

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Haploidente Stammzelltransplantation und anschließende
Immuntherapie mit allogenen natürlichen Killerzellen zur
Behandlung von AML, CML, MDS, ALL und Morbus Hodgkin*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Philipp Friedrich Wilhelm Doepner

aus Hildesheim

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. L. Uharek
 2. Prof. Dr. med. O. Sezer
 3. Prof. Dr. med. M. Schmitt

Datum der Promotion: 03.09.2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Einleitung	6
1.1 Die allogene Blutstammzelltransplantation.....	6
1.1.1 Allgemeines.....	6
1.1.2 Allogene HLA-identische Blutstammzelltransplantationen	6
1.1.3 Haploidente allogene Stammzelltransplantationen	7
1.2 Natürliche Killerzellen.....	9
1.2.1 Allgemeines.....	9
1.2.2 NK-Rezeptoren	10
1.2.3 Alloreaktivität und KIR-Ligandeninkompatibilität	11
1.3 Adjuvante Immuntherapie mit NK-Zellen.....	14
1.4 Fragestellung der Arbeit	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Beteiligte Kliniken.....	16
2.2 Patienten- und Spenderauswahl	16
2.3 Mobilisation peripherer Blutstammzellen.....	16
2.4 Leukapherese	16
2.5 CD34-Selektion	17
2.6 CD56-Selektion	17
2.7 Konditionierung des Transplantatempfängers, Transplantation und Injektion der NK-Zellen	20
2.8 Supportive Maßnahmen	22
2.9 Prophylaxe, Erfassung und Behandlung von GvH-Reaktionen	22
2.10 Test auf zytolytische Aktivität von NK-Zellen.....	23
2.11 Leukämiediagnostik.....	23

2.12	Erfassung der Immunrekonstitution.....	24
2.13	Statistische Methodik	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Technischer Teil.....	26
3.1.1	<i>CD34-Selektion</i>	<i>26</i>
3.1.2	<i>CD56-Selektion</i>	<i>28</i>
3.1.3	<i>Funktionskontrolle der CD56-positiven Zellen.....</i>	<i>30</i>
3.2	Klinischer Teil.....	34
3.2.1	<i>Patienten- und Spendercharakteristika</i>	<i>34</i>
3.2.2	<i>Klinischer Verlauf nach Transplantation.....</i>	<i>36</i>
3.2.2.1	<i>Patientenverlauf, Infektionen und Komplikationen</i>	<i>37</i>
3.2.2.2	<i>GvH-Reaktion</i>	<i>41</i>
3.2.2.3	<i>Engraftment</i>	<i>41</i>
3.2.2.4	<i>NK-Alloreaktivität</i>	<i>44</i>
3.2.2.5	<i>Rezidive</i>	<i>45</i>
3.3	Immunologischer Teil	46
3.3.1	<i>Immunologische Rekonstruktion</i>	<i>46</i>
3.3.2	<i>Rekonstitution des NK-Zellrezeptorenrepertoires.....</i>	<i>49</i>
4	Diskussion	55
4.1	Technischer Teil.....	55
4.2	Klinischer Teil.....	56
4.2.1	<i>Verlauf, Komplikationen und Infektion.....</i>	<i>56</i>
4.2.1.1	<i>Verträglichkeit der NK-Zellinfusion.....</i>	<i>56</i>
4.2.1.2	<i>Komplikationen und Infektionen</i>	<i>56</i>
4.2.2	<i>GvH-Reaktion.....</i>	<i>56</i>
4.2.3	<i>Engraftment.....</i>	<i>59</i>

4.2.4	<i>Rezidive</i>	60
4.2.5	<i>Aktivierung und Expansion der NK-Zellen</i>	61
4.2.6	<i>NK-Alloreaktivität</i>	62
4.3	Immunologischer Teil	63
4.3.1	<i>Immunologische Rekonstitution</i>	63
4.3.2	<i>NK-Zellrezeptorrepertoire</i>	64
5	Zusammenfassung	67
6	Literaturverzeichnis	69
7	Abbildungsverzeichnis	80
8	Tabellenverzeichnis	83
9	Danksagung	85
10	Lebenslauf	86
11	Selbstständigkeitserklärung	87

1 Einleitung

1.1 Die allogene Blutstammzelltransplantation

1.1.1 Allgemeines

Die allogene Blutstammzelltransplantation stellt eine etablierte Behandlungsmethode für Patienten mit akuten Leukämien dar, besonders wenn ein erstes Rezidiv aufgetreten ist oder wenn prognostisch ungünstige zytogenetische Hochrisikoaberrationen vorliegen. Konventionelle Therapieverfahren können hier häufig nur in Ausnahmefällen Langzeitremissionen erreichen (1,2). So ist beispielsweise bei akuter myeloischer Leukämie (AML) eine erfolgreiche Behandlung mit Zytostatika nur bei etwa einem Drittel der betroffenen Patienten möglich (1). Für Patienten mit malignen Lymphomen stellt die allogene Transplantation vor allem dann eine weitere Behandlungsmöglichkeit dar, wenn eine autologe Transplantation nicht erfolgreich war oder aufgrund des gleichzeitigen Befalls des Knochenmarkes nicht möglich ist.

Das Stammzelltransplantat soll durch die immunkompetenten Zellen des Spenders die offensichtlich chemotherapieresistenten Resttumorzellen zerstören und damit zur Heilung führen. Hierbei vermittelt die Alloreaktivität von T-Zellen bei HLA-identischen Transplantationen das Anwachsen des Transplantats und tötet verbliebene leukämische Zellen. Dabei kommt es in den meisten Fällen zu einer schnellen Rekonstitution der Immunkompetenz des Empfängers (3).

Neben der erwünschten Reaktion gegen den Tumor können die Spender-T-Zellen gleichzeitig Graft-versus-Host-Reaktionen (GvH) hervorrufen. Dabei ist die GvH-Reaktion eine der Hauptursachen für die transplantationsassoziierte Mortalität (4).

1.1.2 Allogene HLA-identische Blutstammzelltransplantationen

Wenn ein geeigneter Spender gefunden werden kann, stellt heute die allogene HLA-identische Stammzelltransplantation in vielen Fällen das Standardverfahren dar. Sie ist mit vielen Risiken und Komplikationen verbunden. Neben der Entwicklung von GvH-Reaktionen zählt hierzu insbesondere das Auftreten schwerer Infektionen. Zur Prophylaxe der GvH-Reaktionen stehen prinzipiell zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Erstens die Entfernung der T-Zellen aus dem Transplantat und zweitens die medikamentöse Immunsuppression.

Das heutige Behandlungskonzept mit einem hohen T-Zellgehalt und starker Immunsuppression garantiert ein gutes Engraftment, ist jedoch mit einer relativ hohen Inzidenz von GvH-Reaktionen verbunden (5). Es ist durch die Verwendung peripherer Blutstammzellen möglich geworden, große Zellzahlen zu transplantieren und damit das Abstoßungsrisiko weiter zu minimieren (6).

Das Behandlungskonzept ist nicht für alle Patienten verfügbar. Im Wesentlichen gibt es hierfür drei Gründe:

1. Nur ein Teil der Patienten weist einen HLA-identischen Familienspender auf, mit dem eine sofortige Transplantation möglich ist. In den meisten Industriestaaten gibt es pro Familie im Schnitt weniger als drei Geschwister, das bedeutet, dass weniger als 40% der Patienten ein HLA-identisches Geschwisterpaar haben, denn ein Geschwisterpaar ist nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 25% HLA-identisch (7).
2. Trotz aller Fortschritte bleibt die Suche nach einem HLA-identischen Fremdspender häufig erfolglos. Im Register von Spendewilligen gibt es inzwischen etwa 10 Millionen Eintragungen. Die Wahrscheinlichkeit, einen HLA-identischen nichtverwandten Spender zu finden, variiert je nach Herkunft zwischen 70-80% für die kaukasische Rasse, liegt aber unter 10% für einige ethnische Minderheiten (8).
3. Bei Patienten mit einem hohen Risiko, ein Rezidiv zu erleiden, oder solchen mit einem aggressiven Krankheitsverlauf fehlt meist der zeitliche Rahmen, um auf einen HLA-identischen Fremdspender zu warten.

1.1.3 Haploidente allogene Stammzelltransplantationen

Als Konsequenz der schwierigen Spendersuche versucht man, die Transplantationsmöglichkeiten auf Spender auszuweiten, die nur teilweise in ihren HLA-Merkmalen übereinstimmen, sogenannte haploidentische Spender. Ein solches Behandlungskonzept hält für nahezu jeden Patienten einen geeigneten Familienspender in kurzer Zeit bereit, da der MHC-Status nur über ein Chromosom (Cr 6) vererbt wird und somit jedes Elternteil mindestens haploidentisch zum Kind ist. Die meisten Patienten haben also ein zu ihnen haploidentisches Familienmitglied, das für eine Transplantation zur Verfügung steht. Häufig kann ein Spender ausgewählt werden, der in Hinsicht auf Infektstatus, Alter und Möglichkeit der mehrfachen

Stammzellapherese optimale Voraussetzungen mitbringt. Im Verlauf der Behandlung sind so weitere Spenderlymphozyten schnell und einfach zu akquirieren.

Diese haploidentische Stammzelltransplantation ist eine erfolgversprechende Alternative bei der Therapie von hämatoonkologischen Krankheiten mit relativ schlechter Prognose. Letztendlich ergeben sich jedoch hier drei größere Probleme:

1. T-zellvermittelte GvH-Reaktionen, die auf Grund des unterschiedlichen HLA-Status deutlich stärker ausfallen als bei HLA-identischer Transplantation und die mit reiner Immunsuppression in der Regel nicht unter Kontrolle zu halten sind.
2. Häufiges Transplantatversagen aufgrund der höheren Immunogenität des Transplantats.
3. Häufigere Komplikationen durch Infektionen als bei HLA-identischer Transplantation bedingt durch eine deutlich verlangsamte Immunrekonstitution (5).

T-Zellen sind die Haupteffektoren bei der Entwicklung von GvH-Reaktionen. Ihr Potenzial, GvH-Reaktionen hervorzurufen, ist nach haploidentischen Transplantationen aufgrund des Unterschiedes in den HLA-Merkmalen weitaus höher. Dass man schwere GvH-Reaktionen erfolgreich verhindern kann, indem man vor der Transplantation für eine ausreichende Depletion der T-Zellen sorgt, konnten schon Reisner et al. Anfang der achtziger Jahre zeigen (9). Die heute mögliche T-Zelldepletion um mehrere Log-Stufen (10,11) bringt generell zwei größere Probleme mit sich: Erstens kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Abstoßungsrate und zweitens zu einer Zunahme leukämischer Rezidive. Die höhere Anzahl an Spender-T-Zellen im Transplantat vermittelt bei einem HLA-identischen Transplantationsschema einen besseren Schutz vor Rezidiven durch ihre Alloreaktivität gegen die Empfängerzellen und gegen den leukämischen Klon.

Um trotz einer hohen T-Zelldepletion ein gutes Engraftment zu gewährleisten, werden heute große Mengen peripherer Blutstammzellen transplantiert. Auf diesem Weg lässt sich auch bei niedriger Anzahl übertragener Spender-T-Zellen das Einwachsen des Transplantats sicherstellen. Erstmals beobachtet wurde dieser Effekt bei Mäusen durch die Gabe einer sogenannten „Megadose“ von T-zelldepletierten Stammzellen (12,13).

Erfahrungen an der Universität von Perugia demonstrieren, dass mit der Depletion von T-Zellen aus dem Transplantat und einer hohen Dosis Blutstammzellen nahezu vollständig schwere GvH-Reaktionen verhindert werden, gleichzeitig die

Abstoßungsrate jedoch nicht erhöht ist (14-16). Die T-Zelldepletion und das „Megadosis-Konzept“ verbesserten entscheidend die Möglichkeiten der haploidenten Stammzelltransplantation.

Die heutige Forschung sucht derzeit nach neuen Möglichkeiten, den durch die T-Zelldepletion verlorengegangenen Graft-versus-leukemia-Effekt zu ersetzen. Auf dem Forschungsfeld der adjuvanten immunologischen Zelltherapie werden derzeit große Fortschritte gemacht (17,18). Eine interessante Zellpopulation stellen in diesem Zusammenhang die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) dar.

1.2 Natürliche Killerzellen

1.2.1 Allgemeines

Im Gegensatz zu den B- und T-Zellen, die zum adaptiven Immunsystem gerechnet werden, zählen menschliche NK-Zellen zu den Effektoren des angeborenen Immunsystems. Sie sind zur Lyse von Tumorzellen und virusinfizierten Zellen fähig, ohne durch eine vorherige Antigenpräsentation aktiviert worden zu sein (19-22). Gleichzeitig können bestimmte Subpopulationen auch antikörpermarkierte Zellen über den Fc-Rezeptor CD16 zerstören und spielen damit zusätzlich eine Rolle bei der antikörperabhängigen Zytotoxizität (ADCC) (19,23-25). Erste Aufmerksamkeit im Kontext der Onkologie fanden diese Zellen durch Untersuchungen der Reaktivität von Lymphozyten Gesunder gegen Tumorzellen. Dort stellte sich heraus, dass auch die Lymphozyten gesunder Probanden ohne vorherige Antigenpräsentation in der Lage waren, Tumorzellen abzutöten (26).

Bei der Regulation der Immunantwort haben sie großen Einfluss auf die Exkretion von immunregulativen Zytokinen wie zum Beispiel Interferon γ , TNF- α und GM-CSF (27). Morphologisch sind sie als große granuläre Lymphozyten erkennbar und haben einen Anteil von 10-15% an den peripheren Lymphozyten (28,29). Sie sind auf Grund ihrer spezifischen Funktionsweise besonders effektiv bei der Zerstörung von Tumorzellen, der Lyse von virusinfizierten Zellen und spielen eine Rolle in der Regulation der Hämatopoese (19,30,31). NK-Zellen stammen von Knochenmarkvorläuferzellen ab und brauchen zur Reifung die Umgebung des Knochenmarks (21,32). Einen entscheidenden Faktor bei der Proliferation und der Aktivierung der NK-Zellen stellt Interleukin 2 dar (33-37).

Bei der Erforschung ihrer Funktion und Fähigkeit wurde schnell klar, dass die NK-Zellen im Rahmen der Immunantwort des Körpers einen anderen Funktionsmechanismus als B- oder T-Lymphozyten zeigen. Zur Erklärung der antigenunabhängigen Lyse wurde von Kärre et al. die sogenannte „missing-self“-Hypothese aufgestellt und damit postuliert, dass die NK-Zellen Zellen entdecken und zerstören, die keine Selbsterkennungsmarker exprimieren, d.h. entweder ihre Auto-MHC-Klasse-I-Moleküle verloren haben oder diese individuenspezifischen Marker nicht besitzen (38). Virusinfizierte Zellen regulieren ihre MHC-Moleküle herunter und werden so für die NK-Zellen als Ziel erkennbar. Als physiologisches Korrelat dieser These fand man inhibierende Rezeptoren, die bei Kontakt mit ihren Liganden (MHC-Klasse-I-Moleküle) inhibierende Signale weiterleiten und so die Aktivität der NK-Zelle unterdrücken. Blockiert man diese Rezeptoren, werden auch Zellen mit den passenden MHC-Klasse-I-Molekülen plötzlich für die NK-Zellen als Ziel erkennbar (39-41). NK-Zellen erkennen ihre Zielzelle unter anderem also an den fehlenden MHC-Klasse-I-Molekülen.

1.2.2 NK-Rezeptoren

MHC-Klasse-I-Moleküle sind Liganden für inhibierende NK-Rezeptoren, die eine Zelle vor der Lyse durch NK-Zellen schützen können (42). Oberflächenrezeptoren der NK-Zelle, die entweder inhibierend und oder aktivierend funktionieren, sind charakterisiert worden als „killerzell-immunglobulin-ähnliche Rezeptoren“ (KIRs), Lektine und „natürliche zytotoxische Rezeptoren“ (NCRs) (32,43-45). Zu den inhibierenden Rezeptoren gehören die KIRs und die „C-Typ-Lektin-ähnlichen“ (CD94/NKG2) Rezeptoren. Jedoch besitzen nicht alle KIRs einen hemmenden Einfluss auf die NK-Zelle, manche aktivieren deren Tätigkeit auch (39,46). Eine Entscheidung über Lyse einer Zielzelle durch eine NK-Zelle entsteht integrativ als Resultat aus hemmenden und aktivierenden Signalen an die NK-Zelle (32). Ein inhibierendes Signal bedeutet also nicht automatisch eine Inaktivierung der Zelle, sondern erst das Zusammenspiel aus Aktivierung und Hemmung bestimmt darüber, ob eine Zelle als Ziel erkannt wird.

Jeder humane NK-Zellklon exprimiert durchschnittlich 5-6 HLA I spezifische Rezeptoren (47). KIRs können dabei spezifisch zwischen HLA-A, HLA-B und HLA-C Molekülen unterscheiden (39,48-53). Die drei wichtigsten HLA-Klasse-I-Liganden für die KIRs sind HLA-C der Gruppe 1 und 2 und HLA-Bw4 (54). Da die Vererbung der KIR-Gene und des HLA-Status von unterschiedlichen Chromosomen abhängig ist, kann das Rezeptorrepertoire innerhalb einer Familie sehr unterschiedlich sein und trotz

ähnlichem HLA-Status komplett differieren (45). So werden die KIRs auf Chromosom 19 im „leukocyte receptor complex“ kodiert, während der HLA-Status über Chromosom 6 vererbt wird (55,56). Als Konsequenz daraus ergeben sich Individuen, die Gene für KIRs besitzen, zu denen sie keinen passenden HLA-Liganden haben. Jedoch exprimieren alle körpereigenen NK-Zellen mindestens einen Rezeptor, der spezifisch für ein MHC-Molekül des eigenen Körpers ist („at least one“-Theorie) (47).

Der Genotyp übt einen dominierenden Einfluss auf das Rezeptorrepertoire der NK-Zellen aus, auch wenn der HLA-Status einen modellierenden Effekt zeigt (57). Durch Untersuchungen über ein Jahr an fünf gesunden Probanden konnten Shilling et al. zeigen, dass das KIR-Rezeptorrepertoire eines Menschen zeitlich stabil ist und auch durch Infektionen oder größeren körperlichen Stress nicht verändert wird (57).

Die meisten Menschen besitzen inhibitorische Rezeptoren der drei wichtigsten HLA-Klasse-I-Liganden (HLA-C Gruppe 1 und 2 und HLA-Bw4). So fand man unter 162 Probanden bei einer KIR-Genotypisierung in 97% der Fälle KIR2DL1 (Rezeptor für HLA-C Gruppe 2), in 100% der Fälle KIR2DL2/3 (Rezeptor für HLA-C Gruppe 1) und in 94% der Fälle KIR3DL1 (Rezeptor für HLA-Bw4) (58).

1.2.3 Alloreaktivität und KIR-Ligandeninkompatibilität

Basierend auf der HLA-Klasse-I-Typisierung von Spender und Empfänger spricht man dann von NK-Alloreaktivität, wenn aufgrund fehlender Liganden für die inhibitorischen Rezeptoren der Spender-NK-Zellen erwartet werden kann, dass sie zur Lyse der Empfängerzellen befähigt sind. Das Fehlen passender HLA-Antigene als Liganden für KIRs in einem Transplantationssetting wird auch „KIR-ligand mismatch“ genannt. Hierbei gibt es Hinweise aus Tierstudien, dass gerade diese NK-Alloreaktivität folgende positive Effekte vermitteln kann:

1. NK-Aktivität gegen den leukämischen Klon (GvL-Effekt durch NK-Zellen vermittelt) ohne Auslösen einer systemischen GvHD (32).
2. NK-Aktivität gegen T-Zellen des Empfängers und damit vermindertes Abstoßungsrisiko.
3. NK-Aktivität gegen dendritische Zellen des Empfängers und dadurch reduziertes GvHD-Risiko, weil die dendritischen Zellen durch Antigenpräsentation zur Entwicklung einer GvHD beitragen (59-62).

Weitere experimentelle und klinische Daten weisen darauf hin, dass die NK-Zellaktivität gegenüber der Leukämie entscheidend sein kann und dass die Entfernung von NK-Zellen aus dem Transplantat zu einer Reduktion des antileukämischen Effekts führt (64).

KIR-Liganden-Inkompatibilität in GvH-Richtung	Kein NK-„mismatch“ in GvH-Richtung	NK-„mismatch“ in GvH-Richtung
Spender-NK-Zellalloreaktivität	Nein	Ja
Transplantationsergebnisse:		
- verbessertes Engraftment	Nein (Abstoßungsrate 15,5%)	Ja (keine Abstoßung)
- Schutz vor GvH-Reaktionen	Nein (GvH-Reaktionen 13,7%)	Ja (keine GvH-Reaktionen)
- Rezidivhäufigkeit		
- Hochrisiko ALL	Hoch (5-Jahreswahrscheinlichkeit 90%)	Hoch (5-Jahreswahrscheinlichkeit 85%)
- Hochrisiko AML	Hoch (5-Jahreswahrscheinlichkeit 75%)	Sehr selten (5-Jahreswahrscheinlichkeit 0%)
Einfluß auf die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit	Nein (5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit 5%)	Ja (5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit 60%)

Tabelle 1.1: *Klinische Daten und Transplantationsergebnisse nach haploidenter Transplantation mit und ohne KIR-Liganden-Inkompatibilität in GvH-Richtung der Gruppe Ruggeri et al. (60). Zusehen sind der Schutz vor GvH-Reaktionen und eine bessere Überlebenswahrscheinlichkeit bei KIR-Liganden-Inkompatibilität. Die Rezidivhäufigkeit ist von der bestehenden Krankheit abhängig; hier gibt es keinen Vorteil für Patienten mit ALL, jedoch für Patienten mit AML. Tabelle modifiziert nach Velardi et al. (63).*

Die Bedeutung des „KIR-ligand mismatch“ zeigt sich auch bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie, die mit einer haploidentischen, allogenen und T-zelldepletierten Blutstammzelltransplantation behandelt wurden. Ruggeri et al. zeigen hier eine signifikant erhöhte Überlebensrate, besseres Transplantateinwachsen und ein selteneres Auftreten von GvH-Reaktionen (60) (siehe Tabelle 1.1). Die

Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten mit AML in zweiter bzw. dritter Remission unter einer haploidentischen Stammzelltransplantation mit KIR-Liganden-Inkompatibilität in GvH-Richtung lag bei 60% und übertraf damit sogar die Überlebensrate nach HLA-identischer Transplantation von einem Fremdspender (35% in erster kompletter Remission, 27% in zweiter kompletter Remission und bei 7% nach dritter kompletter Remission oder Rezidiv) (65).

Analysen von Transplantationen bei 85 Patienten (Zeitraum 1993 – 2003) mit fortgeschrittener AML von haploidentischen Spendern dieser Gruppe aus Perugia demonstrieren zusätzlich, dass Transplantationen von NK-alloreaktiven Spendern das Transplantateinwachsen fördern und keine erhöhten Inzidenzen von GvH-Reaktionen zur Folge hat (5). Hervorzuheben ist, dass dieses „mismatch“ besonders bei Patienten mit AML zu einer Verbesserung der Transplantatenergebnisse führt. Bei diesen Patienten kann eine deutliche Verbesserung hinsichtlich der Rezidivhäufigkeit erreicht werden. Während bei vorliegender KIR-Liganden-Inkompatibilität eine Rezidivhäufigkeit von 0% vorliegt, beträgt sie ohne dieses „mismatch“ 75%. Das „KIR-ligand mismatch“ hat jedoch keinen entscheidenden Einfluss auf die Rezidivhäufigkeit bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) (siehe Tabelle 1.1). Leung et al. wiesen jedoch auch für die akuten lymphatischen Leukämien mit „mismatch“ eine geringe Rezidivrate nach (66). Die untersuchte Patientenklientel besteht hierbei jedoch aus Kindern und nicht Erwachsenen. Zu beachten ist dieser Unterschied deshalb, weil Untersuchungen an ALL-Blasten von Kindern und Erwachsenen zeigen, dass die Kinderblasten im Gegensatz zu den Erwachsenenblasten eine hohe Rate spezifischer Bindungsproteine wie die β 1-integrin-Familie (CD29, CD49d), die β 2-integrin-Familie (LFA-1) und die Ig-Superfamilie (ICAM-1, LFA-3) exprimieren (64,67). Diese Bindungsproteine sind möglicherweise essentielle Kofaktoren für die Aktivierung der NK-Zellen.

Daten von Giebel et al. weisen daraufhin, dass auch bei unverwandten allogenen HLA-identischen Stammzelltransplantationen mit einer Verbesserung der Prognose zu rechnen ist. Man konnte eine signifikante Steigerung der Überlebensrate für Patienten, bei denen ein „KIR-ligand mismatch“ vorlag, nachweisen (68). Im Gegensatz dazu zeigen Schaffer et al. in einer retrospektiven Studie, die 190 Transplantationen mit nichtverwandten Spendern untersucht, dass die Überlebensrate bei bestehendem „mismatch“ signifikant niedriger war als bei Transplantationen ohne „mismatch“. Dafür wurde eine höhere Inzidenz der transplantationsassoziierten Mortalität verantwortlich

gemacht (69). Die Datenlage gerade in Bezug auf allogene HLA-identische Transplantationen von Fremd Spendern ist demnach noch sehr kontrovers. Davies et al. zeigen in einer Studie mit 175 Patienten keinen Vorteil für KIR-Liganden-Inkompatibilität bei Transplantation mit einem Fremdspender (70). Unklar bleibt, ob und in wie weit Behandlungsprotokoll und Art der hämatoonkologischen Erkrankung entscheidenden Einfluss auf den Erfolg der Behandlung und die Wirkung des „mismatch“ haben (71).

Bei den hier untersuchten Transplantationen handelt es sich um haploidente Stammzellübertragungen. Aus diesem Grund wurde das Behandlungsprotokoll der Gruppe aus Perugia (Ruggeri et al.) als Grundlage genommen.

1.3 Adjuvante Immuntherapie mit NK-Zellen

Aufgrund ihrer spezifischen Funktionsweise sind NK-Zellen besonders geeignet, HLA-differente Tumorzellen zu erkennen und zu zerstören. Analysen der Lysefähigkeiten von NK-Zellen in vitro haben demonstriert, dass alloreaktive NK-Zellen AML-, CLL- und Non-Hodgkin-Zellen zerstören können (64). Im Gegensatz zu T-Zellen gibt es bei Ihnen keinen Hinweis, dass sie GvH-Reaktionen hervorrufen. So haben Versuche mit NK-Zellen in vitro gezeigt, dass sie nicht in der Lage sind, Fibroblasten, denen inhibierende HLA-Moleküle fehlen, zu lysieren (72). Auch in mehreren Tierexperimenten haben die NK-Zellen nicht zu erkennbaren GvH-Reaktionen geführt (73-75). In Experimenten mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen einen GvL-Effekt ausüben können, ohne dabei GvH-Reaktionen zu provozieren (76). Auf Grund ihrer Aktivität gegen dendritische Zellen des Wirtes wird ihnen sogar ein GvH-protektiver Effekt zugeschrieben (77). Durch die Zerstörung dieser Zellen kommt es zu einer verminderten Antigenpräsentation der dendritischen Zellen an Spender-T-Zellen. Ein Mechanismus, der als entscheidend bei der Entwicklung einer GvH-Reaktion gilt (62,78).

Diese Fähigkeiten lassen den Einsatz der NK-Zellen im Rahmen immuntherapeutischer Ansätze besonders vielversprechend erscheinen. Eine Übertragung in großen Mengen scheint möglich. NK-Zellen könnten sich als Chance bei der Heilung hämatoonkologischer Erkrankungen erweisen. In Kombination mit einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation erscheinen geringere Risiken für Transplantatversagen, GvH-Reaktion und Auftreten von Rezidiven möglich, insbesondere wenn die Alloreaktivität der eingesetzten NK-Zellen aufgrund der HLA-Unterschiede von Spender und

Empfänger eine optimale Effektivität bzw. Zytotoxizität gegen die Leukämie des Empfängers ermöglicht.

1.4 Fragestellung der Arbeit

Im Rahmen einer Phase-I-Studie „Transplantation of haematopoietic stem cells and infusion of CD56+CD3- NK-cells from haploidentical donors in patients with hematological malignancies“ der Universitätskliniken Leipzig und Charité-Universitätsmedizin Campus Benjamin Franklin erfolgte die Stammzelltransplantation der in dieser Arbeit vorgestellten sechs Patienten.

Die Bearbeitung folgender Fragen ist Gegenstand dieser Arbeit:

1. Technische Fragestellungen:

- a) Ist die Aufbereitung eines NK-Zell-Präparates zu therapeutischen Zwecken praktisch und technisch möglich?
- b) Wie hoch ist die Effektivität der verwendeten Methode zur Aufreinigung der NK-Zellen?
- c) Wie ist die Funktion der NK-Zellen nach dem Selektionsverfahren einzuschätzen?

2. Klinische Fragestellungen:

- a) Wie ist das Behandlungsschema für den Patienten verträglich, welche Komplikationen treten auf?
- b) Wie häufig kommt es nach Transplantation zu Graft-versus-Host-Reaktionen und wie stark ist ihre Ausprägung?
- c) Wie ist das Engraftment nach Transplantation zu beurteilen, treten Rezidive auf und welche Ursachen gibt es dafür?

3. Immunologische Fragestellungen:

- a) Wie verläuft die Rekonstruktion der einzelnen immunologischen Zellreihen, gibt es unter den Patienten Gemeinsamkeiten?
- b) Verändert sich das Repertoire der NK-Zellrezeptoren nach Transplantation?

2 Material und Methoden

2.1 Beteiligte Kliniken

Die Patienten wurden in der II. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Leipzig behandelt. Die Stammzelltransplantation mit nachfolgender adaptiver Immuntherapie durch NK-Zellen wurde in der Knochenmarktransplantationseinheit der Klinik durchgeführt. Die Bestrahlung erfolgte in der Radiologischen Klinik der Universitätsklinik Leipzig.

2.2 Patienten- und Spenderauswahl

Die Arbeit umfasste Patienten mit den hämatoonkologischen Krankheiten: ALL, AML, CML, MDS und Morbus Hodgkin. Den Patienten konnte aufgrund ihrer Krankheit oder ihres Krankheitsstadiums mit konventionellen Therapieverfahren keine oder nur eine minimale Heilungschance eröffnet werden. Ein HLA-identischer Fremd- oder Familienspender stand nicht zur Verfügung. Als ungünstiger Parameter wurde gewertet, wenn die prognostizierte 5-Jahres-Überlebensrate unter 20% lag.

Als haploidentische Spender kamen in erster Linie die leiblichen Kinder, Geschwister und Eltern in Frage. Die Auswahl erfolgte nach üblichen Kriterien wie HLA-Status, Virus-Serologie, Alter, Geschlecht und Zahl der Schwangerschaften.

2.3 Mobilisation peripherer Blutstammzellen

Eine Mobilisierung der peripheren Stammzellen erfolgte durch die Vorbehandlung der Spender mit G-CSF. Der Spender erhielt bis zur abgeschlossenen Apherese 2 x 12 µg/kg KG G-CSF täglich. Die erste Apherese wurde am vierten Tag nach Beginn der Mobilisation begonnen und an den Tagen 5, 6 und 7 wiederholt, sofern noch keine ausreichende Ausbeute an CD34⁺-Zellen vorlag.

2.4 Leukapherese

Die Leukapherese erfolgte über einen peripheren Zugang und nur wenn dies nicht möglich war über einen zentralvenösen Zugang. Durchgeführt wurde die Leukapherese mit Hilfe eines Baxter Fenwal CS 3000 Blutzellseparators. Es wurden etwa 10 Liter Vollblut pro Apherese prozessiert. Eine Gesamtzahl von 10 x 10⁶ CD34⁺-Zellen wurde angestrebt, weshalb unmittelbar nach jeder Apherese Aliquots durchgeführt wurden, um

die Zahl der nukleären Zellen und die Zahl der CD34⁺-Zellen zu bestimmen. Danach wurde das Leukaphereseprodukt bis zum nächsten Morgen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Wenn die Gesamtzahl nicht erreicht wurde, erhielt der Spender weiterhin G-CSF und am Folgetag wurde eine weitere Apherese durchgeführt.

2.5 CD34-Selektion

Das Verfahren zur Selektion der Stammzellen beruht auf einer immunmagnetischen Markierung der CD34⁺-Zellen. Unter Beachtung des Nutzungsprotokolls des CliniMACS® Gerätes wurde das vom Spender gewonnene Apheresat mit dem CD34-Antigen (CliniMACS® CD34 Reagenz) inkubiert und mit entsprechender Menge Puffer versetzt. Nach ausreichender Zentrifugation und Aufreinigung trennte der Automat die Zellfraktionen in CD34⁺-Zellen und CD34⁻-Zellen (siehe Abbildung 2.1). Das Protokoll entspricht den Angaben der Firma Miltenyi.

Die überbleibende CD34-depletierte Zellfraktion wird zur Gewinnung der CD56⁺-Zellen verwendet. Aufgrund des bereits bekannten Verfahrens zur Trennung der CD34⁺-Zellen wurde hier nur kurz auf das Prozedere eingegangen. Man erhält ein hochaufgereinigtes Blutstammzellapheresat.

2.6 CD56-Selektion

Das Verfahren isoliert die NK-Zellen aus der CD34⁻-Zellfraktion unter Verwendung der spezifischen Selektionsprogramme des CliniMACS^{plus}® Gerätes (siehe Abbildung 2.1). NK-Zellen besitzen charakteristischerweise auf ihrer Zelloberfläche das CD56 Antigen, es fehlt ihnen jedoch das Antigen CD3. Daher ist eine Trennung unter Verwendung zweier unterschiedlicher Antikörper nacheinander erforderlich, um NK-Zellen in höchster Reinheit zu isolieren. Die Trennung der CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen erfolgte durch eine CD3- Depletion mit anschließender Selektion CD56⁺-Zellen aus der depletierten Fraktion.

Die Depletion der T-Zellen erfolgte durch immunmagnetische Markierung von CD3⁺-Zellen mit anschließender negativer Selektion unmarkierter Zellen. Vor der Markierung der CD3⁺-Zellen wurde die Gesamtzahl der Leukozyten in der Probe bestimmt. Je nach Probengröße wurde zur Markierung des CD3-Antigens das Reagenz „CliniMACS® CD3 T Cell MicroBeads“ in entsprechender Menge zugegeben. Zur Inaktivierung und

Bedeckung der Beutel und Leitungen des Gerätes wurde dem CliniMACS® PBS/EDTA Puffer ein HSA-Puffer in der Endkonzentration von 0,5% zugegeben.

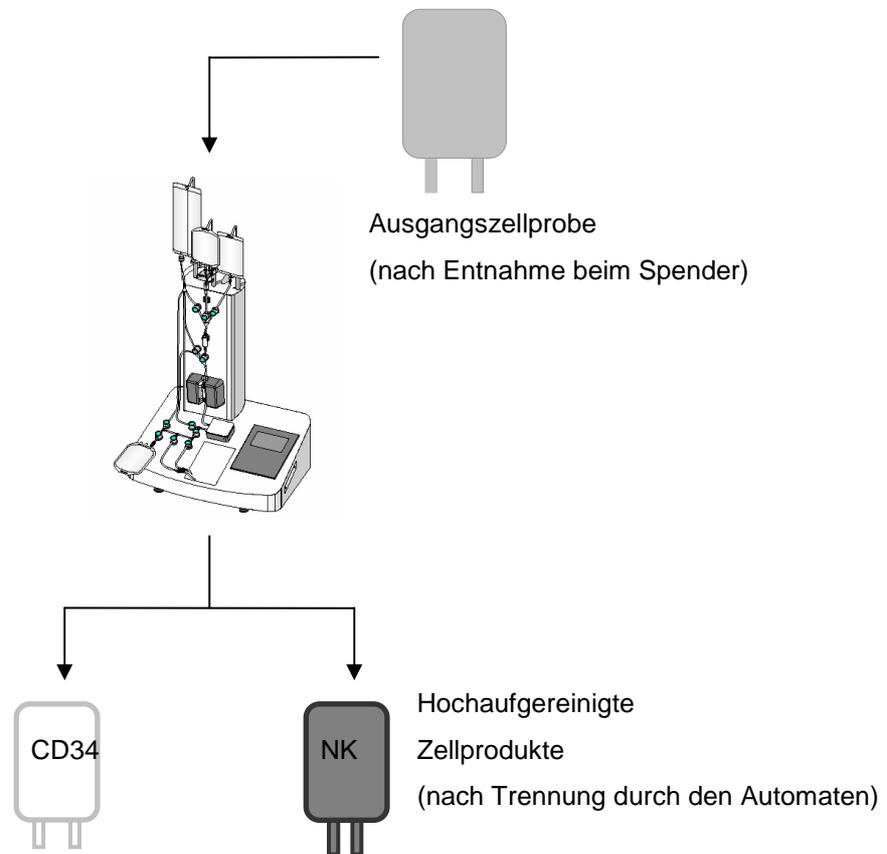


Abbildung 2.1: *Automatisiertes Aufreinigungsverfahren zur Gewinnung hochreiner Zelllösungen.*

Zunächst erfolgte die Überführung des Leukaphereseprodukt in den „Cell Preparation Bag“. Dieser Beutel wurde mit HSA-Puffer angereichertem CliniMACS® PBS/EDTA-Puffer versetzt und anschließend 15 Minuten bei 300 x g (Raumtemperatur 19-25°C) mit ausgeschalteter Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein Endvolumen von 95 ml für bis zu 30×10^9 WBC, oder 150ml für 30×10^9 - 60×10^9 WBC entfernt.

Der entstehenden Zellsuspension wurde „CliniMACS® T-Cell CD3 MicroBeads“ (7.5 mL, Ref.No. 176-01) zugegeben und gut gemischt. Es folgte eine Inkubation des Präparationsbeutels über 30 Minuten bei 19-25°C auf einem Orbitalschüttler mit maximal 25 rpm. Die Probe wurde anschließend nochmals mit PBS/EDTA/HSA

CliniMACS® Puffer versetzt. Nach diesen Arbeitsschritten wurde ein Teil der Probe auf Gesamtzellzahl, Viabilität sowie Frequenz/Zahl CD3⁺-Zellen analysiert.

Zum endgültigen Starten der automatisierten Trennung wurde beim eingeschalteten CliniMACS^{plus}® Gerät das Programm „DEPLETION 2.1“ gewählt und je nach Probengröße das geeignete Schlauchsystem verwendet. Nach Abschluss des Trennvorganges wurden die drei Beutel (Cell Collection Bag; Negative Fraction Bag; Buffer Waste Bag) gewogen und 0,5 ml zur durchflußzytometrischen Analyse (siehe Beispiel Bild 2.2) aus jedem Beutel entnommen.

Die anschließende Anreicherung CD56⁺-NK-Zellen erfolgte durch immunmagnetische Markierung des CD56-Antigens in der CD3⁻-Zellfraktion des vorangegangenen Schrittes. Anschließend trennte das Gerät die Probe ähnlich dem Trennverfahren der CD34-Selektion. Man erhält eine CD56⁺CD3⁻ Zellprobe in hoher Reinheit.

Der Cell Preparation Bag (= Cell Collection Bag bei der CD3-Depletion) wurde mit dem HSA angereicherten CliniMACS PBS/EDTA Puffer versetzt und dann 15 Minuten bei 300 x g mit ausgeschalteter Bremse bei Raumtemperatur (19 – 25 °C) zentrifugiert. Nachfolgend wurde der Überstand entfernt, so dass ein Endvolumen von 20 ml/10x10⁹ WBC übrig blieb. Der anschließend erstellten Resuspension werden 2,5 ml CD56 Microbeads auf 20 ml Suspension zugegeben. Nach Mischen der Probe wurde der Cell Preparation Bag 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler bei maximal 25 rpm inkubiert. Dann wurde das Zellgemisch nochmals mit dem HSA-Puffer angereicherten CliniMACS PBS/EDTA Puffer versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur und 300 x g bei ausgeschalteter Bremse zentrifugiert. Nach Entfernung des Zellüberstandes wurde auf 150 ml mit dem HSA/PBS/EDTA Puffergemisch resuspendiert. Schließlich wurden 0,5 ml der Probe auf Gesamtzellzahl, Viabilität und Frequenz/Zahl CD3⁺-Zellen untersucht.

Die Probe wurde anschließend wieder mit dem PBS/EDTA/HSA Puffer unter Verwendung eines Transfer Sets versetzt. Am Gerät wurde nach dem Einschalten das Programm ENRICHMENT 1.1 gestartet.

Nach Ende des Trennvorganges wurden der Cell Collection Bag, der Negative Fraction Bag und der Buffer Waste Bag gewogen. Allen drei Proben wurde ein Volumen von 0,5 ml entnommen und durchflußzytometrisch untersucht (siehe Beispiel in Abbildung 2.2). Als Ergebnis liegen hochaufgereinigte CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen vor.

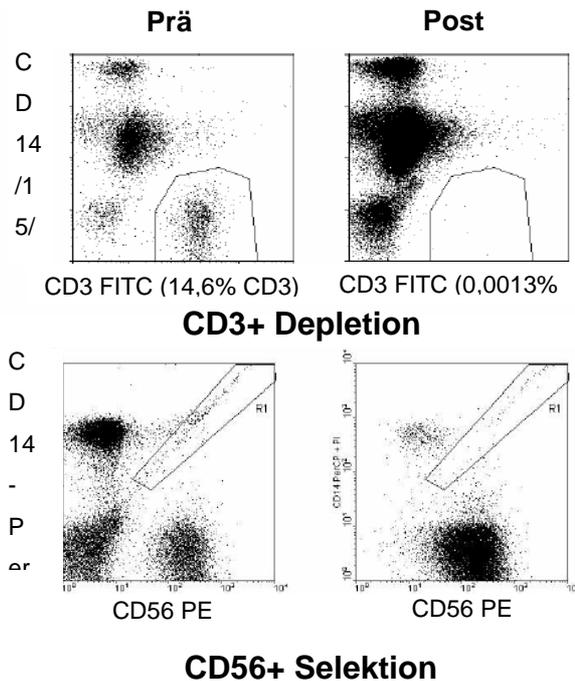


Abbildung 2.2: Durchflußzytometrische Bestimmung der Zellfraktionen in der Probe

2.7 Konditionierung des Transplantatempfängers, Transplantation und Injektion der NK-Zellen

Die Konditionierung bestand aus einer fraktionierten Ganzkörperbestrahlung mit einer Gesamtdosis von 12 Gy, die über insgesamt sechs Einzeldosen an drei Tagen gegeben wurde (Tag -10 bis -8). Alternativ war eine Behandlung mit Busulfan in einer Dosierung von 16 mg/m^2 über vier Tage möglich.

Anschließend erfolgte die Infusion von Thiothepa in einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht des Empfängers (Tag -6) gefolgt von einer fünftägigen Fludarabininfusion (30 mg/m^2) vom Tag -6 bis Tag -2. Zur Abstoßungsprophylaxe wurde zusätzlich OKT3 vom Tag -4 bis +2 als Dauerinfusion infundiert (siehe Abbildung 2.3). Dieses Vorgehen basiert mit leichter Abänderung auf dem erprobten Protokoll des Transplantationszentrums Perugia (16). Bei Patienten, die in den vorhergegangenen sechs Monaten schon einmal transplantiert worden sind, wurde auf die Gabe von Thiothepa und auf die fraktionierte Bestrahlung verzichtet (siehe Abbildung 2.4). Die supportive Therapie während der Konditionierung entsprach den üblichen Richtlinien.

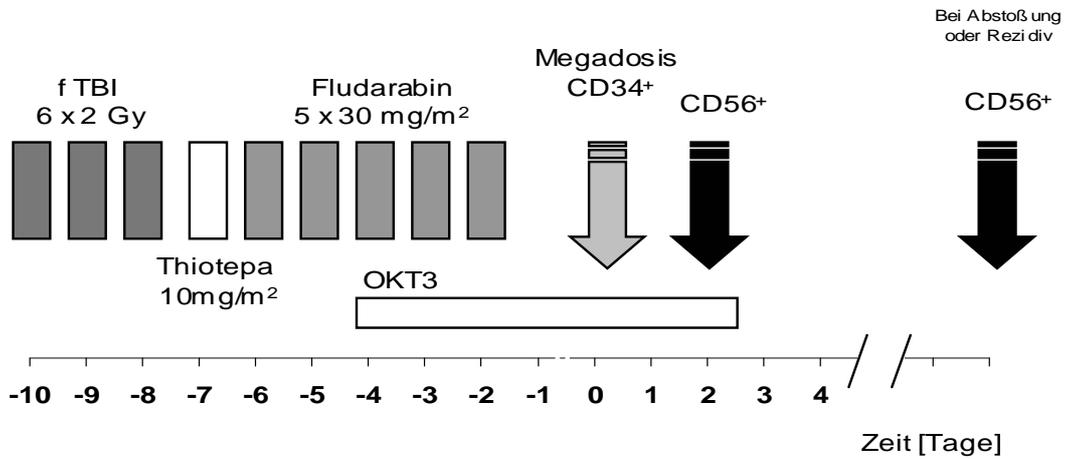


Abbildung 2.3: Konditionierungsschema bei Patienten ohne vorhergegangene Transplantation in den letzten sechs Monaten. N=4

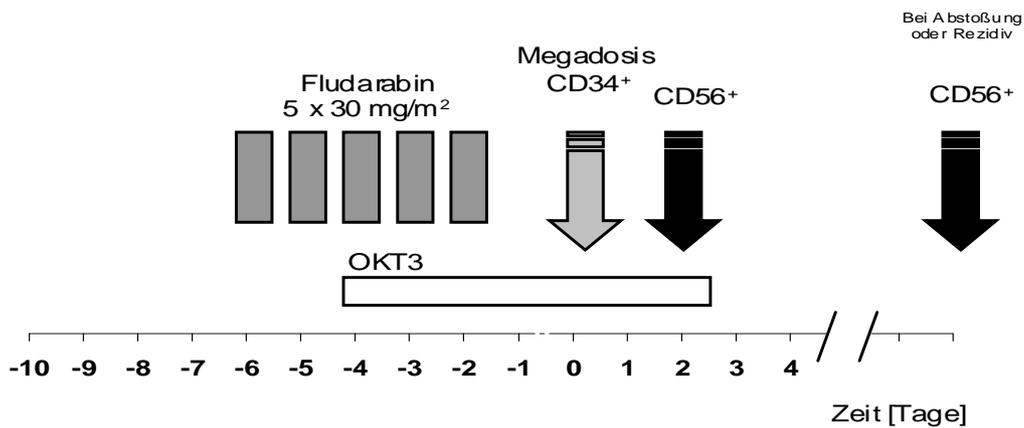


Abbildung 2.4: Konditionierungsschema bei Patienten nach vorangegangener Transplantation in den letzten sechs Monaten vor Behandlungsbeginn. N=2

Die Infusion der peripheren Blutstammzellen erfolgte am Tag 0, definiert als der Tag der Stammzellrückgabe. Diese CD34⁺-Zellfraktion wurde über einen zentralvenösen Zugang appliziert. Wenn mehrere Leukapheresate zur Erreichung der Gesamtzahl an Stammzellen nötig waren, dann wurden alle Produkte am gleichen Tag injiziert (Tag 0).

Die Injektion der NK-Zellen erfolgte am Tag 2 nach Transplantation über einen Zeitraum von 60 Minuten ebenfalls über den zentralvenösen Zugang. Anschließend wurden die Patienten hinsichtlich schwerer Sofortreaktionen, GvH-Reaktionen und anderen Komplikationen überwacht.

2.8 Supportive Maßnahmen

Die supportiven Maßnahmen entsprachen den üblichen Standards für die Fremdspondertransplantation. Zusätzlich erfolgte eine Prophylaxe von eventuellen Pilzinfektionen mit der routinemäßigen Gabe von liposomalem Amphotericin B (Ambisome®) von Tag -1 bis Tag +30 in einer Dosierung von 50 mg jeden zweiten Tag. Ebenfalls wurde eine intensivierete antivirale Prophylaxe mit Gangciclovir und Acyclovir entsprechend dem Schema aus Tabelle 2.1 durchgeführt.

Medikament	Zeitraum	Dosis
Gangciclovir	Tag -10 bis -1	10 mg/kg KG
	Tag+5 bis +15	10 mg/kg KG
Acyclovir	Tag 0 bis + 4	3 x 500 mg/m ² i.v.
	Tag +30 bis Tag +80	30 mg/kg KG p.o.
Ambisome	Tag -10 bis +30	50 mg
Itraconazol	Tag +30 bis +80	2 x 1 Kps.

Tabelle 2.1: *Prophylaktische antivirale und antimykotische Therapie vor und nach Transplantation haploidenter peripherer Stammzellen*

2.9 Prophylaxe, Erfassung und Behandlung von GvH-Reaktionen

Die Entfernung der T-Lymphozyten aus dem Transplantat stellte die einzige Maßnahme zur Prophylaxe der GvH-Reaktion dar. Es erfolgte keine routinemäßige Gabe von

Cyclosporin A oder Methotrexat. Traten Zeichen einer GvH-Reaktion auf wurden sie entsprechend den Glucksberg-Kriterien erfasst und klassifiziert (79). Während der Hospitalisierung erfolgte eine tägliche, nach Entlassung eine wöchentliche Beurteilung der GvHD-Kriterien. Die Beurteilung über Ausmaß und Vorhandensein einer GvH-Reaktion beinhaltete die Bestimmung von Bilirubin, GOT, GPT, LDH und AP. Falls es für die Differentialdiagnose und weitere Therapie unerlässlich war, erfolgte eine Biopsie des betroffenen Organs. Trat eine GvH-Reaktion der Grade II-IV auf, erfolgte eine den klinischen Umständen entsprechende intravenöse Therapie mit Methylprednisolon.

2.10 Test auf zytolytische Aktivität von NK-Zellen

Zur Evaluation der NK-Zellaktivität gegenüber einer NK-sensitiven Leukämiezelllinie (K562) und einer NK-resistenten Zelllinie (ML2) wurde ein spezieller Test angewandt. Zur Überprüfung der zytolytischen Aktivität von NK-Zellen werden hierbei die Zielzellen zunächst mit einem grünen Membranfarbstoff (DiO) gefärbt, um sie später von den nicht gefärbten NK-Zellen unterscheiden zu können. Bei der folgenden Koinkubation von NK-Zellen und gefärbten Zielzellen wird die Membran einiger Zielzellen durch das Perforin der NK-Zellen perforiert und damit zerstört. Anschließend werden die Zellen mit Propidiumiodid, einem roten DNA-Farbstoff, der nur in Zellen mit perforierter Zellmembran eindringen kann, gegengefärbt. Durch dieses Vorgehen werden nur die Zellkerne der zerstörten Zielzellen angefärbt. Bei einer Analyse der Zellen im Durchflußzytometer, können Effektorzellen von Zielzellen durch die grüne Membranfärbung der Zielzellen mit DiO und lebende von toten Zellen durch die rote Färbung mit Propidiumiodid unterschieden werden. Auf durchflußzytometrischer Basis wurde so die Aktivität vor und nach Zytokinstimulation in unterschiedlicher Effektor-Target-Relation getestet. Sofern die Möglichkeit bestand, wurden die Spender-NK-Zellen zusätzlich gegen die Leukämiezellen des Empfängers getestet. Das Verfahren bestimmt floureszenzzytometrisch die Zytolyse und Apoptose von Tumorzellen bei Kontakt mit z.B. NK-Zellen, zytotoxischer Granula (Perforin/Granzymes) und Zytostatika.

2.11 Leukämiediagnostik

Zur umfassenden Charakterisierung der Leukämie des Patienten wurden zytogentische, zellbiologische und immunologische Untersuchungen an eingefrorenen Leukämiezellen des Patienten durchgeführt, sofern die Zellen im Vorfeld der Behandlung asserviert werden konnten.

Die Untersuchungen sollten folgende Ziele haben:

1. Bestimmung des exakten Karyotyps
2. Quantifizierung der minimalen Resterkrankung zum Zeitpunkt der Transplantation und im weiteren Verlauf
3. Feststellung, ob die Leukämie prinzipiell einer immuntherapeutischen Behandlung zugänglich ist oder primär als resistent gegenüber diesem Ansatz angesehen werden muss.

Die Reaktion der Leukämiezellen wurde bei bestimmten Fragestellungen zusätzlich gegenüber bestimmten Reagenzien (z.B. Perforin) und den Spender-NK-Zellen getestet.

2.12 Erfassung der Immunrestitution

Differentialblutbilder wurden vor, während und nach der Behandlung in regelmäßigen Abständen durchgeführt. Bei Leukozytenzahlen unter 500/nl wurde kein Differentialblutbild bestimmt. Während der Konditionierung und nach der Stammzellinfusion wurden tägliche Blutbildkontrollen bis zum Erreichen einer Leukozytenzahl über 3000/nl an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Danach erfolgte eine Blutbildkontrolle in etwa wöchentlichem Abstand.

Zur Erfassung immunologisch relevanter Zellpopulationen wurden unmittelbar vor Transplantation Spender und Empfänger auf die Zahl der peripheren Zellen mit Expression von CD3, CD4, CD8, CD56, CD3/CD4, CD3/CD8, CD3/CD56 untersucht. Nach Transplantation sind routinemäßig Kontrollen an den Tagen 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84 und 100 erfolgt, solange der Zustand des Patienten dies zuließ. Andernfalls wurde die Entnahme sobald wie möglich nachgeholt. Bei einigen Patienten kam es zu häufigeren Untersuchungen. Nach Tag 100 wurden ebenfalls weitere Rekonstitutionsuntersuchungen vorgenommen.

Zur Erfassung der Rekonstitution des NK-Zellrepertoires wurden die Untersuchungen aus technischen Gründen ausschließlich bei den Patienten 3, 5, 6 und 7 durchgeführt. Um den Verlauf der Rekonstitution zu erfassen sind Untersuchungen an den NK-Zellen des Spenders, des Empfängers vor Transplantation und des Empfängers nach Transplantation an Tag 30, 60 und 90 erfolgt, wenn eine ausreichende Menge NK-Zellen asserviert werden konnten. Diese Untersuchungen sind in Düsseldorf

vorgenommen worden. Es wurde die Expression der Rezeptortypen p50.3, NKB1, CD158a, KIR-NKAT2, NKG2A und CD94 auf NK- und T-Zellen gemessen.

2.13 Statistische Methodik

Zur Analyse der Zellseparationsdaten wurden Mittelwert und Standardabweichung der Daten der durchgeführten Untersuchungen ermittelt. Damit soll gezeigt werden, dass das angewandte Verfahren gleichbleibend effektiv mit wenig Abweichung besonders bei der Anreicherung von Zellen (CD34⁺, CD56⁻) oder der Depletion von Zellen genutzt werden kann.

Die Auswertung des klinischen Verlaufs erfolgte durch Beschreibung der sechs Einzelfälle, da eine statistische Auswertung dieser Daten auf Grund der geringen Fallzahl als nicht sinnvoll erschien. Zur Verdeutlichung der Tendenz wurde bei den Engraftmentzeichen der jeweilige Median ausgewiesen.

Zur Auswertung der immunologischen Rekonstitution wiederum wurden die Werte verglichen und wegen der auffallenden Unterschiede im Verlauf in zwei Gruppen geteilt. In der jeweiligen Gruppe wurden Mittelwert und Standardabweichung gebildet und die Blutwerte der unterschiedlichen Tage in sinnvolle Zeiteinheiten zusammengefasst.

Für die Analyse der NK-Zell- und T-Zellrezeptoren und deren veränderten Expression, wurde die prozentuale Spender-NK-Zellzahl (bzw. T-Zellzahl) genommen, die einen bestimmten Rezeptor exprimiert, und hiervon die prozentuale Empfänger-NK-Zellzahl (bzw. T-Zellzahl) des jeweiligen Untersuchungszeitpunktes abgezogen. Als Resultat hat man die prozentuale Veränderung der NK- bzw. T-Zellen, die den jeweiligen Rezeptor exprimieren.

3 Ergebnisse

3.1 Technischer Teil

3.1.1 CD34-Selektion

Die Selektion der CD34⁺-Zellen nach der Apherese verlief bei allen Patienten problemlos und erbrachte erwartungsgemäße Parameter.

Patient/No.	WBC	CD34+	CD34+	Ausbeute	Reinheit	CD34+	CD34+	Vitalität
	($\times 10^8$) pre	(%) pre	($\times 10^8$) pre			($\times 10^8$) post	cells/kg ($\times 10^6$)	n. Selektion in %
1/1	690	0,62	4,278	100	98,89	6,804	8,8	94,76
1/2	780	0,66	5,148	100	99,13	6,82	8,9	94,27
2/1	693,8	1,24	8,603	85,1	97,16	7,319	9,5	99,1
2/2	1297,2	0,79	10,248	78,9	94,74	8,081	10,5	99,3
3/1	847,5	0,56	4,746	95,3	98,14	4,521	5,9	97,4
3/2	1035	0,64	6,624	92,75	97,52	6,144	8,1	99,1
4/1	1252,2	0,48	6,01	94,7	96,47	5,692	9,3	94,97
4/2	1124	0,64	7,194	86,2	95,41	6,202	10,16	99,76
5/1	950	0,665	6,318	89,9	98,5	5,681	11,4	98,58
5/2	793,8	0,76	6,033	98,4	91,4	5,937	11,9	98,37
6/1	599,5	1,13	6,775	100	98,59	7,718	8,1	98,9
6/2	633,4	1,24	7,854	73,76	98,75	5,793	6,1	98,9
6/3	724,7	0,995	7,211	93,23	99,295	6,723	9,6	99,6
6/4	891,5	0,83	7,355	84,4	98,55	6,209	8,5	99,2
6/5	240,2	0,61	1,465	98	82,76	1,435	2	99
7/1	827,4	0,995	8,232	83,89	94,92	6,906	9,9	99,48
7/2	553,9	1,295	7,173	86,23	98,49	6,185	8,8	98,78
Mittelwert	819,65	0,83	6,55	90,63	96,40	6,13	8,67	98,42
Strdabw.	263,46	0,26	1,96	7,92	4,09	1,48	2,32	1,59

Tabelle 3.1: Transplantatzusammensetzung nach CD34-Selektion. Die Reinheit liegt im Mittel bei 96,4%, die Ausbeute bei 90,6%. Die Vitalität lag nach der CD34-Selektion durchschnittlich bei 98,4%.

Im Mittel hatte das Apheresat $819,65 \times 10^8$ Leukozyten (Standardabweichung $263,46 \times 10^8$) und enthielt vor der Selektion durchschnittlich 0,83% CD34⁺-Zellen (Wertebereich 0,48-1,295%; Standardabweichung 0,26%). Nach der Selektion enthielt die positive Fraktion im Mittel $6,13 \times 10^8$ CD34⁺-Zellen (Wertebereich 1,435 - $8,081 \times 10^8$; Standardabweichung $1,96 \times 10^8$), das Zellseparationsgerät (CliniMACS®) erreichte

damit eine durchschnittliche Ausbeute von 90,63% (Standardabweichung 7,92%) und eine Reinheit in der Positivfraktion von 96,4% (Standardabweichung 4,09%). Die im Studienprotokoll angestrebte Mindestmenge von 6×10^6 CD34⁺-Zellen pro kg Körpergewicht des Empfängers wurde immer nach zwei CD34-Selektionen erreicht, sie betrug im Schnitt nach einmaliger Prozedur $8,67 \times 10^6$ CD34⁺ Zellen/kg (Standardabweichung $2,32 \times 10^6$). Die Daten sind in Tabelle 3.1 zusammengestellt.

Patient/No.	WBC ($\times 10^8$) pre	CD3+ ($\times 10^8$)pre	CD3+ ($\times 10^6$)post	Log- Depletion	CD3+ cells/kg ($\times 10^4$)
1/1	690	172,5	0,275	4,8	0,36
1/2	780	163,8	0,55	4,47	0,71
2/1	693,8	178,79	6,325	3,45	8,21
2/2	1297,2	150,48	0,256	4,77	0,33
3/1	847,5	n.a.	0,23	n.a.	0,3
3/2	1035	n.a.	0,819	n.a.	1,08
4/1	1252,2	162,79	1,888	3,94	3,09
4/2	1124	139,38	2,015	3,84	3,3
5/1	950	210,24	0,115	5,26	0,23
5/2	793,8	138,84	0,325	4,63	0,64
6/1	599,5	224,81	0,391	4,76	0,41
6/2	633,4	172,28	0,235	4,87	0,25
6/3	724,7	313,09	0,237	5,12	0,34
6/4	891,5	274,54	0,189	5,16	0,26
6/5	240,2	29,3	0,173	4,23	0,24
7/1	827,4	287,1	0,509	4,75	0,73
7/2	553,9	130,17	5,024	3,41	7,18
Mittelwert	819,65	183,21	1,15	4,50	1,63
Strdabw.	263,46	71,20	1,81	0,60	2,47

Tabelle 3.2: Stammzelltransplantat nach T-Zelldepletion. Durchschnittlich wurde der Anteil der CD3⁺-Zellen um 4,5-log-Stufen verringert.

Nächstes Augenmerk galt der Reduktion der T-Zellen im Transplantat, wegen ihrer Fähigkeit Graft-versus-Host-Reaktionen zu verursachen. Die Depletion der CD3⁺-Zellen aus dem Stammzelltransplantat erfolgte durch die Positivselektion der CD34⁺-Zellen. Dieses Verfahren ermöglichte eine sehr hohe Stammzellausbeute (durchschnittlich 90,63%, s. Tabelle 3.1) und senkte gleichzeitig die Zahl CD3⁺-Zellen um durchschnittlich 4,5 Logarithmusstufen (Wertebereich von 3,41 – 5,26; Standardabweichung 0,6). Es wurde somit eine durchschnittliche Elimination CD3⁺-

Zellen von $183,21 \times 10^8$ (Wertebereich $29,3 \times 10^8 - 313,09 \times 10^8$; Standardabweichung 71,2) auf $1,15 \times 10^6$ Zellen (Wertebereich $0,12 - 6,33 \times 10^6$; Standardabweichung $1,81 \times 10^6$) erreicht. Die transplantierte Menge CD3⁺-Zellen pro kg Körpergewicht des Empfängers betrug im Mittelwert $1,63 \times 10^4$ Zellen/kg (Wertebereich $0,23 - 8,21 \times 10^4$; Standardabweichung $2,47 \times 10^4$). Die genannten Daten können Tabelle 3.2 entnommen werden. Die angewandte Methode zeigte damit, dass sie eine ausreichende Depletion der CD3⁺-Zellen erbrachte und gleichzeitig genügend vitale CD34⁺-Zellen zur Transplantation zur Verfügung stellte. Die Anforderungen an das Transplantat hinsichtlich Sterilität und Kontamination durch CD3⁺-Zellen erfüllen die im Studienprotokoll genannten Eckdaten.

3.1.2 CD56-Selektion

Ziel der CD56-Selektion ist das Bereitstellen eines Infusionsproduktes, das dem Patienten die Gabe eines hochaufgereinigten Zellgemisches mit CD56⁺-Zellen ermöglicht. Gleichzeitig muss diese Infusionslösung alle Bestimmungen hinsichtlich der geforderten Sterilität erfüllen und darf wegen der Gefahr schwerwiegender Graft-versus-Host-Reaktionen nur einen äußerst geringen Anteil an CD3⁺-Zellen enthalten. Das Verfahren erfüllte die genannten Ziele.

Patient/No.	WBC ($\times 10^9$)	CD3 ⁺ (%)		CD3 ⁺ ($\times 10^8$)		Log Depletion	CD3 ⁺ $\times 10^4$ cells/kg
		pre	post	pre	post		
1	589	37,49	0,007	215	0,0343	3,8	4,4
2	800	34,5	0,007	263	0,02	4,12	3,3
3	880,2	10,3	0,02	90,66	0,1757	4,71	23,1
4	1100	15,5	0,24	129,4	1,2	2,03	196,7
5	934,7	20,82	0,03	194,6	0,063	3,49	12,1
6/1	616,25	35,72	0,03	220,12	0,04	3,74	4,2
6/2	817,4	7,9	0,05	64,57	0,166	2,59	22,7
7/1	551,2	41,51	0,045	217,15	0,12	3,26	17,1
7/2	194,7	30,72	0,11	59,81	0,095	2,8	15,3
Mittelwert	720,38	26,05	0,06	161,59	0,21	3,39	33,21
Standardabweichung	265,61	12,61	0,07	76,3	0,37	0,82	61,78

Tabelle 3.3: Zusammensetzung des NK-Zellgabeproduktes, CD3-Depletion. Bei der Bereitung des NK-Zellgabeproduktes wurde die Anzahl der CD3⁺-Zellen durchschnittlich um 3,4-log-Stufen verringert. Die NK-Zellinfusionslösung enthielt im Mittel schließlich nur noch $0,21 \times 10^8$ CD3⁺-Zellen, diese Zellfraktion hatte nur noch einen Anteil von 0,06% am Gesamtzellbestand.

Bei der Depletion der CD3⁺-Zellen zur Erzeugung eines möglichst reinen CD56⁺CD3⁻ Zellgemisches wurden im Durchschnitt 720 x10⁸ Leukozyten (Wertebereich von 194,7 x 10⁸ – 1100 x 10⁸) als Ausgangsmaterial verwendet. Durch die Negativselektion konnte die Zahl CD3⁺-Zellen im Mittel um 3,39 Loggstufen (Standardabweichung 0,82) verringert werden. Wie in Tabelle 3.3 zu sehen wurde ein durchschnittlicher Gehalt von 33,21 x10⁴ CD3⁺-Zellen pro kg Körpergewicht des Empfängers (Wertebereich 3,3 x 10⁴ – 196,7 x 10⁴) erreicht. Im Mittel wurde der CD3⁺-Zellgehalt von 26,05% (Standardabweichung 12,61%) auf 0,06% (Standardabweichung 0,07%) gesenkt. Die Verringerung der CD3⁺-Zellen durch diesen Selektionsschritt ist sehr hoch und verstärkt den gewünschten Effekt dem Patienten möglichst wenig CD3⁺-Zellen zu übertragen. Mit der anschließenden CD56-Anreicherung beginnt der letzte Schritt zur Erstellung des benötigten Infusionsgemisches.

Anreicherung No.	WBC	CD56+	CD56+	CD56+	Ausbeute	Reinheit	CD56+	CD3+	Vitalität n. CD56- Anreicherg.
	(x10 ⁸) pre	(%) pre	(x10 ⁸) pre	(x10 ⁸) post			x10 ⁶ cells/kg	x10 ⁴ cells/kg	
1	315	0,34	1,07	0,424	39,6	7,11	0,55	n.a.	99,36
2	345	1,37	4,02	4,69	100	81,79	7,8	1,04	92,25
3	503,7	2,04	10,28	9,82	95,5	56,88	10	1,82	98,81
4	557,3	1,8	10,031	5,589	55,7	68,24	9,16	13,84	99,07
5	210	4,24	8,904	6,6969	75,2	66,24	12,9	7,38	98,61
6/1	118,8	14,28	16,96	4,638	27,35	94,46	4,88	0,57	99,06
6/2	355	1,08	3,62	10,85	100	70,48	13	13,56	61,44
7/1	285	11,8	33,63	13,98	41,6	89,75	8,33	3,79	83,45
7/2	79,3	12,77	10,13	10,435	100	93,17	14	3,06	90,91
Mittelwert	307,68	5,52	10,96	7,46	70,55	69,79	8,96	5,63	91,44
Strdabw.	159,02	5,70	9,72	4,15	29,85	26,95	4,29	5,41	12,50

Tabelle 3.4: NK-Zellgabeprodukt. Bei der CD56-Anreicherung betrug die Reinheit im Mittel 69,8%, die Ausbeute 70,6%. Die Vitalität lag nach der Anreicherung bei durchschnittlich 91,4%.

Die Positivselektion der CD56⁺-Zellen erbrachte eine Reinheit des Zellgemisches von durchschnittlich 69,79% (Wertebereich, 7,11% - 94,46%, Standardabweichung 26,95%). Die Ausbeute dieser Methode betrug im Durchschnitt 70,55% (Standardabweichung 29,85%); das endgültige Injektionsprodukt enthielt damit durchschnittlich 8,96 x 10⁶ CD56⁺-Zellen pro kg Körpergewicht des Empfängers (Wertebereich von 0,55 x 10⁶ –

14,0 x 10⁶ Zellen/kg) und 5,63 x 10⁴ CD3⁺-Zellen pro kg Körpergewicht des Empfängers. Die Kombination der CD3-Depletion und der CD56-Anreicherung zeigte in den vorliegenden Fällen eine gute Selektion der benötigten CD56⁺CD3⁻-Zellen, die Erzeugung des Zellproduktes gelang zuverlässig. Das CliniMACS®-Gerät gewährleistete bei jeder Prozedur ein einwandfreies und steriles Zellprodukt. Weitere Daten können Tabelle 3.4 entnommen werden.

3.1.3 Funktionskontrolle der CD56-positiven Zellen

Die Spender NK-Zellen wurden in sogenannten Zytotoxizitätstests gegen zwei unterschiedliche Zellpopulationen (ML2 und K562) getestet. Dabei waren die NK-Zellen teilweise mit IL2 aktiviert. Während der Zellklon K562 prinzipiell sensibel gegenüber den NK-Zellen ist, weist ML2 eine Resistenz gegen Perforin auf, die Haupteffektorsubstanz der NK-Zellen. Im Falle von Patientin 7 wurden die NK-Zellen zusätzlich gegen ihre eigenen Blasten getestet.

Bei Patient 2 wurden die NK-Zellen vor der Transplantation untersucht. Die Abbildung 3.1 zeigt, dass die Spender-NK-Zellen gegen den Zellklon ML2 kaum Wirksamkeit entfalten und auch in der aktivierten Form nur eine maximale Lyse von 7,48% erreichten. Ohne IL2-Aktivierung führte erst eine Effektor-Target-Relation von 40:1 zu einer leichten Lyse. Gegen K562 jedoch erreichten die NK-Zellen eine spezifische Lyse von 62,02% im aktivierten Zustand (E:T 10:1). Die Ergebnisse zeigen deutlich erhöhte Lyseeigenschaften der mit IL2-aktivierten NK-Zellen.

Die Zytotoxizitätsteste der NK-Zellen von Patient 3 ergaben ein ähnliches Ergebnis (siehe Abbildung 3.2). Die Untersuchung der NK-Zellen erfolgte jedoch aus technischen Gründen bei diesem Patienten erst nach der Transplantation. Hier zeigten also auch die bereits transplantierten Zellen eine gute Fähigkeit zu Lyse von K562 in vitro auf. Der Vorteil aktivierter NK-Zellen ist bei Patient 3 noch eindrucksvoller.

Die NK-Zellen von Patient 4 wurden aus technischen Gründen nur gegen K562 getestet. Jedoch wurden nicht nur die Spenderzellen sondern auch die Zellen vom Empfänger untersucht. Erneut lässt sich der Vorteil der Aktivierung erkennen. Die Spender-NK- sowie die Empfänger-NK-Zellen konnten höhere Lyseraten im aktivierten Zustand erreichen als im nativen Zustand. In diesem Fall lässt sich außerdem ein Vorteil der Spender-NK-Zellen gegenüber den Empfänger-NK-Zellen erkennen. Die Lyse der Empfängerzellen bei einer Effektor-Target-Relation von 40:1 liegt bei 35,5%, jedoch

erreichen die aktivierten Spenderzellen in gleicher Konzentration eine Lyserate von 70,63% (siehe Abbildung 3.3).

Die Zytotoxizitätsteste bei den Patienten 5, 6 und 7 wurden aus technischen Gründen jeweils erst nach der Transplantation durchgeführt. Zusehen ist wie auch schon bei den vorherigen Patienten, dass insbesondere die Lyse gegen K562 deutlich erfolgreicher verläuft als gegen ML2 und dass die IL2-aktivierten Zellen eine höhere Lyserate in vitro erreichen. Bei Patient 6 sind die Zytotoxizitätsteste nur nach der ersten Transplantation, also mit den NK-Zellen des ersten Spenders, durchgeführt worden. Die Daten sind in den Abbildungen 3.4 – 3.6 zusammengefasst.

Nachdem die Funktionskontrolle auch bei Patientin 7 erfolgreich war, der Therapieverlauf jedoch gerade bei dieser Patientin auf ein Rezidiv hinwies, wurde die Aktivität der NK-Zellen der Patientin und des Wirkstoffs Perforin nochmals einer genaueren Untersuchung unterzogen und zusätzlich gegen die eigenen Blasten getestet. Diese Ergebnisse sind im Kapitel „3.2.2.5 Rezidive“ dargestellt.

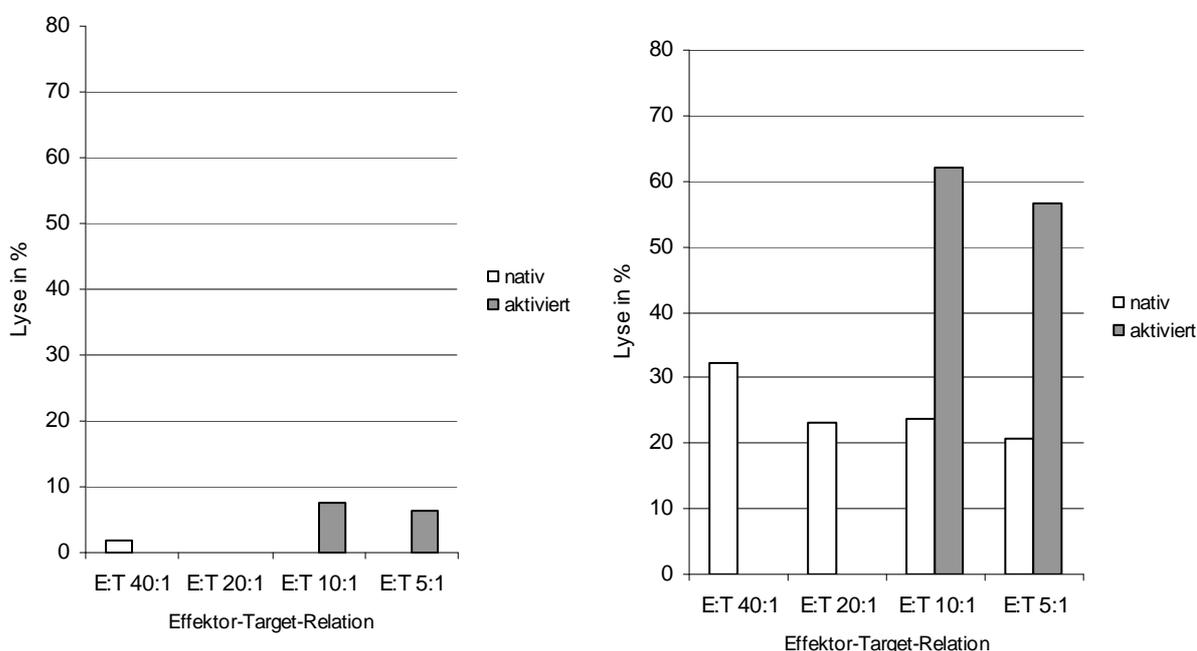


Abbildung 3.1 : Zytotoxizitätsteste der NK-Zellen von Patient 2 vor Transplantation. Links: NK-Zellen gegen ML2; Lyse nur schwach, jedoch stärker mit aktivierten NK-Zellen. Rechts: NK-Zellen gegen K562; stärkste Lyse mit aktivierten NK-Zellen.

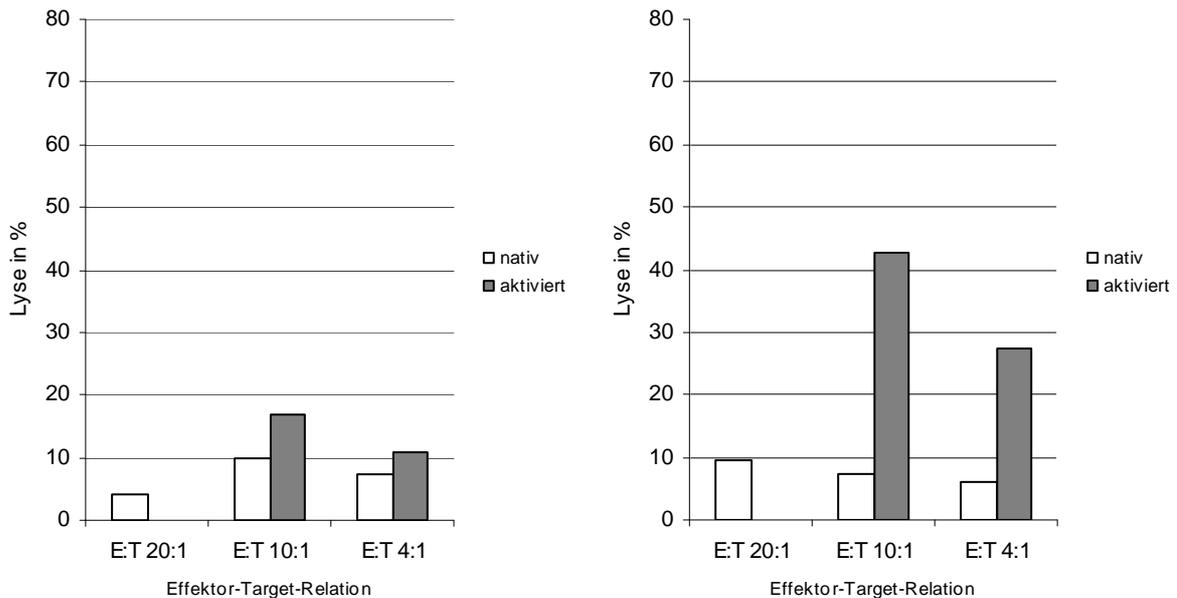


Abbildung 3.2 : Zytotoxizitätsteste der NK-Zellen von Patient 3 nach Transplantation. Links: NK-Zellen gegen ML2; Lyse nur schwach, jedoch stärker mit aktivierten NK-Zellen. Rechts: NK-Zellen gegen K562; stärkste Lyse mit aktivierten NK-Zellen.

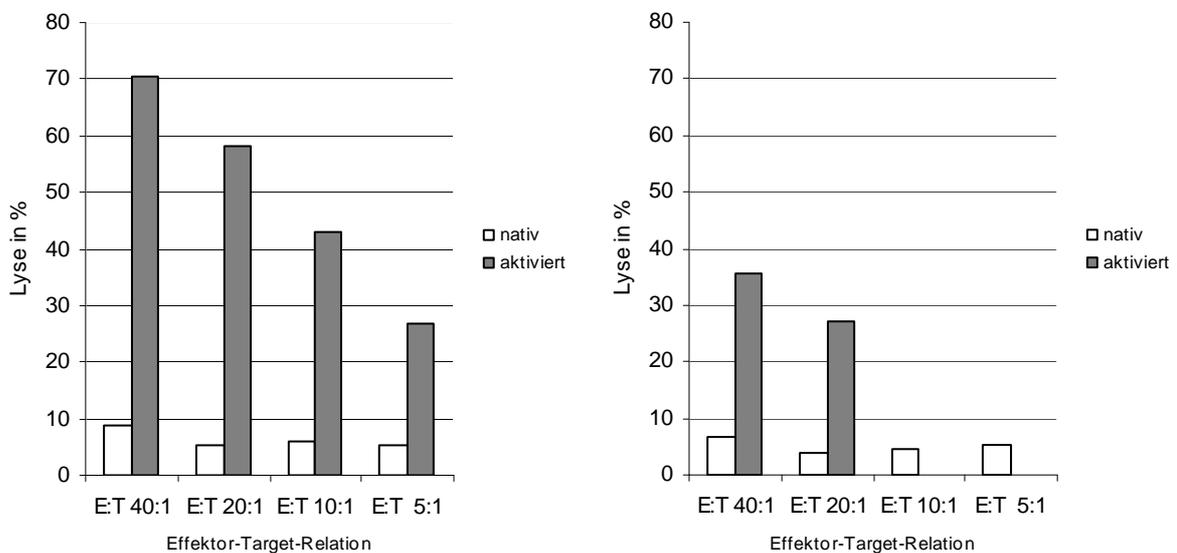


Abbildung 3.3: Zytotoxizitätsteste von Patientin 4 vor Transplantation. Links: Starke spezifische Lyse von K562 durch aktivierte Spender-NK-Zellen. Rechts: Spezifische Lyse von K562 durch Empfänger-NK-Zellen; deutlich schwächeres Lyseverhalten der Empfänger-NK-Zellen im Vergleich mit den Spender-NK-Zellen.

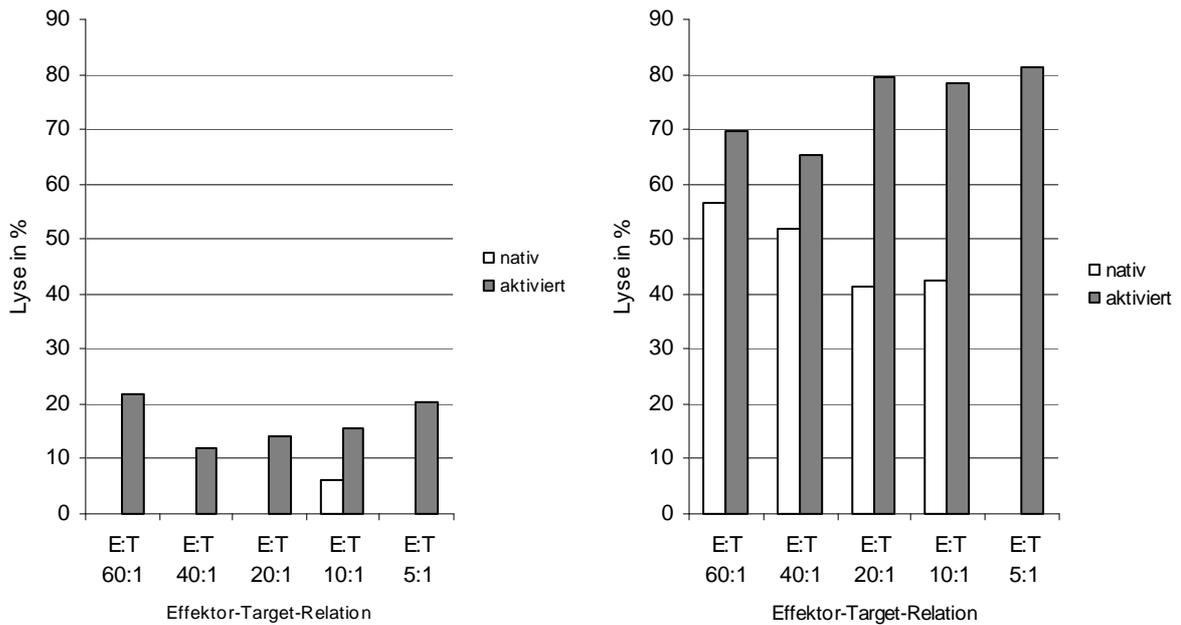


Abbildung 3.4: Zytotoxizitätsteste Patientin 5 nach Transplantation. Links: NK-Zellen gegen ML2, schlechtes Lyseverhalten, jedoch aktivierte NK-Zellen besser. Rechts: NK-Zellen gegen K562. Gutes Lyseverhalten besonders bei den aktivierten NK-Zellen.

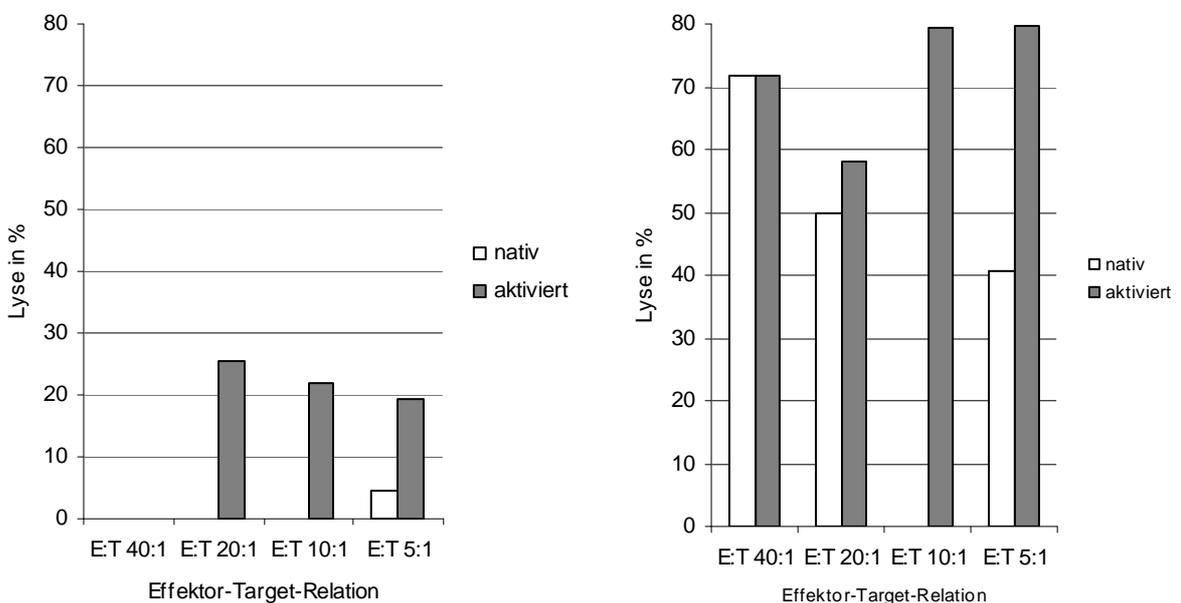


Abbildung 3.5: Zytotoxizitätsteste Patient 6 nach Transplantation. Links: NK-Zellen gegen ML2; schlechtes Lyseverhalten, jedoch aktivierte NK-Zellen besser. Rechts: NK-Zellen gegen K562. Gutes Lyseverhalten besonders bei den aktivierten NK-Zellen.

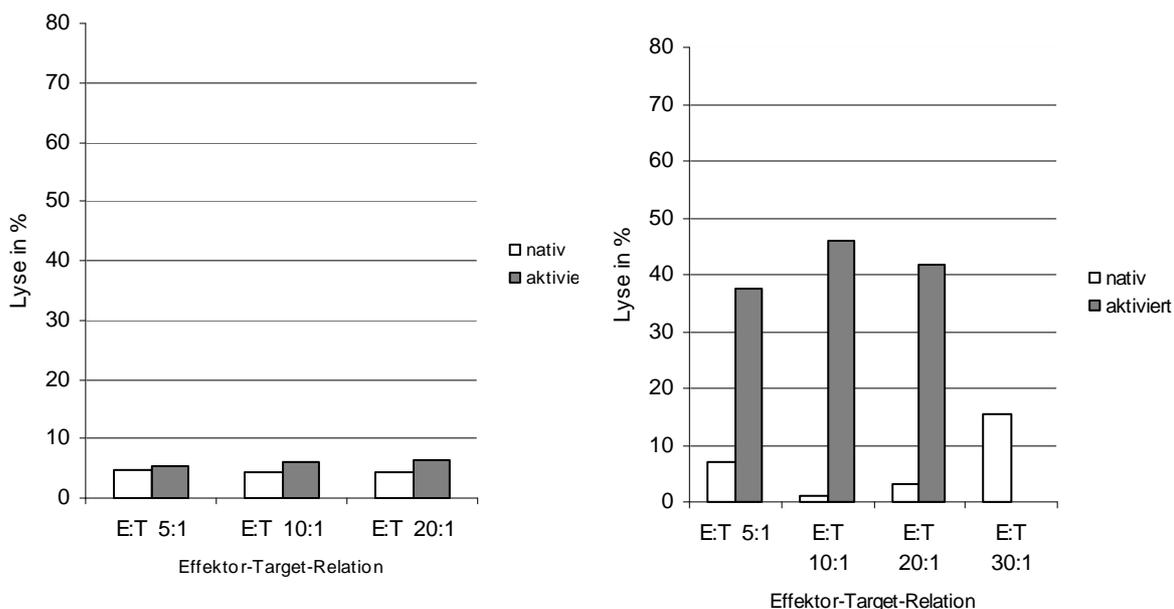


Abbildung 3.6: Zytotoxizitätsteste Patientin 7 nach Transplantation. Links: NK-Zellen gegen ML2, insgesamt schlechtes Lyseverhalten, jedoch aktivierte NK-Zellen besser. Rechts: NK-Zellen gegen K562. Gutes Lyseverhalten der aktivierten NK-Zellen.

3.2 Klinischer Teil

3.2.1 Patienten- und Spendercharakteristika

Die Patientenauswahl erfolgte nach den vorher festgelegten Ein- und Ausschlusskriterien und umfasste Patienten mit den hämatoonkologischen Krankheiten ALL, AML, CML, MDS und Morbus Hodgkin. Die Patienten zeigten entweder ein Rezidiv ihrer Erkrankung oder es musste aufgrund genetischer Untersuchungen von einer besonderen Malignität des Zellklons ausgegangen werden. Allen fehlte ein passender HLA-identischer Fremd- oder Familienspender. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation lag zwischen 17 und 48 Jahren. Insgesamt wurden sechs Patienten im Rahmen dieser Arbeit transplantiert und erhielten anschließend eine Immuntherapie mit hochaufgereinigten NK-Zellen.

Bei Patient 1 wurde nur die Stammzellapherese durchgeführt; eine Transplantation hat wegen eines rapiden Fortschreitens der Grunderkrankung nicht statt gefunden. Weiterführende Charakteristika können der Tabelle 3.5 entnommen werden.

Nach Erstdiagnose der philadelphia-chromosom-positiven CML wurde bei Patient 2 eine Chemotherapie mit ARA-C und IFN begonnen, jedoch vorzeitig auf Grund der starken Unverträglichkeit der Behandlung abgebrochen. Im Anschluss wurde eine Therapie mit Glivec durchgeführt. Nach einem zeitweiligen Erfolg der Therapie war die Krankheit jedoch wieder progredient und der Patient ging in die akzelerierte Phase über. Anschließend wurde eine allogene HLA-identische Transplantation durchgeführt, in deren Verlauf er jedoch ein molekularzytogenetisches Rezidiv erlitt. Die erneute Therapie mit Glivec brachte nur kurzfristig eine zytogenetische Remission, so dass der Patient nach Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien in die Studie aufgenommen wurde.

Patient	Geburtsjahr	Geschlecht	Spender	Diagnose	Status vor TX
2	1980	m	Vater	CML	2. Rezidiv
3	1957	m	Halbbruder	AML	2. Rezidiv
4	1975	m	Bruder	Morbus Hodgkin	1. Rezidiv in Partialremission
5	1985	w	Vater	ALL	hämatolog. CR; molekularbiolog. Persistenz der Erkrankung
6	1954	m	1. Tx Sohn; 2. + 3. Tx Tochter	AML	2. Rezidiv
7	1958	w	Sohn	MDS (AML)	2. Rezidiv

Tabelle 3.5: *Patientencharakteristika, Patienten sind vor Studienbeginn in einem wiederholten Rezidiv oder die Erkrankung persistierte in molekularbiologischen Untersuchungen. Spender waren Familienangehörige.*

Patient 3 erhielt nach Diagnose einer AML (FAB M4) eine Chemotherapie (TAD/HAM) mit anschließender Konsolidierung (ID-ARAC/Mitoxantrome). Im Verlauf kam es zu einem Rezidiv, so dass der Patient nach einem weiteren Zyklus Ida-FLAG den Kriterien folgend in die Studie eingeschlossen wurde.

Nach der Diagnose Morbus Hodgkin wurde Patient 4 nach COPP-ABVD-Schema und anschließender Bestrahlung behandelt. Dies führte zu einer lang anhaltenden Remission (1996-2001). Das spät auftretende Rezidiv wurde erfolglos mit Navelbine/Gentabine und DHAP behandelt, so dass der Patient im Zustand der Partialremission Eingang in die Studie fand.

Patientin 5 wurde nach Diagnose der c-ALL (t (3,9)) im Hochrisikoarm der COALL-97 Studie behandelt und erhielt Induktion und Reinduktion. Aufgrund der Einstufung der Patientin in die Hochrisikogruppe und der Persistenz der Krankheit in molekularbiologischen Untersuchungen wurde die Patientin in die Studie eingeschlossen.

Die AML (FAB M2) des Patienten 6 wurde mit einer Chemotherapie nach dem OSHO-Protokoll (Arm A) und zwei folgenden Konsolidierungen therapiert. Anschließend folgte eine autologe HLA-identische Transplantation, wobei es jedoch zum Transplantatversagen mit nicht geklärter Ursache kam (infektiös-toxisch vs. Persistenz des leukämischen Klons). Nachfolgend wurde er in die Studie aufgenommen.

Nach Diagnose des MDS (Monosomie 7) mit Übergang in eine AML wurde Patientin 7 nach dem OSHO-Protokoll (Arm B) induziert und nachfolgend konsolidiert. Molekulargenetisch blieb die Monosomie 7 jedoch weiter nachweisbar, woraufhin die Patientin eine Therapie nach dem Mito-FLAG-Schema erhielt. Auch nach dieser Therapie persistierte die Monosomie 7 und es kam zu einem ersten Rezidiv mit ansteigenden Blasten. Nachfolgend erhielt die Patientin eine allogene Stammzelltransplantation eines HLA-identischen Fremdspenders (zytologisch und zytogenetisch komplette Remission). Der Einschluss in die Studie erfolgte auf Grund des erneut auftretenden, nun zweiten Rezidivs.

3.2.2 Klinischer Verlauf nach Transplantation

In dieser Arbeit war es primäres Ziel zu zeigen, inwieweit die Gabe haploidenter, zytokinaktivierter NK-Zellen nach Übertragung T-Zell-depletierter peripherer Stammzellen sicher durchführbar ist. Die sichere Durchführung konnte bei jedem der sechs so behandelten Patienten nachgewiesen werden. Eine mit der NK-Zellgabe in Verbindung stehende anaphylaktische Reaktion ist nicht aufgetreten. Die Verträglichkeit in den ersten 24h nach Verabreichung der NK-Zellen war immer gut und ohne außergewöhnliche Belastungen für den Patienten.

3.2.2.1 Patientenverlauf, Infektionen und Komplikationen

Zur Quantifizierung der Toxizität des angewandten Verfahrens wurden ausgewählte Kriterien definiert, die die Belastungen und das Risiko der Transplantation wiedergeben. Die Daten sind in Tabelle 3.6 zusammengestellt. Die Kriterien zeigen im Besonderen die Entstehung von GvH-Reaktionen oder von infektiösen Komplikationen an.

Eine Mukositis Grad 3 konnte bei keinem der Patienten festgestellt werden. Die Fieberentwicklung war nur bei Patient 6 außergewöhnlich hoch. Diese war wahrscheinlich infektiös bedingt und nicht durch das Transplantat oder die NK-Zellgabe vermittelt. Unter einer starken Diarrhö litt ausschließlich Patient 3.

	Pat.2	Pat.3	Pat.4	Pat.5	Pat.6	Pat.7
Mukositis-Grad	2 (54)	2 (23)	2 (1)	2 (3)	2 (56)	2 (84)
Fieber-Grad	2 (9)	2 (21)	2 (2)	2 (66)	4 (258)	2 (7)
Diarrhö-Grad	3 (35)	4 (1)	3 (10)	1 (1)	1 (8)	3 (38)
Dermatitis-Grad	3 (7)	3 (21)	2 (12)	2 (1)	2 (13)	2 (46)
Bilirubin-Grad	4 (140)	4 (27)	3 (32)	1 (27)	2 (258)	4 (119)
VOD-Grad	0	0	0	0	0	0

*In Klammer Tag des Auftretens nach Transplantation

**Definition der Toxizitätsgrade:

- Mukositis 1= schmerzloses Ulkus oder leichter Soor;2= schmerzhafte Ulzera, Ödeme, kann aber Festes essen;3= schmerzhafte Ulzera, Ödeme, kann nichts Festes essen;4= Notwendigkeit parenteraler oder enteraler Nahrungsaufnahmehilfe
- Fieber 1= 37,1-38°;2= 38,1-40°;3= >40°;4= >40° und länger als 24h oder zusätzlich Hypertension
- Diarrhö 1= 4-6 Stühle pro Tag;2= 4-6 Stühle am Tag, nächtliche Stühle, leichte Bauchkrämpfe;3= 7-9 Stühle pro Tag oder starke Bauchkrämpfe oder Inkontinenz;4= >10 Stühle pro Tag oder blutige Auflagerungen im Stuhl oder Notwendigkeit der parenteralen Hilfe
- Dermatitis 1=asymptomatische makulöse oder papulöse Hautveränderungen;2= makulöse oder papulöse Hautveränderungen mit Juckreiz oder anderen assoziierten Symptomen;3= generalisierte makulöse papulöse vesikuläre Eruptionen;4= exfoliative Dermatitis oder ulzeröse Dermatitis
- Bilirubin 1=xx;2= >1,5x Normwert;3= 1,5-3x Normwert;4= >3x Normwert
- VOD 0=kein Auftreten

Tabelle 3.6 : Maximale Toxizität nach Transplantation nach ausgewählten Kriterien. Schweregrade von 1 – 4.

Patient 2 zeigte früh nach Transplantation am Tag 7 eine GvHD °II der Haut, die unter Steroid- und CSA-Therapie beherrschbar war und nach etwa drei Monaten abheilte. Neben einer leichten hämolytischen Anämie, einer akuten gastrointestinalen Blutung und einem steroidinduzierten Diabetes melitus gab es keine weiteren Komplikationen bis Tag 115. Am Tag 115 trat eine wahrscheinlich auf Adenoviren zurückzuführende

Enteritis auf. Ab Tag 131 zeigten die Blutuntersuchungen einen starken Anstieg der Leberwerte, die klinisch als GvHD 1V der Leber gewertet wurden, jedoch ebenfalls aufgrund einer Infektion der Leber mit oben genannten Adenoviren entstanden sein können. Aus pathologischer Sicht ist nach histologischer Aufarbeitung keine definitive Aussage möglich. Der Patient verstarb am Tag 140 an Leber- und Nierenversagen in Kombination mit einer Pneumonie. Die höchsten Billirubinwerte wurden am Tag 140 nach Transplantation gefunden. Es fand ein regelrechtes Einwachsen des Transplantats statt, ein vollständiger Spenderchimärismus wurde nachgewiesen.

Auch Patient 3 zeigte frühzeitig nach Transplantation am Tag 12 Zeichen einer GvHD 1I der Haut, die mit CSA und Steroiden behandelt wurde und gut kontrollierbar war. Eine komplette Abheilung wurde jedoch nicht erreicht. Die GvH-Reaktion ging am Tag 100 in ein limitiertes chronisches Stadium an den Unterschenkeln über, blieb jedoch auf die Haut begrenzt. Bei der letzten Nachuntersuchung waren noch kleine Hautbefunde auf der Vorderseite der beiden Schienbeine zu sehen. Ebenfalls direkt zu Beginn entwickelte Patient 3 eine Infektion durch Staphylokokken (Tag 2), die jedoch nach 6 Tagen ohne große Schwierigkeiten abheilte. Eine Diarrhö, die sich ab Tag 1 manifestierte, begleitete den Patienten 17 Tage mit zum Teil starken Wasserverlusten. Eine Niereninsuffizienz mit erhöhten Kreatininwerten bestand vom zweiten bis zum achten Monat nach Transplantation. Patient 3 lebt ohne Hinweis auf Resterkrankung oder größere andere Komplikationen mit einem kompletten Spenderchimärismus.

Patient 4 entwickelte bereits nach 11 Tagen eine GvHD 1I der Haut und wurde ebenfalls mit Steroiden und CSA behandelt. Hierunter verliefen die Hauterscheinungen milde, heilten jedoch nicht ganz ab. Im Verlauf kam es zu einem steroidinduzierten Diabetes mellitus, der mit Insulin gut beherrschbar war. Am Tag 20 litt der Patient unter einer hämorrhagischen Zystitis und hatte nachfolgend erhöhte Kreatininwerte im Sinne einer Niereninsuffizienz in kompensierter Retention. Eine Verschlechterung des Zustandes begann mit Tag 53 aufgrund einer CMV-induzierten Pneumonie. Der Patient verstarb am Tag 78 infolge eines ARDS mit Sepsis durch Staphylokokkus aureus und Multiorganversagen. Ein Einwachsen des Transplantats hatte bis zu diesem Zeitpunkt stattgefunden, die Chimärismusuntersuchung ergab einen vollständigen Spenderchimärismus.

Bereits nach vier Tagen entwickelte Patientin 5 eine GvHD 1, die jedoch nach eineinhalb Monaten unter Steroid- und CSA-Gabe abheilte. Seit Tag 89 erhält die

Patientin kein CSA und keine Steroide mehr. Wie auch den Toxizitätsgraden in Tabelle 3.6 zu entnehmen ist, erholte sich die Patientin schnell und zeigte keine schwerwiegenden Infektionen oder größeren Komplikationen. Zum Zeitpunkt der Steroidgabe trat ein gut beherrschbarer steroidinduzierter Diabetes mellitus auf. Die Patientin lebt ohne Hinweis auf bestehen einer Resterkrankung beschwerdefrei und zeigt einen kompletten Spenderchimärismus.

Patient 6 präsentierte am Tag 8 erste Zeichen einer GvHD ° I, die mit Steroiden behandelt wurde. Die GvH-Reaktion heilte bis Tag 20 aus. Am Tag 41 diagnostizierte man eine Innenohrschwerhörigkeit aufgrund toxischer Vorgänge, die am Folgetag von einer medikamentös bedingten Polyneuropathie begleitet wurde. Im weiteren Verlauf zeigte der Patient Zeichen einer Leberschädigung aufgrund von Arzneimittelwirkungen, die nach Absetzen der Medikamente rasch abklangen. Am Tag 190 deuteten die klinischen Parameter, insbesondere die Entwicklung der Leukozytenwerte, sowie die Chimärismusverlaufsuntersuchung eine Transplantatabstoßung an. Gleichzeitig wurde eine atypische Pneumonie mit Perikarderguss diagnostiziert. Nachfolgend wurde Patient 6 zum zweiten Mal, diesmal mit Zellen eines anderen Spenders (Tochter) am Tag 203 nach erster Transplantation stammzelltransplantiert. Im Verlauf dieser Transplantation wurde auf eine NK-Zellgabe verzichtet. Acht Tage nach dieser Transplantation manifestierte sich eine Staphylokokkeninfektion, die jedoch unter Antibiotikagabe gut rückläufig war. Einen Monat nach dieser zweiten Transplantation zeigten die Chimärismusuntersuchungen erneut ein fehlendes Einwachsen des Transplantats, so dass es zu einer dritten Stammzelltransplantation am Tag 42 nach zweiter Transplantation kam. Als Spender wurde wiederum die Tochter herangezogen. Zur ersten Transplantation stand diese Spenderin aus physischen Gründen nicht zur Verfügung. Diesmal wurden einen Tag nach Stammzellgabe zusätzlich wieder Spender-NK-Zellen infundiert. Im weiteren Verlauf kam es zu einem schnellen Einwachsen des Transplantats. In Folge dieser dritten Transplantation traten ab Tag 10 Anzeichen einer Sepsis durch *Candida glabrata* auf. Am Tag 17 verstarb der Patient aufgrund eines Multiorganversagens bei septischem Schock. Als Zeichen der schweren Infektion entwickelte der Patient hohes Fieber (siehe Tabelle 3.6).

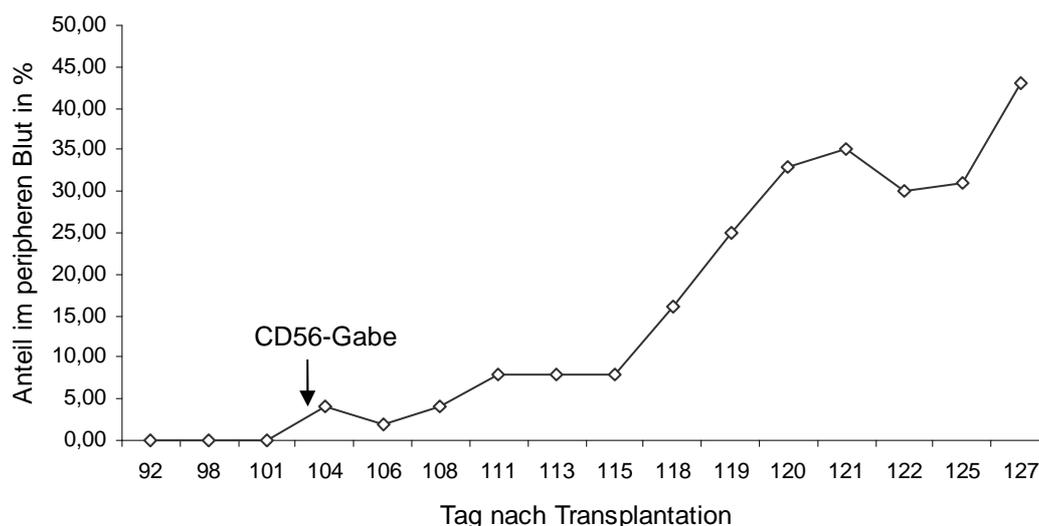


Abbildung 3.7 : Blastenanteil von Patientin 7 im peripheren Blut zum Zeitpunkt des erneuten Rezidivs. Mit einem Pfeil markiert ist die zweite Gabe von Spender-NK-Zellen. Anschließend kurzzeitiger Abfall des Blastenanteils.

Patientin 7 zeigte die ersten Anzeichen für eine GvHD 1I an der Haut am Tag 83. Eine Therapie mit CSA und Steroiden wurde begonnen und die Stärke des Exanthems damit begrenzt; eine Ausheilung fand nicht statt. Am Tag 3 nach Transplantation hatte die Patientin Zeichen einer Pneumonie durch *Pseudomonas mendocina*, die unter Therapie innerhalb von 14 Tagen rückläufig war. Eine weitere infektiöse Komplikation ergab sich am Tag 44 in Form einer durch *Clostridium difficile* hervorgerufenen Enterokolitis, die unter Antibiotikatherapie nach 21 Tagen ausheilte. Das Einwachsen des Transplantats erfolgte anfangs ohne Schwierigkeiten und die erste Untersuchung auf Resterkrankung mit der FISH Technik ergab am Tag 35 in 300 Interphasezellkernen keinen Hinweis auf Monosomie 7. Die erste Chimärismusuntersuchung am Tag 56 ergab in 300 Blut- und Knochenmarkzellen einen 100%igen Spenderchimärismus; 50 CD34⁺-Zellen zeigten ebenfalls einen kompletten Spenderchimärismus. Die Untersuchung von 298 T-Zellen ergab einen Spenderchimärismus von 99,3%. Am Tag 84 zeigte auch diese Zellpopulation einen kompletten Spenderchimärismus. Jedoch zeigte die FISH Untersuchung am Tag 113 mit 94% Monosomie 7 Zellen unter 200 CD34⁺-Zellen aus dem Knochenmark ein molekularzytogenetisches Rezidiv an. Auf Grund des Blastenanstiegs im peripheren Blut wurde der Patientin am Tag 103 eine zusätzliche NK-Zelldosis des Spenders infundiert. Das führte nur zu einem sehr kurzen Abfall der

Blastenzahl im peripheren Blut. Der Verlauf der Blasten im peripheren Blut kann Abbildung 3.7 entnommen werden. Unter dem schnell fortschreitenden Rezidiv verstarb die Patientin am Tag 130 an den Folgen einer nicht beherrschbaren interstitiellen Pneumonie.

3.2.2.2 GvH-Reaktion

Drei Patienten präsentierten im Verlauf eine GVHD °II, wobei sich bei Patient 3 hieraus ein chronisches Stadium entwickelte, das auf den Unterschenkelvorderseitenbereich rechts und links beschränkt blieb. Zwei Patienten zeigten jeweils eine GVHD 1 und ein bei einem Patient wurde eine GvH-Reaktion 1II (nach den Kriterien von Glucksberg) diagnostiziert. Die Reaktionen waren meist auf die Haut beschränkt. Bei Patient 2 wurde eine GvH-Reaktion der Leber vermutet, diese konnte histologisch weder bestätigt noch sicher ausgeschlossen werden. Die verdächtigen Hautläsionen wurden jeweilig biopsiert und anschließend histologisch untersucht. Bei einem pathologischen Befund, der die Zeichen einer GvH-Reaktion der Haut vorwies, wurde das Biopsat bei erstmaliger Diagnosestellung zusätzlich auf das Vorhandensein CD56⁺-Zellen sowie CD3⁺-Zellen im Reaktionsbereich untersucht. Im Verlauf wurden fünf dieser Untersuchungen durchgeführt. In vier Befunden wurden keine Hinweise auf das Vorliegen CD56⁺-Zellen im gesamten Biopsat gefunden, jedoch zeigte sich insbesondere in Abschnitten mit stärkergradig ausgeprägter GvH-Aktivität ein Vorhandensein von CD3⁺-Zellen. Im fünften Befund zeigten sich keine CD3⁺-Zellen, jedoch ließ sich der CD56-Marker an einer Stelle perivaskulär nachweisen.

3.2.2.3 Engraftment

Das Engraftment wird anhand dreier Blutwerte beurteilt. Von einem regelhaften Einwachsen der Leukozyten wird gesprochen, wenn nach Transplantation die Leukozytenzahl $\geq 1,0/\text{nl}$ übersteigt. Für Thrombozyten gilt ein Wert $\geq 50/\text{nl}$ und der Hämoglobinwert soll $\geq 10/\text{nl}$ im Blut betragen.

In Tabelle 3.7 kann man erkennen, dass das Leukozytenengraftment bei den Patienten zum größten Teil innerhalb von 13 Tagen nach Transplantation erfolgte (siehe auch Abbildung 3.8). Insgesamt ist von einem guten Transplantateinwachsen zu sprechen.

Besondere Bedeutung in der Beurteilung des Engraftment kommt in dieser Arbeit Patient 6 zu, da bei ihm das Engraftment nach der ersten Transplantation nur unvollständig bzw. vorübergehend war. Abbildung 3.9 zeigt deshalb gesondert die

Entwicklung der Leukozytenzahl bei Patient 6. Zwar kommt es am Tag 17 nach der ersten Transplantation zu einem Anstieg der Leukozytenzahl im Blut über $2 \times 10^3/\mu\text{l}$, dieser Anstieg ist in der Folge nicht dauerhaft. Immer wieder fällt der Wert unter $1 \times 10^3/\mu\text{l}$. Am Tag 50 liegt der Wert beispielsweise bei $2,2 \times 10^3/\mu\text{l}$. Am Tag 199 nach Transplantation finden sich $0,7 \times 10^3/\mu\text{l}$ Leukozyten im Blut. In Zusammenhang mit der Chimärismusverlaufsuntersuchung konnte von einem Versagen des Transplantats ausgegangen werden.

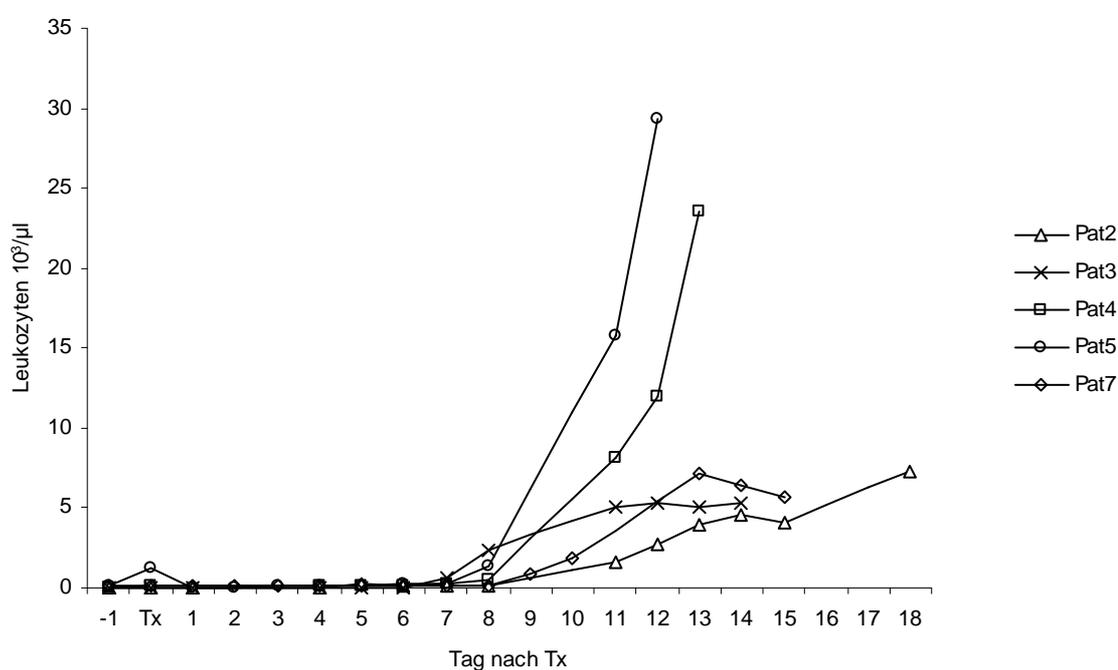


Abbildung 3.8: Entwicklung der Leukozytenzahlen im Blut nach Transplantation bei den Patienten 2 – 5 und 7. Zu sehen ist ein schnelles Leukozytenengraftment.

Deshalb wurde der Patient einer erneuten Stammzelltransplantation unterzogen. Das zweite Transplantat stammte von seiner Tochter, d.h. einem anderen Spender als bei der ersten Transplantation. Es wurde jedoch aus klinischen Gründen beim Spender zunächst auf eine zusätzliche Gabe von NK-Zellen verzichtet. Wie die Daten der Kurve „Pat6/2“ in Abbildung 3.9 zeigen, kam es auch in diesem Fall nicht zum Einwachsen des Transplantats. Erst nach der folgenden dritten Transplantation (Spender war

wiederum die Tochter) mit zusätzlicher Gabe von Spender-NK-Zellen konnte ein regelhaftes Engraftment nachgewiesen werden (Kurve „Pat6/3“ in Abbildung 3.9).

	Tag nach Tx	Median
Leukozyten $\geq 1,0/\text{nl}$	8,8,10,11,13,13,>40*,60	12
Thrombozyten $\geq 50/\text{nl}$	1,6,6,11,>15**,16,>40*,60	13,5
Hb $\geq 10/\text{nl}$	1,2,6,9,10,11,18,>40*	9,5

*Werte „>40“ Tage entstanden bedingt durch die schnell folgende Retransplantation von Patient 6

**der Wert „>15“ Tage ist durch den Tod von Patient 6 nach seiner 3. Transplantation bedingt

Tabelle 3.7: *Engraftmentzeichen. Tag nach Transplantation an dem die Laborparameter der Patienten erstmals den Grenzwert überschreiten. Zusätzlich ist der jeweilige Median ausgewiesen.*

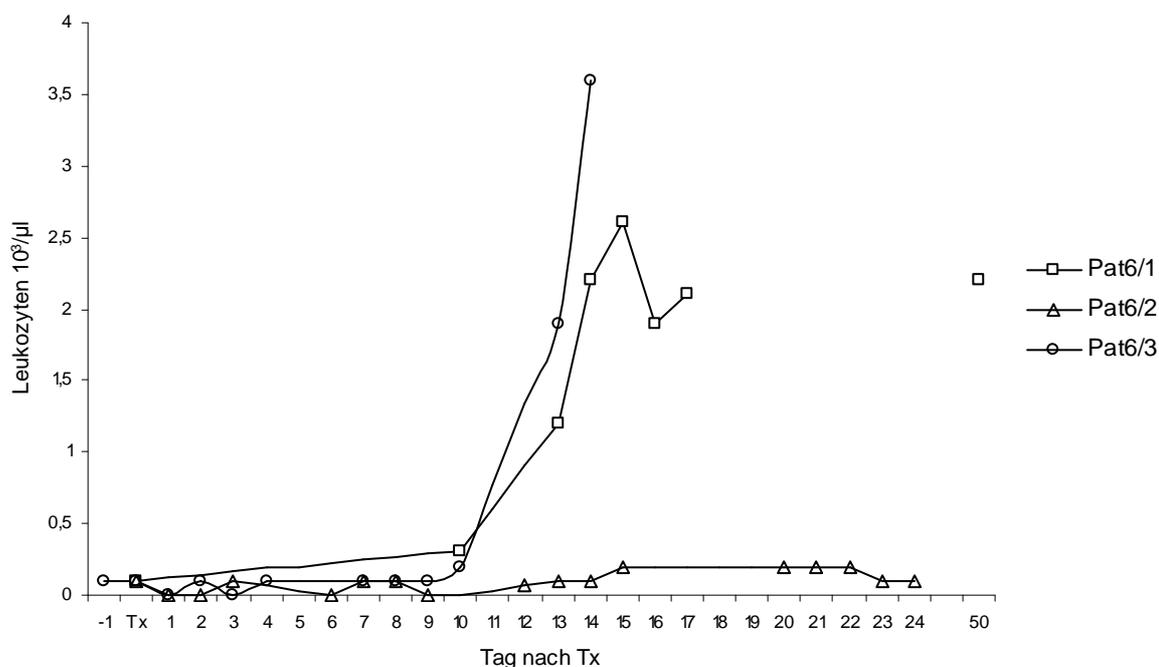


Abbildung 3.9: *Entwicklung der Leukozytenzahlen im Blut nach den drei Transplantationen bei Patient 6. Man sieht das fehlende Leukozytenengraftment bei der zweiten Transplantation.*

3.2.2.4 NK-Alloreaktivität

Der Tabelle 3.8 kann man den HLA-Status der einzelnen Patienten und ihrer dazugehörigen Spender entnehmen. Die Patienten 2, 3, 4 und 6 sind mit ihren jeweiligen Spendern an den HLA-A, -B und -C Loci für ein Oberflächenantigen identisch, für das andere jedoch nicht. Patientin 5 ist an ihrem HLA-A Locus für beide Oberflächenantigene identisch, für HLA-B und -C liegt eine Übereinstimmung jeweils nur für ein Oberflächenantigen vor. Bei Patientin 7 ist der HLA-C Locus identisch, für die anderen beiden Loci liegt ausschließlich eine Übereinstimmung für eines der beiden Oberflächenantigene vor.

Patient bzw. Spender	A	A	B	B	C	C	Gr1 HLA-C	Gr2 HLA-C	HLA-Bw4	NK-Aktivität GvH	NK-Aktivität HvG
Pat2	2	66	44	41	w2	w17		x	x		
Vater	2	-	44	7	w2	w7	x	x	x	Ja	
Pat3	1	66	37	52	w6	-		x	x		
Halbbruder	1	24	18	37	w5	w6		xx	x		
Pat4	23	24	7	39	w7	-	x		nein		
Bruder	3	23	39	60	w3	w7	xx		nein		
Pat5	2	24	62	37	w3	w6	x	x	x		
Vater	2	24	44	62	w3	w5	x	x	x		
Pat6	24	28	39	38	w7	w12	x		x		
1.Spende, Sohn	24	2	39	7	w7	w7	xx		nein		Ja
2./3. Spende, Tochter	3	28	35	38	w4	w12		x	x	Ja	Ja
Pat7	2	32	50	61	w2	w6		xx	nein		
Sohn	1	32	57	61	w2	w6		xx	x	Ja	

Tabelle 3.8: HLA-Merkmale und NK-Aktivität von Patienten und Spendern. Bei den Transplantationen von Patient 2 und 7 gab es eine Reaktivität der NK-Zellen in GvH-Richtung. Patient 6 hatte bei der ersten Transplantation eine Alloreaktivität der NK-Zellen in HvG-Richtung, bei den zwei folgenden Transplantationen mit der Tochter als Spender in beide Richtungen. Die Patienten 3, 4 und 5 hatten weder eine NK-Reaktivität in die eine noch in die andere Richtung.

Zur Betrachtung der KIR-Liganden-Inkompatibilität sind in Tabelle 3.8 noch mal der HLA-Status für HLA-C Gruppe 1 und Gruppe 2 und für HLA-Bw4 gesondert aufgeführt und ein eventuell bestehendes „mismatch“ mit der jeweiligen NK-Alloreaktivitätsrichtung angegeben. Die Patienten 3, 4 und 5 zeigen bei dieser Betrachtung keine KIR-Liganden-Inkompatibilität. Eine Alloreaktivität in GvH-Richtung auf Grund des HLA-Status haben die NK-Zellen von den Patienten 2 und 7. Bei Patientin 7 besteht die Inkompatibilität wegen des „mismatches“ des HLA-Bw4 Antigenkomplexes, bei Patient 2 wegen des unterschiedlichen HLA-C Gruppe 1 Status. Patient 6 hat mit seinem ersten Spender ein „mismatch“ für die HLA-Bw4 Antigene, der eine NK-Zellalloreaktivität in HvG-Richtung erwarten lässt. Mit seinem zweiten Spender hat Patient 6 eine zweifache KIR-Liganden-Inkompatibilität, einerseits für die Antigene der HLA-C Gruppe 2 in GvH-Richtung und andererseits für die Antigene der HLA-C Gruppe 1 in HvG-Richtung.

3.2.2.5 Rezidive

Der Anstieg der Blasten im Blut ab Tag 100 bei Patientin 7 zeigte ein Rezidiv an, dass molekularbiologisch mittels der FISH-Technik am Tag 113 bestätigt werden konnte. Daraufhin erhielt sie am Tag 103 eine zusätzliche NK-Zellgabe, wonach die Blastenzahl nur kurzfristig leicht absank (s. Abbildung 3.7).

K562 (E:T) 10:1	ML2 (E:T) 20:1	Blasten Pat. 7 (E:T) 20:1
45,98%	6,28%	17,44%

K562» Zelllinie
ML2» Zelllinie, Nk-zellresistent
E:T» Effektorzellkonzentration :Targetzellkonzentration

Tabelle 3.9 : *Spezifische Lyse im Zytotoxtest mit IL2-aktivierten NK-Zellen des Spenders von Patient 7 gegen unterschiedliche Targetzellen. Die NK-Zellen sind in der Lage den perforinsensiblen Zellklon K562 zu zerstören. Ihre Wirksamkeit gegen den Zellkon ML2, und gegen die Blasten von Patientin 7 ist jedoch gering.*

Die schwache Wirksamkeit der NK-Zellen mit Alloreaktivität in GvH-Richtung veranlasste eine genauere Untersuchung der NK-Zellen und der Blasten. Die NK-Zellen

wurden weiteren Zytotoxizitätstests unterzogen und hierbei auch gegen den Blastenklon der Patientin getestet. In Tabelle 3.9 kann man sehen, dass die Lyse gegen den Zellklon K562 erfolgreich verläuft und gegen ML2 erwartungsgemäß schlecht ausfällt. Trotz der Alloreaktivität der NK-Zellen in GvH-Richtung erreichen sie mit 17,44% nur eine geringe Lyse gegen die Blasten von Patientin 7. Die Unfähigkeit der NK-Zellen die Blasten zu zerstören konnte zwei Ursachen haben: Entweder ist die Aktivierung der NK-Zellen nicht ausreichend, so dass sie keine Lyseaktivität entfalten, oder die Blasten von Patientin 7 sind gegen den Angriff der NK-Zellen resistent. Deshalb wurden die Blasten auf ihr Lyseverhalten nach Kontakt mit Perforin getestet. Perforin ist die Haupteffektorsubstanz der NK-Zellen. Auch bei diesem Test konnte keine hohe Lyse der Blasten erreicht werden.

3.3 Immunologischer Teil

3.3.1 Immunologische Rekonstruktion

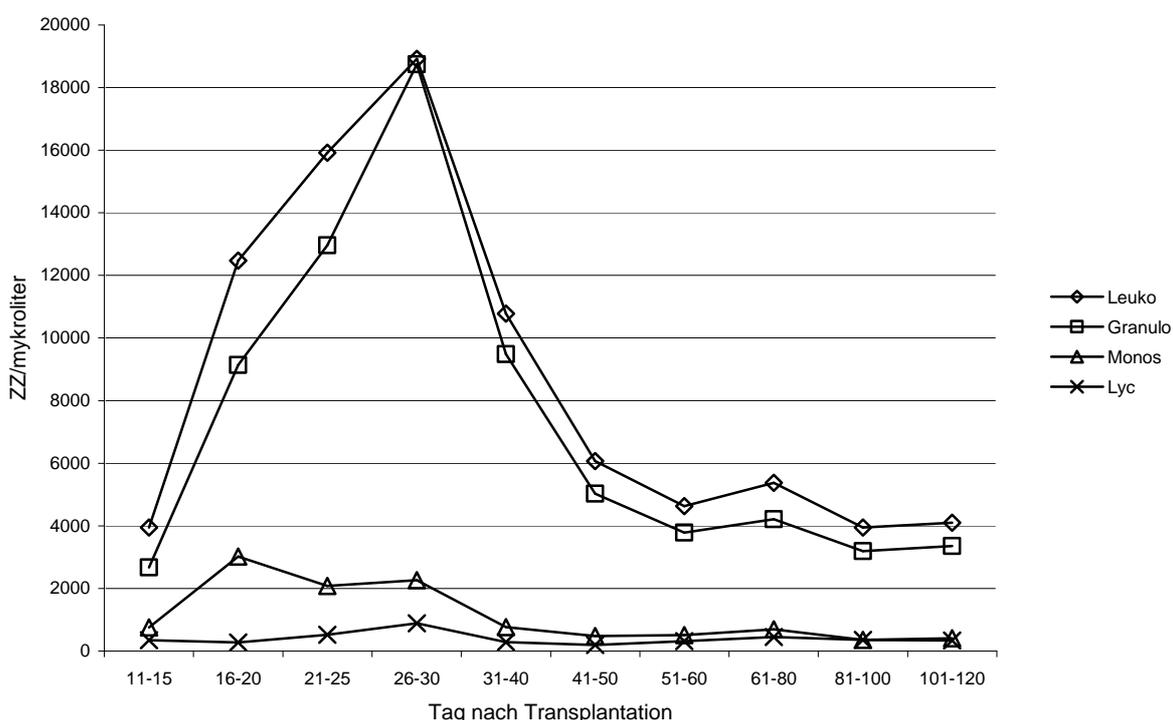


Abbildung 3.10: Entwicklung der Leukozyten nach Transplantation. Zusehen ist ein starker Anstieg der Gesamtleukozyten, vor allem der Granulozyten. Normaler Verlauf der Monozyten. Die Lymphozyten bleiben mit einem Anteil von rund 10% an den Gesamtlmphozyten auf niedrigen Niveau.

Wie im Kapitel Engraftment dargelegt, kam es zu einer schnellen Erholung der Gesamtleukozytenzahlen. Die Rekonstitution der einzelnen Leukozytenunterarten verlief jedoch unterschiedlich. Wie man in Abbildung 3.10 erkennen kann, steigt die Zahl der Granulozyten bis zum dreißigsten Tag stark an und fällt danach langsam auf physiologische Werte. Auch die Rekonstitution der Monozyten verläuft gut. Sie haben einen physiologischen Anteil an den Gesamtleukozyten. Die Lymphozyten zeigen jedoch auch nach 120 Tagen noch keine volle Erholung. Der Anteil an den Gesamtleukozyten beträgt bis Tag 120 nur rund 5-10%. Der Lymphozytenanteil an den Gesamtleukozyten von Patient 3, für den der längste Beobachtungszeitraum vorliegt, betrug am Tag 445 lediglich 10,92%.

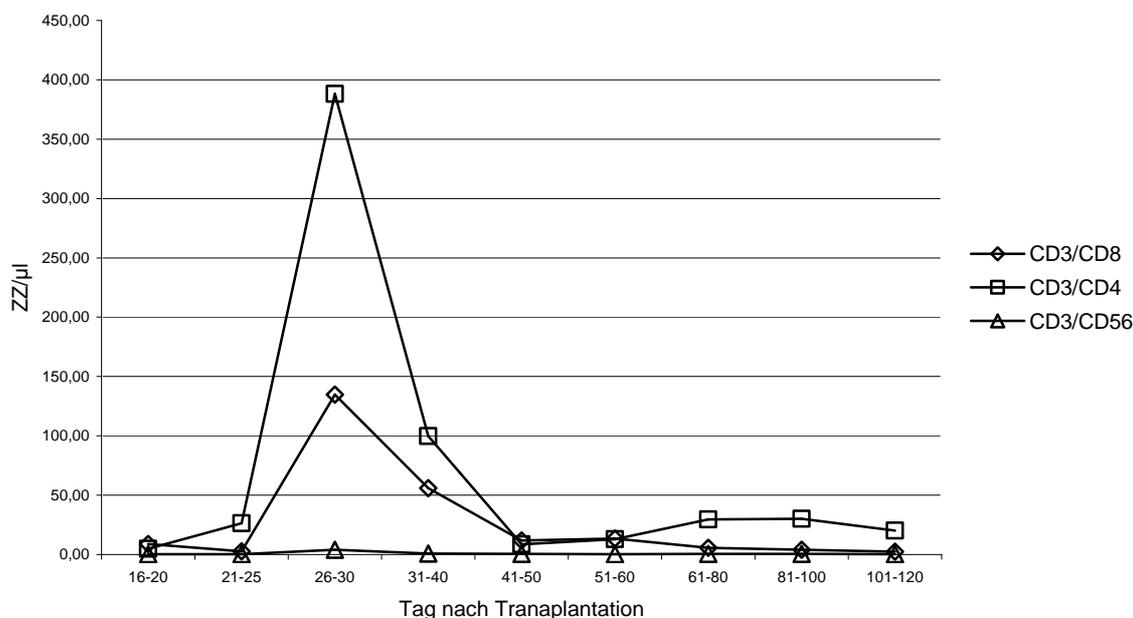


Abbildung 3.11: Patienten 4,5,6 und 7 zeigen einen langsamen Anstieg der T-Zellen bis Tag 120, das Gesamtniveau bleibt jedoch niedrig und beträgt am Tag 120 durchschnittlich rund 150 ZZ/µl. In dieser Gruppe gibt es einen späten Anstieg der NK-Zellen zwischen Tag 60 und 80. Die NK-Zellzahl ist höher als die T-Zellzahl.

Bei der differenzierten Betrachtung der Lymphozyten erscheint es sinnvoll zwei unterschiedliche Gruppen zu bilden. So zeigt die Entwicklung bei den Patienten 4,5,6

und 7, dass es erst relativ spät zu einem Anstieg der T-Zellen kommt. Der Anstieg ist sehr langsam und bleibt, wie man in Abbildung 3.11 sehen kann, mit durchschnittlich rund 150 ZZ/ μ l am Tag 120 nach Transplantation auf einem unphysiologisch niedrigen Niveau. In dieser Gruppe kommt es um Tag 60-80 zu einem starken Anstieg der NK-Zellen mit nachfolgendem leichtem Abfall.

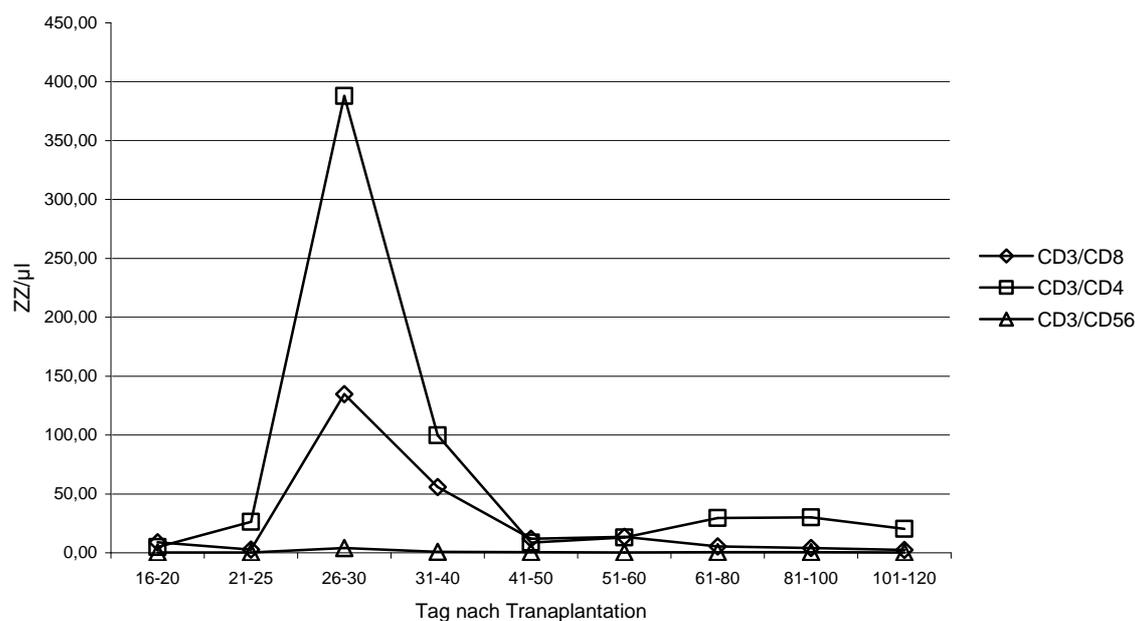


Abbildung 3.12 :Entwicklung der T-Zellunterpopulationen bei Patient 2 und 3. Die Unterpopulationen verlaufen entsprechend dem allgemeinen T-Zellverlauf (siehe Abbildung 3.13). Die $CD4^+$ -T-Zellen stellen den größten Anteil. Bei der Analyse der $CD4^+$ -T-Zellen und der $CD8^+$ -T-Zellen fällt auf, dass die $CD4^+/CD8^+$ Ratio deutlich erhöht ist. Die Zahl der NKT-Zellpopulation ist sehr gering.

Die zweite Gruppe bilden die Patienten 2 und 3. Bei Ihnen ist ein früher Anstieg der T-Zellen in Abbildung 3.13 zu erkennen. Am Tag 30 ist der Höhepunkt überschritten und die T-Zellzahl nimmt deutlich ab ohne Tendenz einer Erholung bis Tag 120. Während sich bei Patient 2 bis zum Tod am Tag 140 kein Anstieg der T-Zellen zeigt, ist bei Patient 3 ab etwa Tag 150 eine langsame Zunahme der T-Zellen zuerkennen (Daten nicht dargestellt). Bei diesen beiden Patienten ist der Anstieg der NK-Zellen zwischen Tag 25-30 und damit deutlich früher als bei der ersten Gruppe.

Allen sechs Patienten gemeinsam ist, dass die NK-Zellzahl über den gesamten Untersuchungszeitraum deutlich über der T-Zellzahl liegt und die T-Zellen ein für normale Verhältnisse viel zu niedriges Niveau behalten. Die hohen Standardabweichungen kommen durch die geringe Fallzahl zustande. Wenn man sich die Einzelfälle betrachtet, erscheint es trotzdem sinnvoll sie in diese zwei Gruppen einzuteilen, denn auch wenn die Einzelwerte stark variieren, bleibt der beschriebene Verlauf gruppentypisch. Auf Grund der kleinen Fallzahl ist diese Entwicklung statistisch nicht signifikant.

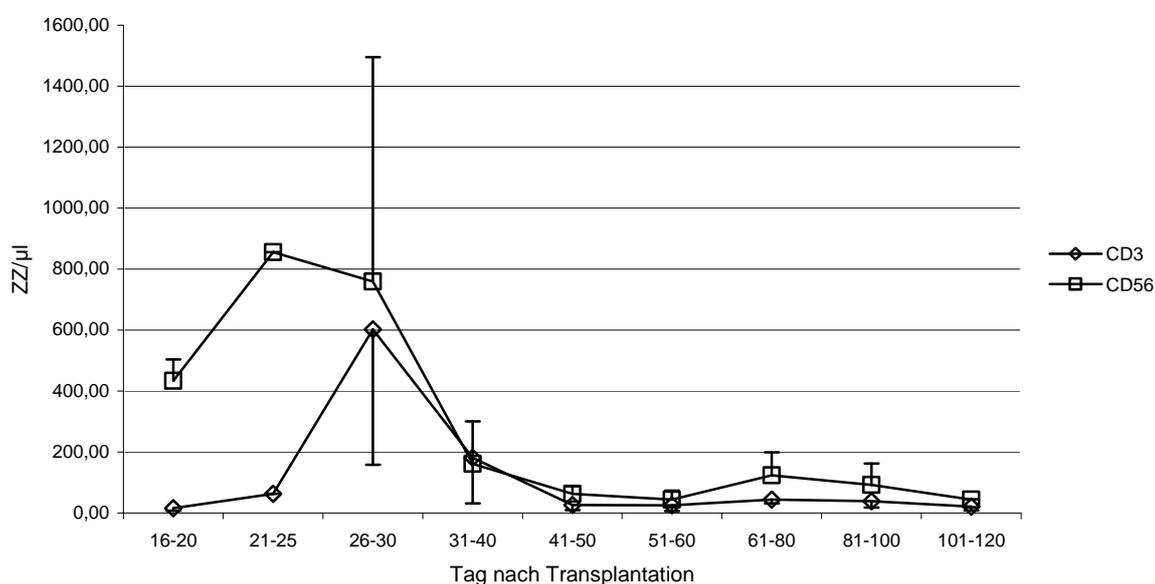


Abbildung 3.13: Patienten 2 und 3 zeigen einen frühen Anstieg der T- und NK-Zellen zwischen Tag 20 und 30. Danach fällt die T-Zellpopulation stark ab und erholt sich bis Tag 120 nicht. Die T-Zellzahl bleibt immer unter der NK-Zellzahl.

3.3.2 Rekonstitution des NK-Zellrezeptorenrepertoires

Die Untersuchung des NK-Zellrezeptorrepertoires erfolgte aus technischen Gründen ausschließlich bei den Patienten 3, 5, 6 und 7. Untersuchungszeitpunkte waren soweit möglich an Tag 30, 60 und 90. In einem Fall zusätzlich am Tag 125. Es wurde ermittelt wie viel Prozent der NK- bzw. T-Zellen den jeweiligen Rezeptor exprimieren.

Bei der Analyse fällt auf, dass sich das Repertoire der Rezeptoren auf den T-Zellen anders verhält als auf den NK-Zellen. Die Regulation der Rezeptoren erfolgt also nicht in gleicher Weise bei den unterschiedlichen Zellpopulationen. Zu den Untersuchungszeitpunkten unterschied sich das NK-Zellrezeptorrepertoire immer vom Spender sowie vom Empfänger vor Transplantation. Wie in Abbildung 3.14 am Beispiel von Patientin 7 für alle Patienten gezeigt wird, ist der Verlauf der Rezeptorexpression zu den untersuchten Zeitpunkten stark schwankend.

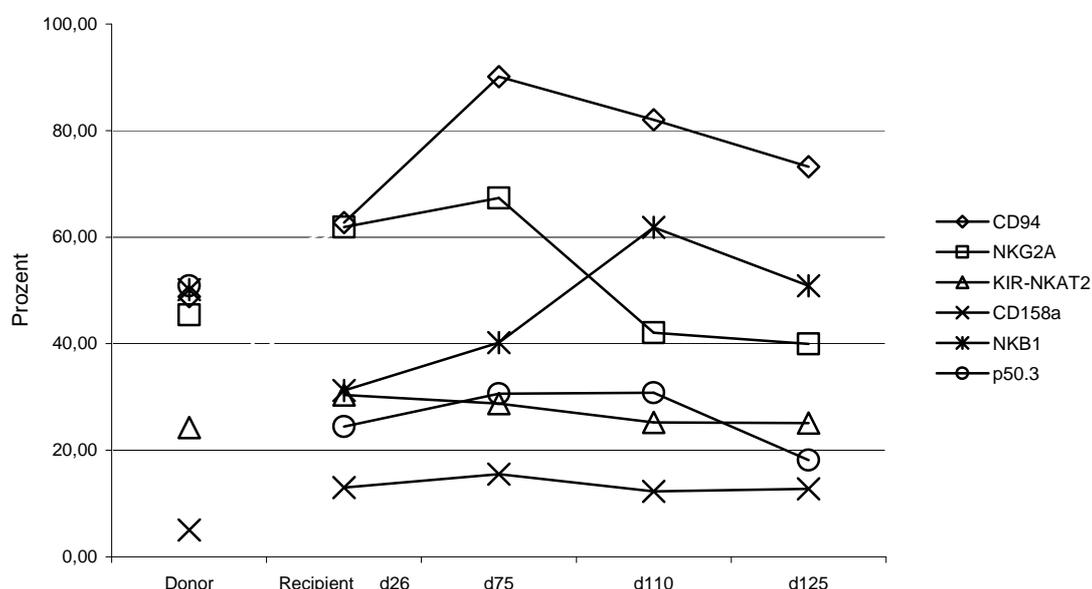


Abbildung 3.14 : Veränderung der Expressionshäufigkeit auf den NK-Zellen bei Patientin 7. Die Schwankungen sind bis Tag 125 noch sehr ausgeprägt.

Alle Patienten zeigen nach Transplantation eine häufige Expression von CD94 und NKG2A. Bei drei der vier Patienten ist die Häufigkeit der Expression von CD94 30-50 Tage nach Transplantation deutlich häufiger als bei Spender und Empfänger vor Transplantation. Nur bei Patient 3 ist die Häufigkeit von CD94 nach Transplantation seltener als bei Spender und Empfänger vor Transplantation. Allerdings ist die Expressionshäufigkeit von CD94 bei Patient 3 auch schon vor Transplantation und bei seinem Spender hoch. So ist die Häufigkeit von CD94 am Tag 29 nach Transplantation

bei Patient 3 nur leicht niedriger als vor Transplantation und liegt bei rund 70%. Bei allen Patienten nimmt mit zunehmender Zeit nach Transplantation die Expression von CD94 ab. Bei Patient 6 sinkt sie bis Tag 86 unter das Niveau des Spenders.

Die prozentuale Veränderung der Expressionshäufigkeit ausgewählter Rezeptoren auf den NK- und T-Zellen ist in den Abbildungen 3.15 – 3.18 zu sehen. Bei Patientin 7 fiel der Anstieg von NKB1-exprimierenden NK-Zellen auf. NKB1 ist ein Ligand von HLA-Bw4. Dort besaß die Patientin ein „mismatch“ in GvH-Richtung. Am HLA-C Locus war die Patientin identisch mit ihrem Spender und besaß keine HLA-C Gruppe 1 Antigene. HLA-C Gruppe 1 Antigene sind Liganden für CD158a, diese Antigene fehlten ebenfalls beim Spender. Es kam nur zu einer leichten Veränderung der Expressionshäufigkeit von CD158a. Der Rezeptor p50.3, dessen Liganden HLA-C Antigene sind (jedoch gruppenunspezifisch), wurde im Gegensatz dazu deutlich seltener nach Transplantation auf NK-Zellen von Patientin 7 exprimiert.

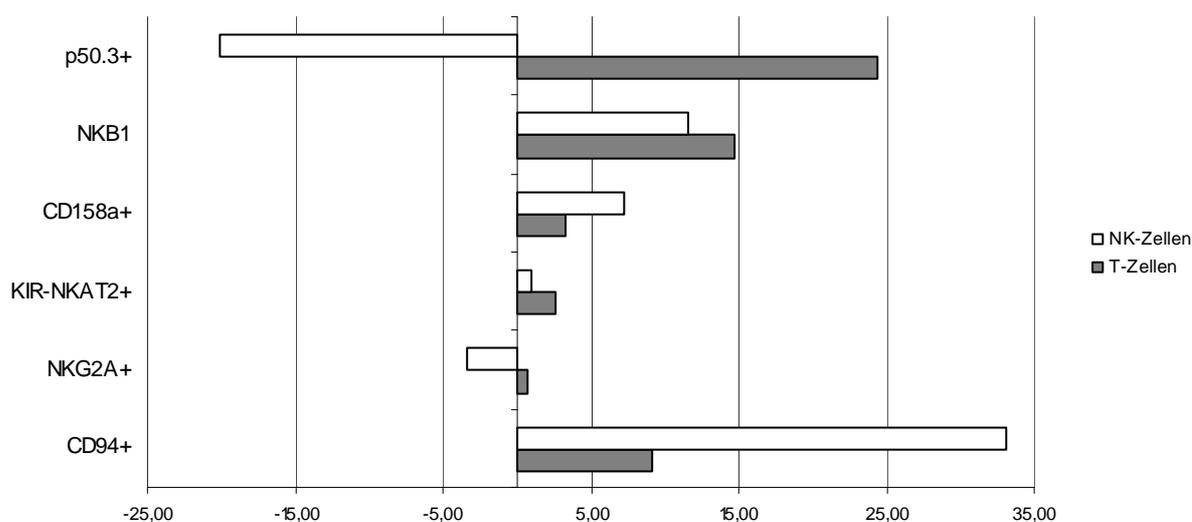


Abbildung 3.15: Prozentuale Veränderung der Expressionshäufigkeit bestimmter Rezeptoren auf NK- und T-Zellen bei Patientin 7 gegenüber dem Spender am Tag 110 nach Transplantation. Auffallend sind der starke Anstieg von CD94- und NKB1-exprimierenden und der Abfall von p50.3-exprimierenden NK-Zellen.

Bei der Transplantationskonstellation von Patientin 5 gab es keine NK-Alloreaktivität in eine bestimmte Richtung. Die Patientin und ihr Spender waren positiv für HLA-C

Gruppe 1 und 2 Antigene sowie für HLA-Bw4. Bis zum Tag 93 zeigten sich kaum Veränderungen des Rezeptorrepertoires mit Ausnahme für CD94 und NKG2A, die von deutlich mehr NK-Zellen exprimiert wurden.

Patient 3 und sein Spender wiesen ebenfalls keine NK-Aktivität in eine bestimmte Richtung auf. Beiden fehlte ein HLA-C Gruppe1 Antigen, waren aber HLA-C Gruppe 2 und HLA-Bw4 positiv. Die Expressionshäufigkeit von CD158a und p50.3 fielen bei diesem Patienten bis zum Tag 90 nach Transplantation ab. Bei NKB1 und NKAT2 waren nur leichte Unterschiede zu erkennen.

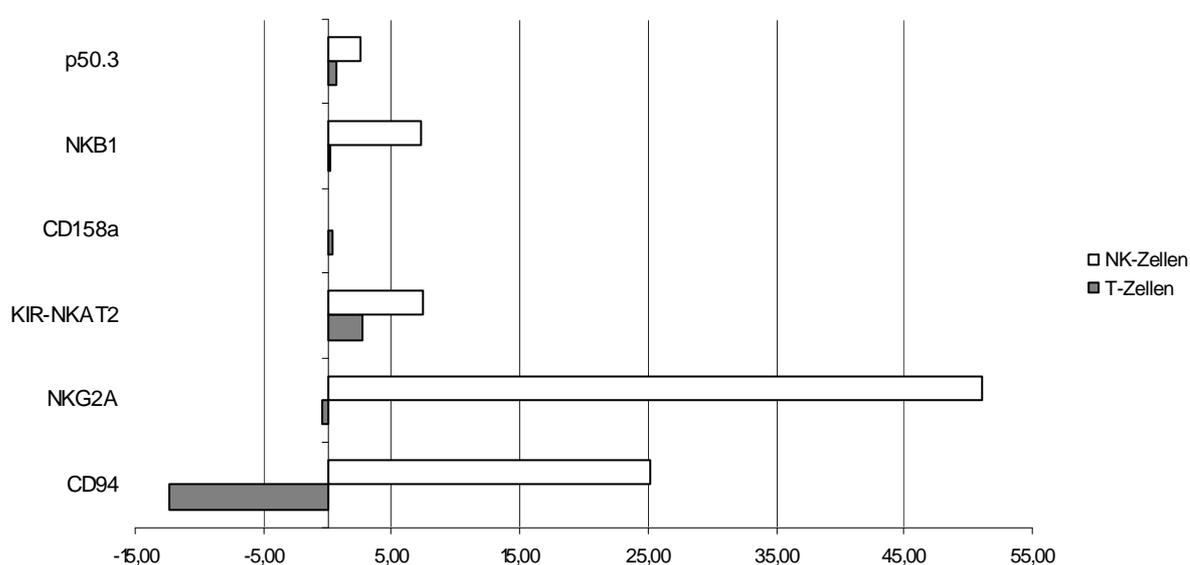


Abbildung 3.16: Prozentuale Veränderung der Expressionshäufigkeit bestimmter Rezeptoren auf NK- und T-Zellen bei Patientin 5 gegenüber dem Spender am Tag 93 nach Transplantation. Zu sehen ist ein starker Anstieg von CD94- und NKG2A-exprimierenden NK-Zellen.

Das Rezeptorrepertoire von Patient 6 ist aus technischen Gründen nur nach der ersten Transplantation untersucht worden. Bei ihm bestand wie bei Patientin 7 eine KIR-Liganden-Inkompatibilität auf Grund des unterschiedlichen HLA-Bw4 Status. Die NK-Alloreaktivität wies jedoch bei Patient 6 in HvG-Richtung, also genau entgegengesetzt. Der Rezeptor NKB1, dessen Ligand HLA-Bw4 ist, wurde hier ebenfalls in die entgegengesetzte Richtung reguliert, d.h. die Expressionshäufigkeit am Tag 86 war

geringer als beim Spender. Bei Patient 6 wurden alle untersuchten Rezeptoren am Tag 86 nach Transplantation deutlich seltener exprimiert als beim Spender. Am HLA-C Locus waren beide positiv für Gruppe 1 Antigene und negativ für Gruppe 2 Antigene.

Bei drei der vier untersuchten Patienten wurden die NK-Zellen ebenfalls nach den Subpopulationen CD56^{bright} und CD56^{dim} untersucht. Bei den Patienten 5 und 7 war kurz nach der Transplantation die Häufigkeit von CD56^{dim} mit rund 20% (Patient 5) und rund 45% (Patient 7) relativ niedrig, bei beiden stieg die Häufigkeit im Verlauf an. Am Tag 93 betrug CD56^{dim} bei Patientin 5 rund 75% und bei Patientin 7 am Tag 125 rund 90%. Entgegengesetzt verlief die Häufigkeit von CD56^{dim} bei Patient 6. Während der Anteil von CD56^{dim} am Tag 27 noch 85% betrug, fiel dieser bis Tag 86 ab auf rund 20%.

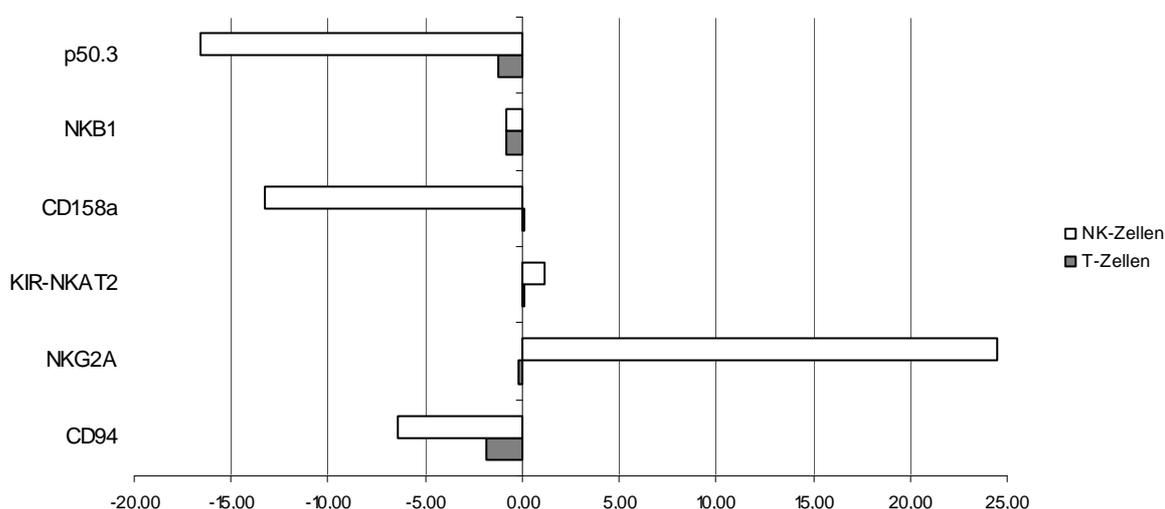


Abbildung 3.17: Prozentuale Veränderung der Expressionshäufigkeit bestimmter Rezeptoren auf NK- und T-Zellen bei Patient 3 gegenüber dem Spender am Tag 90 nach Transplantation. Auffallend sind die abnehmende Expression von p50.3 und CD158a auf den NK-Zellen. Deutlich häufiger als beim Spender wird NKG2A auf den NK-Zellen exprimiert.

Bei CD56^{bright} zeigten sich drei unterschiedliche Verläufe. Bei Patientin 5 war CD56^{bright} direkt nach Transplantation häufig und fiel dann stark ab. Entgegengesetzt verhielt sich CD56^{bright} bei Patient 6. Bei ihm war anfangs die Häufigkeit von CD56^{bright} selten, stieg dann bis Tag 86 deutlich an und überstieg schließlich die CD56^{dim}-Häufigkeit. Patientin

7 hatte am Tag 26 15% CD56^{bright}-Zellen. Im Verlauf wurde CD56^{bright} seltener, am Tag 125 rund 5%.

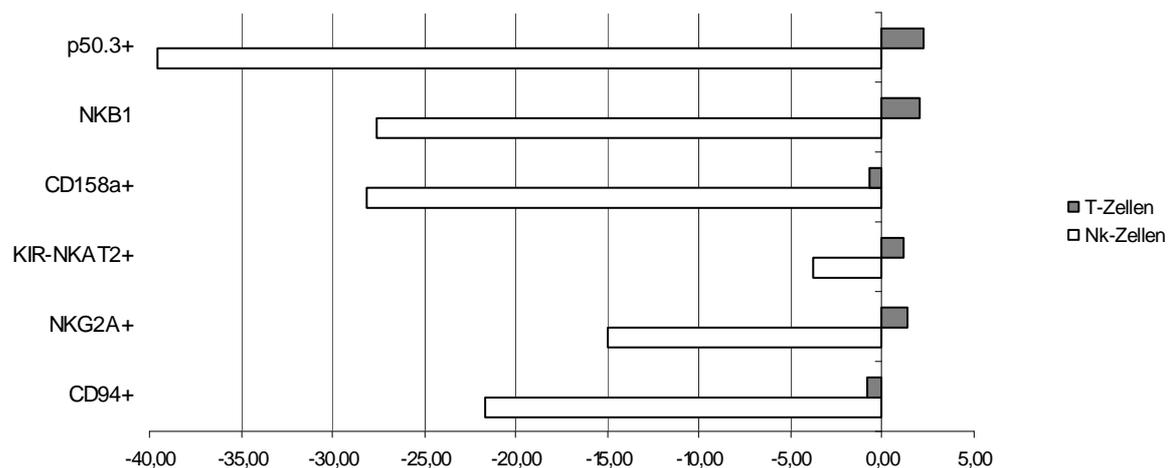


Abbildung 3.18: Prozentuale Veränderung der Expressionshäufigkeit bestimmter Rezeptoren auf NK- und T-Zellen bei Patient 6 gegenüber dem Spender am Tag 86 nach Transplantation. Auffallend ist eine deutlich seltenere Expression aller dargestellten Rezeptoren auf den NK-Zellen.

4 Diskussion

4.1 Technischer Teil

Die vorgestellte Arbeit zeigt, dass es technisch möglich ist, ein hochaufgereinigtes NK-Zellinfusionsprodukt ex vivo aus einem Leukapheresat herzustellen. Es konnte eine adäquate Menge NK-Zellen gewonnen werden und mit dem Verfahren zur Herstellung des Transplantationsproduktes wurde eine effektive T-Zelldepletion erreicht.

Die technische Durchführbarkeit der Aufreinigung von NK-Zellen im klinischen Maßstab konnte ebenfalls von anderen Gruppen gezeigt werden (80,81). Die Resultate demonstrieren, dass das Aufreinigungsverfahren die gestellten Anforderungen an eine klinische Nutzung der Produkte erfüllt.

Zur Herstellung eines NK-Zellinfusionsgemisches sind in der Vergangenheit mehrere Verfahren vorgeschlagen worden. Unter anderem stehen hier Zweischritt-Verfahren mit entweder primärer Depletion von CD3⁺-Zellen durch Immunmagnetisierung und anschließender Anreicherung von CD56⁺-Zellen (81-83) oder CD56-Selektion gefolgt von CD3-Depletion zur Verfügung (84). In der vorliegenden Arbeit wurde ersteres Verfahren gewählt, weil es ein hohes Maß an Reinheit und Ausbeute gewährleistet.

Durch die vor Leukapherese durchgeführte Mobilisation der Blutzellen durch G-CSF erreichte das Stammzellselektionsverfahren eine durchschnittliche Ausbeute von $8,67 \times 10^6$ /kg KG CD34⁺-Zellen pro Leukapherese, so dass spätestens nach zwei Apheresen mit deutlich über 1×10^7 /kg KG CD34⁺-Zellen genügend Zellen zur Megadosistransplantation vorlagen. Die anschließende Selektion der CD56⁺-Zellen aus der Fraktion der CD34⁺-Zellen erreichte nicht die gewünschte Zahl von 1×10^7 /kg KG CD56⁺-Zellen, lag aber mit durchschnittlich $8,96 \times 10^6$ /kg KG CD56⁺-Zellen nah an diesem Zielwert. Die Gründe für das nicht Erreichen des Zielwertes lagen in der relativ geringen NK-Zellzahl im Apheresat und in einem Verlust von NK-Zellen durch die Selektionschritte, wie sie auch von Passweg et al. berichtet werden (81). Der T-Zellanteil an dem NK-Zellinfusionsgemisch war sehr niedrig und erreichte im Mittel $5,63 \times 10^4$ /kg KG CD3⁺-Zellen, überstieg damit jedoch in vier Fällen das vorher gesetzte Ziel von 5×10^4 /kg KG CD3⁺-Zellen. Einer dieser Patienten war Patient 6, der auf Grund der dreimaligen Transplantation insgesamt zwei NK-Zellinfusionen erhielt und deshalb mehr als die gewünschte Menge CD3⁺-Zellen erhielt. Ein zweiter Patient war Patientin 7, die

den Zielwert überschritt, weil sie eine zusätzliche NK-Zellinfusion zum Zeitpunkt ihres Rezidivs erhielt.

4.2 Klinischer Teil

4.2.1 Verlauf, Komplikationen und Infektion

4.2.1.1 Verträglichkeit der NK-Zellinfusion

Diese Arbeit zeigt, dass die zusätzliche Gabe von NK-Zellen im Anschluss an eine haploidentische Blutstammzelltransplantation technisch und klinisch ohne Schwierigkeiten möglich ist. Allergische Reaktionen, Infektionen oder andere Komplikationen, die man der adjuvanten Zelltherapie zuordnen konnte, traten nicht auf. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der Gruppe Passweg et al., die bei der Infusion von hochaufgereinigten NK-Zellen nach haploidentischer Stammzelltransplantation ebenfalls keine direkten Komplikationen beobachten konnten (81).

4.2.1.2 Komplikationen und Infektionen

Zwei der sechs behandelten Patienten leben ohne Hinweis auf eine Resterkkrankung. Drei Patienten sind auf Grund der starken Immunsuppression und des sich nur langsam erholenden Immunsystems an infektiösen Folgen gestorben. Eine Patientin verstarb an den Folgen eines trotz Therapie erneut auftretenden Rezidivs.

Die hohe Rate an letalen Infektionen bleibt eines der Hauptprobleme bei einem haploidentischen Transplantationsschema. Zukünftige Forschungsprojekte sollten Lösungsansätze für diese Problematik enthalten. Der Rekonstitution des Immunsystems gilt in diesem Zusammenhang besonderes Augenmerk.

4.2.2 GvH-Reaktion

Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten entwickelten mindestens eine GvH-Reaktion I. Ein Patient zeigte sogar eine GvH-Reaktion II, wobei diese histologisch nicht einwandfrei bewiesen werden konnte. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den Erfahrungen anderer Autoren, die bei der zusätzlichen Gabe von NK-Zellen ein Auftreten von GvH-Reaktionen nicht nachweisen konnten (80,81,85).

Da die GvH-verdächtigen Bereiche der Haut biopsiert und mikroskopisch untersucht worden sind und sich hierbei in den aktiven Arealen ausschließlich CD3⁺-Zellen fanden,

ist eine Beteiligung der NK-Zellen am Reaktionsgeschehen unwahrscheinlich. Die GvH-Reaktionen waren also T-zellvermittelt.

Eine mögliche Erklärung für die hier beobachtete Häufigkeit von GvH-Reaktionen könnte in der Gabe von OKT3 liegen. Die GvH-Reaktionen zeigten sich alle zu einem frühen Zeitpunkt nach Transplantation. Möglicherweise aktivierte der OKT3-Antikörper, den alle Patienten im Zuge des Transplantationsschemas (siehe Abbildung 2.3 und Abbildung 2.4) erhielten, die wenigen transplantierten T-Zellen. Bei Aversa et al., die bei ihren Untersuchungen nur eine Häufigkeit von 8/100 GvH-Reaktionen beobachteten, wurde der OKT3-Antikörper nicht benutzt (86). Bei der adjuvanten Immuntherapie mit NK-Zellen von fünf Patienten der Gruppe Passweg et al. traten sogar gar keine GvH-Reaktionen in Erscheinung. Das Transplantationsprotokoll umfasste in diesem Fall ebenfalls die Gabe von OKT3, jedoch erst nach Transplantation für 14 Tage und nicht wie in dieser Arbeit schon vier Tage vor Transplantation (81). Der Zeitpunkt der OKT3-Gabe könnte ebenfalls eine Rolle für die unterschiedlichen Ergebnisse gespielt haben.

Auch wenn die Depletion der T-Zellen aus dem Transplantat um durchschnittlich 3,39 Logstufen sehr hoch war, hat ein anderes Verfahren mit einer zweifachen T-Zelldepletion vor CD56⁺-Anreicherung gezeigt, dass eine Hochaufreinigung von NK-Zellen mit einem noch niedrigeren T-Zellgehalt möglich ist (80). In diesem Fall erreichte man eine Depletion um 4,2 bis 6,6 Logstufen. Die mit den IL2-aktivierten NK-Zellinfusionsgemisch behandelten drei Patienten entwickelten im Verlauf keine GvH-Reaktionen. Eine weitere T-Zelldepletion, wie von Koehl et al. gezeigt, kann vermutlich die Entwicklung von GvH-Reaktionen weiter vermindern und gleichzeitig die gewünschte Höchstmenge von 5×10^4 /kg KG CD3⁺-Zellen sicherstellen.

Wie groß der Einfluss der einzelnen Komponenten (Konditionierungsschema, T-Zellgehalt des Infusionsgemisches, medikamentöse Supporttherapie und Rezeptorkonstellation) auf die Entwicklung einer GvH-Reaktion ist, lässt sich nach derzeitigem Wissensstand nicht eindeutig beantworten. Handgretinger et al. berichten aus ihren Untersuchungen z.B. über die Schwierigkeit, Vorhersagen über das Auftreten von GvH-Reaktionen in Abhängigkeit von der transplantierten T-Zellmenge zu machen, so dass die T-Zellmenge nicht der einzige Faktor ist (87). So fanden bei der Betrachtung der Relevanz des KIR-Genpolymorphismus für das Ergebnis von Knochenmarkstransplantationen Gagne et al. unterschiedliche GvH-Reaktionraten für unterschiedliche Spender-Empfänger-KIR-Genpolymorphismen (88). Dort entwickelten

bei Transplantationen von einem Fremdspender 100% der Empfänger eine GvH-Reaktion $>1^\circ$, wenn ihre KIR-Gene identisch mit denen des Spenders waren, der Spender jedoch noch zusätzliche KIR-Gene besaß. Im Vergleich lag die GvH-Reaktionsinzidenz bei nur 60% bei jeder anderen Genkonstellation von Spender und Empfänger. Unter den Bedingungen einer Transplantation von einem verwandten Spender zeigte sich im Gegensatz dazu ein Vorteil für Empfänger, deren KIR-Gene identisch mit denen des Spenders waren und bei denen der Spender ebenfalls noch weitere Gene besaß. Sie entwickelten in keinem Fall eine GvH-Reaktion $>1^\circ$. Diese Daten zeigen, dass die Mechanismen für die Entstehung von GvH-Reaktionen komplex sind und keinem einfachen Regelkreis folgen. KIR-Rezeptoren werden ebenfalls von T-Zellen exprimiert, so dass die Untersuchungen von Gagne et al. keinen direkten Hinweis dafür bieten, dass NK-Zellen an der Vermittlung von GvH-Reaktionen beteiligt sind.

Insgesamt waren die in dieser Arbeit aufgetretenen GvH-Reaktionen gut beherrschbar. In weiteren Studien und an größeren Patientenkollektiven muss ein für das jeweilige Risikoprofil passendes Transplantationschema erarbeitet werden. Um die Entwicklungsmechanismen der GvH-Reaktion und der darauf Einfluss nehmenden Parameter besser zu verstehen, bedarf es weiterer Forschung. Geklärt werden muss, in welchem Ausmaß die Gabe von NK-Zellen die Entwicklung von GvH-Reaktionen beeinflusst. Shlomick et al. zeigten in Mäusestudien, dass durch die Zerstörung dendritischer Zellen GvH-Reaktionen verhindert werden konnten (62). NK-Zellen sind zur Lyse dieser Zellen in vivo fähig (78). Sollte sich ein GvH-protectiver Effekt nachweisen lassen und sollte dieser ausgeprägt sein, was in dieser Arbeit nicht gezeigt werden konnte, ließen sich deutlich mehr T-Zellen transplantieren. Der Verlust des GvL-Effektes durch die starke T-Zelldepletion bei haploidentischen Stammzelltransplantationen könnte reduziert werden, ohne den Patienten ein größeres GvH-Risiko zuzumuten. Bessere Ergebnisse in Bezug auf Rezidivrate und Abstoßungsverhalten könnten damit erreicht werden. Besonders bei der Behandlung von Patienten mit ALL, für die ein GvL-Effekt der NK-Zellen nicht nachgewiesen werden konnte, könnte die Prognose unter einem haploidentischen Transplantationssetting dann vorteilhafter sein.

4.2.3 Engraftment

Die vorliegende Arbeit konnte in ihrem kleinen Patientenkollektiv zeigen, dass das Engraftment bei fünf von sechs Patienten schnell und sicher war. Um das Engraftment unter diesem Transplantationsschema mit dem Engraftmentverhalten anderer Schemata zu vergleichen, bedarf es einer größeren Fallzahl. Die untersuchten Fälle wiesen jedoch auf ein sehr gutes Engraftmentverhalten unter diesen Transplantationsbedingungen hin.

Ausschließlich Patient 6 zeigte nach der ersten Transplantation eine prolongiertes „Non-engraftment“ und nach der zweiten, die ohne NK-Zelltherapie stattfand, ein schnelles Transplantatversagen. Erst die dritte Transplantation mit anschließender NK-Zellinfusion verlief erfolgreich und es kam zu einem schnellen Engraftment. Bei der ersten Transplantation bestand eine Alloreaktivität der NK-Zellen in HvG-Richtung. Die Aktivierung der Spender-NK-Zellen durch übriggebliebene Zellen des Empfängerimmunsystems ist in diesem Fall aus theoretischen Gesichtspunkten nicht optimal. Zusätzlich entfalteten die verbliebenen Empfänger-NK-Zellen eine hohe Aktivität gegen die transplantierten Zellen. Das „Non-engraftment“ nach der ersten Transplantation könnte durch diesen Mechanismus vermittelt sein. Nach der zweiten Transplantation wurden keine zusätzlichen NK-Zellen infundiert, ein GvL-Effekt konnte somit nicht durch NK-Zellen des Spenders unterstützt werden. Da die Alloreaktivität der NK-Zellen aufgrund des neuen Spenders (Tochter) in beide Richtungen (HvG und GvH) aktiv war, konnten verblieben Empfänger-NK-Zellen auch in diesem Fall eine Abstoßungsreaktion unterstützen. Ohne die Spender-NK-Zellen kam es zu einer schnellen Abstoßung des Transplantats. Die dritte Transplantation erfolgte unter den gleichen Spender-Empfänger-Voraussetzungen wie bei der zweiten (Spender war erneut die Tochter). Diesmal erhielt der Patient jedoch zusätzlich eine Spender-NK-Zellinfusion. Nachfolgend kam es zu einem schnellen Engraftment. Anhand des Transplantatversagens nach der zweiten Transplantation und des schnellen Engraftments nach der dritten Transplantation kann ein positiver Effekt einer adjuvanten Immuntherapie mit Spender-NK-Zellen auf das Engraftment vermutet werden. Ein Vorteil für NK-Zellen mit Alloreaktivität in GvH-Richtung erscheint wahrscheinlich beim Vergleich mit der ersten Transplantation.

Der Transplantationsverlauf von Patient 6 zeigt, welchen Einfluss die Auswahl des richtigen Spenders auf das Transplantationsergebnis haben kann. In diesem

Zusammenhang konnten Leung et al. nachweisen, dass die Untersuchung des genauen Rezeptorstatus der NK-Zellen des Spenders zusammen mit dem HLA-Status des Empfängers die besten Vorhersagewerte über das Rezidivrisiko machen konnten (66). Verglichen wurde dieses sogenannte Rezeptor-Liganden-Modell einmal mit der ausschließlichen Untersuchung des HLA-Status von Spender und Empfänger (sog. Ligand-Liganden-Modell) und mit der Lysefähigkeit der NK-Zellen gegen bekannte Leukämiezellklone (sog. NK-Zell-Toxizitäts-Modell), deren Vorhersagewerte signifikant niedriger lagen. Die Prätransplantationsdiagnostik sollte eine Untersuchung des NK-Zellrezeptorstatus umfassen, um die Aktivität der transplantierten NK-Zellen abschätzen zu können und so den Spender mit der höchstmöglichen Wirksamkeit der NK-Zellen gegen die Resterkrankung des Empfängers auszuwählen.

4.2.4 Rezidive

Nur einer der in dieser Arbeit vorgestellten Patienten erlitt ein Rezidiv. Patientin 7 hatte einen starken Blastenanstieg ab Tag 100 nach Transplantation. Dieses Rezidiv erschien besonders überraschend, weil gerade die ihr infundierten NK-Zellen eine Alloreaktivität in GvH-Richtung aufwiesen und deshalb einen starken GvL-Effekt erwarten ließen. Diese Konstellation zeigte in mehreren Studien einen Vorteil für Engraftment und Rezidivhäufigkeit (7). Eine Analyse der Transplantationsergebnisse von 85 Patienten, die von einem haploidenten Spender zwischen 1993 und 2003 transplantiert worden sind, konnte demonstrieren, dass die Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv zu erleiden, bei vorhandener NK-Alloreaktivität gegen den Tumorzellklon deutlich niedriger war. Dort lag die Rezidivwahrscheinlichkeit für die Patienten mit NK-Alloreaktivität bei 17%, im Gegensatz zu 79% bei fehlender NK-Alloreaktivität (58).

Die nach dem Auftreten des Rezidivs erfolgte zweite Gabe von Spender-NK-Zellen zeigte nur eine geringe Wirksamkeit und konnte die Progression der Krankheit nicht aufhalten. Die daraufhin erfolgten Untersuchungen der Empfängerblasten und Spender-NK-Zellen zeigten, dass die Spender-NK-Zellen zwar eine normale Aktivität gegen NK-sensible Zellklone wie K562 hatten, jedoch gegen die Blasten von Patientin 7 wirkungslos blieben. Die Blasten zeigten ebenfalls keine Lyseerscheinungen bei der Inkubation mit Perforin. Hieraus wurde eine Resistenz des Blastenklons gegen Perforin abgeleitet. Damit lässt sich die Wirkungslosigkeit der NK-Zellen erklären und das auftretende Rezidiv ist trotz der NK-Alloreaktivität verständlich, da Perforin die

Haupteffektorsubstanz der NK-Zellen ist (20). Die NK-Zellen konnten in diesem Fall keinen GvL-Effekt vermitteln.

Der Krankheitsverlauf von Patientin 7 zeigt, wie wichtig es ist, die Fähigkeiten und Besonderheiten des Leukämiekklons vor Transplantation zu untersuchen, damit ein geeignetes Therapieschema hinsichtlich Prognose und Wirksamkeit ausgewählt werden kann.

4.2.5 Aktivierung und Expansion der NK-Zellen

Auf Grund von technischen Schwierigkeiten wurden von den später infundierten NK-Zellpräparaten nur drei der acht Infusionsgemische mit IL-2 aktiviert, namentlich die jeweils zweiten Infusionsprodukte der Patienten 6 und 7 und das Infusionsgemisch von Patient 3.

Schon früh in der Erforschung der NK-Zellen konnte gezeigt werden, dass IL-2 die Proliferation der NK-Zellen fördert und deren zytolytische Aktivität verstärkt. Zusätzlich haben Tierstudien demonstriert, dass gerade IL-2-aktivierte NK-Zellen einen stärkeren antileukämischen Effekt besitzen und die GvH-Reaktionen besser verhindern können (73). Eine vorhergehende Aktivierung der NK-Zellen wurde deshalb aus prognostischen Gesichtspunkten durchgeführt. Zusätzlich zeigten die Ergebnisse der Zytotoxteste, dass die aktivierten NK-Zellen eine deutliche Steigerung der Lyserate bewirken (siehe Kapitel 3.1.3). Ähnliche Ergebnisse konnten von Koehl et al. gefunden werden, die die NK-Zellen nach ihrer Selektion 14 Tage mit IL2 stimulierten. Diese NK-Zellen zeigten eine deutlich erhöhte Lysekapazität gegen K562 gegenüber nicht aktivierten NK-Zellen (80). Es ist nach dem derzeitigen Wissenstand nicht eindeutig belegt, ob sich dieser Effekt auch im menschlichen Organismus bemerkbar macht.

In weiteren Untersuchungen muss festgestellt werden, welche Zeitspanne der IL-2-Aktivierung der NK-Zellen am effektivsten ist. Eine längere Inkubation der NK-Zellen mit IL-2 vor ihrer Infusion verstärkt möglicherweise ihre zytolytische Aktivierung. Zur Induktion der Proliferation beispielsweise benötigt IL-2 einen Zeitraum von drei bis vier Tagen (35,37). Dementsprechend ist eine anschließende Applikation von IL-2 am Patienten vielleicht eine weitere Möglichkeit, das Engraftment der NK-Zellen zu fördern und die Expansion der NK-Zellen in vivo zu verstärken (85).

Miller et al. haben festgestellt, dass es zu einem signifikant besseren NK-Zell-Engraftment kam, wenn nach der Konditionierung ein hoher IL-15-Spiegel beim

Patienten vorlag (85). Diese Beobachtungen decken sich mit der Rolle von IL-15 bei der Entwicklung der NK-Zellen aus CD34⁺-Vorläuferzellen (89-91). Der Einfluss des Konditionierungsschemas auf das Engraftment und die Rolle aktivierender Zytokine sowie ihrer Anwendungsmöglichkeiten müssen in Folgestudien weiter untersucht werden.

4.2.6 NK-Alloreaktivität

Bei insgesamt drei Patienten zeigte die HLA-Untersuchung eine prognostizierte NK-Alloreaktivität in GvH-Richtung. Die besonderen Fälle der Patienten 6 und 7 sind oben beschrieben. Der dritte, Patient 2, verstarb an einem Leber- und Nierenversagen in Zusammenhang mit einer Pneumonie.

Dass sich ein Infekt bei Patienten mit einer KIR-Ligandeninkompatibilität häufiger entwickeln könnte, lässt sich nicht direkt folgern. Schaffer et al. berichten zwar über ein gehäuftes Auftreten letaler Infektionen bei Patienten nach Stammzelltransplantation von einem Fremdspender mit KIR-Ligandeninkompatibilität (71), aber bei den bisher veröffentlichten Daten für haploidentische Transplantationen ist über keine Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit von Infektionen berichtet worden.

Die NK-Zellen der zwei lebenden Patienten 3 und 5 und des verstorbenen Patienten 4 wiesen keine spezifische Alloreaktivität auf.

Zusammengefasst lassen sich statistisch signifikante Aussagen über den Vor- oder Nachteil einer NK-Alloreaktivität in GvH- oder HvG-Richtung bei dem kleinen hier untersuchten Patientenkollektiv nicht treffen. Besonders hervorzuheben ist, dass es sich bei zwei von drei Fällen (Patienten 6 und 7) mit NK-Alloreaktivität in GvH-Richtung um solche speziellen Fälle handelte, aus dessen Verlauf sich kein Nachteil für eine KIR-Ligandeninkompatibilität ableiten lässt.

Unter anderem konnten Castro et al. für Patienten mit CML zeigen, dass die NK-Zellen bei der Vermittlung von GvL-Effekten mitverantwortlich sind (92). Da ihre Reaktivität jedoch von einem KIR-Ligandenmismatch abhängig ist, sollte auch der vermittelte GvL-Effekt stärker ausgeprägt sein, wenn eine KIR-Ligandeninkompatibilität in GvH-Richtung vorliegt.

Wie schon in der Einleitung dargelegt, konnten Ruggeri et al. eine deutliche Prognoseverbesserung für Patienten nach haploidentischer Transplantation mit KIR-

Ligandenmismatch in GvH-Richtung nachweisen (60). Deshalb sollte in weiterführenden Studien an größeren Patientenzahlen auch die Bedeutung des KIR-Ligandenmatch oder -mismatch hinsichtlich der Rezidivrate, des Engraftmentverhaltens und der transplantationsassoziierten Komplikationen in einem Transplantationsetting mit anschließender adjuvanter Immuntherapie durch NK-Zellen näher untersucht werden.

4.3 Immunologischer Teil

4.3.1 Immunologische Rekonstitution

Die Rekonstitution der Lymphozyten verlief sehr langsam. Granulozyten und Monozyten erholten sich schnell. Ähnliche Ergebnisse beobachteten auch Passweg et al.: Kurz nach Transplantation bestand der Hauptteil der Leukozyten aus Granulozyten. Die Lymphozytenrekonstitution verlief langsam mit einer schnelleren Erholung der NK-Zellen gegenüber den T-Zellen (81). Die Regeneration der NK-Zellen war in der hier vorgestellten Arbeit ähnlich wie bei Ruggeri et al. gut (60). Die verzögerte Rekonstitution besonders der T-Zellen ist ein bekanntes Problem bei haploidentischen Transplantationen (16,87,93-97). Eine Ursache ist wahrscheinlich die geringe Menge an transplantierten T-Zellen, da zur Verhinderung schwerer GvH-Reaktionen das Transplantat einer effizienten T-Zelldepletion unterzogen wird.

Drei der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten sechs Patienten sind im Verlauf an den direkten Folgen schwerer Infektionen gestorben. Andere Autoren berichten ebenfalls, dass das Risiko, eine letale Infektionskomplikation zu erleiden, das größte Hindernis in Zusammenhang mit haploidentischen Transplantationsschemata darstellt und dass die verzögerte immunologische Rekonstitution ein noch ungelöstes Problem darstellt (98). Ein Einfluss der NK-Zellinfusion auf die immunologische Rekonstruktion konnte nicht festgestellt werden, allerdings fehlt eine Kontrollgruppe und die Patientenzahl ist niedrig. Auch nach haploidentischer Transplantation ohne zusätzliche NK-Zellinfusion ist ein Anstieg der NK-Zellpopulation um das Doppelte aufgefallen (15). Denkbar wäre, dass die relativ hohe Zahl peripherer NK-Zellen im Blut nach der Transplantation die Entwicklung der T-Zellen beeinflusst. Der Anteil an NK-Zellen an den gesamten peripheren Lymphozyten im Blut betrug zeitweise bei einigen Patienten deutlich über 50%, wobei 10-15% physiologisch sind (21). Weiterhin ist bekannt, dass NK-Zellen die Fähigkeit besitzen, Einfluss auf die Hämatopoese zu nehmen (21). Kim et al. konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass ein höherer NK-Zellgehalt im Transplantat zu

einer niedrigeren Inzidenz der nichtrezidivabhängigen Mortalität führt. Gleichzeitig sinkt die Inzidenz von Infektionen (99). In diesem Fall handelte es sich allerdings um HLA-identische Transplantationen von einem Fremdspender. Die Gruppe mit dem höheren NK-Zellgehalt zeigte ebenfalls eine schnellere immunologische Rekonstitution. Es scheint also möglich, dass eine starke NK-Zellpopulation, wie in dieser Arbeit nach Transplantation ebenfalls gegeben, die Maturation der T-Zellen zusätzlich beeinflusst. Die Mechanismen sind allerdings nicht vollständig verstanden.

Aktuell werden unterschiedliche Ansätze verfolgt, um das Problem der langsamen Rekonstitution der T-Zellen in den Griff zu bekommen (100). Amrolia et al. konnten zeigen, dass die zusätzliche Infusion von speziell selektionierten Spender-T-Zellen die Rekonstitution der T-Zellen beschleunigt, ohne Einfluss auf die GvH-Reaktionsrate zu nehmen (101). Versuche, durch ein reduziertes Konditionierungsschema für eine bessere immunologische Rekonstitution zu sorgen, zeigten ebenfalls vielversprechende Ergebnisse (102). Um diese Zusammenhänge differenzierter zu betrachten, bedarf es weitergehender Forschung.

4.3.2 NK-Zellrezeptorrepertoire

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass die Entwicklung des Rezeptorrepertoires auf den NK-Zellen sehr uneinheitlich verlief. Die Schwankungsbreite war bis zum letzten Untersuchungszeitpunkt noch sehr groß, so dass davon ausgegangen werden muss, dass sich noch kein stabiles Rezeptorrepertoire gebildet hatte. Shilling et al. hatten nachgewiesen, dass gesunde Probanden ein konstantes Rezeptorrepertoire besitzen (57). Es ist zum Zeitpunkt der letzten Probeentnahme noch nicht erkennbar, welchem Repertoire (Spender oder Empfänger) die transplantierten NK-Zellen ähnlich sein werden. Untersuchungen der Gruppe Shilling et al. zeigten zusätzlich an 18 Patienten nach allogener Transplantation von einem Fremdspender, dass sich das Rezeptorrepertoire früher oder später in den meisten Fällen dem des Spenders angleicht, jedoch niemals dem ursprünglichen Repertoire des Empfängers vor Transplantation gleicht (103). Dabei erreichten die Empfänger das Spenderrepertoire allerdings erst frühestens nach sechs Monaten. Der hier vorliegende Untersuchungszeitraum ist mit längstens 125 Tagen deutlich kürzer. 22 Patienten bei Leung et al. wiederum zeigten schon nach drei Monaten unter einem haploidenten Transplantationsschema ein Rezeptorrepertoire, das dem der Spender entsprach (66). Um Angaben über das langfristige Rezeptorrepertoire der NK-Zellen

nach haploidenter Transplantation mit zusätzlicher Gabe von Spender-NK-Zellen zu machen, sind ein längerer Untersuchungszeitraum und eine größere Patientenzahl notwendig.

Wie auch Shilling et al. in ihren Studien nachweisen konnten, ist die Expression von CD94/NKG2A nach Transplantation deutlich erhöht (57). Die Gruppe vermutet eine voneinander gegenläufig abhängige Entwicklung der Expression von CD94/NKG2A und den KIR-Rezeptoren. Der exakte Grund für den frühen Anstieg von CD94/NKG2A ist bisher nicht bekannt. CD94/NKG2A könnte in der frühen Entwicklung der NK-Zellen ihre Funktionsfähigkeit gewährleisten, wenn noch nicht das volle KIR-Rezeptorrepertoire ausgebildet ist. Solange die NK-Zellen CD94/NKG2A exprimieren ist ihre Alloreaktivität eingeschränkt, denn alle Menschen exprimieren den zugehörigen Liganden HLA-E. HLA-E inhibiert alle CD94/NKG2A-positiven NK-Zellen (7). Die genaue Bedeutung dieses inhibierenden Effektes und Informationen über die Regulationsmechanismen sollten neue Forschungsprojekte erbringen.

Bei Analyse der Rezeptorexpression in Bezug zum HLA-Status fiel auf, dass Patientin 7 im Verlauf NKB1 auf deutlich mehr NK-Zellen exprimierte, obwohl sie aufgrund des HLA-Status keinen für NKB1 passenden Liganden hatte, ihr Spender jedoch schon. Das umgekehrte Beispiel lieferte Patient 6. Er besaß im Gegensatz zu seinem Spender einen passenden Liganden für den Rezeptor NKB1. In diesem Fall war die Häufigkeit von NKB1-exprimierenden NK-Zellen nach Transplantation deutlich niedriger. Andere Ligand-Rezeptor-Unterschiede zwischen Spender und Empfänger zeigten jedoch in dieser Arbeit kein derartig eindeutiges Verhalten, so dass aus den Daten geschlossen werden kann, dass die Veränderung der Rezeptorexpression von mehreren Faktoren abhängig ist. Die Daten weisen daraufhin, dass der HLA-Status kein dominanter Faktor für diese Regulation ist.

Auch für die unterschiedliche Entwicklung der Zellunterpopulationen CD56^{bright} und CD56^{dim} war kein bestimmter Mechanismus erkennbar. Es gibt Anzeichen dafür, dass sich CD56^{bright} generell in seinem KIR-Rezeptorrepertoire von CD56^{dim} unterscheidet (104). Die unterschiedlichen Phänotypen CD56^{dim} und CD56^{bright} werden außerdem als unterschiedliche Reifungsgrade der NK-Zellen diskutiert, wobei CD56^{dim} physiologischerweise den Hauptteil der Population im peripheren Blut bildet (27,104-106). Daten von anderen Autoren lassen jedoch auch die Hypothese zu, dass es sich bei CD56^{dim} und CD56^{bright} um unterschiedlich differenzierte NK-Zellen handelt (105).

Während CD56^{dim} höhere zytotoxische Aktivität aufweist (107), produziert die CD56^{bright}-Subpopulation den größten Teil der von den NK-Zellen gebildeten Zytokine (105). Die Zytotoxizität der CD56^{bright}-Population kann jedoch durch Stimulation mit IL2 deutlich erhöht werden (108,109). Penack et al. konnten in ihren Untersuchungen feststellen, dass NK-Zellen Zytotoxizität vermitteln, wenn sie CD56^{dim}/CD16⁻ sind. CD56^{bright} vermittelt keine Zytotoxizität gegen Leukämiezellen (106). Patientin 5 wies mit einer steigenden CD56^{dim}- und einer sinkenden CD56^{bright}-Population nach Transplantation eine Veränderung ihrer NK-Zellpopulation in Richtung zytotoxisch-aktiver NK-Zellen auf. Bei Patient 6 war der Verlauf entgegengesetzt. Die Untersuchungen von Patient 6 wurden nach der ersten Transplantation gewonnen, diese resultierte in einem prolongierten Non-engraftment. Patientin 5 wiederum lebt ohne Anzeichen für eine Resterkrankung. Möglicherweise ist das bessere Resultat bei Patientin 5 durch die zytotoxisch-aktiveren NK-Zellen mit vermittelt worden. Insgesamt ist die Bedeutung der unterschiedlichen Subpopulationen der NK-Zellen jedoch nicht vollständig verstanden. Auch hier bedarf es weiterer Forschung.

5 Zusammenfassung

Die HLA-identische Blutstammzelltransplantation als Standardverfahren zur Behandlung hämatoonkologischer Erkrankungen kann aufgrund der schwierigen Spendersuche bis heute nicht jedem Erkrankten zugänglich gemacht werden. Bei der haploidentischen Stammzelltransplantation, die für nahezu alle Patienten einen geeigneten Familienspender bereithält, verhindert die Reduktion der CD3⁺-Zellen im Transplantat zur Vorbeugung schwerer Graft-versus-Host-Reaktionen (GvH) gleichzeitig die Vermittlung eines Graft-versus-Leukemia-Effekts (GvL). Adjuvante Zelltherapien könnten eine mögliche Ergänzung sein und dieses Problem lösen.

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Daten von sechs haploidentischen Stammzelltransplantationen mit zusätzlicher NK-Zellgabe, die im Rahmen einer Phase-I-Studie „Transplantation of haematopoietic stem cells and infusion of CD56+CD3- NK-cells from haploidentical donors in patients with haematological malignancies“ erfolgten. Aus technischer Sicht stellte sich die Frage nach der Machbarkeit der Aufbereitung eines NK-Zell-Präparates, nach der Effektivität der verwendeten Methode und nach der Funktionsfähigkeit der NK-Zellen nach dem Selektionsverfahren. Klinisch interessierte die allgemeine Verträglichkeit des NK-Zellgemisches, das Auftreten von Komplikationen, die Häufigkeit und Ausprägung von GvH-Reaktionen und Rezidiven und die Geschwindigkeit und Zuverlässigkeit des Engraftments. Immunologisch wurde die Rekonstruktion der einzelnen immunologischen Zellreihen sowie des Repertoires der NK-Zellrezeptoren nach Transplantation beobachtet.

Es konnte gezeigt werden, dass das Verfahren technisch und klinisch problemlos umsetzbar ist. Durch die Selektion nach Stammzellapherese konnten NK-Zellen mit einer Reinheit von rund 70% gewonnen werden. Die Depletion der CD3⁺-Zellen um 3,4 log-Stufen führte zu einem Zellanteil von durchschnittlich nur 0,06 % im NK-Zellinfusionsgemisch. Die Vitalität der NK-Zellen lag durchschnittlich bei rund 91 %. Mittels Zytotoxizitätstests wurde die Funktionsfähigkeit der NK-Zellen nach Separation an zwei bekannten Tumorzelllinien (ML2 und K562) erfolgreich bewiesen.

Bei der Verabreichung der NK-Zellen traten keine unerwünschten Reaktionen auf. Alle Patienten zeigten limitierte GvH-Reaktionen der Haut, die gut beherrschbar waren. Das Engraftment verlief bei fünf der sechs Patienten zuverlässig. Ein Patient zeigte nach der ersten Transplantation ein prolongiertes Non-engraftment, nach der zweiten kam es zu

einem Transplantatversagen. Nach einem Spenderwechsel vor der dritten Transplantation auf einen Spender mit KIR-Ligandenmismatch in Graft-versus-Host-Richtung kam es zu einem schnellen Engraftment. Ein Patient verstarb an einem Rezidiv seiner Erkrankung. Die Tumorblasten der Patientin waren im Zytotoxizitätstest resistent gegen die Haupteffektorsubstanz der NK-Zellen. Drei Patienten verstarben an infektiösen Komplikationen. Zwei Patienten leben ohne Anzeichen für eine Resterkrankung.

Bei allen Patienten war die immunologische Restitution verzögert. Insbesondere die Entwicklung der T-Zellen verlief prolongiert. Die Entwicklung des Rezeptorrepertoires der NK-Zellen nach Transplantation zeigte kein einheitliches Verhaltensmuster. Kurz nach Transplantation zeigte sich eine Steigerung der Häufigkeit von NKG2A/CD94 und eine insgesamt gesunkene Häufigkeit der KIR-Rezeptoren.

Andere wissenschaftliche Arbeitsgruppen fanden im Gegensatz zu dieser Arbeit keine Anzeichen von GvH-Reaktionen bei Transplantationen mit adjuvanter NK-Zellgabe. Die immunologische Restitution ist bei allen Autoren nach haploidentischen Transplantationen verzögert. Dieses Problem bleibt vor dem Hintergrund, dass infektiöse Komplikationen nach Transplantation häufige Todesursache sind, derzeit ungelöst. In der zukünftigen wissenschaftlichen Arbeit wird es interessant sein, die Auswirkung der Konditionierung der Empfänger und Zeitpunkt der NK-Zellgabe auf die immunologische Restitution und Heilungsrate zu beobachten. Es fehlen derzeit noch Erkenntnisse über die Entwicklung und das Verhalten der NK-Zellen und ihrer Rezeptoren. Besondere Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang der Erforschung der aktivierenden Rezeptoren sowie der nötigen Kofaktoren für eine Lyse durch NK-Zellen zu. Die Rolle einer KIR-Ligandeninkompatibilität insbesondere unter adjuvanter Gabe von Spender-NK-Zellen ist derzeit ebenfalls unklar. Die Daten von haploidentischen Transplantationen ohne zusätzliche NK-Zellgabe weisen auf einen deutlichen Vorteil für Spender-Empfänger-Konstellationen mit einer KIR-Ligandeninkompatibilität hin. Unter den Voraussetzungen einer HLA-identischen Transplantation sind die bisherigen Ergebnisse jedoch widersprüchlich.

Sollten sich in einer Phase-II-Studie die positiven Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen lassen, könnte dies die Heilungschancen insbesondere von Patienten mit fehlendem HLA-identischen Spender deutlich verbessern.

6 Literaturverzeichnis

1. Buchner T, Hiddemann W, Wormann B et al. Double induction strategy for acute myeloid leukemia: the effect of high-dose cytarabine with mitoxantrone instead of standard-dose cytarabine with daunorubicin and 6-thioguanine: a randomized trial by the German AML Cooperative Group. *Blood* 1999;93: 4116-4124.
2. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999;341: 1051-1062.
3. Kolb HJ, Schmid C, Barrett AJ, Schendel DJ. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood* 2004;103: 767-776.
4. 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.
5. Ruggeri L, Capanni M, Mancusi A, Martelli MF, Velardi A. The impact of donor natural killer cell alloreactivity on allogeneic hematopoietic transplantation. *Transpl Immunol* 2005;14: 203-206.
6. Reisner Y, Bachar-Lustig E, Li HW, Aversa F, Velardi A, Martelli MF. The role of megadose CD34+ progenitor cells in the treatment of leukemia patients without a matched donor and in tolerance induction for organ transplantation. *Ann N Y Acad Sci* 1999;872:336-48; discussion 348-50.: 336-348.
7. 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.
8. Anasetti C, Velardi A. Haematopoetic cell transplantation from HLA partially matched related donors. Blume, K. G., Forman S.J., and Appelbaum F.R. 3rd. 1-1-2004. Blackwell Science. Haematopoetic cell transplantation, 3rd edition.
9. Reisner Y, Kapoor N, Kirkpatrick D et al. Transplantation for severe combined immunodeficiency with HLA-A,B,D,DR incompatible parental marrow cells fractionated by soybean agglutinin and sheep red blood cells. *Blood* 1983;61: 341-348.

10. Lang P, Schumm M, Taylor G et al. Clinical scale isolation of highly purified peripheral CD34+progenitors for autologous and allogeneic transplantation in children. *Bone Marrow Transplant* 1999;24: 583-589.
11. Schumm M, Lang P, Taylor G et al. Isolation of highly purified autologous and allogeneic peripheral CD34+ cells using the CliniMACS device. *J Hematother* 1999;8: 209-218.
12. Bachar-Lustig E, Rachamim N, Li HW, Lan F, Reisner Y. Megadose of T cell-depleted bone marrow overcomes MHC barriers in sublethally irradiated mice. *Nat Med* 1995;1: 1268-1273.
13. Reisner Y, Martelli MF. Bone marrow transplantation across HLA barriers by increasing the number of transplanted cells. *Immunol Today* 1995;16: 437-440.
14. Aversa F, Terenzi A, Felicini R et al. Mismatched T cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation for children with high-risk acute leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1998;22 Suppl 5:S29-32.: S29-S32.
15. Aversa F, Tabilio A, Terenzi A et al. Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood* 1994;84: 3948-3955.
16. Aversa F, Tabilio A, Velardi A et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med* 1998;339: 1186-1193.
17. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990;76: 2462-2465.
18. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 1995;86: 2041-2050.
19. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989;47:187-376.: 187-376.
20. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2: 850-861.

21. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990;76: 2421-2438.
22. French AR, Yokoyama WM. Natural killer cells and viral infections. *Curr Opin Immunol* 2003;15: 45-51.
23. Landay AL, Zarccone D, Grossi CE, Bauer K. Relationship between target cell cycle and susceptibility to natural killer lysis. *Cancer Res* 1987;47: 2767-2770.
24. Perussia B, Trinchieri G, Jackson A et al. The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies. *J Immunol* 1984;133: 180-189.
25. Perussia B, Trinchieri G. Antibody 3G8, specific for the human neutrophil Fc receptor, reacts with natural killer cells. *J Immunol* 1984;132: 1410-1415.
26. Takasugi M, Mickey MR, Terasaki PI. Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells. *Cancer Res* 1973;33: 2898-2902.
27. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001;22: 633-640.
28. Timonen T, Saksela E. Isolation of human NK cells by density gradient centrifugation. *J Immunol Methods* 1980;36: 285-291.
29. Timonen T, Ortaldo JR, Herberman RB. Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *J Exp Med* 1981;153: 569-582.
30. Herberman RB, Ortaldo JR. Natural killer cells: their roles in defenses against disease. *Science* 1981;214: 24-30.
31. Stern P, Gidlund M, Orn A, Wigzell H. Natural killer cells mediate lysis of embryonal carcinoma cells lacking MHC. *Nature* 1980;285: 341-342.
32. Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002;100: 1935-1947.
33. Brunda MJ, Tarnowski D, Davatelis V. Interaction of recombinant interferons with recombinant interleukin-2: differential effects on natural killer cell activity and interleukin-2-activated killer cells. *Int J Cancer* 1986;37: 787-793.

34. Henney CS, Kuribayashi K, Kern DE, Gillis S. Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature* 1981;291: 335-338.
35. London L, Perussia B, Trinchieri G. Induction of proliferation in vitro of resting human natural killer cells: IL 2 induces into cell cycle most peripheral blood NK cells, but only a minor subset of low density T cells. *J Immunol* 1986;137: 3845-3854.
36. Svedersky LP, Shepard HM, Spencer SA, Shalaby MR, Palladino MA. Augmentation of human natural cell-mediated cytotoxicity by recombinant human interleukin 2. *J Immunol* 1984;133: 714-718.
37. Trinchieri G, Matsumoto-Kobayashi M, Clark SC, Seehra J, London L, Perussia B. Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2. *J Exp Med* 1984;160: 1147-1169.
38. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990;11: 237-244.
39. Moretta A, Vitale M, Bottino C et al. P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med* 1993;178: 597-604.
40. Lobo PI, Spencer CE. Use of anti-HLA antibodies to mask major histocompatibility complex gene products on tumor cells can enhance susceptibility of these cells to lysis by natural killer cells. *J Clin Invest* 1989;83: 278-287.
41. Karlhofer FM, Ribaldo RK, Yokoyama WM. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells. *Nature* 1992;358: 66-70.
42. Moretta L, Ciccone E, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A. Human natural killer cells: origin, clonality, specificity, and receptors. *Adv Immunol* 1994;55:341-80.: 341-380.
43. Borrego F, Kabat J, Kim DK et al. Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol* 2002;38: 637-660.
44. Moretta A, Bottino C, Vitale M et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001;19:197-223.: 197-223.

45. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002;20:217-51. Epub;2001 Oct 4.: 217-251.
46. Biassoni R, Cantoni C, Falco M et al. The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions. *J Exp Med* 1996;183: 645-650.
47. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 1997;7: 739-751.
48. Dohring C, Scheidegger D, Samaridis J, Cella M, Colonna M. A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J Immunol* 1996;156: 3098-3101.
49. Litwin V, Gumperz J, Parham P, Phillips JH, Lanier LL. NKB1: a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *J Exp Med* 1994;180: 537-543.
50. Moretta A, Bottino C, Pende D et al. Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J Exp Med* 1990;172: 1589-1598.
51. Pende D, Biassoni R, Cantoni C et al. The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J Exp Med* 1996;184: 505-518.
52. Vitale M, Sivori S, Pende D et al. Physical and functional independency of p70 and p58 natural killer (NK) cell receptors for HLA class I: their role in the definition of different groups of alloreactive NK cell clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93: 1453-1457.
53. Wagtmann N, Rajagopalan S, Winter CC, Peruzzi M, Long EO. Killer cell inhibitory receptors specific for HLA-C and HLA-B identified by direct binding and by functional transfer. *Immunity* 1995;3: 801-809.

54. Passweg JR, Stern M, Koehl U, Uharek L, Tichelli A. Use of natural killer cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2005;35: 637-643.
55. Suto Y, Ishikawa Y, Kasahara M et al. Gene arrangement of the killer cell inhibitory receptor family on human chromosome 19q13.4 detected by fiber-FISH. *Immunogenetics* 1998;48: 235-241.
56. Wende H, Colonna M, Ziegler A, Volz A. Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4. *Mamm Genome* 1999;10: 154-160.
57. Shilling HG, Young N, Guethlein LA et al. Genetic control of human NK cell repertoire. *J Immunol* 2002;169: 239-247.
58. Ruggeri L, Capanni M, Mancusi A et al. Alloreactive natural killer cells in mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 2004;33: 216-221.
59. Ruggeri L, Capanni M, Martelli MF, Velardi A. Cellular therapy: exploiting NK cell alloreactivity in transplantation. *Curr Opin Hematol* 2001;8: 355-359.
60. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295: 2097-2100.
61. Ruggeri L, Capanni M, Tosti A et al. Innate immunity against hematological malignancies. *Cytotherapy* 2002;4: 343-346.
62. 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.
63. Velardi A, Ruggeri L, Alessandro, Moretta, Moretta L. NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation. *Trends Immunol* 2002;23: 438-444.
64. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1999;94: 333-339.

65. Thomas ED, Blume KG, Forman S.J. Hematopoietic Cell Transplantation. 2nd. 1999. Blackwell science.

Ref Type: Serial (Book, Monograph)

66. Leung W, Iyengar R, Turner V et al. Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. *J Immunol* 2004;172: 644-650.

67. Mengarelli A, Zarcone D, Caruso R et al. Adhesion molecule expression, clinical features and therapy outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2001;40: 625-630.

68. 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.

69. Schaffer M, Malmberg KJ, Ringden O, Ljunggren HG, Remberger M. Increased infection-related mortality in KIR-ligand-mismatched unrelated allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation* 2004;78: 1081-1085.

70. 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.

71. Malmberg KJ, Schaffer M, Ringden O, Remberger M, Ljunggren HG. KIR-ligand mismatch in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Mol Immunol* 2005;42: 531-534.

72. Zijlstra M, Auchincloss H, Jr., Loring JM, Chase CM, Russell PS, Jaenisch R. Skin graft rejection by beta 2-microglobulin-deficient mice. *J Exp Med* 1992;175: 885-893.

73. Uharek L, Glass B, Gaska T et al. Natural killer cells as effector cells of graft-versus-leukemia activity in a murine transplantation model. *Bone Marrow Transplant* 1993;12 Suppl 3:S57-60.: S57-S60.

74. Zeis M, Uharek L, Glass B et al. Allogeneic NK cells as potent antileukemic effector cells after allogeneic bone marrow transplantation in mice. *Transplantation* 1995;59: 1734-1736.

75. Zeis M, Uharek L, Glass B et al. Allogeneic MHC-mismatched activated natural killer cells administered after bone marrow transplantation provide a strong graft-versus-leukaemia effect in mice. *Br J Haematol* 1997;96: 757-761.
76. 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.
77. Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Munz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 2002;195: 343-351.
78. Hayakawa Y, Screpanti V, Yagita H et al. NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy. *J Immunol* 2004;172: 123-129.
79. Glucksberg H, Storb R, Fefer A et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 1974;18: 295-304.
80. 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.
81. 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.
82. Iyengar R, Handgretinger R, Babarin-Dorner A et al. Purification of human natural killer cells using a clinical-scale immunomagnetic method. *Cytotherapy* 2003;5: 479-484.
83. Koehl U, Sorensen J, Esser R et al. IL-2 activated NK cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 2004;33: 261-266.
84. Lang P, Pfeiffer M, Handgretinger R et al. Clinical scale isolation of T cell-depleted CD56+ donor lymphocytes in children. *Bone Marrow Transplant* 2002;29: 497-502.

85. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltzis-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.
86. Aversa F, Terenzi A, Tabilio A et al. Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. *J Clin Oncol* 2005;23: 3447-3454.
87. Handgretinger R, Klingebiel T, Lang P et al. Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplant* 2001;27: 777-783.
88. Gagne K, Brizard G, Gueglio B et al. Relevance of KIR gene polymorphisms in bone marrow transplantation outcome. *Hum Immunol* 2002;63: 271-280.
89. Yu H, Fehniger TA, Fuchshuber P et al. Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood* 1998;92: 3647-3657.
90. Miller JS, McCullar V. Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2. *Blood* 2001;98: 705-713.
91. Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 2001;97: 14-32.
92. Castro FA, Palma PV, Morais FR, Voltarelli JC. Immunological effects of donor lymphocyte infusion in patients with chronic myelogenous leukemia relapsing after bone marrow transplantation. *Braz J Med Biol Res* 2004;37: 201-206.
93. Henslee-Downey PJ. Allogeneic transplantation across major HLA barriers. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14: 741-754.
94. Martelli MF, Aversa F, Bachar-Lustig E et al. Transplants across human leukocyte antigen barriers. *Semin Hematol* 2002;39: 48-56.
95. Passweg JR, Kuhne T, Gregor M et al. Increased stem cell dose, as obtained using currently available technology, may not be sufficient for engraftment of haploidentical stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant* 2000;26: 1033-1036.

96. Rowe JM, Lazarus HM. Genetically haploidentical stem cell transplantation for acute leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2001;27: 669-676.
97. Singhal S, Henslee-Downey PJ, Powles R et al. Haploidentical vs autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute leukemia beyond first remission. *Bone Marrow Transplant* 2003;31: 889-895.
98. Walker I, Shehata N, Cantin G et al. Canadian multicenter pilot trial of haploidentical donor transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 2004;33: 222-226.
99. Kim DH, Sohn SK, Lee NY et al. Transplantation with higher dose of natural killer cells associated with better outcomes in terms of non-relapse mortality and infectious events after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation from HLA-matched sibling donors. *Eur J Haematol* 2005;75: 299-308.
100. Ballen KK, Colvin G, Dey BR et al. Cellular immune therapy for refractory cancers: novel therapeutic strategies. *Exp Hematol* 2005;33: 1427-1435.
101. Amrolia PJ, Muccioli-Casadei G, Huls H et al. Adoptive immunotherapy with allodepleted donor T-cells improves immune reconstitution after haploidentical stem cell transplantation. *Blood* 2006;108: 1797-1808.
102. Chen X, Hale GA, Barfield R et al. Rapid immune reconstitution after a reduced-intensity conditioning regimen and a CD3-depleted haploidentical stem cell graft for paediatric refractory haematological malignancies. *Br J Haematol* 2006;135: 524-532.
103. Shilling HG, McQueen KL, Cheng NW, Shizuru JA, Negrin RS, Parham P. Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2003;101: 3730-3740.
104. Jacobs R, Hintzen G, Kemper A et al. CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol* 2001;31: 3121-3127.
105. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 2001;97: 3146-3151.
106. Penack O, Gentilini C, Fischer L et al. CD56dimCD16neg cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets. *Leukemia* 2005;19: 835-840.

107. Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 1989;143: 3183-3191.

108. Robertson MJ, Soiffer RJ, Wolf SF et al. Response of human natural killer (NK) cells to NK cell stimulatory factor (NKSF): cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF. *J Exp Med* 1992;175: 779-788.

109. Ellis TM, Fisher RI. Functional heterogeneity of Leu 19^{bright}+ and Leu 19^{dim}+ lymphokine-activated killer cells. *J Immunol* 1989;142: 2949-2954.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: <i>Automatisiertes Aufreinigungsverfahren zur Gewinnung hochreiner Zelllösungen.</i>	18
Abbildung 2.2: <i>Durchflußzytometrische Bestimmung der Zellfraktionen in der Probe</i> ...	20
Abbildung 2.3: <i>Konditionierungsschema bei Patienten ohne vorhergegangene Transplantation in den letzten sechs Monaten. N=4.</i>	21
Abbildung 2.4: <i>Konditionierungsschema bei Patienten nach vorangegangener Transplantation in den letzten sechs Monaten vor Behandlungsbeginn. N=2</i>	21
Abbildung 3.1 : <i>Zytotoxizitätsteste der NK-Zellen von Patient 2 vor Transplantation. Links: NK-Zellen gegen ML2; Lyse nur schwach, jedoch stärker mit aktivierten NK-Zellen. Rechts: NK-Zellen gegen K562; stärkste Lyse mit aktivierten NK-Zellen.</i> ..	31
Abbildung 3.2 : <i>Zytotoxizitätsteste der NK-Zellen von Patient 3 nach Transplantation. Links: NK-Zellen gegen ML2; Lyse nur schwach, jedoch stärker mit aktivierten NK-Zellen. Rechts: NK-Zellen gegen K562; stärkste Lyse mit aktivierten NK-Zellen.</i> ..	32
Abbildung 3.3: <i>Zytotoxizitätsteste von Patientin 4 vor Transplantation. Links: Starke spezifische Lyse von K562 durch aktivierte Spender-NK-Zellen. Rechts: Spezifische Lyse von K562 durch Empfänger-NK-Zellen; deutlich schwächeres Lyseverhalten der Empfänger-NK-Zellen im Vergleich mit den Spender-NK-Zellen.</i>	32
Abbildung 3.4: <i>Zytotoxizitätsteste Patientin 5 nach Transplantation. Links: NK-Zellen gegen ML2, insgesamt schlechtes Lyseverhalten, jedoch aktivierte NK-Zellen besser. Rechts: NK-Zellen gegen K562. Gutes Lyseverhalten besonders bei den aktivierten NK-Zellen.</i>	33
Abbildung 3.5: <i>Zytotoxizitätsteste Patient 6 nach Transplantation. Links: NK-Zellen gegen ML2, insgesamt schlechtes Lyseverhalten, jedoch aktivierte NK-Zellen besser. Rechts: NK-Zellen gegen K562. Gutes Lyseverhalten besonders bei den aktivierten NK-Zellen.</i>	33
Abbildung 3.6: <i>Zytotoxizitätsteste Patientin 7 nach Transplantation. Links: NK-Zellen gegen ML2, insgesamt schlechtes Lyseverhalten, jedoch aktivierte NK-Zellen</i>	

<i>besser. Rechts: NK-Zellen gegen K562. Gutes Lyseverhalten der aktivierten NK-Zellen.....</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 3.7 : Blastenanteil von Patient 7 im peripheren Blut zum Zeitpunkt des erneuten Rezidivs. Mit einem Pfeil markiert ist die zweite Gabe von Spender-CD56⁺-Zellen. Anschließend kurzzeitiger Abfall des Blastenanteils.....</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 3.8: Entwicklung der Leukozytenzahlen im Blut nach Transplantation bei den Patienten 2 – 5 und 7. Man sieht ein schnelles Leukozytenengraftment.....</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 3.9: Entwicklung der Leukozytenzahlen im Blut nach den drei Transplantationen bei Patient 6. Man sieht das fehlende Leukozytenengraftment bei der zweiten Transplantation.....</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 3.10: Entwicklung der Leukozyten nach Transplantation. Zusehen ist ein starker Anstieg der Gesamtleukozyten, vor allem der Granulozyten. Normaler Verlauf der Monozyten. Die Lymphozyten bleiben mit einem Anteil von rund 10% an den Gesamtlphozyten erniedrigt.....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 3.11: Patienten 4,5,6 und 7 zeigen einen langsamen Anstieg der T-Zellen bis Tag 120, das Gesamtniveau bleibt jedoch niedrig und beträgt am Tag 120 durchschnittlich rund 150 ZZ/μl. In dieser Gruppe gibt es einen späten Anstieg der NK-Zellen zwischen Tag 60 und 80. Auch bei diesen Patienten ist die NK-Zellzahl höher als die T-Zellen.....</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 3.12 :Entwicklung der T-Zellunterpopulationen bei Patient 2 und 3. Die Unterpopulationen verlaufen entsprechend dem allgemeinen T-Zellverlauf. Die CD4⁺-T-Zellen stellen den größten Anteil. Bei der Analyse der CD4⁺-T-Zellen und der CD8⁺-T-Zellen fällt auf, dass die CD4⁺/CD8⁺ Ratio deutlich erhöht ist (siehe Abbildung 3.13). Die Zahl der NKT-Zellpopulation ist sehr gering.....</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 3.13: Patienten 2 und 3 zeigen einen frühen Anstieg der T- und NK-Zellen zwischen Tag 20 und 30. Danach fällt die T-Zellpopulation stark ab und erholt sich bis Tag 120 nicht. Die T-Zellzahl bleibt immer unter der NK-Zellzahl.....</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 3.14 :Veränderung der Expressionshäufigkeit auf den NK-Zellen bei Patientin 7. Die Schwankungen sind bis Tag 125 noch sehr ausgeprägt.....</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 3.15 :Prozentuale Veränderung der Expressionshäufigkeit bestimmter Rezeptoren auf NK- und T-Zellen bei Patientin 7 gegenüber dem Spender am Tag</i>	

110 nach Transplantation. Auffallend sind der starke Expressionsanstieg von CD94 und NKB1 und der Abfall von p50.3 auf den NK-Zellen.....	51
Abbildung 3.16: <i>Prozentuale Veränderung der Expressionshäufigkeit bestimmter Rezeptoren auf NK- und T-Zellen bei Patientin 5 gegenüber dem Spender am Tag 93 nach Transplantation. Zu sehen ist ein starker Expressionsanstieg von CD94 und NKG2A auf den NK-Zellen.</i>	52
Abbildung 3.17: <i>Prozentuale Veränderung der Expressionshäufigkeit bestimmter Rezeptoren auf NK- und T-Zellen bei Patient 3 gegenüber dem Spender am Tag 90 nach Transplantation. Auffallend sind die abnehmende Expression von p50.3 und CD158a auf den NK-Zellen. Deutlich häufiger als beim Spender wird NKG2A auf den NK-Zellen exprimiert.....</i>	53
Abbildung 3.18: <i>Prozentuale Veränderung der Expressionshäufigkeit bestimmter Rezeptoren auf NK- und T-Zellen bei Patient 6 gegenüber dem Spender am Tag 86 nach Transplantation. Auffallend ist eine deutliche Abnahme aller dargestellten Rezeptoren auf den NK-Zellen.</i>	54

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: <i>Klinische Daten und Transplantationsergebnisse nach haploidenter Transplantation mit und ohne KIR-Liganden-Inkompatibilität in GvH-Richtung der Gruppe Ruggeri et al. (60). Zusehen sind der Schutz vor GvH-Reaktionen und eine bessere Überlebenswahrscheinlichkeit bei KIR-Liganden-Inkompatibilität. Die Rezidivhäufigkeit ist von der bestehenden Krankheit abhängig; hier gibt es keinen Vorteil für Patienten mit ALL, jedoch für Patienten mit AML. Tabelle modifiziert nach Velardi et al. (63).</i>	12
Tabelle 2.1: <i>Prophylaktische antivirale und antimykotische Therapie vor und nach Transplantation haploidenter peripherer Stammzellen</i>	22
Tabelle 3.1: <i>Transplantatzusammensetzung nach CD34-Selektion. Die Reinheit liegt im Mittel bei 96,4%, die Ausbeute bei 90,6. Die Vitalität lag nach der CD34-Selektion durchschnittlich bei 98,4%.</i>	26
Tabelle 3.2: <i>Stammzelltransplantat nach T-Zelldepletion. Durchschnittlich wurde der Anteil der CD3+-Zellen um 4,5-log-Stufen verringert.</i>	27
Tabelle 3.3: <i>Zusammensetzung des NK-Zellgabeproduktes, CD3-Depletion. Bei der Bereitung des NK-Zellgabeproduktes wurde die Anzahl der CD3+-Zellen durchschnittlich um 3,4-log-Stufen verringert. Die NK-Zellinfusionslösung enthielt im Mittel schließlich nur noch $0,21 \times 10^8$ CD3+-Zellen, diese Zellfraktion hatte nur noch einen Anteil von 0,06% am Gesamtzellbestand.</i>	28
Tabelle 3.4: <i>NK-Zellgabeprodukt. Bei der CD56-Anreicherung betrug die Reinheit im Mittel 69,8%, die Ausbeute 70,6%. Die Vitalität lag nach der Anreicherung bei durchschnittlich 91,4%.</i>	29
Tabelle 3.5: <i>Patientencharakteristika, Patienten sind vor Studienbeginn in einem wiederholten Rezidiv oder die Erkrankung persistierte in molekularbiologischen Untersuchungen. Spender waren Familienangehörige</i>	35
Tabelle 3.6 : <i>Maximale Toxizität nach Transplantation nach ausgewählten Kriterien. Schweregrade von 1 – 4.</i>	37

- Tabelle 3.7: *Engraftmentzeichen. Tag nach Transplantation an dem die Laborparameter der Patienten erstmals den Grenzwert überschreiten. Zusätzlich ist der jeweilige Median ausgewiesen.....*43
- Tabelle 3.8 :*HLA Merkmale und NK-Aktivität von Patienten und Spendern. Bei den Transplantationen von Patient 2 und 7 gab es eine Reaktivität der NK-Zellen in GvH-Richtung. Patient 6 hatte bei der ersten Transplantation eine Alloreaktivität der NK-Zellen in HvG-Richtung, bei den zwei folgenden Transplantation mit einem anderen Spender in beide Richtungen. Die Patienten 3, 4 und 5 hatten weder eine NK-Reaktivität in die eine noch in die andere Richtung.....*44
- Tabelle 3.9 : *Spezifische Lyse im Zytotoxtest mit IL2 aktivierten NK-Zellen des Spenders von Patient 7 gegen unterschiedliche Targetzellen. Die NK-Zellen sind sehr gut in der Lage den perforinsensiblen Zellklon K562 zu zerstören. Ihre Wirksamkeit gegen den Zellkon ML2, und gegen die Blasten von Patientin 7 ist jedoch gering.....*45

9 Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an Herrn Professor Dr. L. Uharek für die freundliche Überlassung des Themas. Meine Fragen und Probleme fanden jederzeit ein offenes Ohr und Unterstützung.

Ebenfalls bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. U. Hilbers und dem Laborteam, die mir insbesondere die technische Laborarbeit verständlicher machten.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau T. Priestersbach, die dem orthographischen Fehlerteufel zusätzlich den Gar ausmachte.

Vielen herzlichen Dank auch an alle meine engeren Freunde, die an Leid und Frust dieser Arbeit unfreiwillig Teil hatten, für Ihr Verständnis.

Schließlich bedanke ich mich an dieser Stelle bei meinen Eltern und meinen Geschwistern, ohne die ich niemals soweit gekommen wäre. Ihre emotionale und intellektuelle Unterstützung haben mich bis heute geprägt.

10 Lebenslauf

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

11 Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Philipp Friedrich Wilhelm Doepner, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Haploidente Stammzelltransplantation und anschließende Immuntherapie mit allogenen natürlichen Killerzellen zur Behandlung von AML, CML, MDS, ALL und Morbus Hodgkin* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift