

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Klinische Immunologie,
Rheumatologie)

**Die Rolle der invarianten natürlichen Killer-T-Zellen
(iNKT-Zellen) für Spenderlymphozyteninfusionen nach
allogener Blutstammzelltransplantation**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Jahnke, Simona Elisabeth
2021**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. D. Schneidawind

2. Berichterstatter: Professor A. Weber, PhD

Tag der Disputation: 19.06.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung	6
2.1	Allogene Stammzelltransplantation	6
2.2	Spenderlymphozyteninfusionen	13
2.3	Invariante natürliche Killer-T-Zellen (iNKT-Zellen)	18
2.4	Zielsetzung	22
3	Material & Methoden	23
3.1	Material	23
3.1.1	Geräte.....	23
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	24
3.1.3	Chemikalien und Reagenzien	25
3.1.4	Antikörper und Zytokine	26
3.1.5	Medien, Puffer und Lösungen	31
3.1.6	Software.....	32
3.2	Patienten.....	32
3.3	Zelllinien	33
3.4	Methoden	33
3.4.1	Gewinnung von DLIs	33
3.4.2	Färbung der DLI-Proben für die durchflusszytometrische Analyse.....	34
3.4.3	Expansion von iNKT-Zellen aus kryokonservierten DLIs.....	34
3.4.4	Aufreinigung von kultivierten iNKT-Zellen	35
3.4.5	Zytotoxizitätsassays	36
3.4.5.1	Tumorzelllinien	36
3.4.5.2	Primäre Leukämiezellen.....	37

3.4.5.3	CD1d-blockierender Antikörper	38
3.4.6	Bestimmung von Oberflächenmarkern auf Tumorzellen	38
3.4.7	Zytozentrifugenpräparat und May-Grünwald-Giemsa-Färbung	38
3.4.8	CD107a Degranulationsassay.....	39
3.4.9	Zytokinmessungen.....	39
3.5	Statistische Auswertung der Daten	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Patientencharakteristika	41
4.2	Rezidiv und Krankheitsprogress stellen die Hauptindikation für DLIs dar....	43
4.3	Unzureichende Tumorkontrolle und hohe Inzidenz von akuter und chronischer GVHD sind die Hauptprobleme nach DLI-Gabe	45
4.4	DLIs sind ein heterogenes Zellprodukt mit einer zellulären Zusammensetzung ähnlich der humanen PBMCs gesunder Spender.....	47
4.5	DLIs enthalten eine geringe Anzahl an größtenteils CD4 ⁻ /CD8 ⁻ iNKT-Zellen	47
4.6	Robuste Expansion von DLI-iNKTs durch zweiwöchige <i>ex vivo</i> Kultivierung mit Glykolipid-beladenen und bestrahlten <i>Feeder</i> -Zellen.....	50
4.7	Präferenzielle Expansion von CD4 ⁺ /CD8 ⁻ iNKT-Zellen aus DLIs.....	50
4.8	DLI-iNKTs lysieren Jurkatzellen dosisabhängig	52
4.9	Die Stimulation mittels G-CSF hat keinen signifikanten Einfluss auf Anzahl, Subtypen und Funktion von DLI-iNKTs	53
4.10	DLI-iNKTs degranulieren nach Koinkubation mit Jurkatzellen.....	53
4.11	DLI-iNKTs sezernieren proinflammatorische und zytotoxische Zytokine nach Koinkubation mit Jurkatzellen	54
4.12	DLI-iNKTs lysieren Tumorzellen in Abhängigkeit von der CD1d-Expression.....	56

4.13	CD1d-Blockade führt zu verminderter Tumorzellyse und Degranulation von DLI-iNKTs.....	56
4.14	DLI-iNKTs lysieren primäre Leukämiezellen CD1d- und dosisabhängig	61
4.15	Die dosisabhängige Lyse primärer Leukämiezellen ist auch in einem HLA-identischen Setting wirkungsvoll	64
5	Diskussion	66
6	Zusammenfassung	78
7	Finanzierung und Unterstützung	80
8	Veröffentlichungen.....	81
9	Abbildungsverzeichnis	82
10	Tabellenverzeichnis.....	83
11	Anhangsverzeichnis	84
12	Anhang	85
13	Literaturverzeichnis.....	97
14	Erklärung zum Eigenanteil.....	110
15	Danksagung.....	112

1 Abkürzungsverzeichnis

α -GalCer	α -Galactosylceramid
7-AAD	7-Aminoactinomycin
ADL	Aktivitäten des täglichen Lebens (<i>activities of daily living</i>)
aGVHD	akute GVHD
ALL	akute lymphatische Leukämie
allo-SZT	allogene Stammzelltransplantation
auto-SZT	autologe Stammzelltransplantation
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
ARDS	akutes Atemnotsyndrom (<i>acute respiratory distress syndrome</i>)
BCR-ABL	<i>Breakpoint Cluster Region</i> Abelson-Tyrosinkinase
BSZT	Blutstammzelltransplantation
CAR	chimärer Antigenrezeptor (<i>chimeric antigen receptor</i>)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cGVHD	chronische GVHD
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CR	komplette Remission (<i>complete remission</i>)
DC	dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DLBCL	diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (<i>diffuse large B-cell lymphoma</i>)

DLI	Spenderlymphozyteninfusion (<i>donor lymphocyte infusion</i>)
DLI-iNKT	invariante natürliche Killer-T-Zelle aus Spenderlymphozyteninfusion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	doppelt negativ
DRI	<i>disease risk index</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
FACS	fluoreszenz-aktiviertes Zell-Sortieren/-Scannen (<i>fluorescence-activated cell sorting/scanning</i>)
FBS	Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FCR	FC-Rezeptor (engl. <i>fragment crystallisable receptor</i>)
FCS	Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FEV1	forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLAMSA	Konditionierungsregime bestehend aus Fludarabin, Cytarabin und Amsacrin
FLT3	<i>fms like tyrosine kinase 3</i>
FMO	<i>fluorescence minus one</i>
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>)
GMP	gute Herstellungspraxis (<i>good manufacturing practice</i>)
GVHD	Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (<i>graft-versus-host-disease</i>)
GVL	Transplantat-gegen-Leukämie (<i>graft-versus-leukemia</i>)
hCMV	humanes Cytomegalie-Virus
HCT-CI	<i>Hematopoietic Cell Transplantation-Specific Comorbidity Index</i>

HLA	humanes Leukozytenantigen (<i>human leukocyte antigen</i>)
HSC	hämatopoietische Stammzelle (<i>hematopoietic stem cell</i>)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNKT	invariante natürliche Killer-T-Zelle
IRB	<i>Institutional review board</i>
KMT	Knochenmarktransplantation
MAC	myeloablative Konditionierung (<i>myeloablative conditioning</i>)
MACS	magnetisch-aktiviertes Zell-Sortieren (<i>magnetic-activated cell sorting</i>)
MDS	myelodysplastische Syndrome
MDSC	<i>myeloid-derived suppressor cell</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MM	multipl. Myelom
MMRD	nicht-MHC-identischer verwandter Spender (<i>mismatched related donor</i>)
MMUD	nicht-MHC-identischer nicht-verwandter Spender (<i>mismatched unrelated donor</i>)
MRD	minimale Resterkrankung (<i>minimal residual disease</i>) oder MHC-identischer verwandter Spender (<i>matched related donor</i>)
MUD	MHC-identischer nicht-verwandter Spender (<i>matched unrelated donor</i>)
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NIH	<i>National Institutes of Health</i>

NK-Zelle	natürliche Killer-Zelle
NKT-Zelle	natürliche Killer-T-Zelle
NPM1	Nucleophosmin
NRM	Nicht-Rückfall-Mortalität (<i>non relapse mortality</i>)
PBMCs	mononukleäre periphere Blutzellen (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD-1, PD-L1	programmiertes Zelltod-Protein 1, programmiertes Zelltod-Protein-Ligand 1 (<i>programmed cell death protein/-ligand</i>)
PE	Phycoerythrin
PML RARA	<i>Promyelocytic Leukemia Protein</i> Retinsäurerezeptor- α
PR	partielle Remission (<i>partial remission</i>)
PS	Penicillin-Streptomycin
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RIC	intensitätsreduzierte Konditionierung (<i>reduced intensity conditioning</i>)
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
sFas	lösliches Fas (<i>soluble Fas</i>)
sFasL	löslicher Fas-Ligand (<i>soluble Fas-Ligand</i>)
STR	<i>short tandem repeats</i>
SZT	Stammzelltransplantation
TAM	Tumor-assoziierte Makrophage

Th1/2	T-Helfer-Zelle Typ 1/2
TME	<i>tumor microenvironment</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
TRM	transplantationsbedingte Mortalität (<i>transplant-related mortality</i>)
TZR	T-Zell-Rezeptor
VOD	Lebervenenverschlusskrankheit (<i>veno-occlusive disease</i>)

2 Einleitung

2.1 Allogene Stammzelltransplantation

Unter einer Stammzelltransplantation (SZT) versteht man die Übertragung von Blutstammzellen zur Wiederherstellung einer vormals gestörten Knochenmarkfunktion. Man unterscheidet die Blutstammzelltransplantation (BSZT), bei der die Stammzellen aus dem peripheren Blut des Spenders nach Stimulation mit dem Granulozyten-Koloniestimulierenden Faktor (G-CSF) gewonnen werden, von der Knochenmarktransplantation (KMT), die eine Knochenmarkpunktion zur Gewinnung von Blutstammzellen benötigt. Die Stammzellen können dabei vom Patienten selbst stammen (autologe Blutstammzelltransplantation, auto-SZT) oder von einem Fremd- oder Geschwisterspender (allogene Blutstammzelltransplantation, allo-SZT). Auto-SZT erfolgen beispielsweise im Rahmen einer myeloablativen Hochdosischemotherapie. Dabei werden dem Patienten vor der Chemotherapie Blutstammzellen entnommen und nach dieser zur Wiederherstellung der Knochenmarkfunktion, insbesondere zur Regeneration des Blut- und Immunsystems, reinfundiert.

Die Indikationen der allo-SZT lassen sich in maligne und nicht-maligne Faktoren einteilen: Zu letzteren zählt zum Beispiel die homozygote Sichelzellanämie (AWMF-Leitlinie 025/016: Sichelzellkrankheit, Seite 68ff), während die große Gruppe der malignen transplantierbaren Erkrankungen beispielsweise die akute myeloische Leukämie (AML), myelodysplastische Syndrome (MDS) und multiple Myelome (MM) unter bestimmten Voraussetzungen beinhaltet (Leitlinie DAG-KBT: Indikationen zur allogenen Stammzelltransplantation, Version 1, Stand Juni 2016).

Der Stammzelltransplantation ist eine Konditionierungsphase vorgeschaltet, die aus Chemotherapie, Radiatio oder kombinierter Radiochemotherapie bestehen kann. Durch die Konditionierung wird eine Reduktion der Tumorzellmasse erreicht. Außerdem bewirkt sie eine Myeloablation, die Platz für die Stammzellen des Spenders schafft. Durch eine Immunsuppression soll zudem das Einwachsen der neuen Zellen erleichtert und eine Abstoßung verhindert werden. Man unterscheidet myeloablativ, nicht-myeloablativ und intensitätsreduzierte Konditionierungsregimes. Die Wahl der Intensität hängt wesentlich von der Grunderkrankung, dem Rezidivrisiko, dem

Remissionsstatus vor Transplantation sowie patientenabhängigen Faktoren wie Alter und Komorbiditäten ab.

Bei der Auswahl des Spenders ist die *major histocompatibility complex*-(MHC)-Übereinstimmung vorrangig. Abhängig davon und vom Familienstatus werden *matched related donor* (MRD), *matched unrelated donor* (MUD), *mismatched related donor* (MMRD) und *mismatched unrelated donor* (MMUD) unterschieden.

Die Rezidivhäufigkeit ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie der Grunderkrankung, dem Remissionsstatus vor Transplantation, der Art der Konditionierung und der GVHD-Prophylaxe, und beträgt zwischen 10 % und 50 % [1]. Patienten können vor einer allo-SZT anhand klinischer *Scores* wie dem *Hematopoietic Cell Transplantation-Specific Comorbidity Index* (HCT-CI) nach Sorror et al. in verschiedene Risikogruppen eingeordnet werden [2]. Diese geben dann Aufschluss über die *non-relapse*-Mortalität (NRM) zwei Jahre nach SZT. Im HCT-CI werden drei Risikogruppen unterschieden: niedriges Risiko (NRM 14 %), intermediäres Risiko (NRM 21 %) und hohes Risiko (NRM 41 %) [2]. Er berücksichtigt Faktoren wie kardiovaskuläre Risikofaktoren, kardiale und pulmonale Vorerkrankungen, Diabetes mellitus, Adipositas, Infektionen sowie Nieren- und Leberversagen. Somit kann eine primäre Beurteilung der Transplantationseignung erfolgen, die dann in Kombination mit der Evaluation weiterer Faktoren wie dem Alter sowie Art und Stadium der malignen Erkrankung eine umfassende Beurteilung des Transplantationsrisikos ermöglicht.

Für das spezielle Krankheitsrisiko im Kontext der allo-SZT wurde außerdem der *disease risk index* (DRI) entwickelt, der Patienten in vier Risikogruppen mit signifikant unterschiedlichem Gesamtüberleben, progressionsfreien Überleben und Rezidivrisiko stratifiziert [3]. So wird abhängig von einem grunderkrankungsspezifischen Risiko (*disease risk: low, intermediate und high*) und einem stadiumsspezifischen Risiko (*stage risk, low und high*) ein Gesamtrisiko ermittelt. Das *disease risk* wird bei einigen Erkrankungen, wie zum Beispiel chronischen Leukämien (CML, CLL), stadiumsunabhängig zugeteilt (*low*; siehe Tabelle 1, adaptiert nach Armand et al. [3]). Dagegen werden AMLs abhängig von der Zytogenetik in verschiedene Risikogruppen eingeteilt (*favorable, intermediate und adverse cytogenetics*; siehe Tabelle 2, adaptiert nach Armand et al. [3] [4]). Daraus ergibt sich dann ein spezifisches *disease risk*.

Das Rezidivrisiko und damit auch die Kurationschancen sind abhängig von diesen Risikogruppen und dem *stage risk* (Tabelle 3, adaptiert nach Armand et al. [3]).

Tabelle 1: Disease und stage risk

Erkrankung	Risikogruppe (disease risk)
AML- <i>favorable</i> Zytogenetik	<i>Low</i>
CLL	<i>Low</i>
CML	<i>Low</i>
Indolentes B-Zell NHL	<i>Low</i>
ALL	<i>Intermediate</i>
AML <i>intermediate</i> Zytogenetik	<i>Intermediate</i>
MDS <i>intermediate</i> Zytogenetik	<i>Intermediate</i>
Myeloproliferative Neoplasien	<i>Intermediate</i>
Multiples Myelom	<i>Intermediate</i>
Hodgkin Lymphom	<i>Intermediate</i>
DLBCL/Transformiertes indolentes B-NHL	<i>Intermediate</i>
Mantelzelllymphom	<i>Intermediate</i>
T-Zell-Lymphom, nodal	<i>Intermediate</i>
AML <i>adverse</i> Zytogenetik	<i>High</i>
MDS <i>adverse</i> Zytogenetik	<i>High</i>
T-Zell-Lymphom, extranodal	<i>High</i>
Stadium	Risikogruppe (stage risk)
1. CR	<i>Low</i>
≥2. CR	<i>Low</i>
1. PR	<i>Low</i>
Unbehandelt	<i>Low</i>
Chronische Phase CML	<i>Low</i>
≥2. PR (falls RIC)	<i>Low</i>
≥2. PR (falls MAC)	<i>High</i>
Induktionsversagen	<i>High</i>
Aktives Rezidiv	<i>High</i>
<i>Accelerated</i> oder Blasten-Phase CML	<i>High</i>

CR=komplette Remission, PR=partielle Remission, RIC=intensitätsreduzierte Konditionierung, MAC=myeloablative Konditionierung

Adaptiert nach Armand et al. [3].

Tabelle 2: Bestimmung des disease risks der AML anhand der Zytogenetik

Disease risk Gruppe	Zytogenetik
<i>Favorable</i>	Inv (16) ohne komplexen Karyotyp
<i>Intermediate</i>	Normal t (8;21) 11q23 Abnormalität Trisomie/Tetrasomie 8 Abnormales 5 oder 7 Komplex (3 Abnormalitäten) Inv (16) mit komplexem Karyotyp Andere (*)
<i>Adverse</i>	Komplex (≥ 4 Abnormalitäten)

* Außer abn. 12p, 3q, del(9q), t(1;9), t(9;22), t(6;9): in diesem Schema nicht klassifiziert

Adaptiert nach Armand et al. [3, 4].

Tabelle 3: Bestimmung des Gesamtrisikos anhand des disease- und stage risks

Disease risk	Stage risk	Gesamtrisiko
<i>Low</i>	<i>Low</i>	<i>Low</i>
<i>Low</i>	<i>High</i>	<i>Intermediate</i>
<i>Intermediate</i>	<i>Low</i>	<i>Intermediate</i>
<i>Intermediate</i>	<i>High</i>	<i>High</i>
<i>High</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>
<i>High</i>	<i>High</i>	<i>Very high</i>

Adaptiert nach Armand et al. [3].

Armand et al. treffen basierend auf der Bestimmung des Gesamtrisikos anhand des *disease-* und *stage risks* folgende Aussagen [3]: Mit steigendem Gesamtrisiko ergeben sich sinkende Vier-Jahres-Überlebensraten (*low overall risk* 64 %, *intermediate overall risk* 46 %, *high overall risk* 26 % und *very high overall risk* 6 %). Ähnlich verhält sich das Vier-Jahres-Progressionsfreie Überleben: 56 % in der niedrigen Risikogruppe, 40 % in der intermediären, 18 % in der hohen und nur 6 % in der sehr hohen Risikogruppe. Das Vier-Jahres-Rezidivrisiko (Kumulativinzidenz eines Rezidivs) steigt von 19 % in der Niedrigrisiko-Gruppe bis zu 63 % in der sehr hohen Risikogruppe an. Interessanterweise ist diese Risikoeinteilung nicht signifikant mit der Vier-Jahres-*non-relapse*-Mortalität assoziiert (26 % in der Niedrigrisiko-Gruppe vs. 31 % in der sehr hohen Risikogruppe) [3]. Anhand des DRI können also unter Berücksichtigung der Grunderkrankung und des Stadiums Aussagen über die Risikosituation und Überlebensraten einer Patientenpopulation getroffen werden, die später eine Stratifizierung der Kohorte und

einen standardisierten Vergleich mit Patientenkohorten unterschiedlicher Studien und Zentren ermöglichen.

Zu den häufigsten Komplikationen nach allo-SZT gehören Infektionen, toxische Nebenwirkungen der Konditionierung (insbesondere nach myeloablativer Konditionierung) und organspezifischen Schäden, zum Beispiel die Lebervenenverschlusskrankheit (*veno-occlusive disease*, VOD). Dabei treten Frühkomplikationen per definitionem bis Tag +100 nach allo-SZT auf. Später auftretende Komplikationen werden dementsprechend als Spätkomplikationen bezeichnet (Leitlinie DAG-KBT: Akute Komplikationen und supportive Maßnahmen, Version 1, Stand Juni 2016).

Neben der seltenen Transplantatabstoßung kann es außerdem zu einer Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (*graft-versus-host-disease*, GVHD) kommen. Dabei erkennen alloreaktive T-Zellen des Spenders Gewebemerkmale des Empfängers als fremd (*minor* oder *major histocompatibility mismatches*) und verursachen durch eine massive alloreaktive T-Zell-Proliferation Multiorganschäden [5]. Diese manifestieren sich besonders oft an Haut, Darm und Leber. GVHD stellt nach wie vor eine der führenden Ursachen von Morbidität und Mortalität nach allo-SZT dar [6]. Eine akute GVHD zeigt sich in 30-60 % der Patienten, die eine allo-SZT erhalten, und ist für 15-30 % der Todesfälle verantwortlich [7]. Je nach Zeitpunkt des Auftretens unterscheidet man die akute GVHD (<100 Tage nach allo-SZT, aGVHD) von der chronischen GVHD (>100 Tage nach allo-SZT, cGVHD). Seit 2005 wurde diese rein zeitlich definierte Einteilung jedoch teilweise aufgegeben und es werden nun auf Basis der klinischen Symptome aGVHD und cGVHD unterteilt, die im Falle eines Auftretens innerhalb des „typischen“ Zeitraumes als „klassisch“ oder *early/late onset* bezeichnet werden [8]. Auch eine *overlap chronic GVHD* wird nun anerkannt, wenn gleichzeitig Symptome einer aGVHD und cGVHD auftreten [8].

Klinisch werden verschiedene Stadien der aGVHD unterschieden (nach Glucksberg [9], Tabelle 4 sowie Tabelle 5).

Tabelle 4: Organstaging der akuten GVHD nach Glucksberg

Organsystem	Stadium	Kriterien
Haut	1	Makulopapulöses Exanthem <25 % der Körperoberfläche ohne zusätzliche Symptome
	2	Makulopapulöses Exanthem 25-50 % der Körperoberfläche, zusätzlich Symptome wie Pruritus
	3	Generalisierte Erythrodermie, makulöse, papulöse oder vesikuläre Eruptionen oder Desquamationen >50 % der Körperoberfläche
	4	Generalisierte exfoliative Dermatitis oder bullöse Eruptionen
Leber	1	Bilirubin 2 – 3 mg/100 ml oder 35 – 50 µmol/l
	2	Bilirubin 3 – <6 mg/100 ml oder 51 – 102 µmol/l
	3	Bilirubin 6 – <15 mg/100 ml oder 103 – 225 µmol/l
	4	Bilirubin >15 mg/100 ml oder >225 µmol/l
Darm	1	Diarrhoe 500 – 1000 ml/Tag, Nausea und Emesis
	2	Diarrhoe 1000 – 1500 ml/Tag, Nausea und Emesis
	3	Diarrhoe >1500 ml/Tag, Nausea und Emesis
	4	Diarrhoe >1500 ml/Tag, Nausea und Emesis, abdominale Schmerzen oder Ileus

Adaptiert nach Przepiorka et al. [10] und Ball et al. [11].

Tabelle 5: Gesamtscoreing der akuten GVHD

Gesamtgrad GVHD	Haut	Leber	Darm
<i>I</i>	1 – 2	0	0
<i>II</i>	1 – 3	1	1
<i>III</i>	2 – 3	2 – 3	2 – 3
<i>IV</i>	2 – 4	2 – 4	2 – 4

Adaptiert nach Przepiorka et al. [10] und Ball et al. [11].

Auch für die cGVHD gibt es solche Klassifikationen: Nach den Seattle Kriterien kann in *limited* und *extensive disease* unterschieden werden [7]. Im Jahr 2005 wurden in einer Konsensus-Konferenz des *National Institutes of Health* (NIH) Kriterien definiert, die die weitere Unterteilung in milde, moderate und schwere cGVHD ermöglichen [8]. Diese NIH-Kriterien wurden 2014 überarbeitet und ergänzt [12]. In den Kriterien werden Organsysteme wie Haut, Mund, Augen, Gastrointestinaltrakt, Leber, Lungen, Gelenke, Faszien und der weibliche Genitaltrakt berücksichtigt und je nach klinischer Symptomatik mit einem Wert von 0-3 bedacht (0=keine Beschwerden, 3=schwere Beeinträchtigung, siehe Anhang 1). Aus den einzelnen Organ-Scores lässt sich dann der Gesamtschweregrad der cGVHD anhand von Tabelle 6 bestimmen.

Tabelle 6: Bestimmung des Schweregrads der chronischen GVHD (NIH Kriterien)

Grad der cGVHD	Organbeteiligung
<i>mild</i>	- 1 oder 2 Organe/Lokalisationen mit Score 1 (außer Lunge) z.B. leicht trockene Augen mit <3/Tag Augentropfen, orale Läsionen (die Nahrungsaufnahme nicht beeinträchtigen)
<i>moderate</i>	- 3 oder mehr Organe mit Score 1 - mindestens ein Organ mit Score 2 z.B. trockene Augen mit >3/Tag Augentropfen - Lungenscore von 1 (FEV1= 60-79 %, Dyspnoe beim Treppensteigen)
<i>severe</i>	- mindestens ein Organ mit Score 3 z.B. trockene Augen, die ADL beeinträchtigen - Lungenscore von 2 (FEV1= 40-59 %, Dyspnoe auf ebenem Grund)

ADL=Aktivitäten des täglichen Lebens (*activities of daily living*), FEV1= forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde

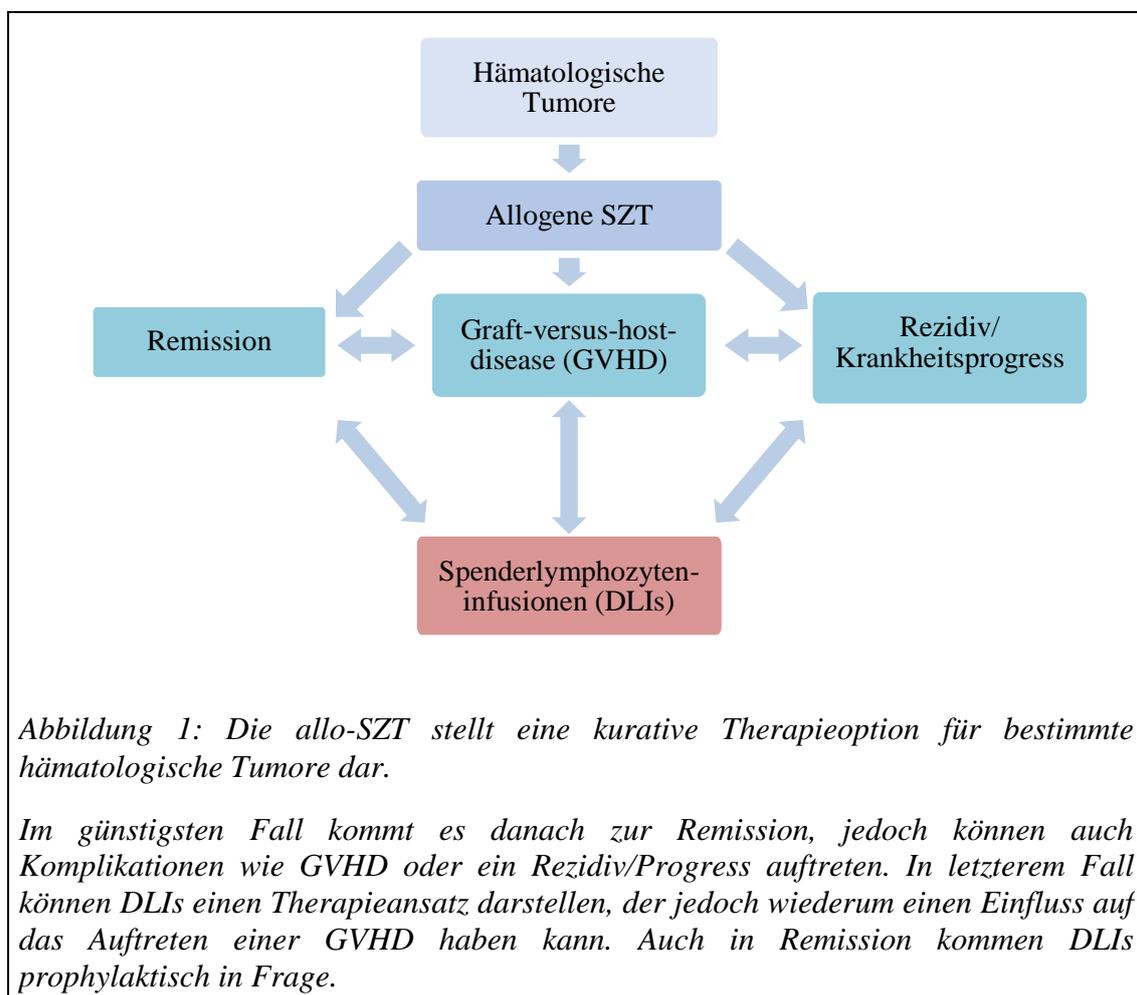
Adaptiert nach Lee et al. [13].

Die cGVHD ähnelt klinisch einer systemischen Autoimmunerkrankung und kann sklerodermiforme und lichenoidale Hautveränderungen, Drüschäden wie Sicca-Syndrom, Darm- und Lungenbeteiligung sowie viele andere Organschäden verursachen. cGVHD ist einer der führenden Gründe für *non-relapse*-Morbidity und -Mortality [14]. Zur Prophylaxe und Therapie einer aGVHD und cGVHD werden eine Vielzahl an Immunsuppressiva eingesetzt, zum Beispiel Glucocorticoide, Methotrexat, Ciclosporin A und Mycophenolat-Mofetil.

Es wurde jedoch auch beschrieben, dass eine cGVHD das Risiko eines Krankheitsrückfalls nach allo-SZT senken kann [15-17]. Außerdem konnte in einer großen CML-Kohorte beobachtet werden, dass die Rezidivwahrscheinlichkeit invers mit dem Grad einer aGVHD oder cGVHD korreliert [18]. Es scheint also eine Verbindung zwischen der organschädigenden Wirkung von expandierten alloreaktiven T-Zellen bei GVHD und der allo-T-Zell-vermittelten Tumorkontrolle zu geben, auf die im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird.

2.2 Spenderlymphozyteninfusionen

Die häufigste Todesursache nach allo-SZT sind jedoch noch immer Krankheitsrezidiv und Progress. In dieser Situation sind die Therapieoptionen sehr begrenzt. Die gezielte Infusion von Lymphozyten des Stammzellspenders (Spenderlymphozyteninfusionen, DLIs) kann hier einen Therapieversuch darstellen (Abbildung 1). In den 1990er Jahren entdeckte Hans-Jochem Kolb, dass DLIs bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) starke GVL-Effekte bewirken und somit die Tumorkontrolle verbessern [19, 20].



Heutzutage haben DLIs ein breites Anwendungsspektrum, das neben der CML auch akute Leukämien (z.B. *high-risk* AML [21]), multiples Myelom [22], rezidierte MDS [23] und experimentell auch solide Tumore wie pädiatrische Sarkome [24] beinhaltet. Die durch DLIs induzierten Remissionsraten schwanken abhängig von der Grunderkrankung

jedoch stark und reichen von >80 % bei CML in der chronischen Phase bis zu <25 % bei akuten Leukämien wie AML und ALL [25].

Der Krankheitsverlauf nach allo-SZT kann mithilfe von sogenannten Chimärismusanalysen aus dem peripheren Blut des Patienten verfolgt werden. Hierfür wird der Anteil von Spenderblutzellen im Empfängerblut mittels Polymerasekettenreaktionen (*polymerase chain reaction, PCR*) von *short tandem repeats* (STR) analysiert [26]. Ansteigende autologe Anteile, auch bezeichnet als zunehmender gemischter Chimärismus, korrelieren dabei mit dem Auftreten eines Krankheitsrezidivs. So stellen die Chimärismusanalysen ein Werkzeug zur Rezidiverkennung dar. Daher zählt zu den Indikationen für DLIs außer dem manifesten Rezidiv auch ein gemischter Chimärismus sowie die minimale Resterkrankung (*minimal residual disease, MRD*). In seltenen Fällen können DLIs in Form virusspezifischer T-Zellen zur Infektkontrolle, z.B. bei post-transplantationalen Epstein-Barr-Virus (EBV)- oder humanen Cytomegalievirus (hCMV)-Infektionen, eingesetzt werden. Auch in manchen Konditionierungsregimes wie FLAMSA-RIC (bestehend aus Fludarabin, Cytarabin und Amsacrin gefolgt von intensitätsreduzierter Konditionierung) sind DLIs als prophylaktische Gabe nach allo-SZT enthalten [27].

DLIs können via Leukapherese aus dem peripheren Blut des Stammzellspenders gewonnen werden. Dabei wird über einen venösen Zugang Blut entnommen, durch ein geschlossenes, steriles System mit einem Zellseparator geleitet und zentrifugiert. So trennen sich die mononukleären Zellen des peripheren Blutes von den restlichen zellulären Blutbestandteilen. Letztere werden dann zum Spender rückgeführt, während die gewonnenen Lymphozyten nach einer Qualitätskontrolle in einem *good manufacturing practice* (gute Herstellungspraxis, GMP)-Labor als DLIs für den Patienten sofort oder zu einem späteren Zeitpunkt nach Kryokonservierung zur Verfügung stehen.

Die Wirksamkeit von DLIs wird primär auf die Ausübung von potenten Graft-versus-Leukemia (GVL)-Effekten zurückgeführt. Der GVL-Effekt ist das benefizielle Pendant zur GVHD und wurde erstmals 1956 von Barnes und Kollegen beschrieben [28]. Hier schienen Leukämiezellen in einem murinen Tumormodell bei verzögerter Bestrahlung durch das neu transplantierte Knochenmark eliminiert zu werden. 1965 wurde dieses Prinzip von Mathé et. al in die Klinik eingeführt [29] und der Begriff „adoptive

Immuntherapie“ wurde geprägt. Horowitz und Kollegen zeigten 1990 anhand der Daten von über 2000 Transplantationen, dass GVL-Effekte zur Senkung der Rezidivwahrscheinlichkeit wichtig sind [17]. Eine T-Zell-Depletion zur Senkung der GVHD-Inzidenz führte außerdem zu einem Anstieg der Rezidivwahrscheinlichkeit [30-32].

Man geht davon aus, dass GVL-Effekte auf verschiedenen Mechanismen beruhen: Zytotoxische Lymphozyten wie CD8⁺ T-Zellen lysieren Leukämiezellen direkt durch Perforin und Granzyme, sie induzieren Apoptose durch den Fas/FasL-Signalweg und es kommt vor allem durch CD4⁺ T-Zellen-vermittelte Zytokinausschüttung zur Proliferationskontrolle und zum Leukämiezelltod [33-38]. In der Initiationsphase der GVL-Reaktion werden T-Zellen über MHC-Komplexe über direkte Antigenpräsentation durch Leukämiezellen oder indirekte Antigenpräsentation durch Antigen-präsentierende Zellen (APZ) aktiviert. Es kommt zu einer klonalen Expansion, wodurch die Effektorphase mit Zytotoxizität durch aktivierte alloreaktive CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen sowie natürliche Killer (NK)-Zellen eingeleitet wird. CD4⁺ T-Zellen können dabei sowohl CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen unterstützen, als auch direkt durch Zytokine agieren. Um eine spezifische antileukämische Immunantwort zu evozieren, muss die Leukämiezelle den T-Zellen spezifische Antigene über MHC-Komplexe präsentieren. Um welche Antigene es sich dabei im Detail handelt, ist nicht immer bekannt. Grundsätzlich können drei Arten von Antigenen unterschieden werden: ubiquitäre, gewebsspezifische und leukämie-spezifische Antigene. Zu den ubiquitären Antigenen zählen beispielsweise *minor histocompatibility* Antigene (mHA) wie HY, HA-3, HA-4 und HA-6 [39-41]. Diese werden von Effektor-T-Zellen des Spenders erkannt und können zu einer GVL-Antwort, aber aufgrund ihrer Unspezifität auch zu GVHD, führen. Es wird davon ausgegangen, dass die T-Zell-Antwort des Spenders auf von hämatopoietischen sowie Epithelzellen breit exprimierte *minor histocompatibility* Antigene GVHD evozieren kann, während die Spender-T-Zell-Antwort auf spezifisch auf hämatopoietischen Zellen exprimierte *minor histocompatibility* Antigene für GVL-Effekte ohne GVHD verantwortlich ist [42]. Ein solches gewebsspezifisches Antigen als Beispiel für die letztgenannte Situation ist HA-2, das 1995 von den Haan und Kollegen entdeckt wurde und nur auf lymphoiden und myeloiden Zellen exprimiert ist [43]. Auch CD19 als lymphoider Marker und CD45 als lymphoider und myeloider Marker sind

solche Antigene. Die Unterscheidung von ubiquitären und gewebsspezifischen Antigenen ist deshalb relevant, weil Patienten nach allo-SZT, die in gewebsspezifischen *minor histocompatibility* Antigenen nicht mit ihrem Spender übereinstimmen, besonders von einer Verstärkung der T-Zell-Antwort zur Augmentation von GVL-Effekten profitieren könnten [42]. Auch das *Targeting* von auf epithelialen und hämatopoietischen Zellen exprimierten Antigenen (ubiquitäre Antigene) könnte GVL-Effekte stärken, jedoch mit höherer GVHD einhergehen: T-Zell-Antworten auf HA-8, UGT2B17 und SMCY *minor histocompatibility* Antigene, die auch auf epithelialen Zellen exprimiert sind, sind besonders mit dem Auftreten einer GVHD assoziiert [42]. Schlussendlich könnten Leukämie-spezifische Antigene wie BCR-ABL bei CML, PML-RARA bei AML M3 oder Ras-Mutationen in myeloiden Leukämien, die als Folge chromosomaler Translokationen, Punkt- oder *frameshift*-Mutationen oder Deletionen entstehen, als Neoantigene fungieren [44]. Die klinische Relevanz der Identifikation von GVL-assoziierten Antigenen wird deutlich darin, dass die adoptive T-Zell-Therapie eine potente Anti-Tumor-Immuntherapie nach allo-SZT darstellen könnte: T-Zellen, die spezifisch für von Leukämiezellen exprimierte Antigene sind, könnten isoliert und *ex vivo* expandiert werden, sodass sie in Folge dem Patienten reinfundiert werden und so effiziente GVL-Effekte ausüben könnten. Am Beispiel von virusspezifischen T-Zellen gegen EBV und hCMV konnte bereits gezeigt werden, dass der adoptive T-Zell-Transfer nach allo-SZT effektiv in der Verhinderung viraler Infektionen ist, ohne GVHD zu evozieren [45-47]. Dudley et al. sowie Yee et al. zeigten in Patienten mit Melanom, dass der Transfer von autologen tumorreaktiven T-Zellen auch im Kontext der Tumorkontrolle realisierbar ist [48, 49].

Bis heute besteht eine der großen Herausforderungen in der Transplantationsmedizin darin, die potenziell lebensbedrohliche GVHD von den erwünschten GVL-Effekten zu trennen. In der Klinik wird auf verschiedene Arten versucht, Einfluss auf das GVHD/GVL-Verhältnis zu nehmen [50]: Den ersten Ansatz stellt die Manipulation von T-Zell-Populationen dar. Beispiele hierfür sind die Elimination von alloreaktiven T-Zellen in Form von T-Zell-Depletion, die Steigerung von $\gamma\delta$ -T-Zell-Aktivität oder regulatorischen T-Zellen sowie die zeitversetzte Infusion von allogenen T-Zellen, so also auch die Gabe von DLIs. Als weiterer Ansatz dienen andere Zellpopulationen im Transplantat, wie NK-Zellen, die ebenfalls manipuliert werden können und GVL-Effekte

ausüben, ohne GVHD zu verursachen. Pharmakologisch kann mittels Immunsuppressiva modulierend eingegriffen werden. Neue Ansätze bieten zielgerichtete Therapien, wobei tumorassoziierte Antigene wie Proteinase-3 und BCR-ABL Angriffspunkte für beispielsweise Tumorstimmungen darstellen [51-55].

Spannend in diesem Kontext ist dabei auch der Ansatz, eine sogenannte intensitätsreduzierte Konditionierung (RIC) mit einer DLI-Gabe zu kombinieren, um so die verringerte Toxizität von RIC-Regimes und die stärkeren GVL-Effekte durch DLIs maximal auszunutzen. In RIC-Regimes, wie Fludarabin plus Busulfan, ist die Dosis der alkylierenden Agenzien um mindestens 30 % reduziert [56]. Dies ermöglicht auch älteren Patienten mit Komorbiditäten, die aufgrund der hohen transplantationsbedingten Mortalität (*transplant-related mortality*, TRM) nicht für eine myeloablative Konditionierung mit anschließender allo-SZT in Frage kommen, von einer allo-SZT zu profitieren. RIC-Regimes vermindern also die TRM und verhindern eine Transplantatabstoßung weitgehend, aber ermöglichen dennoch GVL-Effekte [57].

Dennoch ist der Einsatz von DLIs aufgrund von Komplikationen begrenzt: GVHD stellt eine häufige dosislimitierende Toxizität dar, aufgrund derer das volle Anti-Tumor-Potenzial von DLIs zum Teil nicht ausgeschöpft werden kann. Patienten mit cGVHD vor DLI-Gabe oder rascher DLI-Gabe innerhalb eines Jahres nach allo-SZT zeigten außerdem ein verkürztes *failure*- und sekundäre GVHD-freies Überleben [58].

Auch Panzytopenien und Myelosuppression wurden bei Patienten, die DLIs als Antwort auf rezidierte CML erhielten, beobachtet [59]. Dieses Phänomen kann auch im Rahmen einer aGVHD auftreten.

Das oft unzureichende Ansprechen auf DLIs sowie das Auftreten von Komplikationen könnten zumindest zum Teil darin begründet sein, dass wenig über die zellulären Komponenten von DLIs bekannt ist. In dieser Arbeit wurde deshalb die zelluläre Zusammensetzung von DLIs und insbesondere die der T-Zellen analysiert.

2.3 Invariante natürliche Killer-T-Zellen (iNKT-Zellen)

iNKT-Zellen sind eine Subgruppe der T-Lymphozyten, die durch ihren semi-invarianten $\alpha\beta$ -TZR und bestimmte NK-Zell-Oberflächenmoleküle charakterisiert sind. Bei der Maus besteht dieser TZR aus der invarianten α -Kette $V\alpha 14$ - $J\alpha 18$ und dem limitierten Repertoire einer β -Kette ($V\beta 8$, $V\beta 7$, und $V\beta 2$) [60]. iNKT-Zellen des Menschen exprimieren einen TZR aus einer $V\alpha 24$ - $J\alpha 18$ TZR- α -Kette, gekoppelt mit einer $V\beta 11$ TZR- β -Kette [61]. Zu den von iNKT-Zellen exprimierten NK-Zell-Markern gehören NK1.1 (Maus), die NKG2-Familie und CD161 sowie CD56 (Mensch) [62].

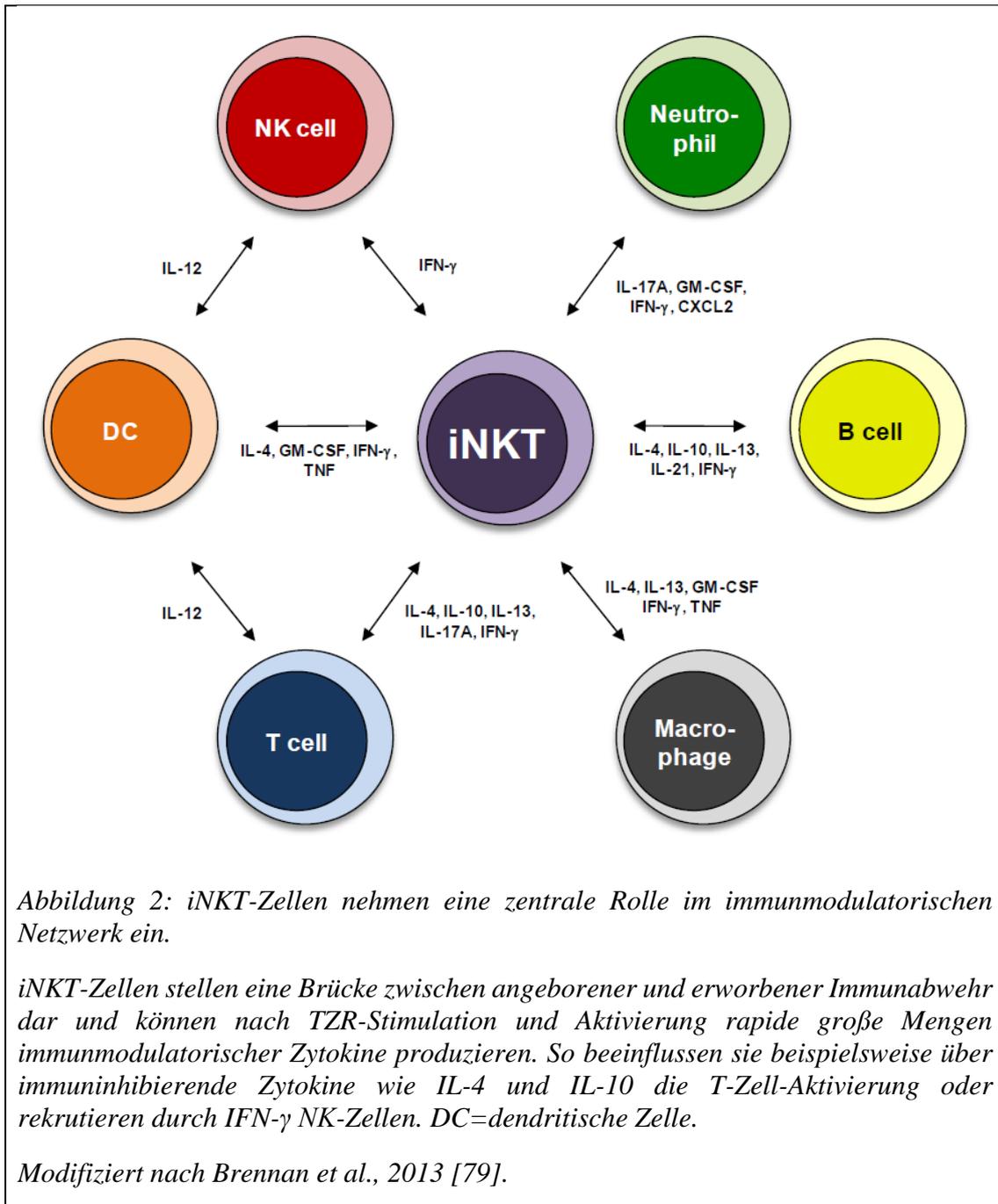
Grundsätzlich können NKT-Zellen in zwei Gruppen eingeteilt werden [63]: Typ I und Typ II NKT Zellen. Typ I NKT-Zellen exprimieren die oben aufgeführten TZR, während Typ II NKT-Zellen diverse TZR tragen können und weniger gut charakterisiert sind [64-68]. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf humanen Typ I NKT-Zellen, auch als iNKT-Zellen bezeichnet.

Anders als konventionelle T-Zellen, die Peptide über MHC-I und MHC-II präsentiert bekommen, erkennen iNKT-Zellen Glykolipide über das nicht-polymorphe, MHC-I-ähnliche Molekül CD1d [69].

Das prototypische Glykolipid α -Galactosylceramid (α -GalCer) wurde in den 1990er Jahren aus dem Meeresschwamm *Agelas mauritianus* isoliert und fiel zunächst durch seine starke Anti-Tumor-Aktivität gegen B16 Melanome in Mäusen auf [70]. In Folge wurde entdeckt, dass α -GalCer ein Ligand des TZR von iNKT-Zellen ist und so dazu in der Lage ist, iNKT-Zellen sehr potent zu stimulieren [71].

iNKT-Zellen sind mit ca. 0,01-0,1 % der humanen PBMCs [72-74] eine kleine Zellpopulation, die trotz ihrer geringen Anzahl eine zentrale Stelle im immunregulatorischen Netzwerk einnimmt (Abbildung 2): So aktivieren sie durch Zytokinausschüttung NK-Zellen [75-77], konventionelle T-Zellen [78-80], B-Zellen [81] und Makrophagen [82] und rekrutieren myeloide DCs [83].

Die Interaktion mit anderen Zelltypen wie NK-Zellen, $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, regulatorischen T-Zellen, Monozyten und B-Zellen [84-86] erfolgt über große Mengen immunmodulatorischer Zytokine [72, 87], die nach Stimulation des TZR ausgeschüttet werden.



Funktionell unterscheidet man drei Subtypen von iNKT-Zellen: CD4⁺, CD8⁺ und CD4⁻/CD8⁻ (doppelt negative, DN) iNKT-Zellen. Während CD8⁺ und DN iNKT-Zellen vor allem Th1 Zytokine wie IL-2, Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) produzieren und ihnen so zytolytische Fähigkeiten zugeschrieben werden, sind CD4⁺ iNKT-Zellen dazu in der Lage, sowohl Th1 (IFN- γ und TNF- α) als auch Th2 (IL-4, IL-5 und IL-13) Zytokine zu sezernieren [72, 73]. Dabei folgt die relative Menge der

sezernierten Zytokine einem CD8⁺DN⁺CD4⁻-Muster für Th1 und einem CD4⁺DN⁺CD8⁻-Muster für Th2 [88]. Somit spielen CD4⁺ iNKT-Zellen auch eine wichtige Rolle in der Immunregulation.

Darüber hinaus wird auch eine Einteilung in iNKT-Subtypen anhand der Zytokinmuster vorgenommen, wobei Th1, Th2 und Th17-iNKT-Zellen unterschieden werden [89]: Th1-iNKT-Zellen tragen neben dem TZR auch einen IL-12-Rezeptor und NK1.1 und sind CD4⁺. Sie produzieren vor allem IFN- γ und in geringem Ausmaß IL-4. Th2-iNKT-Zellen exprimieren neben dem TZR und CD4 einen IL-25-Rezeptor und produzieren IL-4, IL-10, IL-13, IL-9 und in geringem Ausmaß GM-CSF. Th17-iNKT-Zellen tragen neben dem TZR den IL-23-Rezeptor und produzieren IL-17a, IL-21 und IL-22 [89].

Durch ihre Fähigkeit, sowohl rapide Zytokine auszuschütten und so das unspezifische Immunsystem zu aktivieren als auch spezifisch Antigene über ihren TZR zu erkennen, stellen iNKT-Zellen eine Brücke zwischen angeborener und erworbener Immunität her und werden auch als *innate-like lymphocytes* bezeichnet [63].

iNKT-Zellen scheinen bei vielen immun-assoziierten Erkrankungen eine Rolle zu spielen: In bestimmten Autoimmunerkrankungen wie autoimmunem Diabetes mellitus sollen sie im Mausmodell eine protektive Wirkung haben [90]. Eine iNKT-Zell-Defizienz ist zudem bei rheumatoider Arthritis und systemischen Lupus erythematoses zu beobachten [91-95]. Die Rolle von iNKT-Zellen in der systemischen Sklerose wird betont durch eine kürzlich veröffentlichte Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe [96]. Außerdem können iNKT-Zellen die antimikrobielle Abwehr gegen Pilze, Bakterien, Viren und Parasiten stärken [97-101].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Anzahl und Funktionalität von iNKT-Zellen bei vielen Tumoren herabgesetzt ist: Beispielsweise beim Melanom [102], Lungenkarzinomen [103, 104], und bei hämatologischen Neoplasien wie myelodysplastischen Syndromen [105] und multiplen Myelomen [106]. Die Anzahl von iNKT-Zellen korreliert dabei mit dem Überleben und dient als prognostischer Marker, zum Beispiel bei Kopf-Hals-Tumoren [107, 108] und kolorektalen Karzinomen [109].

Zusätzlich zu den quantitativen Einschränkungen kommt dabei eine reduzierte Funktionalität von iNKT-Zellen bei Tumorpatienten hinzu: Die Proliferation von iNKT-

Zellen ist bei Tumorpatienten reduziert [110]. Außerdem ist die Produktion von IFN- γ als wichtiges zytotoxisches Zytokin, das eine wichtige Rolle bei der iNKT-vermittelten Tumorzelllyse spielt, bei iNKT-Zellen von Tumorpatienten in fortgeschrittenen Stadien vermindert [111]. Gleichzeitig fällt eine gesteigerte IL-4-Produktion auf [111], es ist also eine Verschiebung von Th1 zu Th2 Zytokinmustern zu beobachten. Dieser ist *in vitro* reversibel und macht iNKT-Zellen so zu einem potentiellen Angriffspunkt in der Anti-Tumor-Therapie: iNKT-Zell-Stimulation mittels α -GalCer und IL-12 verlagert das Zytokinmuster zu Th1, erhöht so die IFN- γ -Produktion und führt zu einer verbesserten Tumorkontrolle und Verminderung von Metastasierungen im Mausmodell [105, 106, 111, 112].

iNKT-Zellen haben zudem eine besondere Eigenschaft, die sie im Kontext der Stammzelltransplantation vielversprechend erscheinen lässt: Neben ihrer Beteiligung in der Tumorkontrolle und *-surveillance* sind sie auch in der Lage, GVHD zu verhindern. Schneidawind et al. beobachteten 2014, dass CD4⁺ iNKT-Zellen im murinen GVHD-Modell über die Expansion von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen (Tregs) die GVHD-Letalität senkten [113]. Schon geringe Dosen von adoptiv transferierten CD4⁺ iNKT-Zellen waren dabei ausreichend, um effektiv vor GVHD zu schützen, ohne dass GVL-Effekte verloren gingen. In einem Mausmodell ging die cGVHD außerdem mit einer verminderten iNKT-Zellzahl einher und konnte durch den Transfer von iNKT-Zellen vorgebeugt und sogar rückgängig gemacht werden [114]. Die Bedeutung von Tregs in diesem Zusammenhang wird dadurch betont, dass dies bei Treg-Depletion vor dem iNKT-Zell-Transfer nicht mehr möglich war [113].

Auch im Menschen wurde beobachtet, dass hohe Dosen iNKT-Zellen im Transplantat vor aGVHD schützen [115] und dass die frühe posttransplantationale iNKT-Zell-Erholung mit dem Auftreten von aGVHD sowie dem Gesamtüberleben zusammenhängt: Hohe iNKT/T-Zell-Ratios gingen mit niedriger Inzidenz von aGVHD und verringerter *non-relapse* Mortalität sowie verringerter Gesamtmortalität einher [116]. Malard und Kollegen bestätigten, dass hohe Dosen von iNKT-Zellen im Transplantat mit einem besseren GVHD- und progressionsfreien Überleben einhergingen [117].

2.4 Zielsetzung

Aufgrund der GVHD-supprimierenden tolerogenen Wirkung von iNKT-Zellen bei gleichzeitigem Erhalt der GVL-Effekte wird in dieser Arbeit der Fragestellung nachgegangen, welche Rolle iNKT-Zellen für DLIs nach allo-SZT spielen. Dafür sollen zu Beginn klinische Daten im Zusammenhang mit der DLI-Gabe erhoben und analysiert werden. Anschließend soll ein besonderer Fokus darauf gelegt werden, die zytolytischen Fähigkeiten von iNKT-Zellen aus DLIs gegenüber Leukämiezelllinien und primären Leukämiezellen *ex vivo* zu evaluieren. Außerdem sollen Einblicke in die mechanistischen Grundzüge der DLI-iNKT-vermittelten Leukämiezelllyse dargelegt werden.

3 Material & Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Tabelle 7: Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank (Inkubator) HERAcell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Pipetten 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand, Wertheim, Deutschland
Mehrfachdispenser HandyStep S	Brand, Wertheim, Deutschland
Multipette E3 (1 µl - 50 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Neubauer Zählkammer (0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm ²)	Brand, Wertheim, Deutschland
Durchflusszytometer LSR Fortessa	BD Biosciences, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten
Durchflusszytometer FACSAria III	BD Biosciences, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Biosciences, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten
Sterilbank HeraSafe HS12	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kühlschrank Biofresh	Liebherr, Bulle, Schweiz
HERAfreeze HFU B -86 °C Ultratiefkühlschrank	ThermoFisher Scientific Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Schüttelwasserbad GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
neoVortex Schüttler, 2500 UpM	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge Mini Star 7200 UpM	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau, Deutschland

Sicherheits-Absaugsystem Vacusafe Comfort	Integra Biosciences, Biebertal, Deutschland
QuadroMACS Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Cesium-137 Bestrahlungsgerät Gammacell 1000	Atomic Energy of Canada Limited, Chalk River, Kanada
Zytozentrifuge Thermo Shandon Cytospin 3	Marshall Scientific, Hampton, New Hampshire, Vereinigte Staaten
Nikon Eclipse TS100 Mikroskop (x40 Objektiv)	Nikon, Tokyo, Japan
Nikon Digital Sight Kamera	Nikon, Tokyo, Japan

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Kryoröhrchen Cryo.S (2 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Einmalspritzen (20 ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Pipettenspitzen (2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Präzisions-Dispenser-Tips (1 ml, 5 ml, 25 ml)	Brand, Wertheim, Deutschland
Serologische Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 35 ml, 50 ml)	Corning, Corning, New York, Vereinigte Staaten
Reaktionsröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellkulturplatten (6 Well)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Zellkulturplatten (24 Well, 96 Well U bottom)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Rundbodenröhrchen, Polystyrol, 5 ml	Corning, New York, Vereinigte Staaten
MACS LS Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 9: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
<i>Dulbeccos Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphatpuffer, PBS)	Gibco, New York, Vereinigte Staaten
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Fetales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i> , FBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
<i>Biocoll Separating Solution</i> (Ficoll)	Biochrom, Berlin, Deutschland
RPMI 1640 (1X) + Glutamax	Gibco, New York, Vereinigte Staaten
PenStrep (Penicillin-Streptomycin, PS)	Lonza, Basel, Schweiz
Hepes Buffer	Gibco, New York, Vereinigte Staaten
Sodiumpyruvate 100 mmol	Gibco, New York, Vereinigte Staaten
α -Galactosylceramid (α -GalCer)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
rekombinantes humanes Interleukin 2 (rhIL-2)	Novartis, Basel, Schweiz
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
<i>FCR Blocking Reagent</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

7-Aminoactinomycin (7-AAD)	BD Biosciences, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten
<i>Latex beads, polystyrene</i> (3,0 µm)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
<i>OneComp eBeads™ Compensation Beads</i>	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
<i>Protein Transport Inhibitor Cocktail (500X)</i>	eBioscience, San Diego, CA, USA
<i>Anti-PE MicroBeads UltraPure</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>CD34 MicroBead Kit UltraPure</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
LegendPlex humanes CD8/NK Panel	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten
May-Grünwalds Eosin Methylenblaublösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Euparal Einschlussmittel für die Mikroskopie	Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.1.4 Antikörper und Zytokine

Tabelle 10: Antikörper der iNKT-Zell-Expansion

Antigen (Klon)	Fluorochrom	Konzentration	Hersteller
<i>Fixable Viability Dye</i>	eFluor506	1:1000	eBioscience, San Diego, CA, USA
PBS57-CD1d Tetramer	PE	1:1000	National Institutes of Health Tetramer Core Facility, Atlanta, Vereinigte Staaten

CD3 (OKT3)	PerCP/Cy5.5	1:400	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten
CD4 (RPA-T4)	BV421	1:400	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten
CD8a (HIT8a)	FITC	1:600	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten

Tabelle 11: Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse der DLI-Proben - Panel 1

Antigen (Klon)	Fluorochrom	Konzentration	Hersteller
<i>Fixable Viability Dye</i>	eFluor506	1:1000	eBioscience, San Diego, CA, USA
PBS57-CD1d Tetramer	PE	1:1000	National Institutes of Health Tetramer Core Facility, Atlanta, Vereinigte Staaten
CD3 (OKT3)	PerCP/Cy5.5	1:400	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten
CD4 (RPA-T4)	BV785	1:400	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten
CD8a (HIT8a)	AF700	1:600	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten
CD27(O323)	BV421	1:800	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten
CD45 (HI30)	BV650	1:800	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten
CD127 (A019D5)	PE-Cy7	1:200	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten
CD19 (SJ25C1)	APC-Cy7	1:200	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten

CD56 (B159)	FITC	1:100	BD Biosciences, San Diego, CA, Vereinigte Staaten
CD25 (BC96)	BV711	1:80	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten
TCR $\gamma\delta$ (B1)	APC	1:50	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten

Tabelle 12: Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse der DLI-Proben - Panel 2

Antigen (Klon)	Fluorochrom	Konzentration	Hersteller
<i>Fixable Viability Dye</i>	eFluor506	1:1000	eBioscience, San Diego, CA, USA
CD123 (6H6)	PE-Dazzle 594	1:800	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten
CD33 (WM-53)	PE-Cy7	1:800	eBioscience, San Diego, CA, USA
CD11b (ICRF44)	BV421	1:800	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten
CD19 (HIB19)	FITC	1:800	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten
CD3 (SK7)	FITC	1:800	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten
CD16 (3G8)	BV711	1:400	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten
CD45 (HI30)	PE	1:400	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten
HLA-DR (L243)	APC-Cy7	1:200	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten

CD15 (W6P3)	BV605	1:200	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten
CD14 (HCD14)	AF700	1:200	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten
CD34 (4H11)	APC	1:200	eBioscience, San Diego, CA, USA
CD56 (NCAM16.2)	FITC	1:200	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten
CD11c (3.9)	BV785	1:100	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten

Tabelle 13: Antikörper für Zytotoxizitätsassays

Antigen (Klon)	Fluorochrom	Konzentration	Hersteller
<i>Viability Staining Solution</i>	7-Amino-actinomycin (7-AAD)	1:100	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten
<i>Latex beads, polystyrene (3,0 µm)</i>		1:70000	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
PBS57-CD1d Tetramer	PE	1:1000	National Institutes of Health Tetramer Core Facility, Atlanta, Vereinigte Staaten

Tabelle 14: Antikörper für CD107a Assays

Antigen (Klon)	Fluorochrom	Konzentration	Hersteller
<i>Viability Staining Solution</i>	7-Amino-actinomycin (7-AAD)	1:100	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten
<i>Latex beads, polystyrene (3,0 µm)</i>		1:7000	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
PBS57-CD1d Tetramer	PE	1:1000	National Institutes of Health Tetramer Core Facility, Atlanta, Vereinigte Staaten
CD107a (H4A3)	APC	1:100	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten
CD4 (RPA-T4)	BV421	1:400	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten
CD8a (HIT8a)	FITC	1:600	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten
TZR Vα24-Jα18 (iNKT)	PE/Cy7	1:100	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten

Tabelle 15: Antikörper zur Bestimmung von Tumorzellmarkern

Antigen (Klon)	Fluorochrom	Konzentration	Hersteller
<i>Fixable Viability Dye</i>	eFluor506	1:1000	eBioscience, San Diego, CA, USA
CD1d (51.1)	APC	1:50	eBioscience, San Diego, CA, USA

<i>Mouse IgG2b, κ</i> <i>Isotype Ctrl Antibody</i> (MPC-11)	APC	1:50	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten
---	-----	------	---

3.1.5 Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 16: Medien, Puffer und Lösungen

Medium	Inhaltsstoffe (Konzentration)
MACS-Puffer	PBS FCS (0,5 %) EDTA (2 mM)
FACS-Puffer	PBS FBS (2 %)
iNKT-Medium	RPMI 1640+Glutamax FBS (10 %) 2-Mercaptoethanol (55 µM) <i>Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids</i> (0,1 mM) <i>Sodium-Pyruvat</i> (1 mM) PS (100 IE) <i>Hepes Buffer</i> (1 %)
Tumorzellmedium	RPMI 1640 FCS (10 %) PS (1 %)
Einfriermedium	RPMI 1640 FBS (20 %) DMSO (10 %)
Sörensenpuffer	25 ml verdünntes KH_2PO_4 (90,7 g 20x KH_2PO_4 in 1L destilliertem Wasser)

	100 ml verdünntes Na ₂ HPO ₄ (44,7 g 5x Na ₂ HPO ₄ in 1L destilliertem Wasser) 500 ml destilliertes Wasser (pH 6,8)
--	---

3.1.6 Software

Tabelle 17: Software

Software	Hersteller
FlowJo Version 10.2	Tree Star, La Jolla, CA, USA
GraphPad Prism Version 7.01	GraphPad Software, La Jolla, CA, Vereinigte Staaten
LEGENDplex™ Software Version 8	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten
NIS Elements Software	Nikon, Tokyo, Japan

3.2 Patienten

In Kooperation mit dem gemeinsamen Stammzelllabor der Kinderklinik und der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen konnten von 2012 – 2018 88 DLIs gewonnen und kryokonserviert werden. Das schriftliche Einverständnis der Spender sowie eine positive Stellungnahme der Ethikkommission der medizinischen Fakultät Tübingen liegen vor (in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki 1975, revidiert in 2013; IRB-Bestätigungsnummer 887/2017BO2).

Ein Teil der DLI-Spender wurde im Rahmen der peripheren Blutstammzellspende für 5 Tage mit G-CSF stimuliert (Lenograstim, 10 µg/kg/d, Chugai Pharma, Frankfurt, Deutschland).

Patienteneigene Tumorzellen wurden nach Einholen des schriftlichen Einverständnisses vor Therapiebeginn von der AG Prof. Salih, Innere Medizin II,

Universitätsklinikum Tübingen, und unserer eigenen Arbeitsgruppe gewonnen (IRB-Bestätigungsnummer 137/2017BO2).

3.3 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden verwendet: Die akute T-Zell-Leukämie (T-ALL) Jurkat (Klon E6-1, ATCC, Manassas, Virginia, Vereinigte Staaten), die akut monozytische Leukämiezelllinie THP-1 (Klon TIB-202, ATCC, Manassas, Virginia, Vereinigte Staaten) sowie die chronisch myeloische Leukämiezelllinie K562 (Klon CCL-243, ATCC, Manassas, Virginia, Vereinigte Staaten). Diese Zelllinien wurden in Tumorzellmedium (Tabelle 16) bei 37 °C und 5 % CO₂ in Kultur gehalten.

3.4 Methoden

3.4.1 Gewinnung von DLIs

Im Zeitraum von 2012 bis 2018 wurden 88 DLIs über periphere Leukapherese von geeigneten Spendern gewonnen. Diese DLIs wurden nach erfolgter Qualitätskontrolle im gemeinsamen Stammzelllabor der Kinderklinik und Medizinischen Klinik Tübingen entweder frisch den entsprechenden Patienten infundiert oder für spätere Anwendungen kryokonserviert.

DLIs wurden nach ihrer klinischen Verwendung durch das gemeinsame Stammzelllabor der Kinderklinik und Medizinischen Klinik Tübingen bereitgestellt. Unmittelbar nach Erhalt wurden die DLIs durch Dichtegradientenzentrifugation oder durch einmaliges Waschen in PBS (Zentrifugation 450 g, 5 Minuten) aufgearbeitet. Für die Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) wurden die DLIs 1:3 mit PBS verdünnt. In einem 50 ml Falcon wurden 15 ml *Biocoll Separating Solution* vorgelegt und dann mit 35 ml DLIs überschichtet. Bei 23 °C wurde ohne Bremse bei 800 g für 18 Minuten zentrifugiert und anschließend wurde die Interphase abgenommen. Nach erneuter Zentrifugation bei 450 g für 5 Minuten wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet gelöst und mit PBS auf 40 ml aufgefüllt. Dann folgte der Thrombozytenwaschgang bei 130 g für 10 Minuten. Nun wurde die Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen wurden anschließend in Einfriermedium (Tabelle 16) schonend

schrittweise weggefroren. Die Proben wurden dann im Stickstofftank bis zur Verwendung gelagert.

3.4.2 Färbung der DLI-Proben für die durchflusszytometrische Analyse

Die Proben wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, zügig in PBS aufgenommen und bei 450 g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in Rundbodenröhrchen überführt, erneut bei 450 g für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand abgeschüttet. Das Zellpellet wurde für 5 Minuten mit *FCR Blocking Reagent* (Verdünnung 1:100 in FACS-Puffer) bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Antikörper-Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern in Form zweier Mehr-Farben-Panels durchgeführt (Tabelle 11 und Tabelle 12). Hierfür wurden die Proben für 20 Minuten mit den entsprechenden Antikörpern bei 4 °C inkubiert (Verdünnungen siehe ebenfalls Tabelle 11 und Tabelle 12) und die Färbereaktion anschließend durch Zugabe von 1 ml FACS-Puffer pro Tube abgestoppt. Nach erneuter Zentrifugation bei 450 g für 5 Minuten und Verwerfen des Überstandes wurden die Proben auf Eis gelagert und am LSR Fortessa gemessen. Für beide Panels wurden Kompensationskontrollen (*Kompensationsbeads One Comp eBead*, eBioscience, plus 0,5 µl des jeweiligen Antikörpers) eingemessen und am Durchflusszytometer sowie anschließend in der Auswertungssoftware FlowJo kompensiert. Zur Kontrolle der methodisch und technisch korrekten Durchführung und Funktionsweise des Geräts wurden PBMCs von gesunden Probanden (*Buffy coats*, Bezug über die Leukapherese-Abteilung der Blutspendezentrale am Universitätsklinikum Tübingen; IRB-Bestätigungsnummer 483/2015BO2) mitgefärbt und eingemessen.

3.4.3 Expansion von iNKT-Zellen aus kryokonservierten DLIs

DLIs wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, zügig in PBS überführt und bei 450 g für 5 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen unter Ausschluss toter Zellen in Trypanblau gezählt und jeweils 40×10^6 Zellen in 20 ml iNKT-Medium (Tabelle 16) mit 100 IU/ml rekombinanten humanen IL-2 und 100 ng/ml α -GalCer in einer 25 cm² Zellkulturflasche für 7 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. An Tag 7 wurden die kultivierten Zellen gezählt und der Anteil an iNKT-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Tabelle 10). Bei bis dato erfolgreicher

Expansion (prozentuale iNKT-Zahl größer 0,1 % der lebenden Lymphozyten) erfolgte an Tag 7 die Restimulation der kultivierten iNKT-Zellen mit Glykolipid-beladenden (100 ng/ml α -GalCer für bis zu 10×10^8 Zellen für 4 h bei 37 °C inkubiert), mit 30 Gy bestrahlten *Feeder*-Zellen. Die Restimulation erfolgte autolog, oder, bei niedriger Probenverfügbarkeit der DLIs, allogon mit PBMCs gesunder Spender. Je 40×10^6 *Feeder* und 20×10^6 kultivierte Zellen wurden zusammen mit 100 IU/ml IL-2 und 100 ng/ml α -GalCer in einer 75 cm² Zellkulturflasche für weitere 7 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. An Tag 14 erfolgte analog zum Vorgehen an Tag 7 die Bestimmung der iNKT-Zellzahl sowie des iNKT-Zellanteils mittels Durchflusszytometrie (Tabelle 10).

3.4.4 Aufreinigung von kultivierten iNKT-Zellen

An Tag 14 wurden die kultivierten iNKT-Zellen mittels magnetischer Zellseparation (*magnetic-activated cell sorting*, MACS) aufgereinigt. Dazu wurden die kultivierten Zellen aus der Zellkulturflasche in ein 50 ml Falcon überführt, bei 400 g für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend in 5 ml MACS-Puffer aufgenommen. Anschließend wurde PE-gelabeltes PBS57-CD1d Tetramer in der Konzentration 1:1000 zugegeben und bei 4 °C für 15 Minuten inkubiert. Zum Abstoppen der Färbereaktion wurde pro 1×10^7 Zellen 1 ml MACS-Puffer zugegeben und wiederum bei 400 g für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 80 μ l MACS-Puffer je 1×10^7 Zellen aufgenommen und resuspendiert.

Pro 1×10^7 Zellen wurden 20 μ l Anti-PE-Microbeads zugegeben und für weitere 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Dann wurde wiederum mit 1 ml MACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen aufgefüllt, erneut zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 500 μ l MACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen aufgenommen. Der QuadroMacs Magnet wurde mit einer LS Säule bestückt, die Säule mit 3 ml MACS-Puffer gespült und die Zellsuspension aufgebracht. Es folgten drei weitere Waschgänge mit je 3 ml MACS-Puffer, ehe die Zellen durch Aufbringen von 5 ml MACS-Puffer in das Säulenreservoir und Herausdrücken der iNKT-Zellen mittels des geeigneten Stempels in einem 15 ml Falcon aufgefangen wurden.

Die somit auf eine Reinheit von über 90 % aufgereinigten iNKT-Zellen konnten nun mit Hilfe der Trypanblau-Färbung gezählt werden und in weiteren Versuchen eingesetzt werden.

3.4.5 Zytotoxizitätsassays

3.4.5.1 Tumorzelllinien

Die iNKT-Zellen als Effektorzellen wurden, wie unter Kapitel 3.4.4 beschrieben, aufgereinigt und deren Zellzahl bestimmt. Die Zielzellen, die Tumorzelllinien Jurkat, THP-1 und K562, wurden in Tumorzell-Medium (Tabelle 16) mindestens zwei Wochen vor Versuch hinweg bei 37 °C und 5 % CO₂ in Kultur gehalten und alle zwei Tage kultiviert (K562: 1:2,5, Jurkat: 1:2, THP-1 1:1,6). Als Vorbereitung auf das Ansetzen des Versuchs wurde deren Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung bestimmt und die benötigte Anzahl an Tumorzellen wurde in ein 15 ml Falcon abgenommen. Nach Zentrifugation bei 450 g für 5 Minuten wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in der benötigten Menge iNKT-Medium aufgenommen (100 µl je Well) und bei bestimmten Ansätzen wurde 100 ng/ml α-GalCer zugegeben. Mit den kultivierten und aufgereinigten iNKT-Zellen wurde analog dazu verfahren: Die benötigte Menge iNKT-Zellen wurde in ein 15 ml Falcon überführt und zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet dann in 400 µl iNKT-Medium aufgenommen und resuspendiert. Es wurde anschließend eine Verdünnungsreihe angesetzt und die 96-Well-Platte wurde dann für 16 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Nach 16 Stunden wurden die Inhalte der einzelnen Wells in Rundbodenröhrchen überführt, mit 500 µl FACS-Puffer aufgefüllt und für 5 Minuten bei 450 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte die Zugabe des *FCR Blocking Reagents*, eine Inkubation für 5 Minuten bei 4 °C und anschließende Antikörperfärbung mit 7-Aminoactinomycin (7-AAD), PBS57-CD1d Tetramer (PE) und *Latex beads*. Die Antikörperfärbung erfolgte für 20 Minuten bei 4 °C. Im Anschluss wurden die Zellen ohne einen erneuten Waschschrift im Durchflusszytometer gemessen.

Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo. Dabei wurde zunächst auf Einzelzellen *gated*, gefolgt von einem Lymphozyten-*Gate*, um die *beads*

auszuschließen. Um nur die Tumorzellen und nicht fälschlicherweise die iNKT-Zellen hinsichtlich ihrer Viabilität zu beurteilen, wurde die Analyse der Viabilität danach auf CD1d-PBS57-Tetramer-negative Zellen bezogen. Diese Zellen wurden dann anhand von 7-AAD in viable und nicht viable Zellen unterteilt. Die Berechnung der spezifischen Lyse erfolgte mittels der Formel: Prozent spezifische Lyse = $(1 - (\text{Zielzell-Viabilität mit Effektorzellen} / \text{Zielzell-Viabilität ohne Effektorzellen})) \times 100$.

Im Anschluss erfolgte die statistische Auswertung mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism.

3.4.5.2 Primäre Leukämiezellen

Primäre therapienaive Patientenleukämiezellen wurden, wie zuvor beschrieben, bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, in PBS überführt und bei 450 g für 5 Minuten zentrifugiert. Die aufgetauten Zellen wurden dann gezählt und konnten bei Blastenanteilen von >90 % im peripheren Blut der Patienten zum Zeitpunkt der Tumorzellentnahme analog zu den Tumorzelllinien direkt in gewünschter Anzahl verwendet werden.

Bei Blastenanteilen von <90 % in einer Probe CD34⁺ Tumorzellen wurde diese mittels CD34⁺ magnetischer Zellseparation (MACS) aufgereinigt. Dazu wurde das CD34 *MicroBead UltraPure Kit* von Miltenyi Biotec verwendet. Gemäß den Herstellerangaben wurden für bis zu 1×10^8 Zellen 100 µl *FCR Blocking Reagent*, gefolgt von 100 µl *CD34 UltraPure-Beads* zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubationszeit bei 4 °C wurde die Färbereaktion durch die Zugabe von MACS-Puffer abgestoppt, die Probe wurde bei 450 g für 5 Minuten zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes schlussendlich in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen. Die Separation selbst wurde mit Hilfe des QuadroMACS-Magnets und der LS Säule wie in Kapitel 3.4.4 beschrieben durchgeführt. Im Anschluss an die Aufreinigung wurde erneut der Anteil der Blasten in der Probe durchflusszytometrisch bestimmt und bei ausreichender Reinheit (>90 %) wie in Kapitel 3.4.5.1 beschrieben weiter verfahren.

3.4.5.3 CD1d-blockierender Antikörper

In einigen Versuchen wurde zusätzlich der Effekt eines CD1d-blockierenden Antikörpers (LEAF™ Purified anti-human CD1d Antibody, Clone 51.1, BioLegend) untersucht. Hierzu wurden wie oben beschrieben drei Ansätze (jeweils eine Verdünnungsreihe sowie eine Kontrolle mit Tumorzellen alleine) pipettiert, von denen der erste als Kontrolle ohne jegliche Antikörperzusätze fungierte, dem zweiten der CD1d-blockierende Antikörper in der Konzentration 10 µg/ml zugegeben wurde und der dritte als Isotyp-Kontrolle (LEAF™ Purified Mouse IgG2b, Kappa Isotype Ctrl Antibody, BioLegend) in derselben Konzentration diente. Für jeden Ansatz wurde eine Titration durchgeführt und bei bestimmten Ansätzen wurden 100 ng/ml α-GalCer zugegeben. Zur Kontrolle der Viabilität der Zielzellen wurde eine nur Tumorzellen enthaltende Probe mit beurteilt. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte wie oben beschrieben nach 16 Stunden.

3.4.6 Bestimmung von Oberflächenmarkern auf Tumorzellen

Zur Bestimmung der Expression bestimmter Oberflächenmarker auf Tumorzelllinien und primären Tumorzellen wurden diese mit den in Tabelle 15 dargestellten Antikörpern gefärbt. Außerdem wurde eine APC Isotypkontrolle verwendet. Kompensationskontrollen und *Fluorescence Minus One* (FMO) Kontrollen wurden in diesem Experiment zur Kompensation sowie zum korrekten *Gating* verwendet.

Für die Bestimmung des Immunphänotyps im Detail (CD33, CD34, CD117, HLA-DR, MPO) wurde auf die durchflusszytometrischen Daten des FACS-Labors des Universitätsklinikums Tübingen, Abteilung Innere Medizin II, zurückgegriffen. Diese Daten wurden mithilfe eines BD FACS Caliburs gewonnen. Die Angaben zu FLT3- und NPM1-Mutationen stammen aus der klinikinternen Datenbank des Universitätsklinikum Tübingen.

3.4.7 Zytozentrifugenpräparat und May-Grünwald-Giemsa-Färbung

Für die Zytozentrifugenpräparate wurden jeweils 100 000 Zellen einer Leukämiezelllinie oder primären Leukämie in 500 µl PBS aufgenommen. In der Zytozentrifuge wurden die Proben dann für 4 Minuten mit 55 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben für 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

An Tag 1 erfolgte die May-Grünwald-Giemsa-Färbung. Der Sörensenpuffer wurde wie in Tabelle 16 beschrieben angesetzt.

Dann wurden die Proben nach 10-minütiger Fixierung in Methanol ebenfalls 10 Minuten mit der May-Grünwald-Lösung (25 ml May-Grünwald, 25 ml Sörensenpuffer) gefärbt und im Anschluss 20 Minuten mit der Giemsa-Lösung (5 ml Giemsa, 45 ml Sörensenpuffer) gefärbt. Dann wurden die Proben mit Wasser abgewaschen, für 3-4 Minuten in eine Sörensenpuffer-Kammer gelegt und dann über Nacht trocknen gelassen. An Tag 2 wurde ein Tropfen Euparal-Einschlussmittel für die Mikroskopie auf die Proben gegeben, diese mit einem Deckglas abgedeckt und mit einem Nikon Eclipse TS100 Mikroskop (x40 Objektiv) betrachtet. Für die Aufnahmen wurde eine Nikon Digital Sight Kamera mit NIS Elements Software mit einer Auflösung von 1280 x 960 Pixeln verwendet.

3.4.8 CD107a Degranulationsassay

Zur Durchführung des CD107a Degranulationsassays wurde ein APC anti-human CD107a (LAMP-1) Antikörper verwendet. Expandierte und aufgereinigte iNKT-Zellen wurden im Verhältnis 2,5:1 mit verschiedenen Zielzellen für 16 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ koinkubiert. Als Zielzellen dienten eine CD1d-positive Zelllinie (Jurkat) sowie eine CD1d-negative Zelllinie (K562). In einen Ansatz mit iNKT-Zellen und CD1d-positiven Zielzellen wurde der CD1d-blockierende Antikörper in der Zielkonzentration 10 µg/ml gegeben. Außerdem wurde zur Erfassung der *Baseline*-CD107a-Expression ein Ansatz mit iNKT-Zellen ohne Zielzellen eingeschlossen. Allen Ansätzen wurde zu Beginn der 16-stündigen Inkubationszeit ein CD107a-Antikörper (APC, Zielkonzentration 1:100) sowie der *Protein Transport Inhibitor Cocktail* (Zielkonzentration 2 µg/ml) zugegeben. Der vollständige Färbecocktail für den CD107a Assay ist in Tabelle 14 dargestellt. Auch diese Versuche wurden in An- und Abwesenheit von 100 ng/ml α-GalCer durchgeführt.

3.4.9 Zytokinmessungen

Zur Messung verschiedener Zytokine in den Überständen der oben beschriebenen Zytotoxizitätsassays wurde ein Multiplex Assay (LEGENDplex™ Human CD8/NK Panel, 13-plex) verwendet. Expandierte, aufgereinigte iNKT-Zellen ohne Zielzellen,

Zielzellen in iNKT-Medium, sowie iNKT-Zellen und Zielzellen wurden im Verhältnis 5:1 mit einem CD1d-blockierenden Antikörper (Zielkonzentration 10 µg/ml), ohne CD1d-blockierenden Antikörper, sowie mit der entsprechenden Isotypkontrolle derselben Konzentration in einer 96-Well-Platte angesetzt. Den Ansätzen wurden 100 ng/ml α -GalCer zugegeben. Die Ansätze wurden für 16 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bei 450 g für 5 Minuten zentrifugiert, und dann je 100 µl Überstand abgenommen. Diese Überstände wurden bei -20 °C aufbewahrt und dann gemäß Herstellerangaben im Multiplex Assay eingesetzt. Die durchflusszytometrische Analyse wurde an einem BD FACSAria™ III durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der LEGENDplex™ Software von BioLegend.

3.5 Statistische Auswertung der Daten

Zur Auswertung der Durchflusszytometrie-Daten wurde die Software FlowJo verwendet. Die statistische Analyse der erhobenen Daten wurde mit Hilfe der Software GraphPad Prism durchgeführt. Die Daten der Zytokinmessungen wurden mit der LegendPlex Software von BioLegend analysiert und ausgewertet. Alle Experimente wurden aufgrund der limitierten Probenverfügbarkeit primärer Zellen in Duplikaten angesetzt, wobei die erhöhte Fehleranfälligkeit dieser Messungen zu beachten ist, und mindestens zweimal biologisch unabhängig durchgeführt. Um eine Aussage über die statistische Signifikanz treffen zu können, wurde zunächst die Verteilung der jeweiligen Stichprobe bestimmt. Als Test auf Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet. Zur statistischen Auswertung wurden der Student t-Test und die einfache ANOVA verwendet: Lag ein einfacher Vergleich zweier Gruppen (z.B. +/- iNKT-Zellen) vor, so wurde ein Student t-Test verwendet. Bei Vorliegen multipler Vergleiche (*multiple comparisons*) wurde eine einfache ANOVA verwendet. Die in den Abbildungen gezeigten Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (*standard deviation*, SD), wenn die Streuung der Messwerte gezeigt werden soll. Soll die Genauigkeit der Mittelwerte dargestellt werden, so ist der Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) als statistisches Maß gezeigt. $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

Weite Teile der im Ergebnisteil präsentierten Daten sind bereits in der Fachzeitschrift *Frontiers in Immunology* (2019) veröffentlicht [118]. Es sei deshalb im gesamten folgenden Abschnitt auf diese Publikation verwiesen.

4.1 Patientencharakteristika

Unter den 88 durchflusszytometrisch analysierten DLIs fanden sich DLIs von 68 verschiedenen Spendern, von denen 63 in die weiteren Analysen eingingen (5 DLIs wurden aufgrund mangelhafter Probenqualität ausgeschlossen). Von den 63 Patienten mit passender DLI-Probe erhielten dann 44 Patienten tatsächlich auch DLIs (Abbildung 3).

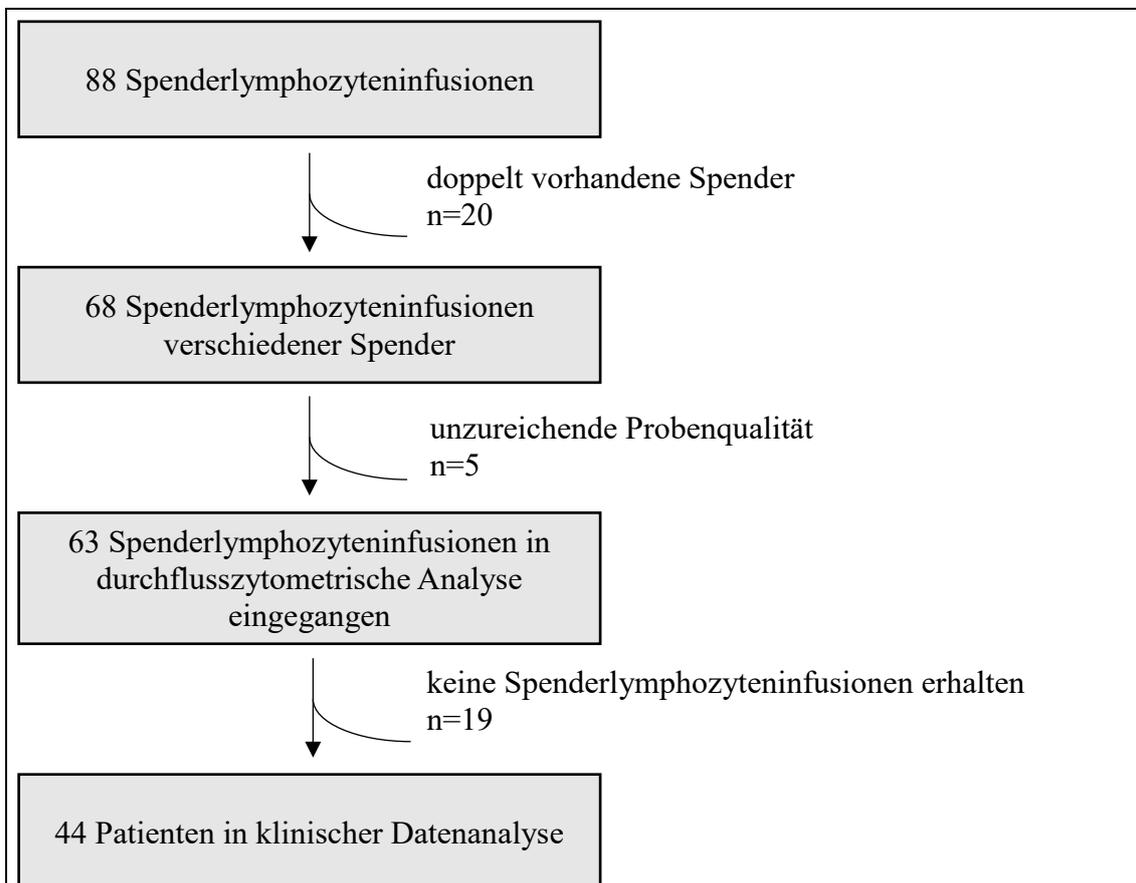


Abbildung 3: Probenfluss der DLIs.

Von ursprünglich 88 Spenderlymphozyteninfusionen gingen 63 Proben in die durchflusszytometrische Analyse und 44 Proben- bzw. Patientendaten in die klinische Datenanalyse ein.

Die Charakteristika der Patienten und Spender sind in Tabelle 18 dargestellt. Hervorzuheben ist dabei, dass der Großteil der Patienten eine AML als hämatologische Grunderkrankung aufwies (25 von 44 Patienten, 57 %). Außerdem wird anhand des *disease risk index* deutlich, dass es sich um ein Mittel- bis Hochrisikokollektiv handelte (38 Patienten in den Risikogruppen *intermediate*, *high* oder *very high*, entspricht 92,7 %). 82 % der Patienten befanden sich vor der allo-SZT in der aktiven Erkrankung, während nur 18 % in kompletter Remission transplantiert wurden.

Tabelle 18: Patienten- und Spendercharakteristika

Diese im Rahmen der Dissertation gewonnenen Daten sind in die Publikation von Schneidawind et al. eingeflossen [119].

Patienten insgesamt n=	44
Empfängeralter (Jahre, Median, Range)	56 (27-71)
Spenderalter (Jahre, Median, Range)	32 (17-70)
Geschlecht Empfänger (Anzahl, %)	
- weiblich	21 (52)
- männlich	23 (48)
Geschlecht Spender (Anzahl, %) Daten von n=43 Spendern verfügbar	
- weiblich	14 (33)
- männlich	29 (67)
Erkrankung (Anzahl, %)	
- AML	25 (57)
- ALL	1 (2)
- MDS	10 (23)
- MPN	4 (9)
- MM	2 (4,5)
- NHL	2 (4,5)
Disease risk index (Anzahl, %) n=41	
- <i>Low</i>	3 (7)
- <i>Intermediate</i>	15 (37)
- <i>High</i>	21 (51)
- <i>Very high</i>	2 (5)
HCT-CI (Anzahl, %)	
- 0	23 (52)
- 1	10 (23)
- 2	4 (9)
- ≥ 3	7 (16)
Krankheitsstatus vor SZT (Anzahl, %)	
- Komplette Remission	8 (18)
- Aktive Erkrankung	36 (82)

CMV Status (Anzahl, %)	
- <i>Match</i>	32 (73)
- <i>Mismatch</i>	12 (27)
CMV Reaktivierung (Anzahl, %)	
- Ja	15 (34)
- Nein	29 (66)
Konditionierungsregime (Anzahl, %)	
- Flu / Mel	6 (14)
- Flu / Bu	14 (32)
- FLAMSA-RIC	15 (34)
- Bu / Cy	5 (11)
- TBI / Cy	1 (2)
- Andere	3 (7)
Spender (Anzahl, %)	
- MMRD	1 (2)
- MRD	27 (61,5)
- MUD	7 (16)
- MMUD	9 (20,5)

4.2 Rezidiv und Krankheitsprogress stellen die Hauptindikation für DLIs dar

Zu den häufigsten Indikationen der DLI-Gabe zählten in absteigender Reihenfolge Rezidiv/ Krankheitsprogress mit 59,1 %, gemischter Chimärismus mit 18,2 %, minimale Resterkrankung (MRD) mit 6,8 %, prophylaktisch im Rahmen der FLAMSA-Studie mit 9,1 %, Transplantatversagen mit 4,5 % sowie in einem Fall EBV-spezifische DLIs mit 2,3 % (Abbildung 4).

Tabelle 19 zeigt die Transplantations- und DLI-Charakteristika der Kohorte. Dabei fällt ins Auge, dass nur 8 von 44 Patienten vor DLI-Gabe einen kompletten Spenderchimärismus im peripheren Blut aufwiesen, während der Großteil (82 %) einen gemischten Chimärismus zeigte (Abbildung 4).

Tabelle 19: Transplantations- und DLI-Charakteristika

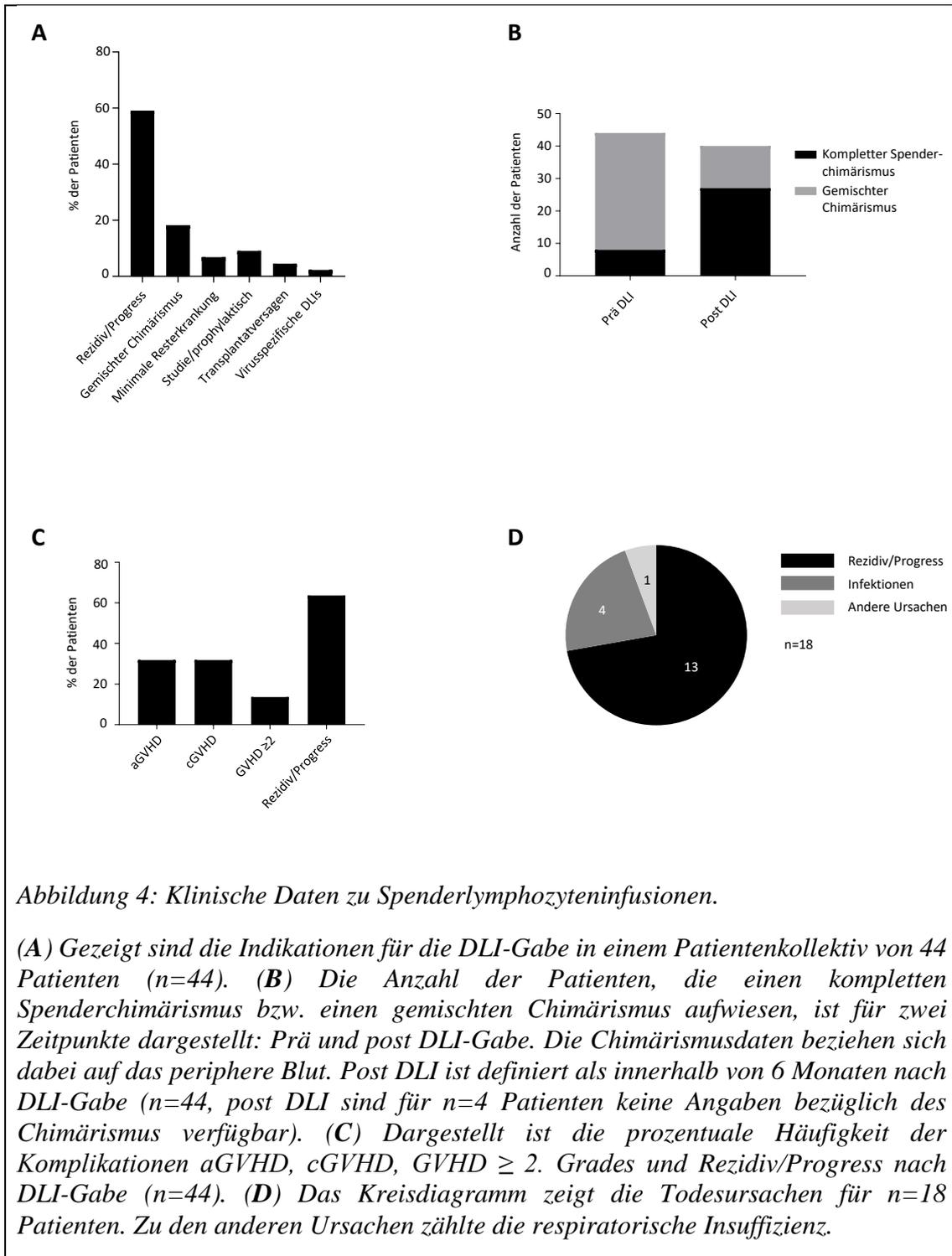
Diese im Rahmen der Dissertation gewonnenen Daten sind in die Publikation von Schneidawind et al. eingeflossen [119].

Patienten insgesamt n=	44
Indikation für DLIs (Anzahl, %)	
- Rezidiv/Progress	26 (59,1)
- gemischter Chimärismus	8 (18,2)
- MRD	3 (6,8)
- prophylaktisch	4 (9,1)
- Transplantatversagen	2 (4,5)
- EBV-spezifische DLIs	1 (2,3)
G-CSF-Stimulation	
- stimuliert	16
- unstimuliert	28
Zeitdauer von SZT zur DLI (Tage, Median, Range)	189,5 (75-6177)
Kumulative Dosis CD3 ⁺ n=40 (x10 ⁶ /kg Median, Range)	16,1 (0,8-280)
Karnofsky-Index zum Zeitpunkt der ersten DLI (Anzahl, %)	
- 100 %	0
- 90 %	9 (20,5)
- 80 %	24 (54,5)
- <70 %	11 (25)
Chimärismus im peripheren Blut vor DLI (Anzahl, %)	
- kompletter Spenderchimärismus	8 (18)
- gemischter Chimärismus	36 (82)
aGVHD nach DLIs (Anzahl, %)	
- Grad 0	30 (68,2)
- Grad 1	9 (20,4)
- Grad ≥2	5 (11,4)
cGVHD nach DLIs (Anzahl, %)	
- keine	30 (68,2)
- limitiert	13 (29,5)
- extensiv	1 (2,3)
Follow-up Zeitraum (Tage, Median, Range)	258 (27-2041)

4.3 Unzureichende Tumorkontrolle und hohe Inzidenz von akuter und chronischer GVHD sind die Hauptprobleme nach DLI-Gabe

Abbildung 4 zeigt die häufigsten Komplikationen nach DLI-Gabe: Trotz des guten initialen Ansprechens auf DLIs stellte ein Rezidiv das größte Problem nach DLI-Gabe dar (63,6 %), noch deutlich vor aGVHD (31,8 %) und cGVHD (31,8 %) oder GVHD \geq 2. Grades (13,6 %), die eine häufige dosislimitierende Toxizität nach allo-SZT und DLI-Gabe sind.

Dementsprechend fällt auch bei Analyse der Haupttodesursachen nach DLI auf, dass in unserem Patientenkollektiv Rezidiv und Krankheitsprogress gemeinsam die häufigste Todesursache darstellten (13 von 18 Fällen, 72,2 %). Die zweithäufigste Todesursache in unserem Kollektiv waren Infektionen mit 22,2 % (4 aus 18 Fällen, CMV-Pneumonien und ARDS) und andere Gründe (5,6 %, 1 aus 18 Fällen). Kein Patient starb an aGVHD oder cGVHD. Dies ist ebenfalls in Abbildung 4 dargestellt.



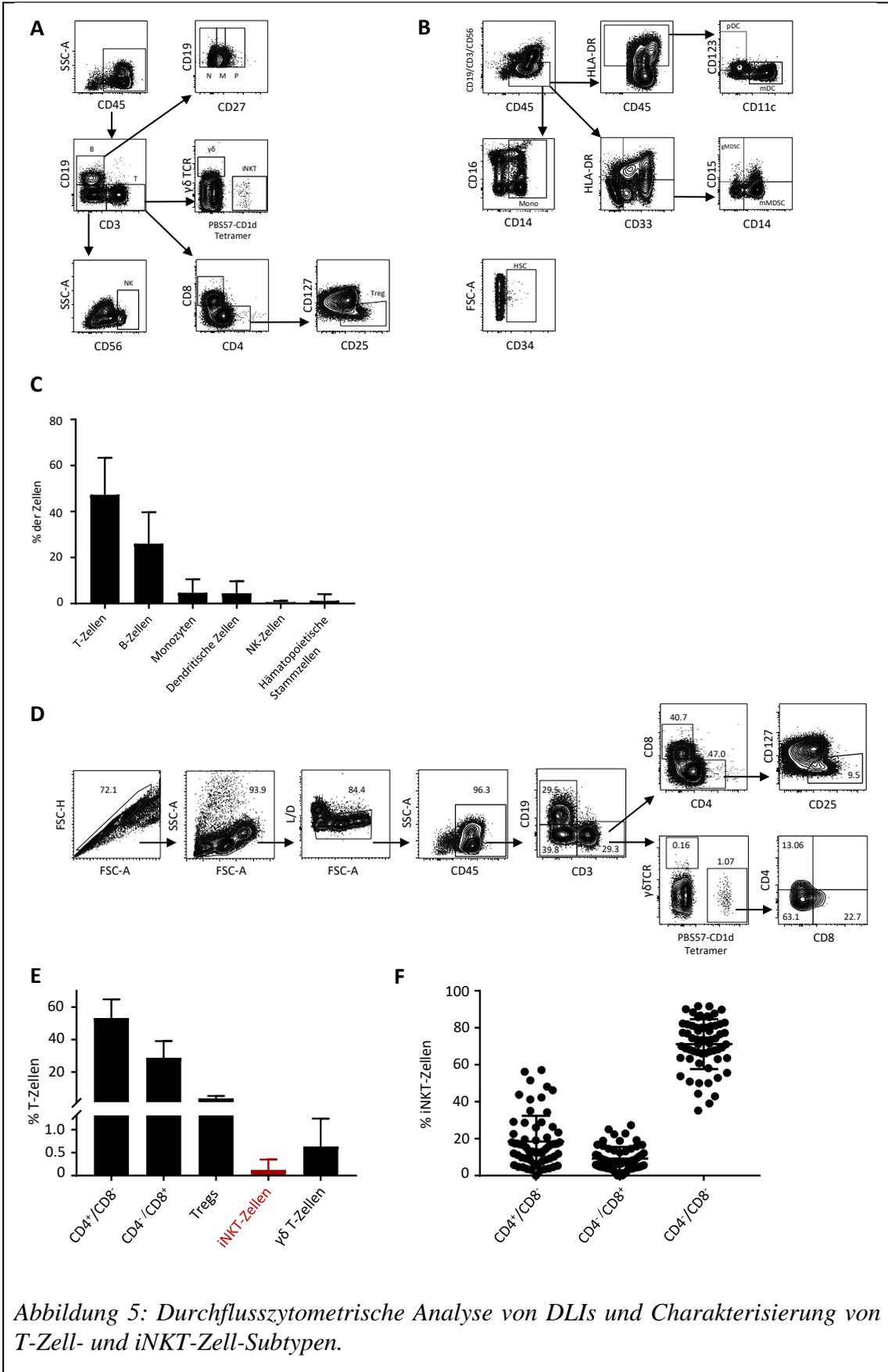
4.4 DLIs sind ein heterogenes Zellprodukt mit einer zellulären Zusammensetzung ähnlich der humanen PBMCs gesunder Spender

DLIs sind ein heterogenes Zellprodukt, deren exakte Zusammensetzung im klinischen Alltag nicht routinemäßig kontrolliert wird. Die Heterogenität ist bedingt durch den Immunstatus des Spenders, Infekte, Alter und viele weitere Faktoren und lässt sich so schwer standardisieren und kontrollieren. Um genauere Aussagen über die zelluläre Zusammensetzung von DLIs treffen zu können, erfolgte hier deren durchflusszytometrische Analyse. Die Etablierung zweier Mehrfarbenpanels und der *Gating*-Strategie ist in Abbildung 5 gezeigt. Bei der durchflusszytometrischen Analyse der DLIs wird deutlich, dass T-Zellen mit 47,3 % der lebenden Zellen (SD 16,4 %, *Range* 8,8-73,3 %) die größte Fraktion in DLIs stellten, gefolgt von B-Zellen (26,1 %, SD 13,7 %, *Range* 1,5-70,3 %), Monozyten (4,7 %, SD 5,9 %, *Range* 0,02-24 %), DCs (4,5 %, SD 5,2 %, *Range* 0,08-21,8 %), NK-Zellen (0,7 %, SD 0,5 %, *Range* 0,001-2,5 %) und hämatopoietischen Stammzellen (1,2 %, SD 2,9 %, *Range* 0,03-21,3 %) (Abbildung 5).

4.5 DLIs enthalten eine geringe Anzahl an größtenteils CD4⁻/CD8⁻ iNKT-Zellen

Ein besonderer Fokus wurde nun auf die T-Zell-Subpopulationen gelegt, wofür die in Abbildung 5 gezeigte *Gating*-Strategie verwendet wurde. In Abbildung 5 ist zu erkennen, dass neben CD4⁺/CD8⁻ (53,3 %, SD 11,5 %, *Range* 26,2-82,9 %), CD4⁻/CD8⁺ T-Zellen (28,8 %, SD 10,2 %, *Range* 2,9-52,3 %), Tregs (3,7 %, SD 1,6 %, *Range* 1-7,7 %) und $\gamma\delta$ T-Zellen (0,6 %, SD 0,6 %, *Range* 0,006-2,6 %) auch iNKT-Zellen mit einem Mittel von 0,12 % der T-Zellen (SD 0,2 %, *Range* 0,002-1,3 %) in DLIs zu finden waren.

Die genauere Charakterisierung der iNKT-Zellen, gezeigt in Abbildung 5, ergab, dass diese größtenteils doppeltnegativ für CD4 und CD8 waren (DN iNKT-Zellen, 71,1 %, SD 13,4 %, *Range* 35,2-91,7 %), gefolgt von CD4⁺/CD8⁻ iNKT-Zellen (18,4 %, SD 14,1 %, *Range* 0-57,1 %) und CD4⁻/CD8⁺ iNKT-Zellen (9,1 %, SD 6,3 %, *Range* 0-27,3 %).



(A) Die Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Analyse von DLIs ist anhand einer repräsentativen DLI-Probe dargestellt. Im hier dargestellten Panel 1 wurden die Hauptpopulationen humaner PBMCs und ihre Subtypen analysiert (B=B-Zellen (10,4 %) mit N=naive B-Zellen (82,3 %), M=B-Gedächtnis-Zellen (17,3 %) und P=Plasmazellen (1,4 %); T=T-Zellen (45,2 %) mit $CD4^+/CD8^-$ (49,7 %), $CD4^+/CD8^+$ (29,7 %) und Treg=regulatorische T-Zellen (10,4 %), $\gamma\delta=\gamma\delta$ -T-Zellen (1,3 %), iNKT=iNKT-Zellen (0,14 %); NK=natürliche Killer-Zellen (5,4 %). Kompensationskontrollen wurden vor der Messung der DLI-Proben eingemessen und dementsprechend kompensiert. Das Pregating aus Einzelzellen, Leukozyten und lebenden Zellen wurde in allen Panels verwendet und ist im Detail in (D) dargestellt. n=63. (B) Panel 2 diente zur durchflusszytometrischen Analyse von dendritischen Zellen (DCs, pDC=plasmazytoide DCs (4,9 %), mDC=myeloische DCs (78,4 %), Monozyten (Mono, 40,1 %), myeloischen Suppressorzellen (gMDSCs=granulozytische myeloid-derived suppressor cells (0,3 %), mMDSCs=monozytische myeloid-derived suppressor cells (73,7 %)) und hämatopoietischen Stammzellen (HSC, 0,18 %). n=63. Das in (D) gezeigte Pregating wurde hier ebenfalls verwendet. (C) zeigt die zelluläre Zusammensetzung von DLIs. Die Fehlerbalken entsprechen SD, n=63. In (D) ist die Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Analyse der T-Zell-Subpopulationen ($CD4^+/CD8^-$, $CD4^+/CD8^+$ T-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen und iNKT-Zellen) sowie zur Analyse von $CD4^+/CD8^-$, $CD4^+/CD8^+$, und $CD4^+/CD8^-$ iNKT-Zellen anhand einer repräsentativen DLI-Probe dargestellt. Außerdem ist das Pregating aus Einzelzellen, Leukozyten und lebenden Zellen gezeigt. n=63. Abbildung (E) zeigt die Häufigkeit der einzelnen T-Zell-Subpopulationen als Prozent der T-Zellen in humanen DLIs. Mittelwert und SD sind dargestellt, n=63. In Abbildung (F) ist die Subcharakterisierung der iNKT-Zellen in $CD4^+/CD8^-$, $CD4^+/CD8^+$, und $CD4^+/CD8^-$ deskriptiv dargestellt. In den Punktwolken sind Einzelwerte, Mittelwert und SD für n=63 DLIs gezeigt.

Diese Daten sind teilweise bereits von Jahnke et al. veröffentlicht [118].

4.6 Robuste Expansion von DLI-iNKTs durch zweiwöchige *ex vivo* Kultivierung mit Glykolipid-beladenen und bestrahlten *Feeder*-Zellen

Aufgrund der geringen Anzahl von iNKT-Zellen in DLIs müssen diese vor dem Einsatz in Experimenten und späterer klinischer Anwendung zunächst expandiert werden. Dies geschah mittels des in Abbildung 6A dargestellten zweiwöchigen Expansionsprotokolls.

Mittels Durchflusszytometrie ließ sich der Expansionsfortschritt bei Beginn der Expansion an Tag 0, an Tag 7 sowie Tag 14 beobachten (Abbildung 6B). Eine durchschnittliche 281-fache Expansion (*Range* 71,4-696,6) wurde dabei erreicht. Die expandierten iNKT-Zellen erreichten an Tag 14 eine mittlere Reinheit von 19,5 % (SD 8,4 %, *Range* 4,6-29 %) und konnten mittels MACS auf >95 % aufgereinigt werden (Abbildung 6C). So konnten die DLI-iNKTs dann in ausreichender Zahl und Reinheit für weitere Versuche eingesetzt werden. *Ex vivo* expandierte iNKT-Zellen aus DLIs werden als DLI-iNKTs bezeichnet.

4.7 Präferenzielle Expansion von CD4⁺/CD8⁻ iNKT-Zellen aus DLIs

α -GalCer ist ein aus dem Meeresschwamm *Agelas mauritanicus* gewonnenes Glykolipid und einer der stärksten bekannten Liganden von iNKT-Zellen. Durch die zweiwöchige Kultivierung und Expansion von DLI-iNKTs mit α -GalCer und IL-2 wurden effiziente Expansionsraten (281,4-fach) erreicht (Abbildung 6D). Dabei beobachteten wir eine präferenzielle Expansion von CD4⁺/CD8⁻ iNKT-Zellen (969-fach) im Vergleich zur 297-fachen Expansion von CD4⁻/CD8⁺ und 122-fachen Expansion von CD4⁻/CD8⁻ iNKT-Zellen (n=7).

Die präferenzielle Expansion von CD4⁺/CD8⁻ iNKT Zellen ist in relativen Zellzahlen auch in Abbildung 6E dargestellt und zeigt, dass CD4⁺/CD8⁻ iNKT-Zellen besonders in den ersten 7 Tagen der Kultur stark expandierten, wohingegen während dieser Zeit CD4⁻/CD8⁺ iNKT-Zellen und CD4⁻/CD8⁻ iNKT-Zellen prozentual abnahmen. CD4⁻/CD8⁺ iNKT-Zellen nahmen in relativen Zahlen während der letzten sieben Tage Kulturdauer wieder leicht zu, während der Anteil der CD4⁻/CD8⁻ iNKT-Zellen stetig sank.

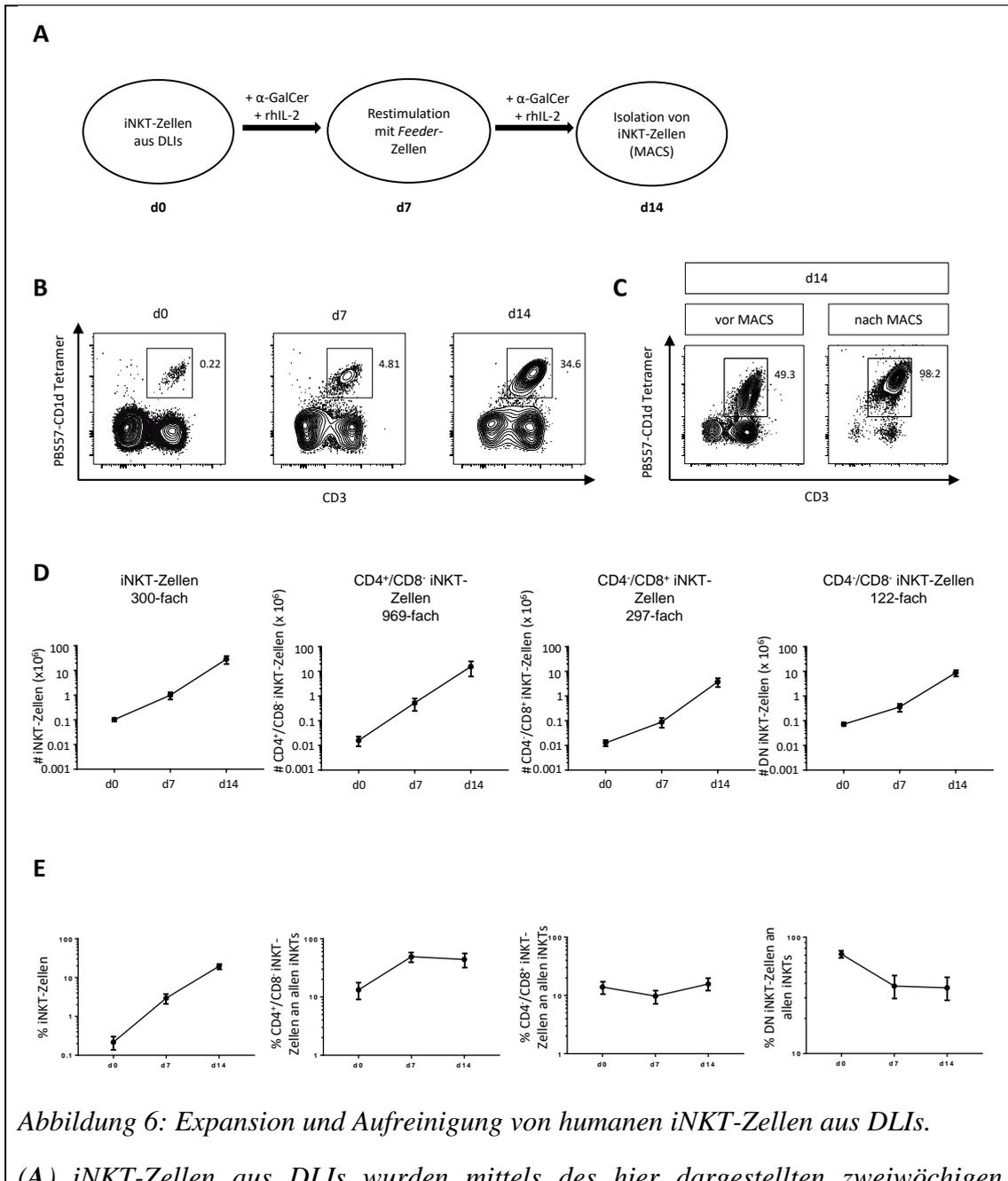


Abbildung 6: Expansion und Aufreinigung von humanen iNKT-Zellen aus DLIs.

(A) iNKT-Zellen aus DLIs wurden mittels des hier dargestellten zweiwöchigen Expansionsprotokolls mit IL-2 und dem Glykolipid α -GalCer expandiert. An Tag 7 der Kultur fand eine allogene Restimulation mit bestrahlten, glykolipid-beladenen Feederzellen statt. An Tag 14 wurden die expandierten DLI-iNKTs mittels MACS aufgereinigt. (B) Die Expansion von DLI-iNKTs wurde durchflusszytometrisch an Tag 0, 7 und 14 überwacht und der Anteil an iNKT-Zellen mittels des PBS57-CD1d Tetramers und CD3 bestimmt. Repräsentative Daten eines von $n=7$ Experimenten sind gezeigt. (C) Die expandierten DLI-iNKTs wurden an Tag 14 der Kultur mittels magnetisch aktiviertem Zellsortieren (MACS) auf $>95\%$ aufgereinigt. Repräsentative Daten eines von $n=7$ Experimenten sind gezeigt. (D) zeigt die DLI-iNKT-Zell-Expansion für die gesamte iNKT-Zell-Population sowie $CD4^+/CD8^-$, $CD4^+/CD8^+$ und $CD4^-/CD8^-$ Subpopulationen in absoluten Zellzahlen ($\times 10^6$). $n=7$, Fehlerbalken entsprechen SEM. Abbildung (E) zeigt die DLI-iNKT-Zell-Expansion in relativen

Zellzahlen (%). Der Anteil der $CD4^+/CD8^-$, $CD4^+/CD8^+$ und $CD4^-/CD8^+$ Subpopulationen an der gesamten iNKT-Zell-Population änderte sich im Verlauf der zweiwöchigen Kultivierung. $n=7$, Fehlerbalken entsprechen SEM. d0, d7 und d14 entspricht Tag 0, 7 und 14.

Diese Daten sind teilweise bereits von Jahnke et al. veröffentlicht [118].

4.8 DLI-iNKTs lysieren Jurkatzellen dosisabhängig

Um Aussagen über die Anti-Tumor-Aktivität von DLI-iNKT-Zellen treffen zu können, wurden die expandierten und aufgereinigten iNKT-Zellen in einem *ex vivo* Tumorkontroll-Modell gegen Leukämiezelllinien getestet. Hierfür wurden DLI-iNKTs und Jurkatzellen in steigenden Effektor:Zielzell-Ratios inkubiert und anschließend die Viabilität der Leukämiezellen mittels Durchflusszytometrie beurteilt. Die *Gating*-Strategie zum Ausschluss von DLI-iNKTs ist in Anhang 2 dargestellt.

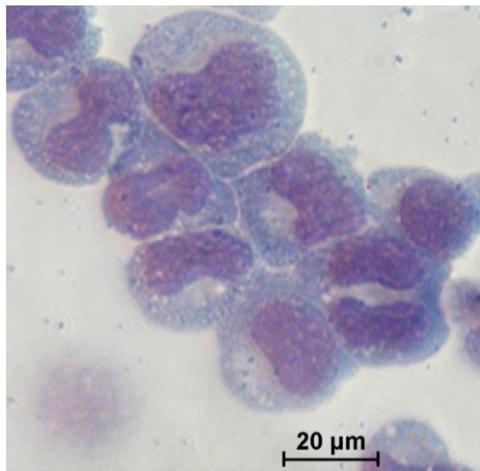


Abbildung 7: Die akute T-Zell-Leukämiezelllinie Jurkat.

Vor dem Einsatz im *ex vivo* Tumorkontroll-Modell wurden Zytozentrifugenpräparate der Leukämiezelllinie Jurkat zur zytologischen Beurteilung der malignen Zellen angefertigt. Die Färbung erfolgte mithilfe der May-Grünwald-Giemsa-Färbung. Anhand der Zytozentrifugenpräparate wird exemplarisch die Morphologie der Tumorzelllinie Jurkat vor der Lyse durch DLI-iNKTs ersichtlich.

Nach Koinkubation von DLI-iNKTs mit der akuten T-Zell-Leukämiezelllinie Jurkat konnten wir eine Lyse von Jurkatzellen beobachten: Bei Zugabe von DLI-iNKTs zu den Leukämiezellen beobachteten wir eine abnehmende Viabilität der Leukämiezellen (Abbildung 8A). Diese DLI-iNKT-vermittelte Lyse von Leukämiezellen war zudem dosisabhängig (Abbildung 8B). Die dosisabhängige Lyse von Jurkatzellen war nach Hinzugabe von α -GalCer am stärksten, jedoch konnten auch ohne α -GalCer effiziente Lyseraten beobachtet werden (Anhang 4).

4.9 Die Stimulation mittels G-CSF hat keinen signifikanten Einfluss auf Anzahl, Subtypen und Funktion von DLI-iNKTs

DLIs können entweder zum Zeitpunkt der Stammzellspende unter G-CSF-Stimulation oder zu einem späteren Zeitpunkt ohne G-CSF-Stimulation durch eine Leukapherese gewonnen werden. In der Studienkohorte von 63 DLIs waren 26 DLIs G-CSF-stimuliert und 35 nicht G-CSF-stimuliert. Für zwei Spender waren keine Daten vorhanden. Der Anteil von iNKT-Zellen an humanen PBMCs an Tag 0 war durch die G-CSF-Stimulation nicht signifikant verändert (Anhang 3A). Des Weiteren ließ sich keine Veränderung im Vorkommen der iNKT-Zell-Subtypen, also $CD4^+/CD8^-$, $CD4^-/CD8^+$ und $CD4^-/CD8^-$ iNKT-Zellen, beobachten (Anhang 3B). Die Expansion von DLI-iNKTs war ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich (Anhang 3C). Um Aussagen über die Funktion von G-CSF-stimulierten und unstimulierten DLI-iNKTs treffen zu können, wurde die lytische Kapazität bei einer Effektor:Zielzell-Ratio von 5:1 herangezogen: Hier zeigte sich kein Unterschied zwischen der G-CSF-stimulierten und unstimulierten Gruppe. Diese Ergebnisse sind in Anhang 3D gezeigt.

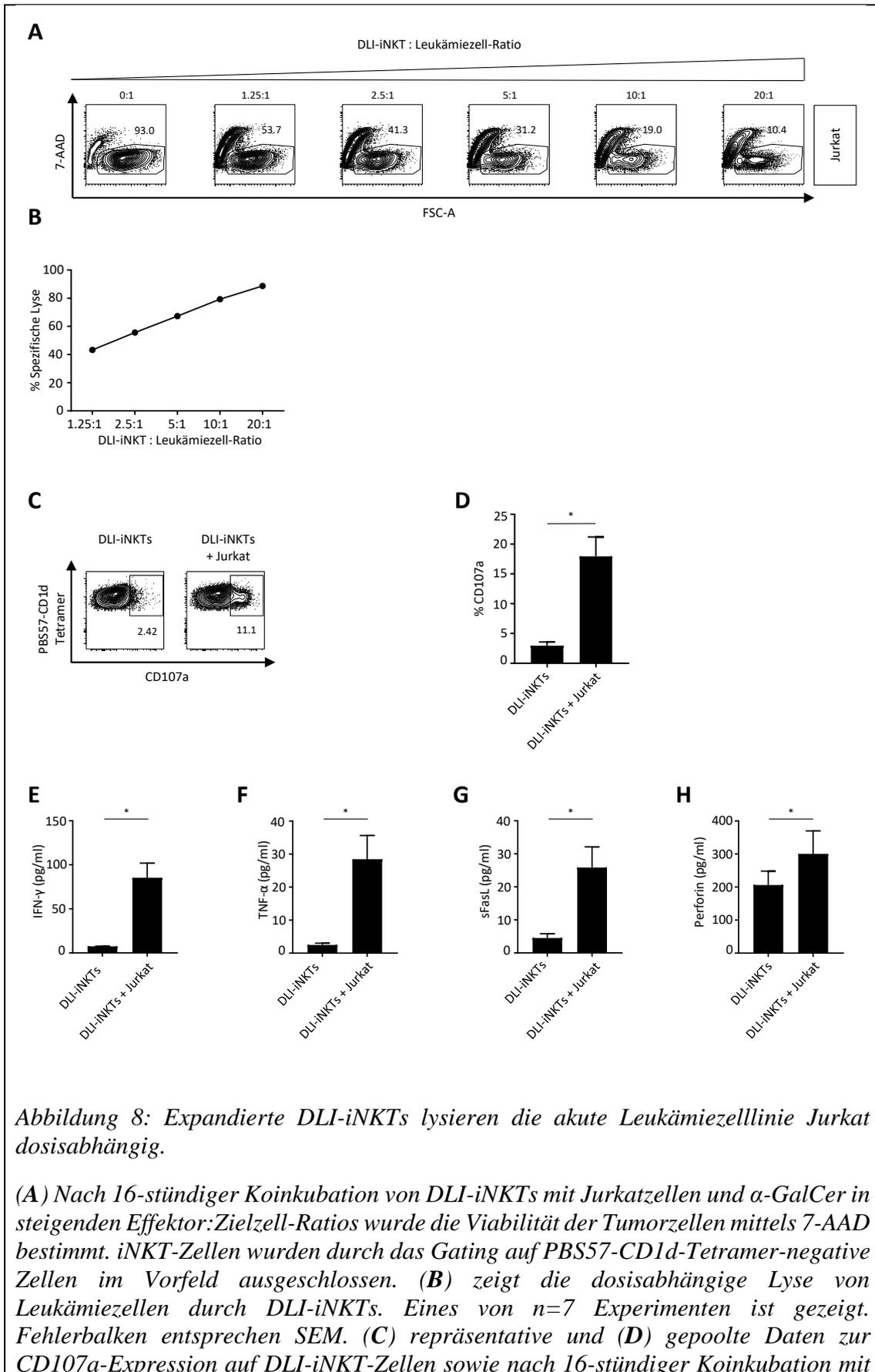
4.10 DLI-iNKTs degranulieren nach Koinkubation mit Jurkatzellen

Die repräsentativen Daten der Durchflusszytometrie zeigten, dass die Degranulation von DLI-iNKTs nach Koinkubation mit Jurkat-Zellen im Vergleich zu iNKT-Zellen alleine signifikant erhöht war (Abbildung 8C, D). Die Degranulation war in Anwesenheit von α -GalCer am stärksten ausgeprägt, fand aber auch ohne α -GalCer in geringerem Ausmaß statt (Anhang 4).

Außerdem wurde analysiert, ob es Unterschiede in der Degranulation der verschiedenen iNKT-Zell-Subtypen gab. Sowohl CD4⁺/CD8⁻, als auch CD4⁻/CD8⁺ und CD4⁻/CD8⁻ iNKT-Zellen degranulierten nach Koinkubation mit Jurkat, wobei die Degranulation der CD4⁻/CD8⁺ und CD4⁻/CD8⁻ iNKT-Zellen besonders betont war (Abbildung 9). Die Zugabe von α -GalCer bewirkte in allen drei iNKT-Zell-Subtypen eine Erhöhung der Degranulation (ebenfalls Abbildung 9).

4.11 DLI-iNKTs sezernieren proinflammatorische und zytotoxische Zytokine nach Koinkubation mit Jurkatzellen

Nach Koinkubation von DLI-iNKTs mit Jurkatzellen waren die Konzentrationen von IFN- γ , TNF- α , *soluble Fas* Ligand (sFasL) und Perforin signifikant erhöht im Vergleich zu DLI-iNKTs-Zellen ohne Tumorzellen (Abbildung 8E-H). Die anderen im *LEGENDplex™ Human CD8/NK Panel (13-plex)* enthaltenen Zytokine zeigten keine signifikanten Veränderungen und sind deshalb hier und in Folge nicht aufgeführt.



*Jurkat und α -GalCer. DLI-iNKTs degranulierten nach Koinkubation mit Jurkat. $n=3$, Fehlerbalken entsprechen SEM. Die Messung von IFN- γ (E), TNF- α (F), sFasL (G) und Perforin (H) in den Überständen der Zytotoxizitätsassays nach 16-stündiger Koinkubation von DLI-iNKTs mit Jurkat und α -GalCer zeigt eine erhöhte Zytokinausschüttung nach Koinkubation von DLI-iNKTs mit Jurkat. $n=5$, Fehlerbalken entsprechen SEM. Zur statistischen Auswertung wurde der Student-t-Test verwendet. *: $p<0,05$.*

Diese Daten sind bereits von Jahnke et al. veröffentlicht [118].

4.12 DLI-iNKTs lysieren Tumorzellen in Abhängigkeit von der CD1d-Expression

Die Leukämiezelllinien Jurkat, THP-1 und K562 wurden mit DLI-iNKTs koinkubiert. In Abbildung 10A ist zu sehen, dass es deutliche Unterschiede in der Lyse durch DLI-iNKTs gab: Jurkatzellen wurden deutlich effizienter lysiert als zum Beispiel THP-1 oder K562, bei denen nur eine geringe Lyse zu beobachten war. Besonders deutlich wurde dies zum Beispiel bei einer 1:1 *Ratio* von DLI-iNKTs zu Leukämiezellen: K562 zeigte hier kaum eine Lyse, während diese bei Jurkat über 60 % betrug.

Aufgrund der Beobachtung, dass iNKT-Zellen einige Leukämiezelllinien deutlich effizienter lysieren konnten als andere, wurden diese Unterschiede genauer untersucht. Es ist bekannt, dass iNKT-Zellen von mit ihnen interagierenden Zellen wie antigenpräsentierenden Zellen und Tumorzellen Glykolipide über das MHC-Klasse-I ähnliche Molekül CD1d präsentiert bekommen. Da somit die Hauptinteraktion von iNKT-Zellen und anderen Zellen über CD1d stattfindet, analysierten wir zunächst durchflusszytometrisch die CD1d-Expression auf verschiedenen Tumorzelllinien (Abbildung 10B). Dabei beobachteten wir die geringste CD1d-Expression auf K562, während THP-1 bereits mehr CD1d exprimierte. Die Leukämiezelllinie Jurkat exprimierte dahingegen in großem Ausmaß CD1d. Interessanterweise zeigte sich hier also ein Zusammenhang zwischen der mittleren CD1d-Expression und der Lyse durch DLI-iNKTs. Die CD1d-*high* Leukämiezelllinie Jurkat wurde deutlich effizienter durch DLI-iNKTs lysiert als die CD1d-*low* Zelllinie K562.

4.13 CD1d-Blockade führt zu verminderter Tumorzellyse und Degranulation von DLI-iNKTs

Für uns war deshalb von Interesse, ob sich die Aktivierung und Degranulation von DLI-iNKTs sowie die subsequente Lyse der CD1d-positiven Zelllinie Jurkat dementsprechend

auch durch einen CD1d-blockierenden Antikörper unterbinden ließ. Abbildung 10C zeigt die durchflusszytometrische Bestimmung der Viabilität der CD1d⁺ Leukämiezelllinie Jurkat bei steigenden Dosen von DLI-iNKT- zu Jurkatzellen. Im Vergleich zur Isotypkontrolle ist erkennbar, dass eine Blockade von CD1d zu einer signifikant geringeren Lyse von Jurkatzellen führte. Dieser Effekt ist auch im Spezifischen-Lyse-Diagramm in Abbildung 10D dargestellt. In Abwesenheit von α -GalCer ließ sich ebenfalls eine Tendenz zur Verminderung der Tumorzellyse durch den Anti-CD1d-Antikörper erkennen, allerdings war dieser Effekt hier nicht signifikant (Anhang 5).

Die Degranulation von DLI-iNKTs im CD107a Assay war bei Hinzugabe des Anti-CD1d-Antikörpers signifikant vermindert im Vergleich zur entsprechenden Isotypkontrolle (Abbildung 10E, F). Dieser Effekt konnte auch in Abwesenheit von α -GalCer beobachtet werden, wenn auch in geringerer Ausprägung (Anhang 5).

Die Konzentrationen von IFN- γ (Abbildung 10G), TNF- α (H), sFasL (I) und Perforin (J) waren mit Anti-CD1d-Antikörper ebenfalls vermindert verglichen mit der Isotypkontrolle.

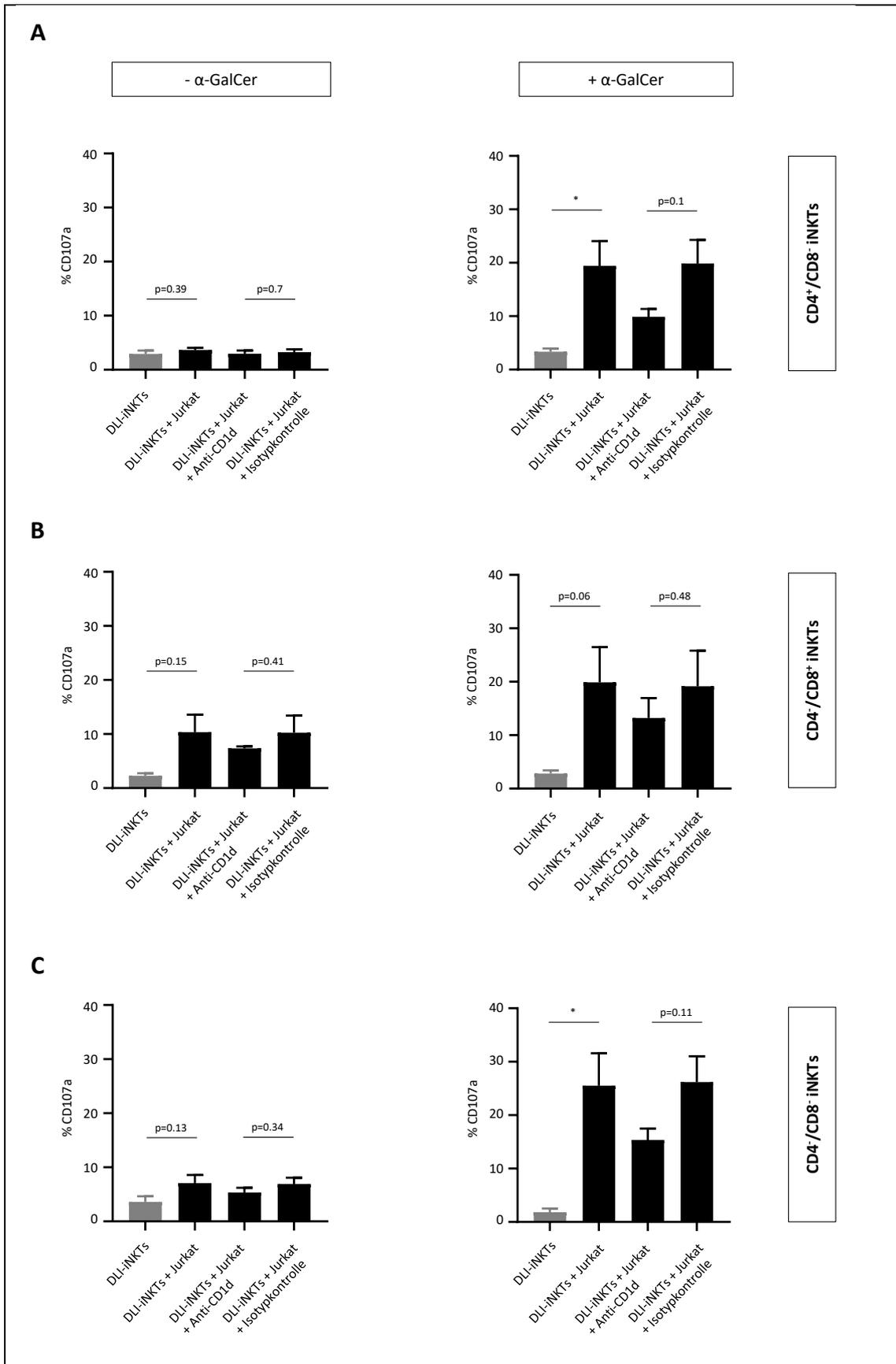


Abbildung 9: Expression von CD107a auf DLI-iNKT-Subtypen.

Die Abbildung zeigt die Expression von CD107a in % auf (A) CD4⁺/CD8⁻, (B) CD4⁻/CD8⁺ und (C) CD4⁻/CD8⁻ DLI-iNKTs nach 16-stündiger Koinkubation mit Jurkat mit dem Anti-CD1d-Antikörper und der entsprechenden Isotypkontrolle in An- und Abwesenheit von α -GalCer bei einer Effektor:Zielzell-Ratio von 2,5:1. iNKT-Zellen wurden mithilfe des PBS57-CD1d Tetramers identifiziert und mittels CD4 und CD8-Antikörpern weiter in CD4⁺/CD8⁻, CD4⁻/CD8⁺ und CD4⁻/CD8⁻ iNKT-Zellen unterteilt. n=3, Fehlerbalken entsprechen SEM. Zur statistischen Auswertung wurde der Student-t-Test verwendet. *: p<0,05.

Diese Daten sind bereits von Jahnke et al. veröffentlicht [118].

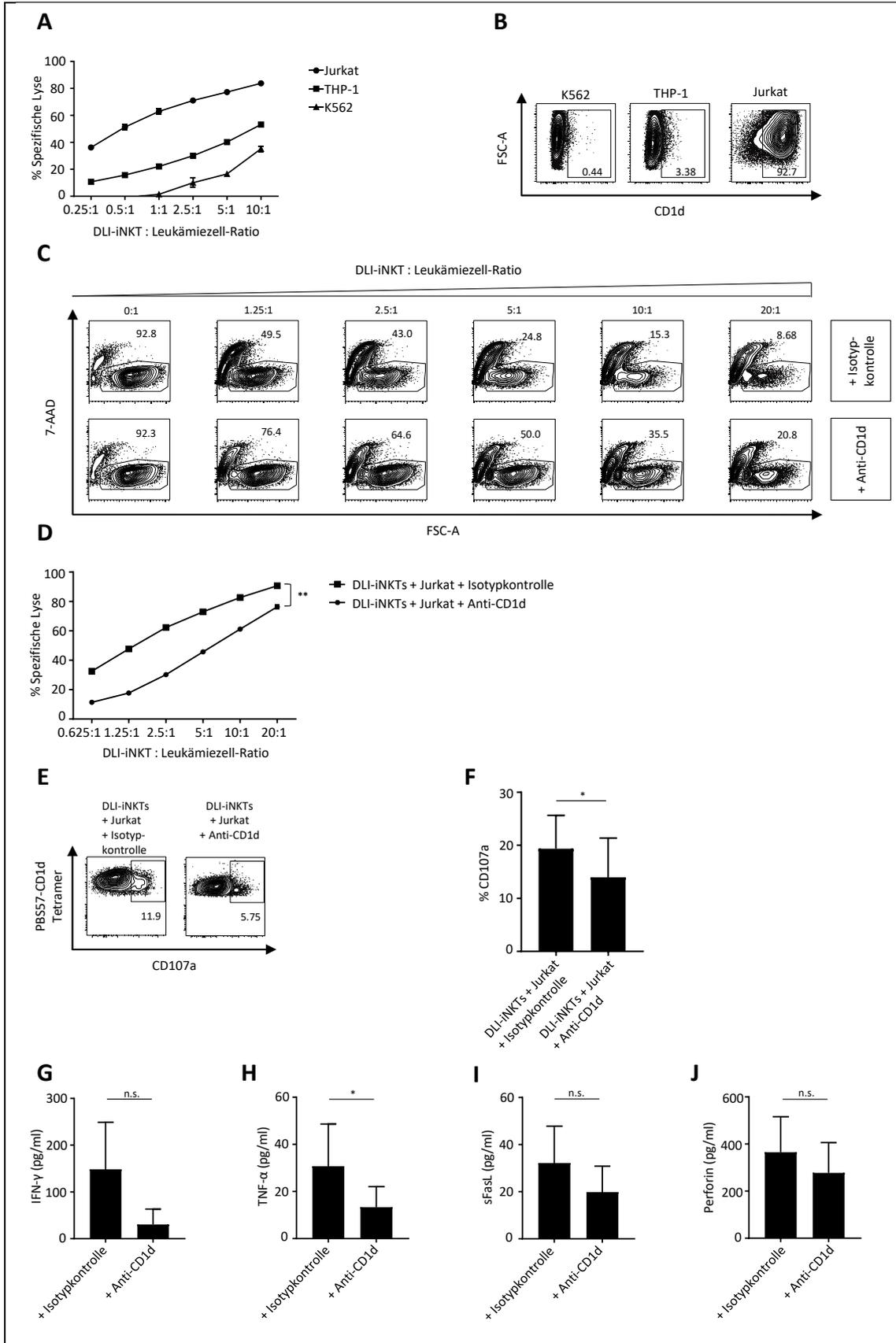


Abbildung 10: Die Leukämiezelllyse lässt sich durch Blockierung von CD1d herabsetzen.

(A) Die Leukämiezelllinien Jurkat, THP-1 und K562 wurden nach 16-stündiger Koinkubation mit DLI-iNKTs und α -GalCer per Durchflusszytometrie hinsichtlich ihrer Viabilität beurteilt. Bei steigenden Effektor:Zielzell-Ratios wurde die DLI-iNKT-vermittelte Tumorzelllyse effizienter und es waren Unterschiede in der Wirksamkeit zwischen den verschiedenen Leukämiezelllinien zu beobachten. Repräsentative Daten sind gezeigt, $n=2$. Die Fehlerbalken stellen SEM dar. (B) Die CD1d-Expression auf den Leukämiezelllinien Jurkat, THP-1 und K562 wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. (C) zeigt die Inhibition der dosisabhängigen Lyse von Jurkat durch DLI-iNKTs bei Einsatz eines blockierenden Anti-CD1d-Antikörpers im Vergleich zur entsprechenden Isotypkontrolle in Anwesenheit von α -GalCer. Dies ist repräsentativ auch im Lysediagramm in Abbildung (D) dargestellt. $n=3$, Fehlerbalken bedeuten SEM. Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA verwendet. (E) Repräsentative Daten und (F) gepoolte Daten zeigen die CD107a-Expression auf CD3⁺PBS57-CD1dTetramer⁺ DLI-iNKTs nach Stimulation mit Jurkat in An- und Abwesenheit des Anti-CD1d-Antikörpers in Anwesenheit von α -GalCer. $n=3$, Fehlerbalken bedeuten SEM. IFN- γ (G), TNF- α (H), sFasL (I) und Perforin (J) wurden nach 16-stündiger Koinkubation von DLI-iNKTs mit Jurkat bei einer Effektor:Zielzell-Ratio von 5:1 in Anwesenheit des Anti-CD1d-Antikörpers bzw. der entsprechenden Isotypkontrolle und α -GalCer in den Überständen der Zytotoxizitätsassays gemessen. $n=5$, Fehlerbalken entsprechen SEM. Zur statistischen Auswertung von (F)-(J) wurde der Student-t-Test verwendet. *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, n.s.= nicht signifikant.

Diese Daten sind bereits von Jahnke et al. veröffentlicht [118].

4.14 DLI-iNKTs lysieren primäre Leukämiezellen CD1d- und dosisabhängig

Von besonderer Relevanz für eine spätere klinische Anwendung ist nun, ob sich die in Tumorzelllinien gewonnenen Ergebnisse auch auf primäre Tumorzellen übertragen lassen. Um dies zu testen, verwendeten wir therapienaive, d.h. nicht vorbehandelte, Leukämiezellen (AML-Blasten) von Patienten, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme einen Blastenanteil von mindestens 90 % im peripheren Blut aufwiesen (siehe auch Anhang 7).

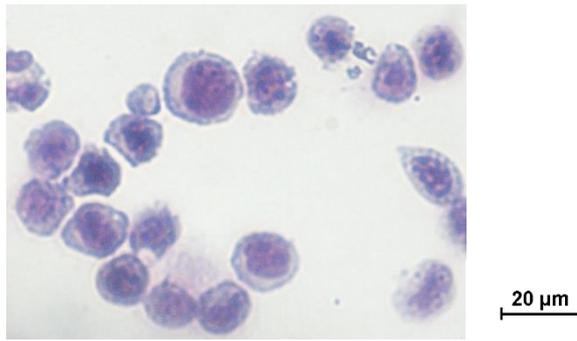


Abbildung 11: Primäre AML-Blasten.

Vor dem Einsatz im ex vivo Tumorkontroll-Modell wurden Zytozentrifugenpräparate der verwendeten primären AML-Blasten zur zytologischen Beurteilung der malignen Zellen angefertigt. Die Färbung erfolgte mithilfe der May-Grünwald-Giemsa-Färbung. Anhand der Zytozentrifugenpräparate wird exemplarisch die Morphologie der primären Tumorzellen ersichtlich. Gezeigt ist eines von insgesamt zehn angefertigten Zytozentrifugenpräparaten verschiedener primärer AML-Blasten. Es handelt sich beim vorliegenden Präparat um eine AML mit rekurrenten genetischen Abnormalitäten ($t(11;22)$, Rearrangement $11q23.3$ ($KMT2A$ bzw. MLL)). Die vorliegenden AML-Blasten wurden vor Beginn einer zytoreduktiven Therapie mit anschließender allo-SZT gewonnen.

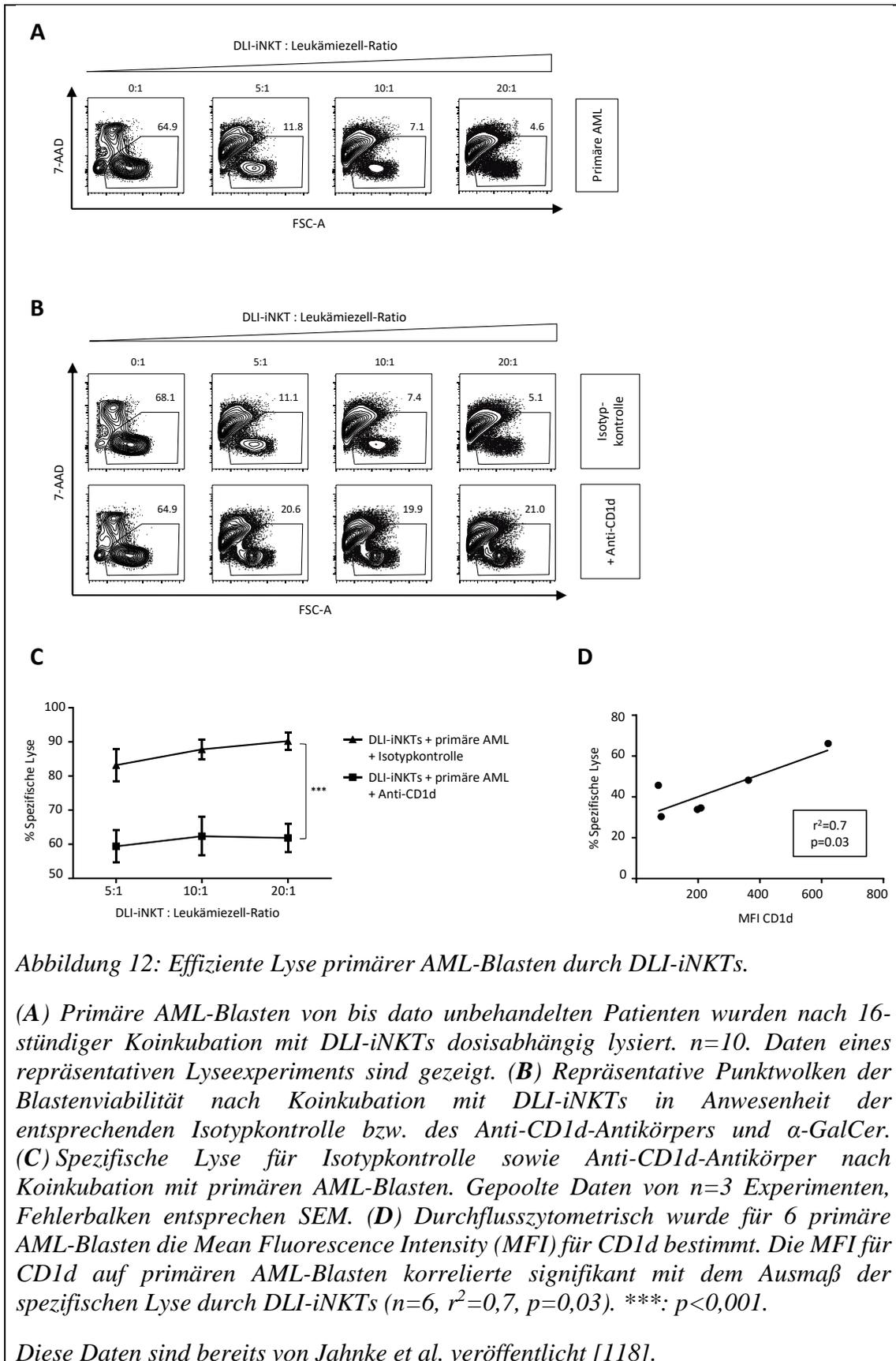
DLI-iNKTs waren in der Lage, primäre AML-Blasten effizient dosisabhängig zu lysieren (Abbildung 12A).

Bei Hinzugabe des Anti-CD1d-Antikörpers trat wiederum eine signifikante Blockade der dosisabhängigen Lyse im Vergleich zur entsprechenden Isotypkontrolle auf (Abbildung 12B, C). Vergleichbare Effekte wurden auch in Abwesenheit von α -GalCer erzielt (Anhang 6).

CD1d scheint also eine zentrale Rolle in der DLI-iNKT-vermittelten Tumorzellyse einzunehmen. Um zu prüfen, ob die CD1d-Expression und Rezeptordichte direkt mit der spezifischen Lyse korreliert, bestimmten wir durchflusszytometrisch die *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) für CD1d und korrelierten diese beiden Parameter.

In Abbildung 12D ist dargestellt, dass die MFI für CD1d deutlich positiv mit der spezifischen Lyse primärer AMLs korrelierte ($r^2=0,71$, $p=0,03$).

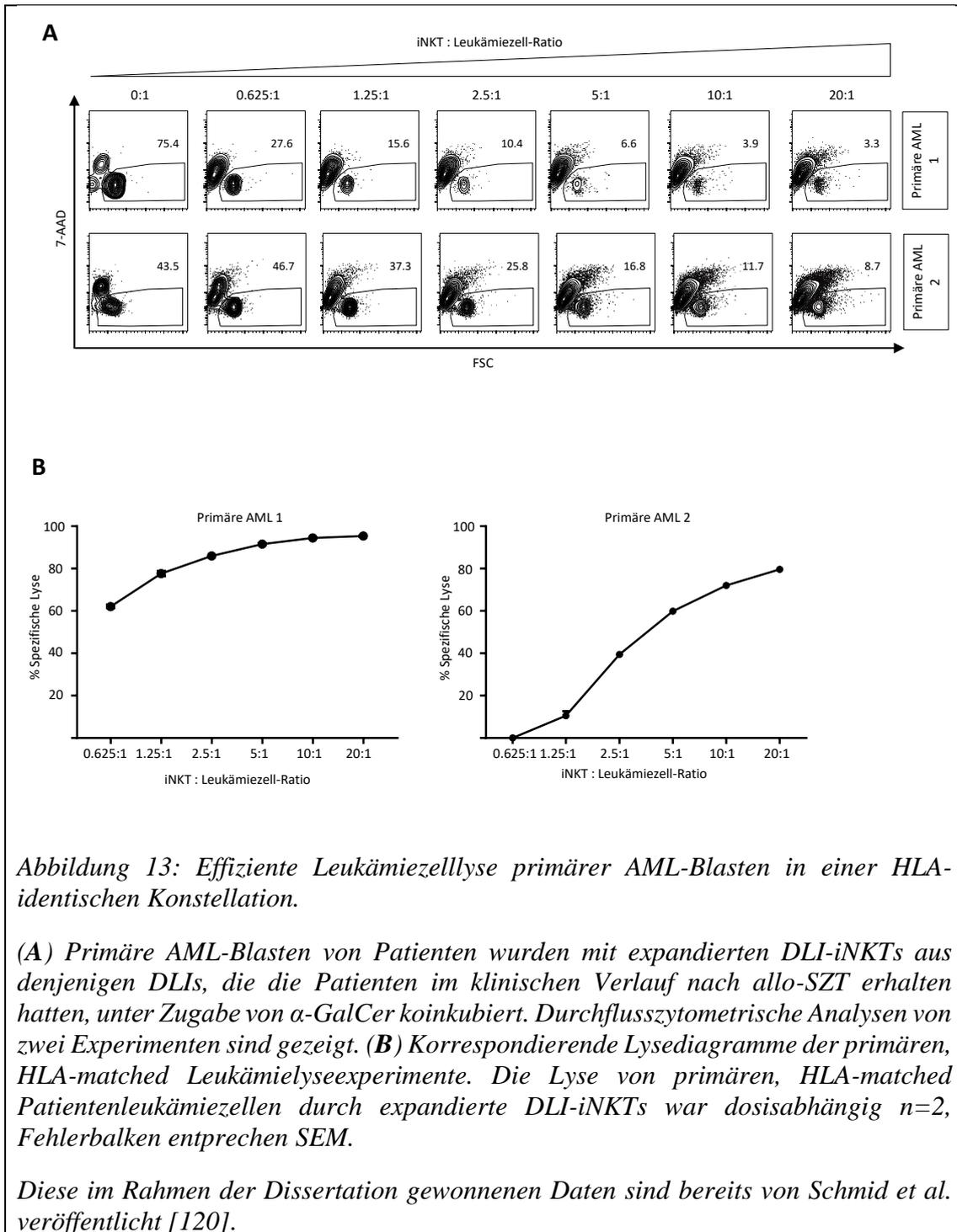
Zusätzliche Informationen zum Immunphänotyp der primären AML-Blasten sind in Anhang 7 dargestellt.



4.15 Die dosisabhängige Lyse primärer Leukämiezellen ist auch in einem HLA-identischen Setting wirkungsvoll

Bisher konnten wir zeigen, dass eine effiziente Dosis- und CD1d-abhängige Lyse von Tumorzelllinien und primären Leukämiezellen eines zum Spender nicht HLA-identischen Patienten (*unmatched donor*) durch DLI-iNKTs stattfindet.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen haben wir im Folgenden untersucht, ob eine effiziente Tumorzellyse auch in einem HLA-identischen Setting zu beobachten ist. Hierfür haben wir primäre therapienaive Leukämiezellen (AML) zweier Patienten, die DLIs von einem in 10/10 HLA-Merkmalen übereinstimmenden Spender bei Rezidiv nach allogener Blutstammzelltransplantation erhielten, mit expandierten und aufgereinigten DLI-iNKT-Zellen aus eben diesen DLIs koinkubiert und konnten dabei eine dosisabhängige, effiziente Tumorzellyse durch DLI-iNKTs beobachten (Abbildung 13).



5 Diskussion

Seit von Hans-Jochem Kolb und Kollegen in den 1990er Jahren erstmals gezeigt wurde, dass DLIs in Patienten mit CML ohne eine Chemo- oder Radiotherapie andauernde Remissionen induzieren können [19, 121], wurde das Forschungsinteresse an DLIs und ihren tumorkontrollierenden Eigenschaften geweckt. Heutzutage sind die Indikationen für DLIs vielfältig und ihr Einsatz ist nicht mehr nur auf CML beschränkt (Leitlinie DAG-KBT: Prävention und Behandlung von Rezidiven nach allogener Stammzelltransplantation, Version 1, Stand Juni 2018). In dem in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv zählten Krankheitsprogress und Rezidiv, gemischter Chimärismus, minimale Resterkrankung, prophylaktische DLI-Gabe und drohendes Transplantatversagen in absteigender Reihenfolge zu den häufigsten Indikationen. Durch die Ausübung starker GVL-Effekte sind DLIs dazu in der Lage, gemischten Chimärismus in vollständigen Spenderchimärismus zu konvertieren [122] und so die Rezidivwahrscheinlichkeit zu senken. Somit stellen DLIs heute eine anerkannte Therapiemöglichkeit bei Rezidiven hämatologischer Tumore nach allo-SZT dar (Leitlinie DAG-KBT: Prävention und Behandlung von Rezidiven nach allogener Stammzelltransplantation, Version 1, Stand Juni 2018). Der klinische Nutzen von DLIs ist in diesem Kontext für akute und chronische lymphoide und myeloische Leukämien, für multiple Myelome sowie einige Lymphome bekannt. Die Sensitivität für DLIs hängt dabei stark von der Tumorentität ab: Eine hohe Sensitivität besteht bei CML, Myelofibrose und niedrig malignen Lymphomen, während AML, MDS, MM und Hodgkin-Lymphom eine mittlere und ALL sowie DLBCL nur eine geringe Sensitivität aufweisen [123]. Man spricht von prophylaktischer DLI-Gabe, wenn diese in Abwesenheit jeglicher Hinweise auf ein Rezidiv oder einen Krankheitsprogress verabreicht werden. Präemptiv bedeutet, dass im Falle einer minimalen Resterkrankungen oder eines gemischten Chimärismus ohne manifestes klinisches Rezidiv DLIs verabreicht werden. Eine therapeutische DLI-Gabe erfolgt bei klinischem oder molekularem Rezidiv. AML-Patienten, die nach allo-SZT präemptive DLIs erhalten, erleiden dabei in mehr als der Hälfte der Fälle kein Rezidiv innerhalb eines Follow-up-Zeitraumes von über 5 Jahren und zeigen ein signifikant besseres Überleben im Vergleich zu denjenigen Patienten, die keine DLIs erhalten [124]. Im Falle einer prophylaktischen DLI-Gabe kann das Gesamtüberleben von Patienten sieben Jahre nach allo-SZT mit 67 %

ebenfalls signifikant höher sein als in der Kontrollgruppe, die keine prophylaktischen DLIs erhält (31 % 7-Jahres-Überleben) [125].

Auch in einigen soliden Tumoren wie dem Nierenzellkarzinom kann eine allo-SZT mit darauffolgender DLI-Gabe bei Rezidiv als Therapieversuch eingesetzt werden [126, 127], jedoch ist die Studienlage hierzu nicht überzeugend. Das wachsende Verständnis der GVL-Effekte, mithilfe derer residuelle oder rekurrente Tumorzellen von Spenderlymphozyten eliminiert werden können, hat außerdem den klinischen Einsatz intensitätsreduzierter Konditionierungsregimes (RIC) gefördert. Dank der geringeren Toxizitäten und somit verminderten *non-relapse*-Mortalität bei erhaltenen GVL-Effekten kommt eine allo-SZT in Kombination mit DLIs nun auch als Therapieoption für ältere Patienten in Frage [122, 128, 129].

Der Nutzen von DLIs und deren GVL-Effekten wird jedoch begrenzt durch das Auftreten von GVHD. Oft ist deshalb keine weitere Dosissteigerung und somit keine Ausnutzung des vollen Potenzials der GVL-Effekte möglich. Auch in unserer Studienpopulation gehörten aGVHD und cGVHD zu den häufigsten Problemen nach DLI-Gabe. Da aGVHD und cGVHD führende Gründe für *non-relapse*-Morbidität und Mortalität nach allo-SZT darstellen [14], ist das Management von GVHD von großer Relevanz. Diesbezüglich erscheint die kleine Population der iNKT-Zellen von Interesse: Eine große Anzahl von iNKT-Zellen in peripheren Stammzelltransplantaten geht mit einer reduzierten Inzidenz von aGVHD einher [115], während die frühe posttransplantionale iNKT-Zell-Erholung das Risiko einer aGVHD senkt und sogar das Gesamtüberleben verbessert [116]. Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass iNKT-Zellen darüber hinaus sogar in einem DLI-ähnlichem Setting, nämlich bei adoptiven Transfer, effektiv eine letale GVHD in einem murinen allo-SZT-Modell verhindern [113]. Somit stellen sie einen vielversprechenden Ansatz in der Kontrolle von GVHD und Promotion benefizieller GVL-Effekte nach allo-SZT dar [113]. Besonders hervorzuheben ist in diesem Kontext, dass ihre immuntoleranzinduzierende und somit GVHD-supprimierende Wirkung nicht mit einem Verlust der Anti-Tumor-Aktivität assoziiert ist. Aus Studien mit Tregs weiß man dagegen, dass die GVHD-Suppression teilweise mit einem Verlust der Anti-Tumor-Immunität einhergeht [130-132]. Für iNKT-Zellen konnte im Kontrast hierzu sogar gezeigt werden, dass die iNKT-Zell-Infusionen selbst starke tumorkontrollierende Effekte ausüben [85]. In dieser Arbeit wurde darüber hinaus gezeigt, dass expandierte

iNKT Zellen aus DLIs eine dosisabhängige Lyse von leukämischen Blasten bewirken [118].

Im Kontext der DLIs existieren jedoch noch viele Herausforderungen und Probleme: Zu den Haupttodesursachen nach DLI-Gabe zählen in unserem Patientenkollektiv Krankheitsprogress- und Rezidiv sowie Infektionen. Auch an anderen Transplantationszentren stellen Rezidiv und Krankheitsprogress die Haupttodesursache nach allo-SZT und DLI-Gabe dar [133-135]. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf die zelluläre Zusammensetzung und die Rolle der in den DLIs enthaltenen iNKT-Zellen (DLI-iNKTs) für die Tumorkontrolle nach allo-SZT gelegt.

Über die zelluläre Zusammensetzung von DLIs ist wenig bekannt und kontrolliert. Im klinischen Alltag wird eine bestimmte Anzahl an $CD3^+$ T-Zellen festgelegt, die pro Kilogramm Körpergewicht des Patienten in den DLIs enthalten sein sollen (Leitlinie DAG-KBT: Prävention und Behandlung von Rezidiven nach allogener Stammzelltransplantation, Version 1, Stand Juni 2018). Dabei kann die zelluläre Zusammensetzung der DLIs von vielen Faktoren, wie dem Spenderalter, dem allgemeinen Gesundheitsstatus und Komorbiditäten, beeinflusst werden. Wie sich auch in den Ergebnissen dieser Arbeit widerspiegelt, besteht dabei eine große zelluläre Heterogenität: Verschiedenste Zellpopulationen sind in unterschiedlichen Häufigkeiten vertreten.

Zusammengefasst ähnelte die zelluläre Zusammensetzung von DLIs also derjenigen von humanen PBMCs gesunder erwachsener Spender, mit einer Ausnahme: Das Vorkommen von hämatopoietischen $CD34^+$ Stammzellen, welche im peripheren Blut adulter Spender in der Regel nur in sehr geringen Mengen vertreten sind, war erhöht, begründet in der teils stattgehabten G-CSF-Stimulation der DLI-Spender. Bei Gewinnung der DLIs zum selben Zeitpunkt wie die Stammzellen für eine periphere Stammzellspende erhielten die Spender davor fünf Tage lang G-CSF. Dies führte zu einer Mobilisation der $CD34^+$ Stammzellen aus dem Knochenmark und somit zu einer Zunahme der $CD34^+$ Zellen im peripheren Blut [119].

Die Analyse der T-Zell-Subpopulationen dieser Patientenkohorte enthüllte, dass iNKT-Zellen in DLIs vorkommen, jedoch in einer geringen Anzahl (Mittelwert 0,124 % der T-Zellen, SD 0,22 %). Interessanterweise waren die meisten iNKT-Zellen in DLIs

doppelnegativ für die Marker CD4 und CD8. Den CD8⁺ und doppelnegativen iNKT-Zellen wird ein Th1-basiertes Zytokinmuster nachgesagt, d.h. sie produzieren vor allem zytotoxische Zytokine wie IFN- γ und TNF- α [73]. Damit spielen sie eine Rolle in der Lyse von Virus- und Tumorzellen. Im Gegensatz dazu produzieren CD4⁺ iNKT-Zellen vor allem Th2-Zytokine wie IL-4 [72] und sind in der Immuntoleranz von Bedeutung.

Besondere Relevanz wird der zellulären Zusammensetzung von DLIs aber zugeschrieben, weil sie potenziell manipulierbar ist: Durch eine Veränderung der zellulären Zusammensetzung ließen sich die Eigenschaften verschiedener Zellpopulationen zur Verbesserung von GVL-Effekten und Verhinderung von GVHD optimal ausnutzen. Immunzytotherapeutische Ansätze verfolgen beispielsweise das Ziel, mit Hilfe des adoptiven Transfers von Tregs oder deren *in vivo* Expansion durch Administration von Zytokinen GVHD zu verhindern [136-140]. Analog dazu wurde hier das Ziel verfolgt, iNKT-Zellen aus DLIs zu expandieren und so durch eine zelluläre Manipulation der DLIs eine verbesserte GVL ohne eine Zunahme von GVHD zu bewirken.

Da iNKT-Zellen im peripheren Blut und in DLIs nur eine geringe Anzahl erreichen, ist eine Expansion und Anreicherung vor ihrem Einsatz in experimentellen Fragestellungen und klinischen Anwendungen unbedingt notwendig. Das von uns verwendete *ex vivo* Expansionsprotokoll mit IL-2 und α -GalCer hat den Vorteil, dass es leicht durchführbar, zeitsparend und effizient ist: Es wurden 300-fache Expansionen der absoluten iNKT-Zellzahlen in zwei Wochen erreicht, was die Basis für weitere klinische Anwendungen von DLI-iNKTs darstellt. Interessanterweise veränderte die zweiwöchige Expansion auch die Subtypisierung der DLI-iNKTs: Waren vor der Expansion noch fast alle iNKT-Zellen doppelnegativ für CD4 und CD8, so zeigte sich im Verlauf eine präferenzielle Expansion von CD4⁺/CD8⁻ iNKT-Zellen. Die oben beschriebene klassische Rolle von CD4⁺/CD8⁻ iNKT-Zellen in der Immuntoleranz wird ergänzt durch ihre Fähigkeit, neben Th2-basierten Zytokinmustern auch Th1-Zytokine zu produzieren [72]: So können sie einerseits nach allogener SZT durch die Produktion von IL-4 und IL-13 zur Wiederherstellung der Immuntoleranz beitragen [141, 142], andererseits sind sie durch die Sekretion von zytotoxischen Effektormolekülen jedoch auch dazu in der Lage, Tumorzellen zu lysieren [143, 144]. Wir konnten experimentell bestätigen, dass expandierte iNKT-Zellen die T-Zell-Aktivierung und Proliferation herabsetzen und so

Immuntoleranz induzieren [120]. Gleichzeitig dazu zeigten wir, dass Leukämiezelllinien und primäre Leukämieblasten effektiv lysiert werden [118, 120].

In der Klinik werden verschiedene Strategien zur Expansion von iNKT-Zellen verfolgt [145]: Die *ex vivo* Expansion oder Aktivierung von iNKT-Zellen stellt den ersten Ansatzpunkt zur therapeutischen Anwendung der iNKT-Zell-medierte Tumorsurveillance dar. Auf der einen Seite können iNKT-Zellen *ex vivo* aktiviert werden, was dann zu einer iNKT-Zell-Expansion *in vivo* führt [146]. Auf der anderen Seite können *ex vivo* expandierte iNKT-Zellen, zum Beispiel mit α -GalCer-stimulierten APZ, direkt infundiert werden: In Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren ergaben sich dabei in klinischen Studien Hinweise auf eine gestärkte Anti-Tumor-Kontrolle [147, 148]. Diese Option zur iNKT-Zell-Expansion kommt der in dieser Arbeit verwendeten Expansionsstrategie am nächsten.

Weitere häufig eingesetzte Strategien beinhalten die intravenöse Injektion von α -GalCer und die Infusion von autologen α -GalCer-stimulierten APZ. Die intravenöse Injektion von α -GalCer in Patienten mit soliden Tumoren zeigt sich in einer klinischen Phase-I Studie als sicher und gut tolerabel [149]. Es werden auch erhöhte Level von iNKT-Zell-assoziierten Zytokinen wie TNF- α und GM-CSF und eine Krankheitsstabilisierung in 7 von 24 Patienten (Median 123 Tage) beobachtet. Jedoch tritt nach einer zunächst potenten Stimulation der iNKT-Zellen durch die α -GalCer-Injektion nach einiger Zeit die sogenannte T-Zell-Erschöpfung (engl. *T-cell exhaustion*) und Anergie ein, in der iNKT-Zellen in einen Zustand reduzierter Aktivität übergehen. Dieser kann schon nach einmaliger α -GalCer-Stimulation auftreten und ist im Mausmodell charakterisiert durch einen Proliferationsverlust und verminderte IFN- γ -Produktion [150]. Interessanterweise bleibt die Fähigkeit zur IL-4-Produktion erhalten [150]: Während die Entstehung von Metastasen im B16-Melanommodell durch anerge iNKT-Zellen vielmehr begünstigt als verhindert wird, sind die immuntoleranten Wirkungen, beispielsweise bei der Verhinderung autoimmuner Enzephalomyelitis, unbeeinträchtigt [150]. Die T-Zell-Erschöpfung und Anergie wird vermittelt durch starke TZR-Stimulation bereits aktivierter T-Zellen in der Abwesenheit von kostimulatorischen Signalen. Dies wurde zuerst in CD4⁺ T-Zellen gezeigt, die bei Stimulation des TZR ohne CD28-Kostimulation in einen hyporesponsiven, hypoproliferativen Zustand übergingen [151-153]. Ursprünglich ein wichtiges Werkzeug in der Selbsttoleranz und zur Verhinderung von

Autoreaktivität des Immunsystems, kann die T-Zell-Erschöpfung und Anergie auch Teil der *Tumor-Escape*-Mechanismen sein, mithilfe derer sich Tumorzellen der Erkennung und Elimination durch Immunzellen entziehen. Von besonderem Interesse ist deshalb im Kontext der Tumorkontrolle durch iNKT-Zellen, ob dieser hyporesponsive Zustand reversibel ist: Beverly et al. konnten zeigen, dass die Zugabe von IL-2 zu anergischen T-Zellen eine Proliferationsinduktion und komplette Reversion der Anergie bewirkt [154]. Eine weitere bedeutende Strategie zur Verhinderung von T-Zell-Anergie stellt ein Eingriff in das *Programmed Cell death protein 1/Programmed Cell death protein ligand 1 und 2* (PD-1/PD-L1, -2) System dar: iNKT-Zellen regulieren bei der auf die α -GalCer-Stimulation folgenden Induktion von Anergie rapide und anhaltend PD-1 hoch [155]. Eine Blockade dieses kostimulatorischen Systems durch den Einsatz von PD-1/PD-L1-Inhibitoren zum Zeitpunkt der α -GalCer-Stimulation kann die Induktion der T-Zell-Anergie verhindern. Eine bereits bestehende Anergie kann durch PD-1/PD-L1-Inhibitoren jedoch nicht rückgängig gemacht werden [155]. PD-1/PD-L1-Inhibitoren wie Nivolumab und Atezolizumab sind in der Klinik auch als Checkpoint-Inhibitoren bekannt und werden beispielsweise bei fortgeschrittenen malignen Melanomen klinisch eingesetzt.

Die Infusion von α -GalCer-stimulierten APZ führt im Vergleich zur alleinigen Infusion von α -GalCer zu einer verlängerten Zytokinantwort [156] und ist bei der klinischen Anwendung an Patienten ebenfalls sicher und gut verträglich [157-164]. Die Auswahl der APZ könnte dabei eine kritische Rolle spielen, da DCs eine bessere iNKT-Zell-Aktivierung als B-Zellen zu bewirken scheinen [165]. Auch die Anwendungsrouten scheint dabei von Bedeutung zu sein, da bei intravenöser Applikation von DCs eine starke Zytokinantwort zu beobachten ist, während die subkutane Applikation in Mäusen keinen Effekt zeigt [166]. Neben der Auswahl des Applikationsweges und der Art der APZ bleibt noch zu klären, ob die bisher beobachteten Effekte wie die erhöhte Frequenz von iNKT-Zellen und erhöhte Zytokinlevel überhaupt mit klinisch relevanten Anti-Tumoreffekten und letztendlich auch mit verlängertem Überleben einhergehen.

Allen hier dargestellten klinischen Applikationsstrategien ist gemeinsam, dass aufgrund der geringen Anzahl von iNKT-Zellen im humanen peripheren Blut hocheffiziente, zeitsparende Expansionsprotokolle von Nöten sind. Das von uns vorgeschlagene

Expansionsprotokoll erfüllt diese Kriterien, müsste jedoch so modifiziert werden, dass die Expansion GMP-konform ablaufen kann.

Neben der Expansion, die elementar für weitere Anwendungen wie *ex vivo* Experimente und später einmal die klinische Anwendung von iNKT-Zellen sein wird, ist die Funktion der expandierten iNKT-Zellen von größtem Interesse. Deshalb wurden die erfolgreich expandierten DLI-iNKTs in *ex vivo* Tumorkontroll-Experimenten eingesetzt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass expandierte iNKT-Zellen aus DLIs effizient Leukämiezelllinien und primäre Tumorzellen lysierten. Dabei war eine Hochregulation von CD107a zu beobachten. CD107a ist ein Degranulationsmarker, der von NK-Zellen [167] und zytotoxischen T-Zellen [168-170] bekannt ist und auch auf iNKT-Zellen exprimiert wird [171]. Bei Degranulation wird der sonst internalisierte Marker auf Vesikeln mit der Zellmembran verschmolzen und kann so durchflusszytometrisch auf der Zelloberfläche detektiert werden. Die CD107a Expression einer Zelle ist somit ein Indikator für deren Aktivierung und Zytotoxizität [172].

Diese Degranulation sowie die nachfolgende Tumorzelllyse geschehen in Abhängigkeit von CD1d. CD1d ist ein nicht polymorphes, hochkonserviertes MHC-Klasse-I-ähnliches Molekül, das vor allem auf Zellen des hämatopoietischen Systems exprimiert ist [173, 174]. Dazu gehören zum Beispiel APZ wie B-Zellen, DCs und Monozyten. Dementsprechend tragen auch viele diesem System entstammende Tumore CD1d [75]. Auch einige solide Tumore wie Prostatakarzinome [175], Mammakarzinome [176], Nierenzellkarzinome [177] und Tumore des zentralen Nervensystems [178, 179] exprimieren CD1d. Die Rolle von CD1d in der iNKT-Tumorkontrolle wird weiter dadurch betont, dass die Herabregulation von CD1d in Patienten mit multiplen Myelomen mit einer Progression assoziiert ist und somit die CD1d-Expression und das Überleben direkt verbunden scheinen [180]. Auch in unseren Daten zeigte sich, dass die CD1d-Expression auf primären AML-Blasten direkt mit der iNKT-Zell-vermittelten Zytotoxizität zusammenhing. Die Höhe der CD1d-Expression könnte also in einer späteren klinischen Anwendung bereits Hinweise darauf geben, ob eine DLI-iNKT-basierte Immunzelltherapie bei drohendem Rezidiv nach allo-SZT wirkungsvoll sein könnte.

Es gibt zwei grundlegende Mechanismen, über die iNKT-Zellen Tumorzellen lysieren können: Unter dem Begriff „direktes *Killing*“ versteht man, dass iNKT-Zellen über ihren TZR ein Glykolipid-Antigen erkennen, das ihnen direkt über das CD1d-Molekül einer CD1d⁺ Tumorzelle präsentiert wird. Daraufhin tritt eine Tumorzelllyse ein, die durch Perforin/Granzym B vermittelt sein kann [181-183]. Auch FasL- oder TNF- α -vermittelte zytotoxische Signalwege spielen eine Rolle [184-186]. „Indirektes *Killing*“ bedeutet, dass die APZ der iNKT-Zelle über CD1d Tumorantigene präsentiert und es so zu einer *Cross*-Präsentation von Tumorantigenen durch APZ kommt. Bei Erkennung des ihr über CD1d präsentierten Glykolipids über ihren TZR wird die iNKT-Zelle dann aktiviert und schüttet große Mengen an Zytokinen wie IFN- γ aus [89, 187-190]. Diese können dann wiederum andere Zellen wie NK-Zellen und tumorspezifische T-Zellen rekrutieren, die daraufhin Tumorzellen lysieren [190-193]. Für die Erkennung und Lyse von CD1d⁻ Tumoren könnte dieser indirekte Mechanismus also von besonderer Bedeutung sein. Um indirekte Lysemechanismen im *ex vivo* Modell zu berücksichtigen, müssten neben Tumorzellen und iNKT-Zellen auch andere Zellpopulationen wie NK-Zellen und T-Zellen enthalten sein. Aufgrund der bisherigen Beobachtung und Annahme, dass CD1d⁺ Tumorzellen von iNKT-Zellen effizienter direkt lysiert werden können, gibt es auch Bestrebungen, CD1d epigenetisch in Tumorzellen zu induzieren und sie so zu einem geeigneteren Angriffspunkt für die iNKT-Zell-vermittelte direkte Tumorzelllyse zu machen [194]. Neue Ansätze in der iNKT-Zell-basierten Immuntumorthérapie, die bei CD1d⁻ Tumoren in Frage kämen, beinhalten beispielsweise den Einsatz von chimären Antigenrezeptor (CAR)-iNKT-Zellen [195]. Dabei werden humane NKT-Zellen mit einem chimären Antigenrezeptor gegen das Neuroblastom-typische GD2 Gangliosid versehen. Die wiederholte Injektion solcher CAR-NKT-Zellen zeigt starke Anti-Tumor-Effekte und verbessert das Überleben von Mäusen mit metastasiertem Neuroblastom, ohne GVHD zu provozieren [195]. Somit wird das Einsatzspektrum von iNKT-Zellen in der Immuntumorthérapie erweitert und eröffnet neue Perspektiven.

Die Mechanismen und Effektormoleküle, über die iNKT-Zellen ihre Rolle in der Anti-Tumor-Immunität ausüben, sind vielfältig und sicher noch nicht zur Gänze bekannt: Über das Perforin/Granzym B-System entsteht nach Freisetzung von Perforin durch Effektorzellen eine Pore in der Zellmembran der Zielzelle, über die dann Granzym B in die Zielzelle gelangt und dort Apoptose induziert. Dieser Weg spielt auch bei der iNKT-

Zell-vermittelten Tumorzelllyse eine Rolle [181-183]. Auch das Fas/FasL-System wird in der iNKT-Tumor-Kontrolle beschrieben [186, 196-198]: FasL, auch als CD95L oder CD178 bezeichnet, ist ein zur Tumornekrosefaktor-Familie zählendes Zytokin, das nach Bindung an seinen Fas-Rezeptor Apoptose auslösen kann. FasL wird vor allem von aktivierten T-Zellen exprimiert, die dann über Bindung an Fas auf Tumorzellen die Tumorzellen in die Apoptose treiben.

iNKT-Zellen können bekannterweise unmittelbar nach Aktivierung große Mengen immunregulatorischer Zytokine freisetzen und nehmen so eine zentrale Rolle im immunmodulatorischen Netzwerk ein [85]. Durch die Produktion und Freisetzung von Zytokinen wie IFN- γ können iNKT-Zellen beispielsweise das angeborene sowie das erworbene Immunsystem aktivieren und so die Anti-Tumor-Aktivität beeinflussen. Deshalb wurden hier verschiedene proinflammatorische Zytokine und proapoptotische Effektormoleküle nach Koinkubation von DLI-iNKTs und Jurkat gemessen. In dem von uns gewählten Setting war zu beobachten, dass DLI-iNKTs bei der CD1d-abhängigen Lyse von Leukämiezellen proinflammatorische und zytotoxische Zytokine und Effektormoleküle ausschütten.

Die präferenzielle Lyse von CD1d⁺ Zelllinien wie Jurkat im Vergleich zur CD1d⁻ Zelllinie K562 könnte zumindest in Teilen auf die experimentellen Besonderheiten zurückzuführen sein: Es wurden nur expandierte, aufgereinigte DLI-iNKTs gegen reine Leukämiezellen in dem Zytotoxizitätsassay getestet. Andere Zellpopulationen, die *in vivo* ebenfalls existieren und interagieren, wurden hier außen vor gelassen. Somit werden indirekte Zytotoxizitätsmechanismen über APZ und Aktivierung von NK und T-Zellen hier nicht zum Tragen gekommen sein. Auch die Rolle von iNKT-Zellen im Tumor *microenvironment* (TME) darf *in vivo* nicht vernachlässigt werden: Aus soliden Tumoren ist bekannt, dass Tumore längst nicht alleine agieren, sondern sich rund um den Tumor ein besonderes TME ausbildet, das den Tumor vor der Anti-Tumor-Reaktion von Immunzellen schützt und den Tumor unterstützende Zellpopulationen wie Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) und myeloide Suppressorzellen (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSCs) miteinschließt. Diese fördern das Tumorwachstum durch die Freisetzung pro-angiogenetischer Faktoren und die Induktion von Immunsuppression in infiltrierenden Immunzellen durch zum Beispiel TGF- β [199]. Charakteristika des TME und heutzutage bekanntes Wissen über dieses variieren zwischen verschiedenen

Tumorentitäten stark: Während das TME in soliden Tumoren verhältnismäßig gut charakterisiert ist, so ist deutlich weniger über das hämatologische Malignitäten bekannt. Man geht davon aus, dass das Knochenmark den Hauptsitz für leukämische Stammzellen darstellt, aber auch sekundär lymphatische Organe wie Lymphknoten und Milz werden als Bestandteile des TME in Leukämien angesehen. In soliden Tumoren können iNKT-Zellen die Anzahl und Funktion dieser Pro-Tumor-Zellpopulationen wie TAMs und MDSCs verringern [200, 201]. In Neuroblastomen konnten iNKT-Zellen TAMs, die sonst durch die Produktion von immunsuppressivem IL-6 und TGF- β die Anti-Tumor-T-Zell-Antwort verhindern, sogar direkt lysieren [202].

Wir haben zunächst eine effiziente Lyse von Leukämiezelllinien und von primären, nicht HLA-identischen Leukämiezellen beobachtet. Im klinischen Alltag wird jedoch versucht, HLA-identische Stammzellspender zu finden, die also in allen analysierten HLA-Merkmalen mit denjenigen des Empfängers übereinstimmen. Diese in 10/10 HLA-Merkmalen übereinstimmenden Spender werden dann als *matched donors* oder „HLA-identisch“ bezeichnet. Für die Translation des hier vorgeschlagenen Ansatzes in die klinische Anwendung von Immunzelltherapien war es deshalb besonders wichtig, ob die DLI-iNKT-vermittelte Leukämiezelllyse auch in einer HLA-identischen Konstellation funktionierte. Die primären, therapienaiven Leukämiezellen des Patienten konnten auch von den expandierten DLI-iNKTs des HLA-identischen Stammzellspenders effizient lysiert werden. Aufgrund der hohen Konservierung des CD1d-Moleküls [203] und fehlenden interindividuellen Variabilität bestehen so wenige Unterschiede in den CD1d-Molekülen verschiedener Menschen, dass es für iNKT-Zellen keine Rolle spielt, ob sie CD1d eines HLA-identischen oder nicht-identischen Spenders erkennen. Unsere Ergebnisse waren in dieser Form also zu erwarten und sind unter Berücksichtigung dieser Besonderheiten der iNKT-Zell-Biologie plausibel.

Eine weitere Besonderheit in dem von uns gewählten *ex vivo* Tumorlysemodell bestand darin, dass zur Kokultur initial α -GalCer zugegeben wurden. Dieses Glykolipid ist ein starker Aktivator von iNKT-Zellen, kommt jedoch als synthetisches Glykolipid, das ursprünglich aus dem Meeresschwamm *Agelas mauritanus* isoliert wurde, physiologischerweise nicht im Menschen vor. Es wurden deshalb weitere Experimente durchgeführt, die die Bedeutung von α -GalCer auf die Tumorzelllyse evaluieren sollten. Im direkten Vergleich zeigte sich, dass in Anwesenheit von α -GalCer in der Tat eine

stärkere Lyse von Tumorzelllinien zu beobachten war als in Abwesenheit. Auch die Degranulation von DLI-iNKTs sowie der Effekt des Anti-CD1d-Antikörpers waren unter Einfluss von α -GalCer stärker ausgeprägt. Interessanterweise war der Einfluss von α -GalCer auf die Lyse von primären AML-Blasten geringer: Hier konnten vergleichbare Ergebnisse mit und ohne α -GalCer erzielt werden. Eine denkbare Erklärung hierfür ist, dass primäre AML-Blasten selbst Glykolipide präsentieren, die dann analog zu α -GalCer zu einer stärkeren Aktivierung von iNKT-Zellen auch in Abwesenheit des von außen zugegebenen α -GalCers führen können. Dennoch sind diese Ergebnisse für eine spätere Anwendung in der Klinik von Bedeutung, da durch die Zugabe von α -GalCer auch bei Patienten bessere Tumorlyseeffekte zu erreichen sein könnten. Chen und Kollegen demonstrierten bereits in einer Phase IIA-Studie, dass die Infusion von α -GalCer bei Patienten nach allo-SZT sicher und gut tolerabel ist [204]. Somit bestünde die Möglichkeit, in der klinischen Anwendung den adoptiven Transfer von expandierten DLI-iNKTs mit der Infusion von α -GalCer zu kombinieren, um GVL-Effekte voll auszuschöpfen.

Dennoch birgt die Infusion von expandierten DLI-iNKTs in Kombination mit α -GalCer Limitationen und es müssen andere Faktoren, die das Outcome nach DLIs beeinflussen, ebenfalls beachtet werden: Unsere Arbeitsgruppe hat an einem kleinen Kollektiv von 44 Patienten Faktoren analysiert, die das progressionsfreie- und Gesamtüberleben nach DLI-Gabe beeinflussten [119]. Dabei wurde deutlich, dass eine stattgefundene G-CSF-Stimulation der Stammzell- und somit auch DLI-Spender zu verbesserten GVL-Effekten führte [119]. Diese führten in Folge durch die Konversion zu vollem Spenderchimärismus zu einer signifikant verringerten Rezidivrate und einem verbesserten Überleben im Vergleich zu nicht-G-CSF-stimulierten DLIs [119]. G-CSF-mobilisierte DLIs enthielten höhere Anzahlen an $CD34^+$ hämatopoietischen Stammzellen, Monozyten und monozytischen MDSCs sowie granulozytischen MDSCs [119]. Das 1-Jahres-Überleben für Patienten mit mehr als 0,15 % $CD34^+$ Zellen betrug 75 % im Vergleich zu 23 % für Patienten mit geringeren Zahlen an $CD34^+$ Zellen ($p=0,01$) [119]. Als unabhängige Faktoren, die das Gesamtüberleben nach DLIs signifikant verbessern, wurden höhere Anzahlen von $CD34^+$ Zellen und monozytischen MDSCs in DLIs identifiziert [119]. Auch das Auftreten einer cGVHD führte zu einem verbesserten Gesamtüberleben [119]. Diese Ergebnisse könnten für Kliniker aufgrund der einfachen Umsetzbarkeit in der

klinischen Routine von Interesse sein, da sich die Protokolle für die Gewinnung von DLIs so anpassen ließen, dass eine Leukapherese möglichst in allen Fällen unter G-CSF-Stimulation stattfände.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse stellte sich nun die Frage, ob eine G-CSF-Stimulation der Spender auch einen Einfluss auf die Häufigkeit und Zusammensetzung der iNKT-Zellpopulation in DLIs und schlussendlich auf die Tumorzellyse durch DLI-iNKTs hatte. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die 63 DLIs in eine G-CSF-stimulierte- (n=26) und eine unstimulierte Gruppe (n=35, Daten von n=2 Spendern nicht verfügbar) unterteilt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der unstimulierten Gesamt-iNKT-Zellzahl in DLIs, der iNKT-Zell-Subtypen oder der Expansion.

Durch eine initiale *ex vivo* Expansion von iNKT-Zellen aus DLIs mittels des hier aufgezeigten Protokolls und ihrer Anreicherung in DLIs in Kombination mit einer Infusion von α -GalCer könnten noch bestehende Hindernisse aus dem Weg geräumt werden. So könnten die vorteilhaften Effekte von DLI-iNKTs auf die Tumorkontrolle und GVHD besser genutzt werden und durch die Reduktion von Rezidiven das Überleben von Patienten mit hämatoonkologischen Erkrankungen nach allo-SZT verbessert werden.

6 Zusammenfassung

Einleitung: Für Patienten mit hämatologischen Neoplasien wie akuten Leukämien stellt eine allogene Blutstammzelltransplantation (allo-SZT) eine kurative Therapieoption dar. Dennoch kommt es im weiteren Verlauf häufig zu Rezidiven, die die häufigste Todesursache nach allo-SZT darstellen. Ein möglicher Ansatz ist die Infusion von Spenderlymphozyten (Spenderlymphozyteninfusionen, DLIs): DLIs können durch potente Transplantat-versus-Leukämie (GVL)-Effekte eine Remission induzieren. Jedoch wird oft kein ausreichendes Ansprechen erreicht. Aufgrund von dosislimitierenden Toxizitäten wie der Transplantat-versus-Host-Erkrankung (GVHD) ist eine Dosisescalation häufig nicht möglich.

Invariante natürliche Killer-T-Zellen (iNKT-Zellen) sind eine kleine Subpopulation der T-Zellen, die an der Tumorkontrolle beteiligt sind, ohne GVHD zu evozieren. In dieser Arbeit wurde deshalb in einem *ex vivo* Tumorkontrollmodell die Anti-Tumor-Immunität von iNKT-Zellen aus DLIs gegenüber Leukämiezelllinien und primären Leukämiezellen evaluiert.

Methoden: 63 humane DLIs wurden durchflusszytometrisch auf ihre zelluläre Zusammensetzung hin analysiert. iNKT-Zellen wurden dabei mithilfe des PBS57-CD1d Tetramers detektiert. iNKT-Zellen aus DLIs wurden mithilfe eines zweiwöchigen Expansionsprotokolls *ex vivo* expandiert und mittels magnetisch-aktivierter Zell-Sortierung (MACS) aufgereinigt. Anschließend wurde der dosisabhängige Effekt (spezifische Lyse) der DLI-iNKTs auf die Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Degranulation von DLI-iNKTs wurde in CD107a-Degranulationsassays gemessen und die Zytokinproduktion mithilfe eines *Bead*-basierten Immunoassay quantifiziert.

Ergebnisse: In einem Patientenkollektiv von 44 Patienten, die DLIs nach allo-SZT erhalten hatten, litt der Großteil der Patienten (n=25) an einer akuten myeloischen Leukämie (AML, 57 %). DLIs trugen zu einer Konversion von gemischtem Chimärismus zu komplettem Spenderchimärismus und so zur Senkung des Rezidivrisikos bei. Dennoch stellten Rezidiv und Krankheitsprogress die häufigste Todesursache nach DLI-Gabe in unserem Kollektiv dar. iNKT-Zellen kamen in einer Häufigkeit von 0,124 % der T-Zellen in humanen kryokonservierten DLIs vor. Dabei dominierten CD4⁺/CD8⁻ iNKT-Zellen

(71,1 %, *Range* 35,2-91,7), gefolgt von CD4⁺/CD8⁻ iNKT-Zellen (18,4 %, *Range* 0-57,1) und CD4⁻/CD8⁺ iNKT-Zellen (9,1 %, *Range* 0-27,3). Die hier erreichte 281,4-fache Expansion von DLI-iNKTs war grundlegend für weitere Experimente und klinische Anwendungen und erlaubte den Einsatz von DLI-iNKTs in Zytotoxizitätsassays. Dabei beobachteten wir eine effiziente dosisabhängige Lyse von Leukämiezelllinien. Eine Inhibition der CD1d/iNKT-Zell-Rezeptor-(iNKTZR) Interaktion durch Zugabe eines Anti-CD1d-Antikörpers in die Kokultur resultierte in einer verminderten Leukämiezelllyse durch DLI-iNKTs. Die Expression des Degranulationsmarkers CD107a auf DLI-iNKTs war nach Koinkubation mit der Leukämiezelllinie Jurkat signifikant erhöht, während eine Blockade der CD1d/iNKTZR-Interaktion eine verminderte Degranulation von DLI-iNKTs bewirkte. Nach Koinkubation mit Jurkat waren außerdem erhöhte Konzentrationen von zytotoxischen Zytokinen und Effektormolekülen wie IFN- γ , TNF- α , Perforin und sFasL zu beobachten. Primäre Leukämiezellen konnten ebenfalls Dosis- und CD1d-abhängig durch expandierte DLI-iNKTs lysiert werden. Das Glykolipid α -Galactosylceramid (α -GalCer) verstärkte die DLI-iNKT-vermittelte Tumorzelllyse, es wurden jedoch auch ohne Zugabe von α -GalCer robuste Anti-Tumor-Effekte beobachtet.

Diskussion: Die zytotoxischen Fähigkeiten von humanen expandierten DLI-iNKTs gegenüber Leukämiezelllinien und primären AML-Blasten von Patienten legen nahe, dass DLI-iNKTs in der Anti-Tumor-Kontrolle nach allo-SZT eine wichtige Rolle spielen könnten. Die Manipulation der zellulären Zusammensetzung von DLIs durch eine *ex vivo* Expansion und Anreicherung von iNKT-Zellen in DLIs könnte GVL-Effekte stärken und somit Rezidive verhindern. Durch die Infusion eines Glykolipids könnten diese Effekte weiter verstärkt werden. So könnte durch die Senkung des Rezidivrisikos ohne eine Erhöhung der GVHD-Inzidenz das progressionsfreie- sowie Gesamtüberleben von Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen nach allo-SZT verbessert werden.

7 Finanzierung und Unterstützung

SJ wurde durch ein Promotionsstipendium des IZKF Promotionskolleg der medizinischen Fakultät (Bevilligungsnummer 2017-2-17) der Eberhard Karls Universität Tübingen unterstützt.

8 Veröffentlichungen

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits in folgenden Fachzeitschriften veröffentlicht:

- S. Jahnke, H. Schmid, K.A. Secker, J. Einhaus, S. Duerr-Stoerzer, H. Keppeler, I. Schober-Melms, R. Baur, M. Schumm, R. Handgretinger, W. Bethge, L. Kanz, C. Schneidawind, D. Schneidawind, **Invariant NKT Cells From Donor Lymphocyte Infusions (DLI-iNKTs) Promote ex vivo Lysis of Leukemic Blasts in a CD1d-Dependent Manner**. Front Immunol, 2019. 10: p. 1542
 - C. Schneidawind, S. Jahnke, I. Schober-Melms, M. Schumm, R. Handgretinger, C. Faul, L. Kanz, W. Bethge, D. Schneidawind, **G-CSF administration prior to donor lymphocyte apheresis promotes anti-leukaemic effects in allogeneic HCT patients**. Br J Haematol, 2019. 186(1): p. 60-71
 - H. Schmid*, C. Schneidawind*, S. Jahnke, F. Kettemann, K.A. Secker, S. Duerr-Stoerzer, H. Keppeler, L. Kanz, P.B. Savage, D. Schneidawind, **Culture-Expanded Human Invariant Natural Killer T Cells Suppress T-Cell Alloreactivity and Eradicate Leukemia**. Front Immunol, 2018. 9: p. 1817
- *geteilte Erstautorenschaft

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die allo-SZT stellt eine kurative Therapieoption für bestimmte hämatologische Tumore dar.....	13
Abbildung 2: iNKT-Zellen nehmen eine zentrale Rolle im immunmodulatorischen Netzwerk ein.	19
Abbildung 3: Probenfluss der DLIs.....	41
Abbildung 4: Klinische Daten zu Spenderlymphozyteninfusionen.	46
Abbildung 5: Durchflusszytometrische Analyse von DLIs und Charakterisierung von T-Zell- und iNKT-Zell-Subtypen.	48
Abbildung 6: Expansion und Aufreinigung von humanen iNKT-Zellen aus DLIs.	51
Abbildung 7: Die akute T-Zell-Leukämiezelllinie Jurkat.	52
Abbildung 8: Expandierte DLI-iNKTs lysieren die akute Leukämiezelllinie Jurkat dosisabhängig.....	55
Abbildung 9: Expression von CD107a auf DLI-iNKT-Subtypen.	59
Abbildung 10: Die Leukämiezelllyse lässt sich durch Blockierung von CD1d herabsetzen.....	61
Abbildung 11: Primäre AML-Blasten.	62
Abbildung 12: Effiziente Lyse primärer AML-Blasten durch DLI-iNKTs.	63
Abbildung 13: Effiziente Leukämiezelllyse primärer AML-Blasten in einer HLA-identischen Konstellation.....	65

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Disease und stage risk	8
Tabelle 2: Bestimmung des disease risks der AML anhand der Zytogenetik	9
Tabelle 3: Bestimmung des Gesamtrisikos anhand des disease- und stage risks	9
Tabelle 4: Organstaging der akuten GVHD nach Glucksberg	11
Tabelle 5: Gesamtscoreing der akuten GVHD.....	11
Tabelle 6: Bestimmung des Schweregrads der chronischen GVHD (NIH Kriterien)....	12
Tabelle 7: Geräte	23
Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien.....	24
Tabelle 9: Chemikalien und Reagenzien	25
Tabelle 10: Antikörper der iNKT-Zell-Expansion	26
Tabelle 11: Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse der DLI-Proben - Panel 1	27
Tabelle 12: Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse der DLI-Proben - Panel 2	28
Tabelle 13: Antikörper für Zytotoxizitätsassays	29
Tabelle 14: Antikörper für CD107a Assays	30
Tabelle 15: Antikörper zur Bestimmung von Tumorzellmarkern	30
Tabelle 16: Medien, Puffer und Lösungen	31
Tabelle 17: Software.....	32
Tabelle 18: Patienten- und Spendercharakteristika	42
Tabelle 19: Transplantations- und DLI-Charakteristika.....	44

11 Anhangsverzeichnis

Anhang 1: Organscoring der chronischen GVHD (NIH Kriterien 2005)	85
Anhang 2: Gating-Strategie der Zytotoxizitätsassays.	88
Anhang 3: Einfluss von G-CSF auf iNKT-Zell-Zahl, Subtypen und Funktion.....	89
Anhang 4: Lyse von Jurkatzellen in An- und Abwesenheit von α -GalCer.	90
Anhang 5: Einfluss von α -GalCer auf die CD1d-Abhängigkeit der DLI-iNKT- vermittelten Lyse von Jurkatzellen.....	92
Anhang 6: Für die Lyse von primären AML-Blasten durch DLI-iNKTs werden in An- und Abwesenheit von α -GalCer vergleichbare Effekte erzielt.....	95
Anhang 7: Immunphänotypisierung der primären AML-Blasten.	96

12 Anhang

Anhang 1: Organscoring der chronischen GVHD (NIH Kriterien 2005)

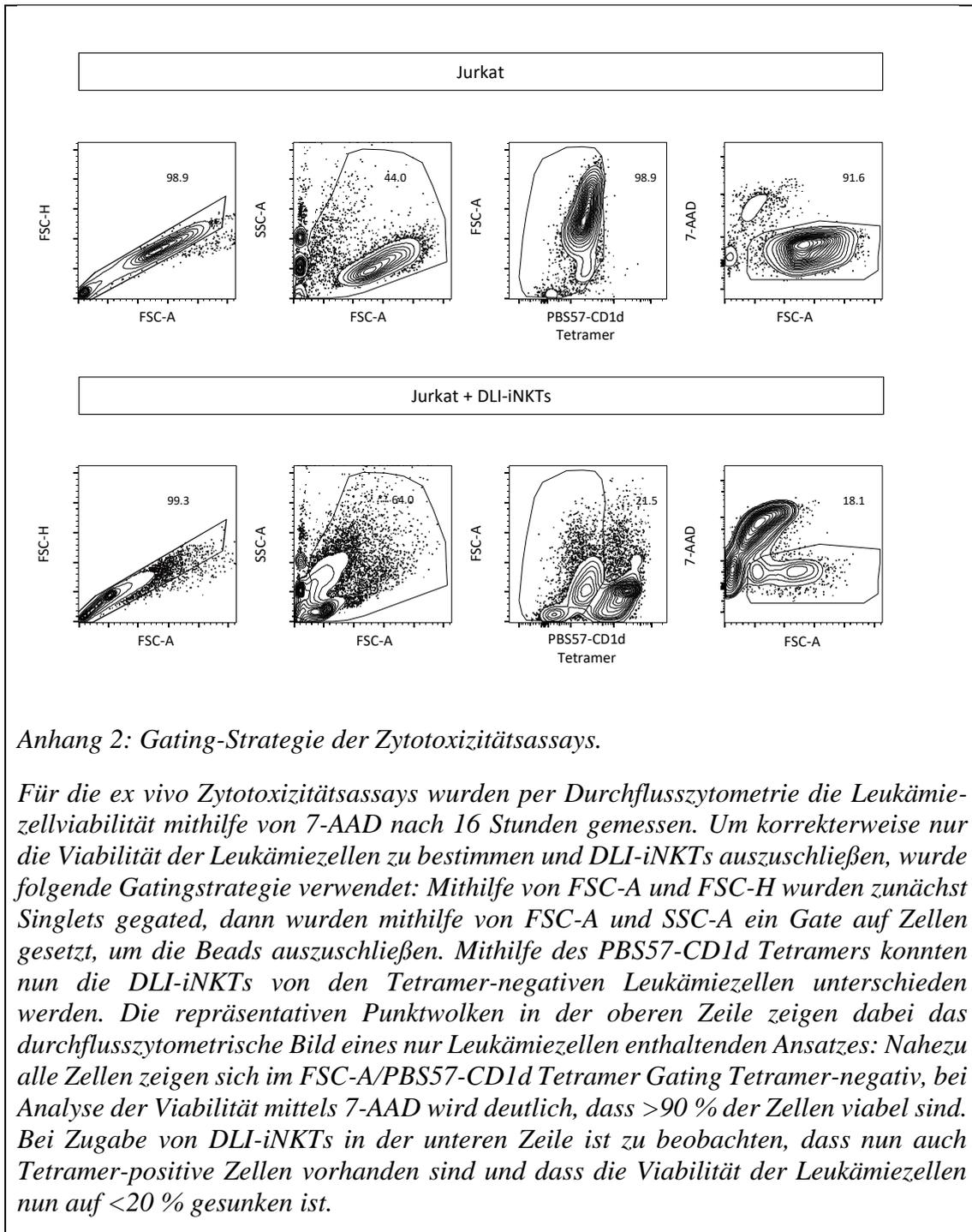
Organsystem	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
Haut <ul style="list-style-type: none"> - Makulopapulöser Ausschlag - Lichen planus ähnliche Veränderungen - Papulosquamöse Läsionen - Hypo/Hyperpigmentation - Erythem - Erythrodermie - Pruritus - Haar- und Nagelbeteiligung - u.v.m. 	keine Symptome	<18 % KOF ohne sklerotische Veränderungen	19-50 % KOF oder oberflächliche sklerotische Veränderungen	>50 % KOF oder tiefe sklerotische Veränderungen oder eingeschränkte Mobilität oder Ulzeration oder schwerer Pruritus
Mund	keine Symptome	milde Symptome ohne signifikante Einschränkungen der oralen Nahrungsaufnahme	moderate Symptome mit teilweiser Einschränkung der oralen Nahrungsaufnahme	schwere Symptome mit erheblicher Einschränkung der oralen Nahrungsaufnahme
Augen	keine Symptome	milde trockene Augen ohne Einschränkung der ADL (Augentropfen <3/Tag) oder asymptomatische Zeichen einer Keratokonjunktivitis sicca	moderate trockene Augen mit teilweiser Einschränkung der ADL (Augentropfen >3/Tag) ohne visuelle Einschränkungen	schwere trockene Augen mit erheblicher Einschränkung der ADL, Unfähigkeit zu arbeiten aufgrund okulärer Symptomatik oder Visusverlust aufgrund Keratokonjunktivitis sicca

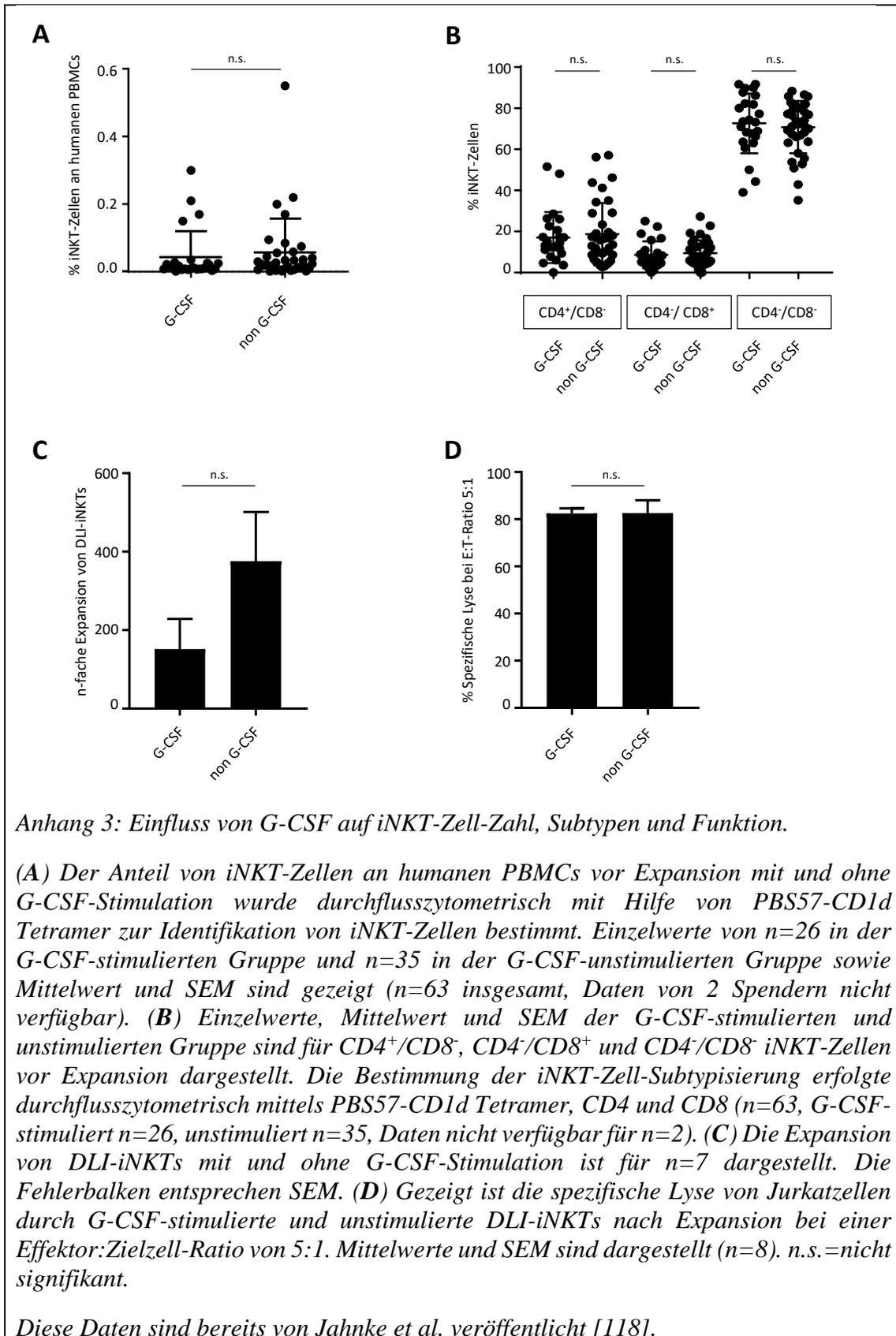
Gastrointestinaltrakt	keine Symptome	Dysphagie, Anorexie, Nausea, Erbrechen, abdominelle Schmerzen, Diarrhöe ohne signifikanten Gewichtsverlust (<5 %)	Symptome aus 1 mit Gewichtsverlust von 5-15 %	Symptome aus 1 mit Gewichtsverlust >15 %, zusätzliche Nahrungsergänzung nötig, oder Ösophagusdilatation
Leber	Leberwerte nicht erhöht	Bilirubin, AST, ALT, AP erhöht <2x ULN	Bilirubin >3mg/dl oder Bilirubin oder Leberenzyme 2-5x ULN	Bilirubin oder Leberenzyme >5x ULN
Lungen FEV1= ____ DLCO= ____	keine Symptome FEV1 >80 % oder LFS=2	milde Symptome: Kurzatmigkeit nach Treppensteigen FEV1= 60-79 % oder LFS 3-5	moderate Symptome: Kurzatmigkeit nach Laufen auf ebenem Boden FEV1= 40-59 % oder LFS 6-9	schwere Symptome: Kurzatmigkeit in Ruhe, O ₂ - Bedarf FEV1 <39 % oder LFS 10-12
Gelenke und Faszien	keine Symptome	milde Festigkeit der Arme und Beine ohne Beeinträchtigung der ADL, normaler bis leicht reduzierter Bewegungsumfang	Festigkeit von Armen und Beinen oder Kontrakturen, Erytheme aufgrund von Faszitis und moderate Einschränkung des Bewegungsumfangs/ADL	Kontrakturen mit signifikanter Einschränkung des Bewegungsumfanges und der ADL (z.B. Schuhe binden unmöglich)

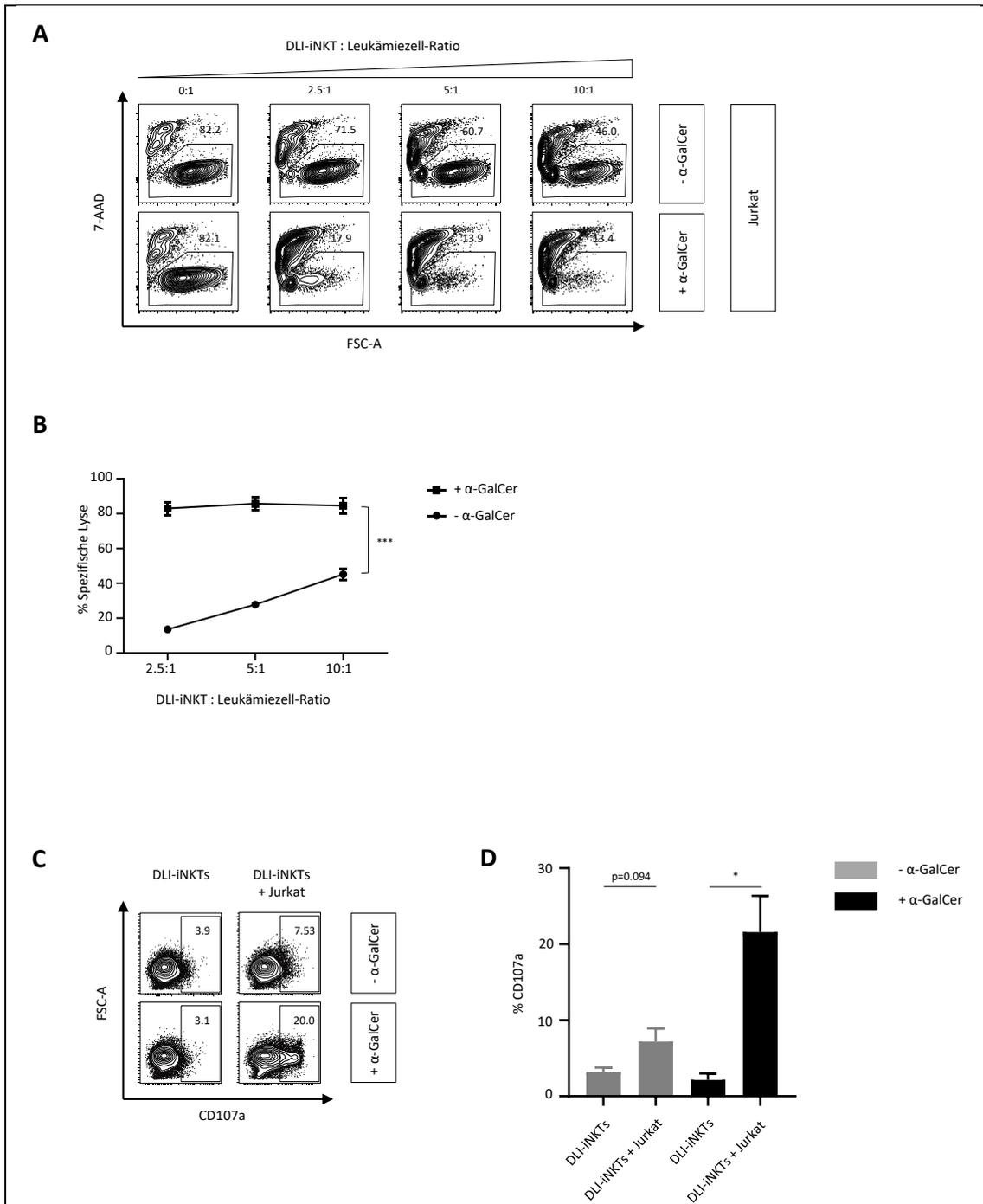
Genitaltrakt	keine Symptome	symptomatisch mit milden Zeichen in der Untersuchung und ohne Effekt auf Koitus, minimale Schmerzen bei gynäkologischer Untersuchung	symptomatisch mit moderaten Zeichen in der Untersuchung und mit milder Dyspareunie oder Schmerzen bei gynäkologischer Untersuchung	symptomatisch mit fortgeschrittenen Zeichen wie Strikturen, Labialagglutination, Ulzerationen und schweren Schmerzen bei Koitus oder Nicht-einbringen des Vaginalspekulums
Performance: EGOC, KPS, LPS: _____	asymptomatisch und voll aktiv (ECOG 0, LPS/KPS 100 %)	symptomatisch, voll ambulant, Einschränkungen nur bei körperlicher Anstrengung (ECOG 1, LPS/KPS 80-90 %)	symptomatisch, ambulant, selbstversorgend, >50 % der Wachzeit außerhalb des Betts (ECOG 2, LPS/KPS 60-80 %)	symptomatisch, eingeschränkt selbstversorgend, >50 % der Wachzeit im Bett (ECOG 3-4, LPS/KPS <60 %)

ULN: upper limit of normal; ADL: Aktivitäten des täglichen Lebens (activities of daily living); ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group; KPS: Karnofsky Performance Status; LPS: Lansky Performance Status; BSA: Körperoberfläche (body surface area); FEV1: Einsekundenkapazität (forced expiratory pressure in one second); DLCO: Diffusionskapazität der Lunge (diffusing capacity oder transfer factor of the lung for carbon monoxide); LFS: Lungenfunktionsscore (lung function score); ALT: Alanineaminotransferase; AST: Aspartateaminotransferase

Adaptiert nach Filipovich et al., 2005 [8].





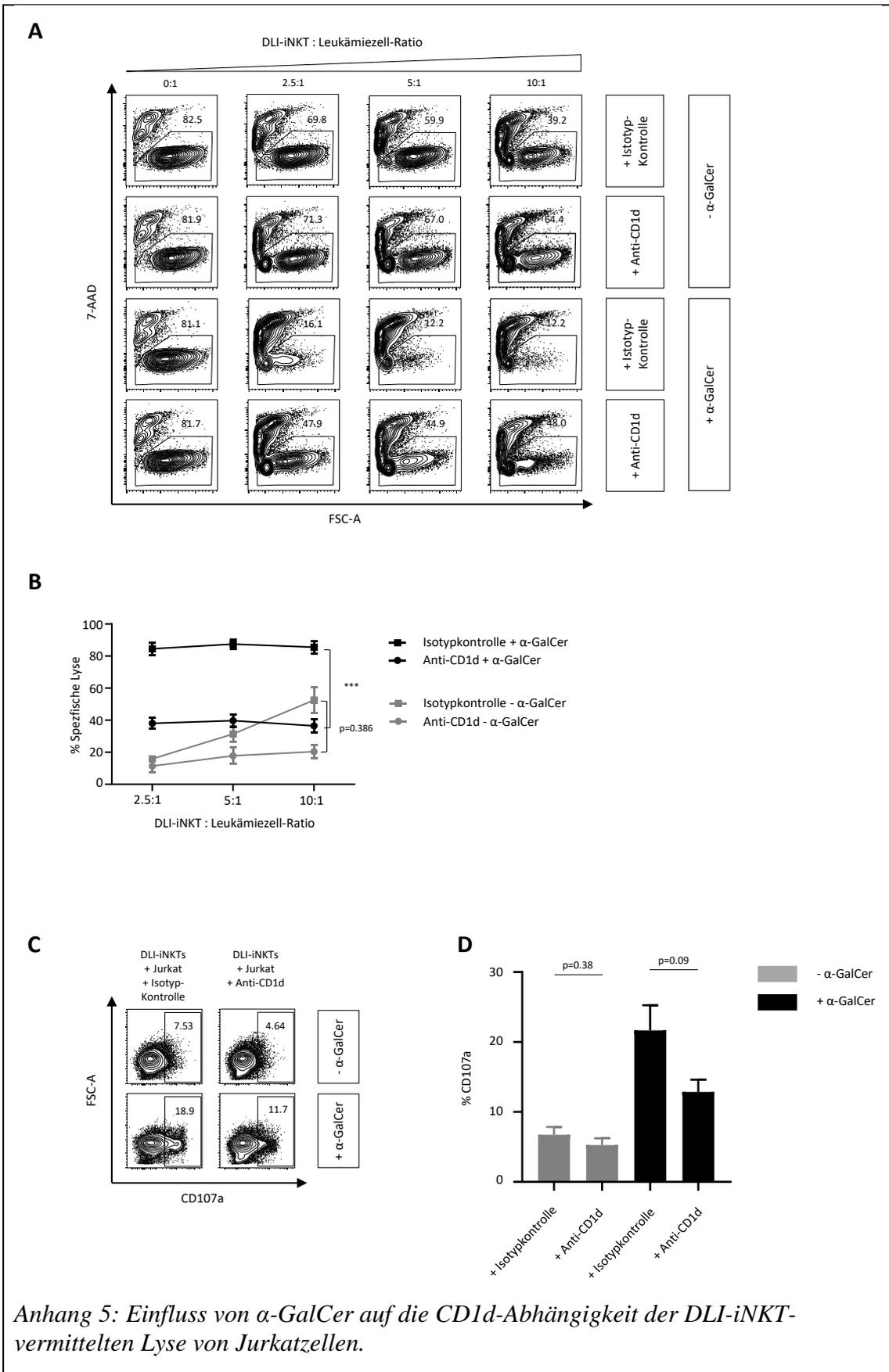


Anhang 4: Lyse von Jurkatzellen in An- und Abwesenheit von α -GalCer.

(A) Expandierte und aufgereinigte DLI-iNKTs wurden mit Jurkatzellen bei steigenden Effektor:Zielzell-Ratios für 16 Stunden in An- und Abwesenheit von α -GalCer koinkubiert. Anschließend wurde die Viabilität der Tumorzellen mittels 7-AAD durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei wurden PBS57-CD1d Tetramer-negative Zellen zuvor ausgeschlossen. Repräsentative Durchflusszytometrie-Daten aus einem von drei Experimenten sind gezeigt. (B) Das Spezifische-Lyse-Diagramm zeigt gepoolte Daten von n=3 Experimenten der DLI-iNKT-vermittelten Leukämiezelllyse mit und ohne α -GalCer. Die Fehlerbalken entsprechen SEM. (C) Die Degranulation

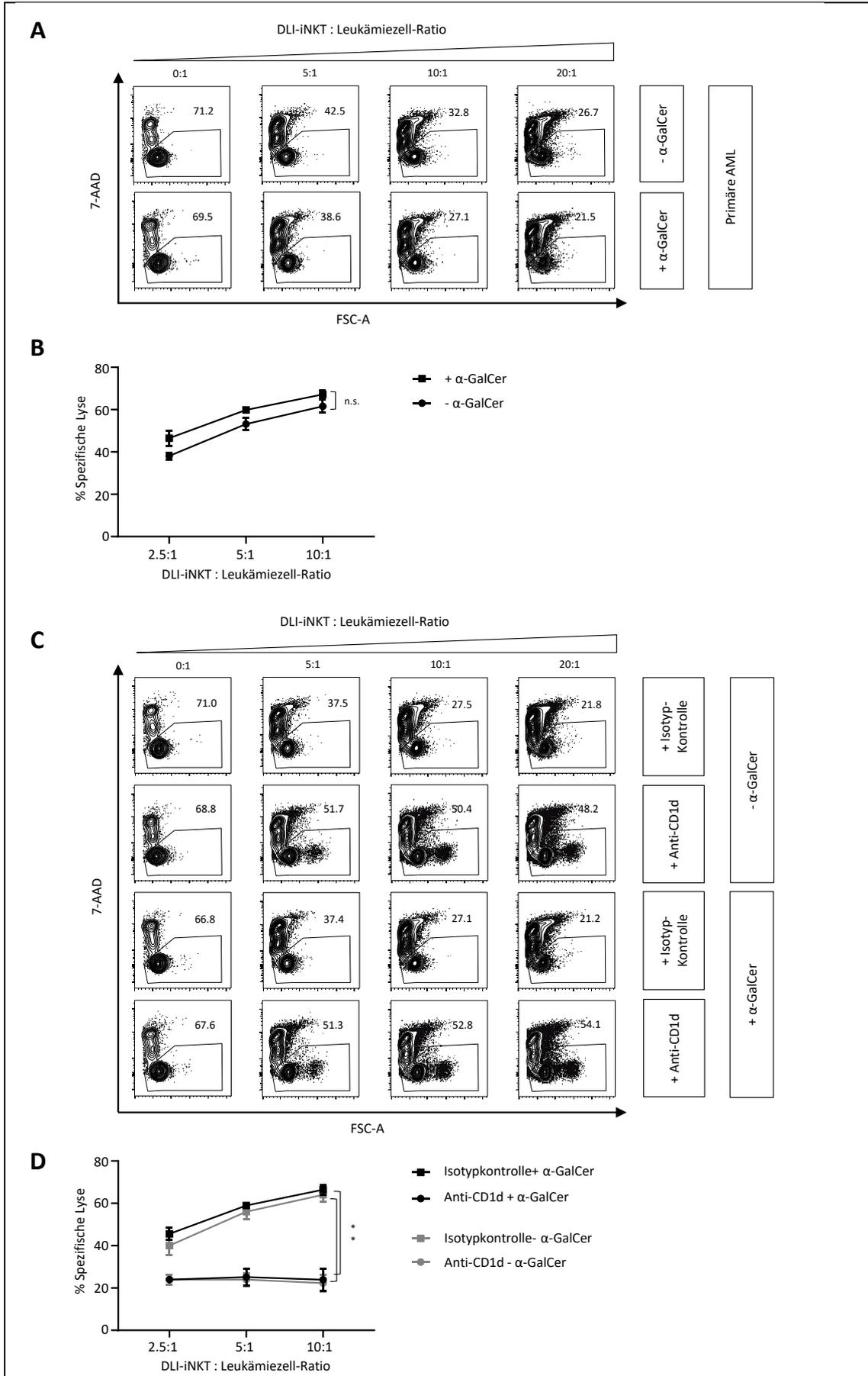
von DLI-iNKTs wurde nach 16-stündiger Koinkubation mit und ohne Jurkatzellen bei einer Effektor:Zielzell-Ratio von 2,5:1 in An- und Abwesenheit von α -GalCer mittels der CD107a-Externalisation, gemessen per Durchflusszytometrie, bestimmt. iNKT-Zellen wurden mithilfe des PBS57-CD1d Tetramers und des iTCR-Antikörpers identifiziert. Repräsentative Daten eines von n=3 Experimenten sind gezeigt. (D) Die Expression von CD107a in % ist für DLI-iNKTs nach 16-stündiger Inkubation ohne Zielzellen sowie nach 16-stündiger Koinkubation mit Jurkatzellen jeweils mit und ohne α -GalCer gezeigt. Gepoolte Daten von n=3 Experimenten sind mit Mittelwert und SEM dargestellt. *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$.

Diese Daten sind bereits von Jahnke et al. veröffentlicht [118].



(A) Die Lyse von Jurkatzellen durch expandierte und aufgereinigte DLI-iNKTs ist nach 16-stündiger Koinkubation mittels 7-AAD durchflusszytometrisch bestimmt worden. Der Effekt des CD1d-blockierenden Antikörpers im Vergleich zur entsprechenden Isotypkontrolle wurde in An- und Abwesenheit von α -GalCer evaluiert. iNKT-Zellen wurden mithilfe des PBS57-CD1d Tetramers identifiziert und ausgeschlossen. Repräsentative Daten eines von $n=3$ Experimenten sind gezeigt. (B) Das Spezifische-Lyse-Diagramm stellt die Lyse der Jurkatzellen durch DLI-iNKTs in An- und Abwesenheit von α -GalCer jeweils für den CD1d-blockierenden Antikörper sowie die entsprechende Isotypkontrolle dar ($n=3$, Fehlerbalken entsprechen SEM). (C) Die Degranulation von DLI-iNKTs in An- und Abwesenheit von α -GalCer wurde nach 16-stündiger Koinkubation mit Jurkatzellen und dem Anti-CD1d-Antikörper bzw. der Isotypkontrolle bestimmt. iNKT-Zellen wurden mithilfe des PBS57-CD1d Tetramers und des iTCR-Antikörpers identifiziert. Repräsentative Daten eines von $n=3$ Experimenten sind gezeigt. (D) Gepoolte Daten von $n=3$ Experimenten zur Degranulation im CD107a-Assay vergleichen den Effekt des Anti-CD1d-Antikörpers im Vergleich zur Isotypkontrolle in An- und Abwesenheit von α -GalCer ($n=3$, Fehlerbalken entsprechen SEM). ***: $p<0,001$.

Diese Daten sind bereits von Jahnke et al. veröffentlicht [118].



Anhang 6: Für die Lyse von primären AML-Blasten durch DLI-iNKTs werden in An- und Abwesenheit von α -GalCer vergleichbare Effekte erzielt.

(A) Primäre AML-Blasten mit einer Reinheit von >90 % wurden für 16 Stunden mit expandierten und aufgereinigten DLI-iNKTs in An- und Abwesenheit von α -GalCer koinkubiert und anschließend in der Durchflusszytometrie mittels 7-AAD auf ihre Viabilität geprüft. iNKT-Zellen wurden durch Gating auf PBS57-CD1d Tetramer negative Zellen ausgeschlossen. Repräsentative Daten eines von n=3 Experimenten sind gezeigt. (B) Im Spezifischen-Lyse-Diagramm wurden für die DLI-iNKT-vermittelte Lyse von primären AML-Blasten vergleichbare Effizienzen mit und ohne α -GalCer erreicht (n=3, Fehlerbalken entsprechen SEM). (C) Nach 16-stündiger Koinkubation von primären AML-Blasten mit DLI-iNKTs in An- und Abwesenheit von α -GalCer wurden die Effekte auf die Lyse mit Anti-CD1d-Antikörper sowie Isotypkontrolle durchflusszytometrisch bestimmt. Repräsentative Daten eines von n=3 Experimenten sind gezeigt. (D) Im Spezifischen-Lyse-Diagramm sind die Lysekurven für den Anti-CD1d-Antikörper sowie die entsprechende Isotypkontrolle in An- und Abwesenheit von α -GalCer aufgetragen (n=3, Fehlerbalken entsprechen SEM).*: $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

Diese Daten sind bereits von Jahnke et al. veröffentlicht [118].

AML	CD33	CD34	CD117	HLA-DR	MPO	FLT-3	NPM1
001	+	0	0/+	0	+	+	+
002	+	0	0	n.a.	+	0	0
003	+	0	+	0	+	0	0
004	+	+	n.a.	+	0	n.a.	n.a.
005	+	0	+	+	+	+	+
006	+	+	+	+	+	+	0
007	+	0	+	+	+	+	0
008	+	+	+	+	+	+	0
009	+	0/+	+	+	+	+	+

Anhang 7: Immunphänotypisierung der primären AML-Blasten.

Der Immunphänotyp der für die Lyseexperimente verwendeten AML-Blasten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist gezeigt. Die Daten wurden mithilfe eines BD FACS Calibur Durchflusszytometer durch das FACS-Labor der Inneren Medizin II des Universitätsklinikum Tübingen akquiriert und zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um primäre, therapienaive AML-Blasten, die mindestens 90 % im peripheren Blut des Patienten stellten. Abkürzungen: 0=negativ, 0/+ =niedrig, +=positiv, n.a. data not available.

Diese Daten sind bereits von Jahnke et al. veröffentlicht [118].

13 Literaturverzeichnis

1. Pasquini MC, Z., X, *Current use and outcome of hematopoietic stem cell transplantation. 2015 CIBMTR Summary Slides.* 2014.
2. Sorrow, M.L., B.R. Logan, X. Zhu, J.D. Rizzo, K.R. Cooke, P.L. McCarthy, et al., *Prospective Validation of the Predictive Power of the Hematopoietic Cell Transplantation Comorbidity Index: A Center for International Blood and Marrow Transplant Research Study.* Biol Blood Marrow Transplant, 2015. **21**(8): p. 1479-87.
3. Armand, P., C.J. Gibson, C. Cutler, V.T. Ho, J. Koreth, E.P. Alyea, et al., *A disease risk index for patients undergoing allogeneic stem cell transplantation.* Blood, 2012. **120**(4): p. 905-913.
4. Armand, P., H.T. Kim, M.J. Zhang, W.S. Perez, P.S. Dal Cin, T.R. Klumpp, et al., *Classifying Cytogenetics in Patients with Acute Myelogenous Leukemia in Complete Remission Undergoing Allogeneic Transplantation: A Center for International Blood and Marrow Transplant Research Study.* Biology of Blood and Marrow Transplantation, 2012. **18**(2): p. 280-288.
5. Ferrara, J.L., J.E. Levine, P. Reddy, and E. Holler, *Graft-versus-host disease.* Lancet, 2009. **373**(9674): p. 1550-61.
6. Magenau, J. and P. Reddy, *Next generation treatment of acute graft-versus-host disease.* Leukemia, 2014. **28**(12): p. 2283-91.
7. Lee, S.J., G. Vogelsang, and M.E. Flowers, *Chronic graft-versus-host disease.* Biol Blood Marrow Transplant, 2003. **9**(4): p. 215-33.
8. Filipovich, A.H., D. Weisdorf, S. Pavletic, G. Socie, J.R. Wingard, S.J. Lee, et al., *National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report.* Biol Blood Marrow Transplant, 2005. **11**(12): p. 945-56.
9. Glucksberg, H., R. Storb, A. Fefer, C.D. Buckner, P.E. Neiman, R.A. Clift, et al., *Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors.* Transplantation, 1974. **18**(4): p. 295-304.
10. Przepiorcka, D., D. Weisdorf, P. Martin, H.G. Klingemann, P. Beatty, J. Hows, et al., *1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading.* Bone Marrow Transplant, 1995. **15**(6): p. 825-8.
11. Ball, L.M., R.M. Egeler, and E.P.W. Party, *Acute GvHD: pathogenesis and classification.* Bone Marrow Transplant, 2008. **41 Suppl 2**: p. S58-64.
12. Jagasia, M.H., H.T. Greinix, M. Arora, K.M. Williams, D. Wolff, E.W. Cowen, et al., *National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report.* Biol Blood Marrow Transplant, 2015. **21**(3): p. 389-401 e1.
13. Lee, S.J., *Classification systems for chronic graft-versus-host disease.* Blood, 2017. **129**(1): p. 30-37.
14. Socie, G. and J. Ritz, *Current issues in chronic graft-versus-host disease.* Blood, 2014. **124**(3): p. 374-84.
15. Mifflin, G., N.H. Russell, I. Franklin, G. Cook, D.W. Milligan, R.M. Hutchinson, et al., *An analysis of the effect of chronic GvHD on relapse and survival following allogeneic PBSC transplantation.* Cytotherapy, 2000. **2**(6): p. 423-8.
16. Weiden, P.L., N. Flournoy, E.D. Thomas, R. Prentice, A. Fefer, C.D. Buckner, et al., *Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts.* N Engl J Med, 1979. **300**(19): p. 1068-73.
17. Horowitz, M.M., R.P. Gale, P.M. Sondel, J.M. Goldman, J. Kersey, H.J. Kolb, et al., *Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation.* Blood, 1990. **75**(3): p. 555-62.

18. Gratwohl, A., R. Brand, J. Apperley, A. Biezen Av, G. Bandini, A. Devergie, et al., *Graft-versus-host disease and outcome in HLA-identical sibling transplantations for chronic myeloid leukemia*. *Blood*, 2002. **100**(12): p. 3877-86.
19. Kolb, H.J., A. Schattenberg, J.M. Goldman, B. Hertenstein, N. Jacobsen, W. Arcese, et al., *Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients*. *Blood*, 1995. **86**(5): p. 2041-50.
20. van Rhee, F. and H.J. Kolb, *Donor leukocyte transfusions for leukemic relapse*. *Curr Opin Hematol*, 1995. **2**(6): p. 423-30.
21. Lee, C.J., B.N. Savani, M. Mohty, N.C. Gorin, M. Labopin, A. Ruggeri, et al., *Post-remission strategies for the prevention of relapse following allogeneic hematopoietic cell transplantation for high-risk acute myeloid leukemia: expert review from the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation*. *Bone Marrow Transplant*, 2018.
22. Groger, M., N. Gagelmann, C. Wolschke, U.M. von Pein, E. Klyuchnikov, M. Christopeit, et al., *Long-Term Results of Prophylactic Donor Lymphocyte Infusions for Patients with Multiple Myeloma after Allogeneic Stem Cell Transplantation*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2018. **24**(7): p. 1399-1405.
23. Schroeder, T., C. Rautenberg, W. Kruger, U. Platzbecker, G. Bug, J. Steinmann, et al., *Treatment of relapsed AML and MDS after allogeneic stem cell transplantation with decitabine and DLI-a retrospective multicenter analysis on behalf of the German Cooperative Transplant Study Group*. *Ann Hematol*, 2018. **97**(2): p. 335-342.
24. Schober, S.J., I. von Luetichau, A. Wawer, M. Steinhauser, C. Salat, W. Schwinger, et al., *Donor lymphocyte infusions in adolescents and young adults for control of advanced pediatric sarcoma*. *Oncotarget*, 2018. **9**(32): p. 22741-22748.
25. Barrett, A.J., *Mechanisms of the graft-versus-leukemia reaction*. *Stem Cells*, 1997. **15**(4): p. 248-58.
26. Bader, P., J. Beck, A. Frey, P.G. Schlegel, H. Hebarth, R. Handgretinger, et al., *Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT*. *Bone Marrow Transplant*, 1998. **21**(5): p. 487-95.
27. Schmid, C., M. Schleuning, G. Ledderose, J. Tischer, and H.J. Kolb, *Sequential regimen of chemotherapy, reduced-intensity conditioning for allogeneic stem-cell transplantation, and prophylactic donor lymphocyte transfusion in high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(24): p. 5675-87.
28. Barnes, D.W., M.J. Corp, J.F. Loutit, and F.E. Neal, *Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication*. *Br Med J*, 1956. **2**(4993): p. 626-7.
29. Mathe, G., J.L. Amiel, L. Schwarzenberg, A. Cattani, M. Schneider, M.J. Devries, et al., *Successful Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Man: Chimerism, Induced Specific Tolerance and Possible Anti-Leukemic Effects*. *Blood*, 1965. **25**: p. 179-96.
30. Apperley, J.F., L. Jones, G. Hale, H. Waldmann, J. Hows, Y. Rombos, et al., *Bone marrow transplantation for patients with chronic myeloid leukaemia: T-cell depletion with Campath-1 reduces the incidence of graft-versus-host disease but may increase the risk of leukaemic relapse*. *Bone Marrow Transplant*, 1986. **1**(1): p. 53-66.
31. Maraninchi, D., E. Gluckman, D. Blaise, D. Guyotat, B. Rio, J.L. Pico, et al., *Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias*. *Lancet*, 1987. **2**(8552): p. 175-8.
32. Marmont, A.M., M.M. Horowitz, R.P. Gale, K. Sobocinski, R.C. Ash, D.W. van Bekkum, et al., *T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia*. *Blood*, 1991. **78**(8): p. 2120-30.
33. Grogg, D., S. Hahn, and P. Erb, *CD4+ T cell-mediated killing of major histocompatibility complex class II-positive antigen-presenting cells (APC). III. CD4+ cytotoxic T cells induce apoptosis of APC*. *Eur J Immunol*, 1992. **22**(1): p. 267-72.

34. Stalder, T., S. Hahn, and P. Erb, *Fas antigen is the major target molecule for CD4+ T cell-mediated cytotoxicity*. J Immunol, 1994. **152**(3): p. 1127-33.
35. Zychlinsky, A., L.M. Zheng, C.C. Liu, and J.D. Young, *Cytolytic lymphocytes induce both apoptosis and necrosis in target cells*. J Immunol, 1991. **146**(1): p. 393-400.
36. Susskind, B., M.D. Shornick, M.R. Iannotti, B. Duffy, P.T. Mehrotra, J.P. Siegel, et al., *Cytolytic effector mechanisms of human CD4+ cytotoxic T lymphocytes*. Hum Immunol, 1996. **45**(1): p. 64-75.
37. Ju, S.T., H. Cui, D.J. Panka, R. Ettinger, and A. Marshak-Rothstein, *Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD4+ Th1 and CD8+ cytotoxic T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4185-9.
38. Kagi, D., F. Vignaux, B. Ledermann, K. Burki, V. Depraetere, S. Nagata, et al., *Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity*. Science, 1994. **265**(5171): p. 528-30.
39. van der Harst, D., E. Goulmy, J.H. Falkenburg, Y.M. Kooij-Winkelaar, S.A. van Luxemburg-Heijs, H.M. Goselink, et al., *Recognition of minor histocompatibility antigens on lymphocytic and myeloid leukemic cells by cytotoxic T-cell clones*. Blood, 1994. **83**(4): p. 1060-6.
40. de Bueger, M., A. Bakker, J.J. Van Rood, F. Van der Woude, and E. Goulmy, *Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens. Ubiquitous versus restricted tissue distribution indicates heterogeneity among human cytotoxic T lymphocyte-defined non-MHC antigens*. J Immunol, 1992. **149**(5): p. 1788-94.
41. Wang, W., L.R. Meadows, J.M. den Haan, N.E. Sherman, Y. Chen, E. Blokland, et al., *Human H-Y: a male-specific histocompatibility antigen derived from the SMCY protein*. Science, 1995. **269**(5230): p. 1588-90.
42. Bleakley, M. and S.R. Riddell, *Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(5): p. 371-80.
43. den Haan, J.M., N.E. Sherman, E. Blokland, E. Huczko, F. Koning, J.W. Drijfhout, et al., *Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen*. Science, 1995. **268**(5216): p. 1476-80.
44. Dermime, S., D. Mavroudis, Y.Z. Jiang, N. Hensel, J. Molldrem, and A.J. Barrett, *Immune escape from a graft-versus-leukemia effect may play a role in the relapse of myeloid leukemias following allogeneic bone marrow transplantation*. Bone Marrow Transplant, 1997. **19**(10): p. 989-99.
45. Riddell, S.R., K.S. Watanabe, J.M. Goodrich, C.R. Li, M.E. Agha, and P.D. Greenberg, *Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones*. Science, 1992. **257**(5067): p. 238-41.
46. Walter, E.A., P.D. Greenberg, M.J. Gilbert, R.J. Finch, K.S. Watanabe, E.D. Thomas, et al., *Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor*. N Engl J Med, 1995. **333**(16): p. 1038-44.
47. Heslop, H.E., C.Y. Ng, C. Li, C.A. Smith, S.K. Loftin, R.A. Krance, et al., *Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes*. Nat Med, 1996. **2**(5): p. 551-5.
48. Dudley, M.E., J.R. Wunderlich, P.F. Robbins, J.C. Yang, P. Hwu, D.J. Schwartzentruber, et al., *Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes*. Science, 2002. **298**(5594): p. 850-4.
49. Yee, C., J.A. Thompson, D. Byrd, S.R. Riddell, P. Roche, E. Celis, et al., *Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16168-73.
50. Li, J.M., C.R. Giver, Y. Lu, M.S. Hossain, M. Akhtari, and E.K. Waller, *Separating graft-versus-leukemia from graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Immunotherapy, 2009. **1**(4): p. 599-621.

51. Molldrem, J., S. Dermime, K. Parker, Y.Z. Jiang, D. Mavroudis, N. Hensel, et al., *Targeted T-cell therapy for human leukemia: cytotoxic T lymphocytes specific for a peptide derived from proteinase 3 preferentially lyse human myeloid leukemia cells.* Blood, 1996. **88**(7): p. 2450-7.
52. Molldrem, J.J., E. Clave, Y.Z. Jiang, D. Mavroudis, A. Raptis, N. Hensel, et al., *Cytotoxic T lymphocytes specific for a nonpolymorphic proteinase 3 peptide preferentially inhibit chronic myeloid leukemia colony-forming units.* Blood, 1997. **90**(7): p. 2529-34.
53. Dengler, R., U. Munstermann, S. al-Batran, I. Hausner, S. Faderl, C. Nerl, et al., *Immunocytochemical and flow cytometric detection of proteinase 3 (myeloblastin) in normal and leukaemic myeloid cells.* Br J Haematol, 1995. **89**(2): p. 250-7.
54. Bocchia, M., T. Korontsvit, Q. Xu, S. Mackinnon, S.Y. Yang, A. Sette, et al., *Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides.* Blood, 1996. **87**(9): p. 3587-92.
55. Clark, R.E., I.A. Dodi, S.C. Hill, J.R. Lill, G. Aubert, A.R. Macintyre, et al., *Direct evidence that leukemic cells present HLA-associated immunogenic peptides derived from the BCR-ABL b3a2 fusion protein.* Blood, 2001. **98**(10): p. 2887-93.
56. Bacigalupo, A., K. Ballen, D. Rizzo, S. Giralt, H. Lazarus, V. Ho, et al., *Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions.* Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**(12): p. 1628-33.
57. Storb, R., *Can reduced-intensity allogeneic transplantation cure older adults with AML?* Best Pract Res Clin Haematol, 2007. **20**(1): p. 85-90.
58. Radujkovic, A., C. Guglielmi, S. Bergantini, S. Iacobelli, A. van Biezen, D. Milojkovic, et al., *Donor Lymphocyte Infusions for Chronic Myeloid Leukemia Relapsing after Allogeneic Stem Cell Transplantation: May We Predict Graft-versus-Leukemia Without Graft-versus-Host Disease?* Biol Blood Marrow Transplant, 2015. **21**(7): p. 1230-6.
59. van Rhee, F., F. Lin, J.O. Cullis, A. Spencer, N.C. Cross, A. Chase, et al., *Relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplant: the case for giving donor leukocyte transfusions before the onset of hematologic relapse.* Blood, 1994. **83**(11): p. 3377-83.
60. Koseki, H., K. Imai, F. Nakayama, T. Sado, K. Moriwaki, and M. Taniguchi, *Homogenous junctional sequence of the V14+ T-cell antigen receptor alpha chain expanded in unprimed mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(14): p. 5248-52.
61. Lantz, O. and A. Bendelac, *An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans.* J Exp Med, 1994. **180**(3): p. 1097-106.
62. Makino, Y., R. Kanno, T. Ito, K. Higashino, and M. Taniguchi, *Predominant expression of invariant V alpha 14+ TCR alpha chain in NK1.1+ T cell populations.* Int Immunol, 1995. **7**(7): p. 1157-61.
63. Godfrey, D.I., H.R. MacDonald, M. Kronenberg, M.J. Smyth, and L. Van Kaer, *NKT cells: what's in a name?* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 231-7.
64. Behar, S.M., T.A. Podrebarac, C.J. Roy, C.R. Wang, and M.B. Brenner, *Diverse TCRs recognize murine CD1.* J Immunol, 1999. **162**(1): p. 161-7.
65. Chiu, Y.H., J. Jayawardena, A. Weiss, D. Lee, S.H. Park, A. Dautry-Varsat, et al., *Distinct subsets of CD1d-restricted T cells recognize self-antigens loaded in different cellular compartments.* J Exp Med, 1999. **189**(1): p. 103-10.
66. Cardell, S., S. Tangri, S. Chan, M. Kronenberg, C. Benoist, and D. Mathis, *CD1-restricted CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice.* J Exp Med, 1995. **182**(4): p. 993-1004.
67. Park, S.H., A. Weiss, K. Benlagha, T. Kyin, L. Teyton, and A. Bendelac, *The mouse CD1d-restricted repertoire is dominated by a few autoreactive T cell receptor families.* J Exp Med, 2001. **193**(8): p. 893-904.
68. Skold, M., N.N. Faizunnessa, C.R. Wang, and S. Cardell, *CD1d-specific NK1.1+ T cells with a transgenic variant TCR.* J Immunol, 2000. **165**(1): p. 168-74.

69. Bendelac, A., *Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes.* J Exp Med, 1995. **182**(6): p. 2091-6.
70. Morita, M., K. Motoki, K. Akimoto, T. Natori, T. Sakai, E. Sawa, et al., *Structure-activity relationship of alpha-galactosylceramides against B16-bearing mice.* J Med Chem, 1995. **38**(12): p. 2176-87.
71. Kawano, T., J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, K. Motoki, et al., *CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides.* Science, 1997. **278**(5343): p. 1626-9.
72. Gumperz, J.E., S. Miyake, T. Yamamura, and M.B. Brenner, *Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining.* J Exp Med, 2002. **195**(5): p. 625-36.
73. Lee, P.T., K. Benlagha, L. Teyton, and A. Bendelac, *Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells.* J Exp Med, 2002. **195**(5): p. 637-41.
74. Montoya, C.J., D. Pollard, J. Martinson, K. Kumari, C. Wasserfall, C.B. Mulder, et al., *Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11.* Immunology, 2007. **122**(1): p. 1-14.
75. Metelitsa, L.S., O.V. Naidenko, A. Kant, H.W. Wu, M.J. Loza, B. Perussia, et al., *Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells.* J Immunol, 2001. **167**(6): p. 3114-22.
76. Carnaud, C., D. Lee, O. Donnars, S.H. Park, A. Beavis, Y. Koezuka, et al., *Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells.* J Immunol, 1999. **163**(9): p. 4647-50.
77. Eberl, G. and H.R. MacDonald, *Selective induction of NK cell proliferation and cytotoxicity by activated NKT cells.* Eur J Immunol, 2000. **30**(4): p. 985-92.
78. Gonzalez-Aseguinolaza, G., L. Van Kaer, C.C. Bergmann, J.M. Wilson, J. Schmiege, M. Kronenberg, et al., *Natural killer T cell ligand alpha-galactosylceramide enhances protective immunity induced by malaria vaccines.* J Exp Med, 2002. **195**(5): p. 617-24.
79. Singh, N., S. Hong, D.C. Scherer, I. Serizawa, N. Burdin, M. Kronenberg, et al., *Cutting edge: activation of NK T cells by CD1d and alpha-galactosylceramide directs conventional T cells to the acquisition of a Th2 phenotype.* J Immunol, 1999. **163**(5): p. 2373-7.
80. Nishimura, T., H. Kitamura, K. Iwakabe, T. Yahata, A. Ohta, M. Sato, et al., *The interface between innate and acquired immunity: glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes.* Int Immunol, 2000. **12**(7): p. 987-94.
81. Burdin, N., L. Brossay, and M. Kronenberg, *Immunization with alpha-galactosylceramide polarizes CD1-reactive NK T cells towards Th2 cytokine synthesis.* Eur J Immunol, 1999. **29**(6): p. 2014-25.
82. Nakagawa, R., I. Serizawa, K. Motoki, M. Sato, H. Ueno, R. Iijima, et al., *Antitumor activity of alpha-galactosylceramide, KRN7000, in mice with the melanoma B16 hepatic metastasis and immunohistological study of tumor infiltrating cells.* Oncol Res, 2000. **12**(2): p. 51-8.
83. Naumov, Y.N., K.S. Bahjat, R. Gausling, R. Abraham, M.A. Exley, Y. Koezuka, et al., *Activation of CD1d-restricted T cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13838-43.
84. Bendelac, A., P.B. Savage, and L. Teyton, *The biology of NKT cells.* Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 297-336.
85. Schneidawind, D., A. Pierini, and R.S. Negrin, *Regulatory T cells and natural killer T cells for modulation of GVHD following allogeneic hematopoietic cell transplantation.* Blood, 2013. **122**(18): p. 3116-21.

86. Leite-de-Moraes, M.C. and M. Dy, *Natural killer T cells: a potent cytokine-producing cell population*. Eur Cytokine Netw, 1997. **8**(3): p. 229-37.
87. Coquet, J.M., S. Chakravarti, K. Kyparissoudis, F.W. McNab, L.A. Pitt, B.S. McKenzie, et al., *Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(32): p. 11287-92.
88. O'Reilly, V., S.G. Zeng, G. Bricard, A. Atzberger, A.E. Hogan, J. Jackson, et al., *Distinct and overlapping effector functions of expanded human CD4+, CD8alpha+ and CD4-CD8alpha- invariant natural killer T cells*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28648.
89. Brennan, P.J., M. Brigl, and M.B. Brenner, *Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(2): p. 101-17.
90. Hong, S., M.T. Wilson, I. Serizawa, L. Wu, N. Singh, O.V. Naidenko, et al., *The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice*. Nat Med, 2001. **7**(9): p. 1052-6.
91. Mansour, S., A.S. Tocheva, J.P. Sanderson, L.M. Goulston, H. Platten, L. Serhal, et al., *Structural and Functional Changes of the Invariant NKT Clonal Repertoire in Early Rheumatoid Arthritis*. J Immunol, 2015. **195**(12): p. 5582-91.
92. van der Vliet, H.J., B.M. von Blomberg, N. Nishi, M. Reijm, A.E. Voskuyl, A.A. van Bodegraven, et al., *Circulating V(alpha24+) Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage*. Clin Immunol, 2001. **100**(2): p. 144-8.
93. Cho, Y.N., S.J. Kee, S.J. Lee, S.R. Seo, T.J. Kim, S.S. Lee, et al., *Numerical and functional deficiencies of natural killer T cells in systemic lupus erythematosus: their deficiency related to disease activity*. Rheumatology (Oxford), 2011. **50**(6): p. 1054-63.
94. Kojo, S., Y. Adachi, H. Keino, M. Taniguchi, and T. Sumida, *Dysfunction of T cell receptor AV24AJ18+, BV11+ double-negative regulatory natural killer T cells in autoimmune diseases*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(5): p. 1127-38.
95. Oishi, Y., T. Sumida, A. Sakamoto, Y. Kita, K. Kurasawa, Y. Nawata, et al., *Selective reduction and recovery of invariant Valpha24JalphaQ T cell receptor T cells in correlation with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol, 2001. **28**(2): p. 275-83.
96. Pecher, A.C., F. Kettemann, E. Asteriti, H. Schmid, S. Duerr-Stoerzer, H. Keppeler, et al., *Invariant natural killer T cells are functionally impaired in patients with systemic sclerosis*. Arthritis Res Ther, 2019. **21**(1): p. 212.
97. Cohen, N.R., R.V. Tatituri, A. Rivera, G.F. Watts, E.Y. Kim, A. Chiba, et al., *Innate recognition of cell wall beta-glucans drives invariant natural killer T cell responses against fungi*. Cell Host Microbe, 2011. **10**(5): p. 437-50.
98. Kawakami, K., N. Yamamoto, Y. Kinjo, K. Miyagi, C. Nakasone, K. Uezu, et al., *Critical role of Valpha14+ natural killer T cells in the innate phase of host protection against Streptococcus pneumoniae infection*. Eur J Immunol, 2003. **33**(12): p. 3322-30.
99. Vasan, S., M.A. Poles, A. Horowitz, E.E. Siladji, M. Markowitz, and M. Tsuji, *Function of NKT cells, potential anti-HIV effector cells, are improved by beginning HAART during acute HIV-1 infection*. Int Immunol, 2007. **19**(8): p. 943-51.
100. Moll, M., C. Kuylenstierna, V.D. Gonzalez, S.K. Andersson, L. Bosnjak, A. Sonnerborg, et al., *Severe functional impairment and elevated PD-1 expression in CD1d-restricted NKT cells retained during chronic HIV-1 infection*. Eur J Immunol, 2009. **39**(3): p. 902-11.
101. Mallevaey, T., J.P. Zanetta, C. Faveeuw, J. Fontaine, E. Maes, F. Platt, et al., *Activation of invariant NKT cells by the helminth parasite schistosoma mansoni*. J Immunol, 2006. **176**(4): p. 2476-85.

102. Kikuchi, A., M. Nieda, C. Schmidt, Y. Koezuka, S. Ishihara, Y. Ishikawa, et al., *In vitro anti-tumour activity of alpha-galactosylceramide-stimulated human invariant Valpha24+NKT cells against melanoma*. Br J Cancer, 2001. **85**(5): p. 741-6.
103. Akutsu, Y., T. Nakayama, M. Harada, T. Kawano, S. Motohashi, E. Shimizu, et al., *Expansion of lung V alpha 14 NKT cells by administration of alpha-galactosylceramide-pulsed dendritic cells*. Jpn J Cancer Res, 2002. **93**(4): p. 397-403.
104. Konishi, J., K. Yamazaki, H. Yokouchi, N. Shinagawa, K. Iwabuchi, and M. Nishimura, *The characteristics of human NKT cells in lung cancer--CD1d independent cytotoxicity against lung cancer cells by NKT cells and decreased human NKT cell response in lung cancer patients*. Hum Immunol, 2004. **65**(11): p. 1377-88.
105. Fujii, S., K. Shimizu, V. Klimek, M.D. Geller, S.D. Nimer, and M.V. Dhodapkar, *Severe and selective deficiency of interferon-gamma-producing invariant natural killer T cells in patients with myelodysplastic syndromes*. Br J Haematol, 2003. **122**(4): p. 617-22.
106. Dhodapkar, M.V., M.D. Geller, D.H. Chang, K. Shimizu, S. Fujii, K.M. Dhodapkar, et al., *A reversible defect in natural killer T cell function characterizes the progression of premalignant to malignant multiple myeloma*. J Exp Med, 2003. **197**(12): p. 1667-76.
107. Molling, J.W., J.A. Langius, J.A. Langendijk, C.R. Leemans, H.J. Bontkes, H.J. van der Vliet, et al., *Low levels of circulating invariant natural killer T cells predict poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. J Clin Oncol, 2007. **25**(7): p. 862-8.
108. Schneiders, F.L., R.C. de Bruin, A.J. van den Eertwegh, R.J. Scheper, C.R. Leemans, R.H. Brakenhoff, et al., *Circulating invariant natural killer T-cell numbers predict outcome in head and neck squamous cell carcinoma: updated analysis with 10-year follow-up*. J Clin Oncol, 2012. **30**(5): p. 567-70.
109. Tachibana, T., H. Onodera, T. Tsuruyama, A. Mori, S. Nagayama, H. Hiai, et al., *Increased intratumor Valpha24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(20): p. 7322-7.
110. Yanagisawa, K., K. Seino, Y. Ishikawa, M. Nozue, T. Todoroki, and K. Fukao, *Impaired proliferative response of V alpha 24 NKT cells from cancer patients against alpha-galactosylceramide*. J Immunol, 2002. **168**(12): p. 6494-9.
111. Tahir, S.M., O. Cheng, A. Shaulov, Y. Koezuka, G.J. Bubley, S.B. Wilson, et al., *Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer*. J Immunol, 2001. **167**(7): p. 4046-50.
112. Exley, M.A., L. Lynch, B. Varghese, M. Nowak, N. Alatrakchi, and S.P. Balk, *Developing understanding of the roles of CD1d-restricted T cell subsets in cancer: reversing tumor-induced defects*. Clin Immunol, 2011. **140**(2): p. 184-95.
113. Schneidawind, D., A. Pierini, M. Alvarez, Y. Pan, J. Baker, C. Buechele, et al., *CD4+ invariant natural killer T cells protect from murine GVHD lethality through expansion of donor CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells*. Blood, 2014. **124**(22): p. 3320-8.
114. Du, J., K. Paz, G. Thangavelu, D. Schneidawind, J. Baker, R. Flynn, et al., *Invariant natural killer T cells ameliorate murine chronic GVHD by expanding donor regulatory T cells*. Blood, 2017. **129**(23): p. 3121-3125.
115. Chaidos, A., S. Patterson, R. Szydlo, M.S. Chaudhry, F. Dazzi, E. Kanfer, et al., *Graft invariant natural killer T-cell dose predicts risk of acute graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Blood, 2012. **119**(21): p. 5030-6.
116. Rubio, M.T., L. Moreira-Teixeira, E. Bachy, M. Bouillie, P. Milpied, T. Coman, et al., *Early posttransplantation donor-derived invariant natural killer T-cell recovery predicts the occurrence of acute graft-versus-host disease and overall survival*. Blood, 2012. **120**(10): p. 2144-54.
117. Malard, F., M. Labopin, P. Chevallier, T. Guillaume, A. Duquesne, F. Riolland, et al., *Larger number of invariant natural killer T cells in PBSC allografts correlates with improved GVHD-free and progression-free survival*. Blood, 2016. **127**(14): p. 1828-35.

118. Jahnke, S., H. Schmid, K.A. Secker, J. Einhaus, S. Duerr-Stoerzer, H. Keppeler, et al., *Invariant NKT Cells From Donor Lymphocyte Infusions (DLI-iNKTs) Promote ex vivo Lysis of Leukemic Blasts in a CD1d-Dependent Manner*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 1542.
119. Schneidawind, C., S. Jahnke, I. Schober-Melms, M. Schumm, R. Handgretinger, C. Faul, et al., *G-CSF administration prior to donor lymphocyte apheresis promotes anti-leukaemic effects in allogeneic HCT patients*. *Br J Haematol*, 2019. **186**(1): p. 60-71.
120. Schmid, H., C. Schneidawind, S. Jahnke, F. Kettemann, K.A. Secker, S. Duerr-Stoerzer, et al., *Culture-Expanded Human Invariant Natural Killer T Cells Suppress T-Cell Alloreactivity and Eradicate Leukemia*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1817.
121. Kolb, H.J., J. Mittermuller, C. Clemm, E. Holler, G. Ledderose, G. Brehm, et al., *Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients*. *Blood*, 1990. **76**(12): p. 2462-5.
122. Marks, D.I., R. Lush, J. Cavenagh, D.W. Milligan, S. Schey, A. Parker, et al., *The toxicity and efficacy of donor lymphocyte infusions given after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation*. *Blood*, 2002. **100**(9): p. 3108-14.
123. Porter, D.L., E.P. Alyea, J.H. Antin, M. DeLima, E. Estey, J.H. Falkenburg, et al., *NCI First International Workshop on the Biology, Prevention, and Treatment of Relapse after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Report from the Committee on Treatment of Relapse after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2010. **16**(11): p. 1467-503.
124. Schmid, C., M. Labopin, A. Nagler, M. Bornhauser, J. Finke, A. Fassas, et al., *Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(31): p. 4938-45.
125. Jedlickova, Z., C. Schmid, C. Koenecke, B. Hertenstein, H. Baurmann, R. Schwerdtfeger, et al., *Long-term results of adjuvant donor lymphocyte transfusion in AML after allogeneic stem cell transplantation*. *Bone Marrow Transplant*, 2016. **51**(5): p. 663-7.
126. Bregni, M., A. Doderio, J. Peccatori, A. Pescarollo, M. Bernardi, I. Sassi, et al., *Nonmyeloablative conditioning followed by hematopoietic cell allografting and donor lymphocyte infusions for patients with metastatic renal and breast cancer*. *Blood*, 2002. **99**(11): p. 4234-6.
127. Barkholt, L., M. Bregni, M. Remberger, D. Blaise, J. Peccatori, G. Massenkeil, et al., *Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for metastatic renal carcinoma in Europe*. *Ann Oncol*, 2006. **17**(7): p. 1134-40.
128. Bethge, W.A., U. Hegenbart, M.J. Stuart, B.E. Storer, M.B. Maris, M.E. Flowers, et al., *Adoptive immunotherapy with donor lymphocyte infusions after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning*. *Blood*, 2004. **103**(3): p. 790-5.
129. Peggs, K.S., K. Thomson, D.P. Hart, J. Geary, E.C. Morris, K. Yong, et al., *Dose-escalated donor lymphocyte infusions following reduced intensity transplantation: toxicity, chimerism, and disease responses*. *Blood*, 2004. **103**(4): p. 1548-56.
130. Shimizu, J., S. Yamazaki, and S. Sakaguchi, *Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity*. *J Immunol*, 1999. **163**(10): p. 5211-8.
131. Onizuka, S., I. Tawara, J. Shimizu, S. Sakaguchi, T. Fujita, and E. Nakayama, *Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody*. *Cancer Res*, 1999. **59**(13): p. 3128-33.
132. Woo, E.Y., C.S. Chu, T.J. Goletz, K. Schlienger, H. Yeh, G. Coukos, et al., *Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer*. *Cancer Res*, 2001. **61**(12): p. 4766-72.

133. Thanarajasingam, G., H.T. Kim, C. Cutler, V.T. Ho, J. Koreth, E.P. Alyea, et al., *Outcome and prognostic factors for patients who relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2013. **19**(12): p. 1713-8.
134. Barrett, A.J. and M. Battiwalla, *Relapse after allogeneic stem cell transplantation*. Expert Rev Hematol, 2010. **3**(4): p. 429-41.
135. D'Souza A, F.C., *Current Uses and Outcomes of Hematopoietic Cell Transplantation (HCT): CIBMTR Summary Slides*. 2018.
136. Brunstein, C.G., J.S. Miller, Q. Cao, D.H. McKenna, K.L. Hippen, J. Curtsinger, et al., *Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics*. Blood, 2011. **117**(3): p. 1061-70.
137. Di Ianni, M., F. Falzetti, A. Carotti, A. Terenzi, B. Del Papa, K. Perruccio, et al., *Immunoselection and clinical use of T regulatory cells in HLA-haploidentical stem cell transplantation*. Best Pract Res Clin Haematol, 2011. **24**(3): p. 459-66.
138. Trzonkowski, P., M. Bieniaszewska, J. Juscinska, A. Dobyszyk, A. Krzystyniak, N. Marek, et al., *First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells*. Clin Immunol, 2009. **133**(1): p. 22-6.
139. Zorn, E., M. Mohseni, H. Kim, F. Porcheray, A. Lynch, R. Bellucci, et al., *Combined CD4+ donor lymphocyte infusion and low-dose recombinant IL-2 expand FOXP3+ regulatory T cells following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**(3): p. 382-8.
140. Koreth, J., K. Matsuoaka, H.T. Kim, S.M. McDonough, B. Bindra, E.P. Alyea, 3rd, et al., *Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease*. N Engl J Med, 2011. **365**(22): p. 2055-66.
141. Hongo, D., X. Tang, S. Dutt, R.G. Nador, and S. Strober, *Interactions between NKT cells and Tregs are required for tolerance to combined bone marrow and organ transplants*. Blood, 2012. **119**(6): p. 1581-9.
142. Imamura, M., Y. Tsutsumi, Y. Miura, T. Toubai, and J. Tanaka, *Immune reconstitution and tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Hematology, 2003. **8**(1): p. 19-26.
143. Nieda, M., A. Nicol, Y. Koezuka, A. Kikuchi, N. Lapteva, Y. Tanaka, et al., *TRAIL expression by activated human CD4(+)V alpha 24NKT cells induces in vitro and in vivo apoptosis of human acute myeloid leukemia cells*. Blood, 2001. **97**(7): p. 2067-74.
144. Chen, H. and W.E. Paul, *Cultured NK1.1+ CD4+ T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon activation by anti-CD3 or CD1*. J Immunol, 1997. **159**(5): p. 2240-9.
145. McEwen-Smith, R.M., M. Salio, and V. Cerundolo, *The regulatory role of invariant NKT cells in tumor immunity*. Cancer Immunol Res, 2015. **3**(5): p. 425-35.
146. Motohashi, S., A. Ishikawa, E. Ishikawa, M. Otsuji, T. Iizasa, H. Hanaoka, et al., *A phase I study of in vitro expanded natural killer T cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(20 Pt 1): p. 6079-86.
147. Yamasaki, K., S. Horiguchi, M. Kurosaki, N. Kunii, K. Nagato, H. Hanaoka, et al., *Induction of NKT cell-specific immune responses in cancer tissues after NKT cell-targeted adoptive immunotherapy*. Clin Immunol, 2011. **138**(3): p. 255-65.
148. Kunii, N., S. Horiguchi, S. Motohashi, H. Yamamoto, N. Ueno, S. Yamamoto, et al., *Combination therapy of in vitro-expanded natural killer T cells and alpha-galactosylceramide-pulsed antigen-presenting cells in patients with recurrent head and neck carcinoma*. Cancer Sci, 2009. **100**(6): p. 1092-8.
149. Giaccone, G., C.J. Punt, Y. Ando, R. Ruijter, N. Nishi, M. Peters, et al., *A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(12): p. 3702-9.

150. Parekh, V.V., M.T. Wilson, D. Olivares-Villagomez, A.K. Singh, L. Wu, C.R. Wang, et al., *Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice*. J Clin Invest, 2005. **115**(9): p. 2572-83.
151. Jenkins, M.K., D.M. Pardoll, J. Mizuguchi, T.M. Chused, and R.H. Schwartz, *Molecular Events in the Induction of a Nonresponsive State in Interleukin 2-Producing Helper Lymphocyte-T Clones*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987. **84**(15): p. 5409-5413.
152. Quill, H. and R.H. Schwartz, *Stimulation of normal inducer T cell clones with antigen presented by purified Ia molecules in planar lipid membranes: specific induction of a long-lived state of proliferative nonresponsiveness*. J Immunol, 1987. **138**(11): p. 3704-12.
153. Jenkins, M.K., C.A. Chen, G. Jung, D.L. Mueller, and R.H. Schwartz, *Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody*. J Immunol, 1990. **144**(1): p. 16-22.
154. Beverly, B., S.M. Kang, M.J. Lenardo, and R.H. Schwartz, *Reversal of in vitro T cell clonal anergy by IL-2 stimulation*. Int Immunol, 1992. **4**(6): p. 661-71.
155. Parekh, V.V., S. Lalani, S. Kim, R. Halder, M. Azuma, H. Yagita, et al., *PD-1/PD-L blockade prevents anergy induction and enhances the anti-tumor activities of glycolipid-activated invariant NKT cells*. J Immunol, 2009. **182**(5): p. 2816-26.
156. Fujii, S., K. Shimizu, M. Kronenberg, and R.M. Steinman, *Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs*. Nature Immunology, 2002. **3**(9): p. 867-+.
157. Exley, M.A., P. Friedlander, N. Alatrakchi, L. Vriend, S. Yue, T. Sasada, et al., *Adoptive Transfer of Invariant NKT Cells as Immunotherapy for Advanced Melanoma: A Phase I Clinical Trial*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(14): p. 3510-3519.
158. Chang, D.H., K. Osman, J. Connolly, A. Kukreja, J. Krasovskiy, M. Pack, et al., *Sustained expansion of NKT cells and antigen-specific T cells after injection of alpha-galactosylceramide loaded mature dendritic cells in cancer patients*. J Exp Med, 2005. **201**(9): p. 1503-17.
159. Ishikawa, A., S. Motohashi, E. Ishikawa, H. Fuchida, K. Higashino, M. Otsuji, et al., *A phase I study of alpha-galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(5): p. 1910-7.
160. Motohashi, S., K. Nagato, N. Kunii, H. Yamamoto, K. Yamasaki, K. Okita, et al., *A phase I-II study of alpha-galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer*. J Immunol, 2009. **182**(4): p. 2492-501.
161. Nagato, K., S. Motohashi, F. Ishibashi, K. Okita, K. Yamasaki, Y. Moriya, et al., *Accumulation of activated invariant natural killer T cells in the tumor microenvironment after alpha-galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells*. J Clin Immunol, 2012. **32**(5): p. 1071-81.
162. Nicol, A.J., A. Tazbirkova, and M. Nieda, *Comparison of clinical and immunological effects of intravenous and intradermal administration of alpha-galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(15): p. 5140-51.
163. Nieda, M., M. Okai, A. Tazbirkova, H. Lin, A. Yamaura, K. Ide, et al., *Therapeutic activation of Valpha24+Vbeta11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity*. Blood, 2004. **103**(2): p. 383-9.
164. Uchida, T., S. Horiguchi, Y. Tanaka, H. Yamamoto, N. Kunii, S. Motohashi, et al., *Phase I study of alpha-galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells administration to the nasal submucosa in unresectable or recurrent head and neck cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(3): p. 337-45.

165. Bezbradica, J.S., A.K. Stanic, N. Matsuki, H. Bour-Jordan, J.A. Bluestone, J.W. Thomas, et al., *Distinct roles of dendritic cells and B cells in Va14Ja18 natural T cell activation in vivo*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 4696-705.
166. Fujii, S., K. Shimizu, M. Kronenberg, and R.M. Steinman, *Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs*. Nat Immunol, 2002. **3**(9): p. 867-74.
167. Alter, G., J.M. Malenfant, and M. Altfeld, *CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity*. J Immunol Methods, 2004. **294**(1-2): p. 15-22.
168. Betts, M.R. and R.A. Koup, *Detection of T-cell degranulation: CD107a and b*. Methods Cell Biol, 2004. **75**: p. 497-512.
169. Watrang, E., T.S. Dalgaard, L.R. Norup, R.B. Kjaerup, A. Lunden, and H.R. Juul-Madsen, *CD107a as a marker of activation in chicken cytotoxic T cells*. J Immunol Methods, 2015. **419**: p. 35-47.
170. Sudworth, A., K.Z. Dai, J.T. Vaage, and L. Kveberg, *Degranulation Response in Cytotoxic Rat Lymphocytes Measured with a Novel CD107a Antibody*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 572.
171. Fernandez, C.S., G. Cameron, D.I. Godfrey, and S.J. Kent, *Ex-vivo alpha-galactosylceramide activation of NKT cells in humans and macaques*. J Immunol Methods, 2012. **382**(1-2): p. 150-9.
172. Aktas, E., U.C. Kucuksezer, S. Bilgic, G. Erten, and G. Deniz, *Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity*. Cell Immunol, 2009. **254**(2): p. 149-54.
173. Brossay, L., D. Jullien, S. Cardell, B.C. Sydora, N. Burdin, R.L. Modlin, et al., *Mouse CD1 is mainly expressed on hemopoietic-derived cells*. J Immunol, 1997. **159**(3): p. 1216-24.
174. Roark, J.H., S.H. Park, J. Jayawardena, U. Kavita, M. Shannon, and A. Bendelac, *CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells*. J Immunol, 1998. **160**(7): p. 3121-7.
175. Nowak, M., M.S. Arredouani, A. Tun-Kyi, I. Schmidt-Wolf, M.G. Sanda, S.P. Balk, et al., *Defective NKT cell activation by CD1d+ TRAMP prostate tumor cells is corrected by interleukin-12 with alpha-galactosylceramide*. PLoS One, 2010. **5**(6): p. e11311.
176. Hix, L.M., Y.H. Shi, R.R. Brutkiewicz, P.L. Stein, C.R. Wang, and M. Zhang, *CD1d-expressing breast cancer cells modulate NKT cell-mediated antitumor immunity in a murine model of breast cancer metastasis*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20702.
177. Chong, T.W., F.Y. Goh, M.Y. Sim, H.H. Huang, A.A. Thike, W.K. Lim, et al., *CD1d expression in renal cell carcinoma is associated with higher relapse rates, poorer cancer-specific and overall survival*. J Clin Pathol, 2015. **68**(3): p. 200-5.
178. Dhodapkar, K.M., B. Cirignano, F. Chamian, D. Zagzag, D.C. Miller, J.L. Finlay, et al., *Invariant natural killer T cells are preserved in patients with glioma and exhibit antitumor lytic activity following dendritic cell-mediated expansion*. Int J Cancer, 2004. **109**(6): p. 893-9.
179. Liu, D., L. Song, V.S. Brawley, N. Robison, J. Wei, X. Gao, et al., *Medulloblastoma expresses CD1d and can be targeted for immunotherapy with NKT cells*. Clin Immunol, 2013. **149**(1): p. 55-64.
180. Spanoudakis, E., M. Hu, K. Naresh, E. Terpos, V. Melo, A. Reid, et al., *Regulation of multiple myeloma survival and progression by CD1d*. Blood, 2009. **113**(11): p. 2498-507.
181. Bassiri, H., R. Das, P. Guan, D.M. Barrett, P.J. Brennan, P.P. Banerjee, et al., *iNKT cell cytotoxic responses control T-lymphoma growth in vitro and in vivo*. Cancer Immunol Res, 2014. **2**(1): p. 59-69.
182. Dao, T., W.Z. Mehal, and I.N. Crispe, *IL-18 augments perforin-dependent cytotoxicity of liver NK-T cells*. J Immunol, 1998. **161**(5): p. 2217-22.

183. van den Broek, M.E., D. Kagi, F. Ossendorp, R. Toes, S. Vamvakas, W.K. Lutz, et al., *Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice*. J Exp Med, 1996. **184**(5): p. 1781-90.
184. Hagihara, M., B. Gansuud, Y. Ueda, T. Tsuchiya, A. Masui, K. Tazume, et al., *Killing activity of human umbilical cord blood-derived TCRValpha24(+) NKT cells against normal and malignant hematological cells in vitro: a comparative study with NK cells or OKT3 activated T lymphocytes or with adult peripheral blood NKT cells*. Cancer Immunol Immunother, 2002. **51**(1): p. 1-8.
185. Leite-De-Moraes, M.C., A. Hameg, A. Arnould, F. Machavoine, Y. Koezuka, E. Schneider, et al., *A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement*. J Immunol, 1999. **163**(11): p. 5871-6.
186. Wingender, G., P. Krebs, B. Beutler, and M. Kronenberg, *Antigen-specific cytotoxicity by invariant NKT cells in vivo is CD95/CD178-dependent and is correlated with antigenic potency*. J Immunol, 2010. **185**(5): p. 2721-9.
187. Salio, M., J.D. Silk, E.Y. Jones, and V. Cerundolo, *Biology of CD1- and MR1-restricted T cells*. Annu Rev Immunol, 2014. **32**: p. 323-66.
188. Constantinides, M.G. and A. Bendelac, *Transcriptional regulation of the NKT cell lineage*. Curr Opin Immunol, 2013. **25**(2): p. 161-7.
189. Rossjohn, J., D.G. Pellicci, O. Patel, L. Gapin, and D.I. Godfrey, *Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(12): p. 845-57.
190. Hermans, I.F., J.D. Silk, U. Gileadi, M. Salio, B. Mathew, G. Ritter, et al., *NKT cells enhance CD4+ and CD8+ T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells*. J Immunol, 2003. **171**(10): p. 5140-7.
191. Fujii, S., K. Shimizu, C. Smith, L. Bonifaz, and R.M. Steinman, *Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein*. J Exp Med, 2003. **198**(2): p. 267-79.
192. Moreno, M., J.W. Molling, S. von Mensdorff-Pouilly, R.H. Verheijen, E. Hooijberg, D. Kramer, et al., *IFN-gamma-producing human invariant NKT cells promote tumor-associated antigen-specific cytotoxic T cell responses*. J Immunol, 2008. **181**(4): p. 2446-54.
193. Silk, J.D., I.F. Hermans, U. Gileadi, T.W. Chong, D. Shepherd, M. Salio, et al., *Utilizing the adjuvant properties of CD1d-dependent NK T cells in T cell-mediated immunotherapy*. J Clin Invest, 2004. **114**(12): p. 1800-11.
194. Dockry, E., S. O'Leary, L.E. Gleeson, J. Lyons, J. Keane, S.G. Gray, et al., *Epigenetic induction of CD1d expression primes lung cancer cells for killing by invariant natural killer T cells*. Oncoimmunology, 2018. **7**(6): p. e1428156.
195. Heczey, A., D. Liu, G. Tian, A.N. Courtney, J. Wei, E. Marinova, et al., *Invariant NKT cells with chimeric antigen receptor provide a novel platform for safe and effective cancer immunotherapy*. Blood, 2014. **124**(18): p. 2824-33.
196. Mori, S., A. Jewett, K. Murakami-Mori, M. Cavalcanti, and B. Bonavida, *The participation of the Fas-mediated cytotoxic pathway by natural killer cells is tumor-cell-dependent*. Cancer Immunol Immunother, 1997. **44**(5): p. 282-90.
197. Dou, R., Z. Hong, X. Tan, F. Hu, Y. Ding, W. Wang, et al., *Fas/FasL interaction mediates imbalanced cytokine/cytotoxicity responses of iNKT cells against Jurkat cells*. Mol Immunol, 2018. **99**: p. 145-153.
198. Lisbonne, M., P. Hachem, M.B. Tonanny, J.M. Fourneau, S. Sidobre, M. Kronenberg, et al., *In vivo activation of invariant V alpha 14 natural killer T cells by alpha-galactosylceramide sequentially induces Fas-dependent and -independent cytotoxicity*. Eur J Immunol, 2004. **34**(5): p. 1381-8.
199. Filipazzi, P., R. Valenti, V. Huber, L. Pilla, P. Canese, M. Iero, et al., *Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with*

- modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine.* J Clin Oncol, 2007. **25**(18): p. 2546-53.
200. De Santo, C., M. Salio, S.H. Masri, L.Y. Lee, T. Dong, A.O. Speak, et al., *Invariant NKT cells reduce the immunosuppressive activity of influenza A virus-induced myeloid-derived suppressor cells in mice and humans.* J Clin Invest, 2008. **118**(12): p. 4036-48.
201. De Santo, C., R. Arscott, S. Booth, I. Karydis, M. Jones, R. Asher, et al., *Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A.* Nat Immunol, 2010. **11**(11): p. 1039-46.
202. Song, L., S. Asgharzadeh, J. Salo, K. Engell, H.W. Wu, R. Sposto, et al., *Valpha24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages.* J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1524-36.
203. Dascher, C.C. and M.B. Brenner, *Evolutionary constraints on CD1 structure: insights from comparative genomic analysis.* Trends Immunol, 2003. **24**(8): p. 412-8.
204. Chen, Y.B., Y.A. Efebera, L. Johnston, E.D. Ball, D. Avigan, L.J. Lekakis, et al., *Increased Foxp3(+)Helios(+) Regulatory T Cells and Decreased Acute Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Patients Receiving Sirolimus and RGI-2001, an Activator of Invariant Natural Killer T Cells.* Biol Blood Marrow Transplant, 2017. **23**(4): p. 625-634.

14 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik/Innere Medizin II des Universitätsklinikums Tübingen in der Arbeitsgruppe PD Dr. Schneidawind unter Betreuung von Prof. Dr. Wolfgang Bethge und PD Dr. Dominik Schneidawind durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch PD Dr. Dominik Schneidawind in Zusammenarbeit mit Hannes Schmid, MSc Biologie, naturwissenschaftlicher Doktorand.

Die Erhebung der klinischen Patientendaten sowie die durchflusszytometrische Analyse der DLIs erfolgten, bei letzterer nach Einarbeitung durch Hannes Schmid, durch mich und leisteten meinen Beitrag zur Publikation *G-CSF administration prior to donor lymphocyte apheresis promotes anti-leukaemic effects in allogeneic HCT patients* von Schneidawind et al., 2019 im *British Journal of Haematology*.

Die Versuche zur durchflusszytometrischen Analyse von DLIs, zur iNKT-Zell-Expansion, Aufreinigung und Tumorzelllyse von Tumorzelllinien und primären AML-Blasten wurden nach Einarbeitung durch Hannes Schmid von mir eigenständig durchgeführt. Die Etablierung, Durchführung und Auswertung der Versuche zur CD107a-Degranulation erfolgte eigenständig durch mich.

Die Versuche zur Messung von Zytokinen (*LegendPlex*) wurden nach Einarbeitung durch Hannes Schmid und Dr. rer. nat. Jennifer Richardson in Zusammenarbeit mit Hannes Schmid und Dr. rer. nat. Jennifer Richardson durchgeführt.

Die Versuche zur Tumorzelllyse in einer HLA-identischen Situation zwischen Spender und Empfänger wurden nach Einarbeitung durch Hannes Schmid durch mich eigenständig durchgeführt und leisteten meinen Beitrag zur Publikation *Culture-expanded human invariant natural killer T cells suppress T-cell alloreactivity and eradicate leukemia* von Schmid et al., 2018 in *Frontiers in Immunology*.

Die Methode zur Gewinnung von Zytozentrifugenpräparaten (*Cytospins*) wurde nach Einarbeitung durch Kathy-Ann Secker mit Unterstützung von Kathy-Ann Secker durchgeführt.

Die Informationen zum Immunphänotyp der primären AML-Blasten stammen aus der klinikinternen Datenbank und wurden durch das FACS-Labor des Universitätsklinikums Tübingen, Abteilung Innere Medizin II gewonnen. Angaben zu FLT3- und NPM1-Mutationen wurden der klinikinternen Datenbank des Universitätsklinikum Tübingen entnommen.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch PD Dr. Dominik Schneidawind eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Dieser Dissertation zugrunde liegt die Publikation *Invariant NKT cells from donor lymphocyte infusions (DLI-iNKTs) promote ex vivo lysis of leukemic blasts in a CD1d-dependent manner*, für die ich als Erstautorin in Zusammenarbeit mit PD Dr. Dominik Schneidawind und nach Einarbeitung durch Hannes Schmid alle Experimente geplant, durchgeführt und ausgewertet habe und deren Manuskript ich in Zusammenarbeit mit PD Dr. Dominik Schneidawind selbstständig verfasst habe. Alle Abbildungen wurden von mir selbstständig erstellt und sind aus der Publikation übernommen und teils abgeändert worden.

Tübingen, den 26.11.2019

15 Danksagung

Mein größter Dank gilt Professor Bethge und PD Dr. Dominik Schneidawind für die herausragende Betreuung meiner Arbeit. Von den ersten Anfängen über die Publikation unseres gemeinsamen Papers bis zur Fertigstellung der Doktorarbeit begleiteten Sie jeden meiner Schritte und standen immer beratend und motivierend zur Seite – vielen Dank!

Ganz besonders hervorheben möchte ich auch meine Arbeitsgruppe, die AG Dr. Schneidawind unter Leitung von Dr. Corina Schneidawind und PD Dr. Dominik Schneidawind: Vielen Dank dafür, dass ich Teil des Laborteams sein darf, vielen Dank für die fantastische Stimmung und die vielen gemeinsamen Stunden, vielen Dank ganz besonders an Hannes Schmid, Kathy-Ann Secker, Silke Dürr-Störzer und Hildegard Keppeler für die Unterstützung und die Ratschläge in jeder Lebenslage! PD Dr. Dominik und Dr. Corina Schneidawind danke ich neben der wirklich immer blitzschnellen Antworten auf meine Fragen besonders dafür, dass sie mich von Anfang an gefördert haben, zu Konferenzteilnahmen ermutigt und immer unterstützt haben! Ein großes Danke an das ganze Labor, ich hätte es nicht besser treffen können!

Außerdem danke ich den Mitgliedern der AG Autenrieth und AG Salih für all die Ratschläge und den Austausch.

Mein Dank gilt weiterhin dem Team des Stammzelllabors der Kinderklinik und der medizinischen Klinik für die Unterstützung bei der Gewinnung der DLIs, ohne die dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Vielen Dank an meine großartige Familie und meinen Freundeskreis für alles! Ein ganz besonderes Dankeschön an dich, Rebecca – so schön, dass wir den ganzen Weg trotz unterschiedlicher Labore gemeinsam gegangen sind!