Edition)*.
- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L. & 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.
- 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. & 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.
- Peters, P.J., Borst, J., Oorschot, V., Fukuda, M., Krahenbuhl, O., Tschopp, J., Slot, J.W. & Geuze, H.J. (1991) Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med*, **173**, 1099-1109.
- Petrie, E.J., Clements, C.S., Lin, J., Sullivan, L.C., Johnson, D., Huyton, T., Heroux, A., Hoare, H.L., Beddoe, T., Reid, H.H., Wilce, M.C., Brooks, A.G. & Rossjohn, J. (2008) CD94-NKG2A recognition of human leukocyte antigen (HLA)-E bound to an HLA class I leader sequence. *J Exp Med*, **205**, 725-735.
- Pezzutto, A.U., T.; Burmester, G.-R. (2007) *Taschenatlas der Immunologie*. Georg Thieme Verlag
- Pipkin, M.E. & Lieberman, J. (2007) Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol*, **19**, 301-308.
- Pogge von Strandmann, E., Simhadri, V.R., von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K.S., Hansen, H.P., Rothe, A., Boll, B., Simhadri, V.L., Borchmann, P., McKinnon, P.J., Hallek, M. & 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.
- Pui, C.H., Relling, M.V. & Downing, J.R. (2004) Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, **350**, 1535-1548.

- Raffaghello, L., Prigione, I., Airoidi, I., Camoriano, M., Levreri, I., Gambini, C., Pende, D., Steinle, A., Ferrone, S. & Pistoia, V. (2004) Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia*, **6**, 558-568.
- Reusing, S.B., Manser, A.R., Enczmann, J., Mulder, A., Claas, F.H., Carrington, M., Fischer, J.C., Borkhardt, A., Babor, F. & Uhrberg, M. (2016) Selective downregulation of HLA-C and HLA-E in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, **174**, 477-480.
- Ribera, J., Morgades, M., Zamora, L., Montesinos, P., Gomez-Segui, I., Pratorcorona, M., Sarra, J., Guardia, R., Nomdedeu, J., Tormo, M., Martinez-Lopez, J., Hernandez-Rivas, J.M., Gonzalez-Campos, J., Barba, P., Escoda, L., Genesca, E., Sole, F., Milla, F., Feliu, E. & Ribera, J.M. (2015) Prognostic significance of copy number alterations in adolescent and adult patients with precursor B acute lymphoblastic leukemia enrolled in PETHEMA protocols. *Cancer*, **121**, 3809-3817.
- Rink, L., Kruse, A. & Haase, H. (2012) *Immunologie für Einsteiger*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Robinson J., H.J., Hayhurst JH, Flicek P, Parham P, Marsh SGE (2015) The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Research*.
- Romanski, A., Bug, G., Becker, S., Kampfmann, M., Seifried, E., Hoelzer, D., Ottmann, O.G. & Tonn, T. (2005) Mechanisms of resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity in acute lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol*, **33**, 344-352.
- Romee, R., Foley, B., Lenvik, T., Wang, Y., Zhang, B., Ankarlo, D., Luo, X., Cooley, S., Verneris, M., Walcheck, B. & Miller, J. (2013) NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood*, **121**, 3599-3608.
- Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R.S., Martelli, M.F. & Velardi, A. (1999) Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, **94**, 333-339.
- Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W.D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., Martelli, M.F. & Velardi, A. (2002) Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*, **295**, 2097-2100.
- Ruggeri, L., Urbani, E., Andre, P., Mancusi, A., Tosti, A., Topini, F., Blery, M., Animobono, L., Romagne, F., Wagtmann, N. & Velardi, A. (2016) Effects of anti-NKG2A antibody administration on leukemia and normal hematopoietic cells. *Haematologica*, **101**, 626-633.
- Salih, H.R., Antropius, H., Gieseke, F., Lutz, S.Z., Kanz, L., Rammensee, H.G. & Steinle, A. (2003) Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood*, **102**, 1389-1396.
- Schrapppe, M., Reiter, A., Ludwig, W.D., Harbott, J., Zimmermann, M., Hiddemann, W., Niemeyer, C., Henze, G., Feldges, A., Zintl, F., Kornhuber, B., Ritter, J., Welte, K., Gadner, H. & Riehm, H. (2000) Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood*, **95**, 3310-3322.
- Siminovitch, L., McCulloch, E.A. & Till, J.E. (1963) The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Comp Physiol*, **62**, 327-336.
- Sivori, S., Pende, D., Bottino, C., Marcenaro, E., Pessino, A., Biassoni, R., Moretta, L. & Moretta, A. (1999) NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol*, **29**, 1656-1666.

- Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L. & Moretta, A. (1997) p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med*, **186**, 1129-1136.
- Smyth, M.J., Godfrey, D.I. & Trapani, J.A. (2001) A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol*, **2**, 293-299.
- Steel, J.C., Waldmann, T.A. & Morris, J.C. (2012) Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer. *Trends Pharmacol Sci*, **33**, 35-41.
- Steinle, A., Li, P., Morris, D.L., Groh, V., Lanier, L.L., Strong, R.K. & Spies, T. (2001) Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics*, **53**, 279-287.
- Stewart, C.A., Laugier-Anfossi, F., Vely, F., Saulquin, X., Riedmuller, J., Tisserant, A., Gauthier, L., Romagne, F., Ferracci, G., Arosa, F.A., Moretta, A., Sun, P.D., Ugolini, S. & Vivier, E. (2005) Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 13224-13229.
- Stringaris, K., Sekine, T., Khoder, A., Alsuliman, A., Razzaghi, B., Sargeant, R., Pavlu, J., Brisley, G., de Lavallade, H., Sarvaria, A., Marin, D., Mielke, S., Apperley, J.F., Shpall, E.J., Barrett, A.J. & Rezvani, K. (2014) Leukemia-induced phenotypic and functional defects in natural killer cells predict failure to achieve remission in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, **99**, 836-847.
- Suda, T., Okazaki, T., Naito, Y., Yokota, T., Arai, N., Ozaki, S., Nakao, K. & Nagata, S. (1995) Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol*, **154**, 3806-3813.
- Sullivan, L.C., Clements, C.S., Rossjohn, J. & Brooks, A.G. (2008) The major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E at the interface between innate and adaptive immunity. *Tissue Antigens*, **72**, 415-424.
- Sutton, V.R., Davis, J.E., Cancilla, M., Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Sedelies, K., Browne, K.A. & Trapani, J.A. (2000) Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J Exp Med*, **192**, 1403-1414.
- Suttorp, e.a. (2016) Der Haupthistokompatibilitätskomplex. *ABW Wissenschaftsverlag, Harrisons Innere Medizin*.
- T. Lapp, D.R.D.B.T.R. (2013a) Humane's Leukozytenantigensystem in der Augenheilkunde. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013*.
- T. Lapp, D.R.D.B.T.R. (2013b) Humanes Leukozytenantigensystem in der Augenheilkunde. **110**, 849-861.
- Thomas, R., Apps, R., Qi, Y., Gao, X., Male, V., O'HUigin, C., O'Connor, G., Ge, D., Fellay, J., Martin, J.N., Margolick, J., Goedert, J.J., Buchbinder, S., Kirk, G.D., Martin, M.P., Telenti, A., Deeks, S.G., Walker, B.D., Goldstein, D., McVicar, D.W., Moffett, A. & Carrington, M. (2009) HLA-C cell surface expression and control of HIV/AIDS correlate with a variant upstream of HLA-C. *Nat Genet*, **41**, 1290-1294.
- Thorsby, E. (2009) A short history of HLA. *Tissue Antigens*.
- Tomasec, P., Braud, V.M., Rickards, C., Powell, M.B., McSharry, B.P., Gadola, S., Cerundolo, V., Borysiewicz, L.K., McMichael, A.J. & Wilkinson, G.W. (2000) Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science*, **287**, 1031.
- Torkar, M., Norgate, Z., Colonna, M., Trowsdale, J. & Wilson, M.J. (1998) Isotypic variation of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex. *Eur J Immunol*, **28**, 3959-3967.

- Trapani, J.A. & Smyth, M.J. (2002) Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*, **2**, 735-747.
- Uhrberg, M. (2005a) The CD107 mobilization assay: viable isolation and immunotherapeutic potential of tumor-cytolytic NK cells. *Leukemia*, **19**, 707-709.
- Uhrberg, M. (2005b) The KIR gene family: life in the fast lane of evolution. *Eur J Immunol*, **35**, 10-15.
- Uhrberg, M. (2005c) Shaping the human NK cell repertoire: an epigenetic glance at KIR gene regulation. *Mol Immunol*, **42**, 471-475.
- Uhrberg, M., Parham, P. & Wernet, P. (2002) Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics*, **54**, 221-229.
- Uhrberg, M., Valiante, N.M., Shum, B.P., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyan, D., Lanier, L.L. & Parham, P. (1997) Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*, **7**, 753-763.
- Ullbrecht, M., Couturier, A., Martinozzi, S., Pla, M., Srivastava, R., Peterson, P.A. & Weiss, E.H. (1999) Cell surface expression of HLA-E: interaction with human beta2-microglobulin and allelic differences. *Eur J Immunol*, **29**, 537-547.
- Vales-Gomez, M., Erskine, R.A., Deacon, M.P., Strominger, J.L. & Reyburn, H.T. (2001) The role of zinc in the binding of killer cell Ig-like receptors to class I MHC proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1734-1739.
- Vales-Gomez, M., Reyburn, H.T., Erskine, R.A., Lopez-Botet, M. & Strominger, J.L. (1999) Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *EMBO J*, **18**, 4250-4260.
- Valiante, N.M., Uhrberg, M., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K., Arnett, K.L., D'Andrea, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L. & Parham, P. (1997) Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity*, **7**, 739-751.
- Vallera, D.A., Felices, M., McElmurry, R.T., McCullar, V., Zhou, X., Schmohl, J., Zhang, B., Lenvik, A., Panoskaltis-Mortari, A., Verneris, M.R., Tolar, J., Cooley, S., Weisdorf, D., Blazar, B.R. & Miller, J.S. (2016) IL-15 Trispecific Killer Engagers (TriKEs) Make Natural Killer Cells Specific to CD33+ Targets While Also Inducing In Vivo Expansion, and Enhanced Function. *Clin Cancer Res*.
- van den Brink, M.R. & Burakoff, S.J. (2002) Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Immunol*, **2**, 273-281.
- Velardi, A., Ruggeri, L., Alessandro, Moretta & Moretta, L. (2002) NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation. *Trends Immunol*, **23**, 438-444.
- Verheyden, S., Bernier, M. & Demanet, C. (2004) Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia. *Leukemia*, **18**, 2002-2007.
- Verheyden, S. & Demanet, C. (2008) NK cell receptors and their ligands in leukemia. *Leukemia*, **22**, 249-257.
- Verheyden, S., Ferrone, S., Mulder, A., Claas, F.H., Schots, R., De Moerloose, B., Benoit, Y. & Demanet, C. (2009) Role of the inhibitory KIR ligand HLA-Bw4 and HLA-C expression levels in the recognition of leukemic cells by Natural Killer cells. *Cancer Immunol Immunother*, **58**, 855-865.
- Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C. & Brossay, L. (2012) Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol*, **12**, 239-252.

- Voskoboinik, I., Dunstone, M.A., Baran, K., Whisstock, J.C. & Trapani, J.A. (2010) Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol Rev*, **235**, 35-54.
- Wada, H., Matsumoto, N., Maenaka, K., Suzuki, K. & Yamamoto, K. (2004) The inhibitory NK cell receptor CD94/NKG2A and the activating receptor CD94/NKG2C bind the top of HLA-E through mostly shared but partly distinct sets of HLA-E residues. *Eur J Immunol*, **34**, 81-90.
- Wassmuth, R. (2010) Primer on the HLA system: basic concepts - medical relevance - laboratory methods - quality management. *Ecomed Medizin*, **1**.
- Wetzler, M., Baer, M.R., Stewart, S.J., Donohue, K., Ford, L., Stewart, C.C., Repasky, E.A. & Ferrone, S. (2001) HLA class I antigen cell surface expression is preserved on acute myeloid leukemia blasts at diagnosis and at relapse. *Leukemia*, **15**, 128-133.
- Wiernik, A., Foley, B., Zhang, B., Verneris, M.R., Warlick, E., Gleason, M.K., Ross, J.A., Luo, X., Weisdorf, D.J., Walcheck, B., Vallera, D.A. & Miller, J.S. (2013) Targeting natural killer cells to acute myeloid leukemia in vitro with a CD16 x 33 bispecific killer cell engager and ADAM17 inhibition. *Clin Cancer Res*, **19**, 3844-3855.
- Yamamoto, T., Yokozeki, H. & Nishioka, K. (2005) Psoriasis arthropathy and HLA-B51: report of 5 cases. *J Dermatol*, **32**, 606-610.
- Yokoyama, W.M., Kim, S. & French, A.R. (2004) The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol*, **22**, 405-429.
- Zang, D.Y., Goodwin, R.G., Loken, M.R., Bryant, E. & Deeg, H.J. (2001) Expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, Apo2L, and its receptors in myelodysplastic syndrome: effects on in vitro hemopoiesis. *Blood*, **98**, 3058-3065.
- Zinkernagel, R.M. & Doherty, P.C. (1974) Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, **248**, 701-702.

Eigene Publikationen

Reusing SB, Manser AR, Enczmann J, Mulder A, Claas FH, Carrington M, Fischer JC, Borkhardt A, Babor F and Uhrberg M (2015), Selective downregulation of HLA-C and HLA-E in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*. doi: 10.1111/bjh.13777

Danksagung

Last but not least ein Dankeschön an die Personen, die mich den letzten Jahren unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein erster, großer Dank gilt Prof. Dr. Markus Uhrberg, der es mir ermöglicht hat, in seiner Arbeitsgruppe an diesem interessanten Thema zu arbeiten. Danke für die Betreuung meiner Promotion, die konstruktiven Diskussionen und die hervorragende fachliche Betreuung.

Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei Prof. Dr. Sebastian Wesselborg aus der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät für die Übernahme des Koreferats und der Mentorenschaft.

Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Dr. Borkhardt (Direktor der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und klinische Immunologie) für die Bereitstellung von Proben und Bluten, den konstruktiven wissenschaftlichen Austausch und das Interesse an meiner Arbeit.

Weiterer Dank gilt Prof. Dr. Univ.-Prof. Dr. Dagmar Wiczorek und Dr. Barbara Hildebrandt für die Durchführung der FISH-Analysen.

Liebe Katharina, danke für die exzellente und geduldige Einführung in die Durchflusszytometrie, deine heilenden Hände an nahezu jedem durchflusszytometrischen Gerät des Instituts und deine positive Art.

Ein großes Dankeschön an meine lieben Kolleginnen Sandra und Sabrina für die tolle und harmonische Arbeitsatmosphäre, die es mir jeden Tag leicht gemacht hat auf die Arbeit zu kommen.

Lieber Florian, durch dich hat das Wort „jour fix“ eine andere Bedeutung erlangt. Ich danke dir für deine gelassene Art, meinen Dickkopf an dem ein oder anderen Tag hinzunehmen, deinen ansteckenden Enthusiasmus und dein Vertrauen in mich.

Liebe Angie, Maryam, Ricarda und Nadine - ihr seid meine Helden der letzten Jahre!

Wenn man so will
seid ihr meine Chill-Out Area
meine Feiertage in jedem Jahr
meine Süßwarenabteilung im Supermarkt
die Lösung, wenn mal was hakt
so wertvoll, dass man es sich gerne aufspart
& so schön, dass man nie darauf verzichten mag

Alina & Feliça
Teufelchen & Engelchen
You are summer to my winter heart, some friendships are timeless!

Melanie, Vanessa, Janette, Ina, Sinja, Verena, Isa, Lisi
Ihr seid meine ewigen Wegbegleiter & die Rockstars meines Lebens

Karina
#partnerincrim- you`re the type of flower that can still grow after a forest fire

Milena & Tabea
Danke für Eure wundervolle & einzigartige Freundschaft

Chris
Danke für deine Geduld, deine positive Art & dass du mich schon so lange begleitest

Mom ∞ Dad
Danke, dass ihr mir gezeigt habt, was endloses GLÜCK bedeutet, wie sich bedingungslose LIEBE anfühlt und wie gut der FRÜHLING duftet - weil Liebe so viel mehr schafft.
Ich liebe Euch

Ihr seid meine Familie und mein Fundament - meine Inspiration und meine Hoffnung an grauen Tagen.
Ihr seid der Wirbelsturm, der mein Leben so wunderbar bunt macht.
Von allen Farben seid ihr meine Lieblingsfarbe.
Es ist Euer bedingungsloser Rückhalt, der mir Mut, Zufriedenheit und Sicherheit gibt und mich morgens im Auto sitzen lässt, mit der Sonne im Gesicht und keinen anderen Gedanken zulässt außer:
„Verdammt Leben - du kannst so schön sein“

Mit euch ist das Meer immer ein bisschen blauer.

Last but not least. Me, myself & I
Immerhin hab auch ich ziemlich lange durchgehalten ;)
in need of VITAMIN SEA

Ich glaube es zu wagen, macht unglaublich viel Sinn!

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erstellt worden ist. Ich erkläre gleichzeitig, dass ich die vorgelegte Dissertation in dieser oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht habe. Weiterhin erkläre ich hiermit, dass vorher noch keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen wurden.

Düsseldorf, den

Sarah Reusing