

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele

**„Untersuchungen zur natürlichen und Aminobisphosphonat-
induzierten antileukämischen Aktivität von humanen allogenen
V γ 9V δ 2 T-Zellen gegenüber akuter myeloischer Leukämie“**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Stefan Gundermann
aus Würzburg

Würzburg, Juni 2014

Referent: Univ.- Prof. Dr. med. Volker Kunzmann
Koreferent: Univ.- Prof. Dr. rer. nat. Thomas Herrmann

Dekan: Univ.- Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2014

Der Promovend ist Arzt

Für meine Familie

Publikationsliste

Auszüge der vorliegenden Dissertation sind in folgende Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge eingegangen:

Abstract/Tagungsbeitrag:

Gundermann S, Klinker E, Einsele H, Kunzmann V. Immunotargeting of primary acute myeloid leukemia by allogeneic $\gamma\delta$ T cells. Onkologie 2012; 35 (suppl 6):1-259, Posterpräsentation auf der Jahrestagung der DGHO 2012, 19-23.10.2012 in Stuttgart

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften:

Gundermann S, Klinker E, Kimmel B, Flierl U, et al., A comprehensive analysis of primary acute myeloid leukemia identifies biomarkers predicting susceptibility to human allogeneic V γ 9V δ 2 T cells. J Immunotherapy. 2014; 37 (6): 321-30

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die akute myeloische Leukämie.....	1
1.1.1 Definition und Leukämogenese.....	1
1.1.2 Epidemiologie	1
1.1.3 Prognosemerkmale.....	2
1.1.4 Induktions- und Post-Remissionstherapie	2
1.1.5 Adoptive Immuntherapien im Nicht-Transplantationssetting.....	4
1.2 Humane $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen	6
1.2.1 $\gamma\delta$ T-Zellen.....	6
1.2.2 $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen.....	6
1.2.3 Spezifische Tumorzellerkennung von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen	10
1.2.4 Pharmakologische Inhibitoren des Mevalonatmetabolismus	13
1.2.5 Immuntherapien mit autologen $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen	16
1.3 Problemstellung und Zielsetzung	17
2 MATERIAL UND METHODEN.....	19
2.1 Material	19
2.1.1 Reagenzien und Stimulanzen.....	19
2.1.2 Chemikalien	20
2.1.3 Zellkulturmedien und Puffer	20
2.1.4 Antikörper und Farbstoffe.....	21
2.1.5 Laborbedarf	23
2.1.6 Durchflusszytometer und Geräte.....	23
2.1.7 Humane Primärzellen.....	24
2.1.8 Humane Zelllinien	25
2.2 Methoden	26
2.2.1 Zellkultur	26
2.2.2 Zell-Separation von Spenderleukapereseprodukten.....	26
2.2.3 $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-Proliferation und Aufreinigung der Effektorzellen	27

2.2.4	Isolierung, Kultivierung und Stimulation von primären AML-Zellen	28
2.2.5	Phänotypische Charakterisierung der AML-Zellen	28
2.2.6	Bestimmung des Differenzierungsstatus der AML-Zellen	29
2.2.7	Aktivitätsbestimmung der HMG-CoA-Reduktase mittels Phosflow	29
2.2.8	Zellulärer Zytotoxizitätsassay	29
2.2.9	Statistik	30
3	ERGEBNISSE	32
3.1	Deskriptive Datenanalyse	32
3.2	Allogene Vγ9Vδ2 T-Zelllinien aus TZR $\alpha\beta$ depletierten Leukaphereseprodukten	34
3.2.1	Proliferation von TZR $\alpha\beta$ depletierten V γ 9V δ 2 T-Zellen.....	34
3.2.2	Zytotoxische Aktivität von TZR $\alpha\beta$ depletierten V γ 9V δ 2 T-Zellen	35
3.3	Natürliche Antileukämieantwort von HLA-inkompatiblen Vγ9Vδ2 T-Zellen .	35
3.3.1	Natürliche Suszeptibilität primärer AML-Zellen gegenüber V γ 9V δ 2 T-Zellen	35
3.3.2	Zelloberflächenexpression Killer-aktivierender und inhibierender Liganden auf primären AML-Zellen.....	36
3.3.3	Korrelation zwischen der antileukämischen Aktivität von V γ 9V δ 2 T-Zellen und der Expression Killer-aktivierender und inhibierender Liganden	38
3.3.4	Korrelation zwischen der Antileukämieantwort von V γ 9V δ 2 T-Zellen und der KIR-Liganden-Inkompatibilität zwischen Patienten und Spendern.....	39
3.4.	Induktion der Antileukämieantwort von Vγ9Vδ2 T-Zellen durch Zoledronat-induzierte Hemmung des Mevalonatmetabolismus der AML-Blasten	41
3.4.1	Direkter zytotoxischer Effekt von Zoledronat auf AML-Blasten	41
3.4.2	Zoledronat-induzierte Zytotoxizität allogener V γ 9V δ 2 T-Zellen gegenüber primären AML-Blasten	42
3.4.3	Aktivität des Mevalonatmetabolismus in Zoledronat-sensitiven und resistenten AML-Blasten	44
3.4.4	Korrelation zwischen der antileukämischen Aktivität von V γ 9V δ 2 T-Zellen und dem Differenzierungsstatus der AML-Blasten	45
4	DISKUSSION	48
4.1	Stellenwert von Spenderlymphozyten der natürlichen Immunantwort im Transplantations- und Nicht-Transplantationssetting	48

4.2 Stellenwert des NKG2D-Signalwegs in der Antileukämieantwort von allogenen Vγ9Vδ2 T-Zellen	49
4.3 Stellenwert der Zoledronatvorbehandlung primärer AML-Zellen für die antileukämische Aktivität von Vγ9Vδ2 T-Zellen	53
4.4 Schlussfolgerung und Perspektive	56
5 ZUSAMMENFASSUNG	58
6 LITERATURVERZEICHNIS	61
7 DANKSAGUNG	VIII
8 CURRICULUM VITAE	IX

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Der $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellrezeptor.	9
Abb. 2: Schematische Darstellung des Mevalonatmetabolismus.....	15
Abb. 3: Dot-Plot eines repräsentativen Zytotoxizitätassays.	30
Abb. 4: Phosphoantigen-induzierte Proliferation von TZR $\alpha\beta$ depletierten $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen.	34
Abb. 5: Zytotoxische Aktivität TZR $\alpha\beta$ depletierter und PAg-expandierter $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber Daudi-Zellen.....	35
Abb. 6: Natürliche antileukämische Aktivität von allogenen $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen.....	36
Abb. 7: Zelloberflächenexpression von Killer-aktivierenden und inhibierenden Liganden auf primären AML-Zellen.	37
Abb. 8: Relativer Anteil an Leukämien mit intermediärer und hoher Oberflächenexpression von Killer-aktivierenden und inhibierenden Liganden.	38
Abb. 9: Zellviabilität von AML-Blasten nach Koinkubation mit Zoledronat.....	41
Abb. 10: Zoledronat-abhängige Zytotoxizität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber primären AML-Blasten.	42
Abb. 11: Heterogene $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegenüber unbehandelten und Zoledronat-vorbehandelten AML-Blasten.....	43
Abb. 12: Unterschiedliche Suszeptibilität unbehandelter und Zoledronat-vorbehandelter AML-Blasten gegenüber $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen.	44
Abb. 13: Aktivität der HMG-CoA-Reduktase in Zoledronat-responsiven und refraktären AML-Zellen.	45
Abb. 14: Zuordnung des Differenzierungsstatus der Leukämiezellen zu den beobachteten Reaktionsgruppen.	46

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABP	Aminobisphosphonate
AK	Antikörper
allo-HSCT	allogene Stammzelltransplantation
AML	Akute myeloische Leukämie
AMP	Antigenpräsentierendes Molekül
ANOVA	Analysis of Variance
APC	Antigenpräsentierende Zellen
APC	Allophycocyanin
APC700	Allophycocyanin 700
Ara-C	Cytarabin
BP	Bisphosphonate
BrHPP	Bromohydrinpyrophosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
BTN	Butyrophilin
CD	Cluster of Differentiation
CDR	Complementarity Determining Region
CoA	Coenzym A
CMV	Cytomegalievirus
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNAM1	DNAX-Accessory-Molecule 1
ECD	Phycoerythrin-Texas Red
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E:T Ratio	Effektor:Target Ratio
et al.	et alii
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanate

Abkürzungsverzeichnis

FPP	Farnesylpyrophosphat
FSC	Forward Scatter
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GPP	Geranylpyrophosphat
HBSS	Hank´s Balanced Salt Solution
HEK-293-Zelllinie	humane embryonale Nierenzellen
HDAC	Histon-Deacetylase
HiDAC	High dose intermittent Ara-C
HLA	Human Leukocyte Antigen
ICAM1	Intercellular Adhaesion Molecule 1
IE	Internationale Einheit
IL-2	Interleukin-2
IPP	Isopentenylpyrophosphat
KIR	Killer-Immunglobulin-Receptor
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
Mean	Mittelwert
MDR	Multi Drug Resistance
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MEP	Methylerythritolphosphatweg
MIC	MHC class I polypeptide-related sequence
MHC	Major Histocompatibility Complex
MVA	Mevalonat
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NKG2D	Natural killer group 2, member D
NKT-Zelle	Natürliche Killer-T-Zellen
NRM	Non-Relapse Mortality
OS	Overall Survival
PAM	Pamidronat
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline
PC3	Phycoerythrin-Cyanine 3
PC7	Phycoerythrin-Cyanine 7

Abkürzungsverzeichnis

PE	Phycoerythrin
RNA	Ribonukleinsäure
PRT	Post-Remissionstherapie
rh	recombinant
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
shRNA	small harpin RNA
SSC	Sideward Scatter
TSA	tumorspezifische Antigene
TZR	T-Zellrezeptor
U	Unit
u. a.	unter anderen
ULBP	UL16-binding protein
z. B.	zum Beispiel
ZOL	Zoledronat
$\alpha\beta$	alpha-beta
$\gamma\delta$	gamma-delta
μM	mikromolar

1 Einleitung

1.1 Die akute myeloische Leukämie

1.1.1 Definition und Leukämogenese

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne klonale Neoplasie myeloischer Vorläuferzellen des Knochenmarks mit variablen Zellreifungsblock, unkontrollierter Proliferation und Apoptoseresistenz. Durch Verdrängung der physiologischen Hämatopoese kommt es zur Knochenmarksinsuffizienz mit Anämie, Granulozytopenie und Thrombozytopenie. Die AML ist eine genetisch heterogene Erkrankung. Die für die Leukämogenese notwendigen genetischen Aberrationen werden fast immer erst im Laufe des Lebens erworben. Bekannte Ursachen sind Exposition gegenüber Chemikalien (Benzol), ionisierender Strahlung (Hiroshima, Nagasaki) und Chemotherapeutika (Topoisomerase II Hemmer). In der Mehrzahl der Fälle sind allerdings keine auslösenden exogenen Faktoren nachweisbar. Die AML ist zudem mit einer Reihe von angeborenen genetischen Anomalien (z. B. Trisomie 21, Fanconi Anämie) sowie malignen hämatologischen Erkrankungen (z. B. Myelodysplastisches Syndrom [MDS]) assoziiert (1).

1.1.2 Epidemiologie

In Deutschland erkrankten 2010 etwa 11.500 Menschen an einer Leukämie. Bei einem Viertel wurde die Diagnose AML gestellt (2). Die AML ist demnach die häufigste akute Leukämie des Erwachsenen mit einem medianen Erkrankungsalter von 65 Jahren. In den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) und Europa liegt die jährliche Inzidenz derzeit stabil bei 3 bis 5 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner. Die Inzidenz ist altersabhängig und steigt bei über 65-Jährigen bis auf 12 Fälle pro 100.000 Einwohner an (3, 4).

Unter Berücksichtigung der steigenden Lebenserwartung der europäischen und US-amerikanischen Bevölkerung ist in den kommenden Jahrzehnten mit einer Zunahme der Zahl an neudiagnostizierten Fällen zu rechnen.

1.1.3 Prognosemerkmale

Das Therapieansprechen, Gesamt (OS)- und krankheitsfreies Überleben (DFS) von Patienten mit AML ist heterogen und von individuellen Patienten- und übergeordneten leukämiespezifischen Merkmalen abhängig.

Aufgrund rekurrenter zytogenetischer Aberrationen der Leukämiezellen lassen sich eine günstige, intermediäre und ungünstige Risikogruppe unterscheiden, die mit dem DFS und OS signifikant korrelieren. Der Karyotyp der leukämischen Blasten ist derzeit der wichtigste unabhängige Prognoseparameter der AML (5-7). Allerdings verteilen sich die zytogenetischen Veränderungen nicht gleichmäßig über alle Altersgruppen (8). Bei der Hälfte aller AML-Patienten können keine günstigen oder ungünstigen zytogenetischen Merkmale nachgewiesen werden (= intermediäre Risikogruppe). Da bei der Mehrheit der Patienten der intermediären Risikogruppe allerdings spezifische molekulare Aberrationen nachweisbar sind erfolgt die Risikoallokation zytogenetisch normaler Leukämien anhand prognosebestimmender Genmutationen bzw. Genüberexpressionen (9, 10). Während das Vorliegen ungünstiger zytogenetischer und molekularer Aberrationen und vorausgegangene Myelodysplasie mit Therapieresistenz und frühzeitigem Erkrankungsrückfall assoziiert sind, korrelieren Alter und Allgemeinzustand des Patienten mit früher therapieassoziierter Mortalität (11). Ältere Patienten (≥ 60 Jahre) zeigen gegenüber AML-Patienten ≤ 60 Jahre ein deutlich geringeres DFS und OS. Die Festlegung der Altersgrenze ist arbiträr und nicht evidenzbasiert. Allerdings zeigen Patienten ≥ 60 Jahre häufig eine ungünstigere Tumorbiologie und Überexpression Multi-Drug-Resistance (MDR)-assoziierter Gene sowie eine höhere Prävalenz therapielimitierender Komorbiditäten (12, 13). Auch unter Berücksichtigung dieser Faktoren stellt das Alter des Patienten einen unabhängigen Prognosemarker dar (14-16).

1.1.4 Induktions- und Post-Remissionstherapie

Das OS von Patienten ≤ 60 Jahren hat sich in den letzten drei Jahrzehnten kontinuierlich verbessert. Dennoch liegt das 5-Jahres-Überleben von Patienten ≤ 60 Jahren nur bei 30 bis 40 %. Die Überlebensraten für Patienten ≥ 60 Jahre

haben sich in den letzten Jahrzehnten kaum verändert. Das 5-Jahres-Überleben liegt lediglich bei 10 bis 15 % (13, 17).

Patienten \leq 60 Jahre

Mit der standardisierten Kombination von Cytarabin (Ara-C) und anthrazyklinhaltiger Induktionstherapie („7+3“ Schema) erzielen bis zu 80 % aller Patienten \leq 60 Jahre eine komplette Remission (CR) (18). Dennoch würde die überwiegende Mehrheit dieser Patienten ohne eine intensiviertere Post-Remissionstherapie (PRT) innerhalb kürzester Zeit einen Erkrankungsrückfall erleiden (18, 19). Die PRT mit Hochdosis-Cytarabin (HiDAC) ist bis auf definierte biologische Subgruppen, die Standardtherapie für Patienten mit günstigen zytogenetischen Aberrationen in kompletter Remission (CR). Demgegenüber belegen Metaanalysen einen signifikanten Überlebensvorteil für Patienten mit ungünstigen genetischen Veränderungen nach allogener Stammzelltransplantation (allo-HSCT) (20). Für Patienten der intermediären Risikogruppe mit fehlenden zytogenetischen Aberrationen liegen keine einheitlichen Therapieempfehlungen vor. Die Wahl der PRT ist überwiegend vom Vorliegen ungünstiger molekularer Prognosemarker bzw. von der Verfügbarkeit verwandter HLA-kompatibler Stammzellspender abhängig (21). Allerdings konnte eine kürzlich veröffentlichte Matched-Pair-Analyse von Stelljes et al. zeigen, dass die allo-HSCT bei Patienten der intermediären Risikogruppe, unabhängig von molekularen Leukämiemerkmale und Spenderauswahl (familiär- bzw. fremdallogen), der chemotherapiebasierten PRT im DFS und OS signifikant überlegen ist (22).

Patienten \geq 60 Jahre

Patienten \geq 60 Jahre zeigen deutlich geringere Ansprech- und Gesamtüberlebensraten gegenüber AML-Patienten \leq 60 Jahre. Dennoch ist der ungünstige Therapieverlauf älterer Patienten ist nicht ausreichend durch eine höhere Frequenz nachteiliger Prognosefaktoren erklärt (16). Mit intensivierter Induktionstherapie erreichen 50 bis 60% aller geeigneten Patienten \geq 60 Jahre eine komplette Remission (23). Allerdings sind ältere Patienten häufig aufgrund

therapielimitierender Komorbiditäten oder reduziertem Allgemeinzustand für eine intensiverte Therapie nicht geeignet. Zur individuellen Abschätzung der Wahrscheinlichkeit welcher Patient von einer intensivierten Therapie profitiert stehen eine Reihe von validierten Prognose-Scores zur Verfügung (11, 24). Die konventionelle myeloablative allo-HSCT ist bei Patienten ≥ 60 Jahren mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert (25). Durch die Einführung dosisreduzierter Konditionierungsregime (RIC) stellt die allo-HSCT allerdings auch für sorgfältig selektionierte Patienten ≥ 60 Jahre eine mögliche Therapieoption dar (26).

1.1.5 Adoptive Immuntherapien im Nicht-Transplantationssetting

Die allo-HSCT ist nach aktueller Studienlage für Patienten mit ungünstigem und intermediärem Risiko die effektivste PRT (22). Allerdings ist eine erhebliche Patientenanzahl aufgrund von Alter, terapielimitierenden Komorbiditäten oder fehlenden HLA-kompatiblen Stammzellspendern für eine allo-HSCT nicht geeignet. Daher sind innovative Behandlungsstrategien dringend notwendig.

Der therapeutische Erfolg der allo-HSCT, insbesondere im Kontext reduzierter Konditionierungsintensität, ist weniger auf das zytoreduktive Konditionierungsregime, sondern überwiegend auf den immunologischen „graft-versus-leukemia“ (GvL)-Effekt zurückzuführen (27, 28). Während der GvL-Effekt in der HLA-kompatiblen allo-HSCT von alloreaktiven $\alpha\beta$ T-Zellen unterhalten wird, zeigen retrospektive Studien, dass der GvL-Effekt im HLA-inkompatiblen Transplantationsmodell (haploidente HSCT; [haplo-HSCT]) von Effektoren der natürlichen Immunantwort (NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen) unterhalten wird (29, 30). Ruggeri et al. konnten erstmals zeigen, dass der Nachweis Killerzell-Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor (KIR)-Liganden-inkompatibler, alloreaktiver NK-Zellen mit einem signifikanten Überlebensvorteil und einer geringeren „graft-versus-host“ (GvH)-Reaktion assoziiert ist (30). Die bisher prospektiv durchgeführten klinischen Phase I/II-Studien im Nicht-Transplantationssetting haben sich daher ausschließlich auf NK-Zellen fokussiert. Miller et al. und Curti et al. konnten zeigen, dass adoptiv transferierte und zum Teil *in vivo* expandierte NK-Zellen bei Patienten mit Hochrisiko-AML objektive Remissionen erzielen können

(31, 32). In einer von Rubnitz et al. publizierten Phase I/II Studie erhielten Kinder und Jugendliche mit genetisch günstiger oder intermediärer AML nach lymphozytendepletierender Chemotherapie KIR-Liganden-inkompatible NK-Zellen von haploidenten Spendern. Zur NK-Zell-Aktivierung und Expansion wurde eine vergleichsweise geringe IL-2-Dosis verabreicht. Alle Patienten zeigten ein transientes NK-Zell-Engraftment ohne Zeichen einer GvHD. Das ereignisfreie Überleben lag nach zwei Jahren bei 100% (33). Vergleichbare prospektive klinische Studien mit allogenen $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen liegen derzeit noch nicht vor. Die bisherigen Studiendaten, die das antileukämische Potenzial von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen untersuchten, beruhen auf präklinischen und klinischen Untersuchungen mit autologen $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen (34, 35). Mehrere Arbeitsgruppen konnten allerdings zeigen, dass die Effektorfunktion autologer phosphoantigenreaktiver $\gamma\delta$ T-Zellen bei verschiedenen Tumorentitäten supprimiert ist (36-38). Das antileukämische Potenzial allogener *in vivo* expandierter $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen ist in der klinischen Forschung bislang noch nicht überprüft worden.

1.2 Humane $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen

1.2.1 $\gamma\delta$ T-Zellen

$\gamma\delta$ T-Zellen oder „*innate-like-lymphocytes*“, sind eine konservierte Subpopulation humaner T-Lymphozyten (1 bis 5%), die den $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor (TZR) exprimieren und spezifische Eigenschaften der angeborenen und adaptiven Immunantwort aufweisen. $\gamma\delta$ T-Zellen sind präaktivierte bzw. „Gedächtnis“ (Memory) T-Lymphozyten, die über Sekretion von Granzymen, Perforin, Zytokinen (Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interferon (INF)- γ), Induktion von Apoptose (FAS- und TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-Signalweg) und antikörperabhängiger zellvermittelter Zytotoxizität (ADCC) an der natürlichen Immunantwort gegenüber mikrobiellen Pathogenen und infektiös- oder maligne transformierten Zellen („*Immunosurveillance*“) beteiligt sind. $\gamma\delta$ T-Zellen haben Eigenschaften professioneller antigenpräsentierender Zellen (APC) und regulieren über ein Spektrum von immunmodulatorischen und immunregulatorischen Zytokinen die Immunantwort des angeborenen und adaptiven Immunsystems und tragen dadurch zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase bei (39, 40).

1.2.2 $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen

Im peripheren Blut zirkulierende $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren mit überwiegender Mehrheit den $V\gamma 9V\delta 2$ -TZR (60 bis 95%) (41). Die Prädominanz des $V\gamma 9V\delta 2$ -TZR besteht nicht von Geburt an. Sie wird während der Kindheit erworben und persistiert im Erwachsenen lebenslang (42). Der Mechanismus der Antigenerkennung von TZR $V\gamma 9V\delta 2$ -Zellen unterscheidet sich deutlich von TZR $\alpha\beta$ Zellen. Im Unterschied zu TZR $\alpha\beta$ Lymphozyten führt die TZR-abhängige Antigenerkennung von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen nicht zu einer Konformationsänderung der CD3-Untereinheit (43). Der $V\gamma 9V\delta 2$ -TZR erkennt natürlich vorkommende phosphorylierte, nicht-peptidische Intermediärprodukte („*Phosphoantigene*“) [PAg], des mikrobiellen Methylerythritolphosphat (MEP)- und eukaryotischen Mevalonat (MVA)-abhängigen Stoffwechselwegs der Isoprenoid- und Cholesterolsynthese ohne Antigenprozessierung und Antigenpräsentation

über den „*Major Histocompatibility Complex*“ (MHC-Komplex) (44). Die PAg-abhängige Antigenerkennung und Aktivierung von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen ist evolutionär hoch konserviert und ein immunologischer Vorteil, der sich nur bei Primaten findet. Der stärkste physiologische Aktivator von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen ist das PAg (*E*)-4-Hydroxy-3-Methyl-but-2-enyl-diphosphat (HMBPP), welches als Intermediärprodukt des MEP-Stoffwechselwegs exklusiv in bestimmten Mikroorganismen vorkommt. Ubiquitäre Stoffwechselzwischenprodukte des MVA-Metabolismus wie Isopentenylpyrophosphat (IPP) stimulieren ebenfalls $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen, allerdings nur in supraphysiologischen Konzentrationen (μM) (45-47). Darüber hinaus können $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen indirekt durch Amino-bisphosphonate (ABP) und Alkylamine aktiviert werden (48-51).

Der molekulare Mechanismus der PAg-induzierten Aktivierung von $V\gamma 9V\delta 2$ Zellen ist noch nicht vollständig geklärt und Gegenstand aktueller Forschung. $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen erkennen PAg TZR-abhängig über Zell-Zell-Kontakt, unabhängig von „klassischen“ antigenpräsentierenden Molekülen wie MHC Klasse I und II, MHC-related Protein 1 (MR1), CD1 und $\beta 2$ -Mikroglobulin (44, 52, 53). Der $V\gamma 9V\delta 2$ TZR bindet PAg allerdings nicht direkt (54). Wang et al. konnten durch zielgerichtete Rezeptormutagenese zeigen, dass alle „*Complementarity Determining Regions*“ (CDR), d.h. alle hypervariablen bindungsrelevanten Bereiche des $V\gamma 9V\delta 2$ TZR an der Erkennung von PAg beteiligt sind. Die Antigenbindungsstelle ist daher wesentlich größer als die zu erkennenden Antigene (HMBPP bzw. IPP) (55). Durch trypsininduzierte Zelloberflächenproteolyse von Targetzellen kann die PAg-vermittelte Erkennung von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen aufgehoben werden (56). Darüber hinaus können humane $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen in Gegenwart von PAg nur Primaten- aber keine murinen Targetzellen erkennen (57). Die bisherigen Forschungsergebnisse legen die Vermutungen nahe, dass ein unter Primaten evolutionär hoch konserviertes, membrangebundenes Oberflächenprotein bzw. membranassoziiertes antigenpräsentierendes Molekül (AMP) für die PAg-vermittelte Erkennung von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen notwendig ist.

Kürzlich veröffentlichte Forschungsarbeiten konnten zeigen, dass Butyrophilin (BTN) 3A1 für die PAg-abhängige Aktivierung bzw. Immunantwort von $V\gamma 9V\delta 2$

T-Zellen eine wesentliche Rolle spielt (58-61). BTN (CD277) sind Proteine der Immunglobulin (Ig) G-Superfamilie, die eine N-terminale Ig-V-ähnliche und eine C-terminale IgC-ähnliche Domäne besitzen und ubiquitär aber variabel exprimiert werden. BTN zeigen strukturelle Homologien zu Proteinen der B7-Familie, die über kostimulierende (B7[CD80 und CD86]/CD28-Interaktion) und inhibierende Signale (Programmed death-ligand [PD-L]1/PD-1-Rezeptor-Interaktion) die antigenspezifische Aktivierung und Immunantwort von $\alpha\beta$ T-Zellen regulieren (62-66). In einer von Harly et al. publizierten Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass ein spezieller agonistischer monoklonaler Antikörper (20.1) gegen CD277 zu einer selektiven Aktivierung und Proliferation von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen führte. Die antikörpervermittelte Stimulation von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen war vergleichbar mit der von PAg, induzierte aber keine intrazelluläre Akkumulation von IPP (59). Die Aktivierung konnte durch einen inhibierenden anti-CD277-Antikörper (103.2) bzw. spezifischen CD277-Gen-Knockdown gehemmt werden (58). In Transfektionsexperimenten mit CD277-Knockdown HE-K293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) konnten Harly et al. zudem nachweisen, dass nur die Isoform BTN3A1 für die PAg-abhängige Immunantwort von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen verantwortlich ist (58). Die Proteinfamilie BTN3A (BTN3A1, BTN3A2, BTN3A3) besitzt eine konservierte homologe extrazelluläre Domäne an der die monoklonalen anti-CD277-Antikörper (20.1 und 103.2) mit hoher Affinität aber unterschiedlicher Valenz binden (67). Die Struktur der intrazellulären Domäne unterscheidet sich, nur BTN3A1 und BTN3A3 besitzen eine intrazelluläre B30.2 Domäne (68). Die bisher veröffentlichten Forschungsergebnisse, die eine direkte Interaktion von PAg und BTN3A1 beschreiben, sind kontrovers und Gegenstand aktueller Diskussion. Vavassori et al. konnten nachweisen, dass PAg mit geringer Affinität an die extrazelluläre Domäne von BTN3A1 binden bzw. BTN3A1 spezifisch mit dem $V\gamma 9V\delta 2$ TZR interagiert (60). Demgegenüber konnte eine erst kürzlich veröffentlichte Arbeit von Sandstrom et al. zeigen, dass PAg spezifisch an die intrazytoplasmatische B30.2 Domäne von BTN3A1 binden. Allerdings konnte die Arbeitsgruppe die von Vavassori et al. beschriebene direkte Assoziation zwischen BTN3A1 und dem $V\gamma 9V\delta 2$ TZR nicht bestätigen (61).

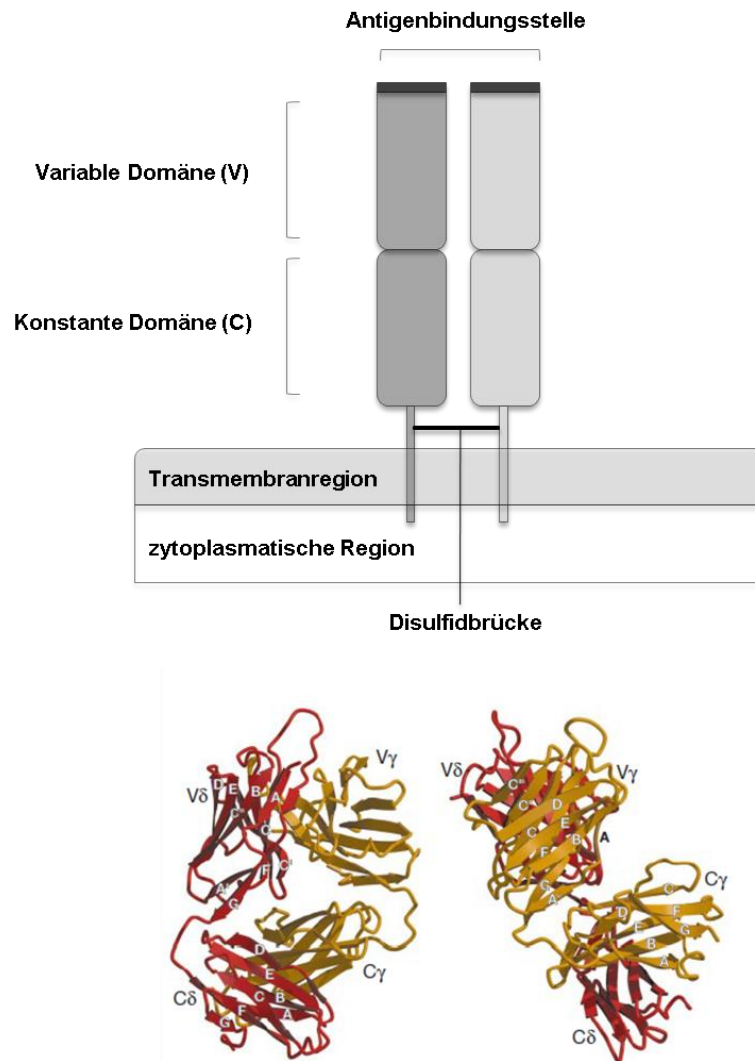


Abb. 1: Der V γ 9V δ 2 T-Zellrezeptor.

Ober: Schematische Darstellung des T-Zellrezeptor (TZR). Der TZR ist ein Heterodimer der mit dem CD3-Proteinkomplex assoziiert ist. Die beiden Ketten (dunkelgrau γ -Kette, hellgrau δ -Kette) sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Der extrazelluläre Bereich besteht aus einer konstanten (C) und variablen (V) Domäne. Die V-Domäne der γ bzw. δ -Untereinheit setzt sich aus V- („variable“) und J- („joining“) Segmenten bzw. V-, D- („diversifying“) und J-Segmenten zusammen, die drei hypervariable, antigenbindungsrelevante „Complementarity Determining Regions“ (CDR) tragen (schwarz). *Unten:* Raummodell des V γ 9V δ 2 TZR, V δ und C δ (rot) und V γ und C γ (gelb). Die CDR sind als Schleifen („loops“) abgebildet. Quelle: Raummodell V γ 9V δ 2 TZR (54).

1.2.3 Spezifische Tumorzellerkennung von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen

Humane $V\delta 2V\gamma 9$ T-Zellen können Tumorzellen TZR-abhängig durch auto-PAg, des MVA-Metabolismus der Cholesterol- und Isoprenoidbiosynthese und TZR-unabhängig analog zu NK-Zellen über Killer-aktivierende Rezeptor-Liganden-Interaktionen erkennen und lysieren.

Auto-Phosphoantigene des Mevalonatmetabolismus

Der MVA-Metabolismus ist ein evolutionär hoch konservierter biochemischer Stoffwechselweg über den von Acetyl-Coenzym A (CoA) ausgehend die Biosynthese von Isoprenoidvorstufen erfolgt. In der geschwindigkeitsbestimmenden Reaktion des MVA-Metabolismus wird 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl (HMG)-CoA durch das Enzym HMG-CoA-Reduktase zu MVA reduziert, das über Zwischenreaktionen zu den MVA-Stoffwechselendprodukten IPP und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) metabolisiert wird. (69). IPP und dessen Isomer DMAPP sind Ausgangssubstrate der Biosynthese von Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP). FPP ist ein Intermediärprodukt der Isoprenoid- bzw. Steroidbiosynthese. FPP und GGPP sind zudem Substrate der posttranslationalen Isoprenylierung bzw. dienen als Membranlipidanker für eine Vielzahl von essentiellen Proteinen der Zellproliferation bzw. des Zellwachstums (70) (Abbildung 2).

HMBPP mikrobiellen Ursprungs und das synthetische Analogon Bromohydrinpyrophosphat (BrHPP) aktivieren $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen in pico- bis nanomolaren Konzentrationen während das strukturell verwandete, ubiquitär vorkommende, IPP $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen erst in mikromolaren Konzentrationen, d.h. mit 10.000-fach geringere Potenz stimulieren kann (71). Diese Konzentrationen werden unter physiologischen Bedingungen in normalen Zellen nicht erreicht. Der MVA-Stoffwechselweg bzw. die Isoprenoidbioynthese ist allerdings in transformierten Zellen häufig dysreguliert und hyperaktiv (72). Das Tumorsuppressorprotein 53 (p53) reguliert als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung den Zellzyklus bzw. induziert DNA-Reparatur und Apoptose. In der Hälfte aller Tumorentitäten ist das p53-kodierende Gen mutiert (73). Freed-Pastor et al. konnten zeigen, dass mutiertes p53 die Aktivität des MVA-Metabolismus und der Isoprenoid-

biosynthese steigert und direkt an der Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps beteiligt ist (74). Gober et al. konnten zudem erstmals nachweisen, dass maligne transformierte Zellen mit hyperaktiven MVA-Metabolismus IPP in supraphysiologischen Konzentrationen akkumulieren und daher spezifisch von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen erkannt und lysiert werden können (75).

Killer-aktivierende und inhibierende Liganden

Neben der TZR-vermittelten Aktivierung von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen durch PAg des MVA-Metabolismus wird die Antitumorantwort von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen TZR-unabhängig über Killer-aktivierende und Killer-inhibierende Rezeptor-Liganden-Interaktionen reguliert.

Der „*Natural Killer Group 2D*“ (NKG2D)-Rezeptor ist ein C-Typ Lektin-ähnliches Transmembranprotein, das als disulfidverbundenes Homodimer auf humanen NK-Zellen, $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen, Natürlichen Killer-T (NKT)-Zellen und CD8- und teilweise CD4-positiven $\alpha\beta$ T-Zellen exprimiert wird (76, 77). Die NKG2D-vermittelte Signalkaskade führt zur Aktivierung von NK- und $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen bzw. kostimuliert die Zytokinproduktion und Proliferation von T- und NKT-Zellen (78). Der NKG2D-Rezeptor erkennt die stressinduzierten Liganden „*MHC-I Polypeptide Related Sequence A/B*“ (MICA/B) und „*UL16 Binding Protein*“ (ULBP)1-6, die strukturelle Homologien zu MHC Klasse 1 Molekülen aufweisen. NKG2D-Liganden (NKG2DL) werden konstitutiv von einer Reihe von soliden und hämatopoetischen Tumorzellen exprimiert (78-81). Epitheliale Tumorzellen (z. B. Mamma, Lunge, Kolon, Pankreas, Ovar, Melanom, Gliome) exprimieren mehrheitlich MICA und MICB sowie verschiedene Liganden der ULBP-Familie (ULBP2, ULBP3 und ULBP5). Dagegen zeigen hämatopoetische Tumorzellen eine deutlich variabelere NKG2DL-Expression (82, 83). Die Oberflächenexpression des NKG2DL ULBP1 korreliert mit der Suszeptibilität hämatopoetischer Tumorzellen gegenüber NK- und $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen *in vitro* (84, 85). Präklinische Untersuchungen konnten zudem zeigen, dass die Expression von NKG2DL auf Tumorzellen pharmakologisch durch Histon-Deacetylase (HDAC)- und Proteasominhibitoren induziert werden kann (86). Die Interaktion des Immunrezeptors „*Lymphocyte Function-Associated Antigen 1*“ (LFA-1) mit dem

Zelladhäsionsmolekül „*Intercellular Adhesion Molecule 1*“ (ICAM1) stellt eine weitere $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-aktivierende Rezeptor-Liganden-Verbindung dar. Uchida und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Erkennung und Zytotoxizität von Myelomzelllinien (RPMI 8226, U226) durch $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen neben der Aktivität des MVA-Stoffwechsels von der ICAM1-Expressionsdichte der Tumorzellen abhängig ist (87).

Der „*DNAX Accessory Molecule-1*“ (DNAM1)-Rezeptor ist ein Zelladhäsionsmolekül der Ig-Superfamilie, der konstitutiv auf CD4- bzw. CD8-positiven T-Zellen, NK-Zellen und $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen exprimiert wird. Die Liganden des DNAM1-Rezeptors sind CD112 (Nektin-2) und CD155 („*Poliovirus Receptor*“) [PVR], die neben APC, Endothel und Epithelzellen von einer Reihe von Tumorzellen (u. a. AML-Blasten) koexprimiert werden (88). Die DNAM1-Signalkaskade vermittelt *in vitro* eine Aktivierung der Antitumorantwort von NK-Zellen gegenüber primären AML-Zellen (89). Toutirais et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen über den DNAM1-Signalweg hepatozelluläre Karzinomzellen effizient lysieren (90).

Neben aktivierenden Rezeptoren-Liganden-Interaktionen wird die Reaktivität bzw. Zytotoxizität von NK- und $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen über verschiedene inhibitorische Signale reguliert. Das Typ-1 Glykoprotein CD200 wird von unterschiedlichen Zellen (z. B. Leukozyten) vor allem aber von immunprivilegierten Gewebe bzw. Organen (Zentrales Nervensystem) exprimiert. Die Interaktion von CD200 mit dem CD200-Rezeptor, der auf immunkompetenten Zellen koexprimiert wird, vermittelt ein immunsuppressives Signal, das zur Inhibition der tumorspezifischen T-Zell-Immunität, Makrophagenfunktion und Induktion von regulatorischen T-Zellen führt (91, 92). CD200 wird von einer Reihe von soliden und hämatopoetischen Tumorzellen (u. a. Lymphom-, Myelom- und AML-Zellen) überexprimiert (93-95). Tonks et al. konnten zeigen, dass die Überexpression von CD200 bei AML-Patienten mit „*none-Core-Bindung-Factor*“ (nCBF) Leukämien mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist (96). Darüber hinaus konnten Coles et al. nachweisen, dass die Überexpression von CD200 die Antitumorantwort von NK-Zellen gegenüber AML-Blasten direkt inhibiert (97).

1.2.4 Pharmakologische Inhibitoren des Mevalonatmetabolismus

Der MVA-Metabolismus und die intrazelluläre Konzentration von IPP bzw. die PAg-abhängige Aktivierung und Tumorzellerkennung von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen kann durch therapeutisch eingesetzte Pharmaka (Statine und Bisphosphonate [BP]) indirekt reguliert werden. Die pharmakologische Substanzklasse der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine) senkt durch kompetitive Hemmung der HMG-CoA-Reduktase die endogene IPP-abhängige Cholesterolsynthese. HMG-CoA-Reduktasehemmer werden in der Behandlung der primären Hypercholesterinämie und zur Prävention kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten mit arteriosklerotischer Herzerkrankung oder Diabetes mellitus eingesetzt. Durch Hemmung der HMG-CoA-Reduktase und konsekutive Inhibition der posttranslationalen Isoprenylierung von essentiellen Zellteilungs- und Zellwachstumsproteinen scheinen Statine darüber hinaus eine direkte Antitumoraktivität zu besitzen (98, 99). Durch Inhibition der HMG-CoA-Reduktase senken Statine die intrazelluläre Konzentration von IPP und führen *in vitro* zu einer verminderten Suszeptibilität von Tumorzellen gegenüber PAg-reaktiven $\gamma\delta$ T-Zellen (75).

Neben Statinen können auch die Gruppe der stickstoffhaltenden Bisphosphonaten (Aminobisphosphonate [ABP]) wie beispielsweise Pamidronat (PAM) und Zoledronat (ZOL) den MVA-Stoffwechselweg spezifisch blockieren. ABP sind degradationsresistente strukturelle Pyrophosphat (Diphosphat)-Analoge, die spezifisch die FFP-Synthase, ein Schlüsselenzym der Cholesterolsynthese und Isoprenoidbiosynthese hemmen und immunmodulatorische und direkte und indirekte Antitumoreigenschaften besitzen (100-102). ABP werden klinisch in der Therapie der postmenopausalen Osteoporose, tumorassoziierten Hyperkalzämie und in der Behandlung ossärer Metastasen bei soliden und hämatopoetischen Tumorerkrankungen eingesetzt. Die ABP-induzierte Hemmung der FFP-Synthaseaktivität führt zur Inhibition der Isoprenylierung von GTPasen der RAS-Superfamilie (Ras, Rho, Rac und Rab), die neben der Steuerung zahlreicher physiologischer Zellprozesse an Tumorstadium, Tumorzellinvasion und Tumormetastasierung beteiligt sind (69). Neben Antitumoreigenschaften besitzen ABP immunstimulatorisches Potenzial. Die

Hemmung des IPP-konsumierenden Enzyms FFP-Synthase führt zur intrazellulären Akkumulation von IPP und zur Aktivierung, Proliferation und Induktion der Effektorfunktion von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen (48, 75, 103). ABP können darüber hinaus durch Akkumulation von IPP die Biosynthese des proapoptotischen ATP-Analogons triphosphoric acid 1-adenosin-5-yl ester 3-(3-methyl-but-3-enyl) ester (Apppl) *in vivo und in vitro* induzieren (104, 105). Nussbaumer et al. konnten zudem zeigen, dass durch ZOL-induzierte Depletion von FFP und GGPP und inflammasomabhängige Caspase-1-Aktivierung und Freisetzung von IL-1 β und IL-18 IL-2 „geprimte“ NK-Zellen aktiviert werden können (106).

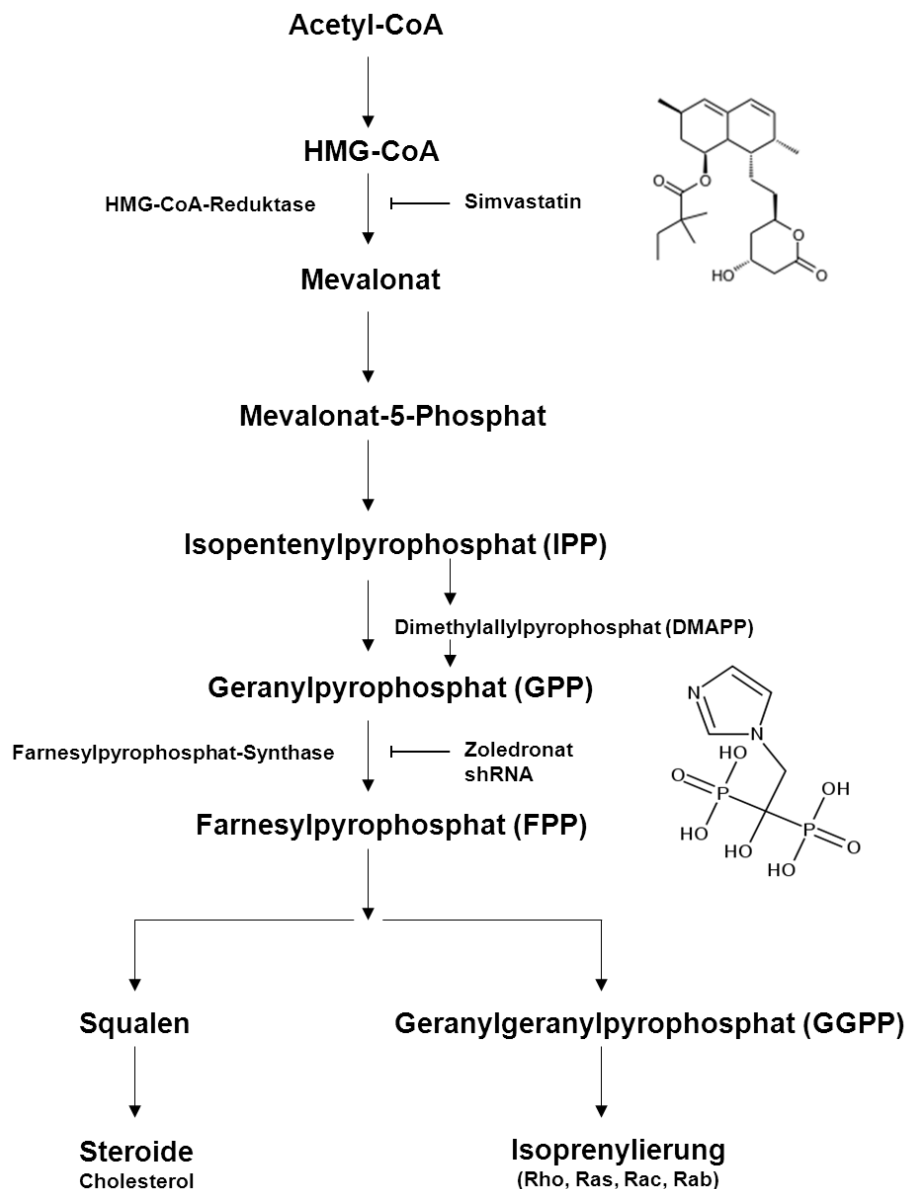


Abb. 2: Schematische Darstellung des Mevalonatmetabolismus.

Statine hemmen die HMG-CoA-Reduktase, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Mevalonatmetabolismus, und senken die intrazelluläre Konzentration von biogenetischen Isoprenoidvorstufen. Aminobisphosphonate (ABP) inhibieren das IPP-konsumierende Enzym Farnesylpyrophosphat (FPP)-Synthase und führen zur intrazellulären Akkumulation von Isopentenylpyrophosphat (IPP) und zur Biosynthese von triphosphoric acid 1-adenosin-5'-yl ester 3-(3-methyl-but 3-enyl) ester (Apppl). Short hairpin RNA (shRNA)-vermittelte Inhibition der FPP-Synthase-Expression imitiert die Wirkung von ABP und führt ebenfalls zur Akkumulation von IPP (107). Die Strukturformeln von Mevastatin und Zoledronat (ZOL) wurden der Online-Enzyklopädie Wikipedia entnommen.

1.2.5 Immuntherapien mit autologen V γ 9V δ 2 T-Zellen

Bisher wurden mehrere Phase I/II-Studien mit autologen *in vivo* PAg und IL-2-aktivierten und expandierten oder *ex vivo* PAg- und IL-2-expandierten und adoptiv-transferierten V γ 9V δ 2 T-Zellen bei Patienten mit verschiedenen soliden und hämatopoetischen Tumorerkrankungen durchgeführt. Allerdings wurden objektive Remissionen nur bei 10 bis 30 % der Patienten beobachtet (35, 103, 108-111). Die aktuelle Studienlage deutet auf eine Präferenz V γ 9V δ 2 T-Zell-basierter Immuntherapien bei hämatologischen Erkrankungen hin (35, 103).

Tabelle 1: Phase I/II Studien mit autologen V γ 9V δ 2 T-Zellen (Auswahl)

Autor	Referenz	Tumorentität	N	PR (%)	SD (%)	PD (%)
Wilhelm et al.	(103)	B-NHL, MM	-	-	-	-
		Arm A=PAM**	10	0	11	89
		Arm B=PAM***	9	33	22	44
Dieli et al.	(111)	Prostatakarzinom*	-	-	-	-
		Arm A=ZOL	9	22	45	33
		Arm B=ZOL + IL-2	9	11	11	89
Bennouna et al.	(110)	Nierenzellkarzinom*	10	0	60	40
Meraviglia et al.	(108)	Mammakarzinom*	10	10	20	70
Nakajima et al.	(109)	NSCLC	8	0	38	62
Kunzmann et al.	(35)	AML	7	29	28	43
		Nierenzellkarzinom*	7	0	43	57
		Malignes Melanom*	6	0	17	83

*metastasiert

**Pamidronat + IL-2 mit steigender IL-2 Dosis über 24 Stunden (Tag 3-8)

***Pamidronat + IL-2 mit 6-stündiger IL-2 Infusion von Tag 1-6

Abkürzungen: AML: Akute myeloische Leukämie, B-NHL: Non-Hodgkin Lymphom der B-Zellreihe, NSCLC: Nicht-kleinzelliges Bronchiakarzinom, MM: Multiples Myelom, ZOL: Zoledronat, PAM: Pamidronat, IL-2: Interleukin 2, PR: partielle Response, SD: stabile Erkrankung, PD: progressive Erkrankung

1.3 Problemstellung und Zielsetzung

Bisher publizierte präklinische und klinische Studien lassen vermuten, dass neben NK-Zellen auch $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen in der Erkennung und Eliminierung von (residuellen) AML-Zellen eine entscheidende Rolle spielen. Innovative Strategien vor allem im haploidenten Transplantationsmodell bzw. im immuntherapeutischen Nicht-Transplantationssetting zielen daher auf eine Generierung von Stammzellpräparaten („grafts“), die überwiegend Spenderlymphozyten der natürlichen Immunantwort (NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen) und nur zu einem geringen Anteil konventionelle $\alpha\beta$ T-Lymphozyten enthalten. Allerdings berücksichtigen die bisherigen CD3-basierten Zellseparationsprotokolle $\gamma\delta$ T-Zellen nicht. Dagegen führt die selektive TZR $\alpha\beta$ bzw. simultane TZR $\alpha\beta/CD19$ Depletion zu einer passiven Anreicherung von NK- und $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen im Stammzellpräparat. Ausgehend vom aktuellen Kenntnisstand lag bisher noch keine Forschungsarbeit vor, die das zytotoxische Potenzial von allogenen $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber primären AML-Blasten direkt evaluiert hat. Das Ziel der vorgelegten Arbeit war es daher die Antileukämieantwort von *ex vivo* TZR $\alpha\beta$ bzw. kombiniert TZR $\alpha\beta/CD19$ -depletierten allogenen $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen unter verschiedenen Gesichtspunkten systematisch zu untersuchen. Dabei wurden folgende Zielsetzungen verfolgt.

- 1) Etablierung von *ex vivo* PAg-expandierten $V\gamma 9V\delta 2$ Effektorzelllinien aus TZR $\alpha\beta$ und TZR $\alpha\beta/CD19$ -depletierten Leukaphereseprodukten von HLA-inkompatiblen Spenderzellen
- 2) Bestimmung der antileukämischen Aktivität von HLA-inkompatiblen TZR $\alpha\beta$ und TZR $\alpha\beta/CD19$ -depletierten $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber primären AML-Zellen
- 3) Phänotypische Charakterisierung von primären AML-Zellen im Hinblick auf Killer-aktivierende und Killer-inhibierende Zelloberflächenantigene (z.B. NKG2D- und DNAM1-Liganden)

- 4) Korrelation der Oberflächenexpression Killer-aktivierender und Killer-inhibierender Zelloberflächenantigene mit der Antileukämieantwort von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen
- 5) Bestimmung der antileukämischen Aktivität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber ABP-vorbehandelten AML-Zellen

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Stimulanzen

Folgende Kulturmedien, Stimulanzen und Zusätze wurden verwendet :

Tabelle 2: Kulturmedien, Puffer und Zusätze

Reagenz	Hersteller
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Saint Louis
DMSO (Dimethyl Sulfoxid)	WAK, GmbH Steinbach
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN TM , Biotech, Aidenbach
Ficoll Paque TM Plus	GE Healthcare TM , Uppsala
HBSS (Hank´s Balanced Salt Solution)	GIBCO [®] , invitrogen, Paisley
Humanes AB Serum (AB)	PAA, Laboratories, Pasching
Kulturmedium RPMI 1640	GIBCO [®] , invitrogen, Paisley
L-Glutamin 2 mM	Life Technologies, Paisley
PBS (Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline)	Biochrom, Berlin
Penicillin 10000 U/ml	Biochrom, Berlin
Streptomycin 10 mg/ml	GIBCO [®] , invitrogen, Paisley

Tabelle 3: Stimulanzen

Reagenz	Hersteller
Bromohydrinpyrophosphat (BrHPP)	Innate Pharma, Marseille
rekombinantes Interleukin 2 (Proleukin [®])	Sigma, Deishofen
Zoledronat (Zometa [®])	Novartis, Basel

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien und sonstige Reagenzien

Produkt	Hersteller
DMSO (Dimethyl Sulfoxid)	WAK GmbH, Steinbach
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma Aldrich, Saint Louis
FACS Flow	BD Biosciences
FACS Rinse	BD Biosciences
FACS Clean	BD Biosciences
Formaldehyde FIX Buffer I	BD Biosciences
Iso Flow Sheath Fluid™	Beckman Coulter
Methanol	J.T. Baker, Deventer
Natriumazid	GIBCO®, invitrogen, Paisley
Trypanblau	GIBCO®, invitrogen, Paisley

2.1.3 Zellkulturmedien und Puffer

Folgende Kulturmedien und Puffer wurden für die Zellkultur von Patienten- und Spenderzellen sowie humanen Zelllinien verwendet.

Supplementiertes RPMI-Medium

500 ml RPMI 1640 Medium wurden mit Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) sowie L-Glutamin (2 mM) sterilfiltriert (< 0,2 µm sterile Membranfilter).

10%iges FCS Medium

Fetales Kälberserum wurde zur Komplementinaktivierung 30 Minuten bei 56°C inkubiert, sterilfiltriert und 1:10 mit supplementierten RPMI 1640 Medium versetzt.

10%iges FCS Medium mit 100 IE/ml rh IL-2

Komplementinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS) wurde sterilfiltriert und 1:10

mit supplementierten RPMI 1640 Medium verdünnt und mit 100 U/ml rekombinanten (rh) IL-2 versetzt.

10%iges AB Medium mit 100 IE/ml rh IL-2

Humanes AB Serum wurde 1:10 mit supplementierten RPMI 1640 Medium verdünnt und mit 100 U/ml rh IL-2 gemischt.

Einfriermedium

Maximal 1×10^7 Zellen wurden in 900 μ l 40%igen FCS-Medium und 900 μ l 20%igen DMSO Medium kryokonserviert.

FACS Trägerlösung

500 ml Dulbecco's PBS wurden mit 5 ml inaktiviertes FCS und 1 ml Natriumazid (20%ige Lösung) versetzt.

3%iger BSA Puffer (PBS/BSA)

3 g Bovines Serumalbumin wurden in 100 ml Dulbecco's PBS gelöst.

MACS Puffer

500 ml Dulbecco's PBS wurde mit 5 ml FCS und 5 ml 200 mM EDTA versetzt.

Waschpuffer

HbSS 10X wurde 1:10 mit Dulbecco's PBS versetzt.

2.1.4 Antikörper und Farbstoffe

Folgende Antikörper und Farbstoffe wurden zur immunphänotypischen Analyse verwendet. Für Standardfärbungen wurden 10 μ l Antikörper pro 1×10^6 Zellen verwendet.

Tabelle 5: monoklonale Antikörper

Antigen	Spezies	Klon	Fluorochrom	Herstellerfirma
CD3	Human	UCHT1	PC7	Beckman Coulter
CD14	Human	RMO52	PC5.5	Beckman Coulter
CD16	Human	3G8	ECD	Beckman Coulter
CD19	Human	J3-119	Alexa Fluor 700	Beckman Coulter
CD33	Human	P67.6	PerCP Cy5.5	Becton Dickinson
CD34	Human	8G12	PerCP Cy5.5	Becton Dickinson
CD34	Human	581	APC	Becton Dickinson
CD45	Human	J.33	Krome Orange	Beckman Coulter
CD45	Human	2D1	PerCP	Becton Dickinson
CD45	Human	HI30	APC	BD Pharmingen
CD56	Human	N901 (NKH-1)	ECD	Beckman Coulter
CD112	Human	TX31	PE	BioLegend
CD117	Human	104D2	APC	Becton Dickinson
CD155	Human	TX24	PE	BioLegend
CD200	Human	MRC OX-104	APC	BD Pharmingen
ICAM-1	Human	RR1/1	FITC	eBioscience
IgG1/IgG2a	Mouse	X40/X39	FITC/PE	Becton Dickinson
IgG1	Mouse	X40	PerCP	Becton Dickinson
IgG1	Mouse	X40	APC	Becton Dickinson
HLA-ABC	Human	B9.12.1	FITC	Beckman Coulter
MICA/B	Human	6D4	PE	BD Pharmingen
TZR-pan- $\alpha\beta$	Human	WT31	FITC	Becton Dickinson
TZR-pan- $\gamma\delta$	Human	IMMU510	FITC	Beckman Coulter
TZR V δ 1	Human	TS8.2	FITC	Thermo Scientific
TZR V δ 2	Human	15D	FITC	Thermo Scientific
TZR V γ 9	Human	7A5	FITC	Thermo Scientific
ULBP1	Human	170818	FITC	R&D Systems

Tabelle 6: sonstige Antikörper und Farbstoffe

Reagenz	Hersteller
ⁱ Anti-phospho-HMG-CoA Reductase ^{Ser872}	Millipore, Schwalbach
CD14 MicroBeads	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
FITC konjugierter anti-rabbit IgG	Jackson Immun Research, UK
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker KIT	Sigma, Saint Louis
TO-PRO [®] -3 iodide - 1mM solution in DMSO	Molecular Probes [®] , Eugene
ⁱ unkonjugierter polyklonaler rabbit IgG	

2.1.5 Laborbedarf

Das nachfolgend aufgezählte Labormaterial: Mikrotiterplatten (Cellstar[®]), sterile Röhrchen (Cellstar[®] Tubes), sterile Pipetten (Cellstar[®]), sterile Pipettenspitzen (Plastibrand[®]), Combitips[®], sterile Filter (Minasart Plus < 0.2 µm Membranfilter mit GF-Vorfilter), MACS[®] Pre-Separation Filter, MACS[®] Separation Columns (25 MS Columns und 25 LD Columns), wurden von den folgenden Firmen bezogen: Eppendorf (Hamburg), Greiner Bio One (Frickenhausen), Hartenstein (Würzburg), Miltenyi Biotech GmbH (Bergisch Gladbach), Sartorius (Göttingen), Sarstedt (Nümbrecht), Schleicher Schuell (Dassel).

2.1.6 Durchflusszytometer und Geräte

<u>FACS Calibur[®]</u>	4-Farb Analyzer
Laser:	Argon-Laser, 488 nm, Roter Diodenlaser, 635 nm
Datenanalyse:	CellQuest 3.0
Hersteller:	Becton Dickinson, Heidelberg
<u>FACS Navios[®]</u>	10-Farb-Analyzer
Laser:	405 nm, 40 mW; 488 nm, 22 mW; 638 nm, 25 mW
Datenanalyse:	Kaluza 1.2
Hersteller:	Beckman Coulter, Krefeld

Tabelle 7: Geräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Autoklav	Vario Dampfsterilisator	Labortechnik, Oberschleißheim
Brutschrank	Hera cell, 5% CO ₂ , 37°C	Heraeus, Hanau
Kryolagerung	Biosafe® Stickstofftank	Cryotherm, Kirchen
	Hera freeze, - 80°C	Heraeus, Hanau
Magnetrührer	IKAMAG® RCT	IKA GmbH, Staufen
Mikroskop	Stero-Mikroskop	Zeis-Winkel, Göttingen
	Inverses-Mikroskop	Hund, Wetzlar
Pipetten	Eppendorf Reseach® Plus	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Accu-Jet®	Braun, Melsungen
Schüttelinkubator	Swip KS-10	Bühler, Bodelshausen
Sterilbank	Biogard 1360-112	Sanford, Maine
Vortex	Vortex Genie 2™	Bender&Hobein, Zürich
Waagen	Präzisionswaage BP 160	Sartorius, Göttingen
Zellseparator	VarioMACS®	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Zentrifugen	Rotanta/AP Rotor 5094A	Hettich, Tuttlingen
	Rotanta 460R	Hettich, Tuttlingen

2.1.7 Humane Primärzellen

Das Patienten- und Spendermaterial wurde nach vorheriger schriftlicher Einwilligung der Studienteilnehmer zwischen Mai 2010 und August 2011 an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II und dem Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie der Universitätsklinik Würzburg entnommen und pseudonymisiert verarbeitet. Ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Würzburg (Nr. 65/11 vom 12.04.2011) liegt vor.

Patientenproben und Krankheitsdaten

Patienten mit *de novo* oder sekundärer AML mit peripheren Blastenanteil $\geq 60\%$ wurden 20 ml heparinisiertes Vollblut im Rahmen von diagnostischen

Routineeingriffen entnommen. Die Untersuchungen zu Morphologie, Immunphänotyp, Zytogenetik und Molekularbiologie der Leukämiezellen erfolgten *lege artis* im Rahmen der Patientenbehandlung. Der HSCT-spezifische Komorbiditätsindex wurde nach Sorrow et al. bestimmt (24, 112).

Spenderlymphozyten

Zwei freiwilligen gesunden HLA-differenten männlichen Spendern wurden im Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Würzburg mittels G-CSF-unstimulierter Leukapherese (Cobe Spectra Apheresis System, Gambro BCT, Planegg Martinsried) einmalig PBMCs entnommen.

KIR-Liganden-Inkompatibilität

Alle Studienteilnehmer wurden im Institut für Klinische Transfusionsmedizin HLA-typisiert. Jede Patienten-/Spenderkonstellation wurde auf Vorliegen einer KIR-Liganden-Inkompatibilität untersucht. Der KIR-Liganden-Mismatch wurde definiert als Inkompatibilität zwischen der Expression von Spender-KIRs und deren inhibitorischen HLA Klasse 1 Liganden (HLA-C Gruppe 1, HLA-C Gruppe 2, HLA-Bw4 Allele) auf den Patientenzellen (30).

2.1.8 Humane Zelllinien

Alle Zelllinien wurden von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkultur (DSMZ), Braunschweig bezogen und nach Angaben des Herstellers kultiviert.

Tabelle 8: Zelllinien

Zelllinie	DSMZ-Nr.	Zelltyp	Immunphänotyp
Daudi	ACC 78	Burkittlymphom	CD19 ⁺ , CD20 ⁺ , CD10 ⁺
RPMI 8226	ACC 402	Multiples Myelom	CD38 ⁺ , CD138 ⁺ , CD19 ⁻

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle dargestellten Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen (Sterilbank) durchgeführt. Alle Zellen wurden in einem Standardinkubator bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre kultiviert.

2.2.2 Zell-Separation von Spenderleukaphereseprodukten

Die Zellseparation wurde unter „*Good-Manufacturing-Practice*“ (GMP)-Bedingungen von den Mitarbeitern des Stammzelllabors der Universitätsklinik Würzburg durchgeführt. Die Leukapheresate wurden mittels magnetischer Zellseparation (Clini-MACS[®] Depletion Tubing Set der Firma Miltenyi Biotech GmbH) TZR $\alpha\beta$ (Donor A) und kombiniert TZR $\alpha\beta$ /CD19 (Donor B) depletiert. Für die genaue Verfahrensweise sei auf die Protokolle des Herstellers verwiesen. Eine detaillierte Zusammensetzung der Leukaphereseprodukte vor und nach Depletion zeigt Abbildung 9.

Tabelle 9: CliniMACS Depletion[®]

Zellfraktionen	Donor A ⁱ	Donor B ⁱⁱ
vor CliniMACS Depletion		
Viabilität (%)	99.35	99.94
WBC (10 ⁹)	6.23	3.86
TZR $\alpha\beta^+$ (10 ⁹)	3.92	1.60
TZR $\alpha\beta^+$ (%)	62.0	41.63
CD19 ⁺ (10 ⁹)	0.81	0.28
CD19 ⁺ (%)	13.00	7.44
TZR $\gamma\delta^+$ (10 ⁹)	0.16	0.041
TZR $\gamma\delta^+$ (%)	2.58	7.43

Zellfraktionen	Donor A ⁱ	Donor B ⁱⁱ
nach CliniMACS Depletion		
Viabilität (%)	85.57	99.95
WBC (10 ⁹)	2.11	1.80
TZR $\alpha\beta^+$ (10 ⁹)	0.000211	0.0000018
TZR $\alpha\beta^+$ (%)	0.01	0.001
CD19 ⁺ (10 ⁹)	7.6	0.00018
CD19 ⁺ (%)	35.99	0.01
TZR $\gamma\delta^+$ (10 ⁹)	1.57	0.0333
TZR $\gamma\delta^+$ (%)	7.43	1.85

ⁱTZR $\alpha\beta$ Depletion; ⁱⁱTZR $\alpha\beta$ /CD19 Depletion

Abkürzungen: WBC: white blood cell count (Leukozyten)

2.2.3 $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-Proliferation und Aufreinigung der Effektorzellen

Zur Generierung von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zelllinien wurden TZR $\alpha\beta$ und TZR $\alpha\beta$ /CD19 depletierte Leukapheresprodukte verwendet. 1×10^5 Spender-PBMCs wurden in 100 μ l rh-IL-2-haltigen (100 U/ml) 10%igen AB Serum in 96 Rundbodenplatten einmalig mit BrHPP (1 μ M) oder ZOL (10 μ M) stimuliert und bis zu zehn Tage kultiviert. Die PBMCs wurden im Intervall von drei Tagen mit Kulturmedium (25 μ l) restimuliert. Zur Bestimmung der absoluten und relativen $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-expansion wurden die PBMCs lichtmikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und der relative Anteil von pan $\gamma\delta$ T-Zellen, $V\delta 2^-$, $V\gamma 9^-$, CD69-, CD16/CD56-, CD14- und CD45-positiven Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dazu wurden mindestens 50.000 Zellen am FACS Navios[®] aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mittels Kaluza Software Version 1.2. Lymphozyten wurden entsprechend ihrer Side Scatter (SSC) und CD45 Expressionseigenschaften detektiert.

Residuelle CD14 positive Zellen wurden mittels positiver magnetischer Zellseparation (MACS) entsprechend den Protokollen des Herstellers (Milteny Biotech GmbH, Bergisch-Gladbach) depletiert. Die PBMCs wurden in 25 ml

MACS Puffer gewaschen, mit der angegebenen Menge an CD14 MicroBeads 15 Minuten bei 4°C inkubiert, auf eine magnetische Säule aufgetragen und mittels Zellseparator isoliert (Vario MACS[®] Zellseparator mit MS oder LS Säulen). Anschließend wurde der relative Anteil von pan $\gamma\delta$ TZR-, CD16/CD56-, CD19-, CD14- und CD45-positiven Zellen in der Zielfraktion (= Negativzellfraktion) durchflusszytometrisch bestimmt.

2.2.4 Isolierung, Kultivierung und Stimulation von primären AML-Zellen

Die primären Leukämiezellen wurden Patienten mit *de novo* oder sekundärer AML und peripheren Blastenanteil > 60 % entnommen. Keiner der Patienten erhielt zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine krankheitsspezifische Therapie.

Patientenvollblut wurde zur Gewinnung von PBMCs dichte zentrifugiert (Ficoll Paque[™] Plus) und bei -80°C und flüssigen Stickstoff zunächst kryokonserviert. Der durchschnittliche Blastenanteil innerhalb der PBMCs betrug 86.37 % \pm 2.29 (Mittelwert \pm Standardfehler). Für die Experimente wurden die AML-Zellen aufgetaut, tote Zellen mittels Dichte zentrifugation entfernt und in 10%igen FCS Medium mit und ohne ZOL (10, 50 μ M) 14 Stunden kultiviert und anschließend zweimalig mit HbSS gewaschen.

2.2.5 Phänotypische Charakterisierung der AML-Zellen

Zur Bestimmung der Oberflächenexpression von Killer-aktivierenden und inhibierenden Liganden wurden die AML-Zellen mit folgenden humanen monoklonalen Antikörpern gefärbt: anti-HLA-ABC (MHC Klasse I), -ICAM1, -ULBP1, -MICA/B, -CD200, -CD155 und -CD112. Zusätzlich wurden die AML-Blasten gegen individuelle leukämiespezifische Oberflächenantigene (CD33, CD34, CD117 und CD45) gefärbt. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte am FACS Calibur[®]. Dazu wurden mindestens 30.000 Leukämiezellen aufgenommen. Die anschließende Datenanalyse erfolgte mittels Cell-Quest Software Version 3.0. Die Oberflächenexpression der untersuchten Antigene wurde als mean fluorescence intensity (MFI) Ratio, kalkuliert als MFI des spezifischen Antikörpers dividiert durch die MFI der korrespondierenden Isotyp-Kontrolle, angegeben.

2.2.6 Bestimmung des Differenzierungsstatus der AML-Zellen

Der Differenzierungsgrad der Leukämiezellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Entsprechend den SSC und CD45 Expressionseigenschaften wurden die AML-Blasten in myeloblastisch (AML-Blasten mit niedriger CD45 und negativer CD14 Expression), monoblastisch (AML-Blasten mit intermediärer CD45 und positiver CD14 Expression) und myelomonozytär (AML-Blasten mit niedriger CD45 und negativer CD14 Expression und ≥ 20 % CD14 positiven Monozyten) eingeteilt.

2.2.7 Aktivitätsbestimmung der HMG-CoA-Reduktase mittels Phosflow

Zum Nachweis des Phosphorylierungsstatus (= Aktivitätszustand) der HMG-CoA-Reduktase wurden die Leukämiezellen mit und ohne ZOL (50 μ M) 14 Stunden stimuliert, mit PBS/ BSA gewaschen und 15 Minuten in Formaldehyd (formaldehyde FIX Buffer I) bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen in 20°C kalten 90%igen Methanol 30 Minuten bei 4°C permeabilisiert, zweimalig mit PBS/BSA gewaschen und mit rabbit anti-phospho-HMG-Co-A reductase (Ser872) 1:100 für 60 Minuten auf einen Schüttler bei RT inkubiert. Nach Abwaschen des Primärantikörpers wurden die AML-Blasten mit FITC-konjugierten anti-rabbit IgG (1:100) und jeweils zwei leukämiespezifischen Zelloberflächenmarkern (jeweils 10 μ l) 30 Minuten bei RT inkubiert. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte am FACS Calibur[®]. Der Grad der Phosphorylierung der HMG-CoA-Reduktase wurde als MFI Ratio, kalkuliert als MFI des spezifischen Antikörpers dividiert durch die MFI der korrespondierenden Isotyp-Kontrolle, angegeben. Für die Auswertung wurde die Cell-Quest Software 3.0 verwendet

2.2.8 Zellulärer Zytotoxizitätsassay

Für die Bestimmung der Zytotoxizität wurde ein standardisierter durchflusszytometrisch-basierter Zytotoxizitätstest verwendet (113). Die Targetzellen wurden zweimal in 1 X PBS gewaschen, in 500 μ l Diluent C oder 1 X PBS resuspendiert und in einer Endkonzentration von 1:500 mit den kommerziell erhältlichen Membranfarbstoff PKH26 nach Anleitung der Herstellerfirma

gefärbt. Der Färbeprozess wurde durch Zugabe von einem ml reinen FCS neutralisiert, die Targetzellsuspension mit zwei ml 10% FCS Medium aufgefüllt, zentrifugiert und zweimalig in HbSS gewaschen. Die PKH26-markierten Targetzellen wurden in einer Effektor:Target (E:T) Verhältnis von 1:1, 10:1 und 50:1 mit $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen in 96-V-well Mikrotiterplatten bei 37°C koinkubiert. Nach vier Stunden wurde die Zellsuspension mit 1 X PBS auf 400 μ l aufgefüllt und 15 Minuten mit dem DNA-Farbstoff To-Pro[®]-3 iodid (1:40) auf Eis inkubiert. Die Messung erfolgte am FACS Calibur[®]. Die spezifische Lyse (%) wurde wie folgt kalkuliert: (Totzellanteil)/(Totzellanteil und Lebendzellanteil) x 100. Zur Berechnung der spezifischen Lyse wurde der Spontantotzellanteil (Target ohne Effektorzellen) abgezogen (Abbildung 3).

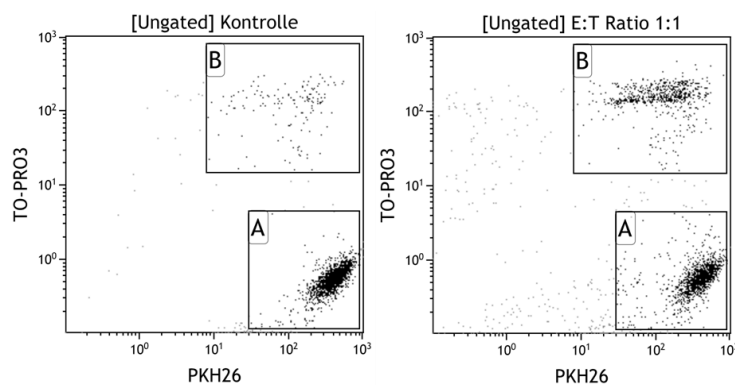


Abb. 3: Dot-Plot eines repräsentativen Zytotoxizitätassays.

Kontrolle und E:T Ratio 1:1, Ereignisse im Gate A (PKH26 positiv) entsprechen dem Lebendzellanteil, Ereignisse im Gate B (PKH26 und TO-PRO3 positiv) dem Totzellanteil

2.2.9 Statistik

Das kommerzielle Datenanalyseprogramm GraphPad Prism Version 4.0 (San Diego, Kalifornien) wurde zur graphischen und statistischen Auswertung verwendet. Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) oder Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die Messwerte der Zytotoxizitätsanalysen entsprechen Zweifachbestimmungen aus denen der Mittelwert \pm SD kalkuliert wurde. Die statistische Analyse metrischer Messgrößen erfolgte mit Hilfe des *t* Test für paarige oder unpaarige Stichproben

oder der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA). Daten mit dichotomen Merkmalen wurden mit zweiseitigem Exater-Fisher-Test analysiert. Die Nullhypothese (H_0) postulierte die gleiche Grundgesamtheit der zu testenden Stichproben. Sie wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $P < 0.05$ aufgegeben oder bei $P > 0.05$ beibehalten.

3 Ergebnisse

3.1 Deskriptive Datenanalyse

Aufgrund der biologischen Variabilität der Erkrankung wurde auf eine Patientenselektion verzichtet um trotz der limitierten Fallzahl eine allgemeine Aussage zu erzielen. Die akute Promyelozytenleukämie (APL) wurde aufgrund des alternativen Behandlungskonzepts in den Untersuchungen nicht berücksichtigt. Das untersuchte Patientenkollektiv umfasste neun Frauen und zehn Männer (Verhältnis Männer zu Frauen 1.1:1) mit einem medianen Alter von 60 Jahren (27- 84 Jahre). 13 Patienten (68 %) wurden mit *de novo* AML, fünf (26 %) mit sekundärer AML aus vorausgegangener Myelodysplasie und ein Patient (5 %) mit therapieassoziiertes AML diagnostiziert. Die für die Auswertung relevanten klinischen Daten (Zytogenetik, Molekularbiologie, HLA-Typisierung, Sensitivität gegenüber Chemotherapie) waren für 16 Patienten (84 %) verfügbar. Eine Darstellung der demographischen und klinischen Patientenmerkmale zeigt Tabelle 10. Alle Patienten \leq 60 Jahre (42 %) erhielten eine doppelte Induktionschemotherapie („7+3“) mit Cytarabin (Ara-C) und Daunorubicin (60 mg/m²). Eine chemotherapiebasierte PRT (HiDAC) erhielten 11 % der Patienten. Bei 67 % der Patienten wurde eine HLA-kompatible allo-HSCT durchgeführt. Zwei Patienten (22 %) verstarben während Induktion I. Patienten \geq 60 Jahre (53 %) erhielten eine Induktionschemotherapie mit Ara-C und Daunorubicin (45 mg/m²) gefolgt von zwei Therapiezyklen mit HiDAC (60 %) oder HLA-kompatibler allo-HSCT (20 %). Zwei Patienten (20 %) konnten aufgrund therapielimitierender Komorbiditäten keine Induktionschemotherapie erhalten.

Tabelle 10: Demographische und klinische Patientenmerkmale

UPN	Alter	HCT-CI ⁱ	AML Subtyp ⁱⁱ	Zytogenetik	Molekularbiologie	Chemotherapie-sensitivität ⁱⁱⁱ
#01	27	1	AML, NOS	47,XX, +21	FLT3-ITD	++
#02	54	0	AML, NOS	46,XX	NPM1	++
#03	28	0	AML, NOS	46,XX	FLT3-ITD; NPM1	++
#04	78	9	AML, NOS	n.b.	n.b.	n.b.
#05	77	5	AML, NOS	46,XX	normal	-
#06	80	3	MDS assoziiert	46,XY	normal	++
#07	72	5	MDS assoziiert	komplex	normal	-
#08	72	2	AML, NOS	47,XX,+21	FLT3-ITD; NPM1	++
#09	56	0	MDS assoziiert	komplex	normal	++
#10	44	n.b.	genetische Abnormalität	Inv16	CBFb-MYH11	n.b.
#11	31	1	AML, NOS	46,XY	FLT3-ITD	-
#12	54	n.b.	AML, NOS	46,XY	FLT3-ITD; NPM1	n.b.
#13	66	3	MDS assoziiert	46,XX, 5q-	MLL-PTD	-
#14	78	3	MDS assoziiert	n.b.	n.b.	n.b.
#15	41	0	AML, NOS	46,XY	normal	-
#16	72	1	AML, NOS	komplex	MLL-PTD	-
#17	54	4	therapieassoziiert	komplex	normal	++
#18	79	1	genetische Abnormalität	46,XY, t(6;9)	FLT3-ITD; DEK-CAN	-
#19	84	5	AML, NOS	komplex	normal	++

ⁱ HCT-CI: Hematopoietic Cell Transplantation-Comorbidity Index (24)

ⁱⁱ WHO Klassifikation 2008 (114)

ⁱⁱⁱ Ansprechen auf Induktionschemotherapie (Ara-C und Daunorubicin)

Abkürzungen: NOS: not otherwise specified, MDS: Myelodysplastisches Syndrom, n.b.: nicht bestimmt, UPN: uniforme Patientennummer

3.2 Allogene $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zelllinien aus TZR $\alpha\beta$ depletierten Leukaphereseprodukten

3.2.1 Proliferation von TZR $\alpha\beta$ depletierten $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen

Zur Generierung standardisierter $V\gamma 9V\delta 2$ -Effektorzelllinien wurden HLA-inkompatible TZR $\alpha\beta$ depletierte Leukaphereseprodukte von zwei gesunden unverwandten Spendern verwendet. Die PBMCs der Spender wurden selektiv TZR $\alpha\beta$ (Donor A) oder kombiniert TZR $\alpha\beta/CD19$ (Donor B) depletiert. Die depletierten Spenderzellen wurden mit BrHPP (1 μ M) oder Zoledronat (ZOL 10 μ M) und rekombinanten IL-2 (100 IE) inkubiert. Die Proliferation wurde am siebten und zehnten Tag bestimmt. Die maximale absolute und relative $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-Expansion wurde bei beiden Spendern am zehnten Tag erreicht. Der durchschnittliche Anteil TZR $V\gamma 9V\delta 2$ positiver Lymphozyten lag bei Donor A bei 75.26 % \pm 2.50 bzw. bei Donor B bei 92.59 % \pm 0.97 (Mittelwert \pm SEM). Eine repräsentative FACS-Analyse einer PAg-stimulierten PBMC-Kultur ist in Abbildung 4 dargestellt.

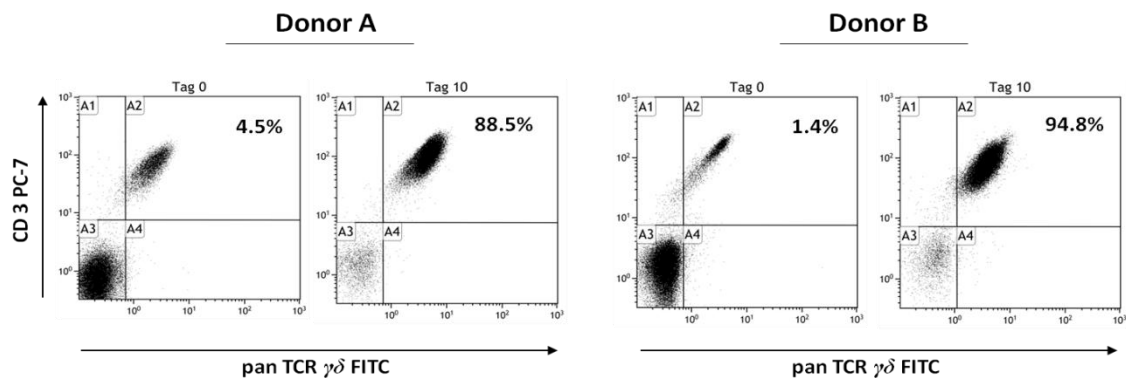


Abb. 4: Phosphoantigen-induzierte Proliferation von TZR $\alpha\beta$ depletierten $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen.

Repräsentative Dot Plots für Donor A und Donor B. Die TZR $\alpha\beta$ (Donor A) bzw. TZR $\alpha\beta/CD19$ (Donor B) depletierte Leukaphereseprodukte wurden mit IL-2 (100 U/ml) und 1 μ M Bromohydrinpyrophosphat (BrHPP) 10 Tage koinkubiert. Der relative Anteil an $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen wurde vor und nach Stimulation durchflusszytometrisch bestimmt. Die dargestellten Analysen sind repräsentativ für 19 (Donor A) und 14 (Donor B) unabhängige Proliferationsassays.

3.2.2 Zytotoxische Aktivität von TZR $\alpha\beta$ depletierten $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen

Zur Überprüfung der Effektorfunktion von TZR $\alpha\beta$ depletierten $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen wurde die zytotoxische Aktivität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber den $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-sensitiven Zelllinien Daudi (Burkittlymphom) und RPMI 8226 (Multiples Myelom) bestimmt. Erwartungsgemäß zeigte sich eine normale Reaktivität TZR $\alpha\beta$ depletierter $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber Daudi und RPMI 8226 Zellen (Abbildung 5).

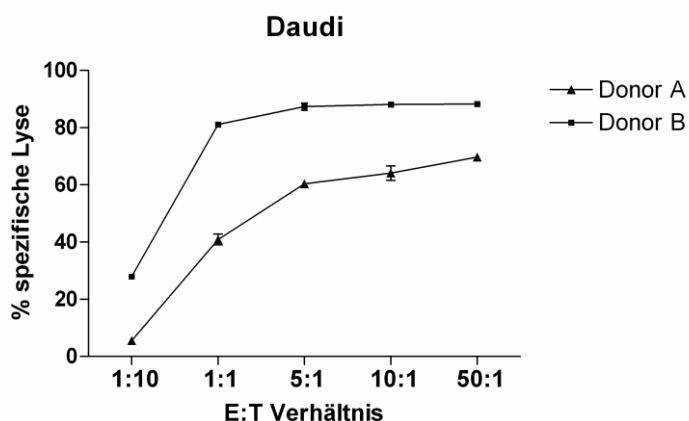


Abb. 5: Zytotoxische Aktivität TZR $\alpha\beta$ depletierter und PAg-expandierter $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber Daudi-Zellen.

Die spezifische Lyse ist dargestellt als Mittelwert \pm SD für die angegebene E:T Ratio. Die Zytotoxizitätsanalysen sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Ähnliche Zytotoxizitätsprofile wurden gegenüber der Zelllinie RPMI 8226 beobachtet.

3.3 Natürliche Antileukämieantwort von HLA-inkompatiblen $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen

3.3.1 Suszeptibilität primärer AML Zellen gegenüber $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen

Zur Bestimmung der antileukämischen Aktivität HLA-inkompatibler $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber AML-Blasten wurden standardisierte Zytotoxizitätsanalysen durchgeführt. Die AML-Zellen wurden 19 Patienten mit unterschiedlichen AML-Subtypen entnommen. Als Effektorzellen dienten die in Kapitel 3.2 dargestellten PAg-reaktiven $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zelllinien. Wie in Abbildung 6 dargestellt zeigte sich

eine hochvariable Zytotoxizität zwischen 2.91 % - 56.26 % (E:T Ratio 50:1). Die nachfolgenden Angaben zur prozentualen spezifischen Lyse beziehen sich auf ein E:T Verhältnis von 50:1. Die antileukämische Aktivität lag durchschnittlich bei 15.55 % \pm 2.94 (Mittelwert \pm SEM). Zur Beurteilung der Suszeptibilität der AML-Zellen gegenüber $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen wurden Leukämien mit einer spezifischen Lyse \geq 15 % als $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-empfindlich bzw. Leukämien mit einer spezifischen Lyse $<$ 15 % als $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-resistent gewertet. Innerhalb der 19 untersuchten Patientenproben waren sieben Leukämien (37 %) empfindlich bzw. zwölf Leukämien (63 %) resistent gegenüber $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen. Zur Überprüfung der Spenderunabhängigkeit der beobachteten Ergebnisse wurden 14 von 19 Leukämien gegenüber Donor B getestet. Die ermittelten Zytotoxizitätsprofile zeigten eine Übereinstimmung in 13 von 14 Analysen (91 %).

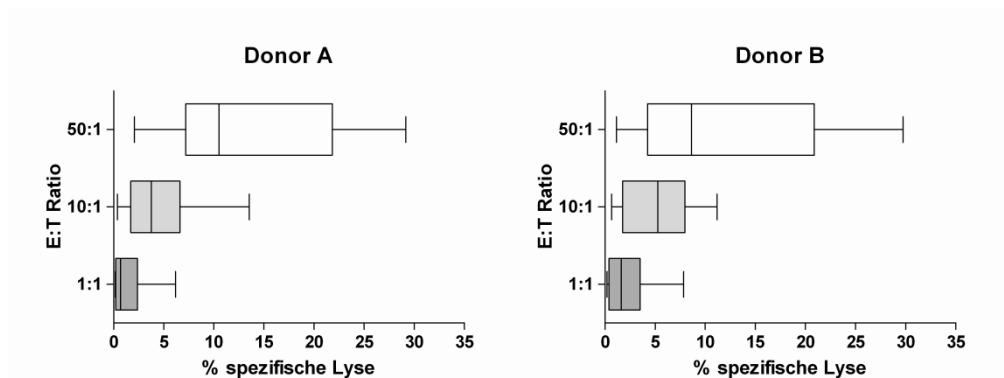


Abb. 6: Natürliche antileukämische Aktivität von allogenen $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen.

Das zytotoxische Potenzial von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber AML-Zellen (n = 18, Donor A; n = 14 Donor B) ist dargestellt als Boxplot für das angegebene E:T Verhältnis. Die senkrechte Linie gibt den Median an. Die Mittelwerte der spezifischen Lyse zwischen Donor A und B unterscheiden sich nicht signifikant (*t* test, $p \geq 0.05$).

3.3.2 Zelloberflächenexpression Killer-aktivierender und inhibierender Liganden auf primären AML-Zellen

Das zytotoxische Potenzial von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen wird neben der TZR-abhängigen Erkennung von PAg, TZR-unabhängig über Killer-aktivierende und

inhibierende Rezeptor-Liganden Interaktionen reguliert. Die Leukämiezellen wurden daher auf eine Oberflächenexpression NK- bzw. $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-aktivierender bzw. inhibierender Kandidatenantigene untersucht. Es zeigte sich eine interindividuell heterogene Expression der untersuchten Kandidatenantigene mit Ausnahme einer signifikanten Koexpression von CD112 und CD155 ($P < 0.05$) sowie einer inversen Koexpression von CD112 und ULBP1 ($P < 0.01$) (Abbildung 7).

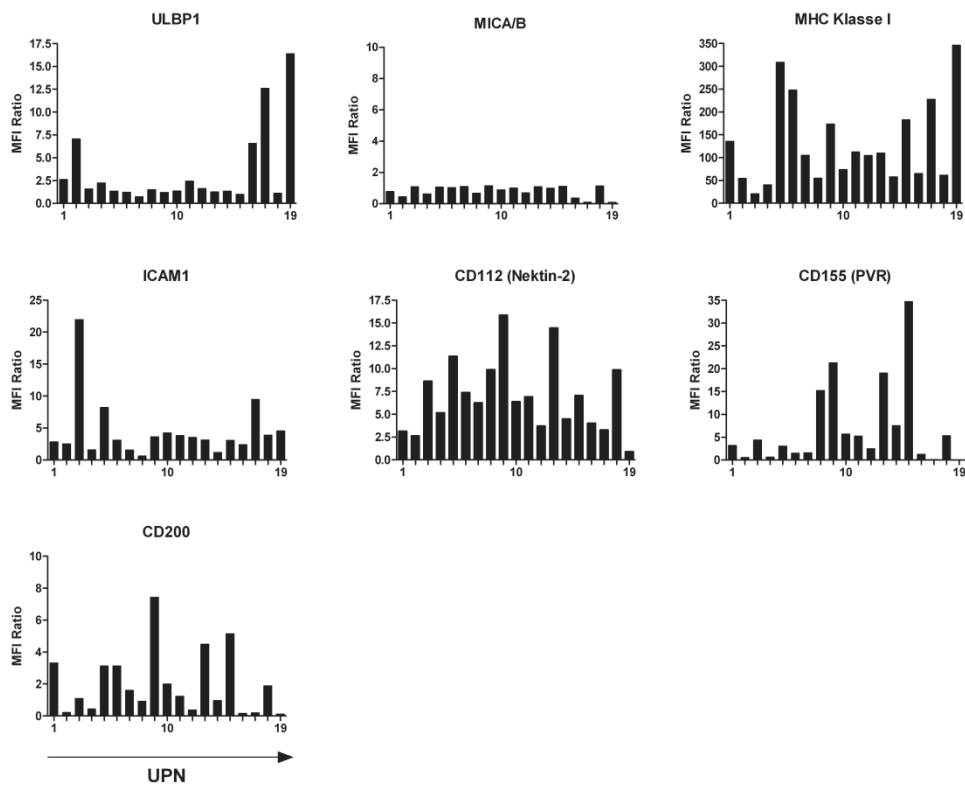


Abb. 7: Zelloberflächenexpression von Killer-aktivierenden und inhibierenden Liganden auf primären AML-Zellen.

Die AML-Blasten wurden gegen die spezifische Antigene und zwei leukämiespezifische Oberflächenmarker (z.B. CD34 und CD33) gefärbt. Die MFI wurde am FACS Calibur bestimmt und die MFI Ratio anschließend kalkuliert. UPN: uniforme Patientenummer.

3.3.3 Korrelation zwischen der antileukämischen Aktivität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen und der Expression Killer-aktivierender und inhibierender Liganden

Zur statistischen Vergleichbarkeit der Oberflächenexpressionsdichte der dargestellten Killer-aktivierenden und inhibierenden Liganden mit den in Absatz 3.3.1 gemessenen Zytotoxizitäten wurde die Expression der Kandidatenantigene basierend auf der kalkulierten MFI Ratio als negativ (MFI Ratio < 5), intermediär (MFI Ratio 5-10) und hoch (MFI Ratio > 10) klassifiziert. Wie in Abbildung 8 dargestellt zeigten 21 % aller Leukämien eine intermediäre bis hohe ULBP1-Expression. ICAM1 wurde bei 16 %, CD112 bei 63 %, CD155 bei 44 % und CD200 bei lediglich 10 % aller Leukämien exprimiert. Die Expression von MICA/B war konsistent negativ.

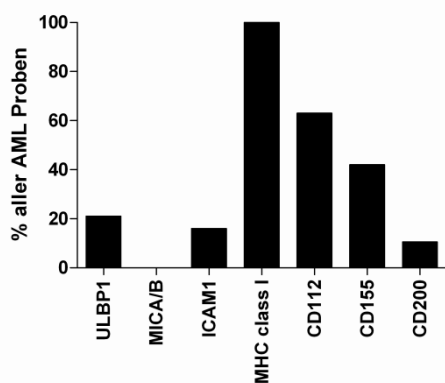


Abb. 8: Relativer Anteil an Leukämien mit intermediärer und hoher Oberflächenexpression von Killer-aktivierenden bzw. inhibierenden Liganden.

Die Oberflächenexpression wurde anhand der absoluten Werte der MFI Ratios in negativ (MFI Ratio ≤ 5), intermediär (MFI Ratio 5-10) und hoch (MFI Ratio ≥ 10) eingeteilt. Für die Darstellung wurden nur MFI Ratio Werte ≥ 5 berücksichtigt.

Im Folgenden wurde in Kontingenzanalysen der Zusammenhang zwischen der beobachteten Zytotoxizität und der Oberflächenexpression der Kandidatenantigene untersucht. Dabei zeigte sich keine Korrelation für ICAM1, MHC Klasse 1, CD155 und CD200. Dagegen korrelierte die Expression von ULBP1 positiv ($P=0.009$; Odds Ratio: 32.1) und die Expression von CD112 (Nektin-2)

negativ ($P=0.010$; Odds Ratio: 0.038) mit der beobachteten zytotoxischen Reaktivität allogener $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen.

Tabelle 11: Expression killer-aktivierender und -inhibierender Liganden Innerhalb $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-empfindlicher und resistenter AML-Blasten (%)ⁱ

Oberflächenmarker	$V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-empfindlich (%)	$V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-resistent (%)	<i>P</i>
ULBP1	57	0	0.009
MICA/B	0	0	-
CD112 (Nectin-2)	28	83	0.010
CD155 (PVR)	14	58	0.147
CD200	0	17	0.508
MHC Klasse I	100	100	-
ICAM1	14	17	1.000

ⁱberücksichtigt wurden nur Oberflächenexpressionen MFI Ratio ≥ 5

3.3.4 Korrelation zwischen der Antileukämieantwort von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen und der KIR-Liganden-Inkompatibilität zwischen Patienten und Spendern

Wie in Absatz 1.1.5 dargestellt zeigten präklinische und klinische Studien im haploidenten Transplantationssetting einen therapeutischen Vorteil bei NK-Zell-KIR-Liganden-Inkompatibilität zwischen Donor und Akzeptor. Im Folgenden wurden daher alle verfügbaren Patienten-Spender-Konstellationen auf einen KIR-Liganden-Mismatch untersucht und mit der beobachteten $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-vermittelten Zytotoxizität verglichen (Tabelle 12).

Innerhalb der auswertbaren Spender-Patienten-Konstellationen (79%) lag in 60% ein KIR-Liganden-Mismatch in GvH/GvL-Richtung vor. Allerdings zeigte sich keine Korrelation mit der antileukämischen Aktivität allogener $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen ($P>0.05$).

Tabelle 12: KIR-Liganden-Mismatch zwischen Patienten und Spendern (GvH/GvL)

UPN	Donor A	Donor B	V γ 9V δ 2 T-Zell-Zytotoxizität	
#1	—	HLA-C group 2	+	-
#2	HLA-Bw4	HLA-C group 2	+	+
#3	HLA-C-group 1	HLA-C group 1	-	-
#4	n.b.	n.b.	+	+
#5	n.b.	n.b.	-	-
#6	HLA-Bw4	HLA-C group 2	-	-
#7	—	—	-	-
#8	—	HLA-C group 2	-	-
#9	HLA-Bw4	—	-	-
#10	—	—	-	-
#11	HLA-Bw4	—	+	+
#12	—	—	-	-
#13	—	—	-	-
#14	n.b.	n.b.	-	-
#15	—	HLA-C group 2	-	-
#16	—	—	+	+
#17	HLA-Bw4	HLA-C group 2	+	+
#18	n.b.	n.b.	-	-
#19	—	—	+	+

- kein KIR-L-Mismatch zwischen Patient und Spender

Abkürzungen: KIR-L: killer Ig-like receptor ligand, GvH: graft vs. host, GvL: graft vs. leukemia, n.b.: nicht bestimmt

3.4. Induktion der Antileukämieantwort von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen durch Zoledronat-induzierte Hemmung des Mevalonatmetabolismus der AML-Blasten

Im vierten Experimentalteil der Arbeit wurde die Möglichkeit untersucht die Zytotoxizität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber primären AML-Blasten pharmakologisch zu steigern bzw. zu induzieren. Mehrere Publikationen konnten bisher zeigen, dass hämatopoetische und solide Tumorzellen nach Vorbehandlung mit ABP wie beispielsweise ZOL von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen effizient lysiert werden können. $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen erkennen Tumorzellen TZR-abhängig durch auto-PAg des MVA-Metabolismus der Cholesterol- und Isoprenoidbiosynthese. Die ABP-vermittelte Hemmung der FFP-Synthese führt zur konsekutiven intrazellulären Akkumulation von IPP/Apppl.

3.4.1 Direkter zytotoxischer Effekt von Zoledronat auf AML-Blasten

Zum Ausschluss einer direkten zytotoxischen Aktivität von ZOL wurden die primären AML-Zellen mit und ohne ZOL (10, 50 μM) 14 Stunden in IL-2-haltigen Kulturmedium koinkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität der Leukämiezellen lichtmikroskopisch und durchflusszytometrisch bestimmt. Keine der getesteten ZOL-Konzentrationen führte nach 14 Stunden zu einer signifikanten Verminderung der Zellviabilität (Abbildung 9).

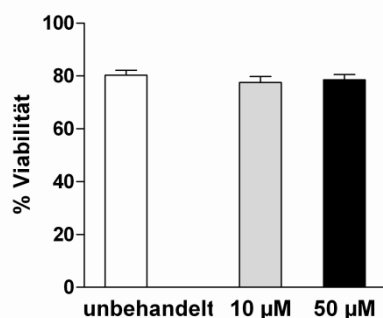


Abb. 9: Zellviabilität von AML-Blasten nach 14-stündiger Koinkubation mit Zoledronat.

Die Zellviabilität ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM von Duplikaten, $n=19$. Die Mittelwerte der Zellviabilität unbehandelter und behandelter AML-Blasten unterscheiden sich nicht signifikant (ANOVA Signifikanztest $P>0.05$).

3.4.2 Zoledronat-induzierte Zytotoxizität allogener $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber primären AML-Blasten

Die folgenden Experimente untersuchten die Zytotoxizität allogener $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber ABP-vorbehandelten AML-Blasten. Eine kontinuierliche 14-stündige Stimulation der Leukämiezellen mit ZOL resultierte in einer signifikanten konzentrationsabhängigen Zunahme der zytotoxischen Aktivität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen. Die durchschnittliche spezifische Lyse ZOL 10 μM und ZOL 50 μM vorbehandelter AML-Blasten betrug 25.24 % \pm 3.91 bzw. 35.93 % \pm 4.39 (Mittelwert \pm SEM). Die durchschnittliche zytotoxische Aktivität war 1.6-fach (ZOL 10 μM) bzw. 2.3-fach (ZOL 50 μM) gesteigert gegenüber der Kontrollgruppe (Abbildung 10).

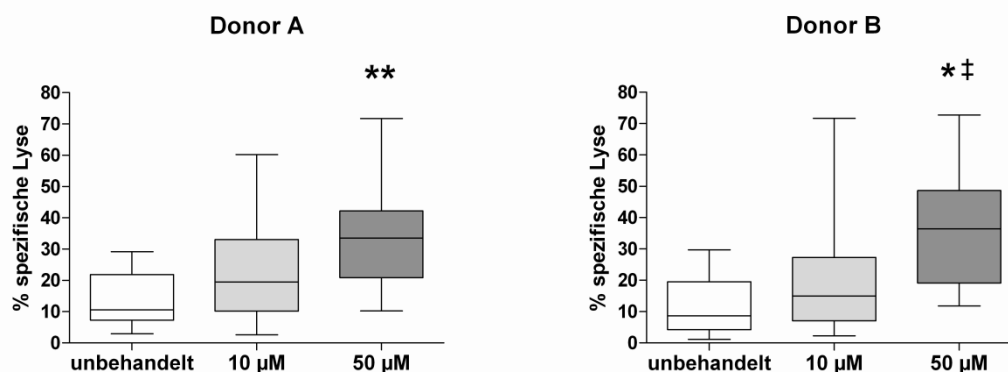


Abb. 10: Zoledronat-abhängige Zytotoxizität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber primären AML-Blasten.

Konzentrationsabhängige Zunahme der zytotoxischen Aktivität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber Zoledronat (ZOL)-vorbehandelten AML-Blasten dargestellt als Box-Whisker-Plots für eine E:T Ratio von 50:1. Die horizontale Linie entspricht dem Median. Die AML-Zellen ($n = 19$ für Donor A, $n = 14$ für Donor B) wurden 14 h mit und ohne ZOL koinkubiert. Anschließend wurden Zytotoxizitätsanalysen durchgeführt. Die Mittelwerte der spezifischen Lyse unbehandelter und ZOL 50 μM vorbehandelter AML Zellen unterscheiden sich signifikant bei Donor A und Donor B (ANOVA Signifikanztest, ** $P<0.01$ vs. unbehandelt, ‡ $P<0.001$ vs. unbehandelt). Die Mittelwerte

Ergebnisse

der spezifischen Lyse zwischen ZOL 10 und 50 μM unterscheiden sich signifikant bei Donor B (ANOVA Signifikanztest, $*P < 0.05$ vs. ZOL 10 μM).

Interessanterweise zeigten die untersuchten unbehandelten und ZOL-vorbehandelten primären AML-Blasten unterschiedliche, spenderunabhängige Zytotoxizitätsmuster (Abbildung 11).

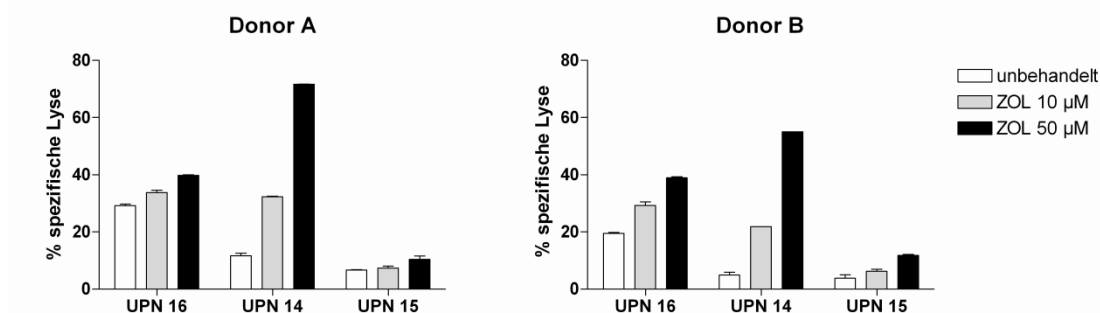


Abb. 11: Heterogene $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegenüber unbehandelten und Zoledronat-vorbehandelten AML-Blasten.

Die Zytotoxizität ist dargestellt als spezifische Lyse \pm SD. Die Daten sind repräsentativ für 19 (Donor A) und 14 (Donor B) unabhängige Experimente.

Basierend auf den Ergebnissen der Zytotoxizitätsmessungen konnten drei Reaktionsgruppen unterschieden werden. Leukämien der Gruppe 1 (37 %) zeigten eine natürliche Suszeptibilität gegenüber $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen. Leukämien der Gruppe 2 (32 %) zeigten keine intrinsische Empfindlichkeit gegenüber $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen. Allerdings bewirkte die Vorbehandlung der AML-Zellen mit ZOL eine signifikante dosisabhängige Zunahme der zytotoxischen Aktivität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen. Die spezifische Lyse ZOL 10 μM und ZOL 50 μM vorbehandelter AML-Blasten war 3.5- bzw. 6-fach gesteigert gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe. Die übrigen Leukämiezellen der Gruppe 3 (31 %) zeigten keine natürliche und nur geringe ABP-induzierte Empfindlichkeit gegenüber $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen. Die Leukämien der Gruppe 3 wurden daher als refraktär klassifiziert (Abbildung 12).

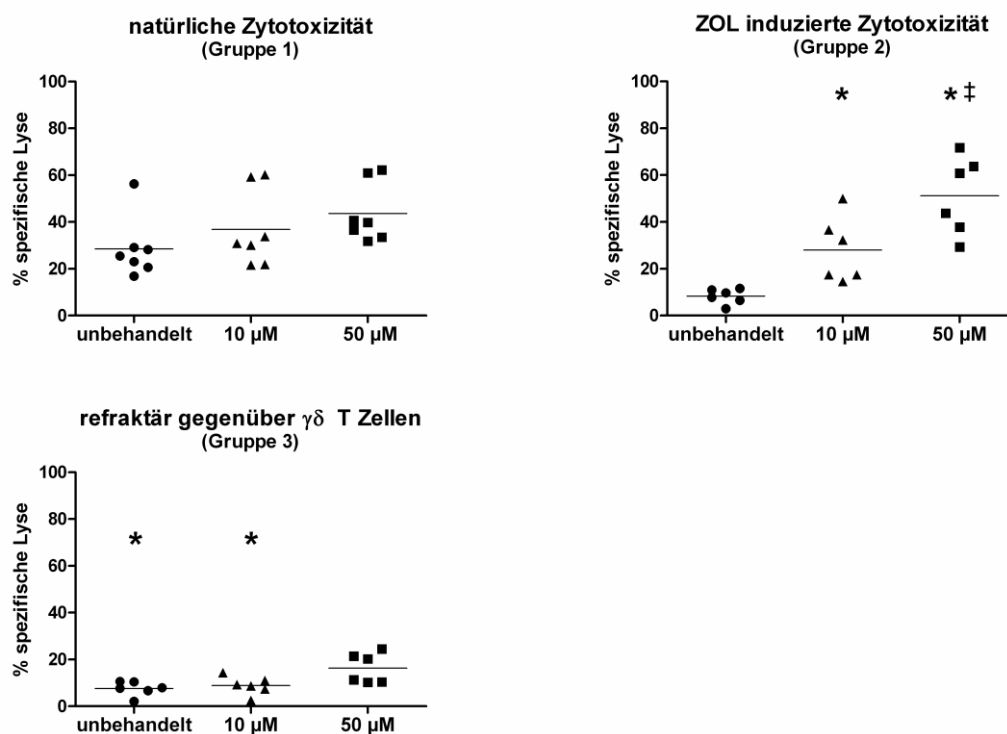


Abb. 12: Unterschiedliche Suszeptibilität unbehandelter und Zoledronat-vorbehandelter AML-Blasten gegenüber $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen.

Antileukämische Aktivität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen (Donor A) gegenüber natürlichen und ZOL-vorbehandelten AML-Blasten, dargestellt als Streudiagramm für eine E:T Ratio von 50:1. Die getesteten AML-Proben wurden den angegebenen Reaktionsgruppen zugeteilt. Die horizontalen Linien entsprechen dem Mittelwert. Die Mittelwerte der spezifischen Lyse unbehandelter und ZOL 10 μM und 50 μM vorbehandelter Leukämiezellen unterscheiden sich in Gruppe 2 signifikant (ANOVA, Signifikanztest, * $p < 0.05$ vs. unbehandelt und ZOL 10 μM , ‡ $p < 0.001$ vs. unbehandelt.). Die Mittelwerte der spezifischen Lyse unterscheiden sich signifikant in Gruppe 3 (ANOVA, Signifikanztest, * $P < 0.05$ vs. ZOL 50 μM).

3.4.3 Aktivität des Mevalonatmetabolismus in Zoledronat-sensitiven und resistenten AML-Blasten

Die Suszeptibilität ABP-behandelter Tumorzellen gegenüber $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen ist mutmaßlich von der Aktivität des MVA-Metabolismus abhängig. Die HMG-CoA-Reduktase, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Cholesterin- und Isoprenoidbiosynthese, reguliert die Aktivität des MVA-Metabolismus. Da die in Absatz 3.4.2 dargestellten Ergebnisse auf eine unterschiedliche Aktivität des

MVA-Stoffwechselwegs hindeuten, wurde in den nachfolgend aufgeführten Experimenten der Phosphorylierungsstatus (= Enzymaktivität) der HMG-CoA-Reduktase mittels Phosflow-Technologie untersucht. Der Phosphorylierungsstatus unbehandelter AML-Zellen aller drei Reaktionsgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede. Allerdings konnte nach 14-stündiger Stimulation mit 50 μ M ZOL eine signifikante Abnahme der Phosphorylierung der HMG-CoA-Reduktase bei ZOL-sensitiven AML-Blasten (Reaktionsgruppe 2) beobachtet werden. Dagegen zeigten ZOL-resistente und hypo-responsive AML-Blasten keine signifikante Aktivitätsänderung der HMG-CoA-Reduktase (Abbildung 13).

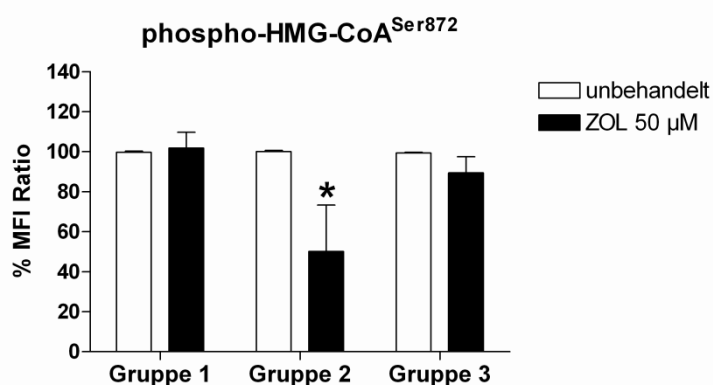


Abb. 13: Aktivität der HMG-CoA Reduktase nach Stimulation mit Zoledronat in ZOL-responsiven und refraktären AML-Zellen.

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM der prozentualen Veränderung der MFI Ratio zur unbehandelten Kontrollgruppe (= 100 %) jeder Reaktionsgruppe; $n = 3$. Die Leukämiezellen wurden 14 Stunden mit 50 μ M ZOL kokubiert. Der Phosphorylierungsgrad der HMG-CoA-Reduktase wurde anschließend mittels Phosflow-Technologie durchflusszytometrisch bestimmt. In Gruppe 2 zeigte sich eine signifikante Abnahme der Phosphorylierungsstatus der HMG-Co-Reduktase ($P < 0.05$, t test).

3.4.4 Korrelation zwischen der antileukämischen Aktivität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen und dem Differenzierungsstatus der AML-Blasten

Im Folgenden wurde der Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsstatus der Leukämiezellen und der natürlichen und ABP-induzierten Zytotoxizität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen untersucht. Der Differenzierungsgrad der AML Blasten wurde

anhand der CD45 und CD14 Oberflächenexpression der Leukämiezellen durchflusszytometrisch bestimmt und den beobachteten Reaktionsgruppen zugeordnet. In Reaktionsgruppe 1 waren alle monoblastisch-differenzierten AML-Blasten vertreten, die eine hohe Expression des NKG2D-Liganden ULBP1 aufwiesen (n = 3). Alle myelo-monozytär-differenzierten Leukämiezellen (n = 5) fanden sich in der ZOL-sensitiven Reaktionsgruppe 2. Dagegen konnte die überwiegende Mehrheit der myeloblastischen AML-Blasten der refraktären Reaktionsgruppe 3 zugeordnet werden (Abbildung 14, Tabelle 13).

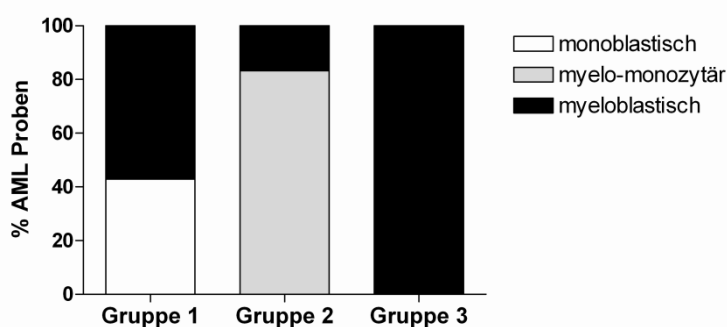


Abb. 14: Zuordnung des Differenzierungsstatus der Leukämiezellen zu den beobachteten Reaktionsgruppen.

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an AML Proben innerhalb einer Reaktionsgruppe (Gruppe 1: n = 7; Gruppe 2: n = 6; Gruppe 3: n = 6).

Tabelle 13: ULBP1 Expression, AML- Differenzierung und Ansprechen primärer AML Blasten auf $V\gamma 9V\delta 2$ T Zellen

UPN	ULBP1 Expression ⁱ	Differenzierungs-grad	Ansprechen auf $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen
#1	2.6	myeloblastisch	Gruppe 1
#2	7.1	myeloblastisch	Gruppe 1
#3	1.6	myeloblastisch	Gruppe 3
#4	2.3	myeloblastisch	Gruppe 1
#5	1.3	myeloblastisch	Gruppe 3
#6	1.2	myelo-monozytär	Gruppe 2
#7	0.7	myelo-monozytär	Gruppe 2

Ergebnisse

#8	1.5	myeloblastisch	Gruppe 3
#9	1.2	myelo-monozytär	Gruppe 2
#10	1.4	myelo-monozytär	Gruppe 2
#11	2.4	myeloblastisch	Gruppe 1
#12	1.6	myeloblastisch	Gruppe 3
#13	1.3	myelo-monozytär	Gruppe 2
#14	1.4	myeloblastisch	Gruppe 2
#15	1.0	myeloblastisch	Gruppe 3
#16	6.6	monoblastisch	Gruppe 1
#17	12.6	monoblastisch	Gruppe 1
#18	1.1	myeloblastisch	Gruppe 3
#19	16.4	monoblastisch	Gruppe 1

iWerte entsprechen der MFI Ratio

Abkürzungen: UPN: uniforme Patientenummer

4 Diskussion

4.1 Stellenwert von Spenderlymphozyten der natürlichen Immunantwort im Transplantations- und Nicht-Transplantationssetting

Die AML ist die häufigste Indikation für eine allo-HSCT. Die Anzahl allogentstammtransplantierter AML-Patienten ist in den letzten 15 Jahren insbesondere durch die Berücksichtigung HLA-kompatibler unverwandter Stammzellspender und Nabelschnurblutstammzellen (UCB) stetig angestiegen (115). Allerdings steht ein verwandter bzw. unverwandter HLA-kompatibler Stammzellspender nur für 25 % bzw. 60 bis 70 % der Patienten zur Verfügung (116). Die unverwandte UCB-Transplantation ist auch bei geringerer HLA-Kompatibilität zwischen Empfänger und Spender möglich aber aufgrund der nur begrenzt verfügbaren Zellzahl nicht für jeden erwachsenen Patienten geeignet (117, 118). Da theoretisch jeder Patient ein haploidenten Familienmitglied nachweisen kann, stellt die haplo-HSCT vor allem für Patienten mit dringlicher Transplantationsindikation ohne verfügbaren HLA-kompatiblen Spender eine sinnvolle Alternative dar (119-121). Trotz erheblichen Fortschritten in der Transplantataufbereitung ist die haplo-HSCT mit einer hohen GvHD-Inzidenz und insbesondere aufgrund der verzögerten Immunrekonstitution mit zum Teil letalen (Virus)-Infektionen (Cytomegalievirus [CMV]-Reaktivierungen) assoziiert (122). Da bisher mehrere klinische Studien zeigen konnten, dass Spenderlymphozyten der natürlichen Immunantwort, insbesondere KIR-Ligandeninkompatible NK-Zellen, objektive Remissionen erzielen können, nutzen innovative Transplantationsstrategien und adoptive Immuntherapien allogene NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen um eine potente Antileukämieantwort zu induzieren (29-31, 33, 123, 124). Die bisher im haploidenten Transplantationssetting verwendeten CD3-depletierten Stammzellpräparate berücksichtigen allerdings das antiinfektive und antileukämische Potenzial von $V\gamma9V\delta2$ T-Zellen nicht. Um Transplantate mit Spenderlymphozyten zu generieren, die einen hohen Anteil an natürlichen Effektorzellen (NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen) bzw. geringen Anteil von konventionellen $\alpha\beta$ T-Zellen beinhalten werden aktuell verschiedene Depletions-

strategien verfolgt. Smetak et al. konnten zeigen, dass durch kombinierte Depletion von CD4 und CD8 positiven $\alpha\beta$ T-Zellen biologisch aktive „*innate lymphocytes*“ (NK- und $V\gamma9V\delta2$ T-Zellen) passiv angereichert werden können (125). In einer kürzlich publizierten Arbeit konnten Wilhelm et al. zudem nachweisen, dass haploidente $V\gamma9V\delta2$ T-Zellen aus CD4 und CD8 depletierten Leukaphereseprodukten erfolgreich adoptiv transferiert und *in vivo* expandiert werden können (124). Ein ähnlicher Ansatz der *ex vivo* Manipulation von Stammzellprodukten zielt auf die selektive Depletion von TZR $\alpha\beta$ T-Zellen mittels direkter Antikörper gegen den TZR $\alpha\beta$ (126, 127). Die zusätzliche simultane Depletion CD19-positiver B-Zellen dient der Prävention einer transplantationsassoziierten lymphoproliferativen B-Zell-Neoplasie (PTLD). Derzeit untersuchen mehrere Phase I/II Studien die Effektivität einer TZR $\alpha\beta$ /CD19 depletierten haplo-HSCT bei pädiatrischen und adulten Patienten mit rezidivierten und refraktären hämatologischen Neoplasien. Die bisher veröffentlichten klinischen Daten zeigen, dass TZR $\alpha\beta$ /CD19 depletierte Stammzellprodukte zu einem stabilen Engraftment und frühen Immunrekonstitution führen bzw. mit einem geringen akuten und chronischen GvHD-Risiko verbunden sind (123, 128). Der Nutzen von haploidenten TZR $\alpha\beta$ /CD19 depletierten Spenderlymphozyten im Nicht-Transplantationssetting bzw. die *in vivo* Expansion von adoptiv transferierten TZR $\alpha\beta$ /CD19 depletierten $V\gamma9V\delta2$ T-Zellen ist allerdings bisher noch nicht im Rahmen klinischer Studien untersucht worden.

4.2 Stellenwert des NKG2D-Signalwegs in der Antileukämieantwort von allogenen $V\gamma9V\delta2$ T-Zellen

$V\gamma9V\delta2$ T-Zellen spielen in der afferenten Phase der Immunantwort eine essentielle Rolle, da sie infektiöse und metabolisch transformierte Zellen über stressinduzierte Antigene erkennen und ohne klonale Expansion effizient lysieren können (40). Mehrere Arbeitsgruppen konnten bisher zeigen, dass die Oberflächenexpression der stressinduzierten NKG2DL MICA, MICB und insbesondere ULBP1 auf hämatopoetischen Tumorzelllinien bzw. primären Tumorzellen mit der Zytotoxizität von NK-Zellen und $V\gamma9V\delta2$ T-Zellen korreliert

(84, 86). Allerdings sind die bisher veröffentlichten Daten vor allem im Hinblick auf die NKG2DL-Expression primärer AML-Zellen uneinheitlich. Während die Arbeiten von Pende et al. und Gertner-Dardenne et al. einen MICA-, MICB-negativen AML-Phänotyp mit niedriger ULBP1 Expressionsdichte beschreiben, fand die Arbeitsgruppe von Alexander Steinle eine hohe Frequenz MICA-positiver primärer Leukämiezellen (34, 83, 89). Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv zeigte sich eine ähnliche variable NKG2DL-Expression. Während 21 % der untersuchten Leukämien ULBP1 koexprimierten konnte bei keiner Leukämie eine relevante Oberflächenexpression für MICA/B nachgewiesen werden. In der Gruppe der ULBP1-positiven Leukämien zeigten in dieser Arbeit ausschließlich monozytär-differenzierte AML-Blasten eine hohe ULBP1-Expressionsdichte. Diese Ergebnisse bestätigen bisher publizierte Daten, die eine Korrelation zwischen dem Zelldifferenzierungsgrad von AML-Blasten und der Oberflächenexpression von ULBP1 beschreiben (86, 129). Die Expression von ULBP1 ist daher möglicherweise myeloischen Zellen vorbehalten, die in einem späteren Reifungsstadium maligne transformieren. Allerdings sind NKG2DL und insbesondere ULBP1 keine tumorspezifischen Antigene (TSA), da sich auch in normalen hämatopoetischen, lymphoretikulären und epithelialen Zellen Transkripte von ULBP1 bzw. eine Oberflächenexpression von ULBP1 nachweisen lässt (81, 129). Der immunologische Stellenwert der ULBP-Expression auf reifen Knochenmarks- bzw. peripheren Blutzellen (Monozyten, Granulozyten und B-Lymphozyten) ist bisher ebenfalls noch nicht geklärt.

Die Arbeitsgruppe von Anita Gomes und Bruno Silva-Santos konnte zeigen, dass die Expression von ULBP1 mit der zytotoxischen Aktivität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber primären Lymphom-, B- und T-Zell-Leukämiezellen bzw. Zelllinien (HL-60, Molt-4, Jurkat) korreliert (84). Darüber hinaus konnte ULBP1 in einer Reihe von Genexpressionsanalysen als prädiktiver Biomarker identifiziert werden, der die Suszeptibilität primärer Leukämie- und Lymphomzellen bzw. hämatopoetischer Tumorzelllinien gegenüber $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen bestimmt (130). Lanca et al. konnten mit spezifischer Rezeptorblockade nachweisen, dass die untersuchten Zelllinien TZR-unabhängig über den

NKG2D-Signalweg lysiert wurden. In Genexpressionsanalysen konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass die mRNA-Expression von ULBP1 in $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-empfindlichen Leukämie- und Lymphomzelllinien signifikant höher war als in $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-resistenten Zelllinien. ShRNA induzierte Gensuppression von ULBP1 führte zu einer signifikanten Reduktion (ca. 50%) der $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-vermittelten Zytotoxizität. Die Autoren schlussfolgerten, dass die zytotoxische Aktivität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber AML-Zelllinien neben dem NKG2D-Signalweg möglicherweise auch über andere Killer-aktivierende Rezeptoren wie beispielsweise DNAM1 induziert wird (84). Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit scheinen diese Beobachtungen teilweise zu bestätigen. Die Antileukämieantwort allogener $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen war gegenüber AML-Zellen mit Koexpression von ULBP1 signifikant gesteigert. Allerdings wurden auch AML-Blasten lysiert die kein ULBP1 exprimierten. Da sich keine positiven Korrelationen zwischen der Oberflächenexpression der DNAM1-Liganden CD112 und CD155 bzw. ICAM1 und der beobachteten Zytotoxizität zeigten, liegt die Vermutung nahe, dass die $V\gamma 9V\delta 2$ TZR-abhängige Erkennung von auto-PAg neben dem NKG2D-Signalweg eine wesentliche Rolle in der antileukämischen Aktivität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen spielt.

Die NKG2D-Signalkaskade hat einen herausragenden Stellenwert in der Immunüberwachung („*Immunosurveillance*“). Guerra et al. konnten zeigen, dass transgene NKG2D-defiziente Mäuse signifikant häufiger maligne Tumore entwickelten als NKG2D-exprimierende Wildtyp-Mäuse (131). Allerdings induzieren Tumore Strategien, sich dem NKG2D-Signalweg zu entziehen (132). Diese Annahme wird durch die Beobachtung erklärt, dass insbesondere NK-Zellen aber auch $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen von Patienten mit hämatologischen und soliden Neoplasien einen herabregulierten NKG2D-Rezeptor aufweisen (133). Eine Untersuchung von Salih et al. konnte zeigen, dass die Sera von 205 Leukämiepatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Spiegel löslicher NKG2DL enthielten. Die Arbeitsgruppe konnte zudem zeigen, dass die löslichen NKG2DL für die Herabregulation des NKG2D-Rezeptors bzw. für die fehlende NK-Zell-Reaktivität verantwortlich waren (134). Diese Beobachtungen stellen wahrscheinlich einen entscheidenden Mechanismus der Immunevasion dar

(135). Eine von Gertner-Dardenne et al. publizierte Arbeit scheint diese Theorie für $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen möglicherweise indirekt zu bestätigen. In spezifischen Blockierungsexperimenten ließ sich keine Beteiligung des NKG2D-Signalwegs an der zytotoxischen Aktivität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber autologen AML-Blasten nachweisen obwohl eine zu dieser Arbeit vergleichbare NKG2DL-Expression vorlag. Dagegen war die Zytotoxizität nach Blockade des $V\gamma 9V\delta 2$ TZR bzw. DNAM1-Rezeptors signifikant reduziert (34). Allerdings wurden die autologen $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen nicht auf eine mögliche Herabregulation des NKG2D-Rezeptor untersucht. Allogene NK- und $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen immunkompetente Spender zeigen keine NKG2DL-vermittelte Rezeptor-modulation und sind daher möglicherweise in der Lage residuelle NKG2DL-exprimierende Leukämiezellen über den NKG2D-Signalweg zu lysieren. Da allerdings auch tumorpromovierende Zytokine wie TGF- β und das Tumormikromilieu mit regulatorischen T-Zellen (TREGs) und myeloischen Suppressorzellen (MDSC) in der Lage sind die NKG2D-vermittelte Antitumorimmunität zu regulieren, müssen *in vivo* Untersuchungen zeigen, welcher Stellenwert der NKG2D-Signalkaskade in der Erkennung und Eliminierung von residuellen Leukämiezellen zukommt (136-138).

Für die übrigen untersuchten Kandidatenantigene (MHC Klasse 1, CD155, ICAM1 und CD200), für die NK- bzw. $\gamma\delta$ T-Zell-aktivierende bzw. inhibierende Rezeptor-Liganden-Interaktionen beschrieben wurden, ergaben sich keine signifikanten Korrelationen. Interessanterweise zeigte sich eine inverse Korrelation für die Koexpression von ULBP1 und CD112. $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-sensitive, ULBP1-exprimierende primäre AML-Zellen zeigten eine signifikant geringere Oberflächenexpression von CD112 (Nektin-2). Für diese Beobachtung gibt es bisher keine ausreichende Erklärung. Die DNAM1-Signalkaskade vermittelt analog zur NKG-2D-Signalkaskade ein aktivierendes Signal. Die Oberflächenexpression von CD112 (Nektin-2) hat daher keine negativ-prognostische Bedeutung. Die Rolle der DNAM1L-Expression in der antileukämischen Aktivität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber AML-Zellen sollte daher an einer größeren Patientenpopulation in weiterführenden Untersuchungen nochmals überprüft werden.

4.3 Stellenwert der Zoledronatvorbehandlung primärer AML-Zellen für die antileukämische Aktivität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bisher nachweisen, dass Tumorzellen nach Stimulation mit ABP intrazellulär IPP/Apppl akkumulieren (75, 139). Darüber hinaus zeigen eine Reihe von präklinischen und klinische Arbeiten, dass ABP-vorbehandelte Tumorzellen von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen *in vivo* und *in vitro* lysiert werden können (48, 140-143). Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit zeigen erstmals, dass die Zytotoxizität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber ZOL-vorbehandelten primären AML-Blasten dosisabhängig gesteigert und selektiv induziert werden kann. Die dargestellten Untersuchungen zeigen zudem signifikante Unterschiede in der Suszeptibilität ZOL-vorbehandelter Leukämiezellen gegenüber $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen.

Die ZOL-induzierte Inaktivierung der FFP-Synthase und konsekutive Akkumulation von IPP bzw. Synthese von Apppl folgt einer zeitabhängigen Reaktionskinetik. Nach Substratbindung der FFP-Synthase kommt zur Isomerisierung des Enzym-Inhibitor-Komplexes (144). Der Enzym-Inhibitor-Komplex wird durch Bindung von IPP verstärkt. Diese Konformationsänderung, d.h. die Potenz der FFP-Synthasehemmung kann durch eine Isomerisationskonstante (K_{ismo}) bestimmt werden. Die K_{ismo} korreliert mit der intrazellulären Akkumulation von IPP und Apppl. Das tertiäre ABP ZOL zeigt gegenüber anderen ABP die höchste K_{ismo} bzw. führt zur stärksten Akkumulation von IPP und Synthese von Apppl (145). Bisher veröffentlichte Daten zeigen, dass die maximale intrazelluläre Konzentration von IPP bzw. Apppl abhängig von der untersuchten Tumorentität und Inkubationsdauer sechs bis zwölf Stunden bzw. 24 Stunden nach Stimulation mit ZOL erreicht wird. Nach Inkubation mit ABP niedrigerer K_{ismo} , d.h. ABP mit geringerer Potenz den Enzym-Inhibitor-Komplex in der isomerisierten Form zu halten, werden maximale IPP/Apppl-Konzentrationen bereits sechs Stunden nach Stimulation erreicht (142, 144, 146, 147). Obwohl in der vorgelegten Arbeit keine Bestimmung der intrazellulären Konzentration von IPP und Apppl erfolgte, kann unter Berücksichtigung der bisher publizierten Daten davon ausgegangen werden, dass nach 14-stündiger Stimulation mit ZOL eine maximale intrazelluläre IPP-

Akkumulation erreicht wurde (144, 147). Interessanterweise ließen sich dennoch substanzielle Unterschiede in der Suszeptibilität von AML-Blasten gegenüber ZOL bzw. gegenüber $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen beobachten. AML-Blasten mit myelo-monozytärer bzw. monozytärer Differenzierung zeigten nach Inkubation mit 10 μM ZOL eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen während myeloblastische Leukämiezellen auch nach Stimulation mit 50 μM ZOL von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen nicht suffizient lysiert werden konnten. Die Suszeptibilität von AML-Zellen gegenüber ZOL ist daher mutmaßlich vom Zelldifferenzierungsgrad bzw. Reifungsstatus der Leukämiezellen abhängig. Die zelluläre Aufnahme von ABP aus dem flüssigen Extrazellulärraum erfolgt über unspezifische Pinozytose. In Zellen mit hoher Endozytoseaktivität, wie beispielsweise Osteoklasten, die zum mononukleär-phagozytären System zählen, lassen sich ABP in hohen Konzentrationen nachweisen (148). Monozyten sind zelluläre Vorstufen von Makrophagen. Daher sind möglicherweise Unterschiede in der Endozytoseaktivität zwischen myeloblastischen und (myelo)-monozytär-differenzierten Leukämiezellen für die differente Suszeptibilität ZOL-vorbehandelter AML-Zellen gegenüber $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen verantwortlich. ZOL ist, wie alle therapeutisch eingesetzten geminalen BP, naturgemäß polar und weist nur eine geringe Bioverfügbarkeit auf. Aufgrund der ausgeprägten Affinität zu mineralisiertem Gewebe akkumulieren BP im Knochen und erreichen insbesondere an frischen Resorptionsstellen supraphysiologische Konzentrationen (149). PB sind Pyrophosphat (Diphosphat)-Analoge bei denen das zentrale Sauerstoffatom durch ein Kohlenstoffatom ersetzt wurde. Dieser Austausch erlaubt zusätzliche Strukturvariationen bzw. die Entwicklung von neuartigen ABP mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften. Zhang et al. konnten zeigen, dass lipophile Pyridinium ABP aufgrund einer verbesserten Membranpermeabilität ~250-fach effektiver $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen aktivieren als alle derzeit eingesetzten ABP (150). Da ZOL wahrscheinlich von der Zellmembran myeloblastischer Leukämiezellen nicht ausreichend resorbiert wurde, wäre es hypothetisch denkbar, dass durch Verwendung lipophiler ABP die *in vitro* und *in*

vivo Suszeptibilität ABP-vorbehandelter AML-Blasten gegenüber $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gesteigert bzw. induziert werden kann.

Allerdings wurden auch einige myeloblastische Leukämiezellen nach Stimulation mit 50 μM ZOL von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen lysiert. Die Endozytoseaktivität von AML-Zellen bzw. die Fähigkeit zur zellulären Resorption von ABP ist daher wahrscheinlich nicht ausschließlich für die unterschiedliche antileukämische Aktivität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber ZOL-vorbehandelten AML-Blasten verantwortlich. Benzaid et al. konnten mit Immunblot-Untersuchungen nachweisen, dass ZOL-sensitive und resistente Mammakarzinom-Zelllinien einen unterschiedlich aktiven MVA-Metabolismus besitzen (142, 146). In den in Kapitel 3.4.3 dargestellten Untersuchungen konnte eine vergleichbare Beobachtung erzielt werden. Nach ZOL-vermittelter Inhibition der FPP-Synthase war die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase in ABP-responsiven Leukämiezellen signifikant gesteigert. Demgegenüber zeigten ZOL-resistente AML-Blasten eine zur unbehandelten Kontrollgruppe unveränderte Aktivität der HMG-CoA-Reduktase. Diese Beobachtungen deuten auf einen Zusammenhang zwischen der Aktivität des MVA-Metabolismus nach ABP-induzierter Hemmung der FPP-Synthase und der Suszeptibilität primärer AML-Zellen gegenüber ZOL und $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen hin. Das Ausmaß der zytotoxischen Aktivität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber ABP-sensibilisierten AML-Blasten ist daher höchstwahrscheinlich von der MVA-Stoffwechselaktivität abhängig. Die Aktivität des MVA-Metabolismus und der Cholesterol- bzw. Isoprenoidbiosynthese wird durch die HMG-CoA-Reduktase bestimmt. Die HMG-CoA-Reduktase reduziert in der geschwindigkeitsbestimmenden Reaktion des MVA-Metabolismus HMG-CoA zu MVA, das weiter zu den biogenetischen Isoprenoidvorstufen IPP und DMAPP metabolisiert wird (Abbildung 2). Die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase wird abhängig vom Cholesterol- bzw. Hormonhaushalt (Insulin, Glukagon), zellulären Energiemangel und zellulären Stress über multivalente Feedback-Mechanismen (Transkription, Degradation und Phosphorylierung) reguliert (151, 152). Die Aktivierung der HMG-CoA-Reduktase erfolgt durch posttranskriptionale Dephosphorylierung am Serinrest 872 durch das Enzym Proteinphosphatase 2A (153-155). Die physiologische Bedeutung dieses

Regulationsmechanismus ist bisher nicht eindeutig geklärt. In Reaktionsgruppe 2 (= ABP-sensitive AML-Zellen) lag der Enzym-Inhibitor-Komplex durch die ZOL-induzierte Hemmung der FFP-Synthaseaktivität wahrscheinlich 14 Stunden kontinuierlich in der isomerisierten Form vor. Durch konsekutive Inhibition der intrinsischen (endogenen) MVA-abhängigen Cholesterolproduktion wird möglicherweise eine Steigerung der HMG-CoA-Reduktaseaktivität (Abnahme der Phosphorylierung) mit konsekutiver Biosynthese von IPP/Apppl induziert. Dieser cholesterolabhängige Feedback-Mechanismus ist auf transkriptionaler Ebene beschrieben wurden (156, 157). Ob die Biosynthese von Cholesterol auch durch posttranskriptionale Phosphorylierung der HMG-CoA-Reduktase reguliert wird ist bisher nicht bekannt, sollte aber in weiterführenden Untersuchungen überprüft werden.

4.4 Schlussfolgerung und Perspektive

Allogene $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen sind potente zytotoxische Effektorzellen um residuelle Leukämiezellen (MRD) zu eradizieren. Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit zeigen, dass die Suszeptibilität von primären AML-Zellen gegenüber PAg-expandeden $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen überwiegend auf NKG2DL-exprimierende (ULBP1) bzw. monozytär-differenzierte Leukämiezellen limitiert ist. Die Empfindlichkeit von AML-Zellen, insbesondere myelo-monozytär-differenzierten Leukämiezellen, kann durch selektive ABP-induzierte Hemmung des Tumor-MVA-Metabolismus und konsekutiver PAg-Akkumulation gesteigert werden. Dennoch wird eine signifikante Anzahl an myeloblastischen ABP-refraktären Leukämiezellen von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen nicht (suffizient) erkannt bzw. lysiert. Die Suszeptibilität von ABP- und $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-resistenten AML-Blasten gegenüber $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen könnte möglicherweise durch die Verwendung von neuartigen lipophilen ABP- und $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zell-stimulierenden Antikörpern induziert werden. Zhang et al. konnten zeigen, dass lipophile ABP trotz einer geringeren Potenz die Aktivität der FFP-Synthase zu inhibieren, $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen ~250-fach effektiver aktivieren können (150). Da diese ABP zusätzlich eine geringere Affinität zu mineralisierten Gewebe zeigen und dadurch vermehrt im Systemkreislauf verfügbar sind, wäre es denkbar, dass lipophile ABP von

der Zellmembran endozytotisch inaktiver Leukämiezellen suffizienter resorbiert werden. Dieser Effekt könnte allerdings durch eine erhöhte Frequenz von systemischen Nebenwirkungen (Nephrotoxizität) mitigiert werden, da auch normale Körperzellen ABP akkumulieren. Eine weitere Möglichkeit ABP-refraktäre AML-Zellen gegenüber $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen zu sensibilisieren könnte durch die additive Stimulation von AML-Blasten mit speziellen agonistischen monoklonalen anti-BTN (CD277)-Antikörpern (20.1) erzielt werden. Der agonistische anti-CD277-Antikörper (20.1) bindet und modifiziert die exoplasmatische Domäne aller Isoformen von BTN3A und imitiert *in vitro* antigenunabhängig die PAg-induzierte Aktivierung von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen. Diese Aktivierung zeigt eine zu PAg-vergleichbare Kinetik und Potenz (58, 59, 67).

Die (Vor)Behandlung von Leukämiezellen mit lipophilen ABP und anti-CD277 (20.1) Antikörpern könnte möglicherweise die Antileukämieantwort von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber primären AML-Zellen signifikant steigern. Die Überprüfung dieser Fragestellungen ist weiterführenden Forschungsarbeiten vorbehalten.

5 Zusammenfassung

Die allo-HSCT ist derzeit das einzige kurative Behandlungskonzept für Patienten mit genetisch definierter intermediärer oder ungünstiger AML. Allerdings ist eine signifikante Anzahl dieser Patienten aufgrund von Alter, therapie-limitierenden Komorbiditäten oder fehlenden HLA-kompatiblen familiär- oder fremdallogenen Spendern für eine allo-HSCT nicht geeignet. Da die aktuellen Therapieprotokolle dieses Patientenkollektiv nicht berücksichtigen, sind innovative immunologische Behandlungskonzepte im Nicht-Transplantationssetting zwingend notwendig. Der durch die allo-HSCT vermittelte GvL-Effekt ist ein herausragendes Beispiel für das Potenzial immunkompetenter Spenderlymphozyten residuelle Leukämiezellen (MRD) zu eradizieren und anhaltende Remissionen zu induzieren. Allerdings wird der klinische Nutzen des GvL-Effekts häufig durch die Koinzidenz zum Teil fataler GvH-Reaktionen und therapieassoziierten Infekt komplikationen mitigiert. Durch die Beobachtung im haploidenten Transplantationssetting, dass ein potenter GvL-Effekt auch von Effektoren der natürlichen Immunantwort induziert werden kann, sind NK und $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen in den Fokus immuntherapeutischer Forschung gerückt. Die bisher durchgeführten Phase I/II Studien haben allerdings ausschließlich die therapeutische Effektivität allogener, insbesondere KIR-Liganden-inkompatibler, NK-Zellen überprüft und das antileukämische Potenzial allogener $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen unbeachtet gelassen. $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen sind eine unkonventionelle Sub-population humaner T-Lymphozyten, die neben der Abwehr mikrobieller Pathogene, Tumorzellen ohne Antigenprozessierung und MHC-restringierte Antigenpräsentation TZR-vermittelt bzw. über NK-Zell-Rezeptoren (z.B. NKG-2D) lysieren können. $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen erkennen TZR-abhängig konservierte exogene (phosphorylierte Intermediärprodukte des mikrobiellen MEP-Stoffwechsels wie HMBPP) oder endogene (ubiquitäre MVA-Metabolite wie IPP) PAg. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass metabolisch-transformierte Zellen (Tumorzellen), die supraphysiologische Konzentrationen von IPP akkumulieren spezifisch von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen erkannt

und lysiert werden können. Durch selektive pharmakologische Hemmung von Schlüsselenzymen des MVA-Metabolismus (FFP-Synthase bzw. HMG-CoA-Reduktase) durch APB (z. B. ZOL) bzw. Statine kann die Konzentration von intrazellulären IPP gesteigert bzw. gemindert werden.

In der vorgelegten Arbeit wurde die natürliche und ABP-induzierte antileukämische Aktivität HLA-inkompatibler allogener $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen gegenüber 19 primären AML-Zellen systematisch evaluiert. Als Effektorzellen wurden aus TZR $\alpha\beta$ bzw. TZR $\alpha\beta$ /CD19-depletierten Leukaphereseprodukten PAg und IL-2-expandierte $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zelllinien generiert. Die Antileukämieantwort von allogenen $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen wurde in einem durchflusszytometrisch-basierten Zytotoxizitätsassay untersucht und mit der Oberflächenexpression Killeraktivierender und inhibierender Liganden (NKG2DL [ULBP1, MICA/B], DNAM1-Liganden [CD112, CD155], ICAM1, CD200 und MHC Klasse 1), KIR-Liganden-Mismatch zwischen Empfänger und Spender und intrinsischen AML-Merkmalen (Zytogenetik, Immunphänotyp, Chemotherapiesensitivität der AML-Blasten) korreliert. Es konnte gezeigt werden, dass allogene HLA-inkompatible $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen primäre AML-Zellen heterogen lysieren (2.91 %- 56.26 %). 37 % der AML-Zellen waren empfindlich bzw. 63 % refraktär gegenüber $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen. Die Suszeptibilität primärer AML-Blasten gegenüber $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen korrelierte mit der Oberflächenexpression von ULBP1 und CD112 und monozytärer bzw. monoblastischer AML-Differenzierung, war aber unabhängig vom KIR-Liganden-Mismatch zwischen Patienten und Spendern, zytogenetischen Risiko und Chemotherapiesensitivität der AML-Blasten. Die Vorbehandlung der Leukämiezellen mit ABP (ZOL) führte, insbesondere bei myelo-monozytär-differenzierten AML-Zellen, zu einer signifikanten dosisabhängigen Steigerung der antileukämischen Aktivität von $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen. Die Empfindlichkeit von myelo-monozytär-differenzierten Leukämiezellen gegenüber Zoledronat bzw. $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen korrelierte mit der Aktivität der HMG-CoA-Reduktase nach ZOL-vermittelter Hemmung des Tumor-MVA-Metabolismus. Die Mehrheit myeloblastischer AML-Blasten zeigte keine natürliche und nur geringe ABP-induzierte Suszeptibilität gegenüber $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen.

Durch selektive TZR $\alpha\beta$ bzw. simultane TZR $\alpha\beta/CD19$ Depletion von Spenderleukaphereseprodukten können Stammzellprodukte generiert werden, die einen hohen Anteil an „*innate lymphocytes*“ (NK- und $V\gamma9V\delta2$ T-Zellen) enthalten. Diese Stammzellprodukte sind der Lage eine potente antiinfektive und antileukämische Immunantwort zu unterhalten ohne eine GvH-Reaktion zu induzieren. Patienten mit AML, die für keine intensivierte PRT (allo-HSCT, HiDAC) geeignet sind, könnten in Zukunft von diesen immuntherapeutischen Strategien profitieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Ferrara F, Schiffer CA. Acute myeloid leukaemia in adults. *Lancet*.2013;381:484-495.
2. Robert Koch-Institut GdeKiDeV. Krebs in Deutschland 2009/2010. Beiträge zur Gesundheitsberichtserstattung des Bundes.2013;9. Ausgabe:124-127.
3. Dores GM, Devesa SS, Curtis RE, Linet MS, Morton LM. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. *Blood*.2012;119:34-43.
4. Sant M, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*.2010;116:3724-3734.
5. Grimwade D, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*.1998;92:2322-2333.
6. Bloomfield CD, et al. Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res*.1998;58:4173-4179.
7. Byrd JC, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*.2002;100:4325-4336.
8. Bacher U, Kern W, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T, Schoch C. Population-based age-specific incidences of cytogenetic subgroups of acute myeloid leukemia. *Haematologica*.2005;90:1502-1510.
9. Rockova V, et al. Risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia: integrative analysis of a multitude of gene mutation and gene expression markers. *Blood*.2011;118:1069-1076.

10. Dohner H, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*.2010;115:453-474.
11. Krug U, et al. Complete remission and early death after intensive chemotherapy in patients aged 60 years or older with acute myeloid leukaemia: a web-based application for prediction of outcomes. *Lancet*.2010;376:2000-2008.
12. Estey E. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in older patients. *J Clin Oncol*.2007;25:1908-1915.
13. Estey E. AML in older patients: are we making progress? *Best Pract Res Clin Haematol*.2009;22:529-536.
14. Juliusson G, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*.2009;113:4179-4187.
15. Appelbaum FR, et al. Age and acute myeloid leukemia. *Blood*.2006;107:3481-3485.
16. Buchner T, et al. Age-related risk profile and chemotherapy dose response in acute myeloid leukemia: a study by the German Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group. *J Clin Oncol*.2009;27:61-69.
17. Burnett A, Wetzler M, Lowenberg B. Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*.2011;29:487-494.
18. Cassileth PA, et al. Maintenance chemotherapy prolongs remission duration in adult acute nonlymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*.1988;6:583-587.
19. Breems DA, et al. Prognostic index for adult patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol*.2005;23:1969-1978.
20. Koreth J, et al. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA*.2009;301:2349-2361.
21. Cornelissen JJ, et al. Results of a HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits for whom? *Blood*.2007;109:3658-3666.

22. Stelljes M, et al. Allogeneic transplantation versus chemotherapy as postremission therapy for acute myeloid leukemia: a prospective matched pairs analysis. *J Clin Oncol.*2014;32:288-296.
23. Lowenberg B, et al. High-dose daunorubicin in older patients with acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine.*2009;361:1235-1248.
24. Sorror ML, et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood.*2005;106:2912-2919.
25. Wallen H, et al. Ablative allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults 60 years of age and older. *J Clin Oncol.*2005;23:3439-3446.
26. Sorror ML, et al. Long-term outcomes among older patients following nonmyeloablative conditioning and allogeneic hematopoietic cell transplantation for advanced hematologic malignancies. *JAMA.*2011;306:1874-1883.
27. Chevallier P, et al. Reduced-intensity conditioning before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients over 60 years: a report from the SFGM-TC. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation.*2012;18:289-294.
28. Koreth J, et al. Reduced-intensity conditioning hematopoietic stem cell transplantation in patients over 60 years: hematologic malignancy outcomes are not impaired in advanced age. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation.*2010;16:792-800.
29. Godder KT, et al. Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased gammadelta T cells after partially mismatched related donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.*2007;39:751-757.
30. Ruggeri L, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.*2002;295:2097-2100.
31. Miller JS, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood.*2005;105:3051-3057.

32. Curti A, et al. Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients. *Blood*.2011;118:3273-3279.
33. Rubnitz JE, et al. NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*.2010;28:955-959.
34. Gertner-Dardenne J, et al. Human Vgamma9Vdelta2 T Cells Specifically Recognize and Kill Acute Myeloid Leukemic Blasts. *Journal of immunology*.2012;188:4701-4708.
35. Kunzmann V, et al. Tumor-promoting Versus Tumor-antagonizing Roles of gammadelta T Cells in Cancer Immunotherapy: Results From a Prospective Phase I/II Trial. *J Immunother*.2012;35:205-213.
36. Zheng BJ, et al. Peripheral gamma delta T-cell deficit in nasopharyngeal carcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer*.2002;99:213-217.
37. Argentati K, et al. Reduced number and impaired function of circulating gamma delta T cells in patients with cutaneous primary melanoma. *The Journal of investigative dermatology*.2003;120:829-834.
38. Kunzmann V, Kimmel B, Herrmann T, Einsele H, Wilhelm M. Inhibition of phosphoantigen-mediated gammadelta T-cell proliferation by CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells. *Immunology*.2009;126:256-267.
39. Hayday AC. [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol*.2000;18:975-1026.
40. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nature reviews Immunology*.2013;13:88-100.
41. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nature reviews Immunology*.2010;10:467-478.
42. Parker CM, et al. Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. *J Exp Med*.1990;171:1597-1612.

43. Dopfer EP, et al. The CD3 Conformational Change in the gammadelta T Cell Receptor Is Not Triggered by Antigens but Can Be Enforced to Enhance Tumor Killing. *Cell reports*.2014.
44. Morita CT, et al. Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Immunity*.1995;3:495-507.
45. Tanaka Y, Morita CT, Tanaka Y, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature*.1995;375:155-158.
46. Burk MR, Mori L, De Libero G. Human V gamma 9-V delta 2 cells are stimulated in a cross-reactive fashion by a variety of phosphorylated metabolites. *Eur J Immunol*.1995;25:2052-2058.
47. Hintz M, et al. Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human gammadelta T cells in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*.2001;509:317-322.
48. Kunzmann V, Bauer E, Feurle J, Weissinger F, Tony HP, Wilhelm M. Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood*.2000;96:384-392.
49. Bukowski JF, Morita CT, Brenner MB. Human gamma delta T cells recognize alkylamines derived from microbes, edible plants, and tea: implications for innate immunity. *Immunity*.1999;11:57-65.
50. Thompson K, Rojas-Navea J, Rogers MJ. Alkylamines cause Vgamma9Vdelta2 T-cell activation and proliferation by inhibiting the mevalonate pathway. *Blood*.2006;107:651-654.
51. Kunzmann V, Bauer E, Wilhelm M. Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate. *The New England journal of medicine*.1999;340:737-738.
52. Bukowski JF, Morita CT, Tanaka Y, Bloom BR, Brenner MB, Band H. V gamma 2V delta 2 TCR-dependent recognition of non-peptide antigens and Daudi cells analyzed by TCR gene transfer. *Journal of immunology*.1995;154:998-1006.
53. Lang F, et al. Early activation of human V gamma 9V delta 2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Journal of immunology*.1995;154:5986-5994.

54. Allison TJ, Winter CC, Fournie JJ, Bonneville M, Garboczi DN. Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature*.2001;411:820-824.
55. Wang H, Fang Z, Morita CT. Vgamma2Vdelta2 T Cell Receptor recognition of prenyl pyrophosphates is dependent on all CDRs. *Journal of immunology*.2010;184:6209-6222.
56. Wei H, et al. Definition of APC presentation of phosphoantigen (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate to Vgamma2Vdelta 2 TCR. *Journal of immunology*.2008;181:4798-4806.
57. Wang H, et al. Conservation of nonpeptide antigen recognition by rhesus monkey V gamma 2V delta 2 T cells. *Journal of immunology*.2003;170:3696-3706.
58. Harly C, et al. Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human gammadelta T-cell subset. *Blood*.2012;120:2269-2279.
59. Wang H, et al. Butyrophilin 3A1 plays an essential role in prenyl pyrophosphate stimulation of human Vgamma2Vdelta2 T cells. *Journal of immunology*.2013;191:1029-1042.
60. Vavassori S, et al. Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human gammadelta T cells. *Nat Immunol*.2013;14:908-916.
61. Sandstrom A, et al. The Intracellular B30.2 Domain of Butyrophilin 3A1 Binds Phosphoantigens to Mediate Activation of Human Vgamma9Vdelta2 T Cells. *Immunity*.2014.
62. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*.1996;14:233-258.
63. Abeler-Dorner L, Swamy M, Williams G, Hayday AC, Bas A. Butyrophilins: an emerging family of immune regulators. *Trends Immunol*.2012;33:34-41.
64. Cubillos-Ruiz JR, et al. CD277 is a negative co-stimulatory molecule universally expressed by ovarian cancer microenvironmental cells. *Oncotarget*.2010;1:329-338.

65. Yamashiro H, Yoshizaki S, Tadaki T, Egawa K, Seo N. Stimulation of human butyrophilin 3 molecules results in negative regulation of cellular immunity. *J Leukoc Biol.*2010;88:757-767.
66. Messal N, et al. Differential role for CD277 as a co-regulator of the immune signal in T and NK cells. *Eur J Immunol.*2011;41:3443-3454.
67. Palakodeti A, et al. The molecular basis for modulation of human Vgamma9Vdelta2 T cell responses by CD277/butyrophilin-3 (BTN3A)-specific antibodies. *The Journal of biological chemistry.*2012;287:32780-32790.
68. Rhodes DA, Stammers M, Malcherek G, Beck S, Trowsdale J. The cluster of BTN genes in the extended major histocompatibility complex. *Genomics.*2001;71:351-362.
69. Thurnher M, Gruenbacher G, Nussbaumer O. Regulation of mevalonate metabolism in cancer and immune cells. *Biochim Biophys Acta.*2013;1831:1009-1015.
70. Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nat Rev Drug Discov.*2007;6:541-555.
71. Wesch D, Marx S, Kabelitz D. Comparative analysis of alpha beta and gamma delta T cell activation by Mycobacterium tuberculosis and isopentenyl pyrophosphate. *Eur J Immunol.*1997;27:952-956.
72. Clendening JW, et al. Dysregulation of the mevalonate pathway promotes transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*2010;107:15051-15056.
73. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.*2000;408:307-310.
74. Freed-Pastor WA, et al. Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. *Cell.*2012;148:244-258.
75. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jenö P, Mori L, De Libero G. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med.*2003;197:163-168.
76. Yabe T, et al. A multigene family on human chromosome 12 encodes natural killer-cell lectins. *Immunogenetics.*1993;37:455-460.

77. Houchins JP, et al. Genomic structure of NKG5, a human NK and T cell-specific activation gene. *Immunogenetics*.1993;37:102-107.
78. Bauer S, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*.1999;285:727-729.
79. Chalupny NJ, Sutherland CL, Lawrence WA, Rein-Weston A, Cosman D. ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. *Biochemical and biophysical research communications*.2003;305:129-135.
80. Radaev S, Sun PD. Structure and function of natural killer cell surface receptors. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*.2003;32:93-114.
81. Cosman D, et al. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*.2001;14:123-133.
82. Chitadze G, Bhat J, Lettau M, Janssen O, Kabelitz D. Generation of soluble NKG2D ligands: proteolytic cleavage, exosome secretion and functional implications. *Scandinavian journal of immunology*.2013;78:120-129.
83. Salih HR, et al. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood*.2003;102:1389-1396.
84. Lanca T, et al. The MHC class Ib protein ULBP1 is a nonredundant determinant of leukemia/lymphoma susceptibility to gammadelta T-cell cytotoxicity. *Blood*.2010;115:2407-2411.
85. Nanbakhsh A, Pochon C, Mallavialle A, Amsellem S, Bourhis JH, Chouaib S. c-Myc regulates NKG2D ligands ULBP1, ULBP2 and ULBP3 expression in acute myeloid leukemia and modulates their susceptibility to natural killer-mediated lysis. *Blood*.2014.
86. Diermayr S, et al. NKG2D ligand expression in AML increases in response to HDAC inhibitor valproic acid and contributes to allorecognition by NK-cell lines with single KIR-HLA class I specificities. *Blood*.2008;111:1428-1436.
87. Uchida R, et al. Gamma delta T cells kill myeloma cells by sensing mevalonate metabolites and ICAM-1 molecules on cell surface. *Biochemical and biophysical research communications*.2007;354:613-618.

88. Bottino C, et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med.*2003;198:557-567.
89. Pende D, et al. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood.*2005;105:2066-2073.
90. Toutirais O, et al. DNAX accessory molecule-1 (CD226) promotes human hepatocellular carcinoma cell lysis by Vgamma9Vdelta2 T cells. *Eur J Immunol.*2009;39:1361-1368.
91. Barclay AN, Wright GJ, Brooke G, Brown MH. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol.*2002;23:285-290.
92. Hoek RM, et al. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science.*2000;290:1768-1771.
93. Tonks A, et al. Transcriptional dysregulation mediated by RUNX1-RUNX1T1 in normal human progenitor cells and in acute myeloid leukaemia. *Leukemia.*2007;21:2495-2505.
94. Kretz-Rommel A, et al. CD200 expression on tumor cells suppresses antitumor immunity: new approaches to cancer immunotherapy. *Journal of immunology.*2007;178:5595-5605.
95. Moreaux J, et al. CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *Blood.*2006;108:4194-4197.
96. Tonks A, et al. CD200 as a prognostic factor in acute myeloid leukaemia. *Leukemia.*2007;21:566-568.
97. Coles SJ, et al. CD200 expression suppresses natural killer cell function and directly inhibits patient anti-tumor response in acute myeloid leukemia. *Leukemia.*2011;25:792-799.
98. Wong WW, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia.*2002;16:508-519.

99. Nielsen SF, Nordestgaard BG, Bojesen SE. Statin use and reduced cancer-related mortality. *The New England journal of medicine*.2012;367:1792-1802.
100. Thurnher M, Nussbaumer O, Gruenbacher G. Novel aspects of mevalonate pathway inhibitors as antitumor agents. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*.2012;18:3524-3531.
101. Kunzmann V, Wilhelm M. Adjuvant zoledronic acid for breast cancer: mechanism of action? *The lancet oncology*.2011;12:991-992.
102. van Beek E, Pieterman E, Cohen L, Lowik C, Papapoulos S. Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates. *Biochemical and biophysical research communications*.1999;264:108-111.
103. Wilhelm M, et al. Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood*.2003;102:200-206.
104. Monkkonen H, et al. A new endogenous ATP analog (Apppl) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. *British journal of pharmacology*.2006;147:437-445.
105. Monkkonen H, Ottewell PD, Kuokkanen J, Monkkonen J, Auriola S, Holen I. Zoledronic acid-induced IPP/Apppl production in vivo. *Life sciences*.2007;81:1066-1070.
106. Nussbaumer O, Gruenbacher G, Gander H, Thurnher M. DC-like cell-dependent activation of human natural killer cells by the bisphosphonate zoledronic acid is regulated by gammadelta T lymphocytes. *Blood*.2011;118:2743-2751.
107. Li J, et al. Reduced expression of the mevalonate pathway enzyme farnesyl pyrophosphate synthase unveils recognition of tumor cells by Vgamma9Vdelta2 T cells. *Journal of immunology*.2009;182:8118-8124.
108. Meraviglia S, et al. In vivo manipulation of Vgamma9Vdelta2 T cells with zoledronate and low-dose interleukin-2 for immunotherapy of advanced breast cancer patients. *Clin Exp Immunol*.2010;161:290-297.

109. Nakajima J, et al. A phase I study of adoptive immunotherapy for recurrent non-small-cell lung cancer patients with autologous gammadelta T cells. *Eur J Cardiothorac Surg.*2010;37:1191-1197.
110. Bennouna J, et al. Phase-I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.*2008;57:1599-1609.
111. Dieli F, et al. Targeting human {gamma}delta} T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.*2007;67:7450-7457.
112. Sorrow ML. How I assess comorbidities before hematopoietic cell transplantation. *Blood.*2013;121:2854-2863.
113. Olin MR, Hwa Choi K, Lee J, Molitor TW. Gammadelta T-lymphocyte cytotoxic activity against *Mycobacterium bovis* analyzed by flow cytometry. *J Immunol Methods.*2005;297:1-11.
114. Vardiman JW, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.*2009;114:937-951.
115. Gupta V, Tallman MS, Weisdorf DJ. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia: myths, controversies, and unknowns. *Blood.*2011;117:2307-2318.
116. Schipper RF, D'Amaro J, Bakker JT, Bakker J, van Rood JJ, Oudshoorn M. HLA gene haplotype frequencies in bone marrow donors worldwide registries. *Hum Immunol.*1997;52:54-71.
117. Gluckman E, Rocha V, Chevret S. Results of unrelated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Rev Clin Exp Hematol.*2001;5:87-99.
118. Sanz MA, Sanz GF. Unrelated donor umbilical cord blood transplantation in adults. *Leukemia.*2002;16:1984-1991.
119. Federmann B, et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: a phase II study. *Haematologica.*2012;97:1523-1531.

120. Aversa F, et al. Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. *J Clin Oncol*.2005;23:3447-3454.
121. Luznik L, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant*.2008;14:641-650.
122. Reisner Y, Hagin D, Martelli MF. Haploidentical hematopoietic transplantation: current status and future perspectives. *Blood*.2011;118:6006-6017.
123. Locatelli F, Bauquet A, Palumbo G, Moretta F, Bertaina A. Negative depletion of alpha/beta+ T cells and of CD19+ B lymphocytes: a novel frontier to optimize the effect of innate immunity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Immunol Lett*.2013;155:21-23.
124. Wilhelm M, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of haploidentical gammadelta T cells. *J Transl Med*.2014;12:45.
125. Smetak M, et al. Clinical-scale single-step CD4(+) and CD8(+) cell depletion for donor innate lymphocyte infusion (DILI). *Bone Marrow Transplant*.2008;41:643-650.
126. Schumm M, et al. Depletion of T-cell receptor alpha/beta and CD19 positive cells from apheresis products with the CliniMACS device. *Cytotherapy*.2013;15:1253-1258.
127. Schumm M, et al. Determination of residual T- and B-cell content after immunomagnetic depletion: proposal for flow cytometric analysis and results from 103 separations. *Cytotherapy*.2006;8:465-472.
128. Peter Lang TF, Heiko-Manuel Teltschik, Michael Schumm, Patrick Schlegel, Matthias Pfeiffer, Martin Ebinger, Carl-Philipp Schwarze and Rupert Handgretinger. Transplantation Of TcR $\alpha\beta$ /CD19 Depleted Stem Cells From Haploidentical Donors In Children: Current Results. *Blood*.2013;122:692.
129. Nowbakht P, et al. Ligands for natural killer cell-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias. *Blood*.2005;105:3615-3622.

130. Gomes AQ, et al. Identification of a panel of ten cell surface protein antigens associated with immunotargeting of leukemias and lymphomas by peripheral blood gammadelta T cells. *Haematologica*.2010;95:1397-1404.
131. Guerra N, et al. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity*.2008;28:571-580.
132. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*.2002;419:734-738.
133. Shen Y, et al. Possible association of decreased NKG2D expression levels and suppression of the activity of natural killer cells in patients with colorectal cancer. *Int J Oncol*.2012;40:1285-1290.
134. Hilpert J, et al. Comprehensive analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia: implications for NKG2D-mediated NK cell responses. *Journal of immunology*.2012;189:1360-1371.
135. Coudert JD, et al. Altered NKG2D function in NK cells induced by chronic exposure to NKG2D ligand-expressing tumor cells. *Blood*.2005;106:1711-1717.
136. Elliott RL, Blobe GC. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol*.2005;23:2078-2093.
137. Li H, Han Y, Guo Q, Zhang M, Cao X. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *Journal of immunology*.2009;182:240-249.
138. Smyth MJ, Teng MW, Swann J, Kyparissoudis K, Godfrey DI, Hayakawa Y. CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *Journal of immunology*.2006;176:1582-1587.
139. Monkkonen H, et al. Bisphosphonate-induced ATP analog formation and its effect on inhibition of cancer cell growth. *Anti-cancer drugs*.2008;19:391-399.
140. D'Asaro M, et al. V gamma 9V delta 2 T lymphocytes efficiently recognize and kill zoledronate-sensitized, imatinib-sensitive, and imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells. *Journal of immunology*.2010;184:3260-3268.
141. Todaro M, et al. Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes. *Journal of immunology*.2009;182:7287-7296.

142. Benzaid I, et al. High phosphoantigen levels in bisphosphonate-treated human breast tumors promote Vgamma9Vdelta2 T-cell chemotaxis and cytotoxicity in vivo. *Cancer Res.*2011;71:4562-4572.
143. Santolaria T, Robard M, Leger A, Catros V, Bonneville M, Scotet E. Repeated systemic administrations of both aminobisphosphonates and human Vgamma9Vdelta2 T cells efficiently control tumor development in vivo. *Journal of immunology.*2013;191:1993-2000.
144. Raikonen J, Taskinen M, Dunford JE, Monkkonen H, Auriola S, Monkkonen J. Correlation between time-dependent inhibition of human farnesyl pyrophosphate synthase and blockade of mevalonate pathway by nitrogen-containing bisphosphonates in cultured cells. *Biochemical and biophysical research communications.*2011;407:663-667.
145. Dunford JE, et al. Structure-activity relationships among the nitrogen containing bisphosphonates in clinical use and other analogues: time-dependent inhibition of human farnesyl pyrophosphate synthase. *Journal of medicinal chemistry.*2008;51:2187-2195.
146. Benzaid I, Monkkonen H, Bonnelye E, Monkkonen J, Clezardin P. In vivo phosphoantigen levels in bisphosphonate-treated human breast tumors trigger Vgamma9Vdelta2 T-cell antitumor cytotoxicity through ICAM-1 engagement. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.*2012;18:6249-6259.
147. Idrees AS, et al. Comparison of gammadelta T cell responses and farnesyl diphosphate synthase inhibition in tumor cells pretreated with zoledronic acid. *Cancer science.*2013;104:536-542.
148. Thompson K, Rogers MJ, Coxon FP, Crockett JC. Cytosolic entry of bisphosphonate drugs requires acidification of vesicles after fluid-phase endocytosis. *Mol Pharmacol.*2006;69:1624-1632.
149. Lin JH. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone.*1996;18:75-85.
150. Zhang Y, et al. Lipophilic pyridinium bisphosphonates: potent gammadelta T cell stimulators. *Angewandte Chemie.*2010;49:1136-1138.

151. Burg JS, Espenshade PJ. Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. *Prog Lipid Res.*2011;50:403-410.
152. DeBose-Boyd RA. Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell research.*2008;18:609-621.
153. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.*1990;343:425-430.
154. Istvan ES, Palnitkar M, Buchanan SK, Deisenhofer J. Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. *EMBO J.*2000;19:819-830.
155. Friesen JA, Rodwell VW. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. *Genome Biol.*2004;5:248.
156. Wiemer AJ, Wiemer DF, Hohl RJ. Geranylgeranyl diphosphate synthase: an emerging therapeutic target. *Clinical pharmacology and therapeutics.*2011;90:804-812.
157. Wiemer DF, Wiemer AJ. Opportunities and challenges in development of phosphoantigens as Vgamma9Vdelta2 T cell agonists. *Biochemical pharmacology.*2014.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Volker Kunzmann, für die Überantwortung des Themas, den gewährten Freiraum zur Gestaltung und Weiterentwicklung der Arbeit, die Möglichkeit zur Publikation und die kritische Durchsicht des Manuskripts. Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Herrmann für die Übernahme des Koreferats und Herrn Prof. Dr. med. Hermann Einsele für die Möglichkeit zur experimentellen Forschung.

Mein aufrichtiger Dank gilt Frau Dr. med. Erdwine Klinker für die Erstellung der KIR-Liganden-Analyse, den Mitarbeitern des Stammzelllabors der Universität Würzburg (insbesondere Rosl Ottohal und Judith Gierse) für die Durchführung der Zellseparation der Spenderleukaphereseprodukte und Dr. rer. nat. Brigitte Kimmel für die Einarbeitung in die Methodik und kritische Durchsicht des Manuskripts.

Im Besonderen danke ich allen Mitarbeitern des Immunbiologischen Labors der Medizinischen Klinik und Poliklinik II (Anette Koss-Kinzinger, Isabelle Kuntzsch, Heide Pototzky, Kathrin Eckert, Silke Killinger und Vanessa Schultz), die mir während der Erstellung dieser Arbeit immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein größter Dank gebührt meinen Eltern, Monika und Andreas Gundermann, ohne deren Unterstützung mein beruflicher Werdegang nicht möglich gewesen wäre.

8 Curriculum Vitae

Der Lebenslauf ist aus Datenschutzgründen nicht in der elektronischen Version der Dissertation enthalten.