

Aus dem Bereich der Biophysik
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg Saar

Einfluss der R-CHOP Therapie auf die Verteilung und die Funktion von Immunzellen bei Patienten mit aggressivem Non-Hodgkin-Lymphom

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes 2022

vorgelegt von

Sylvia Zöphel

Geb. am 17.10.1982 in Oelsnitz/V.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
1. Einleitung	5
1.1. Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom	5
1.1.1. Einteilungen des diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms	6
1.1.2. Behandlung des diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms	7
1.2. Rituximab	8
1.2.1. Wirkweise von Rituximab	8
1.3. Natürliche Killerzellen	10
1.3.1. Aktivierung von NK Zellen	10
1.3.2. NK Zell-Untergruppen	11
1.4. Konventionelle und unkonventionelle CD3 ⁺ T-Zellen	12
1.4.1. Natürliche Killer T-Zellen	13
1.4.2. $\gamma\delta$ T-Zellen	15
1.5. Zielsetzung	16
2. Material und Methoden	17
2.1. Material	17
2.1.1. Antikörper	17
2.1.2. Reagenzien	18
2.1.3. Lösungen	18
2.1.4. Verbrauchsmaterialien	19
2.1.5. Laborgeräte	19
2.1.6. Zellen und Zelllinien	20
2.1.7. Software	21
2.2. Methoden	21
2.2.1. Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes	21
2.2.2. Aufreinigung von natürlichen Killerzellen und CD3 ⁺ T-Zellen	22
2.2.3. Durchflusszytometrische Analyse	24
2.2.4. Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen	25
2.2.5. Real-Time-Killing-Assay	25
2.2.6. Statistik	26
3. Ergebnisse	27
3.2. Untersuchung der Zusammensetzung der PBMC	28
3.2.5. Quantitativ veränderte Granulozyten bei Patienten mit DLBCL	29
3.2.6. Quantitative Veränderung der Monozyten und ihrer Subpopulationen bei Patienten mit DLBCL	31
3.2.7. Quantitative Änderung der B-Zellen durch die R-CHOP Therapie bei Patienten mit DLBCL	36

3.2.8. Quantitative Veränderung der T-Zellen und ihrer Subpopulationen bei Patienten mit DLBCL.....	37
3.2.9. Quantitative Änderung der NK Zellen durch die R-CHOP Therapie bei Patienten mit DLBCL.....	41
3.3. Untersuchung der zytotoxischen Funktion von NK Zellen	42
3.4. Untersuchung der zytotoxischen Funktion von CD3 ⁺ T-Zellen	45
3.5. Einfluss des Anteils CD16 ⁺ Monozyten auf die Prognose von DLBCL Patienten	49
4. Diskussion	51
4.2. Quantitative Bestimmung der Granulozyten bei DLBCL Patienten.....	51
4.3. Quantitative Bestimmung der Monozyten bei DLBCL Patienten.....	53
4.4. Quantitative und funktionelle Untersuchung der NK Zellen bei Patienten mit DLBCL.....	56
4.5. Quantitative Untersuchung der CD3 ⁺ T-Zellen bei Patienten mit DLBCL	58
4.6. Untersuchung der zytotoxischen Funktion der CD3 ⁺ T-Zellen bei Patienten mit DLBCL.....	59
4.6.1. Zytotoxische Aktivität der T-Zellen gegen K562 Zellen.....	60
4.6.2. Zytotoxische Aktivität der T-Zellen gegen U-2932 Zellen	62
5. Literaturverzeichnis	64
6. Anhang	82
6.1. Abbildungsverzeichnis	82
6.2. Tabellenverzeichnis	83
6.3. Abkürzungsverzeichnis	84
Danksagung	86
Veröffentlichungen	87
Lebenslauf.....	87

Zusammenfassung

Das häufig auftretende diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) wird als Standardtherapie mit einer Kombination aus Chemotherapie und dem zusätzlichen Einsatz des therapeutischen anti-CD20 Antikörpers Rituximab behandelt. Trotzdem kommt es bei ca. 30-50 % der Patienten zur Bildung eines Rezidivs oder die Patienten werden refraktär. Daher stellt eine bessere prognostische Beurteilung der Patienten einen wichtigen Schritt in der Entwicklung einer individualisierten Therapie bei Non-Hodgkin-Lymphomen dar.

Innerhalb dieser Arbeit wurden jeweils 27 ml EDTA-Blut (3 x 9 ml) von insgesamt 33 DLBCL Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Diagnosestellung, Verlauf der Therapie und Nachsorge) analysiert, um einen Überblick über quantitative und qualitative Veränderungen der im Blut zirkulierenden Immunzellen zu erhalten. Als Referenzpunkt diente das Blut, das zum Zeitpunkt der „Diagnosestellung“ abgenommen wurde, das zudem mit Blut immunologisch gesunder Spender verglichen wurde. Im weiteren Therapieverlauf, wenn klinisch möglich, wurde das Blut jedes Patienten jeweils vor Rituximab-Gabe zu allen 6-8 Zyklen R-CHOP untersucht. Nach Therapie folgte eine Blutabnahme alle drei Monate zum Nachsorgetermin, sodass der erste in diese Studie eingegangene Patient bereits über einen Zeitraum von drei Jahren untersucht wurde. Aus allen Blutproben wurden PBMC (periphere mononukleäre Zellen) aufgereinigt und durchflusszytometrisch untersucht. Folgende Subpopulationen wurden durch die Verwendung unterschiedlicher Antikörper und einer entsprechenden Gatingstrategie identifiziert: Leukozyten (Singlets, CD45⁺), Granulozyten (FSC-A/SSC-A), Lymphozyten (CD45⁺/CD14⁻) und Monozyten (CD45⁺/CD14⁺). Die Lymphozytenpopulation wurde dann weiter unterteilt in T-Zellen (CD3⁺, mögliche Auftrennung in CD4⁺/CD8⁺), B-Zellen (CD19⁺) und NK Zellen (CD56⁺, CD3⁻, CD19⁻). Da die Bindung des CD20 Antikörpers Rituximab über den Fcγ-Rezeptor CD16 vermittelt wird, wurden die NK Zellen, T-Zellen und Monozyten zusätzlich hinsichtlich ihrer CD16 Expression analysiert. Zudem wird die CD56 Expression in T-Zellen und Monozyten mit Tumorerkrankungen assoziiert, sodass diese Zellpopulationen auch auf ihre CD56-Expression hin untersucht wurden. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ergaben sich für den prozentualen Anteil der NK und B-Zellen (gemessen an den CD45⁺ Leukozyten) keine Unterschiede im Vergleich zu gesunden Spendern. Der Anteil an Granulozyten und T-Zellen war überraschenderweise verringert und der Anteil an Monozyten erhöht. Hier war insbesondere auch der Anteil der CD16⁺ Monozyten im Vergleich zu gesunden Spendern erhöht und korrelierte negativ mit der Prognose der Patienten. Zudem zeigte sich ein zusätzlicher Anstieg der CD16⁺ Monozyten über den Therapieverlauf. Funktional wurde in dieser Studie das Tötungsverhalten von NK und T-Zellen im Populationskillingassay untersucht. Als Zielzelllinien wurden MHC I-defiziente K562-Zellen (natürliche Zytotoxizität) und die CD20⁺ DLBCL-Zelllinie U-2932 verwendet. Das

Killing der U-2932 wurde über Rituximab vermittelt, wobei der Fc-Teil an CD16⁺ NK bzw. T-Zellen bindet, um eine Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) zu induzieren. Hierbei zeigte sich keine veränderte Zytotoxizität der NK Zellen sowohl im Therapieverlauf als auch im Vergleich zu gesunden Kontrollspendern. Das T-Zellkilling war hingegen sowohl Rituximab-spezifisch gegen U-2932 als auch gegen K562-Zellen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die für diese Zytotoxizität verantwortlichen Zellen sind wahrscheinlich unkonventionelle T-Zellen, wie NKT-Zellen oder $\gamma\delta$ T-Zellen. Diese Zellen lysieren ihre Zielzelllinien Antigen-unspezifisch und werden mit wichtigen Funktionen bei der Tumormunität in Zusammenhang gebracht. Die genaue Bestimmung der verantwortlichen Zellen ging über den Rahmen dieser Studie hinaus, wird aber innerhalb unserer Arbeitsgruppe weiter untersucht, da das Vorhandensein der Zellen im Blut bei DLBCL Patienten ein wichtiger immunologischer Parameter sein könnte.

Mit dieser Studie wurde die Aufreinigung, die durchflusszytometrische und funktionelle Analyse von Blutproben von DLBCL Patienten in unserem Labor grundlegend etabliert. Daraus haben sich Folgearbeiten, wie die genetische Untersuchung unterschiedlicher Polymorphismen, Zytokin- und Vitamin D-Spiegel Analysen im Plasma und die Bestimmung weiterer Oberflächenrezeptoren, z.B. mittels CyTOF, ergeben. Damit erhoffen wir uns weitere immunologisch relevante Unterschiede zu finden bzw. die in dieser Studie bereits gefundenen Unterschiede genauer zu charakterisieren, um eine diagnostische oder prognostische Relevanz bestimmen zu können.

Summary

The standard therapy for the common diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is a combination of chemotherapy (CHOP) with the additional use of the therapeutic anti-CD20 antibody Rituximab. Nevertheless, approximately 30-50 % of patients develop a relapse or become refractory. Therefore, a better prognostic assessment of patients represents an important step in the development of individualized therapy for non-Hodgkin lymphoma.

Within this work, 27 ml EDTA blood (3 x 9 ml) each from a total of 33 DLBCL patients were analysed at different time points (diagnosis, course of therapy and follow-up) to obtain an overview of quantitative and qualitative changes of the immune cells circulating in the blood. The blood samples taken at the time of "diagnosis" served as the reference point and was compared with blood samples from healthy controls. In the further course, when clinically possible, the blood of each patient was analysed every 6-8 cycles of R-CHOP before rituximab administration. After therapy, blood sampling followed every three months at the follow-up appointment, so that the first patient included in this study had already been examined over a period of three years. PBMC (peripheral blood mononuclear cells) were purified from all blood samples and analysed by flow cytometry. The following subpopulations were identified by using different antibodies and an appropriate gating strategy: leukocytes (singlets, CD45⁺), granulocytes (FSC A/SSC-A), lymphocytes (CD45⁺/CD14⁻) and monocytes (CD45⁺/CD14⁺). The lymphocyte population was then further subdivided into T cells (CD3⁺, possible separation into CD4⁺/CD8⁺), B cells (CD19⁺) and NK cells (CD56⁺, CD3⁻, CD19⁻). Since the binding of the CD20 antibody rituximab is mediated by the Fcγ receptor CD16, the NK cells, T cells and monocytes were additionally analysed for their CD16 expression. In addition, CD56 expression in T cells and monocytes is associated with tumour disease, consequently these cell populations were also analysed for CD56 expression. At the time of diagnosis, there were no differences in the percentage of NK and B cells (measured by CD45⁺ leukocytes) compared with healthy donors. Surprisingly, the percentage of granulocytes and T cells was decreased and the percentage of monocytes was increased. In particular, the proportion of CD16⁺ monocytes was also increased compared to healthy controls and correlated negatively with the prognosis of the patients. Furthermore, an additional increase of CD16⁺ monocytes was shown over the course of therapy. Functionally, this study investigated the killing behaviour of NK and T cells in the population killing assay. MHC I-deficient K562 cells (natural cytotoxicity) and the CD20⁺ DLBCL cell line U-2932 were used as target cell lines. Killing of U-2932 was mediated via rituximab, with the Fc portion binding to CD16⁺ NK or T cells to induce antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). Here, there was no altered cytotoxicity of NK cells both during the course of therapy and compared to healthy controls. In contrast, T cell killing was significantly increased, both rituximab-specific against U-2932 and against K562 cells at the time of diagnosis compared to the control group. These cells lyse

their target cell lines in an antigen-unspecific manner and are associated with important functions in tumour immunity. The exact determination of the responsible cells was outside the frame of this study, but will be further investigated within our group, as the presence of these cells in the blood might be an important immunological parameter in DLBCL patients.

This study fundamentally established the purification, flow cytometric and functional analysis of blood samples from DLBCL patients in our laboratory. This has resulted in follow-up work, such as the genetic investigation of different polymorphisms, cytokine and vitamin D level analyses in plasma, and the determination of additional surface receptors, e.g., by CyTOF. Thus, we hope to find further immunologically relevant differences or rather to characterize the differences already found in this study more precisely in order to be able to determine a diagnostic or prognostic relevance.

1. Einleitung

Das menschliche Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk bestehend aus Zellen, Geweben und Organen, deren Zusammenwirken die Erkennung und Eliminierung von Pathogenen wie Viren, Bakterien und Parasiten aber auch von körpereigenen entarteten Zellen ermöglicht. Zum angeborenen Immunsystem gehören die Zellen der myeloischen Reihe wie Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen, aber auch natürliche Killerzellen (NK Zellen) als Vertreter der Lymphozyten. Granulozyten können je nach Morphologie und Färbeverhalten in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten unterteilt werden. Dabei sind die neutrophilen Granulozyten mit ca. 70 % die häufigsten Leukozyten im peripheren Blut [Blanco-camarillo 2021]. Der Anteil der eosinophilen und basophilen Granulozyten im peripheren Blut hingegen liegt bei unter 5 %. Aufgrund ihres unregelmäßig geformten Zellkerns werden Granulozyten auch als polymorphkernige Leukozyten bezeichnet. Alle anderen Leukozyten werden als mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) zusammengefasst. Bei den Monozyten handelt es sich dabei um angeborene Zellen des mononukleären Phagozytensystems, die sich als wichtige Regulatoren der Krebsentwicklung und -progression erwiesen haben. Ihr Anteil an den PBMC beträgt ca. 30-40 % [Knörck 2018]. Derzeit gibt es drei Untergruppen von Monozyten, die klassischen ($CD14^+CD16^-$), die nichtklassischen ($CD14^{low}CD16^+$) und intermediären Monozyten ($CD14^+CD16^+$) [Ziegler-Heitbrock 2010]. Bei Krebserkrankungen übernehmen die verschiedenen Untergruppen von Monozyten Funktionen, die sowohl zur pro- als auch zur anti-tumoralen Immunität beitragen, darunter Phagozytose, Sekretion von tumoriziden Mediatoren, Förderung der Angiogenese, Umbau der extrazellulären Matrix, Rekrutierung von Lymphozyten und Differenzierung in tumorassoziierte Makrophagen und dendritische Zellen [Olingy 2019]. Neben den zellulären Komponenten gehören auch Moleküle des Komplementsystems zur angeborenen Immunantwort. Das adaptive Immunsystem besteht ebenfalls aus einer humoralen und einer zellulären Immunantwort. Die Hauptkomponenten der zellulären Immunantwort bilden dabei die T- und B-Lymphozyten, die durch humorale Komponenten wie spezifische Immunglobuline verstärkt wird. Klassische T-Zellen lassen sich in $CD4^+$ T-Helferzellen und $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen unterteilen. Der Anteil der $CD4^+$ T-Zellen beträgt ca. 25-60 % der PBMC, der Anteil der $CD8^+$ T-Zellen 5-30 % [Knörck 2018]. B-Zellen sind antikörperproduzierende Lymphozyten, die bis zu 15 % der PBMC ausmachen. [Knörck 2018].

1.1. Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom

Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) gehört zu den aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen. Lymphome sind Tumore des lymphatischen Systems. Dabei zählen 10 % der Lymphome zu den Hodgkin Lymphomen und die verbleibenden 90 % zu den

Non-Hodgkin-Lymphomen. Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom ist dabei die häufigste Form aller Non-Hodgkin-Lymphome [Armitage 1998, 2017, Papageorgiou 2022, Ta 2022]. Morphologisch charakterisiert ist das diffus großzellige B-Zell-Lymphom durch eine diffuse Infiltration der Lymphknoten mit mittleren- bis großen Zellen. Diese sind dabei reich an Zytoplasma und haben einen mehr als doppelt so großen Zellkern als normale Lymphozyten. Aufgrund ihrer Größe und des diffusen Wachstums zerstören sie die Architektur des betroffenen Lymphknotens [Y. Liu 2019, Martelli 2013]. Sie exprimieren typischerweise pan-B-Zell-Antigene, wie CD19, CD20, CD22, CD79a und CD45 [Y. Liu 2019]. Neben dem Befall der Lymphknoten, kann das DLBCL auch von verschiedenen extranodalen Stellen, wie zum Beispiel dem Gastrointestinaltrakt [Alvarez-Lesmes 2021, Calomino 2022], dem Kopf- und Halsbereich [Kwok 2022] oder dem Urogenitaltrakt [Z.-H. Liu 2021] ausgehen.

1.1.1. Einteilungen des diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms

Alizadeh *et al.* untersuchten die Genexpressionsprofile von Lymphozytenproben von 96 DLBCL Patienten und gesunden Spendern. Anhand dieser Analyse teilten sie das DLBCL basierend der Ursprungszelle (*cell of origin* – COO) ein [Alizadeh 2000, Y. Liu 2019]. Anhand der Ähnlichkeiten der Genexpression mit der mutmaßlichen Ursprungszelle lassen sich die beiden Untergruppen des keimzentrumsartigen (*germinal center B-cell-like* – GCB-Typ) und des aktivierten B-Zell-ähnlichen (*activated B-cell-like* – ABC-Typ) DLBCL unterscheiden (Abbildung 1).

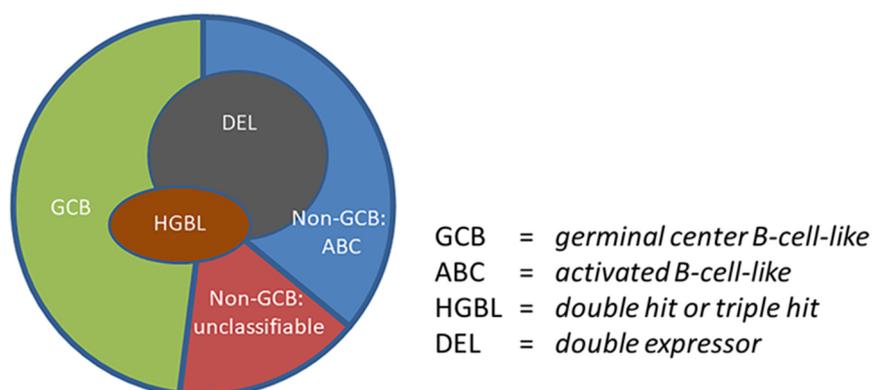


Abbildung 1: Einteilung der DLBCL-Subtypen anhand der COO (cell of origin) und molekularer Eigenschaften und deren Überschneidungen. Modifiziert nach Liu 2019.

Bei ca. 10 – 15 % gelingt hingegen keine eindeutige Zuordnung zu den genannten Untergruppen [Alizadeh 2000]. Diese werden als nicht klassifizierbar bezeichnet. Da die Erstellung von Genexpressionsprofilen allerdings sehr teuer und aufwendig ist, werden in der klinischen Praxis immunhistochemische Algorithmen wie Hans (CD10, BCL6, und MUM1/IRF4) und Tally (CD10, GCET1, MUM1/IRF4, FOXP1, und LMO2) verwendet, um die COO zu identifizieren. Zu den GCB-Markern gehören hierbei CD10, BCL-6, GCET1 und LMO2, wohingegen MUM1/IRF4 und FOXP1 zu den Markern des ABC-Typs zählen. Allerdings

ist durch die Verwendung der immunhistochemischen Algorithmen die Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse nicht immer gegeben [Gutiérrez-García 2011]. Neben der Einteilung anhand der Ursprungszelle können die Untergruppen des DLBCL auch aufgrund molekularer Eigenschaften unterschieden werden. Eine Überexpression von c-Myc und BCL2 wird in 1/3 der neu diagnostizierten Fälle gefunden und in bis zu 50 % der refraktären DLBCLs. Diese werden als DEL (*double expressor lymphoma*) bezeichnet [Herrera 2017, Miura 2016]. Kommt es hingegen zu genetischen Veränderungen in c-Myc und BCL2 und/oder BCL6 werden diese als DH/THLs (*double hit or triple hit lymphoma*) bezeichnet. Häufig werden diese auch als *high grade B-cell-lymphoma* zusammengefasst [Aukema 2011, Friedberg 2012, Swerdlow 2016]. DELs sind häufiger mit dem ABC-Typ assoziiert und DH/THL treten vermehrt innerhalb des GCB-Typs auf [Hu, Xu-Monette, Tzankov 2013]. Das Auftreten von genetischen Veränderungen führt zu einer erhöhten Aggressivität des DLBCL und somit zu einer schlechteren Prognose. Obwohl DLBCL des GCB-Typs in der Regel eine deutlich bessere Prognose haben als DLBCL des ABC-Typs, wird diese durch das Vorhandensein der genetischen Veränderungen deutlich verschlechtert. Daher ist es wichtig neben der COO auch genetische Alterationen in die Beurteilung des DLBCL mit einzubeziehen [Gutiérrez-García 2011, Hu, Xu-Monette, Balasubramanyam 2013, Scott 2015].

1.1.2. Behandlung des diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms

Vor Einsatz von Immuntherapien war die Behandlung des DLBCL mit den Chemotherapeutika Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin (Oncovin®) und dem Glukokortikoid Prednison (CHOP) Standard. Durch die Kombination von CHOP und dem monoklonalen CD20 Antikörper Rituximab vor ca. 20 Jahren hat sich die Prognose von DLBCL Patienten drastisch verbessert, wodurch R-CHOP heute die neue Standardtherapie darstellt [Coiffier 2002, Mondello 2019]. Trotz dieser Verbesserung kommt es bei ca. 30-50 % der Patienten zur Bildung eines Rezidivs [Coiffier 2010, Pfreundschuh 2011]. Nach Rezidivbildung ist die Prognose für die Patienten deutlich schlechter. Nur ein sehr geringer Teil der Patienten kann durch eine aggressivere Chemotherapie mit anschließender autologen Stammzelltransplantation geheilt werden [Gisselbrecht 2010]. Um die Standardtherapie zu verbessern, wurden in den letzten Jahren verschiedene Dosisanpassungen von R-CHOP getestet. So wurde unter anderem die R-CHOP Gabe alle 3 Wochen (R-CHOP21) mit der R-CHOP Gabe alle 2 Wochen (R-CHOP14) verglichen. Dabei zeigte sich bei den Patienten kein Vorteil von R-CHOP14 gegenüber R-CHOP21 [Cunningham 2013, Delarue 2013, Pfreundschuh 2018]. Bei jüngeren Patienten wurde zudem versucht die Anzahl der Chemotherapie-Zyklen zu verringern. Die Verwendung von 4 Zyklen CHOP und 6 Gaben Rituximab zeigte keine schlechtere Therapiewirksamkeit gegenüber der R-CHOP Standardtherapie mit 6 Zyklen. Allerdings verringerten sich die Chemotherapie-assoziierten

Nebenwirkungen [Poeschel 2018]. Neben Rituximab gibt es mittlerweile noch weitere gegen CD20 gerichtete Antikörper, wie Obinutuzumab und Ofatumumab [Herter 2013]. Ein deutlicher Vorteil gegenüber Rituximab bei neu diagnostizierten DLBCL konnte allerdings noch nicht klar gezeigt werden [Klein 2021, Vitolo 2017]. Neben der Verwendung anderer Antikörper wurde auch versucht die verwendeten Chemotherapeutika zu optimieren. So wurde zum Beispiel bei DLBCL Patienten mit schlechter Prognose zusätzlich zu CHOP noch Etoposide gegeben (R-EPOCH). Dabei zeigten sich in verschiedenen Phase II Studien vielversprechende Ergebnisse [Purroy 2015, Wilson 2008, 2012]. In darauffolgenden Phase III Studien konnten diese allerdings nicht bestätigt werden [Wilson 2016].

1.2. Rituximab

Die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern zum therapeutischen Einsatz begann 1975 mit Arbeiten von César Milstein und George Köhler [Köhler, G., Milstein 1975]. 1984 erhielten sie dafür den Nobelpreis für Physiologie und Medizin. 1988 kam es zur Entdeckung von CD20 auf B-Zellen, das sowohl von gesunden B-Zellen, als auch von entarteten B-Zellen exprimiert wird. Durch Bindung des Antikörpers an die CD20⁺ Zellen werden diese durch verschiedene Mechanismen eliminiert (Abbildung 2). Da CD20 jedoch nicht auf unreifen und sich entwickelnden B-Zellen exprimiert wird, kann sich die B-Zellpopulation nach Beendung der Therapie wieder normalisieren [Salles 2017]. Mit CD20 als potentielles Antitumor-Target entwickelte die Biotechnologiefirma Biogen IDEC Rituximab, das spezifisch an CD20 bindet und so CD20-exprimierende Tumorzellen eliminiert [National Cancer Institute]. Rituximab ist ein human/muriner chimärer glykosylierter (Ig)G1- κ Antikörper, der aus einer murinen variablen schweren und leichten Kette und aus einer konstanten humanen Kette gebildet wird. Die Zulassung für Rituximab erfolgte 1997 durch die *US Food and Drug Administration* (FDA) und 1998 durch die *European Medicine Agency* (EMA) für die Anwendung bei refraktären indolenten Non-Hodgkin-Lymphomen. Damit war Rituximab der erste therapeutische Antikörper der im Feld der Onkologie eingesetzt wurde [National Cancer Institute, Salles 2017].

1.2.1. Wirkweise von Rituximab

Rituximab bindet mit hoher Affinität und Spezifität an CD20, das u.a. auf einem Großteil maligner B-Zellen exprimiert wird. Dabei gibt es verschiedene Mechanismen, die für die Eliminierung von CD20⁺ Zellen durch Rituximab verantwortlich sind (Abbildung 2):

1. Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC – *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*): ADCC findet durch die Interaktion zwischen der konstanten humanen Kette (Fc-Region) von Rituximab mit dem Fc γ -Rezeptor auf der Oberfläche von Effektorzellen, wie natürlichen Killerzellen, Granulozyten und Makrophagen und

der Bindung der variablen Region von Rituximab an CD20 auf der Zielzelle statt [Jaglowski 2010]. Diese Interaktion löst den Beginn zellulärer Immunantworten aus, die für die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität zentral sind, einschließlich der Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und Mediatoren, die die Zielzellen abtöten [Boross 2012, Salles 2017].

2. Antikörper-abhängige zelluläre Phagozytose (ADCP – *antibody-dependent cellular phagocytosis*): Durch die Bindung der Fc-Region von Rituximab an Komplementrezeptoren auf Makrophagen wird die Phagozytose der CD20⁺ Zellen induziert [Jaglowski 2010].

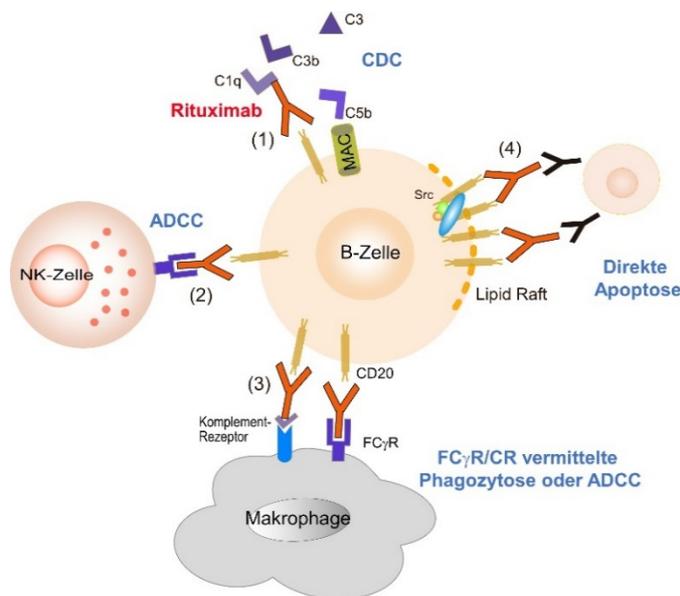


Abbildung 2: Mechanismen des Rituximab-vermittelten Zelltodes. (1) Aktivierung der Komplementkaskade. (2) ADCC durch Bindung von Rituximab an den Fc_γ-R III auf NK Zellen. (3) Phagozytose und ADCC durch Bindung von Rituximab an Fc-Rezeptoren oder Komplementrezeptoren auf Makrophagen. (4) Direkte Apoptose durch Vernetzung mehrerer Moleküle von Rituximab und CD20. (ADCC = *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*; CDC = *complement-mediated cytotoxicity*; NK = natürliche Killerzelle). Modifiziert nach Salles 2017.

3. Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC – *complement-mediated cytotoxicity*): Die Bindung von Rituximab an CD20 auf der Oberfläche von B-Zellen führt zur Aktivierung der Komplementkaskade, die die Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC) induziert. Diese kann dadurch die direkte B-Zell-Lyse durch die komplement-abhängige Zytotoxizität auslösen [Jaglowski 2010, Weiner 2010].
4. Direkte Apoptose: Es wird vermutet, dass die Bindung von Rituximab an CD20 auf B-Zellen deren Zelltod durch nichtklassische Apoptose induziert, indem es die Vernetzung mehrerer CD20 Moleküle vermittelt. Dabei vermittelt die Vernetzung mehrerer CD20 Moleküle durch Rituximab in Lipid Rafts die Wechselwirkung der dadurch entstehenden Komplexe mit Elementen des Tyrosinkinase (Src Kinase) Signalweges, der die direkte Apoptose induziert [Jaglowski 2010, Salles 2017].

1.3. Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK Zellen) sind zytotoxische Lymphozyten, die Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen lysieren können. NK Zellen gehören zum angeborenen Immunsystem. Ihre Aktivität wird durch eine Vielzahl von in der Keimbahn kodierten Rezeptoren reguliert. Diese können aktivierende oder hemmende Signale vermitteln und somit NK Zellantworten auslösen und gleichzeitig die Selbsttoleranz sicherstellen [Watzl 2014]. NK Zellen können ihre zytotoxische Aktivität über zwei verschiedene Wege vermitteln. Sie können zytotoxische Granula freisetzen, die Perforin und Granzyme enthalten, oder sie können durch den Todesrezeptor vermittelte Apoptose auslösen, indem sie TRAIL und/oder Fas-Ligand (FasL) exprimieren. Die durch NK Zellen oder T-Zellen vermittelte zelluläre Zytotoxizität ist für viele Ansätze der Immuntherapie gegen Krebs von entscheidender Bedeutung [Yang 2015]. Antikörperbasierte Therapien wie der anti-CD20-Antikörper Rituximab gegen das Non-Hodgkin-Lymphom hängen unter anderem von der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) ab, die durch NK Zellen vermittelt wird.

1.3.1. Aktivierung von NK Zellen

NK Zellen verfügen über eine Reihe von Rezeptoren, die es ihnen ermöglichen virusinfizierte, körperfremde oder veränderte Zellen aufzuspüren und zu eliminieren und dabei normale körpereigene Zellen zu verschonen. Zu diesen Rezeptoren gehören hemmende, aktivierende, Adhäsions- und Zytokin-Rezeptoren [Cooper 2001, Vivier 2012]. Die Integration dieser Signale entscheidet darüber, ob eine NK Zelle aktiv wird oder nicht. Dabei sind NK Zellen tolerant gegenüber gesunden Wirtszellen. Durch die Aktivierung von inhibitorischen Rezeptoren, die u.a. durch die Präsentation von MHC-Klasse I-Molekülen auf körpereigenen gesunden Zellen ausgelöst wird, kann die Stärke von eingehenden aktivierenden Signalen verringert werden. Beim Menschen sind die wichtigsten inhibierenden Rezeptoren Mitglieder der Killerzell-Immunoglobulin-Rezeptorfamilie (KIRs) und das CD94/NKG2A-Heterodimer. Dabei befindet sich auf den NK Zellen ein unterschiedliches Expressionsmuster der KIR-Rezeptoren [Ochoa 2017]. Tumorzellen können die Expression von MHC-Klasse I-Molekülen verlieren. NK Zellen werden als Reaktion auf diese veränderte Expression dieser Zellen aktiviert, da das inhibitorische Signal der MHC-Klasse I-Moleküle wegfällt. Dies wird als "missing-self"-Auslösung der NK Zellaktivierung bezeichnet [Brodin 2009, Joncker 2009]. Darüber hinaus werden NK Zellen selektiv durch "gestresste" Zellen aktiviert, da diese aktivierende Liganden für NK Zellen hochregulieren und dadurch die hemmende Signalwirkung der MHC-Klasse I-Moleküle überwinden [Bauer 1999, Raulet 2003, 2009]. Dies wird als "stressinduzierte Selbstauslösung" der NK Zellaktivierung bezeichnet (Abbildung 3). In beiden Fällen führt die NK Zellaktivierung direkt durch NK Zell-vermittelte

Zytotoxizität oder indirekt durch die Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen wie Interferon- γ zur Tumoreliminierung [Vivier 2012].

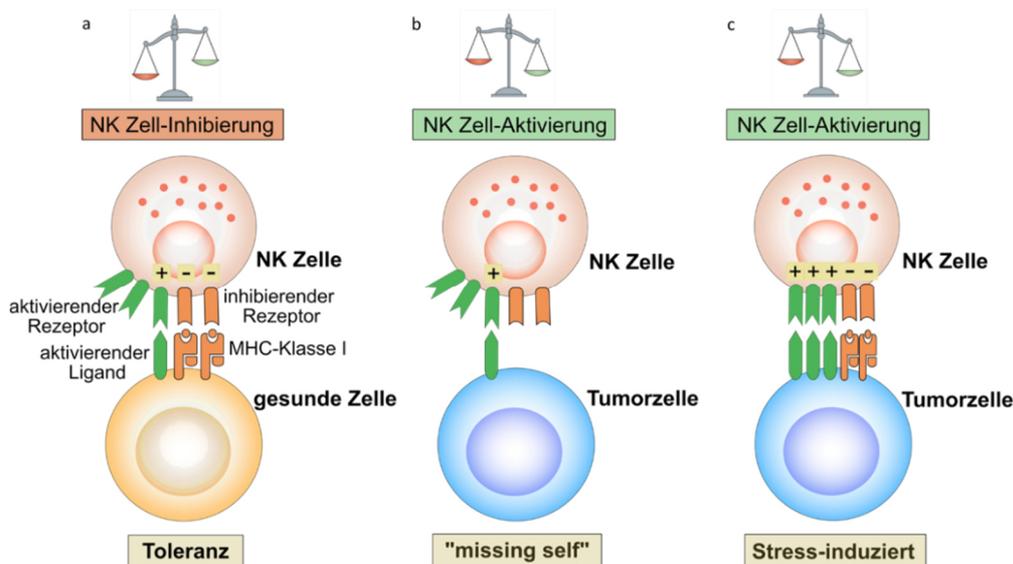


Abbildung 3: Aktivierung und Inhibierung von NK Zellen. (a) Toleranz gegenüber körpereigenen Zellen durch die Vermittlung eines starken inhibitorischen Signals durch die Expression von MHC-Klasse I-Molekülen auf körpereigenen Zellen (Toleranz). (b) Verlust von MHC-Klasse I-Molekülen auf Tumorzellen führt zur Aktivierung von NK Zellen („missing-self“). (c) Aktivierung der NK Zellen durch erhöhte Expression von aktivierenden Liganden („Stress-induzierte Selbstauslösung“) auf Tumorzellen. Die Aktivierung von NK Zellen führt dann zur Tumoreliminierung. Modifiziert nach Vivier 2012.

1.3.2. NK Zell-Untergruppen

NK Zellen können anhand ihrer CD16 und CD56 Expression in zwei Hauptgruppen unterteilt werden, die $CD56^{bright}CD16^{dim/-}$ Zellen und die $CD56^{dim}CD16^+$ Zellen. Dabei machen $CD56^{dim}CD16^+$ Zellen ca. 90 % der NK Zellen im peripheren Blut aus und maximal 10 % sind $CD56^{bright}$ [Caligiuri 2008, Cooper 2001]. Zudem exprimieren nur $CD56^{bright}$ NK Zellen den hämatopoetischen Stammzellmarker CD117 (c-Kit) und den Hochaffinitätsrezeptor für Interleukin 2 (IL2R). Damit proliferieren sie als Reaktion auf pikomolare Konzentrationen dieses Zytokins [Cooper 2001]. Außerdem migrieren $CD56^{bright}$ NK Zellen bevorzugt zu sekundären lymphatischen Organen, wohingegen $CD56^{dim}$ NK Zellen zu akuten Entzündungsherden wandern [Campbell 2001, Cooper 2001]. Auch hinsichtlich der zytotoxischen Aktivität gibt es Unterschiede zwischen den beiden NK Zell-Untergruppen. Die zytotoxische Aktivität von $CD56^{dim}$ Zellen ist signifikant höher, als die der $CD56^{bright}$ Zellen, da sie mehr Perforin, Granzym und zytotoxische Granula enthalten [Cooper 2001, Roland Jacobs 2001]. Zudem sind sie durch die hohe Expression von CD16 effiziente Vermittler der Antikörper-abhängigen Zytotoxizität (ADCC), wohingegen $CD56^{bright}$ NK Zellen die ADCC nur schwach oder gar nicht vermitteln können [Cooper 2001, Nagler 2019, Poli 2009]. Bei der Zytokinproduktion sind hingegen die $CD56^{bright}$ deutlich effektiver. Dabei produzieren sie in Abhängigkeit von der Art der Stimulation vor allem $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, GM-CSF, IL-10 und IL-13 [Poli 2009]. Neben den $CD56^{bright}$ und $CD56^{dim}$ NK Zellen gibt es weitere NK Zellpopulationen wie,

CD56^{dim}CD16⁻ und CD56⁻CD16^{bright}, die nur einen sehr geringen Anteil der NK Zellen ausmachen und vor allem bei bestimmten Erkrankungen und Virusinfektionen erhöht sind [Mavilio 2005, Poli 2009]. Eine Frage, die seit langem diskutiert wird, ist die genaue Art der Beziehung zwischen den beiden Hauptgruppen der NK Zellen. Handelt es sich bei den CD56^{bright} NK Zellen um Vorläufer der CD56^{dim} Zellen oder sind beide Populationen terminal differenzierte Zelltypen, die in keinem direkten Zusammenhang stehen und aus zwei verschiedenen hämatopoetischen Vorläuferzellen hervorgehen [Cichocki 2019]. Bei der ersten Hypothese wäre die Reifung der NK Zellen durch die Runterregulierung von CD56 und den Erwerb von CD16 sowie von KIR-Rezeptoren gekennzeichnet und die CD56^{bright}CD16^{dim} Zellen wären ein Zwischenstadium zwischen den unreifen CD56^{bright}CD16⁻ Zellen und den CD56^{dim}CD16⁺ Zellen [Antoni Chan 2007, Nagler 2019, Ouyang 2007]. Gegen diese Hypothese spricht allerdings, dass CD56^{bright} NK Zellen im Vergleich zu den CD56^{dim} Zellen größere Mengen an Zytokinen produzieren und ein völlig anderes Repertoire an Adhäsions- und Chemokin-Rezeptoren besitzen, was zu unterschiedlichen Migrationseigenschaften führt [Campbell 2001, Cooper 2001, Sedlmayr 1996]. Daher ist auch das Konzept zweier verschiedener endständig differenzierter Zellpopulationen denkbar [Cichocki 2019].

1.4. Konventionelle und unkonventionelle CD3⁺ T-Zellen

T-Zellen stammen von lymphoiden Vorläuferzellen ab und besitzen die Fähigkeit vom Knochenmark zur Thymusdrüse zu gelangen. Im Thymus findet dann die T-Zellentwicklung statt. Diese beinhaltet die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Selektion und Reifung zu naiven T-Zellen [Lind 2001, Schwarz 2006]. Die einfachste Aufteilung der konventionellen T-Zellen ist die der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und der CD4⁺ T-Helferzellen [van der Leun 2020]. Diese erkennen über ihren T-Zellrezeptor Peptidantigene, welche über den Haupthistokompatibilitätskomplex I oder II (MHC I oder II) präsentiert werden. Neben den konventionellen CD3⁺ T-Zellen gibt es auch unkonventionelle CD3⁺ T-Zellen. Zu den am besten untersuchten unkonventionellen T-Zellen gehören die natürlichen Killer T-Zellen (NKT), die Schleimhaut-assoziierten invarianten T-Zellen (MAIT) und die $\gamma\delta$ -T-Zellen (Abbildung 4) [Pellicci 2020].

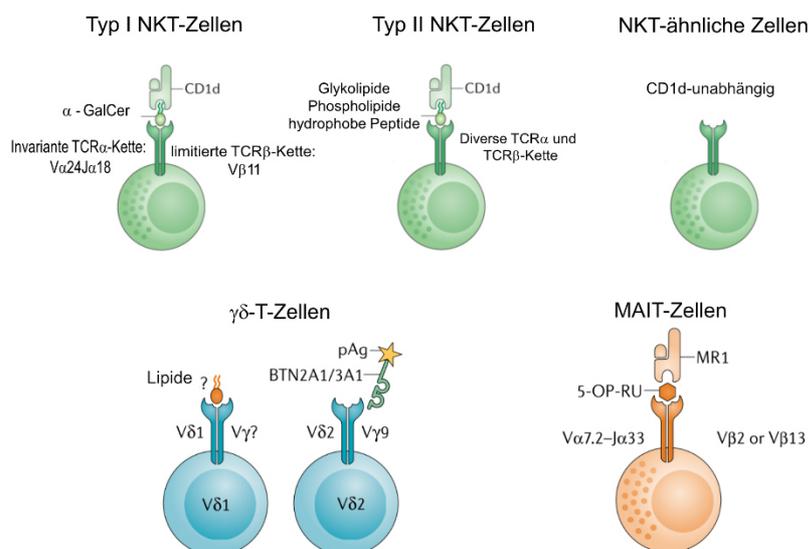


Abbildung 4: Übersicht unkonventionelle T-Zellen. Zu den unkonventionellen T-Zellen gehören natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen - grün), $\gamma\delta$ -T-Zellen (blau) und Schleimhaut-assoziierte invariante T-Zellen (MAIT-Zellen - orange). α -GalCer, α -Galactosylceramid; BTN, Butyrophilin; MR1, MHC-related 1; pAg, Phosphoantigen; TCR, T-Zell-Rezeptor; 5-OP-RU, 5-(2-oxopropylideneamino)-6-d-ribitylaminouracil. Modifiziert nach Pellicci 2020.

1.4.1. Natürliche Killer T-Zellen

Wie konventionelle T-Zellen durchlaufen natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen) eine Thymus-Entwicklung und -Selektion und besitzen einen T-Zell-Rezeptor, um Antigene zu erkennen [Berzins 2004]. Im Gegensatz zu herkömmlichen T-Zellen erkennt der T-Zell-Rezeptor von NKT-Zellen jedoch Lipidantigene, die von einem konservierten und nicht-polymorphen MHC-Klasse I-ähnlichen Molekül CD1d präsentiert werden [Godfrey 2015]. Neben dem T-Zell-Rezeptor besitzen NKT-Zellen auch Rezeptoren für Zytokine wie IL-12, IL-18, IL-25 und IL-23, ähnlich wie angeborene Zellen einschließlich NK Zellen und andere angeborene lymphoide Zellen. Diese Zytokin-Rezeptoren können durch inflammatorische Zytokine auch in Abwesenheit des T-Zell-Rezeptor-Signals aktiviert werden [Cohen 2013, Nair 2017]. Der Begriff NKT leitet sich von früheren Arbeiten in Mäusen ab, in denen NK1.1 als Marker verwendet wurde und die zeigten, dass NKT-Zellen ähnlich aktiviert werden, wie natürliche Killerzellen. Mittlerweile weiß man, dass viele NKT-Zellen NK1.1 negativ sind [Godfrey 2004]. Heute werden NKT-Zellen durch die begrenzte Erkennungsfähigkeit ihres T-Zell-Rezeptors und dessen Erkennung von Lipid und Glykolipid-Antigenen definiert [Godfrey 2004, Terabe 2018]. Abhängig von der Zusammensetzung des T-Zell-Rezeptors und der Antigenerkennung können NKT-Zellen in drei Hauptgruppen unterteilt werden, Typ I, Typ II und NKT-ähnliche Zellen (Abbildung 4). Die T-Zell-Rezeptoren der meisten NKT-Zellen im menschlichen Körper werden aus einer kanonischen α -Kette, bestehend aus $V\alpha 24$ und $J\alpha 18$ Segmenten und einer β -Kette mit begrenzter Variabilität, normalerweise $V\beta 11$ gebildet. Diese NKT-Zellen werden als invariante NKT-Zellen (iNKT-Zellen) bezeichnet [Fujii 2008, Lantz 1994, Porcelli 1993]. Invariante NKT-Zellen können weiter in $CD4^+CD8^-$,

CD4⁺CD8⁺ Zellen oder in CD4/CD8 doppelt-negative Zellen unterteilt werden. Diese Subpopulationen unterscheiden sich dabei vor allem in ihrer Zytokin-Sekretion [Gumperz 2002, Lee 2002]. Der T-Zell-Rezeptor der Typ II NKT-Zellen ist sowohl in der α -Kette, als auch in der β -Kette heterogener als bei Typ I NKT-Zellen und formt unterschiedliche Kombinationen auf der Zelloberfläche. Daher werden sie auch häufig als diverse oder variante NKT-Zellen bezeichnet (Abbildung 4). Aufgrund dieser Diversität sind sie deutlich schwieriger zu charakterisieren und zu untersuchen als iNKT-Zellen. In Tumormodellen sind Typ II NKT-Zellen typischerweise mit einer Immunsuppression assoziiert und zeigen häufig eine entgegengesetzte oder Kreuz-regulierende Rolle zu den iNKT-Zellen [Moodycliffe 2000, Nair 2017, Neparidze 2009]. Alle anderen NKT-Zellen werden zur Gruppe der NKT-ähnlichen Zellen zusammengefasst und sind CD1d-unabhängig (Abbildung 4). Sie sind die am meisten heterogene Gruppe und exprimieren einige NK Zellrezeptoren [Waldowska 2017]. Funktionell reife CD3⁺CD56⁺ NKT-ähnliche Zellen besitzen hohe Level an Granzymen und zeigen eine hohe Lysekapazität gegen viele verschiedene Tumorzellen. Zudem produzieren sie proinflammatorische Zytokine wie IFN γ und TNF α [Hoyle 1998, Pievani 2011, Waldowska 2017].

1.4.1.1. Aktivierung invarianter NKT-Zellen

Die invarianten NKT-Zellen (iNKT-Zellen) erkennen Lipidantigene, die über das MHC-Klasse I-ähnliche Molekül CD1d präsentiert werden. Daher können iNKT-Zellen CD1d exprimierende Tumorzellen durch direkte Zytolyse unter Verwendung von Perforin, Granzym B, FasL oder über TNF α -vermittelte zytotoxische Wege eliminieren [Bassiri 2014, Dao 1998, Hagihara 2002, Wingender 2010]. Dabei stammen CD1d exprimierende Tumore hauptsächlich von myeloischen Zellen und B-Zellen ab. [Metelitsa 2011, Nair 2017]. Es wird angenommen, dass die Oberflächenexpression von CD1d auf den Tumorzellen direkt mit der iNKT-Zell-vermittelten Zytotoxizität korreliert [Haraguchi 2006]. Allerdings exprimieren viele Tumorzellen kein CD1d auf ihrer Oberfläche oder deren Expression ist sehr gering [Metelitsa 2011, Waldowska 2017]. Aber auch ohne eine CD1d-Expression können iNKT Zellen indirekt aktiviert werden. Diese Aktivierung erfolgt über antigenpräsentierende Zellen, die Tumorantigene über CD1d präsentieren und somit iNKT-Zellen aktivieren können [Vivier 2012]. Daraufhin erhöhen iNKT-Zellen die Expression von CD40L. Dies bewirkt eine höhere Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD40 oder CD80 auf den dendritischen Zellen und induziert deren Reifung. Aktivierte dendritische Zellen wiederum beginnen mit der Sekretion von IL-12, das an Rezeptoren auf den iNKT-Zellen bindet und diese aktiviert. Dadurch wird unter anderem die Freisetzung von zytotoxischen Molekülen wie Perforin und Granzym induziert und die Expression von FasL und TRAIL erhöht, was eine direkte Lyse der Tumorzellen induziert. Zudem sezernieren aktivierte iNKT-Zellen

verschiedene Zytokine, vor allem $\text{IFN}\gamma$, und können somit NK Zellen und zytotoxische T-Zellen aktivieren und deren Zytotoxizität erhöhen [Vivier 2012, Waldowska 2017].

1.4.2. $\gamma\delta$ T-Zellen

$\gamma\delta$ T-Zellen sind eine nicht-klassische Zelluntergruppe, die durch die Expression des heterodimeren $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptors auf der Zelloberfläche gekennzeichnet ist. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Tumormunität. Je nach Mikroumgebung können verschiedene Untergruppen von $\gamma\delta$ T-Zellen anti-Tumor oder pro-Tumor-Aktivitäten aufweisen [Y. Li 2021]. Klassische CD3^+ T-Zellen mit $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor exprimieren häufig CD4 oder CD8, wodurch sie in Helfer- und zytotoxische T-Zellen eingeteilt werden können, wohingegen Zellen mit $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor häufig keine Abstammungsmarker exprimieren [Y. L. Wu 2014]. Die Aufteilung der $\gamma\delta$ T-Zellen erfolgt anhand der δ -Kettenexpression. $\gamma\delta$ T-Zellen, die $\text{V}\delta 1$ -Ketten exprimieren, sind vor allem in der intraepithelialen Schicht der Schleimhautoberfläche lokalisiert und sind dort an der Aufrechterhaltung der Integrität des Epithelgewebes beteiligt, indem sie auf Stressantigene auf Epithelzellen reagieren [Groh 1998]. Neben dem Epithel kommen $\text{V}\delta 1$ T-Zellen auch im peripheren Blut vor und machen dort im gesunden Menschen einen Anteil von 10-30 % der $\gamma\delta$ T-Zellen aus [Kabelitz 2000]. Die Mehrheit der im Blut zirkulierenden $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren die $\text{V}\delta 2$ -Kette. Ihr Anteil beträgt dabei beim gesunden Erwachsenen ca. 50-90 % der $\gamma\delta$ T-Zellen [Y. L. Wu 2014]. Die $\text{V}\delta 2$ -Kette paart sich fast ausschließlich mit $\text{V}\gamma 9$. Aktivierte $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ Zellen können Eigenschaften von antigenpräsentierenden Zellen übernehmen [Moser 2011]. Die dritte Population stellen die $\text{V}\delta 3$ T-Zellen dar, die vor allem in der Leber vorkommen. Ihr Anteil im Blut beträgt nur ca. 0,2 % [Y. L. Wu 2014].

1.4.2.1. Antigenerkennung und Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen

Im Vergleich zu $\alpha\beta$ T-Zellen verfügen $\gamma\delta$ T-Zellen über andere Antigenerkennungsmechanismen, die unabhängig von MHC Molekülen sind. Sie können sowohl den $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor, als auch natürliche Killerzellrezeptoren (NKR) nutzen, um eine Vielzahl von tumorassoziierten Antigenen (TAAs) zu erkennen, darunter nicht-peptidische Prenyl-Pyrophosphat-Antigene (PAG) und Stressproteine [Correia 2013]. Die PAG sind Produkte der Isoprenoid-Biosynthese, wie Isoprenpyrophosphat (IPP) aus Säugetierzellen und (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-Enyl Diphosphat (HMBPP) aus pathogenen Mikroorganismen [Sanders 2004, H. Wang 2011, Wei 2008]. Zur Erkennung von Tumorzellen benötigt der $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ T-Zellrezeptor zudem die Hilfe von Butyrophilin (BTN) 3A1. BTN3A1 ist ein Immunglobulin-ähnliches Molekül mit immunmodulatorischer Funktion, das die Interaktion zwischen $\gamma\delta$ T-Zellen und PAG vermitteln kann oder direkt vom $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ T-Zellrezeptor erkannt

werden kann [Gu 2017, Peigné 2017]. Zudem kann der $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellrezeptor den F1-ATPase ApoA1 Komplex erkennen. Dieser wird normalerweise in der inneren Membran der Mitochondrien exprimiert, aber einige Tumorzellen wie Leukämiezellen (K562) und Lymphomzellen (Raji) können ihn ektopisch auf der Zellmembran exprimieren [Y. Li 2021, Scotet 2005]. Neben der Erkennung von TAAs über den T-Zell-Rezeptor, können $\gamma\delta$ T-Zellen diese auch über natürliche Killerzellrezeptoren erkennen. Dazu gehören unter anderem der natürliche Killer-2D-Rezeptor (NKG2D) und das DNAX-Accessory-Molecule1 (DNAM-1) [Y. Li 2021]. NKG2D ist ein Aktivierungsrezeptor vom Lektintyp, der auf natürlichen Killerzellen (NK) und natürlichen Killer-T-Zellen (NKT) und teilweise auf $\gamma\delta$ T Zellen und antigenaktivierten $CD8^+$ T-Zellen exprimiert wird [Dhar 2018]. Die Liganden von NKG2D, wie z.B. MICA/B (*MHC I Chain related molecules A and B*) und ULBP1-6 (*six cytomegalovirus UL16-binding proteins*) werden normalerweise nicht von gesunden Zellen exprimiert, wohingegen Tumorzellen diese vermehrt exprimieren [Dhar 2018, Y. L. Wu 2014].

1.5. Zielsetzung

Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) ist mit bis zu 40 % die häufigste Form aller Non-Hodgkin-Lymphome [Armitage 1998, 2017]. Trotz der deutlich verbesserten Standardtherapie durch den zusätzlichen Einsatz des therapeutischen anti-CD20 Antikörpers Rituximab, kommt es bei ca. 30-50 % der Patienten zur Bildung eines Rezidivs oder die Patienten werden refraktär [Coiffier 2010, Pfreundschuh 2011]. Nach Rezidivbildung oder Refraktärität ist die Prognose für die Patienten deutlich schlechter. Nur ein sehr geringer Teil der Patienten kann durch eine aggressivere Chemotherapie und nachfolgender autologer Stammzelltransplantation geheilt werden [Gisselbrecht 2010]. Daher stellt eine bessere prognostische Beurteilung der Patienten einen wichtigen Schritt in der Entwicklung einer individualisierten Therapie bei Non-Hodgkin-Lymphomen dar. Diese Arbeit soll einen Überblick über quantitative und qualitative Veränderungen der im Blut zirkulierenden Immunzellen bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen geben. Aus diesem Grund wurde das Blut der Patienten über einen langen Zeitraum von bis zu drei Jahren analysiert. Entscheidend hierfür ist die erste Blutentnahme zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, die als Referenzpunkt für „ohne Einfluss der Therapie“ gesehen werden kann. Die Patienten sollen dann über den Verlauf der Therapie und während der Nachsorge analysiert werden. Groß angelegte Studien haben nur zu einigen ausgewählten Zeitpunkten vor allem die Hauptpopulationen der Immunzellen, wie Monozyten, T-Zellen und NK Zellen untersucht. In dieser Arbeit sollen deswegen zusätzlich kleinere Untergruppen der Immunzellen, wie $CD16^+$, $CD56^+$ Monozyten und unkonventionelle T-Zellen wie NKT-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen mit in die Analyse aufgenommen werden, da diesen Zellen eine wichtige Rolle in der Tumormunität zugeschrieben wird. Dabei soll unter anderem untersucht werden, inwieweit die Erkrankung

selbst zu einer Veränderung von Zusammensetzung und Funktion der Immunzellen im peripheren Blut führt. Weiterhin soll geklärt werden, inwieweit mögliche Veränderungen einen Einfluss auf die Prognose der Patienten haben. Eine weitere Frage ist, ob sich die Behandlung der Patienten unter der Standardtherapie R-CHOP auf die Zusammensetzung und die Funktion der Immunzellen auswirkt und ob dies mögliche Folgen für einen Behandlungserfolg der Patienten hat.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Antikörper

In dieser Arbeit wurden Bead-gekoppelte Antikörper zur Aufreinigung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes verwendet und Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse. Alle verwendeten Antikörper sind gegen humane Antigene gerichtet.

Tabelle 1: Bead-gekoppelte Antikörper

Bezeichnung	Firma	Bestellnummer
CD3 Microbeads	Miltenyi	130-050-101
CD14 Microbeads	Miltenyi	130-050-201
CD15 Microbeads	Miltenyi	130-046-601
CD235A Microbeads	Miltenyi	130-050-501
CD56 Microbeads	Miltenyi	130-050-401

Tabelle 2: Antikörper für durchflusszytometrische Analyse

Spezifität	Fluorophor	Klon	Firma	Bestellnummer
anti-CD3	PerCP	SK7	BioLegend	344814
anti-CD45	Brilliant Violet 510	HI30	BioLegend	304036
anti-CD16	PE	B73.1	BioLegend	360704
anti-CD16	PE	3G8	BioLegend	302008
anti-CD14	PE/Cyanine7	M5E2	BioLegend	301814
anti-CD8	FITC	SK1	BioLegend	344704
anti-CD4	Brilliant Violet 421	SK3	BioLegend	344632
anti-CD56	APC	HCD56	BioLegend	318310
anti-CD19	Brilliant Violet 421	HIB19	BioLegend	302234
anti-TCR $\gamma\delta$	PE/Cyanine7	B1	BioLegend	331222

2.1.2. Reagenzien

Tabelle 3: Reagenzien

Chemikalie	Firma	Bestellnummer
Acridine Orange	Logos	F23001
Ammoniumchlorid	Sigma Aldrich	T2265
BSA	Thermo Fisher Scientific	11413164
Calcein-AM	Thermo Fisher Scientific	C3100MP
Coulter Isoton II Diluent	Beckman Coulter	8448011
DMSO	Sigma Aldrich	D4540-100ML
EDTA	Sigma Aldrich	E9884
FACSClean Solution	BD Biosciences	340345
FACSFlow Sheath Fluid	BD Biosciences	342003
FCS	PanBiotech	10270-106
HEPES	Sigma Aldrich	H-7523
KHCO ₃	Sigma Aldrich	17205
NaCl	Merck	106404
PBS	Thermo Fisher Scientific	10270-106
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich	P4333-100ML
Rituximab	Hexal AG	Klinikapotheke, Homburg
Triton X-100	Eurobio	18774

2.1.3. Lösungen

Erythrozyten Lysepuffer

155 mM NH₄Cl

9,99 mM KHCO₃

130 µM EDTA

pH 7,3

HEPES-Puffer

10 mM HEPES

150 mM NaCl

pH 7,4

Färbepuffer Durchflusszytometrie

0,5 % BSA

in PBS, pH 7,4

Calcein-Lösung (500 nM)

Calcein-AM in AIMV + 10 mM Hepes

Tabelle 4: Zellkulturmedien und Pufferlösungen

Bezeichnung	Firma	Bestellnummer
AIMV Medium	Thermo Fisher Scientific	12055-083
Dulbecco`s PBS	Thermo Fisher Scientific	14190-094
Hank`s BSS Lymphozyten	PAA Laboratories	H15-009
Separationsmedium 1077	PromoCell	C-44010
RPMI-1640	Thermo Fisher Scientific	21875-034

2.1.4. Verbrauchsmaterialien

Alltäglicher Laborbedarf, wie Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Zellkulturflaschen und -platten wurden von VWR, BD Biosciences, PEQLAB und Sarstedt bezogen.

Tabelle 5: spezielle Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Firma	Bestellnummer
LD Säulen	Miltenyi	130-042-901
LeucoSep Röhrchen	Greiner Bio-One	227290
MACS SmartStrainers, 30 µm	Miltenyi	130-098-458
MS Säulen	Miltenyi	130-042-201
Falcon® 96-Well Flachboden Zellkulturplatte (Black/Clear Bottom)	VWR	353219

2.1.5. Laborgeräte

Tabelle 6: Laborgeräte

Bezeichnung	Hersteller
CLARIOstar Plus	BMG LABTECH
CO ₂ Inkubator Heracell 150i	Thermo Scientific
CO ₂ Inkubator Heraeus	Thermo Scientific
FACSVerse™	BD Biosciences
Luna™	Logos
Sterilwerkbank	HERAsafe
Vortex Genie 2	Scientific Industries

Vortex Thriller	Peqlab
Zellzähler Z2	Beckman Coulter
Zentrifuge 5418	Eppendorf
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich

2.1.6. Zellen und Zelllinien

K562

Die K562 Zellen stammen von einer 53-jährigen Patientin mit chronischer myeloischer Leukämie in der Blastenkrise [Lozzio 1975]. Durch die fehlende Expression von MHC-Klasse I-Molekülen, die die NK Zell-Aktivität hemmen, eignen sich K562 Zellen sehr gut zur Untersuchung der „natürlichen Zytotoxizität“ von NK Zellen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in RPMI mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep bei 37 °C und 5 % CO₂.

U-2932

Die U-2932 Zellen stammen von einem diffus großzelligem B-Zell-Lymphom (DLBCL), das sich bei einer 29-jährigen Patientin mit rezidivierendem Hodgkin-Lymphom entwickelt hatte [Amini 2002]. U-2932 Zellen exprimieren den B-Zell-Marker CD20 auf ihrer Oberfläche und eignen sich daher zur Untersuchung der Antikörper-abhängigen Zytotoxizität (ADCC) unter Verwendung des anti-CD20 Antikörpers Rituximab. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in RPMI mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep bei 37 °C und 5 % CO₂.

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) sind einkernige Zellen des peripheren Blutes. Zu ihnen zählen B-Zellen, T-Zellen, natürliche Killerzellen, Monozyten und dendritische Zellen. Die in dieser Arbeit verwendeten PBMC stammen aus dem Vollblut von 33 Patienten (Tabelle 7) und aus dem Vollblut von 29 immunologisch gesunden Spendern. Da alle Patienten mit Ausnahme von 4 Patienten Anteile eines DLBCL aufweisen, werden diese in dieser Arbeit als DLBCL Patienten zusammengefasst. Die Patienten stammen aus der Inneren Medizin I und die immunologisch gesunden Spender aus der Inneren Medizin I und der Orthopädie des Universitätsklinikums in Homburg. Ethikantrag Ärztekammer des Saarlandes, Ethik-Kommission Kenn-Nr. 33/18.

Tabelle 7: Übersicht über die Diagnosen der Patienten und deren Risikobewertung

	Anzahl Patienten
diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL)	25
<i>GCB Typ</i>	8
<i>non GCB-Typ</i>	7
follikuläres Lymphom Grad III teilweise Übergang zum DLBCL	4
andere aggressive Non-Hodgkin B-Zell-Lymphome	4
Internationaler prognostischer Index (IPI) für Non-Hodgkin-Lymphome	
IPI 0-1 (niedriges Risiko)	11
IPI 2-3 (niedrig-hoch intermediäres Risiko)	18
IPI 4-5 (hohes Risiko)	3
nicht bekannt	1

2.1.7. Software

Tabelle 8: Software

Bezeichnung	Hersteller
Affinity Designer	Serif
CorelDraw 2019	Corel Corporation
Excel 2019	Microsoft
FACSSuite V1.0.5.3841	BD Biosciences
FlowJo V10.1	BD Biosciences
Powerpoint 2019	Microsoft
Prism 8	Graphpad
Word 2019	Microsoft

2.2. Methoden

2.2.1. Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden aus dem Vollblut von immunologisch gesunden Personen und aus dem Vollblut von Lymphom-Patienten isoliert. Hierfür wurde das erhaltene Blut zunächst für 10 min bei 500 x g (Bremse 2) bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Das dabei abgetrennte Plasma wurde für weitere Analysen bei -80 °C gelagert und das Blut mit 10 ml Hank`s BSS (HBSS) verdünnt. Pro Spender wurden 17 ml Lymphozyten-Separationsmedium in ein 50 ml Leucosep Röhrchen vorgelegt und für 30 s bei 1000 x g und RT zentrifugiert. Im Anschluss wurde das verdünnte Blut in das

vorbereitete Leucosep Röhrchen überführt und mit HBSS aufgefüllt. Um die verschiedenen Blutzellen voneinander zu trennen, wurde das Blut-/Puffergemisch für 30 min bei 450 x g (ohne Beschleunigung und Bremse) und RT zentrifugiert. Der durch die Zentrifugation entstandene weiße Ring zwischen dem Blutplasma und dem Separationsmedium wurde mit einer Pipette abgenommen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde mit HBSS auf 50 ml aufgefüllt und für 15 min bei 250 x g und RT zentrifugiert. Zur Entfernung der verbleibenden Erythrozyten wurde das Pellet je nach Pelletgröße in 0,5 bis 1 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für eine Minute inkubiert. Nach Auffüllen des Reaktionsgefäßes mit HBSS und erneuter Zentrifugation für 10 min bei 130 x g und RT wurde das Zellpellet in 1 ml PBS/0,5 % BSA aufgenommen. Zur Verhinderung der Klumpenbildung bei der weiteren Aufreinigung der Zellen, wurden die Zellen über einen mit 1 ml PBS/0,5 % BSA equilibrierten MACS SmartStrainer gegeben. Dieser wurde im Anschluss mit 1 ml PBS/0,5 % BSA nachgespült. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei 4 °C gelagert.

2.2.2. Aufreinigung von natürlichen Killerzellen und CD3⁺ T-Zellen

Für die Aufreinigung der natürlichen Killerzellen (NK) und der CD3⁺ T-Zellen wurden zunächst Monozyten und Granulozyten aus den PBMC depletiert, da die Lymphom-Patienten im Verlauf der Therapie den Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor G-CSF (Filgrastim) erhalten. Zudem zeigte sich bei einigen Patientenproben ein erhöhtes Aufkommen von Erythrozyten, die dann ebenfalls depletiert wurden (Abbildung 5). Für die Depletion wurden die Zellen zunächst gezählt und für 10 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 85 µl pro 10⁷ Zellen PBS/0,5 % BSA resuspendiert und 5 µl pro 10⁷ Zellen CD14 Microbeads und 10 µl pro 10⁷ Zellen CD15 Microbeads zugegeben und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Bei erhöhtem Vorkommen von Erythrozyten wurden zusätzlich 5 µl pro 10⁷ Zellen CD235A Microbeads zugegeben und das entsprechende Volumen von der Menge des zugegebenen PBS/0,5 % BSA abgezogen. Nach der Inkubation der Zellen mit den Antikörpern wurden diese mit 1-2 ml PBS/0,5 % pro 10⁷ Zellen gewaschen und entsprechend den Herstellerangaben auf eine magnetische Säule (LD Säule von Miltenyi) gegeben. Dabei verbleiben die Bead-gebundenen Zellen in der Säule und die nicht gebundenen Zellen wurden als Durchfluss gesammelt und konnten dann für die weitere Aufreinigung genutzt werden. Für die anschließende Trennung von NK und T-Zellen wurden CD3 Microbeads verwendet. Nach Zentrifugation der Zellen bei 300 x g und 4 °C für 10 min wurden die Zellen in 80 µl pro 10⁷ Zellen PBS/0,5 % BSA resuspendiert und 20 µl pro 10⁷ Zellen CD3 Microbeads zugegeben und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut mit 1-2 ml PBS/0,5 % BSA gewaschen und entsprechend der Herstellerangaben über die LD Säule gegeben. Für die Gewinnung der CD3⁺ Zellen wurde die Säule vom Magneten entfernt und die

Bead-gebundenen Zellen mit Hilfe eines Stempels aus der Säule gedrückt. Die so erhaltenen $CD3^+$ T-Zellen wurden dann bei $300 \times g$ für 10 min zentrifugiert und in AIMV mit 10 % FCS resuspendiert (Dichte: 2×10^6 Zellen/ml) und bei $37^\circ C$ und 5 % CO_2 über Nacht inkubiert. Für die weitere Aufreinigung der NK Zellen wurden die nicht gebundenen $CD3^-$ Zellen verwendet (Abbildung 5).

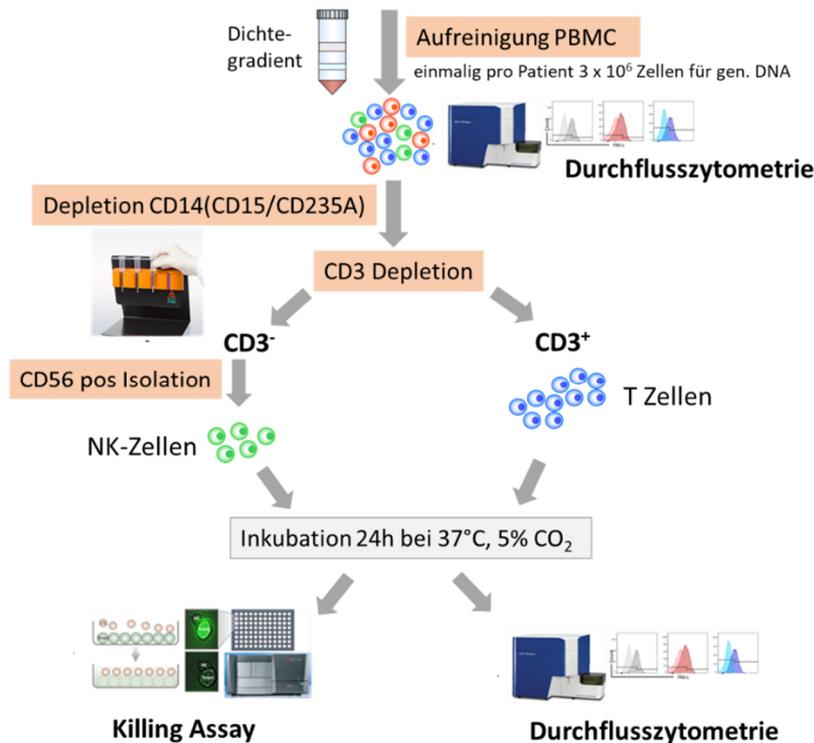


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Zellaufreinigung. PBMC wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und durchflusszytometrisch untersucht. Durch Depletion von CD14, CD15 und CD235A wurden die Monozyten, Granulozyten und Erythrozyten entfernt. Durch die anschließende Verwendung der CD3 Microbeads wurden die T-Zellen isoliert. Aus den $CD3^-$ Zellen wurden die NK Zellen durch eine CD56 Positiv-Isolation aufgereinigt. Die aufgereinigten Zellen wurden nach Inkubation bei $37^\circ C$ und 5 % CO_2 durchflusszytometrisch analysiert und im Real-Time-Killing-Assay eingesetzt.

Diese wurden erneut bei $300 \times g$ und $4^\circ C$ für 10 min zentrifugiert und in $80 \mu l$ pro 10^7 Zellen PBS/0,5 % BSA resuspendiert. Nach Zugabe von $20 \mu l$ pro 10^7 Zellen CD56 Microbeads wurden die Zellen erneut 15 min bei $4^\circ C$ inkubiert. Für die Aufreinigung der $CD56^+$ Zellen wurden die Zellen im Anschluss entsprechend den Herstellerangaben auf eine MS Säule von Miltenyi gegeben. Im Anschluss wurden die Bead-gebundenen Zellen mit Hilfe eines Stempels aus der Säule gedrückt und nach 10-minütiger Zentrifugation bei $300 \times g$ in AIMV mit 10 % FCS resuspendiert (Dichte: 2×10^6 Zellen/ml) und über Nacht bei $37^\circ C$ und 5 % CO_2 inkubiert.

2.2.3. Durchflusszytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie, auch FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) genannt, ermöglicht die gleichzeitige Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln oder Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Dabei können schon anhand der Lichtbeugung und -streckung Informationen über die Größe und Granularität der Zellen gewonnen werden. Zusätzlich können mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Proteine quantifiziert werden. Grundlage hierfür ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern durchgeführt wird. Durch die Anregung der Fluorochrome während der Messung kommt es zur Emission von Fluoreszenzlicht, das mittels Photodetektor registriert wird und dem entsprechenden Antikörper zugeordnet werden kann. Die emittierte Photonenkonzentration verhält sich dabei proportional zur Menge an gebundenem Antikörper pro Zelle. Die durchflusszytometrischen Analysen in dieser Arbeit wurden am FACS Verse durchgeführt (Laser: 488 nm, Filter: 530/30, 575/26, 670/14, 695/40, 780/60; Laser: 640 nm, Filter: 660/20, 780/60; Laser: 405 nm, Filter: 450/40, 525/50). Die Analyse der Daten erfolgte mittels FlowJo Software. Die Bestimmung der Positivpopulationen erfolgte durch die Verwendung von FMO (*fluorescent minus one*) Kontrollen.

Extrazelluläre Färbung

Für die extrazelluläre Färbung der aufgereinigten Zellen wurden je $0,1 - 0,5 \times 10^6$ Zellen für 5 min bei $250 \times g$ zentrifugiert und das Pellet mit PBS/0,5 % BSA gewaschen. In der Zwischenzeit wurde ein Antikörpermix, bestehend aus 100 μ l PBS/0,5 % BSA und 2 μ l pro Probe der entsprechenden Antikörper (Ausnahme CD3-Antikörper mit 0,5 μ l) angesetzt. Nach Zugabe des Antikörpermixes zu den gewaschenen Zellen wurden diese für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Zellen zweimal mit PBS/0,5 % BSA gewaschen und abschließend in 150 μ l PBS/0,5 % BSA aufgenommen und am Durchflusszytometer gemessen. Für die Färbung der PBMC und der aufgereinigten NK Zellen wurden folgende Antikörper verwendet: anti-CD3, -CD45, -CD16 (Klon B73.1), -CD4, -CD8, -CD4, -CD56 und -CD19. Für die aufgereinigten CD3⁺ Zellen wurde zusätzlich ein Antikörper gegen TCR $\gamma\delta$ verwendet. Bei zwei Patienten zeigte sich keine CD16 Bindung des B73.1 Antikörperklons, sodass bei diesen Patienten ein anderer CD16 Klon (3G8) verwendet wurde.

2.2.4. Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen

Die Analyse der Daten erfolgte mittels FlowJo Software. Die Bestimmung der Positivpopulationen erfolgte durch die Verwendung von FMO (*fluorescent minus one*) Kontrollen. Die in den Ergebnissen dargestellten prozentualen Anteile der einzelnen Populationen an den PBMC beziehen sich jeweils auf den Anteil der Zellen an den CD45⁺ Leukozyten. Somit werden Dubletten, Zelltrümmer, Erythrozyten und Thrombozyten aus der Analyse ausgeschlossen. Die angegebene Anzahl der Subtypen pro ml Blut ergibt sich aus dem jeweiligen prozentualen Anteil, bezogen auf die Anzahl der isolierten PBMC pro ml Blut. Mit dem Zellzählgerät Luna™ unter Verwendung des Acridine Orange/PI-Farbstoffes nach Herstellerangaben, wurde eine Lebend/Todzählung durchgeführt. Dieser färbt nur lebende Zellen, die einen Zellkern besitzen. Somit werden Zelltrümmer, Erythrozyten und Thrombozyten bei der Zählung der PBMC nicht mitgezählt.

2.2.5. Real-Time-Killing-Assay

Der Killing-Assay ist ein fluoreszenzbasiertes Verfahren, das eine Quantifizierung der Zytotoxizität von Effektor-Zellen ermöglicht. Im Gegensatz zu bisherigen Standardverfahren, wie ⁵¹Cr-release-Assay, PI (Propidiumiodid) *uptake assays* und LDH (Laktatdehydrogenase) *release assays*, bei denen innerhalb einer Probe nur Endpunktmessungen möglich sind, erlaubt der Killing-Assay die kinetische Bestimmung der Zytotoxizität in Echtzeit [Kummerow 2014]. In dieser Arbeit wurde der Killing-Assay verwendet, um die zytotoxische Aktivität von aufgereinigten NK Zellen und CD3⁺ T-Zellen zu untersuchen. Als Zielzellen dienten entweder K562 Zellen oder U-2932 Zellen. Diese wurden zunächst mit Calcein-AM (500 nM) beladen und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit AIMV + 10 mM HEPES wurden die K562 Zellen mit AIMV + 10 mM HEPES in einer Endkonzentration von 2,5 x 10⁴ Zellen/200 µl aufgenommen. Die U-2932 Zellen wurden in einer Endkonzentration von 5 x 10⁴ Zellen/200 µl aufgenommen. Diese wurden dann mit einer Rituximab-Lösung (U-2932 + Rituximab) oder mit AIMV + 10 mM HEPES (U-2932 – Rituximab) auf 2,5 x 10⁴ Zellen/200 µl verdünnt. Die Endkonzentration von Rituximab betrug hierbei 1 µM. Anschließend wurden je 200 µl der Zielzellsuspension in eine schwarze 96-Well-Platte mit durchsichtigem Boden pipettiert. Zudem wurden vier Kontrollen mitgeführt:

- 1.) Mediumkontrolle: 250 µl AIMV + 10 mM HEPES
- 2.) Lyse-Mediumkontrolle: 250 µl AIMV + 10 mM HEPES + 20 µl Triton X-Lösung
- 3.) Lebendkontrolle: 200 µl Zielzellsuspension + 50 µl AIMV + 10 mM HEPES
- 4.) Lysekontrolle: 200 µl Zielzellsuspension + 50 µl AIMV + 10 mM HEPES + 20 µl Triton X-Lösung

Nach Absetzen der Zielzellen wurden vorsichtig je 50 µl der Effektorzellen in AIMV + 10 mM HEPES auf die Zielzellen pipettiert (Zellzahl entsprechend Zielzell-Effektorzell-Verhältnis). Direkt im Anschluss erfolgte die Messung im Plattenmessgerät alle 10 min über einen Zeitraum von 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Alle Konditionen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Im Falle einer zu geringen Anzahl an isolierten NK oder CD3⁺ T-Zellen wurden diese in Einzelbestimmung pipettiert.

Für die quantitative Auswertung der Zytotoxizität der Effektor-Zellen wurden zunächst die Mittelwerte der Doppelbestimmungen zu jedem gemessenen Zeitpunkt bestimmt und die Werte der Mediumkontrollen subtrahiert. Aufgrund der Volumenvariabilität der Lysekontrolle wurden von der Lysekontrolle die Werte der Lyse-Mediumkontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt subtrahiert. Unter Verwendung der folgenden Formel konnte daraus die Zytotoxizität der Effektor-Zellen berechnet werden.

$$\text{Targetzelllyse [\%]} = \frac{P(t) - (r * LBK(t))}{r * (LK(t) - LBK(t))} * 100$$

LK(t) = Fluoreszenz der Lysekontrolle zum Zeitpunkt t

LBK(t) = Fluoreszenz der Lebendkontrolle zum Zeitpunkt t

P(t) = Fluoreszenz der Probe zum Zeitpunkt t

r = Index zum Zeitpunkt 0 (P(0)/LBK(0))

Da die Verarbeitung der Patientenproben zeitlich nicht planbar ist, haben verschiedene Personen im Labor diese für mich während meiner Abwesenheit übernommen. So haben Cora Hoxha, Johanna Jansky und Nadja Küchler die Aufreinigung und die Durchflusszytometrie der Proben während meiner Abwesenheit übernommen und Gertrud Schäfer und Nadja Küchler pipettierten den Real-Time-Killing-Assay.

2.2.6. Statistik

Die statistische Analyse wurde mit GraphPad Prism 8 durchgeführt. Zur Bestimmung der Normalverteilung wurden der Anderson-Darling Test, der D'Agostini & Pearson Test, der Shapiro-Wilk Test und der Kolmogorov-Smirnov Test verwendet. Abhängig von der Normalverteilung wurde dann ein unpaired t-Test oder ein Mann-Whitney Test durchgeführt. Die ebenfalls von GraphPad Prism bestimmten p-Werte stehen für:

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 und **** p<0,0001.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden Blutproben von 33 Patienten mit aggressivem Non-Hodgkin-Lymphom (Tabelle 7) untersucht. Hierfür wurden zum einen die PBMC mittels Durchflusszytometrie untersucht, um Aussagen bezüglich der quantitativen Verteilung einzelner Zellpopulationen zu treffen. Zudem wurden NK Zellen und im späteren Verlauf der Arbeit auch T-Zellen hinsichtlich ihrer zytotoxischen Funktion untersucht. Dabei sollten sowohl Veränderungen, die durch die Therapie der Erkrankung entstehen untersucht werden, als auch Veränderungen, die durch die Erkrankung selbst entstehen. Um Veränderungen zu untersuchen, die aufgrund der Erkrankung entstehen, wurden die Blutproben der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im Rahmen der ersten Aufnahme in die Klinik untersucht und mit Proben von 29 immunologisch gesunden Probanden verglichen. Diese wurden vom Alter und Geschlecht entsprechend der Patientenkohorte ausgewählt (Abbildung 6).

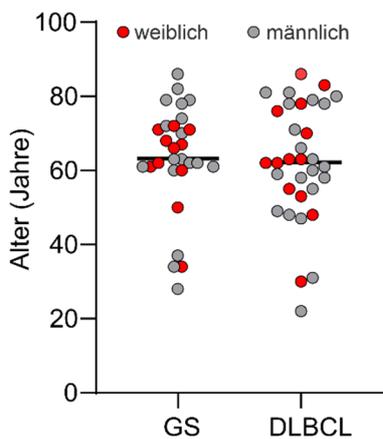


Abbildung 6: Alters- und Geschlechtsverteilung. Vergleich des Alters und des Geschlechts der in der Studie verwendeten Patienten mit diffus großzelligem B-Zell-Lymphom und den immunologisch gesunden Spendern. GS= Gesunde Spender; DLBCL= Patienten mit diffus großzelligem B-Zell-Lymphom.

Nach Diagnosestellung bekommen die Patienten direkt eine Gabe des Glukokortikoid Prednison. Im Anschluss erfolgt die Standardtherapie, die 6-8 Zyklen R-CHOP (Rituximab, Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin und Prednison) beinhaltet (Abbildung 7).

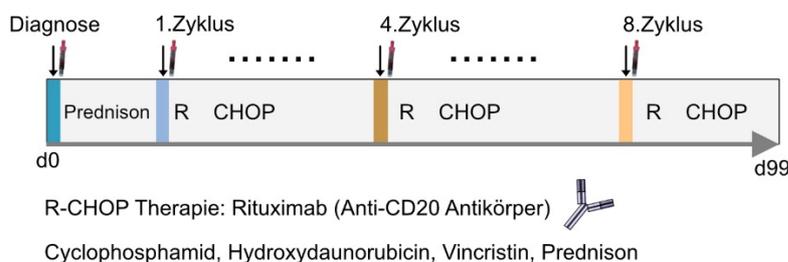


Abbildung 7: Therapieschema. Schematische Darstellung der R-CHOP14 Therapie. Dabei erhalten die DLBCL Patienten bei Diagnosestellung direkt Prednison, gefolgt von 6-8 Zyklen Rituximab und CHOP (C= Cyclophosphamid; H= Hydroxydaunorubicin; O= Oncovin® und P= Prednison) alle 14 Tage.

Um Veränderungen in der Zusammensetzung und der Funktion der Immunzellen zu untersuchen, die aufgrund der Therapie mit Rituximab beziehungsweise der Chemotherapeutika verursacht werden, erfolgten Blutentnahmen vor jedem neuen Zyklus R-CHOP. Diese erfolgten in der Regel alle 14 Tage. Bei einigen Patienten wurde aufgrund des schlechten Allgemeinzustandes und stark veränderter Blutwerte die R-CHOP Gabe um eine Woche verschoben.

3.2. Untersuchung der Zusammensetzung der PBMC

Um die Zusammensetzung der Immunzellen innerhalb der PBMC zu untersuchen, wurden diese durchflusszytometrisch analysiert. Abbildung 8 zeigt die Gating-Strategie zur Bestimmung der Anteile von Monozyten, Granulozyten, T-Zellen, B-Zellen und NK Zellen anhand der PBMC eines Patienten vor Therapiebeginn. Diese Gating-Strategie ist angelehnt an die Arbeit von Knörck *et al.* [Knörck 2018].

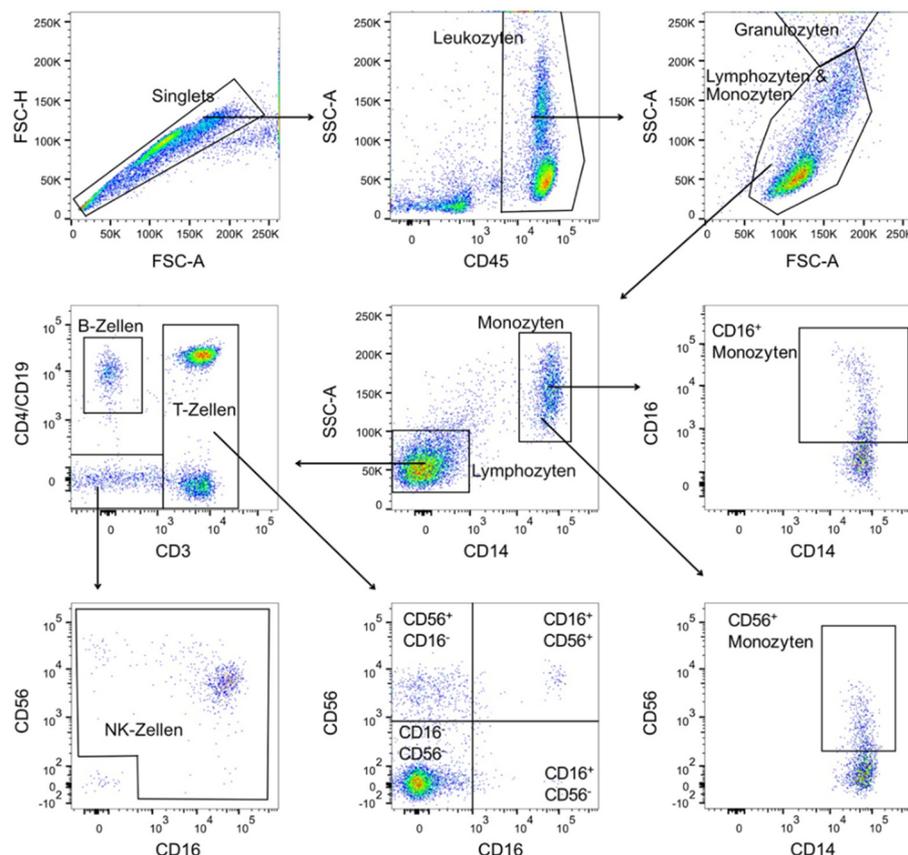


Abbildung 8: Gating-Strategie der aufgereinigten PBMC. PBMC (Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) wurden mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt und im Anschluss durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist eine beispielhafte Gating-Strategie der aufgereinigten PBMC. Hierfür wurden zunächst die Dubletten anhand der Streulichtparameter FSC-A und FSC-H ausgeschlossen und die Leukozyten über $CD45^+$ identifiziert. Aus den Leukozyten wurden im Anschluss aufgrund der Größe (FSC-A) und Granularität (SSC-A) die Granulozyten von den Lymphozyten und Monozyten differenziert. Zur saubereren Auftrennung der Monozyten wurden diese zusätzlich über $CD14^+$ identifiziert. Aus den $CD14^-$ Zellen wurde über $CD3^+$ die T-Zellen ausgewählt, die zudem durch die Verwendung von CD16 und CD56 weiter aufgeschlüsselt wurden. Über $CD19^+$ wurden B-Zellen identifiziert. Aus den $CD19^-/CD4^-$ und $CD3^-$ Zellen wurden die NK Zellen anhand von $CD16^+$ und $CD56^+$ bestimmt. Auch die $CD14^+$ Monozyten wurden durch CD56 und CD16 genauer klassifiziert.

Nach Ausschluss der Dubletten wurden die CD45⁺ Population der Leukozyten ausgewählt und die Granulozyten von den Lymphozyten und Monozyten aufgrund ihrer Granularität separiert. Zur saubereren Auftrennung der Monozyten wurden diese über CD14⁺ identifiziert. Die Population der CD14⁻ Zellen wurde in weitere Subpopulationen unterteilt. Die T-Zellen wurden über die Expression von CD3 identifiziert und die B-Zellen über die Expression von CD19. Aus der CD3⁻ und CD19⁻ Population wurde dann der Anteil an NK Zellen über CD16 und CD56 bestimmt. Anhand dieser Gating-Strategie (Abbildung 8) wurden im folgendem die Blutproben der Patienten und der immunologisch gesunden Probanden hinsichtlich ihrer Zusammensetzung analysiert. Hierfür wurden Blutproben von DLBCL Patienten sowohl zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, als auch vor jedem Zyklus R-CHOP abgenommen und die PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Aufgrund der Abläufe in der Klinik, und auch des unterschiedlichen Gesundheitszustandes der Patienten, war es jedoch nicht möglich zu jedem Zeitpunkt von allen Patienten Blutproben zu erhalten. Daher schwanken die in die Analyse aufgenommenen Patienten in ihrer Anzahl zwischen 9 in Zyklus 7 und 25 in Zyklus 4 (Tabelle 9). Zudem wurden Blutproben der Patienten nach Therapieende 15 Monate lang alle 3 Monate entnommen. Die Anzahl der Patienten, die in diese Analysen integriert wurden, reicht von 9 zum Zeitpunkt 12 Monate nach Therapie bis 12 zum Zeitpunkt 6 Monate nach Therapie (Tabelle 9).

Tabelle 9: Übersicht über die Anzahl der analysierten Proben zu verschiedenen Zeitpunkten der Therapie

	Gesunde Spender	DLBCL Patienten													
		Diagnosestellung	Zyklus R-CHOP								Nachsorge (Monate)				
			1	2	3	4	5	6	7	8	3	6	9	12	15
n =	25	29	23	19	19	19	18	17	9	11	10	12	11	9	11

3.2.5. Quantitativ veränderte Granulozyten bei Patienten mit DLBCL

Für die Bestimmung des prozentualen Anteils der Granulozyten wurden diese nach der durchflusszytometrischen Messung anhand ihrer Größe und Granularität bestimmt (Abbildung 8). Die Analyse des prozentualen Anteils der Granulozyten bezieht sich dabei jeweils auf den Anteil an Granulozyten an den CD45⁺ Leukozyten. Somit werden Zelltrümmer, Erythrozyten und Thrombozyten in der Analyse nicht berücksichtigt. Abbildung 9A zeigt einen Überblick über den Anteil der Granulozyten bei den gesunden Spendern im Vergleich zu den DLBCL Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und unter R-CHOP Therapie, sowie zu verschiedenen Zeitpunkten nach Therapieende. Im Vergleich zu den immunologisch gesunden Spendern zeigte sich bei den DLBCL Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein signifikant verringerter prozentualer Anteil der Granulozyten (Abbildung 9B), und auch eine signifikant verringerte Gesamtzahl der im Blut vorhandenen Granulozyten (Abbildung 9C).

Durch die initiale Behandlung der Patienten mit Prednison zeigte sich bereits eine Erhöhung des prozentualen Anteils an Granulozyten (Abbildung 9D – vor R-CHOP). Im weiteren Verlauf der Behandlung wurde diese Erhöhung noch deutlicher (Abbildung 9A und D).

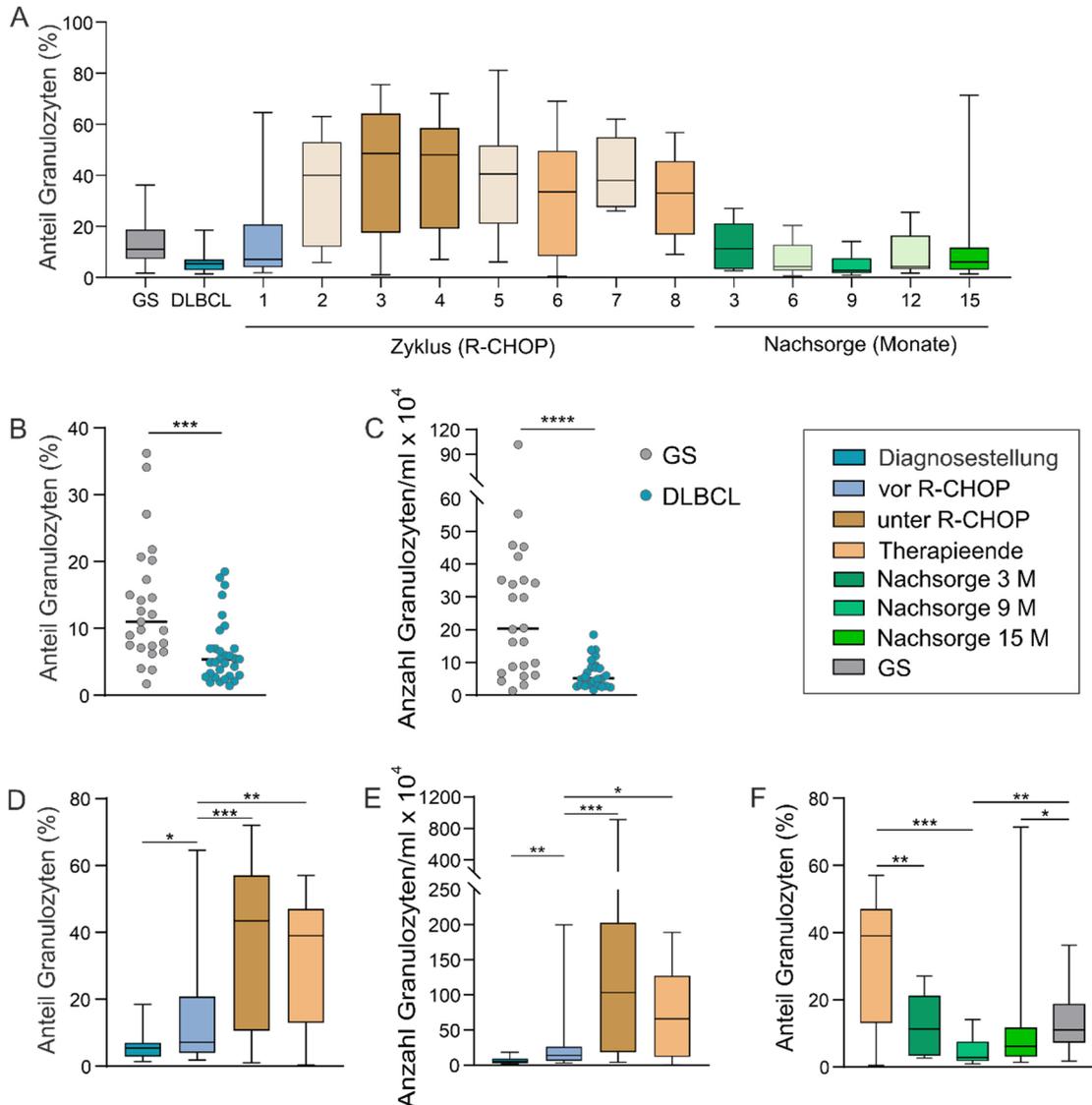


Abbildung 9: Einfluss der DLBCL-Erkrankung und der R-CHOP Therapie auf den Anteil und die Anzahl der Granulozyten. A) Darstellung der Veränderung des Anteils an Granulozyten durch die DLBCL-Erkrankung und durch die Therapie mit R-CHOP. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Granulozyten aus den CD45⁺ Leukozyten bei gesunden Spendern (GS) und bei Patienten mit diffus großzelligem B-Zell-Lymphom zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (DLBCL) und während der verschiedenen Zyklen mit R-CHOP sowie innerhalb der ersten 15 Monate nach Therapieende. B) Statistische Auswertung des prozentualen Anteils der Granulozyten aus den CD45⁺ Leukozyten bei gesunden Spendern (GS - grau) verglichen mit DLBCL Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (DLBCL- türkis). C) Anzahl der Granulozyten pro ml Blut bei gesunden Spendern (GS - grau) im Vergleich zu DLBCL Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (DLBCL- türkis). Bestimmt wurde die Anzahl der Granulozyten durch den prozentualen Anteil der Granulozyten aus den CD45⁺ Leukozyten bezogen auf die Gesamtzahl der im Blut enthaltenen Leukozyten. D) Veränderung des prozentualen Anteils der Granulozyten aus den CD45⁺ Leukozyten durch die Therapie der Patienten mit Prednison (vor R-CHOP) und durch die Behandlung mit R-CHOP (unter R-CHOP = Zyklus 3 oder 4; Therapieende = Zyklus 6 oder 8). E) Veränderung der Anzahl der Granulozyten pro ml Blut durch die Behandlung der Patienten mit Prednison und R-CHOP. F) Prozentualer Anteil der Granulozyten aus den CD45⁺ Leukozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Ende der Therapie (3 M, 9 M und 15 M = Nachsorgetermine nach 3, 9 bzw. 15 Monaten).

Bei der Gesamtzahl der im Blut zirkulierenden Granulozyten zeigte sich bereits durch die initiale Gabe von Prednison ein deutlicherer Anstieg. Durch die darauffolgende Therapie mit R-CHOP und Filgrastim erhöhte sich die Gesamtzahl der Granulozyten im Blut nochmal deutlich (Abbildung 9E). Somit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der DLBCL Patienten zu einem deutlichen Anstieg der Granulozytenanzahl führt, der vermutlich unter anderem durch die Gabe von G-CSF (Filgrastim) induziert wird. Im Weiteren sollte untersucht werden, wie viel Zeit nach Therapieende vergeht, bis sich der Anteil an Granulozyten wieder normalisiert. Hierfür wurden Blutproben der Patienten alle 3 Monate nach Therapieende analysiert. Bereits 3 Monate nach Therapieende zeigte sich ein signifikanter Rückgang der Granulozyten, der nach 9 Monaten noch deutlicher wurde (Abbildung 9F). Somit zeigte sich nach Beendigung der R-CHOP Therapie als auch der Behandlung mit G-CSF (Filgrastim) eine enorme Reduktion der Granulozyten bis zum 9. Monat nach Therapieende. Im Anschluss stieg der Anteil an Granulozyten wieder leicht an, erreichte aber bis 15 Monate nach Therapie nicht den Anteil der Granulozyten der gesunden Kontrollgruppe (Abbildung 9F). Auch zu Beginn der Therapie zeigte sich bei den DLBCL Patienten ein verringerter Anteil der Granulozyten im Vergleich zu den gesunden Spendern (Abbildung 9B).

3.2.6. Quantitative Veränderung der Monozyten und ihrer Subpopulationen bei Patienten mit DLBCL

Für die Bestimmung des prozentualen Anteils der Monozyten an den Leukozyten wurden die CD45⁺ Leukozyten hinsichtlich ihrer CD14 Expression untersucht. Dabei wurden CD14⁺ Zellen als Monozyten definiert [Ziegler-Heitbrock 2010] (Abbildung 8). Abbildung 10A zeigt einen Überblick über den Anteil der Monozyten über den gesamten Therapieverlauf und zu verschiedenen Nachsorgezeitpunkten. Der prozentuale Anteil der Monozyten an den Leukozyten zeigte eine stark signifikante Erhöhung bei Patienten mit DLBCL vor Therapiebeginn, verglichen mit den immunologisch gesunden Spendern (Abbildung 10B). Überraschenderweise zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Gesamtzahl der Monozyten pro ml Blut (Abbildung 10C). Durch die initiale Behandlung der Patienten mit Prednison zeigte sich eine Verringerung des prozentualen Anteils der Monozyten (Abbildung 10D). Die Gesamtzahl der Monozyten hingegen veränderte sich nicht (Abbildung 10E). Durch die Behandlung der Patienten mit R-CHOP und G-CSF (Filgrastim), zeigte sich sowohl ein signifikanter Anstieg des prozentualen Anteils an Monozyten (Abbildung 10D) als auch der Gesamtzahl an Monozyten pro ml Blut, auch wenn der Anstieg der Gesamtzahl der Monozyten zum Ende der Therapie geringer ausfiel als der prozentuale Anstieg (Abbildung 10E). Zudem wurde untersucht, wie schnell nach Therapieende sich der prozentuale Anteil der Monozyten wieder reduziert. Im Vergleich zu der sehr raschen Reduktion des Anteils an Granulozyten nach Therapieende (vergleiche Abbildung 9F) zeigte sich bei dem Anteil an Monozyten ein

deutlich langsamerer Rückgang. So zeigte sich 3 Monate nach Therapieende noch keine Reduktion des Anteils an Monozyten (Abbildung 10F). Selbst 15 Monate nach Therapieende hatte der prozentuale Anteil der Monozyten noch nicht den Anteil der Monozyten der gesunden Probanden erreicht. Jedoch zeigte sich bei den DLBCL Patienten bereits vor Beginn der Therapie ein erhöhter Anteil der Monozyten (Vergleiche Abbildung 10D und F).

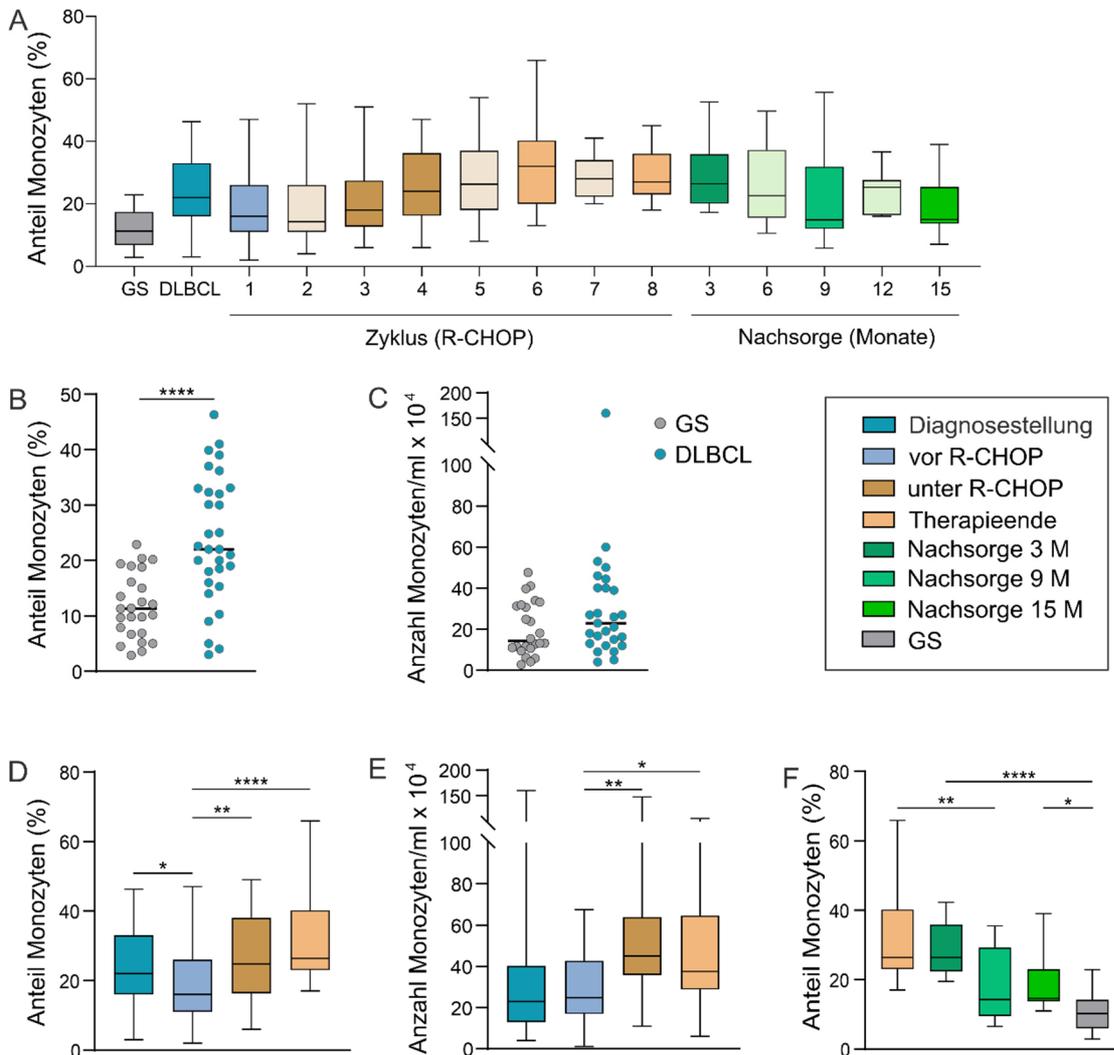


Abbildung 10: Einfluss der DLBCL-Erkrankung und der R-CHOP Therapie auf die Anzahl und den Anteil an Monozyten. A) Übersicht des prozentualen Anteils an Monozyten aus den CD45⁺ Leukozyten bei Patienten mit diffus großzelligem B-Zell-Lymphom zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (DLBCL), im Therapieverlauf und nach Therapieende sowie der Vergleich zu immunologisch gesunden Spendern (GS). B) Prozentualer Anteil der CD14⁺ Monozyten von gesunden Spendern (GS) im Vergleich zu DLBCL Patienten und Anzahl an Monozyten pro ml Blut (C). Die Anzahl der Monozyten im Blut wurde anhand des prozentualen Anteils der Monozyten aus den CD45⁺ Leukozyten bezogen auf die Gesamtzahl der Leukozyten pro ml Blut bestimmt. D) Veränderung des prozentualen Anteils an Monozyten aus den CD45⁺ Leukozyten und der Anzahl an Monozyten pro ml Blut (E) durch die Behandlung mit Prednison (vor R-CHOP) und durch die R-CHOP Therapie (unter R-CHOP = Zyklus 3 oder 4; Therapieende = Zyklus 6 oder 8). F) Prozentualer Anteil an Monozyten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Therapieende (3 M, 9 M und 15 M = Nachsorgetermine nach 3, 9 bzw. 15 Monaten)

Da ein wichtiger Baustein der Behandlung des DLBCL neben der Chemotherapie die Gabe von Rituximab ist, sollte zudem der Anteil und die Anzahl der CD16⁺ Monozyten untersucht werden. Rituximab ist ein chimärer Antikörper, der den Fcγ-Rezeptor III (CD16) binden kann.

Um den Anteil der CD16⁺ Monozyten im Durchflusszytometer zu analysieren, wurden die CD14⁺ Zellen weiter nach CD16⁺ aufgetrennt (Abbildung 8). Abbildung 11A zeigt einen Überblick des prozentualen Anteils der CD16⁺ Monozyten zu allen untersuchten Zeitpunkten.

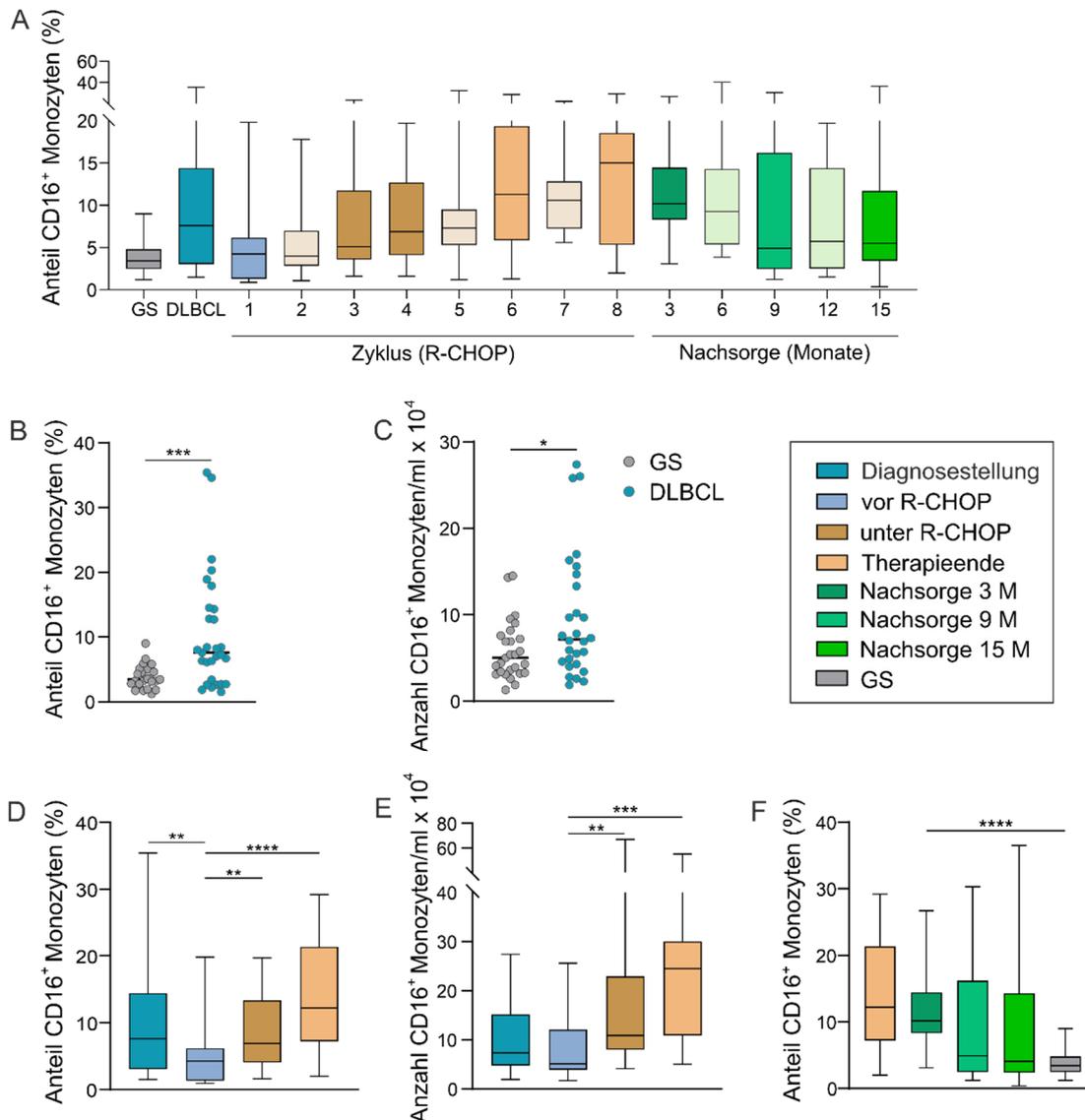


Abbildung 11: Einfluss der DLBCL-Erkrankung und der R-CHOP Therapie auf die Anzahl und den Anteil an CD16⁺ Monozyten. A) Übersicht über den prozentualen Anteil an CD16⁺ Monozyten an den CD45⁺ Leukozyten im Verlauf der R-CHOP Therapie bei Patienten mit DLBCL sowie zu verschiedenen Zeitpunkten nach Therapieende (Nachsorge). B) Prozentualer Anteil der CD16⁺ Monozyten aus den Leukozyten bei DLBCL Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (DLBCL) verglichen zu den gesunden Spendern (GS) und C) Anzahl der CD16⁺ Monozyten pro ml Blut. Diese wird bestimmt durch den prozentualen Anteil der CD16⁺ Monozyten aus den CD45⁺ Leukozyten bezogen auf die Gesamtzahl der Leukozyten pro ml Blut. D-E) Veränderung des prozentualen Anteils der CD16⁺ Monozyten (D) und der Anzahl der CD16⁺ Monozyten pro ml Blut (E) durch die Gabe von Prednison (vor R-CHOP) und die Therapie mit mehreren Zyklen R-CHOP (unter R-CHOP = Zyklus 3 oder 4; Therapieende = Zyklus 6 oder 8). F) Prozentualer Anteil der CD16⁺ Monozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Therapieende (3 M, 9 M und 15 M = Nachsorgetermine nach 3, 9 bzw. 15 Monaten).

Bei der statistischen Analyse wurden zunächst die DLBCL Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mit immunologisch gesunden Spendern verglichen. Dabei zeigte sich bei den Patienten ein signifikant erhöhter Anteil der CD16⁺ Monozyten an den Leukozyten (Abbildung 11B). Zudem zeigte sich eine deutliche Streuung des prozentualen Anteils der

CD16⁺ Monozyten bei den Patienten. So reichte dieser bei den gesunden Spendern von 1,2 % bis 9 % und bei den DLBCL Patienten von 2 % bis 35 %. Ähnlich der Gesamtzahl der Monozyten pro ml Blut, zeigte sich auch bei den CD16⁺ Monozyten ein geringerer Anstieg der Gesamtzahl der Zellen (vergleiche Abbildung 10C und 11C). Jedoch konnten auch in der Gesamtzahl der CD16⁺ Monozyten große Schwankungen innerhalb der DLBCL Patienten beobachtet werden (Abbildung 11C). Die initiale Behandlung der Patienten mit Prednison führte zu einer Verringerung des prozentualen Anteils an CD16⁺ Monozyten (Abbildung 11D) und zu einer tendenziell verringerten Gesamtzahl an CD16⁺ Monozyten (Abbildung 11E). Die Behandlung der Patienten mit R-CHOP und G-CSF (Filgrastim) hingegen führte zu einem sehr starken Anstieg der Gesamtzahl der CD16⁺ Monozyten und des prozentualen Anteils der CD16⁺ Monozyten im Verlauf der Therapie (Abbildung 11D und E). Im Vergleich zum Anstieg der Monozyten im Verlauf der Therapie, zeigte sich bei den CD16⁺ Monozyten ein schnellerer und stärkerer Anstieg, vor allem bei der Gesamtzahl der CD16⁺ Monozyten (Vergleiche Abbildung 10E mit 11E). Allerdings zeigte sich nach Therapieende eine schnellere Normalisierung des prozentualen Anteils an CD16⁺ Monozyten im Vergleich zum prozentualen Anteil der Gesamtpopulation der Monozyten (vergleiche Abbildung 10F mit 11F). Bereits 9 Monate nach Therapieende konnte kein signifikanter Unterschied mehr zum prozentualen Anteil der CD16⁺ Monozyten der gesunden Probanden beobachtet werden (Abbildung 11F). Jedoch zeigten sich bei den DLBCL Patienten auch nach Therapieende deutliche Schwankungen mit einem prozentualen Anteil der CD16⁺ Monozyten zwischen 0,38 % und 36,5 %. Bei den gesunden Spendern hingegen lag der prozentuale Anteil der CD16⁺ Monozyten bei allen Spendern unter 10 % (Abbildung 11F).

Neben den CD16⁺ Monozyten wurde auch der Anteil und die Anzahl der CD56⁺ Monozyten untersucht. Es ist bereits gezeigt, dass eine Erhöhung des Anteils CD56⁺ Monozyten in Zusammenhang mit dem Alter gebracht wird [Krasselt 2013]. Allerdings ist bisher nichts darüber bekannt, inwieweit die DLBCL Erkrankung einen zusätzlichen Einfluss haben könnte. Um einen Einfluss des Alters auszuschließen, wurden die gesunden Spender vom Alter entsprechend den DLBCL Patienten ausgewählt (Abbildung 6). Abbildung 12A zeigt einen Überblick des prozentualen Anteils der CD56⁺ Monozyten zu allen untersuchten Zeitpunkten. Bei den gesunden Spendern reichte der prozentuale Anteil der CD56⁺ Monozyten von 0,3 % bis 8,2 %. Bei den DLBCL Patienten zeigte sich ein stark signifikant erhöhter Anteil der CD56⁺ Monozyten. Dieser reichte von 1 % bis 21,4 % (Abbildung 12B). In der Gesamtzahl der CD56⁺ Monozyten pro ml Blut konnte eine schwach signifikante Erhöhung der Zellen bei den DLBCL Patienten im Vergleich zu den gesunden Probanden festgestellt werden. Zudem zeigten sich auch in der Gesamtzahl der CD56⁺ Monozyten deutliche Schwankungen bei den DLBCL Patienten zwischen 2×10^4 Zellen/ml Blut und 35×10^4 Zellen/ml Blut (Abbildung 12C).

Durch die initiale Behandlung der Patienten mit Prednison zeigte sich keine Veränderung im prozentualen Anteil (Abbildung 12D) und in der Gesamtzahl der CD56⁺ Monozyten (Abbildung 12E).

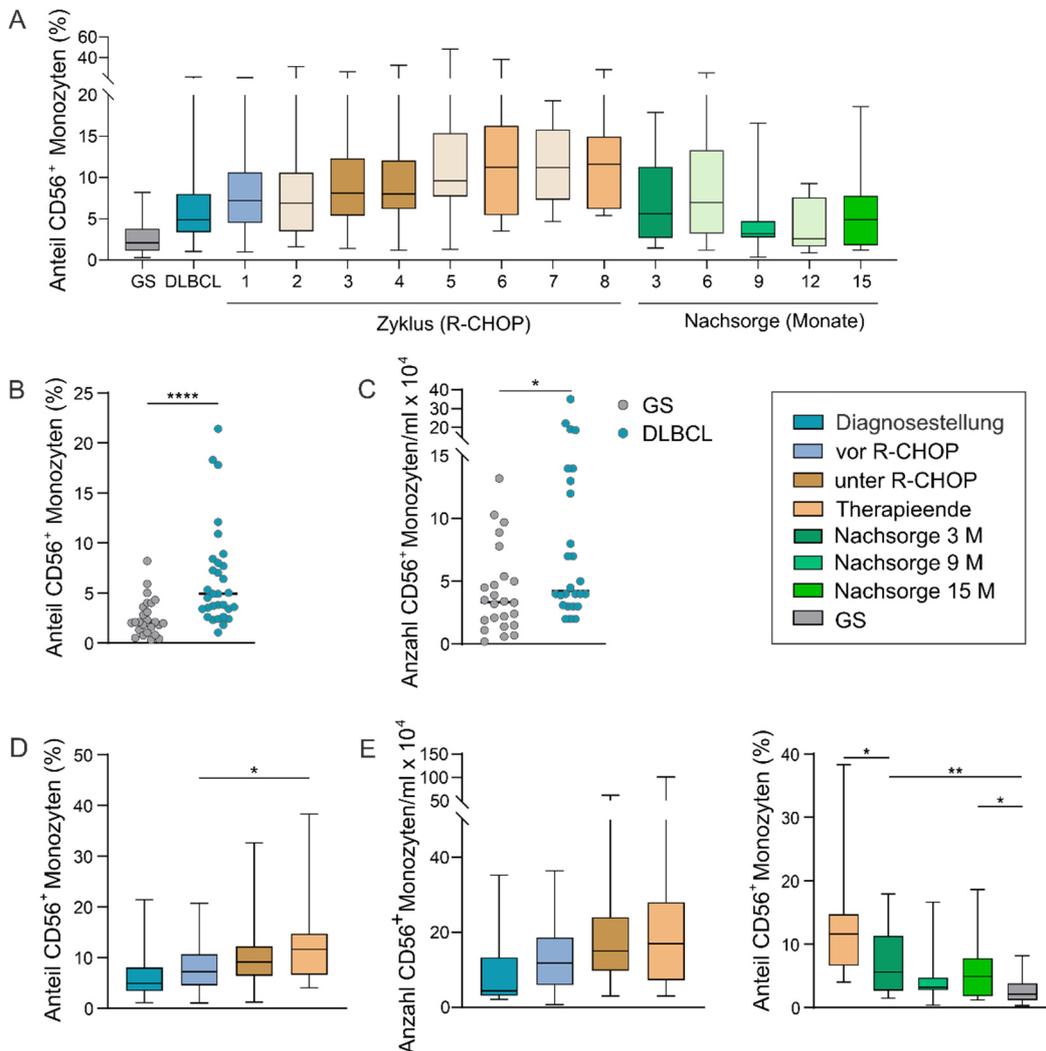


Abbildung 12: Einfluss der DLBCL-Erkrankung und der R-CHOP Therapie auf die Anzahl und den Anteil an CD56⁺ Monozyten. A) Übersicht des prozentualen Anteils an CD56⁺ Monozyten aus den CD45⁺ Leukozyten im Verlauf der R-CHOP Therapie bei Patienten mit DLBCL sowie zu verschiedenen Zeitpunkten nach Therapieende (Nachsorge). B) Prozentualer Anteil der CD56⁺ Monozyten aus den Leukozyten bei DLBCL Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (DLBCL) verglichen mit gesunden Spendern (GS) und C) Anzahl der CD56⁺ Monozyten pro ml Blut. Diese wird anhand des prozentualen Anteils der CD56⁺ Monozyten aus den CD45⁺ Leukozyten bezogen auf die Gesamtzahl der Leukozyten pro ml Blut bestimmt. D) Veränderung des prozentualen Anteils der CD56⁺ Monozyten und der Anzahl der CD56⁺ Monozyten pro ml Blut (E) durch die Gabe von Prednison (vor R-CHOP) und durch die Therapie mit mehreren Zyklen R-CHOP (unter R-CHOP = Zyklus 3 oder 4; Therapieende = Zyklus 6 oder 8). F) Prozentualer Anteil der CD56⁺ Monozyten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ende der Therapie (3 M, 9 M und 15 M = Nachsorgetermine nach 3, 9 bzw. 15 Monaten).

Die Behandlung der Patienten mit mehreren Zyklen R-CHOP führte bis zum Therapieende zu einem leicht signifikanten prozentualen Anstieg der CD56⁺ Monozyten (Abbildung 12D). Analog zum prozentualen Anstieg der CD56⁺ Monozyten stieg auch die Gesamtzahl der CD56⁺ Monozyten pro ml Blut im Verlauf der R-CHOP Therapie tendenziell an (Abbildung 12E). Zudem zeigte sich bei einigen Patienten ein enorm starker Anstieg der

CD56⁺ Monozyten mit einer Gesamtzahl von bis zu 100×10^4 Zellen/ml Blut im letzten Zyklus der Therapie. Nach Therapieende normalisierte sich der prozentuale Anteil der CD56⁺ Monozyten innerhalb der ersten 9 Monate wieder. Auch die enormen Schwankungen im prozentualen Anteil der CD56⁺ Monozyten normalisierten sich rasch nach Therapieende (Abbildung 12F).

3.2.7. Quantitative Änderung der B-Zellen durch die R-CHOP Therapie bei Patienten mit DLBCL

Für die Bestimmung des prozentualen Anteils der B-Zellen wurden die CD45⁺/CD14⁻ Zellen hinsichtlich ihrer CD19 Expression ausgewählt, wobei die CD19⁺ Zellen den B-Zellen entsprechen (Abbildung 8). Abbildung 13A zeigt einen Überblick über den prozentualen Anteil der B-Zellen im gesamten Therapieverlauf und zu verschiedenen Nachsorgeterminen. Zwischen den DLBCL Patienten vor Therapiebeginn und den immunologisch gesunden Spendern zeigte sich kein Unterschied im prozentualen Anteil der B-Zellen (Abbildung 13B). Die Gesamtzahl der B-Zellen pro ml Blut hingegen verringerte sich signifikant (Abbildung 13C). Allerdings fiel auch hier eine deutlich höhere Schwankung des prozentualen Anteils der B-Zellen zwischen den einzelnen Patienten auf. Dieser erreichte bei zwei Patienten einen Anteil von über 30 %. Bei den gesunden Spendern hingegen wurden keine prozentualen Anteile der B-Zellen an den CD45⁺ Leukozyten von über 12 % beobachtet (Abbildung 13B). Die enorme Streuung bei den DLBCL Patienten wird zusätzlich unter dem Aspekt verdeutlicht, dass der Median des prozentualen Anteils der B-Zellen bei den Patienten tendenziell niedriger ist als bei den gesunden Spendern. Das heißt, dass die Mehrheit der Patienten einen geringeren Anteil an B-Zellen aufweist als die gesunden Spender. Die initiale Behandlung der Patienten mit Prednison hatte keinen Einfluss auf den prozentualen Anteil der B-Zellen, führte jedoch zu einer höheren Gesamtzahl an B-Zellen pro ml Blut. Durch die Behandlung der Patienten mit R-CHOP kam es direkt zum erwarteten Verlust der B-Zellen (Abbildung 13A). Dieser zeigte sich sowohl in der Gesamtzahl der B-Zellen pro ml Blut (Abbildung 13C) als auch im prozentualen Anteil (Abbildung 13B). Nach Therapieende zeigte sich, dass sich der Anteil der B-Zellen lange Zeit nicht wieder erhöhte. Bis zu 6 Monate nach Therapieende war kaum ein Anstieg der B-Zellen zu beobachten (Abbildung 13A) und auch nach 9 Monaten gab es noch einen deutlich signifikanten Unterschied des prozentualen Anteils der B-Zellen zwischen den Patienten und den gesunden Spendern. Es zeigte sich jedoch, dass es ab dem 9. Monat nach Therapieende deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten gab (Abbildung 13A und F).

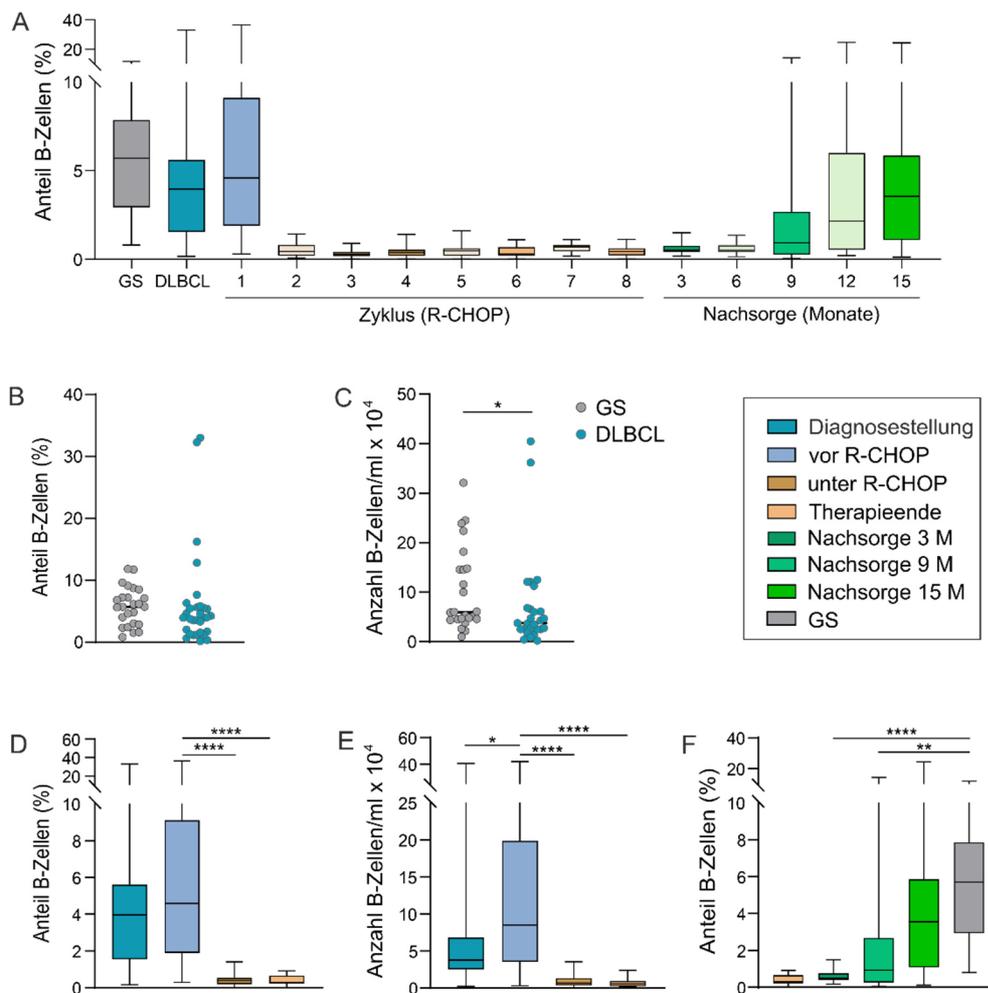


Abbildung 13: Einfluss der DLBCL-Erkrankung und der R-CHOP Therapie auf den Anteil und die Anzahl der B-Zellen. A) Überblick über die Veränderung des B-Zell-Anteils durch die DLBCL-Erkrankung und durch die Therapie mit R-CHOP. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an B-Zellen aus den CD45⁺ Leukozyten bei gesunden Spendern (GS) und bei Patienten mit diffus großzelligem B-Zell-Lymphom zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (DLBCL) und während der verschiedenen Zyklen mit R-CHOP sowie innerhalb der ersten 15 Monate nach Therapieende. B) Statistische Auswertung des prozentualen Anteils der B-Zellen aus den CD45⁺ Leukozyten bei gesunden Spendern (GS) im Vergleich zu DLBCL Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (DLBCL) und der Anzahl der B-Zellen pro ml Blut (C). Bestimmt wurde die Anzahl der B-Zellen durch den prozentualen Anteil der B-Zellen aus den CD45⁺ Leukozyten bezogen auf die Gesamtzahl der im Blut enthaltenen Leukozyten. D) Veränderung des prozentualen Anteils der B-Zellen durch die Therapie der Patienten mit Prednison (vor R-CHOP) und durch die Behandlung mit R-CHOP (unter R-CHOP = Zyklus 3 oder 4; Therapieende = Zyklus 6 oder 8). E) Veränderung der Anzahl der B-Zellen pro ml Blut durch die Behandlung der Patienten mit Prednison und R-CHOP. F) Prozentualer Anteil der B-Zellen aus den CD45⁺ Leukozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Ende der Therapie (3 M, 9 M und 15 M = Nachsorgetermine nach 3, 9 bzw. 15 Monaten).

3.2.8. Quantitative Veränderung der T-Zellen und ihrer Subpopulationen bei Patienten mit DLBCL

Für die Bestimmung des prozentualen Anteils der T-Zellen wurden aus den aufgereinigten PBMC die CD45⁺/CD14⁻ Zellen ausgewählt und aus dieser Population die CD3⁺ Zellen analysiert. Diese entsprechen der Gesamtpopulation der T-Zellen (Abbildung 8). Abbildung 14A zeigt einen Überblick des prozentualen Anteils der T-Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten. Beim Vergleich des prozentualen Anteils der T-Zellen zwischen den Patienten

mit DLBCL und den immunologisch gesunden Spendern zeigte sich ein signifikant erniedrigter Anteil der T-Zellpopulation bei den DLBCL Patienten. Im Median betrug der prozentuale Anteil bei den gesunden Spendern 49 %, bei den DLBCL Patienten hingegen nur 40 % (Abbildung 14B).

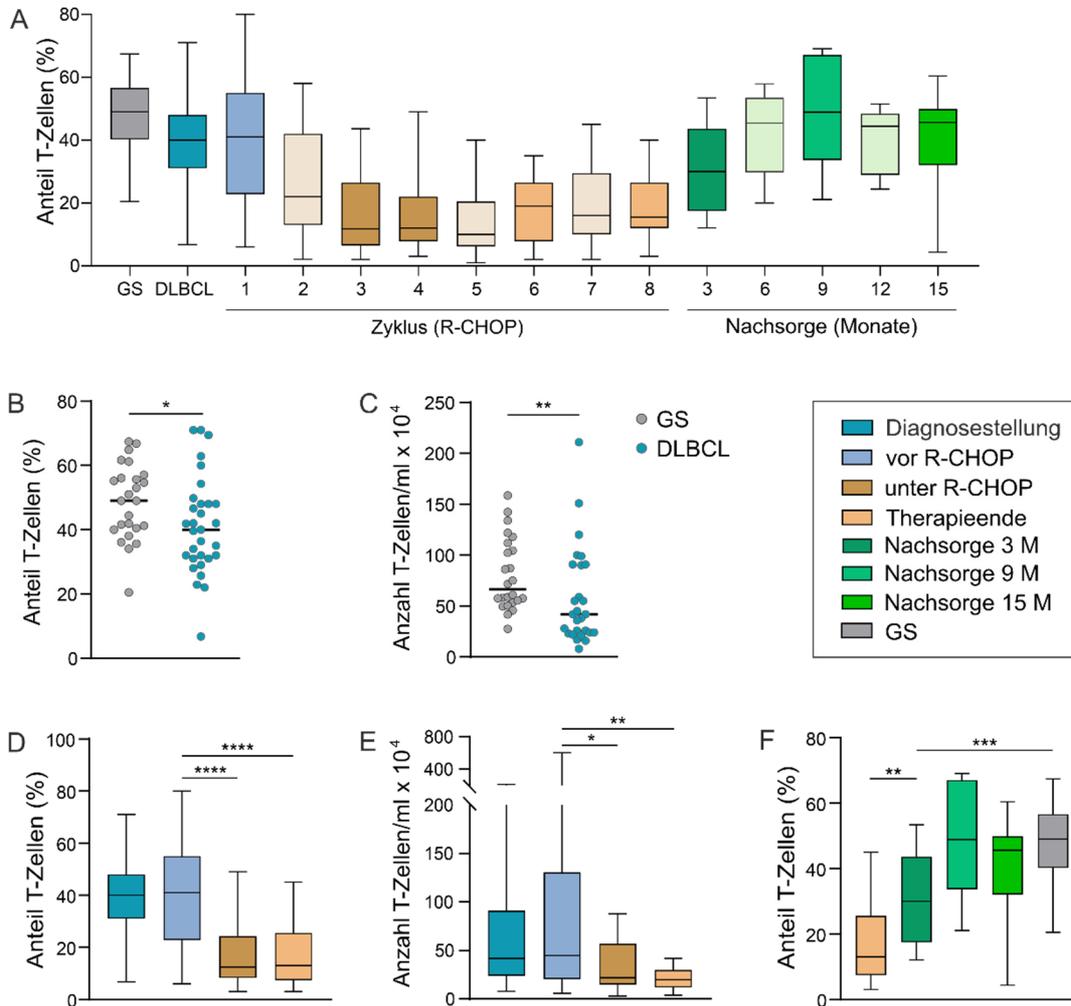


Abbildung 14: Einfluss der DLBCL-Erkrankung und der R-CHOP Therapie auf die Anzahl und den Anteil der T-Zellen. A) Übersicht des prozentualen Anteils der T-Zellen an der Gesamtzahl der CD45⁺ Leukozyten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (DLBCL), im Therapieverlauf der R-CHOP Therapie und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Therapieende (Nachsorge) sowie der Vergleich zu immunologisch gesunden Spendern (GS). B) Prozentualer Anteil der T-Zellen von gesunden Spendern (GS) im Vergleich zu DLBCL Patienten und Gesamtzahl der T-Zellen pro ml Blut (C). Die Gesamtzahl der T-Zellen im Blut wurde durch den prozentualen Anteil der T-Zellen aus den CD45⁺ Leukozyten bezogen auf die Gesamtzahl der Leukozyten pro ml Blut bestimmt. D) Veränderung des prozentualen Anteils der T-Zellen aus den CD45⁺ Leukozyten und der Anzahl der T-Zellen pro ml Blut (E) durch die Behandlung mit Prednison (vor R-CHOP) und durch die R-CHOP Therapie (unter R-CHOP = Zyklus 3 oder 4; Therapieende = Zyklus 6 oder 8). F) Prozentualer Anteil der T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Therapieende (3 M, 9 M und 15 M = Nachsorgetermine nach 3, 9 bzw. 15 Monaten).

Auch die Gesamtzahl der T-Zellen pro ml Blut verringerte sich bei den DLBCL Patienten mit einer Anzahl (Median) von 42 x 10⁴ Zellen/ml Blut im Vergleich zu 66 x 10⁴ Zellen/ml bei den gesunden Spendern (Abbildung 14C). Durch die initiale Gabe von Prednison veränderte sich weder der prozentuale Anteil der T-Zellen noch die Gesamtzahl (Abbildung 14D und E). Mit Beginn der R-CHOP Therapie hingegen sank der prozentuale Anteil der T-Zellen deutlich ab.

Bis Therapieende betrug der Anteil der T-Zellen nur noch zwischen 3 % und 45 % mit einem Median von 13 % (Abbildung 14D). Auch die Gesamtzahl der im Blut zirkulierenden T-Zellen verringerte sich im Verlauf der R-CHOP Therapie signifikant (Abbildung 14E). Zudem zeigte sich bei den DLBCL Patienten vor Beginn der Therapie ein deutlicher Unterschied in der Gesamtzahl der T-Zellen mit einem Minimum von 8×10^4 Zellen/ml Blut und einem Maximum von 211×10^4 Zellen/ml Blut. Am Ende der Therapie hingegen hatte keiner der Patienten mehr als 42×10^4 T-Zellen/ml Blut (Abbildung 14E). Nach Beendigung der R-CHOP Therapie stieg der prozentuale Anteil der T-Zellen direkt wieder an (Abbildung 14F).

Neben der Gesamtpopulation der T-Zellen wurde auch der Anteil an $CD16^+$ T-Zellen untersucht. Diese können Rituximab binden und könnten somit eine Antikörper-abhängige zytotoxische Funktion ausüben. Abbildung 15A zeigt einen Überblick über den prozentualen Anteil der $CD16^+$ T-Zellen der immunologisch gesunden Spender und der DLBCL Patienten zu allen untersuchten Zeitpunkten.

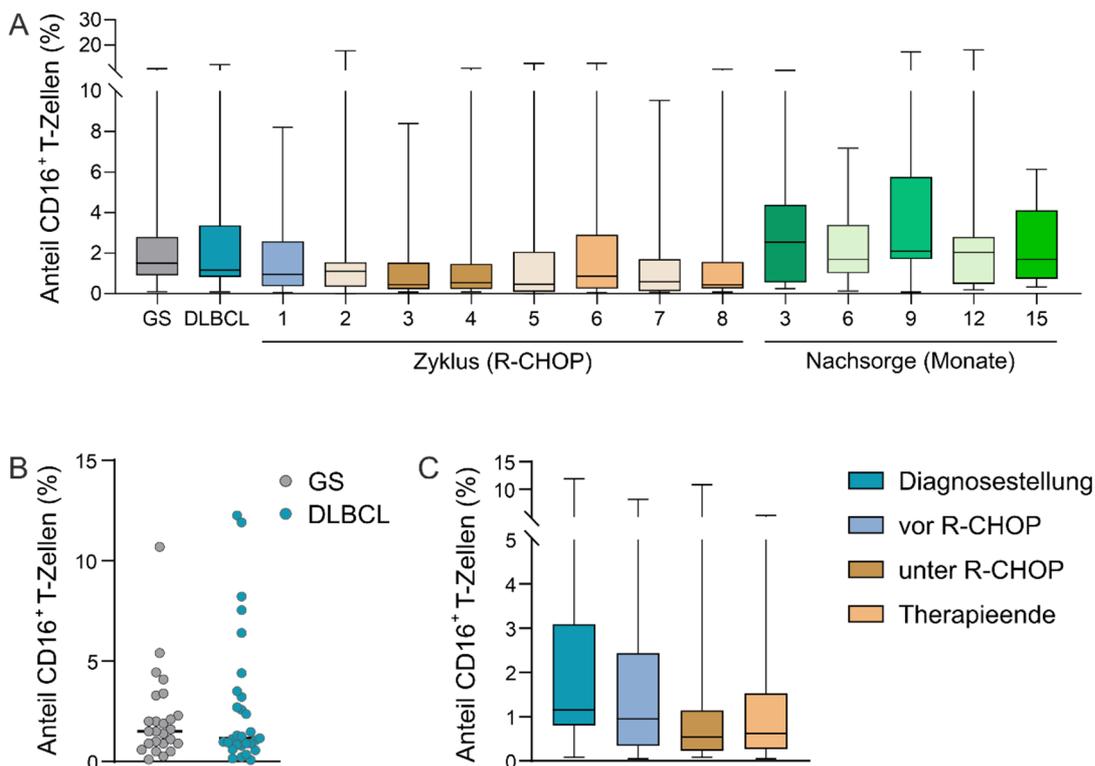


Abbildung 15: Einfluss der DLBCL-Erkrankung und der R-CHOP Therapie auf die Anzahl und den Anteil an $CD16^+$ T-Zellen. A) Übersicht über den prozentualen Anteil der $CD16^+$ T-Zellen an den $CD45^+$ Leukozyten von DLBCL Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (DLBCL), im Verlauf der R-CHOP Therapie und im Vergleich zu gesunden Spendern (GS) sowie zu verschiedenen Zeitpunkten nach Therapieende (Nachsorge). B) Prozentualer Anteil der $CD16^+$ T-Zellen bei DLBCL Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (DLBCL) im Vergleich zu gesunden Spendern (GS). C) Veränderung des prozentualen Anteils der $CD16^+$ T-Zellen durch die Gabe von Prednison (vor R-CHOP) und die Therapie mit mehreren Zyklen R-CHOP (unter R-CHOP = Zyklus 3 oder 4; Therapieende = Zyklus 6 oder 8).

Quantitativ zeigte sich kein signifikanter Unterschied des prozentualen Anteils der CD16⁺ T-Zellen zwischen den DLBCL Patienten und den gesunden Spendern (Abbildung 15B). Auch durch die initiale Behandlung der Patienten mit Prednison und der anschließenden R-CHOP Therapie über mehrere Zyklen kam es zu keiner signifikanten Änderung des prozentualen Anteils der CD16⁺ T-Zellen (Abbildung 15C).

Zu den bekanntesten unkonventionellen T-Zellen gehören die natürlichen Killer-T-Zellen (NKT-Zellen), die unter anderem durch die Expression von CD56 beschrieben werden. NKT-Zellen sind dafür bekannt, dass sie eine zytotoxische Funktion gegen verschiedene Tumore ausüben können [Hoyle 1998, Ortaldo 1991, Pievani 2011]. Daher wurde auch der Anteil der CD56⁺ T-Zellen bei DLBCL Patienten untersucht (Abbildung 16). Beim Vergleich der DLBCL Patienten mit den immunologisch gesunden Spendern wurde kein Unterschied im prozentualen Anteil der CD56⁺ T-Zellen beobachtet (Abbildung 16A und B). Auch die Behandlung der Patienten mit R-CHOP führte zu keiner Änderung des prozentualen Anteils der CD56⁺ T-Zellen (Abbildung 16A und C).

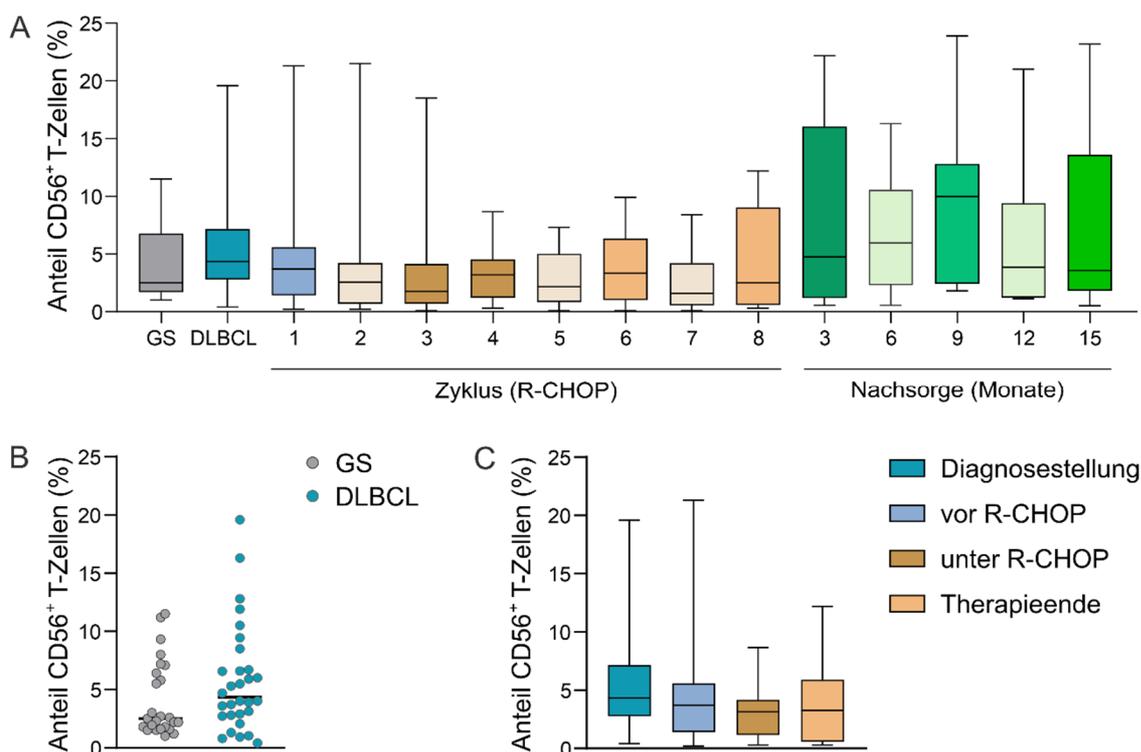


Abbildung 16: Einfluss der DLBCL-Erkrankung und der R-CHOP Therapie auf die Anzahl und den Anteil der CD56⁺ T-Zellen. A) Übersicht des prozentualen Anteils der CD56⁺ T-Zellen an den CD45⁺ Leukozyten bei Patienten mit DLBCL zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (DLBCL), im Verlauf der R-CHOP Therapie und im Vergleich zu immunologisch gesunden Spendern (GS) sowie zu verschiedenen Zeitpunkten nach Therapieende (Nachsorge). B) Prozentualer Anteil der CD56⁺ T-Zellen an den Leukozyten bei DLBCL Patienten bei Diagnosestellung (DLBCL) im Vergleich zu gesunden Spendern (GS). C) Einfluss der Gabe von Prednison (vor R-CHOP) und der Therapie mit mehreren Zyklen R-CHOP (unter R-CHOP = Zyklus 3 oder 4; Therapieende = Zyklus 6 oder 8) auf den prozentualen Anteil der CD56⁺ T-Zellen.

3.2.9. Quantitative Änderung der NK Zellen durch die R-CHOP Therapie bei Patienten mit DLBCL

Für die Bestimmung des prozentualen Anteils der NK Zellen wurden die CD45⁺/CD19⁻/CD3⁻ Zellen hinsichtlich ihrer Expression von CD56 und CD16 untersucht. Bei den NK Zellen unterscheidet man vor allem zwischen zwei Hauptpopulationen, den CD56^{bright} NK Zellen, die kein oder kaum CD16 exprimieren, und den CD56^{dim} NK Zellen, die CD16 erhöht exprimieren. Für die Bestimmung des prozentualen Anteils der NK Zellen an den CD45⁺ Leukozyten wurden beide Populationen in die Analyse miteinbezogen (siehe Abbildung 8).

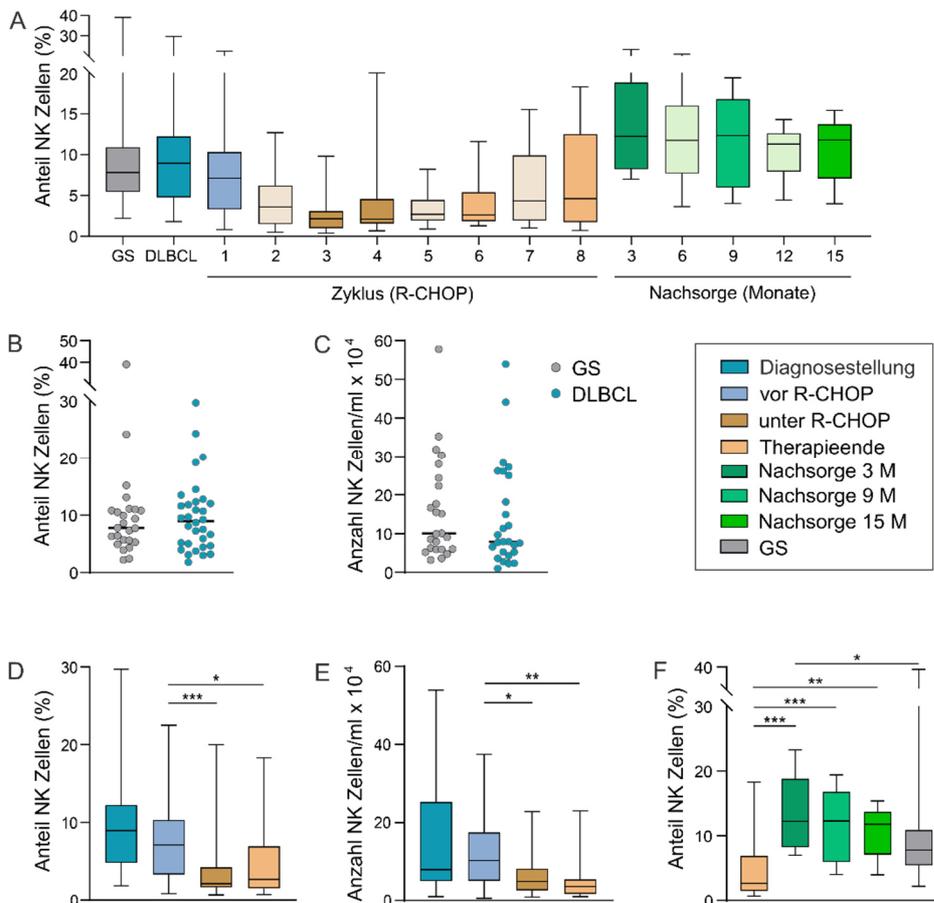


Abbildung 17: Einfluss der DLBCL Erkrankung und der R-CHOP Therapie auf den Anteil und die Anzahl an NK Zellen. A) Darstellung der Veränderung des prozentualen Anteils an NK Zellen durch die DLBCL-Erkrankung und durch die Therapie mit R-CHOP. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der NK Zellen an den CD45⁺ Leukozyten bei gesunden Spendern (GS) und bei Patienten mit diffus großzelligem B-Zell-Lymphom zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (DLBCL) und während der verschiedenen Zyklen mit R-CHOP, sowie innerhalb der ersten 15 Monate nach Therapieende. B) Statistische Auswertung des prozentualen Anteils der NK Zellen bei gesunden Spendern (GS) im Vergleich zu DLBCL Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (DLBCL) und C) der Gesamtzahl der NK Zellen pro ml Blut. Bestimmt wurde die Gesamtzahl der NK Zellen pro ml Blut durch den prozentualen Anteil der NK Zellen an den CD45⁺ Leukozyten bezogen auf die Gesamtzahl der im Blut enthaltenen Leukozyten. D) Veränderung des prozentualen Anteils der NK Zellen durch die Therapie der Patienten mit Prednison (vor R-CHOP) und durch die Behandlung mit R-CHOP (unter R-CHOP = Zyklus 3 oder 4; Therapieende = Zyklus 6 oder 8). E) Veränderung der Gesamtzahl der NK Zellen pro ml Blut durch die Behandlung der Patienten mit Prednison und R-CHOP. F) Prozentualer Anteil der NK Zellen an den CD45⁺ Leukozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Ende der Therapie (3 M, 9 M und 15 M = Nachsorgetermine nach 3, 9 bzw. 15 Monaten).

Abbildung 17A zeigt einen Überblick über den Anteil der NK Zellen bei den gesunden Spendern im Vergleich zu den DLBCL Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und unter R-CHOP Therapie, sowie zu verschiedenen Zeitpunkten nach Therapieende. Weder der prozentuale Anteil der NK Zellen noch die Gesamtzahl der NK Zellen pro ml Blut unterschied sich zwischen den DLBCL Patienten vor Therapiebeginn und den immunologisch gesunden Spendern (Abbildung 17B und C). Auch die initiale Behandlung der Patienten mit Prednison führte zu keiner signifikanten Veränderung des prozentualen Anteils oder der Gesamtzahl der NK Zellen (Abbildung 17D und E). Durch die Behandlung der Patienten mit R-CHOP hingegen verringerte sich sowohl der prozentuale Anteil der NK Zellen signifikant als auch die Gesamtzahl der im Blut enthaltenen NK Zellen. Nach Ende der R-CHOP Therapie erhöhte sich der prozentuale Anteil der NK Zellen direkt wieder signifikant innerhalb der ersten 3 Monate. Dabei zeigte sich eine leichte Überkompensation, bei der der prozentuale Anteil der NK Zellen 3 Monate nach Therapieende im Vergleich zu den gesunden Spendern signifikant erhöht war. 9 Monate nach Therapieende normalisierte sich der Anteil der NK Zellen wieder (Abbildung 17A und F).

3.3. Untersuchung der zytotoxischen Funktion von NK Zellen

Um die zytotoxische Funktion der NK Zellen bei Patienten mit DLBCL zu untersuchen, wurden die NK Zellen aus den PBMC mittels Microbeads von Miltenyi isoliert. Hierfür wurden zunächst die Monozyten, Granulozyten und T-Zellen durch die Verwendung von CD14, CD15 und CD3 Microbeads depletiert und im Anschluss die NK Zellen mittels CD56 positiv isoliert (Abbildung 5). Die isolierten NK Zellen wurden über Nacht in AIMV/10 % FCS bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die zytotoxische Funktion der NK Zellen wurde anschließend im Real-Time Killing Assay untersucht. In die Analyse der Zytotoxizität der NK Zellen gingen nur aufgereinigte NK Zellen ein, die eine Reinheit von über 80 % aufwiesen. Dabei wurde sowohl die „natürliche Zytotoxizität“ gegen K562 Zellen untersucht, als auch die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) gegen U-2932 (Abbildung 18A und B). Bei den U-2932 handelt es sich um eine DLBCL-Zelllinie, die CD20 auf ihrer Oberfläche exprimiert. Durch die Verwendung des chimären anti-CD20 Antikörpers Rituximab kann die Antikörper-abhängige Zytotoxizität der NK Zellen bestimmt werden (Abbildung 18A). Als Negativkontrolle wurde zudem die Zytotoxizität der NK Zellen gegen U-2932 Zellen ohne die Verwendung von Rituximab bestimmt und von der Zytotoxizität der U-2932 mit Rituximab abgezogen (Abbildung 18B). Die K562 Zellen hingegen zeichnen sich durch die fehlende Expression von MHC-Klasse I aus, wodurch ein starkes inhibitorisches Signal für die NK Zellen verloren geht, was zu deren Aktivierung führt (Abbildung 18A).

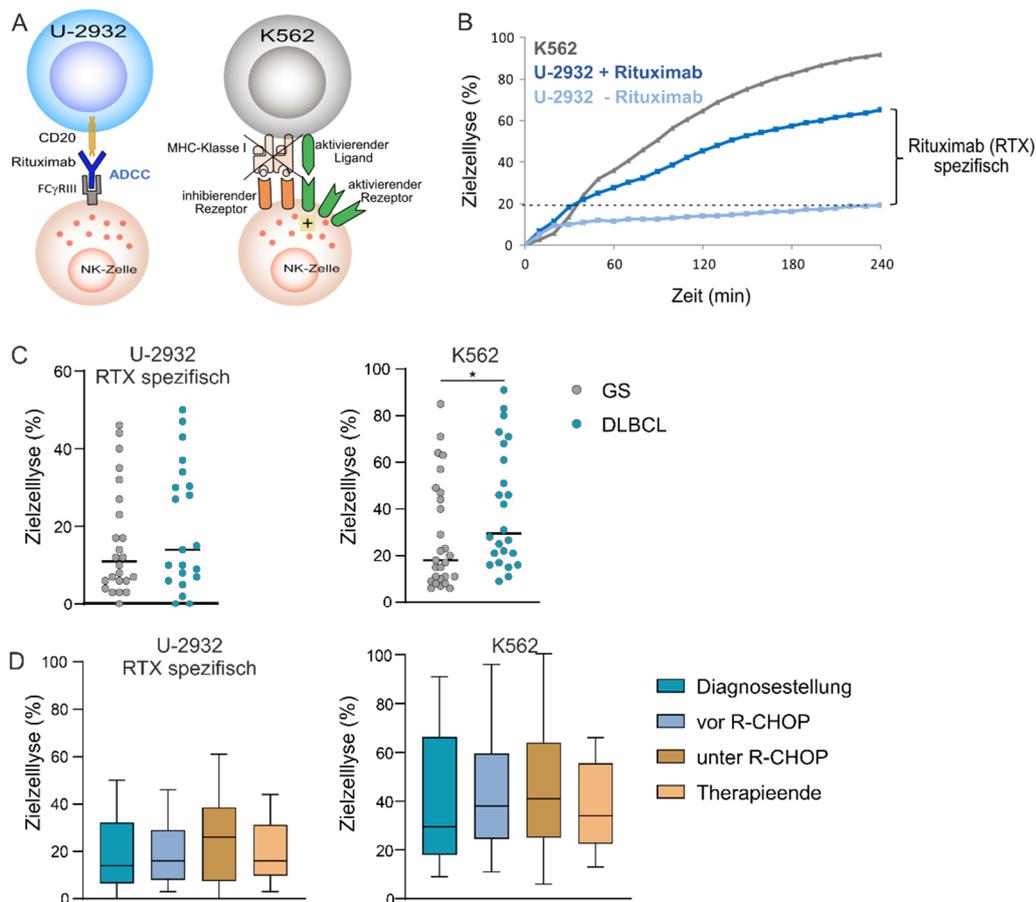


Abbildung 18: Zytotoxische Funktion der NK Zellen bei DLBCL Patienten. A) Schematische Übersicht der verwendeten Zielzelllinien und der Mechanismus der Zielzellerkennung durch die NK Zellen. U-2932 Zellen werden durch die Bindung von Rituximab an CD20 über den Fc γ -Rezeptor III der NK Zellen erkannt und daraufhin eliminiert. K562 Zellen werden durch das Fehlen von MHC-Klasse I als körperfremde Zellen erkannt und durch das Fehlen eines starken inhibitorischen Signals von den NK Zellen eliminiert. B) Beispielhafte Darstellung einer Killing-Kurve eines DLBCL Patienten. Die Verwendung der U-2932 Zellen ohne Rituximab zeigt dabei den Anteil an unspezifischem Killing bzw. die Höhe des Hintergrundsignals. Rituximab-spezifisches Killing entspricht daher der Differenz zwischen der Zielzelllyse zwischen U-2932 mit Rituximab und der Zielzelllyse der U-2932 ohne Rituximab. C) Prozentzahl der lysierten U-2932 (links) und der K562 Zellen (rechts) durch NK Zellen von gesunden Spendern (GS) im Vergleich zu DLBCL Patienten vor Therapiebeginn (DLBCL). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der lysierten Zellen nach 240 min. D) Einfluss der initialen Gabe von Prednison (vor R-CHOP) und der R-CHOP Therapie (unter R-CHOP = Zyklus 3 oder 4; Therapieende = Zyklus 6 oder 8) auf die Lyse von U-2932 Zellen (links) und K562 Zellen (rechts). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der lysierten Zellen nach 240 min. In allen Killing-Versuchen mit NK Zellen wurde eine Effektor- zu Zielzell-Ratio von 2:1 verwendet. RTX=Rituximab.

Abbildung 18C und D zeigt jeweils den Prozentsatz der lysierten Zielzellen nach 240 Minuten. Durch die Erkrankung der Patienten mit DLBCL zeigte sich keine veränderte Rituximab-abhängige Zytotoxizität der NK Zellen gegen die U-2932 (Abbildung 18C links), wohingegen die Zytotoxizität der NK Zellen gegen die K562 Zellen signifikant erhöht war (Abbildung 18C rechts). Die Behandlung der Patienten mit R-CHOP hatte keinen Einfluss auf die zytotoxische Funktion der NK Zellen (Abbildung 18D).

Allerdings zeigte sich durch die Behandlung der Patienten mit R-CHOP eine deutliche Veränderung der Zusammensetzung der aufgereinigten NK Zellen. Bei den NK Zellen

unterscheidet man vor allem zwischen den beiden Hauptpopulationen, den CD56^{dim} NK Zellen, die durch eine hohe Expression von CD16 gekennzeichnet sind, und den CD56^{bright} NK Zellen, die kein CD16 exprimieren (Abbildung 19A und B). Zudem gibt es vereinzelte CD56^{dim} NK Zellen, die kein CD16 exprimieren (hier CD56^{dim}CD16⁻), NK Zellen, die nur eine geringe Expression von CD16 aufweisen (CD16^{dim}) und NK Zellen, die sowohl CD16 als auch CD56 hoch exprimieren (CD56^{bright}CD16⁺).

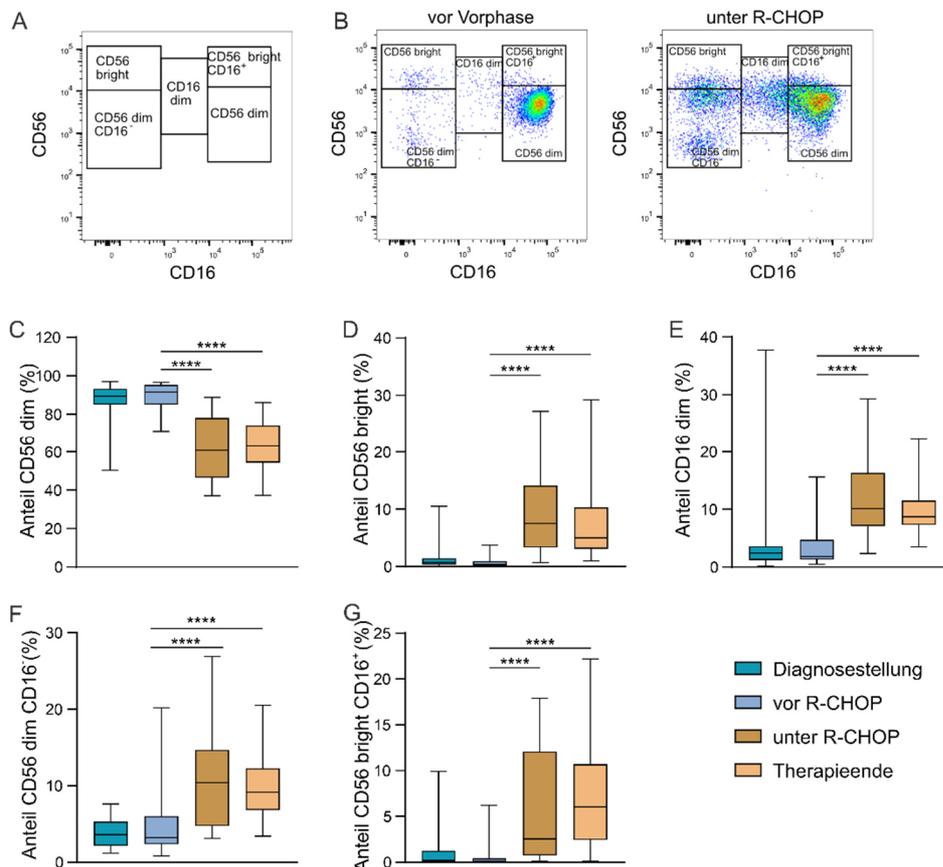


Abbildung 19: Verteilung der NK Subtypen bei Patienten mit DLBCL im Therapieverlauf.

A) Schematische Darstellung der analysierten NK Zell-Subpopulationen. B) Beispielflächenflusszytometrische Analyse eines Patienten mit DLBCL zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (links) und unter R-CHOP Therapie (rechts). Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte nach Kultivierung der aufgereinigten NK Zellen in AIMV/10 % FCS bei 37 °C und 5 % CO₂. Gezeigt wird die Gating-Strategie der aufgereinigten NK Zellen. Diese können anhand ihrer CD16 und CD56 Expression in verschiedene Subtypen unterteilt werden. C-G) Prozentualer Anteil der in B dargestellten NK Subtypen an den CD45⁺/CD3⁻/CD19⁻ Zellen in aufgereinigten NK Zellen bei Patienten mit DLBCL vor Therapiebeginn (vor Vorphase), nach Prednisongabe (vor R-CHOP) und unter R-CHOP Therapie (3-4. Zyklus = unter R-CHOP; 6-8. Zyklus = Therapieende).

Vor Therapiebeginn waren im Median 89,4 % der NK Zellen CD56^{dim} NK Zellen. Durch die Behandlung der Patienten mit R-CHOP verringerte sich der Anteil der CD56^{dim} NK Zellen signifikant auf ca 60 % im Median (Abbildung 19C). Der Anteil der CD56^{bright} Zellen hingegen betrug vor Therapiebeginn im Median nur ca. 1 % der NK Zellen und erhöhte sich während der Behandlung mit R-CHOP signifikant auf 7,5 %. Bei vereinzelten Patienten konnten dabei sogar Anteile von bis zu 29 % beobachtet werden (Abbildung 19D). Auch der Anteil der Zellen, die CD16 nur in geringem Maße exprimieren erhöhte sich durch die Behandlung mit R-CHOP

von 3 % vor Therapiebeginn auf 8 % (Abbildung 19E). Neben den CD56^{bright} NK Zellen, die kein CD16 exprimieren erhöhte sich durch die Behandlung mit R-CHOP auch der Anteil an CD56^{dim} NK Zellen, die kein CD16 exprimieren (Abbildung 19F). Zudem stieg durch die Behandlung mit R-CHOP auch der Anteil der NK Zellen, die sowohl CD16 als auch CD56 stark exprimieren von 1 % zu Therapiebeginn auf 7 % zum Therapieende signifikant an (Abbildung 19G). Zusammenfassend zeigte sich also, dass die CD56^{dim} NK Zellen, die vor Therapiebeginn mit fast 90 % den größten Anteil der NK Zellen ausmachten, im Verlauf der R-CHOP Therapie stark sanken und alle anderen NK Zell-Populationen signifikant anstiegen (Abbildung 19C-G). Dabei zeigte sich bei den NK Zellen durch die Behandlung mit R-CHOP eine Verschiebung der NK Zellen mit hoher CD16 Expression in Richtung von NK Zellen, die verringert CD16 exprimieren (Abbildung 19B).

3.4. Untersuchung der zytotoxischen Funktion von CD3⁺ T-Zellen

Zu Beginn der Studie wurde zunächst die Zytotoxizität von NK Zellen bestimmt, da diese dafür bekannt sind, dass sie als Zellen der angeborenen Immunabwehr eine hohe zytotoxische Aktivität gegen maligne entartete Zellen aufweisen. Zudem wird den NK Zellen eine Hauptrolle in der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität zugeschrieben [Coënon 2022]. Im Verlauf der Studie wurde ein Patient aufgenommen, der eine besondere Form des DLBCL hatte, die sich durch ein vermehrtes Auftreten von CD56⁺ T-Zellen auszeichnet. Es ist bereits bekannt, dass funktionell reife CD3⁺CD56⁺ NKT-ähnliche Zellen eine hohe Tumor-Lyse-Kapazität gegen viele verschiedene Tumorzellen besitzen [Hoyle 1998, Ortaldo 1991, Pievani 2011]. Da bei diesem Patienten mit T-Zell-reichem DLBCL der Anteil an CD56⁺ T-Zellen vor Therapiebeginn über 90 % der T-Zellen ausmachte (Abbildung 20A), wurden diese hinsichtlich ihrer zytotoxischen Aktivität untersucht. Hierfür wurden die CD3⁺ Zellen nach vorheriger Depletion von CD14 und CD15 mittels CD3 Microbeads positiv aufgereinigt (Abbildung 5) und über Nacht in AIMV/10 % FCS bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die CD3⁺ Zellen wurden für die weitere Isolation der NK Zellen verwendet. Im Real-Time Killing Assay zeigte sich bei diesem Patienten dann allerdings überraschenderweise eine deutliche Rituximab-abhängige zytotoxische Funktion der aufgereinigten CD3⁺ T-Zellen gegen die DLBCL-Zelllinie U-2932. Die Rituximab-abhängige Zytotoxizität wird jedoch nicht über CD56, sondern über CD16 vermittelt. Gegen die K562 Zellen hingegen zeigte sich bei diesem Patienten keine zytotoxische Aktivität (Abbildung 20C). Aufgrund der hohen beobachteten Rituximab-abhängigen Zytotoxizität der CD3⁺ T-Zellen bei dem Patienten mit T-Zell-reichem DLBCL und dem Vorhandensein von CD16⁺ T-Zellen bei diesem Patienten und bei weiteren Patienten mit DLBCL (Abbildung 15B und 20B), wurde ab diesem Zeitpunkt neben der zytotoxischen Funktion der NK Zellen auch die Zytotoxizität der T-Zellen analysiert.

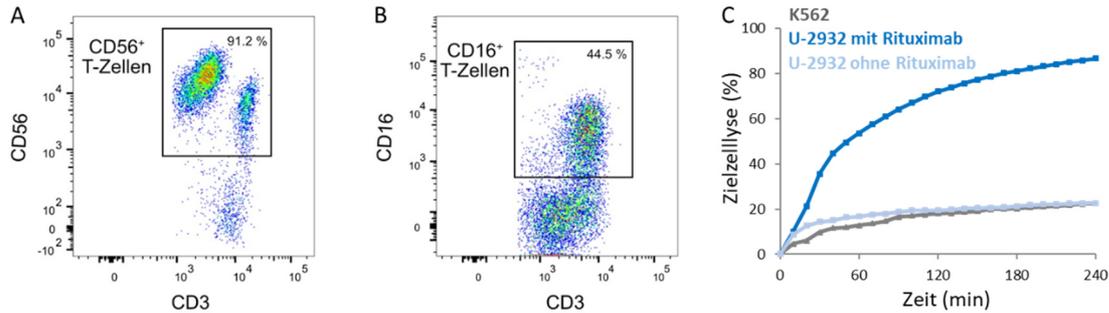


Abbildung 20: Anteil CD56⁺ und CD16⁺ T-Zellen und deren zytotoxische Funktion bei einem Patienten mit T-Zell- und Histiocyten-reichem DLBCL. A) Durchflusszytometrische Analyse der PBMC des Patienten mit T-Zell- und Histiocyten-reichem DLBCL vor Therapiebeginn. B) Durchflusszytometrische Analyse der aufgereinigten CD3⁺ T-Zellen im 2. Zyklus der R-CHOP Therapie C) Real-Time-Killing Assay mit den aufgereinigten CD3⁺ T-Zellen aus B. Effektor- zu Zielzell-Ratio von 10:1

Dabei zeigte sich, dass DLBCL Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im Vergleich zu immunologisch gesunden Spendern eine signifikant erhöhte Rituximab-abhängige Zytotoxizität gegen die U-2932 Zellen aufweisen. Bei 67 % der neu diagnostizierten DLBCL Patienten zeigte sich eine Rituximab-spezifische Lyse der U-2932 über 20 %, bei den gesunden Spendern hingegen nur bei 29 % der Spender (Abbildung 21A links).

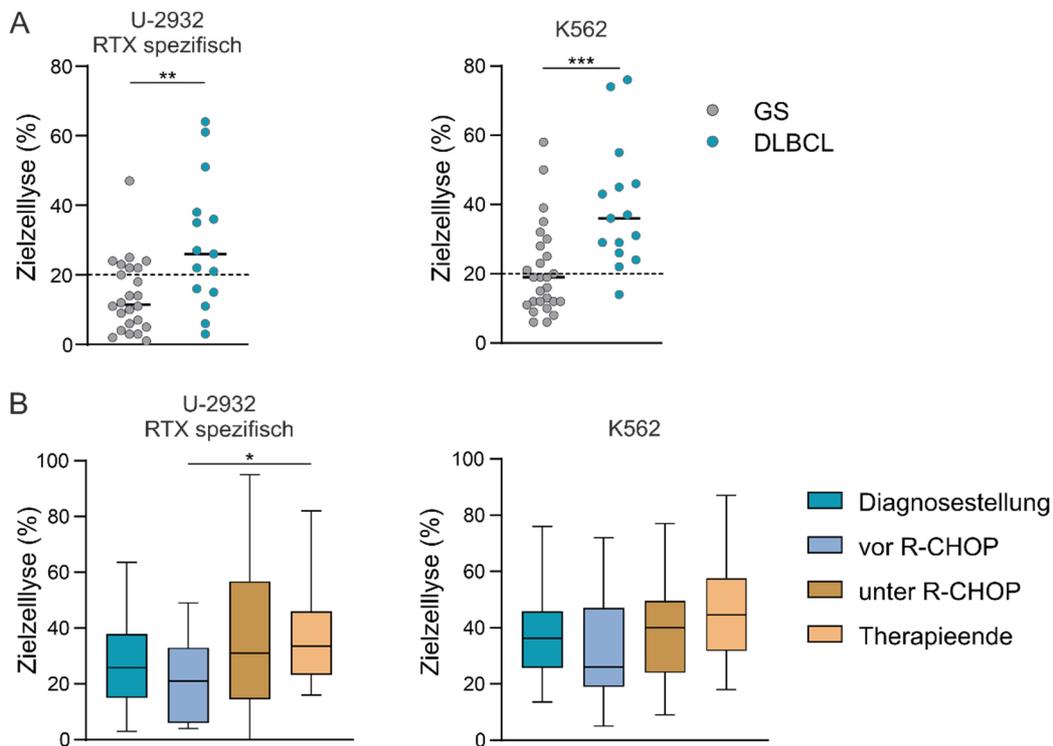


Abbildung 21: Veränderung der zytotoxischen Funktion von CD3⁺ T-Zellen bei DLBCL Patienten. A) Prozentzahl der lysierten U-2932 (links) und der K562 Zellen (rechts) durch aufgereinigte CD3⁺ T-Zellen von gesunden Spendern (GS) im Vergleich zu DLBCL Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (DLBCL). B) Einfluss der initialen Gabe von Prednison (vor R-CHOP) und der R-CHOP Therapie (unter R-CHOP = Zyklus 3 oder 4; Therapieende = Zyklus 6 oder 8) auf die Lyse von U-2932 Zellen (links) und K562 Zellen (rechts) durch aufgereinigte CD3⁺ T-Zellen. Gezeigt ist jeweils die Endpunktllyse nach 240 min. In allen Killing-Versuchen mit isolierten CD3⁺ T-Zellen wurde eine Effektor- zu Zielzell-Ratio von 10:1 verwendet. RTX=Rituximab.

Auch bei den K562 Zellen zeigte sich eine signifikant höhere Zielzellyse bei den aufgereinigten T-Zellen der Patienten mit DLBCL verglichen mit den gesunden Spendern. Hier lag mit Ausnahme eines Patienten bei allen T-Zellen der Patienten die Zielzellyse bei über 20 %. Bei den gesunden Spendern hingegen zeigte sich nur bei 37 % der Spender eine Lyse der K562 Zellen über 20 % (Abbildung 21A rechts). Durch die Behandlung der Patienten mit R-CHOP erhöhte sich die Rituximab-abhängige Zytotoxizität der CD3⁺ T-Zellen bis Therapieende nochmals signifikant, gegen die K562 Zellen zeigte sich eine tendenziell erhöhte Zytotoxizität (Abbildung 21B). Da sich sowohl die Rituximab-spezifische Lyse, als auch die Lyse der K562 Zellen zwischen den T-Zellen der Patienten vor Therapiebeginn und den gesunden Spendern deutlich unterscheidet, wurde im nächsten Schritt überprüft, inwieweit sich der Anteil der CD16⁺ T-Zellen und der CD56⁺ T-Zellen in den aufgereinigten und im RealTime Killing Assay verwendeten T-Zellen zwischen den Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und den gesunden Spendern unterscheidet. Hierfür wurden aufgereinigte T-Zellen zum Zeitpunkt des Real-Time-Killing-Assays durchflusszytometrisch analysiert und der prozentuale Anteil der CD16⁺ T-Zellen und der CD56⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD3⁺ Zellen bestimmt (Abbildung 22).

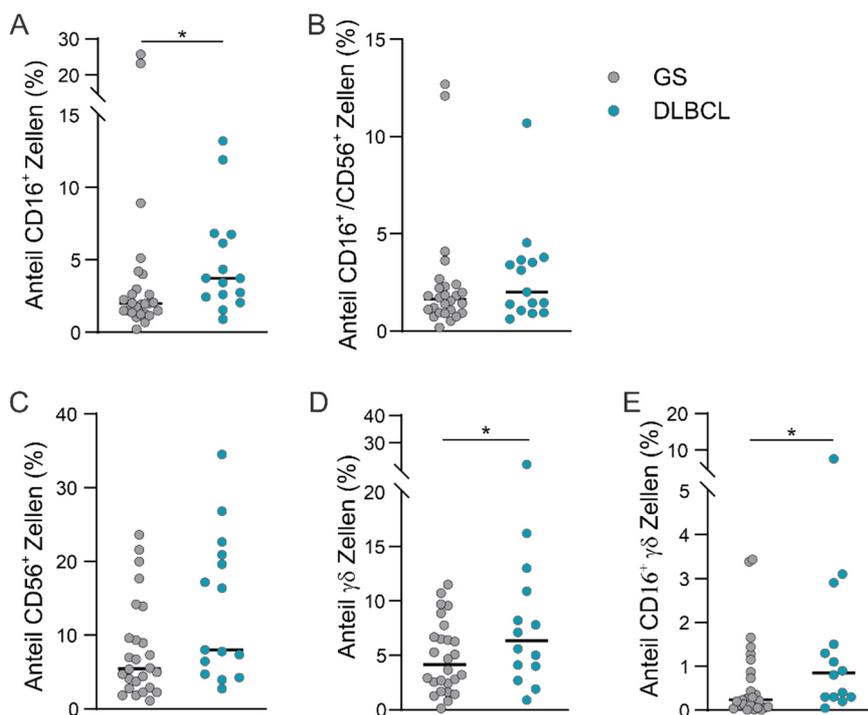


Abbildung 22: prozentualer Anteil einzelner T-Zell-Subtypen. Durchflusszytometrische Analyse der CD3⁺ aufgereinigten T-Zellen. A) Prozentualer Anteil der CD16⁺ Zellen. B) Prozentualer Anteil der CD16⁺/CD56⁺ Zellen. C) Prozentualer Anteil der CD56⁺ Zellen. D) Prozentualer Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen. E) Prozentualer Anteil der CD16⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen. Grau = gesunde Spender (GS); Türkis = DLBCL Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.

Dabei zeigte sich eine leicht signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils der CD16⁺ T-Zellen bei den Patienten mit DLBCL (Abbildung 22A). Der prozentuale Anteil der CD16⁺/CD56⁺ doppelt-positiven Zellen hingegen unterschied sich nicht zwischen den beiden

Kohorten (Abbildung 22B). Und auch im prozentualen Anteil der CD56⁺ T-Zellen zeigte sich keine Veränderung bei den Patienten mit DLBCL (Abbildung 22C). Neben den CD56⁺ T-Zellen gehören auch die $\gamma\delta$ T-Zellen zu den unkonventionellen T-Zellen, denen eine wichtige Rolle bei der Tumormunität zugeschrieben wird [Allegria 2022]. Im Vergleich zu den gesunden Spendern zeigte sich ein signifikant erhöhter prozentualer Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen bei den DLBCL Patienten. Dieser stieg im Median von 4 % bei den gesunden Spendern auf 7 % bei den DLBCL Patienten an (Abbildung 22D). Und auch der prozentuale Anteil der CD16⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen war bei den DLBCL Patienten signifikant erhöht (Abbildung 22E).

Eine weitere Möglichkeit einen Zusammenhang zwischen der erhöhten Zielzellyse und den einzelnen Subpopulationen der T-Zellen zu untersuchen, stellt die Korrelationsanalyse dar. Hierbei sollte überprüft werden, inwieweit der prozentuale Anteil der einzelnen T-Zell-Subpopulationen mit der Prozentzahl der lysierten Zielzellen korreliert. Da die U-2932 Zellen in Abhängigkeit von Rituximab, das den Fc γ -Rezeptor III (CD16) auf den Effektorzellen bindet, lysiert werden, wurde zunächst die Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil der CD16⁺ T-Zellen und der CD16⁺/CD56⁺ T-Zellen mit der Rituximab-spezifischen Lyse der U-2932 Zellen bestimmt (Abbildung 23A und B).

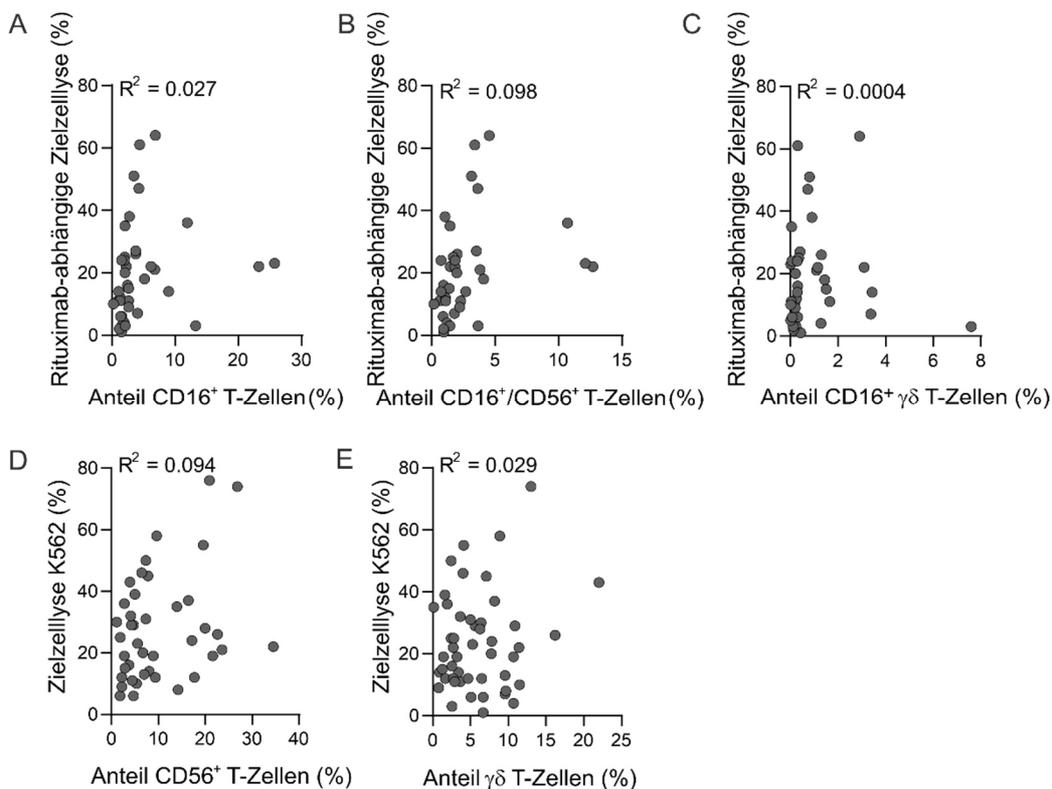


Abbildung 23: Korrelationsanalyse der Zielzellyse mit dem prozentualen Anteil einzelner T-Zell-Subtypen. A-C) Korrelationsanalyse der Rituximab-abhängigen Lyse der U-2932 Zellen mit dem prozentualen Anteil der CD16⁺ T-Zellen (A), der CD16⁺/CD56⁺ Zellen (B) und der CD16⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen (C). D-E) Korrelationsanalyse der Lyse der K562 Zellen mit dem prozentualen Anteil an CD56⁺ T-Zellen (D) und dem prozentualen Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen (E).

Dabei zeigte sich keine Korrelation mit einem R^2 von 0,027 für die Korrelation der $CD16^+$ T-Zellen und der Lyse der U-2932 (Abbildung 23A) und einem R^2 von 0,098 für die Korrelation zwischen den $CD16^+/CD56^+$ T-Zellen und der Lyse der U-2932 (Abbildung 23B). Auch zwischen dem prozentualen Anteil der $CD16^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen und der Rituximab-spezifischen Lyse der U-2932 zeigte sich keine Korrelation mit einem R^2 von 0,0004 (Abbildung 23C). Auch die Korrelationsanalyse der Lyse der K562 Zellen mit den Subpopulationen in den T-Zellen zeigte keinen Zusammenhang. Für die Korrelation der $CD56^+$ T-Zellen mit der Lyse der K562 ergab sich ein R^2 von 0,094 (Abbildung 23D) und für die Korrelation der $\gamma\delta$ T-Zellen mit der Lyse der K562 ein R^2 von 0,029 (Abbildung 23E). Zusammenfassend konnte eine deutlich signifikante Erhöhung der zytotoxischen Aktivität der isolierten $CD3^+$ T-Zellen bei Patienten mit DLBCL beobachtet werden, jedoch ließ sich diese nicht auf den prozentualen Anteil spezieller Subpopulationen zurückführen.

3.5. Einfluss des Anteils $CD16^+$ Monozyten auf die Prognose von DLBCL Patienten

Bei der Analyse der prozentualen Anteile einzelner Zellpopulationen in den PBMC zeigte sich bei den DLBCL Patienten vor Therapiebeginn im Vergleich zu den gesunden Spendern häufig eine starke Streuung des prozentualen Anteils einzelner Zelltypen. Diese Streuung zeigte sich vor allem im prozentualen Anteil der Monozyten (Abbildung 10B), der $CD16^+$ Monozyten (Abbildung 11B), der $CD56^+$ Monozyten (Abbildung 12B), und der B-Zellen (Abbildung 13B). Im Folgenden sollte daher untersucht werden, inwieweit ein deutlich veränderter Anteil der einzelnen Zellpopulationen einen Aufschluss über die Prognose der Patienten geben kann. Dabei sollte die Progredienz der Erkrankung für das erste Jahr nach Therapieende untersucht werden. Von den 33 in die Studie aufgenommenen Patienten entwickelten 8 Patienten innerhalb des ersten Jahres nach Therapieende ein Rezidiv oder sind im Verlauf der Therapie verstorben. 14 Patienten verblieben das erste Jahr in Remission und 11 Patienten befinden sich zum Zeitpunkt, als die Analyse für diese Arbeit beendet wurde noch in Therapie oder innerhalb des ersten Jahres nach Therapieende (Abbildung 24A). Bei der Analyse des prozentualen Anteils der einzelnen Zelltypen an den PBMC und des Auftretens eines Rezidivs innerhalb des ersten Jahres nach Therapieende, zeigte sich nur bei den $CD16^+$ Monozyten ein signifikanter Einfluss des prozentualen Anteils der Zellen auf die Ausbildung eines Rezidivs. Im Vergleich zu den gesunden Spendern, deren Anteil $CD16^+$ Monozyten bei allen Spendern unter 10 % lag, zeigte sich bei 29 % der DLBCL Patienten vor Therapiebeginn ein prozentualer Anteil der $CD16^+$ Monozyten von über 10 %. Von diesen Patienten blieb nur ein Patient das erste Jahr nach Therapieende in Remission, wobei dessen Anteil an $CD16^+$ Monozyten mit 12,8 % eher noch im unteren Bereich lag (Abbildung 24B).

50 % der Patienten mit einem erhöhten Anteil an CD16⁺ Monozyten haben innerhalb des ersten Jahres ein Rezidiv entwickelt und 37,5 % befinden sich aktuell noch in Therapie (Abbildung 24B).

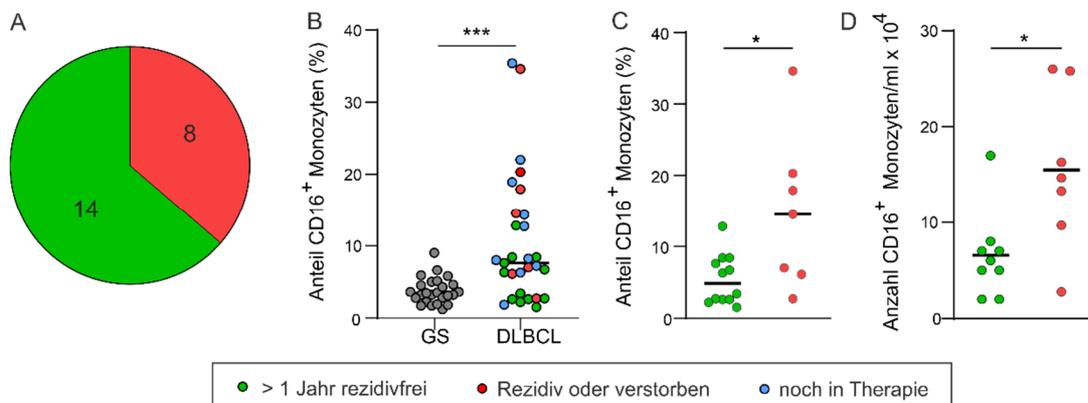


Abbildung 24: Einfluss der Menge an CD16⁺ Monozyten zu Therapiebeginn auf die Prognose von DLBCL Patienten. A) Verteilung der Patienten, welche entweder innerhalb des ersten Jahres nach Therapieende in Remission verblieben sind (grün) oder aber bei denen sich innerhalb des ersten Jahres nach Therapieende ein Rezidiv gebildet hat (rot). B) Prozentualer Anteil der CD16⁺ Monozyten bei gesunden Spendern (grau) im Vergleich zu den DLBCL Patienten vor Therapiebeginn. Dabei wird bei den DLBCL Patienten unterschieden, inwieweit sich bei ihnen innerhalb des ersten Jahres nach Therapieende ein Rezidiv bildete oder nicht. C und D) Vergleich des prozentualen Anteils der CD16⁺ Monozyten (C) und der Gesamtzahl der CD16⁺ Monozyten pro ml Blut (D) zu Therapiebeginn bei Patienten mit Rezidiv (rot) und Patienten in Remission (grün) innerhalb des ersten Jahres nach Therapieende.

Vergleicht man direkt den prozentualen Anteil der CD16⁺ Monozyten zwischen den Patienten, die das erste Jahr in Remission verblieben und den Patienten mit Rezidiv, so zeigte sich bei den Patienten mit Rezidiv ein signifikant erhöhter Anteil an CD16⁺ Monozyten zu Therapiebeginn (Abbildung 24C). Auch die Gesamtzahl der CD16⁺ Monozyten pro ml Blut war bei Patienten mit Rezidiv zu Therapiebeginn signifikant erhöht (Abbildung 24D)

4. Diskussion

Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) ist die häufigste Form des aggressiven Non-Hodgkin-Lymphoms [Armitage 1998, 2017]. Trotz der verbesserten Standardtherapie durch die Gabe von Rituximab kommt es bei ca. 30-50 % der Patienten zur Bildung eines Rezidivs [Coiffier 2010, Pfreundschuh 2011]. Aufgrund dessen ist die prognostische Beurteilung der Patienten wichtig für die Entwicklung einer individualisierten Therapie bei DLBCL. Zurzeit sind prognostische Marker häufig auf Seite der Tumore zu finden, wie zum Beispiel dem immunhistochemischen Nachweis prognostischer Biomarker [Alex Chan 2019, Hans 2004, Papageorgiou 2021], der Erstellung von Genexpressionsanalysen [Rosenwald 2002] oder einer frühen Zwischenanalyse mit Positronenemissionstomographie [Mikhaeel 2009] nach Beginn der R-CHOP Therapie. Neben Unterschieden auf Seiten des Tumors, die einen Einfluss auf die Prognose haben können, spielt auch das Immunsystem eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von Tumorerkrankungen. Daher wurde in dieser Arbeit das Augenmerk auf die Seite des Immunsystems gelegt. Mit dieser Arbeit soll ein Überblick über quantitative, aber auch qualitative Veränderungen, der im Blut zirkulierenden Immunzellen, bei DLBCL Patienten gegeben werden. Dafür wurde Blut sowohl zu Beginn der Therapie, als auch im weiteren Therapieverlauf hinsichtlich der Zusammensetzung untersucht.

4.2. Quantitative Bestimmung der Granulozyten bei DLBCL Patienten

Die Granulozyten gehören zur Gruppe der Leukozyten und können je nach Morphologie und Färbeverhalten in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten unterteilt werden. Da der Anteil der eosinophilen und basophilen Granulozyten im peripheren Blut bei unter 5 % liegt, wurden in dieser Arbeit nur neutrophile Granulozyten berücksichtigt. Diese sind mit ca. 70 % die häufigsten Leukozyten im peripheren Blut [Blanco-camarillo 2021]. Traditionell werden zirkulierende Neutrophile auf einem diskontinuierlichen Dichtegradienten isoliert. Mit dieser Technik befinden sich die Neutrophilen in der granulozytären Fraktion mit hoher Dichte, während sich die PBMC in der Fraktion mit niedriger Dichte befinden [Mishalian 2017]. In dieser Arbeit wurden mit der Dichtegradientenzentrifugation nur die Zellen mit niedriger Dichte isoliert. In den letzten Jahren haben mehrere Studien gezeigt, dass ein beträchtlicher Anteil von Granulozyten zusammen mit den PBMC, die eine niedrigere Dichte haben, aufgereinigt wird. Diese einzigartige Population wird auch als „Low-density-Neutrophile (LDN) bezeichnet und in Zusammenhang mit verschiedenen pathologischen Zuständen wie HIV [Cloke 2012], Autoimmunerkrankungen [Denny 2010] und Krebs [C.-Y. Liu 2010, Rodriguez 2009, Schmielau 2001] gebracht. Dabei zeigte sich in verschiedenen Studien ein erhöhter Anteil der CD15⁺ Neutrophilen, in den mittels Dichtegradienten aufgereinigten PBMC, bei

Patienten mit verschiedenen fortgeschrittenen soliden Tumoren [C.-Y. Liu 2010, Rodriguez 2009, Sagiv 2015, Schmielau 2001]. Diese Beobachtungen in soliden Tumoren konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Im Gegenteil, bei den DLBCL Patienten zeigte sich ein signifikant geringerer prozentualer Anteil an Granulozyten innerhalb der PBMC und auch die Gesamtzahl der im Blut enthaltenen LDN war bei den DLBCL Patienten im Vergleich zu den gesunden Spendern signifikant verringert. Eine mögliche Erklärung für den unerwartet verringerten Anteil an Granulozyten bei den Patienten mit DLBCL könnte die Arbeit von Manfroi *et al.* 2017 liefern. Diese zeigte, dass die transformierten B-Zellen der DLBCL Patienten das Chemokin CXCL8 exprimieren. Bei gesunden B-Zellen hingegen konnte keine Expression des Chemokins beobachtet werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die transformierten B-Zellen dadurch in der Lage sind APRIL⁺ Granulozyten aus dem Blut zum Tumor zu rekrutieren. APRIL wird dabei sowohl von Granulozyten im peripheren Blut als auch von Granulozyten im Knochenmark exprimiert [Manfroi 2017]. Diese Rekrutierung von Granulozyten aus dem Blut in Abhängigkeit von der CXCL8 Expression der Tumorzellen, die bisher nur für DLBCL-Zellen beschrieben ist, könnte die in dieser Arbeit beobachtete verringerte Anzahl an Granulozyten in den PBMC erklären. Allerdings werden in der Arbeit von Manfroi *et al.* 2017 Neutrophile aus der granulozytären Fraktion untersucht. Um die Abwanderung der LDNs aus dem Blut zum Tumor zu bestätigen, müsste daher überprüft werden, inwieweit die Granulozyten, die zusammen mit den PBMC isoliert werden, APRIL positiv sind. In dieser Arbeit konnte allerdings ebenfalls gezeigt werden, dass auch 15 Monate nach Ende der Therapie der Anteil der Neutrophilen in der LD-Fraktion bei den DLBCL Patienten noch signifikant geringer ist, verglichen mit den gesunden Spendern. Dies würde gegen die Theorie sprechen, dass der erniedrigte Anteil der Granulozyten in den PBMC allein durch ein Abwandern der Granulozyten aus dem Blut zum Tumor verursacht wird. Allerdings ist der Unterschied nach Therapieende deutlich geringer als vor Therapiebeginn. Zudem zeigten sich große Schwankungen zwischen den einzelnen Patienten. Daher sollten gerade Patienten, die noch Monate nach Ende der Therapie einen signifikant verringerten Anteil an Granulozyten aufweisen, beobachtet werden, inwieweit diese ein Rezidiv entwickeln.

Durch die Behandlung der Patienten mit R-CHOP erhöhte sich sowohl der prozentuale Anteil der LDN als auch die Gesamtzahl der im Blut enthaltenen LDN. Die bei der Behandlung verwendeten Zytostatika greifen in den Vermehrungszyklus von sich schnell teilenden Zellen ein. Krebszellen, die eine besonders hohe Teilungsrate haben, sind somit besonders anfällig für Zytostatika. Allerdings gibt es auch gesunde Zellen im Körper mit einer hohen Teilungsrate, wie zum Beispiel Zellen des blutbildenden Knochenmarks, die durch die Gabe der Zytostatika zerstört werden. Um zu verhindern, dass die Patienten aufgrund der Zerstörung der Immunzellen eine zu hohe Infektanfälligkeit aufweisen, wird zusammen mit der Chemotherapie auch Filgrastim gegeben. Filgrastim ist ein Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor

(G-CSF), der die Reifung der Neutrophilen anregt. Die Freisetzung der Neutrophilen aus dem Knochenmark hängt zudem von stimulierenden Faktoren und Zytokinen ab, darunter neben IL-23 und IL-17 auch das G-CSF [Ocana 2017]. Durch das verfrühte Ausschütten unreifer Granulozyten aus dem Knochenmark durch die Gabe von G-CSF, lässt sich zudem erklären, warum ein enormer Anstieg der Granulozyten in der Fraktion mit geringer Dichte beobachtet werden kann. Denn während sich reife Neutrophile vor allem in der granulozytären Fraktion mit hoher Dichte isolieren lassen, befinden sich unreife Granulozyten ausschließlich in der Fraktion mit niedriger Dichte [Mishalian 2017]. Somit ist es nicht verwunderlich, dass der Anteil der Neutrophilen in der LD Fraktion durch die Behandlung der Patienten mit Filgrastim signifikant ansteigt.

4.3. Quantitative Bestimmung der Monozyten bei DLBCL Patienten

Monozyten sind angeborene Immunzellen des mononukleären Phagozytensystems, die sich als wichtige Regulatoren der Krebsentwicklung und -progression erwiesen haben. Derzeit gibt es drei Untergruppen von Monozyten, die klassischen Monozyten ($CD14^+CD16^-$), die nichtklassischen Monozyten ($CD14^{low}CD16^+$) und intermediäre Monozyten ($CD14^+CD16^+$) [Ziegler-Heitbrock 2010]. Bei Krebserkrankungen erfüllen die verschiedenen Untergruppen von Monozyten Funktionen, die sowohl zur pro- als auch zur anti-tumoralen Immunität beitragen, darunter Förderung der Angiogenese, Phagozytose, Sekretion von tumoriziden Mediatoren, Umbau der extrazellulären Matrix, Rekrutierung von Lymphozyten und Differenzierung in tumorassoziierte Makrophagen und dendritische Zellen [Olingy 2019]. In dieser Arbeit wurde sowohl der prozentuale Anteil der Gesamtzahl der $CD14^+$ Monozyten bestimmt als auch der prozentuale Anteil der intermediären $CD14^+CD16^+$ Monozyten. Dabei zeigte sich ein signifikant erhöhter prozentualer Anteil der $CD14^+$ Monozyten und der $CD14^+CD16^+$ Monozyten bei den Patienten mit DLBCL im Vergleich zu den gesunden Spendern. Dieser erhöhte Anteil der Monozyten könnte durch vom Tumor stammenden Chemokinen verursacht werden, die die Proliferation von Monozyten induzieren können, wodurch das Tumorwachstum gefördert wird. Monozyten werden aus dem Knochenmark ins Blut freigesetzt und migrieren im Anschluss ins Gewebe, wo sie sich zu Makrophagen differenzieren. Bei der Tumormunität spielen dabei v.a. die tumorassoziierten Makrophagen (TAMs) eine entscheidende Rolle. Li *et al.* konnten bereits zeigen, dass bei DLBCL Patienten die Anzahl der TAMs mit der Zahl der Monozyten im peripheren Blut korreliert [Y.-L. Li 2019]. TAMs können dabei verschiedene Zytokine absondern, die das Tumorwachstum und die Angiogenese fördern. Daher ist es nicht überraschend, dass bereits mehrere Studien zeigen konnten, dass eine erhöhte Anzahl der im Blut zirkulierenden Monozyten mit einer schlechteren Prognose einhergeht [Nitta 2015, Tadmor 2014, Wilcox 2011, C. Wu 2016]. Ein etwas anderer Ansatz, bei dem das Lymphozyten- zu Monozyten-Verhältnis untersucht wurde,

zeigte gleiche Ergebnisse [Gao 2021, Z. M. Li 2012, J. Wang 2017]. Bei all diesen Studien wurde Blut von mehreren hundert Patienten ausschließlich zu Therapiebeginn untersucht. In unserer Arbeit wurde das Blut von 33 DLBCL Patienten zu Beginn und im Verlauf der Therapie untersucht. Ein signifikanter Unterschied im Anteil der Monozyten von Patienten mit Rezidiv und bei Patienten ohne Rezidiv konnte bisher nicht gezeigt werden. Möglicherweise ist die untersuchte Kohorte noch zu klein. Zu einem ähnlichen Schluss kamen die Autoren der Studie von Han *et al.* 2017, die das Blut von 45 DLBCL Patienten untersucht haben und in ihrer Kohorte ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen der Anzahl an Monozyten und der Prognose feststellen konnten [Han 2017].

Umso überraschender ist die Beobachtung, dass sowohl der prozentuale Anteil der CD14⁺CD16⁺ Monozyten als auch die Anzahl der im Blut zirkulierenden CD14⁺CD16⁺ Monozyten bereits einen signifikanten Einfluss auf die Prognose in unserer Studie zeigte. So konnte bisher nur bei einem Patienten mit einem erhöhten Anteil CD14⁺CD16⁺ Monozyten eine rezidivfreie Zeit von über einem Jahr beobachtet werden. Alle anderen Patienten in unserer Studie, die einen erhöhten Anteil der CD14⁺CD16⁺ Monozyten aufwiesen, hatten innerhalb des ersten Jahres nach Therapieende ein Rezidiv entwickelt, sind verstorben oder befinden sich noch in R-CHOP Therapie. In den meisten prognostischen Studien wurde bislang hauptsächlich die Gesamtzahl der Monozyten betrachtet und nur wenige Studien analysierten deren Untergruppen und ihre klinische Relevanz, obwohl bekannt ist, dass deren intrinsische Funktion unterschiedlich ist. So gibt es unter anderem Arbeiten, die zeigen, dass dendritische Zellen (DC), die aus CD16⁺ Monozyten generiert werden, zu einer Untergruppe der regulatorischen DCs gehören, die eine Immuntoleranz gegenüber Tumoren induzieren können [Rivas-Carvalho 2004, Sánchez-Torres 2001]. Einen weiteren entscheidenden Faktor der Tumorprogression stellt die Induktion der Angiogenese dar, da neoplastisches Gewebe ein Gefäßsystem für die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung benötigt. Dabei stellen myeloide Zellen wichtige Regulatoren der Angiogenese in der Tumormikroumgebung dar. Ein wichtiger Faktor für die Angiogenese ist dabei der Wachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Es konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden, dass v.a die CD16⁺ Monozyten und ihre Nachkommen für die Freisetzung von VEGF durch den Tumor verantwortlich sind [Coffelt 2010, Sidibe 2018, Venneri 2007]. Zudem konnte bei Patienten mit einem Cholangiokarzinom gezeigt werden, dass periphere CD16⁺ Monozyten tumorfördernde Eigenschaften aufwiesen, indem sie höhere Mengen angiogener Chemokine und Wachstumsfaktoren exprimieren [Subimerb 2010]. Neben der tumorfördernden Wirkung der CD16⁺ Monozyten könnten diese allerdings auch den Tod von Tumorzellen durch Antikörperabhängige Zytotoxizität (ADCC) auslösen [Yeap 2016]. Bei der Behandlung der DLBCL Patienten gehört die Gabe von Rituximab zur Standardtherapie. Rituximab könnte daher die ADCC der CD16⁺ Monozyten vermitteln.

CD16⁺ Monozyten könnten daher neben den NK Zellen eine weitere Population darstellen, die Tumorzellen über Rituximab direkt lysieren können. Dennoch zeigte sich bei den DLBCL Patienten ein prognostischer Nachteil durch das Vorhandensein der CD16⁺ Monozyten. Somit scheint die tumorfördernde Wirkung der CD16⁺ Monozyten deutlich zu überwiegen. Bei CD16⁺ Monozyten aus dem peripheren Blut von Patienten mit Ovarialkarzinomen konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass deren Aktivierung *in vitro* zu einer verringerten Fähigkeit zur ADCC und Phagozytose von Tumorzellen führte [Gordon 2006]. Inwieweit diese Beobachtungen auch auf die CD16⁺ Monozyten von Lymphompatienten übertragbar ist, ist bisher nicht bekannt. Dennoch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das vermehrte Vorhandensein von CD16⁺ Monozyten bei DLBCL Patienten einen Nachteil hinsichtlich des Therapieerfolges darstellt.

Neben dem Vergleich des prozentualen Anteils der Monozyten von DLBCL Patienten zu Therapiebeginn mit gesunden Spendern wurde auch der Anteil der Monozyten im Verlauf der Therapie bestimmt. Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg des prozentualen Anteils und der Gesamtzahl der CD14⁺ Monozyten und der CD14⁺CD16⁺ Monozyten. Wodurch dieser Anstieg hervorgerufen wird, ist nicht bekannt. Zusammen mit der Chemotherapie und Rituximab erhalten die Patienten noch Filgrastim. Filgrastim reguliert die Produktion von Neutrophilen innerhalb des Knochenmarks, indem es an G-CSF-Rezeptoren bindet. Laut Herstellerangaben stimuliert Filgrastim vor allem Neutrophile und kaum Monozyten (Filgrastim Hexal®). Dennoch konnten Arbeiten von Boneberg 2000 zeigen, dass auch Monozyten G-CSF Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren und dass die Behandlung mit Filgrastim neben der Erhöhung der Neutrophilen auch eine Erhöhung der Monozytenzahl zur Folge hat [Boneberg 2000]. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass Filgrastim auch die Produktion von Monozyten deutlich stimuliert. Unter dem beobachteten Aspekt, dass eine erhöhte Anzahl an Monozyten und CD16⁺ Monozyten zu Therapiebeginn mit einer schlechteren Prognose einhergeht, stellt sich die Frage, ob es für die Patienten von Nachteil sein kann, dass die Anzahl der Monozyten durch die Therapie mit R-CHOP und Filgrastim noch steigt. Möglicherweise wäre es hier sinnvoll nach Alternativen für Filgrastim zu suchen, um eine spezifischere Stimulation der Neutrophilen zu erreichen, ohne dabei einen Einfluss auf die Anzahl der Monozyten und CD16⁺ Monozyten zu nehmen.

Neben den klassischen und den intermediären Monozyten wurde in dieser Arbeit auch der Anteil und die Anzahl der CD56⁺ Monozyten analysiert, wobei sich ein signifikant höherer prozentualer Anteil der CD56⁺ Monozyten bei den DLBCL Patienten im Vergleich zu den gesunden Spendern zeigte. Das Vorhandensein von CD56⁺ Monozyten im peripheren Blut wurde erstmals 2005 von Sconocchia *et al.* beschrieben [Sconocchia 2005]. Seither gibt es nur wenige Veröffentlichungen, die Veränderungen dieser Zellen beschreiben. Unter anderem wird eine erhöhte Anzahl von CD56⁺ Monozyten mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen

wie Morbus Crohn [Grip 2007] und rheumatoider Arthritis [Krasselt 2013] in Zusammenhang gebracht. Zudem konnten Papewalis et al zeigen, dass Patienten mit verschiedenen soliden und endokrinen Tumoren eine erhöhte Anzahl an CD56⁺ Monozyten besitzen und dass die Anzahl der CD56⁺ Monozyten dabei mit der Tumorlast in Zusammenhang steht [Papewalis 2011]. Ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten Anteil der CD56⁺ Monozyten und der DLBCL Erkrankung konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden. Inwieweit dieser erhöhte Anteil CD56⁺ Monozyten eine klinische Relevanz besitzt ist bisher unklar. Krasselt et al. 2013 konnten unter anderem zeigen, dass CD56⁺ Monozyten bei Arthritis Patienten mehr TNF, IL-10 und IL-23 produzieren, als klassische Monozyten. Zudem wurde gezeigt, dass dendritische Zellen, die von CD56⁺ Monozyten abstammen, eine direkte zytolytische Aktivität *in vitro* besitzen, wohingegen DC, die von klassischen Monozyten abstammen keine zytolytische Aktivität zeigten [Papewalis 2008].

4.4. Quantitative und funktionelle Untersuchung der NK Zellen bei Patienten mit DLBCL

NK Zellen sind Teil der angeborenen Immunität und in der Lage Tumorzellen und virusinfizierte Zellen ohne vorherige Sensibilisierung zu töten. Unter normalen physiologischen Bedingungen wird die NK Zellfunktion durch die Balance aus aktivierenden und inhibierenden Signalen kontrolliert [Bryceson 2006, Lewis L Lanier 2008]. Bei DLBCL Patienten ist der monoklonale anti-CD20 Antikörper Rituximab der Schlüssel für die Behandlung der Patienten. Rituximab bewirkt die Eliminierung von CD20⁺ B-Zellen durch die Bindung an den Fc γ -Rezeptor III auf den NK Zellen. In dieser Arbeit wurden sowohl quantitative Veränderungen der NK Zellen und ihrer Subpopulationen untersucht als auch Veränderungen der NK Zell-Zytotoxizität. Im Vergleich zu den gesunden Spendern zeigte sich kein Unterschied im prozentualen Anteil der NK Zellen an den Leukozyten und in der Gesamtzahl der im Blut zirkulierenden NK Zellen. Auch die Arbeit von Cox et al. 2015 zeigte keine Veränderung der absoluten Anzahl an NK Zellen bei DLBCL Patienten vor Therapiebeginn. Allerdings zeigten Cox et al. einen verringerten prozentualen Anteil der NK Zellen an den Lymphozyten [Cox 2015]. Zu den Lymphozyten gehören neben den NK Zellen noch die B-Zellen und die T-Zellen. Wir konnten in unserer Studie zeigen, dass die DLBCL Patienten vor Therapiebeginn im Vergleich zu den gesunden Spendern einen signifikant verringerten Anteil an T-Zellen und B-Zellen in den PBMC aufwiesen. Aufgrund dessen ließe sich der von Cox et al. beobachtete erhöhte prozentuale Anteil an NK Zellen an den Lymphozyten bei unveränderter Gesamtzahl an NK Zellen erklären. Neben der unveränderten Anzahl an NK Zellen bei den DLBCL Patienten zeigte sich auch keine Änderung der Rituximab-abhängigen Zytotoxizität. Wohingegen die „natürliche“ Zytotoxizität gegen die K562 Zellen bei den DLBCL Patienten im Vergleich zu den gesunden Spendern erhöht war. Durch die Behandlung der Patienten mit R-CHOP verringerte

sich der Anteil und die Anzahl der NK Zellen signifikant. Zudem zeigte sich eine deutlich veränderte Verteilung der NK Zell-Untergruppen durch die Behandlung mit R-CHOP. Bei den NK Zellen unterscheidet man zwei Hauptpopulationen, die auf Grundlage ihrer Expression von CD56 charakterisiert sind [Cooper 2001]. CD56^{bright} NK Zellen, die etwa 10 % der im Blut zirkulierenden Zellen ausmachen, gelten im Allgemeinen als stärker proliferativ, haben eine in Ruhe geringere zytotoxische Effektoraktivität und eine höhere Kapazität zur Zytokinproduktion nach Stimulation mit IL-12 und IL-18. CD56^{dim} NK Zellen hingegen sind auch ohne Stimulierung stark zytotoxisch und vermitteln die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC). Durch die Behandlung der Patienten mit R-CHOP zeigte sich eine stark signifikante Verringerung der CD56^{dim} NK Zellen und eine signifikante Erhöhung der CD56^{bright} Zellen. Ähnliche Beobachtungen konnten auch von Cox *et al.* gemacht werden [Cox 2015]. Cox *et al.* erklärt die verringerte CD16 Expression mit einer Herunterregulation von CD16 durch die Therapie. Tatsächlich konnten mehrere Arbeiten zeigen, dass CD16 nach Antikörperbindung und Aktivierung der NK Zellen herunterreguliert wird [Pham 2017, Romee 2013, Srpan 2018]. Dementgegen steht die Annahme, dass CD56^{bright} Zellen Vorläufer der CD56^{dim} Zellen sind. Diese Hypothese wurde erstmals von Lanier *et al.* 1986 aufgestellt [L L Lanier 1986]. Unterstützend für diese Theorie konnte gezeigt werden, dass CD56^{bright} NK Zellen die ersten Lymphozyten sind, die nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) auftreten [Dulphy 2008, R Jacobs 1992, Nguyen 2005]. Durch die chemotherapeutische Behandlung der DLBCL Patienten kommt es zum Verlust von Immunzellen. Diese werden daraufhin im Knochenmark nachgebildet und in die Blutbahn ausgeschüttet. Daher wäre es nicht überraschend, wenn sich auf Grund der Chemotherapie vermehrt weniger stark differenzierte Zellen, wie die CD56^{bright} NK Zellen, im peripheren Blut befinden. Neben den CD56^{bright} NK Zellen konnte auch ein erhöhter Anteil von CD16^{dim} und CD56^{bright}CD16⁺ NK Zellen beobachtet werden. Diese werden bei der Differenzierung der NK Zellen als Zwischenstufen zwischen den CD56^{bright} und den CD56^{dim} Zellen beschrieben [Antoni Chan 2007, Dulphy 2008, Nagler 2019, Ouyang 2007]. Durch die gemeinsame Gabe von Rituximab in Kombination mit der Chemotherapie lässt sich nicht abschließend klären, was in welchem Maße zur Verringerung der CD56^{dim} Zellen und zum Anstieg der CD56^{bright} Zellen führt. Überraschenderweise führte die Verringerung der CD56^{dim} Zellen zu keiner Änderung der Rituximab-abhängigen zytotoxischen Funktion der NK Zellen. Dies steht im Gegensatz zu Beobachtungen von Cox *et al.*, die in ihrer Arbeit eine verringerte Zytotoxizität der NK Zellen unter R-CHOP Therapie beschreiben [Cox 2015]. Allerdings werden in deren Arbeit PBMC verwendet, um die Zytotoxizität der NK Zellen zu bestimmen. Gleichzeitig konnten wir zeigen, dass der Anteil an NK Zellen in den PBMC durch die R-CHOP Therapie signifikant reduziert wird. Dabei sank der Anteil der NK Zellen an den PBMC von 10,3 % vor Therapiebeginn auf 4,1 % unter R-CHOP Therapie. Bei der Untersuchung der Zytotoxizität

unter Verwendung der gleichen PBMC zu Zielzell-Ratio bedeutet dies, dass bei den Patienten unter Therapie weniger als die Hälfte an NK Zellen für die Bestimmung der Zytotoxizität verwendet wurden. Daher ließe sich die von Cox *et al.* beobachtete verringerte zytotoxische Funktion der NK Zellen auf den verringerten Anteil an NK Zellen in den PBMC zurückführen. In unserer Arbeit wurden erstmals aufgereinigte NK Zellen zur Bestimmung ihrer zytotoxischen Funktion verwendet. Dabei zeigte sich keine Beeinträchtigung der Funktion der NK Zellen durch die R-CHOP Therapie, trotz des verringerten Anteils an CD56^{dim} NK Zellen und somit der verringerten Expression von CD16. Vanherberghen *et al.* untersuchten die zytotoxische Funktion der NK Zellen auf Einzelzellebene und konnten dabei zeigen, dass die Minderheit der NK Zellen (ca. 20 %) für die Mehrheit der Zielzellyse verantwortlich ist und ca. die Hälfte der NK Zellen keine Zytotoxizität zeigten [Vanherberghen 2013]. Inwieweit die, nach der Chemotherapie verbliebenen, CD16⁺ NK Zellen eine erhöhte zytotoxische Funktion zeigen und somit den geringeren Anteil kompensieren, ist bisher unbekannt. Srpán *et al.* konnten unter anderem zeigen, dass der Verlust von CD16 das Überleben der NK Zellen fördert und die serielle Abtötung der Tumorzellen verstärkt [Srpán 2018]. Das heißt, dass der Verlust von CD16 zwar die NK Zellantwort auf eine einzelne Zielzelle verringert, sich aber die Fähigkeit der NK Zelle zum seriellen Abtöten mehrerer Zielzellen erhöht. Ähnliche Überlegungen wurden bereits 1992 von Borrego *et al.* aufgestellt, die der Runterregulierung von CD16 eine physiologische Rolle im Aktivierungsprozess der NK Zellen zuschrieben, indem die Runterregulation von CD16 die Ablösung der Zielzelle induziert und somit die Aufrechterhaltung der Signaltransduktion gewährleistet [Borrego 1994]. Diese Arbeiten deuten darauf hin, dass die verringerte Expression von CD16 nicht zwingend mit einer verringerten Zielzellyse einhergehen muss. Nach Therapieende steigt der prozentuale Anteil der NK Zellen direkt wieder an. Schon 3 Monate nach Therapie zeigte sich ein signifikanter Anstieg des prozentualen Anteils der NK Zellen. Dieser war zudem höher als der prozentuale Anteil der NK Zellen der gesunden Spender. 6 Monate nach Therapieende entsprach der Anteil der NK Zellen der DLBCL Patienten dem Anteil der NK Zellen der gesunden Spender.

4.5. Quantitative Untersuchung der CD3⁺ T-Zellen bei Patienten mit DLBCL

Konventionelle T-Zellen gehören zur erworbenen Immunantwort und erkennen über ihren T-Zell-Rezeptor Peptidantigene, welche über MHC I oder MHC II präsentiert werden. Neben den konventionellen T-Zellen befinden sich im peripheren Blut auch unkonventionelle T-Zellen, wie natürliche Killer T-Zellen (NKT), die durch die Expression von einigen NK Zellrezeptoren charakterisiert sind. Funktionell reife CD3⁺CD56⁺ NKT-ähnliche Zellen zeigen eine hohe Tumor-Lyse-Kapazität gegen viele verschiedene Tumorzellen und besitzen ein hohes Level an Granzym [Hoyle 1998, Waldowska 2017]. In dieser Arbeit wurde der prozentuale Anteil

aller CD3⁺ T-Zellen bei Patienten mit DLBCL untersucht. Dabei zeigte sich bei den DLBCL Patienten ein signifikant verringerter prozentualer Anteil der T-Zellpopulation im Vergleich zu den gesunden Spendern und auch die Gesamtzahl der im Blut zirkulierenden T-Zellen war bei den DLBCL Patienten signifikant verringert. Ähnliche Beobachtungen konnten auch in der Arbeit von Bartella *et al.* 2017 gemacht werden, in der das Blut von 32 DLBCL Patienten untersucht wurde. Dabei zeigte sich, dass die Reduktion der T-Zellen v.a. durch die Verringerung der CD4⁺ T-Zellen hervorgerufen wird und es keine Veränderungen in der Anzahl der NKT-ähnlichen CD3⁺CD56⁺ Zellen gibt. Auch in unserer Arbeit zeigte sich kein signifikanter Unterschied im prozentualen Anteil der CD56⁺ T-Zellen zwischen den Patienten vor Therapiebeginn und den gesunden Spendern. Durch die R-CHOP Therapie der Patienten reduzierte sich der prozentuale Anteil und die Gesamtzahl der T-Zellen nochmals signifikant, wohingegen sich der Anteil der CD56⁺ T-Zellen nur leicht verringerte. Da die Gabe von Rituximab einen wichtigen Baustein in der Behandlung von DLBCL Patienten darstellt, wurde zudem der Anteil der CD16⁺ T-Zellen untersucht. Diese haben prinzipiell die Möglichkeit Rituximab zu binden und könnten daher neben den NK Zellen eine Antikörper-abhängige zytotoxische Funktion ausüben. Im Vergleich zu den gesunden Spendern zeigte sich keine Veränderung im prozentualen Anteil der CD16⁺ T-Zellen an den CD45⁺ Leukozyten und auch während der R-CHOP Therapie kam es nur zu einer leichten Verringerung des prozentualen Anteils an CD16⁺ T-Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Erkrankung der Patienten als auch die Therapie mit R-CHOP vor allem einen Einfluss auf die Anzahl der konventionellen T-Zellen hat, wohingegen CD56⁺ NKT-ähnliche Zellen und CD16⁺ T-Zellen quantitativ kaum beeinträchtigt werden. Nach Therapieende steigt der Anteil der T-Zellen dann wieder langsam an und ist bei den Patienten 9 Monate nach Therapieende sogar tendenziell höher als bei den gesunden Spendern. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass der verringerte Anteil der T-Zellen bei den DLBCL Patienten vor Therapiebeginn durch die Erkrankung hervorgerufen wurde.

4.6. Untersuchung der zytotoxischen Funktion der CD3⁺ T-Zellen bei Patienten mit DLBCL

T-Zellen gehören zur erworbenen Immunität und können Zielzellen nur nach vorheriger Antigenpräsentation eliminieren. Dabei erkennen sie über ihren T-Zell-Rezeptor Peptidantigene, welche über den Haupthistokompatibilitätskomplex I oder II (MHC I oder II) präsentiert werden. Ausnahmen stellen hierbei die unkonventionellen T-Zellen dar, die in der Lage sind Lipidantigene von Tumorzellen über ihren T-Zell-Rezeptor zu erkennen und diese ohne vorherige Antigenstimulation zu eliminieren. Zu den am besten untersuchten unkonventionellen T-Zellen gehören die natürlichen Killer T-Zellen (NKT), die Schleimhaut-assoziierten invarianten T-Zellen (MAIT) und die $\gamma\delta$ -T-Zellen [Pellicci 2020].

4.6.1. Zytotoxische Aktivität der T-Zellen gegen K562 Zellen

Bei den K562 Zellen handelt es sich um eine Leukämiezelllinie, die aufgrund der fehlenden Expression von MHC-Klasse I-Molekülen zur Untersuchung der „natürlichen“ Zytotoxizität von NK Zellen verwendet wird. Überraschenderweise zeigte sich bei den DLBCL Patienten vor Therapiebeginn eine stark signifikant verbesserte Lyse der K562 Zellen durch die isolierten CD3⁺ T-Zellen der Patienten im Vergleich zu den gesunden Spendern. Da es sich bei den K562 Zellen um eine typische Zielzelllinie von NK Zellen handelt, stellt sich zunächst die Frage, inwieweit T-Zellen überhaupt in der Lage sind die K562 Zellen zu lysieren. Im Gegensatz zu den konventionellen T-Zellen, die Zielzellen nur antigenspezifisch eliminieren können, gibt es einen geringen Anteil der T-Zellen, die Tumorzellen auch antigenunspezifisch lysieren können. Zu ihnen zählen unter anderem die NKT Zellen mit ihren Untergruppen und die $\gamma\delta$ -T-Zellen. $\gamma\delta$ -T-Zellen können Tumorzellen unter anderem über MICA/B erkennen und dadurch aktiviert werden [Fonseca 2020]. Durch die Aktivierung können die Tumorzellen dann durch FasL eliminiert werden. Die Bindung an MICA findet dabei entweder über den T-Zell-Rezeptor oder über NKG2D statt [Kim 2017, Y. Li 2021, Lu 2011, Nedellec 2010, Xu 2011]. Zudem erkennen V δ 2 T-Zellen den F1-ATPase ApoA1 Komplex, der von den K562 Zellen exprimiert wird [Mookerjee-Basu 2010, Scotet 2005]. In dieser Arbeit konnte nicht nur gezeigt werden, dass T-Zellen die K562 Zellen lysieren können, sondern es zeigte sich auch eine signifikant höhere zytotoxische Aktivität der T-Zellen bei den DLBCL Patienten im Vergleich zu den gesunden Spendern. Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass durch den Kontakt mit Tumorzellen die $\gamma\delta$ T-Zellen vermehrt proliferieren und die Expression von NKG2D hochregulieren [Y. Li 2021, Niu 2015]. Dabei können die V δ 1 T-Zellen auch über Tumor-Antigene, die über CD1d präsentiert werden, aktiviert werden [Bai 2012, Luoma 2014]. Da B-Zellen CD1d exprimieren, wäre es möglich, dass die V δ 1 T-Zellen durch den Kontakt mit CD1d-positiven Tumorzellen *in vivo* aktiviert werden und dann durch die vermehrte Expression von NKG2D Tumorzellen wie die K562 *in vitro* CD1d-unabhängig lysieren können. In dieser Studie konnte neben der verbesserten zytotoxischen Aktivität der CD3⁺ T-Zellen auch ein signifikant höherer Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen bei den DLBCL Patienten beobachtet werden. Allerdings haben wir in dieser Arbeit bisher nicht zwischen V δ 1 und V δ 2 T-Zellen unterschieden. Reboursiere *et al.* konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass bei DLBCL Patienten im Vergleich zu gesunden Menschen die V δ 1 T-Zellen die Hauptpopulation der $\gamma\delta$ T-Zellen ausmachen [Reboursiere 2018]. Dies würde mit der Hypothese übereinstimmen, dass nur die V δ 1 T-Zellen durch die Interaktion mit den CD1d-positiven Lymphomzellen *in vivo* aktiviert werden und die Aktivierung mit einer vermehrten Proliferation und Zytotoxizität einhergeht. Eine direkte Korrelation des prozentualen Anteils der $\gamma\delta$ T-Zellen mit der Lyse der K562 Zellen konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Allerdings wurde bisher auch nicht zwischen V δ 1 und V δ 2 T-Zellen unterschieden. Zudem gibt es neben den $\gamma\delta$ T-Zellen noch weitere

unkonventionelle T-Zellen, die die Lyse der K562 Zellen vermitteln können. So konnten Kuylenstierna *et al.* zeigen, dass mit α -Galactosylceramid aktivierte iNKT Zellen K562 Zellen CD1d-unabhängig lysieren können [Kuylenstierna 2011]. iNKT Zellen gehören zur angeborenen Immunität und werden über den invarianten T-Zell-Rezeptor charakterisiert, der sich beim Menschen aus einer $V\alpha 24$ -Kette und einer $V\beta 11$ -Kette zusammensetzt. Die iNKT Zellen erkennen spezifisch Glykolipidantigene wie α -Galactosylceramid, die von CD1d präsentiert werden [Fujii 2008, Porcelli 1993]. Dabei zeigen iNKT Zellen eine direkte Zytotoxizität gegenüber CD1d-positiven Tumorzellen. Eine direkte Zytotoxizität gegenüber CD1d-negativen Tumorzellen war lange umstritten [Gansuud 2002, Haraguchi 2006, Kawano 1999, Metelitsa 2001]. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass aktivierte iNKT Zellen auch CD1d-negative Tumorzellen lysieren können [Aoki 2020, Kuylenstierna 2011]. Daher ist es gut vorstellbar, dass die iNKT Zellen bei den DLBCL Patienten *in vivo* durch die CD1d-positiven Tumorzellen aktiviert werden und dann *in vitro* die K562 Zellen lysieren können. Bei den gesunden Spendern hingegen werden die iNKT Zellen *in vivo* nicht aktiviert und sind somit nicht in der Lage die K562 Zellen *in vitro* zu lysieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass aktivierte iNKT Zellen die Expression von FasL hochregulieren [Bassiri 2014]. Daher könnte in weiteren Studien überprüft werden, ob die Expression von FasL auf den iNKT Zellen der Patienten erhöht ist. Dies könnte dadurch einen weiteren Hinweis darauf liefern, ob diese *in vivo* durch die Tumorzellen aktiviert wurden. Neben den $\gamma\delta$ T-Zellen und den iNKT Zellen zeigen auch funktionell reife $CD3^+CD56^+$ NKT-ähnliche Zellen eine hohe Tumorlysefähigkeit gegen verschiedene Zielzellen [Hoyle 1998, Ortaldo 1991, Pievani 2011]. Da es innerhalb der im Real-Time Killing Assay verwendeten $CD3^+$ T-Zellpopulation verschiedene T-Zellsubtypen gibt, die die Lyse der K562 Zellen induzieren können, erklärt sich auch, warum es keine direkte Korrelation einzelner T-Zellsubtypen mit der Lyse der K562 Zellen gibt. Um genaue Aussagen treffen zu können, welche T-Zellsubtypen welchen Anteil an der erhöhten Zytotoxizität der T-Zellen bei den DLBCL Patienten haben, müssten diese Zellen separat aufgereinigt und im Real-Time Killing Assay eingesetzt werden. Da der prozentuale Anteil der T-Zellsubtypen an den $CD3^+$ T-Zellen allerdings sehr gering ist, bräuchte man sehr viel Ausgangsmaterial, was bei den DLBCL Patienten nicht oder nur eingeschränkt möglich ist. Eine weitere Möglichkeit würde ein Degranulationsassay darstellen, da man bei diesem anhand entsprechender Antikörper auch beim Einsatz der kompletten $CD3^+$ Population bestimmen könnte, welche Zellen genau degranulieren. Allerdings sagt die reine Degranulation von Vesikeln nicht zwingend etwas über die tatsächliche Fähigkeit zur Tumorzellyse aus. Eine weitere Möglichkeit wäre zudem die Aktivierung der T-Zellen *in vitro* nachzustellen. So könnten zum Beispiel PBMC von gesunden Spendern mit bestrahlten Tumorzellen von DLBCL Patienten aktiviert werden und dann funktionelle Unterschiede in den verschiedenen T-Zellsubtypen untersucht werden.

4.6.2. Zytotoxische Aktivität der T-Zellen gegen U-2932 Zellen

Bei den U-2932 Zellen handelt es sich um eine DLBCL-Zelllinie, die den B-Zellmarker CD20 auf ihrer Oberfläche exprimiert. Durch die Verwendung des anti-CD20 Antikörpers, der sowohl CD20 auf den Zielzellen als auch CD16 auf den Effektorzellen bindet, kann die Antikörper-abhängige Zytotoxizität (ADCC) untersucht werden. Bei den isolierten CD3⁺ T-Zellen der DLBCL Patienten zeigte sich eine signifikant erhöhte Lyse der U-2932 Zellen unter Verwendung von Rituximab im Vergleich zu den gesunden Spendern. Zudem zeigte sich ein leicht erhöhter Anteil CD16⁺ T-Zellen an der im Real-Time-Killing-Assay eingesetzten CD3⁺ T-Zellen bei den DLBCL Patienten verglichen mit den gesunden Spendern. Dennoch zeigte sich keine direkte Korrelation mit dem Anteil der CD16⁺ Zellen im Killing Assay und der Rituximab-spezifischen Lyse der U-2932 Zellen. Dies bedeutet, dass der prozentuale Anteil an CD16⁺ Zellen alleine keinen direkten Hinweis auf die Rituximab-abhängige Zytotoxizität der T-Zellen gibt. Vielmehr unterscheiden sich die CD16⁺ T Zellen in ihrer Funktion zwischen den DLBCL Patienten und den gesunden Spendern. Gertner-Dardenne *et al.* konnten zeigen, dass $\gamma\delta$ T-Zellen, die mit dem synthetischen Phosphorantigen (PAg) Bromhydrinpyrophosphat (BrHPP) aktiviert werden, ihre CD16 Expression erhöhen und sich die ADCC von CD20⁺ Lymphomzellen erhöht [Gertner-Dardenne 2009]. Denn die Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen führt zu deren Reifung zu Effektor-Memory-Zellen, die vermehrt CD16 exprimieren [Lafont 2001]. Bisher ist allerdings nicht bekannt, inwieweit die PAg der Tumorzellen *in vivo* die $\gamma\delta$ T-Zellen der DLBCL Patienten aktivieren können, und diese Aktivierung das verbesserte ADCC bei den DLBCL Patienten *in vitro* erklären kann. Allerdings zeigte sich bei den DLBCL Patienten auch ein höherer prozentualer Anteil an CD16⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen im Vergleich zu den gesunden Spendern, was darauf hindeuten könnte, dass diese *in vivo* durch die Tumorzellen aktiviert wurden. Eine Möglichkeit die Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen durch Tumorzellen zu untersuchen, wäre die Ko-Kultivierung der PBMC gesunder Spender mit bestrahlten DLBCL-Zellen und die anschließende Isolierung der T-Zellen. Sollte sich die Rituximab-spezifische Lyse der U-2932 Zellen durch die vorherige Ko-Kultivierung verbessern, wäre dies ein Hinweis auf die Aktivierung der T-Zellen durch die Tumorzellen. Zudem konnten Gertner-Dardenne *et al.* zeigen, dass aktivierte $\gamma\delta$ T-Zellen Daudi Zellen auch unabhängig von Rituximab lysieren können. Daher wäre es auch möglich die Lyse der Daudi Zellen durch die aufgereinigten T-Zellen zu untersuchen, um zu sehen, ob es auch da Unterschiede zwischen den gesunden Spendern und den DLBCL Patienten gibt. Zudem konnten Reboursiere *et al.* zeigen, dass der Anteil der V δ 1 Zellen bei DLBCL Patienten deutlich erhöht ist im Vergleich zu gesunden Spendern. V δ 1 Zellen zeichnen sich im Vergleich zu V δ 2 Zellen durch eine erhöhte Expression von Granzym B aus und zeigen somit einen zytotoxischen Phänotyp [Simões 2019]. Somit könnte auch der erhöhte Anteil der V δ 1 Zellen einen Einfluss auf die verbesserte Zytotoxizität der T-Zellen haben. Um dies zu überprüfen,

sollte bei den DLBCL Patienten neben dem bisher bestimmten Anteil aller $\gamma\delta$ T Zellen auch der Anteil der V δ 1 Zellen bestimmt werden, um dann zu analysieren, inwieweit es einen Zusammenhang zwischen dem Anteil an V δ 1 T-Zellen und der Lyse der U-2932 Zellen und auch der K562 Zellen gibt.

5. Literaturverzeichnis

- Alizadeh, A. A., Elsen, M. B., Davis, R. E., Ma, C. L., Lossos, I. S., Rosenwald, A., ... Staudt, L. M.** (2000). "Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling." *Nature*, 403(6769), 503–511. <https://doi.org/10.1038/35000501>
- Allegra, A., Casciaro, M., Lo Presti, E., Musolino, C., & Gangemi, S.** (2022). "Harnessing Unconventional T Cells and Innate Lymphoid Cells to Prevent and Treat Hematological Malignancies: Prospects for New Immunotherapy." *Biomolecules*, 12(6), 754. <https://doi.org/10.3390/biom12060754>
- Alvarez-Lesmes, J., Chapman, J. R., Cassidy, D., Zhou, Y., Garcia-Buitrago, M., Montgomery, E. A., ... Poveda, J.** (2021). "Gastrointestinal Tract Lymphomas." *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 145(12), 1585–1596. <https://doi.org/10.5858/arpa.2020-0661-RA>
- Amini, R.-M., Berglund, M., Rosenquist, R., von Heideman, A., Lagercrantz, S., Thunberg, U., ... Enblad, G.** (2002). "A Novel B-cell Line (U-2932) Established from a Patient with Diffuse Large B-cell Lymphoma Following Hodgkin Lymphoma." *Leukemia & Lymphoma*, 43(11), 2179–2189. <https://doi.org/10.1080/1042819021000032917>
- Aoki, T., Takami, M., Takatani, T., Motoyoshi, K., Ishii, A., Hara, A., ... Motohashi, S.** (2020). "Activated invariant natural killer T cells directly recognize leukemia cells in a CD1d-independent manner." *Cancer Science*, 111(7), 2223–2233. <https://doi.org/10.1111/cas.14428>
- Armitage, J. O., Gascoyne, R. D., Lunning, M. A., & Cavalli, F.** (2017). "Non-Hodgkin lymphoma." *The Lancet*, 390(10091), 298–310. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32407-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32407-2)
- Armitage, J. O., & Weisenburger, D. D.** (1998). "New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: Clinical features of the major histologic subtypes." *Journal of Clinical Oncology*, 16(8), 2780–2795. <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.8.2780>
- Aukema, S. M., Siebert, R., Schuurin, E., Imhoff, G. W. Van, Kluin-nelemans, H. C., Boerma, E., & Kluin, P. M.** (2011). "Review article Double-hit B-cell lymphomas," 117(8), 2319–2331. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-297879>.The
- Bai, L., Picard, D., Anderson, B., Chaudhary, V., Luoma, A., Jabri, B., ... Bendelac, A.** (2012). "The majority of CD1d-sulfatide-specific T cells in human blood use a semiinvariant V δ 1 TCR." *European Journal of Immunology*, 42(9), 2505–2510. <https://doi.org/10.1002/eji.201242531>
- Bassiri, H., Das, R., Guan, P., Barrett, D. M., Brennan, P. J., Banerjee, P. P., ... Nichols, K. E.** (2014). "iNKT Cell Cytotoxic Responses Control T-Lymphoma Growth In Vitro and In Vivo." *Cancer Immunology Research*, 2(1), 59–69. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0104>

- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., & Spies, T.** (1999). "Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA." *Science*, 285(5428), 727–729. <https://doi.org/10.1126/science.285.5428.727>
- Berzins, S. P., Uldrich, A. P., Pellicci, D. G., McNab, F., Hayakawa, Y., Smyth, M. J., & Godfrey, D. I.** (2004). "Parallels and distinctions between T and NKT cell development in the thymus." *Immunology and Cell Biology*, 82(3), 269–275. <https://doi.org/10.1111/j.0818-9641.2004.01256.x>
- Blanco-camarillo, C., & Alema, O. R.** (2021). "Low-Density Neutrophils in Healthy Individuals Display a Mature Primed Phenotype," 12(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.672520>
- Boneberg, E. M., Hareng, L., Gantner, F., Wendel, A., & Hartung, T.** (2000). "Human monocytes express functional receptors for granulocyte colony-stimulating factor that mediate suppression of monokines and interferon- γ ." *Blood*, 95(1), 270–276. <https://doi.org/10.1182/blood.v95.1.270>
- Boross, P., & Leusen, J. H. W.** (2012). "Mechanisms of action of CD20 antibodies." *American Journal of Cancer Research*, 2(6), 676–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23226614><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3512181>
- Borrego, F., Lopez-Beltran, A., Peña, J., & Solana, R.** (1994). "Downregulation of Fc γ Receptor IIIA α (CD16-II) on Natural Killer Cells Induced by Anti-CD16 mAb Is Independent of Protein Tyrosine Kinases and Protein Kinase C." *Cellular Immunology*, 158(1), 208–217. <https://doi.org/10.1006/cimm.1994.1268>
- Brodin, P., Lakshmikanth, T., Johansson, S., Kärre, K., & Höglund, P.** (2009). "The strength of inhibitory input during education quantitatively tunes the functional responsiveness of individual natural killer cells." *Blood*, 113(11), 2434–2441. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-156836>
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H.-G., & Long, E. O.** (2006). "Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells." *Immunological Reviews*, 214(1), 73–91. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00457.x>
- Caligiuri, M. A.** (2008). "Human natural killer cells." *Blood*, 112(3), 461–469. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-077438>
- Calomino, N., Fusario, D., Cencini, E., & Lazzi, S.** (2022). "Two secondary localisation of non-Hodgkin's lymphomas in the upper gastrointestinal tract." *BMJ Case Reports*, 15(5), e247607. <https://doi.org/10.1136/bcr-2021-247607>
- Campbell, J. J., Qin, S., Unutmaz, D., Soler, D., Murphy, K. E., Hodge, M. R., ... Butcher, E. C.** (2001). "Unique Subpopulations of CD56 + NK and NK-T Peripheral Blood Lymphocytes Identified by Chemokine Receptor Expression Repertoire ." *The Journal of*

- Immunology*, 166(11), 6477–6482. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.11.6477>
- Chan, Alex, & Dogan, A.** (2019). “Prognostic and Predictive Biomarkers in Diffuse Large B-cell Lymphoma.” *Surgical Pathology Clinics*, 12(3), 699–707. <https://doi.org/10.1016/j.path.2019.03.012>
- Chan, Antoni, Hong, D.-L., Atzberger, A., Kollnberger, S., Filer, A. D., Buckley, C. D., ... Bowness, P.** (2007). “CD56 bright Human NK Cells Differentiate into CD56 dim Cells: Role of Contact with Peripheral Fibroblasts.” *The Journal of Immunology*, 179(1), 89–94. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.1.89>
- Cichocki, F., Grzywacz, B., & Miller, J. S.** (2019). “Human NK Cell Development: One Road or Many?” *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02078>
- Cloke, T., Munder, M., Taylor, G., Müller, I., & Kropf, P.** (2012). “Characterization of a Novel Population of Low-Density Granulocytes Associated with Disease Severity in HIV-1 Infection.” *PLoS ONE*, 7(11), e48939. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048939>
- Coënon, L., & Villalba, M.** (2022). “From CD16a Biology to Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity Improvement.” *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.913215>
- Coffelt, S. B., Tal, A. O., Scholz, A., De Palma, M., Patel, S., Urbich, C., ... Lewis, C. E.** (2010). “Angiopoietin-2 Regulates Gene Expression in TIE2-Expressing Monocytes and Augments Their Inherent Proangiogenic Functions.” *Cancer Research*, 70(13), 5270–5280. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0012>
- Cohen, N. R., Brennan, P. J., Shay, T., Watts, G. F., Brigl, M., Kang, J., ... Benoist, C.** (2013). “Shared and distinct transcriptional programs underlie the hybrid nature of iNKT cells.” *Nature Immunology*, 14(1), 90–99. <https://doi.org/10.1038/ni.2490>
- Coiffier, B.** (2002). “Coiffier B, Lepade E et al.: CHOP chemotherapy plus Rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. N Engl J Med 1993, 329:987-994.” *N Engl J Med*, 346(4), 235–242.
- Coiffier, B., Thieblemont, C., Van Den Neste, E., Lepage, G., Plantier, I., Castaigne, S., ... Tilly, H.** (2010). “Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: A study by the Groupe d’Etudes des Lymphomes de l’Adulte.” *Blood*, 116(12), 2040–2045. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-276246>
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., & Caligiuri, M. A.** (2001). “The biology of human natural killer-cell subsets.” *Trends in Immunology*, 22(11), 633–640. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02060-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02060-9)
- Correia, D. V., & Silva-santos, B.** (2013). “Tumor cell recognition by $\gamma\delta$ T lymphocytes,” (January), 1–5.
- Cox, M. C., Battella, S., La Scaleia, R., Pelliccia, S., Di Napoli, A., Porzia, A., ... Palmieri,**

- G.** (2015). "Tumor-associated and immunochemotherapydependent long-term alterations of the peripheral blood NK cell compartment in DLBCL patients." *OncolImmunology*, 4(3), 1–12. <https://doi.org/10.4161/2162402X.2014.990773>
- Cunningham, D., Hawkes, E. A., Jack, A., Qian, W., Smith, P., Mouncey, P., ... Linch, D.** (2013). "Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: A phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles." *The Lancet*, 381(9880), 1817–1826. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60313-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60313-X)
- Dao, T., Mehal, W. Z., & Crispe, I. N.** (1998). "IL-18 augments perforin-dependent cytotoxicity of liver NK-T cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(5), 2217–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9725214>
- Delarue, R., Tilly, H., Mounier, N., Petrella, T., Salles, G., Thieblemont, C., ... Bosly, A.** (2013). "Dose-dense rituximab-CHOP compared with standard rituximab-CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (the LNH03-6B study): a randomised phase 3 trial." *The Lancet Oncology*, 14(6), 525–533. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70122-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70122-0)
- Denny, M. F., Yalavarthi, S., Zhao, W., Thacker, S. G., Anderson, M., Sandy, A. R., ... Kaplan, M. J.** (2010). "A Distinct Subset of Proinflammatory Neutrophils Isolated from Patients with Systemic Lupus Erythematosus Induces Vascular Damage and Synthesizes Type I IFNs." *The Journal of Immunology*, 184(6), 3284–3297. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902199>
- Dhar, P., & Wu, J. D.** (2018). "NKG2D and its ligands in cancer." *Current Opinion in Immunology*, 51, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.02.004>
- Dulphy, N., Haas, P., Busson, M., Belhadj, S., Peffault de Latour, R., Robin, M., ... Toubert, A.** (2008). "An Unusual CD56 bright CD16 low NK Cell Subset Dominates the Early Posttransplant Period following HLA-Matched Hematopoietic Stem Cell Transplantation." *The Journal of Immunology*, 181(3), 2227–2237. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.2227>
- Fonseca, S., Pereira, V., Lau, C., Teixeira, M. D. A., Bini-Antunes, M., & Lima, M.** (2020). "Human Peripheral Blood Gamma Delta T Cells: Report on a Series of Healthy Caucasian Portuguese Adults and Comprehensive Review of the Literature." *Cells*, 9(3), 1–40. <https://doi.org/10.3390/cells9030729>
- Friedberg, J. W.** (2012). "Double-Hit Diffuse Large B-Cell Lymphoma." *Journal of Clinical Oncology*, 30(28), 3439–3443. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.5800>
- Fujii, S. ichiro.** (2008). "Exploiting dendritic cells and natural killer T cells in immunotherapy against malignancies." *Trends in Immunology*, 29(5), 242–249. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.02.002>

- Gansuud, B., Hagihara, M., Yu, Y., Inoue, H., Ueda, Y., Tsuchiya, T., ... Hotta, T.** (2002). "Human umbilical cord blood NK T cells kill tumors by multiple cytotoxic mechanisms." *Human Immunology*, 63(3), 164–175. [https://doi.org/10.1016/S0198-8859\(01\)00382-2](https://doi.org/10.1016/S0198-8859(01)00382-2)
- Gao, F., Hu, J., Zhang, J., & Xu, Y.** (2021). "Prognostic value of peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio in lymphoma." *Journal of Cancer*, 12(12), 3407–3417. <https://doi.org/10.7150/JCA.50552>
- Gertner-Dardenne, J., Bonnafous, C., Bezombes, C., Capietto, A. H., Scaglione, V., Ingoure, S., ... Fournié, J. J.** (2009). "Bromohydrin pyrophosphate enhances antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity induced by therapeutic antibodies." *Blood*, 113(20), 4875–4884. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-172296>
- Gisselbrecht, C., Glass, B., Mounier, N., Gill, D. S., Linch, D. C., Trneny, M., ... Schmitz, N.** (2010). "Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era." *Journal of Clinical Oncology*, 28(27), 4184–4190. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.1618>
- Godfrey, D. I., MacDonald, H. R., Kronenberg, M., Smyth, M. J., & Van Kaer, L.** (2004). "NKT cells: What's in a name?" *Nature Reviews Immunology*, 4(3), 231–237. <https://doi.org/10.1038/nri1309>
- Godfrey, D. I., Uldrich, A. P., McCluskey, J., Rossjohn, J., & Moody, D. B.** (2015). "The burgeoning family of unconventional T cells." *Nature Immunology*, 16(11), 1114–1124. <https://doi.org/10.1038/ni.3298>
- Gordon, I. O., & Freedman, R. S.** (2006). "Defective Antitumor Function of Monocyte-Derived Macrophages from Epithelial Ovarian Cancer Patients." *Clinical Cancer Research*, 12(5), 1515–1524. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2254>
- Grip, O., Bredberg, A., Lindgren, S., & Henriksson, G.** (2007). "Increased subpopulations of CD16+ and CD56+ blood monocytes in patients with active Crohn's disease." *Inflammatory Bowel Diseases*, 13(5), 566–572. <https://doi.org/10.1002/ibd.20025>
- Groh, V.** (1998). "Recognition of Stress-Induced MHC Molecules by Intestinal Epithelial T Cells." *Science*, 279(5357), 1737–1740. <https://doi.org/10.1126/science.279.5357.1737>
- Gu, S., Sachleben, J. R., Boughter, C. T., Nawrocka, W. I., Borowska, M. T., Tarrasch, J. T., ... Adams, E. J.** (2017). "Phosphoantigen-induced conformational change of butyrophilin 3A1 (BTN3A1) and its implication on V γ 9V δ 2 T cell activation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(35), E7311–E7320. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707547114>
- Gumperz, J. E., Miyake, S., Yamamura, T., & Brenner, M. B.** (2002). "Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining." *Journal of Experimental Medicine*, 195(5), 625–636.

<https://doi.org/10.1084/jem.20011786>

- Gutiérrez-García, G., Cardesa-Salzmann, T., Climent, F., González-Barca, E., Mercadal, S., Mate, J. L., ... López-Guillermo, A.** (2011). "Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy." *Blood*, 117(18), 4836–4843. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-322362>
- Hagihara, M., Gansuud, B., Ueda, Y., Tsuchiya, T., Masui, A., Tazume, K., ... Hotta, T.** (2002). "Killing activity of human umbilical cord blood-derived TCRV α 24+ 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 Immunology, Immunotherapy*, 51(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00262-001-0246-2>
- Han, X., Ruan, J., Zhang, W., Zhou, D., Xu, D., Pei, Q., ... Zuo, M.** (2017). "Prognostic implication of leucocyte subpopulations in diffuse large B-cell lymphoma." *Oncotarget*, 8(29), 47790–47800. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17830>
- Hans, C. P.** (2004). "Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray." *Blood*, 103(1), 275–282. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1545>
- Haraguchi, K., Takahashi, T., Nakahara, F., Matsumoto, A., Kurokawa, M., Ogawa, S., ... Chiba, S.** (2006). "CD1d expression level in tumor cells is an important determinant for anti-tumor immunity by natural killer T cells." *Leukemia and Lymphoma*, 47(10), 2218–2223. <https://doi.org/10.1080/10428190600682688>
- Herrera, A. F., Mei, M., Low, L., Kim, H. T., Griffin, G. K., Song, J. Y., ... Armand, P.** (2017). "Relapsed or refractory double-expressor and double-hit lymphomas have inferior progression-free survival after autologous stem-cell transplantation." *Journal of Clinical Oncology*, 35(1), 24–31. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.68.2740>
- Herter, S., Herting, F., Mundigl, O., Waldhauer, I., Weinzierl, T., Fauti, T., ... Klein, C.** (2013). "Preclinical activity of the type II CD20 antibody GA101 (obinutuzumab) compared with rituximab and ofatumumab in vitro and in xenograft models." *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(10), 2031–2042. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-1182>
- Hoyle, C., Bangs, C. D., Chang, P., Kamel, O., Mehta, B., & Negrin, R. S.** (1998). "Expansion of Philadelphia chromosome-negative CD3+CD56+ cytotoxic cells from chronic myeloid leukemia patients: In vitro and in vivo efficacy in severe combined immunodeficiency disease mice." *Blood*, 92(9), 3318–3327. https://doi.org/10.1182/blood.v92.9.3318.421k39_3318_3327
- Hu, S., Xu-Monette, Z. Y., Balasubramanyam, A., Manyam, G. C., Visco, C., Tzankov, A., ... Young, K. H.** (2013). "CD30 expression defines a novel subgroup of diffuse large B-cell lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: A report

- from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study." *Blood*, 121(14), 2715–2724. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-461848>
- Hu, S., Xu-Monette, Z. Y., Tzankov, A., Green, T., Wu, L., Balasubramanyam, A., ... Young, K. H.** (2013). "MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program." *Blood*, 121(20), 4021–4031. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-460063>
- Jacobs, R., Stoll, M., Stratmann, G., Leo, R., Link, H., & Schmidt, R. E.** (1992). "CD16-CD56+ natural killer cells after bone marrow transplantation." *Blood*, 79(12), 3239–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1375847>
- Jacobs, Roland, Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., ... Schmidt, R. E.** (2001). "CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells." *European Journal of Immunology*, 31(10), 3121–3126. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(2001010\)31:10<3121::AID-IMMU3121>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-4141(2001010)31:10<3121::AID-IMMU3121>3.0.CO;2-4)
- Jaglowski, S. M., Alinari, L., Lapalombella, R., Muthusamy, N., & Byrd, J. C.** (2010). "The clinical application of monoclonal antibodies in chronic lymphocytic leukemia." *Blood*, 116(19), 3705–3714. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-001230>
- Joncker, N. T., Fernandez, N. C., Treiner, E., Vivier, E., & Raulet, D. H.** (2009). "NK Cell Responsiveness Is Tuned Commensurate with the Number of Inhibitory Receptors for Self-MHC Class I: The Rheostat Model." *The Journal of Immunology*, 182(8), 4572–4580. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803900>
- Kabelitz, D., Glatzel, A., & Wesch, D.** (2000). "Antigen Recognition by Human $\gamma\delta$ T Lymphocytes." *International Archives of Allergy and Immunology*, 122(1), 1–7. <https://doi.org/10.1159/000024353>
- Kawano, T., Nakayama, T., Kamada, N., Kaneko, Y., Harada, M., Ogura, N., ... Taniguchi, M.** (1999). "Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human V alpha24 NKT cells." *Cancer Research*, 59(20), 5102–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10537282>
- Kim, K., Bae, S., Capece, T., Nedelkovska, H., Rubio, R. G. De, Smrcka, A. V., ... Kim, M.** (2017). "Targeted calcium influx boosts cytotoxic." *Nature Communications*, 8(May), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms15365>
- Klein, C., Jamois, C., & Nielsen, T.** (2021). "Anti-CD20 treatment for B-cell malignancies: current status and future directions." *Expert Opinion on Biological Therapy*, 21(2), 161–181. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1822318>
- Knörck, A., Marx, S., Friedmann, K. S., Zöphel, S., Lieblang, L., Hässig, C., ... Schwarz, E. C.** (2018). "Quantity, quality, and functionality of peripheral blood cells derived from

- residual blood of different apheresis kits." *Transfusion*, 58(6), 1516–1526. <https://doi.org/10.1111/trf.14616>
- Köhler, G., Milstein, C.** (1975). "Cultivos continuos de células fusionadas que secretan anticuerpos de especificidad predefinida." *Nature*, 256(Mopc 21), 495–497. Retrieved from <http://www.nature.com/articles/256495a0%0Apapers3://publication/doi/10.1038/256495a0>
- Krasselt, M., Baerwald, C., Wagner, U., & Rossol, M.** (2013). "CD56+ monocytes have a dysregulated cytokine response to lipopolysaccharide and accumulate in rheumatoid arthritis and immunosenescence." *Arthritis Research and Therapy*, 15(5), 1. <https://doi.org/10.1186/ar4321>
- Kummerow, C., Schwarz, E. C., Bufe, B., Zufall, F., Hoth, M., & Qu, B.** (2014). "A simple, economic, time-resolved killing assay." *European Journal of Immunology*, 44(6), 1870–1872. <https://doi.org/10.1002/eji.201444518>
- Kuylenstierna, C., Björkström, N. K., Andersson, S. K., Sahlström, P., Bosnjak, L., Paquin-Proulx, D., ... Sandberg, J. K.** (2011). "NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: Direct TCR-independent activation of NK-like cytotoxicity and co-stimulation of activation by CD1d." *European Journal of Immunology*, 41(7), 1913–1923. <https://doi.org/10.1002/eji.200940278>
- Kwok, H. M., Ng, F. H., Chau, C. M., Lam, S. Y., & Ma, J. K. F.** (2022). "Multimodality imaging of extra-nodal lymphoma in the head and neck." *Clinical Radiology*. <https://doi.org/10.1016/j.crad.2022.04.017>
- Lafont, V., Liutard, J., Liutard, J. P., & Favero, J.** (2001). "Production of TNF- α by Human V γ 9V δ 2 T Cells Via Engagement of Fc γ RIIIA, the Low Affinity Type 3 Receptor for the Fc Portion of IgG, Expressed upon TCR Activation by Nonpeptidic Antigen." *The Journal of Immunology*, 166(12), 7190–7199. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7190>
- Lanier, L L, Le, A. M., Civin, C. I., Loken, M. R., & Phillips, J. H.** (1986). "The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 136(12), 4480–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3086432>
- Lanier, Lewis L.** (2008). "Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition." *Nature Immunology*, 9(5), 495–502. <https://doi.org/10.1038/ni1581>
- Lantz, O., & Bendelac, A.** (1994). "An invariant T cell receptor α Chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans." *Journal of Experimental Medicine*, 180(3), 1077–1106. <https://doi.org/10.1084/jem.180.3.1097>
- Lee, P. T., Benlagha, K., Teyton, L., & Bendelac, A.** (2002). "Distinct functional lineages of

- human V α 24 natural killer T cells." *Journal of Experimental Medicine*, 195(5), 637–641. <https://doi.org/10.1084/jem.20011908>
- Li, Y.-L., Shi, Z.-H., Wang, X., Gu, K.-S., & Zhai, Z.-M.** (2019). "Tumor-associated macrophages predict prognosis in diffuse large B-cell lymphoma and correlation with peripheral absolute monocyte count." *BMC Cancer*, 19(1), 1049. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6208-x>
- Li, Y., Li, G., Zhang, J., Wu, X., & Chen, X.** (2021). "The Dual Roles of Human $\gamma\delta$ T Cells: Anti-Tumor or Tumor-Promoting." *Frontiers in Immunology*, 11(February), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.619954>
- Li, Z. M., Huang, J. J., Xia, Y., Sun, J., Huang, Y., Wang, Y., ... Jiang, W. Q.** (2012). "Blood lymphocyte-to-monocyte ratio identifies high-risk patients in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP." *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041658>
- Lind, E. F., Prockop, S. E., Porritt, H. E., & Petrie, H. T.** (2001). "Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development." *Journal of Experimental Medicine*, 194(2), 127–134. <https://doi.org/10.1084/jem.194.2.127>
- Liu, C.-Y., Wang, Y.-M., Wang, C.-L., Feng, P.-H., Ko, H.-W., Liu, Y.-H., ... Kuo, H.-P.** (2010). "Population alterations of l-arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b+/CD14-/CD15+/CD33+ myeloid-derived suppressor cells and CD8+ T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 136(1), 35–45. <https://doi.org/10.1007/s00432-009-0634-0>
- Liu, Y., & Barta, S. K.** (2019). "Diffuse large B-cell lymphoma: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and treatment." *American Journal of Hematology*, 94(5), 604–616. <https://doi.org/10.1002/ajh.25460>
- Liu, Z.-H., Yang, L.-C., Song, P., Fang, K., Zhou, J., Peng, Z.-F., & Dong, Q.** (2021). "Primary Diffuse Large B-Cell Lymphoma of the Urinary Tract: A Population-Based Analysis." *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.609882>
- Lozzio, C., & Lozzio, B.** (1975). "Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome." *Blood*, 45(3), 321–334. <https://doi.org/10.1182/blood.V45.3.321.321>
- Lu, J., Aggarwal, R., Kanji, S., Das, M., Joseph, M., Pompili, V., & Das, H.** (2011). "Human Ovarian Tumor Cells Escape $\gamma\delta$ T Cell Recognition Partly by Down Regulating Surface Expression of MICA and Limiting Cell Cycle Related Molecules." *PLoS ONE*, 6(9), e23348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023348>
- Luoma, A. M., Castro, C. D., & Adams, E. J.** (2014). " $\gamma\delta$ T cell surveillance via CD1 molecules." *Trends in Immunology*, 35(12), 613–621.

<https://doi.org/10.1016/j.it.2014.09.003>

- Manfroi, B., McKee, T., Mayol, J. F., Tabruyn, S., Moret, S., Villiers, C., ... Huard, B.** (2017). "CXCL-8/IL8 produced by diffuse large B-cell lymphomas recruits neutrophils expressing a proliferation-inducing ligand April." *Cancer Research*, 77(5), 1097–1107. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0786>
- Martelli, M., Ferreri, A. J. M., Agostinelli, C., Di Rocco, A., Pfreundschuh, M., & Pileri, S. A.** (2013). "Diffuse large B-cell lymphoma." *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 87(2), 146–171. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2012.12.009>
- Mavilio, D., Lombardo, G., Benjamin, J., Kim, D., Follman, D., Marcenaro, E., ... Fauci, A. S.** (2005). "Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: A highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8), 2886–2891. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409872102>
- Metelitsa, L. S.** (2011). "Anti-tumor potential of type-I NKT cells against CD1d-positive and CD1d-negative tumors in humans." *Clinical Immunology*, 140(2), 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.10.005>
- Metelitsa, L. S., Naidenko, O. V., Kant, A., Wu, H.-W., Loza, M. J., Perussia, B., ... Seeger, R. C.** (2001). "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." *The Journal of Immunology*, 167(6), 3114–3122. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.6.3114>
- Mikhaeel, N. G.** (2009). "Interim fluorodeoxyglucose positron emission tomography for early response assessment in diffuse large B cell lymphoma: where are we now?" *Leukemia & Lymphoma*, 50(12), 1931–1936. <https://doi.org/10.3109/10428190903275610>
- Mishalian, I., Granot, Z., & Fridlender, Z. G.** (2017). "The diversity of circulating neutrophils in cancer." *Immunobiology*, 222(1), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.02.001>
- Miura, K., Takahashi, H., Nakagawa, M., Izu, A., Sugitani, M., Kurita, D., ... Takei, M.** (2016). "Clinical significance of co-expression of MYC and BCL2 protein in aggressive B-cell lymphomas treated with a second line immunochemotherapy." *Leukemia & Lymphoma*, 57(6), 1335–1341. <https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1096352>
- Mondello, P., & Mian, M.** (2019). "Frontline treatment of diffuse large B-cell lymphoma: Beyond R-CHOP." *Hematological Oncology*, 37(4), 333–344. <https://doi.org/10.1002/hon.2613>
- Moodycliffe, A. M., Nghiem, D., Clydesdale, G., & Ullrich, S. E.** (2000). "Immune suppression and skin cancer development: Regulation by NKT cells." *Nature Immunology*, 1(6), 521–525. <https://doi.org/10.1038/82782>
- Mookerjee-Basu, J., Vantourout, P., Martinez, L. O., Perret, B., Collet, X., Périgaud, C., ...**

- Champagne, E.** (2010). "F₁-Adenosine Triphosphatase Displays Properties Characteristic of an Antigen Presentation Molecule for V γ 9V δ 2 T Cells." *The Journal of Immunology*, 184(12), 6920–6928. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904024>
- Moser, B., & Eberl, M.** (2011). " $\gamma\delta$ T-APCs: A novel tool for immunotherapy?" *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(14), 2443–2452. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0706-6>
- Nagler, A., Lanier, L. L., Cwirla, S., Phillips, J. H., & Phillips, J. H.** (2019). "Comparative studies of human FcR3-positive and negative natural killer cells . Why The JI ? Submit online . • Rapid Reviews ! 30 days * from submission to initial decision • No Triage ! Every submission reviewed by practicing scientists • Fast Publicati."
- Nair, S., & Dhodapkar, M. V.** (2017). "Natural killer T cells in cancer immunotherapy." *Frontiers in Immunology*, 8(SEP). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01178>
- National, & Cancer, I.** (n.d.). "Using the immune system in the fight against cancer: discovery of rituximab." Retrieved from <http://www.cancer.gov/research/progress/discovery/blood-cancer>
- Nedellec, S., Sabourin, C., Bonneville, M., & Scotet, E.** (2010). "NKG2D Costimulates Human V γ 9V δ 2 T Cell Antitumor Cytotoxicity through Protein Kinase C θ -Dependent Modulation of Early TCR-Induced Calcium and Transduction Signals." *The Journal of Immunology*, 185(1), 55–63. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000373>
- Neparidze, N., & Dhodapkar, M. V.** (2009). "Harnessing CD1d-Restricted T Cells toward Antitumor Immunity in Humans." *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1174(1), 61–67. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04931.x>
- Nguyen, S., Dhedin, N., Vernant, J.-P., Kuentz, M., Jijakli, A. Al, Rouas-Freiss, N., ... Vieillard, V.** (2005). "NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect." *Blood*, 105(10), 4135–4142. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-4113>
- Nitta, H., Terui, Y., Yokoyama, M., Mishima, Y., Nishimura, N., Ueda, K., ... Hatake, K.** (2015). "Absolute peripheral monocyte count at diagnosis predicts central nervous system relapse in diffuse large B-cell lymphoma." *Haematologica*, 100(1), 87–90. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.114934>
- Niu, C., Jin, H., Li, M., Xu, J., Xu, D., Hu, J., ... Cui, J.** (2015). "In vitro analysis of the proliferative capacity and cytotoxic effects of ex vivo induced natural killer cells, cytokine-induced killer cells, and gamma-delta T cells." *BMC Immunology*, 16(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s12865-015-0124-x>
- Ocana, A., Nieto-Jiménez, C., Pandiella, A., & Templeton, A. J.** (2017). "Neutrophils in cancer: Prognostic role and therapeutic strategies." *Molecular Cancer*, 16(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0707-7>
- Ochoa, M. C., Minute, L., Rodriguez, I., Garasa, S., Perez-Ruiz, E., Inogés, S., ...**

- Berraondo, P.** (2017). "Antibody-dependent cell cytotoxicity: immunotherapy strategies enhancing effector NK cells." *Immunology & Cell Biology*, 95(4), 347–355. <https://doi.org/10.1038/icb.2017.6>
- Olingy, C. E., Dinh, H. Q., & Hedrick, C. C.** (2019). "Monocyte heterogeneity and functions in cancer." *Journal of Leukocyte Biology*, 106(2), 309–322. <https://doi.org/10.1002/JLB.4RI0818-311R>
- Ortaldo, J. R., Winkler-Pickett, R. T., Yagita, H., & Young, H. A.** (1991). "Comparative studies of CD3⁻ and CD3⁺ CD56⁺ cells: Examination of morphology, functions, T cell receptor rearrangement, and pore-forming protein expression." *Cellular Immunology*, 136(2), 486–495. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(91\)90369-M](https://doi.org/10.1016/0008-8749(91)90369-M)
- Ouyang, Q., Baerlocher, G., Vulto, I., & Lansdorp, P. M.** (2007). "Telomere Length in Human Natural Killer Cell Subsets." *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1106(1), 240–252. <https://doi.org/10.1196/annals.1392.001>
- Papageorgiou, S. G., Thomopoulos, T. P., Katagas, I., Bouchla, A., & Pappa, V.** (2021). "Prognostic molecular biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era and their therapeutic implications." *Therapeutic Advances in Hematology*, 12, 204062072110139. <https://doi.org/10.1177/20406207211013987>
- Papageorgiou, S. G., Thomopoulos, T. P., Liaskas, A., & Vassilakopoulos, T. P.** (2022). "Monoclonal Antibodies in the Treatment of Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Moving beyond Rituximab." *Cancers*, 14(8). <https://doi.org/10.3390/cancers14081917>
- Papewalis, C., Jacobs, B., Baran, A. M., Ehlers, M., Stoecklein, N. H., Willenberg, H. S., ... Schott, M.** (2011). "Increased numbers of tumor-lysing monocytes in cancer patients." *Molecular and Cellular Endocrinology*, 337(1–2), 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.01.020>
- Papewalis, C., Jacobs, B., Wuttke, M., Ullrich, E., Baehring, T., Fenk, R., ... Schott, M.** (2008). "IFN- α Skews Monocytes into CD56⁺ -Expressing Dendritic Cells with Potent Functional Activities In Vitro and In Vivo ." *The Journal of Immunology*, 180(3), 1462–1470. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1462>
- Peigné, C.-M., Léger, A., Gesnel, M.-C., Konczak, F., Olive, D., Bonneville, M., ... Scotet, E.** (2017). "The Juxtamembrane Domain of Butyrophilin BTN3A1 Controls Phosphoantigen-Mediated Activation of Human V γ 9V δ 2 T Cells." *The Journal of Immunology*, 198(11), 4228–4234. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601910>
- Pellicci, D. G., Koay, H. F., & Berzins, S. P.** (2020). "Thymic development of unconventional T cells: how NKT cells, MAIT cells and $\gamma\delta$ T cells emerge." *Nature Reviews Immunology*, 20(12), 756–770. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0345-y>
- Pfreundschuh, M., Kuhnt, E., Trümper, L., Österborg, A., Trneny, M., Shepherd, L., ... Murawski, N.** (2011). "CHOP-like chemotherapy with or without rituximab in young

- patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: 6-year results of an open-label randomised study of the MabThera International Trial (MInT) Group." *The Lancet Oncology*, 12(11), 1013–1022. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70235-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70235-2)
- Pfreundschuh, M., Murawski, N., Ziepert, M., Altmann, B., Dreyling, M. H., Borchmann, P., ... Poeschel, V.** (2018). "Radiotherapy (RT) to bulky (B) and extralymphatic (E) disease in combination with 6xR-CHOP-14 or R-CHOP-21 in young good-prognosis DLBCL patients: Results of the 2x2 randomized UNFOLDER trial of the DSHNHL/GLA." *Journal of Clinical Oncology*, 36(15_suppl), 7574–7574. https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.7574
- Pham, D. H., Kim, J. S., Kim, S. K., Shin, D. J., Uong, N. T. T., Hyun, H., ... Park, M. H.** (2017). "Effects of ADAM10 and ADAM17 inhibitors on natural killer cell expansion and antibody-dependent cellular cytotoxicity against breast cancer cells in vitro." *Anticancer Research*, 37(10), 5507–5513. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.11981>
- Pievani, A., Borleri, G., Pende, D., Moretta, L., Rambaldi, A., Golay, J., & Introna, M.** (2011). "Dual-functional capability of CD3 +CD56 + CIK cells, a T-cell subset that acquires NK function and retains TCR-mediated specific cytotoxicity." *Blood*, 118(12), 3301–3310. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-336321>
- Poeschel, V., Held, G., Ziepert, M., Altmann, B., Witzens-Harig, M., Holte, H., ... Pfreundschuh, M.** (2018). "Excellent Outcome of Young Patients (18-60 years) with Favourable-Prognosis Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) Treated with 4 Cycles CHOP Plus 6 Applications of Rituximab: Results of the 592 Patients of the Flyer Trial of the Dshnhl/GLA." *Blood*, 132(Supplement 1), 781–781. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-112403>
- Poli, A., Michel, T., Thérésine, M., Andrès, E., Hentges, F., & Zimmer, J.** (2009). "CD56bright natural killer (NK) cells: An important NK cell subset." *Immunology*, 126(4), 458–465. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.03027.x>
- Porcelli, S., Yockey, C. E., Brenner, M. B., & Balk, S. P.** (1993). "Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4–8– $\alpha\beta$ T cells demonstrates preferential use of several $V\beta$ genes and an invariant TCR α chain." *Journal of Experimental Medicine*, 178(1), 1–16. <https://doi.org/10.1084/jem.178.1.1>
- Purroy, N., Bergua, J., Gallur, L., Prieto, J., Lopez, L. A., Sancho, J. M., ... Lopez, A.** (2015). "Long-term follow-up of dose-adjusted EPOCH plus rituximab (DA-EPOCH-R) in untreated patients with poor prognosis large B-cell lymphoma. A phase II study conducted by the Spanish PETHEMA Group." *British Journal of Haematology*, 169(2), 188–198. <https://doi.org/10.1111/bjh.13273>
- Raulet, D. H.** (2003). "Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands." *Nature Reviews Immunology*, 3(10), 781–790. <https://doi.org/10.1038/nri1199>

- Raulet, D. H., & Guerra, N.** (2009). "Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors." *Nature Reviews Immunology*, 9(8), 568–580. <https://doi.org/10.1038/nri2604>
- Reboursiere, E., Gac, A. C., Garnier, A., Salaun, V., Reman, O., Pham, A. D., ... Toutirais, O.** (2018). "Increased frequencies of circulating and tumor-resident V δ 1+ T cells in patients with diffuse large B-cell lymphoma." *Leukemia and Lymphoma*, 59(1), 187–195. <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1321751>
- Rivas-Carvalho, A.** (2004). "CD16+ human monocyte-derived dendritic cells matured with different and unrelated stimuli promote similar allogeneic Th2 responses: regulation by pro- and anti-inflammatory cytokines." *International Immunology*, 16(9), 1251–1263. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh127>
- Rodriguez, P. C., Ernstoff, M. S., Hernandez, C., Atkins, M., Zabaleta, J., Sierra, R., & Ochoa, A. C.** (2009). "Arginase I-Producing Myeloid-Derived Suppressor Cells in Renal Cell Carcinoma Are a Subpopulation of Activated Granulocytes." *Cancer Research*, 69(4), 1553–1560. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1921>
- Romee, R., Foley, B., Lenvik, T., Wang, Y., Zhang, B., Ankarlo, D., ... Miller, J.** (2013). "NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17)." *Blood*, 121(18), 3599–3608. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-425397>
- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W. C., Connors, J. M., Campo, E., Fisher, R. I., ... Staudt, L. M.** (2002). "The Use of Molecular Profiling to Predict Survival after Chemotherapy for Diffuse Large-B-Cell Lymphoma." *New England Journal of Medicine*, 346(25), 1937–1947. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012914>
- Sagiv, J. Y., Michaeli, J., Assi, S., Mishalian, I., Kisos, H., Levy, L., ... Granot, Z.** (2015). "Phenotypic Diversity and Plasticity in Circulating Neutrophil Subpopulations in Cancer." *Cell Reports*, 10(4), 562–573. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.039>
- Salles, G., Barrett, M., Foà, R., Maurer, J., O'Brien, S., Valente, N., ... Maloney, D. G.** (2017). "Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience." *Advances in Therapy*, 34(10), 2232–2273. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0612-x>
- Sánchez-Torres, C., García-Romo, G. S., Cornejo-Cortés, M. A., Rivas-Carvalho, A., & Sánchez-Schmitz, G.** (2001). "CD16+ and CD16- human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4+ T cells." *International Immunology*, 13(12), 1571–1581. <https://doi.org/10.1093/intimm/13.12.1571>
- Sanders, J. M., Ghosh, S., Chan, J. M. W., Meints, G., Wang, H., Raker, A. M., ... Oldfield, E.** (2004). "Quantitative Structure-Activity Relationships for $\gamma\delta$ T Cell Activation by Bisphosphonates." *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(2), 375–384.

<https://doi.org/10.1021/jm0303709>

- Schmielau, J., & Finn, O. J.** (2001). "Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients." *Cancer Research*, 61(12), 4756–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11406548>
- Schwarz, B. A., & Bhandoola, A.** (2006). "Trafficking from the bone marrow to the thymus: A prerequisite for thymopoiesis." *Immunological Reviews*, 209, 47–57. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00350.x>
- Sconocchia, G., Keyvanfar, K., El Ouriaghli, F., Grube, M., Rezvani, K., Fujiwara, H., ... Barrett, A. J.** (2005). "Phenotype and function of a CD56+ peripheral blood monocyte." *Leukemia*, 19(1), 69–76. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403550>
- Scotet, E., Martinez, L. O., Grant, E., Barbaras, R., Jenö, P., Guiraud, M., ... Champagne, E.** (2005). "Tumor recognition following V γ 9V δ 2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I." *Immunity*, 22(1), 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.11.012>
- Scott, D. W., Mottok, A., Ennishi, D., Wright, G. W., Farinha, P., Ben-Neriah, S., ... Gascoyne, R. D.** (2015). "Prognostic significance of diffuse large B-cell lymphoma cell of origin determined by digital gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue biopsies." *Journal of Clinical Oncology*, 33(26), 2848–2856. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.60.2383>
- Sedlmayr, P., Schallhammer, L., Hammer, A., Wilders-Truschnig, M., Wintersteiger, R., & Dohr, G.** (1996). "Differential Phenotypic Properties of Human Peripheral Blood CD56dim+ and CD56bright+ Natural Killer Cell Subpopulations." *International Archives of Allergy and Immunology*, 110(4), 308–313. <https://doi.org/10.1159/000237321>
- Sidibe, A., Ropraz, P., Jemelin, S., Emre, Y., Poittevin, M., Pocard, M., ... Imhof, B. A.** (2018). "Angiogenic factor-driven inflammation promotes extravasation of human proangiogenic monocytes to tumours." *Nature Communications*, 9(1), 355. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02610-0>
- Simões, C., Silva, I., Carvalho, A., Silva, S., Santos, S., Marques, G., ... Paiva, A.** (2019). "Quantification and phenotypic characterization of peripheral blood V δ 1 + T cells in chronic lymphocytic leukemia and monoclonal B cell lymphocytosis." *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 96(2), 164–168. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21645>
- Srpan, K., Ambrose, A., Karampatzakis, A., Saeed, M., Cartwright, A. N. R., Guldevall, K., ... Davis, D. M.** (2018). "Shedding of CD16 disassembles the NK cell immune synapse and boosts serial engagement of target cells." *Journal of Cell Biology*, 217(9), 3267–3283. <https://doi.org/10.1083/jcb.201712085>
- Subimerb, C., Pinlaor, S., Lulitanond, V., Khuntikeo, N., Okada, S., McGrath, M. S., &**

- Wongkham, S.** (2010). "Circulating CD14+CD16+ monocyte levels predict tissue invasive character of cholangiocarcinoma." *Clinical and Experimental Immunology*, 161(3), 471–479. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04200.x>
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Lee Harris, N., Stein, H., Siebert, R., ... Jaffe, E. S.** (2016). "The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms." *Blood*, 127(20), 2375–2390. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569>
- Ta, R., Yang, D., Hirt, C., Drago, T., & Flavin, R.** (2022). "Molecular Diagnostic Review of Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Its Tumor Microenvironment." *Diagnostics*, 12(5), 1087. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12051087>
- Tadmor, T., Bari, A., Sacchi, S., Marcheselli, L., Liardo, E. V., Avivi, I., ... Polliack, A.** (2014). "Monocyte count at diagnosis is a prognostic parameter in diffuse large B-cell lymphoma: results from a large multicenter study involving 1191 patients in the pre- and post-rituximab era." *Haematologica*, 99(1), 125–130. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.088161>
- Terabe, M., & Berzofsky, J. A.** (2018). "Tissue-specific roles of NKT cells in tumor immunity." *Frontiers in Immunology*, 9(AUG), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01838>
- van der Leun, A. M., Thommen, D. S., & Schumacher, T. N.** (2020). "CD8+ T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis." *Nature Reviews Cancer*, 20(4), 218–232. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0235-4>
- Vanherberghen, B., Olofsson, P. E., Forslund, E., Sternberg-Simon, M., Khorshidi, M. A., Pacouret, S., ... Önfelt, B.** (2013). "Classification of human natural killer cells based on migration behavior and cytotoxic response." *Blood*, 121(8), 1326–1334. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-439851>
- Veneri, M. A., Palma, M. De, Ponzoni, M., Pucci, F., Scielzo, C., Zonari, E., ... Naldini, L.** (2007). "Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer." *Blood*, 109(12), 5276–5285. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-053504>
- Vitolo, U., Trneny, M., Belada, D., Burke, J. M., Carella, A. M., Chua, N., ... Sehn, L. H.** (2017). "Obinutuzumab or rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone in previously untreated diffuse large b-cell lymphoma." *Journal of Clinical Oncology*, 35(31), 3529–3537. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.73.3402>
- Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., & Brossay, L.** (2012). "Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer." *Nature Reviews Immunology*, 12(4), 239–252. <https://doi.org/10.1038/nri3174>
- Waldowska, M., Bojarska-Junak, A., & Roliński, J.** (2017). "A brief review of clinical trials involving manipulation of invariant NKT cells as a promising approach in future cancer therapies." *Central European Journal of Immunology*, 42(2), 181–195.

<https://doi.org/10.5114/ceji.2017.69361>

- Wang, H., Sarikonda, G., Puan, K.-J., Tanaka, Y., Feng, J., Giner, J.-L., ... Morita, C. T.** (2011). "Indirect Stimulation of Human V γ 2V δ 2 T Cells through Alterations in Isoprenoid Metabolism." *The Journal of Immunology*, 187(10), 5099–5113. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002697>
- Wang, J., Gao, K., Lei, W., Dong, L., Xuan, Q., Feng, M., ... Zhang, Q.** (2017). "Lymphocyte-to-monocyte ratio is associated with prognosis of diffuse large B-cell lymphoma: correlation with CD163 positive M2 type tumor-associated macrophages, not PD-1 positive tumor-infiltrating lymphocytes." *Oncotarget*, 8(3), 5414–5425. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14289>
- Watzl, C.** (2014). "How to Trigger a Killer" (pp. 137–170). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800147-9.00005-4>
- Wei, H., Huang, D., Lai, X., Chen, M., Zhong, W., Wang, R., & Chen, Z. W.** (2008). "Definition of APC Presentation of Phosphoantigen (E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl Pyrophosphate to V γ 2V δ 2 TCR." *The Journal of Immunology*, 181(7), 4798–4806. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.7.4798>
- Weiner, G. J.** (2010). "Rituximab: Mechanism of action." *Seminars in Hematology*, 47(2), 115–123. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2010.01.011>
- Wilcox, R. A., Ristow, K., Habermann, T. M., Inwards, D. J., Micallef, I. N. M., Johnston, P. B., ... Porrata, L.** (2011). "The absolute monocyte and lymphocyte prognostic score predicts survival and identifies high-risk patients in diffuse large-B-cell lymphoma." *Leukemia*, 25(9), 1502–1509. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.112>
- Wilson, W. H., Dunleavy, K., Pittaluga, S., Hegde, U., Grant, N., Steinberg, S. M., ... Janik, J. E.** (2008). "Phase II study of dose-adjusted EPOCH and rituximab in untreated diffuse large B-cell lymphoma with analysis of germinal center and post-germinal center biomarkers." *Journal of Clinical Oncology*, 26(16), 2717–2724. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.1391>
- Wilson, W. H., Jung, S. H., Porcu, P., Hurd, D., Johnson, J., Eric Martin, S., ... Hsi, E. D.** (2012). "A cancer and Leukemia Group B multi-center study of DA-EPOCH-rituximab in untreated diffuse large B-cell lymphoma with analysis of outcome by molecular subtype." *Haematologica*, 97(5), 758–765. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.056531>
- Wilson, W. H., Sin-Ho, J., Pitcher, B. N., Hsi, E. D., Friedberg, J., Cheson, B., ... Leonard, J. P.** (2016). "Phase III Randomized Study of R-CHOP Versus DA-EPOCH-R and Molecular Analysis of Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma: CALGB/Alliance 50303." *Blood*, 128(22), 469–469. <https://doi.org/10.1182/blood.V128.22.469.469>
- Wingender, G., Krebs, P., Beutler, B., & Kronenberg, M.** (2010). "Antigen-Specific Cytotoxicity by Invariant NKT Cells In Vivo Is CD95/CD178-Dependent and Is Correlated

- with Antigenic Potency." *The Journal of Immunology*, 185(5), 2721–2729. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001018>
- Wu, C., Wu, X., Liu, X., Yang, P., Xu, J., Chai, Y., ... Zhang, L.** (2016). "Prognostic Significance of Monocytes and Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated with R-CHOP." *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39(2), 521–530. <https://doi.org/10.1159/000445644>
- Wu, Y. L., Ding, Y. P., Tanaka, Y., Shen, L. W., Wei, C. H., Minato, N., & Zhang, W.** (2014). "γδ T cells and their potential for immunotherapy." *International Journal of Biological Sciences*, 10(2), 119–135. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7823>
- Xu, B., Pizarro, J. C., Holmes, M. A., McBeth, C., Groh, V., Spies, T., & Strong, R. K.** (2011). "Crystal structure of a γδ T-cell receptor specific for the human MHC class I homolog MICA." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(6), 2414–2419. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015433108>
- Yang, Y.** (2015). "Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer." *Journal of Clinical Investigation*, 125(9), 3335–3337. <https://doi.org/10.1172/JCI83871>
- Yeap, W. H., Wong, K. L., Shimasaki, N., Teo, E. C. Y., Quek, J. K. S., Yong, H. X., ... Wong, S. C.** (2016). "CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes." *Scientific Reports*, 6(1), 34310. <https://doi.org/10.1038/srep34310>
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., ... Lutz, M. B.** (2010). "Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood." *Blood*, 116(16), e74–e80. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-258558>

6. Anhang

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung der DLBCL-Subtypen anhand der COO und molekularer Eigenschaften und deren Überschneidungen	6
Abbildung 2: Mechanismen des Rituximab-vermittelten Zelltodes.....	9
Abbildung 3: Aktivierung und Inhibierung von NK Zellen.	11
Abbildung 4: Übersicht unkonventionelle T-Zellen.....	13
Abbildung 5: schematische Darstellung der Zellaufreinigung.	23
Abbildung 6: Alters- und Geschlechtsverteilung.....	27
Abbildung 7: Therapieschema.....	27
Abbildung 8: Gating-Strategie der aufgereinigten PBMC.....	28
Abbildung 9: Einfluss der DLBCL-Erkrankung und der R-CHOP Therapie auf den Anteil und die Anzahl der Granulozyten.	30
Abbildung 10: Einfluss der DLBCL-Erkrankung und der R-CHOP Therapie auf die Anzahl und den Anteil an Monozyten.....	32
Abbildung 11: Einfluss der DLBCL-Erkrankung und der R-CHOP Therapie auf die Anzahl und den Anteil an CD16 ⁺ Monozyten.	33
Abbildung 12: Einfluss der DLBCL-Erkrankung und der R-CHOP Therapie auf die Anzahl und den Anteil an CD56 ⁺ Monozyten.	35
Abbildung 13: Einfluss der DLBCL-Erkrankung und der R-CHOP Therapie auf den Anteil und die Anzahl der B-Zellen.	37
Abbildung 14: Einfluss der DLBCL-Erkrankung und der R-CHOP Therapie auf die Anzahl und den Anteil der T-Zellen.	38
Abbildung 15: Einfluss der DLBCL-Erkrankung und der R-CHOP Therapie auf die Anzahl und den Anteil an CD16 ⁺ T-Zellen.....	39
Abbildung 16: Einfluss der DLBCL-Erkrankung und der R-CHOP Therapie auf die Anzahl und den Anteil der CD56 ⁺ T-Zellen.	40
Abbildung 17: Einfluss der DLBCL Erkrankung und der R-CHOP Therapie auf den Anteil und die Anzahl an NK Zellen.....	41
Abbildung 19: Verteilung der NK Subtypen bei Patienten mit DLBCL im Therapieverlauf.	44
Abbildung 20: Anteil CD56 ⁺ und CD16 ⁺ T-Zellen und deren zytotoxische Funktion bei einem Patienten mit T-Zell- und Histiozyten-reichem DLBCL.....	46
Abbildung 21: Veränderung der zytotoxischen Funktion von CD3 ⁺ T-Zellen bei DLBCL Patienten.	46
Abbildung 22: prozentualer Anteil einzelner T-Zell-Subtypen.	47
Abbildung 23: Korrelationsanalyse der Zielzelllyse mit dem prozentualen Anteil einzelner T-Zell-Subtypen.	48
Abbildung 24: Einfluss der Menge CD16 ⁺ Monozyten zu Therapiebeginn auf die Prognose von DLBCL Patienten.	50

6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bead-gekoppelte Antikörper.....	17
Tabelle 2: Antikörper für durchflusszytometrische Analyse	17
Tabelle 3: Reagenzien.....	18
Tabelle 4: Zellkulturmedien und Pufferlösungen	19
Tabelle 5: spezielle Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 6: Laborgeräte	19
Tabelle 7: Übersicht über die Diagnosen der Patienten und deren Risikobewertung	21
Tabelle 8: Software	21
Tabelle 9: Übersicht über die Anzahl der analysierten Proben zu verschiedenen Zeitpunkten der Therapie	29

6.3. Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>activated B cell-like</i>
ADCC	Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität
ADCP	Antikörper-abhängige zelluläre Phagozytose
BCL	B-Zell-Lymphoma
BrHPP	Bromhydrinpyrophosphat
BSA	Bovines Serum-Albumin
BTN	Butyrophilin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD1d	<i>Antigen-Presenting Glycoprotein CD1d</i>
CDC	Komplement-vermittelte Zytotoxizität
COO	<i>cell of origin</i>
CYTOF	<i>Cytometry by time of flight</i>
DC	Dendritische Zelle
DEL	<i>double expressor lymphoma</i>
DH/THL	<i>double hit/triple hit lymphoma</i>
DLBCL	diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMA	<i>European Medicine Agency</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FasL	Fas Ligand
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOXP1	<i>Forkhead Box Protein P1</i>
GCB	<i>germinal center B cell-like</i>
GCET1	<i>germinal center B cell-expressed transcript 1</i>
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGBL	hochmalignes B-Zell-Lymphom
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNKT	invariante natürliche Killer T-Zelle
IPI	internationaler prognostischer Index
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat

KIR	Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LDN	<i>Low-Density-Neutrophile</i>
LMO2	<i>LIM Domain Only Protein 2</i>
MAIT	Mukosa-assoziierte invariante T-Zellen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MICA	<i>MHC Class I Chain-Related Protein A</i>
MUM/IRF4	<i>multiple myeloma 1/interferon regulatory factor 4</i>
NaCl	Natriumchlorid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NK	natürliche Killerzelle
NKR	natürlicher Killerzellrezeptor
NKT	natürliche Killer T-Zelle
PAg	Prenyl-Pyrophosphat-Antigen
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PI	Propidiumiodid
Src	Sarkoma
TAA	tumorassoziiertes Antigen
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor-Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

Danksagung

Ich bedanke mich von Herzen bei allen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Bedanken möchte ich mich dabei besonders bei Prof. Dr. Markus Hoth für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und das damit entgegengebrachte Vertrauen. Ich danke Dir für die moralische Unterstützung und Motivation während der gesamten Zeit.

Aus tiefsten Herzen möchte ich mich bei Dr. Eva Schwarz bedanken, die meine Doktorarbeit wissenschaftlich betreut hat. Neben der sehr guten wissenschaftlichen Betreuung hat mir vor allem deine unfassbare Menschlichkeit während der gesamten Doktorandenzeit den Rücken gestärkt und somit wesentlich zum Erfolg der Arbeit beigetragen. Wenn ich an die gemeinsame Zeit zurück denke fällt mir ein Spruch ein, den ich einmal gelesen habe: „Engel kann man nicht sehen, aber man kann Ihnen begegnen.“

Zudem möchte ich auch der gesamten Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung danken. Dabei geht ein besonderer Dank an meine Mädels im Büro. Durch euch bedeutete mein Laborleben nicht einfach Arbeit, sondern ihr habt es geschafft eine wirkliche Wohlfühlatmosphäre zu schaffen.

Gerne bedanke ich mich auch bei der Abteilung Onkologie und Hämatologie der Inneren Medizin I in Homburg, die mir die Bearbeitung dieses spannenden Themas durch die Bereitstellung der Patientenproben überhaupt ermöglicht haben. Mein besonderer Dank geht dabei an Claudia Schormann, die die Entnahme und Anonymisierung der Proben organisiert hat. Durch deinen Einsatz hat sich meine Arbeit um ein Vielfaches vereinfacht. Vielen Dank dafür.

Da die Arbeit mit Patientenproben zeitlich nicht immer planbar ist, möchte ich mich zudem für die Unterstützung bei der Aufreinigung der Proben während meiner Abwesenheit bedanken. Hierbei gehört mein besonderer Dank Nadja Kuchler, Johanna Jansky, Cora Hoxha und Gertrud Schäfer, die es ermöglicht haben, dass auch während meiner Abwesenheit im Labor keine Daten verloren gegangen sind.

Ein großer Dank gilt auch meiner Familie, die mich schon während des Studiums unterstützt hat. Ein besonderer Dank geht dabei an meine Schwester Dorina, die im wörtlichen Sinne die gesamte Zeit an meiner Seite gestanden, mich moralisch unterstützt hat und immer für einen regen Austausch zu haben war.

Veröffentlichungen

Knörck A, Marx S, Friedmann KS, **Zöphel S**, Lieblang L, Hässig C, Müller I, Pilch J, Sester U, Hoth M, Eichler H, Sester M, Schwarz EC. Quantity, quality and functionality of peripheral blood cells derived from residual blood of different apheresis kits. *Transfusion* 2018. doi: 10.1111/trf.14616.

Kaschek L, **Zöphel S**, Knörck A, Hoth M. A calcium optimum for cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell cytotoxicity. *Semin Cell Dev Biol.* 2021 Jul;115:10-18. doi: 10.1016/j.semcdb.2020.12.002.

Zöphel S, Schäfer G, Nazarieh M, Konetzki V, Hoxha C, Meese E, Hoth M, Helms V, Hamed M, Schwarz EC. Identification of molecular candidates which regulate calcium-dependent CD8+ T-cell cytotoxicity. *bioRxiv* 2020. doi: 10.1101/2020.12.22.423945. *Molecular Immunology* submitted.

Zöphel S, Küchler N., Jansky J, Schäfer G, Hoxha C, Schormann C, Stilgenbauer S, Neumann F, Rixecker T, Regitz E, Eichler H, Orth P, Bewarder M, Hoth M, Thurner L, Schwarz EC. The distribution and function of immune cells in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma before and during R-CHOP standard therapy. Manuscript in preparation.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion: 16.05.2023

Dekan: Prof. Dr. med. M. D. Menger

Berichterstatter: Prof. Markus Hoth
Prof. Martina Sester
Prof. Lorenz Thurner