

Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Rekonstitution von NK-Zell Subpopulationen - Einfluss auf GvHD und Rezidiv nach  
allogener Stammzelltransplantation

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Jonas Wißkirchen  
aus Bonn

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. U. Förstermann

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. M. Theobald

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. T. Bopp

Tag der Promotion: 07. Dezember 2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>II</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturdiskussion .....</b>	<b>3</b>
2.1. Häufigste Indikationen für eine allogene Stammzell-transplantation bei Erwachsenen .....	3
2.1.1. MDS .....	3
2.1.2. AML .....	4
2.2. Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation .....	6
2.3. Graft-versus-Host Disease .....	8
2.4. Rezidiv .....	11
2.5. Infektionen .....	14
2.5.1. CMV .....	14
2.5.2. EBV .....	17
2.6. Immunsystem .....	18
2.6.1. Natürliche Killer-Zellen .....	20
2.7. NK-Zell Rezeptoren .....	22
2.7.1. CD56 .....	22
2.7.2. CD16 .....	23
2.7.3. KIR .....	24
2.7.4. Natural cytotoxicity receptors .....	26
2.7.5. NKG2A .....	30
2.7.6. NKG2C .....	31
2.7.7. NKG2D .....	32
2.7.8. CD69 .....	33
2.7.9. CD62L .....	34
2.7.10. Tigit .....	35
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>36</b>
3.1. <i>Materiellen</i> .....	36
3.1.1. Puffer und Lösungen .....	36
3.1.2. Chemikalien und Reagenzien .....	37
3.1.3. Antikörper für Durchflusszytometrie .....	38
3.1.4. Kits .....	39
3.1.5. Plastikwaren .....	40
3.1.6. Glaswaren .....	41

3.1.7.	Geräte .....	41
3.1.8.	Software .....	42
3.2.	<i>Methoden</i> .....	43
3.2.1.	Allgemein .....	43
3.2.2.	Aufbau Retrospektive Analyse .....	44
3.2.3.	Aufbau prospektive Analyse .....	45
3.2.4.	Patientenkollektive .....	46
3.2.5.	Dichtegradientenzentrifugation zur Gewinnung von PBMCs .....	49
3.2.6.	Färben und Zählen von Zellen .....	49
3.2.7.	Einfrieren von Zellen .....	50
3.2.8.	Auftauen von Zellen .....	50
3.2.9.	Durchflusszytometrische Messungen .....	50
3.2.10.	FACS-Färbung .....	51
3.2.11.	Funktionelle Tests .....	52
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>58</b>
4.1.	<i>Retrospektive Analyse</i> .....	58
4.1.1.	Einleitung .....	58
4.1.2.	Aktivierungsmarker .....	60
4.1.3.	Aktivierende Rezeptoren .....	62
4.1.4.	Inhibitorische Rezeptoren .....	64
4.1.5.	CD62L .....	65
4.2.	<i>Einfluss immunsuppressiver Therapie</i> .....	66
4.3.	<i>Prospektive Analyse</i> .....	67
4.3.1.	Einleitung .....	67
4.3.2.	Rekonstitution der Subpopulationen .....	69
4.3.3.	Aktivierungsmarker .....	73
4.3.4.	Aktivierende Rezeptoren .....	77
4.3.5.	Inhibitorische Rezeptoren .....	81
4.3.6.	CD62L .....	84
4.3.7.	Virusreaktivierungen .....	85
4.4.	<i>Degranulation und Zytokinproduktion</i> .....	86
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>90</b>
5.1.	<i>Unterschiede in der Markerexpression und Rekonstitution bei Patienten mit unterschiedlichen Komplikationen</i> .....	90
5.2.	<i>Veränderte Rekonstitution bei Patienten mit Komplikation</i> .....	91
5.3.	<i>Differentiell gesteigerte Expression von Aktivierungsmarkern</i> .....	95
5.4.	<i>Charakteristische Unterschiede in der Markerexpression bei Patienten mit GvHD97</i>	

5.4.1.	Transplantation bewirkt eine Hochregulierung aktivierender Rezeptoren .....	97
5.4.2.	Gesteigerte Expression inhibitorischer Rezeptoren bei Patienten mit Komplikation .....	100
5.4.3.	CD62L ist auf NK-Zellen von Patienten mit cGvHD signifikant reduziert.....	104
5.6.	<i>Prednisolon und Tacrolimus beeinflussen Expression der Rezeptoren nicht.....</i>	106
5.7.	<i>CMV- und EBV-Reaktivierung verursachen keine charakteristischen Veränderungen der Markerexpression .....</i>	107
5.8.	<i>Keine signifikante Einschränkung von Degranulation und Zytokin-produktion bei Patienten mit Komplikation .....</i>	108
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>111</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>114</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>128</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>129</b>

# Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: RISIKOSTRATIFIZIERUNG DER AML .....	5
TABELLE 2: ORGANSTADIEN DER AGVHD .....	9
TABELLE 3: PUFFER UND LÖSUNGEN .....	36
TABELLE 4: CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN .....	37
TABELLE 5: ANTIKÖRPER .....	38
TABELLE 6: KITS .....	39
TABELLE 7: PLASTIKWAREN .....	40
TABELLE 8: GLASWAREN .....	41
TABELLE 9: GERÄTE .....	41
TABELLE 10: SOFTWARE .....	42
TABELLE 11: PATIENTENKOLLEKTIV RETROSPEKTIVE STUDIE .....	46
TABELLE 12: BUFFYCOATS .....	47
TABELLE 13: PATIENTENKOLLEKTIV PROSPEKTIVE STUDIE .....	48
TABELLE 14: FACS-FÄRBUNG PHÄNOTYPISIERUNG .....	51
TABELLE 15: ANSÄTZE FUNKTIONELLE TESTS .....	56
TABELLE 16: AUSWERTUNG FUNKTIONELLE TESTS .....	57
TABELLE 17 SEKRETION VON IFN- $\gamma$ .....	87
TABELLE 18 DEGRANULATION .....	88
TABELLE 19: CHARAKTERISTISCHE VERÄNDERUNGEN BEI GVHD .....	113

## Abkürzungsverzeichnis

AA	aplastische Anämie
ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
aHSZT	allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeolische Leukämie
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ATG	Anti-Thymozyten-Globulin
BAT3	HLA-B assoziiertes Transkript 3
CAR-T-Zelle	Chimeric Antigen Receptor T-Zelle
CML	chronisch myeolische Leukämie
CMV	Zytomegalievirus
DAMP	Damage-associated-pattern-molecules
DLI	Donor Lymphozyteninfusion
EBV	Eptein-Barr-Virus
Fab	fragment antigen binding
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBM	Fludarabin+BCNU+Melphalan Konditionierungsregime
Fc	chrystallisable fragment
FLAMSA	Melphalan+Fludarabin+TBI+ATG Konditionierungsregime
FLT-3	FMS-like-Tyrosin-Kinase 3
FSC	forward scatter
GvHD	Graft-versus-Host Disease
GVL	Graft-versus-Leukämie
HLA	humane Leukozytenantigene
HS	Heparansulfat
HS-GAG	Heparan-Glykosaminoglykan
HSPG	Heparan-Proteoglykan
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
KIR	Killer cell immunoglobulin-like receptor
LILRB1	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 1
MACS	magnetic activated cell sorting
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
MLL-5	mixed-lineage leukemia protein-5
MRD	minimal residual disease
NCR	natural cytotoxicity receptor
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
Ifn- $\gamma$	Interferon-gamma
ILC	innate lymphoid cells
IL	Interleukin
IPSS	international prognostic scoring system
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
NCR	Natural cytotoxicity receptor

PAMP	pathogen-associated-pattern-molecules
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PNH	paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PTLD	post-transplant lymphoproliferative disorder
pTx	post transplantationem
PVR	poliovirus receptor
PVRL2	poliovirus receptor-related 2
SSC	sideward scatter
TCR	T-Zell-Rezeptor
TBI	total body irradiation
TIGIT	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
WT1	Wilms Tumor 1



# 1. Einleitung

Das Feld der zellbasierten Immuntherapie ist jüngst durch eine weitere hochspezialisierte Therapieform - die CAR-T Zellen - erweitert worden (1). Sie ist nicht nur das Ergebnis jahrelanger intensiver Forschung auf diesem Feld, sondern bestätigt auch die anhaltende Überzeugung der Wissenschaft selbst die aggressivsten und Chemotherapie-refraktären Malignitäten mit Hilfe des Immunsystems besiegen zu können und hat das Interesse an diesem Feld erneut beflügelt.

Etwas länger zurück liegt die Zulassung der Checkpoint-Inhibitoren, welche in großen Teilen der Onkologie eine Revolution der Therapie herbeigeführt hat (2). Auch diese verdeutlicht unser derzeitiges Verständnis von der Entstehung und Progression von malignen Neoplasien als ein Scheitern des Immunsystems.

Dieses Verständnis ist jedoch schon deutlich älter und hat bereits vor mehr als 50 Jahren (3) zu der Entwicklung einer Therapieform geführt, bei welcher das gesamte Immunsystem eines Patienten durch das eines gesunden Spenders ersetzt wird: Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (aHSZT). Jedes Jahr werden in Deutschland über 3000 Patienten allogent Stammzelltransplantiert und dürfen so selbst bei hämatologischen Neoplasien mit den ungünstigsten Risikoprofilen noch eine Hoffnung auf Heilung haben (4).

Allerdings kommt dieser starke therapeutische Effekt nicht ohne komplexe immunvermittelte Komplikationen. Eine dieser Komplikationen ist die chronische GvHD, welche je nach Studie bei teilweise über 60% der Langzeitüberlebenden auftritt (5).

Trotz einer stetigen Weiterentwicklung und einer damit einhergehenden Verbesserung der Prognose der Patienten entwickeln auch heute noch bis zu 50% der Transplantierten ein Rezidiv (6) mit einer infausten Prognose, für welches das Risiko in den ersten zwei Jahren nach Transplantation am höchsten ist.

Die beiden genannten Komplikationen verdeutlichen die bleibende hohe Morbidität der Patienten nach allogener Stammzelltransplantation. Bei einem Langzeitüberleben von 85% nach zehn Jahren bei Patienten, welche die ersten beiden Jahre überlebt hatten (7), bedeutet dies nicht nur eine enorme Belastung

für die Patienten, sondern auch eine ökonomische Belastung für das Gesundheitssystem.

Bei der Transplantation eines gesamten Immunsystems ist es wahrscheinlich unmöglich eine Zellpopulation zu identifizieren, welche sowohl den therapeutischen Effekt vermittelt, als auch die schweren Nebenwirkungen zu verhindern mag.

Dennoch hat sich über die Jahre eine Zellpopulation mit starker intrinsischer Zytotoxizität (8) herauskristallisiert, welche sicherlich weit weniger Aufmerksamkeit als die hochspezifischen T-Lymphozyten erfährt: Die natürlichen Killerzellen.

Mit der „natürlichen“ Eigenschaft jede Zelle zu töten, welche sich ihnen nicht als körpereigen und gesund zu erkennen gibt (9), werden ihnen GvHD-limitierende und Rezidiv-verhindernde Effekte nachgesagt (10).

Diese Arbeit hat das Ziel, eine umfassende Phänotypisierung dieser Zellen im Kontext der allogenen Stammzelltransplantation zu erstellen und zu prüfen, ob Veränderungen im Phänotyp der NK-Zellen mit häufigen Komplikationen der Stammzelltransplantation korrelieren.

## **2. Literaturdiskussion**

### **2.1. Häufigste Indikationen für eine allogene Stammzelltransplantation bei Erwachsenen**

#### **2.1.1. MDS**

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind klonale Erkrankungen hämatopoetischer Stammzellen, welche durch Dysplasien von Blut- und Knochenmarkzellen gekennzeichnet sind und so zu einer hämatopoetischen Insuffizienz führen können. Zudem besteht ein Risiko für das Übergehen in eine akute Leukämie (11).

Das MDS tritt mit einem medianen Erkrankungsalter von 75 Jahren etwas häufiger bei Männern als bei Frauen auf. Insgesamt liegt die Inzidenz bei etwa 4-5 pro 100 000 Einwohnern pro Jahr (12).

Pathogenetisch liegt dem MDS eine Akkumulation von genomischen Schäden zugrunde, welche zu einer Selektion entarteter Stammzellen führt, die im Verlauf der Erkrankung die gesunde Hämatopoese verdrängen können (13).

Meist fällt das MDS durch eine Anämie auf, wobei auch Bi- oder Panzytopenien vorliegen können (14).

Entscheidend für die Diagnose ist die Zytomorphologie des Blutes und des Knochenmarks in welcher bei mindestens einer Zellreihe bei mindestens 10% der Zellen Dysplasiezeichen vorliegen müssen. Dabei zeigt sich das Knochenmark in der Regel normo- oder hyperzellulär, kann in manchen Fällen aber auch hypozellulär sein (15).

Anhand des revidierten international prognostic scoring system (IPSS) kann eine Risikostratifizierung vorgenommen werden (16), welche das therapeutische Vorgehen mitbestimmt. In dieses geht auch der Anteil der Blasten in Blut und Knochenmark mit ein, welcher im Gegensatz zur akuten myelischen Leukämie bei unter 20% liegt (14). Während bei Niedrigrisiko-MDS ein abwartendes Verhalten und bei symptomatischer Anämie eine Gabe von Erythropoetin oder die Transfusion von Erythrozytenkonzentraten Anwendung finden können, kommt bei Hochrisiko-MDS die allogene Stammzelltransplantation als kurative Therapieoption zum Einsatz (15).

## 2.1.2. AML

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine Neoplasie der Myelopoese, die ihren Ursprung in einer klonalen Proliferation CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen hat (17).

Sie ist mit einem Altersmedian von 72 Jahren eine Erkrankung des Alters (18) und hat insgesamt eine Inzidenz von 3,7 pro 100 000.

Das klinische Erscheinungsbild ist durch die zunehmende hämatopoetische Insuffizienz bestimmt. So kann es zu einer Anämie mit verringerter Leistungsfähigkeit, Blutungsneigung durch Thrombozytenmangel und Infektanfälligkeit im Rahmen einer Neutropenie kommen. Unbehandelt führt die AML meist innerhalb eines Jahres zum Tod (19).

Diagnostiziert wird die AML mithilfe einer Zytologie oder Biopsie des Knochenmarks, wobei ein Blastenanteil von  $\geq 20\%$  im peripheren Blut oder Knochenmark krankheitsdefinierend ist (14).

Mit Hilfe zytologischer und zyto- und molekulargenetischer Diagnostik kann die AML anhand der aktuellen WHO Klassifikation in unterschiedliche Subgruppen eingeteilt werden (20).

Die unterschiedlichen molekular-zytogenetischen Veränderungen erlauben zudem eine Einteilung in drei verschiedene prognostische Gruppen gemäß der Klassifikation des European LeukemiaNet (21) (Tabelle 1). Neben den molekular-zytogenetischen Veränderungen ist das Alter der wichtigste prognosebestimmende Faktor (18).

Die Therapie der AML richtet sich nach Alter des Patienten, zugrundeliegenden Mutationen und Risikoklassifizierung.

Sie gliedert sich in eine Induktionstherapie mit dem Ziel des Erreichens einer Remission und eine Postremissionstherapie. Das 7+3-Schema mit Cytarabin an sieben und einem Anthrazyklin an drei Tagen stellt den Standard für die Induktionstherapie bei jüngeren und fitten älteren Patienten dar (22). Abhängig vom Risikoprofil schließt sich bei Patienten mit einem niedrigen Risiko eine Chemokonsolidierung mit hochdosiertem Cytarabin und bei Patienten mit hohem Risiko eine Konsolidierung mit einer allogenen Stammzelltransplantation an (22).

Für ältere Patienten, welche nicht für eine hochdosierte Induktionstherapie geeignet sind, stehen lediglich palliative Ansätze zur Verfügung. Neben einer rein symptomatischen Gabe von Hydroxyurea zur Senkung der Leukozytenzahl können mit hypomethylierenden Substanzen wie 5-Azacytidin und Decitabin eine Verlängerung der Lebenszeit bei höchstmöglicher Lebensqualität erreicht werden (22).

Tabelle 1: Risikostratifizierung der AML

Risikogruppe gemäß ELN	Genetische Aberrationen
<b>Günstig</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i></li> <li>• inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i></li> <li>• Mutiertes <i>NPM1</i> ohne <i>FLT3-ITD</i> oder mit <i>FLT3-ITD</i><sup>niedrig*</sup></li> <li>• Biallelisch mutiertes <i>CEBPA</i></li> </ul>
<b>Intermediär</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutiertes <i>NPM1</i> mit <i>FLT3-ITD</i><sup>hoch*</sup> (normaler Karyotyp)</li> <li>• Wildtyp-<i>NPM1</i> ohne <i>FLT3-ITD</i> (normaler Karyotyp) oder mit <i>FLT3-ITD</i><sup>niedrig*</sup> (mit oder ohne ungünstige genetische Aberrationen)</li> <li>• t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-KMT2A</i><sup>s</sup></li> <li>• Zytogenetische Aberrationen, die nicht als günstig oder ungünstig eingestuft wurden</li> </ul>
<b>Ungünstig</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i></li> <li>• t(v;11)(v;q23); <i>KMT2A</i>-Genumlagerung</li> <li>• t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i></li> <li>• inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2</i>, <i>MECOM (EVI1)</i></li> <li>• -5 oder del(5q); -7; -17/abnl(17p)</li> <li>• komplexer Karyotyp (≥3 Aberrationen<sup>†</sup>)</li> <li>• monosomaler Karyotyp (eine Monosomie, assoziiert mit mindestens einer weiteren Monosomie oder einer anderen strukturellen, chromosomalen Aberration (außer CBF-AML))</li> <li>• Wildtyp-<i>NPM1</i> mit <i>FLT3-ITD</i><sup>hoch*</sup></li> <li>• Mutiertes <i>RUNX1</i><sup>‡</sup></li> <li>• Mutiertes <i>ASXL1</i><sup>‡</sup></li> <li>• Mutiertes <i>TP53</i></li> </ul>

## 2.2. Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) stellt ein Therapieverfahren für eine Vielzahl hämatologischer Erkrankungen dar, bei welchem dem Patienten nach Ablation der eigenen hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark zur Bildung einer neuen Hämatopoese vitale hämatopoetische Stammzellen übertragen werden. Man unterscheidet zwischen einer autologen Transplantation, bei welcher dem Patienten eigene Stammzellen vor Therapiebeginn entnommen und im weiteren Verlauf wieder infundiert werden und einer allogenen Transplantation, bei welcher die infundierten Stammzellen von einem gesunden Spender stammen.

Stammzellen können hierfür durch direkte Aspiration von Knochenmark aus dem Beckenkamm, nach Mobilisation mit Hilfe von Wachstumsfaktoren mittels einer Leukapherese aus dem peripheren Blut oder aus Nabelschnurblut gewonnen werden (23).

Die allogene HSZT kommt z.B. bei der Therapie von Erkrankungen, welche von hämatologischen Stammzellen ausgehen zum Einsatz. Hierzu zählen in erster Linie maligne hämatologische Erkrankungen (akute lymphatische Leukämie (ALL), akute myeloische Leukämie (AML) chronisch myeloische Leukämie (CML)) aber auch andere hämatologische Erkrankungen, wie myelodysplastische Syndrome (MDS), paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH), aplastische Anämie (AA) und Hämoglobinopathien (23).

Durch Ablation der patienteneigenen Hämatopoese werden die Ausgangszellen dieser Erkrankungen eliminiert und durch Übertragung gesunder Stammzellen eine neue gesunde Hämatopoese etabliert.

Hierbei soll das sich neu entwickelnde „Spender“-Immunsystem zusätzlich einen Graft-versus-Leukämie Effekt (GVL) ausüben und mögliche verbliebene entartete Stammzellen des Empfängers eliminieren (24).

Auf der anderen Seite kann das transplantierte Immunsystem sich auch gegen gesundes Spendergewebe richten und eine Graft-versus-Host Reaktion (GvHD) verursachen (24).

Zur Prophylaxe einer solchen GvHD ist es wichtig, dass sich Spender und Empfänger möglichst immunologisch ähnlich sind. Um dies zu erreichen, können Stammzellen von einem Geschwister oder von einem nicht verwandten Spender mit einer möglichst großen Übereinstimmung in den humanen Leukozytenantigenen (HLA) verwendet

werden, wobei auch eine Transplantation mit einem nicht HLA identischen Spender mit einem entsprechend erhöhten Risiko für eine GvHD möglich ist (25).

Die größte Herausforderung ist es daher, die Alloreaktivität des transplantierten Immunsystems so zu balancieren, dass sie auf der einen Seite stark genug ist, um einem Rezidiv vorzubeugen, aber auf der anderen Seite auch keine GvHD verursacht.

In einem Mausmodell der allogenen HSZT konnten Barnes et al. (3) 1956 bereits fundamentale Grundlagen einer erfolgreichen HSZT ausmachen. Zwei Gruppen von Mäusen erhielten eine Bestrahlung als antileukämische Therapie und zur Therapie der Myelosuppression entweder Stammzellen von einem syngenen oder allogenen Mausstamm.

In der Gruppe, welche Stammzellen von syngenen Mäusen erhielt, starben die meisten Mäuse an einem Rezidiv, während in der allogenen transplantierten Gruppe kein Rezidiv auftrat aber alle Mäuse eine GvHD entwickelten. So konnte postuliert werden, dass

1. eine vorbereitende antileukämische Therapie vor HSZT nötig ist,
2. das transplantierte Immunsystem Rezidive der Leukämie verhindern kann,
3. das transplantierte Immunsystem sich auch gegen gesundes Empfängergewebe richten kann.

Thomas et al. (26) führten 1957 allogene Transplantationen an sechs Menschen durch, wobei zu diesem Zeitpunkt noch wenig über die nötige Histokompatibilität bekannt war. Das Transplantat wuchs nur bei zwei Patienten an und alle Patienten verstarben innerhalb von 100 Tagen.

Mit der Entwicklung von Methoden zur HLA-Typisierung Mitte der 1960er Jahre wurde es möglich, Spender und Patienten diesbezüglich abzugleichen (27). 1990 erhielt E. Donnall Thomas den Nobelpreis für Medizin für seine Entdeckungen auf dem Gebiet der Zelltherapien.

Kolb et al. beobachteten, dass Infusionen mit Lymphozyten des ursprünglichen Spenders nach der Transplantation wirksam in der Behandlung von Rezidiven waren, was einen immuntherapeutischen Effekt im Sinne des GVL-Effektes bestätigte und zu der Entwicklung von nicht-myeloablativen Konditionierungsregimen führte, wie sie heute in der Mehrzahl der Fälle durchgeführt werden, beigetragen hat (28).

### 2.3. Graft-versus-Host Disease

Bei der GvHD handelt es sich um eine transplantationsbedingte Komplikation, bei der sich immunkompetente Immunzellen des Spenders gegen gesundes Gewebe des Empfängers richten. Die GvHD stellt neben dem Rezidiv die Hauptursache für Mortalität und Morbidität nach Transplantation dar. Man unterscheidet zwischen einer akuten Form der GvHD (aGvHD) und einer chronischen (cGvHD). Die Inzidenz für eine klinisch signifikante aGvHD (Grad II-IV) liegt bei etwa 40%, während eine cGvHD bei ungefähr 30-70% der Langzeitüberlebenden zu beobachten ist (29, 30).

1966 stellten Billingham et al. (31) drei Voraussetzungen für die Entstehung einer GvHD auf: 1. Der Graft muss immunkompetente Zellen enthalten. 2. Der Empfänger muss Gewebeanigene exprimieren, welche im Spender nicht vorhanden sind. 3. Der Empfänger ist nicht fähig, eine adäquate Antwort einzuleiten, um die transplantierten Zellen zu eliminieren.

Die Inzidenz der GvHD ist abhängig von Disparität in den HLA-Genen zwischen Spender und Empfänger (32-36), wobei auch bei HLA-identen verwandten Spendern noch ein Risiko von etwa 35% für eine akute GvHD Grad II-IV bestehen bleibt (33), was auf eine Bedeutung von genetischen Unterschieden, welche außerhalb der bekannten HLA-Genloci liegen, hindeutet.

Die aGvHD manifestiert sich in erster Linie an der Haut, dem Gastrointestinaltrakt und der Leber. Typische Symptome sind ein juckendes makulopapulöses Exanthem, Hyperbilirubinämie mit Ikterus, Übelkeit und Erbrechen und voluminöse und blutige Durchfälle. Die aGvHD wird anhand klinischer und Laborparameter mithilfe der 1994 auf der Consensus Conference in Keystone revidierten Glucksberg Klassifikation in vier Stadien eingeteilt (37): Grad I (mild), Grad II (moderat), Grad III (schwer), Grad IV (sehr schwer) (Tabelle 2).

Pathophysiologisch geht der aGvHD eine Schädigung von Empfängergewebe verursacht durch die Grunderkrankung, vorausgegangene Infektionen oder das Konditionierungsregime voraus (38). Die betroffenen Organsysteme Haut, Gastrointestinaltrakt und Leber stellen hierbei Organsysteme dar, welche auf der einen Seite eine Barrierefunktion übernehmen und auf der anderen Seite den ersten Ort für eine Interaktion mit exogenen Noxen stellen. Schädigung der genannten Organsysteme führt zu einem Untergang von Zellen und der Freisetzung von damage-associated-pattern-molecules (DAMPs) (39, 40) und durch Verlust der Barrierefunktion



zu einem vermehrten Übertritt von pathogen-associated-pattern-molecules (PAMPs) (41), was zu einer gesteigerten Freisetzung von proinflammatorischen Molekülen wie Ifn- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 (42) und zur Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) (40) führt.

In der Folge erkennen T-Lymphozyten mit ihren T-Zell-Rezeptoren (TCR) Peptide, welche von den APCs über Major-Histocompatibility-Complex Moleküle (MHC) präsentiert werden, oder die fremden MHCs des Empfängers selbst und werden dadurch aktiviert (43).

Aktivierte T-Zellen differenzieren, proliferieren und wandern in die Zielgewebe ein, wo sie durch direkte zytotoxische Wirkung über den Fas/FasL oder den Perforin/Granzym Weg (44) oder durch Sekretion inflammatorischer Zytokine (44) das Gewebe schädigen.

Zur Prävention einer aGvHD wird eine pharmakologische Prophylaxe, welche für gewöhnlich aus einem Calcineurininhibitor (Ciclosporin A, Tacrolimus) und Methotrexat besteht, durchgeführt (45, 46).

Eine weitere Methode der Prävention stellt die in-vivo Depletion von T-Zellen mittels anti-Thymozyten-Globulin (ATG) (45) oder des monoklonalen Antikörpers Alemtuzumab gegen CD52 dar (47). Diese führt zwar zu einer deutlich reduzierten Inzidenz von GvHD, aber auch zu einem erhöhten Risiko für Infektionen und Rezidive (47).

Bei Manifestation einer GvHD gilt eine Therapie mit Kortikosteroiden als Therapie der Wahl (48).

Tabelle 2: Organstadien der aGvHD

	<b>Haut</b>	<b>Darm</b>	<b>Leber</b>
	Klinisches Bild	Diarrhoe ml/Tag	Bilirubin mg/dl
<b>0</b>	Kein Erythem/Exanthem	Diarrhoe <500ml/Tag	<2
<b>1</b>	Makulopapulöses Exanthem <25% der Körperoberfläche	Diarrhoe 500-1000 ml/Tag oder 3-6 Stühle/Tag oder Übelkeit	2-3
<b>2</b>	Makulopapulöses Exanthem 25-50% der Körperoberfläche	Diarrhoe 1000-1500 ml/Tag oder >6 Stühle/Tag	3-6
<b>3</b>	Generalisiertes Exanthem	Diarrhoe >1500 ml/Tag	6-15
<b>4</b>	Generalisiertes Exanthem mit Blasenbildung und Desquamation >5% KOF	Akutes Abdomen mit oder ohne paralytischem Ileus blutige Diarrhoe	>15

Die cGvHD zeichnet sich durch eine vielfältige klinische Manifestation aus, welche nicht wie bei der akuten Form auf epitheliale Gewebe (Haut, Gastrointestinaltrakt, Leber, Lunge) beschränkt ist (30). Die genaue Pathophysiologie der cGvHD scheint komplexer und ist weniger gut verstanden als die der aGvHD und ist eher durch eine Fibrose als durch Inflammation gekennzeichnet. Die Initiierung der cGvHD verläuft ähnlich wie bei der aGvHD mit einem durch Grunderkrankung oder Konditionierung ausgelösten Gewebeschaden, welcher in einem proinflammatorischen Milieu zur Aktivierung von T-Lymphozyten führt. Für die cGvHD scheint zusätzlich eine Aktivierung von B-Lymphozyten mit folgender Sekretion von Alloantikörpern (49) und eine Schädigung des Thymus durch Konditionierung, Therapie mit Calcineurin-Inhibitoren und alloreaktive T-Zellen mit folgendem Verlust zentraler Toleranz von Bedeutung zu sein (50). Diese Mechanismen führen zu einem Gesamtbild ähnlich einer Autoimmunerkrankung mit chronischer Entzündung, welches in einer gestörten Gewebereparatur endet (51).

Für die cGvHD steht bisher keine etablierte Standardprophylaxe zur Verfügung, und in der Therapie kommt, ähnlich wie bei der aGvHD, vor allem eine immunsuppressive Therapie mit Kortikosteroiden zum Einsatz (52).

## 2.4. Rezidiv

Das Rezidiv der AML stellt die häufigste Manifestation eines Therapieversagens nach allogener HSZT dar und betrifft abhängig vom Krankheitsstatus und den zugrundeliegenden Mutationen bis zu 50% der transplantierten Patienten (6).

Die Prognose von Patienten, welche ein Rezidiv erleiden, ist ausgesprochen schlecht, da viele von ihnen, gerade bei einem frühen Rezidiv, eine erneute intensive Therapie nicht vertragen oder refraktär auf eine solche sind. So beträgt die Zwei-Jahres-Überlebensrate von Patienten nach einem Rezidiv unabhängig von der gewählten Therapie unter 20% (53).

Während eine Reihe von Faktoren, wie etwa eine Resistenz gegenüber der Konditionierungstherapie, eine Rolle bei der Entstehung des Rezidivs spielen, spiegelt ein Rezidiv häufig die Tatsache wider, dass T-Zellen und NK-Zellen des Spender-Immunsystems anfangs nach der Transplantation in der Lage waren die Krankheit zu kontrollieren, die Leukämiezellen letztendlich aber eine Möglichkeit gefunden haben der Immunabwehr zu entkommen.

Es gibt verschiedene Wege, wie sich Leukämiezellen der Überwachung durch das transplantierte Immunsystem entziehen können. Eine verringerte, beziehungsweise veränderte, Expression von HLA-Molekülen kann z.B. effektiv die Aktivierung von T-Zellen unterdrücken.

Im Rahmen der haploidenten Transplantation konnte beobachtet werden, dass Leukämiezellen das „gemismatchte“ Allel verlieren und sich so der Abwehr durch die T-Zellen des Spenders entziehen (54). Da dies durch eine Duplikation des „gematchten“ Allels zustande kommt, ist die Expression von HLA-Molekülen insgesamt nicht reduziert und es kommt nicht zu einer Aktivierung von NK-Zellen.

Zusätzlich begünstigen nicht-genomische Veränderungen eine verminderte Expression von HLA-II-Molekülen bei HLA-gematchten und –mismatchten Patienten und vermindern so die Immunogenität der Leukämiezellen (55, 56).

Alternativ können Leukämiezellen die Immunantwort auch durch eine verstärkte Expression von Immun-Checkpoint Molekülen einschränken (z.B. PD-L, B7-H3, CD80, PVRL2) (56).

Über eine Modulation der Freisetzung von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen können Immunzellen indirekt beeinflusst werden. So konnte gezeigt werden, dass

AML-Zellen unter anderem anti-inflammatorisches Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-10 (IL-10) produzieren (57).

IL-15 begünstigt eine Expansion und Aktivierung von Effektor-T-Zellen und NK-Zellen und dessen Produktion ist in AML-Zellen mit internen Tandemduplikationen der FMS-like-Tyrosin-Kinase 3 (FLT-3-ITD) blockiert (58). Reduzierte Serumspiegel von IL-15 sind mit einem erhöhten Risiko für ein Rezidiv assoziiert (59).

Zuletzt kann die Akquirierung neuer treibender Mutationen (z.B. TET1, NRAS, WT1, ETV6, RUNX1, DNMT3A, NPM1, IDH1, FLT3 ITD oder PHF6) die Proliferation der Leukämiezellen weiter steigern und so möglicherweise die Kapazitäten der reaktiven T-Zellen und NK-Zellen überschreiten (60).

Für die Therapie des Rezidivs nach Stammzelltransplantation ist es von entscheidender Bedeutung, dass diese so früh wie möglich initiiert werden kann, wenn die Tumorlast noch gering und eine gewisse Kontrolle durch das transplantierte Immunsystem gegeben ist. Daher kommen verschiedenen Methoden zur Überwachung der minimalen bleibenden Krankheit („minimal residual disease“ =MRD) große Bedeutung zu, um schon ein molekulares Rezidiv behandeln zu können und so dem hämatologischen Rezidiv vorzubeugen. So kann ein molekulares Rezidiv durch die Detektion von Genmutationen (61), den Transkripten von Fusionsgenen (62) und der Überexpression bestimmter Gene (z.B. Wilms Tumor 1 (WT1)) (63) aber auch durch Veränderungen im Empfänger zu Spender Chimärismus (64) und mithilfe der Durchflusszytometrie (64) frühzeitig erkannt werden.

Bei der Therapie stehen die zellulären Therapien wie Donor-Lymphozyteninfusionen (DLIs) (65) und eine zweite Transplantation den pharmakologischen Therapien wie der konventionellen Chemotherapie und gezielten Therapien wie etwa FLT3-Inhibitoren (z.B. Sorafenib) gegenüber (66).

Eine konventionelle Chemotherapie stellt nur für einen geringen Anteil von Patienten bei einem Rezidiv eine Therapieoption dar, da der Gesundheitszustand der meisten Patienten eine solche nicht erlaubt. Auch das Ansprechen ist stark eingeschränkt und nicht von langer Dauer, wobei dieses durch eine Gabe von Spenderzellen verlängert werden kann (2-Jahres-Gesamtüberleben von 55% bei Patienten, die eine zweite Transplantation oder DLI erhielten, gegenüber 20% bei Patienten, die keine Spenderzellen erhielten (67)). Prognostisch günstig ist hierbei ein Abstand von

mindestens 5 Monaten vom Rezidiv zur Transplantation, welcher eine initiale Kontrolle der Leukämie durch das transplantierte Immunsystem widerspiegelt (67).

Neben gezielten pharmakologischen Therapien gegen treibende Mutationen spielt auch der Einsatz hypomethylierender Substanzen wie 5-Azacytidin eine entscheidende Rolle (68).

Diese verursachen eine Reexpression epigenetisch ausgeschalteter Antigene, endogener retroviraler Elemente und dsRNA, was eine antivirale Interferon-Antwort verursacht und die Sichtbarkeit der Zellen für das Immunsystem erhöht (69). Zusätzlich scheinen sie den GVL-Effekt von NK-Zellen zu steigern, ohne das Risiko für eine GvHD zu erhöhen (70).

## **2.5. Infektionen**

Die langanhaltende Leukopenie bis zur Rekonstitution nach Stammzell-transplantation begünstigt die Entstehung von Infektionen durch eine Vielzahl von Erregern. Bakterielle und mykotische Infektionen spielen hierbei vornehmlich früh nach Transplantation in Phasen der Neutropenie eine besondere Rolle (71). Hier ist eine adäquate Infektionsprophylaxe von höchster Bedeutung (72) und bei aktiver Infektion eine rasche und passende antibiotische beziehungsweise antimykotische Therapie indiziert.

Nach Rekonstitution der neutrophilen Granulozyten bleibt aufgrund einer verzögerten Rekonstitution der lymphozytären und adaptiven Immunität jedoch eine Anfälligkeit gegenüber viralen Erregern länger bestehen (71). Die nötige anhaltende Immunsuppression zur Prophylaxe einer GvHD verstärkt und verlängert diese Gefahr um einiges.

So stellen virale Infektionen einen erheblichen Faktor für die längerfristige Morbidität und Mortalität nach Stammzelltransplantation dar (73, 74).

### **2.5.1. CMV**

Das Humane Cytomegalievirus (CMV) ist ein ubiquitär vorkommendes  $\beta$ -Herpesvirus, welches bei immunkompetenten Personen in der Regel eine asymptomatische Primärinfektionen verursacht und zur Serumkonversion führt. Anschließend persistiert es in einer latenten Form im Wirt und die globale Serumprävalenz beträgt etwa 80% (75).

Unter Zuständen der Immunsuppression kann es zu einer Reaktivierung des Virus kommen, welche in einer klinisch signifikanten Ausprägung trotz der aktuellsten zugelassenen Virustatika noch immer bei 37,5% der Patienten nach aHSZT auftritt (73).

Da das Immunsystems des Empfängers durch die Konditionierungstherapie eradiziert wird, haben seropositive Empfänger mit einem seronegativen Spender die höchste Inzidenz einer CMV-Reaktivierung, da diese Patienten von einer Rekonstitution von T-Zellen über den Thymus abhängig sind, um eine primäre T-Zell Antwort auf die Reaktivierung zu initiieren (76).

Eine unkontrollierte Replikation von CMV kann zu lebensbedrohlichen Endorganschäden wie einer interstitiellen Pneumonie oder Befall des Gastrointestinaltrakts führen und sich seltener auch als Retinitis, Hepatitis oder Enzephalitis manifestieren.

Fortschritte bei der antiviralen Therapie haben die Inzidenz von tatsächlichen CMV-Erkrankungen im ersten Jahr nach Transplantation auf etwa 10% reduziert (77). Dennoch liegt die Mortalität bei einer manifesten CMV-Pneumonie bei bis zu 70% innerhalb der ersten sechs Monate nach Diagnosestellung (78). Ein gastrointestinaler Befall ist schwer von einer GvHD zu unterscheiden, welche oft bei denselben Patienten auftritt (79).

Zudem kann eine CMV-Reaktivierung das Outcome auch indirekt durch die Toxizität der antiviralen Therapie und komplexe Einflüsse auf die Immunrekonstitution negativ beeinflussen. Es besteht eine wechselseitige Beziehung zwischen der Entstehung von GvHD und CMV-Reaktivierung (80) und eine CMV Reaktivierung erhöht die Mortalität durch bakterielle Infektionen und Pilzinfektionen (81).

Die Funktionalität des Immunsystems hat maßgeblichen Effekt auf das Risiko einer CMV-Reaktivierung oder Erkrankung und umgekehrt hat CMV tiefgreifenden Einfluss auf die Immunrekonstitution nach HSZT (82).

So kodiert die CMV-DNA für verschiedene immunmodulatorische Genprodukte, wie etwa ein Homolog des immunsuppressiven Interleukin-10, welche sowohl während der latenten als auch der replikativen Phase exprimiert werden (83).

NK-Zellen sind die ersten Zellen, die bei der Abwehr von CMV-Infektionen und Reaktivierungen aktiv werden und die Rekonstitution von NK-Zellen beeinflusst den Verlauf von CMV-Reaktivierungen nach HSZT (84). Allerdings besitzt CMV vielfältige Mechanismen, um die Aktivierung von NK-Zellen zu verhindern.

Auf der einen Seite kann CMV auf zwei Wegen die Signalvermittlung über inhibitorische Rezeptoren verstärken: 1. Das virale Protein UL40 ähnelt der Signalsequenz vieler HLA-C Allele und kann so die Expression von HLA-E auf infizierten Zellen stabilisieren und NK-Zellen über NKG2A inhibieren (85). 2. CMV verursacht die Expression von UL18 als Homolog von MHC-Klasse-I-Molekülen, welches über den Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 1 (LILRB1) NK-Zellen inhibiert (86).

Auf der anderen Seite kann CMV die Expression von Liganden für den aktivierenden NK-Zell-Rezeptor NKG2D herunterregulieren (87, 88) und mithilfe des Proteins pp65 die CD3 $\zeta$ -Domäne von Nkp30 dissoziieren und somit die Funktionalität von NK-Zellen generell einschränken (89).

Als mögliche Adaptation konnte beobachtet werden, dass eine CMV-Reaktivierung zu einer raschen Expansion von NKG2C<sup>+</sup>-NK-Zellen führt (90).

Nach Transplantation wird eine mögliche CMV-Reaktivierung mittels quantitativer PCR überwacht, um dann bei Auftreten von Virus-DNA in der Regel eine präemptive Therapie mit Ganciclovir oder Foscavir zu initiieren. Mit Letermovir wurde 2017 ein wirksames Virustatikum zur Prophylaxe zugelassen, welches an der viralen Terminase angreift, jedoch nicht bei allen Patienten eine Reaktivierung verhindern konnte (73). Die Entwicklung weiterer Virustatika mit anderen Zielstrukturen, sowie CMV spezifische Impfungen und Zelltherapien sind Gegenstand aktueller Forschung (91).



## 2.5.2. EBV

Das zu den  $\gamma$ -Herpesviren gehörende Epstein-Barr-Virus (EBV) ist ein weiterer wichtiger viraler Verursacher von Morbidität und Mortalität nach HSZT (74). Die Primärinfektion läuft bei Kindern oft ohne gravierende Klinik ab, kann aber gerade bei älteren Patienten das Bild einer infektiösen Mononukleose verursachen. Nach stattgehabter Primärinfektion besitzt EBV ähnlich wie CMV die Fähigkeit, in einer latenten Form im Wirtsorganismus zu verbleiben.

Das Virus verweilt in B-Lymphozyten und die Infektion wird durch EBV-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten kontrolliert (92).

Im Rahmen der Transplantation, wenn die Zahl der T-Lymphozyten niedrig ist, kann es zu einer erneuten EBVirämie und zur Entwicklung einer Posttransplantations lymphoproliferativen Erkrankung (PTLD) kommen. Das Virus verlängert die Lebenszeit von infizierten B-Lymphozyten, was zu einer verstärkten Akquirierung von Mutationen, die eine maligne Entartung vorantreiben und schließlich zur Entstehung von Lymphomen führt (93, 94).

Klinisch präsentiert sich die PTLD ähnlich einer systemischen Mononukleose für gewöhnlich mit anhaltendem Fieber, Lymphadenopathie und Tonsillitis bis hin zu Lymphomen (meist phänotypisch ähnlich einem Diffus großzelligen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom) (95).

Es kann aber auch zu anderen Organmanifestationen wie Hepatitis, Colitis, Pneumonie, Nephritis oder einem ZNS-Befall kommen (96).

Die Therapie einer manifesten PTLD setzt sich aus einer Reduktion der Immunsuppression, der Gabe von Rituximab und der Gabe von EBV-spezifischen T-Lymphozyten zusammen.

Neben den spezifischen T-Zellen spielen auch NK-Zellen eine Rolle bei der Eliminierung von infizierten B-Lymphozyten (97) und könnten nach HSZT maßgeblich zu einem Schutz gegenüber einer Reaktivierung beitragen.

## 2.6. Immunsystem

Aufgabe des Immunsystems ist der Schutz des Organismus gegenüber pathogenen Mikroorganismen (98) und entarteten Zellen.

Es lässt sich in eine unspezifische und eine spezifische Immunabwehr unterteilen, welche auf zellulärem Weg oder auch auf humoralem Weg vermittelt werden.

Zellen der unspezifischen Immunabwehr (z.B. Makrophagen, neutrophile Granulozyten und NK-Zellen (99) erkennen auf ihren Zielen PAMPs und DAMPs mithilfe von pattern-recognition-Rezeptoren wie etwa den Toll-like-Rezeptoren (100). In der Folge können sie ihre Ziele entweder direkt abtöten und zusätzlich über die Sezernierung proinflammatorischer Zytokine und Interferone eine Kaskade der Immunabwehr initiieren.

Die zelluläre spezifische Immunabwehr wird in erster Linie von den Lymphozyten (T-Lymphozyten und B-Lymphozyten) getragen.

T-Zellen erkennen mithilfe ihres hochspezifischen T-Zell-Rezeptors antigene Strukturen, welche von anderen Zellen auf MHC-Molekülen exprimiert werden. Antigenpräsentierende Zellen präsentieren intrazelluläre Proteine über MHC-Klasse II Moleküle, welche von CD4+T Zellen mit immunmodulatorischer Wirkung erkannt werden. Das Erkennen von Antigenen auf MHC-Klasse I Molekülen auf anderen Zellen durch CD8+T-Zellen führt zur Lyse der exprimierenden Zelle durch die T-Zelle.

Die „Ausbildung“ von T-Zellen findet im gesunden Organismus im Thymus statt, wo T-Zellen mit einem T-Zell-Rezeptor gegen körpereigene Antigene aussortiert werden (101). Nach aHSZT kann die Rekonstitution der T-Zellen durch eine „periphere homeostatische Expansion“ zudem auch in der Peripherie stattfinden (102). Allerdings geht diese Rekonstitution mit erheblichen quantitativen und qualitativen Defiziten einher (101). Diese qualitativen Defizite sind unter anderem durch eine verminderte Variabilität der T-Zellen bedingt, welche zusätzlich das Risiko für eine aGvHD zu erhöhen scheint (103).

Am stärksten wird die T-Zell-vermittelte Immunität jedoch durch die langsame Rekonstitution, mit Erreichen von normalen Werten zwischen 6-12 Monaten nach Transplantation (104), eingeschränkt.

Da T-Zellen jedoch als die entscheidenden Effektorzellen im Pathomechanismus der aGvHD gelten, gibt es Protokolle, welche ATG und Campath zur GvHD-Prophylaxe verwenden. Der Einsatz dieser Medikamente stellt zwar eine effektive GvHD-

Prophylaxe dar, schränkt die Rekonstitution der T-Zellen allerdings derart ein, dass es zu einer deutlich erhöhten Rate an viralen Infektionen kommt (105).

Aktivierte CD4+ T-Zellen sind in der Entzündungskaskade auch für Aktivierung von B-Zellen verantwortlich. Aktivierte B-Zellen differenzieren zu Plasmazellen, welche spezifische Antikörper bilden, und somit maßgeblich zur humoralen Immunabwehr beitragen. Diese können sich nach einer durchgemachten Infektion auch zu Gedächtnis-B-Zellen differenzieren und bei erneutem Antigenkontakt rapide expandieren und Antikörper bilden.

B-Zellen erreichen etwa ein halbes Jahr nach Transplantation die Konzentrationen wie in gesunden Individuen, wobei die Zahl der Gedächtnis-B-Zellen bis zu zwei Jahre nach Transplantation verringert bleibt (106). Besonders bei der cGvHD scheint die Reifung von B-Zellen gestört (107, 108).

Durch diese verzögerte Rekonstitution des spezifischen Immunsystems sind GvL-Effekt und Infektabwehr insbesondere in den ersten Monaten bis Jahren nach Transplantation stark eingeschränkt.

### 2.6.1. Natürliche Killer-Zellen

Natürliche Killerzellen wurden 1975 erstmals beschrieben und sind Lymphozyten, welche anders als B- und T-Lymphozyten der unspezifischen Immunität angehören. NK-Zellen machen bei gesunden Personen etwa 10-15% der zirkulierenden Lymphozyten aus, und ihre absolute Anzahl pro  $\mu\text{l}$  liegt zwischen 82 und 594 (109). Im Menschen sind sie  $\text{CD3}^+\text{CD56}^+$  und können abhängig von der Menge des exprimierten CD56 in folgende Subpopulationen unterteilt werden:  $\text{CD56}^{\text{bright}}\text{CD16}^-$ , welche als unreife NK-Zellen in erster Linie Zytokine wie  $\text{Ifn-}\gamma$  sezernieren; reife  $\text{CD56}^{\text{dim}}\text{CD16}^+$ , welche 90% der NK-Zellen im peripheren Blut ausmachen und starke zytotoxische Kapazitäten besitzen und die  $\text{CD56}^{\text{bright}}\text{CD16}^+$ , welche eine Zwischenpopulation auf dem Reifungsprozess darstellen (110-112).

NK-Zellen sind die ersten Lymphozyten, welche nach aHSZT vollständig rekonstituieren (113).

Im Gegensatz zu anderen Lymphozyten hängt die Erkennung von Zielzellen nicht von spezifischen Antigenen ab, sondern entsteht durch die Integration von Signalen inhibitorischer und aktivierender Rezeptoren (114).

Die inhibitorischen Rezeptoren, welche HLA-I-Moleküle oder Klasse-I ähnliche Moleküle erkennen, beinhalten zwei Klassen: Die Killer-Immunglobulin-like Rezeptoren (z.B. KIR2DL und KIR3DL) (115) und die C-Type Lectin Rezeptoren CD94/NKG2A/B (116). Da HLA-1 auf allen gesunden körpereigenen Zellen exprimiert wird, führt die Erkennung des „Selbst“ auf diesem Wege zu einer Inhibition der NK-Zelle und schützt die Zelle vor der Lyse.

Des Weiteren fungieren Rezeptoren wie programmed death 1 (PD-1) (117), cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) (118), T cell immunoglobulin and mucin domain containing-3 (TIM-3) (119), und T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains (TIGIT) (120) als Immun-Checkpoints auf NK-Zellen und unterdrücken bei Ligandenbindung eine Aktivierung der NK-Zelle.

Neben einer abweichenden Expression von HLA-Molekülen können gestresste und entartete Zellen zudem über die Expression von Liganden für die aktivierenden Rezeptoren von NK-Zellen erkannt werden. Zu diesen aktivierenden Rezeptoren gehören: KIRs (KIR2DS und KIR3DS), NKG2D, DNAX Accessory Molecule-1 (DNAM-1), der C-Typ Lectin Rezeptor CD94/NKG2C und die natural cytotoxicity Rezeptoren (NKp30, NKp44, NKp46) (114).

Außerdem spielen NK-Zellen eine Rolle bei der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC). Durch Bindung des Fab-Teils (fragment antigen binding) an beispielsweise tumorassoziierte Antigene (TAA) und des Fc-Teils an CD16A wird eine immunologische Synapse gebildet und die NK-Zelle aktiviert (121).

Ihre zytotoxische Wirkung gegenüber Zielzellen vermitteln NK-Zellen zum einen durch die Freisetzung zytolytischer Granula mit Perforin und Granzymen (122) und zum anderen durch Einleitung der Apoptose über Aktivierung von Todesrezeptoren (123). Außerdem können NK-Zellen auf indirektem Wege durch die Sekretion von Chemokinen und Zytokinen entartete Zellen töten und das angeborene und erworbene Immunsystem regulieren (124).

Im Rahmen der allogenen HSZT spielen NK-Zellen somit eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung des GVL-Effekts, können aber gleichzeitig auch GvHD limitierende Wirkung entfalten, indem sie antigenpräsentierende Zellen oder alloreaktive T-Zellen lysieren (10). Über die Sekretion von Zytokinen wie  $\text{Ifn-}\gamma$  können sie zusätzlich das inflammatorische Milieu einer GvHD modulieren (125).

## 2.7. NK-Zell Rezeptoren

### 2.7.1. CD56

Anhand des Levels der Expression des Adhäsionsmoleküls CD56 lassen sich NK-Zellen in die zwei Haupt-Subpopulationen von NK-Zellen mit einer hohen (CD56<sup>bright</sup>) und niedrigen Expression (CD56<sup>dim</sup>) unterteilen.

CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen machen etwa 10% der NK-Zellen des Blutes aus und entsprechen im derzeitigen wissenschaftlichen Konsens als Vorläufer der CD56<sup>dim</sup> eher unreifen NK-Zellen (126). Eine geringere Expression von CD16 bedingt eine eingeschränkte Fähigkeit zur antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität und eine niedrige Expression von KIRs verleiht ihnen eine leichte Aktivierbarkeit und Proliferationsbereitschaft. Anstelle einer starken Zytotoxizität besitzen sie eine ausgeprägte Kapazität zur Sezernierung von Zytokinen (127). Zudem weisen sie eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen wie CD62L auf (128), was ihr präferentielles Vorhandensein in sekundären lymphatischen Organen erklärt.

90% der NK-Zellen des peripheren Blutes sind CD56<sup>dim</sup> und weisen als reife NK-Zellen eine hohe Expression von KIRs (129) und CD16 auf und sind die entscheidende Subpopulation bei der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität.

Die Rekonstitution von NK-Zellen und Expression von CD56 nach HSZT ähnelt der Entwicklung von der Kindheit, mit einem größeren Anteil von CD56<sup>bright</sup> früh nach Transplantation, zum Erwachsenenalter, mit kleinerem Anteil der CD56<sup>bright</sup>. Eine gestörte Rekonstitution, gemessen an einem geringeren Anteil von CD56<sup>bright</sup> an der Gesamtpopulation der NK-Zellen in den ersten zwei Monaten nach HSZT, wurde mit dem Auftreten einer aGvHD in Verbindung gebracht (130).

## 2.7.2. CD16

CD16 ist der Rezeptor, welcher entscheidend für die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) ist (121). Es handelt sich um einen Rezeptor, der das Fc-Fragment von Immunglobulinen bindet, so opsonierte Zellen erkennt und in der Folge die NK-Zelle zur Lyse dieser Zellen stimuliert.

Anhand der Expression von CD16 lassen sich die Subpopulationen von NK-Zellen weiter klassifizieren: CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen können sowohl positiv als auch negativ für CD16 sein, CD56<sup>dim</sup> sind in der Regel stark positiv für CD16 und sind damit die Hauptvermittler der ADCC.

Wie auch bei anderen Rezeptoren kommt es auch bei CD16 bei Ligandenbindung und Aktivierung von NK-Zellen auf Dauer zu einer Internalisierung des Rezeptors (131). Im Gegensatz zu anderen NK-Zell-Rezeptoren dauert die Wiederherstellung von CD16 auf der Zelloberfläche jedoch deutlich länger, sodass die ADCC von NK-Zellen nach ausgeprägter Stimulierung für längere Zeit eingeschränkt sind (132).

### 2.7.3. KIR

Obwohl NK-Zellen bereits Mitte der 70er Jahre entdeckt wurden, blieb der Mechanismus, mit welchem sie zwischen Tumorzellen und gesunden Zellen unterscheiden konnten, lange unbekannt. Die Beobachtung, dass NK-Zellen Lymphomzellen ohne MHC-Klasse I Moleküle auf der Oberfläche lysierten, während Lymphomzellen mit erhaltener Expression von MHC-Klasse I Molekülen resistent waren, führte zur Postulierung der „fehlenden-Selbst-Hypothese“ (9). So mussten NK-Zellen in der Lage sein, die Abwesenheit von eigenen MHC-Klasse I Molekülen auf Zielzellen zu registrieren. Mit der Entdeckung der Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) wurden die ersten Rezeptoren identifiziert, die den NK-Zellen dies ermöglichen (115).

Es existieren allerdings auch aktivierende KIRs (133). In einem Prozess der „Erziehung von NK-Zellen“ müssen die NK-Zellen mit mindestens einem inhibitorischen KIR oder NKG2A das entsprechende MHC-Molekül binden, um voll funktionsfähig zu werden, während eine NK-Zelle mit einem aktivierenden KIR in einem Individuum mit dem dazu passenden MHC-Molekül anerg wird (134, 135).

Neben den KIRs wurde später noch NKG2A als weiterer inhibitorischer Rezeptor identifiziert, welcher eigene gesunde Zellen anhand der Expression des nicht klassischen HLA-Klasse I Moleküls HLA-E erkennen kann (116).

Während unreife NK-Zellen keine KIRs exprimieren und NKG2A als inhibitorischen Rezeptor besitzen, wird bei reifen CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen auf eine Expression von KIRs gewechselt (136).

Die KIR-Gen-Familie besteht aus 13 Genen und zwei Pseudogenen und es existieren verschiedene Haplotypen, die sich in der Anzahl der enthaltenen Gene unterscheiden (137).

Hinzu kommt ein ausgeprägter alleler Polymorphismus (138), was zusammen zu einer ausgeprägten interindividuellen Variabilität der KIR-Genotypen führt.

Diese Variabilität der KIR-Genotypen spielt vor allem bei der haploidenten Transplantation eine Rolle, bei welcher NK-Zellen des Spenders, welche ausschließlich KIRs für eigene MHC-Moleküle besitzen, die auf bestimmten Zellen des Patienten nicht vorhanden sind, alloreaktiv werden und diese Zellen lysieren. Es konnte gezeigt werden, dass dieser KIR-KIR-Ligand mismatch im Rahmen der haploidenten Transplantation zu einem Überlebensvorteil führt (139).



Die Rekonstitution der Expression von KIR-Rezeptoren dauert mindestens ein Jahr und wird der Expression im Spenderorganismus immer ähnlicher. Bei der Hälfte der Patienten einer Studie von HLA-gematchten Transplantationen blieb sie nach einem Jahr stabil wie es bei nicht-transplantierten gesunden Erwachsenen der Fall ist (140).

## 2.7.4. Natural cytotoxicity receptors

Die Familie der natural cytotoxicity receptors (NCRs) wurde erstmals von Moretta et al. vor ungefähr 20 Jahren beschrieben und besteht aus den drei transmembranären Rezeptoren Nkp46, Nkp44, Nkp30, für welche die entsprechenden Gene NCR1, NCR 2 und NCR3 kodieren (141-143).

Während die Blockade eines einzelnen NCRs nur einen geringen Effekt auf die Zytotoxizität der NK-Zellen hatte und der Effekt bei unterschiedlichen Tumorzellen variiert, konnte die Zytotoxizität durch simultane Blockade mehrerer NCRs effizient eingeschränkt werden (141-143). Dies deutet daraufhin, dass eine unterschiedliche Expression von Liganden für die NCRs von verschiedenen Tumorzelltypen und eine variierende Expression NCRs auf NK-Zellen die Zytotoxizität regulieren, welche zusätzlich durch die unterschiedliche Expression von MHC-Klasse-1 Molekülen beeinflusst wird.

Aktuelle Fortschritte in der Identifikation der Liganden der NCRs führen nun zu einem besseren Verständnis der Bedeutung, welche diese Rezeptoren bei der Überwachung von malignen und infizierten Zellen spielen.

Neben NK-Zellen finden sich die NCRs teilweise auch auf anderen Zellen wie innate lymphoid cells (ILCs) (144) und T-Lymphozyten (145).

### 2.7.4.1. Nkp46

Nkp46 wird von allen Subpopulationen der NK-Zellen unabhängig des Aktivierungsstatus exprimiert (141).

Ligandenbindung an Nkp46 stimuliert die NK-Zelle zur Lyse der Zielzelle und zur Sekretion von  $\text{Ifn-}\gamma$  und  $\text{TNF-}\alpha$ .

Wie auch die anderen NCRs bindet Nkp46 an bestimmte Sequenzen von Heparansulfat-Glykosaminoklykanen (HS-GAGs), welche zusammen mit Proteinen Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) bilden und wichtiger Bestandteil der Gewebearchitektur sind. Zusätzlich können sie eine Rolle bei der Tumorprogression spielen, indem sie die Proliferation fördern, ein Entkommen gegenüber dem Immunsystem ermöglichen, die Invasion und Metastasierung in andere Gewebe begünstigen und Bindestellen für basische Domänen von Chemokinen und Wachstumsfaktoren bieten.

Es wird vermutet, dass NK-Zellen auf diesem Weg Veränderungen in der Zusammensetzung der HSPGs im Mikromilieu des Tumors wahrnehmen können, da bestimmte Tumorentitäten veränderte Expressionen von entscheidenden Enzymen der Synthese und des Katabolismus von HS aufweisen (146).

NK-Zellen können mithilfe von Nkp46 zudem virusinfizierte Zellen erkennen. Nkp46 bindet Hämagglutinine und Hämagglutinin-Neuramidase wie sie von Influenza- und Parainfluenzaviren exprimiert werden (147). So führt ein Verlust von Nkp46 bei Mäusen zu einer Anfälligkeit gegenüber Infektionen mit Influenzaviren (148).

Zudem spielen NK-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Lyse von mit Mykobakterium tuberculosis infizierten Monozyten, welche sie über die Expression von Vimentin auf deren Zellmembran erkennen (149, 150).

Nkp46 bindet zudem auch an Adhäsine von *Candida glabrata* und spielt somit eine Rolle in der Abwehr gegenüber diesem opportunistischen Erreger (151).

Die Bedeutung von Nkp46 wurde auch im Rahmen der HSZT evaluiert. So konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass eine Defizienz von Nkp46 zu einer schwereren GvHD als bei Vorhandensein von Nkp46 führt, was auf eine vermehrte Stimulation von T-Zellen durch unreife dendritische Zellen zurückgeführt wurde (152).

Eine hohe Expression von Nkp46 zum Zeitpunkt der Diagnose der Grunderkrankung hatte gegenüber einer niedrigen Expression einen positiven Einfluss auf das progressionsfreie und Gesamtüberleben und die Prognose nach einer HSZT (153).

Im Rahmen der Konditionierung kommt es durch einen verringerten Verbrauch von IL-15 durch NK-Zellen zu einem Anstieg von IL-15, welches invers zur Rekonstitution der NK-Zellen wieder abfällt und gleichzeitig die Expression von Nkp46 stimuliert (154).

Es konnte gezeigt werden, dass AML-Zellen eine verminderte Expression von Nkp46 induzieren können, welche bei Erreichen einer CR reversibel ist, und dass diese verminderte Expression mit einer schlechteren Prognose einhergeht (155).

Zudem wurde bei Patienten mit AML eine verminderte Expression von Nkp46 an Tag 60 nach HSZT beobachtet, welche mit einer eingeschränkten Fähigkeit zur Degranulation verbunden war (156).

## 2.7.4.2. Nkp44

Die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber MHC-defizienten Tumorzellen wird durch Kultur mit IL-2 deutlich verstärkt, was darauf hindeutet, dass NK-Zellen bei Aktivierung weitere aktivierende Rezeptoren hochregulieren.

Während Nkp46 und Nkp30 konstitutiv auch auf ruhenden NK-Zellen exprimiert werden, ist die Expression von Nkp44 auf NK-Zellen nach Stimulation mit IL-2, IL-15 oder IL-1 $\beta$ , besonders auf der CD56<sup>bright</sup> Subpopulation, erhöht (142, 157).

Es existieren drei verschiedene Isoformen von Nkp44 (Nkp44-1, -2 und -3), von denen Nkp44-1 zusätzlich zu seiner aktivierenden Wirkung auf die NK-Zellen auch ein inhibitorisches Signal vermitteln kann (158).

Nkp44 bindet eine Reihe intrazellulärer Liganden, welche von Tumorzellen und virusinfizierten Zellen abweichend auch auf der Zelloberfläche exprimiert werden.

Die auch als Nkp44L bekannte Form des mixed-lineage leukemia protein-5 (MLL5) entsteht durch alternatives Spleißen dieses Proteins, welches sonst ein nukleäres Antigen ist, und wird konsekutiv an der Zelloberfläche exprimiert (159).

Nkp44 interagiert zudem mit dem proliferating cell nuclear antigen (PCNA), welches physiologisch als Kofaktor der DNA-Polymerase  $\delta$  dient, und bei Expression auf der Zelloberfläche über Bindung an Nkp44 eine Inhibition der NK-Zelle bewirkt (160).

Der Platelet-derived growth factor (PDGF) ist ein Wachstumsfaktor, welcher von vielen Krebszellen ausgeschüttet wird und ebenfalls von Nkp44 erkannt wird und dann eine Sezernierung und Ifn- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  bewirkt (161).

Nidogen-1 (NID1) ist integraler Bestandteil der Basalmembran und kann bei manchen Tumorpatienten im Serum gelöst nachgewiesen werden und inhibiert dann über eine Bindung an Nkp44 die NK-Zellen (162).

Wie Nkp46 erkennt auch Nkp44 virale Hämagglutinine und Hämagglutininneuramidase. Außerdem kann es auch Moleküle auf der Oberfläche von bestimmten Bakterien wie *Mycobacterium bovis* (M. bovis), *M. tuberculosis*, *Nocardia farcinica*, und *Pseudomonas aeruginosa* direkt binden (163, 164). Während dies zwar keine direkte Zytotoxizität verursacht, trägt dies dennoch zur Aufrechterhaltung der Aktivierung von NK-Zellen bei (164).

### 2.7.4.3. Nkp30

Die starke Anfälligkeit von K562-Zellen gegenüber NK-Zellen ist durch die Expression von B7-H6 bedingt, welches über Nkp30 erkannt wird (165). Während B7-H6 auf gesunden Zellen nicht exprimiert wird, wird es von einer Vielzahl an Tumorzellen exprimiert und das Protoonkogen MYC erhöht die Expression B7-H6 (166).

Ein weiterer Ligand für Nkp30 ist das HLA-B assoziierte Transkript 3 (BAT3), welches sich physiologisch intrazellulär befindet, jedoch von bestimmten Tumorzellen in Exosomen sezerniert wird, und so NK-Zellen aktiviert (167).

Demgegenüber unterdrückt lösliches BAT3 bei Patienten mit CLL eine Aktivierung von NK-Zellen durch eine Konkurrenz mit dem exosomalen BAT3 und anderen Liganden (168).

Membrangebundenes Galectin-3 kann über Bindung an Nkp30 ebenfalls NK-Zellen stimulieren, während die lösliche Form eine Aktivierung behindert (169).

Das pp65 Protein, welches von Cytomegalievirus-infizierten Zellen exprimiert wird, führt über Bindung an Nkp30 zu einer Inhibition der NK-Zelle (89).

Nkp30 erkennt zudem den Zellwandbestandteil  $\beta$ -1,3 Glucan und führt dann über Freisetzung zytotoxischer Granula zu einer direkten Lyse von *Cryptococcus neoformans* und *Candida albicans* (170, 171).

Es konnte gezeigt werden, dass AML-Zellen eine verminderte Expression von Nkp30 induzieren können, welche bei Erreichen einer CR reversibel ist, und dass diese verminderte Expression mit einer schlechteren Prognose einhergeht (155).

Auch die Expression von Nkp30 wird unmittelbar nach Transplantation durch erhöhte Konzentrationen von IL-15 gesteigert(154).

Eine verminderte Expression von Nkp30 bei Patienten mit AML an Tag 60 nach HSZT führte zu einer reduzierten Fähigkeit zur Degranulation (156).

### 2.7.5. NKG2A

NKG2A ist ein inhibitorischer Rezeptor, welcher HLA-E bindet. HLA-E ist ein nicht klassisches MHC-Klasse I-Molekül, dessen Expression auf der Zelloberfläche abhängig von der Bindung der Signalpeptide der klassischen MHC-Klasse I-Moleküle ist (116). Auch Peptide anderen Ursprungs können die Expression von HLA-E stabilisieren. So trägt HSP60, ein Protein, welches unter Zuständen zellulären Stresses vermehrt gebildet wird, eine Signalsequenz, welche zur Expression von HLA-E führt, welches allerdings nichtmehr von NKG2A erkannt wird und daher die inhibitorische Wirkung auf NK-Zellen verliert (172).

In den ersten Monaten nach Transplantation ist NKG2A der wichtigste inhibitorische Rezeptor auf NK-Zellen, da dessen Expression nach Transplantation erhöht ist, während die Rekonstitution von KIR-Rezeptoren mindestens ein Jahr benötigt (140). Eine Depletion von CD3<sup>+</sup>- und CD19<sup>+</sup>-Zellen im Graft führt zu einer schnelleren Abnahme der Expression von NKG2A und Zunahme der Expression von NKG2C. Diese Entwicklung des Verhältnisses von NKG2A zu NKG2C zugunsten von NKG2C geht mit einer gesteigerten zytolytischen Aktivität und Ifn- $\gamma$ -Sekretion einher (173).

NK-Zellen aus Nabelschnurblut, welche einen unreiferen Phänotyp mit einer erhöhten Expression von NKG2A aufweisen, exprimieren zudem weniger Granzyme-B und zeigen eine eingeschränkte Zytotoxizität auf (174).

In einer prospektiven Analyse wurde beobachtet, dass Patienten, welche eine aGvHD entwickelten, an Tag 30 nach Transplantation einen geringeren Anteil NKG2A<sup>+</sup> NK-Zellen hatten als Patienten, die keine aGvHD entwickelten. Dieser Unterschied in der Expression, welcher nur auf den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen zu sehen war, war an Tag 90 nach Transplantation nicht mehr zu beobachten (175).

### 2.7.6. NKG2C

NKG2C ist ein aktivierender Rezeptor, welcher ähnlich wie NKG2A HLA-E bindet (176). Unter physiologischen Zuständen ist die Expression von HLA-E abhängig von der Bindung mit Signalpeptiden der klassischen MHC-Klasse I-Moleküle, wobei auch virale (85) Proteine und solche, welche bei zellulärem Stress entstehen (172), die Expression von HLA-E ermöglichen können. Die Affinität der unterschiedlichen NKG2-Rezeptoren ist abhängig vom dem an HLA-E gebundenen Peptid, wobei NKG2C in der Regel eine niedrigere Affinität aufweist als NKG2A, sodass die Expression von HLA-E eher eine inhibitorische Wirkung auf NK-Zellen hat (176).

Bei Reaktivierung von CMV nach HSZT kommt es zu einer Expansion NKG2C<sup>+</sup> NK-Zellen (90). Diese erhöhte Anzahl von NKG2C<sup>+</sup> ließ sich auch bei anderen viralen Infektionen bei Patienten beobachten, welche seropositiv für CMV waren (177). Diese NKG2C<sup>+</sup> NK-Zellen weisen eine gesteigerte Kapazität zur Produktion von IFN- $\gamma$  bei Stimulation des CD16 Rezeptors auf (178). Die geringere Rezidivrate bei AML-Patienten nach HSZT bei einer CMV-Reaktivierung wird mit der Expansion dieser hoch funktionalen NKG2C<sup>+</sup>-NK-Zell-Subpopulation in Verbindung gesetzt (179, 180).

Allerdings scheinen diese Wirkungen nicht allein von NKG2C abhängig zu sein. Etwa 4% der Menschen weisen eine homozygote Deletion des Gens für NKG2C auf (NKG2C<sup>-/-</sup>). Bei Empfängern, welche eine Stammzellspende von solchen NKG2C<sup>-/-</sup> Spendern erhielten, konnte als Reaktion auf eine CMV-Infektion eine rasche Reifung von NK-Zellen, im Sinne einer Expansion von CD56<sup>dim</sup>NKG2A<sup>-</sup>KIR<sup>+</sup>-NK-Zellen beobachtet werden (181). Diese expandierte Population von NK-Zellen exprimierte aktivierende KIRs, welche die Zytotoxizität, IFN- $\gamma$  Sekretion und Degranulation stimulieren konnten (181).

### 2.7.7. NKG2D

NKG2D bindet an zwei verschiedene Familien von Liganden: Die MHC-class I chain-related peptides MICA und MICB und die UL-16 binding proteins (ULBP) (87, 182). Dies sind Proteine, welche Ähnlichkeiten zu den MHC-I-Molekülen aufweisen und bei maligner Transformation von Zellen hochreguliert werden (183).

Die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber Tumorzellen korreliert mit der Expression von MICA und ULBP (183) und eine, durch von Tumorzellen sezerniertem TGF- $\beta$  hervorgerufene, verminderte Expression von NKG2D schränkt die Zytotoxizität ein (184).

NKG2D wird neben NK-Zellen auch von  $\gamma/\delta$ -T-Zellen und CD8<sup>+</sup>  $\alpha/\beta$ -T-Zellen exprimiert (182).

Es konnte gezeigt werden, dass Stammzellen der AML die Expression von Liganden für NKG2D über eine erhöhte Expression von Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP1) herunterregulieren, um so der Immunabwehr zu entkommen und, dass die Expression dieser Liganden durch PARP1-Inhibitoren wiederhergestellt werden kann (185).

Auch die Expression von NKG2D ist auf NK-Zellen unmittelbar nach Transplantation bedingt durch erhöhte IL-15 Spiegel gesteigert (154).



### **2.7.8. CD69**

CD69, auch als early activation antigen bekannt, ist ein Rezeptor, welcher von aktivierten T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Thrombozyten und Langerhanszellen exprimiert wird. Es ist eines der ersten Antigene, welche bei Aktivierung von Lymphozyten hochreguliert werden und fungiert dann als kostimulatorischer Rezeptor. Nach Ligandenbindung stimuliert CD69 die Zytotoxizität (186), Proliferation und Expression von Adhäsionsmolekülen wie intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) (187). Somit scheint CD69 essentiell für die Aufrechterhaltung von Effektorfunktionen von aktivierten NK-Zellen zu sein. Ein bekannter Ligand für CD69 ist Galectin-1, welches für die Adhäsion an dendritische Zellen eine Rolle spielt (188).

### 2.7.9. CD62L

Das Lymphozyten-Selektin CD62L ist ein Zelladhäsionsmolekül, welches Zellkontakte bei Immunreaktionen und zu Endothelzellen in Lymphknoten vermittelt und somit eine entscheidende Rolle bei der Migration von Lymphozyten in entzündete Gewebe und Lymphknoten spielt.

CD62L wird vornehmlich von den unreifen CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimiert und nur ein Teil der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen exprimiert CD62L (128). Während CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen ihr Ansprechen auf Zytokine reduzieren und eher über ihre aktivierenden Rezeptoren stimuliert werden, besitzt nur die CD56<sup>dim</sup> CD62L<sup>+</sup> Subpopulation das Potential nach Zytokinstimulation Ifn- $\gamma$  zu produzieren und nach Ligandenbindung an ihre aktivierenden Rezeptoren Zytokine zu produzieren und Zielzellen zu lysieren (189). Diese Tatsache könnte sie als eine spezielle Subpopulation im Reifungsprozess der NK-Zellen auszeichnen.

Die Tatsache, dass CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen eine höhere Expression von CD62L haben, ermöglicht dieser Subpopulation ein leichteres Einwandern in Lymphknoten und früheres Akkumulieren in entzündeten Geweben, wo sie dann mit ihren Zytokinen eine adäquate Entzündungsantwort initiieren können (128). Eine Aktivierung von NK-Zellen durch bestimmte Zytokine führt zudem zu einer Abnahme der Expression von CD62L, was bei der Entwicklung von NK-Zell basierten Therapien bedacht werden muss, da so die Einwanderung in Tumorgewebe eingeschränkt werden kann (128).

## 2.7.10. Tigit

Tigit steht für T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains und wurde zuerst auf T-Lymphozyten entdeckt. Seine bekannten Liganden sind CD155 (PVR: poliovirus receptor) und CD112 (PVRL2: poliovirus receptor-related 2). Die Bindung von Tigit auf T-Lymphozyten an CD155 auf dendritischen Zellen führt zu einer Sekretion von Interleukin-10 durch die dendritischen Zellen und vermittelt so indirekt eine immunsuppressive Wirkung (190). Die intrazelluläre ITIM-Domäne kann nach Ligandenbindung an Tigit zudem auch eine direkte inhibitorische Wirkung auf die Effektorzelle ausüben (191). Tigit wird daher auch als ein Immun-Checkpoint angesehen, da eine erhöhte Expression mit einer Erschöpfung von T-Lymphozyten korreliert und eine Blockade von Tigit die Immunantwort gegenüber bestimmten Tumoren verbessern kann (192) (193). Bei einigen AML-Zellen konnte eine hohe Expression von CD155 und CD112, welche mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet war, nachgewiesen werden und eine Blockade von Tigit oder CD155 und CD112 verstärkte die anti-leukämische Wirkung von Effektorzellen (194).

Auch auf NK-Zellen konnte Tigit nachgewiesen werden und vermittelte nach Bindung von PVR und PVRL2 eine direkte inhibitorische Wirkung auf die NK-Zellen durch seine ITIM-Domäne (191). Zudem wurde beobachtet, dass die Expression von Tigit auf NK-Zellen mit einer Erschöpfung dieser Zellen und eingeschränkten Effektorfunktionen assoziiert war (120). Durch eine Blockade von Tigit konnte die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber unterschiedlichen Tumorentitäten im Mausmodell gesteigert werden (120, 195).

Bisher gibt es keine Arbeiten, welche die Expression von Tigit auf NK-Zellen im Zusammenhang der GvHD untersucht haben.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Materielen

##### 3.1.1. Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

FACS-Puffer	PBS BSA 10% EDTA 0,5M/pH 8,0	493ml 5ml 2ml
FACS-Fix	PBS Formaldehyd 37% EDTA 0,5M/pH 8,0	242ml 6,8ml 1ml
MACS-Puffer	PBS BSA 10% EDTA 0,5M/pH 8,0	236,5ml 12,5ml 1ml
Einfrier-Medium	X-Vivo-15 HSA 20% Heparin	150ml 100ml 2500U
Trypanblau (Stammlösung)	Trypanblau H <sub>2</sub> O destilliert	1g 500ml
Trypanblau (Gebrauchslösung)	Trypanblau Stammlösung 4,5% NaCl-Lösung	37,5ml 12,5ml
K562 Medium	RPMI 1640 BSA 10% Penicillin/Streptomycin	222,5ml 25ml 2,5ml
NK-Zell Medium	X-Vivo-15 HSA Penicillin/Streptomycin	235ml 12,5ml 2,5ml
T-Zell-Medium	AIM V HSA	90ml 10ml
Waschpuffer	Aqua B. Braun BD Perm/Wash	45ml 5ml

PBS + EDTA	PBS EDTA Lösung pH8/0,5M	498ml 2ml
------------	--------------------------------	--------------

### 3.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien

PBS (phosphate-buffered saline), flüssig	Gibco BRL (Karlsruhe)
BSA – albumine from bovine serum	Sigma (Taufkirchen)
EDTA Lösung pH8/0,5M	Sigma
Formaldehyd p.A. 37%	Applichem (Darmstadt)
X-Vivo-15 + Gentamicin und Phenolrot	Lonza (Basel)
Humanalbumin Alburex 20% 20g/100ml	CSL Behring (Marburg)
Heparin Natrium 25 000IE 5 Ampullen	Ratiopharm (Ulm)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth Carl GmbH (Karlsruhe)
Trypanblau	Merck (Darmstadt)
Aqua B. Braun	Braun (Melsungen)
Essigsäure	Merck
Ficoll-Medium (Histopaque 1077)	Sigma-Aldrich (München)
NaCl	Roth Carl GmbH (Karlsruhe)
RPMI Medium 1640	Sigma-Aldrich
BD Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences (San Jose, CA)
BD Perm/Wash	BD Biosciences (San Jose, CA)
AIM V	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA)
Humanes Serum Albumin (HSA)	Eigenherstellung (Transfusionszentrale Universitätsmedizin Mainz)
Penicillin/Streptomycin (10.000U +10.000µg)	Sigma
Golgi-Stop (containing Monensin)	BD Biosciences
Ionomycin	Sigma-Aldrich
PMA	Sigma-Aldrich
Prednisolon	Merck
Tacrolimus	Astellas Pharma (München)

### 3.1.3. Antikörper für Durchflusszytometrie

Tabelle 5: Antikörper

Antikörper	Species	Farbe	Klon	Firma
IgG	mouse	Fitc/PE		Beckmann Coulter (Krefeld)
IgG	mouse	APC		Beckmann Coulter (Krefeld)
IgG	mouse	APC-H7	MOPC-21	BD (San Jose)
IgG	mouse	Pe-Cy7		BD (San Jose)
IgG	mouse	V450	MOPC-21	BD (San Jose)
CD3		Fitc		Beckmann Coulter (Krefeld)
CD3		PE		Beckmann Coulter (Krefeld)
CD3		APC		Beckmann Coulter (Krefeld)
CD3	mouse	APC-H7	SK7	BD (San Jose)
CD3	mouse	Pe-Cy7	SK7	BD (San Jose)
CD3	mouse	V450	SP34-2	BD (San Jose)
CD52	rat	Fitc		Bio-RAD (Kidlington)
CD127		Fitc	eBioRDR5	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA)
CD45		Fitc		Beckmann Coulter (Krefeld)
Nkp44		PE	P44-8	BioLegend (San Diego, CA)
Nkp46		PE	9E2	BioLegend (San Diego, CA)
NKG2A		PE		Miltenyi Biotec (Bergisch- Gladbach)

CD69		PE	FN50	BioLegend (San Diego, CA)
Tigit		PE	MBSA43	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA)
Ifn- $\gamma$	mouse	PE		BD (San Jose)
CD52	rat	PE		Bio-RAD (Kidlington)
CD8		APC		Beckmann Coulter (Krefeld)
NKG2C		APC	REA205	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach)
NKG2D		APC	1D11	BioLegend (San Diego, CA)
CD62L		APC	DREG-56	BioLegend (San Diego, CA)
Nkp30	mouse	APC	P30-15	BioLegend (San Diego, CA)
CD107a	mouse	APC	H4A3	BD (San Jose)
CD14	mouse	APC-H7	M5E2	BD (San Jose)
CD19	mouse	APC-H7	SJ25C1	BD (San Jose)
CD4	mouse	APC-H7	RPA-T4	BD (San Jose)
CD16		Pe-Cy7	3G8	BioLegend (San Diego, CA)
CD56	mouse	V450	B159	BD (San Jose)
CD25	mouse	V450	M-A251	BD (San Jose)

### 3.1.4. Kits

Tabelle 6: Kits

NK-Cell Isolation Kit human	Miltenyi
-----------------------------	----------

### 3.1.5. Plastikwaren

Tabelle 7: Plastikwaren

Pipettenspitzen 0,5µl-10µl, 10µl-200µl, 100µl-1000µl	Starlab (Hamburg)
einmal Pipetten, steril 2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Greiner (Frickenhausen)
FACS-Röhrchen zur Durchflusszytometrie	Fisher Scientific (Schwerte)
Falcons 15ml, 50ml (Zellkulturröhrchen)	Greiner (Frickenhausen)
Einfrierröhrchen (Nuncs) 2ml	Greiner (Frickenhausen)
Einfrierröhrchen-Ständer	Carl Roth GmbH
Einfrierbox	Nalge Nunc (Wiesbaden)
Handschuhe	Semperit (Wien)
Zellkulturflasche Filterdeckel 250ml	Greiner (Frickenhausen)
Zellkulturflasche ohne Filter 250ml	Greiner (Frickenhausen)
MACS-Säule MS	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach)
MACS PreSep-Filter	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach)
24-well Zellkulturplatte	Greiner (Frickenhausen)
96-V-well Zellkulturplatte	Greiner (Frickenhausen)
Reaktionsgefäße (Eppis)	Eppendorf
Celltrics (Filter 50µm Porenweite)	Sysmex (Norderstedt)



### 3.1.6. Glaswaren

Tabelle 8: Glaswaren

Bechergläser 200, 500, 1000ml	Schott (Mainz)
Deckgläser 24x32mm	Menzel (Braunschweig)
Objektträger 25x75mm	Diagonal (Münster)
Zählkammern	Fuchs-Rosenthal Schreck (Hofheim)

### 3.1.7. Geräte

Tabelle 9: Geräte

Herasafe Typ HS-18 (sterile Werkbank)	Kendro Laboratory Products (Hanau)
Hera cell 150 (Brutschrank)	Heraeus (Langenselbold)
Axiovert 40C (Lichtmikroskop)	Zeiss (Jena)
Reax Control (Reagenzglasschüttler)	Heidolph (Schwabach)
Minifuge Reax 2000	Heidolph
MiniStar silverline (Mini-Zentrifuge)	VWR (Darmstadt)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Heraeus Multifuge 1S-R Centrifuge	Thermo Electron Corporation
Heraeus Megafuge 16R Centrifuge	Thermo Scientific
Kühl- und Gefrierkombination 4°C,-20°C	Liebherr (Kirchdorf an der Iller)
Gefrierschrank -80°C Herafreeze	Kendro Laboratory Products
Durchflusszytometer FACS Canto Aria™ mit Software FACS Diva™,	BD Biosciences (Heidelberg)
Stickstoff-Kry-Bank XLC 1370	MVE Europe (Solingen)
Air liquide Espace 331	Tec Lab (Königstein)
Stickstofftank Taylor-Wharton XL180	Tec Lab
MACS-Magnet für Zellseparation	Miltenyi Biotec
Mikroliterpipetten Transferpipette 0,5-10µl, 10-200µl, 100-1000µl	Brand (Wertheim)
Pipettiergerät PipetBoy	VWR

### 3.1.8. Software

Tabelle 10: Software

FlowJo 10.4 für durchflusszytometrische Analysen	FlowJo
GraphPad Prism 8	GraphPad Prism

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. Allgemein**

In dieser Studie wurde die Rekonstitution von NK-Zellen und deren Expression bestimmter Oberflächenantigene bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation untersucht. Hierfür war eine Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) durch Dichtegradientenzentrifugation nötig, um eine Anreicherung von NK-Zellen für die nachfolgenden Untersuchungen zu erreichen. Für die funktionellen Tests wurden NK-Zellen zusätzlich aus den PBMCs mittels einer magnetischen Zellseparation (MACS) isoliert, um so den Einfluss anderer Immunzellen so weit wie möglich auszuschließen.

Untersucht wurden Blutproben von gesunden Spendern als Kontrollgruppe und Patienten nach Stammzelltransplantation. Blutproben von gesunden Spendern erhielten wir anonym als sogenannte Buffycoats, welche bei der Herstellung von Erythrozytenkonzentraten anfallen, von der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz.

Patientenproben wurden für die retrospektive Studie von Patienten entnommen nachdem diese eine der Komplikationen entwickelt hatten. Für die prospektive Studie erfolgte die Blutentnahme an Tag 50 (+/-15), 100 (+/-12), 150 (+/-17), 200 (+/-33) und 365 (+/-109) nach Transplantation.

Patienten wurden zu den genannten Zeitpunkten jeweils zwei 20ml Spritzen Blut entnommen. Zur Gerinnungshemmung wurden wenige Milliliter Heparin hinzugegeben.

Alle Patienten haben vor der Blutentnahme nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung durch die Ärzte des KMT-Teams der Blutentnahme und wissenschaftlichen Untersuchung ihrer Immunzellen im Rahmen einer wissenschaftlichen Studie (#808; „Untersuchungen zur Rekonstitution des Immunsystems in Patienten nach Stammzelltransplantation“ [837.185.00 (1551)]) zugestimmt.

Nach entsprechender Vorbereitung der Proben erfolgte die Bestimmung der Zellpopulationen und der Expression von Oberflächenmarkern und Ifn-g mithilfe der Durchflusszytometrie (FACS). Hiermit lassen sich Zellen, neben einer Auftrennung anhand von morphologischen Eigenschaften (Größe des Zellkerns/Granularität des Zytoplasmas), nach einer Markierung mit fluorochromgekoppelten Antikörpern auch anhand der Expression von Oberflächenmarkern differenzieren.

### 3.2.2. Aufbau Retrospektive Analyse

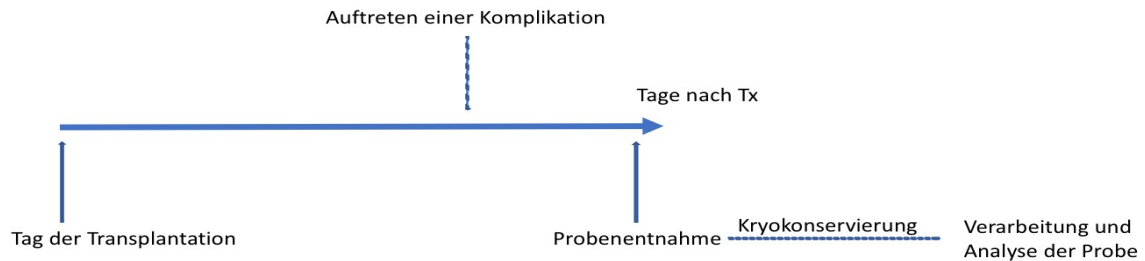


Abb. 1: Aufbau der retrospektiven Studie. Erläuterung siehe Text.

Abbildung 1 gibt einen schematischen Überblick über den Aufbau der retrospektiven Analyse. Nach Transplantation wurden Patienten auf das Auftreten einer aGvHD, cGvHD oder eines Rezidivs hin untersucht. Wenn das Auftreten einer der Komplikationen erfasst wurde (Mittelwerte Tage nach Tx: aGvHD: 69, cGvHD: 281, Rezidiv: 376), erfolgte die Infomation unseres Labors. Bei der nächsten Möglichkeit (z.b. Ambulanztermin) wurde eine Blutentnahme für unser Labor organisiert. Diese erfolgte im Mittel nach 58, 723 bzw. 65 Tagen für aGvHD, cGvHD und Rezidiv. Gerechnet ist hier die Zeit ab Erstmanifestation, was die längere Latenz bei Patienten cGvHD erklärt, bei welchen mitunter erst bei einem späteren Schub eine Blutprobe gewonnen wurde.

Noch am selben Tag erfolgte die Dichtegradientenzentrifugation und die Vorbereitung für die Kryokonservierung. So konnten die Proben bis zur Analyse kryokonserviert werden und alle Patientenproben standen bereits zur Verfügung als diese Doktorarbeit begonnen wurde.

### 3.2.3. Aufbau prospektive Analyse

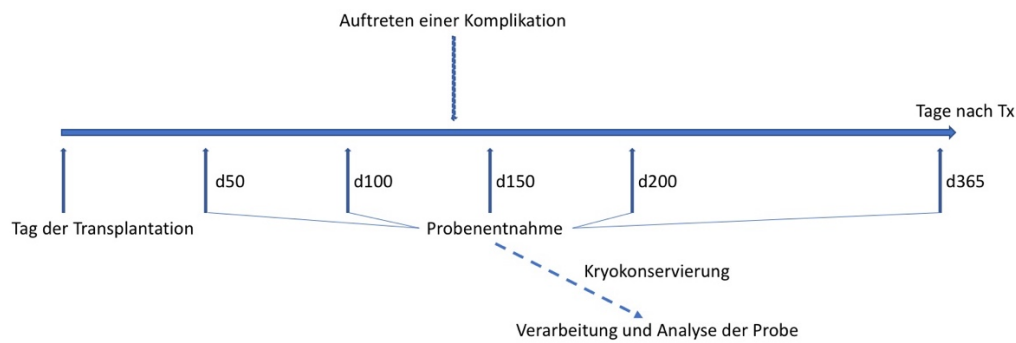


Abb. 2: Aufbau der prospektiven Studie. Erläuterung siehe Text

Abbildung 2 gibt einen schematischen Überblick über den Aufbau der prospektiven Studie. Die Patienten wurden ab dem Tag ihrer Transplantation in die Studie eingeschlossen. Es erfolgten an den vorab definierten Tagen nach Transplantation (50, 100, 150, 200 und 365) Blutentnahmen unabhängig davon, ob bereits eine Komplikation aufgetreten war oder nicht. Trat bei einem Patienten eine aGvHD, cGvHD oder ein Rezidiv auf, so wurden die bei ihm erhobenen Daten für den gesamten Beobachtungszeitraum der entsprechenden Gruppe zugeordnet unabhängig davon zu welchem Zeitpunkt die Komplikation aufgetreten war. Wie in der retrospektiven Analyse erfolgte die Dichtegradientenzentrifugation noch am Tag der Blutentnahme und die Zellen wurden bis zur endgültigen Analyse kryokonserviert.

## 3.2.4. Patientenkollektive

### 3.2.4.1. Patienten der retrospektiven Studie

Tabelle 11: Patientenkollektiv retrospektive Studie

Patient	Erkrankung	Konditionierung	Komplikation (Tage nach Tx)	Probennahme d nach Tx (d nach Komplikation)	Therapie	Virusreaktivierung
aGvHD 1	PMF	Fludarabin, Busulfan, Campath	aGvHD Haut II° ca. 40% KOF, Overall I° (26)	62 (36)	Steroidstoß	EBV-Virämie 01/15 CMV-Reaktivierung 03/15
aGvHD 2	Indolentes B-NHL	Fludarabin, Melphalan, Campath	aGvHD der Haut I°, Darm II° overall III° (79)	96 (27)	Ciclosporin	keine
aGvHD 3	AML	Busulfan, Cyclophosphamid	aGvHD Haut KOF 50% (III°) (112)	126 (14)	Steroidstoß	keine
aGvHD 4	AML	Busulfan, Cyclophosphamid, ATG	aGvHD der Haut (III°, overall II°) (19)	108 (89)	Steroidstoß	CMV-Reaktivierung 04/15
aGvHD 5	AML	Busulfan, Cyclophosphamid	aGvHD Bindehaut (161)	168 (7)	Steroidstoß	CMV-Reaktivierung 06/15 + 09/15 (Valcyte)
aGvHD 6	AML	Fludarabin, BCNU, Melphalan	aGvHD Darm III°, Haut I° (12)	100 (88)	Steroid, MMF, CSA	keine
aGvHD 7	Osteomyelofibrose & MDS	Fludarabin, Melphalan, Campath	aGvHD Haut II Darm I°, V.a. Leber, overall II (108)	152 (44)	Steroid lokal	keine
aGvHD 8	MDS	Fludarabin, Melphalan, Campath	aGvHD Haut >50% der KOF III°, V.a. GvHD GI II°, Overall III° (35)	244 (209)	Steroidstoß	EBV-PTLD 07/15 (Rituximab)
aGvHD 9	AML	Fludarabin, Treosulfan, ATG	aGvHD des GI-Trakts IV°, Haut II° Stadium IV° overall IV° (87)	139 (52)	Steroidstoß	keine
aGvHD 10	AML	Fludarabin, BCNU, Melphalan, ATG	aGvHD Haut I°, Darm IV°; overall IV° (54)	72 (18)	Steroidstoß	EBV 01/19
cGvHD 1	AML	Mel-Flud/ATG/TBI	cGvHD (156)	162 (6)	Prograf	Keine
cGvHD 2	AML	Fludarabin, AraC, Amsacrin, Busulfan, Cyclophosphamid, ATG	cGvHD mit vaginaler Beteiligung (321)	484 (163)	Steroid lokal	CMV-Reaktivierung 12/12+04/13
cGvHD 3	AML	TBI, Cyclophosphamid	cGvHD der MSL, Haut mit Sklerodermie, Augen V.a. GI-Trakt, Leber, Gelenke (37)	338 (301)	Steroidstoß, Rituximab 02/15, Jakavi ab 05/15	keine
cGvHD 4	Sekundäre Myelofibrose	Fludarabin, Melphalan, Campath	cGvHD der Haut und Leber, Overall III° (380)	694 (314)	Steroidstoß, Prograf, ECP, Etanercept	CMV-Reaktivierung 01/14

cGvHD 5	Multiples Myelom	Fludarabin, Melphalan, Campath	cGvHD Leber, Haut, MSH (138)	676 (538)	Steroidstoß	keine
cGvHD 6	AML	Busulfan, Cyclophosphamid	cGvHD MSH, Auge, Haut, Leber (185)	45656 (4380)	Steroid, CSA, ECP, Prograf	keine
cGvHD 7	BPDCN	Fludarabin, Busulfan, ATG	cGvHD (507)	563 (56)	Steroid lokal	CMV-Reaktivierung 06/13 (Cymeven) + 08/13+10/13 (Valcyte)
cGvHD 8	AML	Fludarabin, Melphalan, Campath	cGvHD (697)	724 (27)		CMV-Reaktivierung 11/13 + 01/14 + 04/14 + 08/14 (Valcyte) EBV-assoziierte PTLD 9/15
cGvHD 9	AML	TBI, Cyclophosphamid	cGvHD MSH, o. GI-Trakt, Leber, Augen II° Lerner (108)	645 (537)	Steroid lokal	keine
Rezidiv 1	ALL	Fludarabin, Busulfan, ATG	Rezidiv (362)	523 (161)	Blinatumumab	CMV-Reaktivierung 10/15 (Valcyte), 12/15 (Cymeven)
Rezidiv 2	AML	Fludarabin, Busulfan, ATG	Rezidiv /Persistenz (55)	79 (24)	Vidaza	keine
Rezidiv 3	AML	Busulfan, Cyclophosphamid	Rezidiv (995)	1011 (16)	Reinduktion mit HAM und 2. HSZT	Keine Virusreaktivierung
Rezidiv 4	MDS	Melphalan, Fludarabin, Campath	Rezidiv (135)	149 (14)	Vidaza + DLI	keine
Rezidiv 5	AML	Fludarabin, Melphalan, Campath	Rezidiv (1087)	1152 (65)	Vidaza/ATRA/Pioglitazon	CMV-Reaktivierung (Cymeven und Foscavir) 09 + 12/11+01/12 EBV 02/11, 01/12
Rezidiv 6	DLBCL	Fludarabin, Melphalan, Campath	Rezidiv (97)	137 (40)	Rituximab, Dexamethason	CMV-Reaktivierung 04/14 (Valcyte)
Rezidiv 7	ALL	Fludarabin, Busulfan, ATG	Rezidiv (80)	126 (46)	DLI	keine
Rezidiv 8	AML	TBI, Fludarabin, Cyclophosphamid	Rezidiv (195)	364 (169)	Vidaza	keine

Tabelle 12: Buffycoats

<b>Buffycoats</b>
BC1700384
BC1509509
BC1509516
BC1117335

### 3.2.4.2. Patienten der prospektiven Studie

Tabelle 13: Patientenkollektiv prospektive Studie

Patient	Erkrankung	Konditionierung	Komplikation (Tage nach Tx)	Therapie	Virusreaktivierung
aGvHD p1	AML	Mel-Flud/ATG/TBI	aGvHD d98) cGvHD (d116)	Steroid lokal	CMV (d29)
aGvHD p2	MDS (RAEB1)	Mel-Flud/ATG/TBI	aGvHD (d67)	Steroid lokal	keine
aGvHD p3	AML	Mel-Flud/ATG/TBI	aGvHD (d42) cGvHD (d91)	Steroid lokal	EBV (d48)
aGvHD p4	AML	Mel-Flud/Treo/ATG	aGvHD nach DLI (d139)	Steroid und Prograf systemisch	EBV (d44) CMV (d30) CMV -Retinitis, - Ventrikulitis, -Neuritis cranialis
aGvHD p5	AML	Mel-Flud/ATG/TBI	aGvHD während Tx cGvHD (d171)	Steroidstoß	EBV (d54)
aGvHD p6	AML	Mel-Flud/ATG/TBI	aGvHD overall III (d19)	Steroid lokal	Keine
aGvHD p7	AML	Mel-Flud/Treo/ATG	aGvHD (d111)	Steroid lokal	EBV (d36)
aGvHD p8	AML	Mel-Flud/Treo/ATG	aGvHD (d110) cGvHD (d157)	Steroid lokal	CMV (d20) EBV (d20)
aGvHD p9	AML	Mel-Flud/ATG/TBI	aGvHD (d137)	Steroid lokal	EBV (d53)
cGvHD p1	AML	Mel-Flud/ATG/TBI	cGvHD →overlap severe (d23)	Steroidstoß MMF CSA	EBV (d65) CMV-Kolitis (d34)
cGvHD p2	AML	Mel-Flu/ATG/TBI	cGvHD (d123) Rezidiv nach d365 (d514)	Steroid MSL	EBV (d45)
cGvHD p3	AML	Mel-Flud/ATG/TBI	cGvHD (d115) Rezidiv nach d365 (d467)	MSL steroid	keine
cGvHD p4	AML	Mel-Flud/ATG/TBI	cGvHD (d202) Rezidiv nach d365 (d437)	Steroid lokal	CMV (d27)
Rezidiv p1	AML	Mel-Flud/ATG/TBI	Rezidiv (d248)	Vidaza, DLI	CMV-Erkrankung Magen (d125) EBV-PTLD (d45)
Rezidiv p2	AML	Mel-Flud/ATG/TBI	Rezidiv (d250)	Sorafenib	EBV (d73)
keine Komplikation p1	AML	Flamsa-Bus/Cy/ATG	cGvHD nach d365 (445)		EBV-PTLD (d35) CMV (d62)
keine Komplikation p2	AML	Mel-Flud/ATG/TBI	cGvHD nach d365 (d615)		CMV (d39) EBV (d45)
keine Komplikation p3	AML	Mel-Flud/ATG/TBI	keine		EBV (d49)



### **3.2.5. Dichtegradientenzentrifugation zur Gewinnung von PBMCs**

PBMCs (engl. peripheral blood mononuclear cells) sind einkernige Zellen des peripheren Blutes mit runden Zellkernen. Dies sind in erster Linie Lymphozyten und Monozyten.

Mit Hilfe eines Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymers (Ficoll Medium) lassen sich diese Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation von den anderen Blutzellen trennen.

Hierfür wurde das Blut aus beiden 20ml Spritzen in einem 50ml Zellkulturröhrchen zusammengeführt und mit PBS + EDTA auf 50ml aufgefüllt. In zwei weitere 50ml Zellkulturröhrchen wurden jeweils 15ml Ficoll-Medium gefüllt. Anschließend wurde das Ficoll-Medium in beiden Röhrchen mit jeweils 25ml des Blutgemisches langsam überschichtet, um Aufwirbelungen zu vermeiden.

Dann wurden die beiden Röhrchen 20min bei 2300 Umdrehungen pro Minute (rpm) ohne Bremse zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde die PBMC-Bande oberhalb des Ficolls-Mediums beider Röhrchen mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt und in einem neuen 50ml Zellkulturröhrchen zusammengeführt. Das Röhrchen wurde auf 50ml mit PBS + EDTA aufgefüllt und für 8min bei 1800 rpm zentrifugiert.

Im Anschluss wurde das Zellpellet zweimal in 50ml PBS + EDTA gelöst und 5min bei 1500 rpm zentrifugiert. Zwischen diesen beiden Zentrifugationen wurden die Zellen in einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer gezählt.

### **3.2.6. Färben und Zählen von Zellen**

Für die Zählung der Zellen unter dem Lichtmikroskop mussten die Zellen erst angefärbt werden. Hierfür wurde das Zellpellet zuerst in 10ml PBS + EDTA suspendiert.

In das erste Well einer 96-Well-Zellkulturplatte wurden 100 $\mu$ l der Zellsuspension pipettiert. Im nächsten Well wurden 30 $\mu$ l dieser Suspension mit 30 $\mu$ l Trypanblau Gebrauchslösung gemischt. Von der entstandenen Suspension wurden 10 $\mu$ l im nächsten Well mit 60 $\mu$ l Trypanblau Gebrauchslösung und 30 $\mu$ l Essigsäure gemischt. Hiervon wurden nun 30 $\mu$ l auf eine Fuchs-Rosenthal Zählkammer aufgetragen. Es wurden vier große Quadrate gezählt und deren Mittelwert errechnet.

Der errechnete Mittelwert ergab so die Gesamtzahl der Zellen in der 10ml Suspension in Millionen.

### **3.2.7. Einfrieren von Zellen**

Nach Isolation der PBMCs wurde die absolute Zellzahl bestimmt und die Zellen anschließend in der Zentrifuge für 5min bei 1500min pelletiert und das überschüssige PBS + EDTA dekantiert. Das Pellet wurde dann mit einer Konzentration von maximal 50 000 Zellen/ml in Einfriermedium + 10% DMSO suspendiert. Direkt im Anschluss wurden Nuncs mit 1ml der Lösung befüllt und in Isopropyl-Becher („Frosties“) überführt. Diese sorgen dafür, dass die Temperatur konstant um 1°C pro Minute sinkt und minimieren so die Kristallbildung.

Im Isopropyl-Becher wurden die Zellen zunächst im Gefrierschrank bei -80°C eingefroren und dann in den Stickstofftank eingelagert.

### **3.2.8. Auftauen von Zellen**

Ein Nunc mit den zu untersuchenden Zellen eines Patienten wurde dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37°C leicht angetaut. Nun wurden die Zellen in 10ml PBS + EDTA gelöst und anschließend direkt zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das entstandene Pellet wiederum in 10ml PBS + EDTA suspendiert und die Zellzahl bestimmt. Nach einer weiteren Zentrifugation konnte das Pellet in der benötigten Menge des geeigneten Mediums suspendiert und weiterverarbeitet werden.

### **3.2.9. Durchflusszytometrische Messungen**

Im Durchflusszytometer wird eine Zellsuspension durch hydrodynamischen Druck und mit Hilfe von Mantelflüssigkeit durch einen Messzylinder gepresst. Dieser Messzylinder enthält Laser unterschiedlicher Wellenlängen deren Licht beim Passieren der Zellen gestreut und dann von Detektoren gemessen wird.

Dabei ist die Vorwärtsstreuung (forward scatter, FSC) ein Anhalt für die Größe und die Seitwärtsstreuung (sideward scatter, SSC) für die Granularität der Zellen. Mit Hilfe von mehreren unterschiedlichen antikörpergekoppelten Fluorochromen (FITC, PE, APC, APC-H7, PE-Cy7, V450) lassen sich zusätzlich spezifische Antigene auf der Zelloberfläche oder nach entsprechender Vorbereitung der Zellen intrazellulär nachweisen.

Für diese Arbeit wurden alle Messungen an einem BD FACS Canto II durchgeführt. Die verwendete Software hierbei war BD FACS Diva. Gewonnene Daten wurden anschließend mit FlowJo Version 10.4 analysiert.

### 3.2.10. FACS-Färbung

Nach dem Auftauen der Zellen wurden diese zu einer Konzentration von 1 Million/ml in FACS-Puffer gelöst und dann jeweils 200 000 Zellen auf die Tubes 1-6 und 1 Millionen Zellen auf die Tubes 7-12 verteilt. Auf jedes Tube wurde 1ml FACS-Puffer gegeben und die Zellen im Anschluss 5 min bei 1500rpm zentrifugiert.

Überschüssiger FACS-Puffer wurde dekantiert und ausgeklopft.

Nun wurden die FACS-Antikörper entsprechend dem Panel (s. Tabelle 14) in die einzelnen Tubes pipettiert und dann bei 4°C in Dunkelheit für 15 Minuten inkubiert.

Nicht gebundene Antikörper wurden im Anschluss ausgewaschen indem jeweils 1ml FACS-Puffer pro Tube pipettiert und anschließend 5min bei 1500rpm zentrifugiert wurde. Der überschüssige FACS-Puffer wurde wiederum dekantiert und ausgeklopft und das entstandene Zellpellet mit FACS-Fix zu einer Konzentration von 200 000 Zellen/500µl und 1 Millionen Zellen/750µl gelöst. Die Zellen wurden in der Regel noch am selben Tag durchflusszytometrisch analysiert. Sie konnten so aber auch bis zu eine Woche bei 4°C und Dunkelheit zur endgültigen Messung aufbewahrt werden.

Tabelle 14: FACS-Färbung Phänotypisierung

	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>APC</b>	<b>APC-H7</b>	<b>PE-Cy7</b>	<b>V450</b>
<b>1</b>	IgG <sup>(2,5)</sup>		IgG <sup>(2,5)</sup>	IgG <sup>(1)</sup>	IgG <sup>(2,5)</sup>	IgG <sup>(1)</sup>
<b>2</b>	CD3 <sup>(2,5)</sup>	-	-	-	-	-
<b>3</b>	-	CD3 <sup>(2,5)</sup>	-	-	-	-
<b>4</b>	-	-	CD3 <sup>(2,5)</sup>	-	-	-
<b>5</b>	-	-	-	CD3 <sup>(1)</sup>	-	-
<b>6</b>	-	-	-	-	CD3 <sup>(2,5)</sup>	-
<b>7</b>	CD 52 <sup>(2)</sup>	NKp44 <sup>(1,67)</sup>	-	CD3 <sup>(1)</sup>	CD16 <sup>(0,3)</sup>	CD56 <sup>(5)</sup>
<b>8</b>	CD 52 <sup>(2)</sup>	NKp46 <sup>(2)</sup>	NKG2C <sup>(5)</sup>	CD3 <sup>(1)</sup>	CD16 <sup>(0,3)</sup>	CD56 <sup>(5)</sup>
<b>9</b>	CD 52 <sup>(2)</sup>	NKG2A <sup>(2)</sup>	NKG2D <sup>(1,67)</sup>	CD3 <sup>(1)</sup>	CD16 <sup>(0,3)</sup>	CD56 <sup>(5)</sup>
<b>10</b>	CD 52 <sup>(2)</sup>	CD69 <sup>(2)</sup>	CD62L <sup>(0,5)</sup>	CD 3 <sup>(2)</sup>	CD16 <sup>(0,3)</sup>	CD56 <sup>(5)</sup>
<b>11</b>	CD 52 <sup>(2)</sup>	Tigit <sup>(1)</sup>	NKp 30 <sup>(5)</sup>	CD 3 <sup>(2)</sup>	CD16 <sup>(0,3)</sup>	CD56 <sup>(5)</sup>
<b>12</b>	CD127 <sup>(5)</sup>	CD 52 <sup>(2)</sup>	CD 8 <sup>(2,5)</sup>	CD 4 <sup>(2)</sup>	CD 3 <sup>(2)</sup>	CD 25 <sup>(2)</sup>

### **3.2.11. Funktionelle Tests**

#### **3.2.11.1. Wirkung von Immunsuppressiva auf Markerepression**

Der Calcineurininhibitor Tacrolimus und das Glukokortikoid Prednisolon sind zwei Immunsuppressiva, welche in der Prophylaxe beziehungsweise Therapie der GvHD breite Anwendung finden.

Wir inkubierten PBMCs mit diesen Medikamenten, um anschließend zu untersuchen, ob dies zu Veränderungen der Markerepression auf NK-Zellen führt.

Hierfür wurden frisch isolierte PBMCs eines Buffycoats verwendet. Es wurden sechs Ansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen der Medikamente untersucht: Prednisolon 0,5µg/ml (LD50) und 0,05µg/ml, Tacrolimus 2ng/ml und 0,2ng/ml, Kortison 0,5µg/ml + Tacrolimus 2ng/ml und Kortison 0,05µg/ml + Tacrolimus 0,2ng/ml.

Die separierten PBMCs wurden mit einer Konzentration von 12 Millionen pro Milliliter in T-Zell-Medium suspendiert. Jeweils ein Milliliter hiervon wurde auf die ersten 6 Wells einer 24-Well-Zellkulturplatte gegeben.

Prednisolon wurde mit T-Zellmedium zu einer Konzentration 1µg/µl und Tacrolimus zu 50ng/ml verdünnt. Für die beiden Ansätze mit einer Konzentration von 0,05µg/ml Kortison musste Kortison ein weiteres Mal um den Faktor zehn in T-Zell-Medium verdünnt werden.

Nun wurden die Medikamente den Wells mit den PBMCs zugesetzt um oben genannte Dosierungen zu erreichen. Die Zellen wurden nun für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde jeder Ansatz einzeln mit der FACS-Färbung zur Phänotypisierung (Tabelle 14) gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

### **3.2.11.2. K562 Kultur**

K562 sind myelische Leukämiezellen mit einem bcr:abl Fusionsgen, welche keine MHC-Moleküle exprimieren. Durch das Fehlen von MHC-Molekülen bleibt eine Inhibition der NK-Zellen über KIRs aus. Somit sind diese Zellen besonders geeignet, um die Funktionalität von NK-Zellen unter Ausschluss eines Einflusses durch KIRs zu untersuchen.

Die verwendeten K562 sind uns vor längerer Zeit von einer anderen Arbeitsgruppe aus unserem Zentrum zur Verfügung gestellt worden und stets nach dem im Folgenden beschriebenen Verfahren kultiviert worden. Nach Beendigung der Arbeit mit den K562 sind einige Aliquots wieder kryokonserviert worden, um Ausgangsmaterial für zukünftige Kulturen zur Verfügung zu haben.

K562 wurden nach dem Auftauen mit einer Konzentration von 5 Millionen auf 12ml K562 Medium in einer Zellkulturflasche mit Filter gelöst. Anschließend wurden sie im Brutschrank inkubiert. Vor einer Verwendung in den funktionellen Tests wurden sie für mindestens zwei Wochen zur Proliferation gelassen.

Während dieser zwei Wochen und auch danach wurde zweimal wöchentlich ein Mediumwechsel durchgeführt, indem 10ml der Lösung mit einer Pipette abgezogen und durch frisches K562 Medium ersetzt wurden. In regelmäßigen Abständen und stets vor Gebrauch in den funktionellen Tests erfolgte ein lichtmikroskopischer Ausschluss eines Befalls durch Pilze oder Bakterien.

### **3.2.11.3. Isolation von NK-Zellen mittels MACS**

Wie bei der Durchflusszytometrie erfolgt bei der magnetischen Zellseparation eine spezifische Markierung von Zellen mit Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenantigene. Anschließend findet eine Kopplung magnetischer Nanopartikel an diese Antikörper statt. Die Zellsuspension wird anschließend durch Säulen mit einem Filter geführt, welche sich in einem starken magnetischen Feld befinden. Dabei bleiben Zellen, welche Antikörper und in der Folge auch magnetische Nanopartikel gebunden haben, im Filter hängen. So können alle Zellen, welche das entsprechende Antigen exprimieren, aus der Suspension herausgefiltert werden.

Wir verwendeten das NK-Cell Isolation Kit human von Miltenyi zur Negativselektion. Dieses enthält Antikörper, welche gegen Rezeptoren gerichtet sind, die nicht auf NK-Zellen aber auf den übrigen PBMCs exprimiert werden. So konnte die in der Dichtegradientenzentrifugation gewonnene PBMC-Suspension von den übrigen

PBMCs (z.B. B- und T-Lymphozyten, Monozyten) befreit werden, sodass man ein NK-Zell-Isolat erhalten hat.

Die Isolation wurde gemäß der beiliegenden Gebrauchsanweisung durchgeführt, welche im Folgenden kurz zusammengefasst ist (Data sheet NK cell isolation kit human, Miltenyi Biotec).

Nach dem Auftauen der Zellen wurde das Zellpellet in 40µl MACS-Puffer pro 10 Millionen Zellen gelöst und mit 10µl Antibody Biotin Cocktail pro 10 Millionen Zellen versetzt. Die Zellen wurden nun für 5 Minuten bei 4°C und Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden jeweils 30µl MACS-Puffer und 20µl Microbeads pro 10 Millionen Zellen hinzugefügt und die Zellen für 10 min bei 4°C und Dunkelheit inkubiert.

Nun waren die Zellen magnetisch markiert und konnten mittels MACS herausgefiltert werden.

Für jede 10 Millionen Zellen musste eine einzelne LS-Säule verwendet werden, welche in ein starkes magnetisches Feld eingebracht wurde. Auf die Säulen wurden Cellstrainer (Filter mit 70µm<sup>2</sup> Lochgröße) gesetzt um etwaige Verklumpungen herauszufiltern.

Filter und Säulen wurden vor Verwendung im Gefrierfach gekühlt und nach Einbringen in das magnetische Feld mit 500µl MACS-Puffer gespült. Die Zellsuspension wurde ebenfalls mit weiteren 500µl MACS-Puffer versetzt und dann auf die Filter gegeben. Die Falcons mit der Zellsuspension wurden zwei weitere Male mit 500µl MACS-Puffer ausgewaschen und die Suspension dann ebenfalls durch die Filter gegeben.

Das entstandene Isolat wurde in 50ml Falcons aufgefangen, die Zellzahl bestimmt und 5min bei 1500rpm zentrifugiert.

#### **3.2.11.4. Inkubation der NK-Zellen über Nacht**

Die isolierten NK-Zellen wurden über Nacht in einer Konzentration von 2 Millionen Zellen/ml NK-Zell Medium in einer 24-Well Zellkulturplatte mit maximal 2ml/Well bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.2.11.5. Zytokin- und Degranulationsassay

Wir führten funktionelle Tests durch, um die Fähigkeit zur Zytokinfreisetzung und Degranulation der NK-Zellen zu evaluieren. Die Kapazität zur Zytokinfreisetzung wurde durch eine intrazelluläre FACS-Färbung auf  $\text{Ifn-}\gamma$  gemessen. Die Degranulationsfähigkeit wurde durch Bestimmung der Expression von CD107-a mithilfe einer FACS-Oberflächenfärbung gemessen. CD107-a befindet sich in der Membran von zytotoxischen Granula und wird durch deren Verschmelzung mit der Zellmembran während der Degranulation an die Zelloberfläche getragen. Da 107-a nach transienter Expression auf der Zelloberfläche wieder rasch internalisiert wird, muss die FACS-Färbung für CD107-a während der Inkubation erfolgen.

Jeder Test bestand auf 6 Ansätzen wobei Ansatz 1+4 nur NK-Zellen ohne Stimulus enthielten (Negativkontrolle), Ansatz 2+5 zusätzlich K562 als Zielzellen enthielten und in Ansatz 3+6 eine unspezifische Stimulation mit Ionomycin und Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) als Positivkontrolle erfolgte (Tabelle 12). Ionomycin bewirkt eine Aktivierung von NK-Zellen durch Erhöhung der intrazellulären Calcium-konzentration und PMA verursacht eine direkte Aktivierung der Proteinkinase C.

Die isolierten NK-Zellen wurden aus der 24-Well Platte pipettiert, die einzelnen Wells ein weiteres Mal mit 1ml PBS+EDTA ausgewaschen und für den einzelnen Patienten in einem Falcon gesammelt und dann auf 10ml mit PBS+EDTA aufgestockt. Die Zellzahl wurde bestimmt, die Zellen zentrifugiert und im Anschluss auf eine Konzentration von 20 000 Zellen/100 $\mu$ l NK-Zell Medium eingestellt. Genauso wurde mit den K562 verfahren, von welchen je nach benötigter Menge zwischen 2-10ml aus der Zellkulturflasche entnommen wurden und anschließend nach demselben Prinzip die Konzentration auf 20 000/100 $\mu$ l NK-Zell Medium gesetzt wurde.

Die Stimulation erfolgte in einer 96-Well Kulturplatte mit je 6 Ansätzen pro Patient.

Die ersten drei waren für eine Färbung auf  $\text{Ifn-}\gamma$  vorgesehen, während bei den Ansätzen 4-6 kein Antikörper für  $\text{Ifn-}\gamma$  hinzugegeben wurde, um so den Grenzwert für  $\text{Ifn-}\gamma$  negative Zellen im FACS ermitteln zu können.

In jedes der 6 vorgesehen Wells wurden 100 $\mu$ l der NK-Zell-Lösung des entsprechenden Patienten und 2  $\mu$ l CD107-a Antikörper (APC) pipettiert. Well 1 und 4 fungierten als Negativkontrolle und wurden daher mit 100 $\mu$ l reinem NK-Zell Medium verdünnt. Zu Well 2 und 5 wurden 100 $\mu$ l der K562 Suspension hinzugefügt, während Well 3 und 6 als Positivkontrolle mit 100 $\mu$ l NK-Zell Medium und je 0,5 $\mu$ l Ionomycin und PMA (finale Konzentration 1 $\mu$ M und 50nM) versetzt wurden.

Anschließend wurden die Ansätze für 3 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und nach einer Stunde 0,2µl GolgiStop hinzugefügt. GolgiStop enthält Monensin, welches den Abbau von CD107-a-Antikörper-Konjugaten verhindert, indem es die Ansäuerung von Endosomen inhibiert.

Übersicht der Ansätze siehe: (Tabelle 15)

Tabelle 15: Ansätze funktionelle Tests

	Negativ Kontrolle	K562	Positiv Kontrolle
Färbung mit Ifn-g	20 000 NK-Zellen in 200µl Medium	20 000 NK-Zellen in 200µl Medium + 20 000 K562	20 000 NK-Zellen in 200µl Medium + 0,5µl PMA + 0,5µl Ionomycin
Färbung ohne Ifn-g	20 000 NK-Zellen in 200µl Medium	20 000 NK-Zellen in 200µl Medium + 20 000 K562	20 000 NK-Zellen in 200µl Medium + 0,5µl PMA + 0,5µl Ionomycin



### 3.2.11.6. Auswertung der Stimulationsversuche mittels FACS

Nach der dreistündigen Inkubation wurden die Ansätze nach fünfmaligem auf und ab Pipettieren aus der 96-Well Kulturplatte in FACS-Tubes überführt. Jedes einzelne Well wurde zusätzlich einmal mit FACS-Puffer ausgewaschen und dem entsprechenden Tube hinzugefügt, welches dann mit 1ml FACS-Puffer aufgefüllt wurde. Die Zellen wurden 5 min bei 1500rpm zentrifugiert, das Tube dekantiert und ausgeklopft und dann nach dem Panel (s. Tabelle 16) mit Antikörpern versehen.

Im Anschluss wurden die Tubes für 15 Minuten bei 4°C und Dunkelheit inkubiert und danach mit 1ml FACS-Puffer ausgewaschen. Die Ansätze 4-6 jedes einzelnen Patienten wurden im Anschluss in 200µl FACS-Fix fixiert während die Ansätze 1-3 für eine intrazelluläre Färbung auf IFN-g weiterverarbeitet wurden:

Zuerst wurde das Pellet in 250µl Cytofix/Cytoperm suspendiert und für 20 Minuten bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang mit jeweils 1ml Waschpuffer pro Tube, Zentrifugation und Dekantierung. Nun konnte jedem Tube 1µl Ifn- $\gamma$  -Antikörper (PE) hinzugegeben werden und es erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 4°C in Dunkelheit. Im Anschluss erfolgten wiederum zwei Waschvorgänge mit 1ml Waschpuffer und dann eine Fixierung in 200µl FACS-Fix.

Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen erfolgte hier innerhalb von 12 Stunden.

Tabelle 16: Auswertung funktionelle Tests

	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>APC</b>	<b>APC-H7</b>	<b>PE-CY7</b>	<b>V450</b>
<b>+IFN-g</b>	CD45 <sup>(2)</sup>	IFN-g <sup>(1)</sup>	CD107-a <sup>(2)</sup>	CD3 <sup>(1)</sup> ,14 <sup>(5)</sup> ,19 <sup>(5)</sup>	CD16 <sup>(0,3)</sup>	CD56 <sup>(5)</sup>
<b>-IFN-g</b>	CD45 <sup>(2)</sup>	-	CD107-a <sup>(2)</sup>	CD3 <sup>(1)</sup> ,14 <sup>(5)</sup> ,19 <sup>(5)</sup>	CD16 <sup>(0,3)</sup>	CD56 <sup>(5)</sup>

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Retrospektive Analyse

#### 4.1.1. Einleitung

Die retrospektive Analyse sollte der Bestätigung der Hypothese dienen, dass es bei Patienten mit Komplikation nach Stammzelltransplantation zu Veränderungen in der Markerexpression auf NK-Zellen gegenüber gesunden Kontrollen kommt.

Hierfür wurden 10 Patienten mit aGvHD, 9 mit cGvHD und 8 mit Rezidiv untersucht und deren Markerexpression mit der von 4 gesunden Spendern verglichen.

Die Diagnose einer GvHD wurde anhand der revidierten Glucksberg (akut) beziehungsweise der NIH consensus (chronisch) Kriterien gestellt. Das Rezidiv ist definiert als ein Blastenanstieg auf  $\geq 5\%$  im Knochenmark oder Blut.

Die Charakteristika der Patienten sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Zu beachten ist, dass der Zeitpunkt des Auftretens in den einzelnen Patientengruppen unterschiedlich war: aGvHD 12-161 (MW 69) Tage nach Tx, cGvHD 37-697 (MW 281) Tage nach Tx, Rezidiv 55-1087 (MW 376) Tage nach Tx. Die Probe wurde bei Patienten mit aGvHD im Mittel nach 58 Tagen, bei Patienten mit cGvHD nach 723 Tagen und bei Patienten mit Rezidiv nach 65 Tagen dem ersten Auftreten der Komplikation gewonnen.

Um die Markerexpression auf der Gesamtpopulation der NK-Zellen und im Anschluss auf den einzelnen Subpopulationen zu messen, mussten diese zuerst abgegrenzt werden. Hierfür wurden zuerst die Lymphozyten im forward/sideward-scatter identifiziert. Im nächsten Schritt wurde aus den Lymphozyten ein Gate auf die CD3-Zellen gelegt, um etwaige NK-T-Zellen zu exkludieren. Anschließend konnten die NK-Zellen anhand ihrer Expression von CD56 identifiziert und zusätzlich durch die differentielle Expression von CD16 in die einzelnen Subpopulationen unterteilt werden. Somit ergab die Gesamtheit der CD56+CD3-Lymphozyten die Gesamtpopulation der NK-Zellen. Im Folgenden tragen Grafen, welche die Expression auf der Gesamtpopulation der NK-Zellen zeigen die Überschrift CD56+ bzw. NK-Zellen. Zusätzlich zu den in der Literatur beschriebenen Subpopulationen der CD56brightCD16-, CD56brightCD16+ und CD56dimCD16+ inkludierten wir eine weitere Subpopulation, welche nur wenig CD56 und kein CD16 exprimiert und im Folgenden als R2-Population bezeichnet wird.

Grafen für die einzelnen Subpopulationen geben in der Überschrift stets die genaue Subpopulation an.

Statistisch signifikante Veränderungen werden stets angegeben. Liegt diese Angabe nicht vor, war die Veränderung nicht statistisch signifikant.

Diese Seite zeigt die einzelnen Schritte des Gatings bis zu den Subpopulationen und die Bestimmung der Markerexpression auf diesen am Beispiel von Buffycoat 1117335.

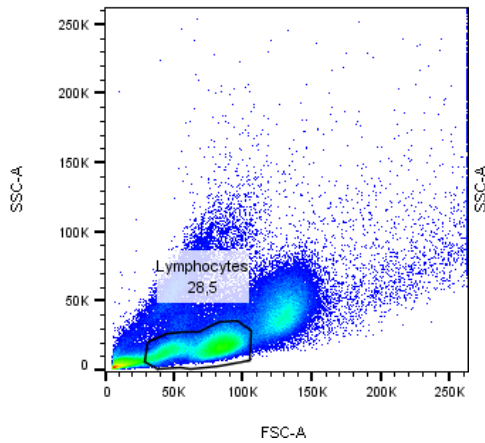


Abb. 3 zeigt die Identifikation von Lymphozyten im forward-sideward-scatter

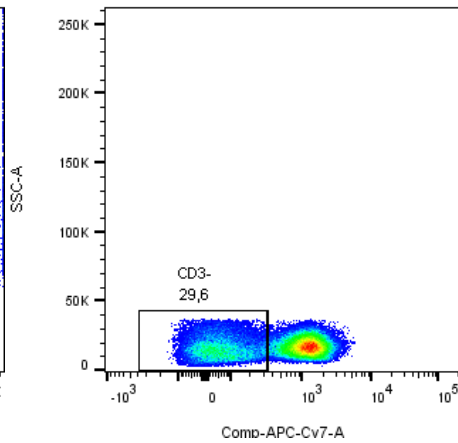


Abb. 4 zeigt die Abgrenzung der CD3-Lymphozyten von der Gesamtheit der Lymphozyten

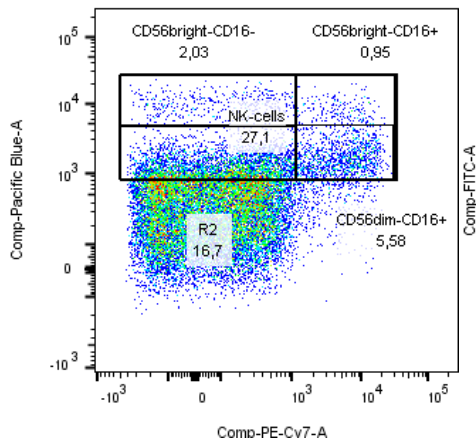


Abb. 5 zeigt die Identifikation der NK-Zellen und deren einzelnen Subpopulationen aus den CD3-Lymphozyten anhand der Expression von CD56 und CD16

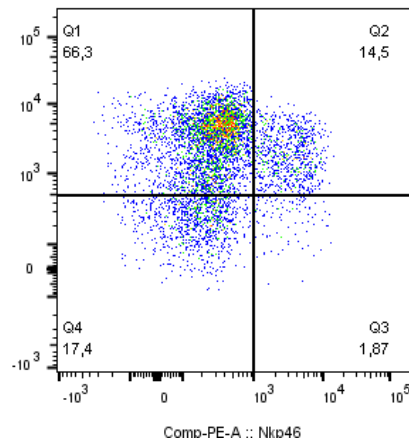


Abb. 6 zeigt beispielhaft die Messung der Expression von Nkp46 auf der Gesamtpopulation der NK-Zellen.

## 4.1.2. Aktivierungsmarker

Bei den Aktivierungsmarkern CD69 und Nkp44 konnten wir für die drei Patientengruppen eine verstärkte Expression nach der Transplantation im Vergleich zu den gesunden Kontrollen beobachten.

Etwa 4% der NK-Zellen von gesunden Spendern exprimierten CD69. In den drei Patientengruppen zeigte sich die Expression mit Werten von im Mittel über 10% mindestens verdoppelt, wobei Patienten mit einer cGvHD den größten Anteil CD69+ NK-Zellen hatten ohne, dass dieser Unterschied statistisch signifikant wäre.

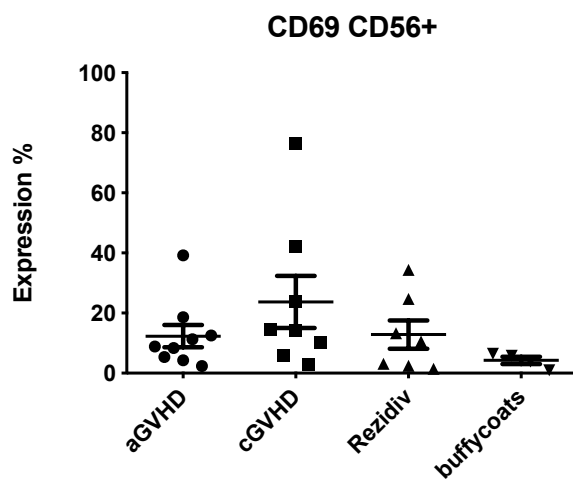


Abb. 7 zeigt den Anteil CD69+ NK-Zellen an der Gesamtpopulation bei Patienten mit aGvHD (MW: 12,3), cGvHD (MW: 23,7) und Rezidiv (MW: 12,84) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (MW: 4,3).

Nkp44+ wurde bei den gesunden Kontrollen auf einem noch geringeren Anteil der NK-Zellen exprimiert als CD69.

Aber auch für Nkp44 war ein Anstieg der Expression in den drei Patientengruppen zu beobachten. Dieser war bei Patienten mit GvHD ausgeprägter als bei Patienten mit Rezidiv, wobei auf der Gesamtpopulation der NK-Zellen für keine der Patientengruppen ein statistisch signifikanter Unterschied beobachtet werden konnte.

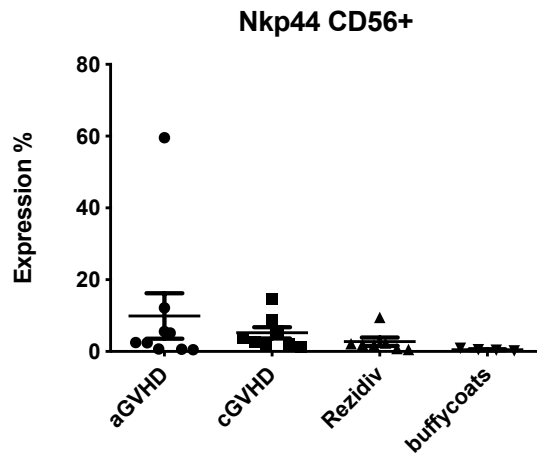


Abb. 8 zeigt den Anteil Nkp44+ NK-Zellen an der Gesamtpopulation bei Patienten mit aGVHD (MW: 9,9), cGVHD (MW: 5,2) und Rezidiv (MW: 2,74) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (MW: 0,5).

Bei Patienten, welche eine aGVHD entwickelt hatten, konnte allerdings eine statistisch signifikant erhöhte Expression von Nkp44 in der Subpopulation der unreifen CD56bright/CD16- NK-Zellen beobachtet werden (p: 0,01). Zudem war die Expression von Nkp44 in dieser Subpopulation deutlich höher als dies in Bezug auf die Gesamtpopulation der Fall ist.

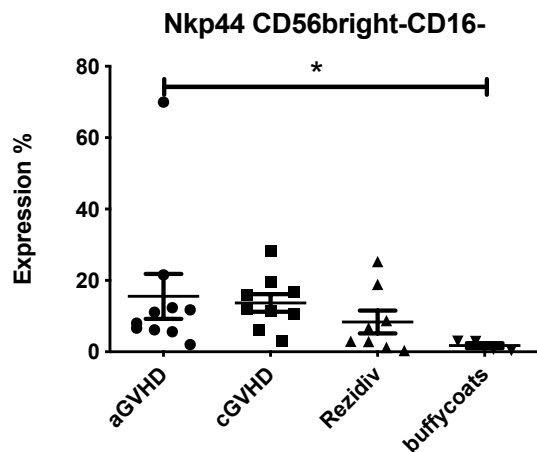


Abb. 9 zeigt den Anteil Nkp44+ Zellen an der CD56brightCD16- Subpopulation bei Patienten mit aGVHD (MW: 15,5), cGVHD (MW: 13,7) und Rezidiv (MW: 8,39) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (MW: 1,75).

### 4.1.3. Aktivierende Rezeptoren

Knapp 70% der NK-Zellen der gesunden Kontrollen exprimierten Nkp30. In jeder der drei Patientengruppen zeigte der überwiegende Teil der Patienten eine um etwa 10% gesteigerte Expression. Allerdings fanden sich auch in jeder Patientengruppe 1-3 Patienten mit einer Expression von unter 40%. In der Gruppe der Patienten mit aGvHD fand sich nur ein derart starker Ausreißer. Hier war die Expression im Mittel leicht erhöht gegenüber den gesunden Kontrollen während sie sich bei Patienten mit cGvHD und Rezidiv leicht verringert zeigte.

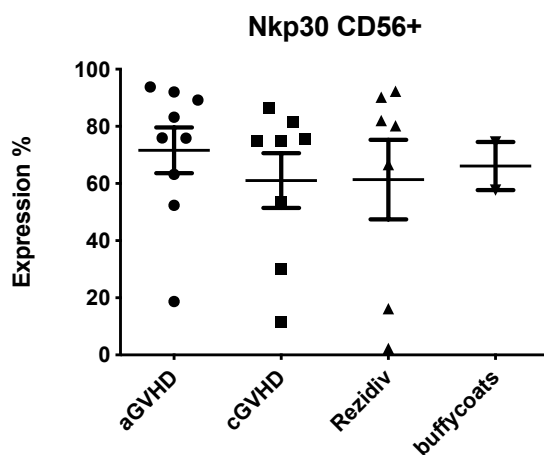


Abb. 10 zeigt den Anteil Nkp30+ NK-Zellen an der Gesamtpopulation bei Patienten mit aGvHD (MW: 71,6), cGvHD (MW: 61,0) und Rezidiv (MW: 61,39) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (MW: 66,1).

Die Expression der Rezeptoren Nkp46 und NKG2D zeigte sich in allen drei Patientengruppen deutlich erhöht. Für Nkp46, welches sich auf etwa 50% der NK-Zellen von gesunden Spendern befindet, ließ sich bei den Patienten eine Expression von im Mittel über 80% nachweisen, wobei diese Veränderung für die beiden Gruppen der GvHD auch statistisch signifikant war (aGvHD p:0,0324, cGvHD p:0,0361).

Für NKG2D zeigte sich in allen drei Gruppen eine statistisch signifikant erhöhte Expression (aGvHD p0,0001, cGvHD p: 0,0036, Rezidiv p: 0,0223).

Während der Anteil NKG2D+ NK-Zellen bei gesunden Spendern im Mittel nur etwa 30% betrug, stieg dieser bei Patienten mit aGvHD mit über 80% und bei Patienten mit cGvHD und Rezidiv mit etwa 70% auf mehr als das Doppelte an.

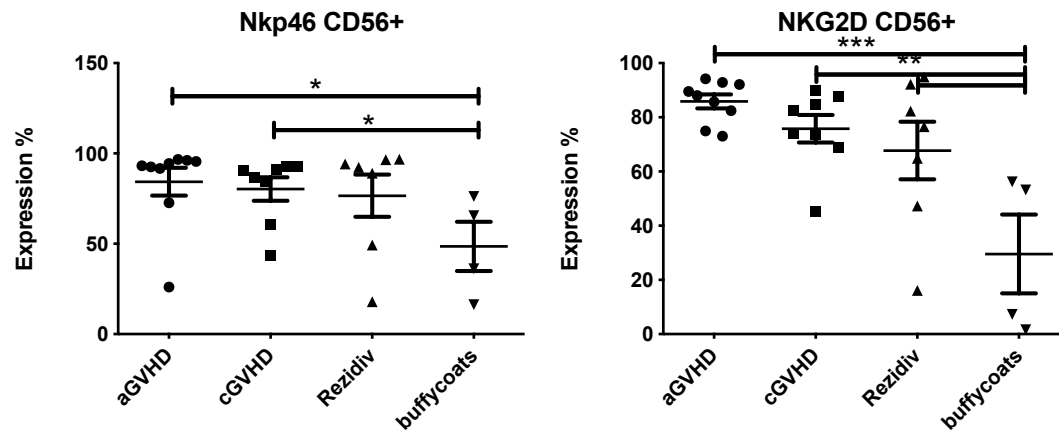


Abb. 11 und 12 zeigen den Anteil Nkp46+ (aGvHD (MW: 84,3), cGvHD (MW: 80,3), Rezidiv (MW: 76,6) gesunde Kontrollen (MW: 48,6)), beziehungsweise NKG2D+ NK-Zellen an der Gesamtpopulation bei Patienten mit aGvHD (MW: 85,9), cGvHD (MW: 75,8) und Rezidiv (MW: 67,75) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (MW: 29,6).

#### 4.1.4. Inhibitorische Rezeptoren

Für NKG2A waren deutliche Unterschiede in der Expression zwischen den einzelnen Gruppen zu beobachten. Durchschnittlich etwa 40% der NK-Zellen von gesunden Spendern exprimierten NKG2A. Bei Patienten mit aGvHD hatte sich dieser Anteil auf im Mittel mit knapp 80% fast verdoppelt ( $p: 0,0131$ ). Bei Patienten mit cGvHD und Rezidiv war der Anteil mit knapp 60% in beiden Gruppen im Mittel zwar ungefähr gleich hoch, allerdings war bei den Patienten mit Rezidiv eine ausgeprägte Varianz zu beobachten (drei Patienten mit einer Expression von ca. 80%, zwei Patienten mit einer Expression von unter 20%).

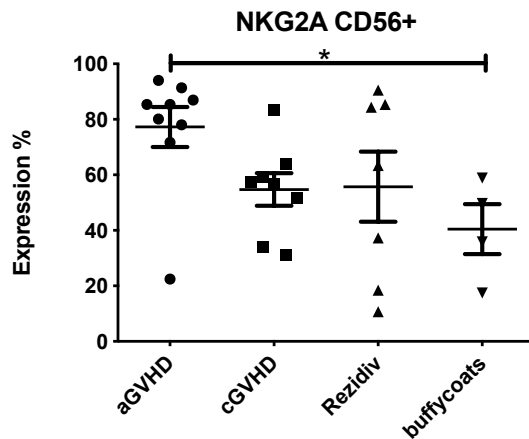


Abb. 13 zeigt den Anteil NKG2A+ NK-Zellen an der Gesamtpopulation bei Patienten mit aGvHD (MW: 77,3), cGvHD (MW: 54,7) und Rezidiv (MW: 55,74) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (MW: 40,5).

Tigit wird bei gesunden Spendern nur von einem minimalen Anteil der NK-Zellen exprimiert (<5%). Bei Patienten nach Stammzelltransplantation ist dieser Anteil deutlich erhöht. Am stärksten ausgeprägt war diese Erhöhung bei Patienten mit cGvHD von denen drei eine gesteigerte Expression auf über 30% der NK-Zellen zeigten.

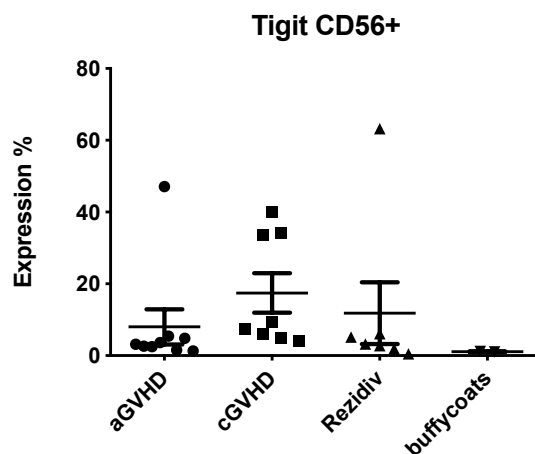


Abb. 14 zeigt den Anteil Tigit+ NK-Zellen an der Gesamtpopulation bei Patienten mit aGvHD (MW: 8,0), cGvHD (MW: 17,4) und Rezidiv (MW: 11,85) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (MW: 1,1).



#### 4.1.5. CD62L

Im Mittel exprimierten 25% der NK-Zellen der gesunden Kontrollen CD62L.

Auch hier war in allen drei Patientengruppen ein Anstieg des Anteils CD62L+ NK-Zellen zu beobachten. Bei Patienten mit cGvHD fiel er jedoch am geringsten aus.

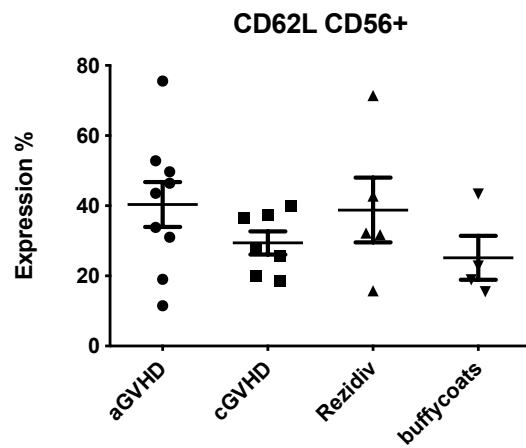


Abb. 15 zeigt den Anteil CD62L+ NK-Zellen an der Gesamtpopulation bei Patienten mit aGvHD (MW: 40,4), cGvHD (MW: 29,4) und Rezidiv (MW: 38,8) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (MW: 25,2).

## 4.2. Einfluss immunsuppressiver Therapie

Um einen möglichen Einfluss der immunsuppressiven Therapie, welche im Rahmen der Transplantation zur Prävention oder Therapie einer GvHD verabreicht wird, auf die Markerexpression zu untersuchen, inkubierten wir NK-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Prednisolon (Kortison) und Tacrolimus. Hierbei wurden für die meisten Marker Schwankungen der Expression von +/-6% gegenüber der Kontrolle beobachtet, welche für diese Rezeptoren jedoch keinen einheitlichen Trend zeigten. Für CD69 konnte allerdings eine Steigerung der Expression, nach Inkubation mit diesen Medikamenten, beobachtet werden. Diese war bei einer Kombination der Medikamente stärker ausgeprägt.

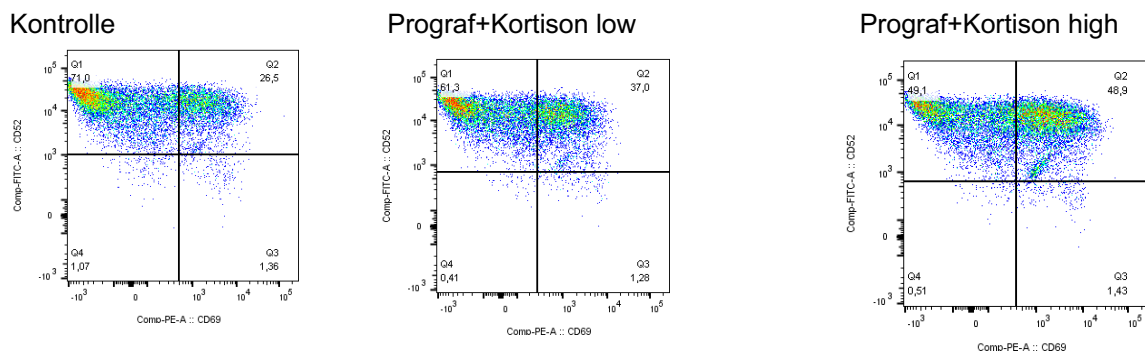


Abb. 16-18 zeigen auf der X-Achse die Expression von CD69 gegen die Expression von CD52 auf der Y-Achse für den Kontroll-Ansatz, den Ansatz mit niedrigdosiertem Prograf+Kortison bzw. hochdosiertem Prograf+Kortison.

Ein entgegengesetzter Effekt ließ sich für Kortison auf die Expression von CD62L beobachten. Hier verringerte eine Inkubation mit Kortison die Expression um mindestens 8%.

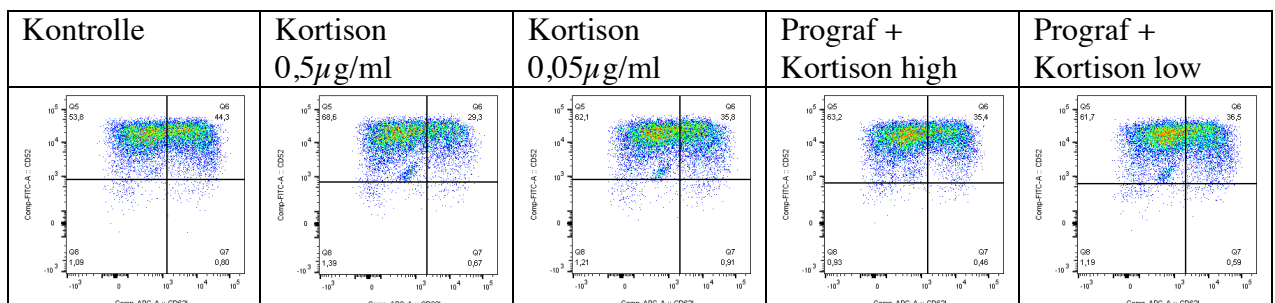


Abb. 19-23 zeigen auf der X-Achse die Expression von CD62L gegen die Expression von CD52 auf der Y-Achse für den Kontroll-Ansatz, die beiden unterschiedlich dosierten Ansätze mit Kortison und die beiden Ansätze mit der Kombination der Immunsuppressiva.

## 4.3. Prospektive Analyse

### 4.3.1. Einleitung

Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse und eine ausreichende Anzahl an Rezidiven in der Kohorte zu haben, wurden hierfür ursprünglich 10 Patienten mit ausschließlich AML eingeschlossen, welche eine Konditionierung nach dem FLAMSA-Protokoll erhielten. Als nach einem halben Jahr noch kein Rezidiv bei diesen Patienten zu beobachten gewesen war, wurden weitere 10 Patienten dieses Konditionierungsregimes und zusätzlich 10 Patienten, welche eine dosisreduzierte Konditionierung (FBM) erhielten, eingeschlossen.

Von den 20 Patienten aus der FLAMSA-Kohorte wurden letztendlich 18, welche mindestens bis d200 pTx überlebt hatten, hinsichtlich der Markerexpression analysiert. Von den Patienten, die eine dosisreduzierte Konditionierung erhalten hatten, überlebten alle bis mindestens d200 und konnten analysiert werden.

In der FLAMSA-Kohorte wurden 9 Fälle einer aGvHD, 4 Fälle einer cGvHD und 2 Rezidive und in der FBM-Kohorte 8 Fälle einer aGvHD und ein Rezidiv beobachtet. In der FLAMSA-Kohorte entwickelten 3 und in der FBM-Kohorte 1 Patient über den Beobachtungszeitraum von 365 Tagen keine der genannten Komplikationen.

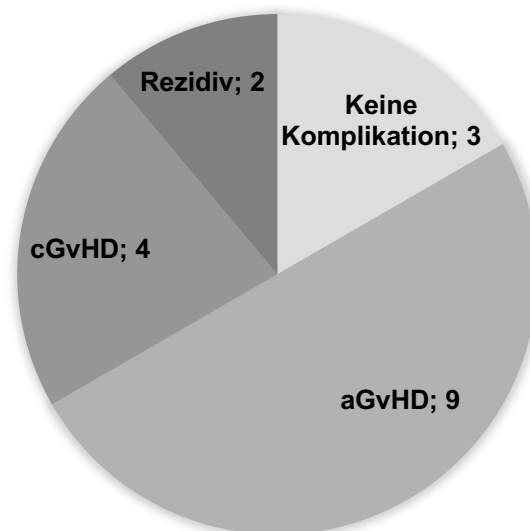


Abb. 24 zeigt den Anteil der einzelnen Komplikationen bzw. Fälle ohne Komplikation im FLAMSA-Kollektiv.

Im Folgenden werden die Ergebnisse für die nach FLAMSA-Protokoll konditionierten Patienten dargestellt, da dieses Kollektiv in Bezug auf die Komplikationen heterogen

genug war, um einen Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen zuzulassen. Bei den FBM-konditionierten Patienten hatten 8/10 Patienten eine aGvHD entwickelt. Die Charakteristika der Patienten sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

### 4.3.2. Rekonstitution der Subpopulationen

Wir konnten beobachten, dass Patienten, welche keine Komplikation entwickelten an d50 zwar absolut die geringste Zahl an NK-Zellen (MW: 34/ $\mu$ l) hatten, aber dann im weiteren Verlauf einen stetigen Anstieg bis d365 (MW: 562/ $\mu$ l) zeigten. Bei Patienten, welche eine GvHD entwickelten, konnten wir diese Zunahme der Zahl von NK-Zellen nicht beobachten.

Hier blieb die Zahl der NK-Zellen über den ganzen Beobachtungszeitraum zwischen min.172/ $\mu$ l (aGvHD d100) und max. 355/ $\mu$ l (cGvHD d200). Ein Vergleich zu unseren Gesunden Kontrollen ist hier leider nicht möglich, da uns für die Buffycoats keine Blutbilder vorlagen. Hier ist also nur ein Vergleich zu den in der Literaturdiskussion erwähnten Referenzwerten von 82-594/ $\mu$ l NK-Zellen möglich. Dieser zeigt, dass lediglich die 34/ $\mu$ l NK-Zellen bei Patienten ohne Komplikation an d50 außerhalb dieses Bereichs liegt.

Bei unseren buffycoats betrug der Anteil der NK-Zellen an den Lymphozyten im Mittel 5%. In allen Patientengruppen war dieser Anteil erhöht, aber zeigte mit der Zeit eine abfallende Tendenz. An d50 fallen besonders die Patienten mit einem späteren Rezidiv durch einen Anteil von lediglich 30% gegenüber den 46% bei Patienten ohne Komplikation auf. Nur in dieser Patientengruppe war ein zwischenzeitlicher Anstieg des Anteils auf 46% an d100 zu beobachten, während der Anteil in den anderen Patientengruppen stetig abnahm und nur bei Patienten ohne Komplikation eine Stabilisation bei ca. 30% ab d150 zeigte. Patienten mit einer cGvHD hatten ab d150 den geringsten Anteil von NK-Zellen.

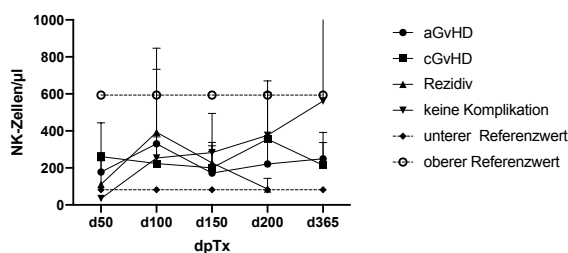


Abb. 25 zeigt die Mittelwerte der absoluten NK-Zell-Zahl für die einzelnen Patientengruppen im Verlauf.

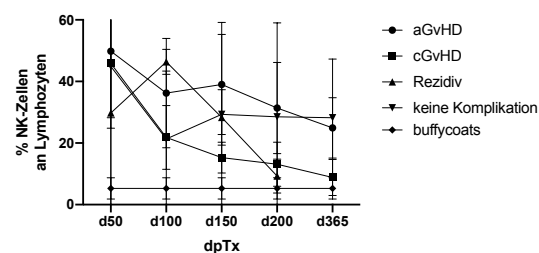


Abb. 26 zeigt die Mittelwerte für den Anteil der NK-Zellen bezogen auf die Lymphozyten für die einzelnen Patientengruppen im Verlauf.

Dieser fallende Anteil an den Lymphozyten spiegelte sich teilweise auch in den Subpopulationen wider. Patienten mit aGvHD hatten den größten Anteil CD56brightCD16- Zellen, welcher von 11% an d50 auf 3% an d365 fiel. Den geringsten

Anteil hatten Patienten mit cGvHD, welcher von 3% an d50 auf 1 % an d365 fiel, was dem Mittelwert bei den buffycoats entspricht.

Patienten mit cGvHD hatten mit 2% an d50 abfallend auf 1% an d365 zudem den geringsten Anteil CD56brightCD16+ NK-Zellen. Den größten Anteil machte die CD56brightCD16+ Subpopulation mit 7% an d50 mit abnehmendem Anteil auf 2% an d365 bei Patienten ohne Komplikation aus. Auffällig war für die beiden unreifen Subpopulationen ein extremer Anstieg des Anteils bei Patienten mit Rezidiv an d100 (CD56brightCD16-:10%, CD56brightCD16+: 11%). Bei den buffycoats machten die CD56brightCD16+ NK-Zellen weniger als 1% der Lymphozyten aus.

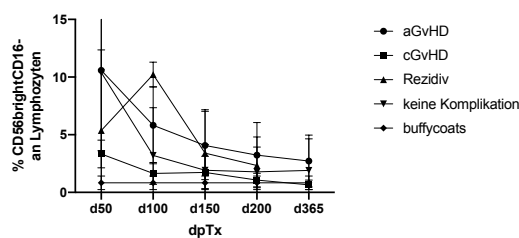


Abb. 27 zeigt die Mittelwerte für den Anteil der Subpopulation der CD56brightCD16- NK-Zellen bezogen auf die Lymphozyten für die einzelnen Patienten-gruppen im Verlauf.

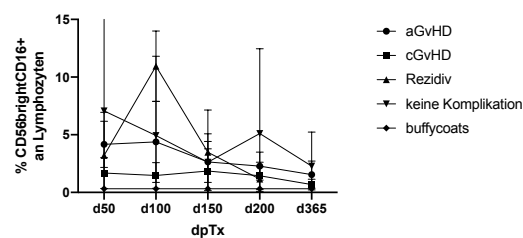


Abb. 28 zeigt die Mittelwerte für den Anteil der Subpopulation der CD56brightCD16+ NK-Zellen bezogen auf die Lymphozyten für die einzelnen Patienten-gruppen im Verlauf.

Der mit der Zeit steigende Anteil der NK-Zellen bei Patienten ohne Komplikation lässt sich hingegen durch eine Zunahme der reifen CD56dimCD16+ NK-Zellen in dieser Gruppe erklären. Der Anteil dieser Subpopulation an den Lymphozyten war im Vergleich zu den buffycoats (Mittelwert: 2%) in allen Patientengruppen erhöht. Die einzige Ausnahme bildeten die Rezidive an d200, wo der Anteil auf knapp unter 2% abfiel.

Der Anteil der R2-Population zeigte eine minimale Abnahme an d365 gegenüber d50 in allen Gruppen. Am auffälligsten war hier ein zwischenzeitlicher Gipfel an d150. Auch hier war der Anteil stets größer als bei den buffycoats (Mittelwert: 2%).

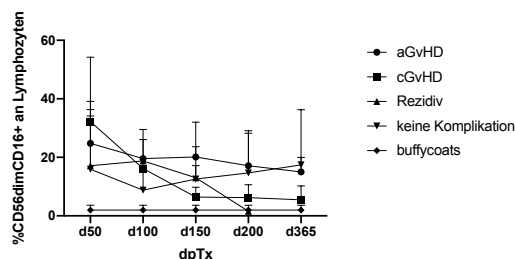


Abb. 29 zeigt die Mittelwerte für den Anteil der Subpopulation der CD56dimCD16+ NK-Zellen bezogen auf die Lymphozyten für die einzelnen Patienten-gruppen im Verlauf.

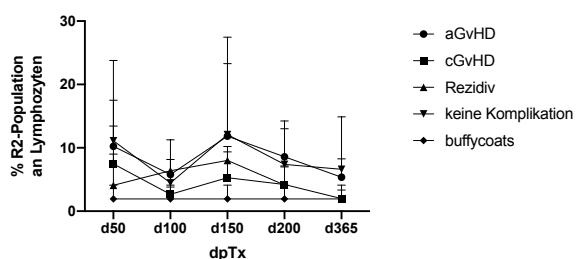


Abb. 30 zeigt die Mittelwerte für den Anteil der R2-Population an den Lymphozyten für die einzelnen Patientengruppen im Verlauf.

Wenn man die absoluten Zahlen der Subpopulationen betrachtet fällt auf, dass Patienten, welche später eine GvHD entwickeln würden, an d50 mindestens doppelt so viele CD56brightCD16- NK-Zellen haben als Patienten, welche keine Komplikation entwickeln (aGvHD: 36/ $\mu$ l, cGvHD: 23/ $\mu$ l, keine Komplikation: 9/ $\mu$ l). Für Patienten ohne Komplikation steigt diese Zahl auf vergleichbare Werte (30/ $\mu$ l) an d100 an und fällt dann ab d150 zusammen mit den Patienten mit einer aGvHD auf die niedrigen Werte von um die 15/ $\mu$ l ab, während die Zahl bei Patienten mit cGvHD bis d200 bei über 25/ $\mu$ l bleibt.

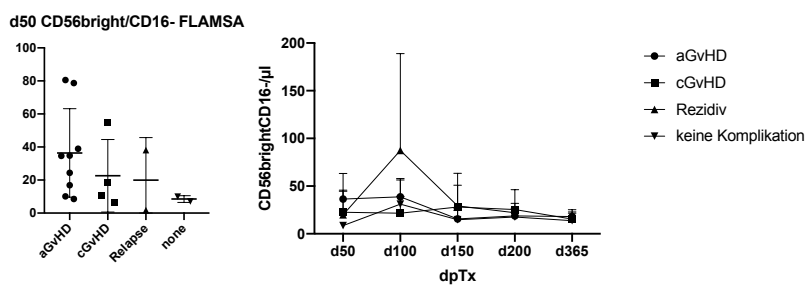


Abb. 31 zeigt die absoluten CD56brightCD16- NK-Zell-Zahlen pro  $\mu$ l an d50 pTx. Abb. 32 zeigt wie sich die Mittelwerte für diese in den einzelnen Gruppen im Verlauf entwickelt haben.

Dem gegenüber verzögert zeigt sich die Zahl der CD56brightCD16+ NK-Zellen mit einheitlich niedrigen Werten von unter 15 Zellen pro  $\mu$ l an d50. An d100 steigt die Zahl in allen Gruppen an - mit einem Maximum von 102/ $\mu$ l bei Patienten mit Rezidiv. Während die Zahl danach in den restlichen Gruppen abnimmt, lässt sich bei Patienten mit cGvHD ein verzögerter Anstieg beobachten, welcher erst an d200 mit 38/ $\mu$ l gipfelt.

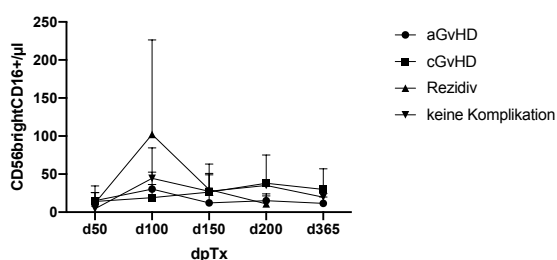


Abb. 33 zeigt die Mittelwerte der absoluten CD56brightCD16+ NK-Zell-Zahlen pro  $\mu$ l im Verlauf.

Der anfangs beschriebene kontinuierliche Anstieg der absoluten NK-Zell-Zahl bei Patienten ohne Komplikation wird, wie schon bei den relativen Werten, durch eine zunehmende Expansion der größten Subpopulation, nämlich den reifen CD56dimCD16+ NK-Zellen, getragen. Demgegenüber fällt die Zahl dieser zytotoxischen NK-Zellen bei Patienten mit einem Rezidiv auf Minimalwerte von 14/ $\mu$ l an d200 ab.

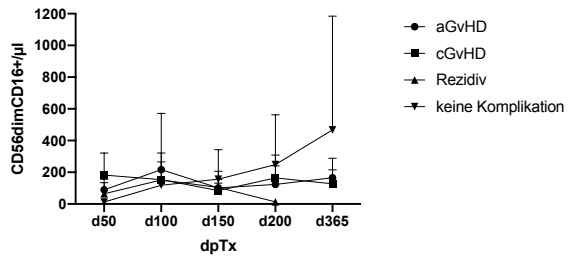


Abb. 34 zeigt die Mittelwerte der absoluten CD56dimCD16+ NK-Zell-Zahlen pro µl im Verlauf.



### 4.3.3. Aktivierungsmarker

In der retrospektiven Analyse beobachteten wir bei den gesunden Kontrollen eine Expression von CD69 auf weniger als 5% der gesamten NK-Zellen, welche sich in den drei Patientenkollektiven auf über 10% verdoppelt zeigte. Prospektiv war zu sehen, dass diese vermehrte Aktivierung von NK-Zellen im Sinne einer starken Expression von CD69 den Komplikationen vorausgeht. Bereits an Tag 50 nach Transplantation betrug der Anteil CD69+ NK-Zellen über alle Gruppen gemittelt über 20% und fiel auch nach einem Jahr nicht unter diesen Wert.

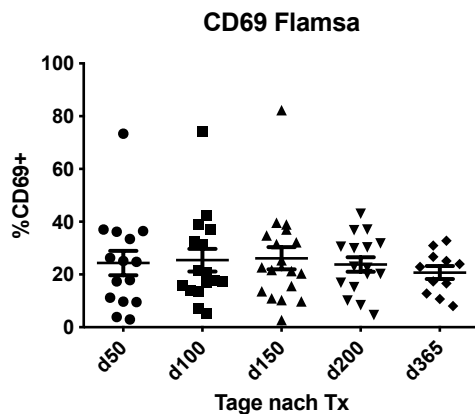


Abb. 35 zeigt den Anteil CD69+ NK-Zellen aller FLAMSA-Patienten im Verlauf

Interessanterweise zeigten Patienten, welche über den Beobachtungszeitraum keine der Komplikationen entwickelten, an d50 mit 26% CD69+ NK-Zellen die für sie höchste Expression, während sie bis d365 auf 17% gefallen war. Entgegengesetzt verhält sich der Trend für Patienten mit einer aGvHD bei welchen der Anteil von 23% an d50 auf ein Maximum von 33% an d150 anstieg und an d365 mit 25% noch immer am höchsten aus den drei Gruppen war. Die besonders starke Expression von CD69 bei Patienten mit cGvHD in der retrospektiven Analyse war in dieser Analyse nur bei einem Patienten an d50 und d100 zu beobachten.

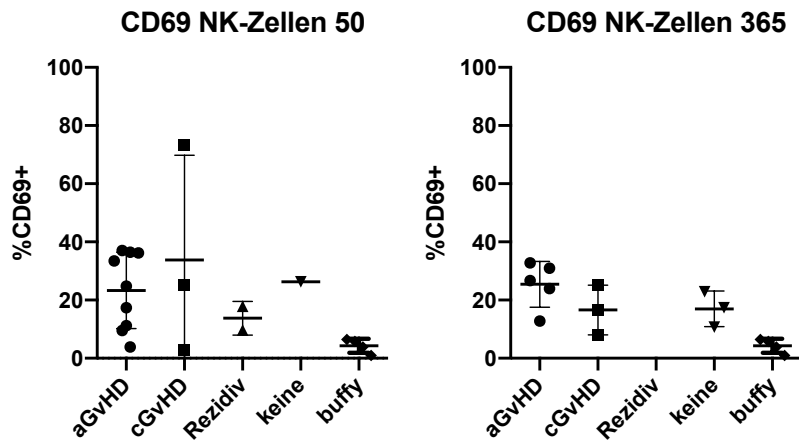


Abb. 36 und 37 zeigen die Expression von CD69 auf der Gesamtpopulation der NK-Zellen an d50 (aGvHD: 23%, cGvHD 34%, Rezidiv: 14% und keine Komplikation: 26%) und d365 (aGvHD: 25%, cGvHD 17% und keine Komplikation: 17%). Vergleich gesunde Kontrollen: 4%.

Dieser gesteigerte Anteil aktivierter NK-Zellen findet sich vornehmlich in der Subpopulation der reifen CD56dim/CD16+ NK-Zellen wo in jeder der Patientengruppen stets ca mindestens 20% der Zellen CD69 exprimierten, während der Anteil dieser bei den CD56bright NK-Zellen zu jeder Zeit unter 20% lag.

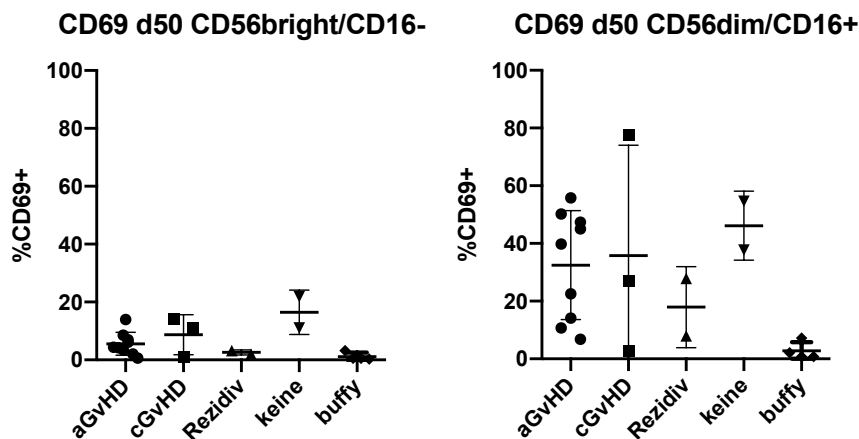


Abb. 38 und 39 zeigen die Expression von CD69 auf der CD56brightCD16- Subpopulation (aGvHD: 6%, cGvHD 9%, Rezidiv: 3% und keine Komplikation: 16%) und der CD56dimCD16+ Subpopulation (aGvHD: 32%, cGvHD 36%, Rezidiv: 18% und keine Komplikation: 46%) an d50. Vergleich gesunde Kontrollen: 1% bzw. 3%.

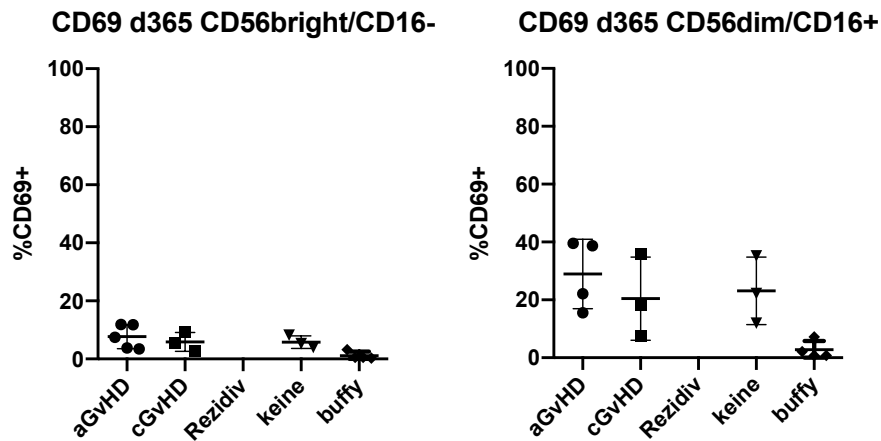


Abb. 40 und 41 zeigen die Expression von CD69 auf der CD56brightCD16- Subpopulation (aGvHD: 8%, cGvHD 6% und keine Komplikation: 6%) und der CD56dimCD16+ Subpopulation (aGvHD: 29%, cGvHD 20%, und keine Komplikation: 23%) an d365. Vergleich gesunde Kontrollen: 1% bzw. 3%.

Auch die Expression von Nkp44 zeigte sich von d50 an erhöht. Sie stieg bis d100 auf ihr Maximum an und fiel danach wieder ab, blieb jedoch weit über dem Maß, welches wir bei den gesunden Kontrollen (1%) beobachtet hatten.

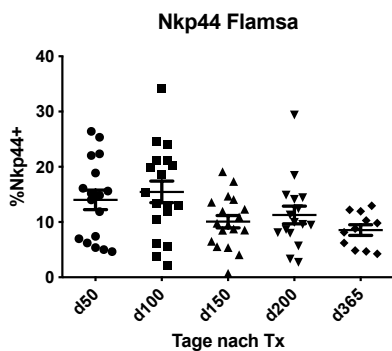


Abb. 42 zeigt den Anteil Nkp44+ NK-Zellen aller FLAMSA-Patienten im Verlauf

Im Gegensatz zu CD69 ist diese gesteigerte Expression aber in erster Linie auf die CD56bright NK-Zellen zurückzuführen. Während an d50 etwa 10% der reifen NK-Zellen Nkp44 exprimierten, fiel dieser Anteil bis d365 fast auf das Level der gesunden Kontrollen. Bei den unreifen NK-Zellen hingegen war der Anteil Nkp44+ NK-Zellen auch an d365 noch größer als 20%.

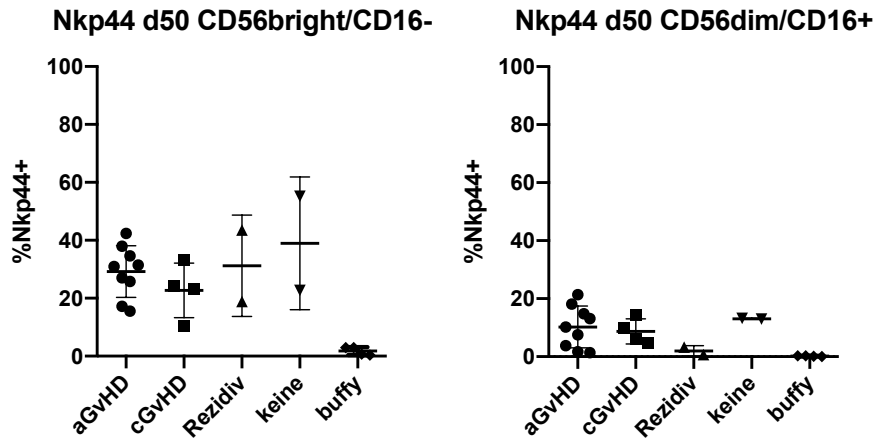


Abb. 43 und 44 zeigen die Expression von Nkp44 auf der CD56brightCD16- Subpopulation (aGvHD: 29%, cGvHD 22%, Rezidiv: 31% und keine Komplikation: 39%) und der CD56dimCD16+ Subpopulation (aGvHD: 10%, cGvHD 9%, Rezidiv: 2% und keine Komplikation: 13%) an d50. Vergleich gesunde Kontrollen: 2% bzw. 0%.

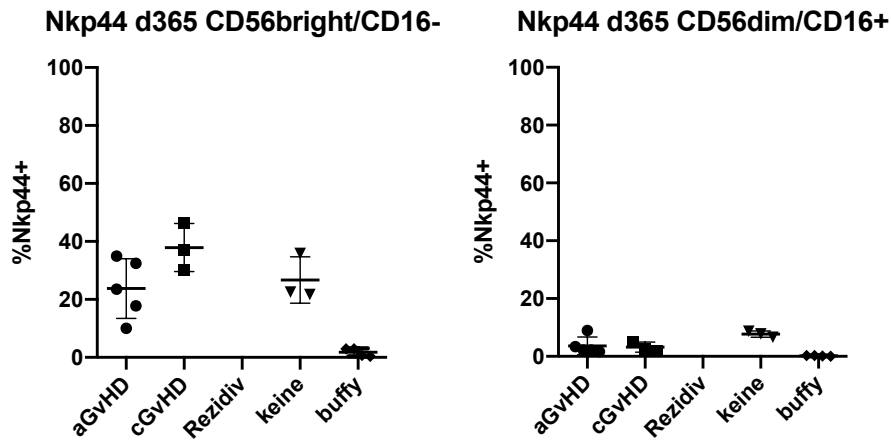


Abb. 45 und 46 zeigen die Expression von Nkp44 auf der CD56brightCD16- Subpopulation (aGvHD: 24%, cGvHD 38% und keine Komplikation: 27%) und der CD56dimCD16+ Subpopulation (aGvHD: 4%, cGvHD 3% und keine Komplikation: 8%) an d365. Vergleich gesunde Kontrollen: 2% bzw. 0%.

### 4.3.4. Aktivierende Rezeptoren

Retrospektiv hatte sich die Expression der aktivierenden Rezeptoren mit der Ausnahme von Nkp30 in allen Patientengruppen erhöht gezeigt.

Prospektiv ließ sich beobachten, dass diese Hochregulierung der Rezeptoren bereits unmittelbar nach Transplantation vor dem Auftreten etwaiger Komplikationen zu beobachten ist.

Gemittelt über alle drei Patientengruppen fiel die Expression von Nkp30 bis d150 auf ein Level vergleichbar mit dem der gesunden Kontrollen, während die Expression von Nkp46 und NKG2D auch an d365 noch deutlich erhöht war.

Für alle drei aktivierenden Rezeptoren lag der Anteil positiver NK-Zellen an d50 mit relativ kleiner Varianz bei Werten von über 60%. Ab d150 zeigte sich allerdings eine stärkere Streuung der Werte mit deutlichen Ausreißern nach unten.

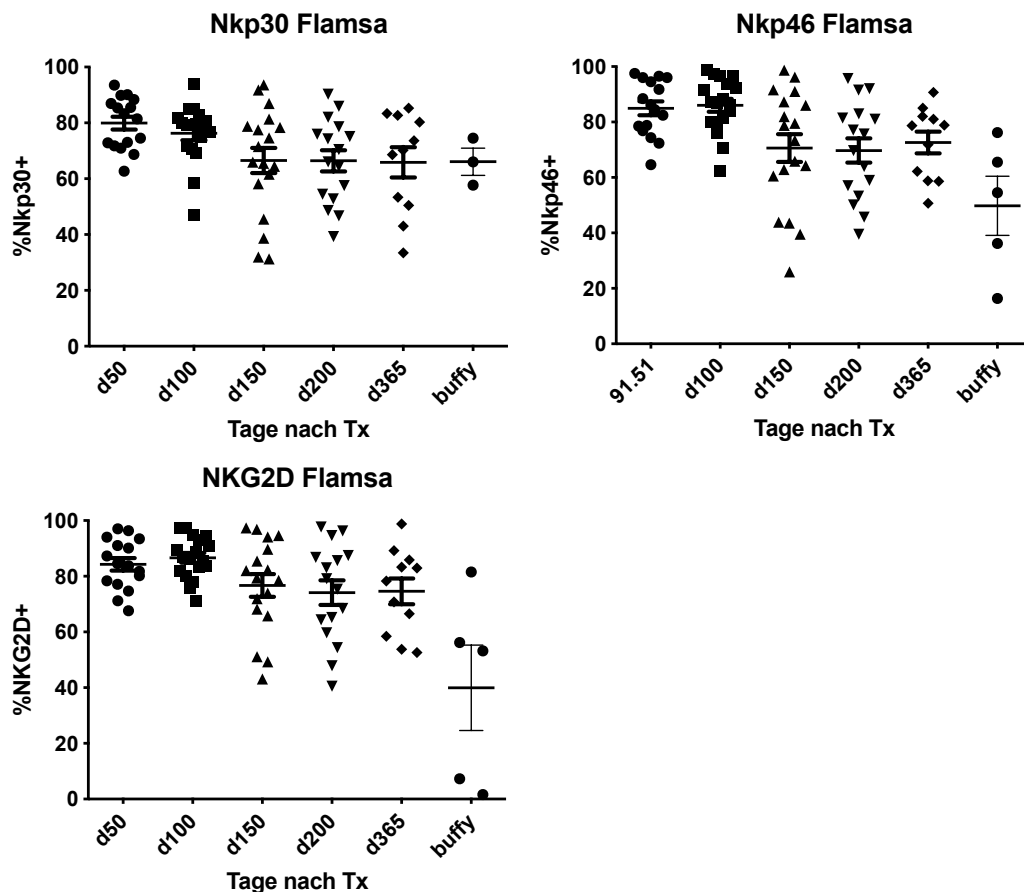


Abb. 47 bis 49 zeigen den Anteil Nkp30+, Nkp46+ und NKG2D+ NK-Zellen aller FLAMSA-Patienten im Verlauf.

Die ausgeprägte Varianz der Expression von Nkp30 spät nach Transplantation ist durch eine im Allgemeinen abfallende Expression in allen Patientengruppen, aber persistierend erhöhte Expression bei einigen Patienten mit GvHD, zu erklären.

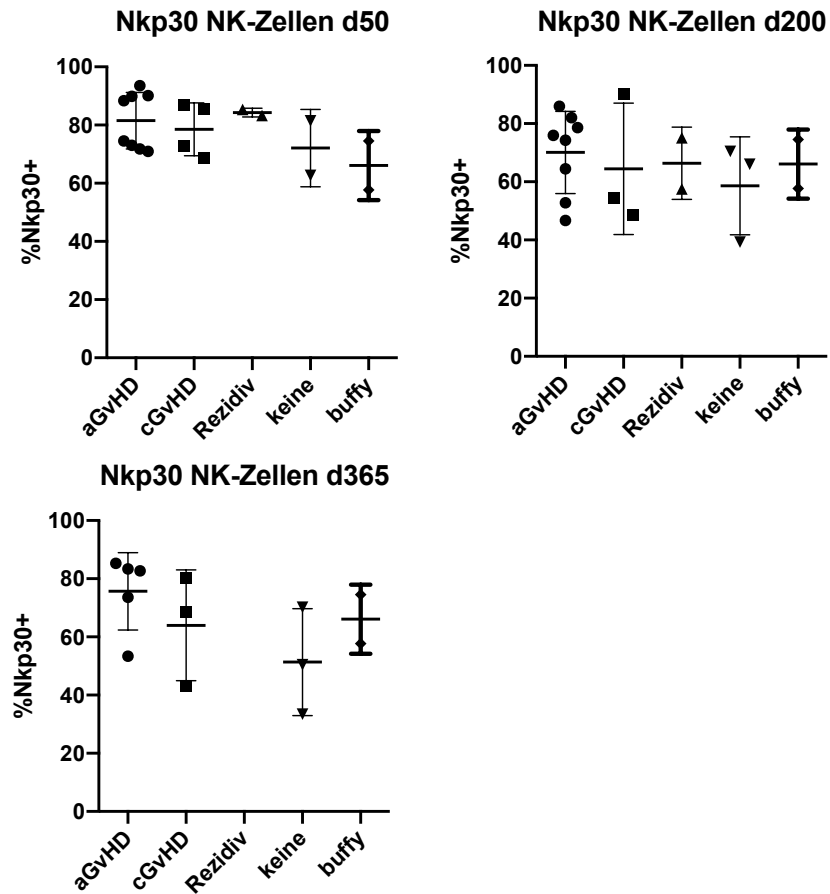


Abb. 50 bis 52 zeigen die Expression von Nkp30 an d50 (aGvHD: 82%, cGvHD 79%, Rezidiv:84% und keine Komplikation: 72%), d200 (aGvHD: 70%, cGvHD 65%, Rezidiv: 66% und keine Komplikation: 59%) und an d365 (aGvHD: 76%, cGvHD 64% und keine Komplikation: 51%). Vergleich gesunde Kontrollen: 66%.

Für Nkp46 ließ sich kein klarer Unterschied zwischen den einzelnen Patientengruppen abgrenzen. In jeder der vier Gruppen waren die unreifen CD56bright NK-Zellen zu 100% Nkp46+. Bei den reifen CD56dim NK-Zellen war der Anteil mit ca. 90% etwas niedriger und variabler, aber lag noch immer stark über dem Vergleichswert der gesunden Kontrollen.

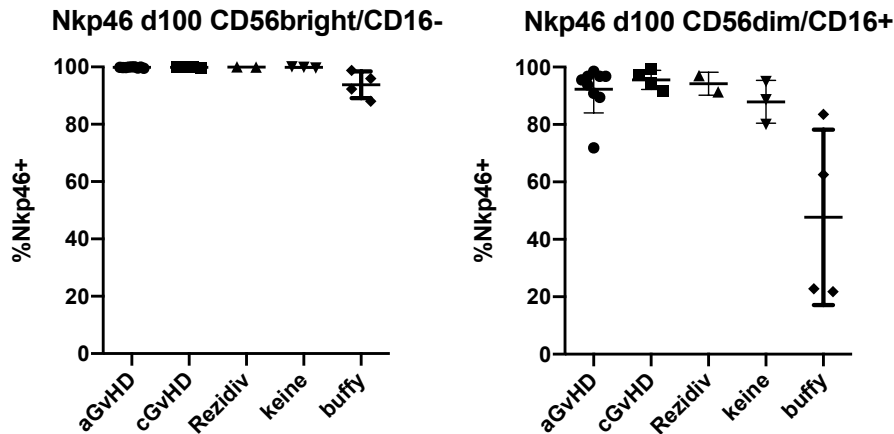


Abb. 53 und 54 zeigen die Expression von Nkp46 auf der CD56brightCD16- Subpopulation (aGvHD: 100%, cGvHD 100% und keine Komplikation: 100%) und der CD56dimCD16+ Subpopulation (aGvHD: 92%, cGvHD 96%, Rezidiv: 94% und keine Komplikation: 88%) an d365. Vergleich gesunde Kontrollen: 94% bzw. 48%.

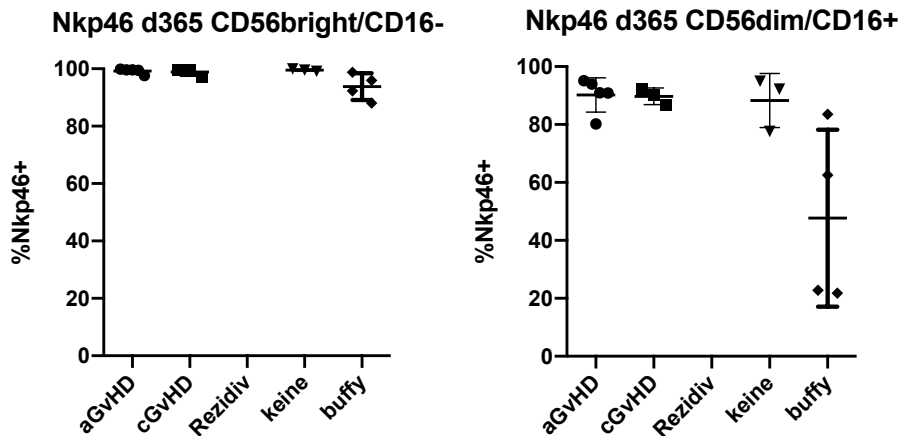


Abb. 55 und 56 zeigen die Expression von Nkp46 auf der CD56brightCD16- Subpopulation (aGvHD: 99%, cGvHD 99% und keine Komplikation: 100%) und der CD56dimCD16+ Subpopulation (aGvHD: 90%, cGvHD 90% und keine Komplikation: 88%) an d365. Vergleich gesunde Kontrollen: 94% bzw. 48%.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei NKG2D. Auch hier war die Expression, über alle Patientengruppen gemittelt, unmittelbar nach Transplantation bereits deutlich erhöht und zeigte dann ab d150 vor allem durch drei Patienten mit einer deutlich verminderten Expression einen reduzierten Mittelwert. Diese drei Patienten waren allerdings auf die Gruppen der unterschiedlichen Komplikationen verteilt, sodass eine verminderte Expression nicht mit einer einzelnen Komplikation assoziiert werden konnte. Auch die

Expression von NKG2D betrug bei den CD56bright NK-Zellen stets um die 100%, während sich die Unterschiede vor allem bei den CD56dim NK-Zellen manifestierten.

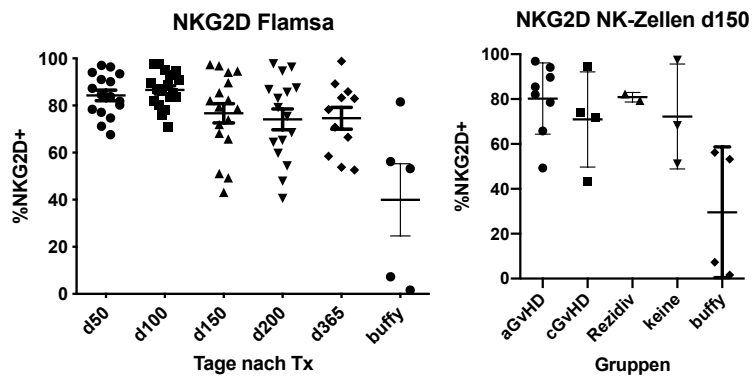


Abb. 57 zeigt den Anteil NKG2D+ NK-Zellen aller FLAMSA-Patienten im Verlauf. Abb. 58 zeigt den Anteil NKG2D+ NK-Zellen an d150 in den einzelnen Patientengruppen.

NKG2C wurde in unserer retrospektiven Analyse noch nicht erfasst, sodass hierzu keine Referenzwerte für die gesunden Kontrollen vorlagen. In der prospektiven Analyse konnten wir jedoch einen einzigartigen Verlauf beobachten.

An d50 nach Transplantation war die Expression in allen Patientengruppen eher niedrig (aGvHD: 8%, cGvHD 13%, Rezidiv 10%, keine Komplikation 14%). Im Verlauf konnten wir jedoch einen deutlichen Anstieg der Expression bei Patienten beobachten, die über den Beobachtungszeitraum keine der Komplikationen entwickelten. Bei Patienten, die eine GvHD entwickelten, hingegen blieb die Expression relativ unverändert und Patienten mit einem Rezidiv zeigten die geringste Expression von NKG2C.

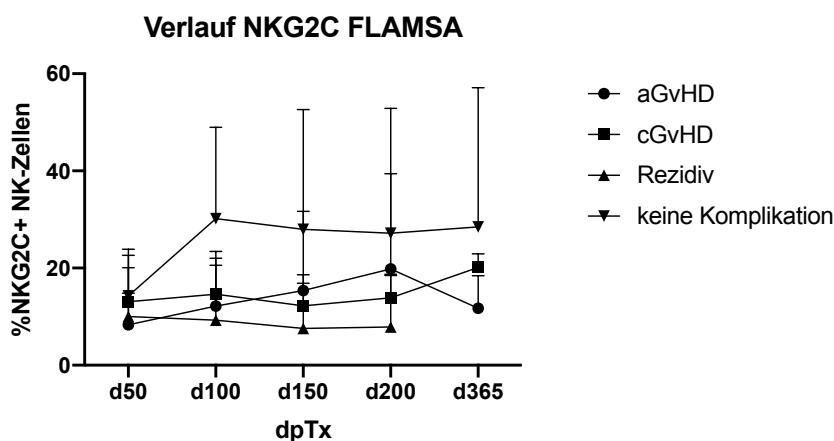


Abb. 59 zeigt die Mittelwerte für NKG2C+ NK-Zellen an der Gesamtpopulation im Verlauf.



### 4.3.5. Inhibitorische Rezeptoren

Bei allen Patienten konnten wir früh nach Transplantation eine gesteigerte Expression von NKG2A beobachten. Patienten, welche keine Komplikation entwickelten, zeigten jedoch eine kontinuierliche Abnahme der Expression und erreichten ab d150 das Level der gesunden Kontrollen, während bei den übrigen Patienten die Expression noch darüber hinaus erhöht blieb.

Auch hier sind die Unterschiede in der Expression ausschließlich auf den reifen NK-Zellen zu finden.

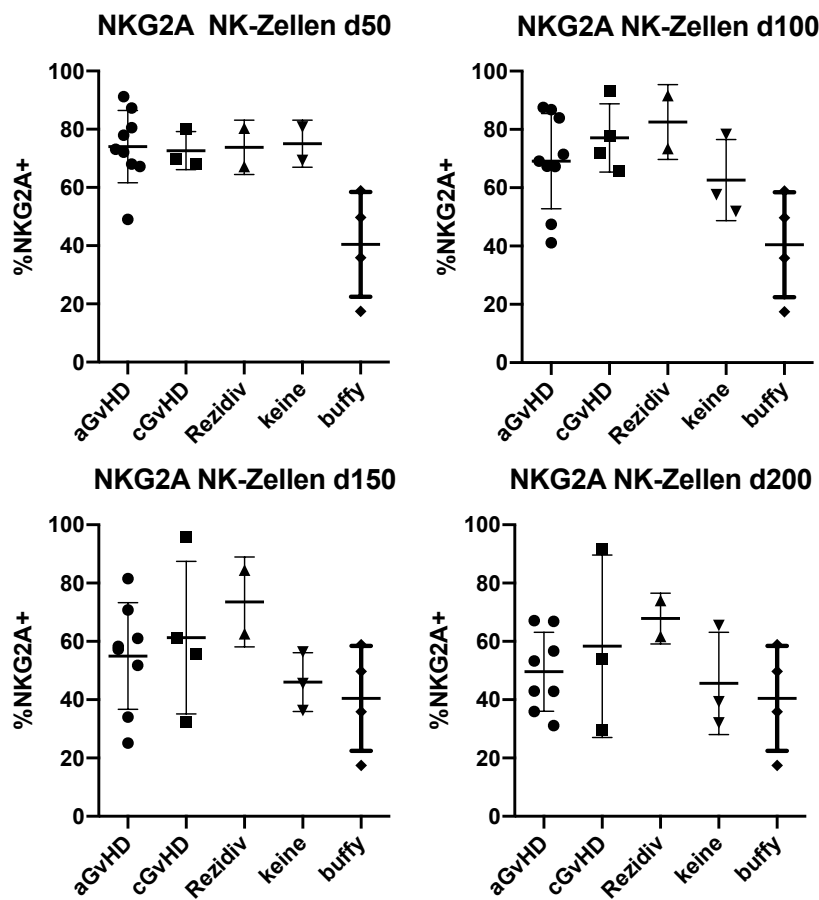


Abb. 60 bis 63 zeigen die Expression von NKG2A an d50 (aGvHD: 74%, cGvHD: 73%, Rezidiv: 74% und keine Komplikation: 75%), d100 (aGvHD: 69%, cGvHD 77%, Rezidiv: 83% und keine Komplikation: 63%), d150 (aGvHD: 52%, cGvHD 61%, Rezidiv: 74% und keine Komplikation: 46%) und an d200 (aGvHD: 50%, cGvHD 58%, Rezidiv: 68% und keine Komplikation: 46%) auf der Gesamtpopulation der NK-Zellen . Vergleich gesunde Kontrollen: 40%.

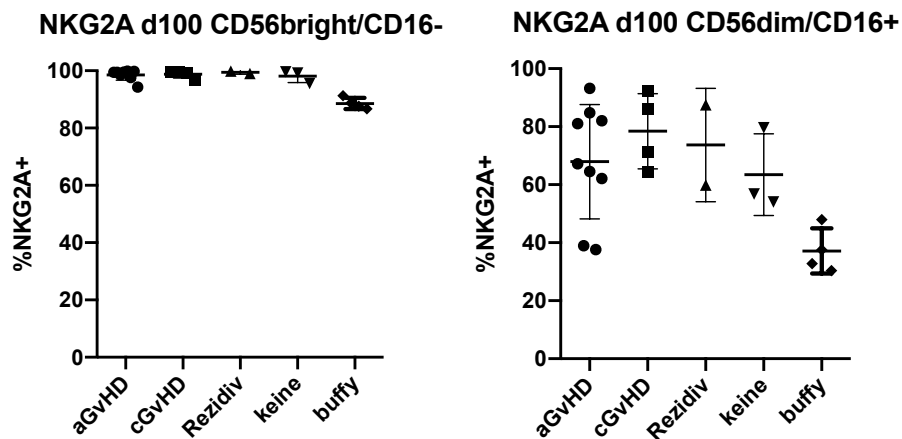


Abb. 64 und 65 zeigen die Expression von NKG2A auf der CD56brightCD16- Subpopulation (aGvHD: 100%, cGvHD 99%, Rezidiv: 99% und keine Komplikation: 100%) und der CD56dimCD16+ Subpopulation (aGvHD: 68%, cGvHD 78%, Rezidiv: 73% und keine Komplikation: 63%) an d100. Vergleich gesunde Kontrollen: 89% bzw. 37%.

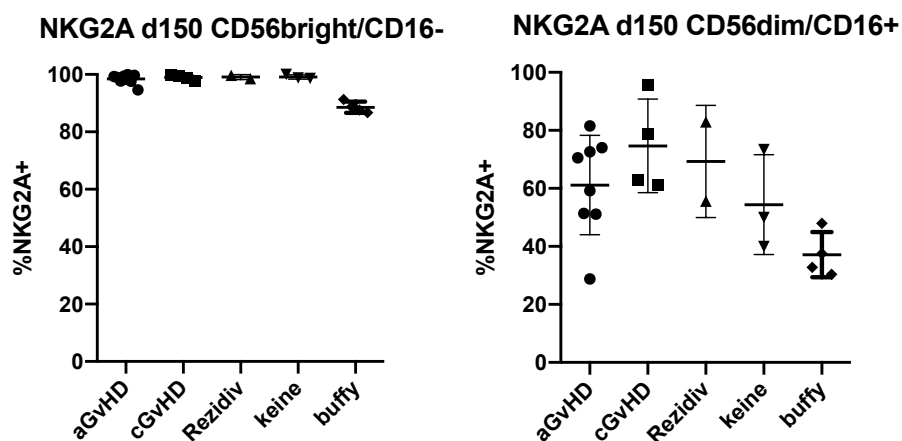


Abb. 66 und 67 zeigen die Expression von NKG2A auf der CD56brightCD16- Subpopulation (aGvHD: 98%, cGvHD 99%, Rezidiv: 99% und keine Komplikation: 99%) und der CD56dimCD16+ Subpopulation (aGvHD: 61%, cGvHD 75%, Rezidiv: 69% und keine Komplikation: 54%) an d150. Vergleich gesunde Kontrollen: 89% bzw. 37%.

Für Tigit beobachteten wir in der retrospektiven Analyse eine leicht erhöhte Expression bei allen Patienten mit einer besonderen Ausprägung bei Patienten mit einer cGvHD. In der prospektiven Beobachtung wurde deutlich, dass diese Hochregulierung von Tigit der Entstehung einer cGvHD vorausgeht, da wir bereits an d50 und d100 bei den Patienten, welche später eine cGvHD entwickeln würden, den größten Anteil Tigit+ NK-Zellen beobachteten. Diese gesteigerte Expression fand sich zudem in allen Subpopulationen der NK-Zellen, wobei die Expression von Tigit mit dem Reifungsstatus zu korrelieren scheint, sodass die reifen CD56dimCD16+ NK-Zellen die stärkste Expression zeigten.

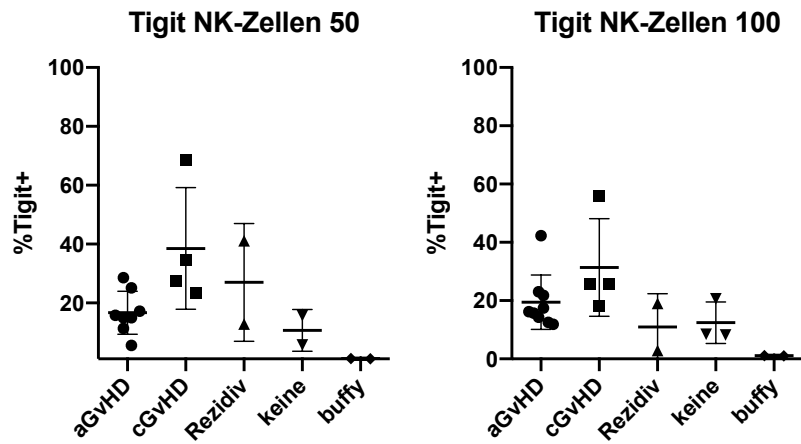


Abb. 68 und 69 zeigen die Expression von Tigit an d50 (aGvHD: 17%, cGvHD: 39%, Rezidiv: 27% und keine Komplikation: 11%) und d100 (aGvHD: 19%, cGvHD: 31%, Rezidiv: 11% und keine Komplikation: 12%) auf der Gesamtpopulation der NK-Zellen. Vergleich gesunde Kontrollen: 1%.

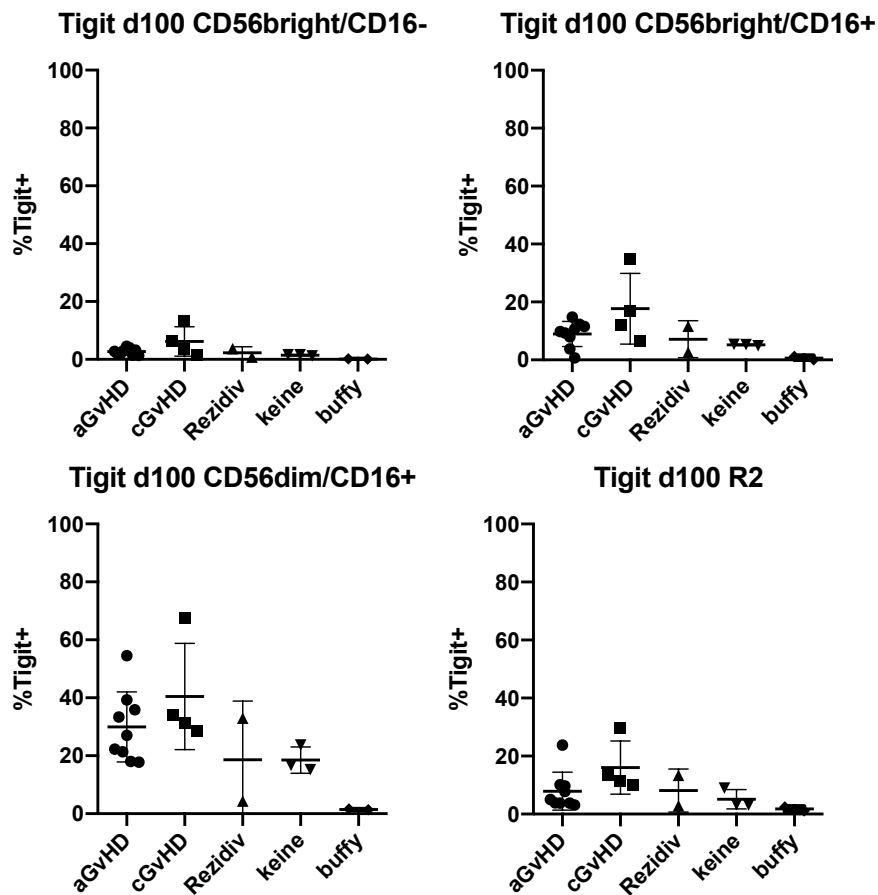


Abb. 70 bis 73 zeigen die Expression von Tigit an d100 in der CD56brightCD16- (aGvHD: 3%, cGvHD: 6%, Rezidiv: 2% und keine Komplikation: 1%), der CD56brightCD16+ (aGvHD: 9%, cGvHD: 18%, Rezidiv: 7% und keine Komplikation: 5%), der CD56dimCD16+ (aGvHD: 30%, cGvHD: 40%, Rezidiv: 19% und keine Komplikation: 19%) und der R2-Population (aGvHD: 8%, cGvHD: 16%, Rezidiv: 8% und keine Komplikation: 5%). Vergleich gesunde Kontrollen: 0%, 1%, 1% und 2%.

### 4.3.6. CD62L

Die Expression von CD62L war unmittelbar nach Transplantation erhöht, wobei Patienten ohne Komplikation die stärkste Expression aufwiesen. Auffällig ist hier eine deutlich weniger stark erhöhte Expression bei Patienten mit cGvHD mit einem statistisch signifikanten Unterschied an d50 (p: 0,0144), d100 (p: 0,0417) und d200 (p:0,0217) im Vergleich zu den Patienten ohne Komplikation. An d365 ist die Expression in allen Patientengruppen abgefallen und unterscheidet sich zwischen den einzelnen Gruppen nicht mehr so stark, aber bleibt im Vergleich zu den gesunden Kontrollen weiterhin erhöht.

Früh nach Transplantation waren diese Unterschiede in allen Subpopulationen der NK-Zellen zu beobachten, während sich die Expression bei den unreifen NK-Zellen zwischen den einzelnen Patientengruppen im Verlauf zunehmend angleicht und sich die Unterschiede vornehmlich bei den reifen NK-Zellen manifestierten.

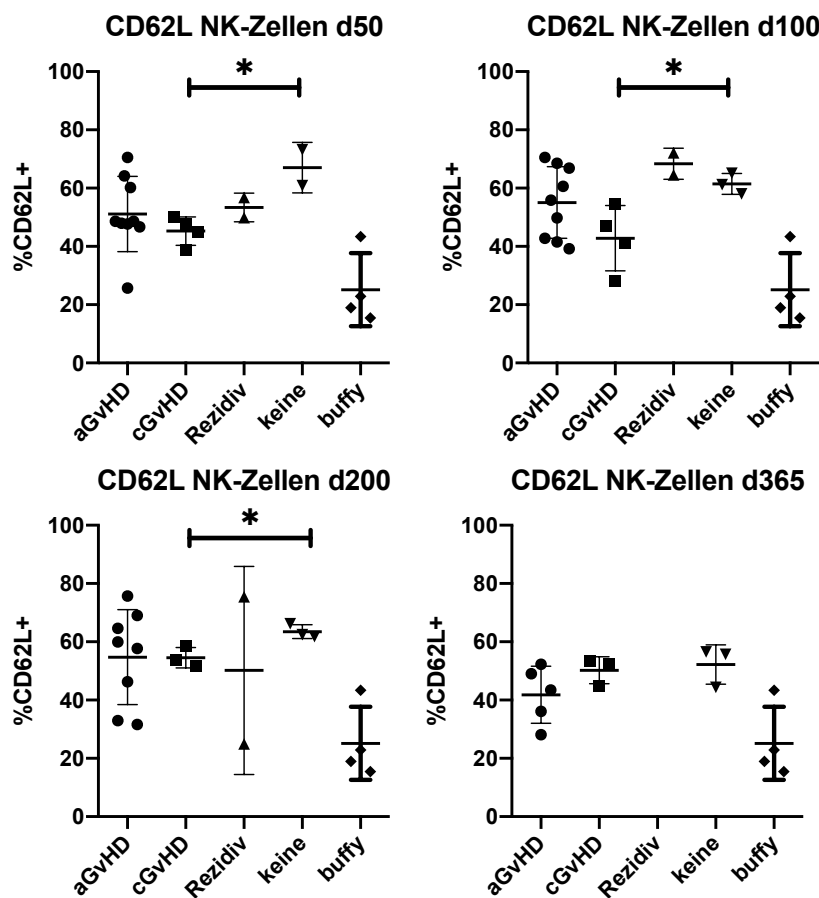


Abb. 74 bis 77 zeigen die Expression von CD62L an d50 (aGvHD: 51%, cGvHD: 45%, Rezidiv: 53% und keine Komplikation: 67%), d100 (aGvHD: 55%, cGvHD: 43%, Rezidiv: 68% und keine Komplikation: 61%), d200 (aGvHD: 55%, cGvHD: 63%, Rezidiv: 50% und keine Komplikation: 63%) und d365 (aGvHD: 42%, cGvHD: 50% und keine Komplikation: 52%) auf der Gesamtpopulation der NK-Zellen. Vergleich gesunde Kontrollen: 25%.

### 4.3.7. Virusreaktivierungen

Da es mit der Ausnahme von lediglich drei Patienten im FLAMSA-Kollektiv und einem Patienten im FBM-Kollektiv bei allen Patienten zu einer Virusreaktivierung und damit zu starken Überschneidungen mit den anderen Komplikationen kam wurde diese Komplikation separat evaluiert.

Im FLAMSA-Kollektiv entwickelten 8 der 18 Patienten eine Reaktivierung von CMV, welche zur Initiierung einer antiviralen Therapie führte. Bei 3 von diesen 8 Patienten kam es zu einer Organmanifestation (1 CMV-Retinitis/neuritis cranialis/ventrikulitis, 1 CMV-Kolitis und 1 CMV-Erkrankung des Magens). Der Mittelwert für den Zeitpunkt einer CMV-Reaktivierung war d46 nach Transplantation

Zu einer Reaktivierung von EBV kam es bei 12 der 18 Patienten, wobei 8 dieser 12 Patienten eine Therapie mit wöchentlichen Gaben von Rituximab erhielten. Zwei der 12 EBV-Reaktivierungen entwickelten sich zu einer EBV-PTLD. Der Mittelwert für den Zeitpunkt einer EBV-Reaktivierung war d46 nach Transplantation

Der größte Teil der Virusreaktivierungen ereignete sich vor d50, sodass hier nur eine retrospektive Analyse möglich war. Wir konnten allerdings in Bezug auf Rekonstitution der Subpopulationen und Markerexpression keine charakteristischen Veränderungen bei den Patienten nach Reaktivierung beobachten. Auch nach Stratifizierung der Schwere der Erkrankung abhängig davon, ob eine Organmanifestation beziehungsweise PTLD vorlag oder nicht, und bei Betrachtung einzelner Patienten, welche im Verlauf eine zweite Virusreaktivierung entwickelten (n=9), ließen sich keine einheitlichen Veränderungen feststellen.

#### 4.4. Degranulation und Zytokinproduktion

Bei der Analyse der Markerexpression fielen charakteristische Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen auf. Um zu untersuchen, ob diese Veränderungen die Funktionalität der Patienten-NK-Zellen beeinflussen, schlossen wir Assays zur Evaluation von Zytokinproduktion und Zytotoxizität an.

Die Expression von Ifn- $\gamma$  wurde intrazellulär mithilfe der in den Methoden beschriebenen intrazellulären FACS-Färbung bestimmt. Zur Bestimmung der Degranulation wurde eine Oberflächenfärbung auf CD107-a verwendet.

Im eigentlichen Test-Ansatz wurden die NK-Zellen mit K562 inkubiert. Es erfolgte zudem eine Negativ-Kontrolle, in welchem die NK-Zellen im gleichen Medium, aber ohne K562, inkubiert wurden. Die Positivkontrolle enthielt NK-Zellen in Medium mit Zusatz von PMA und Ionomycin.

Aufgrund der kleinen Anzahl von lediglich 20 000 NK-Zellen war hier leider keine Untersuchung der einzelnen Subpopulationen und eine Korrelation mit einzelnen Oberflächenmarkern möglich.

Gesunde Kontrollen zeigten ohne Stimulus bei weniger als 5% der NK-Zellen eine Produktion von Ifn- $\gamma$ . Bei den Patienten dagegen war Ifn- $\gamma$  hier bei einem deutlich größeren Anteil der NK-Zellen nachweisbar. Bei Patienten mit einem Rezidiv waren fast 50% der NK-Zellen positiv für Ifn- $\gamma$ .

Bei der Stimulation mit K562 zeigte sich bei fast allen Patientengruppen eine Abnahme der Produktion von Ifn- $\gamma$ . Lediglich Patienten mit cGvHD zeigten hier eine leichtgradige Zunahme der Produktion. Die gesunden Kontrollen hingegen zeigten eine deutliche Zunahme der Produktion, jedoch ohne dabei mehr Ifn- $\gamma$  zu produzieren als die Patienten.

In der Positivkontrolle konnte für alle Gruppen eine gute Fähigkeit zur Produktion von Ifn- $\gamma$  nachgewiesen werden (Mittelwerte 62-85%), wobei die gesunden Kontrollen den größten Anteil Ifn- $\gamma$ + NK-Zellen zeigten. Tabelle 17 fasst die Ausgangswerte in der Negativkontrolle und die darauf bezogenen Veränderungen der Expression von Ifn- $\gamma$  nach Stimulation mit K562 beziehungsweise PMA/Ionomycin zusammen.

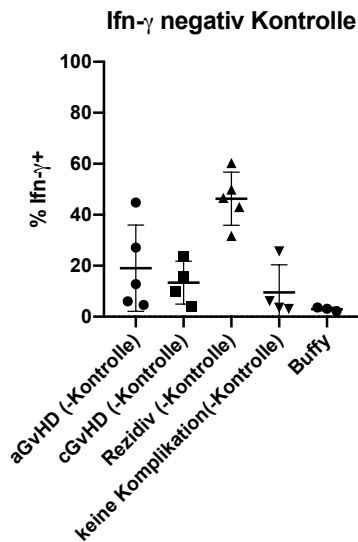


Abb. 78 zeigt die Expression von  $\text{Ifn-}\gamma$  in der Negativkontrolle bei Patienten mit aGvHD (MW: 19%), cGvHD (MW: 13%), Rezidiv (MW: 46%), keinen Komplikationen (MW: 10%) und den gesunden Kontrollen (MW: 3%). Dies entspricht der spontanen Expression von  $\text{Ifn-}\gamma$ .

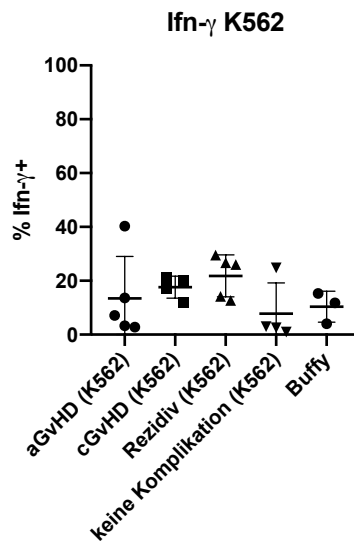


Abb. 79 zeigt die Expression von  $\text{Ifn-}\gamma$  im Testansatz bei Patienten mit aGvHD (MW: 13%), cGvHD (MW: 18%), Rezidiv (MW: 22%), keinen Komplikationen (MW: 8%) und den gesunden Kontrollen (MW: 10%).

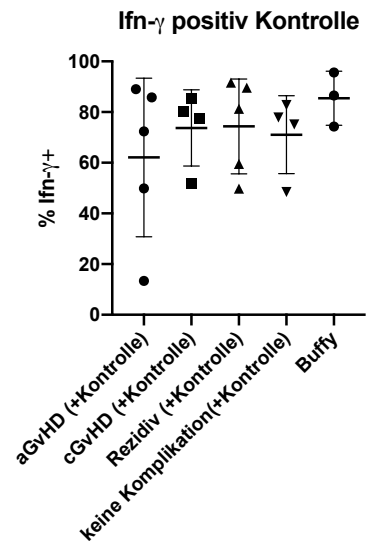


Abb. 80 zeigt die Expression von  $\text{Ifn-}\gamma$  in der Positivkontrolle bei Patienten mit aGvHD (MW: 62%), cGvHD (MW: 74%), Rezidiv (MW: 74%), keinen Komplikationen (MW: 71%) und den gesunden Kontrollen (MW: 85%).

Tabelle 17 Sekretion von  $\text{Ifn-}\gamma$

	$\text{Ifn-}\gamma$ + Negativ-kontrolle	$\Delta$ $\text{Ifn-}\gamma$ K562	$\Delta$ $\text{Ifn-}\gamma$ Positiv- kontrolle
aGvHD	19%	-6%	+43%
cGvHD	13%	+5%	+61%
Rezidiv	46%	-24%	+28%
Keine Komplikation	10%	-2%	+61%
buffycoats	3%	+7%	+83%

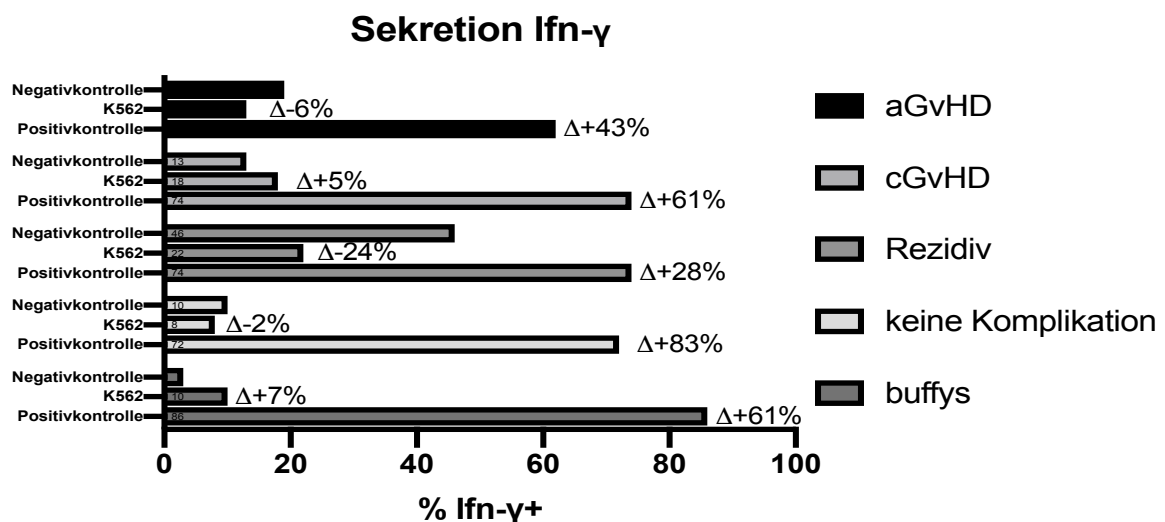


Abb. 81 veranschaulicht die Veränderungen in der Expression von  $\text{Ifn-}\gamma$  nach Stimulation für die einzelnen Patientgruppen.

Eine spontane Degranulation in der Negativkontrolle war nur bei Patienten mit einem Rezidiv durch Nachweis von CD107-a auf ca. 5% der NK-Zellen gegeben.

Nach Inkubation mit K562 konnte in allen Gruppen eine Degranulation nachgewiesen werden, wobei NK-Zellen von gesunden Spendern hier die größten Kapazitäten mit Werten von ca. 20% zeigten. Für Patienten mit aGvHD und Rezidiv lag dieser Wert knapp darunter. Bei Patienten mit cGvHD und ohne Komplikation konnte nur bei 10% der NK-Zellen CD107-a nachgewiesen werden.

In der Positivkontrolle zeigten alle Patientengruppen Werte, die mit denen der gesunden Kontrollen (ca. 55%) vergleichbar waren oder sogar höher lagen (cGvHD, Rezidiv, keine Komplikation).

Tabelle 18 fasst die Ausgangswerte in der Negativkontrolle und die darauf bezogenen Veränderungen in der Expression von CD107-a nach Stimulation mit K562 beziehungsweise PMA/Ionomycin zusammen.

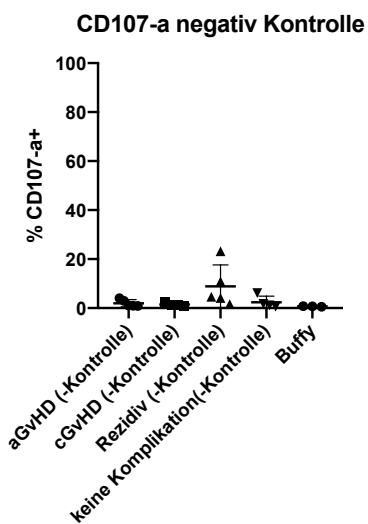


Abb. 82 zeigt die Expression von CD107-a in der Negativkontrolle bei Patienten mit aGvHD (MW: 2%), cGvHD (MW: 1%), Rezidiv (MW: 9%), keinen Komplikationen (MW: 2%) und den gesunden Kontrollen (MW: 1%).

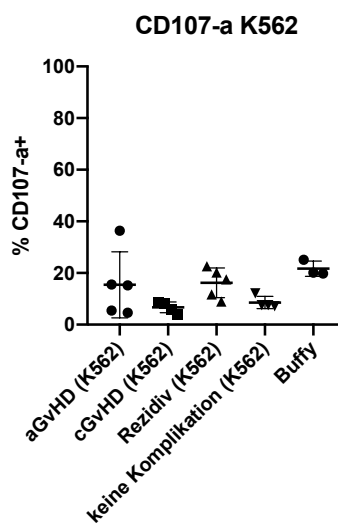


Abb. 83 zeigt die Expression von CD107-a im Testansatz bei Patienten mit aGvHD (MW: 15%), cGvHD (MW: 7%), Rezidiv (MW: 16%), keinen Komplikationen (MW: 9%) und den gesunden Kontrollen (MW: 22%).

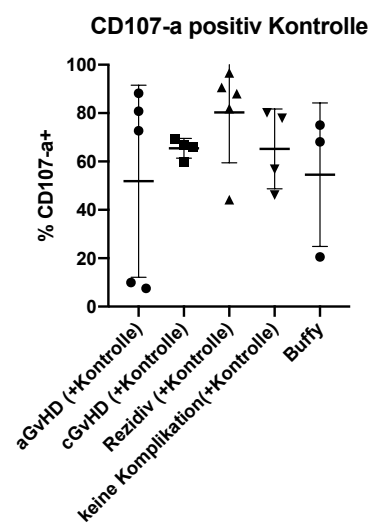


Abb. 84 zeigt die Expression von CD107-a in der Positivkontrolle bei Patienten mit aGvHD (MW: 52%), cGvHD (MW: 65%), Rezidiv (MW: 80%), keinen Komplikationen (MW: 65%) und den gesunden Kontrollen (MW: 55%).

Tabelle 18 Degranulation

	CD107-a+ Negativ-kontrolle	$\Delta$ CD107-a K562	$\Delta$ CD107-a Positiv-kontrolle
aGvHD	2%	+13%	+50%
cGvHD	1%	+6%	+64%
Rezidiv	9%	+7%	+71%
Keine Komplikation	2%	+7	+63%
buffycoats	1%	+21%	+54%



## Degranulation

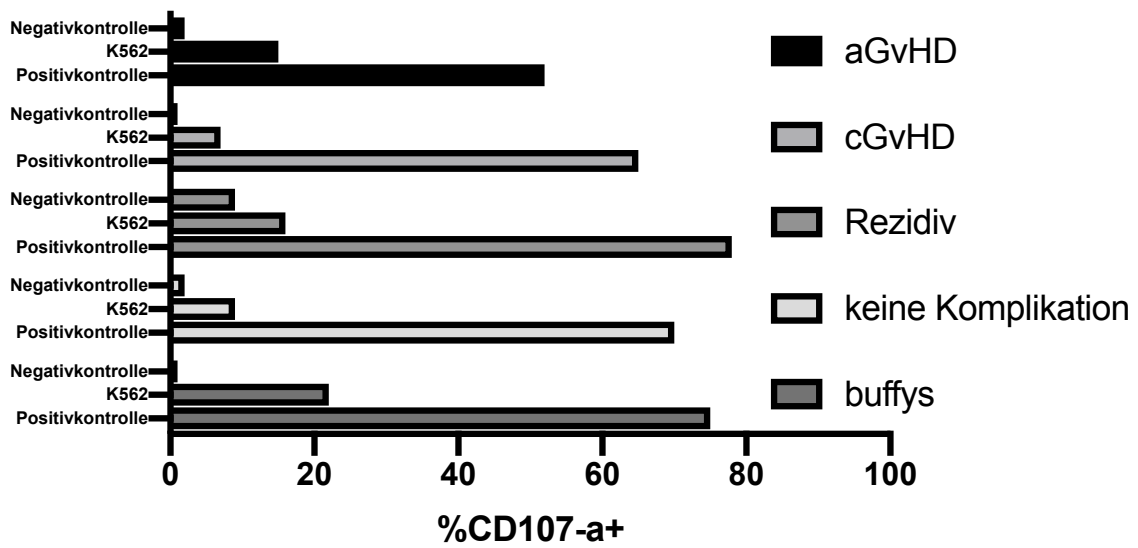


Abb. 85 veranschaulicht die Veränderungen in der Expression von CD107-a nach Stimulation für die einzelnen Patientgruppen.

## 5. Diskussion

### 5.1. Unterschiede in der Markerexpression und Rekonstitution bei Patienten mit unterschiedlichen Komplikationen

Die allogene Stammzelltransplantation stellt nach wie vor die letzte kurative Therapieoption für eine Reihe hoch aggressiver hämatologischer Malignitäten dar. Trotz deutlicher Fortschritte in Bezug auf das Verständnis der pathophysiologischen Grundlagen der wichtigsten Komplikationen bedingen die GvHD und das Rezidiv noch immer eine erhebliche Limitation für den Therapieerfolg.

Die mögliche Bedeutung von NK-Zellen in diesem Zusammenhang ist bereits vielfach beschrieben worden (196, 197). Zudem konnte gezeigt werden, dass es nach Transplantation zu phänotypischen Veränderungen der NK-Zellen kommt (196, 197). Diese Arbeit ist ein Versuch, einen Überblick über Veränderungen in der Rekonstitution der Subpopulationen und Expression von Oberflächenrezeptoren von NK-Zellen bei Patienten mit myeloischen Neoplasien und hohem Rezidiv-Risiko im Zusammenhang mit den wichtigsten Komplikationen der allogenen Stammzelltransplantation in unserem Mainzer Patientenkollektiv zu gewinnen.

Neben den klassischerweise in der Literatur beschriebenen Subpopulationen der NK-Zellen (198) untersuchten wir zusätzlich die von uns so genannte R2-Population.

Einige Rezeptoren sind bereits in einem ähnlichen Kontext einzeln untersucht worden (152-154, 173, 175, 179), sodass jeweils nur eine eingeschränkte Phänotypisierung der NK-Zellen möglich war.

Mit einer relativ kleinen Fallzahl gelang es uns in unserer retrospektiven Analyse zu zeigen, dass es im Rahmen der Transplantation -beziehungsweise durch die einhergehenden Komplikationen dieser- zu ausgeprägten Veränderungen der Expression der von uns ausgewählten Rezeptoren kommt.

In der prospektiven Studie konnten wir Veränderungen identifizieren, welche den Komplikationen vorausgehen (Tigit, CD62L), sich erst nach deren Auftreten manifestieren (NKG2A, NKG2C) oder aber auch gleichermaßen bei Patienten ohne Komplikation auftreten (CD69, Nkp30, Nkp44, Nkp46, NKG2D).

Zusätzlich beobachteten wir Unterschiede in der Rekonstitution der NK-Zellen zwischen den einzelnen Patientengruppen und konnten die Veränderungen in der Markerexpression hierzu in Zusammenhang setzen.

## 5.2. Veränderte Rekonstitution bei Patienten mit Komplikation

NK-Zellen sind die ersten Lymphozyten, welche nach HSZT rekonstituieren und normalerweise innerhalb eines Monats Zahlen vergleichbar mit denen von gesunden Individuen erreichen (113). Allerdings konnten Dulphy et al. zeigen, dass Veränderungen in der Zusammensetzung der Subpopulationen zugunsten der unreifen CD56bright NK-Zellen noch für einen Zeitraum von mindestens einem Jahr nach HSZT fortbestehen (198).

Da sich diese Subpopulationen in ihrer Funktionalität unterscheiden, könnte neben Veränderungen der absoluten NK-Zell Zahl auch ein Missverhältnis der einzelnen Subpopulationen untereinander oder zu anderen Immunzellen zu der Entstehung von Komplikationen beitragen.

So konnten Chan et al. an d14 nach Transplantation ein Verhältnis von 40:1 NK-Zellen gegenüber T-Lymphozyten beobachten (196), welches im Vergleich zu dem Verhältnis von 0,17 bei gesunden Personen (199) die enorme Bedeutung von NK-Zellen unmittelbar nach Transplantation unterstreicht. Des Weiteren war in der Arbeit von Chan et al. eine NK-Zell Zahl von  $<25/\mu\text{l}$  an d14 ein statistisch signifikanter Risikofaktor für eine aGvHD (196).

Huenecke et al. beobachteten, dass bei pädiatrischen HSZT Patienten ein geringerer Anteil von CD56bright an den gesamten NK-Zellen in den ersten drei Monaten mit einem erhöhten Risiko für eine aGvHD assoziiert war (130).

Unsere prospektive Studie beginnt somit zu einem Zeitpunkt, an welchem zumindest die absoluten NK-Zell Zahlen im Bereich von gesunden Personen zu erwarten sind. Ziel war es die Entwicklung der NK-Zellen über einen verlängerten Zeitraum von einem Jahr zu beobachten und den Zusammenhang mit später auftretenden Komplikationen zu analysieren.

Tatsächlich lagen die Mittelwerte für die absolute Gesamtpopulation der NK-Zellen für alle Patientengruppen mit Komplikation stets im Referenzbereich gesunder Individuen ( $73-654/\mu\text{l}$  (200),  $80-690/\mu\text{l}$  (201)).

Wenn man jedoch den Anteil der NK-Zellen an den Lymphozyten betrachtet, fällt auf, dass dieser an d50 in allen Gruppen außer bei den Rezidiven oberhalb des Referenzbereichs (4-28% (200), 5-32% (201)) liegt. Dies lässt sich durch die in der Literaturdiskussion beschriebene verzögerte Rekonstitution von T-Lymphozyten (104) und B-Lymphozyten (106) erklären. Zudem hatten alle Patienten in unserem Kollektiv Antithymozytenglobulin (ATG) erhalten, welches zwar potentiell gegen alle

Lymphozytenpopulationen gerichtet ist, aber am stärksten die Rekonstitution von T-Lymphozyten beeinträchtigt (202, 203).

Da sich zu diesem Zeitpunkt die Verhältnisse zwischen Patienten mit einer späteren GvHD nicht zu denen ohne Komplikation unterscheiden, ist dieser Zeitpunkt wahrscheinlich zu spät gewählt oder der Anteil der NK-Zellen insgesamt an den Lymphozyten hat zu diesem Zeitpunkt keinen maßgeblichen Effekt auf die Entwicklung einer GvHD.

Allerdings bildeten sich im weiteren Verlauf Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen heraus.

Während der Anteil der NK-Zellen an den Lymphozyten in der Gruppe der cGvHD und ohne Komplikationen ab d100 wieder innerhalb des Referenzbereichs gesunder Individuen lag, blieb er bei Patienten mit aGvHD bis einschließlich d150 erhöht.

Dies könnte durch einen präferentiell supprimierenden Effekt der eingesetzten Immunsuppressiva auf T- und B-Lymphozyten bedingt sein, da sich die aGvHD im Mittel früher manifestierte als die anderen Komplikationen (aGvHD: d98, cGvHD: d116, Rezidiv: d249). Die Manifestation einer aGvHD erfordert oft den Einsatz systemischer Immunsuppressiva (i.d.R. einen Kortisonstoß), welchen ein wesentlicher Teil der Patienten mit aGvHD somit bereits vor d100 erhalten hat. In der Gruppe der cGvHD kommt dieser aufgrund der späteren Manifestation erst später zum Einsatz und bei Patienten ohne Komplikation überhaupt nicht.

Auch die GvHD selbst könnte für den geringeren Anteil der anderen Lymphozyten verantwortlich sein, da beispielsweise destruirende Effekte auf den Thymus durch eine GvHD beschrieben sind (204), was folglich die Bildung von T-Lymphozyten einschränkt.

Eine reaktive Vermehrung der NK-Zellen etwa als Antwort auf eine Proliferation alloreaktiver T-Zellen im Rahmen der GvHD ist eher unwahrscheinlich, da es zu keinem ausgeprägten Anstieg der absoluten NK-Zell Zahlen kommt.

Auch denkbar wäre gar ein beitragender Effekt der NK-Zellen zum proinflammatorischen Milieu der aGvHD. Der ab d100 zu beobachtende größere Anteil von NK-Zellen bei Patienten mit aGvHD im Vergleich zu Patienten ohne Komplikation ist vor allem auf einen stärkeren Rückgang des Anteils der unreifen NK-Zellen (CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-/16+</sup>) an den Lymphozyten bei Letzteren als bei Patienten mit aGvHD zurückzuführen.

Dieser größere Anteil der unreifen NK-Zellen, welche ja in erster Linie proinflammatorische Zytokine wie  $\text{Ifn-}\gamma$  sezernieren (112), bei den Patienten mit aGvHD könnte die Aktivierung von T-Zellen noch weiter befeuern.

Auffällig ist zudem der ab d150 zu beobachtende deutlich kleinere Anteil von NK-Zellen bei Patienten mit einer cGvHD. Auch wenn sich die Werte im Referenzbereich für gesunde Individuen bewegen zeigen Patienten mit einer cGvHD nach deren Manifestation (MW: d116) geringere Werte als Patienten ohne Komplikation.

Dies könnte eine verzögerte Folge einer gestörten Neubildung und Ausreifung von NK-Zellen bei Patienten mit cGvHD widerspiegeln.

Huenecke et al. hatten in ihrer Arbeit beobachtet, dass der Anteil der CD56brightCD16- an den gesamten NK-Zellen an d15 nach Transplantation oberhalb des Referenzbereichs von gesunden Kontrollen lag. Mit einer Verzögerung von etwa 3 Monaten kam es zu einer Expansion der CD56bright-CD16+-Sub-population über den Referenzbereich hinaus. Der Anteil der reifen NK-Zellen war hingegen vermindert und erreichte erst 8 Monate nach Transplantation den Referenzbereich (130). Dies spiegelt die sequentielle Reifung der NK-Zellen aus den CD56bright-CD16- über CD56brightCD16+ hin zu den reifen CD56dimCD16+ wider.

In unserer Studie hatten Patienten mit cGvHD an d50 den geringsten Anteil von unreifen CD56brightCD16-/+ . Somit könnte der geringe Anteil von NK-Zellen in dieser Gruppe ab d150 durch eine gestörte De-novo-Produktion schon früh nach Transplantation erklärt werden.

Auf der anderen Seite könnte auch eine Proliferation anderer Lymphozyten diesen geringeren Anteil von NK-Zellen bedingen.

Insgesamt zeigt die Rekonstitution der Subpopulationen der NK-Zellen bei Patienten ohne Komplikation in unserer Studie einen vergleichbaren, aber zeitlich leicht verzögerten, Verlauf wie er von Huenecke et al. bei pädiatrischen Patienten beschrieben wurde (130). Auch hier wurde eine Verschiebung der Subpopulationen zugunsten der CD56brightCD16- NK-Zellen bei Patienten, welche eine aGvHD entwickelt hatten, beobachtet. Während diese Verschiebung in unserer Studie zum Ende des Beobachtungszeitraums zunehmend kleiner wird, war sie bei den pädiatrischen Patienten noch bis 3 Jahre nach Transplantation zu beobachten (130). Huenecke et al. beobachteten für Patienten mit cGvHD eine gestörte Rekonstitution der NK-Zellen in Form einer längeren Persistenz einer starken CD56brightCD16+ Subpopulation. Bei unseren adulten Patienten konnten wir diese nicht beobachten,

was an einer noch stärker ausgeprägten Störung der Rekonstitution liegen könnte oder aber dieser Peak liegt jenseits des Beobachtungszeitraums.

Insgesamt ist die Aussagekraft aufgrund der geringen Fallzahl – gerade für Patienten mit cGvHD und ohne Komplikationen – stark eingeschränkt. Hinzu kommt, dass der Startpunkt für die Analysen scheinbar zu spät gewählt ist, um prädiktive Faktoren für das Entstehen einer aGvHD herauszufinden. Dennoch bestätigen unsere Beobachtungen die Ergebnisse anderer Arbeiten, welche eine rapide Rekonstitution von NK-Zellen innerhalb des ersten Monats zeigen (113). Außerdem konnten wir Hinweise darauf gewinnen, dass eine GvHD die Zusammensetzung von NK-Zellen auch bei adulten Patienten beeinflusst.

### **5.3. Differentiell gesteigerte Expression von Aktivierungsmarkern**

In der retrospektiven Analyse konnten wir zeigen, dass die beiden von uns untersuchten Aktivierungsmarker Nkp44 und CD69 in allen Patientengruppen nach Transplantation verstärkt exprimiert wurden.

Die in der prospektiven Analyse bereits an d50 stark erhöhte Expression dieser Aktivierungsmarker zeigt, dass die Aktivierung der NK-Zellen den Komplikationen vorausgeht.

Dies entspricht unserer Erwartung und lässt sich durch hohe Spiegel proinflammatorischer Zytokine nach Transplantation unabhängig vom Auftreten von Komplikationen, wie sie in mehreren Arbeiten beschrieben wurden (59, 205), erklären. Thiant et al. konnten an einer Kohorte von 40 ausschließlich myeloablativ konditionierten Patienten zeigen, dass die Konzentration von IL-7 und IL-15 invers mit der Zahl der zirkulierenden T-Zellen korreliert und während der tiefsten Lymphopenie an d14 pTx am höchsten war (206). In der Arbeit von Thiant et al. fielen die Spiegel dieser Interleukine an d30 wieder auf das Level vor Transplantation, welches etwa dem Referenzlevel gesunder Individuen entsprach (206).

Dulphy et al. beobachteten ebenfalls, dass die Spiegel von IL-15 nach Transplantation erhöht waren, aber sahen die höchsten Konzentrationen an d50 pTx mit fortwährend erhöhten Spiegeln noch an d90 (198). Leider wurden hier keine Angaben zu dem verwendeten Konditionierungsregime gemacht.

IL-15 gilt als entscheidendes Zytokin für die Stimulation von NK-Zellen (207) und mehrere Arbeiten konnten eine veränderte Markerexpression und Zusammensetzung der NK-Zell-Subpopulationen im Kontext erhöhter IL15-Spiegel beobachten (154, 198).

Neben Zytokinen könnte auch eine mögliche Aktivierung durch residuelle Blasten (208), eine verstärkte Expression der Aktivierungsmarker erklären.

So ist auch die stetige Abnahme der Expression der Aktivierungsmarker bei Patienten ohne Komplikation im Verlauf gemäß den Erwartungen. Auffällig ist jedoch die Tatsache, dass die Expression auch an d365 noch deutlich über der der gesunden Kontrollen liegt.

In Abwesenheit einer apparenten immunvermittelten Komplikation könnte dies ein Hinweis auf eine zentrale Rolle der NK-Zellen über die ersten Monate nach Transplantation hinaus sein. So könnte diese Aktiviertheit ein Resultat aus der ständigen Kontrolle über alloreaktive Zellen, residuelle Blasten oder Pathogene sein.

Zusätzlich mag die Tatsache, dass fast alle Patienten in unserer Kohorte eine Virusreaktivierung entwickelten, miterklärend für die langanhaltend erhöhte Expression der Aktivierungsmarker sein.

Außerdem könnte bei der bei uns ausschließlich verwendeten nicht-myeloablativen Konditionierung eine möglicherweise länger anhaltende Veränderung des Zytokinmilieus ein beitragender Faktor sein.

Interessant ist zudem die differenzielle Expression der beiden Aktivierungsmarker zwischen den einzelnen Subpopulationen.

Nkp44 als zusätzlicher Rezeptor für „natürliche Zytotoxizität“ wäre nach der Literatur eher auf der zytotoxischen CD56dim Subpopulation zu erwarten, zeigte aber in unserem Kollektiv die höhere Expression auf den unreifen NK-Zell-Subpopulationen. Allerdings kann Nkp44 - abhängig von dessen Isoform und der Art des Liganden - gegensätzliche Wirkungen auf die Zelle vermitteln (209).

Shemesh et al. konnten außerhalb des Settings der allogenen HSZT einen Einfluss der Expression von Nkp44 auf die Prognose von Patienten mit AML zeigen (210). Allerdings war es nicht die absolute Expression von Nkp44, die entscheidend war, sondern vielmehr eine starke Expression der inhibitorischen Splice-Variante Nkp44-1, welche mit einer schlechteren Prognose korrelierte (210). Zudem konnten sie zeigen, dass eine Inkubation mit IL-15 zu einer gesteigerten Expression der Splice-Varianten Nkp44-1 und Nkp44-3, aber nicht Nkp44-2, führte (210).

Letztlich ist unsere Arbeit die erste, welche die Expression von Nkp44 auf NK-Zellen im Verlauf nach allogener Stammzelltransplantation genauer untersucht, sodass kein direkter Vergleich zu Ergebnissen anderer Arbeiten möglich ist. Dennoch deutet die hier festgestellte gesteigerte Expression von Nkp44 auf NK-Zellen nach HSZT auf eine möglicherweise besondere Bedeutung dieses Rezeptors nach HSZT hin.

Angesichts der heterogenen Effekte, welche Nkp44 auf NK-Zellen vermitteln kann, und der Tatsache, dass wir zwischen den einzelnen Patientengruppen keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Nkp44 feststellen konnten, wäre es interessant zu untersuchen, ob sich die Isoform zwischen den Patienten und den einzelnen Subpopulationen unterscheidet.



## **5.4. Charakteristische Unterschiede in der Markerexpression bei Patienten mit GvHD**

### **5.4.1. Transplantation bewirkt eine Hochregulierung aktivierender Rezeptoren**

Einhergehend mit der zuvor beschriebenen Aktivierung beobachteten wir eine Adaptation der NK-Zellen durch differenzielle Hochregulierung aktivierender Rezeptoren.

Boyiadzis et al. konnten eine gesteigerte Expression der aktivierenden Rezeptoren Nkp46, Nkp30 und NKG2D unmittelbar nach Transplantation für die ersten drei Monate im Rahmen deutlich erhöhter Spiegel von IL-15 bereits nachweisen (154). Mit Ausnahme von Nkp30 konnten wir diese erhöhte Expression bei allen Patientengruppen auch noch nach Manifestation der Komplikation nachweisen. Die vergleichsweise geringe Expression der aktivierenden Rezeptoren bei Patienten mit cGvHD und Rezidiv im Vergleich zu denen mit aGvHD mag darauf zurückzuführen sein, dass die Probensammlung bei cGvHD und Rezidiv deutlich später nach Transplantation erfolgte.

Im Vergleich zu unserer prospektiven Analyse fiel die Expression in der Studie von Boyiadzis et al. jedoch deutlich früher wieder auf das Level der gesunden Kontrollen, was unter anderem der Verwendung eines anderen Konditionierungsregimes geschuldet sein könnte. Zudem unterscheiden sich die Grunderkrankungen (in genannter Studie fast ausschließlich Lymphome und keine AML) und die Studie macht keine Angabe über das Auftreten von Komplikationen. So könnte die hohe Prävalenz von GvHD mit der einhergehenden Inflammation in unserer Kohorte erklärend für die langanhaltende Erhöhung der Expression sein.

Passend zu dieser Hypothese hatten wir bei Patienten mit GvHD in der retrospektiven Studie tendentiell die stärkste Expression dieser Rezeptoren beobachtet. Leider lagen uns hier jedoch keine Patienten ohne Komplikation vor.

Prospektiv war ebenfalls zu erkennen, dass die Expression bei Patienten mit Rezidiv tendentiell am niedrigsten ist, was eine eingeschränkte Zytotoxizität bei diesen Patienten bedingen könnte. Allerdings ist die Aussagekraft durch die sehr kleine Fallzahl hier stark eingeschränkt.

Die in der retrospektiven Analyse verminderte Expression von NKG2D im Vergleich zu den anderen Patientengruppen und von Nkp30 auch gegenüber den gesunden

Kontrollen bei Patienten mit einem Rezidiv ließe sich auch mit Ergebnissen anderer Arbeiten erklären. Diese konnten eine verringerte Expression von Nkp30 und NKG2D vermittelt durch TGF-beta (211) oder andere parakrine Mechanismen ausgehend von AML-Zellen zeigen (155). Diese verminderte Expression könnte zu einer eingeschränkten Aktivierbarkeit der NK-Zellen beitragen und damit eine effektive Abwehr gegenüber AML-Blasten verhindern.

Allerdings ist dieser Verlust von Nkp30 und NKG2D nur bei einigen Patienten mit einem Rezidiv besonders ausgeprägt, sodass auf Seiten der NK-Zellen eventuell weitere in dieser Arbeit nicht untersuchte aktivierende Rezeptoren oder aber auch eine verstärkte Expression inhibitorischer Rezeptoren eine Rolle spielen müssen. Zudem ist die Pathophysiologie des Rezidivs sehr heterogen. Neben einer verminderten Expression von HLA-1-Molekülen oder einer gesteigerten Expression inhibitorischer Immuncheckpoint-Moleküle können auch die Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine und Produktion von Enzymen mit immunsuppressiver Wirkung eine „Immunflucht“ begünstigen (212).

Generell hätten wir besonders bei den Rezidiven eine verminderte Expression von den NCRs erwartet (153, 155, 166, 167). Aufgrund der Fallzahl von n=2 in der prospektiven Analyse war hier jedoch keine valide Aussage zu generieren und für keinen der beiden Patienten war eine auffallend niedrige Expression zu beobachten.

Umgekehrt könnte die verstärkte Expression aktivierender Rezeptoren bei Patienten mit GvHD miterklärend für das geringere Rezidivrisiko dieser Patienten sein. Weitere funktionelle Untersuchungen sind nötig, um dies zu bestätigen.

Am auffälligsten verhält sich jedoch die Expression von NKG2C. Hier war im Gegensatz zu den anderen Rezeptoren mit der Zeit eine Zunahme der Expression zu verzeichnen. Dies kann durchaus auf die zunehmende Ausreifung der NK-Zellen zurückzuführen sein, da NKG2C vornehmlich auf reifen NK-Zellen exprimiert wird (213). Dies ist in Kongruenz mit der niedrigeren Expression von NKG2C bei Patienten mit GvHD, welche einen größeren Anteil unreifer NK-Zellen hatten.

Hinzu könnte die vielfach beschriebene Expansion von NKG2C+ NK-Zellen bei Virusreaktivierung nach stattgehabter CMV-Infektion kommen (90) (177). Die Expansion dieser NKG2C+ NK-Zellen im Rahmen einer CMV-Reaktivierung wurde mit einem geringeren Rezidivrisiko assoziiert (180). Umso interessanter ist die Tatsache, dass die Expression von NKG2C bei unseren Rezidiven am niedrigsten war. Bei der kleinen Fallzahl von n=2 benötigt dies jedoch eine Bestätigung in einer größeren Zahl von Rezidiven.

Aufgrund der frühen Virusreaktivierungen und der daher retrospektiven Analyse in Bezug auf diese Fragestellung konnten wir den Effekt der Reaktivierungen auf die NKG2C-Expression leider nicht genauer untersuchen. Zusätzlich konnten wir keinen Unterschied zwischen den drei Patienten ohne Virusreaktivierung im Vergleich zu den Übrigen in Bezug auf die Expression von NKG2C beobachten.

So könnte die vergleichsweise geringe Expression des aktivierenden NKG2C bei Patienten mit GvHD durchaus zu einer eingeschränkten Aktivierbarkeit und Kontrolle von NK-Zellen gegenüber alloreaktiven T-Zellen und dendritischen Zellen beitragen.

Dies steht in Einklang mit Ergebnissen von Kordelas et al., welche NKG2C und NKG2A isoliert betrachteten und eine signifikante Reduktion von NKG2C bei Patienten mit schwerer cGvHD gegenüber Patienten mit milder bzw. ohne GvHD zeigten (214) und im nächsten Abschnitt genauer diskutiert werden.

## **5.4.2. Gesteigerte Expression inhibitorischer Rezeptoren bei Patienten mit Komplikation**

Für die inhibitorischen Rezeptoren konnten wir die prägnantesten Unterschiede bei Patienten mit einer Komplikation im Vergleich zu denen ohne Komplikation beobachten.

Die Bedeutung von NKG2A im Zusammenhang der aGvHD ist bisher mit unterschiedlichen Ergebnissen vor allem zu früheren Zeitpunkten nach Transplantation untersucht worden.

Hu et al. evaluierten die Expression von NKG2A früh nach Transplantation bei 59 haplo-ident transplantierten Patienten. Die erste Analyse erfolgte hier an d30, wobei zu diesem Zeitpunkt noch keiner der Patienten Zeichen einer aGvHD entwickelt hatte. Die zweite und finale Analyse erfolgte an d90. Patienten, welche innerhalb der 90 Tage eine aGvHD entwickelt hatten, wurden für beide Termine der Gruppe der aGvHD zugeordnet.

Die Analyse an d30 war somit vielmehr prospektiver Natur und zeigte eine verminderte Expression von NKG2A bei Patienten, welche später einer aGvHD entwickelten. An d90 war dieser Unterschied zwischen den Gruppen nicht mehr auszumachen (175). Dieser Verlust des Unterschiedes an d90 war auf eine abnehmende Expression von NKG2A bei Patienten ohne GvHD zurückzuführen, während die Expression bei Patienten mit aGvHD unverändert blieb.

Kordelas et al. untersuchten die Expression von NKG2C und NKG2A über einen Zeitraum von einem Jahr prospektiv. Etwa die Hälfte der Patienten in dieser Studie waren mit einem HLA-Mismatch transplantiert, der Rest HLA-ident. Im Verlauf zeigte sich hier für NKG2A kein Unterschied in der Expression zwischen Patienten mit GvHD und Patienten ohne GvHD. Allerdings beobachteten sie, dass im Verlauf bei den HLA-mismatch Transplantierten das Verhältnis der Expression von NKG2C/NKG2A bei Patienten mit schwerer GvHD zugunsten von NKG2A verschoben war (214). Zudem zeigen die Daten von Kordelas et al., dass die Expression von NKG2A unabhängig von Komplikationen im Verlauf der 12 Monate progredient abnahm.

Bei unseren retrospektiven Daten fällt die höchste Expression von NKG2A bei Patienten mit aGvHD auf. Dies könnte durch einen zeitlichen Bias mitbedingt sein, da die Probensammlung bei Patienten mit aGvHD am frühesten nach Tx erfolgte und mehrere Studien zeigen konnten, dass NKG2A in erster Linie auf unreifen NK-Zellen exprimiert wird (140, 174). Diese Hypothese konnten wir weiter bekräftigen, indem wir

in der prospektiven Analyse zeigen konnten, dass die Expression von NKG2A früh nach Transplantation am höchsten war und im weiteren Verlauf abnahm.

Die Daten von Hu et al. hatten Hinweise darauf geliefert, dass die Expression von NKG2A bei Patienten mit aGvHD nach Transplantation im Verlauf nicht abfiel, während Kordelas et al. über die Zeit eine Verschiebung des Verhältnisses der Expression von NKG2A zu NKG2C zugunsten von NKG2A beschrieben. Die Ergebnisse der beiden Studien wären durch eine Retention von NKG2A auf der Oberfläche von NK-Zellen bei Patienten mit GvHD zu erklären. Diese Vermutung scheinen unsere prospektiven Daten zu bestätigen.

Bei den Patienten ohne Komplikation war eine stetige Abnahme der Expression von NKG2A bis nahezu auf das Level der gesunden Kontrollen an d150 zu beobachten. Bei den Patienten mit Komplikation verlief dieser Prozess deutlich verzögert ab und sie zeigten noch an d200 eine erhöhte Expression.

Im Kontext der oben beschriebenen niedrigeren Expression von NKG2C könnte eine verstärkte Expression von NKG2A bei diesen Patienten durchaus zu einer gestörten NK-Zell Funktion beitragen. Bei diesem Expressionsverhältnis werden die NK-Zellen durch HLA-E eher inhibiert, sodass die Reaktivität gegenüber HLA-E exprimierenden Zellen reduziert wird. Im Kontext der GvHD könnte so eine verminderte Reaktivität gegenüber dendritischen Zellen und T-Lymphozyten von pathophysiologischer Bedeutung sein.

Hier werden weitere funktionelle Tests benötigt, um zu klären welche Faktoren einer GvHD diese Veränderungen bewirken und welchen Einfluss dies auf die Proliferation alloreaktiver T-Zellen hat.

Bei den Rezidiven beobachteten wir in der retrospektiven Analyse die größte Streuung in Bezug auf die Expression von NKG2A. So könnte bei den drei Rezidiv-Patienten mit einer deutlich erhöhten Expression von NKG2A diese durchaus Ursache für eine eingeschränkte Funktionalität der NK-Zellen sein.

In der prospektiven Analyse zeigten die beiden Rezidiv-Patienten eine durchweg hohe Expression von NKG2A. In Anbetracht der starken Streuung in der retrospektiven Analyse erlaubt diese kleine Fallzahl jedoch keine Hypothese zur Bedeutung von NKG2A im Kontext des Rezidivs.

Die Bedeutung von Tigit auf NK-Zellen in Bezug auf GvHD und Rezidiv nach HSZT ist bisher noch nicht stark erforscht worden. Als Immuncheckpoint (193) könnte ihm allerdings eine besondere Bedeutung in der Pathophysiologie dieser Immunpathologien zukommen.

Umso interessanter ist unsere Beobachtung, dass Tigit in allen Patientengruppen erhöht ist und Patienten mit einer cGvHD mit einer besonders starken Expression herausstechen. Die stärkste Expression von Tigit war auf den reifen CD56dimCD16+ NK-Zellen zu beobachten, sodass die Expression von Tigit wahrscheinlich vor allem Einfluss auf direkte zytotoxische Wirkungen der NK-Zellen hat. Zudem konnten wir zeigen, dass diese verstärkte Expression der Entstehung der cGvHD vorausgeht, da sie schon an d50 und d100 zu verzeichnen war.

Diese veränderte Expression könnte aufgrund einer alterierten Interaktion mit dendritischen Zellen und alloreaktiven T-Zellen erhebliche Einflüsse auf zugrundeliegende immunologische Prozesse haben (191). Olson et al. konnten zeigen, dass Spender-NK-Zellen die Proliferation von Spender-T-Zellen auf vielfältige Art beeinflussen können und zwar unter anderem auch durch eine direkte Lyse der T-Zellen (10).

Des Weiteren ist die Aktivierung von T-Zellen durch APCs ein zentraler anerkannter Schritt in der pathophysiologischen Kaskade der GvHD. Ein wesentlicher GvHD limitierender Effekt wird den NK-Zellen daher durch die Elimination von APCs zugeschrieben (139). Mit PVR ist ein entsprechender Ligand für Tigit auf dendritischen Zellen bereits bekannt (139) und man kann daher davon ausgehen, dass eine vermehrte Expression von Tigit auf NK-Zellen die Lyse dendritischer Zellen einschränkt. Während ein solcher Ligand auf T-Zellen noch nicht identifiziert ist, konnte eine vermehrte Expression von PVR auf bestimmten Tumorzellen nachgewiesen werden (194, 215). Dies unterstreicht die mögliche Bedeutung einer verstärkten Expression von Tigit im Kontext des Rezidivs.

Die Tatsache, dass Tigit besonders bei Patienten mit chronischer GvHD, aber weniger mit akuter GvHD, erhöht ist, legt nahe, dass Tigit weitere immunregulatorische Mechanismen von NK-Zellen einschränkt. So wäre es interessant zu sehen, ob weitere Zellen, welche speziell bei der chronischen GvHD eine Rolle spielen - wie etwa Th17-Zellen oder B-Zellen- Liganden für Tigit exprimieren.

Diese verstärkte Expression der inhibitorischen Rezeptoren NKG2A und Tigit und die verminderte Expression von aktivierendem NKG2C bei Patienten mit GvHD und deren mögliche Konsequenzen für die Interaktion zwischen NK-Zellen und dendritischen

Zellen beziehungsweise T-Zellen ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.

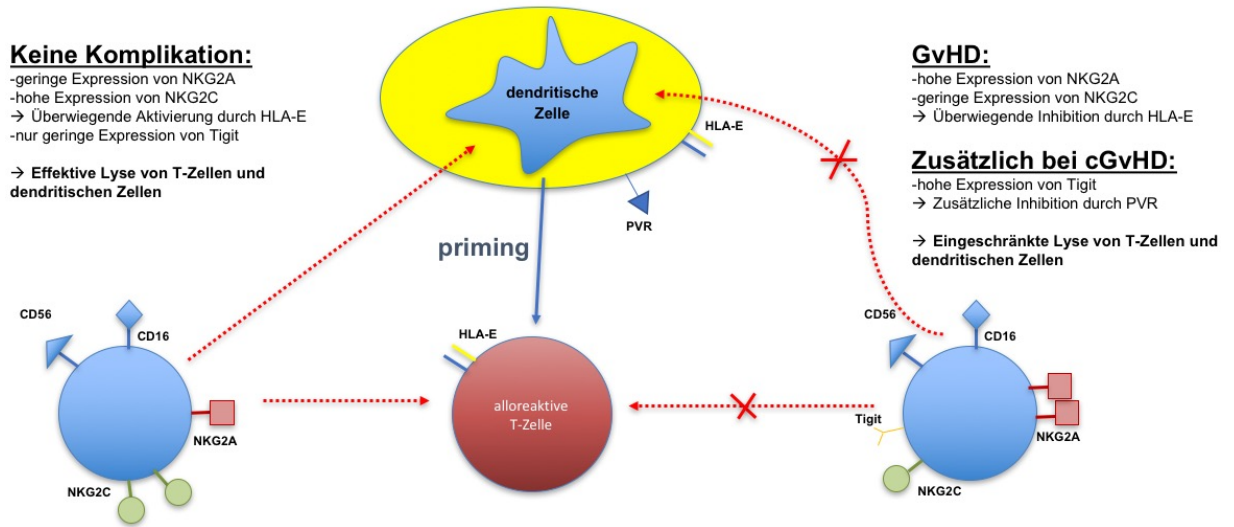


Abb. 86 zeigt schematisch die veränderte Expression von Tigit, NKG2A und NKG2C bei Patienten mit GvHD und deren mögliche Einflüsse auf die Interaktion zwischen NK-Zellen und dendritischen Zellen beziehungsweise T-Zellen.

### **5.4.3. CD62L ist auf NK-Zellen von Patienten mit cGvHD signifikant reduziert**

Die Bedeutung von CD62L auf NK-Zellen im Kontext der Entstehung von GvHD und Rezidiv ist bisher nicht erforscht, allerdings ist CD62L von zentraler Bedeutung für Lymphozyten, um in Lymphknoten und Orte eines Entzündungsgeschehens einzuwandern (216).

Wir beobachteten in beiden Analysen, dass auch die Expression von CD62L im Rahmen der Transplantation hochreguliert wird.

Die präferentielle Expression auf CD56bright NK-Zellen und die damit mögliche besondere Bedeutung für die frühe Extravasation von CD56bright NK-Zellen zur Initiierung und Modulation von Immunantworten sind bereits diskutiert worden (128).

Allerdings fiel bei Patienten mit einer GvHD eine geringer ausgeprägte Erhöhung als bei Patienten ohne Komplikation auf.

Diese geringere Expression von CD62L bei Patienten mit GvHD könnte das inflammatorische Geschehen einer GvHD vielfach beeinflussen.

So könnte ein eingeschränktes Eindringen von NK-Zellen an Orte des Entzündungsgeschehens in einer verzögerten Pathogenabwehr und damit einem größeren Barrierschaden resultieren, welcher als einer der initialen Schritte der GvHD-Entstehung angesehen wird (217-219).

In der Folge könnte es zu einer vermehrten Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen kommen. Die GvHD-präventive Lyse von APCs (139) wäre durch den lokalen Mangel an NK-Zellen zusätzlich eingeschränkt und eine verstärkte Aktivierung alloreaktiver T-Zellen möglich.

Zudem sind CD56dim NK-Zellen, welche kein CD62L exprimieren, in ihrem Ansprechen auf Zytokine eingeschränkt (189) und können ihre immunregulatorischen Funktionen daher möglicherweise nicht adäquat ausführen.

Auf der anderen Seite könnte eine eingeschränkte Extravasation, bedingt durch die niedrige Expression von CD62L bei Patienten mit GvHD, miterklärend für den größeren Anteil von CD56bright NK-Zellen, welche normalerweise die höchste CD62L-Expression aufweisen, im Blut dieser Patienten sein.

Die möglichen Konsequenzen einer niedrigen Expression von CD62L werden in Abbildung 87 schematisch zusammengefasst.



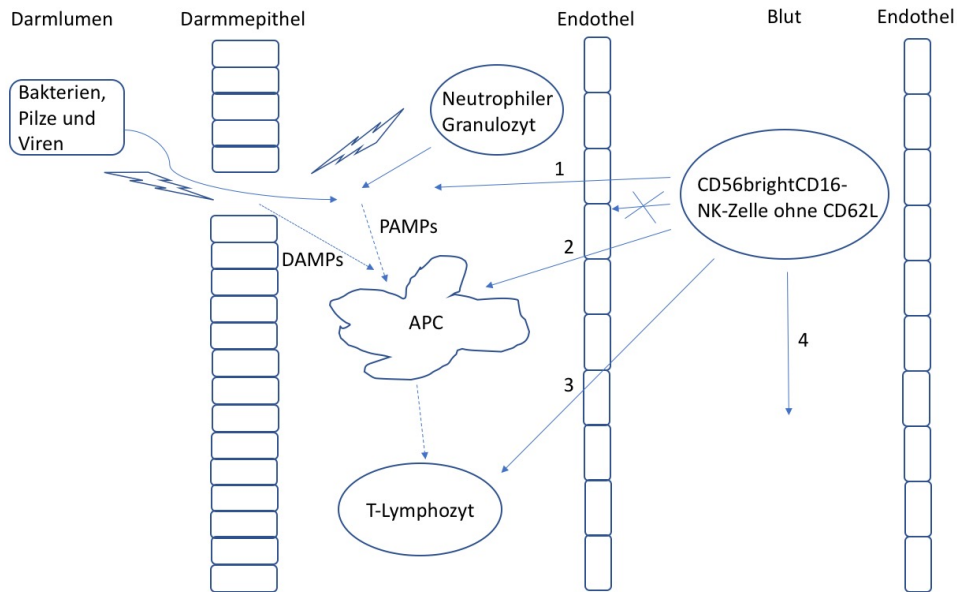


Abb. 87 zeigt schematisch am Beispiel der Darmmukosa, wie eine verminderte Expression von CD62L auf NK-Zellen das inflammatorische Geschehen beeinflussen kann. Das Entzündungsgeschehen wird durch Pathogene aus dem Darmlumen initiiert wenn diese das Epithel schädigen und in die Mukosa eindringen. Nun kann es über Pathogen associated molecular patterns (z.B. Lipopolysaccharid) zu einer direkten Aktivierung von APCs kommen. Zudem unterliegen die Pathogen der Abwehr durch Immunzellen wie z.B. Neutrophile Granulozyten, welche durch Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies eine weitere Gewebeschädigung verursachen können. Durch die Gewebeschädigung werden Damage associated molecular patterns freigesetzt (z.B. Interleukin 33), welche eine direkte Aktivierung von T-Lymphozyten bewirken. Zusätzlich werden die T-Lymphozyten von den aktivierten APCs stimuliert. Dies führt zu einer massiven Stimulation von T-Zellen, welche sich in der Folge gegen Antigene des Empfängers richten können und dadurch alloreaktiv werden. NK-Zellen können in mehrere Schritte dieser Kaskade eingreifen und sie entschleunigen. Folgende Schritte können gestört sein, wenn NK-Zellen aufgrund fehlender Expression von CD62L nicht in das entzündete Gewebe eindringen können:

- 1: NK-Zellen können virale Infektionen nicht adäquat kontrollieren, was potentiell zu einem größeren Gewebeschaden führen kann.
2. NK-Zellen können die gewebeständigen APCs nicht lysieren, welche in der Folge vermehrt T-Lymphozyten stimulieren können.
3. NK-Zellen können die aktivierten und potentiell alloreaktiven T-Zellen im Gewebe nicht erreichen und sie daher nicht lysieren.
4. Aufgrund der gestörten Extravasation akkumulieren CD56brightCD16- NK-Zellen im Blut.

## **5.6. Prednisolon und Tacrolimus beeinflussen Expression der Rezeptoren nicht**

Unser funktioneller Test zur Untersuchung des Einflusses von Immunsuppressiva auf die Markerexpression sollte ausschließen, dass die beobachteten Veränderungen der Markerexpression in der retrospektiven Analyse durch den Einsatz dieser Medikamente im Rahmen der Transplantation bedingt ist.

Für fast alle Rezeptoren konnten wir zeigen, dass es zumindest nach einer dreistündigen Inkubation mit Prednisolon und/oder Tacrolimus in-vitro zu keinen relevanten Veränderungen kommt.

Allerdings verursachte Kortison eine verminderte Expression von CD62L. Da eine GvHD in der Regel akut mit Kortison therapiert wird, könnte dies miterklärend für die niedrigere Expression von CD62L bei Patienten mit GvHD gegenüber den Patienten mit Rezidiv sein.

Die oben erläuterten möglichen Einflüsse einer verminderten Expression von CD62L auf immunregulatorische Funktionen der NK-Zellen könnten jedoch auch eine Rolle bei steroidrefraktären Verläufen einer GvHD spielen.

Bestätigungen dieser Beobachtung - besonders an Patientenproben - und funktionelle Tests sind nötig, um den Einfluss von Kortison auf die Expression von CD62L zu sichern und dessen Konsequenzen zu definieren.

Alle Patienten in unserer prospektiven Studie erhielten im Rahmen der Konditionierung ATG, sodass hierdurch ein uniformer Einfluss für die einzelnen Patienten in unserem Kollektiv zu erwarten war. Daher ist es unwahrscheinlich, dass ATG für die beobachteten Veränderungen der Markerexpression verantwortlich ist, und dessen Effekt auf die Markerexpression wurde nicht explizit untersucht.

Allerdings hat die Verwendung von ATG in der Konditionierung in unserem Kollektiv sicherlich Einfluss auf die Vergleichbarkeit unserer Daten mit denen anderer Studien. So gibt es Daten die zeigen, dass ATG neben der Rekonstitution von NK-Zellen (203) auch deren Rezeptorexpression und Funktionalität beeinflusst (220).

## **5.7. CMV- und EBV-Reaktivierung verursachen keine charakteristischen Veränderungen der Markerexpression**

NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort im Rahmen von viralen Infektionen (87). Daher erwarteten wir Unterschiede in der Expression von Oberflächenmarkern zwischen Patienten, welche keine Virusreaktivierung entwickelten, und solchen, welche von einer Reaktivierung von CMV oder EBV betroffen waren.

Tatsächlich konnten wir für keinen der von uns untersuchten Rezeptoren charakteristische Veränderungen zwischen den beiden Gruppen ausmachen.

Auch eine Zunahme von NKG2C<sup>+</sup> NK-Zellen wie sie zuvor von Foley et al. beschrieben wurde (90) konnten wir in unserem Kollektiv nicht beobachten. In der Studie von Foley et al. erhielten die Patienten fast ausschließlich Stammzellen aus Nabelschnurblut was eine überwiegende CMV-Naivität der Spenderzellen nahelegt und daher alleine erklärend für die unterschiedlichen Beobachtungen sein könnte. Zudem ereignete sich der überwiegende Anteil von Virusreaktivierungen in unserem Kollektiv vor d50 pTx, sodass wir keinen Mittelwert für die Expression von NKG2C vor Reaktivierung aufstellen konnten. So ist eine Zunahme der Expression von NKG2C nach Reaktivierung nicht ausgeschlossen, auch wenn sich die Expression zwischen den beiden Gruppen im Verlauf nicht eindeutig unterscheidet. Hinzu kommt, dass die Patienten in der Studie von Foley et al. (90) eine einheitliche antivirale Therapie mit Ganciclovir erhielten, während bei uns auch Foscavir, Valganciclovir und Cidofovir zum Einsatz kamen.

Auch für die NCRs, welche bei anderen viralen Infektionen eine Rolle spielen (147, 148), konnten wir keine richtungsweisenden Veränderungen bei EBV- und CMV-Reaktivierungen feststellen. Dies könnte durch die relativ kleine Fallzahl von Patienten ohne Reaktivierung (n=3), aber vor allem auch aufgrund einer Überlagerung durch die anderen Komplikationen, bedingt sein. Folglich scheint eine isolierte Betrachtung der Reaktivierung unter Ausschluss anderer Komplikationen nötig, um eine Bedeutung der untersuchten Marker ausschließen zu können.

## **5.8. Keine signifikante Einschränkung von Degranulation und Zytokinproduktion bei Patienten mit Komplikation**

Ziel unserer Degranulations - und Zytokinfreisetzungssassays war es, die Veränderungen der Markerepression zwischen den einzelnen Patienten-Gruppen mit Veränderungen der Funktionalität der NK-Zellen zu korrelieren.

Die Tests erlaubten uns die spontane Aktivität, die Aktivierbarkeit durch Tumorzellen mit HLA-Verlust (K562) und die maximale Kapazität zur Sezernierung von Ifn- $\gamma$  und zytotoxischen Degranulation zu vergleichen.

Die Fähigkeit zur Produktion von Ifn- $\gamma$  und Degranulation von NK-Zellen nach HSZT ist 2011 bereits von Foley et al. untersucht worden (221). Hier wurden diese Funktionen von NK-Zellen nach Transplantation von T-Zell-depletierten, nicht-T-Zell-depletierten und Grafts aus Nabelschnurblut mit NK-Zellen des Spenders verglichen. Nach Inkubation mit K562 zeigte sich die Degranulation nur nach den nicht-T-Zell-depletierten Transplantationen eingeschränkt, während sie nach Transplantation von Nabelschnurblut sogar erhöht war. Dagegen zeigte sich die Produktion von Ifn- $\gamma$  nach Stimulation mit K562 in allen Gruppen nach HSZT vermindert. Auf Stimulation mit IL-12 und IL-18 hin war sie jedoch uneingeschränkt.

Zudem konnten Foley et al. herausfinden, dass diese eingeschränkte Produktion von Ifn- $\gamma$  mit einer fehlenden Expression von KIRs korrelierte. Wie in der Literaturdiskussion bereits beschrieben, ist das Erkennen von eigenen MHC-Molekülen über NKG2A oder KIRs Voraussetzung für die „Lizensierung“ von NK-Zellen während deren Reifung (135). In der Arbeit von Foley et al. war eine alleinige Expression von NKG2A ausreichend, um NK-Zellen zu einer adäquaten Zytotoxizität, aber nicht Ifn- $\gamma$ -Produktion, zu „lizensieren“ (221).

In unserer Studie war die Expression von Ifn- $\gamma$  von NK-Zellen ohne Stimulus bei Patienten höher als bei den buffycoats. Dies spiegelt die ausgeprägte Aktiviertheit der NK-Zellen nach Transplantation wider und verdeutlicht deren mögliche immunregulatorische Bedeutung.

Die niedrige Expression von CD107-a in Ruhe zeigt jedoch, dass es nicht zu einer spontanen Degranulation kommt.

Auffallend war hier jedoch die starke spontane Aktivität der NK-Zellen von Patienten mit einem Rezidiv. Dies könnte auf eine bereits in-vivo stattgefundenene Aktivierung der NK-Zellen durch Blasten zurückzuführen sein. Allerdings wäre auch eine

Kontamination des Tests durch Blasten möglich. Wir verwendeten zur Isolation eine Negativselektion. Diese richtet sich gegen Antigene, welche von PBMCs, die keine NK-Zellen sind, exprimiert werden. Wenn die Blasten keines dieser Antigene exprimieren, unterwandern sie diese Selektion, sodass sie mit in den Testansatz gelangen und dort eine ungewollte Stimulation der NK-Zellen verursachen können.

Die Ergebnisse der Inkubation mit K562-Zellen war sicherlich für die Fälle der Rezidive am interessantesten. Hier konnten wir beobachten, dass deren NK-Zellen die stärkste Aktivität in Bezug auf Degranulation und Zytokinproduktion aus den Patientengruppen zeigten. Dies könnte ebenfalls aus einer bereits in-vivo erfolgten Aktivierung und Adaptation resultieren. Anhand dieser Daten kann eine stärkere Zytotoxizität von NK-Zellen jedoch nicht für das geringere Rezidivrisiko von Patienten mit GvHD (222, 223) verantwortlich gemacht werden.

Allerdings ist zu erkennen, dass keine der Patientengruppen so gut degranuliert wie die buffycoats. Dies würde bedeuten, dass trotz der in dieser Arbeit angenommenen gesteigerten Aktivität von NK-Zellen nach Transplantation deren zytotoxische Aktivität gegenüber AML-Zellen eingeschränkt ist. Dies entspricht nicht den Ergebnissen von Foley et al., welche eine uneingeschränkte Degranulation von NK-Zellen nach HSZT nach Kontakt zu K562 zeigten (221). Hier könnte neben dem Bestehen von Komplikationen, zu welchen in der Arbeit von Foley et al. keine Angaben gemacht wurden, auch die unterschiedlichen Testansätze eine Erklärung sein: Foley et al. inkubierten PBMCs mit K562, während wir isolierte NK-Zellen verwendeten. Die Präsenz von anderen involvierten Lymphozyten könnte die Degranulation der NK-Zellen maßgeblich beeinflussen.

Einen entscheidenden Einfluss könnte hier auch der deutlich größere Anteil reifer CD56dimCD16+ NK-Zellen an der NK-Zell-Gesamtpopulation bei den buffycoats (Mittelwert: 90,9%) gegenüber den Patienten (aGvHD: 59,2%, cGvHD 61,7%, Rezidiv: 53,9%, keine Komplikation: 55,9%) haben. Schließlich gelten diese reifen NK-Zellen als die primär zytotoxische Subpopulation mit voll ausgebildeter KIR-Expression, welche bei Kontakt mit K562 mit fehlender HLA-Expression am besten degranulieren sollten. Hier sind Testansätze mit einer größeren Anzahl NK-Zellen nötig, um die Subgruppen einzeln vergleichen zu können.

Bei Betrachtung der Positiv-Kontrolle fällt jedoch auf, dass die Kapazität zur Degranulation insgesamt bei den Patienten gegenüber den buffycoats erhöht ist. Auch wenn die Stimulation der NK-Zellen hier unabhängig von Oberflächenrezeptoren erfolgt, stünde dies in Einklang mit der Beobachtung, dass es zumindest in Form der

Rezeptorexpression zu einer Adaptation der NK-Zellen nach Transplantation kommt. Diese Adaptation sollte die Funktionalität der NK-Zellen eher steigern, da sie längere Zeit das Fehlen anderer Lymphozyten kompensieren müssen. So konnten Dulphy et al. in ihrer zuvor bereits erwähnten Arbeit zeigen, dass NK-Zellen im Rahmen erhöhter IL-15 Spiegel nach Transplantation einen erhöhten Gehalt an Perforinen aufweisen (198).

So ist in Zusammenschau der genannten Beobachtungen festzustellen, dass die NK-Zellen von den Patienten nach Transplantation zwar eine gesteigerte Kapazität zur Degranulation besitzen, diese aber zumindest gegenüber K562 nicht zum Ausdruck bringen können.

Dem gegenüber steht die insgesamt eher verminderte Kapazität der Sekretion von Ifn- $\gamma$  bei den Patienten gegenüber den buffycoats in der Positiv-Kontrolle.

Hier passen unsere Ergebnisse zu den von Foley et al. beschriebenen. Zusätzlich zu der von Foley et al. beschriebenen verminderten Produktion von Ifn- $\gamma$  nach Inkubation mit K562 beobachteten wir diese auch bei der Positivkontrolle, was ebenfalls den oben genannten methodischen Unterschieden geschuldet sein könnte.

Letztlich ist die Fallzahl bei den funktionellen Tests zu klein, um hier charakteristische und signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen festzumachen. Vor dem Hintergrund, dass sich in allen Patientengruppen eine schlechte Funktionalität gegenüber K562 verglichen mit den gesunden Kontrollen zeigte und dies zumindest in Bezug auf die Degranulation nicht durch eine global eingeschränkte Funktion zu erklären ist, sind weiterhin gestörte Zell-zu-Zell Interaktionen als ursächlich anzunehmen. Eine Untersuchung einzelner Rezeptoren wäre hier eventuell zielführender. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wäre es allerdings nötig für alle untersuchten Rezeptoren Antikörper mit demselben Fluorochrom zur Verfügung zu haben. Dann wäre es möglich für jeden Rezeptor die Expression von Ifn- $\gamma$  und CD107-a mit demselben Antikörper nachzuweisen.

Eine zytotoxische Wirkung gegenüber APCs oder alloreaktiven T-Zellen lässt sich mit diesem Testansatz leider nicht evaluieren und wäre für die Fälle der GvHD bestimmt deutlich interessanter zu untersuchen.

## 6. Zusammenfassung

Diese Arbeit hatte das Ziel eine Phänotypisierung von NK-Zellen bei Patienten mit myeloischen Neoplasien mit hohem Rezidiv-Risiko nach allogener Stammzelltransplantation vorzunehmen und etwaige Auffälligkeiten im Phänotyp mit der Entstehung von GvHD und Rezidiv in Verbindung zu setzen.

Wir konnten zeigen, dass es im Rahmen der Transplantation bei allen betrachteten Markern unabhängig von der zugrundeliegenden Komplikation zu ausgeprägten Veränderungen der Expression auf NK-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen kommt.

Mit Ausnahme von Nkp30 zeigte sich die Expression aller von uns untersuchten Rezeptoren in jeder Patientengruppe nach Auftreten der Komplikationen erhöht.

Dies verdeutlicht den hohen Anpassungsdruck, welchem die Zellen hier unterliegen, und legt nahe, dass eine unzureichende Adaptation an der Entstehung von Komplikationen beteiligt sein kann. Mögliche zugrundeliegende Mechanismen dieser Anpassung, wie virale Infektionen oder erhöhte Spiegel bestimmter Zytokine, sind für einzelne Rezeptoren bereits identifiziert worden.

So konnten wir beobachten, dass die verstärkte Expression der aktivierenden Rezeptoren durch die Transplantation an sich hervorgerufen wird. Ein Korrelat der retrospektiv beobachteten verminderten Expression von Nkp30 konnten wir prospektiv nicht beobachten und auch für die übrigen aktivierenden Rezeptoren konnten wir keine bedeutenden Unterschiede zwischen den Patientengruppen ausmachen.

Das ausschließlich prospektiv untersuchte NKG2C zeigte einen gänzlich anderen Verlauf. Hier war bei Patienten ohne Komplikation erst im Verlauf nach HSZT eine Zunahme der Expression zu beobachten, während diese bei Patienten mit Komplikation vergleichsweise niedrig blieb.

Charakteristische Unterschiede zwischen den Patientengruppen ließen sich vor allem bei den inhibitorischen Rezeptoren beobachten. NKG2A als funktioneller Gegenspieler zu NKG2C war zwar ebenfalls in allen Gruppen unmittelbar nach HSZT erhöht, aber zeigte sich bei Patienten ohne Komplikation ab d150 etwa auf dem Level der gesunden Kontrollen. Patienten mit Komplikation wiesen noch darüber hinaus eine verstärkte Expression dieses inhibitorischen Rezeptors auf.

Für Tigit konnten wir eine besondere Bedeutung bei der cGvHD beobachten, da es sich bei diesen Patienten sowohl retrospektiv als auch prospektiv außerordentlich erhöht zeigte.

Auch für CD62L konnten wir eine allgemeine Hochregulierung nach HSZT beobachten, welche aber bei Patienten mit GvHD weniger ausgeprägt war als bei Patienten ohne Komplikation. Für Patienten mit cGvHD war dieser Unterschied auch statistisch signifikant und könnte weitreichende Folgen für die Verteilung von NK-Zellen innerhalb des Organismus und der Teilhabe an inflammatorischen Prozessen haben.

Ein wesentlicher Grund für die veränderte Markerexpression ist sicherlich der veränderte Reifestatus und die zunehmende Ausreifung der NK-Zellen nach HSZT. Wir konnten die bereits vielfach beschriebene rasche Rekonstitution absoluter NK-Zell-Zahlen nach Transplantation bestätigen, aber eine differenzielle Verteilung der Subpopulation zwischen den Patientengruppen beobachten.

Patienten ohne Komplikation hatten früh nach Transplantation einen großen Anteil unreifer NK-Zellen während sich die Verhältnisse im Verlauf zugunsten der reifen NK-Zellen verschoben.

Patienten mit aGvHD wiesen deutlich verlängert eine Verschiebung der Verhältnisse zugunsten der unreifen NK-Zellen auf.

Patienten mit cGvHD hatten früh nach Transplantation einen deutlich kleineren Anteil unreifer NK-Zellen, welcher im weiteren Verlauf in einem kleineren Anteil reifer NK-Zellen und NK-Zellen insgesamt an den Lymphozyten resultierte.

Für Virusreaktivierungen konnten wir keinen Effekt auf die Expression von Oberflächenmarkern nachweisen, wie er zuvor in anderen Arbeiten beschrieben wurde. Dennoch widersprechen unsere Ergebnisse nicht zwangsläufig den vorausgegangenen Arbeiten, da unsere Analyse in Bezug auf diese Fragestellung eher retrospektiver Natur war und wir eine große Interferenz durch die anderen Komplikationen hatten.

Auch wenn wir hierfür nur einen Test durchführten, haben wir zeigen können, dass die im Rahmen der HSZT verwendeten Immunsuppressiva zumindest in-vitro nicht für die von uns beobachteten Markerveränderungen verantwortlich gemacht werden können. Bezüglich der Funktionalität von NK-Zellen konnten wir mit unserer kleinen Fallzahl keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen ausmachen. Allerdings konnten wir beobachten, dass die Kapazität zur Degranulation nach HSZT global eher verbessert erscheint. Jedoch konnten die Patientenzellen dieses Potential zumindest gegenüber K562 nicht zum Ausdruck bringen.

Auffällig war zudem eine im Vergleich zu den gesunden Kontrollen erhöhte spontane Produktion von  $\text{Ifn-}\gamma$  in allen Patientengruppen. Diese wurde durch den Kontakt zu



K562 supprimiert und auch die maximale Kapazität in der Positivkontrolle war im Vergleich zu den gesunden Kontrollen wiederum vermindert.

Unsere Arbeit bestätigt somit, dass es durch die Transplantation an sich zu Veränderungen der Zusammensetzung der Subpopulationen der NK-Zellen und auch deren Markereexpression kommt.

Wir konnten zudem zeigen, dass bei Patienten mit aGvHD und cGvHD charakteristische Unterschiede zu Patienten ohne Komplikation auftreten.

Diese Veränderungen bedürfen einer weiteren isolierten Betrachtung und genauerer funktioneller Untersuchungen, um ihre pathophysiologische Relevanz bei diesen Komplikationen zu klären.

Für die Rezidive haben wir leider keine hinreichend große Fallzahl erreichen können, um hier mögliche Auffälligkeiten statistisch erkennen zu können.

Die charakteristischen Veränderungen bei Patienten mit GvHD sind noch einmal in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Charakteristische Veränderungen bei GvHD

<b>Komplikation</b>	<b>Veränderung</b>
<b>aGvHD</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Langanhaltende Verschiebung zugunsten CD56brightCD16-</li> <li>• Eher niedrige Expression von CD62L</li> <li>• Länger fortbestehend hohe Expression von NKG2A</li> <li>• Ausbleibender Anstieg der Expression von NKG2C</li> </ul>
<b>cGvHD</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geringer Anteil von CD56brightCD16- früh nach Tx</li> <li>• Kleinster Anteil von NK-Zellen an Lymphozyten später nach Tx</li> <li>• Stärkste Expression von Tigit</li> <li>• Eher niedrige Expression von CD62L</li> <li>• Länger fortbestehend hohe Expression von NKG2A</li> <li>• Ausbleibender Anstieg der Expression von NKG2C</li> </ul>

Mit weiteren Untersuchungen, um die Ursache dieser Veränderungen und deren Auswirkungen auf die Funktionalität der NK-Zellen zu klären, hoffen wir zu einer Weiterentwicklung der Zelltherapie bei der AML beitragen zu können.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Ali S, Kjekken R, Niederlaender C, Markey G, Saunders TS, Opsata M, et al. The European Medicines Agency Review of Kymriah (Tisagenlecleucel) for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia and Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Oncologist*. 2020;25(2):e321-e7.
2. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;372(21):2018-28.
3. Barnes DW, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J*. 1956;2(4993):626-7.
4. Hilgendorf I, Greinix H, Halter JP, Lawitschka A, Bertz H, Wolff D. Long-term follow-up after allogeneic stem cell transplantation. *Dtsch Arztebl Int*. 2015;112(4):51-8.
5. Flowers ME, Parker PM, Johnston LJ, Matos AV, Storer B, Bensinger WI, et al. Comparison of chronic graft-versus-host disease after transplantation of peripheral blood stem cells versus bone marrow in allogeneic recipients: long-term follow-up of a randomized trial. *Blood*. 2002;100(2):415-9.
6. Rautenberg C, Germing U, Haas R, Kobbe G, Schroeder T. Relapse of Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Stem Cell Transplantation: Prevention, Detection, and Treatment. *Int J Mol Sci*. 2019;20(1).
7. Wingard JR, Majhail NS, Brazauskas R, Wang Z, Sobocinski KA, Jacobsohn D, et al. Long-term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2011;29(16):2230-9.
8. Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol*. 1975;5(2):117-21.
9. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. 1990;11(7):237-44.
10. Olson JA, Leveson-Gower DB, Gill S, Baker J, Beilhack A, Negrin RS. NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood*. 2010;115(21):4293-301.
11. Gupta G, Singh R, Kotasthane DS, Kotasthane VD. Myelodysplastic syndromes/neoplasms: recent classification system based on World Health Organization Classification of Tumors - International Agency for Research on Cancer for Hematopoietic and Lymphoid Tissues. *J Blood Med*. 2010;1:171-82.
12. Neukirchen J, Schoonen WM, Strupp C, Gattermann N, Aul C, Haas R, et al. Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Dusseldorf MDS-registry. *Leuk Res*. 2011;35(12):1591-6.
13. Aleshin A, Greenberg PL. Molecular pathophysiology of the myelodysplastic syndromes: insights for targeted therapy. *Blood Adv*. 2018;2(20):2787-97.
14. Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2009;361(19):1872-85.
15. Malcovati L, Hellstrom-Lindberg E, Bowen D, Ades L, Cermak J, Del Canizo C, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*. 2013;122(17):2943-64.
16. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Sole F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120(12):2454-65.
17. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994;367(6464):645-8.

18. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Mollgard L, Stockelberg D, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*. 2009;113(18):4179-87.
19. Southam CM, Craver LF, Dargeon HW, Burchenal JH. A study of the natural history of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions. *Cancer*. 1951;4(1):39-59.
20. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.
21. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-47.
22. Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2019 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2018;93(10):1267-91.
23. Ljungman P, Bregni M, Brune M, Cornelissen J, de Witte T, Dini G, et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45(2):219-34.
24. Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M, Devries MJ, et al. Successful Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Man: Chimerism, Induced Specific Tolerance and Possible Anti-Leukemic Effects. *Blood*. 1965;25:179-96.
25. Howard CA, Fernandez-Vina MA, Appelbaum FR, Confer DL, Devine SM, Horowitz MM, et al. Recommendations for donor human leukocyte antigen assessment and matching for allogeneic stem cell transplantation: consensus opinion of the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network (BMT CTN). *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(1):4-7.
26. Thomas ED, Lochte HL, Jr., Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*. 1957;257(11):491-6.
27. van Rood JJ. The detection of transplantation antigens in leukocytes. *Semin Hematol*. 1968;5(2):187-214.
28. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood*. 1995;86(5):2041-50.
29. Hatzimichael E, Tuthill M. Hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells Cloning*. 2010;3:105-17.
30. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(3):389-401 e1.
31. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect*. 1966;62:21-78.
32. Loiseau P, Busson M, Balere ML, Dormoy A, Bignon JD, Gagne K, et al. HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13(8):965-74.
33. Hahn T, McCarthy PL, Jr., Zhang MJ, Wang D, Arora M, Frangoul H, et al. Risk factors for acute graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplants for adults with leukemia. *J Clin Oncol*. 2008;26(35):5728-34.
34. Kernan NA, Bartsch G, Ash RC, Beatty PG, Champlin R, Filipovich A, et al. Analysis of 462 transplantations from unrelated donors facilitated by the National Marrow Donor Program. *N Engl J Med*. 1993;328(9):593-602.
35. Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz M, et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes

- of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood*. 2004;104(7):1923-30.
36. Petersdorf EW, Malkki M, O'HUigin C, Carrington M, Gooley T, Haagenson MD, et al. High HLA-DP Expression and Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med*. 2015;373(7):599-609.
  37. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant*. 1995;15(6):825-8.
  38. Couriel DR, Saliba RM, Giralt S, Khouri I, Andersson B, de Lima M, et al. Acute and chronic graft-versus-host disease after ablative and nonmyeloablative conditioning for allogeneic hematopoietic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2004;10(3):178-85.
  39. Wilhelm K, Ganesan J, Muller T, Durr C, Grimm M, Beilhack A, et al. Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat Med*. 2010;16(12):1434-8.
  40. Brennan TV, Lin L, Huang X, Cardona DM, Li Z, Dredge K, et al. Heparan sulfate, an endogenous TLR4 agonist, promotes acute GVHD after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2012;120(14):2899-908.
  41. Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2000;95(9):2754-9.
  42. Jankovic D, Ganesan J, Bscheider M, Stickel N, Weber FC, Guarda G, et al. The Nlrp3 inflammasome regulates acute graft-versus-host disease. *J Exp Med*. 2013;210(10):1899-910.
  43. Matte-Martone C, Liu J, Jain D, McNiff J, Shlomchik WD. CD8+ but not CD4+ T cells require cognate interactions with target tissues to mediate GVHD across only minor H antigens, whereas both CD4+ and CD8+ T cells require direct leukemic contact to mediate GVL. *Blood*. 2008;111(7):3884-92.
  44. van den Brink MR, Burakoff SJ. Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(4):273-81.
  45. Finke J, Bethge WA, Schmoor C, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR, et al. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2009;10(9):855-64.
  46. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, et al. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Engl J Med*. 1986;314(12):729-35.
  47. Ali R, Ramdial J, Algaze S, Beitinjaneh A. The Role of Anti-Thymocyte Globulin or Alemtuzumab-Based Serotherapy in the Prophylaxis and Management of Graft-Versus-Host Disease. *Biomedicines*. 2017;5(4).
  48. Mielcarek M, Furlong T, Storer BE, Green ML, McDonald GB, Carpenter PA, et al. Effectiveness and safety of lower dose prednisone for initial treatment of acute graft-versus-host disease: a randomized controlled trial. *Haematologica*. 2015;100(6):842-8.
  49. Srinivasan M, Flynn R, Price A, Ranger A, Browning JL, Taylor PA, et al. Donor B-cell alloantibody deposition and germinal center formation are required for the development of murine chronic GVHD and bronchiolitis obliterans. *Blood*. 2012;119(6):1570-80.
  50. Wu T, Young JS, Johnston H, Ni X, Deng R, Racine J, et al. Thymic damage, impaired negative selection, and development of chronic graft-versus-host disease caused by donor CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol*. 2013;191(1):488-99.
  51. Cooke KR, Luznik L, Sarantopoulos S, Hakim FT, Jagasia M, Fowler DH, et al. The Biology of Chronic Graft-versus-Host Disease: A Task Force Report from the National

- Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23(2):211-34.
52. Akpek G, Lee SM, Anders V, Vogelsang GB. A high-dose pulse steroid regimen for controlling active chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2001;7(9):495-502.
53. Schmid C, de Wreede LC, van Biezen A, Finke J, Ehninger G, Ganser A, et al. Outcome after relapse of myelodysplastic syndrome and secondary acute myeloid leukemia following allogeneic stem cell transplantation: a retrospective registry analysis on 698 patients by the Chronic Malignancies Working Party of the European Society of Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica*. 2018;103(2):237-45.
54. Vago L, Perna SK, Zanussi M, Mazzi B, Barlassina C, Stanghellini MT, et al. Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2009;361(5):478-88.
55. Christopher MJ, Petti AA, Rettig MP, Miller CA, Chendamarai E, Duncavage EJ, et al. Immune Escape of Relapsed AML Cells after Allogeneic Transplantation. *N Engl J Med*. 2018;379(24):2330-41.
56. Toffalori C, Zito L, Gambacorta V, Riba M, Oliveira G, Bucci G, et al. Immune signature drives leukemia escape and relapse after hematopoietic cell transplantation. *Nat Med*. 2019;25(4):603-11.
57. Park HH, Kim M, Lee BH, Lim J, Kim Y, Lee EJ, et al. Intracellular IL-4, IL-10, and IFN-gamma levels of leukemic cells and bone marrow T cells in acute leukemia. *Ann Clin Lab Sci*. 2006;36(1):7-15.
58. Mathew NR, Baumgartner F, Braun L, O'Sullivan D, Thomas S, Waterhouse M, et al. Sorafenib promotes graft-versus-leukemia activity in mice and humans through IL-15 production in FLT3-ITD-mutant leukemia cells. *Nat Med*. 2018;24(3):282-91.
59. Thiant S, Yakoub-Agha I, Magro L, Trauet J, Coiteux V, Jouet JP, et al. Plasma levels of IL-7 and IL-15 in the first month after myeloablative BMT are predictive biomarkers of both acute GVHD and relapse. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45(10):1546-52.
60. Quek L, Ferguson P, Metzner M, Ahmed I, Kennedy A, Garnett C, et al. Mutational analysis of disease relapse in patients allografted for acute myeloid leukemia. *Blood Adv*. 2016;1(3):193-204.
61. Schnittger S, Kern W, Tschulik C, Weiss T, Dicker F, Falini B, et al. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood*. 2009;114(11):2220-31.
62. Yin JA, O'Brien MA, Hills RK, Daly SB, Wheatley K, Burnett AK. Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial. *Blood*. 2012;120(14):2826-35.
63. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic JV, et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *J Clin Oncol*. 2009;27(31):5195-201.
64. Thiede C, Bornhauser M, Ehninger G. Evaluation of STR informativity for chimerism testing--comparative analysis of 27 STR systems in 203 matched related donor recipient pairs. *Leukemia*. 2004;18(2):248-54.
65. Schmid C, Labopin M, Nagler A, Bornhauser M, Finke J, Fassas A, et al. Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party. *J Clin Oncol*. 2007;25(31):4938-45.

66. Metzelder SK, Schroeder T, Finck A, Scholl S, Fey M, Gotze K, et al. High activity of sorafenib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia synergizes with allo-immune effects to induce sustained responses. *Leukemia*. 2012;26(11):2353-9.
67. Schmid C, Labopin M, Nagler A, Niederwieser D, Castagna L, Tabrizi R, et al. Treatment, risk factors, and outcome of adults with relapsed AML after reduced intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2012;119(6):1599-606.
68. Goodyear OC, Dennis M, Jilani NY, Loke J, Siddique S, Ryan G, et al. Azacitidine augments expansion of regulatory T cells after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2012;119(14):3361-9.
69. Chiappinelli KB, Strissel PL, Desrichard A, Li H, Henke C, Akman B, et al. Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses. *Cell*. 2017;169(2):361.
70. Santourlidis S, Trompeter HI, Weinhold S, Eisermann B, Meyer KL, Wernet P, et al. Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *J Immunol*. 2002;169(8):4253-61.
71. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective. Preface. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44(8):453-5.
72. Ullmann AJ, Schmidt-Hieber M, Bertz H, Heinz WJ, Kiehl M, Kruger W, et al. Infectious diseases in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: prevention and prophylaxis strategy guidelines 2016. *Ann Hematol*. 2016;95(9):1435-55.
73. Marty FM, Ljungman P, Chemaly RF, Maertens J, Dadwal SS, Duarte RF, et al. Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med*. 2017;377(25):2433-44.
74. Ocheni S, Kroeger N, Zabelina T, Sobottka I, Ayuk F, Wolschke C, et al. EBV reactivation and post transplant lymphoproliferative disorders following allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42(3):181-6.
75. Zuhair M, Smit GSA, Wallis G, Jabbar F, Smith C, Devleesschauwer B, et al. Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*. 2019;29(3):e2034.
76. George B, Pati N, Gilroy N, Ratnamohan M, Huang G, Kerridge I, et al. Pre-transplant cytomegalovirus (CMV) serostatus remains the most important determinant of CMV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the era of surveillance and preemptive therapy. *Transpl Infect Dis*. 2010;12(4):322-9.
77. Boeckh M, Ljungman P. How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood*. 2009;113(23):5711-9.
78. Erard V, Guthrie KA, Seo S, Smith J, Huang M, Chien J, et al. Reduced Mortality of Cytomegalovirus Pneumonia After Hematopoietic Cell Transplantation Due to Antiviral Therapy and Changes in Transplantation Practices. *Clin Infect Dis*. 2015;61(1):31-9.
79. Cho BS, Yahng SA, Kim JH, Yoon JH, Shin SH, Lee SE, et al. Impact of cytomegalovirus gastrointestinal disease on the clinical outcomes in patients with gastrointestinal graft-versus-host disease in the era of preemptive therapy. *Ann Hematol*. 2013;92(4):497-504.
80. Cantoni N, Hirsch HH, Khanna N, Gerull S, Buser A, Bucher C, et al. Evidence for a bidirectional relationship between cytomegalovirus replication and acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(9):1309-14.
81. Nichols WG, Corey L, Gooley T, Davis C, Boeckh M. High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J Infect Dis*. 2002;185(3):273-82.

82. Itzykson R, Robin M, Moins-Teisserenc H, Delord M, Busson M, Xhaard A, et al. Cytomegalovirus shapes long-term immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2015;100(1):114-23.
83. Young VP, Mariano MC, Tu CC, Allaire KM, Avdic S, Slobedman B, et al. Modulation of the Host Environment by Human Cytomegalovirus with Viral Interleukin 10 in Peripheral Blood. *J Infect Dis*. 2017;215(6):874-82.
84. Quinnan GV, Jr., Kirmani N, Rook AH, Manischewitz JF, Jackson L, Moreschi G, et al. Cytotoxic t cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med*. 1982;307(1):7-13.
85. Ulbrecht M, Martinozzi S, Grzeschik M, Hengel H, Ellwart JW, Pla M, et al. Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis. *J Immunol*. 2000;164(10):5019-22.
86. Chapman TL, Heikeman AP, Bjorkman PJ. The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity*. 1999;11(5):603-13.
87. Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, et al. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*. 2001;14(2):123-33.
88. Wills MR, Ashiru O, Reeves MB, Okecha G, Trowsdale J, Tomasec P, et al. Human cytomegalovirus encodes an MHC class I-like molecule (UL142) that functions to inhibit NK cell lysis. *J Immunol*. 2005;175(11):7457-65.
89. Arnon TI, Achdout H, Levi O, Markel G, Saleh N, Katz G, et al. Inhibition of the Nkp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol*. 2005;6(5):515-23.
90. Foley B, Cooley S, Verneris MR, Pitt M, Curtsinger J, Luo X, et al. Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. *Blood*. 2012;119(11):2665-74.
91. Hakki M. Moving Past Ganciclovir and Foscarnet: Advances in CMV Therapy. *Curr Hematol Malig Rep*. 2020.
92. Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*. 2000;343(7):481-92.
93. Henderson S, Rowe M, Gregory C, Croom-Carter D, Wang F, Longnecker R, et al. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell*. 1991;65(7):1107-15.
94. Capello D, Rossi D, Gaidano G. Post-transplant lymphoproliferative disorders: molecular basis of disease histogenesis and pathogenesis. *Hematol Oncol*. 2005;23(2):61-7.
95. Hou HA, Yao M, Tang JL, Chen YK, Ko BS, Huang SY, et al. Poor outcome in post transplant lymphoproliferative disorder with pulmonary involvement after allogeneic hematopoietic SCT: 13 years' experience in a single institute. *Bone Marrow Transplant*. 2009;43(4):315-21.
96. Deeg HJ, Socie G. Malignancies after hematopoietic stem cell transplantation: many questions, some answers. *Blood*. 1998;91(6):1833-44.
97. Djaoud Z, Guethlein LA, Horowitz A, Azzi T, Nemat-Gorgani N, Olive D, et al. Two alternate strategies for innate immunity to Epstein-Barr virus: One using NK cells and the other NK cells and gammadelta T cells. *J Exp Med*. 2017;214(6):1827-41.
98. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.
99. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216.
100. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001;2(8):675-80.

101. Mackall CL, Gress RE. Thymic aging and T-cell regeneration. *Immunol Rev.* 1997;160:91-102.
102. Rocha B, Dautigny N, Pereira P. Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios in vivo. *Eur J Immunol.* 1989;19(5):905-11.
103. Leick M, Gittelman RM, Yusko E, Sanders C, Robins H, DeFilipp Z, et al. T Cell Clonal Dynamics Determined by High-Resolution TCR-beta Sequencing in Recipients after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2020;26(9):1567-74.
104. Chao NJ, Liu CX, Rooney B, Chen BJ, Long GD, Vredenburgh JJ, et al. Nonmyeloablative regimen preserves "niches" allowing for peripheral expansion of donor T-cells. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8(5):249-56.
105. Doderio A, Carrabba M, Milani R, Rizzo E, Raganato A, Montefusco V, et al. Reduced-intensity conditioning containing low-dose alemtuzumab before allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: graft-versus-host disease is decreased but T-cell reconstitution is delayed. *Exp Hematol.* 2005;33(8):920-7.
106. Abdel-Azim H, Elshoury A, Mahadeo KM, Parkman R, Kapoor N. Humoral Immune Reconstitution Kinetics after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Children: A Maturation Block of IgM Memory B Cells May Lead to Impaired Antibody Immune Reconstitution. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017;23(9):1437-46.
107. Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, Cutler CS, Bhuiya NS, Schowalter M, et al. Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2009;113(16):3865-74.
108. Sarantopoulos S, Ritz J. Aberrant B-cell homeostasis in chronic GVHD. *Blood.* 2015;125(11):1703-7.
109. Apoil PA, Puissant-Lubrano B, Congy-Jolivet N, Peres M, Tkaczuk J, Roubinet F, et al. Reference values for T, B and NK human lymphocyte subpopulations in adults. *Data Brief.* 2017;12:400-4.
110. Romagnani C, Juelke K, Falco M, Morandi B, D'Agostino A, Costa R, et al. CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol.* 2007;178(8):4947-55.
111. Morice WG. The immunophenotypic attributes of NK cells and NK-cell lineage lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol.* 2007;127(6):881-6.
112. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001;22(11):633-40.
113. Ullah MA, Hill GR, Tey SK. Functional Reconstitution of Natural Killer Cells in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol.* 2016;7:144.
114. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol.* 2008;9(5):495-502.
115. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, et al. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:619-48.
116. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature.* 1998;391(6669):795-9.
117. Pesce S, Greppi M, Tabellini G, Rampinelli F, Parolini S, Olive D, et al. Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(1):335-46 e3.
118. Stojanovic A, Fiegler N, Brunner-Weinzierl M, Cerwenka A. CTLA-4 is expressed by activated mouse NK cells and inhibits NK Cell IFN-gamma production in response to mature dendritic cells. *J Immunol.* 2014;192(9):4184-91.
119. Xu L, Huang Y, Tan L, Yu W, Chen D, Lu C, et al. Increased Tim-3 expression in peripheral NK cells predicts a poorer prognosis and Tim-3 blockade improves NK cell-



- mediated cytotoxicity in human lung adenocarcinoma. *Int Immunopharmacol.* 2015;29(2):635-41.
120. Zhang Q, Bi J, Zheng X, Chen Y, Wang H, Wu W, et al. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nat Immunol.* 2018;19(7):723-32.
121. Leibson PJ. Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity.* 1997;6(6):655-61.
122. Topham NJ, Hewitt EW. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology.* 2009;128(1):7-15.
123. Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Kayagaki N, Yamaguchi N, Kakuta S, et al. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med.* 2001;7(1):94-100.
124. Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood.* 2010;115(11):2167-76.
125. Yang YG, Wang H, Asavaroengchai W, Dey BR. Role of Interferon-gamma in GVHD and GVL. *Cell Mol Immunol.* 2005;2(5):323-9.
126. Luetke-Eversloh M, Killig M, Romagnani C. Signatures of human NK cell development and terminal differentiation. *Front Immunol.* 2013;4:499.
127. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood.* 2001;97(10):3146-51.
128. Frey M, Packianathan NB, Fehniger TA, Ross ME, Wang WC, Stewart CC, et al. Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J Immunol.* 1998;161(1):400-8.
129. Bjorkstrom NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood.* 2010;116(19):3853-64.
130. Huenecke S, Cappel C, Esser R, Pfirrmann V, Salzmann-Manrique E, Betz S, et al. Development of Three Different NK Cell Subpopulations during Immune Reconstitution after Pediatric Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Prognostic Markers in GvHD and Viral Infections. *Front Immunol.* 2017;8:109.
131. Adamczyk P, Daren A, Sulecka A, Bladzinski P, Cichocki L, Kalisz A, et al. Do better communication skills promote sheltered employment in schizophrenia? *Schizophr Res.* 2016;176(2-3):331-9.
132. Goodier MR, Lusa C, Sherratt S, Rodriguez-Galan A, Behrens R, Riley EM. Sustained Immune Complex-Mediated Reduction in CD16 Expression after Vaccination Regulates NK Cell Function. *Front Immunol.* 2016;7:384.
133. Moretta A, Sivori S, Vitale M, Pende D, Morelli L, Augugliaro R, et al. Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med.* 1995;182(3):875-84.
134. Fauriat C, Ivarsson MA, Ljunggren HG, Malmberg KJ, Michaelsson J. Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors. *Blood.* 2010;115(6):1166-74.
135. Anfossi N, Andre P, Guia S, Falk CS, Roetynck S, Stewart CA, et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity.* 2006;25(2):331-42.
136. Moretta L. Dissecting CD56dim human NK cells. *Blood.* 2010;116(19):3689-91.
137. Hsu KC, Liu XR, Selvakumar A, Mickelson E, O'Reilly RJ, Dupont B. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol.* 2002;169(9):5118-29.

138. Pende D, Falco M, Vitale M, Cantoni C, Vitale C, Munari E, et al. Killer Ig-Like Receptors (KIRs): Their Role in NK Cell Modulation and Developments Leading to Their Clinical Exploitation. *Front Immunol.* 2019;10:1179.
139. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.* 2002;295(5562):2097-100.
140. 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(9):3730-40.
141. Sivori S, Vitale M, Morelli L, Sanseverino L, Augugliaro R, Bottino C, et al. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med.* 1997;186(7):1129-36.
142. Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, et al. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med.* 1998;187(12):2065-72.
143. Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, et al. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med.* 1999;190(10):1505-16.
144. Fuchs A, Vermi W, Lee JS, Lonardi S, Gilfillan S, Newberry RD, et al. Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN-gamma-producing cells. *Immunity.* 2013;38(4):769-81.
145. von Lilienfeld-Toal M, Nattermann J, Feldmann G, Sievers E, Frank S, Strehl J, et al. Activated gammadelta T cells express the natural cytotoxicity receptor natural killer p 44 and show cytotoxic activity against myeloma cells. *Clin Exp Immunol.* 2006;144(3):528-33.
146. Raman K, Kuberan B. Chemical Tumor Biology of Heparan Sulfate Proteoglycans. *Curr Chem Biol.* 2010;4(1):20-31.
147. Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, Bushkin Y, et al. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature.* 2001;409(6823):1055-60.
148. Jang Y, Gerbec ZJ, Won T, Choi B, Podsiad A, B BM, et al. Cutting Edge: Check Your Mice-A Point Mutation in the Ncr1 Locus Identified in CD45.1 Congenic Mice with Consequences in Mouse Susceptibility to Infection. *J Immunol.* 2018;200(6):1982-7.
149. Vankayalapati R, Garg A, Porgador A, Griffith DE, Klucar P, Safi H, et al. Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol.* 2005;175(7):4611-7.
150. Garg A, Barnes PF, Porgador A, Roy S, Wu S, Nanda JS, et al. Vimentin expressed on Mycobacterium tuberculosis-infected human monocytes is involved in binding to the NKp46 receptor. *J Immunol.* 2006;177(9):6192-8.
151. Vitenshtein A, Charpak-Amikam Y, Yamin R, Bauman Y, Isaacson B, Stein N, et al. NK Cell Recognition of *Candida glabrata* through Binding of NKp46 and NCR1 to Fungal Ligands Epa1, Epa6, and Epa7. *Cell Host Microbe.* 2016;20(4):527-34.
152. Ghadially H, Ohana M, Elboim M, Gazit R, Gur C, Nagler A, et al. NK cell receptor NKp46 regulates graft-versus-host disease. *Cell Rep.* 2014;7(6):1809-14.
153. Chretien AS, Devillier R, Fauriat C, Orlanducci F, Harbi S, Le Roy A, et al. NKp46 expression on NK cells as a prognostic and predictive biomarker for response to allo-SCT in patients with AML. *Oncoimmunology.* 2017;6(12):e1307491.
154. Boyiadzis M, Memon S, Carson J, Allen K, Szczepanski MJ, Vance BA, et al. Up-regulation of NK cell activating receptors following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation under a lymphodepleting reduced intensity regimen is associated with elevated IL-15 levels. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14(3):290-300.

155. Fauriat C, Just-Landi S, Mallet F, Arnoulet C, Sainty D, Olive D, et al. Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood*. 2007;109(1):323-30.
156. Pittari G, Fregni G, Roguet L, Garcia A, Vataire AL, Wittnebel S, et al. Early evaluation of natural killer activity in post-transplant acute myeloid leukemia patients. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45(5):862-71.
157. Mattioli I, Pesant M, Tentorio PF, Molgora M, Marcenaro E, Lugli E, et al. Priming of Human Resting NK Cells by Autologous M1 Macrophages via the Engagement of IL-1beta, IFN-beta, and IL-15 Pathways. *J Immunol*. 2015;195(6):2818-28.
158. Campbell KS, Yusa S, Kikuchi-Maki A, Catina TL. NKp44 triggers NK cell activation through DAP12 association that is not influenced by a putative cytoplasmic inhibitory sequence. *J Immunol*. 2004;172(2):899-906.
159. Baychelier F, Sennepin A, Ermonval M, Dorgham K, Debre P, Vieillard V. Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Blood*. 2013;122(17):2935-42.
160. Rosental B, Brusilovsky M, Hadad U, Oz D, Appel MY, Afergan F, et al. Proliferating cell nuclear antigen is a novel inhibitory ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *J Immunol*. 2011;187(11):5693-702.
161. Barrow AD, Edeling MA, Trifonov V, Luo J, Goyal P, Bohl B, et al. Natural Killer Cells Control Tumor Growth by Sensing a Growth Factor. *Cell*. 2018;172(3):534-48 e19.
162. Gaggero S, Bruschi M, Petretto A, Parodi M, Del Zotto G, Lavarello C, et al. Nidogen-1 is a novel extracellular ligand for the NKp44 activating receptor. *Oncoimmunology*. 2018;7(9):e1470730.
163. Esin S, Batoni G, Counoupas C, Stringaro A, Brancatisano FL, Colone M, et al. Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor NKp44 to the surfaces of mycobacteria and other bacteria. *Infect Immun*. 2008;76(4):1719-27.
164. Esin S, Counoupas C, Aulicino A, Brancatisano FL, Maisetta G, Bottai D, et al. Interaction of Mycobacterium tuberculosis cell wall components with the human natural killer cell receptors NKp44 and Toll-like receptor 2. *Scand J Immunol*. 2013;77(6):460-9.
165. Brandt CS, Baratin M, Yi EC, Kennedy J, Gao Z, Fox B, et al. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med*. 2009;206(7):1495-503.
166. Textor S, Bossler F, Henrich KO, Gartlgruber M, Pollmann J, Fiegler N, et al. The proto-oncogene Myc drives expression of the NK cell-activating NKp30 ligand B7-H6 in tumor cells. *Oncoimmunology*. 2016;5(7):e1116674.
167. Pogge von Strandmann E, Simhadri VR, von Tresckow B, Sasse S, Reiners KS, Hansen HP, et al. Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity*. 2007;27(6):965-74.
168. Reiners KS, Topolar D, Henke A, Simhadri VR, Kessler J, Sauer M, et al. Soluble ligands for NK cell receptors promote evasion of chronic lymphocytic leukemia cells from NK cell anti-tumor activity. *Blood*. 2013;121(18):3658-65.
169. Wang W, Guo H, Geng J, Zheng X, Wei H, Sun R, et al. Tumor-released Galectin-3, a soluble inhibitory ligand of human NKp30, plays an important role in tumor escape from NK cell attack. *J Biol Chem*. 2014;289(48):33311-9.
170. Li SS, Kyei SK, Timm-McCann M, Ogbomo H, Jones GJ, Shi M, et al. The NK receptor NKp30 mediates direct fungal recognition and killing and is diminished in NK cells from HIV-infected patients. *Cell Host Microbe*. 2013;14(4):387-97.
171. Li SS, Ogbomo H, Mansour MK, Xiang RF, Szabo L, Munro F, et al. Identification of the fungal ligand triggering cytotoxic PRR-mediated NK cell killing of *Cryptococcus* and *Candida*. *Nat Commun*. 2018;9(1):751.

172. Michaelsson J, Teixeira de Matos C, Achour A, Lanier LL, Karre K, Soderstrom K. A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. *J Exp Med.* 2002;196(11):1403-14.
173. Eissens DN, Schaap NP, Preijers FW, Dolstra H, van Cranenbroek B, Schattenberg AV, et al. CD3+/CD19+-depleted grafts in HLA-matched allogeneic peripheral blood stem cell transplantation lead to early NK cell cytolytic responses and reduced inhibitory activity of NKG2A. *Leukemia.* 2010;24(3):583-91.
174. Wang Y, Xu H, Zheng X, Wei H, Sun R, Tian Z. High expression of NKG2A/CD94 and low expression of granzyme B are associated with reduced cord blood NK cell activity. *Cell Mol Immunol.* 2007;4(5):377-82.
175. Hu LJ, Zhao XY, Yu XX, Lv M, Han TT, Han W, et al. Quantity and Quality Reconstitution of NKG2A(+) Natural Killer Cells Are Associated with Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019;25(1):1-11.
176. Kaiser BK, Barahmand-Pour F, Paulsene W, Medley S, Geraghty DE, Strong RK. Interactions between NKG2x immunoreceptors and HLA-E ligands display overlapping affinities and thermodynamics. *J Immunol.* 2005;174(5):2878-84.
177. Beziat V, Dalgard O, Asselah T, Halfon P, Bedossa P, Boudifa A, et al. CMV drives clonal expansion of NKG2C+ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. *Eur J Immunol.* 2012;42(2):447-57.
178. Fehniger TA, Cooper MA. Harnessing NK Cell Memory for Cancer Immunotherapy. *Trends Immunol.* 2016;37(12):877-88.
179. Elmaagacli AH, Steckel NK, Koldehoff M, Hegerfeldt Y, Trensche R, Ditschkowski M, et al. Early human cytomegalovirus replication after transplantation is associated with a decreased relapse risk: evidence for a putative virus-versus-leukemia effect in acute myeloid leukemia patients. *Blood.* 2011;118(5):1402-12.
180. Cichocki F, Cooley S, Davis Z, DeFor TE, Schlums H, Zhang B, et al. CD56dimCD57+NKG2C+ NK cell expansion is associated with reduced leukemia relapse after reduced intensity HCT. *Leukemia.* 2016;30(2):456-63.
181. Della Chiesa M, Falco M, Bertaina A, Muccio L, Alicata C, Frassoni F, et al. Human cytomegalovirus infection promotes rapid maturation of NK cells expressing activating killer Ig-like receptor in patients transplanted with NKG2C-/- umbilical cord blood. *J Immunol.* 2014;192(4):1471-9.
182. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science.* 1999;285(5428):727-9.
183. Pende D, Rivera P, Marcenaro S, Chang CC, Biassoni R, Conte R, et al. Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res.* 2002;62(21):6178-86.
184. Lee JC, Lee KM, Kim DW, Heo DS. Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *J Immunol.* 2004;172(12):7335-40.
185. Paczulla AM, Rothfelder K, Raffel S, Konantz M, Steinbacher J, Wang H, et al. Absence of NKG2D ligands defines leukaemia stem cells and mediates their immune evasion. *Nature.* 2019.
186. Moretta A, Poggi A, Pende D, Tripodi G, Orengo AM, Pella N, et al. CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta. *J Exp Med.* 1991;174(6):1393-8.

187. Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Pena J, Solana R. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology*. 1999;97(1):159-65.
188. de la Fuente H, Cruz-Adalia A, Martinez Del Hoyo G, Cibrian-Vera D, Bonay P, Perez-Hernandez D, et al. The leukocyte activation receptor CD69 controls T cell differentiation through its interaction with galectin-1. *Mol Cell Biol*. 2014;34(13):2479-87.
189. Juelke K, Killig M, Luetke-Eversloh M, Parente E, Gruen J, Morandi B, et al. CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells. *Blood*. 2010;116(8):1299-307.
190. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol*. 2009;10(1):48-57.
191. Stanietsky N, Simic H, Arapovic J, Toporik A, Levy O, Novik A, et al. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(42):17858-63.
192. Wu L, Mao L, Liu JF, Chen L, Yu GT, Yang LL, et al. Blockade of TIGIT/CD155 signaling reverses T-cell exhaustion and enhances antitumor capability in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Res*. 2019.
193. He W, Zhang H, Han F, Chen X, Lin R, Wang W, et al. CD155/TIGIT Signaling Regulates CD8(+) T-cell Metabolism and Promotes Tumor Progression in Human Gastric Cancer. *Cancer Res*. 2017;77(22):6375-88.
194. Stamm H, Klingler F, Grossjohann EM, Muschhammer J, Vettorazzi E, Heuser M, et al. Immune checkpoints PVR and PVRL2 are prognostic markers in AML and their blockade represents a new therapeutic option. *Oncogene*. 2018;37(39):5269-80.
195. Chauvin JM, Ka M, Pagliano O, Menna C, Ding Q, DeBlasio R, et al. IL15 Stimulation with TIGIT Blockade Reverses CD155-mediated NK-Cell Dysfunction in Melanoma. *Clin Cancer Res*. 2020;26(20):5520-33.
196. Chan YLT, Zuo J, Inman C, Croft W, Begum J, Croudace J, et al. NK cells produce high levels of IL-10 early after allogeneic stem cell transplantation and suppress development of acute GVHD. *Eur J Immunol*. 2018;48(2):316-29.
197. Pical-Izard C, Crocchiolo R, Granjeaud S, Kochbati E, Just-Landi S, Chabannon C, et al. Reconstitution of natural killer cells in HLA-matched HSCT after reduced-intensity conditioning: impact on clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(3):429-39.
198. Dulphy N, Haas P, Busson M, Belhadj S, Peffault de Latour R, Robin M, et al. An unusual CD56(bright) CD16(low) NK cell subset dominates the early posttransplant period following HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol*. 2008;181(3):2227-37.
199. Bisset LR, Lung TL, Kaelin M, Ludwig E, Dubs RW. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *Eur J Haematol*. 2004;72(3):203-12.
200. Santagostino A, Garbaccio G, Pistorio A, Bolis V, Camisasca G, Pagliaro P, et al. An Italian national multicenter study for the definition of reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. *Haematologica*. 1999;84(6):499-504.
201. Jentsch-Ullrich K, Koenigsman M, Mohren M, Franke A. Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults--a monocentric German study. *Clin Immunol*. 2005;116(2):192-7.
202. Servais S, Menten-Dedoyart C, Beguin Y, Seidel L, Gothot A, Daulne C, et al. Impact of Pre-Transplant Anti-T Cell Globulin (ATG) on Immune Recovery after Myeloablative Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation. *PLoS One*. 2015;10(6):e0130026.
203. Bosch M, Dhadda M, Hoegh-Petersen M, Liu Y, Hagel LM, Podgorny P, et al. Immune reconstitution after anti-thymocyte globulin-conditioned hematopoietic cell transplantation. *Cytotherapy*. 2012;14(10):1258-75.

204. Muller-Hermelink HK, Sale GE, Borisch B, Storb R. Pathology of the thymus after allogeneic bone marrow transplantation in man. A histologic immunohistochemical study of 36 patients. *Am J Pathol.* 1987;129(2):242-56.
205. Carayol G, Bourhis JH, Guillard M, Bosq J, Pailler C, Castagna L, et al. Quantitative analysis of T helper 1, T helper 2, and inflammatory cytokine expression in patients after allogeneic bone marrow transplantation: relationship with the occurrence of acute graft-versus-host disease. *Transplantation.* 1997;63(9):1307-13.
206. Thiant S, Labalette M, Trauet J, Coiteux V, de Berranger E, Dessaint JP, et al. Plasma levels of IL-7 and IL-15 after reduced intensity conditioned allo-SCT and relationship to acute GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2011;46(10):1374-81.
207. Carson WE, Fehniger TA, Haldar S, Eckhert K, Lindemann MJ, Lai CF, et al. A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J Clin Invest.* 1997;99(5):937-43.
208. Yan Y, Steinherz P, Klingemann HG, Dennig D, Childs BH, McGuirk J, et al. Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias. *Clin Cancer Res.* 1998;4(11):2859-68.
209. Parodi M, Favoreel H, Candiano G, Gaggero S, Sivori S, Mingari MC, et al. NKp44-NKp44 Ligand Interactions in the Regulation of Natural Killer Cells and Other Innate Lymphoid Cells in Humans. *Front Immunol.* 2019;10:719.
210. Shemesh A, Brusilovsky M, Hadad U, Teltsh O, Edri A, Rubin E, et al. Survival in acute myeloid leukemia is associated with NKp44 splice variants. *Oncotarget.* 2016;7(22):32933-45.
211. Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, et al. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(7):4120-5.
212. Zeiser R, Vago L. Mechanisms of immune escape after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2019;133(12):1290-7.
213. Kim KH, Yu HT, Hwang I, Park S, Park SH, Kim S, et al. Phenotypic and Functional Analysis of Human NK Cell Subpopulations According to the Expression of FcepsilonRIgamma and NKG2C. *Front Immunol.* 2019;10:2865.
214. Kordelas L, Steckel NK, Horn PA, Beelen DW, Rebmann V. The Activating NKG2C Receptor Is Significantly Reduced in NK Cells after Allogeneic Stem Cell Transplantation in Patients with Severe Graft-versus-Host Disease. *Int J Mol Sci.* 2016;17(11).
215. Masson D, Jarry A, Baurly B, Blanchardie P, Laboisie C, Lustenberger P, et al. Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma. *Gut.* 2001;49(2):236-40.
216. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(9):678-89.
217. Shono Y, Docampo MD, Peled JU, Perobelli SM, Velardi E, Tsai JJ, et al. Increased GVHD-related mortality with broad-spectrum antibiotic use after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in human patients and mice. *Sci Transl Med.* 2016;8(339):339ra71.
218. Schwab L, Goroncy L, Palaniyandi S, Gautam S, Triantafyllopoulou A, Mocsai A, et al. Neutrophil granulocytes recruited upon translocation of intestinal bacteria enhance graft-versus-host disease via tissue damage. *Nat Med.* 2014;20(6):648-54.
219. van Bekkum DW, Roodenburg J, Heidt PJ, van der Waaij D. Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora. *J Natl Cancer Inst.* 1974;52(2):401-4.
220. Stauch D, Dernier A, Sarmiento Marchese E, Kunert K, Volk HD, Pratschke J, et al. Targeting of natural killer cells by rabbit antithymocyte globulin and campath-1H: similar effects independent of specificity. *PLoS One.* 2009;4(3):e4709.

221. Foley B, Cooley S, Verneris MR, Curtsinger J, Luo X, Waller EK, et al. NK cell education after allogeneic transplantation: dissociation between recovery of cytokine-producing and cytotoxic functions. *Blood*. 2011;118(10):2784-92.
222. Kato M, Kurata M, Kanda J, Kato K, Tomizawa D, Kudo K, et al. Impact of graft-versus-host disease on relapse and survival after allogeneic stem cell transplantation for pediatric leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2019;54(1):68-75.
223. Shokouhi S, Bray S, Bakhtiyari S, Sayehmiri K, Alimoghadam K, Ghavamzadeh A. Effects of aGVHD and cGVHD on Survival Rate in Patients with Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*. 2015;9(3):112-21.

## 8. Danksagung

Diese Dissertation wurde in der III. Medizinischen Klinik für Hämatologie, Onkologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Mainz unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Theobald durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt:

Frau Dr. Eva Maria Wagner-Drouet für die Erstellung dieses Dissertationsthemas, die gute Zusammenarbeit, die Motivation, konstruktive Kritik, persönliche Beratung und Einarbeitung in dieses komplexe und interessante Themengebiet und zuletzt die äußerst sorgfältige Korrektur dieser Arbeit. Zudem für die Ermöglichung einer Famulatur auf der Station für Stammzelltransplantation und Präsentation von Ergebnissen auf mehreren Kongressen.

Der gesamten AG Wagner-Drouet. Insbesondere Diana Wolf für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei allen Experimenten und die Organisation des Labors.

Der AG Ullrich des Universitätsklinikums Frankfurt für die Unterstützung bei der Etablierung der funktionellen Tests.

Der AG Wölfel der Universitätsmedizin Mainz für die gute Kooperation und Bereitstellung von mehreren Materialien.

Besonderer Dank gilt zudem meinen Eltern, die mich in allen Situationen unterstützt und motiviert haben.

Mein Dank gilt auch all jenen, die hier keine persönliche Erwähnung finden konnten und mir in den letzten 6 Jahren bei Experimenten und der schriftlichen Erstellung dieser Arbeit eine Hilfe waren.



## 9. Lebenslauf

### Jonas Wißkirchen

geboren am: 29.08.1993 in Bonn

#### **Aktuell**

01/2020 – laufend Assistenzarzt, III. Medizinische Klinik Universitätsmedizin Mainz

#### **Akademische Laufbahn**

11/2018 – 11/2019 Praktisches Jahr an der Universitätsmedizin Mainz

04/2013 – 11/2019 Studium der Humanmedizin an der Universitätsmedizin Mainz

mündliches Staatsexamen (M3) 11/2019 Note 1,0  
schriftliches Staatsexamen (M2) 10/2018, Note: 2,0  
Physikum 03/2015, Note: 2,0

10/2016 – 02/2021 Dissertationsschrift: „Rekonstitution von NK-Zell Subpopulationen – Einfluss auf GvHD und Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation“

03/2018 Veröffentlichung eines Posters auf der EBMT 2018: „GvL without GvHD ? Role of different NK-cell Subpopulations after allogeneic stem cell transplantation“

03/2018 Veröffentlichung eines Posters auf dem SPIG-Jahreskongress 2018: „GvL ohne GvHD ? Rolle verschiedener NK-Zell Subpopulationen im Kontext der allogenen Stammzelltransplantation“

#### **Berufserfahrung, klinische Erfahrung**

09/2016 – laufend Mitarbeiter bei der Entwicklung einer Webseite zur Information über komplementäre onkologische Therapien

PJ Terial Innere Medizin: Universitätsmedizin Mainz

PJ Terial Chirurgie: Universitätsmedizin Mainz

PJ Terial Pädiatrie: Universitätsmedizin Mainz

Famulaturen: Allgemeinmedizin: Gemeinschaftspraxis Dr. Spahn und Dr. Bernedo, Mainz

Innere Medizin: Knochenmarktransplantation, Universitätsmedizin Mainz

Neurologie: Stroke Unit, Universitätsmedizin Mainz

Orthopädie: Gelenkzentrum Rhein-Main, Mainz

Kongresse: ESMO 2013 Congress, Amsterdam

ESMO 2014 Congress, Madrid

ESMO 2015 Congress, Wien

ESMO 2017 Congress, Madrid

ASCO Annual Meeting 2018, Chicago

ASCO Member seit 2018

Auslandsaufenthalte:

09/2010 – 07/2012 A-Level (Hochschulreife) an Dauntsey`s School, Devizes

### **Fremdsprachenkenntnisse**

Englisch (verhandlungssicher)

### **Sonstiges**

IT-Kenntnisse: Microsoft Office, SAP