

Aus der Medizinischen Klinik m.S. Hämatologie, Onkologie und
Tumorimmunologie, Campus Virchow Klinikum,
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Anti-Tumor Effekte von anti-T-Zell Globulin (ATG)

Welchen Einfluss hat ATG Fresenius auf die antikörperabhängige
zelluläre Zytotoxizität (ADCC) gegen hämatopoietische Tumoren? Löst
ATG Apoptose bei Tumorzellen aus?

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Hanna Elisabeth Brinkmann

aus Frankfurt am Main

Datum der Promotion: 10.03.2017

Inhaltsverzeichnis

1.1	Abstract Deutsch	5
1.2	Abstract Englisch	7
2.	Einführung	9
2.1	Allogene hämatopoietische Stammzeltransplantation	9
2.2	Graft-versus-Host-Disease	10
2.3	T-Zellen – zwei Seiten einer Medaille: GVT und GVHD	12
2.4	Konditionierung: Verschiedene Ansätze	12
2.5	Antikörper und ihre Wirkweisen: ADCC und Apoptose	13
2.6	In vivo und in vitro T-Zell-Depletion: Effekte und Unterschiede	14
2.7	Anti-T-Zell Globulin: Beschreibung und Wirkweise	14
2.8	Bisherige Erkenntnisse zum Einsatz von ATG bei Patienten	15
2.9	Anti-T-Zell Globulin und verwandte Präparate	17
2.10	Entwicklung der Hypothese und Fragestellung	17
3.	Methoden	19
3.0.1	Zelllinien	19
3.0.2	Zelllinien: Anzucht und Handhabung	19
3.0.3	Anti-T-Zell-Globulin	20
3.0.4	Beschreibung des Annexin V Apoptose Assay	21
3.0.5	Vorarbeit zu den CD107a und Apoptose Assays	22
3.1	CD107a Assay	22
3.1.1	Rituximab Etablierungsvorversuche	23
3.1.2	Effektorzellen (NK) : Targetzellen (Tumorzellen) Verhältnis (Ratio)	23
3.1.3	NK-Zell Isolierung	23
3.1.4	Färbung der Zellen und Inkubationszeit	24
3.1.5	Erweiterung durch Fixieren der Zellen: Fixierungsprotokoll	26
3.1.6	Protokoll 2 ohne NK-Zell Isolierung	26
3.1.7	Staining, Inkubation, Messung	28
3.1.8	Durchflusszytometrie	29
3.2	Apoptose Assay mit Annexin V	30

3.2.1	PBMCs und Zellaussage	30
3.2.2	Ansätze	30
3.2.3	Inkubation, Staining	31
3.2.4	Durchflusszytometrie	31
3.2.5	Verschiedene Inkubationszeiten	32
4.	Ergebnisse	33
4.1	Effekt von Rituximab auf die ADCC gegen Tumoren	33
4.1.1	Einfluss der Effektorzellen (NK):Targetzellen Ratio auf die ADCC gegen Tumoren	
4.2	Etablierung des CD107a Assays mit PBMCs	34
4.3	Einfluss von ATG-Fresenius auf die ADCC gegen Tumoren	35
4.3.1	Koinkubation der Tumorzellen JeKo-1 und PBMCs	35
4.3.2	Steigerung der NK-Zell-Degranulation unter ATG Einfluss	37
4.3.3	Vergleich der 20 µg/ml und 1000 µg/ml ATG Dosierung	38
4.3.4	Ergebnis aller Tumorzellen: Wie ausgeprägt ist die ADCC?	39
4.3.5	Repräsentative Darstellung aller getesteten ATG-Dosierungen auf die ADCC gegen RAJI Burkitt-Lymphom Zellen	41
4.3.6	Darstellung der ATG Konzentrationen: 20 µg/ml und 100 µg/ml , mit denen die deutlichsten Ergebnisse erzielt wurden	42
4.4	Apoptose Assay	44
4.4.1	Repräsentative Darstellung des Apoptose Assays an HL-60	44
4.4.2	Annexin V Anstieg bei RAJI und HL-60	45
4.4.3	Ergebnisse aller Tumorzelllinien ohne PBMCs mit verschiedenen ATG Dosierungen und Camptothecin	47
4.4.4	Repräsentative Darstellung von JeKo-1 mit und ohne PBMCs	48
4.4.5	Ergebnisse Tumorzellen mit PBMCs	50
4.4.6	Vergleich zweier AML-Zelllinien im Apoptoseversuch	51
5.	Diskussion	52
5.1	ATG Bindung an Tumorzellen	52
5.2	ATG und Pharmakokinetik	52
5.3	T-Zell-Depletion: Therapeutische Effekte und Risiken	53
5.4	ATG und cGVHD	53
5.5	Bedeutung des CD107a Assays	54

5.6	Immunzellen und ihre Wirkung gegen Tumoren: Mit und ohne ATG	55
5.7	ATG: Pros and Cons oder ATG und das Infektionsrisiko	55
5.8	ATG: Wann ist der beste Zeitpunkt?	57
5.9	ATG und mögliche Vorteile gegenüber mAbs	57
5.10	ATG und der deutliche Einfluss auf die ADCC	57
5.11	ATG und die Apoptose der Tumorzellen	59
5.12	Wie beeinflusst die CDC den programmierten Zelltod?	60
	Zusammenfassung: Klinische Signifikanz und Ausblick	61
6.	Literaturverzeichnis	62
7.	Eidesstattliche Versicherung	70
8.	Lebenslauf mit Unterschrift	71
9.	Publikationsliste	73
10.	Danksagungen	74

1.1 Abstract Deutsch

Einleitung

Die allogene hämatopoietische Stammzelltransplantation (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) ist eine etablierte Therapie für eine Vielzahl hämatopoietischer Erkrankungen. Es ist aktuell ein Standardverfahren, die im Transplantat enthaltenen T-Zellen des Spenders zu depletieren, da sie hauptverantwortlich für die Entwicklung der Graft-versus-Host-Disease (GVHD) sind.

Es bestehen prinzipiell zwei Möglichkeiten zur Depletion von T-Zellen: *In vitro* durch Manipulation des Transplantats und *in vivo*, z.B. durch Gabe des polyklonalen Antikörpers Anti-T-Zell Globulin (ATG).

Klinische Daten zeigen eine vergleichbare Effektivität der beiden Ansätze zur Verhinderung der GVHD. Allerdings zeigte die *in vitro* T-Zell-Depletion eine erhöhte Tumorrezidivrate, die nach *in vivo* T-Zell-Depletion nicht auftrat. Diese Daten bilden die Grundlage für die Haupthypothese dieser Arbeit: „ATG hat anti-Tumor Effekte“.

Methodik

Ich habe den CD107a Assay und den Apoptose Annexin V Assay, die beide auf Durchflusszytometrie basiert sind, angewendet. Ich arbeite mit lebenden Tumorzellen verschiedener hämatologischer Erkrankungen, die mit PBMCs (peripheral blood mononuclear cell, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) zusammen inkubiert werden. Beim CD107a Assay wird die NK-Zell (Natürliche Killerzellen) Degranulation als Marker der gesteigerten ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity, Antikörper-induzierte zelluläre Zytotoxizität) gemessen. Die Expression von Annexin V zeigt den Einfluss von ATG auf die Apoptose und die komplement-unabhängige Zytotoxizität auf.

Ergebnisse

ATG löst bei NK-Zellen im Beisein von unterschiedlichen Tumorzellen in allen getesteten Dosierungen eine gesteigerte Degranulation und damit auch eine verstärkte ADCC aus. Der Einfluss von ATG auf die Apoptoseinduktion bei Tumorzellen ist ebenfalls deutlich. Die Tumorzellen zeigen einen signifikanten Anstieg des Annexin V, der auf eine ATG induzierte Apoptose hinweist.

Schlussfolgerung

Meine Ergebnisse zeigen, dass ATG anti-Tumor Effekte vermittelt. Sie liefern eine mögliche Erklärung für die relativ geringe Leukämie rezidivrate nach allo-HSCT mit *in vivo* T-Zell Depletion. Die Bindung von ATG an Tumorzellen ist durch den Herstellungsvorgang erklärt: Kanninchen werden mit einer humanen T-Zell-Lymphom Linie beimpft, die auch verschiedene Antigene exprimiert. Meine Daten haben Implikationen für zukünftige Therapieansätze bei der allo-HSCT, vor allem in Situationen, wo eine T-Zell-Depletion bei einer erhöhten Tumorrezidivgefahr eingesetzt wird.

1.2 Abstract English

Introduction

The allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is an established therapy for a multitude of diseases, mainly haematologic malignancies.

This thesis investigates a complication of that therapy, the Graft-versus-Host-disease (GVHD) and one of its different possible medical treatments, the polyclonal antibody anti-thymocyte globulin (ATG).

In clinical use, it is a standard procedure to deplete the graft of its T-cell, for they are one of the main effectors for the development of GVHD.

In principle, there are two possibilities for the depletion of T-cells: *In vitro* through manipulation of the graft itself or *in vivo*, for example through the administration of ATG. Clinical data show that both approaches are similarly effective in order to prevent GVHD. However, the *in vitro* T-cell depletion showed a significantly increased tumor relapse rate which did not occur with the *in vivo* T-cell depletion. Those data are the basis for the main hypothesis of my work: „ATG has anti-tumor effects.“

Methods

I occupy myself mostly with flowcytometric methods and apply two different assays, the CD107a and the apoptosis Annexin V assay. I work with living tumor cells of a variety of hematological malignancies that are conincubated with PBMCs and analysed. During the CD107a assay, the NK-cell (natural killer cell) degranulation is measured as a marker for an increase of ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity). The expression of Annexin V on tumor cells shows the impact of ATG on apoptosis and therefore on the complement-independent cytotoxicity.

Results

ATG induces an increase of the degranulation of NK-cells and thus an enhanced ADCC in the presence of various tumor cells. The influence of ATG on the induction of apoptosis in tumor cells is equally distinct. All tumor cells show a strong rise of Annexin V lest they are incubated only with ATG, which indicates the ATG-induced apoptosis.

Conclusion

My results about the antitumor effects of ATG, shown through the experiments with ADCC and the induction of apoptosis, contribute to an improved understanding of the immunologic processes in the early phase after alloHSCT. They provide a possible explanation for the relatively low leukemia relapse rate after allo-HSCT with *in vivo* T-cell depletion. The binding of ATG to tumor cells can be explained with the manufacturing method: Rabbits are inoculated with a human T-cell-lymphoma line, which expresses a variety of antigens.

My findings could potentially influence future therapeutical approaches concerning the allo-HSCT, especially in situations where a depletion of T-cells is required but tumor relapse is a major concern.

2. Einführung

2.1 Allogene hämatopoietische Stammzelltransplantation

Die allogene hämatopoietische Stammzelltransplantation (HSCT) ist eine etablierte Therapie für eine Vielzahl hämatopoietischer Erkrankungen. Ihr Einsatzort ist vielfältig und reicht von der Therapie bei malignen Bluterkrankungen und anderen Tumorerkrankungen bis zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythemathodes. [1, 2]

Ursprünglich als Therapieansatz für strahlenexponierte Patienten nach den Atombombenexplosionen in Hiroshima und Nagasaki und dem Ende des zweiten Weltkrieges erforscht, wurden zunächst an Mäusen und Hunden Knochenmarkstransplantationen durchgeführt und früh das Therapiepotenzial entdeckt. [3, 4]

Bereits 1959 erfolgte die erste erfolgreiche Knochenmarkstransplantation beim Menschen. Trotz hoher und damals noch ungeklärter Risiken von Relapse und Transplantatversagen erfolgten zahlreiche Transplantationsversuche, bei denen viele Patienten nach einigen Monaten verstarben. [5-7] Erst mit der Entdeckung und Erforschung des HLA Systems (human leukocyte antigen) sowie der Einführung von Methotrexat, Cyclophosphamid und der Ganzkörperbestrahlung (total body irradiation, TBI) etablierte sich die Therapie. [8-12]

Das Überleben (Overall Survival, OS) nach allo-HSCT konnte in den folgenden Jahrzehnten durch Innovationen in den Bereichen Chemotherapeutika, Transplantations-Konditionierungsvorbereitungen und supportive Therapien deutlich verbessert werden. [13]

In einem 2010 veröffentlichten Paper des New England Journal of Medicine zeigte sich erneut eine Reduktion der Mortalität und der Morbidität nach allo-HSCT (zwischen 1993-2007), obwohl die Transplantierten über die Jahre älter und gebrechlicher (d.h. mit zahlreicheren Komorbiditäten belastet) wurden. Sämtliche Risikofaktoren wie schwere GVHD, Organschäden (Leber, Niere, Lunge) und Infektionen sanken signifikant. [14]

2.2 Graft-versus-Host-Disease

Trotz immenser Fortschritte seit Beginn der HSCT, der Abnahme der transplantationsassoziierten Morbidität und Mortalität, bleibt die Graft-versus-Host-Krankheit eine große medizinische Herausforderung. [11, 15]

Akute GVHD ist eine häufige Komplikation bei alloHSCT sowie auch bei Donor Lymphocyte Infusionen (Spender-Lymphozyten-Infusionen, DLI). [16] Die Krankheit wurde früh als „wasting disease“ beschrieben, aufgrund deren die ersten experimentell transplantierten Mäuse unerklärlicherweise starben. [4, 17] Spender-T-Zellen richten ihre Aktivität nicht nur gegen die malignen Blutzellen (der gewünschte GVT, Graft-versus-Tumor-Effekt), sondern auch gegen empfängerkörper eigenes normales Gewebe. [3, 18] Die Inzidenz ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wie etwa der Art der Prophylaxe, dem HLA - Matching von Spender und Empfänger, der Intensität des Conditioning Regimes, der Zusammensetzung des Grafts und dem Alter sowie der vorhergehenden Gesamtkonstitution des Patienten. [19-22]

Das Ausmaß an a/cGVHD (akut/chronisch) unterscheidet sich auch in Abhängigkeit vom verwendeten Transplantat. So sind zum Beispiel mobilisierte periphere Blutstammzellen (PBSC) assoziiert mit einer geringeren Rückfallrate (relapse rate) aufgrund höherer Graft-versus-Tumor-Effekte, haben aber im Gegensatz zu Knochenmark (Bone Marrow, BM) eine höhere Inzidenz von cGVHD. [23-25]

Bereits vor mehr als fünfzig Jahren definierte Billingham die drei Voraussetzungen, um eine GVHD zu entwickeln:

- Das Graft muss immunkompetente Zellen beinhalten
- Im Empfänger müssen Gewebeantigene vorhanden sein, die im Spender nicht anwesend sind und
- Der Empfänger ist nicht in der Lage, die transplantierten Zellen mit einer körpereigenen Reaktion komplett abzustößen. [11, 26]

GVHD wird je nach Schweregrad in verschiedene Kategorien unterteilt und nach „akut“ oder „chronisch“ unterschieden, wobei die Therapie und Prävention der akuten GVHD weitaus besser und häufiger erforscht wurden. Ursprünglich wurde ein Auftreten der

ersten GVHD Symptome vor dem 100. Post-Stammzellinfusionstag als akut, danach als chronisch eingeteilt; diese strengere Einteilung wurde allerdings durch veränderte therapeutisch-medikamentöse Vorbereitung und ein verändertes Verständnis von GVHD aufgelockert. [11]

Die gängigste Einteilung der akuten GVHD in die Grade I – IV beruht auf den Glucksberg-Seattle Kriterien (GSC), die sich auf den Schweregrad des Befalls der Haut, Leber und gastrointestinalen Traktes/GIT beziehen (Hautausschlag, erhöhtes Bilirubin, Durchfall). [27]

Inzwischen werden zusätzlich zu den GSC auch weitere Laborwerte (wie etwa Thrombozytenanzahl, Cholinesterase, Hb) zur Prädiktion des Therapieerfolges und eventuellen Modifikation verwendet. [28, 29] Zudem entwickelte die International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) ein neues Staging System, den IBMTR Severity Index, der allerdings trotz guter Korrelation mit den Prognosen seltener angewendet wird. [22, 30]

Nach aktuellem Forschungsstand teilt sich die Pathophysiologie der Entstehung der GVHD in drei Phasen: Zunächst wird durch das Konditionierungsregiment Gewebe beschädigt. Dadurch aktivieren sich körpereigene Antigen-präsentierende Zellen (APC) [22] sowie später die im Graft enthaltenen T-Zellen, und sie proliferieren (afferente Phase). Letztendlich werden dadurch inflammatorische Zytokine wie TNF- α (Tumornekrosefaktor α) freigesetzt, die zur Gewebsnekrose führen (Vollbild der GVHD, efferente Phase).

[11, 31, 32]

Bekannt ist auch, dass inflammatorische Zytokine eine wichtige Rolle in der frühen Phase sowie in der Verstärkung der GVHD spielen. [32] Allerdings scheint es, dass eine Inaktivierung der Zytokine (wie etwa TNF- α) zwar zur Reduzierung der GVHD, allerdings zu einem erhöhten Anstieg der infektiösen Komplikationen führt. [31]

Ein weiterer bekannter auslösender Faktor ist die Exposition der befallenen Organe (Leber, Haut, gastrointestinaler Trakt/GIT) gegenüber mikrobiellen Pathogenen. Mäuse, die nach der HSCT in keimfreien Umgebungen blieben, zeigten eine signifikante Reduzierung des Schweregrads und der Inzidenz akuter GVHD.

Die Risikofaktoren für ein Auftreten akuter und chronischer GVHD unterscheiden sich ebenfalls: Keineswegs ist die chronische GVHD (cGVHD) nur eine Folge der akuten GVHD (aGVHD), sondern vielmehr ein eigenständiges Krankheitsbild mit eigenen Risikofaktoren. [33, 34]

Die Total Body Irradiation (TBI), eine Ganzkörperbestrahlung, die häufig zum präparativen Regime vor einer alloHSCT gehört, sowie HLA-mismatching sind häufiger assoziiert mit dem Auftreten von aGVHD, haben allerdings wenig Einfluss auf die Entstehung von cGVHD. Das steigende Alter der Patienten ist hingegen häufiger assoziiert mit einer Zunahme der Inzidenz der cGVHD. [34]

2.3 T-Zellen - zwei Seiten einer Medaille: GVT und GVHD

T-Zellen sind ein essentieller Bestandteil des Transplantats. Bestehend aus verschiedenen T-Zell Untergruppen tragen sie dazu bei, dass die hämatopoietischen Stammzellen des Spenders anwachsen, und vermindern die Abstoßungsreaktionen. Zudem greifen die T-Zellen die von der Chemotherapie und der Konditionierung übriggebliebenen Tumorzellen an und sind somit die treibende Kraft hinter dem GVT Effekt. Andererseits sind sie auch hauptverantwortlich für die Entwicklung der GVHD, besonders der akuten. Es ist deshalb schwierig, die therapeutische Balance zwischen einer Eliminierung der T-Zellen und ihren wertvollen Effekten zu finden. [11, 35, 36]

2.4 Konditionierung: Verschiedene Ansätze

Die Konditionierung eines Patienten hat drei Ziele: Platz zu schaffen für das Transplantat, Immunsuppression und natürlich die Eradikation der Erkrankung. Es gibt Hinweise darauf, dass ein depletiertes Knochenmark eher das Transplantat aufnimmt als ein „volles“. Die Immunsuppression wird wichtiger, je mehr HLA-Mismatching erfolgt und je stärker der Empfänger durch z.B. Transfusionen bereits sensibilisiert ist. [11, 37]

Bei der Konditionierung gibt es verschiedene Ansätze: Die Zugabe von Cyclophosphamid zur TBI war eine der ersten erfolgreichen Therapiekombinationen; weitere (auch Mehrfachkombinationen) mit u.a. Busulfan, Etoposid und Melphalan folgten. Inzwischen differenziert man je nach Risikoprofil des Patienten zwischen unterschiedlichen Therapien, während die Kombinationen Busulfan + Cyclophosphamid

und TBI + Cyclophosphamid am häufigsten zur myeloablativen Konditionierung eingesetzt werden. [11, 37-40] Zudem versucht man inzwischen, bei älteren und komorbiden Patienten möglichst ein reduziertes Konditionierungsregime anzuwenden (z.B. durch die Anwendung von Fludarabin oder ATG). [41-43]

Die am häufigsten eingesetzte Akuttherapie bei Transplantatabstoßung ist hochdosiertes Prednisolon, um eine sofortige Immunsuppression herbeizuführen. [44]

2.5 Antikörper und ihre Wirkweisen: ADCC und Apoptose

Monoklonale Antikörper (monoclonal antibodies, mAb) richten sich gegen ein einzelnes Epitop und binden daher mit hoher Spezifität Moleküle. Im Gegensatz zu polyklonalen Antikörpern entstammen sie alle aus einer Ursprungs-B-Zelle. Sie werden sowohl zu diagnostischen Zwecken als auch (in jüngerer Zeit) therapeutisch eingesetzt.

mAbs werden aus sogenannten Hybridomzellen (einer Fusion aus einer B-Zell-Reihe, die den Antikörper produziert und einer Plasmazytom-Plasmazellreihe mit unbegrenzter Teilungsrage) gewonnen, welche entweder in Tieren oder in Zellkulturen gezüchtet werden. [45, 46]

Die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) wurde zuvor als eines der Hauptwirkmechanismen von monoklonalen Antikörpern für den therapeutischen Effekt gegen Tumorzellen beschrieben. [47]

Die Antikörper binden an Oberflächenantigene auf Zielzellen, z.B. Tumorzellen. Diese Markierung führt zu einer effektiveren Immunantwort der NK-Zellen durch Degranulation. [48]

Der programmierte Zelltod (Apoptose) führt zu charakteristischen Veränderungen der Zellen und zum Untergang der Zellen durch einen komplexen Mechanismus von Rezeptoren und Zytokinen. [49] ATG induziert auf mindestens drei verschiedenen Wegen die Apoptose: Durch Kaspase Aktivierung, durch Cathepsin B Freisetzung aus Lysosomen und durch die Mitochondrien Membran Depolarisation. [50]

Interessanterweise tritt dieser Effekt der ADCC auch bei sehr niedrigen ATG Konzentrationen auf und wirkt dann in vitro selektiv auf aktivierte T-Zellen (diejenigen, welche u.a. für die Aktivität der GVHD verantwortlich sind) und nicht auf ruhende T-Zellen. [51]

2.6 in vivo und in vitro T-Zell-Depletion: Effekte und Unterschiede

Die *in vivo* T-Zell Depletion ist eine nun häufig eingesetzte und effektive Methode, um das Auftreten von schwerer GVHD zu reduzieren und bei bestimmten hämatologischen Krankheitsbildern auch das Überleben (OS) post-Transplant zu verbessern; [52, 53] zum Effekt auf das OS gibt es unterschiedliche Ergebnisse bei Verwendung des monoklonalen anti-CD52 Antikörpers Alemtuzumab (Campath) und bei ATG. [33, 54, 55] So treten gehäuft Rezidive nach Verwendung von Alemtuzumab nach HSCT auf, nicht jedoch bei der Verwendung von ATG. [56, 57]

Die *in vitro* T-Zell Depletion vor Infusion des Transplantats ist sehr effektiv, um GVHD präventiv zu behandeln - allerdings erhöht diese Art der T-Zell-Depletion die Gefahr eines Rezidivs nach allo HSCT, da der GVT-Effekt stark über die Spender-T-Zellen gesteuert wird. [35, 58] In einigen Zentren wird versucht, der erhöhten Rezidivrate mit TBI oder Chemotherapeutika entgegenzuwirken, was wiederum eine erhöhte Morbiditäts- und Mortalitätsrate aufgrund der Nebenwirkungen nach sich zieht. Aktuell erforscht man als Therapiealternativen u.a. die Zugabe von aufbereiteten T-Zellen (nach Depletion der alloreaktiven T-Zellen) oder selektierten NK-Zellen. [36, 41]

2.7 Anti-T-Zell Globulin: Beschreibung und Wirkweise

Polyklonale Antikörper/ATG werden bereits seit Jahrzehnten zur Immunsuppression angewendet, auch wenn viele Effekte sich erst im Laufe der Zeit herausstellten.

Erst in letzter Zeit klärt die Forschung die genauen Wirkmechanismen auf und versetzt Ärzte weltweit somit in die Lage, den klinischen Einsatz dosis- und zeitpunktgenauer anzupassen.

ATG Zubereitungen bestehen aus einer polyklonalen Mischung aus IgG und IgM Immunglobulinen, die in Kaninchen oder Pferden durch Injektion von humanen T-Thymozyten oder T-Lymphomzellen gezüchtet werden. [59, 60]

Ein Haupteinsatzort von polyklonalen Antikörpern ist die Konditionierung vor allogener hämatopoietischer Stammzelltransplantation, um der Entstehung sowohl von akuter als auch chronischer GVHD vorzubeugen. Der Hauptmechanismus ist die *in vivo* Depletion der T-Zellen. Der immunologische Beginn der GVHD-Reaktion tritt bereits direkt nach

Infusion des Allografts, lange vor dem Auftreten erster Symptome, auf und muss daher präventiv behandelt werden. [61, 62]

Die T-Zell-Immunreaktion ist ein redundanter Prozess, bei dem viele Oberflächenmarker und Korezeptoren der T-Zellen im immunologischen Prozess ersetzt werden bzw die Rolle eines fehlenden Glieds einnehmen können. Deswegen eignen sich polyklonale Antikörper besonders gut dazu, die transplantationsassoziierte Immunreaktion zu modifizieren. [63, 64]

ATG hat sowohl den Effekt der Unterdrückung der Immunreaktion des Empfängers und dadurch Förderung des Engraftments der körperfremden HSCT als auch die Supprimierung der Aktivität der Spender-T-Zellen, um GVHD vermindern. [57, 65-67]

Seit dem ersten Einsatz bei der HSCT hat sich das Wissen um ATG gemehrt: Durch zahlreiche klinische Studien gab es Dosisanpassungen in Bezug auf verschiedene prä-alloHSCT Regime, TBI und reduced-intensity Konditionierung. [13, 68]

ATG wird für die Behandlung einiger weiterer Konditionen eingesetzt, wie etwa bei der Rescuetherapie bei akutem Transplantatversagen bei allo-HSCT und Nierentransplantation, schwerer aplastischer Anämie, Autoimmunerkrankungen und GVHD. [69-71]

ATG wird nicht als Einzelmedikament zur Prophylaxe von GVHD verwendet, sondern meist zusätzlich zu Cyclosporin A und Mycophenolat Mofetil oder Methotrexat verabreicht. [22, 38, 42, 43, 72-74]

2.8 Bisherige Erkenntnisse zum Einsatz von ATG bei Patienten

Durch eine in vitro Depletion der alloreaktiven T-Zellen sinkt die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer GVHD, jedoch steigen sowohl das Rezidiv- wie auch das Infektionsrisiko wegen des fehlenden GVT-Effekts. [75] Überraschenderweise scheint die Gabe von ATG zur in vivo T-Zell Depletion nicht die Rezidivgefahr nach HSCT zu erhöhen und dennoch die Rate an GVHD zu senken. [52, 57, 65, 66, 72, 76-79]

Der Einfluss von ATG auf die Infektionsrate durch Epstein-Barr-Virus (EBV) und andere virale und bakterielle Erkrankungen wird aktuell noch kontrovers diskutiert. Fatale Infektionen scheinen allerdings eher bei high-dose als bei low-dose ATG aufzutreten [14, 52, 72, 79-81].

Es wurde bereits vermutet, dass ATG einen Einfluss auf sowohl direkte als auch Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC) sowie Opsonierung und Phagozytose hat und die Mechanismen verstärkt bzw. induzieren kann. Bekannt ist auch, dass die Zugabe von Komplement den zytotoxischen Effekt von ATG und die Zytotoxizität anderer Medikamente (z.B. Fludarabin) verstärkt. Allerdings sind die Mechanismen noch nicht geklärt und werden weiterhin erforscht. [68, 82-86]

Anti-Thymozytenglobulin ist zudem ein potenter Auslöser von Apoptose bei verschiedensten peripheren mononuklearen Blutzellen und auch von verschiedenen leukämischen Zelllinien. [87]

Der Einsatz von low-dose ATG zeigte, dass sowohl die Inzidenz von (v.a. schwerer/ Grad III-IV) aGVHD als auch von cGVHD vermindert werden konnte und die Lebensqualität verbessert wurde, ohne dass das OS negativ oder positiv beeinflusst wurde. [33, 52, 61, 78, 88, 89]

Diese Vermutung wird u.a. dadurch gestärkt, dass aGVHD dann vermindert auftritt, wenn hohe Serumlevelkonzentrationen von ATG post-Transplant vorhanden sind und das Auftreten von cGVHD durch zeitgleiche ATG und Graft Administration vermindert werden kann. [79, 90-92]

Ferner wurde ATG effektiv bei der alloHSCT bei mismatched unrelated donors eingesetzt, die normalerweise eine erhöhte Rate von GVHD und Transplant-assoziiertes Mortalität (TRM) nach sich zieht. Die war nach Zugabe von ATG im Vergleich zu matched unrelated donors nicht der Fall. [93] Finke et al fanden zudem, dass die Zugabe von ATG zur Standard-GVHD-Prophylaxe in einer ebenso niedrigen Rate schwerer GVHD bei unmatched unrelated SCT resultierte wie bei matched-sibling SCT. [94]

Es gibt zudem vermehrt Hinweise auf eine Wirkung von ATG auf antigenpräsentierende dendritische Zellen und eine Induktion der Depletion von zirkulierenden myeloischen und plasmazytoische dendritische Zellen, die eine signifikante Rolle in der Aktivierung von T- und B-Zellen spielen und daher einen Einfluss auf die Verminderung der GVHD haben könnten. [59, 95, 96]

2.9 Anti-T-Zell Globulin und verwandte Präparate

Es existieren verschiedene ATG-Präparate, z.B. ATG Fresenius, Thymoglobulin, Lymphoglobulin, ATGAM etc., die sich in Ihrem Speziesursprung, ihrer Dosierungswirkstärke sowie in ihrer in-vivo Akkumulationsfähigkeit unterscheiden. [52, 87] Dabei gibt es nur geringe Unterschiede in Ihrer Zytotoxizität. Resistenz gegenüber ATG kann durch Zugabe von Komplement oder aktiviertem humanem Plasma vermindert werden. Dies weist möglicherweise auf die Wichtigkeit der komplementabhängigen Zytotoxizität (CDC) hin, die ebenfalls im Rahmen meiner Arbeit und unseres Papers eine Rolle spielte. [97, 98]

In meiner Forschung verwendete ich ausschließlich das ATG – Fresenius Präparat.

2.10 Entwicklung der Hypothese und Fragestellung

Aus der vorhandenen Literatur lässt sich vermuten, dass, da die Verwendung von ATG trotz effektiver Unterdrückung der GVHD durch Supprimierung der T-Zellen keine verstärkte Rezidivrate nach sich zieht, andere Mechanismen die Wirksamkeit von ATG beeinflussen. Wahrscheinlich hat ATG unterschiedliche Anti-Tumor-Effekte, deren Mechanismen bislang unbekannt sind.

So ist zum Beispiel noch nicht geklärt, ob ATG eine ADCC gegen Tumore auslöst und somit einen direkten Einfluss auf NK-Zell-Degranulation hat.

Es ist fraglich, ob es einen direkten komplement-unabhängigen zytotoxischen Effekt von ATG auf die Tumorzellen an sich gibt, zum Beispiel in Form einer verstärkten Apoptose unter Einfluss von ATG, sowohl in Anwesenheit von PBMCs als auch ohne.

Auch die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) spielt bekannterweise beim Einfluss von mAb auf verschiedene Tumorerkrankungen eine Rolle, die für ATG noch nicht abschließend erforscht ist (Ayuk für chronisch-lymphatische Leukämie/CLL und Multiples Myelom/MM [84, 85]).

Diese Arbeit erforscht den Einfluss von aTG auf die ADCC als Reaktion der NK- Zellen auf Tumorzellen und auf die Apoptose der Tumorzellen.

Wesentliche Fragen sind: Wie hoch ist der Einfluss von ATG auf die antikörper-induzierte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) gegen hämatopoietische Tumore?

In welcher NK-Zell : Tumorzellratio ist die Reaktion am eindeutigsten zu verzeichnen?
Inwiefern ist die Reaktion der Effektorzellen von der ATG Konzentration abhängig?

Löst ATG eine komplementunabhängige Zytotoxizität mit Apoptosereaktion in hämatopoitischen Tumorzellen aus? Inwieweit hat die Anwesenheit von PBMCs einen Einfluss auf die Apoptose?

Ich vermute - aufgrund der Effektivität der mAb Rituximab und Alemtuzumab auf die NK-Zell-Degranulation und damit die ADCC – dass die NK-Zellen eine Steigerung der ADCC unter ATG Einfluss haben. Voruntersuchungen haben gezeigt, dass der Einfluss von ATG konzentrationsabhängig ist. Daher vermute ich, dass die Höhe der ATG-Konzentration mit der Stärke der NK-Zell Degranulation positiv korreliert.

Allerdings wurde auch eine Sättigungskurve bei der Bindung von ATG an NK-Zellen beschrieben, d.h. möglicherweise wird die Reaktion auf eine steigende Konzentration von ATG abflachen. [48]

Ferner gehe ich davon aus, dass ATG bei allen hämatopoietischen Tumorzelllinien, die ich testen werde, Apoptose auslösen wird. Solche Untersuchungen wurden bereits mit CLL, einigen B-Zelllinien und MM durchgeführt. ATG-ähnliche Medikamente steigerten in diesen Fällen die komplementunabhängige Zytotoxizität (Ayuk, Bonnefoy-Berard). Ich erwarte zudem, dass ähnliche Tumorzelllinien ähnlich reagieren werden.

3. Methoden

3.0.1 Zelllinien

K562 (akute myeloische Leukämie, AML), HL-60 (AML), Karpas-422 (B-Zell-Lymphom) und YT (T/NK-Zell Lymphom, TCL) Zellen wurden in mit 20% fetalem Kälberserum (FCS) angereicherten Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptavidin (Invitrogen, Darmstadt) kultiviert.

K562 (AML) and Mec-1 (chronisch lymphatische Leukämie, CLL) wurden in IMDM mit 10% FCS kultiviert. RPMI-8226 (Multiples Myelom, MM), RAJI (BL), JeKo-1 (Mantelzelllymphom, MCL), EHEB (CLL, Epstein-Barr transformiert) wurden in mit 10% FCS angereicherten Roswell Park Memorial Institute RPMI -1640 Medium, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptavidin gezogen. In alle Flaschen RPMi-Medium wurde Glutamin (Sigma-Aldrich) als Nährstoff zugegeben.

3.0.2 Zelllinien: Anzucht und Handhabung

Zum Großteil wurden die Zellen nach dem Auftauen zunächst in mit 20% FCS angereichertem RPMI-1640 Medium, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptavidin angezüchtet und nach Stabilisierung des Wachstums auf ihre Erhaltungskonzentration von 10% FCS reduziert.

Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Zellinkubator (BINDER, C150 E1) unter befeuchteten Bedingungen angezüchtet.

Alle Zelllinien erhielt ich in gefrorenem Zustand. Sie wurden zunächst in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank aufbewahrt. Die Zelllinien wurden nach Bedarf zwei bis drei Wochen vor dem jeweiligen Assay aufgetaut, kultiviert und später entweder verworfen oder erneut eingefroren.

Die meisten Zelllinien wurden mit 70% RPMI, 20% FBS und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) eingefroren. Alle Zelllinien wurden im Verlauf der Arbeit mindestens einmal aufgetaut und wieder eingefroren. Dabei zeigte die Zelllinie EHEB (CLL) als einzige bereits Schäden bei der ersten Auftauung, was wahrscheinlich ein Hinweis auf Schäden durch das Einfrieren oder die Verwendung davor war. Die EHEB-Zellen wurden neu erworben und es wurde mit den neuen Zellkulturen gearbeitet.

Es wurden keine Zelllinien eingefroren, die sich länger als vier Wochen in Zellkultur befanden. Als Kulturflaschen wurden v.a. Tissue Culture Flask (SARSTEDT, nicht adhären für Suspensionszellen) verwendet, in 50ml oder 250ml Flaschen.

Bei verzögertem Wachstum der Zellen wurden die Zellen zunächst in 24-Well-Zellkulturplatten (Tissue Culture Plate, SARSTEDT) und später in Zellflaschen (zunächst SARSTEDT 50ml, dann SARSTEDT 250ml) kultiviert. Für das Suspendieren und Bearbeiten der Zellen wurden vornehmlich die Serological Pipette (SARSTEDT, non progenic) in den Größen 5, 10, 25ml verwendet. Als Pipettierhilfe benutzte ich vornehmlich einen Pipetboy (Integra Biosciences).

Alle Arbeiten mit den eingefrorenen und angezüchteten Zellen erfolgten unter sterilen Bedingungen (Thermo Scientific, SAFE 2020). Die Zellen wurden täglich auf Zellpopulation und Wachstum mikroskopisch (Mikroskop: Motic Germany, BA410 Binocular) sowie etwaige Erregerfremdpopulationen (als Zeichen für Kontamination) geprüft und ggf. umgesetzt. Sie wurden mit entweder mit 10% oder 20% FCS versetzten RPMI-Medium plus 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptavidin ernährt.

3.0.3 Anti-T-Zell Globulin

Für alle Experimente verwendete ich das Anti-T-Zell Globulin ATG Fresenius (Neovii Biotech, Gräfeling, Deutschland), ein polyklonales Kaninchen Anti-T-Zell Globulin.

Es wird durch Immunisierung von New Zealand White Kaninchen mit der humanen Jurkat T-lymphoblastischen Zelllinie produziert. Den Kaninchen werden diese Jurkat Zellen injiziert und bilden Antikörper gegen die Zellen. Das den Kaninchen entnommen Blut, in dem sich die Antikörper befinden, wird zentrifugiert und das Serum durch Filter und Chromatografie aufgereinigt. [99]

ATG Fresenius enthält Antikörper mit einem breiten Spektrum an Spezifität gegenüber Antigenen, die auf verschiedenen normalen und malignen hämatopoietischen Zellen exprimiert werden, darunter T, B, NK und dendritischen Zellen. Es wird häufig im klinischen Bereich eingesetzt, v.a. bei humanen Transplantationen. Einige Haupteinsatzgebiete sind die Konditionierung für allo-HSCT, Prophylaxe und Behandlung von GVHD, sowie Prophylaxe und Behandlung von Transplantatabstoßung. [97] Der Name anti-T-Zell Globulin ist eigentlich inadäquat, da

das Medikament auch auf andere Zellgruppen wie etwa NK- und B-Zellen wirkt und kein gesamtes Serumglobulin, sondern ausschließlich IgG enthält. [52, 99]

3.0.4 Beschreibung des Annexin V Apoptose Assay

Der Apoptose Assay ist ein bereits vorbeschriebender Assay, der sich im Anschluss an den CD107a Assay ohne größere Schwierigkeiten im Labor etablieren ließ.

Grulich et al erforschten, dass ATG in verschiedenen leukämischen Zelllinien Apoptose auslösen kann, ohne den gleichen Effekt bei hämatopoietischen Stammzellen zu haben. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen des Multiplen Myeloms keine apoptotische Reaktion auf ATG, und stattdessen wurde komplementabhängige Zelllyse induziert. Es wurde interessanterweise bemerkt, dass einzig die NK-Zell-leukämische Reihe YT dem Einfluss von ATG induzierter Apoptose resistent war. [85, 87]

Annexine sind kalziumabhängige, u.a. an Phosphatidylserin bindende Proteine. Phosphatidylserin befindet sich normalerweise auf der Innenseite der Plasmamembran von Zellen; bei Apoptose verschiebt sich die Struktur, und Phosphatidylserin wird auf der extrazellulären Membran exprimiert, was apoptotische Zellen als Ziele der Phagozytose markiert. [100, 101]

Durch die Markierung mit Fluoreszenz-gekennzeichnetem Annexin V kann so Phosphatidylserin auf der Oberfläche apoptotischer Zellen erkannt werden. [102, 103]

Bereits in frühen Stadien der Apoptose bindet das gefärbte Annexin V an Phosphatidylserin, während andere Marker, wie etwa Propidium Iodid / PI, welches ebenfalls nekrotische Zellen nach Auflösung der Zellmembranen markiert, noch keine Aktivität zeigen. [104] Im späten Stadium der Apoptose hingegen können sowohl Propidium Iodid (PI) als auch Annexin V flowzytometrisch entdeckt werden; auf diese Weise wird das frühe Stadium des programmierten Zelltods (Apoptose) vom späten Stadium (Nekrose) unterschieden. [105]

Camptothecin ist ein natürliches Alkaloid, gewonnen aus der Rinde und dem Samen des *Camptotheca acuminata*. Es wirkt durch Hemmung der Topoisomerase I und führt somit durch DNA-Strangbrüche zur Apoptose. Weiterentwicklungen von Camptothecin sind Irinotecan und Topotecan. Sie werden als Zytostatika in der Tumorthherapie eingesetzt. [106, 107]

3.0.5 Vorarbeit zu den CD107a und Apoptose Assays

Wie bereits in Vorstudien festgestellt, ist die Menge an degranulierenden NK-Zellen abhängig von der Effektor:Target (Zielzellen) Ratio. Auch wenn diese Ratio bei ähnlichen Experimenten bereits beschrieben wurde, [48] haben wir sie ebenfalls getestet, um den Assay im Labor zu etablieren.

3.1 CD107a Assay

Der CD107a Assay hat sich bereits als Marker für zelluläre zytotoxische Aktivität bewährt. Der via FACS Flow Methode gemessene Marker CD107a korreliert mit der Aktivität der NK-Zell-Degranulation, die wiederum mit der Aktivität der NK-Zellen korreliert. Daher ist er eine verlässliche Methode, NK-Zellen in ihrer Aktivität zu quantifizieren und auch Untergruppen zuzuordnen.

NK-Zellen erkennen wie andere Immunzellen auch Major Histocompatibility Complex (MHC), die auf der Oberfläche von tumorbefallenen oder infizierten Zellen präsentiert werden. Sie exprimieren u.a. die Oberflächenmarker CD56 und CD16; CD16 etwa bindet an den Fc-Teil von IgG Antikörpern, was in der NK-Zelle die ADCC triggert. Dabei wird durch das Binden vom Fc-Teil an CD16 die Ausschüttung der Granula in der Zelle ausgelöst. Die Granulamembran verschmilzt mit der Zellmembran und setzt die in den Granula enthaltene (Signal-) Stoffe Perforin, Granzym, u.a. frei. Dadurch wird der Oberflächenmarker CD107a, der sonst nur auf der Granulamembran exprimiert wird, auf die Zelloberfläche gebracht und kann gefärbt werden. [48, 108]

Die Färbung erfolgte mit PE für CD107a, APC für CD56 und APC-Cy7 für CD3 (s.u.). Die Assays, die ich durchgeführt habe, wurden bereits in ähnlicher Form in der AG Penack für die monoklonalen Antikörper (mAb) Rituximab und Alemtuzumab durchgeführt und veröffentlicht. [48, 109] Daher verwendete ich als Positivkontrolle den mAb Rituximab, um einen Vergleich zwischen normaler (unbeeinflusster) und durch ATG und Rituximab gepimpter NK-Zelldegranulation gegenüber Tumorzellen zu haben.

Beim CD107a Assay wurden zwei verschiedene Protokolle angewendet. Beim Protokoll 1 wurden NK-Zellen durch MACS von den übrigen PBMCs isoliert und in einer Konzentration von $2 \cdot 10^5 / 100 \mu\text{l}$ in die 96er Wellplatte (Tissue Culture Plate 96-Well,

SARSTEDT) suspendiert; beim Protokoll 2 wurde nach sorgfältiger Überprüfung auf Vergleichbarkeit der NK-Isolierungsschritt verlassen und mit PBMCs gearbeitet.

3.1.1 Rituximab Etablierungsvorversuche

Die Verwendung des CD107a Assay für die Messung des Einflusses von Rituximab (sowie Alemtuzumab) auf ADCC ist ein in der Arbeitsgruppe Penack bereits vorgeschriebener Versuch. Der (unten beschriebene) Assay wurde von mir mehrfach mit Rituximab als repräsentativem mAb durchgeführt, da es bereits veröffentlichte Daten dazu gab und somit die Vergleichbarkeit gegeben war. [48] So konnte ich sicher sein, den Assay vollständig und vergleichbar durchführen zu können, wenn ich Rituximab durch das polyklonale ATG ersetze, und ich hatte zudem eine Positivkontrolle etabliert.

3.1.2 Effektorzellen (NK) : Targetzellen (Tumorzellen) Verhältnis (Ratio)

Um die ebenfalls vorgeschriebenen Effektor:Targetzell Ratios zu überprüfen und ggf. anzupassen, führte ich die Assays ebenfalls mit dem bereits etablierten mAb Rituximab durch. Dabei wurden die Effektor:Target Ratio von 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 1:1, 1:10, 1:20, 1:50 und 1:100 getestet.

3.1.3. NK-Zell Isolierung

Zunächst wurde verschiedenen Probanden Blut entnommen, die sich alle freiwillig zur unentgeltlichen Blutentnahme meldeten und informiert die Zustimmung zur Verwendung in den Assays erteilten. Das Blut wurde zunächst 1:2 mit PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung, Dulbecco's PBS, steril) verdünnt.

Dann wurde in 50ml Zentrifugenröhrchen 25ml verdünntes Blut auf 12,5ml Trennlösung (Bicoll Separating Solution, BiochromAG) geschichtet, indem ich die Blutmischung langsam auf die Trennlösung laufen ließ.

Danach erfolgte eine 27 minütige Gradientenzentrifugation in der Zentrifuge (Megafuge 1.0R, HERAEUS) bei 1600 Umdrehungen pro Minute (rpm) ohne Bremse.

Nach der Zentrifugation nahm ich die aus PBMCs bestehende mononukleäre Zellschicht (BuffyCoat) ab und wusch sie zweimal mit PBS, bei einer Zentrifugation von

1600rpm und 5min. Danach wurden die PBMCs in 1ml MACSA-Puffer aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte durch Zählung in einer Neubauer improved-Zählkammer nach Anfärbung eines kleinen Teils der Zellen mit Trypanblau (Mischung 100µl RPMI Medium, 50µl Trypanblau, 50µl Zellsuspension).

Danach erfolgte die NK-Zellselektion (CD-56 Selektion) mittels MACS-Technik (MACS NJ Cell Isolation Kit, human, Miltenyi Biotec). Während des folgenden Prozesses wurde auf Eis gearbeitet. Die Zellen wurden einmal in MACS-Puffer gewaschen (bei 4°C, 5min, 1600rpm), das Zellpellet wurde in 80µl MACS-Puffer/ 1×10^7 Zellen und 20µl CD-56-Beads (Miltenyi Biotec)/ 1×10^7 Zellen aufgenommen.

Es erfolgte die Inkubation der Zellsuspension für 15 min im Kühlschrank bei 4°C. Die Zellen wurden mit dem 20-fachen Markierungsvolumen in MACS-Puffer gewaschen und bei 4°C erneut zentrifugiert (1600rpm, 5min).

Nach Abnahme des Überstandes wurde das mit CD-56 Beads angereicherte Zellpellet in 500µl MACS-Puffer/ 2×10^7 Zellen aufgenommen. Die vorgekühlte MS-Säule wurde mit 500µl MACS-Puffer äquilibriert, und ich ließ die Zellsuspension über die Säule laufen. Die Säule wurde nach Durchlaufen der Zellsuspension drei Mal mit 500µl MACS-Puffer gespült. Danach wurde die Säule vom Magneten entfernt und die Positivfraktion (die mit CD56-Beads angereicherten Zellen klebten an der Säule des Magneten fest) mit 1000µl MACS-Puffer eluiert. Die Positivfraktion entsprach den NK-Zellen. Die Zellzahl der NK-Zellen wurde auf 2×10^5 Zellen/100µl in RPMI Medium verdünnt.

Während des MACS-Vorgangs wurden auch die jeweilig verwendeten Tumorzellen vorbereitet. Die Tumorzellen wurden nach Zentrifugation (1200rpm, bei 24°C) in 1ml RPMI aufgenommen und ebenfalls in der Neubauer improved-Zählkammer nach Anfärbung mit Trypanblau gezählt.

Die Zellen wurden auf 2×10^5 /100µl RPMI eingestellt und in 96er-Wellplatten gegeben. Dazu wurden nun die NK-Zellen in einer Ratio von 1:1 (NK-Zellen:Tumorzellen) in die Wells hinzugegeben. Bei einer höheren Effektor:Zielzellen-Ratio resultieren geringere Anstiege des CD107a Markers. [48]

Für jede Zelllinie wurde pro Assay ein Ansatz in Kombination mit NK-Zellen und ein Ansatz ohne NK-Zellen gemacht; zudem wurde ein Ansatz mit alleinigen NK-Zellen durchgeführt, um unspezifische NK-Zell-Aktivität zu entdecken. Rituximab wurde als positive Kontrolle in einer Konzentration von 20µg/ml bei jedem Assay als Ansatz verwendet; zudem wurden für ATG verschiedene Konzentrationen ausgetestet.

Die ATG-Konzentrationen, die getestet wurden, waren 20µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml, 200µg/ml, 500µg/ml und 1000µg/ml. Es wurden von den Antikörpermischungen (sowohl ATG als auch Rituximab) jeweils 50µl in ein Well gegeben, sodass das Endvolumen in den Wells 250µl betrug.

3.1.4 Färbung der Zellen und Inkubationszeit

Auf die 250µl wurde nun 12µl anti-CD107a PE-konjugierter monoklonaler Antikörper (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) zugegeben. Es folgte eine Inkubation für drei Stunden im Zellinkubator bei 37°C und 5% CO₂. Es wurden im Rahmen der Vorversuche und Etablierungen des CD107a Assays auch unterschiedliche Inkubationszeiten von 1, 3, 6, 12, 24 und 48 Stunden von ATG und Rituximab getestet, auch wenn die dreistündige Inkubationszeit bereits vorgeschrieben war. Da die Degranulationsraten bei <3 Stunden sehr gering und bei >3 Stunden proportional zur Zeit anstiegen, wurden die drei Stunden beibehalten.

Nach der dreistündigen Inkubation wurde 2mM Monensin in 100% Alkohol (Monensin Natrium, SIGMA) in jedes Well gegeben und für weitere zwei Stunden inkubiert. Monensin zeigt eine inhibitorische Wirkung auf die NK-Zell-Degranulation und wird verwendet, um einen genauen Zeitrahmen für die Wirkzeit der Antikörper zu stellen. [110, 111]

Nach Ablauf der Inkubationszeit mit Monensin erfolgte eine Abzentrifugation (1200rpm, 24°C) und zweifache Waschung mit PBS. Die Zellen wurden in 75 µl PBS aufgenommen. Es folgte die Färbung mit 20µl APC-gelabeltem anti-CD56 (BD Biosciences) pro Well (pro 75µl Zellsuspension) und 5µl APC-Cy7-gelabeltem anti-CD3 mAb (BD Biosciences) pro Well. Die Mischung wurde weitere 20min bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Die Zellen wurden ein weiteres Mal abzentrifugiert und zweimal in PBS gewaschen.

Es wurden bei jedem Versuch Ansätze mit Einzelfärbungen (nur CD56, CD3, CD107a) und eine ungefärbte Probe erstellt. Jedes Experiment wurde pro Zellreihe dreimal durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu beurteilen.

3.1.5 Erweiterung durch Fixieren der Zellen: Fixierungsprotokoll

Da das FACSCanto Zellflow Gerät sich nicht direkt im selben Laborgebäude befand und die Messungen somit immer einen etwas längeren Transport der Zellen erforderten (ein Risikofaktor für eine potenzielle Verfälschung der Ergebnisse), überlegte ich, ob eine Fixierung der Zellen möglich sei oder ob sie die Ergebnisse wesentlich verändern würde.

Deswegen testete ich nach Etablierung des Rituximab Protokolls in zwei komplett eigenständigen Assays, ob und wie eine Fixierung die endgültig gefärbten Zellen beeinflussen würden.

Dazu gab ich eine 4-prozentige phosphatgebufferte Formaldehydlösung (Carl Roth, Roti-Histofix 4%) nach Beendigung der Färbung durch die APC-gelabelten anti-CD3 und APC-Cy7-gelabelten anti-CD56 in den Wells, je Well 200µl und inkubierte sie weitere 20min. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde die Wellplatte dunkel im Kühlschrank aufbewahrt. Etwa 20 Stunden später wurden die fixierten Zellen zusammen mit einem unfixierten "frischen" Assay im FACSFlow gemessen.

Es stellte sich heraus, dass die Fixierung keinen wesentlichen Einfluss auf die Ergebnisse hat. Daher verwendete ich anfangs bei vielen Assays die Zellfixierung mit Formaldehyd, auch beim Apoptose Assay.

Da ich bei CD107a Assay häufig im Verlauf nur noch die einstündige Inkubationszeit verwendete, erübrigte sich dort im Verlauf der Versuche die Fixierung mit Formaldehyd.

3.1.6 Protokoll 2 ohne NK-Zell Isolierung

Die MACS Selektion mit dem Arbeiten auf Eis war sehr aufwendig, da eine Kontrolle der Zellen wieder einen riskanten Transport der Zellen zum FACS Gerät erforderte. Es entspricht auch nicht dem menschlichen Organismus, nur konzentrierte Mengen an NK-Zellen zu isolieren.

Die NK-Zellen können wegen den CD56 und CD3 Färbungen auch bei Messungen mit allen PBMCs gated werden, und beim CD107a Assay wird die NK-Zell Degranulation gemessen. Deshalb wurde nach Etablierung aller CD107a Protokolle (sowie dem Fixierungsprotokoll) auf die Isolierung der NK-Zellen aus den PBMCs durch MACS verzichtet.

Die Ergebnisse mit den isolierten NK-Zellen und den PBMCs waren nach dem Gaten im FACS Programm vergleichbar. Deswegen kann man davon ausgehen, zukünftig auf die NK-Zell Isolierung zu verzichten können.

Da CD56 auch auf NKT-Zellen (Natural killer-like T-Cells) exprimiert werden kann, diese gleichzeitig aber auch CD3 positiv sind (T-Zell-Cluster of Differentiation), wurde im Anschluss an die Messungen immer auf CD56+/CD3- gated, um ausschließlich die Aktivität der NK-Zellen beurteilen zu können. [112]

Es wurde von verschiedenen Probanden Blut entnommen, die sich alle freiwillig zur unbezahlten Blutentnahme meldeten. Das Blut wurde zunächst 1:2 mit PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung, Dulbecco's PBS, steril) verdünnt.

Dann wurde in 50ml Zentrifugenröhrchen 25ml verdünntes Blut auf 12,5ml Trennlösung (Bicoll Separating Solution, BiochromAG) geschichtet, in dem man die Blutmischung langsam auf die Trennlösung laufen ließ. Danach erfolgte eine 27 minütige Gradientenzentrifugation in der Zentrifuge (Megafuge 1.0R, HERAEUS) bei 1600 Umdrehungen pro Minute (rpm) ohne Bremse.

Nach der Zentrifugation nahm ich die aus PBMCs bestehende mononukleäre Zellschicht (BuffyCoat) ab und wusch sie zweimal mit PBS, bei einer Zentrifugation von 1600rpm und 5min. Die Zellen wurden in 10ml RPMI aufgenommen und in einer Neubauer improved-Zählkammer nach Anfärbung eines kleinen Teils der Zellen mit Trypanblau gezählt (Mischung 100µl RPMI Medium, 50µl Trypanblau, 50µl Zellsuspension).

Die Zellen wurden nun auf das 10fache der NK-Zell-Konzentration eingestellt, da NK-Zellen von den PBMCs etwa 10% ausmachen, also auf $2 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$ (Well). Die Effektor:Target Ratio betrug dennoch 1:1, da die NK-Zellen noch immer eine Konzentration von $2 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$ hatten.

Die Tumorzellen wurden nach Zentrifugation (1200rpm, bei 24°C) in 1ml RPMI aufgenommen und in der Neubauer improved-Zählkammer nach Anfärbung mit Trypanblau gezählt (Mischung 100µl RPMI Medium, 50µl Trypanblau, 50µl Zellsuspension). Die Zellen wurden auf 2×10^5 /100µl RPMI eingestellt und in 96er-Wellplatten gegeben.

Für jede Zelllinie wurde pro Assay ein Ansatz in Kombination mit PBMCs und ein Ansatz ohne PBMCs (als Nativkontrolle) gemacht, zudem gab es einen Ansatz mit nur PBMCs. Rituximab wurde als Positivkontrolle in einer Konzentration von 20µg/ml bei jedem Assay als Ansatz verwendet, zudem wurden für ATG verschiedene Konzentrationen ausgetestet.

Die ATG-Konzentrationen, die am Anfang der Assayreihe getestet wurden, waren 20µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml, 200µg/ml, 500µg/ml und 1000µg/ml. Diese Konzentrationen leitete ich mir von bereits vorbeschriebenen Assays ab. [84, 98, 113] Je ein Ansatz pro Durchführung ohne ATG wurde als Negativkontrolle durchgeführt. Aufgrund der kaum besseren Wirksamkeit wurde beim Apoptose Assay die 1000 µg/ml Konzentration verlassen; ein weiterer Grund war der höhere Material- und Kostenaufwand (s. Resultate unten).

3.1.7 Staining, Inkubation, Messung

Es wurden von den Antikörpermischungen (sowohl ATG als auch Rituximab) jeweils 50µl in ein Well gegeben, sodass das Endvolumen in den Wells 250µl betrug.

Auf die 250µl wurde nun 12µl anti-CD107a PE Antikörper zugegeben. Es folgte eine Inkubation für drei Stunden im Zellinkubator bei 37°C und 5% CO₂. Nach der dreistündigen Inkubation wurde 2mM Monensin (Monensin Natrium, SIGMA) in jedes Well gegeben und für weitere zwei Stunden inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit mit Monensin erfolgte eine Abzentrifugation (1200rpm, 24°C) und zweifache Waschung mit PBS. Es folgte die Färbung mit 20µl APC-labeled-anti-CD56/75µl Zellsuspension pro Well und 5µl APC-Cy7-labeled-CD3/75µl Zellsuspension pro Well. Die Mischung wurde weitere 20min bei 4°C im Kühlschrank

inkubiert. Die Zellen wurden ein weiteres Mal abzentrifugiert und zweimal in PBS gewaschen.

Es wurden bei jedem Versuch Ansätze mit Einzelfärbungen (nur CD56, CD3, CD107a) und eine ungefärbte Probe erstellt. Alle Ansätze wurden zum Assessment der Reproduzierbarkeit dreimal pro Zelllinie durchgeführt.

Für die Messung wurden die Zellen in FACS-Röhrchen mit 200µl PBS gefüllt und abgedunkelt zum FACSTFlow Gerät transportiert.

3.1.8 Durchflusszytometrie

Die Flow Cytometrie Analyse wurde mit einem FACScalibur Cytometer (BD Pharmingen) durchgeführt. Es wurde folgende Assay-Farbeinstellungen verwendet: anti-CD107a PE-Cy5, anti-CD3 APC, anti CD-56 APC. Die mindestens gefacste Zellzahl betrug 10.000 Zellen pro Messung. Zunächst wurde bei Anwesenheit von PBMCs auf diese ein Gate gesetzt, um ausschließlich die Reaktion der CD56+ Zellen bewerten zu können (Voraufnahmen waren bereits vorhanden). Danach wurde im FlowJo Programm eine Vier-Quadranten-Einteilung vorgenommen, um die CD3-/CD56+/CD107a+ Zellen evaluieren zu können.

3.2. Apoptose Assay mit Annexin V

3.2.1 PBMCs und Zellaussessment

Es wurde von unterschiedlichen Probanden Blut entnommen, die sich alle freiwillig und unentgeltlich zur Blutentnahme meldeten. Die Probanden wurden über die weitere wissenschaftliche Verwendung ihres Blutes informiert und gaben ihre Zustimmung. Das Blut wurde zunächst 1:2 mit PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung, Dulbecco's PBS, steril) verdünnt.

Dann wurde in 50ml Zentrifugenröhrchen 25ml verdünntes Blut auf 12,5ml Trennlösung (Bicoll Separating Solution, BiochromAG) geschichtet. Danach erfolgte eine 27 minutige Gradientenzentrifugation in der Zentrifuge (Megafuge 1.0R, HERAEUS) bei 1600 Umdrehungen pro Minute (rpm) ohne Bremse.

Nach der Zentrifugation wurde die aus PBMCs bestehende mononukleäre Zellschicht (BuffyCoat) abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen, bei einer Zentrifugation von 1600rpm und 5min. Die Zellen wurden in 10ml RPMI aufgenommen und in einer Neubauer improved-Zählkammer nach Anfärbung eines kleinen Teils der Zellen mit Trypanblau gezählt (Mischung 100µl RPMI Medium, 50µl Trypanblau, 50µl Zellsuspension).

3.2.2 Ansätze

Beim Apoptose Assay wurde direkt mit den PBMCs (nicht mit per MACS separierten NK-Zellen) gearbeitet (s. Assay oben) und die Zellen wurden zum Teil (je nach Assaylaufzeit) fixiert (s. Fixierungsprotokoll oben). Ohne Fixierung wurden die Zellen mit einer maximalen Lagerungszeit von zwei Stunden gefacst.

Die Tumorzellen wurden nach Zentrifugation (1200rpm, bei 24°C) in 1ml RPMI aufgenommen und in der Neubauer improved-Zählkammer nach Anfärbung mit Trypanblau gezählt (Mischung 100µl RPMI Medium, 50µl Trypanblau, 50µl Zellsuspension). Die Zellen wurden auf $2 \times 10^5 / 100\mu\text{l}$ RPMI eingestellt und in 96er-Wellplatten gegeben.

Pro Assay wurden für jede Tumorzelllinie ein Ansatz in Kombination mit PBMCs und ein Ansatz ohne PBMCs (als Nativkontrolle) gemacht; zudem gab es einen Ansatz mit nur PBMCs. Je ein Wellansatz pro Zelllinie mit Camptothecin wurde als Positivkontrolle in einer Konzentration von 2 mM (5µM auf 250µl Well) durchgeführt. [102, 105] Für die ATG Dosierung wurden die Konzentrationen 10µg/ml und 100µg/ml ausgetestet. Für jede Zelllinie wurden zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit mindestens drei Experimentenansätze durchgeführt.

3.2.3 Inkubation, Staining

Nach der Inkubationszeit der Zellen mit Camptothecin bzw. ATG von 24 Stunden (s.u.) wurden die Zellen in PBS einmal gewaschen, bei einer Zentrifugation von 1600rpm und 5min. Danach wurden die Zellen in einer 1:10 Binding Buffer Lösung (Miltenyi Biotec) gewaschen und ebenso abzentrifugiert.

Die Zellen wurden in 100µl verdünntem Buffer aufgenommen. Darauf wurden sie mit 5µl Annexin 12min. bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine weitere Waschung mit verdünntem Buffer und Abzentrifugation.

Die Zellen wurden in 200µl verdünntem Buffer aufgenommen, in FACS Röhren umpipettiert und im letzten Schritt mit Propidium Iodide Staining Solution gefärbt, um die Nekrotestadien zwischen früh und spät zu unterscheiden.

Die Zellen wurden innerhalb von zwei Stunden beim FACSCanto Gerät per FACS Flow analysiert.

3.2.4 Durchflusszytometrie

Die Flow Cytometrie Analyse wurde mit einem FACScalibur Cytometer (BD Pharmingen) durchgeführt. Es wurde folgende Assay-Farbeinstellungen verwendet: PerCP-Cy5-5-A (Propidium Iodid), Comp-FITC-A (Annexin V)

Die gefacste Zellzahl pro Messung betrug immer mindestens 10.000 Zellen. Im FlowJo Programm wurde ein Vier-Quadranten-Gate (nach PerCP-Cy5-5-A und FITC-A) gesetzt, um das Wachstum der nekrotischen und apoptotischen beurteilen zu können.

3.2.5 Verschiedene Inkubationszeiten

Um zunächst einen Vergleich verschiedener Inkubationszeiten des Apoptose Assays (also verschieden langer Zeiten für die Apoptose der Tumorzellen) zu haben, wurden mit der Tumorzelllinie RAJI (Burkitt's Lymphom) unterschiedliche Ansätze getestet. Ich verwendete die Inkubationszeiten von 1, 4, 8, 24, und 48 Stunden.

Da sich allerdings die Ergebnisse bei verschiedenen Apoptose-/Inkubationszeiten nicht wesentlich in ihrer Aussagekraft unterschieden, blieb ich am Ende bei der weniger aufwändigen Inkubationszeit von 24 Stunden. So beziehen sich auch die publizierten Ergebnisse aller Apoptose Assays auf eine vierundzwanzigstündige Inkubationszeit.

RAJI	Burkitt's Lymphom
EHEB	Chronische B-Zell Leukämie
YT	T-Zell Lymphom
K562	Akute myeloische Leukämie
HL-60	Akute myeloische Leukämie
JeKo-1	Mantelzelllymphom
Karpas 422	Follikuläres Lymphom

Tabelle 1 Verwendete Zelllinien im Überblick

4. Ergebnisse

4.1 Effekt von Rituximab auf die ADCC gegen Tumoren

Die Verwendung von Rituximab bei der Koinkubation von CD20+ Tumorzelllinien mit PBMCs steigert die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC)

Bei der Darstellung der anti-CD107a markierten CD56+CD3- PBMCs wurde ein deutlicher Unterschied zwischen den mit Rituximab koinkubierten und den ohne Rituximab koinkubierten Zelllinien gefunden (s. Tabelle)

Bei den Tests, bei denen Rituximab hinzugefügt wurde, zeigten die im FACS gegateten NK-Zellen eine weitaus höhere Expression des CD107a Oberflächenmarkers als bei den ohne Rituximab. Dementsprechend gemessen ist auch die Degranulationsrate der NK-Zellen, die mit der CD107a Expression korreliert, erhöht.

Effektorzellen (NK) : Zielzellen (RAJI)	Ohne Rituximab, CD107a positive Zellen in %	10µg/ml Rituximab, CD107a positive Zellen in %
100 : 1	2,95	6,19
50 : 1	2,13	7,12
20 : 1	2,59	9,93
10 : 1	2,13	9,06
1 : 1	3,46	19,55
1 : 10	6,13	22,83
1 : 20	4,81	29,73
1 : 50	5,02	26,79
1 : 100	5,76	29,12

Tabelle 2 Verschiedene Effektor : Zielzellen Ratios mit NK-Zellen und RAJI, in Inkubation ohne Rituximab und mit 10µg/ml Rituximab

4.1.1 Einfluss der Effektorzellen (NK) : Targetzellen (Tumorzellen) Ratio auf die ADCC gegen Tumoren

Die Effektor : Targetzell - Ratio hat keinen signifikanten Einfluss auf die Rituximab-vermittelte Degranulation der NK-Zellen (ADCC)

Bei allen Verhältnissen der NK-Zellen gegenüber den Tumorzellen zeigte sich eine deutlich gesteigerte Expression von CD107a bei Messungen in der Flowzytometrie bei Zugabe von 10 µg/ml Rituximab. Auch bei starken Konzentrationsunterschieden der beiden Zellkomponenten verursachte Rituximab stets eine stark gesteigerte Degranulation der NK-Zellen.

Die weiteren Versuche wurden mit einer NK-Zell:Tumorzellratio von 1:1 bzw einer PBMC:Tumorzellratio von 10:1 durchgeführt (NK-Zellen sind anteilig etwa 10-15% der PBMCs).

4.2 Etablierung des CD107a Assays mit PBMCs

ATG induziert und verstärkt die ADCC ab einer Dosierung von 20µg/ml sowohl in isoliert getesteten NK-Zellen als auch bei nicht-isolierten NK-Zellen

Ursprünglich war es der Standard bei Assays zur Kontrolle der Degranulation die NK-Zellen vorher per MACS zu isolieren. Der Prozess war langwierig und kompliziert. Ich habe festgestellt, dass bei der Verwendung von PBMCs statt NK-Zellen (in angepasster Dosis, NK-Zellen sind min 10% der PBMCs) vergleichbare Ergebnisse herauskommen. Die Kontrollen im FACS mit der entsprechenden Gattung auf CD56⁺ (NK-Zell-Cluster of differentiation) und CD3⁻ zeigten eine vergleichbare Reaktion der NK-Zellen auf die gleichen Dosierungen (ab 20 µg/ml) ATG unabhängig von ihrer Isolierung.

Der Vorteil der Arbeit mit PBMCs und somit nicht-isolierten NK-Zellen ist, dass die Assays einfacher und schneller durchführbar sind. Artefakte wie die mögliche Stimulierung von CD56⁺ Zellen durch die MACS Selektion werden vermieden.

4.3 Einfluss von ATG-Fresenius auf die ADCC gegen Tumoren

Die Zugabe von ATG-Fresenius zu den Tumorzellen und PBMCs führt zu einer deutlich gesteigerten Aktivität der NK-Zellen und dementsprechend zu einer gesteigerten ADCC.

Die NK-Zellen haben auch ohne ATG eine Grundaktivität und spontane Degranulation (s.u.). Deswegen enthielten alle Assaydurchführungen auch Ansätze ohne Medikamente und ohne Tumorzellen.

Die Zellen, bei denen der Assay die deutlichste ADCC von Seiten der NK-Zellen zeigte, waren die Linien Jeko-1 (Mantelzelllymphom) und HL-60 (Promyelozyten Leukämie). Abbildung 1 veranschaulicht am Beispiel von Jeko-1 (Effektor : Target Ratio von 10 : 1, PBMCs : Tumorzellen), dass die Anzahl der gemessenen CD3-/CD56+/CD107a+ Zellen bei einer Konzentration von 20µg/ml ATG im Vergleich zur unstimulierten Gruppe ohne ATG deutlich zunimmt (s. Q2, 2. Quadrant)

4.3.1 Koninkubation der Tumorzellen JeKo-1 und PBMCs

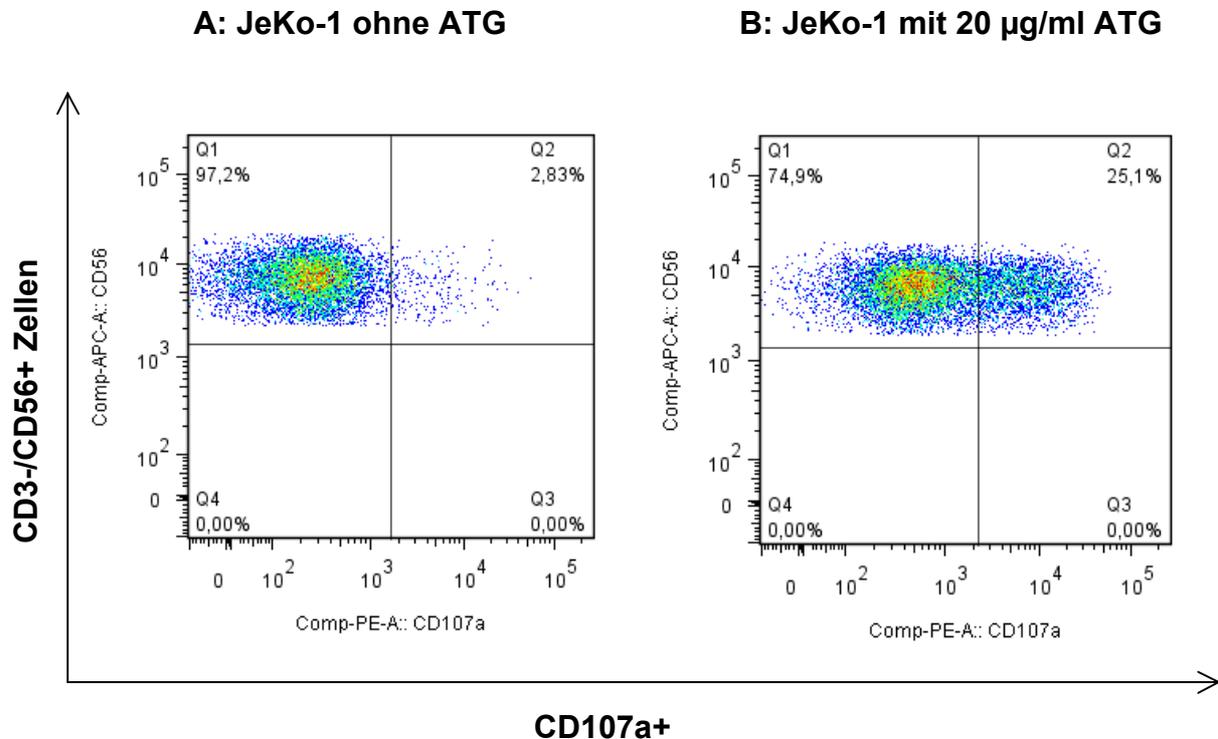


Abb 1 Einfluss von ATG auf die NK-Zell-Aktivität (Q2) in Form der Degranulation bei Koinkubation mit JeKo-1, A ohne ATG, B mit 20µg/ml ATG

Repräsentative FACS Polkadot Darstellung der Reaktion der NK-Zellen auf die Zelllinie Jeko-1 (Mantelzelllymphom). Die Abbildung zeigt die zunächst auf CD3-/CD56+ gegäteten Zellen und die Reaktion auf 20µg/ml ATG im Vergleich zu den Zellen ohne ATG. CD3-/CD56+ Zellen = NK-Zellen ohne NK-like-T-Zellen, CD107a = degranulierende Zellen. Im Quadranten 2 (Q2) Anzahl der CD3-/CD56+/CD107a+ Zellen in Prozent.

Die Expression von CD107a nimmt bei B im Vergleich zu A deutlich zu, d.h. die NK-Zell-Degranulation ist durch ATG deutlich stärker zur ADCC mit Jeko-1 als Targetzellen angeregt als ohne ATG.

Die NK-Zellen reagieren mit einer gesteigerten ADCC sowohl in ihrem Umfeld innerhalb der PBMCS als auch isoliert verstärkt durch die Zugabe von ATG-Fresenius in Anwesenheit der Tumorzellen (Targetzellen).

Zudem verstärkt sich die Degranulation der NK-Zellen auch spontan ohne Anwesenheit von Targetzellen, wenn ATG zugegeben wird. (s. Abb 2)

4.3.2 Steigerung der NK-Zell-Degranulation unter ATG Einfluss

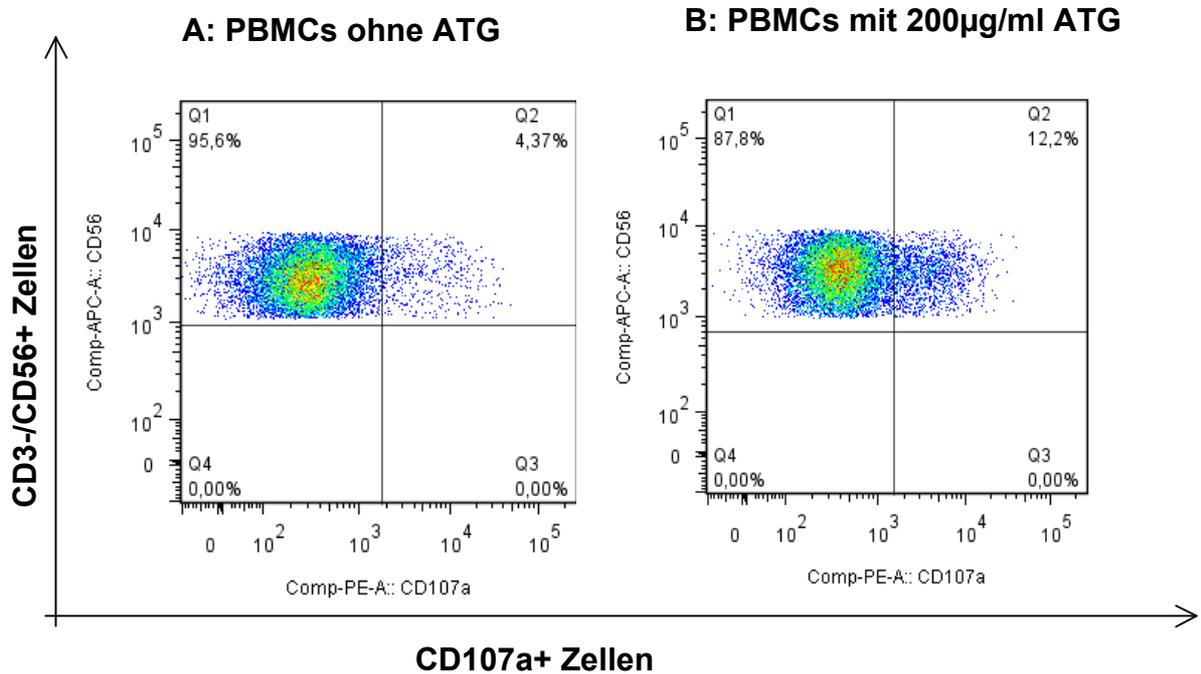


Abb 2 Darstellung der PBMCs und der NK-Zell-Aktivität ohne Einfluss von ATG (A) und mit 200 µg/ml ATG (B)

FACS Polkadot Darstellung der PBMCs ohne Koninkubation von Tumorzellen. Die NK-Zellen haben eine spontane Grundaktivität ohne Einfluss von Targetzellen oder Medikamenten. Die Degranulation verdoppelt sich bei Zugabe von 200 µg/ml ATG. CD3-/CD56+ Zellen = NK-Zellen ohne NK-like-T-Zellen, CD107a = degranulierende Zellen. Im Quadranten 2 (Q2) Anzahl der CD3-/CD56+/CD107a+ Zellen in Prozent.

Die NK-Zellen zeigen eine deutliche Reaktion auf die Zugabe von ATG-Fresenius auch in Abwesenheit von Tumorzellen. Die Degranulation verstärkte sich, je höher die applizierte ATG Dosis war.

Das zeigt, dass eine Steigerung der Degranulation, die Voraussetzung für die ADCC Kaskade ist, auch ohne Targetzellen stimulierbar ist und die NK-Zellen möglicherweise durch ATG vorbereitet (vorstimuliert) werden.

4.3.3 Vergleich der 20 µg/ml und 1000 µg/ml ATG Dosierung

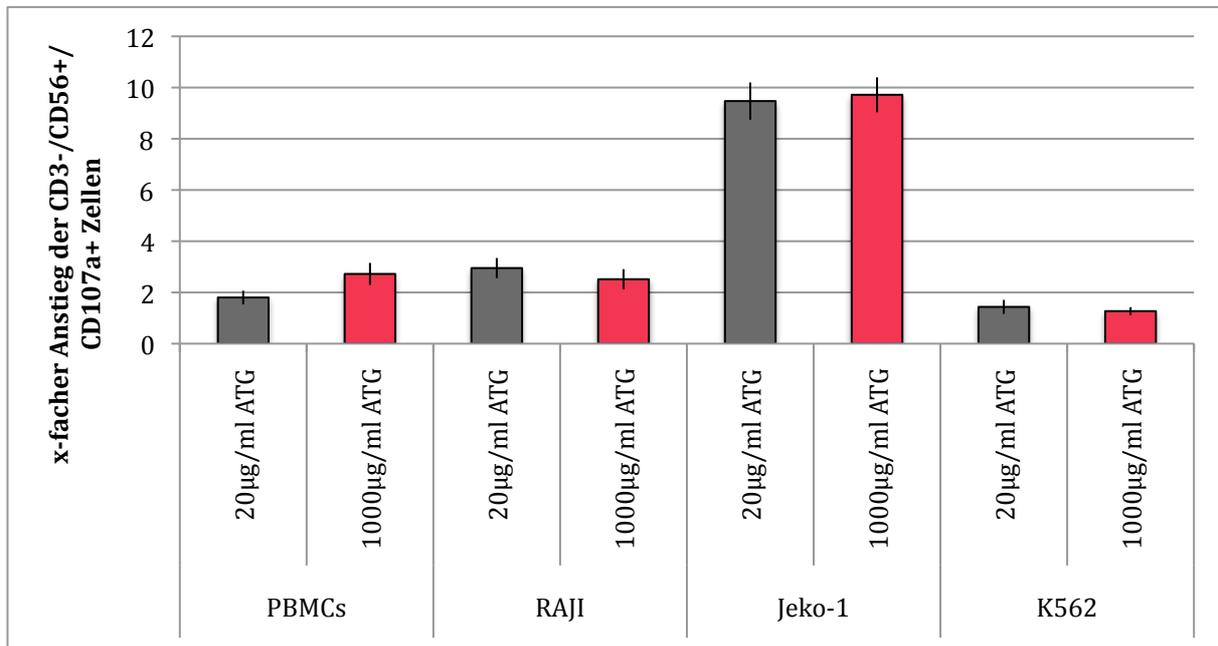


Abb 3 Dosierungen im Vergleich: Einige Tumorzelllinien mit den Dosierungen 20 µg/ml (grau) und 1000 µg/ml ATG (rot) als x-fachen Anstieg mit Standardabweichung

Bei allen dargestellten Zelllinien zeigt sich bei Zugabe von ATG ein starker Anstieg der NK-Zell Degranulation (CD3-/CD56+/CD107a+ Zellen). Bei den Zelllinien zeigt sich fast immer ein doppelter Anstieg der CD3-/CD56+/CD107a+ Zellen. Der Unterschied der NK-Zell-Aktivität zwischen 20µg/ml und 1000µg/ml ATG hingegen ist weniger deutlich bis gar nicht vorhanden.

Fast alle Zelllinien zeigten eine abflachende Reaktion bezüglich der ATG Konzentrationen. Während bei 20 µg/ml ATG die Expression von CD107a deutlich stieg, flachte sie bei höheren Konzentrationen im Verhältnis eher ab und nahm erst ab einer hochgradigen Dosis von 500-1000 µg/ml wieder zu.

Daher werden bei den folgenden Durchführungen des Assays die gemessenen Dosierungen auf 20 µg/ml und 100 µg/ml beschränkt, da diese die eindeutigsten und vergleichbarsten Ergebnisse bei allen Zelllinien hervorriefen.

4.3.4 Ergebnis aller Tumorzellen: Wie ausgeprägt ist die ADCC?

Tumorzellen (immer mit PBMCS in 1:10)	ATG-Fresenius Konzentration	Anzahl der CD3- /CD56+/CD107a+ Zellen in Prozent
RAJI	Ohne ATG	4,89
	20µg/ml ATG	14,43
	50µg/ml ATG	10,44
	100µg/ml ATG	9,64
	200µg/ml ATG	8,36
	500µg/ml ATG	12,83
	1000µg/ml ATG	12,3
	EHEB	Ohne ATG
20µg/ml ATG		27,23
50µg/ml ATG		22,63
100µg/ml ATG		18,83
200µg/ml ATG		13,33
500µg/ml ATG		16,2
1000µg/ml ATG		20,76
YT		Ohne ATG
	20µg/ml ATG	16,73
	50µg/ml ATG	13,33
	100µg/ml ATG	12,93
	200µg/ml ATG	11,73
	500µg/ml ATG	13,4
	1000µg/ml ATG	15,133
	K562	Ohne ATG
20µg/ml ATG		22,73
50µg/ml ATG		22,03
100µg/ml ATG		17,83
200µg/ml ATG		15,33
500µg/ml ATG		15,73

	1000µg/ml ATG	20,1
HL-60	Ohne ATG	14,27
	20µg/ml ATG	31,33
	50µg/ml ATG	24,27
	100µg/ml ATG	22,73
	200µg/ml ATG	19,07
	500µg/ml ATG	17,8
	1000µg/ml ATG	23,4
JeKo-1	Ohne ATG	2,713
	20µg/ml ATG	25,7
	50µg/ml ATG	17,97
	100µg/ml ATG	18
	200µg/ml ATG	15,3
	500µg/ml ATG	15,4
	1000µg/ml ATG	26,37

Tabelle 3 Alle getesteten Tumorzelllinien im Mittelwert der dreifachen Durchführung mit allen getesteten Konzentrationen (ohne ATG, 10µg/ml, 20µg/ml, 50 µg/ml, 100µg/ml, 200µg/ml, 500µg/ml, 1000µg/ml) in Koinkubation mit PBMCs in einer Ratio von 1:10, alle Werte $p \leq 0,05$ (K562) oder $p \leq 0,001$

Alle getesteten Tumorzelllinien lösten bei den NK-Zellen eine verstärkte Degranulation unter Einfluss von ATG aus, die zum Teil dosisabhängig ist. Die Dosierung von 20µg/ml macht immer einen deutlichen Sprung der ADCC gegenüber vom Test ohne ATG.

Bemerkenswerterweise zeigte die Dosierung 100µg/ml immer eine etwas niedrigere ADCC als die 20µg/ml, die ADCC fiel (s. etwa Abb 4) bis zu 200µg/ml stetig ab. Erst die deutlich höheren Dosierungen 500 und 1000µg/ml ATG bewirkten bei einigen Tumorzelllinien eine leichte Steigerung der NK-Zell Degranulation.

4.3.5 Repräsentative Darstellung aller getesteten ATG-Dosierungen auf die ADCC gegen RAJI Burkitt-Lymphom Zellen

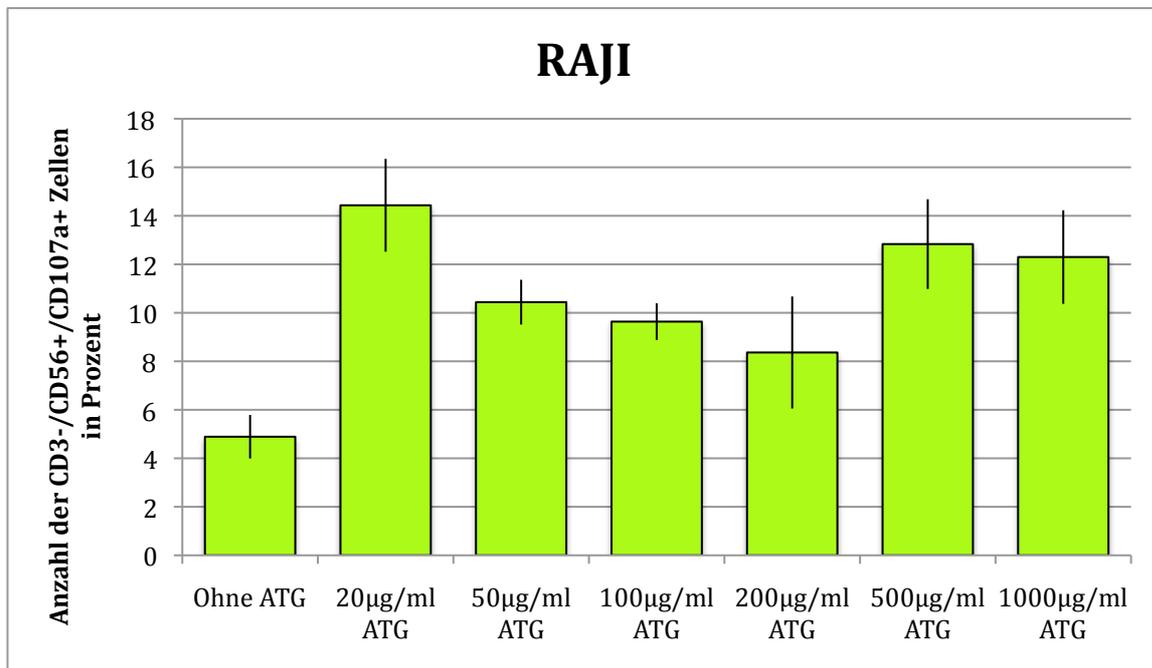


Abb 4 Balkendiagramm von RAJI (Burkitts Lymphom) mit allen ATG-Konzentrationen und Standardabweichungen

Alle verwendeten Konzentrationen (20, 50, 100, 200, 500, 1000µg/ml) zeigten eine deutliche Steigerung der ADCC als Zunahme der CD3-/CD56+/CD107a+ Population. Die Steigerung von 20µg/ml ist bei der RAJI-Zelllinie am stärksten ausgeprägt. Die Kontrolle ohne ATG zeigt die spontane NK-Zell-Degranulation als Reaktion auf die Präsenz der Tumorzellen.

Wie bei der Zelllinie RAJI (Burkitt's Lymphom) repräsentativ dargestellt, zeigt jede Dosierung von ATG-Fresenius bei allen Tumorzelllinien eine erhöhte NK-Zell Degranulation und damit auch eine erhöhte ADCC. Allerdings unterscheiden sich die jeweiligen Reaktionen auf die Dosierungen. Ich verwendete für die weitere Durchführung der genaueren Auswertung des Assays die Dosierungen 20µg/ml (immer einen deutlichen Unterschied zur Probe ohne ATG) und 100µg/ml.

Auch in unserem publizierten Paper (Westphal et al, 2014) [97] wurden diese beiden Dosierungen aufgrund der einfacheren Darstellbarkeit und Übersichtlichkeit gewählt (s. folgenden Grafik).

4.3.6 Darstellung der ATG Konzentrationen: 20 µg/ml und 100 µg/ml , mit denen die deutlichsten Ergebnisse erzielt wurden

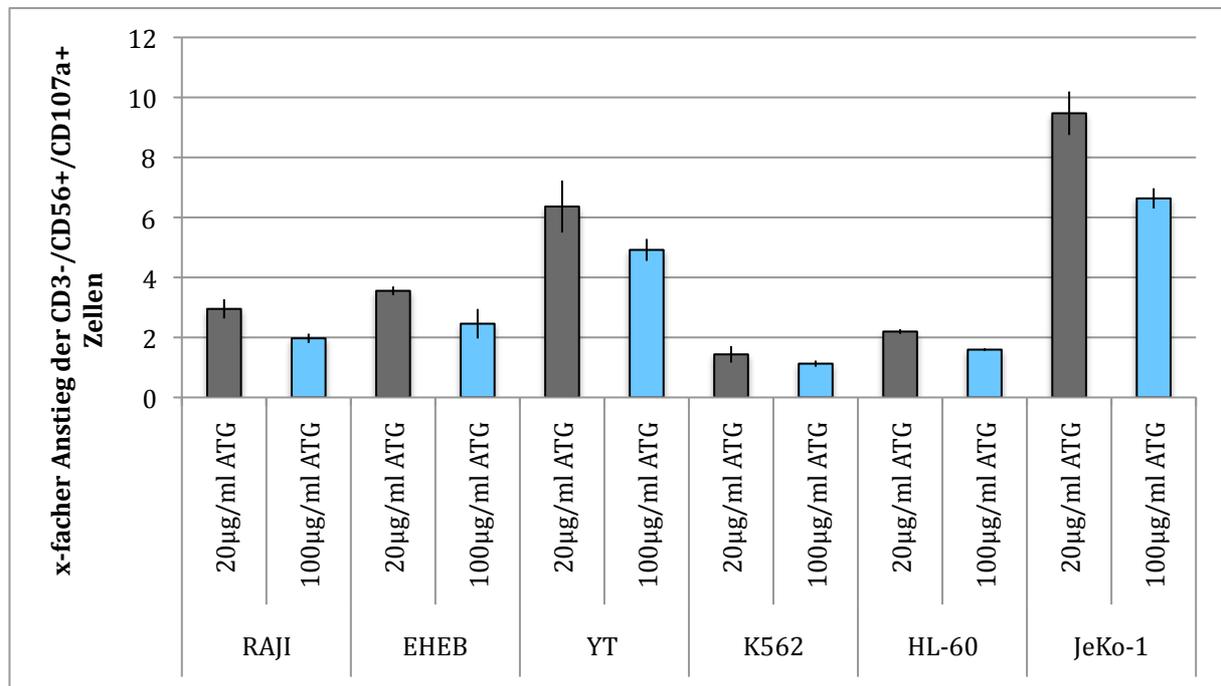


Abb 5 Balkendiagramm der Tumorzelllinien RAJI, EHEB, YT, K562, HL-60, Jeko-1 mit 20µg/ml und 100 µg/ml ATG-Konzentrationen und Standardabweichung

Bei ausnahmslos allen getesteten Zelllinien zeigte sich nach Zugabe von ATG ein Anstieg des gemessenen CD107a Markers (CD3-/CD56+/CD107a+ Zellen).

Der Effekt von ATG-Fresenius in den Konzentrationen 20 und 100µg/ml auf die ADCC, gemessen an der CD107a Exprimierung als Zeichen für die NK-Zell-Degranulation wurde bei den Tumorzelllinien HL-60, K562, RAJI, EHEB, JeKo-1 und YT durch Durchflusszytometrie getestet. (Abb. 5)

JeKo-1 (Mantelzelllymphom) und YT (T-Zell Lymphom) zeigen den höchsten Anstieg der NK-Zell Degranulation. Ferner gibt es einen mehr als doppelten Anstieg der ADCC bei den Zelllinien RAJI (Burkitt's Lymphom) und EHEB (Chronische B-Zell Leukämie). Der Anstieg der CD3-/CD56+CD107a+ Population bei den akuten myeloischen Tumorzelllinien K562 und HL-60 ist am geringsten. Auffällig ist zudem, dass, auch wenn

beide ATG Konzentrationen eine Steigerung der ADCC hervorrufen, bei allen Zelllinien die Reaktion auf 20µg/ml stärker ausfällt als auf die 100µg/ml Konzentration.

Die ADCC scheint auch abhängig zu sein von der jeweils repräsentierten Erkrankung. So reagieren die akuten myeloischen Leukämiezellen weniger eindeutig auf ATG, während insbesondere die Low-Grade Lymphome die am deutlichsten gesteigerte CD3-/CD56+CD107a+ Population zeigen.

4.4 Apoptose Assay

4.4.1 Repräsentative Darstellung des Apoptose Assays an HL-60

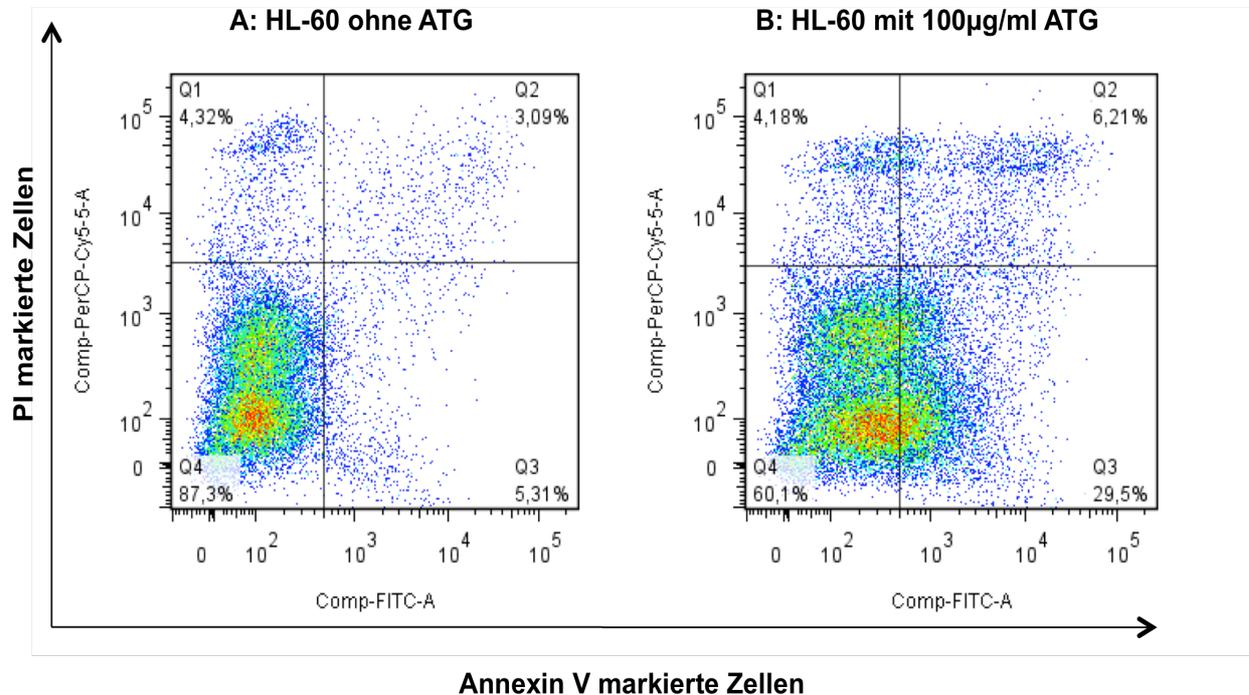


Abb 6 Repräsentative FACS Polkadotabbildung des Apoptose Assays bei HL – 60 (AML) ohne ATG (A) und mit 100 µg/ml ATG (B)

Dargestellt wird die AML HL-60 ohne PBMCs. Comp-PerCP-Cy5-5-A ist die Färbung für Propidium Iodid (PI), Comp-FITC-A die für Annexin V. In den Quadranten steht die Anzahl aller Tumorzellen in Prozent, in Q4 befinden sich alle lebendigen (PI- und Annexin V-) HL-60 Zellen. Q2 beinhaltet die nekrotischen Zellen, die sowohl PI positiv als auch Annexin V positiv gestained sind. Die apoptotischen Zellen werden in Q3 angezeigt (nur Annexin V+).

Sowohl die apoptotischen als auch die nekrotischen HL-60 Tumorzellen steigen unter dem Einfluss von 100 µg/ml ATG an – eindrucksvoll zeigt sich eine Rechtsverschiebung der Zellpopulation (B).

Dennoch ist der Einfluss von ATG eindeutig höher auf die Apoptose, die später folgende Nekrose ist nach einer Stunde Inkubationszeit noch nicht allzu weit fortgeschritten.

4.4.2 Annexin V Anstieg bei RAJI und HL-60

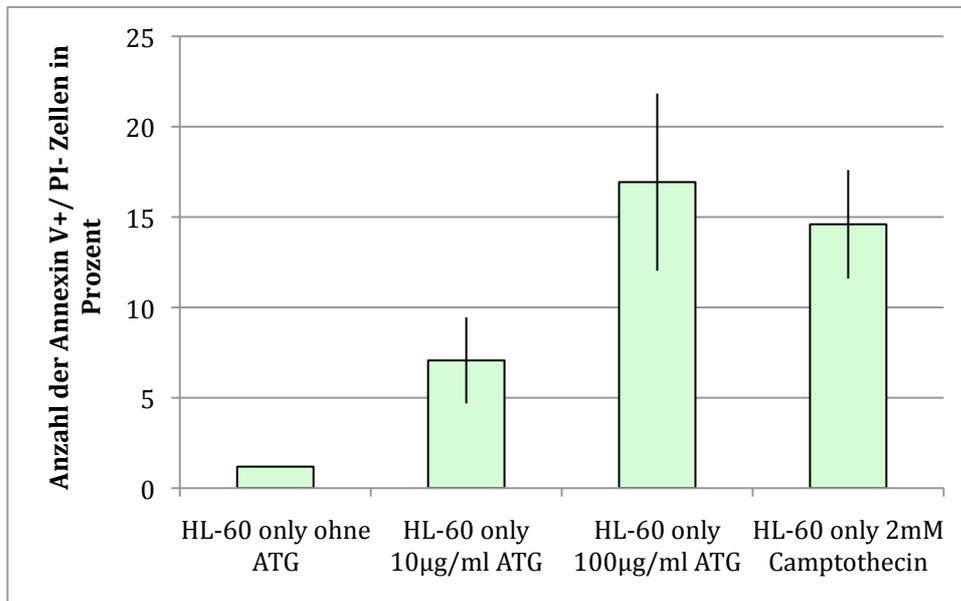


Abb 7.1 Repräsentatives Balkendiagramm mit der HL-60 Zelllinie (AML) im Apoptoseversuch ohne ATG, mit 10µg/ml ATG, 100µg/ml ATG und 2mM Camptothecin

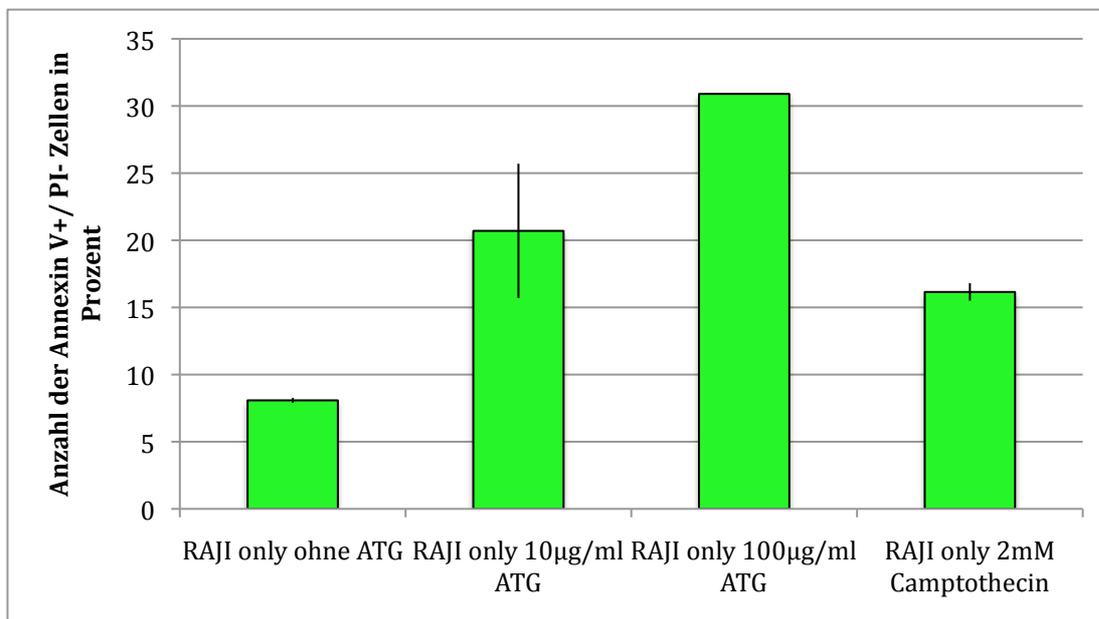


Abb 7.2 Repräsentatives Balkendiagramm der Reaktion der RAJI Zelllinie (Burkitt's Lymphom) im Apoptoseversuch ohne ATG, mit 10µg/ml ATG, 100µg/ml ATG und 2mM Camptothecin

HL-60 wurde ohne Zugabe von PBMCs auf verschiedene ATG Konzentrationen und 2mM Camptothecin getestet. HL-60 zeigte den deutlichsten Anstieg der Apoptoserate (y-Achse, n-facher Anstieg angegeben) bei Zugabe von ATG in beiden Konzentrationen, während die nativen Zellen ohne ATG kaum apoptotisch reagierten. Camptothecin ist die Positivkontrolle.

RAJI wurde als Zelllinie ebenfalls ohne Zugabe von PBMCs mit ATG und Camptothecin inkubiert. Ebenfalls gezeigt wird die Zelllinie ohne Zugabe von Medikamenten; die Population der apoptotischen Zellen als Annexin V+/PI- wird in Prozent angegeben.

RAJI zeigt unter steigender ATG Konzentration eine steigende Apoptoserate. Die Zelllinie zeigt bereits ohne ATG eine Apoptoseneigung, die sich unter Zugabe von ATG vervielfacht. Das Burkitt's Lymphom zeigte von allen Zelllinien die stärkste generelle Apoptoseneigung, auch ohne ATG. Dagegen zeigte HL-60 zwar eine geringe native Apoptoserate, hatte allerdings den stärksten Anstieg unter dem Einfluss von ATG.

Die Prozentzahlen beziehen sich auf die Annexin V positiven Zellen, ohne die nekrotischen Propidium Iodid markierten Zellen miteinzubeziehen. Teilweise zeigten die Zellen eine größere Anzahl nekrotischer Zellen (PI+), was allerdings für einen bereits vor Koinkubation mit ATG bzw Camptothecin begonnenen Zelltod spricht.

4.4.3 Ergebnisse aller Tumorzelllinien ohne PBMCs mit verschiedenen ATG Dosierungen und Camptothecin

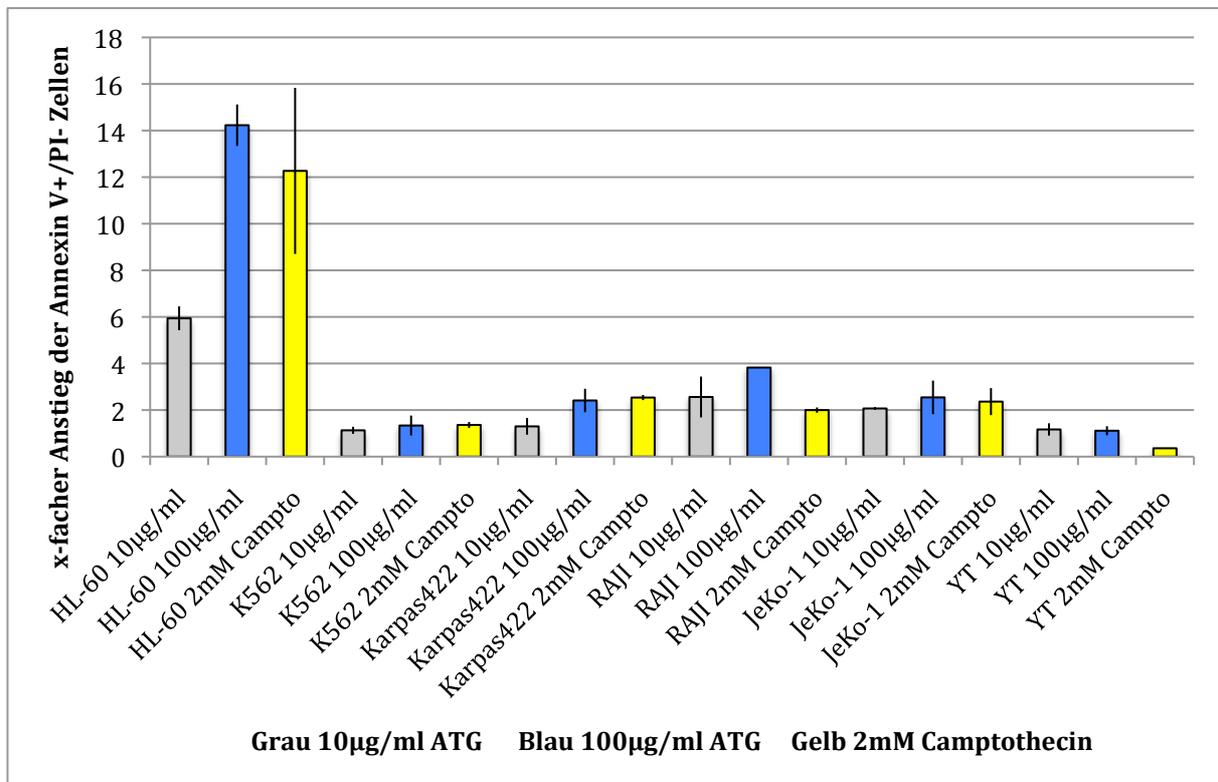


Abb 8 Balkendiagramm der Tumorzelllinien HL-60, K562, Karpas422, RAJI, JeKo-1 und YT (ohne PBMCs) ohne ATG, mit 10µg/ml und 100µg/ml ATG und 2mM Camptothecin

Der Anstieg der apoptotischen Zellpopulation, gekennzeichnet durch die Annexin V positiven/PI-negativen Zellen, wird als x-facher Anstieg dargestellt. Alle Zelllinien außer YT reagierten mehr oder minder deutlich mit gesteigerter Apoptose auf die zwei Dosierungen ATG, einige auch eindeutig stärker als auf die Positivkontrolle mit Camptothecin.

ATG induzierte Apoptose in allen getesteten Tumorzelllinien und Erkrankungen (AML, Mantelzelllymphom, T-Zell-Lymphom, Burkitt's Lymphom, Follikuläres Lymphom). Besonders stark reagiert die akute myeloische Leukämie HL-60 (s. Abb 1 & 3).

Die Apoptose ist abhängig von der Dosierung. So zeigte sich bei ausnahmslos allen getesteten Zelllinien die Dosierung von 100µg/ml ATG stärker apoptose-induzierend als die 10µg/ml Dosierung. Die Zelllinien HL-60, RAJI und JeKo-1 reagierten bei der

Dosierung von 100µg/ml ATG auch mit mehr Apoptose als bei Koinkubation mit Camptothecin – einem sehr potenten Zytostatikum und Apoptoseinduzierer. Die Zelllinie YT reagierte als einzige Zelllinie kaum verstärkt apoptotisch, weder auf die Positivkontrolle Camptothecin noch auf ATG.

4.4.4 Repräsentative Darstellung von JeKo-1 mit und ohne PBMCs

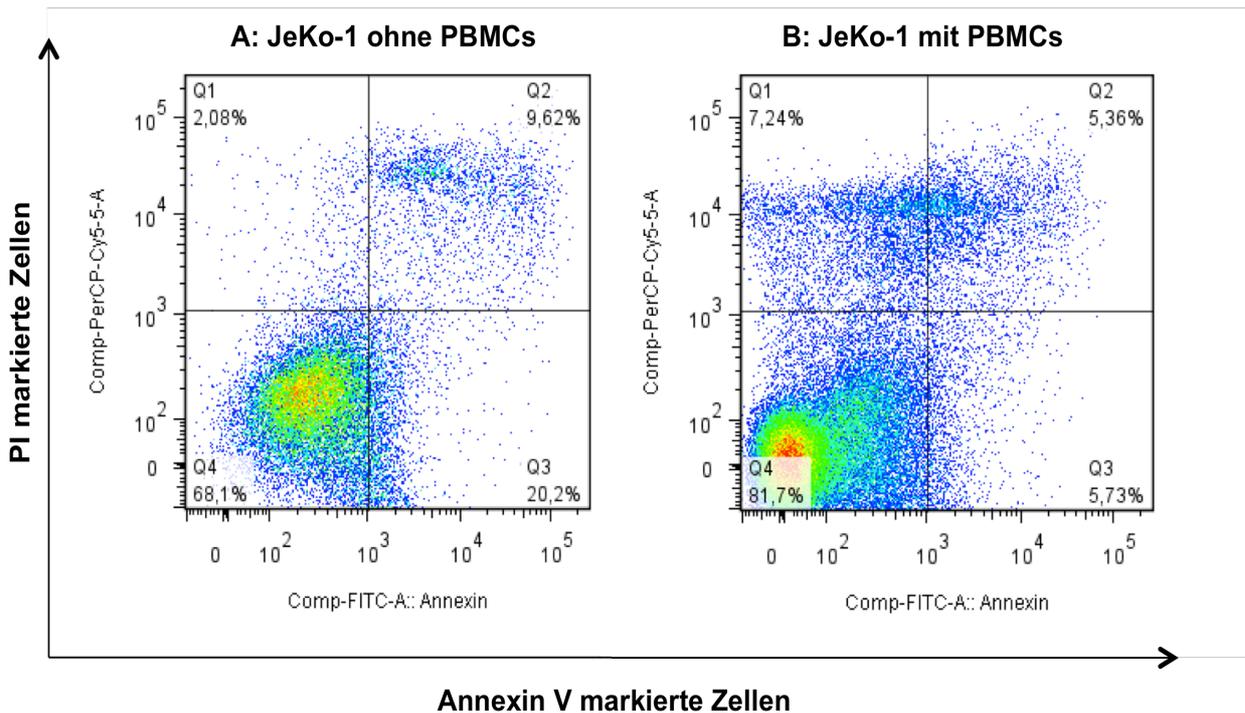


Abb 9 FACS Polkadot Plot von JeKo-1 ohne PBMCs (A) im Vergleich zu JeKo-1 mit PBMCs (B), jeweils mit 100µg/ml ATG

Die Tumorzelllinie JeKo-1 (AML) wird repräsentativ dargestellt in Koinkubation mit PBMCs (Ratio 1 : 10) und ohne PBMCs, in der Dosierung 100µg/ml ATG-Fresenius, da diese bei allen Zelllinien den höchsten Einfluss auf die komplement-unabhängige Zytotoxizität, wenn keine PBMCs mitinkubiert wurden. Comp-PerCP-Cy5-5-A = Propidium Iodid (PI), Comp-FITC-A = Annexin V.

Die JeKo-1 Zellen zeigen eine hohe Prozentzahl lebendiger Tumorzellen bei Koinkubation mit PBMCs in der Färbung mit Annexin V (Q4). Zudem zeigen sich kaum nekrotische (Q2) oder apoptotische Zellen (Q3).

Im Gegensatz zu den Tumorzellen, die ohne PBMCs mit ATG und Camptothecin inkubiert wurden, zeigten alle Tumorzellen mit den PBMCs keine verstärkte Apoptose unter ATG Einfluss.

Lediglich die YT reagierte mit einer Apoptosesteigerung bei beiden Dosierungen 10µg/ml und 100µg/ml ATG, jedoch kaum in Gegenwart von 2mM Camptothecin. Die Zelllinien Karpas-422, K562, RAJI, JeKo-1 und HL-60 zeigten entweder kaum Anstieg oder in einigen Fällen sogar einen Abfall der Apoptoserate.

In der unten stehenden Tabelle sind die Mittelwerte aller Durchführungen angegeben – wie man sieht, sind z.T. die Prozentanteile der Annexin V+ /PI- Zellen bei den Testungen ohne ATG höher.

4.4.5 Ergebnisse Tumorzellen mit PBMCs

Zellen und Medikamente mit Dosierungen	Wert in % der Annexin V+ /PI- Zellen
HL-60+PBMCs ohne ATG	6,21
HL-60+PBMC mit 10µg/ml ATG	5,41
HL-60+PBMC mit 100µg/ml ATG	5,79
HL-60+PBMC mit 2mM Camptothecin	5,1
JeKo-1+PBMC ohne ATG	6,11
JeKo-1+PBMC mit 10µg/ml ATG	8,98
JeKo-1+PBMC mit 100µg/ml ATG	9,79
JeKo-1+PBMC mit 2mM Camptothecin	7,04
RAJI+PBMC ohne ATG	7,4
RAJI+PBMC mit 10µg/ml ATG	5,08
RAJI+PBMC mit 100µg/ml ATG	3,05
RAJI+PBMC mit 2mM Camptothecin	6,88
Karpas-422+PBMC ohne ATG	4,57
Karpas-422+PBMC mit 10µg/ml ATG	6,47
Karpas-422+PBMC mit 100µg/ml ATG	5,94
Karpas-422+PBMC mit 2mM Camptothecin	8,03
K562+PBMC ohne ATG	7,11
K562+PBMC mit 10µg/ml ATG	6,71
K562+PBMC mit 100µg/ml ATG	6,98
K562+PBMC mit 2mM Camptothecin	8,88
YT+PBMC ohne ATG	5,85
YT+PBMC mit 10µg/ml ATG	6,66
YT+PBMC mit 100µg/ml ATG	9,26
YT+PBMC mit 2mM ATG	5,49

Tabelle 4 Tabellarische Darstellung der Apoptoseraten aller getesteten Tumorzellen mit PBMCs.

Die Tumorzellen zeigen keine verstärkte Apoptose im Beisein von PBMCs unter dem Einfluss sowohl von ATG als auch Camptothecin. Daher scheinen die PBMCs und damit die Anwesenheit von Komplement die komplement-unabhängige Zytotoxizität zu beeinflussen.

4.4.6 Vergleich zweier AML-Zelllinien im Apoptoseversuch

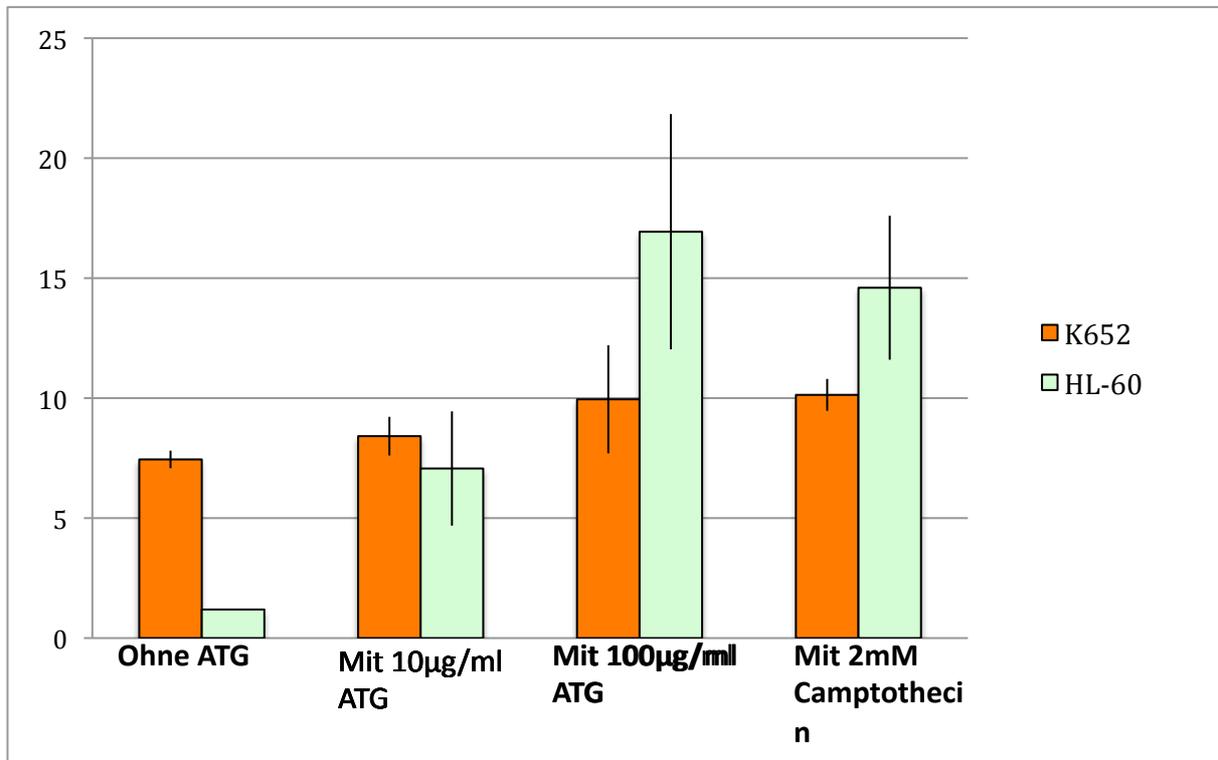


Abb 10 Balkendiagramm: Vergleich der Apoptoserate zweier AML-Zelllinien (HL-60 und K562) ohne ATG, mit 10 und 100 µg/ml ATG und 2 mM Camptothecin

HL-60 zeigt eine weitaus stärkere Reaktion auf die steigende ATG Konzentration als K562, bei der die Apoptoserate nicht signifikant zunimmt. Camptothecin ist die Positivkontrolle. K562 zeigt eine höhere primäre Apoptoserate ohne Einflussfaktoren wie ATG und Camptothecin.

Sowohl HL-60 als auch K562 sind akute myeloische Leukämien, und die Tumorzelllinien reagieren sehr unterschiedlich. Während K562 bereits eine apoptotische Reaktion ohne Zugabe von ATG zeigte, war bei HL-60 eine eigene Reaktion kaum vorhanden. Erst durch ATG steigt die Apoptoserate von HL-60 an, auch wenn die durch 10 µg/ml ATG sehr leicht gesteigerte Reaktion von K562 noch immer höher ist – im Verhältnis zur Probe ohne ATG allerdings nicht signifikant.

Bei der Dosierung von 100 µg/ml zeigt HL-60 noch eine deutlich Zunahme der Apoptose. Auch wenn bei K562 ebenfalls eine leichte Steigerung zu verzeichnen ist (ebenso bei 2 mM Camptothecin), ist der messbare Einfluss von ATG auf die Zelllinie gering.

5. Diskussion

Obwohl ATG häufig bei Patienten mit hämatologischen Tumoren im Rahmen von allogener HSCTs eingesetzt wird, wurden die Antitumor-Immunologie-Effekte von ATG in Bezug auf die ADCC bislang noch nicht getestet.

Ich habe in vitro demonstrieren können, dass durch ATG ausgelöste Antitumor-Effekte bereits ab relativ geringen Dosierungen wie 10 µg/ml bestehen. Signifikante Steigerungen von ADCC und Apoptose in Tumorzellen wurden durch niedrige Dosierungen von ATG erreicht. Die niedrigsten getesteten ATG Konzentrationen (10 µg/ml beim Apoptose Assay und 20 µg/ml beim CD107a Assay) lösten bereits einen zum Teil starken Anstieg der jeweiligen Marker im FACS aus, und das unabhängig von Inkubationszeit, Fixierung oder NK-Zell-Isolierung.

5.1. ATG Bindung an Tumorzellen

Eine Erklärung für meine Resultate bietet die Tatsache, dass ATG-Fresenius an verschiedene Tumorzellen bindet, und diese Bindung konzentrationsabhängig ist. Dies liegt möglicherweise an der aberranten Expression von myeloischen Antigenen und B-Zell Markern, die bei der Jurkatzelllinie nachgewiesen wurde. Die bei Westphal et al getesteten Konzentrationen reflektieren die Bandbreite der ATG-Konzentration in Patienten. Die Tatsache, dass ATG bereits bei Konzentrationen von 10 µg/ml an die verschiedenen Tumorzelllinien bindet, könnte auch bedeuten, dass man von meinen Ergebnissen auch fundierte klinische Rückschlüsse auf die Effektivität der ADCC und Apoptose in Patienten ziehen kann. Die Bindung und damit die Wirkung von ATG-F scheinen auf der Expression gemeinsamer Oberflächenproteine wie etwa CD37 von Jurkat und anderen malignen Zelllinien zu beruhen. [97, 114, 115]

5.2 ATG und Pharmakokinetik

Meine Ergebnisse sind eine mögliche Erklärung für die klinische Beobachtung, dass trotz effektiver Depletion von Spender-T-Zellen die Tumorrezidivrate nach alloHSCT nicht ansteigt. [36, 76] Bei Patienten liegen die Serumkonzentration von ATG noch für einen längeren Zeitraum >10 µg/ml. Wie von der Arbeitsgruppe Ciceri et al publiziert, beträgt die Konzentration im Patientenserum bei Administration von

Standardkonditionierungsdosierung 30mg ATG pro kg Körpergewicht (KG) im Schnitt nach Infusion etwa 300µg/ml als Peakwert. So deuten ihre Ergebnisse darauf hin, dass ATG eine mittlere Halbwertszeit von 69 Tagen (d) hat und nach 60d post Infusion noch immer eine Konzentration im Patientenserum von über 100µg/ml hat. Dies würde bedeuten, dass ATG über eine hinreichend lange Zeit im Patienten verbleibt, um Antitumoreffekte nach alloHSCT zu verstärken. [116, 117]

5.3 T-Zell-Depletion: Therapeutische Effekte und Risiken

Zahlreiche Studien und Publikationen haben bereits belegt, dass während einer *in vitro* T-Zell-Depletion eine erhöhte Tumorrezidivgefahr besteht. Zudem kann ATG zur *in vivo* T-Zell-Depletion effektiv gegen GVHD eingesetzt werden, ohne Einfluss auf die Rezidivrate zu nehmen. Finke et al zeigten etwa, dass die Anwendung von ATG zusätzlich zu Ciclosporin und MTX bei nicht-verwandter HSCT (unrelated donor HSCT) die Inzidenz von schwerer aGVHD (III-IV) deutlich senkte, ohne dass die Elimination der „residual disease“ (von der Konditionierung übrig gebliebene maligne Tumorzellen) negativ beeinflusst wurde. Kroger et al fanden ähnliche Ergebnisse nach einer auf myeloische Leukämien beschränkten Studie. Die Gruppe um Hoegh-Petersen publizierte unlängst, dass hohe ATG-Level (die spezifisch an T- und B-Zellen gebunden waren) sieben Tage post-HSCT mit einer deutlich niedrigeren Rate an aGVHD (II-IV) sowie einer niedrigeren Rezidivrate assoziiert waren. [65, 72, 76, 79]

5.4 ATG und cGVHD

Kontroverser diskutiert wird der Einfluss von ATG auf cGVHD. ATG bleibt nach Erkenntnissen der Ciceri und anderer AGs noch wochenlang in effektiver Konzentration im Patienten. Im Einklang mit Deeg, Hatanaka u.a. publizierten Ergebnissen fanden Storek et al eine signifikante Reduktion der cGVHD insbesondere nach früher ATG Administration, ohne allerdings einen deutlichen OS-Benefit hervorzubringen. Bacigalupo et al fanden in ihren Studien widersprüchliche Daten bezüglich cGVHD. Einig scheinen sich alle Gruppen in der Erkenntnis zu sein, dass ATG die schwere und extensive cGVHD unterdrückt, unterschiedliche Ergebnisse gibt es beim Einfluss von ATG auf leichte cGHVD. Eine jüngere französische 3-Phasen Studie von Socié et al bestätigten den supprimierenden Einfluss von ATG auf cGVHD und hoben auch die

Bedeutung der Reduzierung der Morbidität für die Lebensqualität der Patienten hervor. [33, 52, 78, 88-90, 118]

Während also ATG eindeutige Effekte durch die in vivo T-Zell-Depletion auf beide Formen der GVHD (akut und chronisch) zeigt, tragen möglicherweise die von mir erforschten Antitumoreffekte, die von den NK-Zellen durch die ADCC und die Apoptoseinduktion mitgetragen werden, zur Verhinderung der erhöhten Rezidivrate bei. Gerade bei einer langen Verweildauer von ATG im Patienten verhindert es die Entwicklung der cGVHD, während zeitgleich die letzten Tumorzellreste eliminiert werden.

Meine Ergebnisse haben zudem gezeigt, dass der Einfluss von ATG auf NK-Zellen nicht beeinflusst wird durch Anwesenheit weiterer Immunzellen (aller anderen PBMCs). Dies ist der Zusammensetzung im menschlichen Körper näher als bei den Assays mit reinen NK-Zellen, die von den PBMCs per MACS isoliert wurden.

5.5 Bedeutung des CD107a Assays

Der CD107a Assay hat sich bereits als Marker für zelluläre zytotoxische Aktivität bewährt. Der via FACS Flow Methode gemessene Marker CD107a korreliert mit der Aktivität der NK-Zell-Degranulation, die wiederum mit der Aktivität der NK-Zellen korreliert. Daher ist er eine gute Methode, NK-Zellen in ihrer Aktivität zu quantifizieren und auch Untergruppen zuzuordnen. [109]

Zudem kann dieser Assay perspektivisch zur Vorhersage der Therapieerfolge und zur optimalen Dosierungseinstellung bei Patienten mit ATG und monoklonalen Antikörpern verwendet werden. [48]

Die Verwendung von markiertem anti-CD107a Antikörper hat auch den Vorteil, dass der Assay ohne Radioaktivität (im Gegensatz zum Chromium51 release assay) auskommt und einfach durchführbar ist. Dies kann insbesondere in der Klinik zur Kontrolle der Restaktivität von T- und NK-Zellen wichtig sein. [47] Ein weiterer Aspekt ist, dass die Messung der NK-Zell Aktivität direkt durch ihre Degranulation und nicht mehr passiv durch die Erfassung der abgetöteten Zellen erfolgt.

5.6. Immunzellen und ihre Wirkung gegen Tumoren: Mit und ohne ATG

Anders als B- und T-Zellen vollziehen NK-Zellen keine antigenabhängige somatische Restrukturierung ihrer Rezeptoren und haben auch keine antigenspezifisch geklonten Rezeptoren wie etwa Immunglobuline oder T-Zell-Rezeptoren. Daher sind sie in der Lage, schnell und ohne vorherige Stimulation und Sensibilisierung auf Stresssignale in Zellen zu reagieren. [119]

Sowohl zytolytische T-Zellen als auch NK-Zellen töten die Zielzellen v.a. durch Degranulation (s.o.) und der Freisetzung von Effektorstoffen wie Perforin, Granzym und diversen Zytokinen wie Interferon- γ und TNF- α . Wolint et al haben bei Erforschung der zytolytischen Aktivität von T-Zellen festgestellt, dass die Degranulation der verschiedenen T-Zellen-Untergruppen ähnlich verläuft, während Alter et al via des CD107a Assays eine Korrelation zwischen NK-Zell-Degranulation als Reaktion auf virale Replikation bei HIV infizierten Patienten fanden. [120-123]

ATG-Fresenius erhöht die antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität dosisabhängig. Die NK-Zellen zeigen als Reaktion auf die Tumorzellen eine unterschiedlich stark ausgeprägte spontane Degranulation, die durch ATG und Rituximab gesteigert wird. Diese Reaktion findet bereits sehr früh (nach nur drei Stunden Koinkubation der Effektor- mit den Targetzellen) statt und steigert sich mit längerer Inkubationszeit und höherer ATG Dosierung.

5.7 ATG: Pros and Cons oder ATG und das Infektionsrisiko

Eines der Hauptprobleme beim Einsatz von ATG ist die möglicherweise erhöhte Anfälligkeit gegenüber viralen und bakteriellen Erkrankungen wie etwa EBV. Diese Infektionsgefahr wird kontrovers diskutiert und scheint auch eher beim Einsatz von high-dose ATG ein Thema zu sein. Die Theorie wird von der Publikation von Ayuk et al bestätigt, die eine Assoziation zwischen einer hohen Dosis ATG (60 μ mg/kg KG, im Gegensatz zu 20-30mg/kg KG) und der erhöhten Inzidenz fataler Infektionen in einer retrospektiven Studie feststellen, welche dementsprechend auch die TRM beeinflusste. [116]

Finke et al fanden keine erhöhte infektions- oder rezidivbedingte Mortalität beim Einsatz von ATG zusätzlich zu MTX und Ciclosporin, während die Gruppe um Hoegh-Petersen bei hoher ATG Konzentration (Tag 7 post-HSCT) eine erhöhte Rate an viralen, aber nicht bakteriellen oder fungalen Infekten feststellte. Die Studie fand auch, dass andererseits eine hohe Konzentration ATG, welches an B- und T-Zellen binden konnte, eine niedrige Rate an aGVHD nach sich zog und sogar mit einer niedrigeren Relapse Rate assoziiert war. [72, 79] Bereits früh stellten Bonnefoy-Berard und Revillard fest, dass ATG in unterschiedlicher Dosierung einen variierenden Einfluss auf T-Zellen hat. Obwohl die starken immunsuppressiven Effekte zu schwerer iatrogener Immundefizienz mit folgender Reaktivierung von z.B. CMV führen können, unterdrücken ATGs eben auch alloreaktive T-Zellen und tragen somit zum besseren Engraftment des Transplantats bei. [82] Daher bestand bisher auch die logische Vermutung, dass der Einsatz von ATG nicht nur eine infektionsfördernde Wirkung, sondern zudem auch negativen Einfluss auf die Vernichtung der Resttumoraktivität hat, da viele Publikationen die Unterdrückung des Immunsystems durch ATG nach alloHSCT bestätigen.

In der Diskussion dazu geben meine Ergebnisse des CD107a Assays eine mögliche Erklärung dafür, warum ATG eine Senkung der GVHD Rate hervorruft, ohne die Rezidiv- bzw Infektionsrate zu erhöhen. Laut meinen Ergebnissen folgt auf die Bindung von ATG an Tumorzellen eine Reaktionskaskade, die NK-Zellen aktiviert und bei den Tumorzellen selbst (s.u.) die Apoptose herbeiführt. Zudem induzierte ATG eine deutlich gesteigerte ADCC gegen häufige maligne Tumorzelllinien. Da NK-Zellen die prädominanten lymphoiden Zellen während der ersten drei Monate nach allogener HSCT sind, ist der Einfluss auf das Überleben und die dauerhafte Elimination der jeweiligen Erkrankung in diesem Zeitraum am höchsten. [109, 124] Dieser Antitumoreffekt beginnt bereits direkt nach der ATG Infusion.

Auch ohne Einfluss der Targetzellen erhöht ATG die Degranulationsrate bei NK-Zellen, was eine direkte Wirkung von ATG auf die Immunzellen zeigt (s. Fragestellung im Hypothesenteil). Diesen Einfluss auf die Aktivität und Degranulation der NK-Zellen kann man sich therapeutisch auch in anderen Bereichen zunutze machen, um kombiniert immunmodulatorisch (ATG unterdrückt auch T-Zellen) einzuwirken.

5.8 ATG: Wann ist der beste Zeitpunkt?

Optimalerweise sollte die Gabe von ATG zum präparativen prophylaktischen Regime gehören, da die immunologischen GVHD Entzündungsreaktionen sich bereits einige Zeit vor dem Auftreten erster Symptome entwickeln. [61, 62] Dies wird dadurch bestärkt, dass hohe Serumlevelkonzentration post-Transplant mit einer verminderten Rate an aGVHD einhergehen und die zeitgleiche Gabe von ATG und Graft das Auftreten von cGVHD mindert. Dies könnte auf den frühen Mechanismen der T-Zell-Unterdrückung beruhen. Ferner habe ich gezeigt, dass der Antitumoreffekt, speziell die ADCC, ebenfalls in der frühen Phase nach alloHSCT stattfindet, die NK-Zell Reaktion also zeitgleich mit dem Einfluss von ATG auf die T-Zellen erfolgt. Das vermindert die Aktivität der Abstoßungsreaktion und entzündlichen Prozesse (auch längerfristig, s. cGVHD) und ebenso die Gefahr der Rezidivneigung aufgrund der Residualerkrankung. [79, 90, 92]

5.9 ATG und mögliche Vorteile gegenüber mAbs

Im Vergleich zu Alemtuzumab wurde gezeigt, dass die Gabe von ATG eine höhere NK-Zell Aktivität nach einer alloHSCT nach sich zieht, was u.a. damit begründet wurde, dass der anti-CD52 Antikörper eine anhaltende Depletion der NK-Zellen hervorruft. [125] In der Phase nach der Transplantation wäre ATG, was die Antitumoreffekte angeht, den monoklonalen Antikörpern also potentiell überlegen – das müsste noch in klinischen Studien genauer beurteilt werden. Aktuell gibt es bereits experimentell-therapeutische Ansätze, wie etwa die Transfusion von alloreaktiven T-Zellen (nach einer erfolgten T-Zell-Depletion) oder der Einsatz von selektiven NK-Zellen. [126] ATG könnte dabei als vorstimulierendes Medikament wirken, um die NK-Zellen direkt zu aktivieren und die Antitumoreffekte wie ADCC spezifisch gegen die Tumorzellen einzusetzen.

5.10 ATG und der deutliche Einfluss auf die ADCC

Alle Tumorzelllinien riefen bei den Konzentrationen 20 µg/ml und 100 µg/ml ATG deutlich erhöhte ADCC hervor – man könnte also klinisch erwarten, dass eine ATG Therapie bei verschiedenen Tumorentitäten, insbesondere bei malignen

Lymphomerkkrankungen, eine gute Wirksamkeit gegenüber der GVHD nach alloHSCT ohne erhöhte Rezidive erzielt. Da die Tumorzellen unterschiedlich deutlich reagieren, wäre es möglicherweise sinnvoll, mehrere Zelllinien ausschließlich einer Erkrankung (z.B. nur AML) bezüglich ihrer Reaktion auf ATG zu vergleichen. So könnte man bessere Dosisanpassungen für die jeweilige Tumorerkrankung in der Klinik vornehmen, je nachdem ob die Variabilität in den Ergebnissen höher oder niedriger ist.

Die ADCC ist zwar von der ATG Konzentration abhängig; es scheint allerdings eine Sättigung einzutreten, je höher die ATG Dosis ist. Wie bereits vorher festgestellt, steigt die spezifische Bindung von ATG an Tumorzellen konzentrationsabhängig an. [97] Es wäre in dem Fall interessant zu wissen, ob die Bindung und der Einfluss von ATG ebenfalls einer Sättigungskurve folgen oder ob ab der durchschnittlichen ATG Dosierung von etwa 20-100 µg/ml die maximal effektive Degranulation von NK-Zellen erreicht ist. Dafür spricht, dass die NK-Zellen bei dem Assay selbst bei einer so hohen Dosis wie 1000 µg/ml, die im besten hypothetischen Fall eine Steigerung der ADCC gegenüber 100 µg/ml um das zehnfache hervorgerufen hätte, kaum signifikant mehr degranulieren als bei niedrigeren Dosierungen von etwa 20 µg/ml.

Das hochaggressive und schwer behandelbare Burkitts Lymphom (Zelllinie RAJI) rief im CD107a Assay eine besonders hohe ADCC hervor. Auch reagierte die Tumorzelllinie überdurchschnittlich auf die Gabe von ATG ohne Koinkubation mit PBMCs mit einer erhöhten Apoptoserate. Aktuell wird v.a. der monoklonale Antikörper Rituximab in Kombination mit dem CHOP Schema gegeben. [127] Meine Ergebnisse könnten polyklonale Antikörper stärker in den therapeutischen Fokus rücken.

ATG bleibt aufgrund der langen Halbwertszeit bei Standardkonditionierung ausreichend lange im Plasma, um sowohl die beginnende GVHD zu unterdrücken als auch die Antitumoreffekte freizusetzen. In dieser Hinsicht ist Kaninchen ATG dem aus Pferden gewonnen ATG überlegen, da seine funktionelle Halbwertszeit länger ist. Allerdings gibt es bezüglich der Restaktivität von ATG-F im Serum widersprüchliche Aussagen, so dass man zeitliche und Dosisanpassungen je nach Patientenserumlevel berücksichtigen muss. [128-130]

Aus allen genannten Gründen kann man aus den Ergebnissen des CD107a Assays schließen, dass sich die Hypothesen bezüglich des direkten ATG-Einflusses auf die NK-Zellen bestätigt haben: ATG löst im Beisein von Tumorzellen eine verstärkte Degranulation in NK-Zellen und erhöhte ADCC aus. Der Einfluss von ATG ist konzentrationsabhängig, aber die ADCC steigt nicht linear zur erhöhten Dosis ATG an; dies deutet auf eine Sättigungsreaktion hin.

5.11 ATG und die Apoptose der Tumorzellen

Ayuk et al zeigten bereits, dass ATG-Fresenius sowohl eine verstärkte komplement-abhängige als auch eine erhöhte komplement-unabhängige Zytotoxizität hervorruft. Die Ergebnisse bezogen sich allerdings auf eine kleine Selektion von Tumorzellen (Multiples Myelom, einige B-Zell-Tumoren) und wurden bis jetzt nicht weiterverfolgt. Ich hypothesisierte, dass ATG-Fresenius bei allen zu untersuchenden Zelllinien eine komplement-unabhängige Zytotoxizität in Form der Apoptose auslösen würde. [82, 84, 85] Zudem war zu erwarten, dass Zelllinien einer gleichen Erkrankung auch ähnlich deutlich reagieren würden. So hätte die Möglichkeit bestanden, in der Klinik mit einer bestimmten ATG-Dosierungsvorstellung an eine Therapie heranzugehen.

Meine Forschungen haben diese Hypothese zum Großteil bestätigt.

ATG löst in beiden Konzentration (10 µg/ml und 100 µg/ml) bei allen Tumorzellen außer dem T-Zell-Lymphom YT Apoptose aus, wenn die Zelllinien alleine mit ATG inkubiert wurden. Auch der prozentuale Anteil an nekrotischen Zellen nimmt unter ATG Einfluss leicht zu. Anti-Thymozytenglobulin ist zudem ein potenter Auslöser von Apoptose bei verschiedensten peripheren mononuklearen Blutzellen und auch von verschiedenen leukämischen Zelllinien. YT war auch in Vorstudien gegenüber ATG induzierter Apoptose resistent. [87]

Die Zelllinien reagieren unterschiedlich sensibel auf ATG mit unterschiedlichem Ansteigen der komplement-unabhängigen Zytotoxizität. Dies wurde auch in späteren Studien bestätigt. [113] Es spiegelt auch den klinischen Alltag wieder, bei dem noch deutlich mehr äußerliche Einflüsse und externe Faktoren eine Rolle im Verlauf der Krankheiten spielen, wie etwa Komorbiditäten der Patienten oder Keimbelastungen der Umwelt.

Es gibt allerdings überraschenderweise keine oder kaum eine ATG induzierte Steigerung der Apoptoserate bei Tumorzelllinie in Koinkubation mit PBMCs. In vitro scheint dies ungewöhnlich, da ich in meinen Hypothesen durch die natürliche Präsenz von PBMCs im menschlichen Körper keine Verhinderung dieses spezifischen Antitumoreffektes erwartet hatte.

5.12 Wie beeinflusst die CDC den programmierten Zelltod?

In der Arbeitsgruppe wurde eine weiterführende Variante der Experimente mit Testung der komplement-abhängigen Zytotoxizität (CDC) durchgeführt, bei der als Quelle für Komplement humanes Serum (Negativkontrolle mit hitzedeaktivierten humanen Serum) verwendet wurde.

Dort zeigte sich nach Zugabe des humanen Serums ein sprunghafter Anstieg der Apoptose- und Nekroserate, auch bei Zellen, die vorher eine geringere Apoptoserate beim Annexin V Assay zeigten. Diese Resultate sind auch im Einklang mit vorher beschriebenen Ergebnissen, bei denen die Zugabe von Komplement die Apoptoseresistenz von MM-Zellen überwand. [85, 97]

Das heißt, dass in vivo, also im tumorerkranken Patienten, die Tumorzellen apoptotisch auf ATG reagieren, und die Anwesenheit von Komplement diesen Effekt potenziert.

Eine weitere Erklärung könnte sein, dass im Beisein von PBMCs und insbesondere NK-Zellen andere Immunantworten wie die ADCC prädominieren und der Effekt zusätzlich durch das Einwirken von Komplement gesteigert wird.

Diese Resultate zeigen auf, wie bedeutsam der Einfluss der Umweltfaktoren und die vorherige Konstitution des Patienten sind. Apoptose ist nur ein Antitumoreffekt von mehreren, der sehr effektiv ist und durch weitere Faktoren verstärkt werden kann.

Man kann nicht von der Krankheit auf die Effektivität von ATG-Fresenius auf die Apoptoseinduktion schließen, da z.B. K562 und HL-60 sehr verschieden reagierten. Die Tatsache, dass bei meinen Ergebnissen zwei Tumorzelllinien der akuten myeloischen Leukämie unterschiedlich auf ATG als Apoptoseinduzierer reagieren, bedeutet möglicherweise auch, dass man nicht einfach Rückschlüsse von einem *in vitro* Ergebnis auf die Effektivität von ATG bei Therapieansätzen von malignen Erkrankungen schließen kann. Apoptose, ob nun komplement-verstärkt oder nicht, wird bis zu einem

gewissen Grade immer eine Rolle beim Antitumoreffekt spielen; diese ist aber abhängig vom ATG Spiegel *in vivo* und vielen weiteren Faktoren wie dem Konditionierungsregime oder dem körpereigenen Metabolismus.

Zusammenfassung: Klinische Signifikanz und Ausblick

ATG wird in zunehmend bei der allo-HSCT eingesetzt, ohne dass dessen Effekte auf die post-HSCT immunologischen Vorgänge genau bekannt sind. Meine Ergebnisse zeigen, dass ATG anti-Tumor Effekte vermittelt und liefern eine mögliche Erklärung für die relativ geringe Leukämie rezidivrate nach allo-HSCT mit *in vivo* T Zell Depletion. Sie tragen dazu bei, die Mechanismen von anti-Tumor Effekten durch polyklonale Antikörper besser zu verstehen und haben damit potenziell wichtige klinische Implikationen. Ich konnte demonstrieren, dass ATG die anti-Tumor Effekte über verschiedene Wirkmechanismen vermittelt.

ATG wirkt der Entwicklung von akuter und chronischer GVHD entgegen und ist gleichzeitig in der Lage, durch den Antitumoreffekt (u.a. die verstärkte ADCC und Apoptoseinduktion) eine Rezidivneigung zu verhindern. Es wird nun auch zunehmend zur Verminderung der cGVHD nach einer PBSCT eingesetzt.

Meine Arbeit trägt außerdem dazu bei, ein verbessertes Verständnis der immunologischen Vorgänge in der frühesten Phase nach einer allo-HSCT zu erlangen. Dieses Wissen ist wichtig für die Wahl zukünftiger Therapien nach einer allo-HSCT bei Patienten mit erhöhtem Tumorrezidivrisiko, bei denen eine T-Zell-Depletion notwendig ist.

Meine Ergebnisse sind meines Wissens die ersten Daten, die eine Steigerung der ADCC bei NK-Zellen durch ATG belegen. Diese Ergebnisse könnten die wissenschaftliche Basis liefern für einen klinischen Einsatz einer Kombination von polyklonalen Antikörpern und NK-Zell Immuntherapie. Dieser Ansatz ist insbesondere bei haploidenten allo-HSCTs sehr interessant, da hier die anti-Tumor Effekte von NK-Zellen als besonders ausgeprägt gelten.

ATG bleibt ein spannendes Medikament mit aufgrund seiner Polyklonalität großen Bandbreite an therapeutischen Effekten, von denen der Einfluss auf die ADCC und Apoptose bei leukämischen Zellen einen Teil darstellt.

6. Literaturverzeichnis

1. Marmont AM, Burt RK, *Hematopoietic stem cell transplantation for systemic lupus erythematosus, the antiphospholipid syndrome and bullous skin diseases*. *Autoimmunity*, 2008. 41(8): p. 639-47.
2. Illei GG, Cervera R, Burt RK, Doria A, Hiepe F, Jayne D, Pavletic S, Martin T, Marmont A, Saccardi R, Voskuyl AE, Farge D, *Current state and future directions of autologous hematopoietic stem cell transplantation in systemic lupus erythematosus*. *Ann Rheum Dis*, 2011. 70(12): p. 2071-4.
3. Barnes DW, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE, *Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication*. *Br Med J*, 1956. 2(4993): p. 626-7.
4. Thomas ED, Blume KG, *Historical markers in the development of allogeneic hematopoietic cell transplantation*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 1999. 5(6): p. 341-6.
5. Bortin MM, *A compendium of reported human bone marrow transplants*. *Transplantation*, 1970. 9(6): p. 571-87.
6. Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M, Devries M J, Tubiana M, Lalanne C, Binet JL, Papiernik M, Seman G, Matsukura M, Mery AM, Schwarzmann V, Flaisler A, *Successful Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Man: Chimerism, Induced Specific Tolerance and Possible Anti-Leukemic Effects*. *Blood*, 1965. 25: p. 179-96.
7. Thomas ED, Lochte HL Jr., Lu WC, Ferrebee JW, *Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy*. *N Engl J Med*, 1957. 257(11): p. 491-6.
8. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, Fernandez-Vina M, Flomenberg N, Horowitz M, Hurley CK, Noreen H, Oudshoorn M, Petersdorf E, Setterholm M, Spellman S, Weisdorf D, Williams TM, Anasetti C, *High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation*. *Blood*, 2007. 110(13): p. 4576-83.
9. Storb R, Raff RF, Appelbaum FR, Graham TC, Schuening FG, Sale G, Pepe M, *Comparison of fractionated to single-dose total body irradiation in conditioning canine littermates for DLA-identical marrow grafts*. *Blood*, 1989. 74(3): p. 1139-43.
10. Santos GW, Owens AH, Jr., *Allogeneic marrow transplants in cyclophosphamide treated mice*. *Transplant Proc*, 1969. 1(1): p. 44-6.
11. Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Masszi T, *The EBMT Handbook, 6th Edition*. 6 ed, ed. C.E. Apperley J, Gluckman E, Masszi T Vol. 6. 2012: ESH European School of Hematology. 683.
12. Dausset J, *[Iso-leuko-antibodies]*. *Acta Haematol*, 1958. 20(1-4): p. 156-66.
13. Horan JT, Logan BR, Agovi-Johnson MA, Lazarus HM, Bacigalupo AA, Ballen KK, Bredeson CN, Carabasi MH, Gupta V, Hale GA, Khoury HJ, Juckett MB, Litzow MR, Martino R, McCarthy PL, Smith FO, Rizzo JD, Pasquini MC *Reducing the risk for transplantation-related mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation: how much progress has been made?* *J Clin Oncol*, 2011. 29(7): p. 805-13.
14. Gooley TA, Chien JW, Pergam SA, Hingorani S, Sorrow ML, Boeckh M, Martin PJ, Sandmaier BM, Marr KA, Appelbaum FR, Storb R, McDonald GB, *Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation*. *N Engl J Med*, 2010. 363(22): p. 2091-101.
15. Martin PJ, McDonald GB, Sanders JE, Anasetti C, Appelbaum FR, Deeg HJ, Nash RA, Petersdorf EW, Hansen JA, Storb R, *Increasingly frequent diagnosis of acute gastrointestinal graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2004. 10(5): p. 320-7.
16. Deol A, Lum LG, *Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological malignancies after stem cell transplantation revisited*. *Cancer Treat Rev*, 2010. 36(7): p. 528-38.
17. Mathe G, Schwarzenberg L, de Vries MJ, Amiel JL, Cattani A, Schneider M, Binet JL, Tubiana M, Lalanne C, Schwarzmann V, Nordmann R, *The various aspects of the secondary syndrome complicating allogeneic bone marrow transplantations or leukocyte transfusions in patients suffering from malignant hemopathies*. *Eur J Cancer*, 1965. 1(2): p. 75-113.

18. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, *Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation*. Blood, 1990. 75(3): p. 555-62.
19. Appelbaum, F.R., *Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy*. Nature, 2001. 411(6835): p. 385-9.
20. Klein J, Sato A, *The HLA system. Second of two parts*. N Engl J Med, 2000. 343(11): p. 782-6.
21. Klein J, Sato A, *The HLA system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. 343(10): p. 702-9.
22. Bacigalupo, A., *Management of acute graft-versus-host disease*. Br J Haematol, 2007. 137(2): p. 87-98.
23. Nagler A, Labopin M, Shimoni A, Niederwieser D, Mufti GJ, Zander AR, Arnold R, Greinix H, Cornelissen JJ, Jackson GH, Craddock C, Bunjes DW, Ganser A, Russell NH, Kyrzcz-Krzemien S, Rocha V, Mohty M, *Mobilized peripheral blood stem cells compared with bone marrow as the stem cell source for unrelated donor allogeneic transplantation with reduced-intensity conditioning in patients with acute myeloid leukemia in complete remission: an analysis from the Acute Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2012. 18(9): p. 1422-9.
24. Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, Clift R, Forman SJ, Negrin R, Kashyap A, Flowers ME, Lilleby K, Chauncey TR, Storb R, Appelbaum FR, *Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers*. N Engl J Med, 2001. 344(3): p. 175-81.
25. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, Waller EK, Weisdorf DJ, Wingard JR, Cutler CS, Westervelt P, Woolfrey A, Couban S, Ehninger G, Johnston L, Maziarz RT, Pulsipher MA, Porter DL, Mineishi S, McCarty JM, Khan SP, Anderlini P, Bensinger WI, Leitman SF, Rowley SD, Bredeson C, Carter SL, Horowitz MM, Confer, D. L., *Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors*. N Engl J Med, 2012. 367(16): p. 1487-96.
26. Billingham RE, *The biology of graft-versus-host reactions*. Harvey Lect, 1966. 62: p. 21-78.
27. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED, *Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors*. Transplantation, 1974. 18(4): p. 295-304.
28. Dominietto A, Raiola AM, van Lint MT, Lamparelli T, Gualandi F, Berisso G, Bregante S, Frassoni F, Casarino L, Verdiani S, Bacigalupo A, *Factors influencing haematological recovery after allogeneic haematopoietic stem cell transplants: graft-versus-host disease, donor type, cytomegalovirus infections and cell dose*. Br J Haematol, 2001. 112(1): p. 219-27.
29. Lee KH, Choi SJ, Lee JH, Lee JS, Kim WK, Lee KB, Sohn SK, Kim JG, Kim DH, Seol M, Lee YS, Lee JH, *Prognostic factors identifiable at the time of onset of acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation*. Haematologica, 2005. 90(7): p. 939-48.
30. Rowlings PA, Przepioraka D, Klein JP, Gale RP, Passweg JR, Henslee-Downey PJ, Cahn JY, Calderwood S, Gratwohl A, Socie G, Abecasis MM, Sobocinski KA, Zhang MJ, Horowitz MM, *IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade*. Br J Haematol, 1997. 97(4): p. 855-64.
31. Marty FM, Lee SJ, Fahey MM, Alyea EP, Soiffer RJ, Antin JH, Baden LR, *Infliximab use in patients with severe graft-versus-host disease and other emerging risk factors of non-Candida invasive fungal infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: a cohort study*. Blood, 2003. 102(8): p. 2768-76.
32. Ferrara JL, *Pathogenesis of acute graft-versus-host disease: cytokines and cellular effectors*. J Hematother Stem Cell Res, 2000. 9(3): p. 299-306.
33. Bacigalupo A, Lamparelli T, Barisione G, Bruzzi P, Guidi S, Alessandrino PE, di Bartolomeo P, Oneto R, Bruno B, Sacchi N, van Lint MT, Bosi A, *Thymoglobulin prevents chronic graft-versus-host disease, chronic lung dysfunction, and late transplant-related mortality: long-term follow-up of a randomized trial in patients undergoing unrelated donor transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2006. 12(5): p. 560-5.
34. Flowers ME, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem HP, Petersdorf EW, Pereira SE, Nash RA, Mielcarek M, Fero ML, Warren EH, Sanders JE, Storb RF, Appelbaum FR, Storer BE, Martin PJ, *Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic*

- graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. Blood*, 2011. 117(11): p. 3214-9.
35. Maraninchi D, Gluckman E, Blaise D, Guyotat D, Rio B, Pico JL, Leblond V, Michallet M, Dreyfus F, Ifrah N, *Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias. Lancet*, 1987. 2(8552): p. 175-8.
 36. Ho VT, Soiffer RJ, *The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Blood*, 2001. 98(12): p. 3192-204.
 37. Lowsky R, Takahashi T, Liu YP, Dejbakhsh-Jones S, Grumet FC, Shizuru JA, Laport GG, Stockerl-Goldstein KE, Johnston LJ, Hoppe RT, Bloch DA, Blume KG, Negrin RS, Strober S, *Protective conditioning for acute graft-versus-host disease. N Engl J Med*, 2005. 353(13): p. 1321-31.
 38. Nash RA, Johnston L, Parker P, McCune JS, Storer B, Slattery JT, Furlong T, Anasetti C, Appelbaum FR, Lloid ME, Deeg HJ, Kiem HP, Martin PJ, Schubert MM, Witherspoon RP, Forman SJ, Blume K, Storb R, *A phase I/II study of mycophenolate mofetil in combination with cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after myeloablative conditioning and allogeneic hematopoietic cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant*, 2005. 11(7): p. 495-505.
 39. Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R, Saral R, Beschorner WE, Bias WB, Braine HG, Burns WH, Elfenbein GJ, Kaizer H, *Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. N Engl J Med*, 1983. 309(22): p. 1347-53.
 40. Bensing W, *High-dose preparatory regimens*. 4th ed. In: Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation. 2009.
 41. Soiffer RJ, Lerademacher J, Ho V, Kan F, Artz A, Champlin RE, Devine S, Isola L, Lazarus HM, Marks DI, Porter DL, Waller EK, Horowitz MM, Eapen M, *Impact of immune modulation with anti-T-cell antibodies on the outcome of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. Blood*, 2011. 117(25): p. 6963-70.
 42. Brissot E, Chevallier P, Guillaume T, Delaunay J, Ayari S, Dubruille V, Le Gouill S, Mahe B, Gastinne T, Blin N, Saulquin B, Moreau P, Harousseau JL, Mohty M, *Prophylaxis with mycophenolate mofetil and CsA can decrease the incidence of severe acute GVHD after antithymocyte globulin-based reduced-intensity preparative regimen and allo-SCT from HLA-matched unrelated donors. Bone Marrow Transplant*, 2010. 45(4): p. 786-8.
 43. Bacigalupo A, *Second EBMT Workshop on reduced intensity allogeneic hemopoietic stem cell transplants (RI-HSCT). Bone Marrow Transplant*, 2002. 29(3): p. 191-5.
 44. Mielcarek M, Storer BE, Boeckh M, Carpenter PA, McDonald GB, Deeg HJ, Nash RA, Flowers ME, Doney K, Lee S, Marr KA, Furlong T, Storb R, Appelbaum FR, Martin PJ, *Initial therapy of acute graft-versus-host disease with low-dose prednisone does not compromise patient outcomes. Blood*, 2009. 113(13): p. 2888-94.
 45. Harjunpaa A, Junnikkala S, Meri S, *Rituximab (anti-CD20) therapy of B-cell lymphomas: direct complement killing is superior to cellular effector mechanisms. Scand J Immunol*, 2000. 51(6): p. 634-41.
 46. Kohler G, Milstein C, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature*, 1975. 256(5517): p. 495-7.
 47. Penack O, Gentilini C, Fischer L, Asemissen AM, Scheibenbogen C, Thiel E, Uharek L, *CD56dimCD16neg cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets. Leukemia*, 2005. 19(5): p. 835-40.
 48. Fischer L, Penack O, Gentilini C, Nogai A, Muessig A, Thiel E, Uharek L, *The anti-lymphoma effect of antibody-mediated immunotherapy is based on an increased degranulation of peripheral blood natural killer (NK) cells. Exp Hematol*, 2006. 34(6): p. 753-9.
 49. Reed JC, *Mechanisms of apoptosis. Am J Pathol*, 2000. 157(5): p. 1415-30.
 50. Zand MS, Vo T, Huggins J, Felgar R, Liesveld J, Pellegrin T, Bozorgzadeh A, Sanz I, Briggs BJ, *Polyclonal rabbit antithymocyte globulin triggers B-cell and plasma cell apoptosis by multiple pathways. Transplantation*, 2005. 79(11): p. 1507-15.
 51. Genestier L, Fournel S, Flacher M, Assossou O, Revillard JP, Bonnefoy-Berard N, *Induction of*

- Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins.* Blood, 1998. 91(7): p. 2360-8.
52. Storek J, Mohty M, Boelens JJ, *Rabbit anti-T cell globulin in allogeneic hematopoietic cell transplantation.* Biol Blood Marrow Transplant, 2015. 21(6): p. 959-70.
 53. Sheng Z, Ma H, Pang W, Niu S, Xu J, *In vivo T-cell depletion with antithymocyte globulins improves overall survival after myeloablative allogeneic stem cell transplantation in patients with hematologic disorders.* Acta Haematol, 2013. 129(3): p. 146-53.
 54. Theurich S, Fischmann H, Chakupurakal G, Shimabukuro-Vornhagen A, Chemnitz JM, Holtick U, Rothe A, Scheid C, Hallek M, Skoetz N, von Bergwelt-Baildon M, *Anti-thymocyte globulins for post-transplant graft-versus-host disease prophylaxis-A systematic review and meta-analysis.* Crit Rev Oncol Hematol, 2013. 88(1): p. 178-86.
 55. Russell JA, Turner AR, Larratt L, Chaudhry A, Morris D, Brown C, Quinlan D, Stewart D, *Adult recipients of matched related donor blood cell transplants given myeloablative regimens including pretransplant antithymocyte globulin have lower mortality related to graft-versus-host disease: a matched pair analysis.* Biol Blood Marrow Transplant, 2007. 13(3): p. 299-306.
 56. Potter VT, Krishnamurthy P, Barber LD, Lim Z, Kenyon M, Ireland RM, de Lavallade H, Dhouri A, Marsh JC, Marcus R, Devereux S, Ho A, Pagliuca A, Mufti GJ, *Long-term outcomes of alemtuzumab-based reduced-intensity conditioned hematopoietic stem cell transplantation for myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia secondary to myelodysplastic syndrome.* Biol Blood Marrow Transplant, 2014. 20(1): p. 111-7.
 57. Baron F, Labopin M, Blaise D, Lopez-Corral L, Vigouroux S, Craddock C, Attal M, Jindra P, Goker H, Socie G, Chevallier P, Browne P, Sandstedt A, Duarte RF, Nagler A, Mohty M, *Impact of in vivo T-cell depletion on outcome of AML patients in first CR given peripheral blood stem cells and reduced-intensity conditioning allo-SCT from a HLA-identical sibling donor: a report from the Acute Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation.* Bone Marrow Transplant, 2014. 49(3): p. 389-96.
 58. Mohty M, *Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond.* Leukemia (2007), 2007(21): p. 1387-1394.
 59. Monti P, *Effects of anti-lymphocytes and anti-thymocytes globulin on human dendritic cells.* Int Immunopharmacol, 2003. 3(2): p. 189-96.
 60. Rebellato LM, Gross U, Verbanac KM., Thomas JM, *A comprehensive definition of the major antibody specificities in polyclonal rabbit antithymocyte globulin.* Transplantation, 1994. 57(5): p. 685-94.
 61. Kumar A, Mhaskar AR, Reljic T, Mhaskar RS, Kharfan-Dabaja MA, Anasetti C, Mohty M, Djulbegovic B, *Antithymocyte globulin for acute-graft-versus-host-disease prophylaxis in patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation: a systematic review.* Leukemia, 2012. 26(4): p. 582-8.
 62. Ferrara JL, Reddy P, *Pathophysiology of graft-versus-host disease.* Semin Hematol, 2006. 43(1): p. 3-10.
 63. Preville X, Flacher M, LeMauff B, Beauchard S, Davelu P, Tiollier J, Revillard JP, *Mechanisms involved in antithymocyte globulin immunosuppressive activity in a nonhuman primate model.* Transplantation, 2001. 71(3): p. 460-8.
 64. Michallet MC, Preville X, Flacher M, Fournel S, Genestier L, Revillard JP, *Functional antibodies to leukocyte adhesion molecules in antithymocyte globulins.* Transplantation, 2003. 75(5): p. 657-62.
 65. Finke J, Bertz H, Schmoor C, Veelken H, Behringer D, Wasch R, Kunzmann R, Heidecker L, Lang H, Meyer-Konig U, Mertelsmann R, *Allogeneic bone marrow transplantation from unrelated donors using in vivo anti-T-cell globulin.* Br J Haematol, 2000. 111(1): p. 303-13.
 66. Zander AR, Zabelina T, Kroger N, Renges H, Kruger W, Loliger C, Durken M, Stockschrader M, de Wit M, Wacker-Backhaus G, Bielack S, Jaburg N, Russmann B, Erttmann R, Kabisch H, *Use of a five-agent GVHD prevention regimen in recipients of unrelated donor marrow.* Bone Marrow Transplant, 1999. 23(9): p. 889-93.
 67. Hows J, Bradley BA, Gore S, Downie T, Howard M, Gluckman E, *Prospective evaluation of*

- unrelated donor bone marrow transplantation. The International Marrow Unrelated Search and Transplant (IMUST) Study. Bone Marrow Transplant, 1993. 12(4): p. 371-80.*
68. Merion RM, Howell T, Bromberg JS, *Partial T-cell activation and anergy induction by polyclonal antithymocyte globulin. Transplantation, 1998. 65(11): p. 1481-9.*
 69. Lytton SD, Denton CP, Nutzenberger AM, *Treatment of autoimmune disease with rabbit anti-T lymphocyte globulin: clinical efficacy and potential mechanisms of action. Ann N Y Acad Sci, 2007. 1110: p. 285-96.*
 70. Crump M, Larratt LM, Maki E, Curtis JE, Minden MD, Meharchand JM, Lipton JH, Messner HA, *Treatment of adults with severe aplastic anemia: primary therapy with antithymocyte globulin (ATG) and rescue of ATG failures with bone marrow transplantation. Am J Med, 1992. 92(6): p. 596-602.*
 71. Zhu D, Qi G, Tang Q, Li L, Yang C, Lin M, Wu B, Xu, Cai J, Zhu T, Rong R, *Combination of Total Lymphoid Irradiation, Low-Dose IVIG and ATG as Rescue Therapy for Highly Sensitized and Antibody-Mediated Rejection Renal Transplant Recipients. Clin Transpl, 2014: p. 215-21.*
 72. Finke J, Bethge WA, Schmoor C, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR, Volin L, Ruutu T, Heim DA, Schwerdtfeger R, Kolbe K, Mayer J, Maertens JA, Linkesch W, Holler E, Koza V, Bornhauser M, Einsele H, Kolb HJ, Bertz H, Egger M, Grishina O, Socie G, *Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. Lancet Oncol, 2009. 10(9): p. 855-64.*
 73. Ringden O, Remberger M, Carlens S, Hagglund H, Mattsson J, Aschan J, Lonnqvist B, Klaesson S, Winiarski J, Dalianis T, Olerup O, Sparrelid E, Elmhorn-Rosenborg A, Svahn BM, Ljungman P, *Low incidence of acute graft-versus-host disease, using unrelated HLA-A-, HLA-B-, and HLA-DR-compatible donors and conditioning, including anti-T-cell antibodies. Transplantation, 1998. 66(5): p. 620-5.*
 74. Ziegler C, Finke J, Grulich C, *Rabbit anti-T-lymphocyte globulin (ATG) persists with differential reactivity in patients' sera after full hematopoietic regeneration from allogeneic stem cell transplantation. Transpl Immunol, 2014. 30(4): p. 136-9.*
 75. Marmont AM, Horowitz MM, Gale RP, Sobocinski K, Ash RC, van Bekkum DW, Champlin RE, Dicke KA, Goldman JM, Good RA, *T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. Blood, 1991. 78(8): p. 2120-30.*
 76. Kroger N, Zabelina T, Kruger W, Renges H, Stute N, Rischewski J, Sonnenberg S, Ayuk, F, Togel F, Schade U, Fiegel H, Erttmann R, Loliger C, Zander AR, *In vivo T cell depletion with pretransplant anti-thymocyte globulin reduces graft-versus-host disease without increasing relapse in good risk myeloid leukemia patients after stem cell transplantation from matched related donors. Bone Marrow Transplant, 2002. 29(8): p. 683-9.*
 77. Kroger N, Einsele H, Wolff D, Casper J, Freund M, Derigs G, Wandt H, Schafer-Eckart K, Wittkowsky G, Schmitz N, Kruger W, Zabelina T, Renges H, Ayuk F, Krull A, Zander A, *Myeloablative intensified conditioning regimen with in vivo T-cell depletion (ATG) followed by allografting in patients with advanced multiple myeloma. A phase I/II study of the German Study-group Multiple Myeloma (DSMM). Bone Marrow Transplant, 2003. 31(11): p. 973-9.*
 78. Deeg HJ, Storer BE, Boeckh M, Martin PJ, McCune JS, Myerson D, Heimfeld S, Flowers ME, Anasetti C, Doney KC, Hansen JA, Kiem HP, Nash RA, O'Donnell PV, Radich JP, Sandmaier BM, Scott BL, Sorrow ML, Warren EH, Witherspoon RP, Woolfrey A, Appelbaum FR, Storb R, *Reduced incidence of acute and chronic graft-versus-host disease with the addition of thymoglobulin to a targeted busulfan/cyclophosphamide regimen. Biol Blood Marrow Transplant, 2006. 12(5): p. 573-84.*
 79. Hoegh-Petersen M, Amin MA, Liu Y, Ugarte-Torres A, Williamson TS, Podgorny PJ, Russell JA, Grigg A, Ritchie D, Storek J, *Anti-thymocyte globulins capable of binding to T and B cells reduce graft-vs-host disease without increasing relapse. Bone Marrow Transplant, 2013. 48(1): p. 105-14.*
 80. Remberger M, Svahn BM, Mattsson J, Ringden O, *Dose study of thymoglobulin during conditioning for unrelated donor allogeneic stem-cell transplantation. Transplantation, 2004. 78(1): p. 122-7.*

81. Kroger N, Zabelina T, Kruger W, Renges H, Stute N, Schrum J, Kabisch H, Schafhausen P, Jaburg N, Loliger C, Schafer P, Hinke A, Zander AR, *Patient cytomegalovirus seropositivity with or without reactivation is the most important prognostic factor for survival and treatment-related mortality in stem cell transplantation from unrelated donors using pretransplant in vivo T-cell depletion with anti-thymocyte globulin*. Br J Haematol, 2001. 113(4): p. 1060-71.
82. Bonnefoy-Berard N, Revillard JP, *Mechanisms of immunosuppression induced by antithymocyte globulins and OKT3*. J Heart Lung Transplant, 1996. 15(5): p. 435-42.
83. Varghese Z, Abudher MN, Fernando ON, Moorhead JF, *Induction therapy with bolus ATG increases cyclosporine sensitivity in renal transplant recipients*. Transplant Proc, 2001. 33(3): p. 2251-3.
84. Ayuk FA, Atassi N, Schuch G, Mina S, Fang L, Bokemeyer C, Fehse B, Zander AR, Kroger N, *Complement-dependent and complement-independent cytotoxicity of polyclonal antithymocyte globulins in chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Res, 2008. 32(8): p. 1200-6.
85. Ayuk FA, Fang L, Fehse B, Zander AR, Kroger N, *Antithymocyte globulin induces complement-dependent cell lysis and caspase-dependent apoptosis in myeloma cells*. Exp Hematol, 2005. 33(12): p. 1531-6.
86. Yoshimi A, Ito M, Kojima S, *Leukemic cell death induced by antithymocyte globulin*. Leuk Res, 2005. 29(7): p. 821-7.
87. Grulich C, Ziegler C, Finke J, *Rabbit anti T-lymphocyte globulin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cell compartments and leukemia cells, while hematopoietic stem cells are apoptosis resistant*. Biol Blood Marrow Transplant, 2009. 15(2): p. 173-82.
88. Hatanaka K, Fuji S, Ikegame K, Kato R, Wake A, Hidaka M, Ito T, Inoue M, Nagatoshi Y, Takami A, Uike N, Sakamaki H, Yabe H, Morishima Y, Suzuki R, Atsuta Y, Fukuda T, *Low incidences of acute and chronic graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation with low-dose anti-T lymphocyte globulin*. Int J Hematol, 2012. 96(6): p. 773-80.
89. Bacigalupo A, Lamparelli T, Bruzzi P, Guidi S, Alessandrino PE, di Bartolomeo P, Oneto R, Bruno B, Barbanti M, Sacchi N, Van Lint MT, Bosi A, *Antithymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis in transplants from unrelated donors: 2 randomized studies from Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO)*. Blood, 2001. 98(10): p. 2942-7.
90. Socie G, Schmoor C, Bethge WA, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR, Volin L, Ruutu T, Heim DA, Schwerdtfeger R, Kolbe K, Mayer J, Maertens JA, Linkesch W, Holler E, Koza V, Bornhauser M, Einsele H, Kolb HJ, Bertz H, Egger M, Grishina O, Finke J, *Chronic graft-versus-host disease: long-term results from a randomized trial on graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin ATG-Fresenius*. Blood, 2011. 117(23): p. 6375-82.
91. Podgorny PJ, Ugarte-Torres A, Liu Y, Williamson TS, Russell JA, Storek J, *High rabbit-antihuman thymocyte globulin levels are associated with low likelihood of graft-vs-host disease and high likelihood of posttransplant lymphoproliferative disorder*. Biol Blood Marrow Transplant, 2010. 16(7): p. 915-26.
92. Chawla S, Dharmani-Khan P, Liu Y, Prokopishyn N, Amlish Munir M, Griffiths C, Khan FM, Stewart DA, Russell JA, Daly A, Storek J, *High serum level of antithymocyte globulin immediately before graft infusion is associated with a low likelihood of chronic, but not acute, graft-versus-host disease*. Biol Blood Marrow Transplant, 2014. 20(8): p. 1156-62.
93. Ayuk F, Diyachenko G, Zabelina T, Panse J, Wolschke C, Eiermann T, Binder T, Fehse B, Erttmann R, Kabisch H, Bacher U, Kroger N, Zander A, *Anti-thymocyte globulin overcomes the negative impact of HLA mismatching in transplantation from unrelated donors*. Exp Hematol, 2008. 36(8): p. 1047-54.
94. Finke J, Schmoor C, Lang H, Potthoff K, Bertz H, *Matched and mismatched allogeneic stem-cell transplantation from unrelated donors using combined graft-versus-host disease prophylaxis including rabbit anti-T lymphocyte globulin*. J Clin Oncol, 2003. 21(3): p. 506-13.
95. Banchereau J, Steinman RM, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. 392(6673): p. 245-52.

96. Fang L, Fehse B, Engel M, Zander A, Kroger N, *Antithymocyte globulin induces ex vivo and in vivo depletion of myeloid and plasmacytoid dendritic cells*. Transplantation, 2005. 79(3): p. 369-71.
97. Westphal S, Brinkmann H, Kalupa M, Wilke A, Seitz-Merwald I, Penack O, *Anti-tumor effects of anti-T-cell globulin*. Exp Hematol, 2014. 42(10): p. 875-82.
98. Ayuk F, Maywald N, Hannemann S, Larsen U, Zander A, Kroger N, *Comparison of the cytotoxicity of 4 preparations of anti-T-cell globulins in various hematological malignancies*. Anticancer Res, 2009. 29(4): p. 1355-60.
99. Biotech N, *ATG Fresenius S Polyklonaler Antikörper bei Transplantation*, N. Biotech, Editor.
100. Huber R, Romisch J, Paques EP, *The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes*. EMBO J, 1990. 9(12): p. 3867-74.
101. Huber R, Schneider M, Mayr I, Romisch J, Paques EP, *The calcium binding sites in human annexin V by crystal structure analysis at 2.0 Å resolution. Implications for membrane binding and calcium channel activity*. FEBS Lett, 1990. 275(1-2): p. 15-21.
102. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH, *Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis*. Blood, 1994. 84(5): p. 1415-20.
103. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C, *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. J Immunol Methods, 1995. 184(1): p. 39-51.
104. Lecoecur, H, *Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases*. Exp Cell Res, 2002. 277(1): p. 1-14.
105. eBioscience, *Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC Catalog Number 88-8005*.
106. Lorence A, Nessler CL, *Camptothecin, over four decades of surprising findings*. Phytochemistry, 2004. 65(20): p. 2735-49.
107. Slatter JG, Schaaf LJ, Sams JP, Feenstra KL, Johnson MG, Bombardt PA, Cathcart KS, Verburg MT, Pearson LK, Compton LD, Miller LL, Baker DS, Pesheck CV, Lord RS, 3rd, *Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of irinotecan (CPT-11) following I.V. infusion of [(14)C]CPT-11 in cancer patients*. Drug Metab Dispos, 2000. 28(4): p. 423-33.
108. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S, *Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells*. Science, 2011. 331(6013): p. 44-9.
109. Penack O, Fischer L, Stroux A, Gentilini C, Nogai A, Muessig A, Ganepola S, Lange T, Kliem C, Marinets O, Blau IW, Thiel E, Uharek L, *A novel method to quantify and characterize leukemia-reactive natural killer cells in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation following conventional or reduced-dose conditioning*. Int J Hematol, 2007. 85(4): p. 326-32.
110. Tartakoff AM, *Perturbation of the structure and function of the Golgi complex by monovalent carboxylic ionophores*. Methods Enzymol, 1983. 98: p. 47-59.
111. Carpen O, Virtanen I, Saksela E, *The cytotoxic activity of human natural killer cells requires an intact secretory apparatus*. Cell Immunol, 1981. 58(1): p. 97-106.
112. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA, *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol, 2001. 22(11): p. 633-40.
113. Dabas R, Lee R, Servito MT, Dharmani-Khan P, Modi M, Slyke Tv, Luider J, Durand C, Larratt L, Brandwein J, Daly A, Khan FM, Storek J, *Anti-thymocyte globulin at clinically relevant concentration kills leukemic blasts*. Biology of Blood and Marrow Transplantation x, 2016. Biology of Blood and Marrow Transplantation (2016), doi: 10.1016/j.bbmt.2016.01.002.
114. Serru V, Dessen P, Boucheix C, Rubinstein E, *Sequence and expression of seven new tetraspans*. Biochim Biophys Acta, 2000. 1478(1): p. 159-63.
115. Azuma Y, Kurusu Y, Sato H, Higai K, Matsumoto K, *Increased expression of Lewis X and Y antigens on the cell surface and FUT 4 mRNA during granzyme B-induced Jurkat cell apoptosis*. Biol Pharm Bull, 2007. 30(4): p. 655-60.
116. Ayuk F, Diyachenko G, Zabelina T, Wolschke C, Fehse B, Bacher U, Erttmann R, Kroger N,

- Zander AR, *Comparison of two doses of antithymocyte globulin in patients undergoing matched unrelated donor allogeneic stem cell transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2008. 14(8): p. 913-9.
117. Mastaglio S, Peccatori J, Bernardi M, Clerici, A, Crotta, C, Messina, A, Assanelli, C, Corti, M.T, Lupo Stanghellini, M, Marcatti, C, Bonini, F, Ciceri, *Pharmacokinetics of ATG-Fresenius S in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation: implications for adoptive immunotherapy*. Paper presented at: 35th Annual Meeting of the EBMT, Göteborg, Sweden, 2009.
http://registration.akm.ch/einsicht.php?XNABSTRACT_ID=80548&XNSPRACHE_ID=2&XNKONGRESS_ID=91&XNMASKEN_ID=900.
 118. Mohty M, Diyachenko G, Zabelina T, Wolschke C, Fehse B, Bacher U, Erttmann R, Kroger N, Zander AR, *Antithymocyte globulins and chronic graft-vs-host disease after myeloablative allogeneic stem cell transplantation from HLA-matched unrelated donors: a report from the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire*. Leukemia, 2010. 24(11): p. 1867-74.
 119. James OI, Davies KS, Barrett JA, Rezvani K, *Opportunities and limitations of NK cells as adoptive therapy for malignant disease*. Cytotherapy, 2014(Nov 16(11)): p. 1453-1466.
 120. Bossi G, Griffiths GM, *Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells*. Nat Med, 1999. 5(1): p. 90-6.
 121. Alter G, Malenfant JM, Delabre RM, Burgett NC, Yu XG, Lichterfeld M, Zaunders J., Altfeld M, *Increased natural killer cell activity in viremic HIV-1 infection*. J Immunol, 2004. 173(8): p. 5305-11.
 122. Wolint P, Betts MR, Koup RA, Oxenius A, *Immediate cytotoxicity but not degranulation distinguishes effector and memory subsets of CD8+ T cells*. J Exp Med, 2004. 199(7): p. 925-36.
 123. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S, *Functions of natural killer cells*. Nat Immunol, 2008. 9(5): p. 503-10.
 124. Sanderson CJ, Clark IA, Taylor GA, *Different effector cell types in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*. Nature, 1975. 253(5490): p. 376-7.
 125. Penack O, Fischer L, Stroux A, Gentilini C, Nogai A, Muessig A, Rieger K, Ganepola S, Herr W, Meyer RG, Thiel E, Uharek L, *Serotherapy with thymoglobulin and alemtuzumab differentially influences frequency and function of natural killer cells after allogeneic stem cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2008. 41(4): p. 377-83.
 126. Rezvani K, Rouse RH, *The Application of Natural Killer Cell Immunotherapy for the Treatment of Cancer*. Front Immunol, 2015. 6: p. 578.
 127. Hoelzer D, Walewski J, Dohner H, Viardot A, Hiddemann W, Spiekermann K, Serve H, Duhrsen U, Huttmann A, Thiel E, Dengler J, Kneba M, Schaich M, Schmidt-Wolf IG, Beck J, Hertenstein B, Reichle A, Domanska-Czyz K, Fietkau R, Horst HA, Rieder H, Schwartz S, Burmeister T, Gokbuget N, , *Improved outcome of adult Burkitt lymphoma/leukemia with rituximab and chemotherapy: report of a large prospective multicenter trial*. Blood, 2014. 124(26): p. 3870-9.
 128. Mastaglio S, Forcina A, Seitz I, Martinius H, Peccatori J, Bernardi M, Clerici D, Corti C, Crotta A, Stanghellini MT, Messina C, Bonini C, Ciceri F, *Pharmacokinetics (PK) Study Of Antithymocyte Globulins Fresenius (ATG-F) Prior To Allogeneic Stem Cell Transplantation: Implications For Timing Of Graft and Early Adoptive Immunotherapy Infusions*. Blood, 2013. 122(21): p. 4536 - 4536.
 129. Bunn D, Lea CK, Bevan DJ, Higgins RM, Hendry BM, *The pharmacokinetics of anti-thymocyte globulin (ATG) following intravenous infusion in man*. Clin Nephrol, 1996. 45(1): p. 29-32.
 130. Forman SJ, Antin JH, *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation, 2 Volume Set*. Vol. 1. 2015, Wiley-Blackwell.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Hanna Brinkmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Anti-Tumor Effekte von anti-T-Zell Globulin - Welchen Einfluss hat ATG Fresenius auf die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) gegen hämatopoietische Tumoren? Löst ATG Apoptose bei Tumorzellen aus?“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Hanna Elisabeth Brinkmann hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Westphal, S.; Brinkmann, H.; Kalupa, M.; Wilke, A.; Seitz-Merwald, I.; Penack, O., „Anti-tumor effects of anti-T-cell globulin“, Experimental Hematology, 2014

Beitrag: Erforschung des Einflusses von ATG auf die antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität der NK-Zellen und Apoptose von Tumorzellen im in vitro Versuch mit verschiedenen Tumorentitäten sowie die Anwendung des CD107a und Annexin V Assays

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

1. Westphal, S., Brinkmann, H., Kalupa, M., Wilke, A., Seitz-Merwald, I., Penack, O.
Anti-tumor effects of anti-T-cell globulin
Experimental Hematology, 2014. 42(10): p. 875-82

Danksagungen

Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Olaf Penack, danke ich für die Bereitstellung des großartigen Themas und die langjährige Betreuung. Ich möchte mich insbesondere für die Ausdauer und die gelegentlichen Motivationsschubser sowie das sorgfältige Korrekturlesen bedanken, ohne die ich diese Arbeit wahrscheinlich nicht geschafft hätte.

Ich danke Frau Dr. rer. nat. Sabine Westphal, meiner Zweitbetreuerin, die mit viel Geduld meine Laborzeit unterstützt hat und mir mit Rat und Tat von Anfang an zur Seite stand.

Mein besonderer Dank gilt auch der gesamten aktuellen und ehemaligen Arbeitsgruppe Penack, die mir in verschiedenen Aspekten der Doktorarbeit zur Seite standen: Karen Großmann, Andrea Wilke, Katarina Riesner, Jörg Mengwasser, Sandra Rudloff, Steffen Cordes und insbesondere Martina Kalupa, die mir die wichtigen Grundlagen der Laborarbeit näher gebracht und mich bei allen Assays tatkräftig unterstützt hat.

Vielen Dank auch an Christine Bruns, die ich zu einigen Fragestellungen bezüglich der Assays konsultiert habe.

Meinen wunderbaren Eltern danke ich für alle Chancen, die sie mir emotional und finanziell ermöglicht haben und die natürlich weit über diese Dissertation hinausgehen. Danke, dass Ihr mich immer unterstützt habt und mir die Zeit gegeben habt, alle meine Ziele und Träume zu verwirklichen. Im Speziellen danke ich hier noch meinem Vater, der sich ohne medizinische Vorkenntnisse meine Dissertation viele Male durchgelesen hat, um ein einwandfreies Ergebnis bezüglich der Grammatik und Rechtschreibung zu erzielen.

Antoine Rebstein danke ich für seine emotionale und kulinarische Unterstützung – ohne deine Liebe und Motivation wäre mir vieles schwerer gefallen.

Bei meinen ebenfalls Dissertationsschreibenden Freunden bedanke ich mich für die vielen Stunden Freizeit und Diskussion – es war immer schön zu wissen, dass man mit seinen akademischen Problemen nicht alleine ist.