

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Klinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin III
Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie
Direktor: Prof. Dr. med. T. Klingebiel

**Entwicklung einer Methode zur Untersuchung
der zytotoxischen Aktivität von NK- und T-Zellen
gegen Leukämieblasten
mittels Vierfarb-Durchflusszytometrie**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Stefanie-Yvonne Zimmermann
aus
Waiblingen

Frankfurt am Main, 2003

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. T. Klingebiel

Koreferent: PD Dr. H. Martin

Datum der mündlichen Prüfung: 18.4.2005

1. Einleitung	1
1.1 Zytotoxische Interaktion zwischen Zellen	1
1.1.1 Zielzellen zellulärer Zytotoxizität	2
1.1.2 Effektorzellen zellulärer Zytotoxizität: Art und Mechanismus.....	2
1.1.2.1 NK-Zellen.....	3
1.1.2.2 T-Zellen.....	5
1.2 Bedeutung zytotoxischer Interaktionen.....	7
1.2.1 Physiologische Bedeutung der zellulären Zytotoxizität: virale und anti-Tumor- Immunität	7
1.2.2 Aspekte der klinischen Bedeutung zellulärer Zytotoxizität: Graft-versus-Host- und Graft-versus-Leukämie-Reaktionen.....	7
1.2.3 Immuntherapie mit zytotoxischen Zellen.....	9
1.3 Zytotoxizitätsmessung.....	10
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	12
2. Materialien und Methoden	14
2.1 Geräte und Materialien.....	14
2.1.1 Allgemein.....	14
2.1.2 Zellaufbereitung und -separation	14
2.1.3 Durchflusszytometrie	14
2.1.4 Europium-Assay.....	15
2.1.5 Zellkultur.....	15
2.1.6 Datenaufbereitung	15
2.2 Methoden.....	16
2.2.1 Pipettiertechnik.....	16
2.2.2 Waschschrte	16
2.2.3 Dichtegradienten-Zentrifugation.....	16
2.2.4 Zellgewinnung und -aufbereitung	17
2.2.4.1 Zielzellen der zytotoxischen Aktivität	17
2.2.4.1.1 K562.....	17
2.2.4.1.2 Leukämieblasten.....	17
2.2.4.1.2.1 Entnahme.....	17
2.2.4.1.2.2 Anreicherung und Kryopräservation.....	17
2.2.4.1.2.3 Auftauen kryopräservierter Leukämieblasten	18

2.2.4.2 Zytotoxische Effektorzellen	18
2.2.4.2.1 NK-92	18
2.2.4.2.2 Primäre NK-Zellen und T-Zellen	19
2.2.4.2.2.1 Magnet activated cell sorting	19
2.2.4.2.2.2 Alternatives Anreicherungsverfahren: Rosette-Technik	20
2.2.4.2.2.3 Kultur und Aktivierung	21
2.2.5 Durchflusszytometrie	22
2.2.5.1 Prinzip	22
2.2.5.2 Flusszelle und hydrodynamische Fokussierung	22
2.2.5.3 Optische Konfiguration des verwendeten Zytometers	23
2.2.5.4 Signalerfassung und Verstärkung	24
2.2.5.5 Datenaufnahme und Analyse	25
2.2.5.6 Vorwärts- und Seitwärtsstreuung des Laserlichts	26
2.2.5.7 Fluoreszenz	27
2.2.5.8 Eingesetzte Fluorochrome	28
2.2.5.9 Spektrale Fluoreszenzüberlappung und Kompensation	28
2.2.5.10 Zytometereinstellung	30
2.2.5.11 Antikörpermarkierung	32
2.2.5.12 Absolutmessungen mit Flow-Count Fluorosphären	33
2.2.6 Europium-Assay	33
2.2.7 Statistische Methoden	34
3. Ergebnisse	35
3.1 Zellaufbereitung	35
3.1.1 Patientenproben (Zielzellen)	35
3.1.2 Spenderlymphozyten (Effektorzellen)	35
3.2 Vorversuche zur Entwicklung des Assays	36
3.2.1 Differenzielle Markierung der Patienten- und Spenderzellen: Screening auf geeignete monoklonale Antikörper	36
3.2.1.1 Markierung mit einem monoklonalen Antikörper	38
3.2.1.2 Markierung mit zwei monoklonalen Antikörpern	40
3.2.1.2.1 Kombination zweier monoklonaler Antikörper gegen die Zielzellen	40
3.2.1.2.2 Kombination monoklonaler Antikörper gegen die Ziel- und gegen die Effektorzellen	40
3.2.2 Markierung der Zelllinien NK-92 und K562 mit monoklonalen Antikörpern	41
3.2.3 Färbung toter Zellen: Vergleich Propidiumjodid und 7-Amino-Actinomycin D	41
3.2.4 Durchflusszytometrische Konzentrationsbestimmung: Verwendung eines internen Standards	42

3.2.5 Einfluss von monoklonalen Antikörpern, Propidiumjodid und Beads auf die Zellen im zeitlichen Verlauf.....	43
3.2.6 Zytometersteuerung.....	44
3.2.6.1 Messung mit FITC- und PE-konjugierten monoklonalen Antikörpern und Propidiumjodid.....	44
3.2.6.2 Messung mit monoklonalen Antikörpern in vier Fluoreszenzen und Propidiumjodid.....	45
3.2.7 Simultane Markierung von T-Zellen mit PC5-konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen CD4 und CD8.....	46
3.3 Entwicklung und Optimierung des durchflusszytometrischen Zytotoxizitätsassays	47
3.3.1 Variante 1: Messung des Prozentsatzes toter Zielzellen	47
3.3.1.1 Ablauf des Assays	47
3.3.1.2 Messung	48
3.3.1.3 Analysenauswertung	48
3.3.1.4 Ergebnisse der Auswertungen.....	50
3.3.2 Variante 2: Messung der Konzentrationsänderung lebender Zellen unter Verwendung von FITC- und PE-konjugierten Antikörpern und Propidiumjodid	52
3.3.2.1 Ablauf des Assays	53
3.3.2.2 Messung	53
3.3.2.3 Analysenauswertung	53
3.3.2.4 Ergebnisse der veränderten Auswertestrategie	55
3.3.3 Endvariante: Messung der Konzentrationsänderung lebender Zellen unter Markierung mit FITC-, PE-, ECD- und PC5-konjugierten Antikörpern sowie Propidiumjodid.....	57
3.3.3.1 Ablauf.....	57
3.3.3.2 Messung	58
3.3.3.3 Analysenauswertung	58
3.3.3.4 Ergebnisse der Auswertungen.....	60
3.4 Vergleich, Validierung und Optimierung der Assayvarianten.....	60
3.4.1 Vergleichende Assayauswertungen nach Verlusten lebender Zellen und Zunahme Propidiumjodid positiver Events.....	60
3.4.2 Validierung der neu entwickelten Assays anhand des Europium-Release-Assays....	61
3.4.2 Kinetik der Zellkonzentrationen von Effektoren und Zielzellen im Verlauf von vier Stunden.....	63
3.4.4 Aussagekraft des Assays	64
3.4.5 Fehlerquellen.....	64

4. Diskussion	66
4.1 Zytotoxizitätsmessung in der Literatur	66
4.1.1 Kategorie 1: Messung des Zelltods	68
4.1.1.1 Nachweis einer Markersubstanz (Kategorie 1a)	68
4.1.1.2 Direkter Nachweis toter Zellen (Kategorie 1b).....	69
4.1.2 Kategorie 2: Messung der überlebenden Zellen.....	70
4.1.2.1 Nachweis einer Markersubstanz (Kategorie 2a)	70
4.1.2.2 Direkter Nachweis lebender Zellen (Kategorie 2b)	71
4.1.3 Kategorie 3: Messung aktiver Mediatoren der zellulären Zytotoxizität	72
4.1.3.1 Nachweis einer Markersubstanz (Kategorie 3a)	72
4.1.3.2 Direkter Nachweis der Zellen (Kategorie 3b).....	72
4.1.4 Zur Zytotoxizitätsmessung eingesetzte Messverfahren	73
4.1.5 Durchflusszytometrische Unterscheidung zwischen Ziel- und Effektorzellen in der Literatur.....	73
4.2 Bisherige Zytotoxizitätsmessung	75
4.3 Entwicklung des neuen Assays	76
4.3.1 Wahl der Methode.....	76
4.3.2 Messung der PI positiven Zielzellen zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität: Verlust toter Zellen aus der Gesamtrechnung.....	77
4.3.3 Einführung eines internen Standards zur Quantifizierung des Zellüberlebens: Umwandlung in einen Assay der Kategorie 2b.....	77
4.3.4 Erweiterter Einsatz von monoklonalen Antikörpern.....	79
4.3.4.1 Optimierung der Zytometer-Steuerung und Einsatz von mAb gegen CD4 und CD8 in gleicher Fluoreszenz	79
4.3.4.2 Standardmäßiger Einsatz von Antikörpern zur Markierung der Effektoren und Erfassung der Konjugatbildung.....	80
4.3.5 Behandlung der spontanen Konzentrationsänderung der Zellen: Vergleich mit Release-Methoden und konventionellen durchfluss-zytometrischen Assays	81
4.3.6 Aussagekraft des neu entwickelten Assays: Einteilung der zytotoxischen Aktivität in Grade.....	84
4.3.7 Vor- und Nachteile des neu entwickelten und etablierten Assays	85
4.4 Ausblick	87

5. Zusammenfassung	88
Abstract	89
6. Literatur	92
Anhang	I
Abbildungsverzeichnis	I
Herleitungen der benutzten Formeln zur Berechnung des Ergebnisses der Zytotoxizitäts-Assays.....	II
Abkürzungsverzeichnis und Definitionen	V
Danksagungen	VI
Veröffentlichungen.....	VII
Lebenslauf	VIII
Erklärung	IX

1. Einleitung

Trotz großer Erfolge in der Therapie maligner Erkrankungen der Kindes- und Jugendalters gibt es eine beträchtliche Zahl an Patienten, bei denen konventionelle chemoradiotherapeutische Therapieansätze versagen. So gibt es bei den akuten Leukämien, deren Chancen auf ein ereignisfreies Überleben mit ca. 50 – 75 % bei akuter myeloischer bzw. akuter lymphoblastischer Leukämie vergleichsweise gut ist, Gruppen von Hochrisikopatienten mit sehr schlechter Prognose mit Überlebenschancen < 20% unter konventioneller Therapie. Diese Patienten können anhand des Therapieansprechens zu definierten Zeitpunkten und molekulargenetischen Markern sowie Art und Zeitpunkt ihres Rezidivs frühzeitig identifiziert werden. In den Hochrisikogruppen der soliden Tumoren liegt die Heilungschance aufgrund schlechten Therapieansprechens und Rezidiven ebenfalls zum Teil weit unter 50%. Daher wird zunehmend versucht, zusätzliche Therapieverfahren für solche Patienten mit schlechter Prognose zu entwickeln. Besonderes Interesse gilt Ansätzen, die eine Zytotoxizität von autologen oder allogenen Immunzellen sowie Zelllinien gegen malignen Zellen therapeutisch zu nutzen versuchen, hierzu zählt im weiteren Sinne auch die Transplantation allogener hämatopoetischer Stammzellen.

1.1 Zytotoxische Interaktion zwischen Zellen

Zytotoxizität im Sinne dieser Arbeit ist das gezielte Erkennen und Abtöten von Zellen (Zielzellen) durch darauf spezialisierte Zellen des Immunsystems (Effektorzellen.) Zwei Arten der zellulären Zytotoxizität werden unterschieden: die antikörpervermittelte (antibody directed cellular cytotoxicity, ADCC) und die direkte Zytotoxizität.

Die Interaktion zwischen Ziel- und Effektorzellen kann in mehrere Schritte gegliedert werden, denen gegebenenfalls eine Aktivierung über Antigen, Zytokine und direkte Interaktion mit akzessorischen Zellen vorangeht. Diese sind:

- Erkennen der Zielzelle durch die Effektorzelle
- Adhäsion an die Zielzelle mit Ausbildung einer „immunologischen Synapse“
- Einleitung der Zerstörung der Zielzelle
- Ablösen der Effektorzelle von der Zielzelle (*Montoya et al. 2002, Bromley et al. 2001*).

1.1.1 Zielzellen zellulärer Zytotoxizität

Zielzellen einer zellulären zytotoxischen Aktivität können sowohl mit intrazellulären Pathogenen infizierte Zellen als auch sonstige abnorme Zellen (z.B. Tumorzellen, allogene Zellen) sein. Die Art der Veränderung der Zielzellen (Expression als „fremd“ erkannter Epitope auf infizierten Zellen, allogenen Zellen oder transformierten Zellen, herabgesetzte MHC I-Expressionsdichte) beeinflusst den Typ der Effektorzelle (s.u.).

1.1.2 Effektorzellen zellulärer Zytotoxizität: Art und Mechanismus

Effektorzellen der zellulären Zytotoxizität sind vor allem Natürliche Killer- (NK-) Zellen als Vertreter des schnellen, unspezifischen und zytotoxische T-Zellen als solche des adaptiven, spezifischen Immunsystems. Sie bilden ein ineinandergreifendes, in weiten Strecken komplementäres System der Immunabwehr, wobei der Anteil beider Zellarten an einer Immunreaktion von der Zielzelle bzw. dem abzuwehrenden Agens abhängt. Adhäsion und Zellzerstörung erfolgen bei beiden Zelltypen nach dem gleichen Muster. Adhäsionsmoleküle der Effektorzellen und deren Liganden auf Zielzellen führen zu einem verstärkten, verlängerten und engen Zell-Zell-Kontakt und vermitteln zum Teil kostimulatorische Signale (*Salazar-Fontana et al. 2001*). Die Zerstörung der Zielzelle erfolgt über Auslösen der Apoptose und Zytolyse durch Fas-Ligand, Tumor-Nekrose-Faktor (*Arase et al. 1995, Russell et al. 2002, Smyth et al. 2000*) und vor allem durch Exozytose von Perforin und Granzym haltigen Granula (*Podack et al. 1991*). Perforin polymerisiert in Membranen zu Kanälen, die die Membranintegrität durchbrechen. Granzyme sind Serinesterasen, die über Endozytose in die Zellen gelangen und dort durch Aktivierung von Caspasen eine DNA-Fragmentierung bewirken. Die Freisetzung aus den Endosomen wird dabei anscheinend durch ebenfalls endozytiertes Perforin bewirkt (*Trapani et al. 2002, Barry et al. 2002*). Das genaue Zusammenspiel der beteiligten Faktoren ist noch nicht geklärt.

Der grundlegende Unterschied zwischen T- und NK-Zellen liegt in der Art der Zielzellerkennung und ihrer Aktivierung. T-Zellen erkennen über den T-Zellrezeptor spezifisch Antigen. Dieses muss gebunden an ein *human leukocyte antigen* (HLA), einem Genprodukt des *major histocompatibility complex* (MHC), auf der Zelloberfläche der Zellen präsentiert werden, mit denen die T-Zelle interagiert, wie z.B. antigenpräsentierende Zellen oder auch Zielzellen der zytotoxischen Aktivität. Für ihre Aktivierung und Differenzierung von naiven zu Effektorzellen benötigen sie außerdem die kostimulatorische Hilfe dendritischer Zellen, professioneller antigenpräsentierender Zellen (s. 1.1.2.2). NK-Zellen unterliegen dagegen als Zellen des unspezifischen Immunsystems Steuerungsmechanismen,

die unmittelbar wirksam sind und keine „Lernschritte“ erfordern. Im Gegensatz zu T-Zellen reagieren sie auf das Fehlen einer MHC-Expression (s. 1.1.2.1).

1.1.2.1 NK-Zellen

NK-Zellen stellen 5 – 15% der Lymphozyten im peripheren Blut. Von diesen sind ca. 80% – 90% zu ADCC bzw. direkter Zytotoxizität fähig. Sie sind durch die Oberflächenexpression von CD56 bzw. CD16 bei Fehlen des T-Zellantigens CD3 charakterisiert. Eine kleine Subpopulation ist gekennzeichnet durch starke CD56-Expression; diese Population ist durch IL-2 gut expandierbar und aktivierbar und zeigt dann eine ausgeprägte direkte zytotoxische Aktivität (*Farag et al. 2002*).

Die NK-Zellaktivität unterliegt den Signalen inhibierender und aktivierender Rezeptoren (Abb. 1). Gemäß der „Missing Self“-Hypothese kann eine direkte Zytotoxizität von NK-Zellen ausgelöst werden durch das Fehlen einer Gruppe von HLA-Molekülen oder eine verminderte HLA-Dichte auf ihren Zielzellen (*Kärre et al. 1986, Shimizu et al. 1989, Storkus et al. 1989*). Zwei Typen von HLA Klasse I-Rezeptoren finden sich auf NK-Zellen (*Lanier 1998*). Ligand für den C-Lektin-Typ ist HLA-E, ein Molekül, das konservierte Nonapeptide klassischer MHC I-Produkte (HLA-A, -B und -C) benötigt, um an der Zelloberfläche exprimiert zu werden. Der C-Lektin-Rezeptortyp erkennt daher die MHC I-Expression durch Zellen an sich. Liganden der Rezeptoren des Immunglobulin-Typs (*killer immunoglobulin* oder *inhibitory receptor*, KIR) dagegen sind gemeinsame Epitope von HLA Klasse I-Molekülen, welche bestimmte Allele von HLA-A, -B und -C zu Gruppen zusammenfassen.

Tabelle 1: MHC-Rezeptoren der NK-Zellen und ihre Liganden

Rezeptor	C-Lektin-Typ	KIR Gruppe 1	KIR Gruppe 2	KIR Gruppe 3	KIR Gruppe 4
Liganden	HLA-E	HLA-Cw2, 4, 5, 6	HLA-Cw1, 3, 7, 8	HLA-Bw4	HLA-A3, 11

Die MHC-Rezeptoren der NK-Zellen umfassen jeweils sowohl inhibierende als auch aktivierende Subtypen, die sich durch ihre intrazelluläre Domänen unterscheiden. Das Signal der inhibierenden Rezeptoren ist stärker als das aktivierende, so dass bei regelrechter MHC-Expression einer Zielzelle die Aktivierung der NK-Zelle unterbleibt. Der C-Lektin-Typ der NK-Rezeptoren beinhaltet auch aktivierende Unterformen, die stressinduzierte Moleküle (MICA und ULBP) erkennen.

C-Lektin- und Immunglobulin-Typen der MHC-Rezeptoren umfassen sowohl inhibierende als auch aktivierende Rezeptoren, die sich bei gleichartiger extrazellulärer Domäne durch ihren intrazellulären Anteil unterscheiden. Durch diesen haben sie bei gleicher Spezifität gegensätzliche Wirkungen auf die NK-Zelle. Das Signal inhibitorischer Rezeptoren ist dabei stärker als das korrespondierender aktivierender (*Farag et al. 2002*). Inhibitorische

Rezeptoren des C-Lektin-Typs sind auf allen NK-Zellen vorhanden. Die Expression der Rezeptoren des Immunglobulin-Typs hängt vom KIR-Genotyp ab und ist auf den KIR exprimierenden Zellen zufällig verteilt, d.h. eine NK-Zelle kann einen, aber auch mehrere Rezeptoren unterschiedlicher Spezifität dieses Typs tragen (Farag *et al.* 2002). Kürzlich wurden zudem aktivierende NK-Rezeptoren des C-Lektin-Typs für stressinduzierte Moleküle bekannt. Zu den aktivierenden Rezeptoren gehören auch NKp30, NKp44 und NKp46 mit bislang unbekanntem Liganden (Dieffenbach *et al.* 2001). Hierdurch erhält die Hypothese Unterstützung, dass das inhibitorische Signal durch ein aktivierendes auch übertroffen werden kann, wenn Zielzellen entsprechend verändert sind.

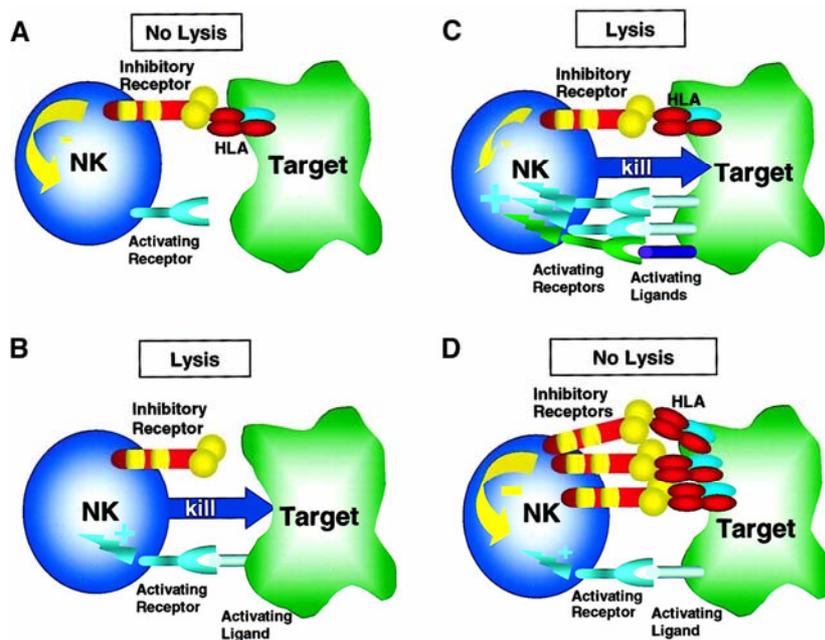


Abb. 1: Aktivierung und Inhibition der NK-Zelle

Die NK-Zellaktivität unterliegt einem fein ausbalancierten Wechselspiel inhibitorischer und aktivierender Rezeptoren. Im Ruhezustand überwiegt das inhibitorische Signal. Eine Zielzelllyse wird ausgelöst durch Abnahme des inhibitorischen oder Zunahme des aktivierenden Signals. Inhibitorische Rezeptoren erkennen ein gemeinsames Antigen von HLA-Untergruppen oder aber HLA-E, das nur exprimiert wird, wenn es durch ein Nonapeptid anderer HLA-Moleküle stabilisiert wird und damit eine regelrechte MHC-Expression anzeigt. Aktivierende Rezeptoren können ebenfalls (schwächer als inhibitorische) HLA-Liganden erkennen, seit kurzem sind auch aktivierende Rezeptoren für stressinduzierte Liganden (MICA, ULBP) bekannt.

- A: Nur der inhibitorische Rezeptor erkennt einen Ligand, eine Aktivierung der NK-Zelle unterbleibt.
 B: Nur der aktivierende Rezeptor erkennt einen Ligand, die Zielzelle wird lysiert.
 C: Das aktivierende Signal überwiegt das inhibierende, die Zelle wird lysiert.
 D: Das inhibierende Signal überwiegt das aktivierende, eine Lyse unterbleibt. Quelle: Farag *et al.* 2002.

Die Zielzellerkennung der ADCC erfolgt über Antikörper, die spezifisch an Zielzellen binden. Im Fall der NK-Zellen wird der F_c-Teil eines Immunglobulins der Klasse IgG durch den Fcγ-Rezeptor III (CD16) gebunden (Lanier 1998). Eine antikörpervermittelte Erkennung ist für das unspezifische Immunsystem charakteristisch, dessen Aktivität dadurch spezifisch gesteuert wird und findet sich ähnlich auch bei Monozyten und Granulozyten.

NK-Zellen sind bereits ohne zusätzliche Stimulation zur zytotoxischen Reaktion in der Lage. Eine Aktivierung mit stark erhöhter Wirksamkeit und erweitertem Zielzellspektrum kann durch Zytokine induziert werden. Interferon α und β , die von virusinfizierten Zellen produziert werden, wirken ebenso aktivierend wie Interleukin (IL)-2 und IL-12 (*Biron et al. 1999, Germann et al. 1995, Herberman 2002*).

1.1.2.2 T-Zellen

Im Gegensatz zu NK-Zellen erfolgt die Zielzellerkennung durch eine zytotoxische T-Zelle antigenspezifisch und meist MHC abhängig, eine MHC-nichtrestringierte Zytotoxizität durch NK-T-Zellen gegen Tumorzellen wird ebenfalls beschrieben (*Sponaas et al. 1988*).

Die Antigenspezifität wird durch den T-Zellrezeptor (TZR) bewirkt, der eine Peptidsequenz erkennt. Jeder T-Zellrezeptor einer gegebenen T-Zelle ist spezifisch für die gleiche Sequenz. Eine T-Zelle rekombiniert ihre für den TZR kodierende DNA während der Reifung im Thymus, die Vielzahl der erkannten Antigene rührt aus der Gesamtheit der möglichen Kombinationen (*Clark et al. 1984*).

Damit ein Antigen an den TZR binden kann, muss es gekoppelt an ein HLA-Molekül auf der Zelloberfläche präsentiert werden (*Weyand et al. 1981*). „Proben“ der durch die Zelle synthetisierten Proteine werden im endoplasmatischen Retikulum an HLA Klasse I-Moleküle gebunden und mit diesen an die Zelloberfläche transportiert. Diese MHC I-Expression findet sich in fast allen körpereigenen Zellen. Extrazelluläres Antigen, das phagozytiert und in Lysosomen abgebaut wurde, wird über HLA Klasse II-Moleküle präsentiert (*Braciale et al. 1987*). Eine MHC II-Expression findet sich daher in den Zellen des Immunsystems. Die Aufteilung der Antigenpräsentation zwischen MHC I und MHC II ist allerdings nicht absolut, insbesondere in dendritischen Zellen ist ein sog. *Cross-priming* möglich (*Larsson et al. 2003*). T-Zellen unterscheiden MHC I und MHC II über ihre TZR-Korezeptoren, CD8 bzw. CD4 (*Swain et al. 1983, Vignali 1994*). Entsprechend dieser Zuordnung gehören CD4 exprimierende T-Zellen in der Mehrzahl zu den Helferzellen. Zytotoxische T-Zellen können CD4 positiv sein, also MHC II erkennen (*Susskind et al. 1996*), tragen in den meisten Fällen jedoch CD8, den MHC I-Korezeptor.

Ob eine Antigenerkennung zur T-Zellaktivierung führt, hängt vom Differenzierungszustand der T-Zelle und kostimulierenden Signalen ab (*Linsley et al. 1993*). Eine naive T-Zelle, die erstmalig Kontakt mit ihrem Antigen hat, benötigt zur Aktivierung ein kostimulatorisches Signal über CD28, das durch dendritische Zellen vermittelt wird (*Tseng 2002 et al.*, Abb. 2).

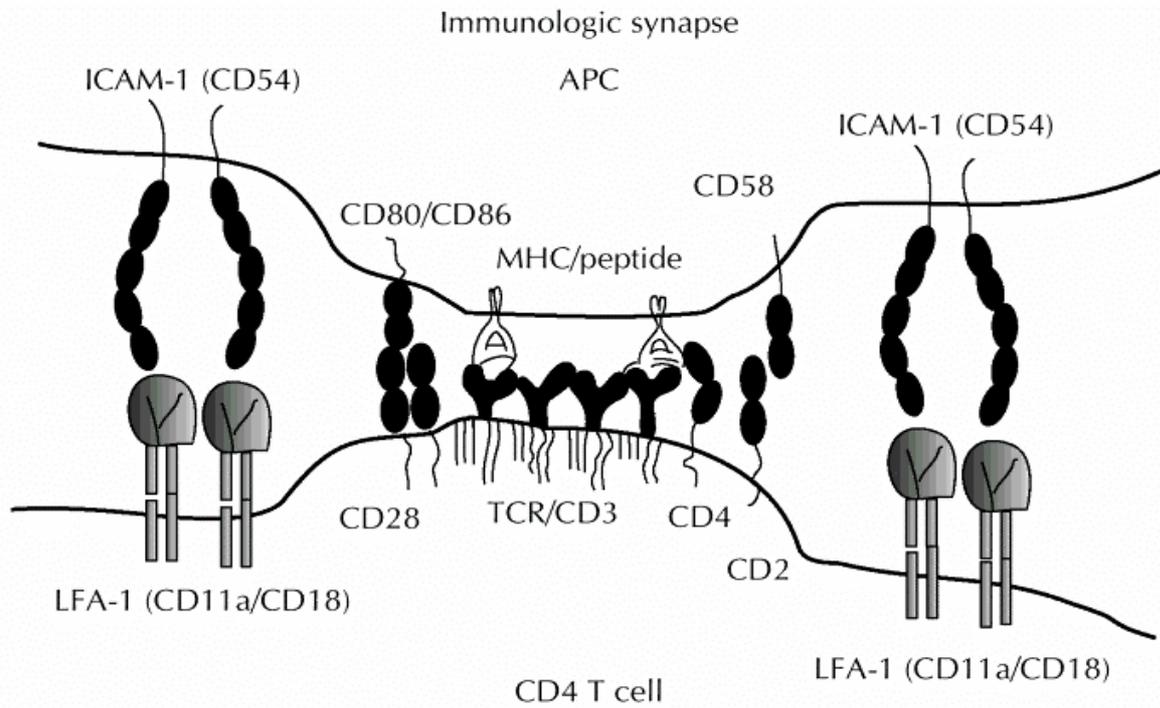


Abb. 2: T-Zellaktivierung: Immunologische Synapse zwischen einer T-Zelle und einer antigenpräsentierenden Zelle

Nach initialer Erkennung des MHC-Antigenkomplexes über den T-Zellrezeptor (TCR) und Adhäsion an die antigenpräsentierende Zelle (APC) erfolgt eine längere T-Zell-APC-Interaktion, bei der eine immunologische Synapse ausgebildet wird. Diese besteht aus einem zentralen Areal, in dem die Interaktion zwischen Peptid-MHC-Komplex und TCR-Komplex erfolgt, weiter außen liegen Rezeptor-Ligandenpaare zur Kostimulation (CD2/CD58, CD28/CD80 und CD86) und ganz außen Adhäsionsmoleküle (LFA-1/CD54), die die Synapse stabilisieren und den engen Zell-Zellkontakt in der Mitte ermöglichen. Adhäsions- und kostimulatorische Funktion sind allerdings nicht streng getrennt. Quelle: *Salazar-Fontana et al. 2001*.

Eine zytotoxische T-Effektorzelle dagegen benötigt keine Kostimulation mehr, sie ist unmittelbar aktiv (*Hamann et al. 1997*). Gedächtniszellen wiederum exprimieren CD28, erhalten zur Reaktivierung also ebenfalls kostimulierende Signale von professionellen antigenpräsentierenden Zellen. Das kostimulatorische Signal entscheidet, ob eine ruhende T-Zelle nach Antigenkontakt aktiviert wird und in Teilung und Differenzierung eintritt; fehlt es, tritt Anergie ein (*Salazar-Fontana et al. 2001*).

T-Zellsubpopulationen können ebenfalls die MHC-Rezeptoren des C-Lektin- und des Immunglobulintyps tragen und werden dann durch diese zusätzlich reguliert (*Lanier 1998, Vivier et al. 2002*).

1.2 Bedeutung zytotoxischer Interaktionen

1.2.1 Physiologische Bedeutung der zellulären Zytotoxizität: virale und anti-Tumor-Immunität

Potenzielle Ziele einer zytotoxischen Aktivität sowohl von T- als auch NK-Zellen sind durch intrazelluläre Pathogene befallene Zellen sowie Tumorzellen (*Lieberman 2003*). Wie bereits erwähnt, tragen zytotoxische T-Zellen in der Mehrzahl den MHC I-Korezeptor CD8. Ihre Zielzellen sind daher Zellen, die ein verändertes, von ihnen selbst hergestelltes Peptid präsentieren; dazu gehören virale Peptide, aber auch Tumorantigene. Allerdings können sowohl virusinfizierte Zellen als auch maligne transformierte Zellen ihre MHC I-Expression herabregulieren (*Rees et al. 1999*). In diesem Fall werden sie durch NK-Zellen erkannt, vorausgesetzt, dass durch virale DNA oder Tumorzellen keine Expression MHC-artiger Moleküle verursacht wird, selektiv die Herabregulierung der Expression inhibitorischer HLA-C- und -E- Moleküle auf der Zelloberfläche verhindert oder HLA-E durch ein virales Peptid anstelle eines Nonapeptids von HLA-A, -B oder -C stabilisiert wird (*Scalzo 2002*).

Zusätzlich beeinflussen weitere Faktoren (Adhäsion, Aktivierung) die zytotoxische Interaktion (*Farag et al. 2002, Lanier 1998, Uharek et al. 1996, Montoya et al. 2002*). Diese können insbesondere bei maligne transformierten Zellen verändert sein oder ganz fehlen, wodurch die Ausbildung der immunologischen Synapse für eine effektive Interaktion unterbleibt. Einige Autoren stellten zudem fest, dass die MHC Klasse I-Expression von Zellen nicht mit ihrer Empfindlichkeit für NK-Zellaktivität korreliert (*Stam et al. 1989, Lehmann et al. 1999*). Auch wurde berichtet, dass virusinfizierte und Tumorzellen unmittelbar die Mechanismen der zellulären Toxizität unterlaufen können (*Trapani et al. 2002*). Dies unterstreicht die Komplexität zytotoxischer Interaktionen.

1.2.2 Aspekte der klinischen Bedeutung zellulärer Zytotoxizität: Graft-versus-Host- und Graft-versus-Leukämie-Reaktionen

Die zelluläre Zytotoxizität wird weitgehend als der der *Graft-versus-Leukämie-Reaktion* (GvL) nach allogener hämatopoetischer Transplantation zugrundeliegende Mechanismus angesehen. Bei einer solchen Transplantation wird das blutbildende und das Immunsystem des Transplantatempfängers durch das des Spenders ersetzt. Die GvL ist eine immunologische Reaktion, bei welcher von Spenderzellen abstammende Immunzellen aktiv noch vorhandene maligne Zellen des Empfängers eliminieren. Eine GvL wurde bereits 1956 durch *Barnes et al.*

als Wirkmechanismus vorgeschlagen, in denen durch allogene Transplantation eine Leukämie eradiziert wurde (*Barnes et al. 1956*). Der Nachweis der GvL beim Menschen gelang zunächst in erster Linie deduktiv anhand einer besseren Prognose nach allogener Transplantation als nach konventioneller Therapie, die nicht allein durch die aggressive konditionierende Chemotherapie zu erklären war. Die GvL wurde direkt nachgewiesen durch Untersuchungen *in vitro* und durch die Wirksamkeit von Spenderlymphozyteninfusionen oder Unterbrechen der Immunsuppression im Rezidivfall nach allogener Transplantation (*Gao et al. 2000, Bonnet et al. 1999, Dolstra et al. 1999, Albi et al. 1996, Howrey et al. 2000*). Verschiedene Arten maligner hämatologischer Erkrankungen zeigen hierbei eine unterschiedliche Sensitivität für eine GvL (*Kolb et al. 1995*).

Die GvL tritt in Korrelation mit der *Graft-versus-Host*-Erkrankung (GvHD) auf und ist in vielen Fällen eine Erscheinung dieser (*Luznik et al. 2002*). Eine GvHD kann leicht verlaufen, aber auch eine schwere bis tödliche Reaktion von Spenderlymphozyten sein. Sie wird durch Spenderzellen vermittelt, die sich gegen Gewebe des Empfängers allgemein richten und diese schädigen, darunter auch die malignen Zellen, falls diese über gleiche Antigene wie gesunde Gewebe erkannt werden können. Verantwortlich für die GvHD sind alloreaktive zytotoxische T-Zellen, die auf HLA-Merkmale des Empfängers reagieren; die Wahrscheinlichkeit und Schwere einer GvHD, aber auch einer GvL steigt daher mit zunehmender „Fremdheit“, d.h. genetischen Unterschieden zwischen Spender und Empfänger insbesondere des MHC-Lokus.

Auch der gegenteilige Fall, das Auftreten einer GvL bei gleichzeitiger Unterbindung einer GvHD, wurde beschrieben. Hier wurden NK-Zellen als für diese Phänomene verantwortliche Zellen ausgemacht; Voraussetzung war ein sogenanntes gerichtetes KIR-*Mismatch*. Bei dieser Konstellation zwischen Transplantatspender und –Empfänger tragen Spender-NK-Zellen inhibitorische Rezeptoren des KIR-Typs, für die der HLA-Typ des Empfängers keine passenden Liganden aufweist. Daher werden NK-Zellen, die nur diesen KIR tragen, in ihrer Aktivität nicht gehemmt und eliminieren maligne Zellen wie möglicherweise auch die GvHD fördernden dendritischen Zellen des Empfängers (*Ruggeri et al. 2002*).

1.2.3 Immuntherapie mit zytotoxischen Zellen

GvL oder allgemeiner *Graft-versus-Tumor*-Reaktionen werden auch jenseits allogener Transplantationen bei Infusionen von Immunzellpräparaten genutzt. Im einfachsten Fall erhalten Patienten nach allogener Transplantation unbehandeltes peripheres Blut oder unstimuliertes Leukapherisat des Spenders, um eine GvL durch die darin enthaltenen T- oder auch NK-Zellen zu induzieren (*Slavin et al. 1998, Porter et al. 1995, Luznik et al. 2002*). Als eine Indikation für eine solche *donor lymphocyte infusion*, DLI, bei Kindern gilt der Nachweis eines steigenden Anteils patienteneigener Zellen im Blut oder Knochenmark; dieser ist oft durch T-Zellen bedingt, die das Transplantat abstoßen und so dem Rezidiv Vorschub leisten. Es wurde gezeigt, dass DLI diesen Anstieg unter Umständen umkehren können (*Bader et al. 1999*). Allerdings werden DLI restriktiv gehandhabt, da sie das Risiko einer schweren GvHD bergen bei unvorhersehbarem Nutzen (*Collins et al. 1997, Verdonck et al. 1998*).

Speziellere immuntherapeutische Ansätze zielen darauf ab, gezielt nur eine Art Immunzellen zu infundieren, in Frage kommen hierfür T- und NK-Zellen sowie dendritische Zellen als hochpotente Aktivatoren einer T-zellvermittelten Immunantwort.

Primäre NK-Zellen sind in der Regel erst in einem hohen Verhältnis von Effektorzellen zu Zielzellen optimal wirksam; eine Stimulierung mittels Zytokinen führt allerdings zu einer Steigerung ihrer Aktivität. Eine Anreicherung der NK-Zellen erlaubt, diese *in vitro* durch IL-2 zu aktivieren und zu expandieren, ohne durch dieses auch auf T-Zellen hochwirksame Zytokin zugleich die infundierte T-Zelldosis und –aggressivität zu erhöhen (*Lang et al. 2002*).

Für Gaben primärer T-Zellen wurden Methoden entwickelt, im Falle einer nicht erwünschten, schweren GvH gezielt medikamentös eine Apoptose infundierter T-Zellen zu induzieren. Für diesen Zweck wurden verschiedene Suizidgen-Systeme entwickelt und in T-Zellen eingeschleust. Diese sensibilisieren die transduzierten T-Zellen für Medikamente, die unter normalen Bedingungen nicht zu ihrem Absterben führen. Klinisch eingesetzt wurde bereits ein Herpes-simplex-Virus Thymidin-Kinase-System, durch welches in transduzierten T-Zellen Ganciclovir zu seinem Monophosphat und weiter über physiologische intrazelluläre Kinasen zu seiner Wirkform phosphoryliert wird. Das Triphosphat wird in neue synthetisierte DNA eingebaut und induziert als falscher Basenbaustein Strangabbrüche (*Bonini et al. 1997*).

Dendritische Zellen sind als „professionelle antigenpräsentierende Zellen“ hochpotente physiologische Aktivatoren der durch T-Zellen vermittelten Immunantwort. Diese Fähigkeit zur T-Zellaktivierung wird therapeutisch genutzt, indem dendritische Zellen mit Tumorlysaten oder -peptiden behandelt und als „Vakzine“ infundiert werden, um eine In vivo-Immunantwort durch T-Zellen zu generieren (*Geiger et al. 2001, Brossart 2002*).

Um die Aktivität von Immunzellen gegen Tumoren gezielt zu steuern, werden Untersuchungen zu den Möglichkeiten und der Wirksamkeit eines sogenannten Retargeting unternommen. Hierfür werden immunkompetente Zellen mit chimären antigenspezifischen Rezeptoren transduziert. Erkennt der Rezeptor seinen spezifischen Ligand auf einer Zelle, erfolgt eine Aktivierung der Effektorzelle mit konsekutiver Zielzelllyse (*Uherek et al. 2002, Willemsen et al. 2001, Schirrmann et al. 2001*). Eine Variante dieses Ansatzes ist der Einsatz bispezifischer Antikörper gegen ein Zielzellepitop und einen aktivierenden Rezeptor der zytotoxischen Zellen (*Kipriyanov et al. 1998*).

1.3 Zytotoxizitätsmessung

Der Aufwand und das Risiko zellulärer Immuntherapien bei potenziell fehlendem Nutzen impliziert die Notwendigkeit der Messung der Aktivität solcher manipulierter Immunzellen vor Applikation. Diese Notwendigkeit der unmittelbaren Zytotoxizitätsmessung wird durch die Untersuchungsergebnisse in der Literatur unterstrichen. So fanden manche Autoren keine Korrelation der gemessenen zytotoxischen Aktivität zur MHC I-Expression und der Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Zielzellen; das Zielzellspektrum variierte je nach Aktivitätszustand der Effektorzellen und der unterschiedliche Zeitpunkt der Lyse ließ vermuten, dass unterschiedliche Mechanismen durch die Effektoren eingesetzt wurden (*Lehmann et al. 1999*).

Für die Messung der zytotoxischen Aktivität werden Effektorzellen mit potenziellen Zielzellen in mehreren Effektor:Zielzell-Ratien (Effektor:Target-, E:T-Ratio) über 2 – 4 Stunden oder länger kokultiviert und anschließend gemessen; die Veränderungen der Zielzellen in den Kokulturen werden mit denen einer Zielzellkontrolle verglichen und daraus Rückschlüsse über den Einfluss der Effektorzellen gezogen.

Der älteste und am weitesten verbreitete Zytotoxizitätsassay ist der Chrom-Release-Assay (*Brunner et al. 1968*). Dieser Assay misst aus den toten Zellen in den Kulturüberstand freigesetztes radioaktives $^{51}\text{Chrom}$. Nach gleichem Prinzip arbeitet der Europiumassay, hier wird ein fluoreszierendes Substrat nachgewiesen (*Blomberg et al. 1986*). Weiterhin finden sich in der Literatur zahlreiche durchflusszytometrische Assays, die meist über Totfarbstoffe oder anhand Veränderungen der Lichtstreuungseigenschaften tote Zellen nachweisen. Auch der Nachweis von Enzymaktivität der Zielzellen wird eingesetzt, um deren Überleben oder Absterben zu ermitteln und zu quantifizieren (eine Übersicht über die Assays zellulärer Zytotoxizität in der Literatur wird unter 5.1 gegeben).

Zu Beginn dieser Arbeit wurden in der Klinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin III zwei Zytotoxizitätsassays parallel verwendet, der Europium-Release-Assay und ein durchflusszytometrischer Assay.

Der durchflusszytometrische Assay basierte auf einer Membranfärbung der Zielzellen mit PKH-67, einem grün fluoreszierenden Farbstoff. Zur Färbung der Zielzellen wurden diese dreimalig mit Puffer gewaschen, um sämtliche Proteine in Serum oder Zellkulturmedium zu entfernen, auf $1 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt und für 5 Minuten mit der Färbelösung inkubiert. Die Färbung wurde durch Zugabe von fetalem Kälberserum abgestoppt und die Zellen erneut zweimalig gewaschen, um sämtliche Farbüberschüsse zu entfernen. Danach wurden die Kokulturen und Kontrollen erstellt und für 4 h im Brutschrank inkubiert. Zur durchflusszytometrischen Messung wurden $10 \mu\text{l}$ einer $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ -Lösung an PI zugegeben und zur Bestimmung der toten Zielzellen der Prozentsatz der PI und PKH-67 doppelt positiven zellulären Events an den gesamten PKH-67 positiven Events berechnet.

Der Färbevorgang war zeitintensiv und mit ausgedehnter Zellmanipulation und Zellverlusten von ca. 50% behaftet, so dass insbesondere bei Einsatz von kryopräserviertem Zellmaterial gehäuft die Anzahl der Ansätze reduziert werden musste. In ca. einem Drittel der Fälle war die Anfärbung der Zellen von vornherein zu schwach, um eine vollständige Unterscheidung von den Effektorzellen zu ermöglichen; das Problem konnte auch durch wiederholte Optimierungsversuche nicht behoben werden. Zudem war die Färbung nicht für Patientenproben geeignet, die noch Restlymphozyten enthielten, da sie die Zellen nicht differenziert markierte.

Nach Kokultur machte sich ein zusätzlicher Verlust der Membranfärbung bemerkbar, der die Unterscheidung weiter verschlechterte, so dass die Mehrzahl der Assays nicht sinnvoll auswertbar war. In den anderen Fällen traten regelmäßig Ergebnisse auf, die keine sinnvolle Interpretation hinsichtlich des Vorliegens oder Fehlens einer zytotoxischen Aktivität erlaubten, so dass eine hohe Ausfallsrate an Assays zu verzeichnen war.

Der als Referenz- und Ergänzungsmethode eingesetzte Europium-Assay (s. 2.2.6) war ebenfalls nicht zuverlässig aussagefähig. Zum einen war die Markierung der Patientenzellen häufig schlecht, so dass sie nur gering über der Spontanfluoreszenz lag, zum anderen traten durch unzureichende Maximallyse wiederholt Aktivitäten von deutlich über 100% (bis 150%) auf, so dass zwar allgemein eine Aktivität festgestellt werden konnte, das Ausmaß aber nicht beurteilbar war. Wie der durchflusszytometrische PKH-67-Assay war auch die Europium-Methode nicht für gemischte Zielzellpopulationen geeignet, da sie die Zellen nicht differenziert markierte. Zudem waren die Effektoren nicht gesondert beurteilbar. Die dargelegten Schwierigkeiten machten die Etablierung eines neuen Assays zur Beurteilung einer zytotoxischen Aktivität insbesondere gegen kryopräservierte Leukämieblasten notwendig.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Gabe zytotoxisch aktiver Zellen eröffnet neue Therapieoptionen für Patienten mit malignen Erkrankungen schlechter Prognose. Da diese Ansätze mit erheblichen Risiken für die Patienten behaftet sind, werden vermehrt Anstrengungen unternommen, durch ex vivo-Manipulation der Zellen das Risiko zu minimieren oder den Nutzen zu optimieren. Die spezifisch zytotoxische Komponente der Immunzellen wird angereichert, expandiert und aktiviert sowie gegebenenfalls genetisch verändert. Diese Verfahren sind aufwändig und können potenziell zu einem Verlust der zytotoxischen Aktivität führen. Zur Analyse der Aktivität manipulierter Zellen und der Effektivität immuntherapeutischer Ansätze für den jeweiligen Patienten ist daher eine geeignete Untersuchungsmethode unerlässlich. Die bislang in der Klinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin III eingesetzten Zytotoxizitätsassays waren in ihrer Aussagefähigkeit unbefriedigend. Um besser als bisher manipulierte Zellen auf ihre Funktionsfähigkeit untersuchen zu können, sollte ein neuer Zytotoxizitätsassay entwickelt werden. Für diesen wurde die Durchflusszytometrie als Messmethode gewählt, da sie eine direkte Visualisierung der Zellen erlaubt und die Beurteilung mehr als nur einer Population ermöglicht.

Der neu zu entwickelnde Assay sollte einfach in der Handhabung sein und eine Kokultur weitgehend unmanipulierter Ziel- und Effektorzellen erlauben. Als Zielzellen sollten sowohl Leukämie-Zelllinien als auch kryopräservierte leukämische Blasten von Patienten einsetzbar sein. Es sollte die Aktivität sowohl der Zelllinie NK-92 als auch primärer, aus Blut von gesunden Spendern gewonnener Zellen nachweisbar sein. Durch Markierung mittels Fluoreszenz konjugierter monoklonaler Antikörper sollte eine optimale Differenzierung der in den Kokulturen enthaltenen Zellpopulationen erfolgen. In Patientenproben enthaltene nicht-blastäre Zellen sollten von den eigentlichen Zielzellen unterscheidbar sein, um auch Patientenmaterial verwenden zu können, das weniger als 80% an Leukämieblasten aufweist. Ein Totfarbstoff sollte zwischen vitalen und toten Zellen unterscheiden.

Um eine gute Darstellung der Zielzellen in Kokultur mit den Effektorzellen durch Antikörpermarkierung zu erreichen, mussten folgende Voraussetzungen erfüllt werden:

- Alle Zielzellen sollten durch Antikörper erfasst werden, auch heterogene maligne Populationen in manchen Patientenproben;
- der Antikörper zur Markierung der Zielzellen sollte nicht an die Effektorzellen binden;
- weitere in Patientenproben enthaltene Zellen (Restlymphozyten) sollten durch den Antikörper nicht oder deutlich verschieden von den Blasten markiert werden;
- das Signal der markierten, Fluoreszenz positiven Zellen sollte deutlich von dem der negativen unterscheidbar sein;
- das zu markierende Epitop sollte auf der Zelloberfläche liegen, um eine Membranpermeabilisation zur intrazellulären Markierung zu vermeiden, die zu fälschlicher Markierung mit dem Totfarbstoff führen würde;
- der Totfarbstoff sollte lebende klar von toten Zellen unterscheiden und eine Quantifizierung einer spezifischen Lyse der Ziel- durch die Effektorzellen ermöglichen.

2. Materialien und Methoden

2.1 Geräte und Materialien

2.1.1 Allgemein

Pipetten „Reference“ 10 µl – 100 µl, 100 – 1000 µl	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
TipOne Pipettenspitzen, blau und gelb	StarLab OY, Helsinki, Finnland
Minifuge RF	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland
Polypropylen-Röhrchen, 15 ml und 50 ml	Becton Dickinson Labware Europe, Meylan, Frankreich
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	Sarstedt GmbH, Nümbrecht, Deutschland

2.1.2 Zellaufbereitung und -separation

CD3 MicroBeads,	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland	
CD56 MicroBeads,		
Depletions- und Selektionssäulen,		
AutoMacs, MiniMacs, VarioMacs		
RosetteSep Kits		Stem Cell Technologies Inc, Meylan, Frankreich
Biocoll		Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Dulbecco's PBS, Kalzium und Magnesium frei		BioWhittacker, Verviers, Belgien
DMSO		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

2.1.3 Durchflusszytometrie

Vierfluoreszenz-Durchflusszytometer XL-MCL mit 525 nm-, 575 nm-, 620 nm- und 675 nm-Bandpass-Filtern	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
TQ-Prep	Coulter Corporation, Miami, USA
75 mm-Probenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
CD3 (UCHT1) FITC, PE und ECD,	Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich
CD4 (13B8.2) PC5,	
CD8 (B9.11) PC5,	
CD10 (ALB1) FITC und PE,	
CD13 (SJ1D1) PE,	
CD15 (80H5) FITC,	
CD19 (J4.119) FITC und PE,	
CD33 (D3HL60-251) PE,	
CD34 (581) FITC und PE,	
CD45 (J33) FITC,	
CD56 (N901/NKH-1) FITC, PE und PC5	
StemTrol-Zellen	

Cyto-Stat tetraCHROME CD45/CD4/CD8/CD3,
 (B3821F4A, FCI12T4D11, SFCI21ThyD3, UCHT1),
 Cyto-Stat tetraCHROME CD45/CD56/CD19/CD3,
 (B3221F4A, N901/NKH-1, J4.119, UCHT1),
 Flow-Count Beads,
 Flow-Set Beads,
 CytoComp Cell Kit,
 CytoComp Reagent Kit,
 Immuno-Trol Kontrollblut,
 ImmunoPrep-Lysesystem
 7-AAD,
 Propidiumjodid

Beckman Coulter, Roissy, Frankreich
 Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland

2.1.4 Europium-Assay

1234 Delfia Research Fluorimeter
 96-Well-Titerplatten
 NaCl,
 KCl,
 MgCl₂,
 Europium-3-Acetat
 DPTA
 Enhacement-Solution,
 Lyse-Puffer

Wallac OY, Turku, Finnland
 Nalge Nunc, Roskilde, Dänemark
 Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
 Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
 Wallac OY, Turku, Finnland

2.1.5 Zellkultur

Sterilbank HeraSafe,
 Brutschrank BBD 6220
 Zellkulturflaschen
 X-vivo 10 Zellkulturmedium
 RPMI 1640 Zellkulturmedium,
 Glutamin 200 mM
 Proleukin rhIL-2
 FCS

Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland
 Nalge Nunc, Roskilde, Dänemark
 BioWhittacker, Verviers, Belgien
 Gibco, Paisley, Großbritannien
 Chiron GmbH, Ratingen, Deutschland
 Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland

2.1.6 Datenaufbereitung

TravelMate
 System II Version 3.0,
 Expo 32 Software
 MS Excel 97,
 MS Word 97,
 Windows 98
 Rittersport pfefferminz

Acer Computer GmbH, Ahrensburg, Deutschland
 Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
 Microsoft Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Pipettiertechnik

Für alle Schritte, die präzises Pipettieren erforderten, wurde die reverse Pipettiertechnik angewandt, d.h., das zu pipettierende Volumen wurde einmalig aufgezogen und danach ausgestoßen, um die Pipettenspitze zu benetzen, bevor endgültig pipettiert wurde. Auf diese Weise wurden Volumenverluste durch Rückstände in der Pipettenspitze verhindert.

2.2.2 Waschschritte

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Zellen in Kalzium und Magnesium freiem PBS (PBS w/o) gewaschen. Dazu wurden sie in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, mit PBS w/o aufgefüllt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur bei 200 x g mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet aufgeklopft. Danach wurden die Zellen resuspendiert.

2.2.3 Dichtegradienten-Zentrifugation

Dieses Verfahren zur Auftrennung von Zellsuspensionen nutzt Dichteunterschiede zwischen deren Bestandteilen aus (*Noble et al. 1967*). Es wurde hier angewandt, um Erythrozyten, Granulozyten und gegebenenfalls deren Vorstufen aus Blut- oder Knochenmarksproben zu entfernen. Die Proben wurden zunächst im Verhältnis 1:2 mit PBS w/o versetzt und dann auf das Ficoll-Hypaque-Trennmedium aufgeschichtet. Die Dichte des Ficolls lag zwischen der von Erythrozyten und Granulozyten auf der einen und derer der mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) und des Plasmas einschließlich Thrombozyten auf der anderen Seite. Während der folgenden, 30 minütigen Zentrifugation bei 250 x g diffundierten erythrozytäre und granulozytäre Zellen durch das Trennmedium, während sich die mononukleären Zellen in einem „Ring“ an der Röhrchenwandung auf dem Trennmedium sammelten. Die Thrombozyten verblieben im Plasmaüberstand. Der „Ring“ mononukleärer Zellen wurde mit einer Pipette abgehoben und zweimal gewaschen, um Ficoll-Reste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in 3 ml PBS w/o resuspendiert und die Konzentration mit einem Zählgerät des hämatologischen Routinelabors bestimmt.

2.2.4 Zellgewinnung und -aufbereitung

2.2.4.1 Zielzellen der zytotoxischen Aktivität

2.2.4.1.1 K562

K562 (ATCC Nr. CCL-243) ist eine Zelllinie, die aus Blasten eines Patienten mit akuter myeloischer Leukämie generiert wurde. Sie zeichnet sich durch Fehlen der Mehrzahl auf hämatopoetischen Zellen exprimierter Oberflächenmarker aus, sie ist lediglich zu 25% für CD7 positiv. Aufgrund des völligen Fehlens einer MHC I-Expression sind K562-Zellen sehr empfindlich für Lyse durch NK-Zellen, sowohl naiver als auch Lymphokin aktivierter. K562 wird daher als Zielzelllinie für NK-Zellaktivität eingesetzt (*Ortaldo et al. 1977*).

K562 wurde in RPMI 1640 unter Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS) und 1% einer 200 mM Lösung von Glutamin in 5% CO₂-Atmosphäre bei 95% Luftfeuchte und 37 °C kultiviert. Um die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten, wurden die Kulturen alle 3-4 Tage auf $0,5 - 1 \cdot 10^6$ /ml mit Kulturmedium verdünnt.

2.2.4.1.2 Leukämieblasten

2.2.4.1.2.1 Entnahme

Die Gewinnung von Patientenblasten erfolgte im Rahmen der diagnostischen Knochenmarkspunktionen bzw. Blutentnahmen zum Diagnose- bzw. Rezidivzeitpunkt. Es wurden jeweils heparinisierte Proben gesammelt.

2.2.4.1.2.2 Anreicherung und Kryopräservierung

Um Erythrozyten, Granulozyten und unreife Vorstufen dieser zu entfernen, wurde eine Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation vorgenommen (s.o.) Anschließend wurden die Zellen auf eine Konzentration von $2 \cdot 10^7$ /ml eingestellt. Diese Suspension wurde 1:2 mit X-vivo 10 Zellkulturmedium + 10 % FCS und einer Endkonzentration von 10 % DMSO als Frostschutz versetzt. Die Zellen wurden in 1 ml-Portionen auf Einfrierröhrchen verteilt und bei -80 °C oder -180 °C kryopräserviert. Dichtegradienten-Zentrifugation und Kryopräservierung erfolgten unter sterilen Kautelen.

2.2.4.1.2.3 Auftauen kryopräservierter Leukämieblasten

Zum Auftauen wurden die Proben zügig in PBS w/o mit 10 % EDTA ca. 1:10 verdünnt und für 15 Minuten bei 4 – 8 °C gelagert, um eine Diffusion des toxischen DMSO aus den Zellen bei noch reduzierter Stoffwechselaktivität zu ermöglichen. Danach wurden die Zellen zentrifugiert und das Pellet einmalig in X-vivo 10 mit 5 % FCS und 100 µg Acetylcystein als SH-Gruppendonator zum Entgiften restlichen DMSO gewaschen. Die Zellen wurden im Anschluss in X-vivo 10 mit 5 % FCS aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 – 8 °C gelagert.

2.2.4.2 Zytotoxische Effektorzellen

2.2.4.2.1 NK-92

NK-92 ist eine von einem Patienten mit malignem Non-Hodgkin-Lymphom gewonnene und 1992 etablierte Zelllinie. Sie wächst IL-2-abhängig und ähnelt in ihren Eigenschaften aktivierten NK-Zellen, zeichnet sich allerdings durch eine höhere zytotoxische Aktivität gegen ein breiteres Spektrum an Zielzellen aus. Als ursächlich hierfür wird das weitgehende Fehlen von inhibitorischen Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie angesehen (*Maki et al. 2001*). An Zelloberflächen-Antigenen finden sich CD2, CD7, CD11a, CD28, CD45, CD54 sowie CD56 in hoher Dichte (CD56^{bright}). Eine Reihe gängiger Antigene von Zellen hämatopoetischer Linien findet sich nicht; NK-92-Zellen sind negativ für CD1, CD3, CD4, CD5, CD8 (T-zelluläre, z.T. auch monozytäre und dendritische Antigene), CD10, CD19, CD20, CD23 (B-zelluläre, z.T. T-, granulozytäre Antigene), CD14, CD16 (monozytäre Antigene, CD16 auch auf CD56^{dim}-NK-Zellen und Granulozyten) sowie CD34 und HLA-DR. Die NK-92-Zelllinie wurde uns freundlicherweise von H.G. Klingemann zur Verfügung gestellt.

NK-92-Zellen wurden in X-vivo 10 supplementiert mit hitzeinaktiviertem humanen Plasma (5%) und 100 IE/ml IL-2 bei 37 °C in 5% CO₂-Atmosphäre bei 95% Luftfeuchte kultiviert, durch regelmäßiges Verdünnen mit Kulturmedium wurden sie in der logarithmischen Expansionsphase bei 3 – 5 * 10⁵/ml gehalten.

2.2.4.2.2 Primäre NK-Zellen und T-Zellen

Als Quelle der Effektorzellen dienten Proben aus Negativfraktionen CD34 selektierter peripherer Blutstammzellpräparaten gesunder Spender im Rahmen allogener Transplantationen sowie Blutproben. Um die Effekte der T- und NK-Zellen unabhängig voneinander und von anderen Zellen zu beurteilen, wurden sie hochangereichert. Dafür wurden zwei prinzipiell unterschiedliche Techniken angewandt.

2.2.4.2.2.1 Magnet activated cell sorting

Für diese Methode war eine initiale Erythrozyten- und Granulozytenreduktion erforderlich, um handhabbare Volumina zu erhalten, einer Hämolyse vorzubeugen und unspezifische Bindungen zu reduzieren. Im Falle von Leukapherisaten wurde sie durch die Apherese selbst erreicht, bei peripherem Blut wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt (s.o.) und die mononukleäre Zellfraktion weiterverarbeitet. Es erfolgte zunächst die Selektion der T-Zellen über den T-Zellmarker CD3. Die Negativfraktion wurde gegebenenfalls einer T-Zelldepletion unterzogen, um residuale CD3 und CD56 doppelt positive T-Zellen zu entfernen. Aus der T-Zell-freien Negativfraktion dieser Schritte wurden die NK-Zellen nach Markierung über den NK-Zellmarker CD56 gewonnen.

Die Zellen wurden auf ein Volumen von 300 – 500 µl eingestellt und mit dem jeweiligen an ferromagnetische Beads gekoppelten Selektionsantikörper in einem Volumenverhältnis von 5:1 Zellsuspension:Antikörpersuspension für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellsuspensionen mit PBS w/o gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Danach wurden sie über eine Macs-Säule aus Dextran beschichteten ferromagnetischen Beads geleitet, die sich in einem starken Magnetfeld befand; dadurch blieben die markierten Zellen an die Säule gebunden, während die nicht markierten Zellen mit PBS eluiert wurden. Durch Entfernen des Magnetfeldes wurde die Bindung der markierten Zellen an die Säule aufgehoben. Diese wurden ebenfalls mit PBS w/o eluiert und separat aufgefangen.

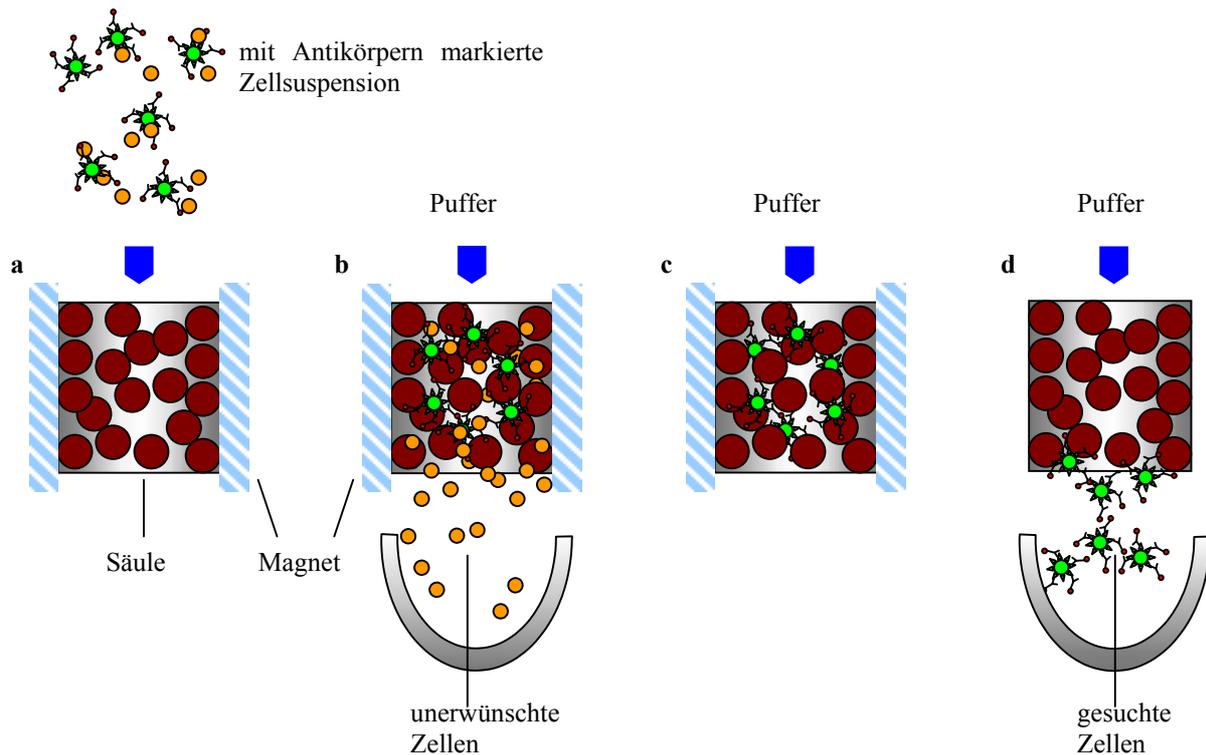


Abb. 3: Prinzip der Macs-Technik

Die gesuchten Zellen (grün) werden mit einem Antikörper markiert, an den Eisenoxid-Kügelchen gekoppelt sind. Die Zellsuspension wird durch eine Säule mit (größeren) Eisenoxid-Kügelchen geleitet, an die ein starkes Magnetfeld anliegt (a). Die antikörpermarkierten Zellen werden durch das Magnetfeld in der Säule zurückgehalten, die übrigen Zellen mit Puffer eluiert und aufgefangen (b). Zurück bleiben die gesuchten Zellen, diese werden ein zweites Mal mit Puffer gespült (c). Wird der Magnet entfernt, können die gesuchten Zellen ebenfalls eluiert und aufgefangen werden (d).

2.2.4.2.2 Alternatives Anreicherungsverfahren: Rosette-Technik

Dieses Verfahren besteht im Wesentlichen aus einer Dichtegradienten-Zentrifugation wie oben beschrieben. Vorher erfolgt eine 15 minütige Inkubation mit einem Gemisch aus bispezifischen tetrameren Antikörpern gegen auf Erythrozyten exprimiertes Glykophorin A zum einen und zum anderen gegen CD3, CD4, CD19, CD36 und CD66b zur Gewinnung von NK-Zellen bzw. CD16, CD19, CD36, CD56 und CD66b für T-Zellen. Durch diese Antikörper werden sämtliche unerwünschten Leukozyten an die Erythrozyten gebunden und diffundieren mit diesen durch das Trennmedium, die gesuchten Zellen verbleiben im Ring auf dem Medium und können abgehoben werden. Dieses Verfahren eignet sich nicht für Apherisate oder andere Materialien mit geringem Erythrozytenanteil.

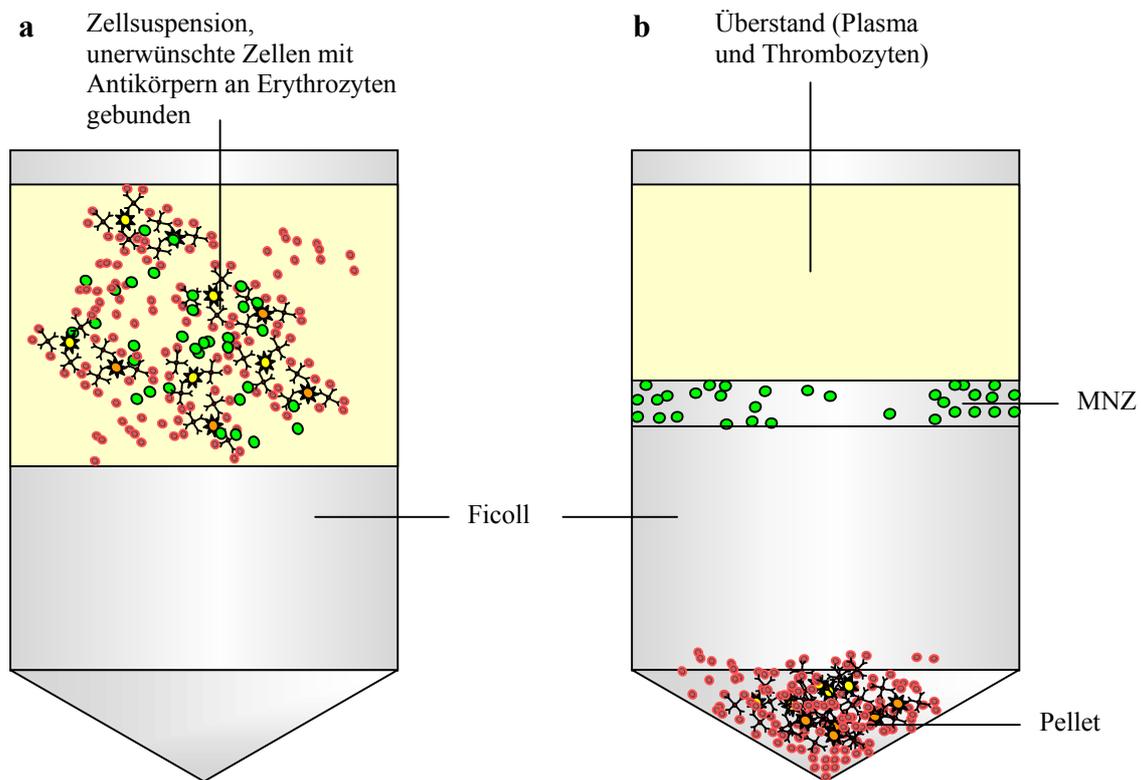


Abb. 4: Prinzip der Rosette-Technik

Die Zellsuspension wird mit tetrameren bispezifischen Antikörpern inkubiert, die jeweils ein Epitop der unerwünschten Zellen und Glycophorin A auf Erythrozyten erkennen. Dadurch werden die unerwünschten Zellen an die Erythrozyten gebunden. Die markierte Suspension wird auf eine Ficoll-Trennmedium geschichtet (a). In der anschließenden Zentrifugation diffundieren die Zellagglutinate durch das Trennmedium und sammeln sich im Pellet, die unmarkierten, gesuchten mononukleären Zellen (MNZ) verbleiben auf dem Trennmedium (b) und können mit einer Pipette abgehoben werden. Der Überstand besteht aus Plasma und Thrombozyten, er wird ebenfalls verworfen.

2.2.4.2.2.3 Kultur und Aktivierung

Die angereicherten T- oder NK-Zellen wurden in X-vivo 10 Kulturmedium unter Zusatz von 5 % FCS und 1 % Glutamin aufgenommen, die initiale Dichte lag zwischen $5 \cdot 10^5/\text{ml}$ und $10 \cdot 10^5/\text{ml}$. Zur Aktivierung und Expansion wurden 100 IE IL-2/ml für T-Zellen bzw. 1000 IE/ml für NK-Zellen zugesetzt. Sobald Zellkolonien sichtbar wurden, wurde mit einer vorsichtigen Mediumzugabe begonnen; die Zieldichte lag bei $<1 \cdot 10^7/\text{ml}$. Die Zellen wurden für 10-14 Tage kultiviert, danach erfolgte die durchflusszytometrische Überprüfung auf Reinheit und Vitalität mittels der Antikörperkombinationen CD45/4/8/3 bzw. CD45/56/19/3 und Propidiumjodid (s.u.).

2.2.5 Durchflusszytometrie

2.2.5.1 Prinzip

Die Durchflusszytometrie wird eingesetzt, um Eigenschaften in einer Suspension enthaltener partikulärer Bestandteile in der Größe von $0,5 \mu\text{m}$ – $40 \mu\text{m}$ und von Makromolekülen darzustellen. Zur Detektion und Charakterisierung von Partikeln nutzt sie deren Lichtstreuungseigenschaften sowie die Fluoreszenzemissionen gezielt eingebrachter Fluorochrome; über die Fluoreszenz allein können auch Makromoleküle wie DNA erfasst werden. Ein Laserstrahl regt die Fluorochrome zur Fluoreszenz an und wird gegebenenfalls an Partikeln und ihren Bestandteilen gestreut. Eine Übersicht über die physikalischen Grundlagen der Durchflusszytometrie gibt *Watson 1999*.

2.2.5.2 Flusszelle und hydrodynamische Fokussierung

Um die Lichtstreuung und die Fluoreszenzen den Partikeln zuordnen zu können, müssen die Partikel den Laserstrahl einzeln passieren. Dazu wird die „hydrodynamische Fokussierung“ (*Crosland-Taylor 1953*) in einer „Flusszelle“ genutzt. Die zu untersuchende Suspension wird in der Flusszellen in einen unter Druck fließenden Strom einer isotonen Salzlösung (*Sheath*) injiziert. Sie wird vom *Sheath*-Strom erfasst und beschleunigt, vermischt sich aber nicht mit diesem. Durch die Beschleunigung werden die partikulären Bestandteile vereinzelt und passieren so nacheinander den Laserstrahl, der senkrecht zur Fließrichtung eintritt (Abb. 5). Das Laserlicht wird durch die Partikel gestreut, gebeugt und regt die Fluoreszenz daran gebundener Fluorochrome an.

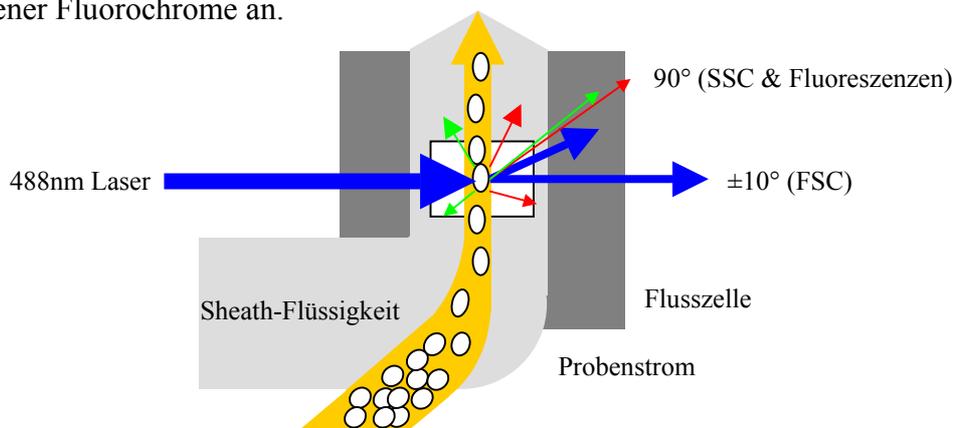


Abb. 5: Prinzip der hydrodynamische Fokussierung in der verwendeten Flusszelle

Eine isotonische Salzlösung (*Sheath*) fließt unter Druck durch die Flusszelle. Die Probe wird in den *Sheath*-Strom injiziert und durch diesen beschleunigt, die Zellen werden dadurch „mitgerissen“ und vereinzelt. Sie passieren so nacheinander den Laserstrahl, der senkrecht zum Fluss eintritt; dieser wird an den Partikeln gestreut und regt gleichzeitig die Fluoreszenz daran gebundener Fluorochrome an. Das von den Partikeln ausgesandte Licht wird in ± 10 Grad zum Lasereinfall und in 90° -Richtung dazu gesammelt, fokussiert und auf die Detektoren geleitet.

2.2.5.3 Optische Konfiguration des verwendeten Zytometers

Das von den Partikeln emittierte Licht wird über dichroische Longpass- (DL) und Bandpass- (BP) Filter aufgliedert und auf die Detektoren für das Streulicht und die vier Fluoreszenzen (FL 1 – 4) geleitet (Abb. 6). Hiervon liegt der Detektor für eine schwache Streuung bzw. Beugung (*forward scatter*, FSC), eine Photodiode, in Verlängerung des Laserstrahls. Die Photodiode für eine starke Streuung (*side scatter*, SSC) sowie die Photomultiplier-Röhren der FL 1 – 4 sind rechtwinklig dazu angeordnet. Das emittierte Licht in dieser Richtung wird über eine Anordnung von Linsen und Filtern zunächst gebündelt (in Abb. 6 nicht dargestellt). Das Streulicht macht den größten Teil des in 90°-Richtung aufgefangenen Lichts aus; dieses in seiner Frequenz unveränderte Laserlicht wird über einen 488 nm dichroischen Longpassfilter ausgefiltert und auf den SSC-Detektor gespiegelt. Licht höherer Wellenlänge, also sämtliche Fluoreszenzen, passiert den Longpass- und einen 488 nm Blockfilter, der eventuell noch verbliebenes Laserlicht entfernt.

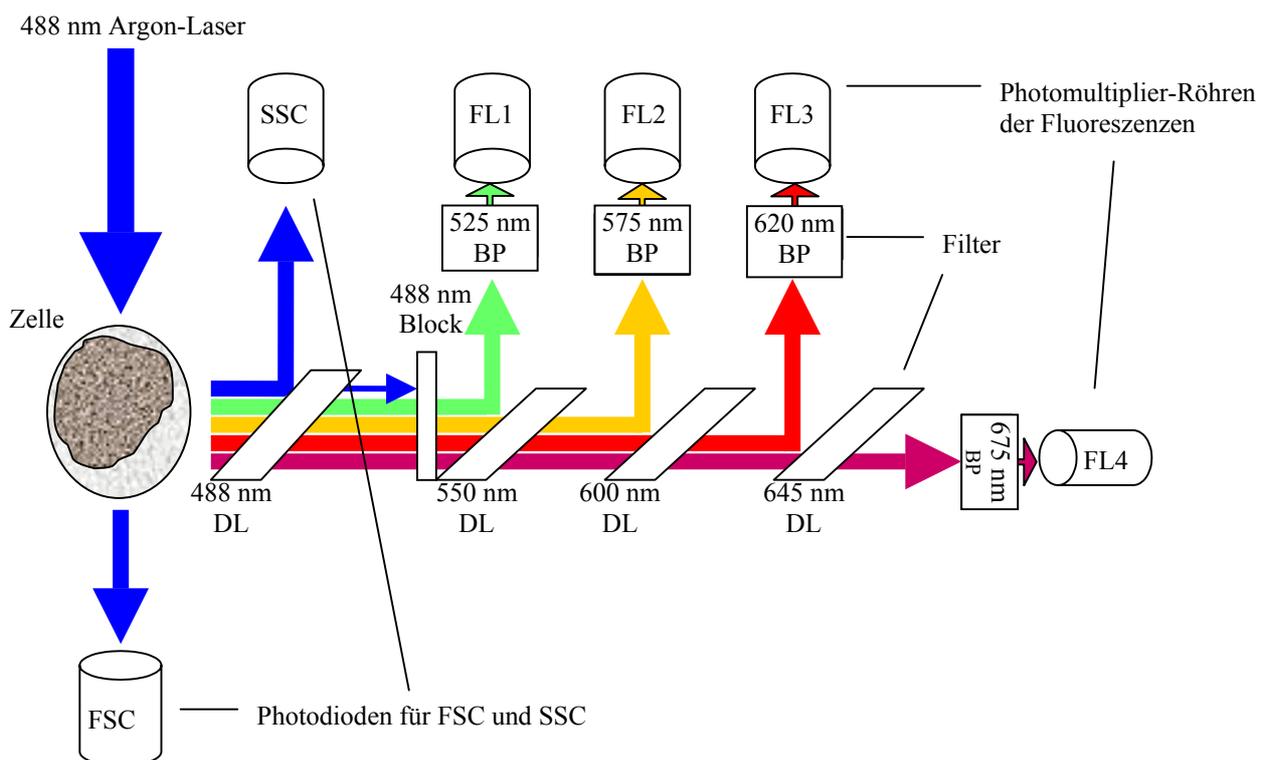


Abb. 6: Optische Konfiguration des eingesetzten Durchflusszytometers

Probenfließrichtung senkrecht zur Darstellungsebene. BP = Bandpassfilter, DL = dichroischer Longpassfilter, FL = Photomultiplier der Fluoreszenzen. Das Laserlicht trifft auf ein Partikel, wird an diesem gestreut und regt gegebenenfalls Fluoreszenzen an. Streulicht wird auf die FSC- und SSC-Detektoren geleitet, das Fluoreszenzsignal über eine Anordnung von Longpass- und Bandpassfiltern in vier Detektionsbereiche aufgliedert und auf Photomultiplier-Röhren gelenkt.

Es folgen drei weitere dichroische Longpassfilter von 550 nm, 600 nm und 645 nm, die sukzessive Licht kürzerer Wellenlänge auf die Detektoren für die ersten drei Fluoreszenzen umleiten. Der vierte Fluoreszenzdetektor liegt hinter dem letzten Longpassfilter. Jedem der Fluoreszenzdetektoren ist ein Bandpassfilter vorgeschaltet, der das Spektrum der detektierten Wellenlängen in beide Richtungen weiter eingrenzt. Nach Passage dieser Filter trifft das Licht auf die Kathoden der Photomultiplier-Röhren.

2.2.5.4 Signalerfassung und Verstärkung

Die Photokathoden der Photomultiplier-Röhren wandeln das optische Signal in ein elektronisches um und verstärken es dabei. Ein auftreffendes Lichtquant löst Elektronen aus der Kathode; diese werden im Hochvakuum durch ein elektrisches Feld auf ein System an Dynoden steigenden Potenzials geleitet. Jedes Elektron löst an der folgenden Dynode durch Stoßionisation weitere Elektronen heraus, so dass eine kaskadenartige Multiplikation des Eingangssignals resultiert. Die an der letzten Dynode herausgelösten Elektronen treffen auf die Anode. Dadurch fließt ein Strom, dessen Stärke gemessen wird (Abb. 7).

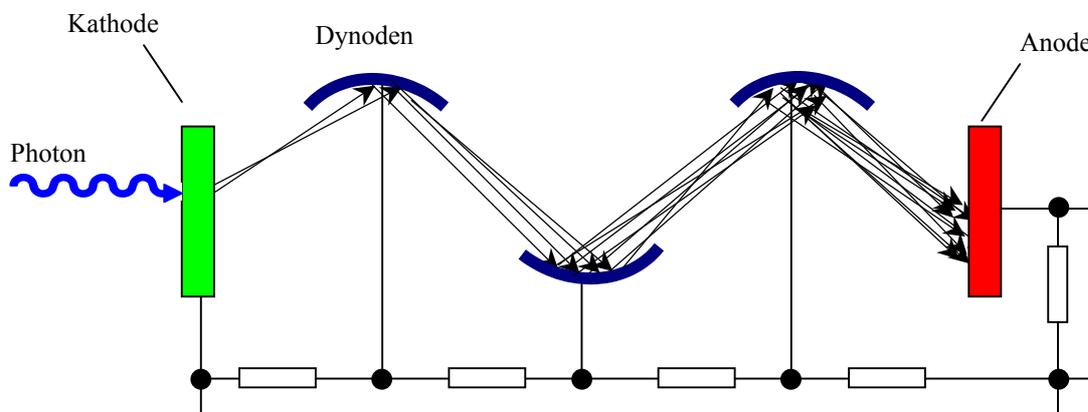


Abb. 7: Prinzip der Signalverstärkung

Die Signalverstärkung erfolgt über Photomultiplier-Röhren. Photonen treffen auf die Photokathode, an der über den photoelektrischen Effekt Elektronen herausgelöst, im Vakuum der Röhre durch ein elektrisches Feld beschleunigt und auf ein System von Dynoden geleitet werden. An jeder Dynode werden durch Stoßionisation weitere Elektronen herausgelöst und beschleunigt, das Signal wird lawinenartig verstärkt. Die Elektronen treffen schließlich auf die Anode und lösen dort einen Strom aus. Die anliegende Spannung kann variiert werden und damit das Ausmaß der Verstärkung.

Das Ausmaß der Signalverstärkung ist abhängig von der an den Photomultipliern anliegenden Spannung, diese kann variiert werden. Weiterhin kann zwischen linearer und logarithmischer Verstärkung gewählt werden. Eine logarithmische Verstärkung führt zu einer stärkeren

Aufspreizung schwacher Signale im Vergleich zu starken Signalen, dadurch kann eine starke Variationsbreite der Signalintensität gut erfasst werden. Sie ist in der Regel für die Fluoreszenzdetektion geeignet. Das eher homogene, wenig in seiner Intensität variierende Streulicht der Zellen wird durch eine lineare Verstärkung gut dargestellt. Die benötigte Verstärkung ist für die schwachen Fluoreszenzsignale deutlich größer als für die Streulichtsignale. Auch innerhalb der Fluoreszenzen gibt es Variationen; diese hängen zum einen von den gewählten Fluorochromen ab, da der Wirkungsgrad der anregenden Photonen für Fluorochrome verschieden ist (s.u.); zum anderen variiert auch das Ausmaß, mit dem ein Fluorochrom und gegebenenfalls dessen Träger an Zellstrukturen bindet.

2.2.5.5 Datenaufnahme und Analyse

Das gemessene Signal wird digitalisiert; die in zeitlichem Zusammenhang stehenden Signale der aktiven Detektoren werden über die Software als ein Ereignis (*Event*) miteinander verknüpft und können in Histogrammen beliebig kombiniert dargestellt werden. Die Darstellung kann in Ein-Parameter-Histogrammen über die Anzahl der Events pro Intensitätskanal oder in Zwei-Parameter Histogrammen mit Blick auf die Kombination zweier Eigenschaften erfolgen. Da Zellen einer Population hinsichtlich einer gemeinsamen Eigenschaft geringfügig voneinander abweichen, erscheinen sie in der Zwei-Parameter-Punktauftragung als mehr oder minder diffuse „Wolken“ mit Häufung um einen Mittelwert (seltener Median). Zur kombinierten Betrachtung verschiedener Eigenschaften der Events dient das sogenannte Gating, eine Schnittmengenbildung. Die Events, die einer gesuchten Population in einem Histogramm entsprechen, werden in einer „Region“ zusammengefasst. Diese Region wird als „Gate“ eingerichtet und definiert dann die Menge darin enthaltener Events. Auch mehrere Regionen können zu einem Gate verknüpft werden, in diesem Fall müssen die Events dieses Gates den Kriterien sämtlicher einbezogener Regionen entsprechen, sind also eine Schnittmenge. Events, die nicht in einer solchen Region liegen, fallen aus den Histogrammen und ihren Statistiken heraus, die auf dieses Gate bezogen sind (Abb. 8).

Die benutzerdefinierten Vorgaben zur Datenaufnahme und Darstellung der Daten werden in „Protokollen“ festgehalten. Die Zytometersteuerung mit Verstärkungs- und Kompensations-einstellungen wird mit dem Protokoll verknüpft. Protokolle dienen also als „Messvorlage“,

sind dabei in ihrem Aufbau nicht statisch; die Darstellung der Daten kann nachträglich verändert werden. Die Messdatensätze können zur Nachanalyse bei Bedarf auch in andere Protokolle eingeladen werden.

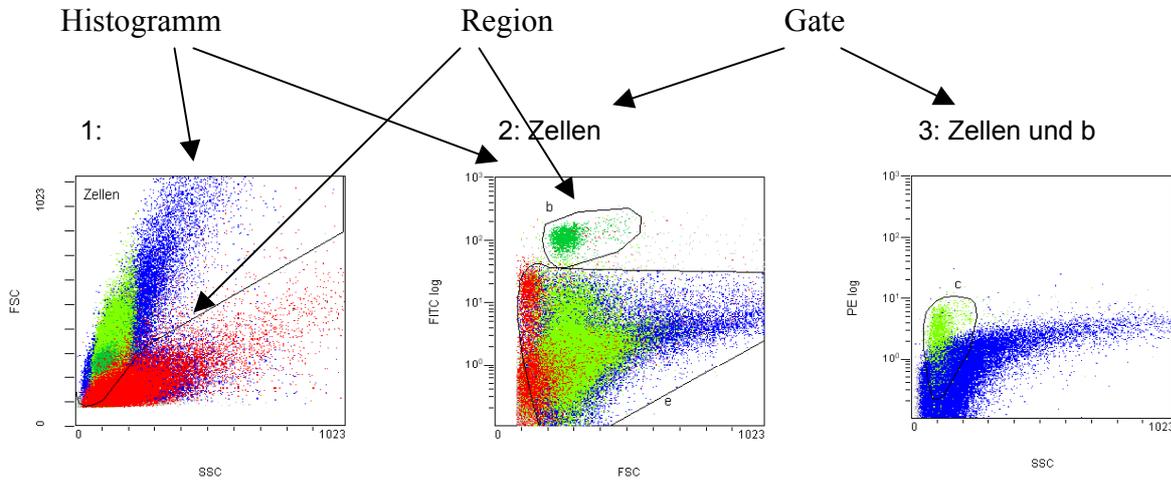


Abb. 8: Histogramm, Regionen und Gates

Die aufgezeichneten Ereignisse, „Events“, werden in Histogrammen dargestellt, hier Zwei-Parameter-Dotplots. Um interessierende Populationen in einem Histogramm statistisch zu erfassen, kann eine Region definiert werden. Sollen selektiv die Events einer Region oder die Schnittmenge mehrerer Regionen nach anderen Kriterien beleuchtet werden, können „Gates“ geschaffen werden, die sich auf diese Regionen beziehen. In diesem Fall sind „Zellen“, b und c Regionen; „Zellen“ ist zugleich ein Gate, dessen Events in Histogramm 2 nach anderen Gesichtspunkten dargestellt sind. Ein zweites Gate ist „Zellen und b“; in dem so gegateten dritten Histogramm wird daher nur die Schnittmenge der in diesen beiden Regionen erfassten Events dargestellt. Gates können auch zur Farbzuzuweisung benutzt werden; hier wurde den Propidiumjodid positiven Events Rot, dem Gate „b und c“ Dunkelgrün zugewiesen. Die so farblich markierten Events lassen sich dadurch in den verschiedenen Histogrammen wiederfinden. Grün: Blasten, blau: T-Zellen, rot: PI positive Events, Ausschnittsweise Wiedergabe der Analyse.

2.2.5.6 Vorwärts- und Seitwärtsstreuung des Laserlichts

Die Streuung des Laserlichts durch Partikel kann differenziert werden in eine Streuung bzw. Beugung um $\pm 10^\circ$ zum Einfallswinkel und eine Streuung um 90° . Erstere wird als *forward scatter* (FSC, Vorwärtsstreuung) bezeichnet und korreliert mit der Partikelgröße. Letztere, der *side scatter* (SSC), ist eine Folge der Streuung an Strukturen in Zellinnerem und Membranen wie z.B. Membranfältelungen und Granula; sie korreliert mit der Komplexität bzw. Granularität der Partikel. Anhand ihrer Lichtstreu-Eigenschaften lassen sich Zellpopulationen oft eingrenzen. So können in peripherem Blut über diese beiden Parameter bereits Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten unterschieden werden.

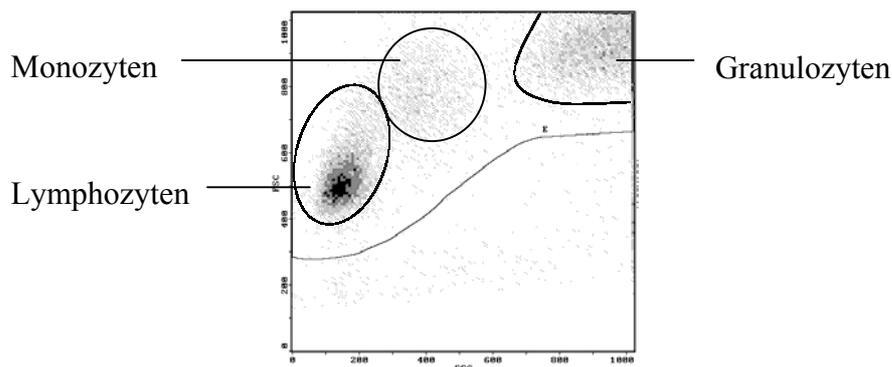


Abb. 9: Beispiel einer FSC gegen SSC – Auftragung von Leukozyten aus peripherem Blut

Die Größe (Ordinate) ist gegen die Komplexität bzw. Granularität (Abszisse) aufgetragen. Allein aufgrund dieser beiden Parameter können die drei großen Populationen an Leukozyten in gesundem Blut bereits unterschieden werden. Die Erythrozyten wurden lysiert, sie sind in ihren FSC- und SSC-Eigenschaften Lymphozyten ähnlich.

2.2.5.7 Fluoreszenz

Fluoreszenz ist eine Eigenschaft von Molekülen mit Elektronen eines geringen Energieniveaus, die durch Photonen leicht auf ein höheres Niveau angehoben werden können. Bei Rückfall auf das energieärmere Niveau wird die überschüssige Energie als Lichtquant abgegeben. Die Wellenlänge des so emittierten Lichts entspricht dabei der Differenz der Energieniveaus und ist geringer als die des anregenden Lichts. Daraus ergibt sich für ein Fluorochrom ein Exzitations- und ein Emissionsspektrum, d.h. ein Wellenlängenbereich, dessen Photonen mindestens genügend Energie übertragen können, um das Elektron anzuregen und ein Wellenlängenbereich, der der abgegebenen Energie entspricht.

Da die Energieabgabe durch geringfügige zusätzlich zugeführte Energie beeinflusst wird, mehr noch aber durch unvollständige, schrittweise Energieabgabe der Elektronen als Lichtquanten geringer Energie oder teilweise Abgabe in anderen Energieformen, entsteht keine scharfe Emissionslinie. Vielmehr zeigen sich Emissionsspektren, die ein „Shouldering“ zu geringeren Frequenzen hin aufweisen, also eine Verbreiterung in Richtung höherer Wellenlänge bzw. geringerer Energie des abgegebenen Lichts (Abb. 10). Dies ist von Bedeutung für die Kompensation (s.u.).

Die eingesetzten Fluorochrome können mit monoklonalen Antikörpern konjugiert sein, die an extra- und intrazelluläre Epitope binden, sie können direkt an Strukturen binden wie z.B. Membranfarbstoffe, DNA-Farbstoffe und mitochondriale Farbstoffe oder intrazellulär als Reaktionsprodukt z.B. oxidativer Vorgänge gebildet werden. Die selektive Fluoreszenzmarkierung der gesuchten Parameter erlaubt die differenzierte Darstellung von Zelleigenschaften.

2.2.5.8 Eingesetzte Fluorochrome

Die Wahl der Fluorochrome hängt neben der Fragestellung auch von der Wellenlänge des anregenden Laserlichts sowie den verwendeten Filtern ab. Voraussetzung ist, dass die Frequenz des Lasers in das Exzitationsspektrum fällt und das Emissionsspektrum durch mindestens einen der Detektoren erfasst werden kann. Als Antikörper konjugierte Fluorochrome verwendet wurden in dieser Arbeit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC, Fluoreszenz (FL) 1, „gelb-grün“), Phycoerythrin (PE, FL2, „gelb-oranger“), Texas Red-Phycoerythrin (Energy coupled dye, ECD, FL3, „orange-rot“) und Phycoerythrin-Cyanin 5.1 (PC5, FL4, „dunkelrot“), s. Abb. 10. Letztere beiden sind Tandem-Konjugate aus zwei Fluorochromen, bei denen die Emissionen des ersten Fluorochroms das zweite anregen, so dass ein neues, weiter in den roten Bereich verschobenes Signal resultiert. Die Sättigung des Phycoerythrin durch das Tandem-Fluorochrom und damit das Emissionsspektrum kann zwischen den Herstellern variieren. Für ein solches Tandem-Konjugat verschiedener Hersteller muss gegebenenfalls eine eigene Geräteeinstellung erfolgen.

FITC ist ein synthetisches, verhältnismäßig schwaches Fluorochrom mit einem Wirkungsgrad von ca. 30% des anregenden Lichts. Phycoerythrin dagegen ist ein der Photosynthese entstammendes Molekül, das eine starke Fluoreszenz zeigt; auch seine Tandem-Konjugate geben ein intensives Signal.

Tote Zellen lassen sich selektiv anfärben durch Farbstoffe, die nur geschädigte Membranen passieren. Hierzu zählen die beiden Actinomycin D-Derivate Propidiumjodid (PI) und 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) (*Schmid et al. 1992*). Beide Farbstoffe interkalieren wie Actinomycin D in Doppelstrang-DNA. Durch das dort herrschende hydrophobe Milieu erfahren sie eine Konformationsänderung und können so fluoreszieren; sie markieren daher selektiv Doppelstrang-DNA. Die beiden Substanzen unterscheiden sich sowohl hinsichtlich ihrer Emissionsspektren als auch ihrer Fluoreszenzintensität. Das Spektrum von PI reicht vom orangefarbenen bis in den dunkelroten Wellenlängenbereich, seine Fluoreszenz ist sehr intensiv. Dagegen fluoresziert 7-AAD schwächer im roten bis dunkelroten Bereich.

2.2.5.9 Spektrale Fluoreszenzüberlappung und Kompensation

Idealerweise werden Fluorochrome miteinander kombiniert, deren Emissionsspektren sich deutlich voneinander unterscheiden und deren Maximum im Bereich des Bandpassfilters vor einem Detektor liegt. Auch bei sorgfältiger Wahl können die Emissionsspektren einander jedoch teilweise überlappen, wobei ein Fluorochrom geringer Wellenlänge aufgrund seines „Shoulderings“ zu höheren Wellenlängen hin ein solches höherer Wellenlängen stärker

überlappt als umgekehrt. Diese Überlappung kann bis in den Detektionsbereich für ein anderes Fluorochrom reichen und dadurch ein Signal auf dem „falschen“ Detektor auslösen (Abb. 10).

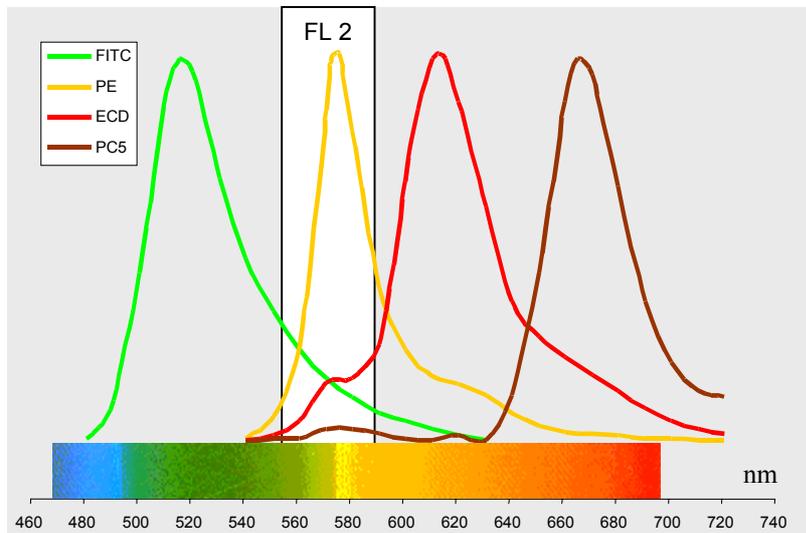


Abb. 10: Fluoreszenzspektren eingesetzter Fluorochrome

Emissionspektren von FITC, PE, ECD und PC5. Hell unterlegt: Detektionsbereich des zweiten Fluoreszenzdetektors des verwendeten Zytometers mit PE als Haupt- und FITC, ECD sowie PC5 als überlappende Signale, die kompensiert werden müssen. Zugrundegelegt werden die Signale im „richtigen“ Detektionsbereich für das jeweilige Kompensation, diese sind bei konstanten Verstärkungen dem überlappenden Anteil proportional. Dieser kann daher als Prozent des „richtigen“ Signals vom Signal des „falschen“ Detektors abgezogen werden.

Beachte die zusätzlichen geringen Peaks der PE-Tandemkonjugate (ECD und PC5) im PE- und für PC5 auch im ECD-Bereich. Diese entstehen dadurch, dass das PE-Signal von seinem Partnerfluorochrom nicht vollständig absorbiert wird. Der Anteil des PE-Signals an dem des Tandemfarbstoffs kann zwischen Herstellern variieren, so dass eine eigene, daran angepasste Kompensation nötig wird. Zu den Fluorochromen s. auch 2.2.5.8.

Bei gleichbleibender Verstärkungseinstellung der beiden Detektoren ist auch bei unterschiedlicher Intensität das „falsche“ Signal proportional zum Signal am „richtigen“ Detektor, kann also als Prozent des „richtigen“ Signals ausgedrückt werden. Der Prozentsatz ändert sich, sobald eine der beiden Verstärkungen geändert wird, da das „richtige“ Signal der Verstärkung des „richtigen“ Photomultipliers unterliegt, das „falsche“ der Verstärkung des „falschen“. Würde also die Spannung am „falschen“ Detektor hochreguliert, würde das „falsche“ Signal einen größeren Prozentsatz des „richtigen“ ausmachen als zuvor.

Die Proportionalität der Überlappung wird für die Kompensation ausgenutzt. Kompensation bedeutet, dass von dem Signal eines Detektors das „falsche“ Signal, ausgedrückt als Prozent des Signals des „richtigen“ Detektors, rechnerisch abgezogen wird. Voraussetzung für eine gültige Kompensation ist also, dass die vorgewählten Verstärkerspannungen nicht verändert werden. Eine Kompensation ist immer dann erforderlich, wenn mindestens zwei einander in einem Detektorbereich überlappende Fluorochrome in einer Probe eingesetzt werden sollen.

Bei drei oder vier Fluoreszenzen ergibt sich eine Kompensationsmatrix.

COMPENSATION					
Signal out = B - %A					
B	A→	FL1	FL2	FL3	FL4
FL1			0.0	0.0	12.9
FL2		22.8		0.0	12.0
FL3		0.0	0.0		0.0
FL4		0.0	6.8	0.0	

↓	↓	Fast Comp	↑	↑
---	---	--------------	---	---

STATUS					
--------	--	--	--	--	--

Abb. 11: Kompensationsmatrix bei Einsatz von FITC, PE und 7-AAD

Die Matrix zeigt die Prozentsätze des Signals eines Detektors, die vom zu kompensierenden Signal eines zweiten Detektors abgezogen wird. Beispielsweise wird vom Signal auf dem zweiten Fluoreszenzdetektor (FL2) 22,8% des des ersten Detektors (FL1) abgezogen. Der dritte Fluoreszenzbereich, der hier nicht zur Fluorochromdetektion genutzt wird, bleibt unkompensiert.

Das Signal des „richtigen“ Detektors kann auch Anteile anderer Fluorochrome enthalten. Diese werden nicht berücksichtigt, wenn das Signal als Grundlage für die Kompensation eines anderen Signals genommen wird. Daraus resultiert gegebenenfalls eine Überkompensation. Diese macht sich vor allem dann bemerkbar, wenn ersteres Signal stark, letzteres aber schwach verstärkt wird. Dieses Problem wurde erst in der ADC (*Advanced digital compensation*)-Software gelöst, die für die vorliegende Arbeit noch nicht eingesetzt wurde.

2.2.5.10 Zytometereinstellung

Für eine Messung müssen Verstärkung und Kompensation festgelegt werden. Das geschieht über ein Setup. Ziel ist, die zu betrachtenden Zellpopulationen anhand ihrer Scatter-Eigenschaften bereits eingrenzen zu können und die Fluoreszenz-Verstärkung so zu wählen, dass das Signal positiver Zellen deutlich von dem negativer Events abgrenzbar ist. Positive Populationen sollten dabei nicht so stark aufgespreizt werden, dass sie in den Histogrammen nicht mehr zusammenhängend dargestellt werden, negative Events aber ebenfalls als Population sichtbar bleiben.

Standardisierte Setups erfolgen nach einem einheitlichen Prinzip. Ein Setup-Protokollfolge (Panel) besteht aus einem Protokoll für die Verstärkungseinstellung, mindestens einem Protokoll für die Kompensation und einem Verifizierungsprotokoll. Mit ersterem werden Partikel mit einer standardisierten, gleichmäßigen Fluoreszenz gemessen (Flow-Set-Beads). Die Verstärkerspannungen der aktiven Fluoreszenzdetektoren werden so justiert, dass das

jeweilige Fluoreszenzsignal in eine vorgegebene schmale Region fällt (Abb. 12) und werden in einer Zytometersteuerungsdatei gespeichert.

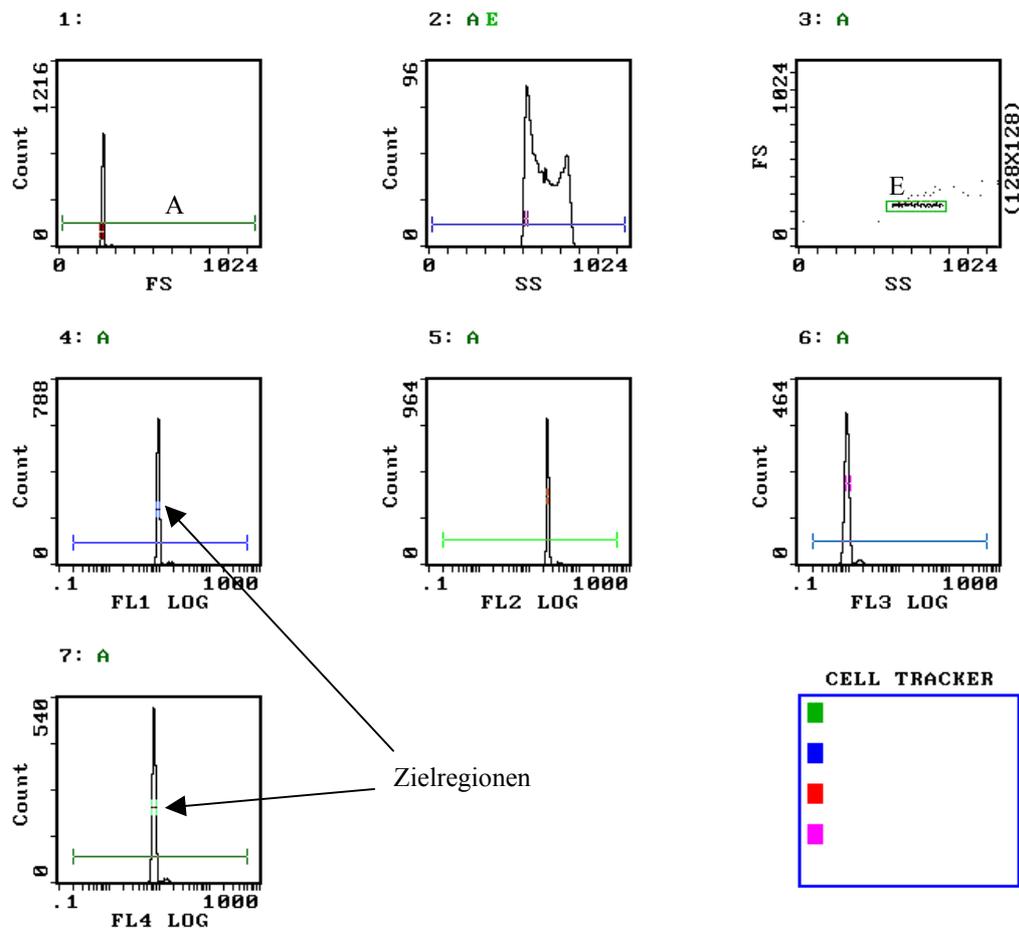


Abb. 12: Flow-Set-Protokoll für die standardisierte Verstärkungseinstellung

Die Verstärkung der Fluoreszenzbereiche 1 – 4 wird so lange justiert, bis die Zielintensität des Signals der Flow-Set-Beads erreicht ist. Die Zielintensitäten werden durch die schmalen Regionen auf halber Peak-Höhe vorgegeben.

Die Lage der Zielregion hängt von der gewünschten Verstärkung ab und wird einmalig nur bei Erstellung des Setup-Panels angepasst. Sie bleibt für alle mit diesem Setup-Panel durchgeführten Zytometereichungen unverändert; so wird eine Konstanz zwischen verschiedenen Messzeitpunkten gewährleistet.

Mit den neu eingestellten Verstärkerspannungen wird die Kompensation durchgeführt. Hierzu werden Partikel benötigt, die jeweils nur ein Fluoreszenzsignal liefern, in Kombination mit solchen, die kein Signal aufweisen. Gängig ist die Markierung von Lymphozyten mit CD4 in der einen Fluoreszenz und CD8 in einer zweiten, die restlichen Lymphozyten dienen als Negativpopulation. Die zu kompensierenden Fluoreszenzen werden gegeneinander aufgetragen. In einem solchen Beispiel wird nun durch Veränderung der Kompensation das

Signal der CD4 positiven Population im „CD8-Detektor“-Bereich solange angepasst, bis der Mittelwert ihrer Fluoreszenz in diesem Kanal dem der Negativpopulation entspricht. Umgekehrt soll am Ende das Signal der CD8 positiven Population dem der Negativpopulation im Kanal der CD4-Fluoreszenz entsprechen.

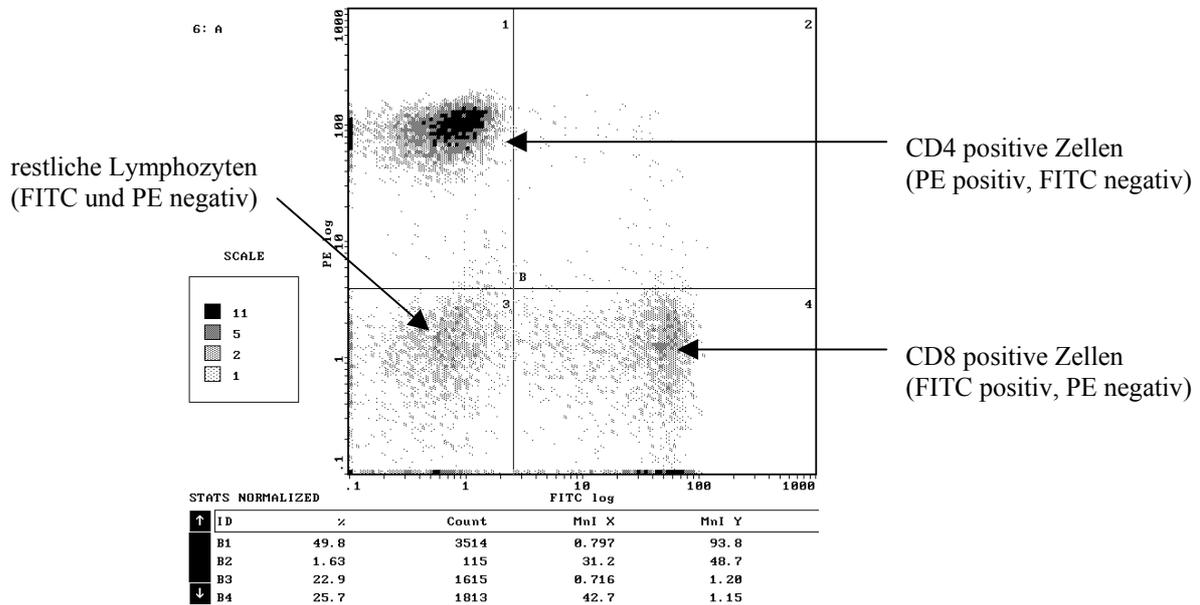


Abb. 13: Beispiel eines Kompensationshistogramms

Markierung von Lymphozyten mit CD4 PE- und CD8 FITC-mAb. B-Zellen und ein Großteil der NK-Zellen bleiben unmarkiert im Quadrant B3. Die ermittelte mittlere Fluoreszenzintensität auf der Abszisse (Mnl X) in den Quadranten B1 und B3 wird so lang durch Kompensation justiert, bis der Unterschied $<0,1$ relative Fluoreszenzeinheiten beträgt, ebenso die Mnl Y der Quadranten B3 und B4.

Die Kompensation wird ebenfalls in der Zytometersteuerungsdatei abgelegt. Ist die Kompensation für alle relevanten Fluoreszenzen erfolgt, wird eine Kontrollprobe mit der justierten Zytometersteuerung gemessen. Diese Kontrollprobe enthält für alle eingesetzten Fluoreszenzen markierte Populationen. Für vier Fluoreszenzen gängig ist die Kontrolle mit CD45 FITC-, CD4 PE-, CD8 ECD- und CD3 PC5-mAb markierten peripheren Blut-T-Zellen. Auf eine so erstellte Steuerungsdatei kann mit verschiedenen Messprotokollen zugegriffen werden.

2.2.5.11 Antikörpermarkierung

Ein wichtiges Verfahren zur Differenzierung von Zelltypen in der Durchflusszytometrie ist die Markierung der Zellen mittels Fluoreszenz gekoppelten monoklonalen Antikörpern (mAb) gegen definierte, extra- oder intrazellulär gelegene Epitope. Determinanten der Antikörperbindung sind Spezifität für Epitope und Konzentration des Antikörpers in der Probe. Bei gleichbleibender, im Überschuss zugegebener Antikörperbindung erfolgt eine

gleich starke Markierung der Epitope, wenn das Probenvolumen ebenfalls gleich ist, da sich ein stöchiometrisches Gleichgewicht zwischen Antikörperbindung und –ablösung einstellt, das von der Antikörperkonzentration abhängt.

Es wurde das vom Hersteller empfohlene Volumen an Antikörper-Suspension eingesetzt, um eine Sättigung der Bindung an die Zellen und damit eine optimale Markierung zu erreichen. Die Inkubation erfolgte für mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln, um ein Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern.

2.2.5.12 Absolutmessungen mit *Flow-Count* Fluorosphären

Im Gegensatz zu hämatologischen Zählgeräten arbeitet die Durchflusszytometrie nicht mit fest vorgegebenen Probenvolumina. Daher erfordert eine Konzentrationsbestimmung der Zellen einer Probe entweder eine zusätzliche Messung an einem hämatologischen Zählgerät (*Dual-Platform*-Messung) oder – für genauere Ergebnisse und in Konzentrationsbereichen $< 100/\mu\text{l}$ – die Zugabe eines internen Zählstandards (*Single-Platform*-Messung.) Als interner Standard wurden Flow-Count-Fluorosphären (Beads) eingesetzt. Dabei handelt es sich um über den gesamten Detektorenbereich des Zytometers stark fluoreszierende Kunststoffpartikel etwa in der Größe von Lymphozyten, allerdings mit einer ausgeprägten Seitwärtsstreuung. Die Konzentration ist seitens des Herstellers bekannt. Wird ein definiertes genaues Volumen dieser Beads zu einem definierten genauen Volumen einer Probe gegeben und die Anzahl der Beads und der Zellen im gemessenen (unbekannten) Volumen gezählt, lässt sich daraus die Zellkonzentration berechnen nach der Formel

$$\text{Zellkonzentration} = \frac{\text{Konzentration Beads} * \text{Anzahl Zellen}}{\text{Anzahl Beads}}$$

2.2.6 Europium-Assay

Dieser Zytotoxizitäts-Assay basiert auf einer Freisetzung von vorher zugeführtem Europium-DPTA-Chelat aus dem Zytoplasma zerfallener Zielzellen zum Nachweis von Zelluntergang. Das Chelat wird fluorimetrisch im Überstand gemessen. Als Ziel- bzw. Effektorzellen wurden K562 bzw. NK-92 eingesetzt. Die Zielzellen wurden gezählt und einmal mit RPMI 1640 supplementiert mit 5% FCS gewaschen. 5×10^6 Zielzellen wurden in 800 μl Europium-Puffer aufgenommen und für 10 Minuten auf Eis gekühlt, durch Elektroporation permeabilisiert und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden sie fünfmal mit PBS gewaschen, der Überstand dabei sorgfältig entfernt. Danach wurde die Zielzellkonzentration auf $5 \times 10^5/\text{ml}$ in

RPMI 1640 mit 5% FCS eingestellt, je 100 µl davon wurden in Wells einer 96-Well-Rundboden-Titerplatte pipettiert. Dazu wurden 100 µl der NK-Zell-Suspension in verschiedenen Konzentration gegeben, um Effektor:Target (E:T)-Verhältnisse von 1:1, 5:1, 7.5:1, 10:1 und 20:1 zu erreichen. Um Spontanfreisetzung und maximale Freisetzung von Europium aus den Zielzellen zu erfassen, wurden Kontroll-Wells mit reinen Zielzellen erstellt. Für die maximale Freisetzung wurden 10 µl Lysepuffer zugesetzt, um die Zielzellen vollständig zu zerstören. Die Platte wurde für 2 Minuten bei 50 x g zentrifugiert, um eine Sedimentation der Zellen zu erreichen. Es erfolgten jeweils Dreifachansätze. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchte wurde die Titerplatte bei 500 x g für 5 Minuten zentrifugiert und je 20 µl der Überstände in eine FluoroNunc-Titerplatte überführt. Zu den Überständen wurden je 200 µl Enhancement-Lösung gegeben. Die Platte wurde 15 Minuten dunkel bei RT auf einem Schüttler inkubiert und dann die Fluoreszenz von Europium-DPTA mit einem zeitauflösenden Fluorimeter gemessen. Die zytotoxische Aktivität wurde berechnet als

$$\% \text{ zytotoxische Aktivität} = \frac{(\text{experimentelle Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung})}{(\text{maximale Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung})} \cdot 100\%$$

2.2.7 Statistische Methoden

Für den Vergleich der Methoden zur Zytotoxizitätsbestimmung wurde der Wilcoxon Rangtest gewählt. Dieser nichtparametrische Test vergleicht gepaarte Messwerte hinsichtlich ihrer Differenz unter der Nullhypothese, dass der Mittelwert der mit der einen Methode erhobenen Messdaten von dem der anderen nicht differiere ($H_0: \bar{x}_1 = \bar{x}_2$) und der Alternativhypothese $H_A: \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$ (zweiseitige Fragestellung.)

Für die Beurteilung der Aussagefähigkeit der endgültigen Auswertemethode hinsichtlich des spezifischen Verlusts an Zielzellen wurde der U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney eingesetzt. Dieser nichtparametrische Rangsummentest erlaubt einen Medianwertvergleich bei unbekannter Verteilung der Daten, setzt also keine Normalverteilung voraus, solange die Verteilungen der verglichenen Daten nicht stark voneinander abweichen. Es wurde die einseitige Fragestellung geprüft mit $H_0: \text{Median}_{\text{nach Inkubation}} = \text{Median}_{\text{vor Inkubation}}$ und der Alternativhypothese $H_A: \text{Median}_{\text{nach Ink}} < \text{Median}_{\text{vor Ink}}$ (Sachs 1999).

3. Ergebnisse

3.1 Zellaufbereitung

3.1.1 Patientenproben (Zielzellen)

Der Blastenanteil in den Patientenproben nach Dichtegradienten-Zentrifugation variierte zwischen 25 % und >95 % (Median: 75 %); die übrigen Zellen waren nach Kryopräservierung Lymphozyten, bei frischem Material nach Ficoll-Zentrifugation zum Teil auch Monozyten.

Die Recovery nach Kryopräservierung lag zwischen 20 % und 60 % der ausgewiesenen eingefrorenen Zellzahlen mit einer Viabilität von > 90 %, meist > 95 %. Für die Zellzahleinstellung wurden alle zellulären Events herangezogen. Es wurden Proben von insgesamt 47 Patienten in Assays eingesetzt, die zugrundeliegenden Diagnosen waren common ALL oder prä-B ALL (n = 29), T-ALL (n = 5), AML oder JMML (n = 13). Mehrfachtestungen kamen vor.

3.1.2 Spenderlymphozyten (Effektorzellen)

Die selektierten Effektoren wiesen im Median eine Reinheit von 97,3 % der gewünschten Population auf (Range: 95 % – 98,7 %). In den T-Zellpräparaten waren keine NK-Zellen, in den NK-Zellpräparaten keine residualen T-Zellen nachweisbar (< 0,01% der Events.) Die Viabilität unmittelbar nach Selektion lag im Median bei 99,2 % (Range: 98,7 – 99,5 %). Die Effektoren wurden zwischen 5 Tagen und drei Wochen kultiviert und expandiert, bevor sie auf ihre Aktivität gegen Zielzellen getestet wurden. Zum Zeitpunkt der Testungen waren keine kontaminierenden Zellen nachweisbar, die Anzahl gegateter toter Zellen vor Kokultur lag < 5%. Für die Zellzahleinstellung der Effektoren wurden die lebenden Zellen herangezogen.

3.2 Vorversuche zur Entwicklung des Assays

3.2.1 Differenzielle Markierung der Patienten- und Spenderzellen: Screening auf geeignete monoklonale Antikörper

Die Blasten der akuten Leukämien leiten sich von unreifen Formen lymphatischer oder myeloischer Zellen ab und ähneln diesen in den exprimierten Epitopen. Für eine Markierung der Blasten durch mAb kamen daher vor allem Progenitormerkmale und Epitope in Frage, die nur auf bestimmten Entwicklungsstufen der verschiedenen Zellreihen zu finden sind, nicht jedoch auf reifen lymphatischen Zellen, sowie myeloische Epitope. Zu diesen zählen CD34, CD133, CD117 als Progenitormerkmale, CD10 als Marker unreifer B-Zellen und eines Typs unreifer T-Zellen (auch auf reifen Zellen der myelomonozytären Reihe) sowie CD13, CD15 und CD33 als myeloische Merkmale.

Die aufgeführten Epitope finden sich in verschiedenen Kombinationen bei der Mehrzahl der akuten Leukämien des Kindesalters, teilweise auch als aberrante Marker auf Blasten, die einer anderen hämatopoetischen Linie entstammen. Insbesondere CD13 und CD33 finden sich auf lymphoblastischen Leukämien, allerdings häufig nur partiell exprimiert.

Die diagnostischen Leukämietypisierungen des immunologischen Labors im Hause wurden für die Wahl der Antikörper herangezogen, gegebenenfalls ebenso die des Referenzlabors in Berlin. Diese liegen zum Zeitpunkt der Zytotoxizitätstestung in der Regel vor, so dass eine Vorauswahl der potenziell geeigneten Antikörper getroffen werden kann. Eine Übersicht über die vorliegenden Leukämietypisierungen mit Blick auf die häufigsten Epitope gibt Tabelle 2, CD56 und CD7 als NK- bzw. kombiniertes NK- und T-Zellepitop wurden zusätzlich aufgeführt.

3.2.1.1 Markierung mit einem monoklonalen Antikörper

Aus Tabelle 2 geht hervor, dass die Blasten der aufgeführten Leukämien bereits > 90% allein über CD10, CD34 oder CD33 markierbar waren. Die Intensität der Markierung durch diese mAb wurde an Patientenproben und NK-Zellen getestet, zur Vorauswahl wurde die jeweilige Leukämietypisierung herangezogen. Die mAb wurden, wenn vorhanden, einmal FITC- und einmal PE – konjugiert eingesetzt. Zum Vergleich der Fluoreszenzen von Ziel- und Effektorzellen wurden die Histogramme der Blasten und der NK-Zellen, die die Fluoreszenz gegen FSC und SSC aufrufen, im Multigraph-Modus des Software überlagert (Abb. 14).

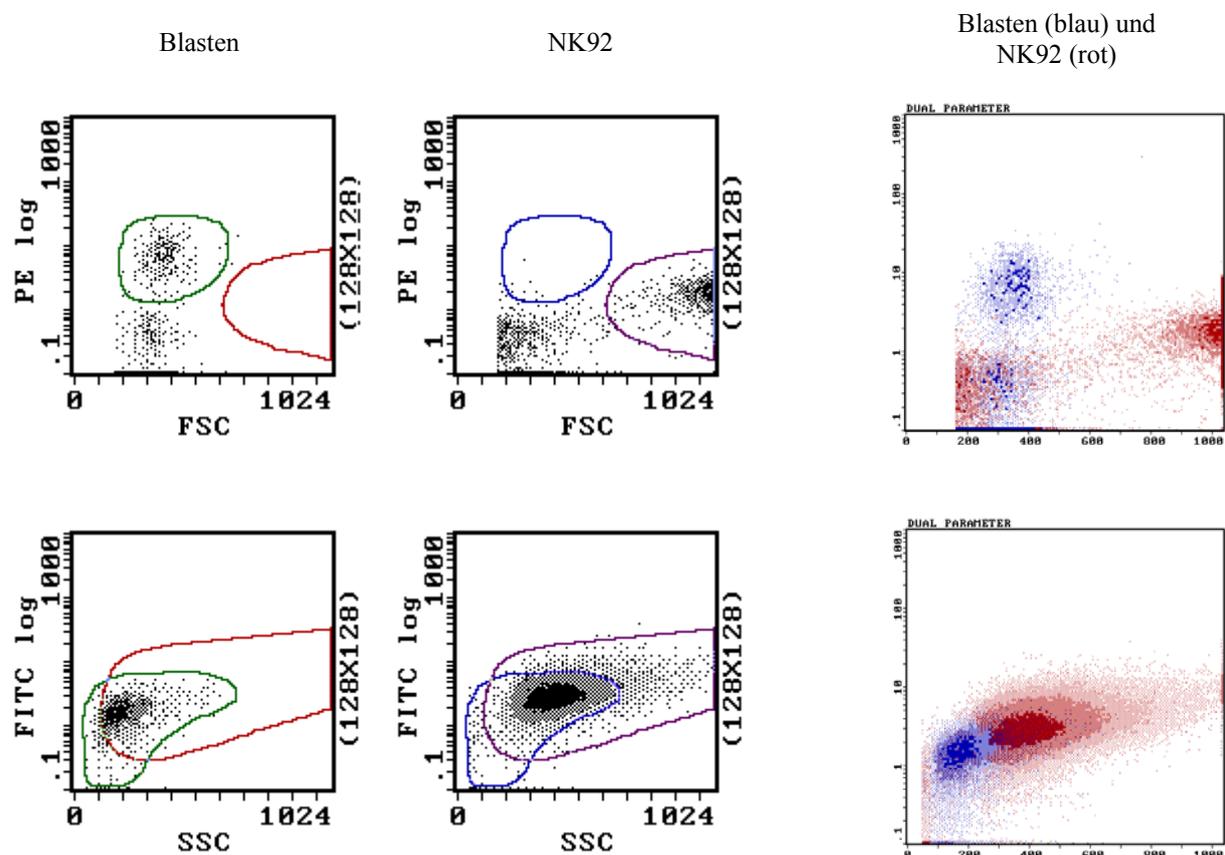


Abb. 14: Beispiel einer Multigraph-Analyse

Gleiche Histogramme aus zwei verschiedenen Analysen können übereinander projiziert und so die Lage der Populationen relativ zueinander eingeschätzt werden. Dies kann eingesetzt werden, um die Unterscheidung der Populationen durch einen mAb abzuschätzen. Beispiel einer zufriedenstellenden Trennung durch CD10 PE bei ALL (oben) und einer schlechten Trennung durch CD13 FITC bei AML (unten), jeweils NK-92 als Effektorpopulation. Links und mittig: Zielzellprobe und Effektorprobe, rechts: Multigraph-Ansicht der beiden jeweiligen Histogramme, die Events aus den jeweils zwei Analysen farblich unterschieden.

In Abb. 15 sind die erzielten Fluoreszenzintensitäten einer Reihe getesteter Proben vergleichend aufgetragen.

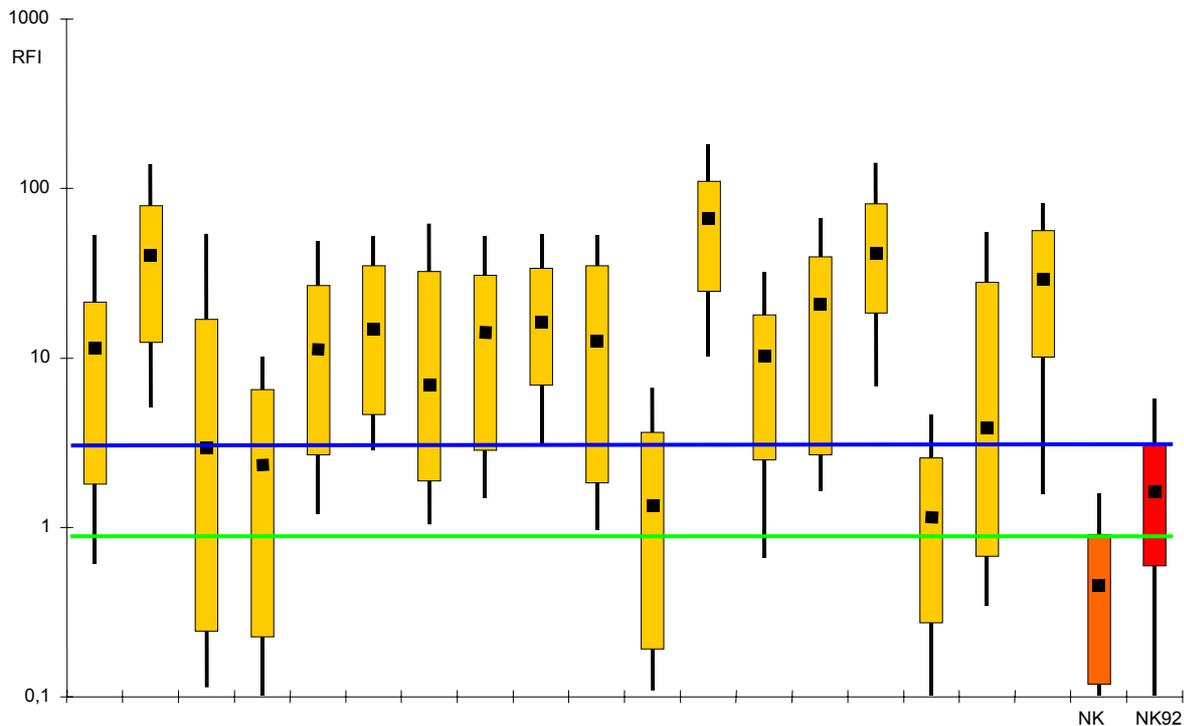


Abb. 15: Relative Fluoreszenzintensitäten von 18 *cALL*-Blastenproben, primären NK-Zellen und NK-92 nach Markierung mit einem PE-konjugierten mAb gegen CD10

Dargestellt sind der gesamte Fluoreszenzbereich der jeweiligen Population (schwarze senkrechte Linien) und der Median (schwarze Quadrate); der orangefarbene Kasten umfasst den Bereich von 3% - 97% der Events.

Die Trennung der Blasten von den primären NK-Zellen ist meist gut (grüne Linie), lediglich in fünf Fällen zeigt sich eine merkliche Überschneidung durch zu geringe Fluoreszenz der Blasten. Dagegen zeigen acht Fälle eine starke Fluoreszenzüberschneidung mit NK-92 und vier Fälle immerhin eine schwache (blaue Linie); ursächlich ist die hohe Autofluoreszenz der Zelllinie. In diese Darstellung fließen allerdings die Größe und Komplexität der NK-92 nicht ein, die deutlich über der von ALL-Blasten liegen und daher trotz einer mäßigen Fluoreszenzintensität der markierten Blasten eine Unterscheidung in den meisten Fällen erlauben.

In einigen Fällen war die mittels eines mAb erzielte Fluoreszenzintensität zu gering, um eine ausreichende Abgrenzung der Blasten von nicht-blastären Zellen (kontaminierende Patientenzellen, NK-Zellen) zu erzielen. In anderen Fällen war es schwierig, bei breit streuender Fluoreszenzintensität eine klare Population zu erkennen oder bei zwei Peaks der Fluoreszenzintensität beide dadurch entstehenden Populationen sicher den Blasten zuzuordnen. Durch die Markierung mit einem Antikörper allein war daher in drei Vierteln der getesteten Fälle eine sichere Eingrenzung der Zielzellen und Unterscheidung von den Effektorzellen möglich. In 8 dieser Fälle waren auch die Effektoren nicht durch Streuung von Lymphozyten aus der Zielzellprobe überlagert. In einem Viertel erlaubte der Einsatz eines mAb keine klare Abgrenzung von Blasten und Effektoren bzw. Restlymphozyten.

3.2.1.2 Markierung mit zwei monoklonalen Antikörpern

Zwei mögliche Vorgehensweisen wurden getestet, um auch in den Fällen schlechter Markierung mit einem mAb die Blasten und Effektoren sicher voneinander und von anderen Zellen zu unterscheiden; bei beiden wurden jeweils zwei verschieden Fluoreszenz markierte (FITC und PE) mAb kombiniert.

3.2.1.2.1 Kombination zweier monoklonaler Antikörper gegen die Zielzellen

In der ersten Variante wurden zwei mAb gegen die Patientenzellen eingesetzt, von denen der eine unabhängig von einer Spezifität für die Blasten ein möglichst starkes Signal liefern, der andere die Unterscheidung der Blasten von in der Probe zum Teil noch enthaltenen Lymphozyten ermöglichen sollte. Mindestens einer dieser mAb sollte die Effektorzellen nicht oder in der Intensität deutlich verschieden markieren. Die Schnittmenge der beiden Fluoreszenz-signale wurde zur Definition der Blastenpopulation genutzt. Für Leukämien der B-Zellreihe wurde CD19 gewählt, das zugleich normale B-Zellen umfasst. Für die meisten anderen Fälle wurde ein anti-CD45 mAb eingesetzt; dieser bindet zwar an alle Leukozyten, allerdings

werden Blasten häufig deutlich geringer als Lymphozyten (also auch T- und NK-Zellen) markiert. In einigen Fällen wurde ein Antikörper (z.B. CD15) gemäß der immunologischen Typisierung ausgewählt, wenn das Epitop nicht auf Effektoren, dagegen auf >80% der Blasten exprimiert wurde.

Die Kombination zweier Antikörper gegen die Blasten ermöglichte eine differenziertere Darstellung der Blasten gegenüber den übrigen Lymphozyten und eine verbesserte Definition der Blastenpopulation bei breit streuender Fluoreszenzintensität. Allerdings traten Überlagerung zwischen in der Patientenprobe enthaltenen übrigen Lymphozyten sowie den NK-Zellen auf. In einigen Fällen wurde auch durch den zweiten mAb keine ausreichend starke Markierung der Blasten erreicht. Bei Einsatz eines anti-CD45 mAb waren auch die NK-Zellen als Population sichtbar, falls sie nicht von Blasten überlagert waren.

3.2.1.2.2 Kombination monoklonaler Antikörper gegen die Ziel- und gegen die Effektorzellen

Im zweiten Fall wurden sowohl Ziel- als auch Effektorzellen mit je einem mAb markiert. Für NK-Zellen wurde anti-CD56 FITC eingesetzt; CD56 wird im peripheren Blut auf ca. 80-90% der NK-Zellen gefunden. Auf IL-2 aktivierten NK-Zellen erscheint es zu 100% und ist im Vergleich zu ruhenden NK-Zellen höher exprimiert, so dass die Markierung ein starkes Signal

ergibt. T-Zellen wurden mit anti-CD3 FITC markiert; dieser mAb erfasst alle reifen T-Zellen. Durch den Einsatz von CD56 FITC oder CD3 FITC war es möglich, neben den Blasten auch die Effektoren stärker als Population zu visualisieren. Dies erleichterte das Setzen der Regionen für die Effektoren, die für die Berechnung von Streuung im Assay sicher erfasst werden sollten. Allerdings wurde das Problem der durch weite Streuung oder zwei Fluoreszenzpeaks unklar definierten Blastenpopulationen nicht gelöst. Auch war eine Streuung von weniger stark markierten Effektorzellen in die Zielzellregionen zu verzeichnen. Lagen restliche Lymphozyten in der Blastenprobe vor, war eine Unterscheidung schwach markierter Blasten von diesen nach wie vor nicht möglich.

Da keine der beiden Strategien in allen Fällen erfolgreich war, wurden beide je nach Konstellation eingesetzt, d.h. es erfolgte eine Austestung der in Frage kommenden Antikörerkombinationen zu Beginn eines Assays.

3.2.2 Markierung der Zelllinien NK-92 und K562 mit monoklonalen Antikörpern

Besonderheiten zeigten die Zelllinien NK-92 und K562. Sie leiten sich ab von malignen Zellen, d.h. ihr Markerprofil entspricht nicht dem normaler Zellen. So exprimiert NK-92 CD45 und CD56 in starkem Ausmaß, wird allerdings von vielen mAb (unspezifisch) schwach markiert. K562 dagegen trägt fast keine gängigen Oberflächenmarker und ist daher schlecht mit mAb markierbar. Bei vergleichender Analyse unterschieden sich beide Zelllinien von Lymphozyten durch ihre Größe und ihre Komplexität und zeigen eine deutliche Auto-fluoreszenz, die dem Signal schwach markierter Blasten äquivalent war (Abb. 15, NK-92).

3.2.3 Färbung toter Zellen: Vergleich Propidiumjodid und 7-Amino-Actinomycin D

Propidiumjodid (PI) wurde in einem bisher in der Kinderklinik etablierten durchflusszytometrischen Assay als Totfarbstoff eingesetzt. Neben diesem stand 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) zur Verfügung. Beide Substanzen wurden hinsichtlich ihres Spektrums und ihrer Fluoreszenzintensität verglichen.

Für die Testung der beiden Farbstoffe wurden Proben überalterter Kulturen von NK-92 und K562 sowie kryopräservierte Blasten, die sowohl lebende als auch bereits abgestorbene Zellen enthielten, jeweils vergleichend mit PI und 7-AAD gefärbt. Es wurde nur der Totfarbstoff eingesetzt, so dass eine Kompensation entfiel. Die Proben wurden alle im selben

Protokoll bei gleichen Verstärkereinstellungen der vier Photomultiplier-Röhren gemessen und das Signal in allen vier Fluoreszenzbereichen des Zytometers erfasst.

Bei ansonsten gleicher Behandlung der Probe lieferte Propidiumjodid ein deutlich stärkeres Signal als 7-AAD, so dass die Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen klarer ausfiel (Abb. 16). Aufgrund des gegenüber 7-AAD weiter in den kurzwelligeren Bereich verschobenen Emissionsspektrums gab PI ein Signal auch im 2. Fluoreszenzkanal.

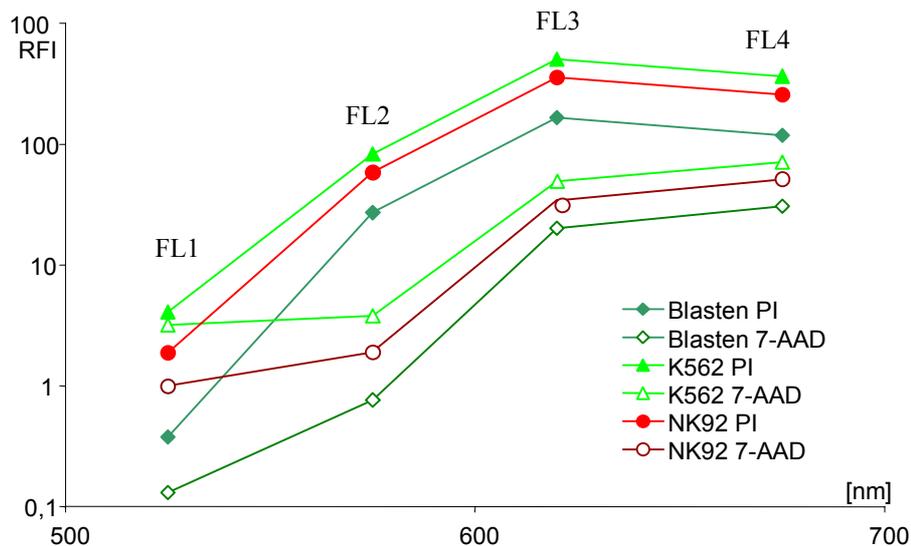


Abb. 16: Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität von Propidiumjodid und 7-AAD

Kryopräservierte Blasten und überalterte Kulturen von K562 und NK-92 wurden jeweils mit PI und mit 7-AAD gefärbt. Gemessen wurde das unkompenzierte Signal bei gleicher Verstärkung aller vier Fluoreszenzbereiche. Während 7-AAD im vierten Bereich bei 675 nm (PC5-Bereich) am stärksten fluoresziert, erreicht das bis zu 30fach stärkere Signal von PI sein Maximum bereits bei 620 nm (ECD-Bereich) und ist noch im PE-Bereich (575 nm) stark nachweisbar. Im FITC- Bereich (525 nm) gibt 7-AAD kein Signal, das gemessene Signal der 7-AAD gefärbten Proben entstammt hier der Autofluoreszenz der Zelllinien. RFI = relative Fluoreszenzintensität. Die einzelnen Messpunkte wurden der Übersichtlichkeit halber mit Linien verbunden.

3.2.4 Durchflusszytometrische Konzentrationsbestimmung: Verwendung eines internen Standards

Um die Konzentrationsänderung lebender Zellen im Verlauf eines Assays zu ermitteln, wurde es notwendig, die Zielzellkonzentration in einer gegebenen Probe vor und nach Kokultur zu messen. Ein interner Standard erlaubt die durchflusszytometrische Konzentrationsbestimmung; als solcher Standard wurden Flow-Count Beads gewählt. Ein bekanntes genaues Volumen dieser Beads wird einem bekannten genauen Volumen einer Probe zugesetzt. Die Zählung der Zellen erfolgt relativ zu den in der gleichen Zeiteinheit gezählten Beads bei bekannter Absolutzahl (Volumen * bekannter Konzentration) an Beads. Eine weitere Verdünnung des Gesamtansatzes aus Probe und Beads zu Messzwecken hat daher keine Auswirkung auf das Ergebnis.

Da die Aussagefähigkeit über eine Konzentrationsänderung von der Genauigkeit abhängt, mit der die Ansätze pipettiert und gemessen werden, wurden wiederholt Serien von 20 gleichen Ansätzen erstellt. Diese bestanden entweder aus Blasten oder K562 allein oder zwei miteinander nicht reagierenden Zellarten (NK-92 und ausgewählte Blasten). In letzterem Fall wurden zusätzlich Kontrollen für beide Zellarten erstellt. Direkt vor Messung wurden jeweils 50 µl Beads zugesetzt. Aus den ermittelten Zellzahlen wurde der Mittelwert und der Variationskoeffizient (VK) errechnet und im Fall der Kokultur von NK-92 und Blasten die aus den Kontrollen errechnete „Soll“-Konzentration der Kokulturen mit der gemessenen verglichen. Für Einzelzellsuspensionen lag der VK zwischen 1,5 % und 2 %, für Kokulturen zwischen 2,5 % und 4,5 % sowohl bei direkter Messung als auch Berechnung der Konzentration aus den Kontrollen, wenn keine Reaktion stattfand und zwischen 3,5 % und 8 % bei ausgeprägter zytotoxischer Aktivität.

3.2.5 Einfluss von monoklonalen Antikörpern, Propidiumjodid und Beads auf die Zellen im zeitlichen Verlauf

Zwischen Probenmarkierung und Messung vergehen u.U. 35 – 60 Minuten. Um den Einfluss der Reagenzien auf die gemessene Konzentration abzuschätzen, wurden Proben kryopräservierter Blasten mit mAb und PI sowie mAb, PI und Beads versetzt und bei Raumtemperatur gelagert. Parallel wurden Proben unmarkierten Zellen bearbeitet. Viertelstündlich über 60 Minuten wurden je einer Probe der drei Messreihen die fehlenden mAb und/oder PI zugesetzt, für 15 min inkubiert und dann gemessen; noch fehlende Beads wurden erst unmittelbar vor Messung zugegeben. Die Konzentration der nativ gelagerten Zellen wurde als Prozent der Ausgangskonzentration berechnet, die der anderen Proben als Prozent der nativen Zellen zum jeweiligen Messpunkt. Der Verlauf ist in Abb. 17 dargestellt. Demnach war auch 45 - 60 Minuten nach Zugabe von mAb und PI kein Einfluss dieser Reagenzien festzustellen, der zu einer Konzentrationsänderung vitaler Zellen führt, während nach Zugabe der Beads eine geringe Konzentrationsabnahme relativ zu den nativen Zellen nach einer Stunde zu verzeichnen war. Beads werden allerdings in der Regel erst direkt vor Messung zugegeben.

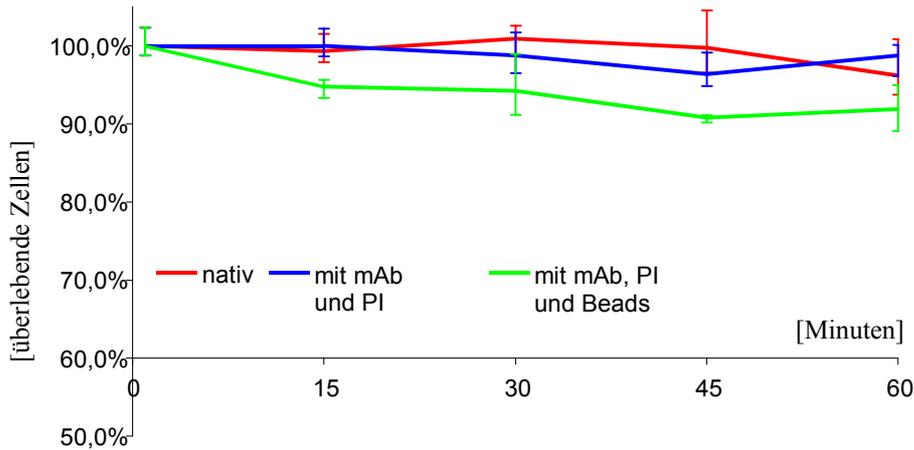


Abb. 17: Einfluss der verwendeten Reagenzien auf das Überleben der Zellen

Von Probenvorbereitung bis zur Messung können zwischen bis zu 60 Minuten verstreichen, in denen die Zellen dem Einfluss der mAb und PI, eventuell auch der Beadssuspension ausgesetzt sind. Daher wurden kryopräservierte Blasten unmarkiert und markiert sowie markiert und mit Beads versetzt über eine Stunde bei Raumtemperatur gelagert und ihre Zellkonzentration viertelstündlich gemessen. Die Konzentration der unmarkierten, nativen Zellen wurde als % der Ausgangskonzentration, die der markierten Proben als % der unmarkierten dargestellt. Einzig bei Lagerung bereits mit Beads versetzter Proben zeigt sich ein merklicher Verlust von 10% gegenüber der nativen Kontrolle. Beads werden allerdings in der Regel erst direkt vor Messung zugegeben, so dass dieser Einfluss dann nicht zum Tragen kommt.

3.2.6 Zytometersteuerung

3.2.6.1 Messung mit FITC- und PE-konjugierten monoklonalen Antikörpern und Propidiumjodid

Für die Messung mit FITC- und PE-konjugierten mAb und PI wurde das Setup für die modifizierte Stammzellmessung nach ISHAGE-Richtlinien adaptiert. Diese sieht die Verwendung von zwei mAb mit den genannten Fluoreszenzmolekülen und 7-AAD als Totfarbstoff vor. Die Verstärkerzeleinstellungen für die Flow-Set-Beads wurden übernommen. Zur Kompensation wurden frische Vollblutproben mit fixierten und permeabilisierten Stammzellen (StemTrol-Zellen) versetzt. Die Lymphozyten wurden mit CD4 FITC- und CD8 PE-mAb markiert, die Stammzellen mit PI gefärbt, die restlichen, unmarkierten Lymphozyten dienen als Negativpopulation. Erythrozyten wurden mit einem Ammoniumchlorid-Lysepuffer zerstört. Die Kompensation wurde akzeptiert, wenn der Unterschied der relativen mittleren Fluoreszenzintensitäten der beiden für eine Fluoreszenz negativen Populationen $< 0,1$ war (Abb. 13). Für die Kontrollmessung des Setups wurde peripheres Blut mit einer bekannten Menge der StemTrol-Zellen versetzt und mit CD45 FITC- und CD34 PE-mAb sowie PI gefärbt. Die Ergebnisse wurden mit denen gleicher Proben verglichen, die mit 7-AAD anstelle PI gefärbt und mit der Zytometersteuerung für

Stammzellen gemessen wurden. Für eine Messreihe von sechs Proben mit verschiedenen Konzentrationen an StemTrol-Zellen wurden mit beiden Färbungen gleiche Ergebnisse erzielt.

Tabelle 3: Vergleich der Setups mit PI oder mit 7-AAD als Totfarbstoff

Probe	CD34 [μl]		Leukozyten [μl]		CD34 [% der Leukozyten]	
	PI	7-AAD	PI	7-AAD	PI	7-AAD
1	301	298	6071	5985	4,96	4,98
2	137	137	5207	5235	2,63	2,62
3	37	37	5601	5512	0,66	0,67
4	12	11	5285	5174	0,23	0,21
5	5	4	4973	4870	0,10	0,08
6	1	1	5051	5256	0,02	0,02

Sechs Blutproben wurden mit absteigenden Konzentrationen an StemTrol-Zellen versetzt und mit CD45-FITC- und CD34-PE-mAb markiert. Nach Lyse der Erythrozyten wurden je 500 μl jeder Probe mit PI bzw. 7-AAD versetzt. Zur Messung wurden Zählbeads zugegeben. Die so gemessenen Konzentrationen der CD45 positiven Leukozyten und der sowohl CD34 als auch Totfarbstoff positiven StemTrol-Zellen und die daraus errechneten Prozentwerte sind für beide Färbungen gleich.

3.2.6.2 Messung mit monoklonalen Antikörpern in vier Fluoreszenzen und Propidiumjodid

Um auch den dritten und vierten Fluoreszenzbereich für die Detektion von mAb-Bindung nutzen zu können, wurde eine neue Zytometersteuerung konzipiert unter Ausnutzung des breiten Fluoreszenzpeaks von PI.

Es wurden optimale Verstärkungen für FITC, PE und PC5 markierte mAb gewählt. Da PI sein Fluoreszenzmaximum im dritten Fluoreszenzbereich hat, wurde dieser für PI sowie die stark fluoreszierenden Beads reserviert und daher nur schwach verstärkt. Als zusätzlicher Parameter wurde die Messzeit zugeschaltet.

Das Setup erfolgte mit Flow-Set Beads und vier Proben anti-CD4 und anti-CD8-mAb markierter Lymphozyten in den Fluoreszenzkombinationen FITC/PE, PE/ECD, PE/PC5 und ECD/PC5. Das Signal des dritten Fluoreszenzbereichs wurde überkompensiert, so dass alle außer die mit ECD markierten Zellen dort in den kleinsten Intensitätskanal fielen. Das im dritten und vierten Fluoreszenzkanal fast gleich intensive PI-Signal blieb durch dieses Setup im dritten Fluoreszenzkanal sichtbar verstärkt, aber weitgehend gegen den vierten (und zweiten) Kanal unkompensiert und konnte dadurch identifiziert werden (Abb. 18). Dieses Setup führte dazu, dass alle vier Fluoreszenzbereiche für eine Antikörpermarkierung der Zellen genutzt werden konnten bei gleichzeitiger Identifizierung toter Zellen über PI mit der Einschränkung, dass für eine sinnvoll ECD-Markierung eine hohe Epitopdichte (wie z.B. von CD3) nötig war. Seine Gültigkeit wurde verifiziert anhand frischer Lymphozyten,

die mit StemTrol-Zellen versetzt und mit anti-CD45 FITC, anti-CD4 PE, anti-CD8 ECD, anti-CD3-PC5 und PI gefärbt wurden. Die prozentualen Anteile der Lymphozyten nach Abzug der PI positiven Events entsprachen denen gleicher Proben, die ohne StemTrol-Zellen im Routineprotokoll für die T-Zellsubtypenbestimmung gemessen wurden.

3.2.7 Simultane Markierung von T-Zellen mit PC5-konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen CD4 und CD8

Die eingesetzten T-Zellproben bestanden sowohl aus CD4 als auch CD8 positiven T-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Populationen unterschiedlich auf die Zielzellen reagieren können (s.u. 4.9.2.4). Da die Expressionsdichte dieser Epitope auf den T-Zellen unterschiedlich ist, wurde der gleichzeitige Einsatz in einer Probe von anti-CD4 und anti-CD8-mAb, beide PC5-konjugiert, getestet. Es zeigte sich, dass die beiden Populationen in ihrer Intensität deutlich unterschiedliche Signale lieferten; das Signal der CD8 positiven (zytotoxischen) Zellen war dabei um ca. $\frac{1}{2}$ Log-Stufe stärker als das der CD4 positiven (Helfer-) T-Zellen. Beide Populationen konnten daher bei gleichzeitiger Markierung mit PC5-konjugierten mAb voneinander unterschieden werden (Abb. 18).

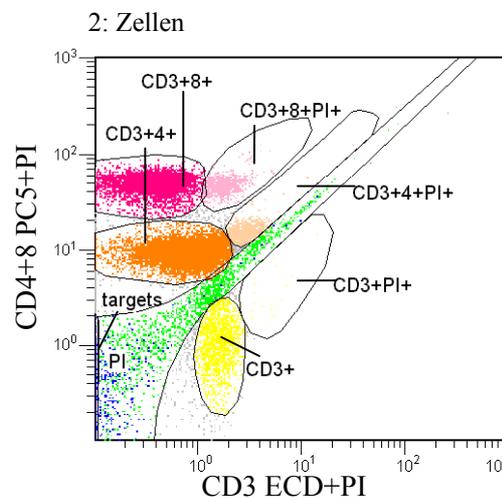


Abb. 18: Simultane Markierung einer Kokultur aus Blasten und T-Zellen mit mAb gegen Blasten und CD3 ECD, CD4 PC5, CD8 PC5 und PI

Aufgetragen wurde der vierte (Ordinate) gegen den dritten (Abszisse) Fluoreszenzbereich, dargestellt sind die als zellulär akzeptierten Events. Die simultane Markierung der T-Zellen mit mAb gegen CD4 und CD8 in der gleichen Fluoreszenz (PC5) erlaubt eine klare Unterscheidung der beiden Populationen durch die unterschiedliche Intensität des erhaltenen Signals. Durch die zusätzliche Markierung mit CD3-mAb in ECD sind auch die CD3+4-8- NK-T-Zellen abgrenzbar. In dieser Probe ebenfalls enthaltene Blasten erscheinen durch die starke Überkompensation ganz an den linken unteren Rand des Histogramms gedrängt und sind daher nicht als Population sichtbar, sie werden im ersten und zweiten Fluoreszenzbereich gegatet (nicht abgebildet). Das PI-Signal ist unkompensiert und bildet daher eine diagonal verlaufende Linie, da eine schwache bzw. eine starke Intensität des Signals im einen Kanal einer ebenso schwachen bzw. starken Intensität im anderen Kanal entspricht. Als Folge der Überkompensation wandert das T-Zellsignal mit zunehmender Markierung der Zellen durch einen PC5-konjugierten mAb auf der Abszisse nach links, dadurch erscheinen die CD8+ Zellen weniger CD3 zu tragen als die CD4+ oder die NK-T-Zellen.

3.3 Entwicklung und Optimierung des durchflusszytometrischen Zytotoxizitätsassays

Im Verlauf dieser Arbeit wurden sukzessive und aufeinander aufbauend drei Varianten des Assays entwickelt; die dritte Variante wurde als Endresultat akzeptiert. Der Übersichtlichkeit halber werden sie hier direkt hintereinander vorgestellt.

3.3.1 Variante 1: Messung des Prozentsatzes toter Zielzellen

Die erste Variante des Assays maß den Prozentsatz PI positiver, toter Zielzellen an den Gesamtzielzellen als Korrelat der zytotoxischen Aktivität der Effektoren.

Es wurden zwei mAb zur Unterscheidung zwischen Ziel-, Effektor- und restlichen Zellen eingesetzt; die endgültige Wahl wurde getroffen durch Austestung der Antikörper an Ziel- und Effektorzellen. Gefordert wurde mindestens ein Antikörper mit starker Bindung an die interessierenden Zellen. War dies ein mAb gegen die Zielzellen, wurde er wegen des stärkeren Signals als PE-Konjugat eingesetzt. Mussten statt dessen die Effektoren markiert werden, wurde dieser mAb FITC-konjugiert eingesetzt, um mit dem PE-konjugierten mAb gegen die Zielzellen dennoch ein möglichst starkes Signal zu erreichen. Als Totfarbstoff wurde PI gewählt. Den Fluoreszenzen entsprechend wurde die modifizierte Zytometersteuerung der Stammzellmessung (3.2.6.1) verwendet. Für diese Variante wurden nur aktivierte NK-Zellen und NK-92 als Effektoren eingesetzt.

3.3.1.1 Ablauf des Assays

Die Zielzellen wurden auf eine Konzentration von $2 \cdot 10^5/\text{ml}$ eingestellt. Für die Effektorzellen wurde eine Verdünnungsreihe erstellt von $2 \cdot 10^6/\text{ml}$, $1 \cdot 10^6/\text{ml}$ sowie $2 \cdot 10^5/\text{ml}$. Die Kokulturen und Kontrollen wurden nach folgendem Schema pipettiert:

Tabelle 4: Pipettierschema Variante 1

			Effektor:Target-Ratio				
	Kontrolle Effektoren	Kontrolle Zielzellen	1:1	5:1	10:1	20:1	40:1
Zielzellen		400 μl	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl	100 μl
Effektorzellen	400 μl		200 μl (aus $2 \cdot 10^5/\text{ml}$)	200 μl (aus $1 \cdot 10^6/\text{ml}$)	200 μl (aus $2 \cdot 10^6/\text{ml}$)	400 μl (aus $2 \cdot 10^6/\text{ml}$)	400 μl (aus $2 \cdot 10^6/\text{ml}$)

Sämtliche Proben wurden kurz anzenrifugiert, damit die Zellen für eine optimale Interaktion sedimentierten. Die Kokultur von vier Stunden erfolgte bei 37 °C und 95% Luftfeuchte in 5% CO₂-Atmosphäre.

3.3.1.2 Messung

Zur Messung wurden alle Proben mit je 10 µl der ausgewählten FITC- und PE-konjugierten mAb und PI markiert. Es wurden 5000 Zielzell-Events aufgenommen oder die Messung nach fünf Minuten gestoppt.

3.3.1.3 Analysenauswertung

Im Mess- und Analyseprotokoll wurde der FSC gegen den SSC aufgetragen und die zellulären Events eingegrenzt (Abb. 19, Histogramm (H) 4). Ausschließliche diese wurden in den anderen Histogrammen betrachtet. Durch die Reduktion der Daten um nichtzelluläre Events (Zellbruchstücke, Verunreinigungen) wurde eine bessere Darstellung seltener Events (Zielzellen) erreicht. In den Auftragungen FITC gegen FSC (H 1) und PE gegen SSC (H 2) sowie FITC gegen PE (H 3) wurden jeweils Regionen für die Zielzellen definiert. Die Schnittmenge aller dieser Regionen, die akzeptierten „Zielzellen“, wurden als Counts je Fluoreszenzkanal der vierten Fluoreszenz (einparametrische Darstellung) aufgetragen (H 8). Die PI positiven Events dieses Histogramms wurden als „tote Zielzellen“ prozentual ausgewertet (Abb. 19). Analog wurden Regionen für die Effektorzellen definiert, um gegebenenfalls Streuungen der Effektorzellen in die Zielzellregionen unter Zuhilfenahme der Kontrollen rechnerisch ausgleichen zu können (Berechnung s. Anhang). Auch die Effektorzellen wurden als einparametrische PI-Darstellung aufgetragen, um ihren Zustand beurteilen zu können (nicht dargestellt).

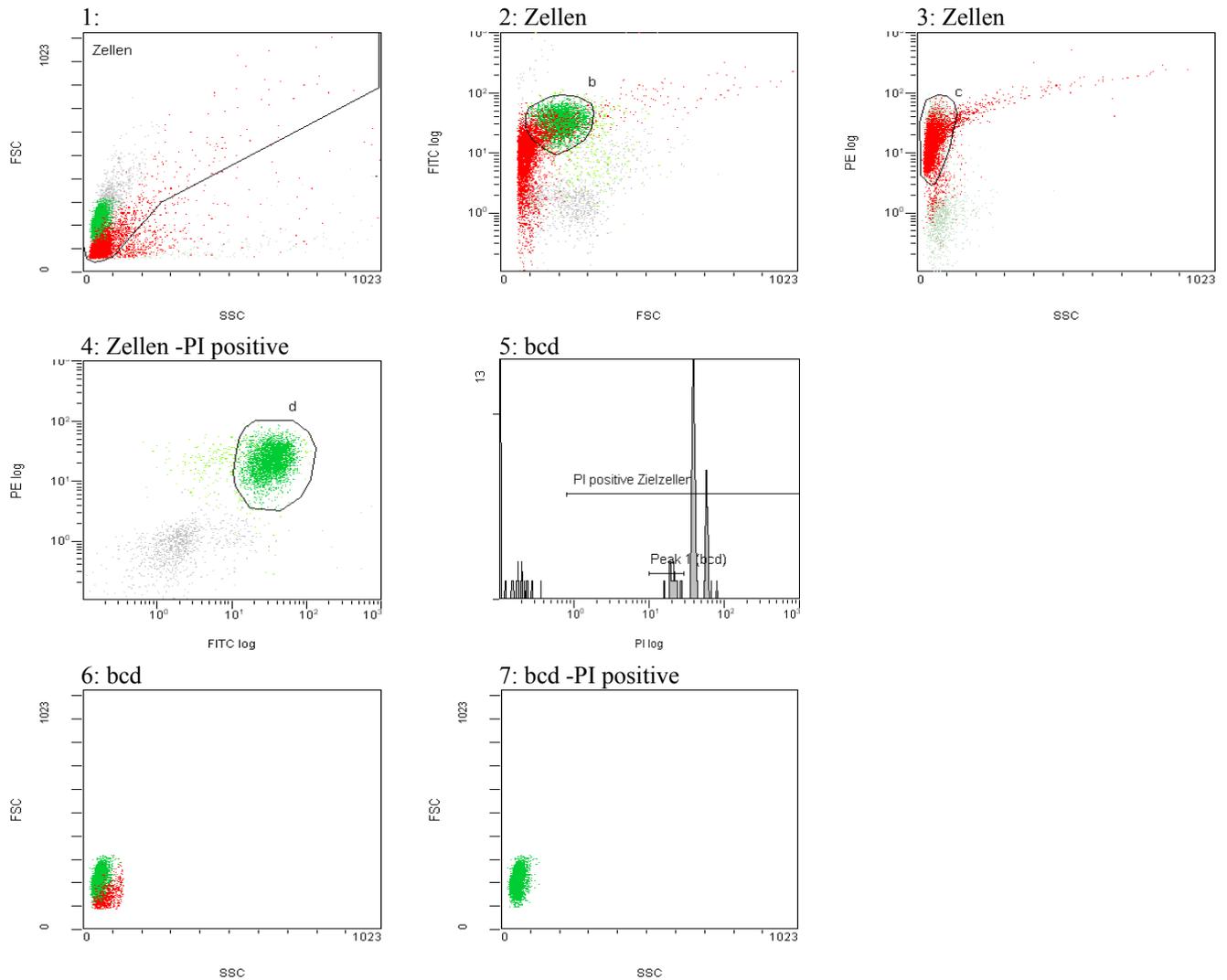


Abb. 19: Gatingstrategie des ersten Assays

Darstellung einer Zielzellkontrolle.

Hellgrün: in b oder c gegatete Events, dunkelgrün: Schnittmenge aus b, c, d abzüglich der PI positiven, rot: PI positive, grau: „Zellen“ und ungegatete Events. Zur Darstellung des Gatings s. Abb. 8.

Zum besseren Vergleich der Histogramme untereinander wurde die Reihenfolge der Histogramme in der Abbildung gegenüber dem eigentlichen Auswerte-Protokoll abgeändert.

Histogramm (H) 1: Auftragung aller Events nach Größe und Komplexität.

H 2 und 3: Auftragung der in H 1 gegateten Zellen nach Fluoreszenzeigenschaften und Scatereigenschaften.

H 4: Auftragung beider Fluoreszenzen gegeneinander, PI positive hier ausgeblendet (Gate „- PI positive“).

H 2 – H 4 sind auf die Region “Zellen” in H 1 gegatet, um nicht-zelluläre Events auszublenden, diese Abgrenzung gelingt allerdings aufgrund des fließenden Übergangs lebender Zellen, toter Zellen und subzellulärem Debris sehr schlecht. In H 2 – H 4 wurde jeweils eine Region (b, c und d) erstellt, die im jeweiligen Histogramm die Zielzellen definiert. Die Schnittmenge dieser Regionen wurde hinsichtlich der PI Positivität ausgewertet (H 5). Zum Vergleich wurde diese Schnittmenge nochmals wie in H 1 aufgetragen (H 6). Hier zeigt sich deutlich, dass die Populationen der PI positiven „Zellen“ (rot) sich von den vitalen Zielzellen (grün) unterscheidet und die Abgrenzung gegenüber den übrigen PI positiven Events in H 1 willkürlich erscheint. Dies ist auf Histogramm 2 zurückzuführen, in dem die Grenzen der Region die Population der PI positiven durchschneidet. Insbesondere fällt hier auf, dass die PI positiven Events deutlich verschieden von den vitalen Zellen durch den FITC-mAb markiert werden, vgl. dagegen H 3. Die PI negativen Zielzell-Events sind dagegen in allen Histogrammen als Population klar eingrenzbar und stellen sich auch als solche in der FSC gegen SSC-Auftragung dar (H 7).

Zunächst wurden die Daten der Ziel- und Effektorzellkontrollen eingeladen, um anhand dieser die Lage der Regionen für beide Populationen festzulegen. Das Protokoll wurde mit den so definierten Regionen abgespeichert und die Messdaten der Kokulturen nacheinander eingespielt. Im Idealfall sollten die Regionen nicht mehr verschoben werden, um die über die Kontrollen berechnete Streuung verwenden zu können. Der Prozentanteil der PI positiven Events an den Zielzellevents abzüglich dessen der Zielzellkontrolle wurde als zytotoxische Aktivität der Effektorzellen definiert (s. 4.3 und Anhang):

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \% \text{ PI positive Zielzellen}_{\text{Kokultur}} - \frac{(100 - \% \text{ PI positive Zielzellen}_{\text{Kokultur}})}{(100 - \% \text{ PI positive Zielzellen}_{\text{Kontrolle}})}$$

3.3.1.4 Ergebnisse der Auswertungen

Die Eingrenzung der Ziel- und Effektorpopulationen nach Kokultur zeigte sich unerwartet schwierig. Das deutlich geringere FSC-Signal der toten gegenüber den lebenden Zellen führte zu einem fließenden Übergang zwischen lebenden Zellen, toten Zellen und nichtzellulären Events in der FSC/SSC-Auftragung (H 1 in Abb. 19). Dieses Problem wurde auch durch „Rückgaten“ der PI positiven Events (z.B. farblich unterschiedliche Darstellung innerhalb der Gesamtevents) nicht gelöst. Dadurch war es nicht eindeutig möglich, Zellen von Zellbruchstücken zu trennen. Verstärkt wurde dies in Assays beobachtet, in denen eine zytotoxische Aktivität vermutet wurde und in den Fällen, in denen kryopräservierte Zielzellen eingesetzt wurden.

Eine weitere Schwierigkeit ergab sich durch Populationen, die aufgrund ihrer Verteilung als Artefakte durch unspezifische Antikörperbindung interpretiert wurden, dazu gehört der „Schweif“ an PI positiven in H 3 der Abb. 19. Auch hierdurch war das Setzen von Regionen für die Ziel- und Effektorzellen erschwert, da nicht beurteilbar war, um welche Art Zellen – wenn überhaupt – es sich bei diesen Events handelte. Andererseits trat eine abgeschwächte Markierbarkeit toter oder geschädigter Zellen durch mAb auf (Abb. 19, H 2). Dies führte dazu, dass sich die toten Zellen vorher gut unterscheidbarer Populationen hinsichtlich ihres Fluoreszenzsignals annäherten. Tote NK-Zellen waren daher von toten Zielzellen nicht sicher unterscheidbar. Zusammenfassend fielen daher die PI positiven Zellen nicht sicher in die über die Kontrollen prädefinierten Regionen, sondern streuten weit bei aufgehobener Trennschärfe der Antikörpermarkierung und der Streulichteigenschaften, ohne dass eine rechnerische Korrektur möglich war.

Die Probleme bei der Eingrenzung der Populationen wurden ergänzt durch inkonsistente Ergebnisse bei der Berechnung der Zytotoxizität. Insbesondere fiel bei einer Reihe von Versuchen auf, dass der Prozentanteil der Zielzellen an den Gesamtzellen stärker abnahm, als PI positive Zellen auftraten, d.h. es war ein Verlust an Zielzellen zu beobachten, der durch die Zunahme PI positiver Zellen nicht erfasst wurde (Abb. 20).

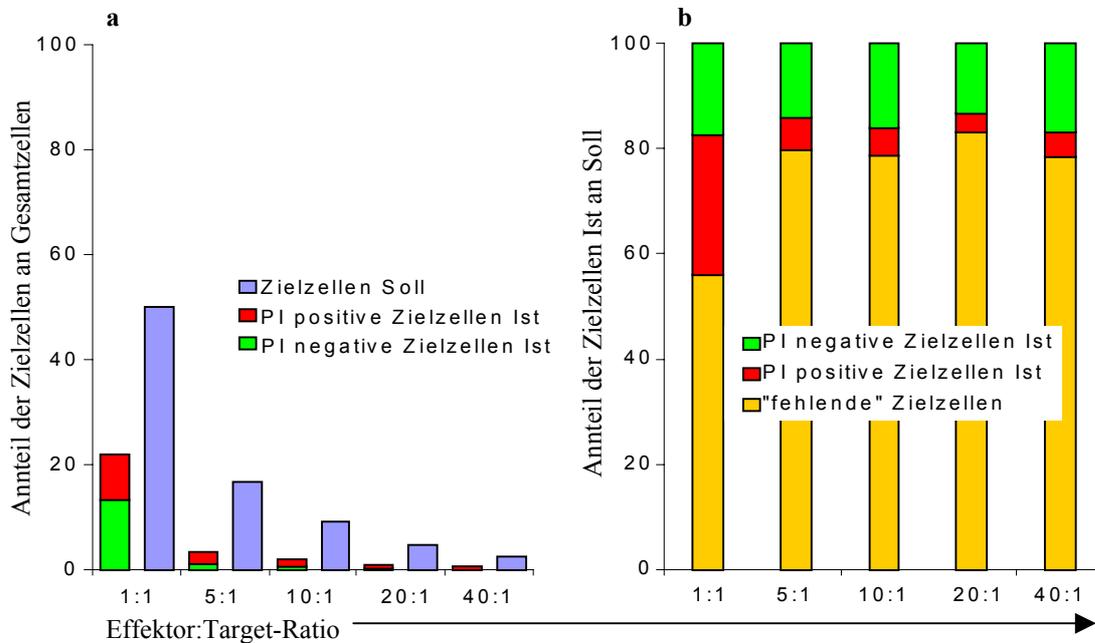


Abb. 20: NK-92 gegen K562, Auswertung über PI positive Events in der Zielzellpopulation

a) Der tatsächliche Anteil der Zielzellen (Summe der PI positiven und PI negativen Zielzellevents, rot und grün) an den Gesamtzellen in den Ansätzen wurde verglichen mit dem Soll-Anteil bei gegebener E:T-Ratio (blau) unter der Annahme, dass die Ausgangskonzentrationen der Ziel- und Effektorzellen dem Soll entsprachen. Es zeigt sich eine Differenz von Ist zu Soll von ca. 50%.

b) Gleiche Analysen, Anteile der gemessenen PI positiven und negativen Zielzellevents am Sollwert, Differenz zwischen Ist und Soll orange dargestellt. Da die Differenz zwischen dem Ansatz mit submaximaler zytotoxischer Aktivität (1:1) und den übrigen deutlich zunimmt, ist nicht von einem systematischen Fehler (falsche Ausgangskonzentrationen) auszugehen. Der Assay steht repräsentativ für 6 Assays von NK-92 gegen K562 und AML-Blasten.

In mehreren Assays mit NK-92 und K562 unter Markierung mit CD45 FITC-mAb und CD56 PE-mAb fiel eine Population auf, die sich durch CD56 markieren ließ, aber in Größe und Komplexität über den NK-92-Zellen lag (Abb. 21). Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung dieser antikörpermarkierten Proben zeigte neben orange und grünen (PE und FITC, NK-92) und nicht fluoreszierenden Einzelzellen (K562) auch Konjugate, in denen eine nicht fluoreszierende Zelle umgeben war von solchen, die sowohl grün als auch orange fluoreszierten. Bei der beobachteten Population handelte es sich demnach um Effektorzell-Zielzellkonjugate aus nicht antikörpermarkierten K562 und markierten NK-92. Diese Population war durchflusszytometrisch für PI schwach positiv (Abb. 21).

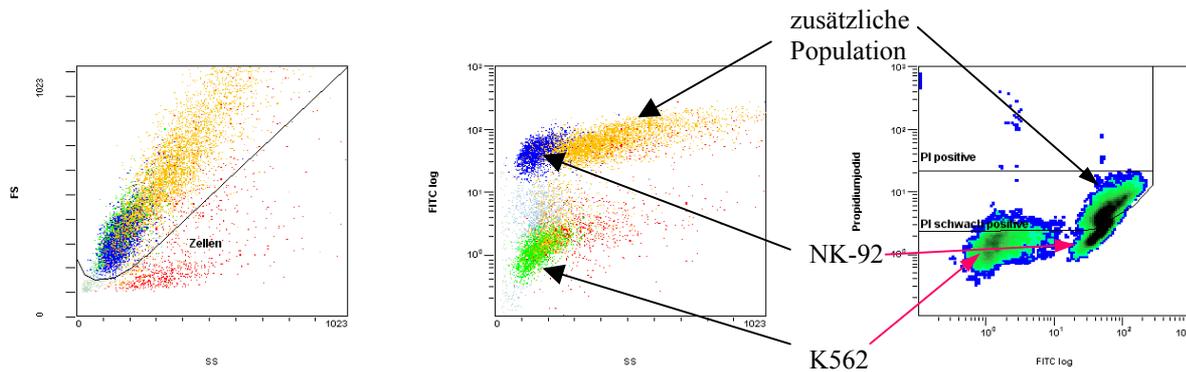


Abb. 21: Nachweis einer Konjugatbildung

NK-92 gegen K562 im Verhältnis 5:1 nach vier Stunden Kokultur. Neben NK-92 (blau) und K562 (grün) fällt eine dritte Population (orange) in den ersten beiden Histogrammen auf. Wird FITC gegen Propidiumjodid aufgetragen, zeigt sich auch hier neben den zu erwartenden Ziel- und Effektorzellpopulationen eine dritte, die ein schwaches PI-Signal gibt (rechts, zur klareren Unterscheidung der beiden FITC positiven Populationen wurde eine Dichtedarstellung gewählt). Sie entspricht der ungewöhnlich großen und komplexen Population in den ersten beiden Histogrammen. Fluoreszenzmikroskopisch wurde diese Population als Konjugate aus jeweils mehreren NK-92 und einer K562-Zelle identifiziert. Rot: PI hochpositive Events.

3.3.2 Variante 2: Messung der Konzentrationsänderung lebender Zellen unter Verwendung von FITC- und PE-konjugierten Antikörpern und Propidiumjodid

Mit diesem Assay wurde die Konzentrationsänderung der lebenden Zellen in Kokultur gemessen. Für die Markierung der Ziel- bzw. Effektorzellen wurden wie bisher FITC – und PE – konjugierte mAb eingesetzt, PI diente dem Ausgaten toter Zellen. Zur Konzentrationsbestimmung wurden Flow-Count Beads als interner Standard eingeführt. Um eine Abnahme der Zielzellen im Assayverlauf zu erfassen, wurde die Konzentration der Kokulturen mit denen der Kontrollen verglichen. Vor Inkubation wurden ebenfalls Kontrollen gemessen, anhand derer die Startkonzentrationen der Kokulturen und die Spontanverluste errechnet wurden. Für die Erfassung der Beads wurde der dritte Fluoreszenzdetektor zugeschaltet und eine Verstärkung gewählt, die die Beads im Bereich zwischen 100 und 200 relativen Fluoreszenzeinheiten plazierte. Eine Kompensation dieses Kanals war nicht notwendig, da hier keine Markierung der Zellen erfolgte, d.h. die übrige Zytometersteuerung blieb gegenüber der bisherigen unverändert.

3.3.2.1 Ablauf des Assays

Die Zielzellen und Effektorzellen wurden auf eine Konzentration von auf $1 * 10^6$ /ml eingestellt und die Proben nach folgendem Schema pipettiert, nach Möglichkeit in Dreifachansätzen:

Tabelle 5: Pipettierschema Variante 2

		Effektor:Target-Ratio					
	Kontrolle Effektoren	Kontrolle Zielzellen	1:1	5:1	10:1	20:1	40:1
Zielzellen		2 * 400 μ l	200 μ l	100 μ l	100 μ l	50 μ l	50 μ l
Effektorzellen	2 * 400 μ l		200 μ l	500 μ l	1000 μ l	1000 μ l	2000 μ l

Je eine Kontrolle der Ziel- und der Effektorzellen wurde sofort gemessen. Die übrigen Ansätze wurden wie bisher anzenrifugiert und für 2-72 h im Brutschrank inkubiert. Als Effektoren wurden sowohl NK- als auch T-Zellen eingesetzt.

3.3.2.2 Messung

Nach Inkubation erfolgte die Markierung der Proben wie bisher; unmittelbar vor Messung wurden 50 μ l Beads hinzugegeben. Es erfolgte eine Messung der Kontrollen vor sowie der weiteren Kontrollen und der Kokulturen nach Inkubation.

3.3.2.3 Analysenauswertung

Das Mess- und Analyseprotokoll wurde jeweils um ein Histogramm erweitert, das die dritte Fluoreszenz gegen den FSC auftrug; hier wurde die Kalibrationsregion für die Beads eingeführt. Aus den Schnittmengen der Ziel- bzw. Effektorzellevents wurden die PI positiven Events ausgeblendet und die Ziel- und Effektorzellen in jeweils eigenen Histogrammen in einer FSC gegen SSC-Auftragung dargestellt (Abb. 22).

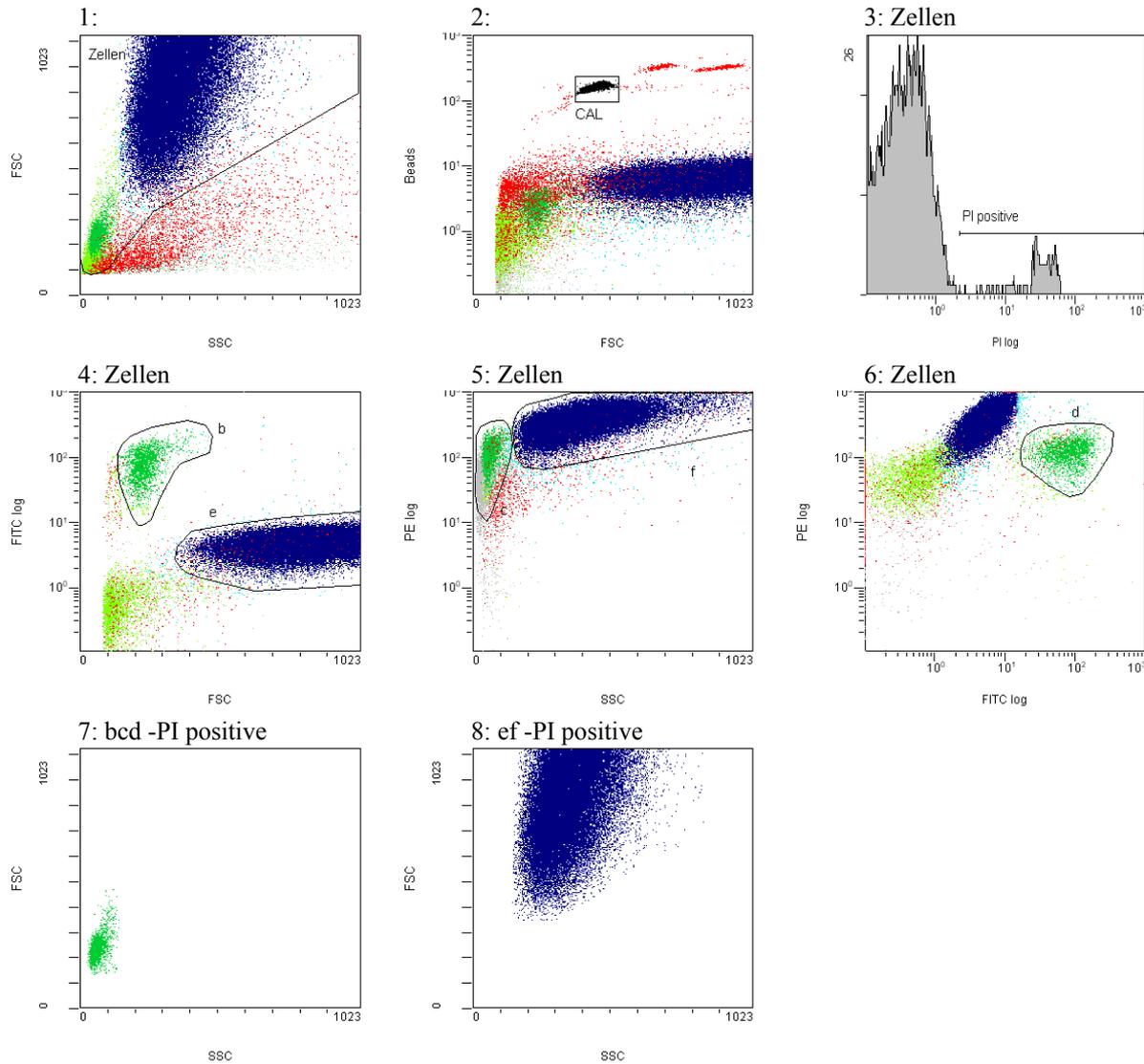


Abb. 22: Gatingstrategie der zweiten Assayvariante

Dunkelblau: Effektorzellen (Schnittmenge aus e und fabzüglich PI positive), hellgrün: nur in b oder c gegatete Events, dunkelgrün: Zielzellen (Schnittmenge aus b, c und d abzüglich PI positive), rot: PI positive Events, schwarz: gegatete Flow-Count-Beads.

In Histogramm (H) 1 wurde die Größe gegen die Komplexität aufgetragen und eine Region (R) für zelluläre Events definiert. Diese wurden in H 3 – 6 nach Fluoreszenz- und Scattereigenschaften aufgetragen.

H 3: Hier wurden die PI positiven Events gegatet und rot markiert; das Gate erfasst zugleich die intensiv fluoreszierenden Beads.

H 4 – 6: Darstellung der zellulären Events nach mAb-Fluoreszenz, Größe und Komplexität. Die Zielzellen wurden in den Regionen b, c und d, Effektorzellen in e und f eingegrenzt.

H 7 - 8: Die Schnittmenge aus b, c und d abzüglich der PI positiven wurde als vitale Zielzellen in H 7, die aus e und f abzüglich der PI positiven in H 8 als vitale Effektorzellen dargestellt und ihre Konzentration relativ zu den in H 2 gegateten Flow-Count Beads ausgewertet.

Die Auswertung erfolgte wiederum zunächst unter Festlegung der Regionen für Ziel- und Effektorzellen über die Kontrollen und dann sukzessives Einladen der Kokultur-Messdaten in das Auswerteprotokoll. Es wurden die Konzentrationen der PI negativen Ziel- und Effektorzellen abgelesen, die durch die Software über die Beads errechnet wurde. Da Beads und Proben in verschiedenen, wechselnden Verhältnissen zueinander pipettiert waren,

mussten diese Konzentrationen auf die tatsächliche Konzentrationen umgerechnet werden. Hierzu wurde eine Excel-Tabelle erstellt, in der die Umrechnung der Konzentrationen und die Korrektur der Streuung automatisiert erfolgte, sobald die anteiligen Volumina der Zellen und der Beads sowie die „gemessene“ Konzentrationen eingegeben wurden. Die Spontanoten der Kontrollen wurden von den Ausgangskonzentrationen vor Kokultur abgezogen und die Konzentrationsänderung der Zellen auf diese bereinigten Ausgangskonzentrationen bezogen.

3.3.2.4 Ergebnisse der veränderten Auswertestrategie

Es wurden sowohl T- als auch NK-Zellen in verschiedenen Verhältnissen gegen K562 oder gegen Blasten eingesetzt. Die Ausblendung der PI positiven Events ermöglichte eine gute Abgrenzung der Zellpopulationen, so dass im Gegensatz zur vorherigen Assayvariante die Regionen gut definierbar waren. Die Korrektur eventueller Streuung ($< 1\%$ der jeweiligen Populationen) erfolgte nach der im Anhang ausgeführten Formel.

Die zytotoxische Aktivität wurde in diesen Analysen zusätzlich nach der ersten Variante über die PI positiven Zielzellen berechnet und mit der Auswertung über den Verlust PI negativer verglichen, zusätzlich erfolgte eine Validierung der Vorgehensweise über den Europium-Assay (s. unter 3.4).

Die zusätzliche Auswertung der Effektorzellen erwies sich als aufschlussreich. In den Fällen, in denen keine zytotoxische Aktivität nachgewiesen wurde, blieb ihre Konzentration in allen Ansätzen unverändert. Dagegen zeigte sich bei vorhandener Aktivität zu frühen Messpunkten (2 – 4 nach Inkubationsbeginn) eine starke Abnahme der Effektoren in den kleinen Rationen (1:1 und 5:1), während in den hohen E:T-Verhältnissen die Konzentration der Effektoren weiterhin unverändert blieb. Nach 24 – 72 dagegen lag die Konzentration in den geringen und den hohen Konzentrationsverhältnissen im Bereich der Startkonzentration, während sich bei mittleren Verhältnissen eine Zunahme der Effektoren zeigen ließ, die in dem Ansatz am größten war, in dem erstmalig die volle zytotoxische Aktivität erreicht wurde (Abb. 23).

Die Beurteilung der T-Zellen erforderte Parallelansätze, in denen nicht die Blasten, sondern die T-Zellsubpopulationen mit CD4 FITC- und CD8 PE-mAb markiert wurden. In diesen konnte der beschriebene Effekt für die CD8 positive Population nachgewiesen werden, während die CD4 positive gegenüber der Ausgangskonzentration unverändert blieb.

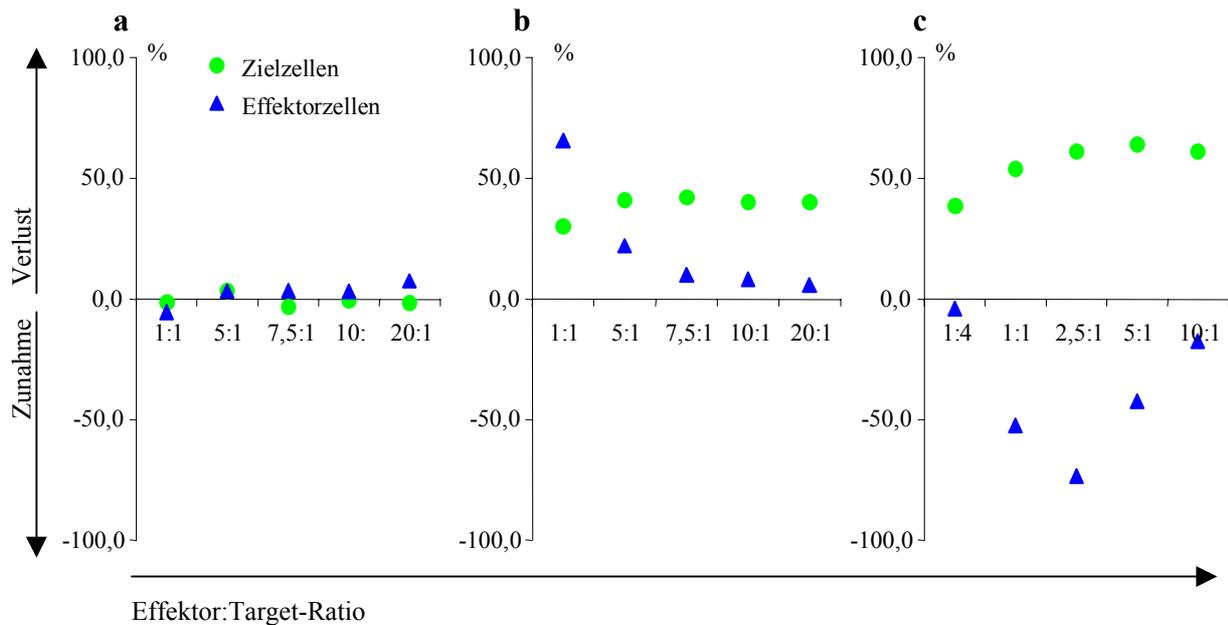


Abb. 23: Ratioabhängige Konzentrationsänderungen der Ziel- und Effektorzellen in Kokultur

a) und b) NK-Zellen gegen Blasten, Inkubation über 4 h. Bei Vorliegen einer zytotoxischen Aktivität (Abnahme der Zielzellen) ändert sich auch die Konzentration der Effektoren in charakteristischer Weise: Nach 4 h (b) nehmen die Effektorzellen in den kleinen E:T-Ratien stark ab, in den höheren dagegen weniger. Dies entspricht der Bindung mehrerer Effektorzellen an eine Zielzelle, wodurch die Konzentration an einzelnen Effektorzellen abnimmt. Ein tatsächlicher Verlust durch Apoptose ist ebenfalls denkbar, wurde aber nicht untersucht. Fehlt eine Aktivität, bleiben beide Konzentrationen unverändert (a).

c) T-Zellen gegen Blasten, Inkubation über 48 h. Bei Vorliegen einer zytotoxischen Aktivität gegen die Blasten zeigt sich eine Zunahme der Effektorkonzentrationen durch den Zielzellstimulus. Sichtbar wird dies vor allem in Ansätzen mit optimalen E:T-Verhältnissen (maximales Killing bei minimaler Effektorkonzentration, hier bei 2,5:1), während darunter als Ausdruck einer Erschöpfung der Effektoren die Zunahme geringer ausfällt und in einigen Assays auch ein Verlust auftritt. Jenseits optimaler E:T-Ratien fällt die Effektorzellzunahme geringer aus als Ausdruck eines schwächeren Stimulus durch eine geringe Zielzellkonzentration. Repräsentative Assays.

Probleme ergaben sich durch den Einsatz der Beads, sie führten zu einer vermehrten Verstopfung des Probenwegs. Dies war teilweise in den Analysen ablesbar dadurch, dass die Beads und mit ihnen die übrigen Populationen gegenüber ihrer Lage in den anderen Analysen „verrutscht“ waren, da ihre Fluoreszenz- und Scattersignale abnahmen. Die Ergebnisse dieser Analysen wichen vom erwarteten Wert teils erheblich ab.

Die Bindung von mAb an Epitope ist kein irreversibler Prozess, vielmehr stellt sich ein stöchiometrisches Gleichgewicht zwischen Bindung und Ablösung der Antikörper ein. Dieses Gleichgewicht ist abhängig von der Antikörperkonzentration in der Probe. Eine gleich starke Markierung von Zellen mit einem gegebenen mAb wird daher nur bei gleichen Proben- und Antikörpervolumina erreicht. Auf gleiche Volumina der Ansätze wurde dennoch verzichtet, da optimalen Messvolumina und -konzentrationen sowie weniger Pipettierschritten der Vorrang eingeräumt wurde. Die Unterschiede in der Fluoreszenzintensität der Proben waren gering, machten aber mitunter eine Nachjustierung der Auswerteregionen notwendig.

Dies beeinträchtigt die rechnerische Korrektur von Streuungen, die unveränderte Regionen im Vergleich zu den Kontrollen voraussetzt (Anhang). In den Assays lag zuletzt allerdings keine oder eine extrem geringe Streuung vor, so dass sich keine Nachteile ergaben.

3.3.3 Endvariante: Messung der Konzentrationsänderung lebender Zellen unter Markierung mit FITC-, PE-, ECD- und PC5-konjugierten Antikörpern sowie Propidiumjodid

In diesem Schritt wurde bei sonst gleichem Ablauf eine neue Zytometersteuerung erstellt, die die Hinzunahme von PC5, gegebenenfalls auch ECD konjugierten mAb erlaubte, so dass alle vier Fluoreszenzbereiche für eine Antikörperdetektion herangezogen werden konnten. Die Zielzellen wurden regelhaft mit FITC- und PE- konjugierten mAb markiert, die Effektorzellen mit PC5-konjugierten mAb, um eine Standardisierung zu erreichen. PI diente weiterhin der Ausblendung toter Zellen aus der Analyse, die Auswertung erfolgte über die Konzentrationsänderung der vitalen Zellpopulationen.

3.3.3.1 Ablauf

Zielzellen und T-Zellen wurden auf eine Konzentration von $5 \cdot 10^5$ /ml, NK-Zellen wurden auf $1 \cdot 10^6$ /ml eingestellt und die Proben nach folgenden Schemata pipettiert:

Tabelle 6: Pipettierschemata Variante 3

NK-Zellen:

		Effektor:Target-Ratio					
	Kontrolle Effektoren	Kontrolle Zielzellen	1:1	5:1	7,5:1	10:1	20:1
Zielzellen		2 * 400 µl	200 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
NK-Zellen	2 * 400 µl		100 µl	250 µl	375 µl	500 µl	1000 µl

T-Zellen:

		Effektor:Target-Ratio					
	Kontrolle Effektoren	Kontrolle Zielzellen	1:4	1:1	2,5:1	5:1	10:1
Zielzellen		2 * 400 µl	400 µl	200 µl	100 µl	100 µl	100 µl
T-Zellen	2 * 400 µl		100 µl	200 µl	250 µl	500 µl	1000 µl

3.3.3.2 Messung

Je eine Kontrolle der Ziel- und der Effektorzellen wurde sofort gemessen. Die übrigen Proben wurden wie bisher behandelt. Die Markierung der Zellen erfolgte in den ersten Assays mit je einem FITC- und einem PE-konjugierten mAb gegen die Zielzellen. NK-Zellen wurden CD56-PC5-mAb, T-Zellen simultan mit CD4- und CD8-PC5-mAb dargestellt. Die dritte Fluoreszenz wurde für PI und Beads eingesetzt. Alternative Markierungsverfahren einschließlich Zugabe eines ECD-konjugierten mAb gegen Ziel- oder Effektorzellen wurden in späteren Assays eingesetzt. Die Markierung der Proben erfolgte sequenziell, um die Kontaktzeit mit mAb und PI vor Messung im Bereich von < 30 Minuten zu halten. Unmittelbar vor Messung wurden jeder Probe 50 µl Beads hinzupipettiert. Alle Proben wurden fünf Minuten vermessen, nach drei Proben wurde mit Aqua dest gespült, um einem Verschluss des Probenwegs durch die Beads vorzubeugen. Der gleichmäßige Probenfluss wurde durch Auftragung der Beads gegen die Messzeit überwacht, gegebenenfalls wurde eine Verstopfung durch die „Prime“-Funktion des Zytometers beseitigt.

3.3.3.3 Analysenauswertung

Wie bisher wurden zuerst die Kontrollen ausgewertet und anhand dessen die benötigten Regionen definiert, dann wurden die Messdaten der Kokulturen in das vorbereitete Protokoll eingeladen (Abb. 24). Das Signal der PI positiven Events wurde in einer Auftragung von FL 3 gegen FL 4 erfasst und gegebenenfalls aus den übrigen Histogrammen ausgeblendet, um die Regionen korrekt setzen zu können. Daraufhin wurden Ziel- und Effektorzellen über die Fluoreszenzsignale der eingesetzten Antikörper sowie über SSC und FSC eingegrenzt, die Schnittmenge dieser Gates in einem eigenen SSC gegen FSC-Dotplot für Ziel- und für Effektorzellen aufgetragen und die Events relativ zu den Beads gezählt. Die Beads selbst wurden anhand ihres von den Zellen stark differierenden FSC-/SSC-Signals erfasst und in der dritten Fluoreszenz gegen die Messzeit aufgetragen, um den gleichmäßigen Probenfluss zu überwachen; 95% der gegateten „Beads“-Events mussten in einer vorgegebenen Kalibrationsregion liegen, damit die Messung akzeptiert wurde. Um Unregelmäßigkeiten im Probenfluss einer Messung gegebenenfalls nachträglich ausgleichen zu können, wurde in diesem Histogramm ein Gate definiert, das nur den gültigen Messzeitraum umfasste; alle Histogramme wurden hierauf gegatet (Abb. 24).

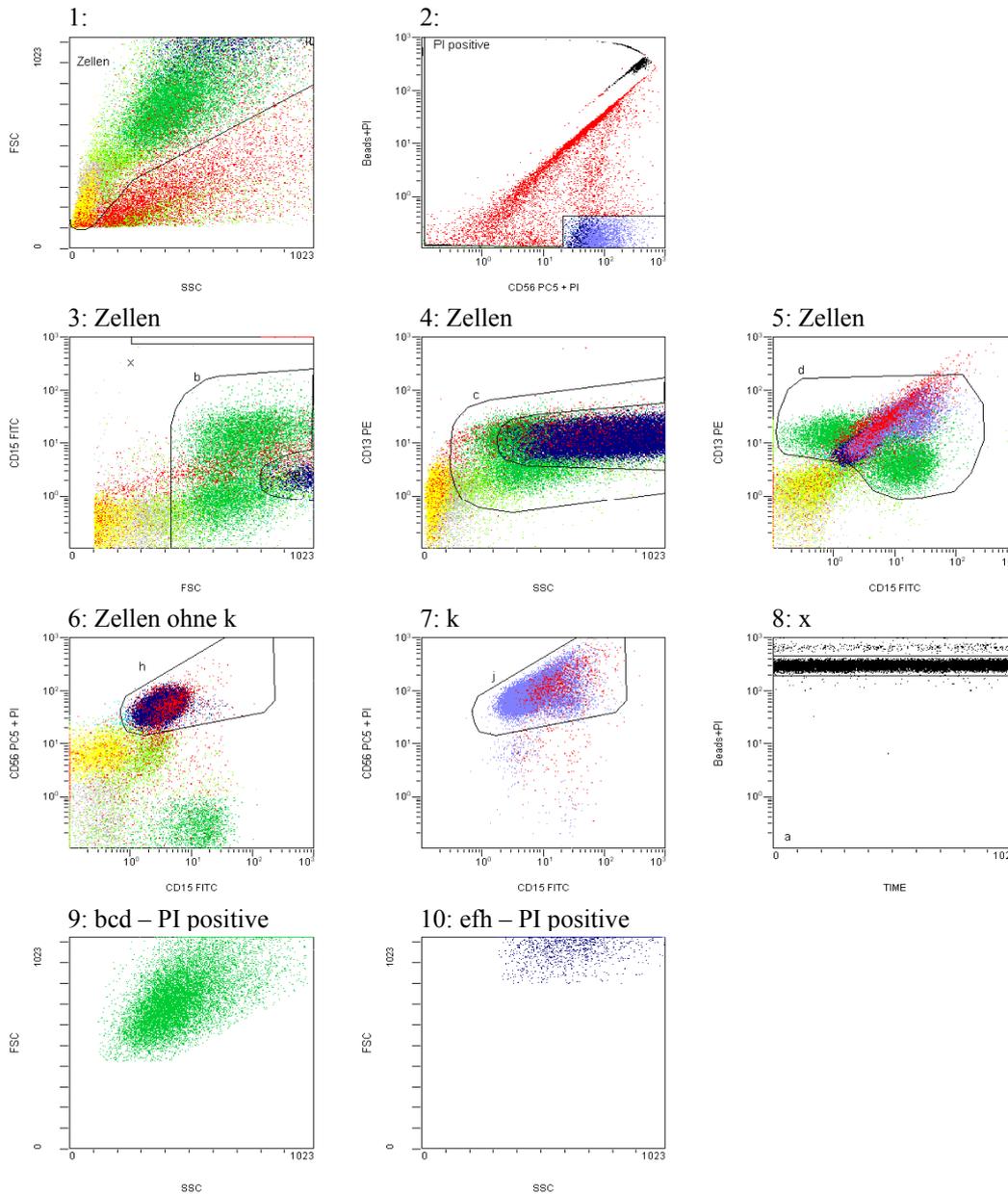


Abb. 24: Gatingstrategie der letzten Assayvariante

Dunkelgrün: PI negative Zielzellen, hellgrün: nur in einer Region (b, c oder d) als Zielzellen akzeptierte Events, blau: PI negative Effektoren, rot: PI positive Events, schwarz: Beads, gelb: sonstige Zellen (z.B. Lymphozyten).

Histogramm (H) 1: Wie bisher wurden die ungegateden Events nach Größe und Komplexität (FSC und SSC) aufgetragen und eine Region für Zellen definiert. Die folgenden Histogramme sind auf diese Region gegated.

H 2: Auftragung der dritten gegen die vierte Fluoreszenz, hier wurden die PI positiven Events anhand ihres charakteristischen unkompenzierten Signals eingegated (Abb. 18). PC5-positive Effektorzell-Events wurden nicht in das Gate einbezogen (blau).

H 3 – 6: Auftragung der Zellen nach Fluoreszenzen sowie Größe und Komplexität. In H 3 – 5 wurden die Regionen b – d für Zielzellen definiert, in H 3, 4 und 6 die Regionen e, f und h für die Effektoren.

H 6 und H 7: Das Histogramm für die Definition der CD56 positiven Effektoren wurde für diese Darstellung in zwei Histogramme aufgespalten, die die Events in der Region “Zellen” abzüglich Region k (H 1, rechte obere Ecke) bzw. nur in Region k zeigen. Während die in H 6, Region h dargestellten Effektoren jenseits der Autofluoreszenz kein CD15-Signal zeigen – das Signal der Blasten (dunkelgrün) ist deutlich stärker – zeigt die in der deckungsgleichen Region j (H 7) dargestellte Population zusätzlich zum CD56-Signal teilweise auch ein CD15 Signal. Zusammen mit den extrem hohen FSC- und SSC- Eigenschaften wird diese Population dadurch als Effektorzell-Zielzellkonjugate identifiziert.

H 9 und 10: Darstellung der Ziel- bzw. Effektorzellen (Schnittmengen aus Regionen b – d bzw. e, f und h exklusive der PI positiven Events), ihre Konzentration wurde relativ zu den Beads (H 8) errechnet.

3.3.3.4 Ergebnisse der Auswertungen

Die Darstellung der Beads im Zeitverlauf zeigte meist einen gleichmäßigen Probenfluss im Verlauf der Messungen. Durch die zusätzliche Antikörpermarkierung wurde die Eingrenzung der Ziel- und Effektorpopulationen noch einmal verbessert; beide Populationen waren klar darstellbar, wobei in der Regel drei mAb eingesetzt wurden. Die flexible Wahl der eingesetzten mAb und der Fluoreszenzen ermöglichte erweiterte Messungen in einem einzigen Probenansatz. Dadurch wurde Probenmaterial, mAb und Arbeitszeit eingespart bei gleichzeitig verbesserter Aussage. So konnten T-Zellen, die mit einem Suizidgen und einem Gen für ein trunkiertes CD34-Molekül kotransduziert worden waren, anteilig an der Gesamtpopulation dargestellt und ihre Alloreaktivität ausgewertet werden bei gleichzeitiger Differenzierung der CD4 und der CD8 positiven Population und guter Beurteilbarkeit der Zielzellen. Bei Auswertung der Analysen durch verschiedene Bearbeiter ergaben sich Unterschiede in der berechneten Zytotoxizität von 5-10%.

3.4 Vergleich, Validierung und Optimierung der Assayvarianten

3.4.1 Vergleichende Assayauswertungen nach Verlusten lebender Zellen und Zunahme Propidiumjodid positiver Events

Die beiden grundsätzlichen Varianten der Auswertungen – PI positive Zellen und Konzentrationsänderung PI negativer Zellen – wurden miteinander verglichen, indem die Analysen aus sieben Assays mit beiden Methoden ausgewertet wurden. Der Vergleich ergab eine erhebliche Diskrepanz bis hin zu gegenteiligen Aussagen über das Vorliegen einer spezifischen zytotoxischen Aktivität. Übereinstimmung fand sich in Experimenten, in denen die Blasten offenbar nicht durch die Effektoren angegriffen wurden. In fast allen anderen Fällen lag der Prozentsatz PI positiver Zielzellen an den Zielzellen deutlich unterhalb des Verlustes an PI negativen Zielzellen (Abb. 25).

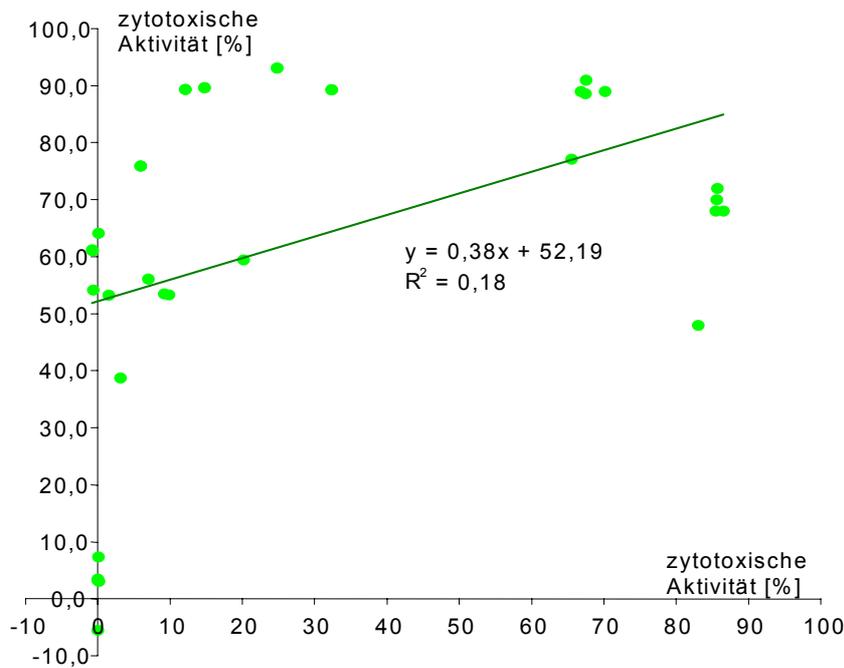


Abb. 25: Vergleich der Auswertung über PI positive und PI negative Events

Die Analysen aus insgesamt sieben Assays wurden sowohl hinsichtlich des Anteils PI positiver, toter Zielzellen an den Gesamtzielzellen als auch hinsichtlich des Verlustes an vitalen Zielzellen ausgewertet. Es zeigen sich klare Unterschiede bis hin zu einer gegenteiligen Aussage über das Vorliegen einer zytotoxischen Aktivität, die beiden Auswertungsarten korrelieren nur schwach ($r = 0,42$). In der Mehrzahl der Fälle wurden weniger PI positive Zielzellen gemessen, als vitale Zielzellen abgenommen hatten. Dies untermauert die Hypothese, dass tote Zellen vollständig zerfallen und sich dadurch der Messung mit PI entziehen. In fünf Analysen wurde eine größere Zunahme an toten als Abnahme an lebenden Zielzellen gemessen. Hier war es nicht möglich, PI positive Zellen von PI positivem subzellulären Debris sauber zu unterscheiden, so dass vermutlich ein Teil des Debris als Zellen gezählt wurde. Da eine Zelle in mehrere Fragmente zerfallen kann, erklärt dies die überproportionale Zunahme toter „Zellen“.

Die Ergebnisse der Auswertungen wurden mit dem Wilcoxon-Rangtest für paarweise verbundene Stichproben ($n = 35$) untersucht. Der Unterschied zwischen beiden Auswertemethoden war statistisch signifikant mit $P \leq 0,001$.

3.4.2 Validierung der neu entwickelten Assays anhand des Europium-Release-Assays

Der starke Unterschied zwischen den beiden Auswertevarianten erforderte eine Validierung mit einem anerkannten Assay. Hierzu wurde der Europium-Assay herangezogen. Parallel erfolgte der durchflusszytometrische Versuch. Es wurde NK-92 gegen K562 in Dreifachansätzen getestet. Die Auswertung des durchflusszytometrischen Versuchs mit beiden Varianten zeigte die gleichen Differenzen wie die bisherigen Assays mit deutlich niedrigeren Ergebnissen für die zytotoxische Aktivität, wenn der Anteil toter Zielzellen herangezogen wurde, als über den Verlust lebender Zielzellen errechnet. Die Auswertung über die PI negativen Zielzellen führte für die hohen E:T-Ratien zu übereinstimmenden

Ergebnissen mit dem Europium-Assay, wick allerdings im 1:1-Ansatz von diesem ab, während die Auswertung über die PI positiven Zielzellen lediglich im 1:1-Ansatz das Ergebnis des Europium-Assays zeigte (Abb. 26).

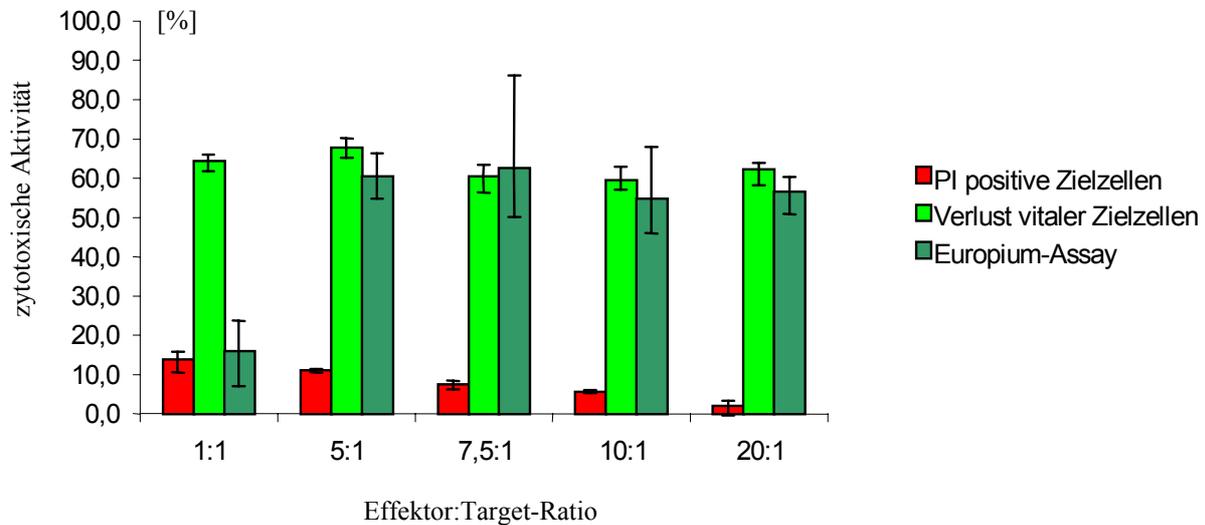


Abb. 26: Validierung der durchflusszytometrischen Assays mittels Europium-Release-Assay

Parallelversuch des Europium-Release- und des durchflusszytometrischen Assays. Der durchflusszytometrische Versuch wurde ausgewertet sowohl nach Anteil PI Positiver an den Zielzellen als auch nach Abnahme lebender Zielzellen. Die Auswertung der PI positiven Zielzellen liefert eine signifikant geringere Aktivität ($P \leq 0,01$) als der Europium-Assay. Dagegen ergibt die Auswertung der Konzentrationsabnahme der vitalen Zielzellen gleiche Werte; der 1:1-Wert ist durch die Bildung von Effektor-Zielzell-Konjugaten verzerrt, die durch die Fluoreszenzmarkierung der Effektoren noch vitale Zielzellen aus dem Zielzellengate „heraushebt“. Bemerkenswert sind die deutlich geringeren Messschwankungen des durchflusszytometrischen Assays (Abweichungsbalken, jeweils Tripelansätze.)

Die statistische Analyse der Daten mit dem Wilcoxon-Rangtest ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Ergebnissen des Europium-Assays und der Auswertung über den Verlust PI negativer Zellen mit der Einschränkung, dass der Unterschied im Wilcoxon-Test nur dann nicht mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 10% signifikant war, wenn die Messwerte für das 1:1-Verhältnis aus der Analyse herausgenommen wurden. Dies wurde für zulässig erachtet, da aufgrund der Markierung mit mAb gegen die Effektorzellen insbesondere im 1:1-Ansatz der Teil der Zielzellen aus den Zielzellregionen der Fluoreszenzen herausgehoben wurde, der in Konjugaten an Effektorzellen gebunden war (s.o. und Abb. 21 sowie Abb. 27). Dieser Teil ging damit der Auswertung der Zielzellen hinsichtlich PI verloren; diese Ansätze konnten daher nicht sinnvoll für den Vergleich herangezogen werden.

Der Vergleich der Auswertung der PI positiven Zielzellen mit den Ergebnissen des Europium-Assays zeigte dagegen einen signifikanten Unterschied ($P \leq 0,01$) mit deutlich geringeren gemessenen Aktivitäten im durchflusszytometrischen Assay.

3.4.3 Kinetik der Zellkonzentrationen von Effektoren und Zielzellen im Verlauf von vier Stunden

Um Aufschluss über den Zeitraum zu erhalten, in dem die Interaktion zwischen Ziel- und Effektorzellen abläuft und so die minimale Kokulturdauer für die Beurteilung der zytotoxischen Aktivität festzulegen, wurde eine Kinetik über 4 Stunden erstellt. Sieben gleiche Ansätze aus Spender-NK-Zellen und K562 wurden im Verhältnis 5:1 pipettiert und nach Anzentrifugation im Brutschrank kultiviert, ein Ansatz wurde sofort mit Antikörpern inkubiert. Zusätzlich wurden Kontrollen für die NK-Zellen und für K562 angesetzt. Die Ansätze wurden zu den in Abb. 27 gezeigten Zeitpunkten gemessen, die NK-Zellkontrolle zum Zeitpunkt 0 Minuten. Die Konzentrationen der Kokultur zum Zeitpunkt 0 wurden mit Hilfe der initialen Kontrollen errechnet.

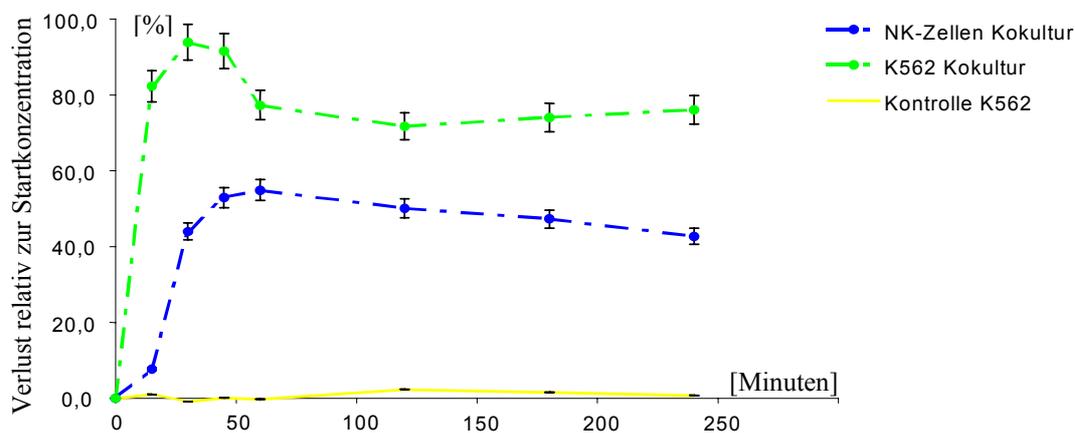


Abb. 27: Zeitverlauf der Kokultur von NK-Zellen und K562

K562 wurden mit NK-Zellen kokultiviert. Im Verlauf von vier Stunden wurden Proben der Kokultur zunächst viertelstündlich, dann stündlich gemessen und die Konzentrationsverläufe relativ zur Ausgangskonzentration berechnet, die Proben wurden dazu mit mAb gegen die NK-Zellen markiert. Bereits innerhalb der ersten 15 Minuten stellt sich eine ausgeprägte Reaktion zwischen Ziel- und Effektorzellen dar; der anfangs größere, im Verlauf zurückgehende „Verlust“ an Zielzellen erklärt sich aus der Bildung von Ziel-Effektorzell-Konjugaten, die die Fluoreszenz der Effektoren aufweisen und deshalb nicht als Zielzellen gezählt wurden. Auch der anfängliche Verlust an Effektoren läßt sich durch die Konjugatbildung erklären; es sind mehr als eine Effektorzelle pro Zielzelle an diesen beteiligt. Mit zunehmender Kokulturdauer lösen sich die Konjugate, die aus diesen freigesetzten überlebenden Zellen erscheinen wieder als solche in den Regionen und werden daher gezählt. Die Zielzellkontrolle bleibt im gesamten Zeitraum unverändert. Eine Effektorzellkontrolle wurde zu Beginn und am Ende der Kokultur gemessen, sie zeigte keine Veränderung (nicht dargestellt).

Dem Ergebnis zufolge zeigen die Zellen bereits 15 Minuten nach Beginn der Kokultur eine ausgeprägte Reaktion bei unveränderter Zielzellkontrolle über den gesamten Zeitraum. Nach 60 Minuten stabilisieren sich die Zielzellen der Kokultur auf einem Konzentrationsniveau, während die Effektorzellen im beobachteten Zeitraum nach anfangs starken Verlusten jenseits von 60 Minuten bis zum Ende der Beobachtungsperiode kontinuierlich wieder leicht zuzunehmen scheinen.

3.4.4 Aussagekraft des Assays

Für das Ergebnis eines Assays ist die Pipettier- und Messgenauigkeit ausschlaggebend. Die Versuche zur Präzision der durchflusszytometrischen Konzentrationsbestimmung (3.2.4) zeigten einen VK dieser Messungen von ca. 5 % in Kokulturansätzen und einen VK der Berechnung der Startkonzentrationen anhand der Kontrollen von ebenfalls ca. 5 %.

In einem Modell wurden fiktive Dreifachansätze von Zellen einer mittleren Ausgangskonzentration von 300/ μ l angenommen. Die Konzentrationen von zwei dieser Ansätze wurden als $\bar{x} \pm s * 1,96$ und des dritten als \bar{x} gewählt, so dass unter der Voraussetzung einer Normalverteilung der Bereich von 95 % der Messergebnisse erfasst wurde. Die Abnahme der Konzentration in Schritten von 1 % des Ausgangswertes wurde mit dem einfachen, nichtparametrischen U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney auf Signifikanz bei einseitiger Fragestellung (Nullhypothese: kein Unterschied des Mittelwertes (MW) oder MW vor Kokultur > nach Kokultur, Alternativhypothese: MW nach Kokultur < vor Kokultur) untersucht. Unter diesen Voraussetzungen wäre eine Änderung ab 18 % der Ausgangskonzentration signifikant mit $P \leq 0,05$. Da Abweichungen des gemessenen vom wahren MW mit einer Standardabweichung von $s_{MW} = s * \sqrt{n}$ sowie Unterschiede zwischen den Bearbeitern der Analysen auftreten, kann aufgrund allein statistischer Annahmen, d.h. bei Außerachtlassen der Ergebnisse verschiedener Konzentrationen und der Konzentrationsänderungen sowohl der Ziel- als auch der Effektorzellen, von einer Signifikanz der ermittelten Konzentrationsänderung gegenüber der Ausgangspopulation ab ca. 25% ausgegangen werden.

3.4.5 Fehlerquellen

Hauptfehlerquelle war eine unzureichend sorgfältige Erstellung der Ansätze mit erhöhter Pipettiergenauigkeit und schlechter Durchmischung der Proben vor Erstellen der Ansätze. Auch fehlerhaft pipettierte Volumina führten zu falschen Ergebnissen, dies betraf in der Regel jedoch nur einen Ansatz, der aus der Wertung genommen werden konnte. In einem Assay wurde vergessen, die Kokulturen kurz anzuzentrifugieren, um eine Sedimentierung der Zellen zu erreichen. Dies resultierte in einer Zytotoxizität, die um 50% hinter dem erwarteten Ergebnis zurückblieb, bei Wiederholung des Assays trat die erwartete Zytotoxizität auf. Eine weitere Fehlerquelle stellten die Spontantoten bei kryopräservierten Leukämieblasten dar. Zum einen gab es Fälle, in denen in den Kontrollen höhere Verluste auftraten als in den Kokulturen. Als Erklärung wurde angenommen, dass durch die Effektoren produzierte

Zytokine sich in den Kokulturen positiv auf die Blasten auswirkten; das Problem wurde deutlich reduziert durch Zugabe von FCS zum Zellkulturmedium. Weiterhin traten in zwei Fällen Spontanote von >80% auf, in diesen Fällen war die Lagerungsphase nach Auftauen im Kühlschrank unterblieben, so dass DMSO nicht ausreichend aus den Zellen diffundiert war, um es auszuwaschen. Da hierdurch die Konzentrationen der überlebenden, potenziell für eine zytotoxische Aktivität empfindliche Zielzellen sehr gering wurde, waren die Ergebnisse der Assays nur mit Einschränkung beurteilbar. Eine Gerinnselbildung in den Proben verändert die Zellkonzentration in nicht vorhersehbarer Weise, daher musste auf eine Verklumpung auch geringen Ausmaßes geachtet werden.

In einem Fall wurde bei Markierung der Effektorzellen (T-Zellen) nicht genügend Rücksicht auf das immunologische Markerprofil der Zielzellen genommen. Bei diesen Blasten eines Patienten mit JMML war CD4 schwach exprimiert, so dass die Blasten durch gegen die T-Zellen eingesetzten CD4-mAb ebenfalls markiert wurden. Dadurch schien ein Spontanverlust von >90% aufgetreten zu sein. Der Fehler wurde bei einer nachträglichen Auswertung erkannt und konnte aufgrund der insgesamt schwächeren CD4-Expression der Blasten im Vergleich zu den T-Helferzellen behoben werden. Denkbar ist in diesem Zusammenhang eine völlig falsche Wahl an mAb, dem wird durch die Vortestung aller einzusetzender mAb und die Markierung und Messung der Kontrollen vor Inkubation entgegengewirkt. Eine Verwechslung der Regionen von Ziel- und Effektorzellen in einem Histogramm führt zu einem falschen Gating, das fast alle Zellen ausblendet. Insgesamt muss dem Gating eine hohe Aufmerksamkeit geschenkt werden, um nicht falsche Kriterien anzulegen. Schwierig kann insbesondere die Beurteilung des FSC zur Unterscheidung von Zellen und subzellulären Events sein. Hier ist Stringenz in der Positionierung der Regionen zu fordern. Um auch kleine Events aufzuzeichnen, die noch durch Zellen verursacht werden, muss auf die korrekte Verstärkung des FSC und eine nicht zu hohe Schwelle der Datenaufzeichnung geachtet werden. Eine willkürliche Veränderung der Fluoreszenzverstärkung und -kompensation ohne Berücksichtigung deren unmittelbaren Zusammenhangs resultiert in einer unbrauchbaren Zytometereinstellung, die eine Beurteilung der Fluoreszenzen zunichte macht.

4. Diskussion

Zytotoxische Aktivität von T- und NK-Zellen ist ein multifaktorielles, komplexes Geschehen, das noch nicht in allen Einzelheiten bekannt ist und sich der Abschätzung aufgrund einfach messbarer Parameter entzieht. Bei der Entwicklung und Validierung zellulärer Therapieformen für Patienten mit malignen Erkrankungen spielt daher die unmittelbare Zytotoxizitätsmessung eine wichtige Rolle.

4.1 Zytotoxizitätsmessung in der Literatur

Die Schwierigkeit der Zytotoxizitätsmessung wird reflektiert durch die Vielzahl der in der Literatur beschriebenen Assays (Tabelle 7). Diese lassen sich in drei Kategorien einteilen. Eine Kategorie (1, s. 4.1.1) umfasst die Messung des Zelltodes der Zielzellen, eine zweite (2, s. 4.1.2) die des Überlebens von Zielzellen und eine dritte (3, s. 4.1.3) den direkten Nachweis der Effektorzellaktivität. Die Kategorien können weiter gegliedert werden in Assays, die Markersubstanzen nachweisen und quantifizieren (1, 2 & 3a) und solche, die die Zellen selbst darstellen (1, 2 & 3b). Die erste Kategorie mit ihren beiden Untergruppen umfasst den Großteil der verschiedenen Zytotoxizitätsassays.

Tabelle 7: Assays zellulärer Zytotoxizität in der Literatur

Kategorie	Zellunter- scheidung	Messmethode	gemessener Parameter	
1a	0	Fluorimetrie	PI	Sano 1995
1a	I	Beta-Counter	[3H]Prolin	Saal 1976
1a	I	Beta-Counter	[3H]Thymidin	Keilholz 1990
1a	I	Elisa	Beta-Galactosidase-Aktivität	Ohmori 1992
1a	I	Elispot	Beta-Galactosidase-Aktivität	Snyder 2003
1a	I	Fluorimetrie	Carboxyfluoresceindiacetat	Provinciali 1992
1a	I	Fluorimetrie	Europium-DTPA	Blomberg 1986
1a	I	Fluorimetrie	Europium-DTPA	Haque 1997
1a	I	Fluorimetrie	Hoechst 33342	Brenan 1988
1a	I	Fluorimetrie	KLUK	Li 1996
1a	I	Fluorimetrie	Luziferase-Aktivität	Schafer 1997
1a	I	Gamma-Kamera	¹¹¹ Indiumoxin	Wilttrout 1978
1a	I	Gamma-Kamera	⁵¹ Chrom	Brunner 1968
1a	IV	Elisa	DNA-Fragmentierung, LDH	Ito 1996
1a	IV	Fluorimetrie	Ethidiumbromid	Brawn 1975
1a	IV	Lumineszenz	AP-Aktivität	Kasatori 1994
1a	IV	Lumineszenz	Glyceraldehyd-3-PDH-Aktivität	Corey 1997
1a	IV	Photometrie	LDH-Aktivität	Juriscic 1999
1a	IV	Photometrie	LDH-Aktivität	Korzeniewski 1983

Kategorie	Zellunter- scheidung	Messmethode	gemessener Parameter	
1b	I	DZM	Calcein-AM, Ethidium-Homodimer 1	Papadopoulos 1994
1b	I	DZM	CD71-FITC-Affinität	Hoshino 1991
1b	I	DZM	DIOC18(3), PI	Kane 1996
1b	I	DZM	DIOC18(3), PI	Lehmann 1999
1b	I	DZM	DIOC18(3), PI	Mattis 1997
1b	I	DZM	Fluorochrom, FSC	Shi 1987
1b	I	DZM	MitoTracker Green FM, PI	Vizler 2002
1b	I	DZM	Octadecylamin-FITC, PI	Radosevic 1990
1b	I	DZM	PKH 1, PI	Slezak 1989
1b	I	DZM	PKH 26, PI, Annexin-V	Fischer 2002
1b	I	DZM	PKH 26, TO-PRO3-Jodid	Wilkinson 2001
1b	I	DZM	PKH 67, 7-AAD, Annexin-V	Malyguine 2002
1b	I	DZM	PKH 67, 7-AAD, Annexin-V	Derby 2001
1b	II	DZM	CFSE, 7-AAD	Lecoeur 2001
1b	II	DZM	DIO18(3), 7-AAD, mAb	Hoppner 2002
1b	II	DZM	mAb, Scatter, PI	Godoy-Ramirez 2000
1b	II	DZM	mAb, Annexin-V	Goldberg 1999
1b	II/III	DZM	Scatter	Zamai 1998
1b	III	DZM	Scatter	Baker 2001
1b	IV	DZM	EGFP, PI	Kantakamalakul 2003
1b	IV	DZM	FSC, SSC, PI	Zarcone 1986
1b	IV	DZM	PI	Jacobs 1983
1b	IV	DZM	Scatter, PI	Oumouna 2001
2a	I	Beta-Counter	51Chrom	Hillman 1993
2a	I	Fluorimetrie	BCECF	Wierda 1989
2a	IV	Beta-Counter	[3H]Leuzin-Inkorporation	Schechter 1976
2a	IV	Beta-Counter	[3H]Uridin RNA-Inkorporation	Smith 1979
2a	IV	Colorimetrie	MTT	Hussain 1993
2a	IV	Colorimetrie	MTT	Kumar 1996
2a	IV	Colorimetrie	MTT	Nouri 1995
2a	IV	Colorimetrie	Neutral red	Mullbacher 1984
2a	IV	Fluorimetrie	4-Methylumbelliferylheptanoat	Virag 1995
2a	IV	Fluorimetrie	alamarBlue	Gazzano-Santoro 1997
2a	IV	Fluorimetrie	alamarBlue	Nociari 1998
2a	IV	Photometrie	γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität	Murata 1997
2b	I	FMS	Hoechst 33342, Trypanblau	Duerst 1985
2b	I	DZM	Calcein-AM, 7-AAD	Topakas 2001
2b	III	DZM	PKH 26, PKH 2	Flieger 1995
2b	IV	Mikroskopie	Kolonie-Formierung	Fujita 1986
2b	IV	DZM	Scatter, PI	Stevenson 1986
2b	IV	DZM	Scatter, PI	Wang 2002
3a	V	Elisa	Serinproteasen-Aktivität	Grando 1988
3a	V	Elisa	Granzym B-Aktivität	McElhaney 1996
3b	?	DZM	Konjugatbildung	Perez 1985
3b	III	DZM	Konjugatbildung	Bonavida 1994

Kategorien: 1) Messung des Zelltodes, 2) Messung des Überlebens, 3) Messung zytotoxischer Mediatoren
 Untergruppen: a) Quantifizierung einer Markersubstanz, b) Messung der Zellen selbst
 Differenzierung zwischen Ziel- und Effektorzellen: I) Zielzellen markiert, II) Effektoren markiert, III) beide markiert, IV) Zielzelleigenschaft V) Effektoreigenschaft 0) keine Unterscheidung angegeben
 DZM: Durchflusszytometrie, FMS: Fluoreszenzmikroskopie

Übersichtsweise Wiedergabe der Literatur ohne Anspruch auf Vollständigkeit.

4.1.1 Kategorie 1: Messung des Zelltods

4.1.1.1 Nachweis einer Markersubstanz (Kategorie 1a)

Die Assays der Kategorie 1a messen als Korrelat des Zelltodes die Menge von Markersubstanzen, die aus dem Zytoplasma der toten Zielzellen in den Überstand freigesetzt wurde. Der Anteil an Markersubstanz, die in Kokulturen von Ziel- und Effektorzellen über die spontan freigesetzte Menge in den Kontrollen hinausgeht, wird als Anteil der maximal freisetzbaren Substanz (Maximallyse) ausgedrückt und als zytotoxische Aktivität der Effektorzellen definiert.

Wichtige Vertreter der Kategorie 1a sind die $^{51}\text{Chrom}$ -Release-Methode und ein Teil der Europium-Assays (z.B. *Brunner et al. 1968*, *Blomberg 1986*, Tabelle 7). Die Zielzellen werden vor Kokultur mit dem radioaktiven Chrom-Isotop bzw. mit Europium oder einem Chelator wie DPTA markiert und in Titerplatten mit den Effektorzellen ausgesät. Nach Kokultur und Zentrifugation wird im Überstand die Gamma- oder Beta-Strahlung des Chroms bzw. nach Bildung eines fluoreszierenden Europium-Chelats durch Zugabe der fehlenden Komponente die Fluoreszenzintensität gemessen. Alternative radioaktive oder fluorogene Tracer wie $^{111}\text{Indium}$, $[3\text{H}]\text{Prolin}$, $[3\text{H}]\text{Thymidin}$ oder KLUK zeichnen sich aus durch unterschiedlich effektive Markierung der Zielzellen, andere Halbwertszeiten oder andere Fluoreszenzintensität. Von Nachteil sind eine mögliche Beeinträchtigung der Zielzellen durch die Markierung, eine unzureichende Markierbarkeit mancher Zielzellen bzw. ein Markierungsverlust während der Assaydauer. Zudem erfordert die Markierung eine ausgedehnte Manipulation der Zielzellen mit mehreren Waschschritten und gegebenenfalls einer Membran-Elektroporation. Diese Manipulation kann potenziell Eigenschaften der Zielzellen so verändern, dass sich ihre Sensitivität für die Effektorzellaktivität ändert. Im Falle der radioaktiven Substanzen sind neben geeigneten Messgeräten ferner geeignete Räumlichkeiten, Entsorgungsmöglichkeiten und eine Umgangsgenehmigung erforderlich. Durch den Zerfall ist die Haltbarkeit der radioaktiven Substanzen beschränkt, was die Flexibilität der Durchführung dieser Assays einschränkt; auch ist die Assaydauer durch die Halbwertszeit limitiert.

Weitere Assays der Kategorie 1a messen die Freisetzung endogener Substanzen wie z.B. Laktatdehydrogenase oder alkalische Phosphatase bzw. deren Enzymreaktion in Form von colorimetrischen oder Lumineszenz-Assays (z.B. *Kasatori et al. 1994*, *Corey et al. 1997*,

Tabelle 7). Voraussetzung für diese Assays ist, dass die gesuchte Substanz spezifisch in den Ziel - aber nicht den Effektorzellen und anderen Zellen in ausreichender Konzentration oder Aktivität vorhanden ist bzw. aus letzteren nicht freigesetzt wird. Dies wird zum Teil erreicht durch Transduktion der Zielzellen mit β -Galaktosidase oder Luziferase. Diese Assays sind in ihrem Zielzellspektrum stark eingeschränkt, in der Mehrzahl beschränken sie sich auf eine Zelllinie wie K562. Vorteil dieser Methoden ist, dass die Markierungsschritte und damit die Manipulation unmittelbar zu Assaybeginn der Zielzellen entfällt.

Die Assays der Kategorie 1a zusammengefasst sind somit für homogene Zielzellpopulationen geeignet. Dann besteht ihr Vorteil darin, dass alle tote Zielzellen erfasst werden, sobald ihre Membranintegrität verloren geht, solange nur die Zielzellen die Markersubstanz enthalten oder freisetzen, die Markersubstanz nicht im Verlauf des Assays durch andere Zellen (lebende Ziel- oder auch Effektorzellen) wieder aufgenommen und so aus dem Überstand entfernt wird und dass die artifizielle Maximallanalyse ausreicht, tatsächlich eine vollständige Freisetzung der Markersubstanz als Bezugsgröße zur Berechnung der zytotoxischen Aktivität auszulösen.

4.1.1.2 Direkter Nachweis toter Zellen (Kategorie 1b)

In diese Kategorie fallen die Mehrzahl der durchflusszytometrischen Assays (z.B. *Papadopoulos et al. 1994*, Tabelle 7). Tote Zellen werden anhand ihrer Scattereigenschaften und/oder anhand der Aufnahme eines Totfarbstoffs identifiziert. Der Anteil toter Zellen mit den sonstigen Eigenschaften der Zielzellen an den Gesamtzielzellen abzüglich der Spontanoten der Zielzellkontrollen wird als zytotoxische Aktivität der Effektorzellen definiert. Als Totfarbstoffe dienen vor allem PI und 7-AAD, weiterhin wird zusätzlich Annexin-V verwendet. Annexin-V bindet als Apoptosefarbstoff an Phosphatidylserin, das auf die Membranaußenseite apoptotischer Zellen geswicht wird (*Fadok et al. 1992*, *Koopman et al. 1994*). Wird es kombiniert mit einem der anderen Totfarbstoffe, erlaubt es die Unterscheidung apoptotischer von nekrotischen Zellen und damit der beiden Formen der zellulären Zytotoxizität (*Bartkowiak et al. 1999*).

Diese Assays setzen voraus, dass tote Zellen tatsächlich noch als Zellen vorliegen, also nicht vollständig zerfallen und sich nicht in ihren Eigenschaften so verändern, dass sie nicht mehr als Zielzellen identifizierbar sind. Kommt in durchflusszytometrischen Assays kein Totfarbstoff zum Einsatz, muss die Abnahme des Volumens toter Zellen ausreichen, um sie anhand des Vorwärtsscatters von den lebenden klar zu unterscheiden; ihre Scattereigenschaften müssen sie aber dennoch ausreichend von Zelltrümmern und anderen subzellulären Partikeln abgrenzen, um nicht falsch positive Ergebnisse durch Zählung von solchen nicht-zellulären Events zu erhalten. Für diese Art der Assays kommen daher Zielzellen in Frage, die auch nach Absterben noch stabil sind und nicht sofort vollständig zerfallen. Am ehesten erfüllt werden diese Bedingungen durch frische, unmanipulierte Zellen und Zelllinien. Soll vor allem der Vorwärtsscat (Zellgröße) ausgewertet werden, sollten die Zielzellen ein großes Volumen aufweisen. Dies trifft für Suspensionszellen vor allem auf Zelllinien und AML-Blasten zu. Die mögliche Assaydauer ist durch den Zerfall der toten Zellen begrenzt, die dadurch der Messung entgehen.

4.1.2 Kategorie 2: Messung der überlebenden Zellen

4.1.2.1 Nachweis einer Markersubstanz (Kategorie 2a)

Diese Kategorie 2a umfasst Assays, die auf der Messung von Stoffwechselaktivität oder inkorporierten Substanzen beruhen (z.B. *Hillman et al. 1993*, *Hussain et al. 1993*, Tabelle 7). Die Messungen der Stoffwechselaktivität umfassen Modifikationen des in der Pharmakologie gebräuchlichen colorimetrischen MTT-Assays, die die Bildung eines Farbstoffs oder Fluorochroms nachweisen (z.B. *Hussain et al. 1993*, Tabelle 7). Wie bereits für die Assays der Kategorie 1a gesagt, sollte der Substratumsatz zielzellspezifisch erfolgen. Alternativ muss der Anteil des durch Effektoren umgesetzten Substrats abgezogen werden. Dies setzt ausreichend stoffwechselaktive, am ehesten frische Zielzellen und gegebenenfalls genau bekannte, durch die Kokultur unveränderte Effektorenkonzentrationen voraus.

Eine Substanzinkorporation kann vor oder nach Kokultur erfolgen. Für eine Markierung vor Kokultur wird ⁵¹Chrom eingesetzt (*Hillman 1993*). Dieses wird nach Kokultur nicht im Zentrifugationsüberstand, sondern in der Zellfraktion nachgewiesen. Die Methode erfordert wie die Assays der Kategorie 1a eine ausgedehnte Manipulation der Zielzellen zur Markierung. Sie setzt voraus, dass die Konzentration der Markersubstanz in den Zielzellen relativ zu den Kontrollen unverändert bleibt. Sie darf daher nicht nach Freisetzung aus toten

durch lebende Zielzellen wieder aufgenommen werden. Andererseits müssen Zellen, die noch Aktivität enthalten, tatsächlich vital sein, d.h. tote Zellen müssen vollständig zerfallen. Um nur die Aktivität des in Zellen enthaltenen $^{51}\text{Chroms}$ zu messen, müssen die Zellen nach Kultur gewaschen werden. Dies führt zu Zellverlusten, die nicht kontrollierbar sind und das Ergebnis verfälschen können. Die Verwendung des $^{51}\text{Chroms}$ beinhaltet die oben aufgeführten Voraussetzungen für den Umgang mit Radioaktivität.

Zur Inkorporation nach Kokultur wurden radioaktiv markierte Aminosäuren oder Nukleosidanaloga eingesetzt (*Schechter et al. 1976, Smith et al. 1979*). Auch hier müssen die Zellen vor Messung gewaschen werden, um die im Kulturüberstand enthaltene Aktivität zu entfernen. Eine Inkorporation erfordert neben dem Umgang mit radioaktiven Substanzen Zielzellen, die ausreichend stoffwechselaktiv sind, d.h. auch hier sind am besten frische Zellen und insbesondere Zelllinien einsetzbar. Effektorzellen dürfen die Substanz nicht inkorporieren, oder die Aufnahme muss quantifizierbar und rechnerisch ausgleichbar sein.

4.1.2.2 Direkter Nachweis lebender Zellen (Kategorie 2b)

Die direkte Quantifizierung überlebender Zielzellen erfolgt durchflusszytometrisch oder mikroskopisch (z.B. *Topakas et al. 2001, Duerst et al. 1985*, Tabelle 7). Sie erfordert eine Referenzgröße zum Vergleich der Zellzahlen untereinander. Diese Größe kann das Messvolumen sein oder ein bekannter interner Standard. Die meisten Durchflusszytometer sind nicht für volumetrische Analysen ausgelegt. Als Korrelat des (unbekannten) Messvolumens wurde in einem Assay die Messzeit bei festgelegtem Probenfluss eingesetzt (*Wang et al. 2002*). Der Vorteil bei dieser Vorgehensweise ist, dass die Probe mehrmals zu unterschiedlichen Zeitpunkten vermessen werden kann und keine zusätzlichen, fehlerbehafteten Pipettierschritte anfallen. Nachteilig wirken sich Unregelmäßigkeiten im Probenfluss aus, die aufgrund Verunreinigungen des Probenwegs und Schwankungen des Vakuumdrucks bzw. Umgebungsdrucks auftreten, so dass in gleicher Zeiteinheit unterschiedliche Probenvolumina prozessiert werden. Die Notwendigkeit einer volumetrischen Zellzählung oder einer fixen Messzeit kann durch einen internen Standard umgangen werden (*Flieger et al. 1995, Stevenson et al. 1986*). In einem Assay wurden fixierte CLL-Blasten als solcher eingesetzt. Diese sind in ihren Scattereigenschaften Lymphozyten sehr ähnlich und müssen daher gefärbt werden, um sie von diesen und von Debris sicher zu unterscheiden. Alternativ werden fertige Standards mit breiten Fluoreszenzspektren und von Zellen stark verschiedenen Scattereigenschaften kommerziell

angeboten. Diese sind gebrauchsfertig und werden in der *Single-Platform*-Stammzellmessung (gleichzeitige durchflusszytometrische Messung von Zellkonzentrationen und –anteilen in der Probe) verwendet. Bei Einsatz interner Standards wirken sich Schwankungen der anteiligen Volumina und Konzentrationen von Probe und Standard nachteilig aus (*Law et al. 1999*) und schränken die Aussagefähigkeit der Messungen ein, sie sind in erster Linie von der Sorgfalt der Probenerstellung und dem verwendeten Zellmaterial abhängig. Tote Zellen müssen sich von vitalen in dem gemessenen Parameter (Scatter, Aufnahme eines Totfarbstoffs) ausreichend unterscheiden, um sie von der Zählung ausschließen zu können. Im Gegensatz zur direkten Zählung der toten Zellen werden aber keine weiteren Anforderungen an tote Zellen hinsichtlich ihrer Stabilität gestellt. Die durchflusszytometrische Zellzählung ist von der Stoffwechselaktivität der Zielzellen unabhängig.

In frühen Assays wurde mikroskopisch die Inhibition der Koloniebildung der Zielzellen durch zytotoxische Zellen als Korrelat der Aktivität nachgewiesen (*Duerst et al. 1985*). Für den Nachweis sind primär vermehrungsfähige Zielzellen vonnöten; diese Methode ist zudem wenig zur Quantifizierung der Aktivität geeignet.

4.1.3 Kategorie 3: Messung aktiver Mediatoren der zellulären Zytotoxizität

4.1.3.1 Nachweis einer Markersubstanz (Kategorie 3a)

Der kleinste Teil der in der Literatur beschriebenen Assays nutzt die Freisetzung von Mediatoren aus den Effektorzellen (*McElhaney et al. 1996, Grando et al. 1988*, Tabelle 7). Gemessen wird der Substratumsatz durch Serinesterasen oder, spezieller, durch Granzym B. Diese Assays erfassen die granulagebundene Komponente zellulärer Zytotoxizität, die Apoptoseinduktion über Fas-Fas-Ligand-Interaktion oder TNF alpha entgeht der Messung.

4.1.3.2 Direkter Nachweis der Zellen (Kategorie 3b)

Hierunter fallen Assays, die eine Konjugatbildung zwischen Ziel- und Effektorzellen nachweisen (z.B. *Bonavida et al. 1994, Perez et al. 1985*, Tabelle 7). Die Adhäsion an die Zielzellen ist ein wichtiger Schritt im Ablauf einer zytotoxischen Interaktion, allerdings wurde gezeigt, dass Konjugatbildung und zytotoxische Aktivität nicht miteinander korrelieren (*Perez et al. 1985*). Dieser Nachweis einer Konjugatbildung erfasst daher sehr eingeschränkt eine zytotoxische Aktivität.

4.1.4 Zur Zytotoxizitätsmessung eingesetzte Messverfahren

Unabhängig von der Kategorie des Assays werden eine Reihe verschiedener Messmethoden genutzt. Zu diesen zählen die Messung radioaktiven Zerfalls, die Fluorimetrie, die Durchflusszytometrie, Elisa und Elispot, Colorimetrie sowie die Mikroskopie (Tabelle 7). Grundsätzlich sind „blinde“ Methoden, die eine Substanz als Surrogat der Zelllyse oder des Überlebens messen, anfällig für Verunreinigungen der eigentlichen Zielzellen durch andere Zellen; diese können nicht unterschieden werden. Die gemessene Lyse kann in diesen Fällen daher nicht sicher der eigentlichen Zielzellpopulation wie z.B. Leukämieblasten zugeordnet werden. Die Maximallyse als Referenzgröße zur Berechnung der Aktivität liefert zudem einen falsche hohen Wert, liegt eine deutliche Verunreinigung der Zielzellen durch andere Zellen vor. Gefordert für diese Assays werden daher Reinheiten der Zielzellpopulation von $> 80\%$, optimaler $> 90\%$. Diese Bedingung ist durch Patientenproben in vielen Fällen nicht erfüllt, häufig liegen auch nach Dichtegradientenzentrifugation zusätzlich neben Blasten andere mononukleäre Zellen von $> 40\%$ in der Probe vor. Aufgrund der Messungenauigkeit sind diese Methoden zudem nicht verwendbar bei hohen Spontanverlusten, wie sie bei kryopräserviertem, vorgeschädigten Material auftreten. In diesen Fällen ist der Unterschied in den Ansätzen mit spezifischer Lyse zu den Kontrollansätzen zu gering, um signifikant auszufallen. Das Gesamtergebnis wird schon bei mittleren Spontanraten ab 30% stark verzerrt.

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, Zellen und ihre Eigenschaften durch geeignete, gegebenenfalls an spezifisch bindende monoklonale Antikörper gekoppelte Fluorochrome zu markieren und voneinander zu unterscheiden. Sie ist daher eine Messmethode für komplex zusammengesetzte Proben, zu denen auch Proben aus Patientenblut und Knochenmark gezählt werden können.

4.1.5 Durchflusszytometrische Unterscheidung zwischen Ziel- und Effektorzellen in der Literatur

Wie bereits erwähnt, ist allen zellulären Zytotoxizitätsassays gemein, dass der als Korrelat der Zytotoxizität gemessene Parameter sicher der „richtigen“ Zellpopulation zuzuordnen sein muss. In den meisten Fällen bedeutet das, dass die gemessene Substanz den Zielzellen entstammen oder die gemessene Eigenschaft (Substratumsatz, Aufnahme des Totfarbstoffs

oder eines Markers, Koloniebildung, Konzentrationsänderung) eine Eigenschaft der Zielzellen sein muss. Für die durchflusszytometrischen Messung müssen sich die Zielzellen anhand von Fluoreszenz und Scattereigenschaften klar von den Effektorzellen und eventuell anderen Zellen unterscheiden. Dies wird auf verschiedene Weise versucht. Eine Reihe von Assays setzt Membranfarbstoffe ein, wahlweise werden Ziel- oder Effektorzellen oder beide gefärbt (z.B. *Fischer et al. 2002, Derby et al. 2001*). Diese Farbstoffe sind hydrophobe Substanzen, die sich in die Lipiddoppelschicht der Zellmembranen einlagern. Sie binden nicht mit hoher Affinität an bestimmte Strukturen und können daher bei Zell-Zellkontakten aufgrund der Brown-Molekularbewegung zwischen den Zellen ausgetauscht werden. Da diese engen Kontakte einen wichtigen Bestandteil zellulärer Zytotoxizität bilden, wird die Trennung zwischen Ziel- und Effektorzellen mit zunehmender Kokulturdauer schlechter. Die verschiedenen Farbstoffe zeigen hierbei eine unterschiedliche Stabilität der Zellmarkierung, zum Teil ist der Austausch nur gering.

Weiterhin unterscheiden Membranfarbstoffe wie auch intrazelluläre Farbstoffe (z.B. *Mattis et al. 1997*) nicht zwischen mehreren Zellpopulationen, die eventuell in der zu markierenden Probe vorliegen. Insbesondere Patientenmaterial enthält neben den malignen Zellen variable Anteile an Lymphozyten, Monozyten und gegebenenfalls auch Granulozyten sowie – bei Knochenmarksproben – deren Vorläufer; diese werden durch den Membranfarbstoff in der gleichen Weise gefärbt wie Blasten als eigentliche Zielzellen und können das Ergebnis der Zytotoxizitätsmessung so verzerren, wenn sie eine von den eigentlichen Zielzellen verschiedene Sensitivität für die Effektorzellaktivität aufweisen. Der Färbevorgang selbst ist aufwändig und erfordert mehrere Waschschrte mit ausgedehnten Zellverlusten (ca. 10% pro Waschschrte). Er ist anfällig für störende Einflüsse wie z.B. Serumproteine, die den Farbstoff abfangen. Membranfarbstoffe eignen sich am ehesten dann, wenn reine Zielzellpopulationen (Zelllinien) in ausreichender Zahl vorliegen, die unter bekannten Bedingungen kultiviert werden, so dass die Markierung optimiert werden kann.

Eine weitere Möglichkeit der Unterscheidung zwischen Ziel- und Effektorzellen besteht darin, unterschiedliche Scattereigenschaften und Autofluoreszenzen auszuwerten (z.B. *Zarcone et al. 1986, Oumouna et al. 2001*). Zellen, die über längere Zeit kultiviert werden, nehmen an Größe sowie Komplexität zu und zeigen verstärkte Autofluoreszenz. Dadurch können einerseits Zielzelllinien von unmanipulierten primären lymphozytären Effektoren, andererseits, weniger deutlich, expandierte und aktivierte NK- oder T-Zellen und entsprechende Zelllinien von ALL-Blasten unterschieden werden, wohingegen AML-Blasten

aufgrund ihrer Größe und gegebenenfalls Granularität insbesondere den expandierten, primären Lymphozyten ähnlich sind. Diese Methode eignet sich daher vor allem für den Einsatz primärer, unmanipulierter Effektoren gegen kultivierte Zielzellen oder – mit Einschränkungen – umgekehrt.

Als dritte Möglichkeit werden monoklonale Fluoreszenz konjugierte Antikörper zur Zellmarkierung eingesetzt (z.B. *Godoy-Ramirez et al. 2000*, *Goldberg et al. 1999*). Eine Antikörpermarkierung ist zur Analyse von Zellpopulationen wie zum Beispiel Lymphozytensubpopulationen weit verbreitet (*Reimann et al. 2000*). Grundsätzlich ermöglicht sie eine selektive Darstellung von Epitopen und bei geeigneter Antikörperwahl die Unterscheidung von Zellpopulationen. Die Markierung mit mAb, wahlweise der Ziel-, der Effektorzellen oder beider, erfolgt schnell und erfordert keine weitere Zellmanipulation; sie ist für unterschiedlichste Zellen geeignet. Kontaminierende Nicht-Zielzellen können potenziell erkannt und aus der Beurteilung ausgeschlossen werden. Daher erscheint diese Markierungsmethode für heterogenes Zellmaterial wie Patientenproben geeignet. Die Kokultur der Zellen kann zudem in nativem Zustand erfolgen, wodurch die Zellmanipulation mit potenziellen Einflüssen auf die zytotoxische Interaktion auf ein Minimum reduziert wird. Allerdings können mAb potenziell eine intrinsische Aktivität entfalten. So kann ein mAb, der gegen CD3 auf T-Zellen gerichtet ist, eine aktivierende Wirkung auf die T-Zelle über diesen Bestandteil des T-Zellrezeptors entfalten, die innerhalb der Dauer der Antikörperinkubation von mindestens 10 – 15 Minuten das Ergebnis eines Assays möglicherweise verzerrt.

4.2 Bisherige Zytotoxizitätsmessung

In der Klinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin III waren sowohl der Europium-Release-Assay als auch ein durchflusszytometrischer Assay in Gebrauch. Der Europium-Assay wies die Freisetzung von Europium aus den toten Zielzellen nach, die durch Elektroporation vor Kokultur mit diesem markiert worden waren. Der durchflusszytometrische Assay basierte auf der Membranfärbung der Zielzellen vor Inkubation mit PKH 67 und dem prozentualen Nachweis der toten Zielzellen nach Inkubation über Propidiumjodidfärbung. Beide Assays erforderten hohen Arbeits- und Zeitaufwand und lieferten unbefriedigende Ergebnisse. Diese waren eng verknüpft mit einer unzureichenden Markierung der Leukämieblasten und dem Verlust an Fluoreszenz der Zielzellpopulation nach Inkubation, einer Beimischung von gesunden Lymphozyten zu den Blasten als eigentliche

Zielzellen in Patientenproben und einer Maximallyse im Europium-Assay, die deutlich unter der Freisetzung der Kokulturen lag, also die Kriterien der Maximallyse nicht erfüllte. Damit wiesen beide Assays die unter 4.1.1.1 und 4.1.1.2 beschriebenen Nachteile ihrer jeweiligen Kategorie auf, die ihre Verwendung für die Messung der spezifischen Aktivität von Effektorzellen gegen kryopräservierte heterogene Patientenproben stark einschränkten.

4.3 Entwicklung des neuen Assays

4.3.1 Wahl der Methode

Da Patientenproben mit variierendem Anteil maligner Zellen als Zielzellproben eingesetzt werden sollten, wurde die Durchflusszytometrie als Methode beibehalten, um durch geeignete Markierung mit monoklonalen Antikörpern und Farbstoffen eine Differenzierung von Zellpopulationen zu erreichen.

Von den publizierten Zytotoxizitätsassays, die mAb zur Zellmarkierung einsetzen, verwendet einer CD45, um NK-Zellen von K562 zu unterscheiden (*Godoy-Ramirez et al. 2000*). Dies ist eingeschränkt auf Patientenproben anwendbar, wenn Blasten CD45 nur gering exprimieren, führt aber nicht zu einer Unterscheidung der Effektorzellen von übrigen Zellen. Ein weiterer Assay nutzt die unterschiedliche Affinität lebender und toter K562 für CD71 zur Messung des Anteils der Toten; die Effektoren bleiben unmarkiert (*Hoshino. et al. 1991*). Zwei weitere Assays setzen PE konjugierte mAb ein. In einem werden die Effektorzellen markiert (*Goldberg et al. 1999*), im anderen wird fakultativ ein mAb gegen Zielzellen eingesetzt (*Hoppner et al. 2002*). Diese Assays schöpfen nicht das Potenzial der Markierung mit mAb aus. Der in dieser Arbeit entwickelte Assay wurde dahingehend optimiert, vor allem die malignen Zellen als Zielzellen überlagerungsfrei darzustellen, um auch geringe Restpopulationen nach erfolgter Zellzerstörung nachweisen und quantifizieren zu können und sie gegebenenfalls gegen ebenfalls in den Patientenproben enthaltenen Lymphozyten und andere Zellen abzugrenzen, die möglicherweise eine andere Sensitivität für die Effektorzellen aufweisen. Hierbei zeigten sich Kombinationen aus zwei Antikörpern einer einfachen Markierung als überlegen.

4.3.2 Messung der PI positiven Zielzellen zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität: Verlust toter Zellen aus der Gesamtrechnung

Die erste getestete Variante gehörte der Kategorie 1b an, maß also in Anlehnung an die Mehrzahl der durchflusszytometrischen Assays den Anteil toter Zellen an der jeweiligen Population. Allerdings traten bei Einsatz kryopräservierter Zielzellen Diskrepanzen zwischen erwarteten und erzielten Ergebnisse auf. Sorgfältige Auswertungen aller dargestellten Populationen führten zu der Hypothese, dass tote Zielzellen durch vollständigen Zerfall der Messung entgehen. Ein Verlust toter Zellen ist in der Literatur beschrieben worden, allerdings im Zusammenhang mit Phagozytose durch durch Monozyten (*Munn et al. 1989*).

Da zudem die Eingrenzung der Populationen sehr viel besser gelang, wenn nur die lebenden Zellen betrachtet wurden, wurde die gegensätzliche Herangehensweise gewählt, eine Auswertung des Verlusts an lebenden Zellen.

4.3.3 Einführung eines internen Standards zur Quantifizierung des Zellüberlebens: Umwandlung in einen Assay der Kategorie 2b

Die Quantifizierung der Verlustes lebender Zellen erfordert den Vergleich der Anzahl überlebender Zellen in den Kokulturen mit denen der Kontrollen, es war also eine Konzentrationsmessung notwendig. Da das verwendete Durchflusszytometer keine genaue Volumenmessung erlaubte, wurde ein interner Standard benötigt. Die Effektorzellen schieden als solcher aus, da auch sie Veränderungen nach Kokultur aufwiesen, die eine Konzentrationsänderung denkbar erscheinen ließen. Daher wurden standardisierte Zählbeads als interner Standard gewählt. Prinzipiell ist auch eine Konzentrationsmessung über ein hämatologisches Zählgerät denkbar; allerdings lagen die Konzentrationen der Zielzellen unterhalb des linearen Messbereichs solcher Zählgeräte und umfassten Probenmaterial, für welches diese nicht ausgelegt sind. Weiterhin wird die Verwendung eines internen Standards (*Single-Platform-Messung*) dem ergänzenden Einsatz eines hämatologischen Zählgeräts (*Dual-Platform-Messung*) als überlegen angesehen (*Reimann et al. 2000*).

Mit der Auswertung der überlebenden Zellen ließ sich zeigen, dass die Zunahme der PI positiven, toten Zellen wie vermutet nicht mit der Abnahme an lebenden Zellen korrelierte; es gingen Zellen durch Zerfall vollständig verloren. Der Unterschied zwischen beiden Auswertemethoden war hoch signifikant. Der Vergleich mit dem Europium-Assay anhand

von Zelllinien bestätigte die Vorgehensweise, das Überleben zu messen. In der Literatur finden sich drei weitere durchflusszytometrische Assays dieser Art (*Topakas et al. 2001, Flieger et al. 1995, Wang et al. 2002*). Alle nutzten allerdings nur eine Zelllinie als Zielzellen und setzten keine mAb ein. Flieger *et al.* verglichen ihre Methode mit dem ⁵¹Chrom-Release-Assay und erhielten vergleichbare Ergebnisse; ein Vergleich mit einer konventionellen durchflusszytometrischen Methode wurde in allen drei Fällen nicht vorgenommen.

Die Auswertung der Effektoren im neuen Assay bestätigte die Annahme, dass auch deren Konzentration sich im Verlauf der zytotoxischen Interaktion verändert. Diese Veränderung zeigte sich bei einer kurzen Kokultur von 3 – 4 h am ausgeprägtesten in den kleinen E:T-Ratien; in diesen nahmen die Effektoren stark ab um bis zu > 50% der Ausgangskonzentration. Dieser Effekt schwächte sich in den höheren E:T-Ratien ab. Blieben dagegen die Zielzellkonzentrationen im Verlauf des Assays konstant, veränderten sich auch die Effektorkonzentrationen nicht. Bei längerer Kokulturdauer – getestet wurden 48 - 72 Stunden – war dagegen eine Zunahme der Effektoren in mittleren Ratien bei weniger veränderten Konzentrationen in geringen und höheren Ratien zu verzeichnen. Die Konzentrationsverläufe der Effektoren erklären sich zum einen durch die Konjugatbildung mit den Zielzellen. Diese Konjugatbildung konnte direkt nachgewiesen werden. Mehrere Effektoren können dabei an eine Zielzelle binden und erscheinen dann als nur ein „Ereignis“ auf den Detektoren des Durchflusszytometers, diese Konjugatbildung wurde bereits mehrfach gezeigt und ihre Beziehung zur zytotoxischen Aktivität untersucht (*Bonavida et al. 1994, Godoy-Ramirez et al. 2000, Perez et al. 1985*). Durch die Konjugatbildung nimmt die Konzentration an Einzelzellen ab. Da die Anzahl der an einem Konjugat beteiligten Effektoren einer Sättigung unterliegt, nimmt der Anteil an gebundenen Einzelzellen mit zunehmender E:T-Ratio ab. Zum anderen sind Effektoren nur zur Interaktion mit einer begrenzten Zahl an Zielzellen in der Lage und sterben danach ab; dies führt zu der beobachteten Abnahme vor allem in geringen Ratien. Bei längeren Kokulturverläufen lösen sich die Konjugate und die Effektoren werden daraus wieder freigesetzt; dies war bereits in der Kinetik über die erste Stunde der Kokultur sichtbar. Bei Kokultur über mehrere Tage macht sich zusätzlich der aktivierende und proliferationsstimulierende Effekt der Zielzellen bemerkbar. Da in den geringen E:T-Ratien

initial ein tatsächlicher Verlust an Effektoren durch deren Zelltod eintritt bzw. diese anerg werden (*Jewett et al. 1996*), ist dieser Effekt hier weniger deutlich. Dagegen steigt die Effektorzellkonzentration in den mittleren über die Ausgangskonzentration an, bleibt aber in hohen Rationen – bei Stimulation durch zu wenige Zielzellen – weitgehend unverändert. Bleibt dagegen eine zytotoxische Reaktion insgesamt aus, verhält sich die Effektorzellkonzentration analog den Kontrollen. Diese Konzentrationsverläufe können zusätzlich zur Beurteilung der zytotoxischen Aktivität herangezogen werden. Veröffentlichte Daten zum Verhalten der Effektorzellkonzentration in Kokultur wurden nicht gefunden. Der von *Flieger et al. (Flieger et al. 1995)* vorgeschlagene durchflusszytometrische Assay, der wie der hier entwickelte die Konzentrationen überlebender Zellen mißt, bietet theoretisch die Möglichkeit, auch die Effektoren auszuwerten. Allerdings wird auch dort zur Konzentrationsänderung nach Kokultur keine Aussage gemacht.

In der Literatur finden sich Beispiele einer fast lineare Zunahme der gemessenen zytotoxischen Aktivität mit zunehmender Effektor:Target-Ratio (*Flieger et al. 1995, Johann et al. 1995*). Die Ergebnisse des hier entwickelten Assays weichen von diesem Muster ab; vielmehr findet sich eine Sättigung, d.h., die Aktivität überschreitet einen bestimmten Wert auch bei Zugabe von mehr Effektorzellen nicht; auch hierfür finden sich Beispiele (*Handgretinger et al. 1999, Klingemann et al. 1996*). *Bol et al.* schlugen die Einführung eines Plateau-Werts vor und weisen auf einen Zusammenhang mit der Effektorzellfrequenz in einer Population hin (*Bol et al. 1986*).

4.3.4 Erweiterter Einsatz von monoklonalen Antikörpern

4.3.4.1 Optimierung der Zytometer-Steuerung und Einsatz von mAb gegen CD4 und CD8 in gleicher Fluoreszenz

Da im Verlauf der Etablierung des Assays zunehmend komplexe Proben, u.a. mit gentransduzierten T-Zellen als Effektorzellen gegen Patientenproben, in Zytotoxizitätsassays eingesetzt werden sollten, wurde eine neue Zytometersteuerung entwickelt, die eine Detektion des Fluoreszenzsignals von mAb in allen vier Fluoreszenzbereichen bei gleichzeitigem Einsatz von PI ermöglicht. Zusätzlich wurde die Markierung der CD4- und CD8-positiven T-Zellpopulationen mit mAb der gleichen Fluoreszenz eingeführt.

Die neue Zytometersteuerung nutzt das im Vergleich zu den an mAb gebundene Fluorochrome breite Fluoreszenzspektrum von PI, das bei Kompensation für die mAb-Fluorochrome ein unkompensiertes Signal liefert und darüber identifiziert werden kann. Dies war möglich, da bei dem neu entwickelten Assay im Gegensatz zu den meisten anderen durchflusszytometrischen Assays die PI negativen zellulären Events ausgewertet wurden. Das hinsichtlich eine Markierung mit mAb nicht mehr differenzierbar Signal der PI positiven Events wurde dagegen ausgeblendet. Die Identifizierung und Ausblendung PI positiver Events über das unkompensierte Signal und die damit einhergehende Möglichkeit, auch den vierten und dritten Fluoreszenzbereich zur Detektion einer Antikörpermarkierung zu nutzen, fand sich in der Literatur weder in Zytotoxizitätsassays noch in anderen Messungen, die eine PI-Färbung einsetzen.

Der simultane Einsatz von mAb einer Fluoreszenz gegen CD4 und CD8 findet sich in einer Arbeit publiziert. Im Gegensatz zur in der vorliegenden Arbeit angewendeten Verfahrensweise wurde dort zusätzlich zum Unterschied der Epitopdichte eine mAb-Verdünnung und eine Kompetition von unkonjugierten mAb mit dem konjugierten genutzt, um verschiedene Fluoreszenzintensitäten beider Zellpopulationen zu erzielen (*Horan et al. 1986*). Diese aufwändigere Methode könnte dann sinnvoll zum Einsatz kommen, wenn antigenspezifische, restimulierte Effektor-T-Zellen nachgewiesen werden sollen. Da diese in sehr geringer Frequenz in peripheren T-Zellen vorkommen, ist allenfalls eine ausgezeichnete Trennung der CD4- und CD8-positiven T-Zellen ausreichend, um eine Proliferationsinduktion nachweisen zu können.

4.3.4.2 Standardmäßiger Einsatz von Antikörpern zur Markierung der Effektoren und Erfassung der Konjugatbildung

Bei den ersten beiden getesteten Assayvarianten war ein mAb gegen ein Blastenepitop gerichtet, der zweite je nach Ergebnis einer Vortestung gegen die Effektoren oder die Blasten. Der Einsatz von mehr als zwei mAb in einer Probe eröffnete die Möglichkeit einer verbesserten Vergleichbarkeit der Assays untereinander, indem stets die Effektorzellen markiert wurden. Effektorzellen bilden Konjugate mit den Zielzellen, die auch nach längerer Kokultur nachweisbar sind und die nicht unbedingt mit einer Lyse der Zielzellen einhergehen (*Perez et al. 1985*). Daher besteht ein Unterschied zwischen Assays, in denen die Effektoren

markiert wurden und solchen, in denen sie unmarkiert blieben. Im ersten Fall weisen Zielzell-Effektor-Konjugate die Fluoreszenz sowohl der Ziel- als auch der Effektorzellen auf. Dadurch werden sie weder im Ziel- noch im Effektorzellengate erfasst, die einander ausschließen. Bei unmarkierten Effektoren dagegen werden diese Konjugate als sehr große und komplexe Events im Zielzellengate erfasst. Daher scheint die Konzentration der Zielzellen bei Vorliegen von Konjugaten verschieden, je nachdem, ob die Effektoren markiert wurden oder nicht. Dieser Effekt macht sich vor allem in den Rationen bemerkbar, in denen noch nicht die volle Aktivität erreicht wurde. Hier machen Konjugate – mit potenziell noch vitalen Zielzellen – einen größeren Prozentanteil an den Zielzellen aus als in höheren Rationen. Als Ursache hierfür kann eine Erschöpfung der zytotoxischen Aktivität der Effektoren, beispielsweise durch Depletion der zytotoxischen Granula, diskutiert werden. Konjugate können allerdings bei Markierung sowohl der Ziel- als auch der Effektorzellen aufgrund ihrer doppelten Fluoreszenzeigenschaft und ihrer Größe und Komplexität gezielt erfasst werden. Da offenbar in höheren Rationen nur eine Zielzelle gegebenenfalls durch mehrere Effektoren gebunden wird (*Perez et al. 1985, Garcia-Panarrubia et al. 1989*), können die Konjugate mit Einschränkung als Zielzellen gezählt werden. Die Fluoreszenzintensität des „Effektor-mAb“ kann Aufschluss geben auf die Anzahl der am Konjugat beteiligten Effektoren, wenn sie gegen den „Peak“-Parameter dieser Fluoreszenz aufgetragen wird. Die zusätzliche Erfassung der Konjugate ergibt einen weiteren Hinweis auf vorliegende zelluläre Interaktionen.

Die in einigen Assays in dieser Arbeit nachgewiesenen Konjugate waren PI schwach positiv (Abb. 21). PI schwach positive Events sind als apoptotische Zellen beschrieben (*Bartkowiak et al. 1999*). Das PI-Signal der Konjugate kann allerdings nicht den an den Konjugaten beteiligten Ziel- oder Effektorzellen zugeordnet werden, beide kommen als Quelle potenziell in Frage.

4.3.5 Behandlung der spontanen Konzentrationsänderung der Zellen: Vergleich mit Release-Methoden und konventionellen durchflusszytometrischen Assays

Die verwendeten kryopräservierten Patientenproben zeigten eine hohe spontane Zerfallsrate. So war im Verlauf eines vierstündigen Assays mit bis zu 50% spontanen Verlusten zu rechnen. Dies warf die Frage nach der rechnerischen Behandlung dieser Toten auf.

Das spontane Absterben von Zellen ist ein Prozess, der unabhängig von der Sensitivität der Zellen für eine zytotoxische Aktivität abläuft. Daher sollte der gleiche Prozentanteil der nicht spontan absterbenden Zellen durch die Effektoren lysiert werden wie der der Gesamtzielzellen, d.h., der Anteil lysierter Zellen ist vom Anteil der Spontananten unabhängig (Abb. 28, Modell 2). Dies wird unterstrichen dadurch, dass der Großteil der spezifischen Lyse unter Umständen bereits innerhalb der ersten Stunde erfolgt, wenn sich der Spontanzerfall noch nicht stark bemerkbar macht (vgl. Abb. 17 und Abb. 27).

In der für die Release-Verfahren benutzten Formel wird dem dadurch Rechnung getragen, dass der Spontan-Release sowohl vom Maximal-Release als auch von der experimentellen Freisetzung abgezogen wird. Die spezifische, durch Effektorzellen verursachte Freisetzung an Marker in den Überstand wird also nur auf den Teil der Zellen bezogen, der nicht spontan zugrunde gegangen ist, dieser wird als 100% gesetzt (*Brunner et al. 1968, Blomberg et al. 1986*):

$$\text{zytotoxische Aktivität} = \frac{(\text{experimentelle Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung})}{(\text{maximale Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung})} * 100\%$$

Durchflusszytometrische Assays, die tote Zielzellen als Anteil der Gesamtzielzellen auswerten, messen den Spontanverlust direkt über den Anteil der toten Zellen in den Zielzellkontrollen und ziehen ihn dann von dem Anteil toter Zielzellen der Kokulturen ab, sofern überhaupt angegeben (*Johann et al. 1995, Kane et al. 1996*):

$$\text{zytotoxische Aktivität} = (\text{tote Zielzellen}_{\text{Kokultur}} - \text{tote Zielzellen}_{\text{Kontrolle}}) * 100\%$$

Diese Art der Berechnung berücksichtigt die Unabhängigkeit des Spontanzerfalls und der spezifischen Lyse nicht (Modell 1 Abb. 28). Das führt dazu, dass bei gleichen Zielzellen je nach Ausmaß des Spontanzerfalls – z.B. bei frisch und kryopräserviert eingesetzten Blasten – bei tatsächlich gleicher spezifischer Lyse durch Effektoren in der kryopräservierten Zellprobe eine geringere Aktivität errechnet wird, da der Spontanzerfall und damit der Anteil der abgezogenen toten Zielzellen größer ist.

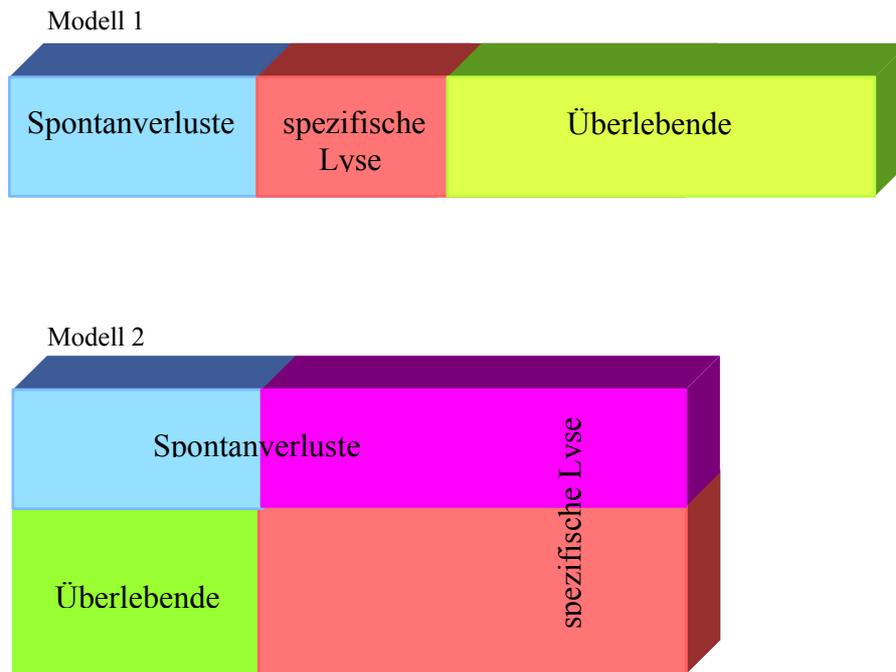


Abb. 28: Zwei Modelle des Verhältnisses von spezifischer Lyse zu Spontanverlusten

Modell 1: Abzug der Spontanverluste von den Gesamtverlusten. Die Spontanverluste und die zytotoxischen Reaktion werden als voneinander abhängig aufgefasst. Die zytotoxische Aktivität (rot) wird als Prozent der gesamten Zellen ausgedrückt (Summe aus Rot, Blau und Grün). Diesem Modell entspricht die Berechnung der zytotoxischen Aktivität in den konventionellen durchflusszytometrischen Verfahren, die den Anteil toter Zielzellen abzüglich Spontananten an den Gesamtzielzellen auswerten.

Modell 2: Abzug der Spontanverluste (Blau und Violett) von der initialen Zellzahl. Der Spontanverlust wird als von der zytotoxischen Reaktion unabhängiger, stochastischer Prozess gewertet. Die zytotoxische Aktivität (rot) wird als Anteil der nicht spontan abgestorbenen Zellen (Summe aus Rot und Grün) ausgedrückt. Diesem Modell entspricht die Berechnung der Aktivität bei Release-Verfahren und im hier entwickelten Assay sowie die in dieser Arbeit eingesetzte Berechnung der zytotoxischen Aktivität über die PI positiven, s. Anhang.

Im hier etablierten Assay mussten Konzentrationen zueinander in Bezug gesetzt werden. Zwei Möglichkeiten sind denkbar. Zum einen kann die Endkonzentration der Kontrollen als Bezugsgröße für die der Kokulturen zugrundegelegt werden:

$$\text{zytotoxische Aktivität} = (1 - k_{\text{Kokultur}}/k_{\text{Kontrolle}}) * 100\%,$$

k = Konzentration der Zielzellen.

Diese Formel zur Berechnung der zytotoxischen Aktivität wird von Wang *et al.* eingesetzt (Wang *et al.* 2002). Bei dieser Vorgehensweise kann auf eine Messung der Kontrollen vor Inkubation verzichtet werden, sie erfordert besonders dann wenig Rechenaufwand, wenn die Ausgangskonzentration der betrachteten Population in allen Ansätzen gleich ist. Allerdings entfällt in diesem Fall die Überprüfung der Ausgangskonzentrationen und damit der pipettierten Rationen.

Im anderen Fall kann die Endkonzentration der Kokulturen auf die Ausgangskonzentration der Kontrollen bezogen werden. Dieses Vorgehen ist dem ersten rechnerisch äquivalent, wenn beachtet wird, dass die spontane Konzentrationsänderung von der Ausgangskonzentration der Kokulturen (Modell 2, Abb. 28) und nicht der gemessenen Konzentration nach Kokultur (Modell 1, Abb. 28) abgezogen wird. Die zytotoxische Aktivität kann dann als Verlust der „restlichen“ Ausgangspopulation ausgedrückt werden:

$$\Delta k_{\text{Kokultur}} = \left(1 - \frac{k_{\text{Kokultur nach}} * k_{\text{Kontrolle vor}}}{k_{\text{Kokultur vor}} * k_{\text{Kontrolle nach}}} \right) * 100\% \quad k = \text{Konzentration}$$

Als „Nebenprodukt“ dieser Vorgehensweise können anhand der Kontrollen vor Kokultur die tatsächlichen Ausgangskonzentrationen und die daraus resultierenden E:T-Ratien ebenso wie der Spontanverlust errechnet werden, d.h., es kann eine Qualitätskontrolle der Konzentrationseinstellung und des verwendeten Materials vorgenommen werden.

Diese Vorgehensweise ist denen in der Literatur, insbesondere den Release-Verfahren, äquivalent; auch hier werden sowohl Spontanverluste als auch spezifische Verluste ermittelt.

4.3.6 Aussagekraft des neu entwickelten Assays: Einteilung der zytotoxischen Aktivität in Grade

Durch Ungenauigkeiten der eingesetzten Volumina unterliegen die Messergebnisse Schwankungen, die die Aussagefähigkeit beeinflussen. Im Vergleich zu den Assays der Literatur können allerdings durch die zusätzliche Auswertung der Effektorzellen und ihres charakteristischen Verhaltens zusätzliche Aussagen über das Vorliegen einer zytotoxischen Aktivität gewonnen werden. Über die Schwankungen der Ergebnisse in der Literatur finden sich kaum Aussagen. Topakas *et al.* erzielten mit einer volumetrischen Konzentrationsmessung einen der hier vorgestellten Konzentrationsmessung vergleichbaren Variationskoeffizient von 6% (Topakas *et al.* 2001) und daraus resultierend ein vergleichbares Auflösungsvermögen der zytotoxischen Aktivität.

Die Erfahrung mit dem in dieser Arbeit neu entwickelten Assay hat gezeigt, dass durch Auswertung der Ziel- und Effektorzellen und des Vergleichs der Ergebnisse der verschiedenen E:T-Ratien Unterschiede ab 10% für eine Aussage verwertbar sind. Da fraglich ist, ob derart geringe Unterschiede von praktischer Bedeutung sind, wird vorgeschlagen, die Aktivitäten in Grade einzuteilen mit 0 = 0 – 19 % Änderung (keine Aktivität), 1 = 20 – 39 %

(geringe Aktivität), 2 = 41 – 69 % (mittlere) und 3 = 61 – 100 % (hohe Aktivität.) Vergleichbare Einteilungen finden sich auch in der Literatur (*Yan et al. 1998*).

4.3.7 Vor- und Nachteile des neu entwickelten und etablierten Assays

Der in dieser Arbeit entwickelte durchflusszytometrische Zytotoxizitätsassay bietet im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Assays einige Vorteile. Der Einsatz spezifisch bindender mAb erlaubt die differenzierte, je nach Fragestellung flexible Darstellung von in Proben enthaltenen Zellen und Partikeln. Dies führt zu einer hohen Flexibilität bei der Auswahl von Zielzellen, der Assay ist nicht beschränkt auf eine Zelllinie oder einen Zelltyp. Nicht zu den eigentlichen Zielzellen gehörende Zellen wie restliche Lymphozyten in Patientenproben leukämischer Blasten können dargestellt und aus der Auswertung ausgegliedert werden. Dadurch ist die Limitierung einer Vielzahl von Assays wie die Release-Methoden oder auch Methoden mit Membranfärbungen, die einen Blastenanteil von >80% fordern, aufgehoben. Durch die Ausschöpfung aller vier Fluoreszenzbereiche für die Antikörperdetektion bei gleichzeitigem Einsatz eines Totfarbstoffs eröffnet der Assay die Möglichkeit, Effektorzellen und Subpopulationen gesondert zu betrachten. Freie, nicht zur Definition der betrachteten Zellpopulationen genutzte Detektionsbereiche des Zytometers erlauben die gleichzeitige Untersuchung zusätzlicher Parameter wie z.B. Aktivierungsmarker, ohne zusätzliche Proben und damit Material wie Zellen oder mAb zu erfordern. In bisherigen Assays wird allenfalls ein mAb eingesetzt (*Godoy-Ramirez et al. 2000, Goldberg et al. 1999, Hoshino et al. 1991*). Nicht nur die direkte zelluläre, sondern auch antikörper- und substanzvermittelte zytotoxische Aktivitäten sollten mit dem in dieser Arbeit entwickelten Assay messbar sein. Der Assay gehört zur Kategorie 2b (Messung überlebender Zellen) und erfasst als solcher die gesamte Aktivität, anders als die große Mehrzahl der durchflusszytometrischen Assays, die der Kategorie 1b angehören (Messung der toten Zellen, z.B. *Oumouna et al. 2001, Hoppner et al. 2002*, Tabelle 7). Da die lebenden Zellen ausgewertet werden, entfallen die Schwierigkeiten, die sich bei Betrachtung mit Totfarbstoff gefärbter Events ergeben, namentlich die Unterscheidung von zellulären und subzellulären Events sowie der Verlust an toten Zellen durch vollständigen Zerfall. Durch die optimierte rechnerische Behandlung ist es möglich, selbst bei größeren Spontanverlusten die zytotoxische Aktivität zu quantifizieren, auch da die Messgenauigkeit größer als bei den konventionellen Release-Methoden ist. Die Zellen werden vor Kokultur nicht manipuliert wie durch mehrfaches Waschen bei anderen Färbe- und Markierungsverfahren

(z.B. *Brunner et al. 1968*, *Blomberg et al. 1986*, *Derby et al. 2001*, Tabelle 7) und während der Kokultur auch keinen Fremdstoffen wie Farbstoffen und radioaktiven Isotopen ausgesetzt. Daher wird der mögliche Einfluss solcher Faktoren auf relevante Parameter (MHC I, Adhäsionsmoleküle, Vitalität) minimiert. Allerdings ist ein Einfluss durch eine potenzielle intrinsische Aktivität der zur Markierung verwendeten mAb nicht ohne weiteres abzuschätzen; gegebenenfalls muss der mAb daraufhin untersucht werden. Die Kokulturdauer des Assays wird nicht durch eine Halbwertszeit oder einen Farbstoffverlust, sondern allenfalls durch die Spontanverluste limitiert. Das Ergebnis der Messung ist nicht von der Stoffwechselaktivität der Zielzellen abhängig wie bei Proliferations- oder Enzymassays (z.B. *Corey et al. 1997*, *Keilholz et al. 1990*, Tabelle 7).

Da verschiedene Ziel- und Effektorzellen durch variierende mAb markiert werden, die unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten erzielen, ist eine von Fall zu Fall angepasste Platzierung der Regionen notwendig. Bei komplexen und dadurch schwierig zu beurteilenden Ansätzen ist weiterhin ein differenziertes Rückgaten erforderlich, das Erfahrung und Urteilsvermögen erfordert. Dadurch ist der Assay in seiner Auswertung durch eine subjektive Komponente behaftet, die zu Abweichungen in den Ergebnissen von $\pm 10\%$ führen kann. Eine vollständige Standardisierung ist dadurch nicht möglich. Dies gilt in unterschiedlichem Ausmaß allerdings für die Mehrzahl der durchflusszytometrischen, „optischen“ Assays, im Gegensatz zu den Release- und Inkorporations-Methoden.

Da die gemessenen Konzentrationen von den anteiligen Volumina von Zielzellen, Effektoren und Beads beeinflusst werden (*Law et al. 1999*), ist der Assay anfälliger für Pipettierungenauigkeiten als Assays, deren Aussage in erster Linie von der Absolutzahl der Zielzellen in einem Ansatz abhängt (wie z.B. Release-Methoden, die die Gesamtfluoreszenz oder Radioaktivität messen) oder Methoden, die den Anteil der toten Zielzellen an den Gesamtzielzellen betrachten. Dies wird aufgewogen durch die zusätzliche Aussage, die aus den Effektorzellen gezogen werden kann.

Eine Differenzierung von lytischer und apoptotischer Komponente der zytotoxischen Aktivität ist mit diesem Assay denkbar. Annexin-V als Apoptosemarker kann zwar in der Assayvariante mit vier Antikörperfluoreszenzen nicht sinnvoll eingesetzt werden, da das Antikörpersignal der toten Zellen weitgehend durch das des PI überlagert ist. Frühe apoptotische Zellen, die noch nicht stark PI aufnehmen, sollten allerdings darstellbar sein. Für eine entsprechende Fragestellung wäre jedoch die zweite Assayvariante vorzuziehen,

die PI kompensiert einsetzt und daher auch die weitere Differenzierung der Eigenschaften PI positiven Events erlaubt, mit der Einschränkung der veränderten Bindung von mAb an tote Zellen.

4.4 Ausblick

Der Assay wurde entwickelt für reine Effektorzellpopulationen und Suspensionszellen. Nicht getestet wurde bisher die Anwendung auf unselektierte mononukleäre Zellen und Vollblut. Aufgrund der Änderungen, die sich in der Konzentration der tatsächlichen Effektorzellen bei unveränderten Konzentrationen der anderen, potenziellen Effektoren zeigen, sollte es möglich sein, bei entsprechend lang gewählten Inkubationszeiten die für eine spezifische Aktivität gegen die Zielzellen verantwortlichen Effektoren aus den mononukleären Zellen herauszufiltern. Dies würde eine deutliche Ersparnis an Arbeitsaufwand und Zellmaterial bedeuten, wenn eine entsprechende Fragestellung bearbeitet wird.

Die Frage, was mit den Effektoren unter Kokultur geschieht, ist von Bedeutung für die Zellmenge einer zellulären Immuntherapie. Werden die Effektoren durch die Interaktion mit zu vielen Zielzellen erschöpft oder sterben sogar ab, muss daraus die Forderung nach Gabe von Effektoren in größeren Anteilen gestellt werden. Insbesondere in den 1:1-Ratien war eine Abnahme an Effektoren zu frühen Zeitpunkten und ein bleibender Verlust oder eine allenfalls geringe Zunahme bei längerfristiger Kokultur zu beobachten. Der Frage nach den Ursachen – Konjugatbildung, Absterben, Anergie – und deren Anteilen an diesen Phänomenen ist bislang nicht weiter nachgegangen worden. Denkbar sind beispielsweise Messung der Anzahl von Effektoren und Granzym-B-Nachweis in den Konjugaten, eine Annexin-V-Markierung zur Apoptosemessung bzw. Bromdesoxyuridineinbau zum Nachweis des Anteils proliferierender Effektoren.

Adhärente Zellen stellen einen bedeutenden Anteil der Zellen maligner Erkrankungen. In der Klinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin III des Klinikums der Johann Wolfgang von Goethe-Universität liegt ein Schwerpunkt auf der Neuroblastomforschung. Daher wäre es wünschenswert, den durchflusszytometrischen Assay auch für adhärente Zellen zu etablieren. Denkbar wäre, dass eine Fixation der Zellen nach erfolgter Kokultur und nach Ablösen der adhärennten Zellen ein Wiederanheften verhindert, so dass die Zellen in ihrer Konzentration durchflusszytometrisch gemessen werden können. Dies bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

5. Zusammenfassung

Zelluläre Zytotoxizität ist ein Phänomen, das für die Wirkung allogener Stammzelltransplantationen verantwortlich gemacht wird. Sie wird zudem genutzt im Rahmen zellulärer Immuntherapien mit Spenderlymphozyten, angereicherten, aktivierten und z.T. gentechnisch veränderten T- und NK-Zellen, Targeting der Antitumor-Immunantwort mit bispezifischen Antikörpern und der Vakzinierung mit dendritischen Zellen. Ihre Messung ist von großer Bedeutung bei der Weiterentwicklung und Validierung solcher Verfahren. In der Klinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität werden gegenwärtig mehrere solcher Verfahren entwickelt und eingesetzt. Eine Zytotoxizitätsmessung insbesondere gegen patienteneigene Leukämieblasten ist daher unerlässlich.

Proben von Leukämieblasten aus peripherem Blut oder Knochenmark von Patienten sind heterogen und enthalten in der Regel restliche gesunde Zellen. Diese Zellen verzerren die Messung einer spezifischen Zytotoxizität gegen die Blasten, wenn sie nicht gezielt aus der Auswertung ausgeschlossen werden. Effektorzellen bestehen ebenfalls aus Subpopulationen, die in unterschiedlichem Ausmaß mit den Blasten interagieren. Um solche komplexen Proben adäquat analysieren zu können, sollte ein durchflusszytometrischer Assay unter Ausnutzung des Potenzials monoklonaler Antikörper zur differenziellen Markierung von Zellpopulationen entwickelt werden.

Die Auswertung der Leukämietypisierungen von 47 Patienten und Austestung in Frage kommender Antikörper ergab, dass eine Wahl der Antikörper aufgrund des immunologischen Subtyps einer Leukämie nur mit Einschränkung möglich ist, so dass eine Vorabtestung der Antikörper erfolgen muss. Bei Einsatz der Markierung von Proben mit FITC- und PE-konjugierten Antikörper in einem konventionellen durchflusszytometrischen Assay, der die PI positiven Zielzellen an den Gesamtzielzellen als Korrelat der zytotoxischen Aktivität der Effektorzellen maß, traten Diskrepanzen in den Anteilen der Zellpopulationen einer Probe auf. Diese legten den Schluss nahe, dass tote Zellen durch vollständige Fragmentierung einer Messung entgehen. In einer neu konzipierten Assayvariante wurde daher das gegenteilige Konzept gewählt, die Messung des Überlebens der Zellen. Dies wurde ermöglicht durch die Einführung eines internen Standards, der eine durchflusszytometrische Konzentrationsmessung erlaubt. Mit diesem Verfahren wurde gezeigt, dass die Zunahme der mit PI erfassten

toten Zellen nur gering mit der Abnahme lebender Zellen korreliert. Die Validierung anhand des Europium-Release-Assays ergab übereinstimmende Ergebnisse dieser zweiten Assayform mit diesem bei signifikantem ($P \leq 0,01$, Wilcoxon-Rangtest) Unterschied der ersten Variante. Der im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelte Assay erlaubte zusätzlich die Beurteilung auch des Verhaltens der Effektorzellkonzentrationen. Es wurde gezeigt, dass diese sich bei vorhandener zytotoxischer Aktivität gegen die Zielzellen änderten im Sinne einer initialen Abnahme insbesondere in den geringen Effektor:Zielzell-Ratien und einer erneuten Zunahme bei längerer Kokulturdauer im Sinne einer Proliferationsinduktion durch den Zielzellstimulus. In einem letzten Schritt wurde eine modifizierte Zytometersteuerung und die Markierung CD4 und CD8 positiver T-Zellen in der gleichen Fluoreszenz unter Ausnutzung der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten eingeführt. Dadurch wurde es möglich, bei vier Fluoreszenzbereichen simultan bis zu fünf verschiedene monoklonale Antikörper zuzüglich Propidiumjodid in einem einzigen Ansatz zu verwenden und so nicht nur lebende Ziel- und Effektorzellen zu differenzieren, sondern durch entsprechende Kombination der Antikörper auch Effektorzellsubpopulationen wie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in ihrem Verhalten zu beurteilen. Über die gleichzeitige Auswertung von Ziel- und Effektorzellen in verschiedenen Effektor:Zielzell-Ratien erlaubt dieser neue Assay differenzierte Aussagen über das Verhalten und die Reaktivität von Zellen in Kokultur bei einfacher Handhabung, minimaler Zellmanipulation im Verlauf des Assays durch Markierung erst nach Kokultur und hoher Flexibilität in der bearbeiteten Fragestellung.

Abstract

Cytotoxic activity of T- and NK-cells is thought to be the mechanism underlying the graft-versus-leukemia effect in allogeneic hemopoetic stem cell transplantation. It is exploited in immunotherapy with donor lymphocyte infusions. Currently, efforts are under way to propagate the effectiveness and safety of cellular immunotherapy by enrichment, activation or genetic modification of immunocompetent cells. These approaches comprise application of allogeneic suicide gene transduced donor T cells, retargeting of Fc γ -receptor bearing cells by bispecific antibodies or transduction of tumor specific activating receptors as well as autologous dendritic cell vaccines for T cell activation. To validate such strategies and test their efficacy against patient malignant cells, assessing the cytotoxic activity of the manipulated putative effector cells is crucial.

Samples of leukemic blasts can be heterogenous and contain normal lymphocytes or bone marrow cells, mounting up to > 50% of cells. If not excluded from analysis, these cells may distort results obtained from cytotoxicity assays. Effector cells themselves can be inhomogenous, including subpopulations both reactive or anergic to the target cells employed. To assess cell lysis using these complex samples in the setting of immunotherapy, a suitable cytotoxicity assay was needed. Exploiting the potential of monoclonal antibodies (mAb) to distinguish cells by their surface marker expression and propidium iodide (PI) as a marker of dead cells, in this work a four color-flow cytometric cytotoxicity assay was developed.

Screening the leukemic cells from 47 children showed that mAb distinctly marking the populations of a coculture of effector cells and patient malignant target cells cannot be selected according to the subtype of leukemia alone, due to variations in fluorescence intensities yielded. Consequently, preselected antibodies were tested for their capacity to differentially mark the blasts and effectors in each case.

Based on the concept of the majority of flow cytometric assays proposed in literature, in a first assay variant dead target cells were measured as percent of all target cells. Cell populations were distinguished by two mAb, conjugated with FITC and PE fluorescent molecules, respectively. In a series of assays using cryopreserved blasts as target cells, discrepancies between the proportions of cells expected in a sample and those actually detected became obvious, with an overall decrease of target cell percentage. It was concluded that dead cells escaped detection by dissolving completely. Additionally, changes in scatter and mAb binding properties of dead cells hampered consistent and precise gating. Therefore, in the opposite approach, the loss of vital cell concentrations of cocultures relative to the controls was calculated. Flow-Count beads were used as internal standard to concomitantly measure cell concentrations and proportions within a flow cytometric sample. PI staining served as an exclusion criterion. Comparison of the results of a series of assays calculated with either method showed a loose correlation, only. The results from the europium release assay agreed with the results obtained from calculating vital cell loss while differing significantly from the proportion of dead cells measured, which were lower ($p < 0,01$, Wilcoxon's rank test). This finding supported the hypothesis of loss of dead cells from detection.

In addition to measuring cytotoxic activity, the newly developed assay also allowed for assessing the changes in effector cell concentrations. These were shown to correspond to target cell lysis, with an initial loss of effectors through conjugate formation and induction of

proliferation after a prolonged period of stimulation with target cells. By contrast, when no target cell lysis occurred, effector concentrations remained unchanged, as well. In a third step of development, modifications of the cytometer controls made the use of antibodies conjugated to four different fluorochromes possible while detecting and excluding PI stained cells from analysis by the uncompensated signal of PI. Moreover, T-helper and cytotoxic T-cell subsets were distinguished by their different fluorescence intensities simultaneously employing PC5 conjugated monoclonal antibodies both against CD4 and CD8. These combined strategies allowed for the use of up to five monoclonal antibodies and PI within one sample, offering the possibility to measure activation or transduction markers.

To conclude, concomitantly calculating changes in both target and effector cell concentration, this newly developed highly flexible cytotoxicity assay yields a maximum of information on reactivity and interactions of cells in combination with minimal manipulation of the samples by marking cells after coculture, only.

6. Literatur

- Albi N, Ruggeri L, Aversa F, Merigiola C, Tosti A, Tognellini R, Grossi CE, Martelli MF, Velardi A. Natural killer (NK)-cell function and antileukemic activity of a large population of CD3+/CD8+ T cells expressing NK receptors for major histocompatibility complex class I after „three-loci“ HLA-incompatible bone marrow transplantation. *Blood* 1996;87:3993-4000.
- Arase H, Arase N, Saito T. Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. *J Exp Med* 1995;181:1235-8.
- Bachmann MF, McKall-Faienza K, Schmits R, Bouchard D, Beach J, Speiser DE, Mak TW, Ohashi PS. Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity* 1997;7:549-57.
- Bader P, Klingebiel T, Schaudt A, Theurer-Mainka U, Handgretinger R, Lang P, Niethammer D, Beck JF. Prevention of relapse in pediatric patients with acute leukemias and MDS after allogeneic SCT by early immunotherapy initiated on the basis of increasing mixed chimerism: a single center experience of 12 children. *Leukemia* 1999;13:2079-86.
- Baker EJ, Ichiki AT, Day NE, Andrews RB, Bamberger EG, Lozzio CB. Simultaneous flow cytometric measurement of K-562 megakaryocytic differentiation and CD56+ large granular lymphocyte cytotoxicity. *J Immunol Methods* 2001;253:37-44.
- Barnes DWH, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE. Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. Preliminary communication. *Br Med J* 1956;2:626-7.
- Barry M, Bleackley C. Cytotoxic lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2002;2:401-9.
- Bartkowiak D, Hoegner S, Baust H, Nothdurft W, Roettinger E. Comparative analysis of apoptosis in HL60 detected by annexin-V and fluorescein-diacetate. *Cytometry* 1999;37:191-6.
- Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999;17:189-220.
- Blomberg K, Granberg C, Hemmila I, Lovgren T. Europium-labeled target cells in an assay of natural killer cell activity. I. A novel non-radioactive method based on time-resolved fluorescence. *J Immunol Methods* 1986;86:225-9.
- Bol SJ, Rosdorff HJ, Ronteltap CP, Hennen LA. Cellular cytotoxicity assessed by the 51Cr release assay. Biological interpretation of mathematical parameters. *J Immunol Methods* 1986;90:15-23.
- Bonavida B, Braquet M, Lebow LT, Jewett A. Qualitative and quantitative analysis of subpopulations of cytotoxic effector cells by flow cytometry. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1994;9:19-25.
- Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, Servida P, Zappone E, Ruggeri L, Rossini S, Mavilio F, Traversari C, Bordignon C. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 1997;276:1719-24.
- Bonnet D, Warren EH, Greenberg PD, Dick JE, Riddell SR. CD8(+) minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocyte clones eliminate human acute myeloid leukemia stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:8639-44.

- Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Invest* 1968;97:77 - 89.
- Braciale TJ, Morrison LA, Sweetser MT, Sambrook J, Gething MJ, Braciale VL. Antigen presentation pathways to class I and II MHC-restricted T lymphocytes. *Immunol Rev* 1987;98:95-114.
- Brawn RJ, Barker CR, Oesterle AD, Kelly RJ, Dandliker WB. An improved fluorescence probe cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 1975;9:7-26.
- Brenan M, Parish CR. Automated fluorometric assay for T cell cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1988 Aug 9;112:121-31.
- Bromley SK, Burack WR, Johnson KG, Somersalo K, Sims TN, Sumen C, Davies MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* 2001;19:375-96.
- Brossart MD. Dendritic cells in vaccination therapies of malignant diseases. *Transfus Apheresis Sci* 2002;27:183-6.
- Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC, Chaphuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labeled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 1968;14:181-96.
- Clark SP, Yoshikai Y, Taylor S, Siu G, Hood L, Mak TW. Identification of a diversity segment of human T-cell receptor beta-chain, and comparison with the analogous murine element. *Nature* 1984;311:387-9.
- Collins RH Jr, Shpilberg O, Drobosky WR, Porter DL, Giralt S, Champlin R, Goodman SA, Wolff SN, Hu W, Verfaillie C, List A, Dalton W, Ognoskie N, Chetrit A, Antin JH, Nemunaitis J. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancies after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1997;15:433-44.
- Corey MJ, Kinders RJ, Brown LG, Vessella RL. A very sensitive coupled luminescent assay for cytotoxicity and complement-mediated lysis. *J Immunol Methods* 1997;207:43-51.
- Crosland-Taylor P. A device for counting small particles suspended in fluid through a tube. *Nature* 1953;171:37-8.
- Derby E, Reddy V, Kopp W, Nelson E, Baseler M, Sayers T, Malyguine A. Three-color flow cytometric assay for the study of the mechanisms of cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Lett* 2001;78:35-9.
- Dieffenbach A, Raulet DH. Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunol Rev* 2001;181:170-84.
- Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, Wyllie AH. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim Biophys Acta* 1992;1133:275-85.
- Dolstra H, Fredrix H, Maas F, Coulie PG, Basseur F, Mensink E, Adema GJ, de Witte TM, Figdor CG, van de Wiel-van Kemenade E. A human minor histocompatibility antigen specific for B cell acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med* 1999;189:301-8.
- Duerst RE, Frantz CN. A sensitive assay of cytotoxicity applicable to mixed cell populations. *J Immunol Methods* 1985;82:39-46.
- Fadok VA, Voelkner DR, Campbell DA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207-2216.

- Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002;100:1935-47.
- Fischer K, Andreesen R, Mackensen A. An improved flow cytometric assay for the determination of cytotoxic T lymphocyte activity. *J Immunol Methods* 2002;259:159-69.
- Flieger D, Gruber R, Schlimok G, Reiter C, Pantel K, Riethmuller G. A novel non-radioactive cellular cytotoxicity test based on the differential assessment of living and killed target and effector cells. *J Immunol Methods* 1995;180:1-13.
- Fujita J, Saijo N, Sasaki Y, Futami H, Ishihara J, Takahashi H, Hoshi A, Hamburger AW. Detection of cytotoxicity of freshly obtained lymphocytes and of lymphocytes activated with recombinant interleukin II (rIL-2) against lung cancer cell lines by human tumor clonogenic assay (HTCA). *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986;22:445-50.
- Gao L, Bellantuono I, Elsasser A, Marley SB, Gordon MY, Goldman JM, Stauss HJ. Selective elimination of leukemic CD34(+) progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1. *Blood* 2000;95:2198-203.
- Garcia-Penarrubia P, Koster FT, Bankhurst AD. Population distribution of natural killer and K562 target cell conjugates. *Nat Immun Cell Growth Regul* 1989;8:57-65.
- Gazzano-Santoro H, Ralph P, Ryskamp TC, Chen AB, Mukku VR. A non-radioactive complement-dependent cytotoxicity assay for anti-CD20 monoclonal antibody. *J Immunol Methods* 1997;202:163-71.
- Geiger JD, Hutchinson RJ, Hohenkirk LF, McKenna EA, Yanik GA, Levine JL, Chang AE, Braun TM, Mulé JJ. Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression. *Cancer Res* 2001;61:8513-9.
- Germann T, Rude E. Interleukin-12. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;108:103-12.
- Godoy-Ramirez K, Franck K, Gaines H. A novel method for the simultaneous assessment of natural killer cell conjugate formation and cytotoxicity at the single-cell level by multi-parameter flow cytometry. *J Immunol Methods* 2000;239:35-44.
- Goldberg JE, Sherwood SW, Clayberger C. A novel method for measuring CTL and NK cell-mediated cytotoxicity using annexin V and two-color flow cytometry. *J Immunol Methods* 1999;224:1-9.
- Grando SA, Drannik GN, Kostromin AP, Glukhenky BT, Boiko YY, Korostash TA, Demidov SV, Senyuk OF. Serine proteinase esterolytic activity as an assay of cytotoxic reactions. *J Immunol Methods* 1988 Oct 26;113:237-46.
- Hamann D, Baars PA, Martin HG, Hooibrink B, Kerkhof-Garde S, Klein MR, van Lier RAW. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med* 1997;186:1407-18.
- Handgretinger R, Geiselhart A, Moris A, Grau R, Teuffel O, Bethge W, Kanz L, Fisch P. Pure red-cell aplasia associated with clonal expansion of granular lymphocytes expressing killer-cell inhibitory receptors. *New Engl J Med* 1999;340:278-84.
- Haque K, Truman C, Dittmer I, Laundry G, Denning-Kendall P, Hows J, Feest T, Bradley B. Modified cytotoxic T lymphocyte precursor frequency assay by measuring released europium in a time resolved fluorometer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1997;45:37-42.
- Henkart PA. Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules. *Immunity* 1994;1:343-6.

- Herberman RB. Cancer immunotherapy with natural killer cells. *Semin Oncol* 2002;29:27-30.
- Hillman GG, Roessler N, Fulbright RS, Pontes JE, Haas GP. Application of the direct beta counter Matrix 96 for cytotoxic assays: simultaneous processing and reading of 96 wells using a ⁵¹Cr-retention assay. *Cancer Immunol Immunother* 1993;36:351-6.
- Hoppner M, Luhm J, Schlenke P, Koritke P, Frohn C. A flow-cytometry based cytotoxicity assay using stained effector cells in combination with native target cells. *J Immunol Methods* 2002 Sep 15;267:157-63.
- Horan PK, Slezak SE, Poste G. Improved flow cytometric analysis of leukocyte subsets: simultaneous identification of five cell subsets using two-color immunofluorescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:8361-5.
- Hoshino T, Hara A, Inoue M, Honda J, Imai Y, Oizumi K, Yokoyama MM. Flow cytometric measurement of NK cell cytotoxicity. *J Clin Lab Immunol* 1991;36:39-43.
- Howrey RP, Martin PL, Driscoll T, Szabolcs P, Kelly T, Shpall EJ, Bearman SI, Slat-Vasquez V, Rubinstein P, Stevens CE, Kurtzberg J. Graft-versus-leukemia-induced complete remission following unrelated umbilical cord blood transplantation for acute leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:1251-4.
- Hussain RF, Nouri AM, Oliver RT. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J Immunol Methods* 1993 Mar 15;160:89-96.
- Ito M, Watanabe M, Kamiya H, Sakurai M. Non-radioactive assay of natural killer cell-mediated cytotoxicity against cytomegalovirus-infected fibroblasts by DNA fragmentation ELISA. *J Virol Methods* 1996;56:77-84.
- Jacobs DB, Pipho C. Use of propidium iodide staining and flow cytometry to measure anti-mediated cytotoxicity: resolution of complement-sensitive and resistant target cells. *J Immunol Methods* 1983 Aug 12;62:101-8.
- Jewett A, Bonavida B. Target-induced inactivation and cell death by apoptosis in a subset of human NK-cells. *J Immunol* 1996;156:907-15.
- Johann S, Blümel G, Lipp M, Förster R. A versatile flow cytometry-based assay for the determination of short- and long-term natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 1995;185:209-16.
- Juriscic V, Spuzic I, Konjevic G. A comparison of the NK cell cytotoxicity with effects of TNF-alpha against K-562 cells, determined by LDH release assay. *Cancer Lett* 1999;138:67-72.
- Kane KL, Ashton FA, Schmitz JL, Folds JD. Determination of natural killer cell function by flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3:295-300.
- Kantakamalakul W, Jaroenpool J, Pattanapanyasat K. A novel enhanced green fluorescent protein (EGFP)-K562 flow cytometric method for measuring natural killer (NK) cell cytotoxic activity. *J Immunol Methods* 2003;272:189-97.
- Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986;319:675-8.
- Kasatori N, Urayama T, Mori T, Ishikawa F. [Cytotoxicity test based on luminescent assay of alkaline phosphatase released from target cells] *Rinsho Byori* 1994;42:1050-4.
- Keilholz U, Dummer R, Welters H, Brado B, Galm F, Matheiwetz P, Hunstein W. A modified cytotoxicity assay with high sensitivity. *Scand J Clin Lab Invest* 1990;50:879-84.

- Kipriyanov SM, Moldenhauer G, Strauss G, Little M. Bispecific CD3 x CD19 diabody for T cell-mediated lysis of malignant human B cells. *Int J Cancer* 1998;77:763-72.
- Klingemann HG, Wong E, Maki G. A cytotoxic NK-cell line (NK-92) for ex vivo purging of leukemia from blood. *Biol Blood Marrow Transpl* 1996;2:68-75.
- Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European group for Blood and marrow transplantation working party chronic leukemia. *Blood* 1995;86:2041-50.
- Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, van Oers MHJ. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994;84:1415-20.
- Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1983;64:313-20.
- Kumar PA, Das SK. A colorimetric assay to evaluate the cytotoxic activity of the intestinal intraepithelial lymphocytes of chickens. *Vet Res Commun* 1996;20:513-8.
- Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998;16:359-93.
- Lang P, Pfeiffer M, Handgretinger R, Schumm M, Demirdelen B, Stanojevic S, Klingebiel T, Koehl U, Kuci S, Niethammer D. Clinical scale isolation of T cell-depleted CD56+ donor lymphocytes in children. *Bone Marrow Transplant* 2002;29:497-502.
- Larsson M, Fonteneau JF, Bhardwaj N. Cross-presentation of cell-associated antigens by dendritic cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2003;276:261-75.
- Law P, Traylor L, Recktenwald DJ. Cell analysis for hematopoietic stem/progenitor cell transplantation. *Cytometry* 1999;38:47-52.
- Lecoeur H, Fevrier M, Garcia S, Riviere Y, Gougeon ML. A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 2001;253:177-87.
- Lehmann C, Glass B, Zeis M, Schmitz N, Uharek L. Investigating the lysis of small-cell lung cancer cell lines by activated natural killer (NK) cells with a fluorometric assay for NK-cell-mediated cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother* 1999;48:209-13.
- Li J, Zhang Z, Jin B, Tian F. Natural killer cell cytotoxicity assay with time-resolved fluorimetry. *Sci China C Life Sci* 1996;39:217-24.
- Lieberman J. Cell death and immunity: The WBC of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003;3:361-70.
- Linsley PS, Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* 1993;11:191-212.
- Luznik L, Fuchs EJ. Donor lymphocyte infusions to treat hematologic malignancies in relapse after allogeneic blood or marrow transplantation. *Cancer Control* 2002;9:123-37.
- Maki G, Klingemann HG, Martinson JA, Tam YK. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. *J Hematother Stem Cell Res* 2001;10:369-83.
- Malyguine A, Derby E, Brooks A, Reddy V, Baseler M, Sayers T. Study of diverse mechanisms of cell-mediated cytotoxicity in gene-targeted mice using flow cytometric cytotoxicity assay. *Immunol Lett* 2002;83:55-9.

- Mattis AE, Bernhardt G, Lipp M, Forster R. Analyzing cytotoxic T lymphocyte activity: a simple and reliable flow cytometry-based assay. *J Immunol Methods* 1997;204:135-42.
- McElhaney JE, Pinkoski MJ, Upshaw CM, Bleackley RC. The cell-mediated cytotoxic response to influenza vaccination using an assay for granzyme B activity. *J Immunol Methods* 1996;190:11-20.
- Montoya MC, Sancho D, Vicente-Manzanares M, Sanchez-Madrid F. Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunol Rev* 2002;186:68-82.
- Mullbacher A, Parish CR, Mundy JP. An improved colorimetric assay for T cell cytotoxicity in vitro. *J Immunol Methods* 1984;68:205-15.
- Munn DH, Cheung NKV. Antibody-dependent antitumor cytotoxicity by human monocytes cultured with recombinant macrophage colony-stimulating factor. Induction of efficient antibody-mediated antitumor cytotoxicity not detected by isotope release assays. *J Exp Med* 1989;170:511-26.
- Murata J, Ricciardi-Castagnoli P, Dessous L'Eglise Mange P, Martin F, Juillerat-Jeanneret L. Microglial cells induce cytotoxic effects toward colon carcinoma cells: measurement of tumor cytotoxicity with a gamma-glutamyl transpeptidase assay. *Int J Cancer* 1997;70:169-74.
- Noble PB, Cutts JH. Separation of blood leukocytes by Ficoll gradient. *Can Vet J* 1967;8:110-1.
- Nociari MM, Shalev A, Benias P, Russo C. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1998;213:157-67.
- Nouri AM, Mansouri M, Hussain RF, Dos Santos AV, Oliver RT. Super-sensitive epithelial cell line and colorimetric assay to replace the conventional K562 target and chromium release assay for assessment of non-MHC-restricted cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1995;180:63-8.
- Ohmori H, Takai T, Tanigawa T, Honma Y. Establishment of an enzyme release assay for cytotoxic T lymphocyte activity. *J Immunol Methods* 1992;147:119-24.
- Ortaldo JR, Oldham RK, Cannon GC, Herberman RB. Specificity of natural cytotoxic reactivity of normal human lymphocytes against a myeloid leukemia cell line. *J Natl Cancer Inst* 1977;59:77-82.
- Oumouna M, Jaso-Friedmann L, Evans DL. Flow cytometry-based assay for determination of teleost cytotoxic cell lysis of target cells. *Cytometry* 2001;45:259-66.
- Papadopoulos NG, Dedoussis GV, Spanakos G, Gritzapis AD, Baxevasis CN, Papamichail M. An improved fluorescence assay for the determination of lymphocyte-mediated cytotoxicity using flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994;177:101-11.
- Perez P, Bluestone JA, Stephany DA, Segal DM. Quantitative measurements of the specificity and kinetics of conjugate formation between cloned cytotoxic T lymphocytes and splenic target cells by dual parameter flow cytometry. *J Immunol* 1985;134:478-85.
- Podack ER, Hengartner H, Lichtenheld MG. A central role of perforin in cytolysis? *Annu Rev Immunol* 1991;9:129-57.
- Porter DL, Antin JH. Adoptive immunotherapy for relapsed leukemia following allogeneic bone marrow transplantation. *Leuk Lymphoma* 1995;17:191-7.
- Provinciali M, Di Stefano G, Fabris N. Optimization of cytotoxic assay by target cell retention of the fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate (CFDA) and comparison with conventional 51CR release assay. *J Immunol Methods* 1992;155:19-24.

- Radosevic K, Garritsen HS, Van Graft M, De Grooth BG, Greve J. A simple and sensitive flow cytometric assay for the determination of the cytotoxic activity of human natural killer cells. *J Immunol Methods* 1990;135:81-9.
- Rees RC Mian S. Selective MHC expression in tumours modulates adaptive and innate antitumour responses. *Cancer Immunol Immunother* 1999;48:374-81.
- Reimann KA, O'Gorman MR, Spritzler J, Wilkening CL, Sabath DE, Helm K, Campbell DE. Multisite comparison of CD4 and CD8 T-lymphocyte counting by single- versus multiple-platform methodologies: evaluation of Beckman Coulter flow-count fluorospheres and the tetraONE system. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:333-5.
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097-100.
- Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2002;20:323-70.
- Saal JG, Rieber EP, Riethmuller G. Cell-mediated cytotoxicity for melanoma tumor cells: detection by a (3H) proline release assay. *Scand J Immunol* 1976;5:455-66.
- Sachs L, angewandte Statistik, 9. Auflage 1999, Springer Verlag Berlin.
- Salazar-Fontana LI, Bierer B. T-lymphocyte coactivator molecules. *Curr Opin Hematol* 2001;8:5-11.
- Sano N, Kurata O, Okamoto N, Ikeda Y. A new fluorochromasia method using a fluorescence microplate reader for assay of cytotoxic activity of carp leucocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 1995;47:173-8.
- Scalzo AA. Successful control of virus by NK cells - a balance of opposing forces? *Trends Microbiol* 2002;10:470-4.
- Schafer H, Schafer A, Kiderlen AF, Masihi KN, Burger R. A highly sensitive cytotoxicity assay based on the release of reporter enzymes, from stably transfected cell lines. *J Immunol Methods* 1997;204:89-98.
- Schechter B, Feldman M. An in vitro assay of cell-mediated cytotoxicity. Terminal labeling with 3h-leucine. *Transplantation* 1976;22:337-44.
- Schirrmann T, Pecher G. Tumor-specific targeting of a cell line with natural killer cell activity by asialoglycoprotein receptor gene transfer. *Cancer Immunol Immunother* 2001;50:549-56.
- Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry* 1992;13:204-8.
- Shi TX, Tong MJ, Bohman R. The application of flow cytometry in the study of natural killer cell cytotoxicity. *Clin Immunol Immunopathol* 1987;45:356-65.
- Shimizu Y, DeMars R. Demonstration b class I gene transfer that reduced susceptibility of human cells to natural killer cell-mediated lysis is inversely correlated with HLA class I antigen expression. *Eur J Immunol* 1989;19:447-51.
- Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, Varadi G, Kirschbaum M, Ackerstein A, Samuel S, Amar A, Brautbar C, Ben-Tal O, Eldor A, Or R. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 1998;91:756-63.

- Slezak SE, Horan PK. Cell-mediated cytotoxicity. A highly sensitive and informative flow cytometric assay. *J Immunol Methods* 1989;117:205-14.
- Smith G, Nicklin S. [³H]Uridine uptake by target monolayers as a terminal label in an in vitro cell-mediated cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 1979;25:265-74.
- Smyth MJ, Johnstone RW. Role of TNF in lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Microsc Res Tech* 2000;50:196-208.
- Snyder JE, Bowers WJ, Livingstone AM, Lee FE, Federoff HJ, Mosmann TR. Measuring the frequency of mouse and human cytotoxic T cells by the Lysispot assay: independent regulation of cytokine secretion and short-term killing. *Nat Med* 2003;9:231-6.
- Sponaas AM, Loveland B, Simpson E. MHC-unrestricted T-cell cytotoxicity against tumour cells. *Immunology* 1988;63:233 - 9.
- Stam NJ, Kast WM, Voordouw AC, Pastoors LB, Hoeven FA van der, Melief CJ, Ploegh HL. Lack of correlation between levels of MHC class I antigen and susceptibility to lysis of small cellular lung carcinoma (SCLC) by natural killer cells. *J Immunol* 1989;142:4113 -7.
- Stevenson AP, Martin JC, Stewart CC. Simultaneous measurements of macrophage-induced cytostasis and cytotoxicity of EMT6 cells by flow cytometry. *Cancer Res* 1986;46:99-105.
- Storkus WJ, Alexander J, Payne JA, Dawson JR, Cresswell P. Reversal of natural killer susceptibility in target cells expressing transfected class I HLA genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2361-4.
- Susskind B, Shornick MD, Iannotti MR, Duffy B, Mehrotra PT, Siegel JP, Mohanakumar T. Cytolytic effector mechanisms of human CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes. *Hum Immunol* 1996;45:64-75.
- Swain SL. T cell subsets and the recognition of MHC class. *Immunol Rev* 1983;74:129-42.
- Topakas GN, Karchilaki IN, Cacoullos NT, Stavropoulos-Giokas C. Cell mediated cytotoxicity assessment by relative changes in viable target absolute counts. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2001;23:459-75.
- Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002;2:735-47.
- Tseng SY, Dustin ML. T-cell activation: a multidimensional signaling network. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:575-80.
- Uharek L, Zeis M, Glass B, Steinmann J, Dreger P, Gassmann W, Schmitz N, Müller-Ruchholz W. High lytic activity against human leukaemia cells after activation of allogeneic NK cells by IL-12 and IL-2. *Leukemia* 1996;10:1758 -64.
- Uharek C, Tonn T, Uharek B, Becker S, Schnierle B, Klingemann HG, Wels W. Retargeting of natural killer-cell cytolytic activity to ErbB2-expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction. *Blood* 2002;100:1265-73.
- Verdonck LF, Petersen EJ, Lokhorst HM, Nieuwenhuis HK, Dekker AW, Tilanus MG, de Weger RA. Donor leukocyte infusions for recurrent hematologic malignancies after allogeneic bone marrow transplantation: impact of infused and residual donor T cells. *Bone Marrow Transplant* 1998;22:1057-63.
- Vignali DA. The interaction between CD4 and MHC class II molecules and its effect on T cell function. *Behring Inst Mitt* 1994;94:133-47.

- Virag L, Kerekgyarto C, Fachel J. A simple, rapid and sensitive fluorimetric assay for the measurement of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1995;185:199-208.
- Vivier E, Tomaselle E, Pascale P. Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? *Curr Opin Immunol* 2002;14:306-11.
- Vizler C, Nagy T, Kusz E, Glavinas H, Duda E. Flow cytometric cytotoxicity assay for measuring mammalian and avian NK cell activity. *Cytometry* 2002;47:158-62.
- Wang YY, Zheng XX. A flow cytometry-based assay for quantitative analysis of cellular proliferation and cytotoxicity in vitro. *J Immunol Methods* 2002;268:179-88.
- Watson JV. The early fluidic and optical physics of cytometry. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 1999;38:2-14.
- Weyand C, Hammerling GJ, Goronzy J. Recognition of H-2 domains by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1981;292:627-9.
- Wierda WG, Mehr DS, Kim YB. Comparison of fluorochrome-labeled and ⁵¹Cr-labeled targets for natural killer cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 1989;122:15-24.
- Wilkinson RW, Lee-MacAry AE, Davies D, Snary D, Ross EL. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: a flow cytometry-based assay using fluorophores. *J Immunol Methods* 2001;258:183-91.
- Willemsen RA, Debets R, Hart E, Hoogenboom HR, Bolhuis RL, Chames P. A phage display selected fab fragment with MHC class I-restricted specificity for MAGE-A1 allows for retargeting of primary human T lymphocytes. *Gene Ther* 2001;8:1601-8.
- Wiltrout RH, Frost P, Cummings GD. Isotope-release cytotoxicity assay with the use of indium-111: advantage over chromium-51 in long-term assays. *J Natl Cancer Inst* 1978;61:183-8.
- Yan Y, Steinherz P, Klingemann HG, Dennig D, Childs BH, MyGuirk J, O'Reilly RJ. Antileukemic activity of a natural killer cell line against human leukemias. *Clin Cancer Res* 1998;4:2859-68.
- Zamai L, Mariani AR, Zauli G, Rodella L, Rezzani R, Manzoli FA, Vitale M. Kinetics of in vitro natural killer activity against K562 cells as detected by flow cytometry. *Cytometry* 1998;32:280-5.
- Zarcone D, Tilden AB, Cloud G, Friedman HM, Landay A, Grossi CE. Flow cytometry evaluation of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1986;94:247-55.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aktivierung und Inhibition der NK-Zelle	4
Abb. 2: T-Zellaktivierung: Immunologische Synapse zwischen einer T-Zelle und einer antigenpräsentierenden Zelle.....	6
Abb. 3: Prinzip der Macs-Technik	20
Abb. 4: Prinzip der Rosette-Technik.....	21
Abb. 5: Prinzip der hydrodynamische Fokussierung in der verwendeten Flusszelle.....	22
Abb. 6: Optische Konfiguration des eingesetzten Durchflusszytometers.....	23
Abb. 7: Prinzip der Signalverstärkung	24
Abb. 8: Histogramm, Regionen und Gates	26
Abb. 9: Beispiel einer FSC gegen SSC – Auftragung von Leukozyten aus peripherem Blut	27
Abb. 10: Fluoreszenzspektren eingesetzter Fluorochrome	29
Abb. 11: Kompensationsmatrix bei Einsatz von FITC, PE und 7-AAD.....	30
Abb. 12: Flow-Set-Protokoll für die standardisierte Verstärkungseinstellung	31
Abb. 13: Beispiel eines Kompensationshistogramms	32
Abb. 14: Beispiel einer Multigraph-Analyse	38
Abb. 15: Relative Fluoreszenzintensitäten von 18 cALL-Blastenproben, primären NK-Zellen und NK-92 nach Markierung mit einem PE-konjugierten mAb gegen CD10.....	39
Abb. 16: Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität von Propidiumjodid und 7-AAD.....	42
Abb. 17: Einfluss der verwendeten Reagenzien auf das Überleben der Zellen	44
Abb. 18: Simultane Markierung einer Kokultur aus Blasten und T-Zellen mit mAb gegen Blasten und CD3 ECD, CD4 PC5, CD8 PC5 und PI.....	46
Abb. 19: Gatingstrategie des ersten Assays	49
Abb. 20: NK-92 gegen K562, Auswertung über PI positive Events in der Zielzellpopulation ...	51
Abb. 21: Nachweis einer Konjugatbildung.....	52
Abb. 23: Gatingstrategie der zweiten Assayvariante	54
Abb. 24: Ratioabhängige Konzentrationsänderungen der Ziel- und Effektorzellen in Kokultur	56
Abb. 25: Gatingstrategie der letzten Assayvariante	59
Abb. 26: Vergleich der Auswertung über PI positive und PI negative Events	61
Abb. 27: Validierung der durchflusszytometrischen Assays mittels Europium-Release-Assay .	62
Abb. 28: Zeitverlauf der Kokultur von NK-Zellen und K562	63
Abb. 29: Zwei Modelle des Verhältnisses von spezifischer Lyse zu Spontanverlusten.....	83

Herleitungen der benutzten Formeln zur Berechnung des Ergebnisses der Zytotoxizitäts-Assays

Bereinigung der betrachteten Populationen um gegenseitige Streuung

Voraussetzungen:

- Es wurden Kontrollen gemessen, in denen die beteiligten Zellen alleine Vorlagen.
- Die Regionen zur Eingrenzung der Populationen wurden in den Analysen nach Inkubation nicht verschoben.
- Die Streuung der Populationen in die Regionen der anderen Populationen ist in allen Ansätzen nach Inkubation gleich der der Kontrollen.

Definitionen:

Gemessene Größen:

ΣE = Zahl der im Effektorzellenhistogramm erscheinenden Events

ΣZ = Zahl der im Zielzellenhistogramm erscheinenden Events

Nur in den Kontrollen direkt messbare Größen: Streuung:

a = Zielzellen im Effektorzellenhistogramm

b = Effektorzellen im Zielzellenhistogramm

Gesuchte Größen:

x = Zielzellen im Zielzellenhistogramm

y = Effektorzellen im Effektorzellenhistogramm

Es gilt:

$$\Sigma Z = x + b$$

$$\Sigma E = y + a$$

=>

$$x = \Sigma Z - b \quad (1)$$

$$y = \Sigma E - a \quad (2)$$

Es gilt für die Kontrollen:

Zielzellkontrolle:

$$b = 0$$

$$\Sigma Z = x + b = x$$

$$a/\Sigma Z = a/x = r = \text{konstant}$$

=>

$$a = rx \quad (3)$$

Effektorzellkontrolle:

$$a = 0$$

$$\Sigma E = y + a = y$$

$$b/\Sigma E = b/y = t = \text{konstant}$$

=>

$$b = ty \quad (4)$$

Aus (1) – (4) folgt:

$$x = \Sigma Z - ty = \Sigma Z - t(\Sigma E - a) = \Sigma Z - t(\Sigma E - rx) = \Sigma Z - t\Sigma E + trx$$

$$\Rightarrow x - trx = x(1 - tr) = \Sigma Z - t\Sigma E \Rightarrow$$

$$\boxed{x = (\Sigma Z - t\Sigma E)/(1 - tr)}$$

Die Gleichungen nach y aufgelöst ergeben analog:

$$\boxed{y = (\Sigma E - r\Sigma Z)/(1 - tr)}$$

Sind die o.g. Voraussetzungen erfüllt, läßt sich anhand dieser Gleichungen die Zahl an Ziel- und Effektorzellen abzüglich der Streuung der jeweils anderen Population in den Reaktions-Ansätzen berechnen.

Berechnung der Konzentrationsänderung in den Kokulturen:

Aus den Ergebnissen der Streuungskorrektur können die Konzentrationsänderungen (entspricht für Zielzellen der zytotoxischen Aktivität der Effektoren) der verschiedenen Populationen berechnet werden:

Definitionen:

k: errechnete Konzentration der betrachteten Population (aus gemessener Anzahl von Zellen, Beads und deren bekannten anteiligen Volumina abzüglich der Streuung)

Kontrolle vor/nach: Kontrolle vor/nach Kokultur

Kokultur vor/nach: Kokulturansatz von Ziel- und Effektorzellen vor/nach Kokultur

Es gilt:

Anteil überlebender Zellen in Kontrollen:

$$a = k_{\text{Kontrolle nach}} / k_{\text{Kontrolle vor}} \quad (1)$$

Bereinigung der gemessenen Konzentration um Spontanveränderungen:

$$k_{\text{Kokultur vor bereinigt}} = k_{\text{Kokultur vor}} * a \quad (2)$$

Anteil Überlebender in den Kokulturen:

$$b = k_{\text{Kokultur nach}} / k_{\text{Kokultur vor bereinigt}} \quad (3)$$

Verlust Überlebender in den Kokulturen:

$$\Delta k_{\text{Kokultur}} = 1 - b \quad (4)$$

aus (1) – (4) ergibt sich:

$$\Delta k_{\text{Kokultur}} = 1 - k_{\text{Kokultur nach}} / (k_{\text{Kokultur vor}} * k_{\text{Kontrolle nach}} / k_{\text{Kontrolle vor}})$$

oder

$$\Delta k_{\text{Kokultur}} = \left(1 - \frac{k_{\text{Kokultur nach}} * k_{\text{Kontrolle vor}}}{k_{\text{Kokultur vor}} * k_{\text{Kontrolle nach}}} \right) * 100\%$$

Berechnung der zytotoxischen Aktivität als % PI positive Zielzellen der Gesamtzielzellen nach Modell 2:

Definitionen:

p = % PI positive tote Zellen der betrachteten Population

q = % PI negative überlebende Zellen der betrachteten Population

s = Spontantote

Gemessene Größen:

P_{Kokultur}

$P_{\text{Kontrolle}}$

Q_{Kokultur}

$Q_{\text{Kontrolle}}$

Gesuchte Größen:

$S_{q(\text{Kokultur})}$ = Spontantote *der nicht spezifisch lysierten* Zielzellen der Kokulturansätze

x = spezifische Lyse der Kokulturansätze

Es gilt:

$$X_{\text{Kokultur}} = P_{\text{Kokultur}} - S_{q(\text{Kokultur})} \quad (1)$$

$$S_{q(\text{Kokultur})}/Q_{\text{Kokultur}} = S_{\text{Kontrolle}}/Q_{\text{Kontrolle}} = P_{\text{Kontrolle}}/Q_{\text{Kontrolle}}$$

=>

$$S_{q(\text{Kokultur})} = Q_{\text{Kokultur}} * P_{\text{Kontrolle}}/Q_{\text{Kontrolle}} \quad (2)$$

Aus (1) und (2) ergibt sich:

$$X_{\text{Kokultur}} = P_{\text{Kokultur}} - Q_{\text{Kokultur}} * P_{\text{Kontrolle}}/Q_{\text{Kontrolle}}$$

oder

$$\text{zytotoxische Aktivität} = P_{\text{Kokultur}} - Q_{\text{Kokultur}} * \frac{P_{\text{Kontrolle}}}{Q_{\text{Kontrolle}}}$$

P = PI positive Zielzellen, Q = PI negative Zielzellen

Abkürzungsverzeichnis und Definitionen

7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
ADCC	<i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DZM	Durchflusszytometrie
ECD	<i>energy coupled dye</i> , Texas Red-Phycoerythrin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E:T-Ratio	Effektor:Target-Ratio
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiozyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	<i>forward scatter</i> , Vorwärtstreuung
g	Erdbeschleunigungskonstante
GvHD	<i>Graft-versus-Host-Erkrankung</i>
GvL	<i>Graft-versus-Leukämie-Reaktion</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> , menschliches Leukozytenantigen
IL	Interleukin
IF	Interferon
Ig	Immunglobulin
mAb	<i>monoclonal antibody</i> , monoklonaler Antikörper
Macs	<i>magnet activated cells sorting</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Hauptgewebsverträglichkeitskomplex
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
Panel	Festgelegte Abfolge von Protokollen, welche untereinander verknüpft sein können
PC5	Phycoerythrin-Cyanin 5.1
PBS w/o	<i>phosphate buffered saline without</i> , kalzium- und magnesiumfreie gepufferte Salzlösung
PI	Propidiumjodid
Protokoll	Software-Maske für die Darstellung durchflusszytometrischer Messdaten
PE	Phycoerythrin
RFI	Relative Fluoreszenzintensität
RT	Raumtemperatur
SSC	<i>side scatter</i> , Seitwärtsstreuung
TZR	T-Zellrezeptor

Danksagungen

Eine umfangreiche Methodenentwicklung als Doktorarbeit ist in der Humanmedizin ungewöhnlich und erfordert vielfältiges Know-How, Logistik, Geld und gute Worte. So bin ich im Großen wie im Kleinen kontinuierlich durch eine ganze Reihe von Menschen unterstützt worden, die dadurch Wesentliches zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich hoffe, die Befruchtung war nicht einseitig, sondern dass ich auch etwas zurückgegeben habe.

Mein Dank gilt

Prof. Dr. med. T. Klingebiel für die Annahme als Doktorandin,

Dr. Ulrike Köhl für den Anstoß zu diesem Thema und den Initialfunken, die fruchtbaren, mitunter mediterran lebhaften Diskussionen, das freundschaftliche Arbeitsklima, die ausdauernde, nachhaltige Unterstützung in jeder Hinsicht und das funktionstüchtige Modell-Minifahrrad zum Geburtstag,

Dr. Ruth Esser für anregende Gedanken, Papers und präzises Nachhaken und Durchdenken,

Dr. Eckhard Rohrbach für die Unterstützung bei der Materialbeschaffung, den ermutigenden Zuspruch und den „Einsatz im Hintergrund“,

Ilse Bühler für die Einführung in „den alten PKH 67-Zytotox“ und die Unterstützung bei den ersten Versuchsdurchführungen mit heiterem Wesen und Humor,

Andrea Brinkmann für „Gefummel“ an diversen Durchflusszytometern und die Übernahme des fertigen Assays,

Stephanie Grohal für die Unterstützung bei den Zellkulturen,

Yvonne Einhäuser, Regine Quaritsch und Carla Kramm für die Unterstützung bei den Selektionen,

Dr. Kristin Junker für die Aufgabe mit den T-Zellen,

Dr. Christoph Uherek und Tina Müller aus dem Georg-Speyer-Haus für Unterstützung beim Europium-Assay,

allen Mitarbeiterinnen und dem (meist) einzigen Mitarbeiter des KMT-Labors für die gute Zusammenarbeit: Es hat auf jeden Fall Spaß gemacht,

den Patientinnen und Patienten und ihren Eltern für die Überlassung des Probenmaterials,

dem Verein „Hilfe für Krebskranke Kinder Frankfurt e.V.“, durch dessen Unterstützung diese Arbeit möglich wurde

... und natürlich meinen Eltern für Unterstützung und die Lektionen der Vergangenheit und Gegenwart und vor allem meinem Lebensgefährten, der mich trotzdem ertragen hat.

Veröffentlichungen

Papers

Junker K, Koehl U, **Zimmermann S**, Stein S, Schwabe D, Klingebiel T, Grez M. Kinetics of cell death in T lymphocytes genetically modified with two novel suicide fusion genes. *Gene Ther* 2003;10:1189-97.

Zimmermann S, Klingebiel B, Koehl U, Sörensen J, Schwabe D. Tecelac as antithymocyte globulin in childhood allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*;29:957-62 (2002).

Koehl U, **Zimmermann S**, Esser R, Sörensen J, Grüttner HP, Duchscherer M, Seifried E, Klingebiel T, Schwabe D. Autologous transplantation of CD133 selected haematopoietic progenitor cells in a paediatric patient with relapsed leukemia. *Bone Marrow Transplant*;29:927-30 (2002).

Koehl U, **Zimmermann S**, Esser R, Junker K, Sörensen J, Grüttner HP, Henschler R, Seifried E, Martin H, Grez M, Klingebiel T, Schwabe D. CD34 and CD133-selection: from purging of stem cell grafts to purification of gene modified T-cells. *Bone Marrow Transplant*;30 (Supplement 1):S44-5 (2002).

Abstracts

Zimmermann SY, Esser R, Rohrbach E, Klingebiel T, Schwabe D, Koehl U. Cytotoxic activity of NK cells and T cells against leukemic blasts: simultaneous detection of effector proliferation, surface marker changes and killing efficiency by four-colored flow cytometric analysis. *J Biol Regul Homeost agents*;16:A10 (2002).

Koehl U, Junker K, **Zimmermann S**, Esser R, Schwabe D, Klingebiel T, Grez M. Highly purified CD3+ T-cells for suicide gene transduction: Feasibility for immunotherapy with large number of donor lymphocytes after allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant*;29:O267 (2002).

Zimmermann S, Schwabe D, Bühler I, Esser R, Rohrbach E, Sörensen J, Grüttner HP, Klingebiel T, Koehl U. A novel quantitative assay to determine the cytotoxic activity of lymphokine activated killer cells by multi-parameter flow cytometry. *Bone Marrow Transplant*;27:S136 (2001).

Grüttner HP, Koehl U, Bochenek K, Andreas C, **Zimmermann S**, Gunkel M, Esser R, Bartling T, Sörensen J, Rohrbach E, Brinkmann A, Klingebiel T, Schwabe D. Optimum timing of apheresis following G-CSF in autologous setting: monitoring of CD34⁺ cell concentration in the peripheral blood of children within 24 hours before apheresis. *Bone Marrow Transplant*;27:P754 (2001).

Koehl U, Esser R, **Zimmermann S**, Gunkel M, Bartling T, Grüttner HP, Sörensen J, Kotchetkov R, Martin H, Grohal S, Petershofen E, Seifried E, Vogel JU, Cinatl J, Schumm M, Lang P, Handgretinger R, Klingebiel T, Schwabe D. Large scale purification of progenitor cells by AC133⁺ selection. *Bone Marrow Transplant*;27:P736 (2001).

Koehl U, Esser R, **Zimmermann S**, Grüttner HP, Sörensen J, Martin H, Petershofen E, Seifried E, Schumm M, Lang P, Handgretinger R, Schwabe D, Klingebiel T. Clinical scale purification of progenitor cells by CD133⁺ selection: From laboratory experience to the first transplantation of a pediatric patient with relapsed leukemia. *Blood*;98:3533 (2001).

Bochenek K, Andreas C, Koehl U, Bartling T, Esser R, Gunkel M, **Zimmermann S**, Rohrbach E, Gruettner HP, Kornhuber B, Schwabe D. Optimized timing for apheresis of CD34+ blood progenitor cells in autologous setting: monitoring of progenitor cell concentration in peripheral blood of children within 24 hours before apheresis. *Klin Pädiatr*;212:130 (2000).

Lebenslauf



Stefanie-Yvonne Zimmermann
geb. 08. Nov 1970 in Waiblingen
Familienstand: ledig
Alt-Griesheim 32
65933 Frankfurt

Schullaufbahn

1977-1981	Grundschule Deutsche Schule Abu Dhabi, VAE
1981-1982	Christopherusschule Versmold
1982-1988	Johannes-Kepler-Gymnasium Ibbenbüren
1988-1989	Auslandsaufenthalt Anbu Khareini, Nepal
1989-1991	Augustinerschule Friedberg/Hessen
08. Juni 1991	Abitur

Studium

1991-1992	Humanmedizin, Christian-Albrechts-Universität Kiel
WS1991/92	Geologie, Technische Universität Darmstadt
SS 1992	Fahrradreise San Francisco – Boston
1992-1999	Humanmedizin, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt
27.3.1995	Ärztliche Vorprüfung
29.8.1996	erster Abschnitt Ärztliche Prüfung
10.9.1998	zweiter Abschnitt Ärztliche Prüfung
23.11.1999	dritter Abschnitt Ärztliche Prüfung

Beruflicher Werdegang

2000-2001	Ärztin im Praktikum, Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt
seit 10/2001	Assistenzärztin und wissenschaftliche Mitarbeiterin, Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Entwicklung einer Methode zur Untersuchung der zytotoxischen Aktivität von NK- und T-Zellen gegen Leukämieblasten mittels Vierfarb-Durchflusszytometrie“

an der Klinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin III, Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Hämostaseologie

unter Betreuung durch Prof. Dr. med. T.Klingebl

und Anleitung von Dr. phil. nat. Ulrike Köhl

mit Unterstützung durch die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Labors für Stammzelltransplantation und Immuntherapie ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Teile dieser Arbeit wurden bisher veröffentlicht in: Junker K, Koehl U, Zimmermann S, Stein S, Schwabe D, Klingebiel T, Grez M. Kinetics of cell death in T lymphocytes genetically modified with two novel suicide fusion genes. Gene Ther 2003;10:1189-97.

Frankfurt am Main, 2003



Stefanie-Yvonne Zimmermann