

Charité Zentrum 14 für Tumormedizin  
Medizinische Klinik III, Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. E. Thiel, Campus Benjamin Franklin

## **Habilitationsschrift**

### **Endotheliale Progenitorzellen und Natürliche Killerzellen bei Allogener Stammzelltransplantation und Tumor-Immuntherapie**

zur Erlangung der Venia legendi  
für das Fach  
Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Olaf Penack**

geb. am 11. Dezember 1971 in Kassel

eingereicht im Juni 2009

Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: PD Dr. Christine S. Falk

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang E. Berdel

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	
1.1	Immuntherapie maligner Erkrankungen.....	4
1.2	Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation.....	5
1.3	Graft-versus-tumor Effekt.....	6
1.4	Graft-versus-host Krankheit.....	7
1.5	Mausmodelle für allogene Knochenmarktransplantation.....	8
1.6	Neovaskularisierung und Endotheliale Progenitorzellen während Tumorwachstum.....	11
1.7	Neovaskularisierung und Endotheliale Progenitorzellen während Entzündungen.....	12
1.8	Anti-Tumor Effekte durch Natürliche Killerzellen.....	13
1.9	Natürliche Killerzellen und die graft-versus-host Krankheit.....	15
<b>2</b>	<b>Eigene Arbeiten</b>	
2.1	Endotheliale Progenitorzellen bei der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation .....	17
2.2	Natürliche Killerzellen bei der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation.....	24
2.2.1	Etablierung einer Methode zur Messung der NK Aktivität gegen Tumorzellen.....	24
2.2.2	Identifikation von NK Zell Subpopulationen die ADCC gegen Tumorzellen vermitteln.....	26
2.2.3	Einfluss des Konditionierungsprotokolls auf die NK Aktivität bei Patienten nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation....	28
2.2.4	Einfluss von Alemtuzumab of die NK Aktivität bei Patienten nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation.....	30
2.2.5	Einfluss von ATG of die NK Aktivität bei Patienten nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation.....	32
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	
3.1	Endotheliale Progenitorzellen bei der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation .....	34
3.2	Anti-Tumor Effekte durch Natürliche Killerzellen.....	38
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	45
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	48
<b>6</b>	<b>Danksagung</b> .....	55

## Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
Allo-KMT	Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigen präsentierende Zelle
ATG	Anti-Thymozyten Globulin
CD107a	Lysosomal-associated membrane protein-1
DLI	Donor Lymphozyten Infusion
EC	Endothelzelle
EPC	Endotheliale Progenitorzelle
GFP	Green fluorescence protein
GVHD	Graft-versus-host Krankheit
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
GVT	Graft-versus-tumor
IFN $\gamma$	Interferon Gamma
IL	Interleukin
KIR	Killer cell immunoglobulin-like receptors
MHC	Major histocompatibility complex
NK Zelle	Natürliche Killerzelle
TBI	Total body irradiation
TNF	Tumor-necrosis-factor
VE-cadherin	Vascular endothelial cadherin
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

# 1 Einleitung

## 1.1 Immuntherapie maligner Erkrankungen

Durch aktuelle Forschungsergebnisse wird die herausragende Bedeutung des Immunsystems für die Abwehr und Kontrolle von Tumorzellen belegt.<sup>1</sup> Japanische Forscher haben durch eine Langzeitbeobachtung an einer Population von mehr als 3500 gesunden Menschen herausfinden können, dass die Zytotoxizität von Lymphozyten im peripheren Blut einen erheblichen Einfluss auf die Inzidenz von Malignomen hat.<sup>2</sup> Menschen mit Lymphozyten, die eine niedrige Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen haben, erkrankten häufiger an Krebs im Verlauf Ihres Lebens. Bei Patienten nach Organtransplantationen, die mit einer immunsuppressiven Therapie behandelt werden, besteht daher ein bis zu 25fach erhöhtes Risiko an Krebs zu erkranken im Vergleich zur Normalbevölkerung.<sup>3</sup> Bei soliden sowie bei hämatologischen Tumoren wurde festgestellt, dass der Grad der Infiltration von T Zellen im Tumorgewebe die Prognose des Patienten voraussagen kann.<sup>4,5</sup> Diese Erkenntnisse haben die Forschungstätigkeit auf dem Gebiet der Tumor-Immuntherapie erheblich stimuliert. Insbesondere im Bereich der Therapie mit monoklonalen Antikörpern, der zellbasierten Therapie und der Impftherapie wurden große Fortschritte gemacht. Die Gabe von monoklonalen Antikörpern gegen Tumor Antigene hat Einzug in die klinische Praxis gefunden, z.B. bei Mamma Ca. (Trastuzumab),<sup>6</sup> bei B Zell Lymphomen (Rituximab)<sup>7</sup> und bei verschiedenen soliden Tumoren (Cetuximab).<sup>8</sup> Auch zelluläre Therapien, wie z.B. die adoptive Gabe von tumorspezifischen T Zellen, sind bereits in der klinischen Phase der Testung.<sup>9</sup>

Ein weiterer vielversprechender immuntherapeutischerer Ansatz, der schon klinisch bei unterschiedlichen Krebsarten verwendet wird, ist die Vakzinierung mit Tumor Antigenen.<sup>10</sup> Die zurzeit effektivste Immuntherapie gegen Krebs ist jedoch die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allo-KMT), bei der Immunzellen des Knochenmarkspenders die Tumorzellen des Patienten attackieren und dadurch schwer behandelbare Tumorerkrankung geheilt werden können.<sup>11</sup>

## **1.2 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation**

Die allo-KMT ist eine wichtige kurative Therapie für eine Reihe von malignen Erkrankungen, wie z.B. Leukämien, Lymphome und Nierenzellkarzinome, und nicht-malignen Erkrankungen, wie z.B. aplastische Anämien und schwere kombinierte Immundefizienz.<sup>12,13</sup> Der therapeutische Nutzen der allo-KMT ist nicht nur darin begründet, dass höhere Dosen von Chemotherapie oder Bestrahlung gegeben werden können, sondern auch durch den so genannten graft-versus-tumor (GVT) Effekt, bei dem das Immunsystem des Spenders Krebszellen des Empfängers bekämpft.<sup>11,14-16</sup> Leider ist die allo-KMT kein komplikationsarmes Verfahren: Die graft-versus-host Krankheit (GVHD) ist eine progressive systemische Entzündung, die vor allem den Darm, die Leber und die Haut betrifft und erhebliche Morbidität und Mortalität verursacht.<sup>17-19</sup> Die meisten Patienten bei denen eine allo-KMT durchgeführt wird leiden trotz prophylaktischer Maßnahmen an GVHD und bis zu 20% sterben an GVHD.<sup>20,21</sup> Ein erhebliches klinisches Problem ist die Unterdrückung der T Zelle Funktion durch die heutzutage angewandten prophylaktischen oder therapeutischen

Strategien für GVHD, wie z.B. T Zell Depletion<sup>22,23</sup> und Immunsuppression, wodurch das Risiko für Tumor Rückfall und für Infektionen erhöht wird.<sup>24,25</sup> Die Begründung hierfür ist die zentrale Funktion von T Zellen sowohl für die Entstehung der GVHD als auch für die Eliminierung von Tumorzellen und Mikroorganismen. Daher ist ein wesentliches Ziel der Forschung im Bereich der allo-KMT Strategien zur Prophylaxe oder Therapie der GVHD zu finden, die keine negative Wirkung auf die T Zell Funktion haben und damit den GVT Effekt und die Funktion des Immunsystems nach allo-KMT nicht negativ beeinflussen.<sup>26,27</sup>

### **1.3 Graft-versus-tumor Effekt**

Untersuchungen in Tiermodellen und bei Menschen haben zu der Hypothese geführt, dass immunkompetente Spenderzellen zur Eliminierung von Tumorzellen nach allo-KMT beitragen.<sup>28-32</sup> Klinische Studien haben eine inverse Assoziation zwischen GVHD und Tumor Rückfällen nach allo-KMT gezeigt. Zudem wurde eine erhöhte Rate an Rückfällen bei (a) allo-KMT von identischen Zwillingen, (b) autologer KMT und (c) T Zell Depletion des Stammzelltransplantates gefunden.<sup>29,32,33</sup> Der überzeugendste Beweis für die Wichtigkeit des GVT Effekts nach allo-KMT ist die Induktion von Langzeitremissionen bei allo-KMT Empfängern, die einen Tumorrückfall haben, durch Gabe von Spenderlymphozyten (donor lymphocyte infusions, DLI).<sup>30,32</sup> Neben der überragenden Bedeutung von Spender T Lymphozyten, die tumorspezifische Antigene oder allo-Antigene auf malignen Zellen erkennen,

haben auch natürliche Killerzellen (NK Zellen), die unspezifisch körperfremde Zellen erkennen können, erhebliche Bedeutung für den GVT Effekt.<sup>34-36</sup>

#### **1.4 Graft-versus-host Krankheit**

Spender T Lymphozyten, die mit Histokompatibilitäts-Antigenen auf Empfängerzellen reagieren, sind nicht nur für den positiven GVT Effekt verantwortlich, sondern auch für die akute GVHD, welche erhebliche klinische Probleme verursacht.<sup>37-40</sup> Die Pathophysiologie der akuten GVHD ist eine komplexe Kaskade von humoralen und zellulären Interaktionen zwischen Spender- und Empfängerzellen. Ferrara hat ein Modell für die Entstehung der GVHD vorgeschlagen, das aus drei aufeinander folgenden Phasen besteht.<sup>41</sup> In der ersten Phase erzeugt die Konditionierung mit Chemotherapie oder Ganzkörperbestrahlung ein Gewebeschaden von Empfängergewebe, insbesondere im Darmtrakt. Das führt zur Translokation von Mikroorganismen und deren Bestandteilen, wie z.B. Endotoxin und Lipopolysacchariden (LPS), vom intestinalen Lumen in die Darmwand und damit ins Blut- und Lymphsystem. LPS stimuliert die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie z.B. Interleukinen und Tumor-necrosis-factor (TNF). Diese Zytokine verstärken die Immunreaktion von Spender T Zellen durch eine Förderung der Expression von MHC-, kostimulatorischen- und Adhäsionsmolekülen. Die zweite Phase ist geprägt durch die Präsentation von Antigenen durch Antigen präsentierende Zellen (APCs) und die Aktivierung und Proliferation von Typ1 T Helferzellen (TH1). Die aktivierten TH1 Zellen sezernieren eine Reihe von Zytokinen, wie z.B. Interleukin 2 (IL-2) und Interferon Gamma (IFN $\gamma$ ), was zu einer weiteren

Expansion von T Zellen und anderen Immunzellen, wie z.B. Makrophagen und Monozyten, führt. In der dritten Phase, der Effektorphase, infiltrieren allo-reaktive T Zellen die typischen Zielorgane der GVHD (Darm, Leber und Haut) und führen zu Entzündung und Gewebeschaden.

## **1.5 Mausmodelle für allogene Knochenmarkstransplantation**

Studien mit Mausmodellen sind klinisch relevant für die Entwicklung der allo-KMT. E. Donnall Thomas, der den Nobelpreis in Physiologie oder Medizin in 1990 "für seine Pionierarbeit in Knochenmarkstransplantation" erhalten hat, folgerte in der Nobelpreis Rede (Dezember, 1990) dass "*...die Übertragung von Knochenmark keine klinische Anwendung gefunden hätte ohne Tierforschung, an erster Stelle Nagetiere....*". Als wichtige und klinisch relevante Ergebnisse aus Tiermodellen listete er auf: (a) Knochenmarkzell Infusion als Rettung nach letaler Bestrahlung,<sup>42</sup> (b) Mäuse, die durch die Infusion von Knochenmark vor den Folgen letaler Bestrahlung gerettet wurden sind immunologisch tolerant gegenüber Hauttransplantaten, (c) graft-versus-tumor Effekt, (d) Methotrexat als GVHD Prophylaxe. Zusätzlich wurden Maus HSCT Modelle dazu benutzt zu zeigen, dass (a) GVHD hauptsächlich durch T Zellen verursacht wird,<sup>43</sup> (b) TNF zur Entwicklung der GVHD beiträgt,<sup>44</sup> (c) die Konditionierungstherapie eine massive Produktion von Zytokinen verursacht,<sup>17</sup> (d) regulatorische T Zellen GVHD inhibieren können.<sup>45,46</sup>

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene murine GVHD und GVT Modelle mit unterschiedlichen Antigen Differenzen verwendet (Tabelle 1) um auszuschließen, dass die Beobachtungen abhängig vom Mausstamm oder



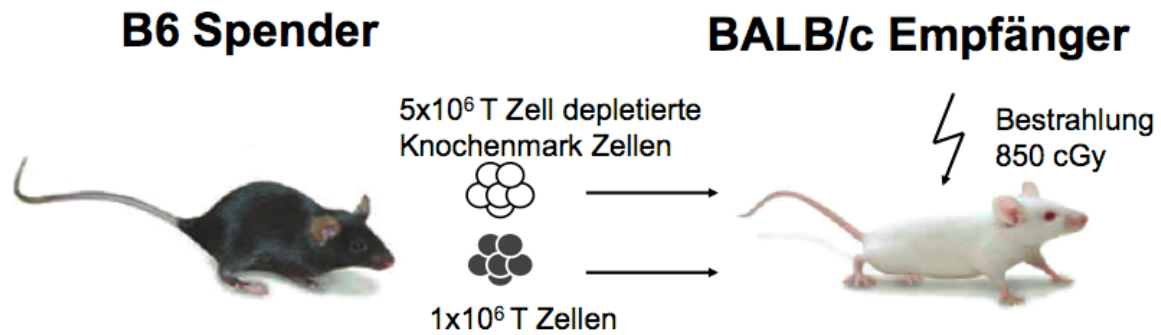
Modell waren. Kritische Transplantationsparameter, wie z.B. die T Zelldosis, Knochenmarkszelldosis und Bestrahlungsdosis, wurden etabliert.<sup>47-51</sup> Die Tumormodelle repräsentieren zwei der häufigsten Indikationen für allo-KMT (akute myeloische Leukämie, Lymphom) und den einzigen soliden Tumor (Nierenzellkarzinom), für den zurzeit die allo-KMT an einigen Zentren getestet wird.

**Tabelle 1.** *Murine Knochenmarktransplantationsmodelle.*

<i>Modell</i>	<i>Antigen Disparität</i>	<i>Muriner Tumor</i>
B6 → BALB/c	MHC Klasse I/II	A20 (Lymphom), RENCA (Nierenzellkarzinom)
B10BR → B6	MHC Klasse I/II	C1498 (AML)

Das Spenderknochenmark wird aus dem Femur und der Tibia von 8 bis 12 Wochen alten Mäusen gewonnen. T Zellen werden aus dem Knochenmark durch Inkubation mit anti-Thy-1.2 Antikörpern und nachfolgender Inkubation mit Kaninchen Komplement entfernt. Die Transplantation wird durch Injektion in die Schwanzvene nach letaler Bestrahlung des Empfängers durchgeführt (BALB/c: 850-900 cGy, B6 1100 cGy, und B6D2F1 1300 cGy TBI [total body irradiation]). GVHD wird durch die Zugabe von splenischen T Zellen induziert, die durch Nylon Wolle Passage gewonnen werden.

**Abbildung 1.** *Schematische Darstellung des B6 → BALB/c allo-KMT Modells.*



Die Schwere der GVHD wird durch Überleben und ein klinisches scoring System (Gewichtsverlust, Haltung, Aktivität, Fell und Haut), sowie durch verblindete histo-pathologische Untersuchung von GVHD Zielorganen (Darm, Leber und Haut) erfasst. Die Tumoren (A20, RENCA, C1498) wurden retroviral transduziert, um firefly luciferase zu exprimieren. Das Tumorstadium wurde durch die biolumineszente Signalintensität und durch histo-pathologische Untersuchung quantifiziert.

### 1.6 Neovaskularisierung und Endotheliale Progenitorzellen während Tumorstadium

Die Neovaskularisierung ist in letzter Zeit zu einem interessanten Zielobjekt für Krebstherapien geworden.<sup>52,53</sup> Seit Judah Folkman 1971 die erste Hypothese zur Wichtigkeit der Neovaskularisierung für das Wachstum von malignen Tumoren postulierte<sup>54</sup> sind verschiedene Angiogenese-Inhibitoren entwickelt worden. Mehrere dieser Medikamente sind schon in Europa und den USA für die Behandlung von bösartigen Erkrankungen in Gebrauch. Eine dieser Substanzen, Bevacizumab (ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen vaskulären

endothelialen Wachstumsfaktor [vascular endothelial growth factor, VEGF]), ist sogar in Kombination mit Chemotherapie als Erstlinienbehandlung von metastasierten kolorektalen Karzinomen und von fortgeschritten kleinzelligen Bronchialkarzinomen zugelassen worden.<sup>52</sup>

Zur Neovaskularisierung beim Erwachsenen Menschen tragen sowohl die Angiogenese, das Sprießen von gewebeständigen Endothelzellen (ECs), als auch die Vaskulogenese, die Rekrutierung von im Knochenmark entstandenen zirkulierenden Endothelialen Progenitorzellen (EPCs) bei.<sup>52,53,55,56</sup> EPCs sind eine Untergruppe von Knochenmarksständigen Zellen, die sowohl Oberflächenmarker von Progenitorzellen als auch von ECs exprimieren (z.B. c-Kit, CD34, CD133, VEGFR2, VE-cadherin und CD31). Die meisten durchgeführten Studien sprechen dafür, dass EPCs von hämatopoetischen Stammzellen abstammen.<sup>57-60</sup> EPCs können unter verschiedenen Umständen, z.B. bei Entzündungen, Tumoren, Ischämie und Gefäßverletzungen, vom Knochenmark ins Blut mobilisiert werden und dadurch zu Gefäßen überall im Körper rekrutiert werden. Die Mobilisierung von EPCs vom Knochenmark in die Zirkulation kann durch VEGF und GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) induziert werden. Die Existenz von EPCs und Ihre Rolle in maligner Neovaskularisierung ist Gegenstand einer lebhaften wissenschaftlichen Diskussion während der letzten zehn Jahre gewesen.<sup>52,53,57-59,61-68</sup> Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden unterschiedlich große Anteile von gewebeständigen ECs und aus dem Knochenmark stammenden ECs in Blutgefäßen von malignen Tumoren gefunden.<sup>66,68-71</sup> Überzeugende Beweise für die erhebliche Bedeutung von EPCs für Tumorgefäße konnten durch genetische und pharmakologische Depletion von EPCs in Tumor Mausmodellen gewonnen

werden. Leyden and Rafii haben Id-mutierte Mäuse dazu benutzt zu zeigen, dass die Rekrutierung von EPCs nötig und ausreichend für die Neovaskularisierung von Tumorgefäßen ist.<sup>72</sup> Kürzlich haben Mittal and Kollegen eine erhebliche Anti-Tumor Wirkung eines anti-VE-cadherin Antikörpers (E4G10) demonstriert, der spezifisch EPCs depletiert und damit Tumor Neovaskularisierung hemmt.<sup>64,65</sup>

## **1.7 Neovaskularisierung und Endotheliale Progenitorzellen während Entzündungen**

Die Wichtigkeit der Neovaskularisierung für die Pathogenese unterschiedlicher entzündlicher Erkrankungen, wie z.B. rheumatoide Arthritis, Asthma bronchiale, Psoriasis, Kolitis Ulzerosa und Morbus Crohn, ist in den letzten Jahren entdeckt worden.<sup>73-77</sup> Es konnten auch schon erste experimentelle und klinische therapeutische Erfolge bei inflammatorischen Erkrankungen mit Medikamenten erzielt werden, die Neovaskularisierung hemmen.<sup>78-80</sup> Die Regulation von Gefäßwachstum während entzündlichen Prozessen ist sehr komplex und entzündliche Erkrankungen sind durch die gegenseitige Stimulation von Entzündung und Neovaskularisierung charakterisiert.<sup>81</sup> Regulatorische Wachstumsfaktoren und Zytokine, die sowohl von ECs als auch von verschiedenen Immunzellen produziert werden, tragen sowohl zur Neovaskularisierung als auch zur Rekrutierung von proinflammatorischen Immunzellen zum Entzündungsherd bei.<sup>81-83</sup> EPCs wurden in entzündeten Geweben von verschiedenen Arbeitsgruppen gefunden.<sup>78,84</sup> Die biologische Bedeutung von EPCs für Entzündungsvorgänge ist jedoch unklar, da es bisher

keine Untersuchungen zur spezifischen Blockade oder Depletion von EPCs in Tiermodellen für entzündliche Erkrankungen gibt.

## 1.8 Anti-Tumor Effekte durch Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK Zellen) befinden sich hauptsächlich im Knochenmark, der Milz und dem Blut, wo sie etwa 5-15% der Lymphozyten betragen.<sup>85</sup> NK Zellen haben die Fähigkeit Tumorzellen und infizierte Zellen unspezifisch ohne vorherige Stimulation durch die Exozytose von zytotoxischen Substanzen abzutöten.<sup>86,87</sup> Die Aktivität von NK Zellen wird über verschiedene aktivierende und hemmende Oberflächenrezeptoren geregelt, von denen die inhibitorischen KIRs (killer cell immunoglobulin-like receptors) eine besonders wichtige Bedeutung haben. Die inhibitorischen KIRs erkennen MHC Moleküle der Klasse I, die sich auf der Oberfläche normaler Körperzellen befinden. Klas Kärre formulierte in den 1970er Jahren die *missing self* Hypothese, die von einer Runter-Regulation von MHC Molekülen auf Tumorzellen und infizierten Zellen und damit einer Aktivierung von NK Zellen ausgeht, und von Forschungsergebnissen in den darauf folgenden Jahrzehnten bestätigt wurde.<sup>88,89</sup>

Zum therapeutischen Effekt der allo-KMT gegen Tumoren tragen NK Zellen möglicherweise entscheidend bei. Hinweise für die Wichtigkeit der NK Zellen im Zusammenhang des GVT Effekts ergeben sich vor allem aus Untersuchungen zum genetischen Polymorphismus von KIR Genen in Patientenpopulationen nach HSCT. Die Forschergruppe aus Perugia um Velardi hat in verschiedenen Untersuchungen zeigen können, dass Empfänger einer haploidenten allo-KMT

(von nicht HLA identen Familienspendern) mit KIR Gen mismatch zwischen Spender und Empfänger eine geringere Rückfallwahrscheinlichkeit von Tumoren haben als allo-KMT Empfänger ohne KIR mismatch.<sup>90,91</sup> Bei der HLA identischen allo-KMT wird der Effekt eines KIR mismatches kontrovers diskutiert. US amerikanische und europäische Gruppen konnten an relativ großen Patientenpopulationen keine Unterschiede im therapeutischen Ergebnis einer allo-KMT vom unverwandten Spender zwischen KIR mismatch und KIR match Situationen finden.<sup>92,93</sup> Demgegenüber wurde ein Überlebensvorteil von Empfängern einer HLA identischen allo-KMT mit KIR mismatch in unterschiedlichen Patientenpopulationen gezeigt.<sup>94-96</sup> Eine Erklärung für die voneinander differierenden Ergebnisse könnten eine ganze Reihe von potentiellen Einflussfaktoren wie z.B. der Einfluss des Konditionierungsregimes (Bestrahlung, Chemotherapie) und der T Zell Depletion (ATG, Campath, OKT-3) auf die NK Zellzahl und NK Zellfunktion sein.<sup>97,98</sup>

Der Anti-Tumor Effekt von NK Zellen nach Transplantation wird in klinischen Studien zur adoptiven NK Zell Therapie an unterschiedlichen Zentren weltweit genutzt.<sup>99-102</sup> Zudem hat eine Arbeitsgruppe aus Minnesota (USA) bei nicht transplantierten Patienten mit akuter myeloischer Leukämie und hochdosierter Chemotherapie beobachtet, dass adoptive NK Zelltherapie von haploidenten Familienspendern einen erheblichen Anti-Leukämie Effekt hatte.<sup>103</sup>

## **1.9 Natürliche Killerzellen und die graft-versus-host Krankheit**

Hinsichtlich direkter Effekte in GVHD Zielgeweben spielen NK Zellen keine oder nur eine untergeordnete Rolle bei der Initiierung der GVHD weil die NK Zell-

Funktion nicht auf MHC Moleküle beschränkt ist.<sup>26</sup> Jedoch gibt es verschiedene Möglichkeiten der Interaktionen zwischen Spender NK Zellen und Empfänger APCs, sowie zwischen Spender NK Zellen und Spender T Zellen, die erheblich auf die Pathophysiologie der GVHD einwirken können. In der Frühphase nach allo-KMT können Spender NK Zellen die Allo-Aktivierung von Spender T-Zellen gegen Empfänger Gewebe über den Mechanismus einer Abtötung von Empfänger APCs hemmen. Die Arbeitsgruppe von Shlomchik demonstrierte, dass die Anwesenheit von Empfänger APCs für die Initiierung der GVHD nötig ist.<sup>104</sup>

Daher kann eine adoptive Gabe von KIR inkompatiblen allogenen NK Zellen, nicht aber von KIR kompatiblen allogenen NK Zellen, die Entstehung einer GVHD im Mausmodell verhindern.<sup>105</sup> Demgegenüber können in der Spätphase der GVHD, in der allo-reaktive Spender T Zellen schon expandiert und aktiviert sind, NK Zellen möglicherweise die schwere der GVHD verstärken. Es wurde postuliert, dass dies über den Mechanismus einer erhöhten Zytokinproduktion (wie z.B. Interleukin 1 und TNF $\alpha$  [Tumor necrosis factor alpha, Lymphotoxin alpha]) von Spender NK Zellen, die zu mehr T Zell Aktivierung und Proliferation führt, vermittelt ist.<sup>26,106</sup>

Bei Patienten nach allo-KMT konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die Rekonstitution von NK Zellen in der frühen Post-Transplantationsphase positiv mit dem klinischen Erfolg korreliert ist.<sup>107</sup> Patienten mit hoher T Zell : NK Zell Ratio hatten eine erhöhte Inzidenz von GVHD und umgekehrt war eine niedrige T Zell : NK Zell Ratio mit weniger GVHD und verbessertem Überleben assoziiert.<sup>107</sup> Von verschiedenen Gruppen wurden klinisch relevante potentielle Einflussfaktoren auf die anti-GVHD Aktivität von NK Zellen, wie z.B. die Art der

Immunsuppression (Cyclosporin A reguliert KIRs)<sup>108</sup> und der T Zell Depletion, beschrieben.<sup>97,98</sup>



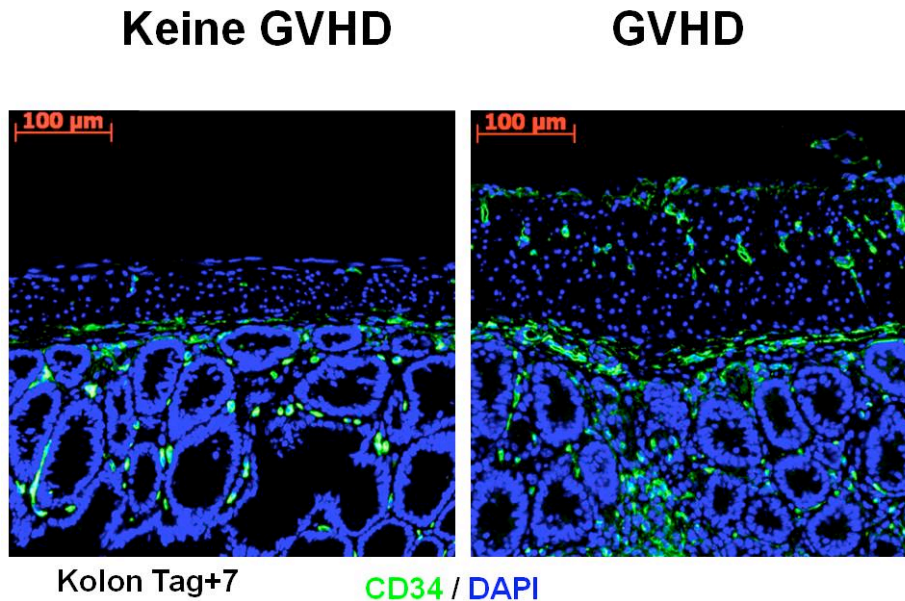
## **2 Eigene Arbeiten**

### **2.1 Endotheliale Progenitorzellen bei der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation**

Wie einleitend ausgeführt, besteht eine Verbindung zwischen der Neovaskularisierung, dem Wachstum von Blutgefäßen, zu verschiedenen entzündlichen Erkrankungen sowie zu Tumorerkrankungen. Sowohl die Proliferation von gewebeständigen Endothelzellen (ECs, Angiogenese), als auch die Rekrutierung von zirkulierenden Endothelialen Progenitorzellen (EPCs, Vaskulogenese) können zur Neovaskularisierung beitragen. Die Vaskulogenese spielt während der Embryogenese eine entscheidende Rolle, jedoch ist die biologische Bedeutung von EPCs für Entzündungsvorgänge beim erwachsenen Menschen unklar.

Wir haben die Bedeutung von Angiogenese und Vaskulogenese für Entzündungen in verschiedenen gut charakterisierten Mausmodellen für die graft-versus-host Krankheit (GVHD) untersucht. Als erstes haben wir die Neovaskularisierung in GVHD Zielorganen mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie quantifiziert (Abbildung 2) und eine erhöhte Gefäßdichte in der Leber, Ileum und Kolon während der GVHD zu verschiedenen Zeitpunkten nach allogener Knochenmarktransplantation (allo-KMT) gefunden.

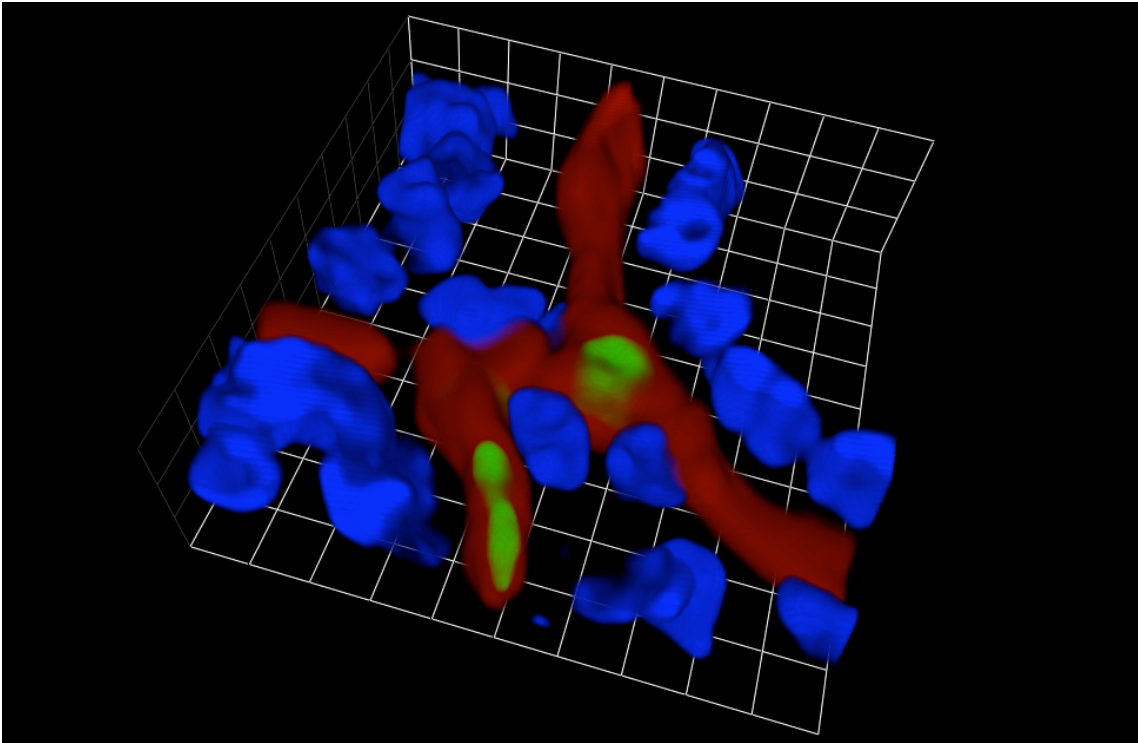
**Abbildung 2.** Erhöhte Gefäßdichte im Kolon während der GVHD.  
Immufluoreszenzmikroskopie nach Färbung mit anti-CD34 und DAPI.



Wir konnten Spenderendothelzellen und Empfängerendothelzellen aufgrund unterschiedlicher MHC Antigene in der Durchflusszytometrie unterscheiden und fanden eine signifikant erhöhte Anzahl von Spenderendothelzellen und eine gleich bleibende Anzahl von Empfängerendothelzellen während der GVHD. Diese Ergebnisse zeigen, dass Neovaskularisierung während der GVHD von aus dem Spenderknochenmark entstammten Endothelzellen ausgeht und nicht von gewebständigen Empfängerendothelzellen.

Um eine vaskuläre Inkorporation von EPCs nachweisen zu können haben wir GFP+ (green fluorescence protein) EPCs zum Zeitpunkt der Transplantation transferiert und haben die Inkorporation dieser Zellen in neu entstandene Blutgefäße in GVHD Zielorganen (Leber und Darm) in der Fluoreszenzmikroskopie nachweisen können (Abbildung 3).

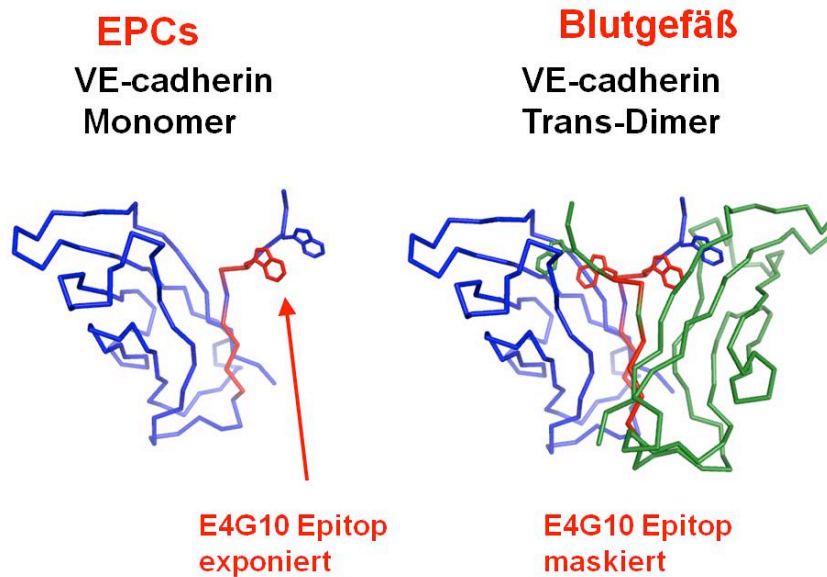
**Abbildung 3.** *Hochauflösendes Bild der Inkorporation von GFP+ EPC's (grün) in die Wand von Blutgefäßen (rot, MECA-32) während der GVHD.*



Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse eine wichtige Bedeutung der Vaskulogenese für die Entzündung während der GVHD.

In einem nächsten Schritt haben wir einen monoklonalen Antikörper (E4G10) gegen das vaskuläre endotheliale Adhäsionsmolekül VE-cadherin eingesetzt, um EPCs zu depletieren. E4G10 erkennt ein terminales VE-cadherin Epitop, das auf zirkulierenden EPCs exponiert ist, aber in etablierten Blutgefäßen maskiert ist (Abbildung 4).

**Abbildung 4.** Das E4G10 Epitop ist an der Oberfläche von EPCs exponiert, jedoch im Endothelzellverband in Blutgefäßen maskiert.

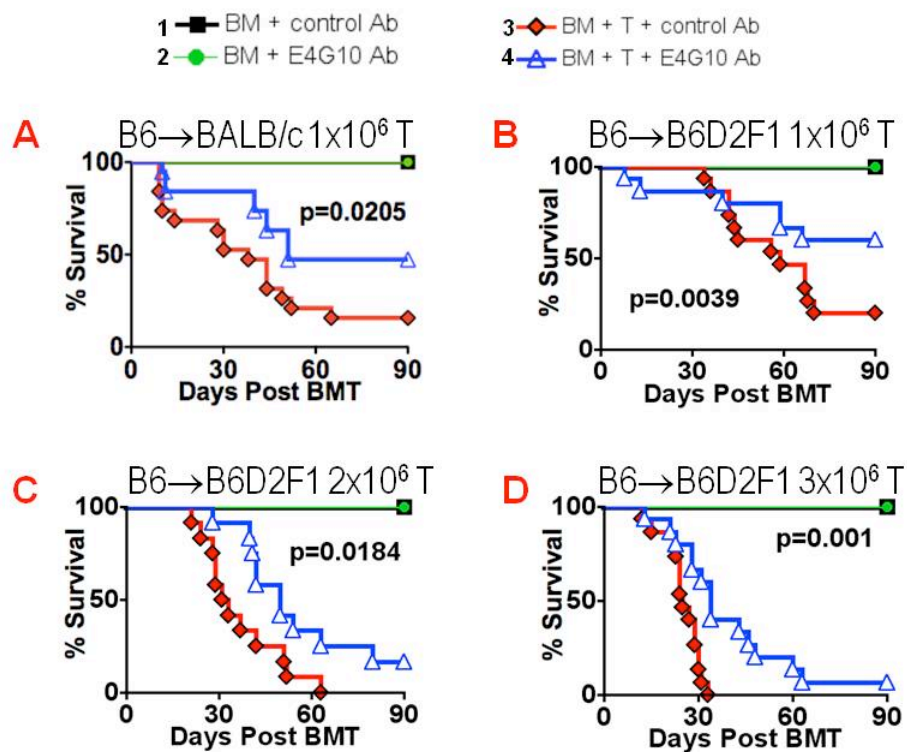


Als Zeichen einer effektiven EPC Depletion durch E4G10 haben wir eine signifikant reduzierte Anzahl von EPCs im Knochenmark und im peripheren Blut bei E4G10 behandelten allo-KMT Empfängern gefunden. Als Folge der EPC Depletion haben wir eine Hemmung der Neovaskularisierung während der GVHD in der Leber, im Ileum und im Kolon beobachtet. E4G10 behandelte allo-KMT Empfänger hatten ein signifikant höheres Überleben und bessere klinische GVHD Parameter in allen getesteten GVHD Modellen (Abbildung 5, B6→BALB/c [ $1 \times 10^6$  T], B6→B6D2F1 [ $1 \times 10^6$  T], B6→B6D2F1 [ $2 \times 10^6$  T], B6→B6D2F1 [ $3 \times 10^6$  T]).

Zudem fanden wir signifikant reduzierte, GVHD-spezifische histopathologische Veränderungen sowie eine signifikant reduzierte Anzahl von Gewebe infiltrierenden alloreaktiven CD3+ T Zellen als Effekt der EPC Depletion in GVHD

Zielorganen. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine EPC Depletion mit E4G10 zur effektiven Hemmung von Entzündungen führt.

**Abbildung 5.** Überlebensvorteil in verschiedenen murinen allo-KMT Modellen durch die Behandlung mit dem VE-cadherin Antikörper E4G10 (blaue Dreiecke) im Vergleich mit der Kontrollgruppe (rote Diamanten).



Im Gegensatz dazu fanden wir, dass die Behandlung mit den Antikörpern MF1 und DC101, die gegen den VEGFR1 bzw. VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor) gerichtet sind, dosisabhängig zum frühen Tod oder zur Hemmung der hämatopoetischen Rekonstitution führte. In einer Genexpressionsanalyse von Lebergewebe konnten wir die Hochregulation verschiedener für die Neovaskularisierung wichtiger Gene während der GVHD

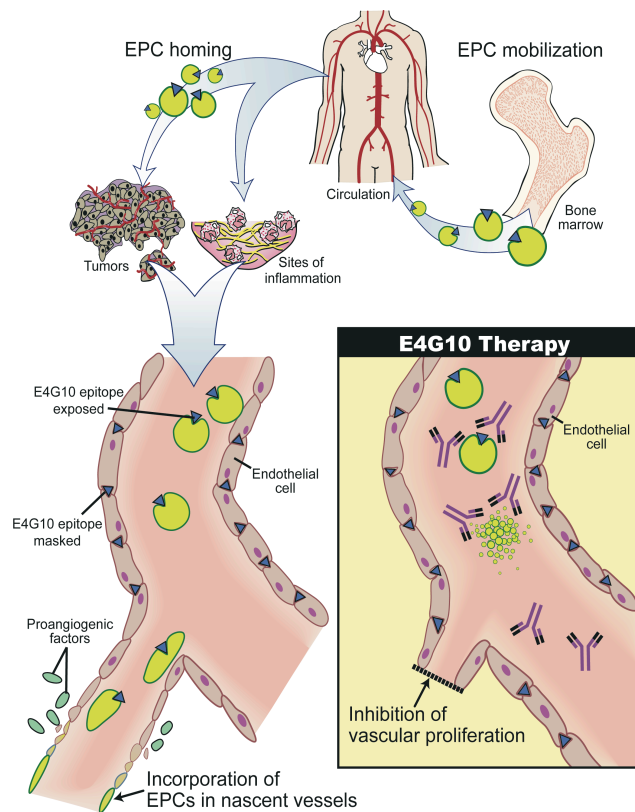
nachweisen. Interessanterweise war jedoch VEGF bei allo-KMT Empfängern mit GVHD nicht hoch reguliert.

Um die Bedeutung von EPCs für Tumoren nach allo-KMT zu untersuchen haben wir Empfängern einer T Zell depletierten allo-KMT GFP+ EPCs und Nierenkarzinomzellen (RENCA) an Tag 0 der KMT intravenös verabreicht. Wir haben beobachtet, dass GFP+ EPCs zu neu gebildeten Gefäßen in Lungenmetastasen des Nierenzellkarzinoms rekrutiert wurden. Die Applikation von E4G10 hatte einen signifikanten hemmenden Effekt auf das Tumorstadium von soliden (RENCA) sowie hämatologischen Neoplasien (A20 Lymphom) und führte zu einem Überlebensvorteil (RENCA, C1498 AML).

Um die klinische Situation der allo-KMT für maligne Tumoren besser nachahmen zu können haben wir Experimente durchgeführt, bei denen allo-KMT Empfänger sowohl Tumorzellen als auch allogene T Zellen intravenös verabreicht bekommen haben. Alloreaktive Zellen sind sowohl für den Graft-versus-tumor (GVT) Effekt als auch für die GVHD verantwortlich. Die E4G10 Applikation führte zu einem signifikanten Überlebensvorteil in allen getesteten Modellen (B6→BALB/c [ $1 \times 10^5$  B6 T and  $2 \times 10^5$  RENCA], B10BR→B6 [ $1 \times 10^5$  B10BR T and  $2 \times 10^5$  C1498], B6→BALB/c [ $2 \times 10^5$  B6 T and  $5 \times 10^5$  A20]). Der Gesamtüberlebensvorteil resultierte sowohl aus einer Reduktion der Tumor bedingten Mortalität als auch aus einer Verringerung der GVHD bedingten Mortalität.

Zusammengefasst demonstrieren unsere Ergebnisse eine wichtige Bedeutung der Vaskulogenese und der EPCs für Entzündungsvorgänge. Wir haben die Depletion von EPCs zur Hemmung von Neovaskularisierung als neuen therapeutischen Ansatz bei der allo-KMT entdeckt.

**Abbildung 6.** Schematische Darstellung der EPC Biologie und des Effektes einer spezifischen Depletion von EPCs mit dem Anti-VE-cadherin Antikörper E4G10, der VE-cadherin Monomere auf EPCs erkennt jedoch nicht an VE-cadherin Trans-Dimere in Blutgefäßen bindet.



### Inhibition of Neovascularization Simultaneously Ameliorates GVHD and Decreases Tumor Growth

Penack. O, Henke E, Suh D, King CG, Smith OD, Na IK, Holland AM, Ghosh A, Lu SX, Jenq R, Liu C, Murphy GF, Lu T, May C, Scheinberg DA, Gao DC, Mittal V, Heller G, Benezra R, van den Brink MR.

Eingereicht bei 'Journal of the National Cancer Institute' (JNCI).

## **2.2 Natürliche Killerzellen bei der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation**

### **2.2.1 Etablierung einer Methode zur Messung der Aktivität Natürlicher Killerzellen gegen Tumorzellen**

NK Zellen vermitteln wichtige Immunfunktionen gegen Tumorzellen sowie gegen Infektionserreger in der frühen Phase nach allo-KMT. Daher ist eine präzise Erfassung der Einflussfaktoren auf die Reaktivität von NK Zellen wichtig. Wir haben eine Methode etabliert, mit der verlässlich und genau die NK-Reaktivität gegen Tumorzellen auf einer Einzelzellebene erfasst werden kann.

Die Aktivierung von NK Zellen führt zur Degranulation und Sekretion von zytotoxischen Granula. Während dieses Prozesses verschmelzen die Granulamembran und die Zellmembran, so dass Proteine der Granulamembran auf der Zelloberfläche erscheinen. Eines dieser Proteine, was nur nach Degranulation an der Oberfläche von NK Zellen expremiert wird, ist das lysosomal-associated membrane protein-1 (CD107a). Wir haben uns dieses Phänomen zu Nutzen gemacht und eine auf die Durchflusszytometrie basierte Methode entwickelt, mit der die Degranulation von NK Zellen nach Inkubation mit Tumorzellen und damit die Reaktivität gegen Tumorzellen erfasst werden kann. Der neue CD107a Test korreliert sehr gut mit der Lyse von Tumorzellen und hat den Vorteil, zytotoxische NK Zell Subpopulationen schnell und einfach mit der Durchflusszytometrie erkennen zu können.



**CD56dimCD16neg cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets**

Penack O, Gentilini C, Fischer L, Asemissen AM, Scheibenbogen C, Thiel E, Uharek L.

Leukemia. 2005 May;19(5):835-40.

## **2.2.2 Identifikation von NK Zell Subpopulationen, die ADCC (antibody-dependend-cellular-cytotoxicity) gegen Tumorzellen vermitteln**

Die Gabe von monoklonalen Antikörpern ist eine etablierte Immuntherapie, die zur Behandlung von bösartigen hämatologischen Erkrankungen eingesetzt wird. Es ist jedoch weiterhin unklar welcher Wirkmechanismus für die Effektivität von monoklonalen Antikörpern, wie z.B. Rituximab (Anti-CD20) und Alemtuzumab (Anti-CD52), verantwortlich ist. Verschiedene mögliche Wirkmechanismen wurden beschrieben: 1) Antikörper vermittelte zelluläre Zytotoxizität (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC), 2) Apoptose von Tumorzellen, die durch monoklonale Antikörper ausgelöst wird, und 3) Komplement vermittelte Lyse von Tumorzellen. In dieser Studie haben wir den CD107a Test dazu benutzt, NK Zell Subpopulationen zu charakterisieren, die den Anti-Lymphom Effekt von Rituximab und Alemtuzumab vermitteln. Wir haben eine spezifische und dosisabhängige Aktivierung von NK Zellen als Reaktion auf Rituximab und Alemtuzumab beobachtet. In vitro fanden wir eine enge Korrelation zwischen der Konzentration von Rituximab sowie Alemtuzumab und der Anzahl der degranulierenden NK Zellen. Wir konnten eine Subpopulation von NK Zellen identifizieren, die hauptsächlich für die ADCC verantwortlich ist: CD56(dim), CD69(+), NKG2D(+), NKp30(-), NKp46(-), and CD94(-). Bei Patienten mit malignen non-Hodgkin Lymphomen haben wir nach Gabe von Rituximab eine erhöhte NK-Reaktivität gegen Lymphomzellen nachweisen können. Zusammengefasst konnten wir NK Zellen, die für ADCC gegen Lymphomzellen verantwortlich sind, mit dem CD107a Test quantifizieren und charakterisieren. In Zukunft könnte der CD107a Test dazu genutzt werden Therapieansprechen bei

individuellen Patienten vorauszusagen und könnte dabei helfen, die optimalen Dosierung und Zeitpunkte der Applikation von monoklonalen Antikörpern zu ermitteln.

**The anti-lymphoma effect of antibody-mediated immunotherapy is based on an increased degranulation of peripheral blood natural killer (NK) cells**

\*Fischer L, \*Penack O, Gentilini C, Nogai A, Muessig A, Thiel E, Uharek L.

\* Both authors contributed equally to this work

Exp Hematol. 2006 Jun;34(6):753-9.

### **2.2.3 Einfluss des Konditionierungsprotokolls auf die NK Aktivität bei Patienten nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation**

In den letzten Jahren werden zunehmend allo-KMTs mit reduzierter Konditionierung durchgeführt. Bei allo-KMTs mit reduzierter Konditionierung ist der therapeutische Effekt weniger auf der zytotoxischen Wirkung der Chemotherapie oder Bestrahlung basiert als vielmehr auf der GVT Aktivität von Spenderlymphozyten. Da die NK Zellen die vorherrschende Lymphozytenpopulation im peripheren Blut in der frühen Phase (bis ca. Tag 30) nach allo-KMT sind, haben NK Zellen möglicherweise eine ganz besonders wichtige Funktion bei der allo-KMT mit reduzierter Konditionierung. Wir haben den CD107a assay dazu benutzt die Reaktivität von NK Zellen gegen standardisierte Tumor Zielzellen bei Patienten nach allo-KMT mit konventioneller Konditionierung im Vergleich zur reduzierten Konditionierung zu bestimmen. Wir fanden eine signifikant höhere Anzahl von degranulierenden NK Zellen im peripheren Blut bei Patienten nach reduzierter Konditionierung zu verschiedenen Zeitpunkten nach allo-KMT. Diese Ergebnisse zeigen einen hohe Anti-Tumor Aktivität von NK Zellen nach dosisreduzierter Konditionierung. Bei der Analyse der verschiedenen NK Zell Subpopulationen konnten wir herausfinden, dass die vorherrschende Subpopulation nach allo-KMT CD56bright NK Zellen waren, die bei Normalpersonen weniger als 5% der NK Zellen ausmachen. Weiterhin beobachteten wir, dass die CD56bright NK Zellen nach allo-KMT funktionell verschieden von CD56bright NK Zellen bei Normalpersonen sind: Ein hoher Prozentsatz der CD56bright NK Zellen nach allo-KMT war Tumor reaktiv im Gegensatz zu nicht Tumor reaktiven CD56bright NK Zellen bei normalen

Personen. Zusammengefasst fanden wir eine erhöhte NK Zell Aktivität gegen Tumorzellen nach allo-KMT mit reduzierter Konditionierung, was eine Erklärung der guten klinischen Anti-Tumor Effektivität der allo-KMT mit reduzierter Konditionierung ist.

**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**

\*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.

\* both authors contributed equally to this work

Int J Hematol. 2007 May;85(4):326-32.

#### **2.2.4 Einfluss von Alemtuzumab auf die NK Aktivität bei Patienten nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation**

Depletion von T Zellen ist eine effektive Prophylaxe der GVHD. In der klinischen allo-KMT wird häufig eine *in vivo* T Zell Depletion mit Anti-Thymozyten Globulinen (ATGs) oder mit dem monoklonalen Antikörper Alemtuzumab (Campath, Anti-CD52) durchgeführt. Trotz der weit verbreiteten klinischen Anwendung der *in vivo* T Zell Depletion ist die Wirkung von Alemtuzumab und ATG auf NK Zellen, die wichtige immunologische Funktionen in der Phase nach allo-KMT übernehmen, unbekannt. In der vorliegenden Studie haben wir die Induktion von NK Zell Apoptose *in vitro* durch Thymoglobulin (ATG) und Alemtuzumab mit der Propidium-Jodid und Annexin V Methode bestimmt und den Effekt von ATG und Alemtuzumab bei Patienten nach allo-KMT mit dem CD107a assay analysiert. Alemtuzumab und Thymoglobulin hatten *in vitro* eine gleichsam starke toxische Wirkung auf NK Zellen: Geringe Konzentrationen (<1 µg/ml) induzierten Apoptose und Nekrose in >30% der NK Zellen. *In vivo* gab es jedoch erhebliche Unterschiede zwischen Thymoglobulin und Alemtuzumab hinsichtlich der Wirkung auf NK Zellen: Die Anzahl der Tumor reaktiven (CD107a+) NK Zellen an Tag 30 nach allo-KMT betrug im Mittel 13.16 pro µl bei Patienten nach Therapie mit 6 mg/kg Thymoglobulin und 1.15 pro µl bei Patienten nach Therapie mit 100 mg Alemtuzumab (p=0.02). Zusammengefasst sind Thymoglobulin und Alemtuzumab gleich NK Zell toxisch *in vitro*, jedoch besteht *in vivo* eine erhöhte NK Zell Toxizität für Alemtuzumab.

**Serotherapy with thymoglobulin and alemtuzumab differentially influences frequency and function of natural killer cells after allogeneic stem cell transplantation**

Penack O, Fischer L, Stroux A, Gentilini C, Nogai A, Muessig A, Rieger K, Ganepola S, Herr W, Meyer RG, Thiel E, Uharek L.

Bone Marrow Transplant.

### **2.2.5 Einfluss von verschiedenen Anti-Thymozyten Globulinen (ATGs) auf die Aktivität Natürlicher Killerzellen bei Patienten nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation**

Die *in vivo* T Zell Depletion ist eine in der allo-KMT und in der Organtransplantation eingesetzte Methode, die der Immunsuppression dient. Dabei wird am häufigsten ATG eingesetzt, was von verschiedenen Firmen auf unterschiedliche Weise produziert wird. Der Effekt von im Handel befindlichen ATGs auf NK Zellen, die wichtige immunologische Funktionen in der Phase nach Transplantation übernehmen, ist unbekannt. Wir haben den Effekt von ATG auf NK Zellen und T Zellen *in vitro* untersucht. Wir haben mononukleare Zellen des peripheren Blutes mit verschiedenen ATGs (Thymoglobulin, Lymphoglobulin und ATG-Fresenius) in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Im Anschluss haben wir nekrotische und apoptotische Zellen durch deren Aufnahme von Propidium Jodid und Annexin V mit Hilfe der Durchflusszytometrie quantifiziert. Wie erwartet ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen ATGs hinsichtlich Ihrer Toxizität auf T Zellen. Überraschenderweise haben wir jedoch erhebliche Unterschiede in der NK Zell Toxizität der einzelnen ATGs entdeckt: In klinisch relevanten Konzentrationen hatte Lymphoglobulin signifikant weniger Potenz, Apoptose und Nekrose bei NK Zellen zu induzieren als Thymoglobulin und ATG-Fresenius. Die mittleren Prozentwerte für apoptotische oder nekrotische Zellen nach Inkubation mit 1 µg/ml ATG betragen für Lymphoglobulin 2%, ATG-Fresenius 35% und für Thymoglobulin 38% ( $p < 0.001$ ). Dies ist der erste Bericht, der unterschiedliche Effekte der verschiedenen ATGs auf NK Zellen beschreibt. Wenn die Erhaltung



der NK Zell vermittelten Immunfunktionen erwünscht ist, erscheint der Einsatz von Lymphoglobulin sinnvoller als der von Thymoglobulin oder von ATG Fresenius.

**The type of ATG matters -- natural killer cells are influenced differentially by Thymoglobulin, Lymphoglobulin and ATG-Fresenius**

Penack O, Fischer L, Gentilini C, Nogai A, Muessig A, Rieger K, Ganepola S, Thiel E, Uharek L.

Transpl Immunol. 2007

### **3 Diskussion**

#### **3.1 Endotheliale Progenitorzellen bei der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation**

Die Hypothese, dass eine therapeutische Hemmung der Neovaskularisierung bei verschiedenen malignen und entzündlichen Erkrankungen effektiv sein könnte, wurde schon vor Jahrzehnten formuliert.<sup>109-112</sup> Jedoch hat es erhebliche Zeit und Mühen in Anspruch genommen, bis Ende der 80er Jahre VEGF (vascular endothelial growth factor) geklont werden konnte.<sup>113,114</sup> Damit wurde ein therapeutisches Ziel definiert, was zur klinischen Entwicklung von Angiogenesehemmern geführt hat. Heutzutage hat Bevacizumab (Avastin), ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF, weit verbreiteten Einsatz in der Tumortherapie gefunden. FDA Zulassungen bestehen für sehr häufige maligne Erkrankungen wie z.B. kolorektale Karzinome, Bronchialkarzinome und Mammakarzinome.<sup>115-117</sup> Bei entzündlichen Erkrankungen, z.B. bei Asthma bronchiale, entzündlichen Darmerkrankungen und Psoriasis, ist die Hemmung der Neovaskularisierung ebenfalls als therapeutisches Ziel entdeckt worden,<sup>79,80,118</sup> jedoch ist die Behandlung mit Angiogenesehemmern noch keine Standardtherapie bei Patienten mit Entzündungskrankheiten.<sup>119-121</sup>

Die Rolle der Neovaskularisierung bei der Pathophysiologie der GVHD war bisher nicht bekannt. Zusätzlich war unklar ob die Neovaskularisierung während Entzündungen ausschließlich durch Angiogenese vermittelt wird, oder ob auch die Rekrutierung von zirkulierenden EPCs (Vaskulogenese) eine wichtige Rolle spielt.

Wir haben die Bedeutung von Angiogenese und Vaskulogenese für Entzündungen in verschiedenen Mausmodellen für die graft-versus-host Krankheit (GVHD) untersucht. Die wichtigsten Vorteile dieser Modelle sind: 1) Die Entzündung während der GVHD ist gut beschrieben und charakterisiert; 2) Die Entzündung ist nicht auf ein einzelnes Organ beschränkt und die Pathophysiologie hat viele Gemeinsamkeiten mit anderen Entzündungskrankheiten, wie z.B. mit entzündlichen Darmerkrankungen; 3) Aufgrund der Antigen Differenzen zwischen Spender und Empfänger (MHC oder minor histocompatibility Antigene), ermöglichten uns die Modelle zu identifizieren welche Endothelzellen aus Knochenmarkszellen hervorgegangen sind, ohne dass wir genetische Modifikationen (die Ihre *in vivo* Funktion verändern könnte) vornehmen mussten; und 4) da GVHD und Tumorrückfall die wichtigsten Komplikationen in der allo-KMT sind, konnten wir simultan die Rolle von EPCs bei Entzündungen und Tumoren in klinisch relevanten Modellen erforschen.

Um die Rolle der Vaskulogenese und EPCs getrennt von der Angiogenese untersuchen zu können haben wir einen Antikörper (E4G10) benutzt, dessen hohe Spezifität für EPCs in vorherigen Untersuchungen gezeigt wurde.<sup>64,65</sup> E4G10 erkennt das vaskuläre endotheliale Adhäsionsmolekül VE-cadherin, das ein Endothel-spezifisches Adhäsionsmolekül ist und zur Verbindung von Endothelzellen nötig ist. VE-cadherin ist daher in Blutgefäßen im gesamten Körper vorhanden.<sup>122,123</sup> E4G10 erkennt ein endständiges Epitop, das auf VE-cadherin Monomeren zugänglich und während der Trans-Dimerisierung verdeckt wird.<sup>124</sup> EPCs exprimierten die monomere Form von VE-cadherin, während Endothelzellen in Blutgefäßen die Trans-Dimere von VE-cadherin exprimieren. Somit erkennt E4G10 VE-cadherin auf der Oberfläche von EPCs, aber nicht auf

Endothelzellen, die sich in der Blutgefäßwand befinden. Dies führt dazu, dass E4G10 nicht an etablierte Blutgefäße bindet und daher nicht die typischen Nebenwirkungen anderer nicht EPC spezifischer anti-VE-cadherin Antikörper verursacht, wie z.B. eine erhöhte Gefäßdurchlässigkeit.<sup>65,125-127</sup>

Wir konnten nachweisen, dass die GVHD durch eine erhöhte Gefäßdichte in typischen Zielorganen wie der Leber und des Darms charakterisiert ist. In den vergangenen Jahren wurde die Bedeutung der Vaskulogenese und EPCs gegenüber der Angiogenese für die Neovaskularisierung sehr lebhaft diskutiert.<sup>52,53,57,59,63,69,71</sup> Dabei wurde an den vorherigen Studien kritisiert, dass als Quelle für EPCs nicht selektierte Knochenmarkszellen benutzt wurden, die in einer Kontamination von hämatopoetischen Zellen resultiert haben könnte. Daher haben wir Experimente durchgeführt, bei denen wir GFP exprimierende EPCs selektiert haben und diese adoptiv transferiert haben. Unsere Ergebnisse zeigen eine Inkorporation von EPCs in neu entstandene Blutgefäße in GVHD Zielorganen.

Unsere Resultate demonstrieren, dass eine Hemmung der Entzündung während der GVHD durch die Depletion von EPCs mit Hilfe von E4G10 durchführbar ist. Wir identifizieren die spezifische Inhibition der Vaskulogenese als neues therapeutisches Konzept zur therapeutischen Beeinflussung der GVHD. Auch bei anderen Entzündungskrankheiten, wie z.B. bei der Rheumatoiden Arthritis und beim Asthma bronchiale, sind EPCs in neu gebildeten Blutgefäßen nachgewiesen worden.<sup>78,128</sup> Folglich ist die EPC Depletion auch bei diesen Erkrankungen ein interessantes therapeutisches Konzept.

Mit Hilfe eines RNA Gene-arrays konnten wir während der GVHD eine Hochregulation verschiedener proangiogenetischer Gene nachweisen.

Interessanterweise war VEGF nicht unter diesen hoch regulierten Genen. Aus diesem Grund erscheint eine wichtige Rolle von VEGF während der GVHD unwahrscheinlich und eine Prophylaxe oder Therapie der GVHD durch Medikamente, die in die VEGF Biologie eingreifen, muss kritisch betrachtet werden. Im Gegensatz zur untergeordneten Rolle von VEGF bei der GVHD ist eine herausragende Rolle von VEGF bei der Neovaskularisierung während des Wachstums von malignen Tumoren und einzelnen Entzündungskrankheiten vorbeschrieben.<sup>119,129-131</sup>

Vor kurzem konnte eine wichtige Funktion von EPCs im Wachstum solider Tumoren in unterschiedlichen experimentellen Modellen nachgewiesen werden.<sup>26,55,56,62,64,65,67,72,127</sup> Unsere Daten erweitern diese Ergebnisse auf das Gebiet der hämatologischen Tumoren: Wir haben gezeigt, dass die Gabe von E4G10 auch das Wachstum von Lymphomen und akuter myeloischer Leukämie (AML) *in vivo* hemmen kann. Unsere Ergebnisse untermauern aktuelle klinische Daten, die auf eine wichtige Funktion der Neovaskularisierung im Wachstum nicht nur von soliden Tumoren, sondern auch bei hämatologischen Neoplasien hinweisen.<sup>132-134</sup> Die beobachtete Hemmung des Tumorwachstums von hämatologischen Neoplasien als Effekt der EPC Depletion war jedoch relativ moderat und auch abhängig vom gewählten Tumormodell. Eine mögliche Strategie, um die Effektivität von E4G10 gegen hämatologische Neoplasien zu verstärken, könnte die Konjugierung von E4G10 mit Alpha-Partikeln sein (z.B. (225)Ac-E4G10), die potente Strahlung mit kurzer Reichweite liefern können und erfolgreich bei soliden Tumoren eingesetzt wurden.<sup>127</sup>

Die allo-KMT ist die zur Zeit effektivste Immuntherapie gegen Krebs, mit der sonst unheilbare maligne Erkrankungen eradiziert werden können.<sup>15</sup> Die

Hauptkomplikationen der allo-KMT sind Tumorrückfall und GVHD. Alloreaktive T Zellen vermitteln sowohl die GVHD als auch die erwünschte GVT Aktivität. Daher ist die therapeutische Trennung der GVHD und des GVT Effekts eine der dringlichsten therapeutischen Herausforderungen in der allo-KMT.<sup>27</sup> In den meisten Zentren wird eine *in vivo* oder *ex vivo* T Zell Depletion zur Prävention der GVHD eingesetzt, die sehr wirksam ist, jedoch leider das Risiko eines Tumorrückfalls erhöhen kann.<sup>39</sup> Unsere Strategie einer Depletion von EPCs führte zur simultanen Verbesserung der GVHD und zur Hemmung von Tumorwachstum, was zur gleichzeitigen Reduktion der GVHD-assoziierten Mortalität und Tumor-assoziierten Mortalität führte. Daher könnte die spezifische Hemmung der Vaskulogenese mittels der Depletion von EPCs eine neue Möglichkeit sein die wesentlichen Komplikationen einer allo-KMT (GVHD und Tumor Rückfall) mit einer einzigen Substanz zu therapieren.

Zusammengefasst ist in der Arbeit die biologische Bedeutung der Vaskulogenese während der GVHD demonstriert. Wir zeigen, dass die spezifische Depletion von EPCs zur Hemmung der Vaskulogenese während der GVHD ein effektives therapeutisches Konzept zur Prophylaxe der GVHD darstellt, was sich durch gleichzeitige Effektivität gegen maligne Tumoren auszeichnet.

### **3.2 Anti-Tumor Effekte von Natürliche Killerzellen**

Unsere Ergebnisse zeigen, dass NK Zellen des Spenders in der Frühphase nach allo-KMT (bis ca. Tag 30 nach Transplantation) die vorherrschende Lymphozytensubpopulation im peripheren Blut der allo-KMT Empfänger

sind.<sup>135,136</sup> Klinische Daten weisen auf eine entscheidende Bedeutung der Allo-Reaktivität von Spender NK Zellen gegen Tumorzellen des Empfängers für die Anti-Tumor Aktivität einer allo-KMT hin. An verschiedenen Zentren wurde ein Überlebensvorteil von Empfängern einer HLA identischen allo-KMT mit KIR mismatch gezeigt.<sup>94-96</sup> Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass NK Zellen wichtige Immunfunktionen gegen Tumorzellen in der frühen Phase nach allo-KMT vermitteln. Daher erscheint eine hohe NK Zell Aktivität nach allo-KMT wünschenswert und eine genaue Erfassung der Einflussfaktoren auf die Reaktivität von NK Zellen wichtig. Leider hat die Standardmethode zur Erfassung der Anti-Tumor Aktivität von NK Zellen, der Chromium (51Cr) release assay, erhebliche Nachteile, wie z.B. hohe spontane Freisetzung von Radioaktivität und die fehlende Möglichkeit zwischen verschiedenen aktiven Zellpopulationen zu unterscheiden.<sup>137</sup> Mit dem längerfristigen Ziel Einflussfaktoren auf die NK Zell Aktivität bei Patienten nach allo-KMT und bei Patienten, die mit monoklonalen Antikörpern behandelt werden, untersuchen zu können, haben wir zunächst eine Methode etabliert, mit der verlässlich und genau die NK Reaktivität gegen Tumorzellen erfasst werden kann.

Die direkte Abtötung von Tumorzellen durch NK Zellen oder zytotoxische T Zellen wird hauptsächlich durch die Exozytose von lytischen Granulae vermittelt, die Perforin und Granzyme enthalten.<sup>138,139</sup> Während dieses Prozesses verschmelzen die Granulamembran und die Zellmembran, so dass Proteine der Granulamembran auf der Zelloberfläche erscheinen.<sup>140</sup> Eines dieser Proteine, was nur nach Degranulation an der Oberfläche von NK Zellen expremiert wird, ist das Lysosomal-associated membrane protein-1 (CD107a). Hinsichtlich der Funktion von CD107a wurde ursprünglich vermutet, dass CD107a für die

Protektion der Granulamembran gegen lytische Substanzen wichtig sein könnte, weil CD107a stark auf der luminalen Seite der lytischen Granula exprimiert wird.<sup>141</sup> Jedoch wurden bei CD107a defizienten Mäusen (knock out) keine Unterschiede bezüglich der Integrität oder Größe der lytischen Granula gefunden.<sup>142,143</sup> Die physiologische Funktion von CD107a ist somit weiterhin unbekannt.

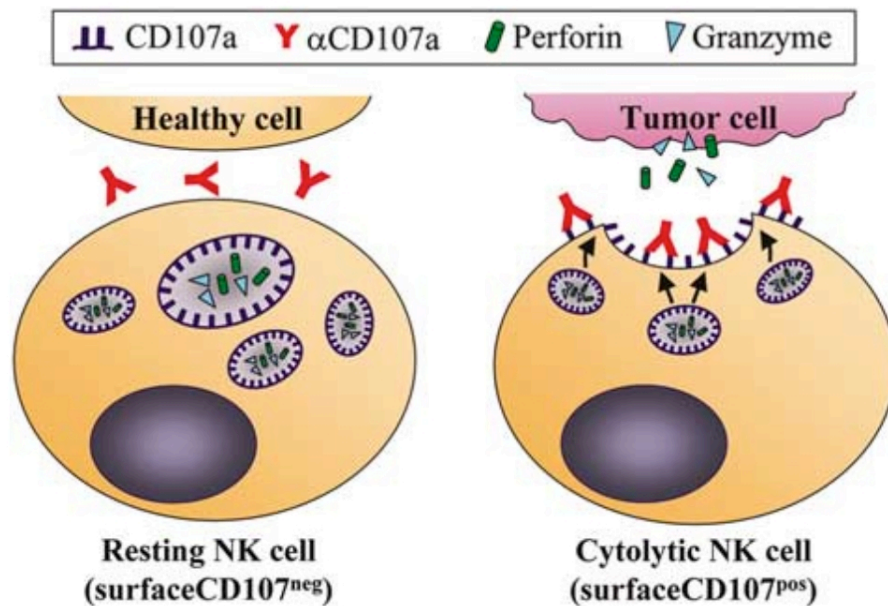
Vor kurzem wurde von Betts et al. eine einfache durchflusszytometrische Methode entwickelt, mit der aktivierte T Zellen aufgrund der Oberflächenexpression von CD107a identifiziert werden konnten.<sup>144</sup> Das Labor von Peter Lee hat den CD107a assay dazu genutzt tumorspezifische T Zellen zu identifizieren.<sup>145</sup> Wolint et al. haben die CD107a Oberflächenexpression genutzt, um die zytolytische Aktivität in verschiedenen T Zell Subgruppen (effector memory, central memory) zu bestimmen.<sup>146</sup> Die Autoren konnten zeigen, dass eine Degranulation in allen T Zell Subgruppen mit gleicher Kinetik erfolgte. Jedoch war bei central memory T Zellen eine degranulation nicht von lytischer Aktivität gefolgt, was wahrscheinlich an einem Mangel an gespeicherten lytischen Substanzen in central memory T Zellen liegt. Somit ist die CD107a Expression bei T Zellen ein guter Aktivierungsmarker, jedoch ein recht unzuverlässiger Marker für die zytolytische Aktivität.

Aufgrund der hohen Konzentrationen an Perforin und Granzym in den lytischen Granula der NK Zellen haben wir die Hypothese aufgestellt, dass die CD107a Expression bei NK Zellen mit der zytolytischen Aktivität korreliert. Wir konnten an verschiedenen Tumorentitäten zeigen, dass der neue CD107a assay sehr gut mit der Lyse von Tumorzellen korreliert (Abbildung 7). Er hat den Vorteil zytotoxische NK Zell Subpopulationen schnell und einfach mit der Durchflusszytometrie



erkennen zu können. Mit dieser Methode konnten wir verschiedene Einflussfaktoren auf die NK Zell Reaktivität gegen Tumorzellen bei Patienten nach allo-KMT erfassen.

**Abbildung 7.** Schematische Darstellung des von uns etablierten CD107a NK Zell assays.<sup>147</sup> CD107a Glykoproteine befinden sich an der luminalen Seite der lytischen Granula von NK Zellen. Bei der Interaktion mit Tumorzellen kommt es zur Exozytose der lytischen Substanzen. Bei diesem Vorgang verschmelzen die Granulamembran und die Zellmembran, wodurch CD107a an der Zelloberfläche erscheint und mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern in der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden kann.



Als erste Anwendung des CD107a NK Zell assays haben wir die Reaktivität von NK Zellen in der Frühphase nach allo-KMT untersucht. Wir haben dabei den Einfluss der Art des Konditionierungsregimes auf die NK Zell Anzahl und deren Aktivität gegen standardisierte Tumorzellen erfasst. In den letzten Jahren ist

neben der allo-KMT mit klassischer Konditionierung, die zum letalen Knochenmarksschaden führt, die Konditionierung mit reduzierter Intensität (RIC, reduced intensity conditioning) in die klinische Routine integriert worden. Trotz zum Teil geringer Chemotherapie- und Bestrahlungsdosen haben diese RIC allo-KMTs eine erstaunliche klinische Effektivität.<sup>148-152</sup> Es ist möglich, dass eine verbesserte Rekonstitution von Immunzellen in der Frühphase nach Transplantation für die hohe Wirksamkeit der RIC allo-KMTs verantwortlich ist. Bisherige Studien beschränkten sich aufgrund methodischer Schwierigkeiten auf die Erfassung der Anzahl der NK Zellen bei Patienten nach allo-KMT, ohne deren funktionelle Eigenschaften untersuchen zu können.<sup>153-155</sup> Unsere Arbeit zeigt, dass die zytolytische Aktivität von Tumor reaktiven NK Zellen bei Patienten nach RIC allo-KMT im Vergleich zu Patienten nach konventioneller allo-KMT deutlich höher ist.<sup>135</sup> Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnten wir demonstrieren, dass der Phänotyp der Tumor-reaktiven NK Zellen nach allo-KMT (CD56<sup>bright</sup>) sich von Tumor reaktiven NK Zellen bei Normalspendern (CD56<sup>dim</sup>) unterscheidet. Bisher war angenommen worden, dass CD56<sup>bright</sup> NK Zellen nicht zytolytisch aktiv seien, sondern durch die Sekretion von verschiedenen Zytokinen (z.B. IFN- $\gamma$ , TNF- $\gamma$  und IL-10) immunregulatorische Funktionen übernehmen.<sup>156</sup>

Als nächsten Schritt haben wir den Einfluss der *in vivo* T Zell Depletion, die häufig in der allo-KMT von Fremdspendern zur Immunsuppression eingesetzt wird,<sup>17</sup> auf die Aktivität der NK Zellen in der Frühphase nach allo-KMT untersucht. In der klinischen allo-KMT wird die *in vivo* T Zell Depletion meist mit Anti-Thymozyten Globulinen (ATGs) oder mit dem monoklonalen Antikörper Alemtuzumab (Campath, Anti-CD52) durchgeführt. Trotz der weit verbreiteten

klinischen Anwendung von Alemtuzumab und ATG ist deren Wirkung auf NK Zellen, die wichtige immunologische Funktionen in der Phase nach allo-KMT übernehmen, unbekannt gewesen. Wir konnten demonstrieren, dass Thymoglobulin (ein polyklonales Kaninchen ATG) und Alemtuzumab gleichermaßen NK Zell toxisch *in vitro* sind. Bei Patienten, die in unserer Abteilung oder im Universitätsklinikum Mainz transplantiert worden sind, fanden wir jedoch eine erhöhte NK Zell Toxizität von Alemtuzumab im Vergleich zu Thymoglobulin.<sup>136</sup> Die Diskrepanz zwischen *in vitro* und *in vivo* Befunden ist wahrscheinlich eine Folge der deutlich längeren biologischen Halbwertszeit von Alemtuzumab im Vergleich zu Thymoglobulin.<sup>157-159</sup> Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine T Zell Depletion mit Alemtuzumab zur verlängerten Immunsuppression nach allo-KMT führt. Unsere Daten lieferten eine mögliche pathophysiologische Grundlage für Publikationen von anderen Arbeitsgruppen, die über ein erhöhtes Risiko von Infektion und Tumor Rückfall bei mit Alemtuzumab behandelten allo-KMT Empfängern berichteten.<sup>160,161</sup>

Als nächsten Schritt haben wir verschiedene ATGs bezüglich Ihres zytotoxischen Effektes auf NK Zellen untersucht und überraschenderweise grundlegende Unterschiede gefunden: Thymoglobulin (Kaninchen ATG) und ATG Fresenius induzierten in sehr niedrigen Konzentrationen eine Apoptose oder Nekrose von NK Zellen. Im Gegensatz dazu war Lymphoglobulin (Pferde ATG) deutlich weniger toxisch auf NK Zellen in klinisch üblichen Konzentrationen.<sup>157,159,162</sup> Unsere Ergebnisse liefern die präklinische Grundlage für randomisierte klinische Studien, die den Effekt der verschiedenen ATGs auf unterschiedliche Lymphozytensubpopulationen *in vivo* analysieren können.

Zusammengefasst haben wir eine Durchflusszytometrie-basierte Methode entwickelt mit der wir die NK Zellaktivität gegenüber standardisierten Tumorzellen einfach und verlässlich erfassen können. Diese neue Methode haben wir dazu genutzt verschiedene Einflussfaktoren, wie z.B. das Konditionierungsregime und die T Zell Depletion, auf die NK Zellaktivität nach allo-KMT zu untersuchen. Unsere Ergebnisse könnten zur Entwicklung von Strategien zur Verstärkung der GVT Aktivität nach der allo-KMT beitragen.

## 4 Zusammenfassung

Immuntherapien für Krebserkrankungen haben in den letzten Jahrzehnten mehr und mehr Eingang in die klinische Praxis gefunden. Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allo-KMT) ist zurzeit die effektivste Immuntherapie für maligne Erkrankungen. Der therapeutische Nutzen der allo-KMT bei malignen Erkrankungen ist zum Großteil durch die so genannte graft-versus-tumor (GVT) Aktivität von Immunzellen des Spenders vermittelt. Leider ist die allo-KMT kein komplikationsarmes Verfahren: Die graft-versus-host Krankheit (GVHD) ist eine progressive systemische Entzündung, die vor allem den Darm, die Leber und die Haut betrifft und erhebliche Morbidität und Mortalität verursacht. Ein großes klinisches Problem stellt die Prophylaxe und Therapie der GVHD dar. Heutzutage angewandte therapeutische Strategien beeinträchtigen die T Zell Funktion und führen zu erhöhtem Risiko eines Tumor Rückfalls. Daher sind wir an der Entwicklung therapeutischer Strategien interessiert, die sich durch eine hohe Effektivität gegen die GVHD auszeichnen ohne die GVT Aktivität negativ zu beeinflussen.

Eine von uns neu beschriebene therapeutische Strategie bei GVHD ist die Hemmung der Neovaskularisierung durch spezifische Depletion von Endothelialen Progenitorzellen (EPCs). Zur Neovaskularisierung beim erwachsenen Menschen tragen sowohl die Angiogenese, das Sprießen von gewebeständigen Endothelzellen (ECs), als auch die Vaskulogenese, die Rekrutierung von im Knochenmark entstandenen zirkulierenden EPCs, bei. Es besteht eine Verbindung zwischen der Neovaskularisierung, dem Wachstum von

Blutgefäßen, zu verschiedenen entzündlichen Erkrankungen sowie zu Tumorerkrankungen. Daher haben wir die Bedeutung von Angiogenese und Vaskulogenese für Entzündungen in Mausmodellen für die GVHD untersucht. Wir konnten herausfinden, dass die GVHD durch vermehrte Neovaskularisierung in GVHD Zielorganen charakterisiert ist. Dabei demonstrierten wir eine besonders wichtige Bedeutung der Vaskulogenese für die Entzündung während der GVHD. Wir haben einen monoklonalen Antikörper (E4G10) gegen das vaskuläre endotheliale Adhäsionsmolekül VE-cadherin eingesetzt, um EPCs zu depletieren und damit spezifisch die Vaskulogenese zu hemmen. Als Folge der EPC Depletion haben wir eine Hemmung der Neovaskularisierung beobachtet, die zur Verbesserung der systemischen und organspezifischen GVHD mit Überlebensvorteil führte. In Experimenten, bei denen allo-KMT Empfänger sowohl Tumorzellen als auch allogene T Zellen intravenös verabreicht bekommen haben, konnten wir einen simultanen positiven Effekt der EPC Depletion auf Tumorwachstum und GVHD beobachten, der zu einem erheblichen Überlebensvorteil der E4G10 behandelten allo-KMT Empfänger führte. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Hemmung der Vaskulogenese mittels der Depletion von EPCs eine einzigartige Möglichkeit darstellt, um die beiden wesentlichen Komplikationen der allo-KMT (GVHD und Tumor Rückfall) mit einer therapeutischen Strategie zu behandeln.

Ein weiterer Ansatz zur Entwicklung von neuen therapeutische Strategien bei der GVHD ist die Nutzung der hohen Anti-Tumor Aktivität von natürlichen Killerzellen (NK Zellen). Klinische Daten zeigen, dass die Allo-Reaktivität von Spender NK Zellen gegen Empfänger Tumorzellen entscheidend zur Anti-Tumor Aktivität einer allo-KMT beiträgt. Um verschiedene Einflussfaktoren auf die NK Zell

Aktivität nach allo-KMT untersuchen zu können haben wir eine Methode etabliert, mit der verlässlich und genau die NK Reaktivität gegen Tumorzellen auf einer Einzelzellebene erfasst werden kann. Unsere Methode beruht auf der durchflusszytometrischen Erfassung von CD107a, einem Granulamembranprotein, was bei der Degranulation von NK Zellen an der Zelloberfläche expremiert wird. Mit dieser Methode konnten wir Einflussfaktoren auf die NK Zell Aktivität nach allo-KMT nachweisen: 1) Das Konditionierungsregime - wir fanden eine erhöhte NK Zell Aktivität gegen Tumorzellen nach allo-KMT mit reduzierter Konditionierung. Die hohe Anti-Tumor Reaktivität von NK Zellen ist eine mögliche Erklärung der guten klinischen Effektivität der allo-KMT mit reduzierter Konditionierung. 2) Die T Zell Depletion – wir fanden eine erhöhte NK Zell Toxizität für Alemtuzumab (Campath) *in vivo* im Vergleich zu Thymoglobulin (Kaninchen ATG). Unsere Ergebnisse liefern die pathophysiologische Grundlage für klinische Berichte über ein erhöhtes Risiko von Tumorrückfällen nach allo-KMT bei T Zell Depletion mit Alemtuzumab und legen einen kritischen Umgang mit Alemtuzumab bei der allo-KMT nahe.

## 5 Literatur

1. Finn OJ. Cancer immunology. *N Engl J Med*. 2008;358:2704-2715.
2. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet*. 2000;356:1795-1799.
3. Roithmaier S, Haydon AM, Loi S, et al. Incidence of malignancies in heart and/or lung transplant recipients: a single-institution experience. *J Heart Lung Transplant*. 2007;26:845-849.
4. Dave SS, Wright G, Tan B, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med*. 2004;351:2159-2169.
5. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313:1960-1964.
6. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353:1659-1672.
7. Weiner GJ, Link BK. Monoclonal antibody therapy of B cell lymphoma. *Expert Opin Biol Ther*. 2004;4:375-385.
8. Giaccone G. Epidermal growth factor receptor inhibitors in the treatment of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:3235-3242.
9. June CH. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J Clin Invest*. 2007;117:1466-1476.
10. Jager E, Jager D, Knuth A. Clinical cancer vaccine trials. *Curr Opin Immunol*. 2002;14:178-182.
11. Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature*. 2001;411:385-389.
12. Armitage JO. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1994;330:827-838.
13. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2006;354:1813-1826.
14. Bortin MM, Rimm AA, Saltzstein EC. Graft versus leukemia: quantification of adoptive immunotherapy in murine leukemia. *Science*. 1973;179:811-813.
15. Kolb HJ, Schmid C, Barrett AJ, Schendel DJ. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood*. 2004;103:767-776.
16. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med*. 1979;300:1068-1073.
17. Ferrara JL, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 1991;324:667-674.
18. Nakic B, Nakic Z, Silobrcic V. Graft versus host reaction in parabiotic disease. *Nature*. 1960;186:322-323.
19. Weiser RS, Granger GA, Brown W, Baker P, Jutila J, Holmes B. Production of Acute Allogeneic Disease in Mice. *Transplantation*. 1965;3:10-21.
20. Riddell SR, Appelbaum FR. Graft-versus-host disease: a surge of developments. *PLoS Med*. 2007;4:e198.
21. Ringden O, Le Blanc K. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: state of the art and new perspectives. *Apmis*. 2005;113:813-830.
22. Ledney GD, van Bekkum DW. Secondary disease in irradiated mice grafted with allogeneic bone marrow from antilymphocyte serum-treated donors. *J Natl Cancer Inst*. 1969;42:633-641.
23. Storb R, Gluckman E, Thomas ED, et al. Treatment of established human graft-versus-host disease by antithymocyte globulin. *Blood*. 1974;44:56-75.
24. Goldman JM, Gale RP, Horowitz MM, et al. Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann Intern Med*. 1988;108:806-814.
25. Marmont AM, Horowitz MM, Gale RP, et al. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood*. 1991;78:2120-2130.
26. Asai O, Longo DL, Tian ZG, et al. Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest*. 1998;101:1835-1842.
27. Rezvani AR, Storb RF. Separation of graft-vs.-tumor effects from graft-vs.-host disease in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Autoimmun*. 2008;30:172-179.



28. Bortin MM, Truitt RL, Rimm AA, Bach FH. Graft-versus-leukaemia reactivity induced by alloimmunisation without augmentation of graft-versus-host reactivity. *Nature*. 1979;281:490-491.
29. Antin JH. Graft-versus-leukemia: no longer an epiphenomenon [editorial]. *Blood*. 1993;82:2273-2277.
30. Collins RH, Jr., Shpilberg O, Drobyski WR, et al. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation [see comments]. *J Clin Oncol*. 1997;15:433-444.
31. Johnson BD, Hanke CA, Truitt RL. The graft-versus-leukemia effect of post-transplant donor leukocyte infusion. *Leuk Lymphoma*. 1996;23:1-9.
32. Truitt RL, Johnson BD. Principles of graft-vs.-leukemia reactivity. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1995;1:61-68.
33. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 1990;75:555-562.
34. Falkenburg JH, Faber LM, van den Elshout M, et al. Generation of donor-derived antileukemic cytotoxic T-lymphocyte responses for treatment of relapsed leukemia after allogeneic HLA- identical bone marrow transplantation. *J Immunother*. 1993;14:305-309.
35. Sosman JA, Oettel KR, Smith SD, Hank JA, Fisch P, Sondel PM. Specific recognition of human leukemic cells by allogeneic T cells: II. Evidence for HLA-D restricted determinants on leukemic cells that are crossreactive with determinants present on unrelated nonleukemic cells. *Blood*. 1990;75:2005-2016.
36. Truitt RL, Shih CY, Lefever AV, Tempelis LD, Andreani M, Bortin MM. Characterization of alloimmunization-induced T lymphocytes reactive against AKR leukemia in vitro and correlation with graft-vs-leukemia activity in vivo. *J Immunol*. 1983;131:2050-2058.
37. Deeg HJ. How I treat refractory acute GVHD. *Blood*. 2007;109:4119-4126.
38. Gratwohl A, Hermans J, Apperley J, et al. Acute graft-versus-host disease: grade and outcome in patients with chronic myelogenous leukemia. Working Party Chronic Leukemia of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*. 1995;86:813-818.
39. 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;98:3192-3204.
40. Hows JM, Passweg JR, Tichelli A, et al. Comparison of long-term outcomes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from matched sibling and unrelated donors. *Bone Marrow Transplant*. 2006;38:799-805.
41. Ferrara JL, Levy R, Chao NJ. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1999;5:347-356.
42. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst*. 1951;12:197-201.
43. Korngold B, Sprent J. Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow. *J Exp Med*. 1978;148:1687-1698.
44. Piguet PF, Grau GE, Allet B, Vassalli P. Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs.-host disease. *J Exp Med*. 1987;166:1280-1289.
45. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med*. 2003;9:1144-1150.
46. Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J Exp Med*. 2001;193:1311-1318.
47. Borsotti C, Franklin AR, Lu SX, et al. Absence of donor T cell derived soluble TNF decreases graft-versus-host-disease without impairing graft-versus-tumor activity. *Blood*. 2007.
48. Hubbard VM, Eng JM, Ramirez-Montagut T, et al. Absence of inducible costimulator on alloreactive T cells reduces graft versus host disease and induces Th2 deviation. *Blood*. 2005;106:3285-3292.
49. Schmaltz C, Alpdogan O, Kappel BJ, et al. T cells require TRAIL for optimal graft-versus-tumor activity. *Nat Med*. 2002;8:1433-1437.
50. Terwey TH, Kim TD, Kochman AA, et al. CCR2 is required for CD8-induced graft-versus-host disease. *Blood*. 2005;106:3322-3330.

51. Waldman E, Lu SX, Hubbard VM, et al. Absence of beta7 integrin results in less graft-versus-host disease because of decreased homing of alloreactive T cells to intestine. *Blood*. 2006;107:1703-1711.
52. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005;438:967-974.
53. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med*. 2008;358:2039-2049.
54. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med*. 1971;133:275-288.
55. Stoll BR, Migliorini C, Kadambi A, Munn LL, Jain RK. A mathematical model of the contribution of endothelial progenitor cells to angiogenesis in tumors: implications for antiangiogenic therapy. *Blood*. 2003;102:2555-2561.
56. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*. 2005;23:1011-1027.
57. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-967.
58. Bailey AS, Jiang S, Afentoulis M, et al. Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood*. 2004;103:13-19.
59. Bertolini F, Mancuso P, Kerbel RS. Circulating endothelial progenitor cells. *N Engl J Med*. 2005;353:2613-2616; author reply 2613-2616.
60. Ribatti D. The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review. *Leuk Res*. 2007;31:439-444.
61. Bailey AS, Willenbring H, Jiang S, et al. Myeloid lineage progenitors give rise to vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:13156-13161.
62. Ciarrocchi A, Jankovic V, Shaked Y, et al. Id1 restrains p21 expression to control endothelial progenitor cell formation. *PLoS ONE*. 2007;2:e1338.
63. Duda DG, Cohen KS, Kozin SV, et al. Evidence for incorporation of bone marrow-derived endothelial cells into perfused blood vessels in tumors. *Blood*. 2006;107:2774-2776.
64. Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K, Mittal V. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science*. 2008;319:195-198.
65. Nolan DJ, Ciarrocchi A, Mellick AS, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev*. 2007;21:1546-1558.
66. Rajantie I, Ilmonen M, Alminaita A, Ozerdem U, Alitalo K, Salven P. Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood*. 2004;104:2084-2086.
67. Shaked Y, Ciarrocchi A, Franco M, et al. Therapy-induced acute recruitment of circulating endothelial progenitor cells to tumors. *Science*. 2006;313:1785-1787.
68. Zentilin L, Tafuro S, Zacchigna S, et al. Bone marrow mononuclear cells are recruited to the sites of VEGF-induced neovascularization but are not incorporated into the newly formed vessels. *Blood*. 2006;107:3546-3554.
69. Larrivee B, Niessen K, Pollet I, et al. Minimal contribution of marrow-derived endothelial precursors to tumor vasculature. *J Immunol*. 2005;175:2890-2899.
70. Sharpe EE, 3rd, Teleron AA, Li B, et al. The origin and in vivo significance of murine and human culture-expanded endothelial progenitor cells. *Am J Pathol*. 2006;168:1710-1721.
71. Spring H, Schuler T, Arnold B, Hammerling GJ, Ganss R. Chemokines direct endothelial progenitors into tumor neovessels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:18111-18116.
72. Lyden D, Hattori K, Dias S, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med*. 2001;7:1194-1201.
73. Charan NB, Baile EM, Pare PD. Bronchial vascular congestion and angiogenesis. *Eur Respir J*. 1997;10:1173-1180.
74. Colville-Nash PR, Scott DL. Angiogenesis and rheumatoid arthritis: pathogenic and therapeutic implications. *Ann Rheum Dis*. 1992;51:919-925.
75. Costa C, Incio J, Soares R. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis*. 2007;10:149-166.
76. Deban L, Correale C, Vetrano S, Malesci A, Danese S. Multiple pathogenic roles of microvasculature in inflammatory bowel disease: a Jack of all trades. *Am J Pathol*. 2008;172:1457-1466.
77. Hatoum OA, Heidemann J, Binion DG. The intestinal microvasculature as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1072:78-97.

78. Asosingh K, Swaidani S, Aronica M, Erzurum SC. Th1- and Th2-dependent endothelial progenitor cell recruitment and angiogenic switch in asthma. *J Immunol.* 2007;178:6482-6494.
79. Danese S, Sans M, Spencer DM, et al. Angiogenesis blockade as a new therapeutic approach to experimental colitis. *Gut.* 2007;56:855-862.
80. Firestein GS. Starving the synovium: angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 1999;103:3-4.
81. Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *Faseb J.* 1997;11:457-465.
82. Monaco C, Andreacos E, Young S, Feldmann M, Paleolog E. T cell-mediated signaling to vascular endothelium: induction of cytokines, chemokines, and tissue factor. *J Leukoc Biol.* 2002;71:659-668.
83. Mor F, Quintana FJ, Cohen IR. Angiogenesis-inflammation cross-talk: vascular endothelial growth factor is secreted by activated T cells and induces Th1 polarization. *J Immunol.* 2004;172:4618-4623.
84. Crosby JR, Kaminski WE, Schatteman G, et al. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res.* 2000;87:728-730.
85. Moretta A, Bottino C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. What is a natural killer cell? *Nat Immunol.* 2002;3:6-8.
86. Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol.* 1975;5:117-121.
87. Wolfe SA, Tracey DE, Henney CS. Introduction of "natural" killer' cells by BCG. *Nature.* 1976;262:584-586.
88. Moretta L, Bottino C, Pende D, Castriconi R, Mingari MC, Moretta A. Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Semin Immunol.* 2006;18:151-158.
89. Karre K. Natural killer cell recognition of missing self. *Nat Immunol.* 2008;9:477-480.
90. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.* 2002;295:2097-2100.
91. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, et al. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood.* 2007;110:433-440.
92. Davies SM, Ruggieri L, DeFor T, et al. Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor. *Blood.* 2002;100:3825-3827.
93. Farag SS, Bacigalupo A, Eapen M, et al. The effect of KIR ligand incompatibility on the outcome of unrelated donor transplantation: a report from the center for international blood and marrow transplant research, the European blood and marrow transplant registry, and the Dutch registry. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006;12:876-884.
94. Beelen DW, Ottinger HD, Ferencik S, et al. Genotypic inhibitory killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility enhances the long-term antileukemic effect of unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias. *Blood.* 2005;105:2594-2600.
95. Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood.* 2003;102:814-819.
96. Hsu KC, Keever-Taylor CA, Wilton A, et al. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood.* 2005;105:4878-4884.
97. Mohty M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia.* 2007;21:1387-1394.
98. Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, et al. NK cell alloreactivity and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis.* 2008;40:84-90.
99. Koehl U, Esser R, Zimmermann S, et al. Ex vivo expansion of highly purified NK cells for immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation in children. *Klin Padiatr.* 2005;217:345-350.
100. Kuwatani M, Ikarashi Y, Iizuka A, et al. Modulation of acute graft-versus-host disease and chimerism after adoptive transfer of in vitro-expanded invariant Valpha14 natural killer T cells. *Immunol Lett.* 2006;106:82-90.

101. Passweg JR, Tichelli A, Meyer-Monard S, et al. Purified donor NK-lymphocyte infusion to consolidate engraftment after haploidentical stem cell transplantation. *Leukemia*. 2004;18:1835-1838.
102. Ruggeri L, Mancusi A, Perruccio K, Burchielli E, Martelli MF, Velardi A. Natural killer cell alloreactivity for leukemia therapy. *J Immunother*. 2005;28:175-182.
103. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*. 2005;105:3051-3057.
104. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science*. 1999;285:412-415.
105. Lundqvist A, McCoy JP, Samsel L, Childs R. Reduction of GVHD and enhanced antitumor effects after adoptive infusion of alloreactive Ly49-mismatched NK cells from MHC-matched donors. *Blood*. 2007;109:3603-3606.
106. Murphy WJ, Keller JR, Harrison CL, Young HA, Longo DL. Interleukin-2-activated natural killer cells can support hematopoiesis in vitro and promote marrow engraftment in vivo. *Blood*. 1992;80:670-677.
107. Chang YJ, Zhao XY, Huang XJ. Effects of the NK cell recovery on outcomes of unmanipulated haploidentical blood and marrow transplantation for patients with hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14:323-334.
108. Wang H, Grzywacz B, Sukovich D, et al. The unexpected effect of cyclosporin A on CD56+CD16- and CD56+CD16+ natural killer cell subpopulations. *Blood*. 2007;110:1530-1539.
109. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971;285:1182-1186.
110. Folkman J. Angiogenesis in psoriasis: therapeutic implications. *J Invest Dermatol*. 1972;59:40-43.
111. Moschocowitz E. Relation of lymphocytic infiltration of inflammatory origin to angiogenesis. *AMA Arch Pathol*. 1950;49:247-266.
112. Siegel RC. Angiogenesis in progressive systemic sclerosis. *N Engl J Med*. 1972;286:217.
113. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;161:851-858.
114. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989;246:1306-1309.
115. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;350:2335-2342.
116. Miller K, Wang M, Gralow J, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2007;357:2666-2676.
117. Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2006;355:2542-2550.
118. Halin C, Fahrngruber H, Meingassner JG, et al. Inhibition of chronic and acute skin inflammation by treatment with a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Am J Pathol*. 2008;173:265-277.
119. Chidlow JH, Jr., Shukla D, Grisham MB, Kevil CG. Pathogenic angiogenesis in IBD and experimental colitis: new ideas and therapeutic avenues. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;293:G5-G18.
120. Heidenreich R, Rocken M, Ghoreschi K. Angiogenesis: the new potential target for the therapy of psoriasis? *Drug News Perspect*. 2008;21:97-105.
121. Leath TM, Singla M, Peters SP. Novel and emerging therapies for asthma. *Drug Discov Today*. 2005;10:1647-1655.
122. Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5:261-270.
123. Vestweber D. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:223-232.
124. May C, Doody JF, Abdullah R, et al. Identification of a transiently exposed VE-cadherin epitope that allows for specific targeting of an antibody to the tumor neovasculature. *Blood*. 2005;105:4337-4344.
125. Liao F, Doody JF, Overholser J, et al. Selective targeting of angiogenic tumor vasculature by vascular endothelial-cadherin antibody inhibits tumor growth without affecting vascular permeability. *Cancer Res*. 2002;62:2567-2575.

126. Liao F, Li Y, O'Connor W, et al. Monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin is a potent inhibitor of angiogenesis, tumor growth, and metastasis. *Cancer Res.* 2000;60:6805-6810.
127. Singh Jaggi J, Henke E, Seshan SV, et al. Selective alpha-particle mediated depletion of tumor vasculature with vascular normalization. *PLoS ONE.* 2007;2:e267.
128. Silverman MD, Haas CS, Rad AM, Arbab AS, Koch AE. The role of vascular cell adhesion molecule 1/ very late activation antigen 4 in endothelial progenitor cell recruitment to rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum.* 2007;56:1817-1826.
129. Angelo LS, Kurzrock R. Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators. *Clin Cancer Res.* 2007;13:2825-2830.
130. Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer.* 2008;8:579-591.
131. Ferrara N. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology.* 2005;69 Suppl 3:11-16.
132. Kumpers P, Koenecke C, Hecker H, et al. Angiopoietin-2 predicts disease-free survival after allogeneic stem cell transplantation in patients with high-risk myeloid malignancies. *Blood.* 2008;112:2139-2148.
133. Lee CY, Tien HF, Hu CY, Chou WC, Lin LI. Marrow angiogenesis-associated factors as prognostic biomarkers in patients with acute myelogenous leukaemia. *Br J Cancer.* 2007;97:877-882.
134. Schliemann C, Bieker R, Thoennissen N, et al. Circulating angiopoietin-2 is a strong prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2007;21:1901-1906.
135. Penack O, Fischer L, Stroux A, et al. 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;85:326-332.
136. Penack O, Fischer L, Stroux A, et al. Serotherapy with thymoglobulin and alemtuzumab differentially influences frequency and function of natural killer cells after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41:377-383.
137. Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC, Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology.* 1968;14:181-196.
138. Davis DM, Dustin ML. What is the importance of the immunological synapse? *Trends Immunol.* 2004;25:323-327.
139. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:735-747.
140. Peters PJ, Borst J, Oorschot V, et al. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med.* 1991;173:1099-1109.
141. Fukuda M. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J Biol Chem.* 1991;266:21327-21330.
142. Andrejewski N, Punnonen EL, Guhde G, et al. Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice. *J Biol Chem.* 1999;274:12692-12701.
143. Chang MH, Karageorgos LE, Meikle PJ. CD107a (LAMP-1) and CD107b (LAMP-2). *J Biol Regul Homeost Agents.* 2002;16:147-151.
144. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods.* 2003;281:65-78.
145. Rubio V, Stuge TB, Singh N, et al. Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells. *Nat Med.* 2003;9:1377-1382.
146. 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;199:925-936.
147. Uhrberg M. The CD107 mobilization assay: viable isolation and immunotherapeutic potential of tumor-cytolytic NK cells. *Leukemia.* 2005;19:707-709.
148. Crawley C, Iacobelli S, Bjorkstrand B, Apperley JF, Niederwieser D, Gahrton G. Reduced-intensity conditioning for myeloma: lower nonrelapse mortality but higher relapse rates compared with myeloablative conditioning. *Blood.* 2007;109:3588-3594.
149. Estey E, de Lima M, Tibes R, et al. Prospective feasibility analysis of reduced-intensity conditioning (RIC) regimens for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in elderly patients with acute myeloid leukemia (AML) and high-risk myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood.* 2007;109:1395-1400.

150. Martino R, Iacobelli S, Brand R, et al. Retrospective comparison of reduced-intensity conditioning and conventional high-dose conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using HLA-identical sibling donors in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2006;108:836-846.
151. Schmid C, Schleuning M, Schwerdtfeger R, et al. Long-term survival in refractory acute myeloid leukemia after sequential treatment with chemotherapy and reduced-intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2006;108:1092-1099.
152. Sorror ML, Storer BE, Maloney DG, Sandmaier BM, Martin PJ, Storb R. Outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative or myeloablative conditioning regimens for treatment of lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;111:446-452.
153. Larosa F, Marmier C, Robinet E, et al. Peripheral T-cell expansion and low infection rate after reduced-intensity conditioning and allogeneic blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35:859-868.
154. Mohty M, Gaugler B, Faucher C, et al. Recovery of lymphocyte and dendritic cell subsets following reduced intensity allogeneic bone marrow transplantation. *Hematology*. 2002;7:157-164.
155. Scholl S, Mugee LO, Issa MC, et al. Impact of early NK cell recovery on development of GvHD and CMV reactivation in dose-reduced regimen prior to allogeneic PBSCT. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35:183-190.
156. Ferlazzo G, Munz C. NK cell compartments and their activation by dendritic cells. *J Immunol*. 2004;172:1333-1339.
157. Hale G, Rebello P, Brettman LR, et al. Blood concentrations of alemtuzumab and antiglobulin responses in patients with chronic lymphocytic leukemia following intravenous or subcutaneous routes of administration. *Blood*. 2004;104:948-955.
158. Rebello P, Cwynarski K, Varughese M, Eades A, Apperley JF, Hale G. Pharmacokinetics of CAMPATH-1H in BMT patients. *Cytotherapy*. 2001;3:261-267.
159. Waller EK, Langston AA, Lonial S, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-thymocyte globulin in recipients of partially HLA-matched blood hematopoietic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2003;9:460-471.
160. Kroger N, Shaw B, Iacobelli S, et al. Comparison between antithymocyte globulin and alemtuzumab and the possible impact of KIR-ligand mismatch after dose-reduced conditioning and unrelated stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2005;129:631-643.
161. Peleg AY, Husain S, Kwak EJ, et al. Opportunistic infections in 547 organ transplant recipients receiving alemtuzumab, a humanized monoclonal CD-52 antibody. *Clin Infect Dis*. 2007;44:204-212.
162. Remberger M, Sundberg B. Rabbit-immunoglobulin G levels in patients receiving thymoglobulin as part of conditioning before unrelated donor stem cell transplantation. *Haematologica*. 2005;90:931-938.

## 6 Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Eckhard Thiel bedanken, der mich nach meiner Zeit als Arzt im Praktikum in seine Klinik aufgenommen und in einmaliger Form gefördert hat. Seine nachhaltige Unterstützung ermöglichte meinen wissenschaftlichen und klinischen Werdegang.

Herr Prof. Dr. Lutz Uharek weckte mein Interesse an der Transplantationsimmunologie und förderte meine Forschungsprojekte in ganz besonderem Maße. Diese Habilitationsschrift wäre ohne seine Hilfe und Unterstützung nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Marcel van den Brink verdanke ich vertiefte Einblicke in die experimentelle Knochenmarkstransplantation. Sein Enthusiasmus für dieses Forschungsfeld hat auch mich begeistert und angesteckt. Ich danke ihm für zwei erfolgreiche Jahre in seinem Labor im Memorial Sloan-Kettering Cancer Center.

Herrn PD Dr. Jörg Rathgeber, meinem Doktorvater, verdanke ich den Einstieg in die medizinische Forschung und das wissenschaftliche Arbeiten. Er hat meine weitere wissenschaftliche Entwicklung stets wohlwollend begleitet und unterstützt.

Die vorliegenden Arbeiten wären nicht möglich geworden ohne exzellente Kollegen und Kooperationspartner. Um nur einige wenige – in alphabetischer Reihenfolge - zu nennen:

PD Dr. Igor Wolfgang Blau, Dr. Katharina Brandl, Dr. Lars Fischer, Kati Freyberg, Dr. Erik Henke, Christopher King, Prof. Dr. Georg Maschmeyer, Dr. Il-Kang Na, Uttam Rao, PD Dr. Stefan Schwartz, Odette Smith, David Suh, Dr. Klaus Züchner.

Sehr viel zu verdanken habe ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die über viele Jahre durch verständnisvolle Unterstützung meinen wissenschaftlichen Weg ermöglichten.

Für die finanzielle Unterstützung meiner Forschungsarbeit danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

# ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, 18.06.2009

Olaf Penack