

Aus der Abteilung Hämatologie und Onkologie
(Prof. Dr. med. L. Trümper)

im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Selbsttoleranz von NK-Zellen

INAUGURAL- DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Julian Dreves
aus
Göttingen

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. B. Glaß

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. L. Walter

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2011

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	1
II.	Abbildungsverzeichnis.....	2
III.	Tabellenverzeichnis	3
1	Einleitung.....	4
2	Methoden	9
2.1	Gewinnung der Effektorzellen (NK-Zell-Isolierung).....	9
2.1.1	Gewinnung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut.....	9
2.1.2	Separation der NK-Zellen	9
2.1.3	Separation von Mono-KIR-NK-Zellen.....	10
2.2	Zielzellen	11
2.3	Zellkultur	12
2.4	Durchflusszytometrie (FACS)	12
2.4.1	Bestimmung des Zelltyps	13
2.4.2	Expression verschiedener Oberflächenmoleküle.....	14
2.4.3	Durchflusszytometrische Untersuchungen mit CD107a	15
2.4.4	KIR-Typisierung der NK-Zellen	17
2.4.5	Durchflusszytometrische Phänotypisierung der eingesetzten Zielzellen.....	18
2.5	Versuchsaufbau.....	19
2.6	Versuchsdurchführung.....	20
3	Ergebnisse.....	22
3.1	Reinheitsgrad und Oberflächenmarker der eingesetzten Zielzellen und NK-Zellen.....	22
3.1.1	Zielzellen: Expression von relevanten Zelloberflächenmarkern	22
3.1.2	NK-Zellen: Reinheitsgrad der Aufreinigung.....	27
3.2	Nachweis von KIR ⁺ NKG2A ⁻ NK-Zellen und potentiell autoreaktiven KIR-positiven NK-Zellen	30
3.2.1	KIR ⁺ NKG2A ⁻ NK-Zellen	30
3.2.2	Potentiell autoreaktive KIR-positiv NK-Zellen.....	30
3.3	Charakterisierung der KIR-Funktion	32
3.3.1	KIR/ KIR-Liganden-Interaktion bei Zielzellen mit passendem Liganden oder fehlendem HLA	32
3.3.2	Hyporeaktivität der KIR ⁺ NKG2A ⁻ und der KIR-positiven NK-Zellen ohne korrespondierenden Liganden im Donor	33
3.3.3	Unspezifische Hemmung der NK-Zellen durch HLA-Klasse-I (HLA-C).....	36
3.3.4	Aktivität der KIR ⁺ NKG2A ⁻ NK-Zellen in Co-Kultur im Vergleich mit den Monokulturen	39
4	Diskussion.....	40
5	Zusammenfassung	49
6	Literaturverzeichnis	51
7	Anhang: Materialien.....	60

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispielhafte Darstellung von Messereignissen in Form eines Punktwolkendiagramms.....	13
Abbildung 2: Differenzierung von Oberflächenmerkmalen durch Immunfluoreszenz-markierte Antikörper	15
Abbildung 3: Definition der NK-Zell-Region	16
Abbildung 4: Festlegung des Schwellenwertes für die Aktivitätsmessung anhand der Negativkontrolle mittels eines Markers.....	16
Abbildung 5: Aktivitätsmessung der NK-Zellen.....	17
Abbildung 6: HLA-ABC-Expressionsdichte aller eingesetzten Zielzellen im Vergleich.....	23
Abbildung 7: MIC-A/B-Expressionsdichte aller eingesetzten Zielzellen im Vergleich.....	25
Abbildung 8: PRR2-Expressionsdichte aller eingesetzten Zielzellen im Vergleich.....	26
Abbildung 9: Reinheitsgrad der NK-Zellen	27
Abbildung 10: KIR-Repertoire und Mono-KIR-Fraktionen.....	28
Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse der aufgereinigten NK-Zellen.....	29
Abbildung 12: „Normale“ KIR/KIR-Liganden-Interaktion.....	32
Abbildung 13: Nachweis der Hyporeaktivität KIR ⁺ NKG2A ⁻ NK-Zellen.....	34
Abbildung 14: Nachweis der Hyporeaktivität potentiell autoreaktiver NK-Zellen.....	35
Abbildung 15: Unspezifische Hemmung der NK-Zellen durch HLA-I	38
Abbildung 16: Vergleich zweier Subpopulationen von KIR ⁺ NKG2A ⁻ NK-Zellen.....	39

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswahl an humanen NK-Zell-Rezeptoren mit Auflistung von Funktion und Liganden.....	7
Tabelle 2: Zusammensetzung der PE-gekoppelten Antikörper-Cocktails für die Mono-KIR-Separation.....	10
Tabelle 3: Verwendete K562-Transfektanten und entsprechende HLA-I-Moleküle.....	11
Tabelle 4: Pipettierschema der immuno-phänotypischen KIR-Typisierung.....	18
Tabelle 5: Pipettierschema der CD107a-Analyse der drei verschiedenen NK-Zell-Fraktionen mit den oben angegebenen Zielzellen	20
Tabelle 6: Pipettierschema der Immunophänotyp-Kontrolle im Versuch eingesetzter Zielzellen	21
Tabelle 7: Durchschnitt der mittleren Fluoreszenzintensität mit Standardabweichung (SD) der eingesetzten Zielzellen in 6 Versuchen.....	22
Tabelle 8: Durchschnitt der mittleren Fluoreszenzintensität und SD der MIC-A/B-Expression der eingesetzten Zielzellen in 6 Versuchen.....	24
Tabelle 9: Durchschnitt der mittleren Fluoreszenzintensität und SD der PRR2-Expression der eingesetzten Zielzellen in 6 Versuchen.....	24
Tabelle 10: KIR-Repertoire und KIR-Liganden: Phänotypisierung.....	30
Tabelle 11: HLA-Typisierung: Übersicht der HLA-Typisierung der 6 Donoren.....	31
Tabelle 12: Missverhältnis KIR/ KIR-Ligand: Konstellation der KIR mit den entsprechenden HLA-I-Liganden in den verwendeten Donoren.....	31
Tabelle 13: Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen (SD), Angabe der T-Tests (gepaart, zweiseitig) der durchgeführten CD107a-Mobilisations-Assays von der KIR2DL1-Fraktion der Gruppe A bei Stimulation mit den Zielzellen K562, K562 Cw0505 und B-LCL.....	33
Tabelle 14: Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen (SD), Angabe der T-Tests (gepaart, zweiseitig) der durchgeführten CD107a-Mobilisations-Assays von der KIR2DL2/3-Fraktion der Gruppe A und B bei Stimulation mit den Zielzellen K562, K562 Cw0303 und B-LCL.....	33
Tabelle 15: Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen (SD), Angabe der T-Tests (gepaart, zweiseitig) der durchgeführten CD107a-Mobilisations-Assays von der KIR2DL1- und der KIR ⁻ NKG2A ⁻ -Fraktion der Gruppe A bei Stimulation mit den angegebenen Zielzellen.....	34
Tabelle 16: Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen (SD), Angabe der T-Tests (gepaart, zweiseitig) der durchgeführten CD107a-Mobilisations-Assays von der KIR2DL2/3- und der KIR2DL1- Fraktion der Gruppe B.....	36
Tabelle 17: Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen (SD), sowie Angabe der T-Tests (gepaart, zweiseitig) der durchgeführten CD107a-Mobilisations-Assays von den aufgeführten NK-Zell Fraktionen.....	38
Tabelle 18: Vergleich der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD), sowie Angabe der T-Tests (gepaart, zweiseitig) der durchgeführten CD107a-Mobilisations-Assays von den aufgeführten NK-Zell-Fraktionen bei Stimulation mit K562.....	39

1 Einleitung

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) wurden erstmals in den 70er Jahren, mit der Fähigkeit Tumorzellen und virusinfizierte Zellen ohne vorherige Sensibilisierung zu töten, beschrieben. Sie wurden als unspezifische Subpopulation der Lymphozyten eingeordnet und zunächst N-Zellen genannt (Herberman et al 1975 a; Herberman et al 1975 b). Neben dieser Funktion, die zur Entdeckung der NK-Zellen führte, haben sie Aufgaben in der Abwehr von Parasiten und intrazellulären Bakterien (Laskay et al. 1993). Die Antwort erfolgt im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem sofort und scheint die bedeutendste Rolle in der frühen Infektionsphase mit Pathogenen zu spielen (Gasser und Raulet 2006). Die Eigenschaften von NK-Zellen, maligne und allogene hämatopoetische Zellen zu erkennen und zu zerstören, weckten die Hoffnung, in der Immuntherapie von Tumorerkrankungen zu profitieren (Biron et al. 1999). Doch ohne die detaillierten Kenntnisse über die konkrete Immunreaktion und das große Rezeptorrepertoire der NK-Zellen waren die ersten klinischen Versuche enttäuschend (Rosenberg et al. 1993).

Indessen hat vor allem in der letzten Dekade das Wissen über die Funktionen und Wirkmechanismen von NK-Zellen rapide zugenommen. Die Effektorfunktionen von NK-Zellen sind äußerst komplex und vielschichtig. Die Aktivierung von NK-Zellen bewirkt sowohl eine direkte zytotoxische wie auch eine regulatorische Immunantwort. Die am besten charakterisierte und häufig für Aktivitätsnachweise eingesetzte Effektorfunktion ist die Zytotoxizität von NK-Zellen. Die Sekretion von Vesikeln mit zytotoxischen Bestandteilen (unter anderem Granzyme B) führt zur Lyse der Zielzellen (Hasenkamp et al. 2006). Weiterhin schütten NK-Zellen eine große Anzahl an Botenstoffen aus. Dazu gehören mehrere Zytokine. So werden zur Modulation der Hämatopoese hämatopoetische Faktoren wie IL-3 (Interleukin 3) und GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor) sezerniert. Weitere sezernierte Zytokine sind TNF-alpha (Tumor-Nekrose Faktor alpha) und regulatorische Zytokine wie TGF-beta (*transforming growth factor*) und Interferon gamma (Perussia 1996). Die zusätzlich ausgeschütteten Chemokine induzieren Entzündungsreaktionen (Biron et al. 1999). Weiterhin üben NK-Zellen einen regulatorischen Effekt auf das adaptive Immunsystem aus, unter anderem durch Kommunikation mit dendritischen Zellen (Moretta A 2005).

Aus den potenten, potentiell autoreaktiven, zytotoxischen Funktionen leitet sich automatisch die Frage ab, wie die NK-Zelle zwischen pathogenen und gesunden Zellen diskriminieren kann. Heute ist bekannt, dass der endgültige Effekt von der Integration aller aktivierenden wie

inhibierenden Rezeptorsignale abhängt (Lanier 2005; Raulet et al. 2001; Raulet und Vance 2006). Trotz der Komplexität dieses Integrationsprozesses bleibt die Selbsttoleranz immer erhalten. Bevor jedoch genauer auf die Selbsttoleranzmechanismen eingegangen werden kann, sollen zunächst die dafür entscheidenden molekularen Grundlagen beschrieben werden. Viele inhibitorische Rezeptoren von NK-Zellen sind spezifisch für HLA-Klasse-I-Moleküle, welche auf allen kernhaltigen gesunden Körperzellen exprimiert werden, und spielen bei der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz eine wesentliche Rolle (Karre et al. 1986). Drei Rezeptorfamilien sind im Menschen maßgeblich an der NK-Zell-Erkennung von HLA-Klasse-I-Molekülen beteiligt (Lanier 1998). Dazu gehören die teils inhibitorischen, teils aktivierenden HLA-spezifischen Rezeptoren KIR (*killer cell immunoglobuline like receptors*), CD94/NKG sowie LILRB1. Die KIR gehören zu der Immunglobulin-Superfamilie und bestehen aus transmembranösen Typ-I-Glycoproteinen mit zwei (KIR2D) oder drei (KIR3D) Immunglobulin-ähnlichen Domänen auf der extrazellulären Seite der NK-Zelle (Colonna und Samaridis 1995). Zu der Familie gehören ca. 15 Rezeptoren, welche auf dem Chromosom 19 kodiert sind und sowohl aktivierende wie auch inhibierende Rezeptoren beinhalten (Uhrberg et al. 1997). Die Expression ist stabil und wird nicht durch externe Einflüsse verändert (Gumperz et al. 1996; Shilling et al. 2002). Bei KIR mit aktivierender Funktion sind die intrazellulären Domänen kurz (KIR2/3DS). Die Signaltransduktion findet wie bei den T-Zell- und B-Zell-Antigenrezeptoren durch Adapterproteine statt, welche ein ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) enthalten. NK-Zellen exprimieren drei verschiedene aktivierende Adaptormoleküle: DAP12, CD3 ζ und Fc ϵ RI γ (Anderson et al. 1989; Hibbs et al. 1989; Lanier et al. 1998 b). Die KIR mit inhibitorischer Funktion besitzen eine lange intrazelluläre Domäne (KIR2/3DL) und leiten die Signale intrazellulär mithilfe eines ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) weiter. Die Phosphorylierung der Tyrosin-Residuen der ITIMs bewirkt eine Rekrutierung von SHP-1- und SHP-2-Phosphatasen. SHP-1 und SHP-2 inhibieren die aktivierenden Signalwege. Es kommt zu einer verringerten Phosphorylierung zahlreicher intrazellulärer Signalproteine (Lanier 2005; Yusa et al. 2002; Yusa und Campbell 2003).

Die Liganden der KIR-Familie sind Untergruppen von klassischen HLA-Klasse-I-Molekülen (vor allem HLA-B und HLA-C), wobei die aktivierenden Rezeptoren eine geringere Affinität zu den Liganden haben sollen als deren inhibitorische Gegenspieler (Lanier 2005; O'Connor et al. 2006). Die Rezeptoren und Liganden sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Die CD94- und NKG2-Familie von Genen kodieren Rezeptoren, welche teilweise das non-klassische HLA-E binden (CD94/NKG2A und CD94/NKG2C) (Borrego et al. 1998; Lee et al.

1998). Ein interessanter Aspekt von HLA-E ist, dass es die wichtigsten Proteine der HLA-Subgruppen HLA-A, -B, -C und -G präsentiert (Llano et al. 1998). So können die CD94/NKG2-Rezeptoren durch Interaktion mit HLA-E das gesamte HLA-Repertoire aller klassischen wie nicht-klassischen Klassen überwachen. CD94 und NKG2 enkodieren transmembrane Typ-II-Proteine der *lectin-like* Familie. CD94 wird dabei entweder als Heterodimer über Disulfid-Brücken mit NKG2A oder mit NKG2C exprimiert (Lazetic et al. 1996). CD94/NKG2A-Heterodimere sind inhibierende, mit den Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 assoziierende Rezeptoren, während CD94/NKG2C-Heterodimere durch Assoziation mit dem Adapterprotein DAP12 aktivierend wirken (Houchins et al. 1997; Lanier et al. 1998 a; Le Drean et al. 1998). Genauso wie bei den KIR besitzen die inhibierenden Rezeptoren eine höhere Affinität zu den Liganden (Winter et al. 1998). Die Expression ist jedoch weniger stabil als bei den KIR, sondern stark abhängig von dem Zytokinmilieu in der Umgebung der NK-Zelle (Bertone et al. 1999; Lanier 2005). LILRB1, auch bekannt unter den Namen LIR-1 (*leukocyte immunoglobuline receptor 1*) und ILT-2 (*immunoglobuline-like transcript 2*), bindet mit geringer Affinität an eine HLA-I-Domäne, welche konserviert auf fast allen Subgruppen (HLA-A bis -G) zu finden ist (Lepin et al. 2000). Dieser Rezeptor scheint jedoch nur eine untergeordnete Rolle in der Inhibition von NK-Zellen zu spielen (Lanier 2005).

Trotz der großen Anzahl an inhibitorischen Rezeptoren, welche in der humanen Keimbahn kodiert sind, exprimiert jede NK-Zelle typischerweise nur einen kleinen Anteil dieser Rezeptoren. In diesem unbekanntem Prozess scheint jede Kombination möglich zu sein (Raulet et al. 2001; Valiante et al. 1997). Von den HLA-I unabhängigen aktivierenden Rezeptoren sind besonders die NCR (*natural cytotoxicity receptors*) und NKG2D relevant für HLA-I-unabhängige Erkennung von Tumorzellen (Moretta L et al. 2006). Zu den NCR gehören NKp30, NKp44 und NKp46. NKp30 und NKp46 werden sowohl auf aktivierten wie auch ruhenden NK-Zellen exprimiert (Pende et al. 1999; Pessino et al. 1998). NKp44 wird nur bei NK-Zell-Aktivierung exprimiert (Vitale et al. 1998). Auch bei dieser Rezeptorgruppe werden die Signale durch ITAM-gekoppelte aktivierende Adapterproteine (unter anderem DAP12, CD3 ζ , Fc ϵ RI γ) weitergegeben (Bottino et al. 2004). Die Liganden sind zurzeit noch unbekannt. NKG2D ist ein potenter aktivierender homodimerischer Rezeptor mit einer *lectin-like* Domäne. In Menschen findet die Signaltransduktion von NKG2D ausschließlich durch Assoziation mit dem aktivierenden Adapterprotein DAP10 statt (Andre et al. 2004; Bauer et al. 1999). Ligand des Rezeptors sind MIC A und MIC B (*MHC class I related chain A/B*). Dessen Expression wird vor allem durch zellulären Stress wie Tumortransformation, Hitzeschock oder virale Infiltration induziert (Raulet 2003).

Rezeptor	Funktion	Ligand
KIR2DL1	Inhibition	HLA-C2,4,5,6
KIR2DL2/3	Inhibition	HLA-C1,3,7,8
KIR3DL1	Inhibition	HLA-Bw4
CD94/NKG2A	Inhibition	HLA-E
LILRB1	Inhibition	HLA-A,B,C,D,E,F,G
NKG2C	Aktivierung	HLA-E
NKG2D	Aktivierung	MIC A, MIC B
NCRs	Aktivierung	?

Tabelle 1: Auswahl an humanen NK-Zell-Rezeptoren mit Auflistung von Funktion und Liganden.

Mit der Entdeckung dieser großen Anzahl an Rezeptoren entstand die Frage nach dem Mechanismus der NK-Zellen, fehlende Selbst-Merkmale zu erkennen. Die „*missing-self*“ Hypothese war der erste Ansatz, diese Frage zu beantworten, und basierte auf dem Gedanken, dass Zielzellen von NK-Zellen dann detektiert und eliminiert werden, wenn sie keine selbstspezifischen Oberflächenmarker exprimieren (Karre 2002). Auf die Inhibition von NK-Zellen bezogen, entspricht dieser Hypothese das „*at-least-one*“-Modell. Bis in das Jahr 2006 wurde dabei die Selbsttoleranz von NK-Zellen alleinig auf die Expression inhibitorischer HLA-spezifischer Rezeptoren zurückgeführt. Das Modell beruht auf der Annahme, dass jede normale NK-Zelle mindestens einen inhibitorischen HLA-I-spezifischen Rezeptor exprimiert, dessen Aktivierung potenter ist als die Aktivierung aller aktivierenden Rezeptoren durch gesunde Zellen (Moretta L et al. 2006).

Da, wie oben erwähnt, die Expression HLA-spezifischer inhibitorischer Rezeptoren weitgehend randomisiert ist und die HLA-Klasse-I-Moleküle unabhängig vererbt werden, stellt sich die Frage, ob NK-Zellen ohne HLA-I-spezifische Rezeptoren existieren oder wie diese potentielle Autoreaktivität verhindert wird (Gumperz et al. 1996). Denn bislang ist keine Autoimmunerkrankung beschrieben, der eine Störung der Selbsttoleranz von NK-Zellen zugrunde liegt (Gasser und Raulet 2006). Anfang der neunziger Jahre wurden Studien veröffentlicht, in denen NK-Zellen in HLA-I-defizienten Mäusen untersucht wurden. Sie enthielten eine normale Anzahl an NK-Zellen und zeigten trotz fehlender Liganden für HLA-spezifische Rezeptoren keine Autoreaktivität (Hoglund et al. 1998; Liao et al. 1991; Ljunggren et al. 1994). Im Jahr 2005 wurden erstmals in murinen Modellen NK-Zellen ohne HLA-spezifische inhibitorische Rezeptoren nachgewiesen (Fernandez et al. 2005; Kim et al. 2005). Sowohl die NK-Zellen in HLA-I-defizienten Mäusen wie die NK-Zellen ohne HLA-I-

spezifischen inhibitorischen Rezeptor waren selbsttolerant und zeigten keine autoimmunen Phänomene. Funktionelle Analysen dieser NK-Zellen zeigten jedoch wesentliche Defizite. So wurde eine verminderte Abstoßung von allogenen Knochenmarktransplantaten, eine geringere Zytotoxizität bei Antikörper-markierten Zielzellen, sowie eine verringerte Zytolyse von Tumorzellen beobachtet. Auch die Zytokinproduktion war vermindert (Fernandez et al. 2005; Kim et al. 2005; Liao et al. 1991). Die beobachteten Defekte sind jedoch nicht vollständig. Eine Restfunktionalität konnte nachgewiesen werden. Dieser Zustand wurde „*hyporesponsiveness*“ (Hyporeaktivität) genannt (Fernandez et al. 2005). Die Frage nach entsprechenden humanen NK-Zellen ohne inhibitorische HLA-spezifische Rezeptoren war Ausgangspunkt dieser Dissertation. Bei Nachweis dieser Zellpopulation ist die Frage nach der Funktion interessant. Gibt es, wie im murinen Modell, funktionelle Defizite? Welche Rolle spielt HLA-I bei der Selbsttoleranz von NK-Zellen?

Klinische Relevanz bekommt das Thema aufgrund der Tatsache, dass die „*missing-self*“ Hypothese auch theoretische Grundlage des beobachteten Graft-versus-Leukämie-Effektes bei allogenen Stammzelltransplantationen mit KIR-Liganden-Inkompatibilität des Empfängers ist. So konnte in mehreren Studien bei allogenen Stammzelltransplantationen mit KIR-Liganden-Inkompatibilität des Empfängers eine Alloreaktivität der transplantierten NK-Zellen des Empfängers nachgewiesen werden. Der Benefit, welcher auf die Alloreaktivität der NK-Zellen zurückgeführt wurde, zeigte sich in einem verstärkten Graft-versus-Leukämie-Effekt, einer geringeren Rezidiv-Rate und dem selteneren Auftreten einer Graft-versus-Host-Erkrankung (Ruggeri et al. 1999; Ruggeri et al. 2002). In einer Studie zeigte sich sogar ein besseres Gesamtüberleben bei KIR-Liganden-Inkompatibilität des Empfängers als bei kompatiblen KIR-Liganden bzw. komplett HLA-kompatiblen Transplantaten (Giebel et al. 2003). Die aktuell vermuteten Ursachen dieser günstigen Effekte sind bis jetzt erst im murinen Modell gut untersucht worden. So eliminieren alloreaktive NK-Zellen nicht nur verbleibende leukämische Zellen im Empfänger, sondern beseitigen auch verbliebene T-Zellen und Antigen-präsentierende Zellen, welche die Aktivität von Lymphozyten des Spenders auf Empfängergewebe triggern und so vor einer Graft-versus-Host-Erkrankung schützen (Ruggeri et al. 2002; Shlomchik et al. 1999). Ein besseres Verständnis der Regulationsmechanismen und der Selbsttoleranz von NK-Zellen könnte vielleicht zu einer Änderung der Strategie bei der Auswahl von allogenen Transplantaten bei leukämischen Grunderkrankungen führen.

2 Methoden

Detaillierte Angaben zu dem verwendeten Material finden sich im Anhang.

2.1 Gewinnung der Effektorzellen (NK-Zell-Isolierung)

2.1.1 Gewinnung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMNZ) wurden aus frischem, venösem Vollblut freiwilliger, gesunder Spender (die hochauflösend HLA-typisiert sind) gewonnen. Das Blut wurde in heparinisierten Perfusorspritzen gesammelt und die PBMNZ mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dafür wurde das entnommene Blut im Verhältnis 1:1 mit PBS (*phosphate buffer saline*) verdünnt, über eine Separationslösung (Ficoll) geschichtet und für 20 Minuten bei 2200 Umdrehungen pro Minute (U/min) ungebremst zentrifugiert. Die dabei entstehende Interphase enthielt die PBMNZ und wurde durch Aspiration mit einer 10-ml-Pipette isoliert. Anschließend wurde die gewonnene Zellfraktion zweimal mit PBS gewaschen und die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Die Separationslösung wirkt während dieser Zentrifugation wie ein Filter, der Zellen nach ihrer Dichte trennt. Dadurch entsteht am Boden des Zentrifugenröhrchens ein Niederschlag (*pellet*), welches Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten enthält. Darüber ist eine Phase mit der Separationslösung. Auf dieser entsteht die sogenannte Interphase, die die mononukleären Zellen enthält. Oben befindet sich die Plasmaphase.

2.1.2 Separation der NK-Zellen

Die Separation der NK-Zellen erfolgte mittels immunomagnetischer Depletion der CD3-, CD4-, CD14-, CD15-, CD19-, CD36-, CD123- und CD235a- positiven Zellen der frisch isolierten PBMNZ. Je 1×10^7 Zellen wurden in 40 μ l MACS-Puffer resuspendiert und mit 10 μ l *NK Cell Biotin Antibody Cocktail* 10 Minuten bei 4°C auf dem Rollschüttler inkubiert. Nach Zugabe von 30 μ l MACS-Puffer und 20 μ l *NK Cell MicroBead Cocktail* pro 1×10^7 Zellen wurden die PBMNZ für weitere 15 Minuten bei 4°C auf dem Rollschüttler inkubiert, mit MACS-Puffer gewaschen und bis 1×10^8 Zellen in 500 μ l MACS-Puffer resuspendiert. Danach wurde die Zellsuspension auf die nach Protokoll des Herstellers vorbereiteten Separationssäulen (bis maximal 1×10^7 markierte Zellen über eine MS-Säule nach vorigem Spülen mit 500 μ l MACS-Puffer, bis maximal 1×10^8 markierte Zellen über eine LS-Säule

nach vorigem Spülen mit 3 ml MACS-Puffer) im Magnetfeld des VARIO MACS gegeben. Die Negativfraktion enthielt die unmarkierten, von der Säule nicht zurückgehaltenen NK-Zellen. Die Negativfraktion wurde erneut gewaschen, in Zellkultur-Medium (RPMI 1640 Medium mit 10% FCS und Penicillin/Streptomycin) resuspendiert und mit dem CASY Zell-Zähler die Zellzahl bestimmt. 5×10^6 NK-Zellen je ml Zellkultur-Medium wurden 16 Stunden mit 500 U (Einheiten) pro ml IL-2 bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.1.3 Separation von Mono-KIR-NK-Zellen

Mono-KIR-NK-Zellen sind Subpopulationen, welche ausschließlich einen spezifischen inhibitorischen KIR-Rezeptor als einzigen HLA-Klasse-I-spezifischen inhibitorischen Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren.

Nach der 16-stündigen Inkubation mit IL-2 wurde die isolierte NK-Zell-Gesamtpopulation in 100 µl MACS-Puffer je 1×10^7 Zellen resuspendiert und mit PE-gekoppelten Antikörpern, wie in Tabelle 2 gezeigt, für 30 Minuten bei 18°C unter Lichtschutz auf dem Rollschüttler inkubiert.

zu isolierende Mono-KIR-Fraktion	PE-gekoppelte Antikörper			
	NKG2A	CD158a	NKAT2	NKB1
2DL1	20µl je 1×10^7 Zellen	-	15µl je 1×10^7 Zellen	15µl je 1×10^7 Zellen
2DL2/3	20µl je 1×10^7 Zellen	15µl je 1×10^7 Zellen	-	15µl je 1×10^7 Zellen
3DL2	20µl je 1×10^7 Zellen	15µl je 1×10^7 Zellen	15µl je 1×10^7 Zellen	-

Tabelle 2: Zusammensetzung der PE-gekoppelten Antikörper-Cocktails für die Mono-KIR-Separation.

Nach einmaligem Waschen mit MACS-NK-Cell-MicroBead-Cocktail-Puffer, wurden die NK-Zellen in 60 µl MACS-Puffer je 1×10^7 Zellen resuspendiert und mit 40 µl Anti-PE MicroBeads für 20 Minuten bei 18°C unter Lichtschutz auf dem Rollschüttler inkubiert. Anschließend wurde erneut mit MACS-Puffer gewaschen und die Zellen über die nach Hersteller-Protokoll präparierte Separationssäule (bis maximal 1×10^8 markierte Zellen über eine mit 2 ml MACS-Puffer gespülte LD- Säule) gegeben.

Die Negativfraktion bildete die entsprechend nach Tabelle 2 ausgewählte Mono-KIR-Fraktion. Um Verunreinigungen mit CD56-negativen Zellen zu minimieren, wurde mit der isolierten Negativfraktion eine immunomagnetische Positiv-Anreicherung mit CD56-MicroBeads durchgeführt. Bis 1×10^7 NK-Zellen wurden in 80 μ l MACS-Puffer resuspendiert und mit 20 μ l CD56 MicroBeads für 15 Minuten bei 4°C auf dem Rollschüttler inkubiert, gewaschen und über die nach Hersteller-Protokoll präparierte Separationssäule (bis maximal 1×10^7 markierte Zellen über eine mit 500 μ l MACS-Puffer gespülte MS-Säule, bis maximal 1×10^8 markierte Zellen über eine mit 3 ml MACS-Puffer gespülte LS-Säule) gegeben. In der Positivfraktion, die mit einem beiliegenden Presskolben und 1 ml MACS-Puffer aus der Säule eluiert wurde, waren die NK-Zellen der gereinigten Mono-KIR-Fraktion, die als Effektorzellen in den durchgeführten Versuchen eingesetzt wurden. Vor Einsatz der Mono-KIR-NK-Zellen wurden diese durchflusszytometrisch auf ihre Reinheit untersucht. Überprüft wurden die Expression von CD56, CD16, CD45 und KIR, sowie die fehlende Expression von CD20 und CD3.

2.2 Zielzellen

K562-Transfektanten	Transfiziertes HLA-I	Entsprechender KIR
K562 CW0505	HLA-C*0505	KIR2DL1
K562 CW0303	HLA-C*0303	KIR2DL2/3
K562 B0708	HLA-B*0708 (Bw6)	-
K562 B4405	HLA-B*4405 (Bw4)	KIR3DL1

Tabelle 3: Verwendete K562-Transfektanten und entsprechende HLA-I-Moleküle

Es wurde die NK-Aktivität gegen drei verschiedene Arten von Zielzellen untersucht:

- **K562** ist eine hochgradig undifferenzierte humane Ziellinie aus hämatopoetischen Blasten einer Blastenkrise bei chronisch myeloischer Leukämie mit erythrozytären und myeloischen Merkmalen. Die NK-Zell-sensitive Zelllinie exprimiert keine HLA-Klasse-I-Moleküle (Penack et al. 2005). Sie wurde erhalten von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Deutschland).
- **4 Varianten von K562-Transfektanten:** Die HLA-I-negative K562-Parenteralzelllinie wurde mit cDNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure) der

entsprechenden HLA-Moleküle stabil transfiziert (siehe Tabelle 3). Diese Zellen wurden freundlicherweise von W. Herr (Universitätsklinikum Mainz, Medizinische Klinik III) hergestellt und überlassen.

- **B-LCL** sind in vitro EBV (Epstein-Barr-Virus)- transfizierte B-Lymphozyten von HLA-typisierten gesunden Spendern, abgeleitet nach dem Standard-Protokoll (Tosato und Cohen 2007). Die normalen B-Lymphozyten wurden aus peripherem venösem Blut gewonnen. Kurz zusammengefasst wurden 2×10^6 PBMNZ in 400 μ l Medium suspendiert und mit 1 ml Zellkultur-Überstand der EBV-produzierenden Zelllinie B95-8 inkubiert. Nach 24 Stunden wurden 1,4 ml Medium und 10 μ g Cyclosporin A hinzugegeben. Eine Woche später wurden die Zellen mit Medium gewaschen und in 1 ml Medium und 1 μ g/ml Cyclosporin A resuspendiert. Nach einer weiteren Woche wurde normales Medium zum Kultivieren verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO₂.

2.3 Zellkultur

Alle Schritte der Zellkultivierung wurden unter sterilen Bedingungen mit sterilen Medien, Lösungen und Materialien an einer Sterilwerkbank durchgeführt, um eine Kontamination mit Pilzen und Bakterien zu vermeiden. Täglich wurden die Zellen mittels Durchlichtmikroskopie auf mikrobiologische Kontamination überprüft. Kontaminierte Kulturen wurden verworfen. Die Zellkulturen wurden bei 37°C mit 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Sie wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% fetalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Drei Mal pro Woche wurden die Zellen geteilt und mit frischem Medium versorgt. Regelmäßig wurden alle Kulturen auf Befall mit intrazellulären Mikroorganismen, wie Mykoplasmen, per PCR überprüft. Kontaminierte Kulturen wurden verworfen oder isoliert und dekontaminiert.

2.4 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) dient der Messung spezifischer Charakteristika von gelösten Zellen und Partikeln. Das Prinzip beruht auf der spezifischen Streuung und Brechung von Licht, wenn die zu untersuchenden Zellen oder Partikel in einem hydrodynamischen fokussierten Flüssigkeitsstrom auf eine oder mehrere

Laserstrahlen treffen. Mit verschiedenen Lasern können sowohl der Zelltyp, wie auch die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle nach Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern bestimmt werden.

2.4.1 Bestimmung des Zelltyps

Der Zelltyp in einer gemischten Zellsuspension wird durch quantitative Messung des Vorwärtsstreulichts (*forward scatter*, FSC) und des Seitwärtsstreulichts (*sideward scatter*, SSC) ermittelt. FSC dient als Maß für die Zellgröße und SSC als Maß für die Granularität von Zellen. Durch Darstellung aller Messereignisse in Form von Punktwolkendiagrammen mit FSC auf der Abzisse und SSC auf der Ordinate können die einzelnen Zellpopulationen nach der Messung unterschieden werden (Abbildung 1).

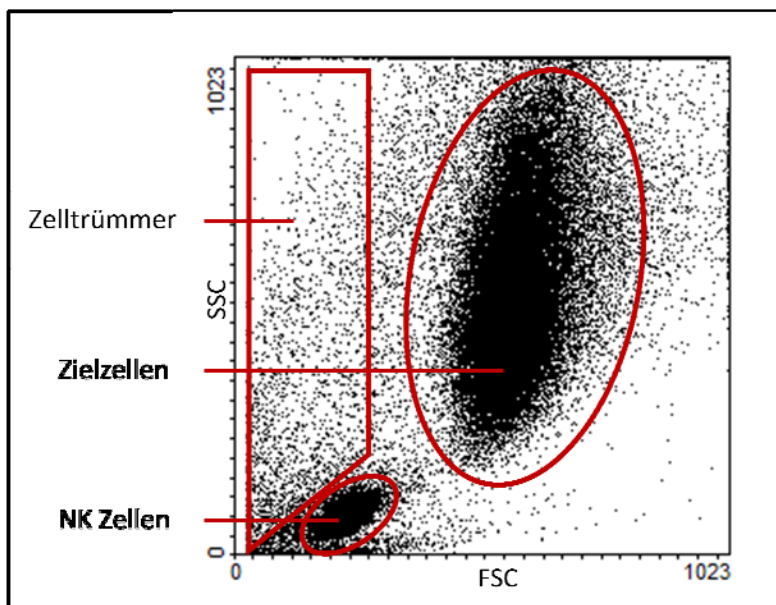


Abbildung 1: Beispielhafte Darstellung von Messereignissen in Form eines Punktwolkendiagramms.

2.4.2 Expression verschiedener Oberflächenmoleküle

Um die Zielzellen auf spezifische Oberflächenmerkmale in der Durchflusszytometrie untersuchen zu können, wurden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern markiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Antikörper eingesetzt, die mit je einem der folgenden Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt waren:

- FITC** (*fluorescein isothiocyanate*): Ableitung in Fluoreszenz 1 (FL 1), Absorptions-Maximum bei 495 nm, Emission von Licht der Wellenlänge 520 nm = grün
- PE** (*phycoerythrin*): Ableitung in Fluoreszenz 2 (FL 2), Absorptions-Maximum bei 565 nm, Emission von Licht der Wellenlänge 570 nm = gelb/orange
- PerCP** (*peridinin chlorophyll protein*): Ableitung in Fluoreszenz 3, Absorptions-Maximum bei 490 nm, Emission von Licht der Wellenlänge 675 nm = rot
- Pe-Cy5** (*PerCP mit cyanine dye*): Ableitung in Fluoreszenz 3, Absorptions-Maximum bei 490 nm, Emission von Licht der Wellenlänge 694 nm = rot.

Die Inkubation der FITC-, PE- und PerCP- gekoppelten Antikörper erfolgte 30 Minuten bei 4°C. Die Inkubation mit dem PE-Cy5-gekoppelten Antikörper CD107a erfolgte über 2 Stunden bei 37°C und 5% CO₂. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in 250 µl PBS resuspendiert und am FACScan-Durchflusszytometer mit dem Messprogramm CellQuest (BD, New Jersey, USA) analysiert. Die Auswertung der FACS-Analyse erfolgte mit der Software Win MDI Version 2.8 (Win MDI Version 2.8, Joseph Trotter). Ein Beispiel für die Differenzierung von Oberflächenmerkmalen durch die oben genannten Immunfluoreszenz-markierten Antikörper zeigt Abbildung 2.

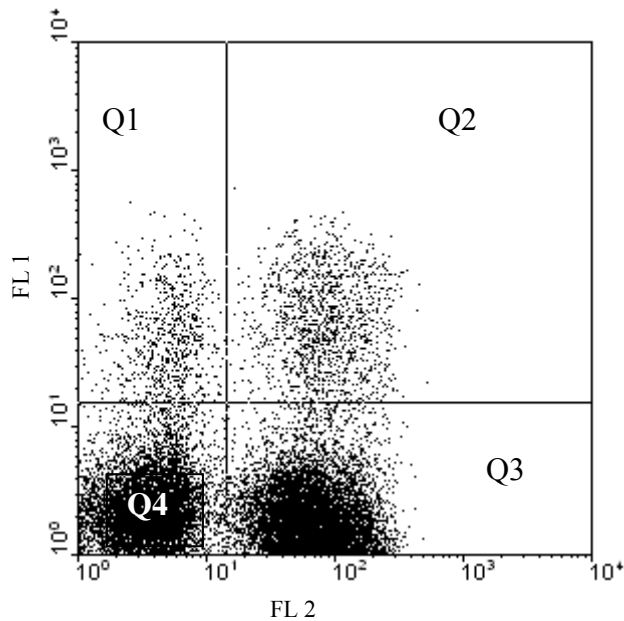


Abbildung 2: Differenzierung von Oberflächenmerkmalen durch Immunfluoreszenz-markierte Antikörper: Q1: FL-1-positiv und FL-2-negativ, Q2: FL-1- und FL-2-positiv, Q3: FL-1-negativ und FL-2-positiv, Q4: FL-1- und FL-2-negativ

2.4.3 Durchflusszytometrische Untersuchungen mit CD107a

CD107a ist ein Lysosomen-assoziiertes Membranprotein (LAMP-1). Es ist ein Marker intrazytoplasmatischer zytolytischer Granula, der bei Degranulation der NK-Zelle auf der Zellmembran detektierbar wird. Die CD107a-Expression auf der Zellmembran korreliert positiv mit der NK-Zell-Aktivierung respektive der zellvermittelten Lyse (Alter et al. 2004; Penack et al. 2005). Die CD107a-Messung folgte mit Modifikationen dem Protokoll des CD107a-Mobilisations-Assays (modifiziert von Penack et al. 2005):

Vorher aufgereinigte Mono-KIR-Zellen wurden mit oder ohne Zielzellen in einem Effektor-Zielzell-Verhältnis von 1:2 für 1 Stunde bei 37°C und 5% CO₂ mit 5 µl Pe-Cy5-gekoppelten CD107a-Antikörper inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl Monensin wurden die Zellen für eine weitere Stunde inkubiert. Nach insgesamt 2 Stunden wurden sie mit PBS gewaschen. Mittels FACS-Analyse wurde der Anteil der CD107a-positiven NK-Zellen gemessen. In der Auswertung mit der Software Win MDI Version 2.8 wurde zunächst die Region für die NK-Zellen definiert (siehe Abbildung 3). Für die Aktivitätsmessung wurden nur die in der Region liegenden Zellen berücksichtigt. Die Darstellung der CD107a-Positivität erfolgte in Histogrammen (siehe Abbildung 4).

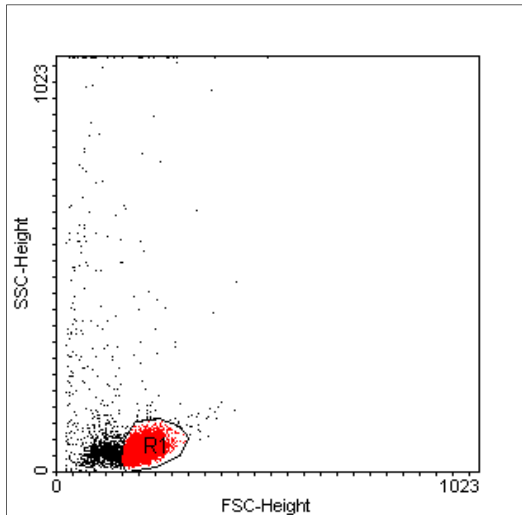


Abbildung 3: Definition der NK-Zell-Region

Der Schwellenwert für die Aktivitätsmessung wurde anhand einer Negativkontrolle (Solowert von NK-Zellen ohne Zielzellen) mittels eines Markers festgelegt (siehe Abbildung 4 und 5). Die ausgewerteten Daten wurden grafisch als NK-Zell-Stimulationsindex dargestellt: $(\text{Messwert} - \text{Leerwert}) / \text{Leerwert}$. Der Stimulationsindex gibt die Aktivität der NK-Zellen durch Stimulation der entsprechenden Zielzelle an. Weiterhin werden so die Auswirkungen der unterschiedlichen Leerwerte auf die Versuchsergebnisse berücksichtigt. Der Marker für den Leerwert wurde definiert als die Position im Histogramm, an welcher die Hauptverteilung auf Null sinkt. Die Ergebnisse wurden mit Excel 2007 (Excel 2007, Microsoft Corporation, Redmont, USA) auf Signifikanz überprüft. Als statistischer Test wurde ein gepaarter zweiseitiger T-Test genutzt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,09$ festgesetzt.

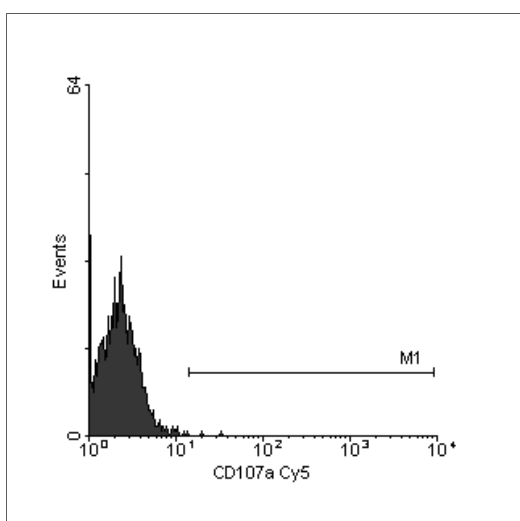


Abbildung 4: Festlegung des Schwellenwertes für die Aktivitätsmessung anhand der Negativkontrolle mittels eines Markers (M1)

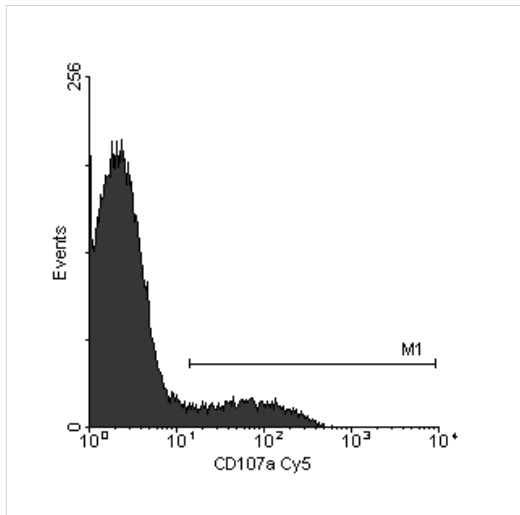


Abbildung 5: Aktivitätsmessung der NK-Zellen

2.4.4 KIR-Typisierung der NK-Zellen

Das Rezeptor-Repertoire der NK-Zellen wurde immuno-phänotypisch bestimmt. Folgende konjugierte monoklonale Antikörper wurden benutzt: CD3, FITC, CD16-FITC, CD56-AlexaFluor488, NKG2A-PE, CD158a-FITC (KIR2DL/S1), NKAT2-PE (KIR2DL/S2/3) und NKB1-Biotin (KIR3DL/S1, gekoppelt mit Streptavidin-PerCP). Nach Aufreinigung der NK-Zell-Population wurden die Zellen in 50 µl PBS suspendiert und nach dem in Tabelle 4 dargestellten Pipettierschema mit je 10µl der entsprechenden monoklonalen Antikörper für 30 Minuten bei 4°C auf dem Rollschüttler inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die Zell-Suspensionen mit Biotin-gekoppelten Antikörpern wurden in 50 µl PBS resuspendiert und mit 10 µl SA-PerCP für 20 Minuten bei 4°C auf dem Rollschüttler inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden alle Zellen in 250 µl PBS resuspendiert und mit dem FACS-Gerät analysiert. Die Auswertung der FACS-Analyse erfolgte mit der Software WinMDI Version 2.8. Die PCR (*polymerase chain reaction*)-Amplifikation der KIR-Gene und eine KIR-spezifische PCR-SSP (*sequence-specific priming*)-Typisierung der NK-Zellspender wurde freundlicherweise von Markus Uhrberg (Institut für Transplantations- und Gewebemedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland) durchgeführt.

FACS-Röhrchen	NK-Zellen (NK)	Antikörper gekoppelt mit		
		Fluoreszenz 1	Fluoreszenz 2	Fluoreszenz 3
1	NK + IL-2	solo		
2	NK + IL-2	IgG-1-Kontrolle		PerCP
3	NK + IL-2	CD56 Alexa Fluor 488	CD3 PE	
4	NK + IL-2	CD56 Alexa Fluor 488	CD16 PE	
5	NK + IL-2		CD 20 PE	
6	NK + IL-2		CD314 PE	
7	NK + IL-2		NKp46 PE	
8	NK + IL-2		CD337 PE	
9	NK + IL-2		CD226 PE	
10	NK + IL-2	CD158a FITC	NKAT2 PE	NKB1 Biotin+ SA-PerCP
11	NK + IL-2	CD158a FITC	NKG2A PE	NKB1 Biotin SA-PerCP
12	NK + IL-2	NKAT2 FITC	NKG2A PE	NKB1 Biotin+ SA-PerCP
13	NK + IL-2	CD158a+ NKAT2 FITC	NKG2A PE	NKB1 Biotin+ SA-PerCP

Tabelle 4: Pipettierschema der immuno-phänotypischen KIR-Typisierung

2.4.5 Durchflusszytometrische Phänotypisierung der eingesetzten Zielzellen

Die Zielzellen wurden bei jedem Versuch auf die Expression bestimmter relevanter Oberflächenmerkmale untersucht, um eine mögliche Beeinflussung auf die NK-Zellaktivität durch eine unterschiedliche Expressionsdichte zu detektieren. Folgende monoklonale PE-gekoppelte Antikörper wurden eingesetzt:

HLA-ABC-PE:

Der Antikörper ist gegen ein monomorphes Epitop von HLA-A, -B und -C gerichtet und dient der Expressionskontrolle der transfizierten HLA-Klasse-I-Moleküle.

MICA/B-PE:

MICA/B ist ein stress-induzierter, entfernt HLA-I-homologer Ligand auf Epithelien und Tumorzellen für den aktivierenden Rezeptor NKG2D von NK-Zellen.

PRR2-PE:

PRR2 ist homolog zu dem Poliovirus-Rezeptor und reagiert mit dem Poliovirus-Rezeptor-2-Protein. PRR2 wird regelmäßig von Blasten bei akuter myeloischer Leukämie exprimiert. Er ist der Ligand zum aktivierenden Rezeptor DNAM-1 (CD226) von NK-Zellen.

Die Zielzellen wurden in 200 µl PBS suspendiert und 30 Minuten bei 4°C mit den oben genannten monoklonalen Antikörpern auf dem Rollschüttler inkubiert, gewaschen und per Durchflusszytometrie analysiert. Die Auswertung erfolgte mit Win MDI 2.8.

2.5 Versuchsaufbau

Die Versuchsreihe bestand aus einer parallelen FACS-Analyse von Mono-KIR2DL1-, Mono-KIR2DL2/3- und KIR/NKG2A-negativen NK-Zellen. Dabei wurden zwei Gruppen von gesunden Spendern untersucht: Drei KIR2DL1-positive Donoren mit entsprechenden HLA-Liganden und drei Donoren mit KIR2DL1 ohne passenden HLA-Liganden, also mit einem endogenen KIR/KIR-Liganden-Missverhältnis. Alle Donoren hatten KIR-negative und NKG2A-negative NK-Zellen. Die Spender waren vorher alle hochauflösend HLA-typisiert worden. Es wurden vier Subpopulationen von NK-Zellen untersucht:

Subpopulation 1: Mono-KIR2DL1-positive und NKG2A-negative NK-Zellen mit entsprechendem HLA-Liganden im Donor

Subpopulation 2: Mono-KIR2DL1-positive und NKG2A-negative NK-Zellen ohne entsprechenden HLA-Liganden im Donor

Subpopulation 3: Mono-KIR2DL2/3-positive und NKG2A-negative NK-Zellen mit entsprechendem Liganden im Donor

Subpopulation 4: KIR-negative und NKG2A-negative NK-Zellen in Solo-Kultur

Die Mono-KIR-Fraktionen waren aufgrund der technisch nicht durchführbaren immunomagnetischen Positiv-Depletion allnegativer NK-Zellen immer kontaminiert mit KIR- und NKG2A-negativen (KIR⁻NKG2A⁻) NK-Zellen. Die Co-Kulturen wurden durch Antikörper-Markierung der KIR mit der Immunfluoreszenz FITC voneinander unterschieden. Als Zielzellen wurden die K562-Transfektanten eingesetzt. Positiv-Kontrolle war die HLA-negative K562-Zelllinie, Negativ-Kontrolle waren B-LCL eines Spenders, welcher alle relevanten KIR-Liganden exprimiert.

2.6 Versuchsdurchführung

Zunächst erfolgte die oben beschriebene NK-Zellisolation aus 150-250 ml venösen Frischblutes. Die Gesamtpopulation der NK-Zellen wurde in drei Portionen aufgeteilt. Mit jeweils einer der Portionen wurden eine Mono-KIR2DL1-, eine Mono-KIR2DL2/3- sowie eine KIR^{NKG2A}-Aufreinigung durchgeführt. Mit den aufgereinigten NK-Zellen wurde eine CD107a-Analyse mit den oben erwähnten Zielzellen durchgeführt (siehe Tabelle 5).

FACS-Röhrchen	MonoKIR-Fraktion	Antikörper gekoppelt mit			Zielzellen
		Fluoreszenz 1	Fluoreszenz 2	Fluoreszenz 3	
1	KIR ^{NKG2A}	solo			
2	KIR ^{NKG2A}	CD56 Alexa Fluor	CD3 PE		
3	KIR ^{NKG2A}	CD158a FITC	NKG2a PE		
4	KIR ^{NKG2A}	NKAT2 FITC	NKB1 PE		
5	KIR2DL1	Solo			
6	KIR2DL1	CD56 Alexa Fluor	CD3 PE		
7	KIR2DL1	CD158a FITC	NKG2a PE		
8	KIR2DL1	NKAT2 FITC	NKB1 PE		
9	KIR2DL2/3	Solo			
10	KIR2DL2/3	CD56 Alexa Fluor	CD3 PE		
11	KIR2DL2/3	CD158a FITC	NKG2a PE		
12	KIR2DL2/3	NKAT2 FITC	NKB1 PE		
13	KIR ^{NKG2A}			CD107a Cy5	Solo
14	KIR ^{NKG2A}			CD107a Cy5	K562
15	KIR ^{NKG2A}			CD107a Cy5	K562 CW0505
16	KIR ^{NKG2A}			CD107a Cy5	K562 CW0303
17	KIR ^{NKG2A}			CD107a Cy5	K562 B708
18	KIR ^{NKG2A}			CD107a Cy5	K562 B4405
19	KIR ^{NKG2A}			CD107a Cy5	B-LCL
20	KIR2DL1	CD158a FITC		CD107a Cy5	Solo
21	KIR2DL1	CD158a FITC		CD107a Cy5	K562
22	KIR2DL1	CD158a FITC		CD107a Cy5	K562 CW0505
23	KIR2DL1	CD158a FITC		CD107a Cy5	K562 CW0303
24	KIR2DL1	CD158a FITC		CD107a Cy5	K562 B708
25	KIR2DL1	CD158a FITC		CD107a Cy5	K562 B4405
26	KIR2DL1	CD158a FITC		CD107a Cy5	B-LCL
27	KIR2DL2/3	NKAT2 FITC		CD107a Cy5	Solo
28	KIR2DL2/3	NKAT2 FITC		CD107a Cy5	K562
29	KIR2DL2/3	NKAT2 FITC		CD107a Cy5	K562 CW0505
30	KIR2DL2/3	NKAT2 FITC		CD107a Cy5	K562 CW0303
31	KIR2DL2/3	NKAT2 FITC		CD107a Cy5	K562 B708
32	KIR2DL2/3	NKAT2 FITC		CD107a Cy5	K562 B4405
33	KIR2DL2/3	NKAT2 FITC		CD107a Cy5	B-LCL

Tabelle 5: Pipettierschema der CD107a-Analyse der drei verschiedenen NK-Zell-Fraktionen mit den oben angegebenen Zielzellen (FACS-Röhrchen 13-33). Zusätzlich wurde eine Immunophänotyp-Kontrolle der NK-Zellen durchgeführt (FACS-Röhrchen 1-12).

Nach der Inkubation mit CD107a wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Ergänzend wurde eine Immuno-Phänotypisierung der NK-Zellen der CD107a-Assays und der Zielzellen separat durchgeführt (siehe Tabelle 6). Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit dem FACS-Gerät analysiert. Die Auswertung erfolgte mit WinMDI 2.8. Die Ergebnisse aus den ersten 12 FACS-Röhrchen dienten zur Analyse des Immunophänotyps der eingesetzten NK-Zellen. Nach Markierung der NK-Zellpopulation wurde zur Unterscheidung der mit unterschiedlichen Fluoreszenzen gekoppelten NK-Zellen ein Quadrant in das Punktwolkendiagramm gelegt. So konnte festgestellt werden, ob die richtigen Mono-KIR-Fraktionen aufgereinigt wurden und mit welchem Reinheitsgrad. Mit den Messergebnissen der restlichen FACS-Röhrchen wurden anschließend die eigentliche Versuchsauswertung durchgeführt. Dazu wurden nach erneuter Selektion der NK-Zellpopulation Histogramme erstellt, welche die Intensität des mit Fluoreszenz-3 registrierten Antikörpers CD107a-Cy5 gegenüber den gemessenen Ereignissen darstellten. Anschließend wurde ein Marker zur Abgrenzung des negativen von dem positiven Maximum eingesetzt. So konnte die Degranulation gegenüber den verschiedenen Zielzellen erfasst werden.

1	BLCL JH	solo
2	BLCL JH	W632
3	BLCL JH	MIC A/B PE
4	BLCL JH	Anti PRR2
5	K562 0303	solo
6	K562 0303	W632
7	K562 0303	MIC A/B PE
8	K562 0303	Anti PRR2
9	K562 0505	solo
10	K562 0505	W632
11	K562 0505	MIC A/B PE
12	K562 0505	Anti PRR2
13	K562 B708	solo
14	K562 B708	W632
15	K562 B708	MIC A/B PE
16	K562 B708	Anti PRR2
17	K562 B4405	solo
18	K562 B4405	W632
19	K562 B4405	MIC A/B PE
20	K562 B4405	Anti PRR2
21	K562	solo
22	K562	W632
23	K562	MIC A/B PE
24	K562	Anti PRR2

Tabelle 6: Pipettierschema der Immunophänotyp-Kontrolle im Versuch eingesetzter Zielzellen

3 Ergebnisse

3.1 Reinheitsgrad und Oberflächenmarker der eingesetzten Zielzellen und NK-Zellen

3.1.1 Zielzellen: Expression von relevanten Zelloberflächenmarkern

Um die Vergleichbarkeit der einzelnen Versuche zu gewährleisten, wurde bei jedem Versuch die Expression von für die NK-Zell-Aktivität relevanten Oberflächenmerkmalen auf den Zielzellen durchflusszytometrisch bestimmt. Untersucht wurden Liganden zu inhibitorischen und aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren.

HLA-Klasse-I-Expression und Expressionsdichte

Die Höhe der HLA-Expression war sowohl bei den transfizierten K562 als auch bei den verwendeten B-LCL über die gesamte Versuchsreihe konstant hoch. In den Versuchen waren durchschnittlich 88,44% (Standardabweichung (SD) 12,95, Minimum 74,52%, Maximum 97,59%) der transfizierten K562 und der B-LCL HLA-I-positiv. Dabei waren in sechs Versuchen die B-LCL im Mittel zu 99,99% HLA-I-positiv (SD 0,02), die K562 Cw0303 zu 94,33% (SD 5,84), die K562 Cw0505 zu 74,26% (SD 22,31), die K562 B0708 zu 96,23% (SD 5,05) und die K562 B4405 zu 94,96% (SD 5,23) HLA-I-positiv. Die Expressionsdichte der HLA-I-positiven Zelllinien zeigte einen großen Unterschied zwischen transfizierten K562 und den verwendeten B-LCL. Unter gleichen Bedingungen bei gleicher Konzentration der eingesetzten Antikörper, Zellen und Suspensionslösung betrug die mittlere Fluoreszenzintensität der B-LCL mit dem eingesetzten Antikörper W6-32-PE gegen pan-HLA-I im Durchschnitt 7724,95 (SD 1052,02), in simultan durchgeführten Tests bei den anderen Zielzellen mit HLA-Expression im Mittel 576,95 (SD 309,6). Die HLA-I-negativen K562 zeigten eine Fluoreszenzintensität, die im Bereich der Isotypkontrollen lag (Abbildung 6, Tabelle 7).

Zielzelle	B-LCL	K562 Cw0303	K562 Cw0505	K562 B0708	K562 B4405	K562
Mittelwert	7724,95	611,5	130,15	812,73	753,43	31,55
SD	1052,02	120,98	0,02	30,44	169,9	4,3

Tabelle 7: Durchschnitt der mittleren Fluoreszenzintensität mit Standardabweichung (SD) der eingesetzten Zielzellen in 6 Versuchen. Höchste Expression bei B-LCL, niedrigste bei HLA-I-negativen K562

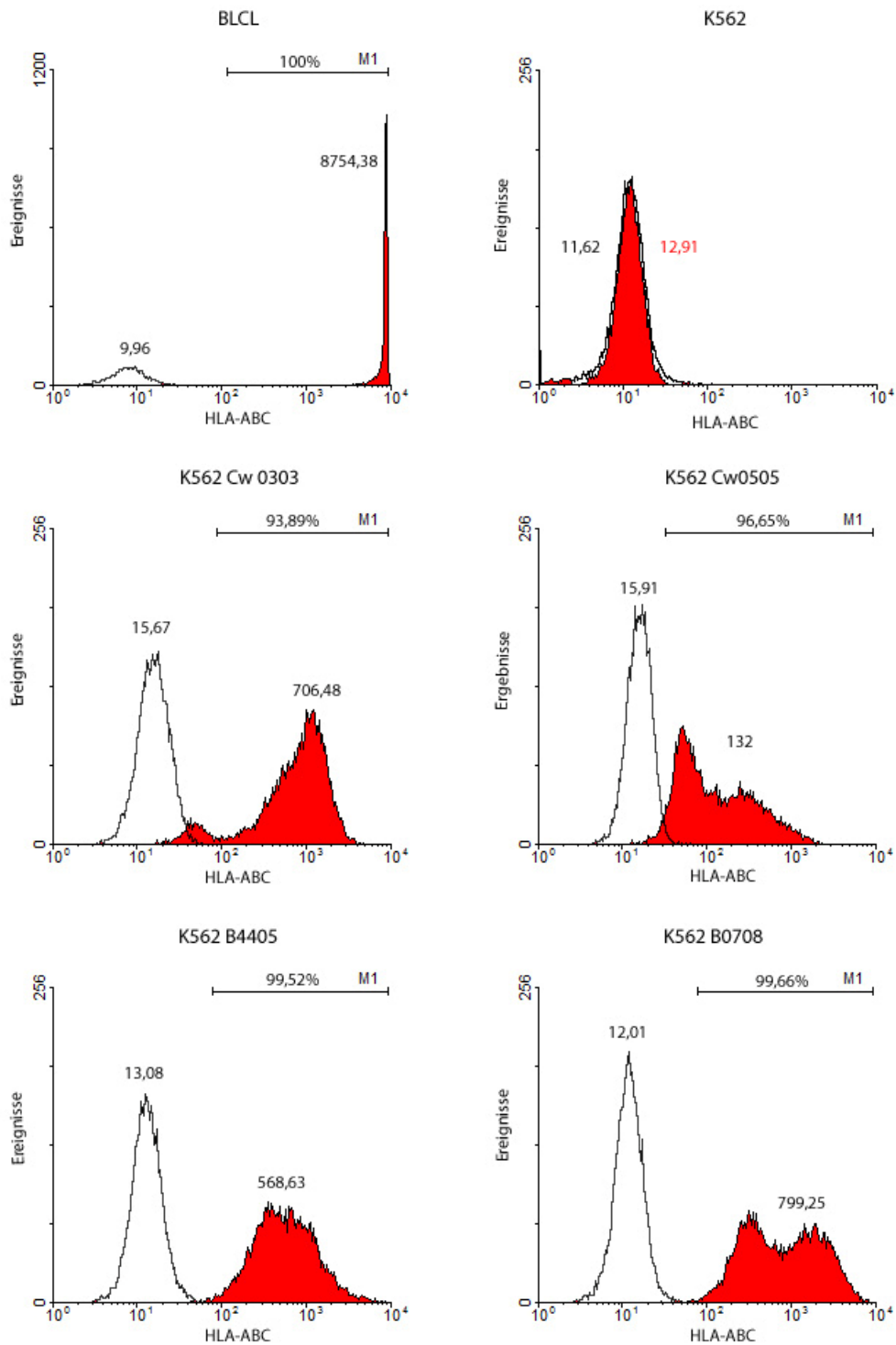


Abbildung 6: HLA-ABC-Expressionsdichte aller eingesetzten Zielzellen im Vergleich. . Die y-Achse zeigt die Anzahl der gemessenen Ereignisse an, die x-Achse stellt die Fluoreszenzintensität von W6-32-PE (HLA-ABC) dar. Die roten Histogramme geben die Fluoreszenzintensität der antikörpermarkierten Zielzellen an, die weißen Diagramme entsprechen der Isotypkontrolle. Die Zahlen über den Histogrammen bezeichnen die mittlere Fluoreszenzintensität des jeweiligen Histogramms. Der Marker M1 zeigt an, wie viel Prozent der Zielzellen HLA-ABC-positiv sind. Gemessen wurden 20.000 Ereignisse (Zellen) je Zellsorte.

MIC-A/B-Expression

Die MIC-A/B-Expressionsdichte aller Zielzellen, angegeben in der mittleren Fluoreszenzdichte, betrug 55,09 (SD 37,56). Alle verwendeten Zielzellen waren insgesamt homogen positiv (Abbildung 7, Tabelle 8).

Zielzelle	B-LCL	K562 Cw0303	K562 Cw0505	K562 B0708	K562 B4405	K562	gesamt
Mittelwert	26,18	47,13	34,01	128,5	57,46	37,28	55,09
SD	10,44	16,42	14,31	38,79	10,32	7,86	37,56

Tabelle 8: Durchschnitt der mittleren Fluoreszenzintensität und SD der MIC-A/B-Expression der eingesetzten Zielzellen in 6 Versuchen. Maximum bei K562 B0708, Minimum bei B-LCL.

PRR2-Expression

Die PRR2-Expression war auf allen Zelllinien sowohl innerhalb der einzelnen Versuche wie auch im Vergleich aller unabhängig voneinander durchgeführten Experimente konstant. Im Mittel lag die Expressionsdichte von PRR2, gemessen in der mittleren Fluoreszenzintensität, bei 114,02 (SD 45,38). Etwas unter dem Durchschnitt lagen die B-LCL (47,84, SD 23,68). Bei den anderen Zielzellen war die Expressionsdichte homogen (Abbildung 8, Tabelle 9).

Zielzelle	B-LCL	K562 Cw0303	K562 Cw0505	K562 B0708	K562 B4405	K562
Mittelwert	47,84	86,27	114,53	108,05	173,02	154,39
SD	23,68	37,98	63,14	51,67	75,37	0

Tabelle 9: Durchschnitt der mittleren Fluoreszenzintensität und SD der PRR2-Expression der eingesetzten Zielzellen in 6 Versuchen.

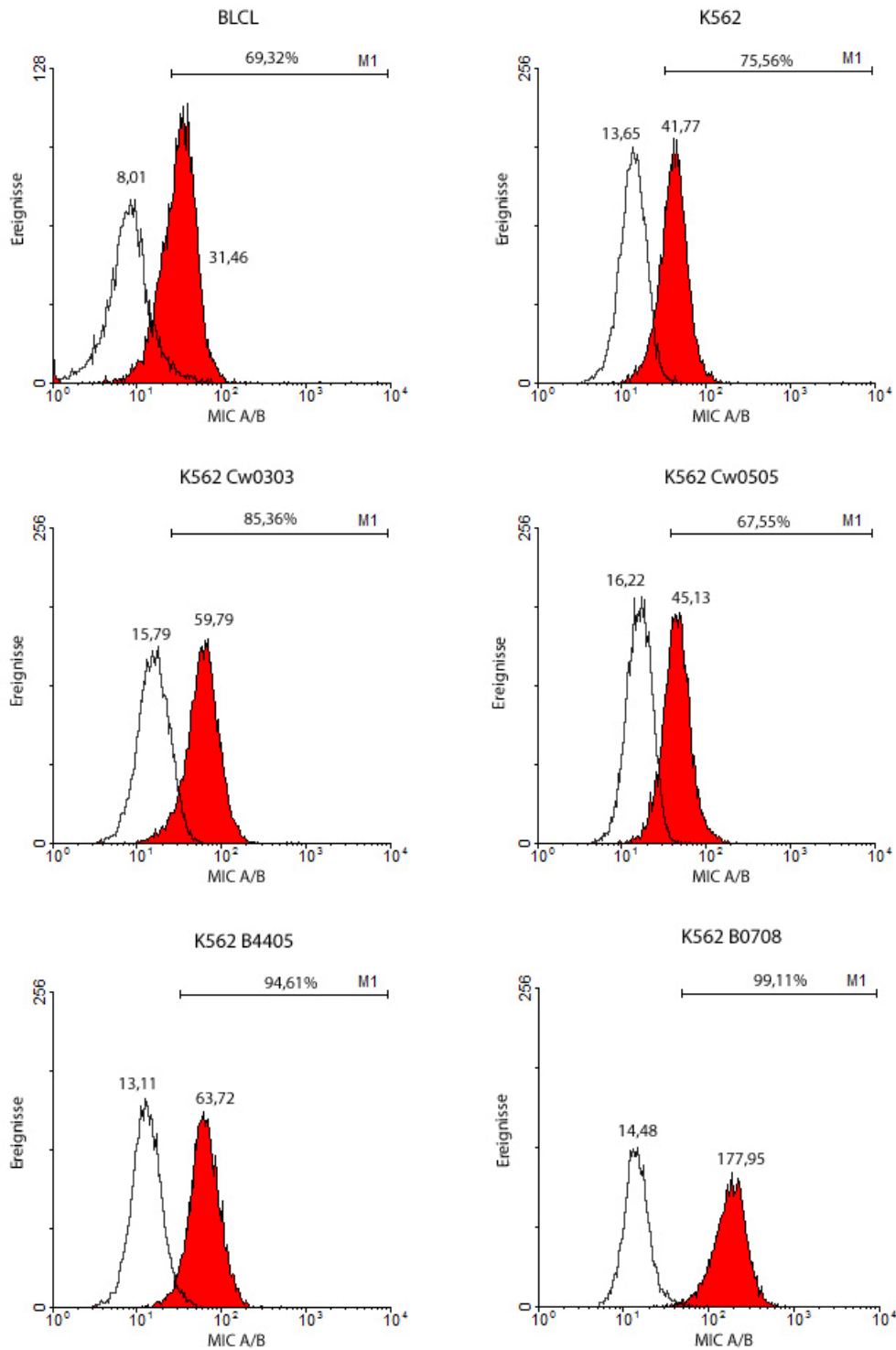


Abbildung 7: MIC-A/B-Expressionsdichte aller eingesetzten Zielzellen im Vergleich. Die y-Achse zeigt die Anzahl der gemessenen Ereignisse an, die x-Achse stellt die Fluoreszenzintensität von MIC-A/B-PE dar. Die roten Histogramme geben die Fluoreszenzintensität der antikörpermarkierten Zielzellen an, die weißen Diagramme entsprechen der Isotypkontrolle. Die Zahlen über den Histogrammen bezeichnen die mittlere Fluoreszenzintensität des jeweiligen Histogramms. Der Marker M1 zeigt an, wie viel Prozent der Zielzellen HLA-ABC-positiv sind. Gemessen wurden 20.000 Ereignisse (Zellen) je Zellsorte.

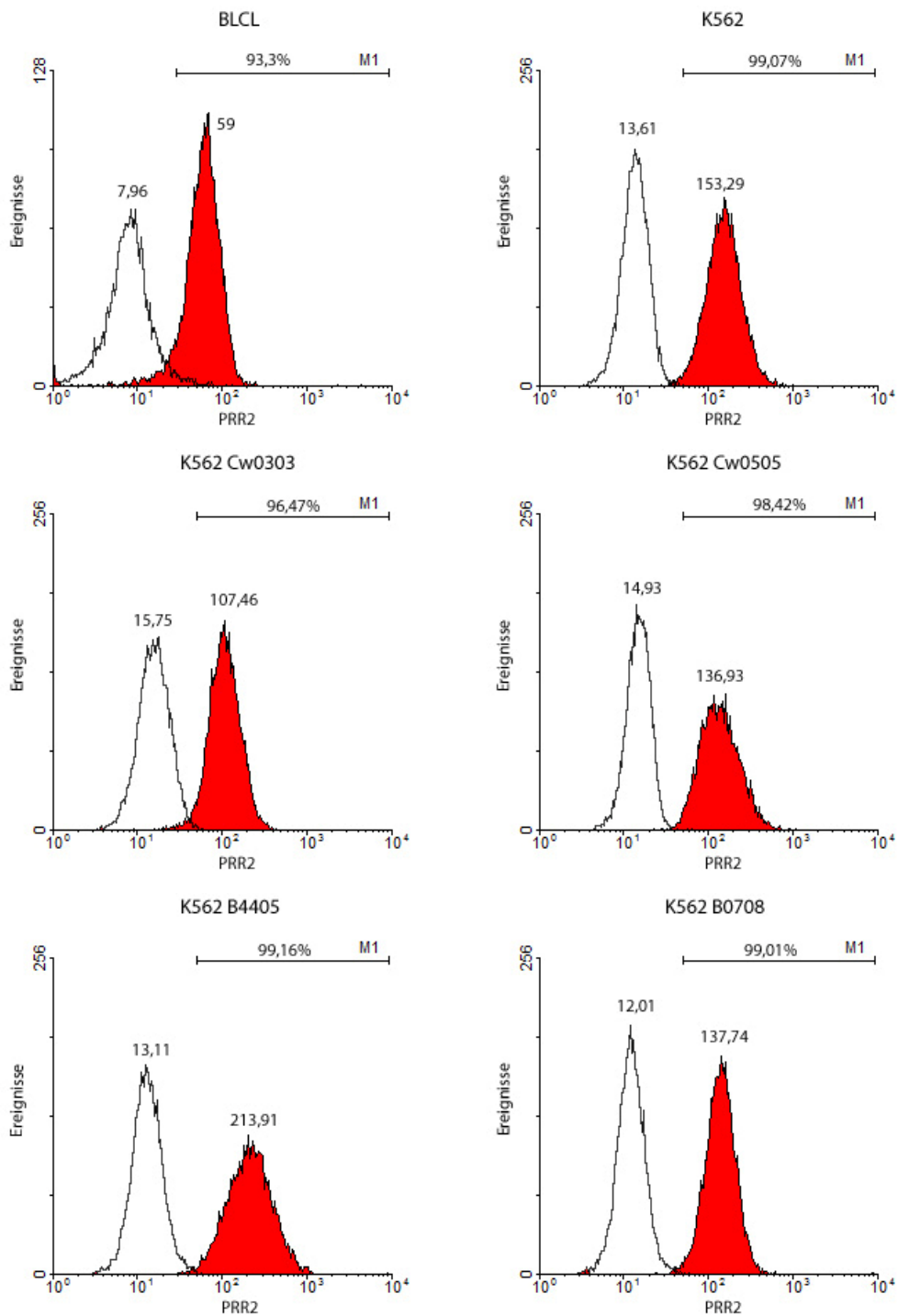


Abbildung 8: PRR2-Expressionsdichte aller eingesetzten Zielzellen im Vergleich. Die y-Achse zeigt die Anzahl der gemessenen Ereignisse an, die x-Achse stellt die Fluoreszenzintensität von PRR2-PE dar. Die roten Histogramme geben die Fluoreszenzintensität der antikörpermarkierten Zielzellen an, die weißen Diagramme entsprechen der Isotypkontrolle. Die Zahlen über den Histogrammen bezeichnen die mittlere Fluoreszenzintensität des jeweiligen Histogramms. Der Marker M1 zeigt an, wie viel Prozent der Zielzellen HLA-ABC-positiv sind. Gemessen wurden 20.000 Ereignisse (Zellen) je Zellsorte.

3.1.2 NK-Zellen: Reinheitsgrad der Aufreinigung

Bei jedem Versuch wurde parallel der Reinheitsgrad der NK-Zellen nach Aufreinigung durchflusszytometrisch überprüft. Bestimmt wurden der Anteil der NK-Zellen ($CD56^+CD3^-$; $+$ = positiv, $-$ = negativ), der T-Zellen ($CD3^+CD56^-$), der $CD56^+CD3^+$ NKT-Zellen (NK- und T-Zellen) und der $CD56^-CD3^-$ Zellen (siehe Abbildung 9). Im Mittel waren 97,63% der gemessenen Zellen $CD56^+CD3^-$ (mindestens 95,08%, maximal 99,24%, SD 1,79). Doppelt positiv waren im Mittel 0,44%, während $CD56^-CD3^+$ Zellen in keinem der Versuche auftraten. Doppelt negativ waren im Durchschnitt 1,93% der eingesetzten Zellen.

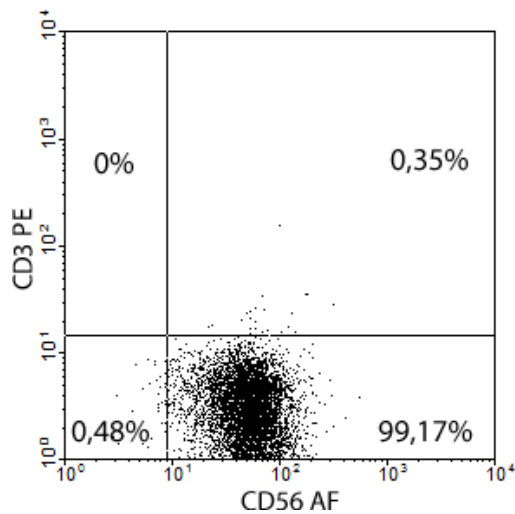


Abbildung 9: Reinheitsgrad der NK-Zellen: Fluoreszenz 1 (x-Achse): CD56-AlexaFluor 488, Fluoreszenz 2 (y-Achse): CD3-PE. Die Zahlen zeigen den Prozentsatz der in den jeweiligen Quadranten gezählten Ereignisse. Gezeigt sind exemplarisch die Daten einer Aufreinigung von Donor 2.

Unfraktionierte Gesamtmenge der NK-Zellen

Um die einzelnen Subfraktionen von NK-Zellen besser charakterisieren zu können, wurden getrennt zwei unterschiedliche Mono-KIR-Fraktionen und die KIR^+NKG2A^- -Fraktion parallel aufgereinigt.

Da bei allen Donoren KIR^+NKG2A^- NK-Zellen in den KIR-Repertoiren nachzuweisen waren, die sich immunomagnetisch nicht durch Antikörpermarkierung separieren ließen, waren die $KIR2DL1^-$ und die $KIR2DL2/3^-$ -Fraktion mit KIR^+NKG2A^- NK-Zellen kontaminiert (siehe Abbildung 10). Eine immunomagnetische Antikörpermarkierung zur Separation der Kulturen hätte zu einer Aktivierung bzw. Blockade des entsprechenden KIR geführt und auf diese Weise die funktionellen Untersuchungen verfälscht. Die Co-Kulturen wurden deshalb erst nach den funktionellen Tests durch fluoreszenzgekoppelte Antikörper (FITC) gegen die untersuchten KIR ($KIR2DL1$ und $KIR2DL2/3$) markiert und damit unterscheidbar gemacht (siehe Abbildung 11).

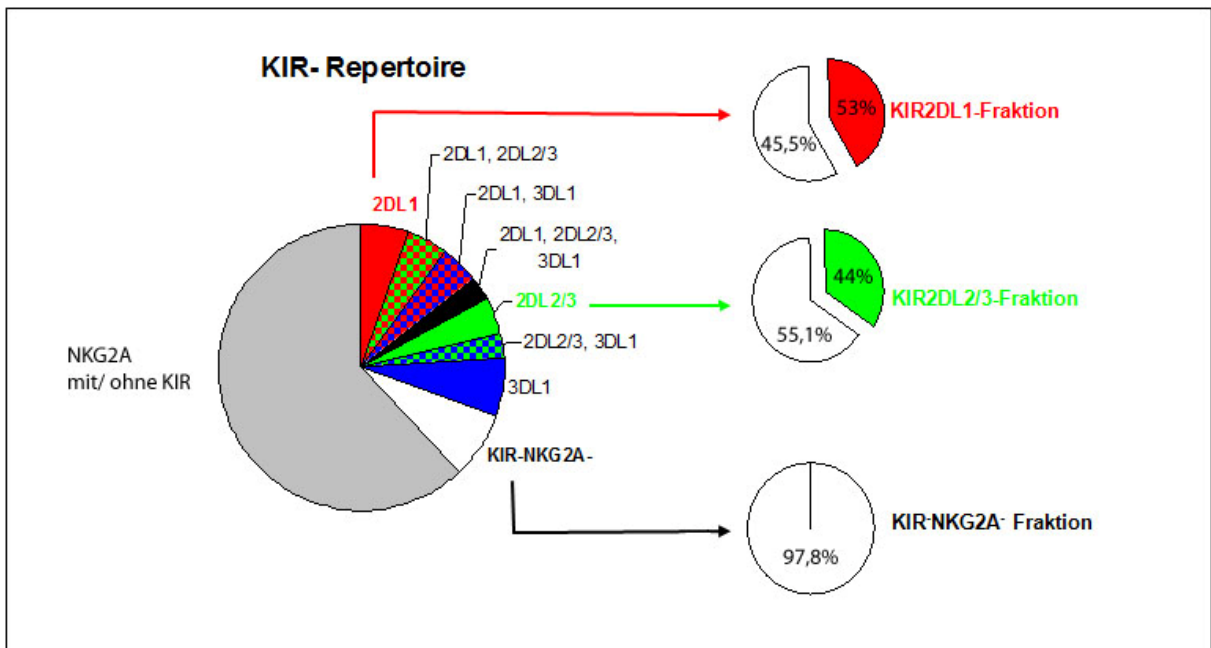


Abbildung 10: KIR-Repertoire und Mono-KIR-Fraktionen; linkes Kreisdiagramm: KIR-Repertoire von Donor 1 mit Darstellung aller NK-Zellen mit Expression von einem, zwei, drei KIR oder ohne inhibitorischen Rezeptor (KIR⁻NKG2A⁻ NK-Zellen). Alle NK-Zellen, die entweder nur NKG2A oder NKG2A und 1, 2 oder 3 KIR exprimieren, sind unter NKG2A zusammengefasst worden. Rechte Kreisdiagramme: Aus dem KIR-Repertoire isolierte Mono-KIR-Fraktionen. Die KIR-exprimierenden Fraktionen enthalten KIR⁻NKG2A⁻ NK-Zellen, welche bei fehlendem spezifischen Marker nicht depletiert werden können.

KIR⁻NKG2A⁻: Die KIR⁻NKG2A⁻-Fraktionen waren bei den sechs Versuchen im Mittel zu 97,76% (Minimum: 95,22%, SD 1,37) CD56⁺CD3⁻ und KIR⁻NKG2A⁻ NK-Zellen.

KIR2DL1: Insgesamt 98,49% (Minimum: 97,63%, SD 0,73) gehörten durchschnittlich zu der aufgereinigten Co-Kultur (KIR2DL1 oder KIR⁻NKG2A⁻). Im Mittel waren 53% (SD 2,19) KIR2DL1 positiv und 45,48% (SD 1,76) KIR⁻NKG2A⁻ NK-Zellen.

KIR2DL2/3: Im Mittel waren 44,09% (SD 13,63) KIR2DL2/3 positiv und 55,14% (SD 13,16) KIR⁻NKG2A⁻ NK-Zellen. Insgesamt waren durchschnittlich 99,23% (Minimum: 98,41%, SD 0,62) der aufgereinigten NK-Zellen KIR2DL2/3 positiv oder KIR⁻NKG2A⁻.

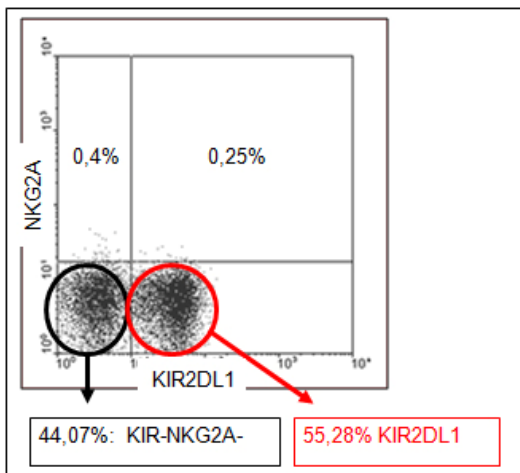
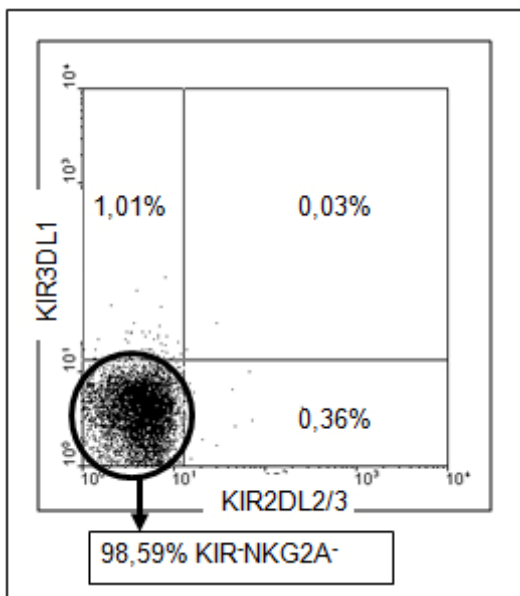
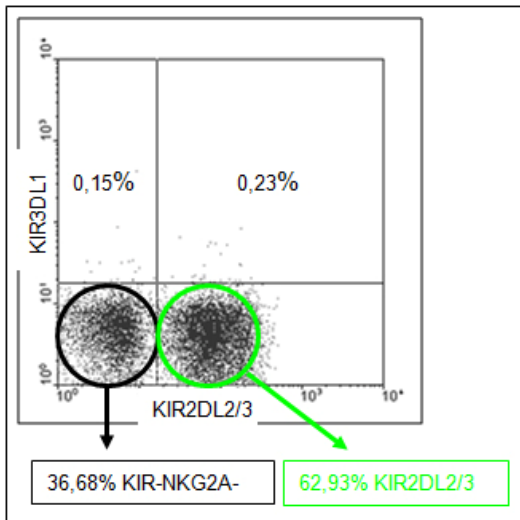


Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse der aufgereinigten NK-Zellen: Dargestellt sind Punktwolkendiagramme der einzelnen Fraktionen. Fraktion 1 enthält nur KIR⁻NKG2A⁻ NK-Zellen (mitte). Alle bekannten inhibitorischen Rezeptoren wurden immunomagnetisch depletiert. Fraktion 2 enthält KIR⁻NKG2A⁻ und KIR2DL1-positive (rot) NK-Zellen (unten). Darstellung von KIR2DL1 durch CD158a-FITC-Antikörper. Fraktion 3 enthält KIR⁻NKG2A⁻ und KIR2DL2/3-positive (grün) NK-Zellen (oben). Darstellung von KIR2DL2/3 durch NKAT2-FITC-Antikörpermarkierung. Andere KIR werden von den einzelnen Fraktionen nicht exprimiert. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der Ereignisse in den jeweiligen Quadranten an. Gemessen wurden 50.000 Ereignisse pro Ansatz.

3.2 Nachweis von KIR^{NKG2A} NK-Zellen und potentiell autoreaktiven KIR-positiven NK-Zellen

3.2.1 KIR^{NKG2A} NK-Zellen

Bei der phänotypischen KIR-Typisierung waren bei allen sechs Donoren KIR^{NKG2A} NK-Zellen nachzuweisen. Der Anteil an dem Gesamtrepertoire variierte von 7,53% bis 37%. Im Mittel waren 19,87% der phänotypisierten NK-Zellen bei den sechs Donoren ohne relevanten inhibitorischen Rezeptor. Die Repertoires wurden bei einigen Donoren im Verlauf eines Jahres mehrmals überprüft. Es traten keine Veränderungen auf, die Expression war über die gesamte Dauer der Versuchsreihe stabil.

3.2.2 Potentiell autoreaktive KIR-positive NK-Zellen

Um die Existenz potentiell autoreaktiver NK-Zellen nachzuweisen, wurde das KIR-Repertoire mit dem HLA-Typ jedes einzelnen Donors verglichen. Tabelle 10 zeigt das phänotypische KIR-Repertoire der sechs Donoren mit den möglichen Liganden. Alle Donoren außer Donor 1 und Donor 5 exprimieren die drei untersuchten inhibitorischen KIR, Donor 1 und Donor 5 exprimieren kein KIR3DL1.

	Donor	1	2	3	4	5	6	KIR-Liganden
inhibitorische KIR	2DL1	+	+	+	+	+	+	HLA-C2,4,5,6
	2DL2/3	+	+	+	+	+	+	HLA-C1,3,7,8
	3DL1	-	+	+	+	-	+	HLA-Bw4

Tabelle 10: KIR-Repertoire und KIR-Liganden: Phänotypisierung relevanter inhibitorischer KIR bei allen 6 Donoren

Tabelle 11 zeigt die HLA-Typen derselben sechs untersuchten Donoren. Die Donoren 1-3 haben sowohl einen entsprechenden Liganden für KIR2DL1 wie auch für KIR2DL2/3. Die Donoren 4-6 jedoch haben zwar einen entsprechenden Liganden für KIR2DL2/3, aber keinen für KIR2DL1, obwohl sie NK-Zellen in ihrem Repertoire besitzen, welche KIR2DL1 als einzigen inhibitorischen Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren.

Es liegt ein Missverhältnis zwischen exprimierten KIR und entsprechenden Liganden vor (siehe Tabelle 12). So können die Donoren in 2 Gruppen eingeteilt werden: Gruppe A (Donoren 1-3) hat für jeden exprimierten inhibitorischen KIR einen passenden HLA-Liganden auf ihren Körperzellen, während Gruppe B (Donoren 4-6) zwar KIR2DL1 exprimiert, aber keinen passenden inhibitorischen HLA-Liganden auf ihren Körperzellen trägt.

Donor	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DR	HLA-DQ
1	1	8, 62	w4, w7	15, 7	1, 9
2	3, 32	7, 44	w5, w7	4, 13	6, 8
3	1	37, 62	w3, w6		
4	1, 3	8, 49	w7	3, 11	
5	1, 2	14, 62	w3	1, 7	1, 2
6	2, 26	7, 55	w3, w7	11, 13	6, 7

Tabelle 11: HLA-Typisierung: Übersicht der HLA-Typisierung der 6 Donoren

		inhibitorischer KIR	
Donor	Nr.	KIR2DL1	KIR2DL2/3
Gruppe A	1	HLA-Cw04	HLA-Cw07
	2	HLA-Cw05	HLA-Cw07
	3	HLA-Cw06	HLA-Cw03
Gruppe B	4	-	HLA-Cw07
	5	-	HLA-Cw03
	6	-	HLA-Cw03, 07

Tabelle 12: Missverhältnis KIR/ KIR-Ligand: Konstellation der KIR mit den entsprechenden HLA-I-Liganden in den verwendeten Donoren

3.3 Charakterisierung der KIR-Funktion

3.3.1 KIR/ KIR-Liganden-Interaktion bei Zielzellen mit passendem Liganden oder fehlendem HLA

Zunächst wurde die Aktivität der aufgereinigten Mono-KIR-Fraktionen von Gruppe A gegenüber Zielzellen untersucht, die entweder keine HLA-Expression zeigen (K562) oder den passenden HLA-Liganden exprimieren. So konnte die normale Interaktion der KIR mit ihren entsprechenden Liganden untersucht werden.

Die Aktivitätsanalyse mittels durchflusszytometrischem CD107a-Assay zeigt die größte Aktivität der KIR2DL1-Fraktion und der KIR2DL2/3-Fraktion gegen HLA-negative K562. Bei der Bestimmung dieser Aktivität wurden nur KIR-positive NK-Zellen analysiert. Eine signifikant geringere Aktivität bzw. deutliche Hemmung der NK-Zellen zeigt sich bei der Interaktion mit dem jeweiligen korrespondierenden K562-Transfektanten (Abbildung 12, Tabelle 13 u. 14). Die stärkste Hemmung der Aktivität wird durch die B-LCL-Zelllinie bewirkt, welche sowohl beide eingesetzten KIR-Liganden wie auch HLA in höherer Dichte als die K562 Cw0505 und K562 Cw0303 exprimiert.

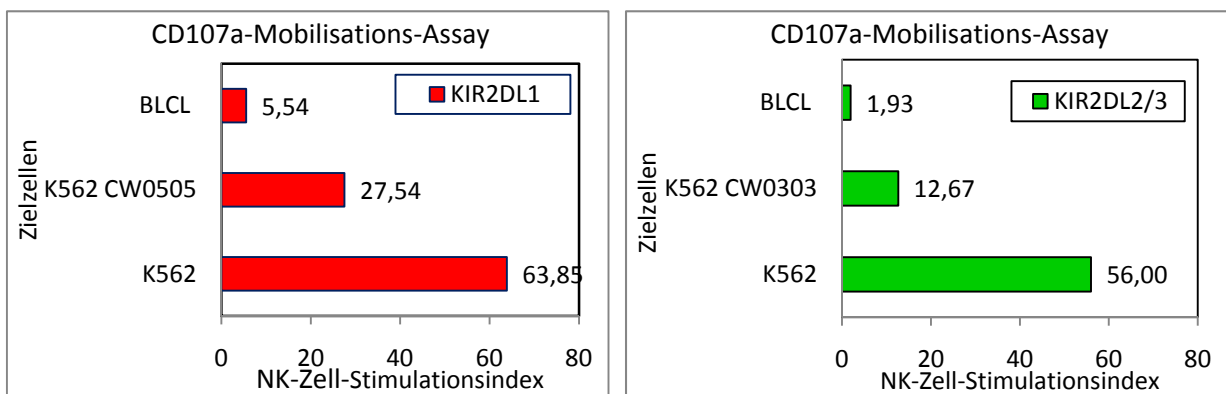


Abbildung 12: „Normale“ KIR/KIR-Liganden-Interaktion: CD107a-Mobilisations-Assay mit Darstellung der NK-Zell-Stimulationsindices bei Stimulation mit den angezeigten Zielzellen; Maximalaktivität der KIR2DL1-Fraktion (rot) und der KIR2DL2/3-Fraktion (grün) gegen HLA-negative K562, signifikante Hemmung durch K562-Transfektanten mit passendem KIR-Liganden, starke Hemmung durch B-LCL mit natürlicher Expression von beiden eingesetzten inhibitorischen KIR-Liganden; repräsentative Daten von Donor 3 aus Gruppe A, zweimal reproduziert.

Gruppe A	Zielzellen:	K562	K562 Cw0505	B-LCL
KIR2DL1	Mittelwert	67,55	37,21	16,19
	SD	6,06	8,39	21,71
p (T-Test)	K562 vs K562 Cw0505		0,020	-
	K562 vs BLCL		-	0,073

Tabelle 13: Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen (SD), Angabe der T-Tests (gepaart, zweiseitig) der durchgeführten CD107a-Mobilisations-Assays von der KIR2DL1-Fraktion der Gruppe A bei Stimulation mit den Zielzellen K562, K562 Cw0505 und B-LCL. Die Mittelwerte sind als NK-Zell-Stimulationsindices aufgeführt.

Gruppe A + B	Zielzellen:	K562	K562 Cw0303	B-LCL
KIR2DL2/3	Mittelwert	45,10	23,96	11,34
	SD	28,32	26,62	18,93
p (T-Test)	K562 vs K562 Cw0303		0,006	-
	K562 vs BLCL		-	0,009

Tabelle 14: Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen (SD), Angabe der T-Tests (gepaart, zweiseitig) der durchgeführten CD107a-Mobilisations-Assays von der KIR2DL2/3-Fraktion der Gruppe A und B bei Stimulation mit den Zielzellen K562, K562 Cw0303 und B-LCL. Die Mittelwerte sind als NK-Zell-Stimulationsindices aufgeführt.

3.3.2 Hyporeaktivität der KIR⁻NKG2A⁻ und der KIR-positiven NK-Zellen ohne korrespondierenden Liganden im Donor

Hyporeaktivität der KIR⁻NKG2A⁻ NK-Zellen

Es wurden KIR-positive NK-Zellen aus der KIR2DL1-Fraktion von Donoren der Gruppe A mit NK-Zellen der entsprechenden KIR⁻NKG2A⁻-Fraktion des jeweils selben Donors verglichen. Die NK-Zellen wurden mit den angegebenen Zielzellen stimuliert. Bei der KIR⁻NKG2A⁻-Fraktion ist eine signifikant geringere Aktivität gegenüber den Zielzellen als bei der KIR2DL1-Fraktion zu beobachten (siehe Abbildung 13, Tabelle 15). Jedoch ist die Fraktion nicht komplett inaktiv, sondern zeigt eine signifikante Aktivität gegenüber HLA-negativen Zielzellen. KIR⁻NKG2A⁻ NK-Zellen sind im Vergleich zu KIR-tragenden NK-Zellen hyporeaktiv. Diese Aktivitätsunterschiede konnten auch bei dem Vergleich von KIR-positiven NK-Zellen aus der KIR2DL2/3-Fraktion mit der entsprechenden KIR⁻NKG2A⁻-Fraktion festgestellt werden (Daten nicht abgebildet).

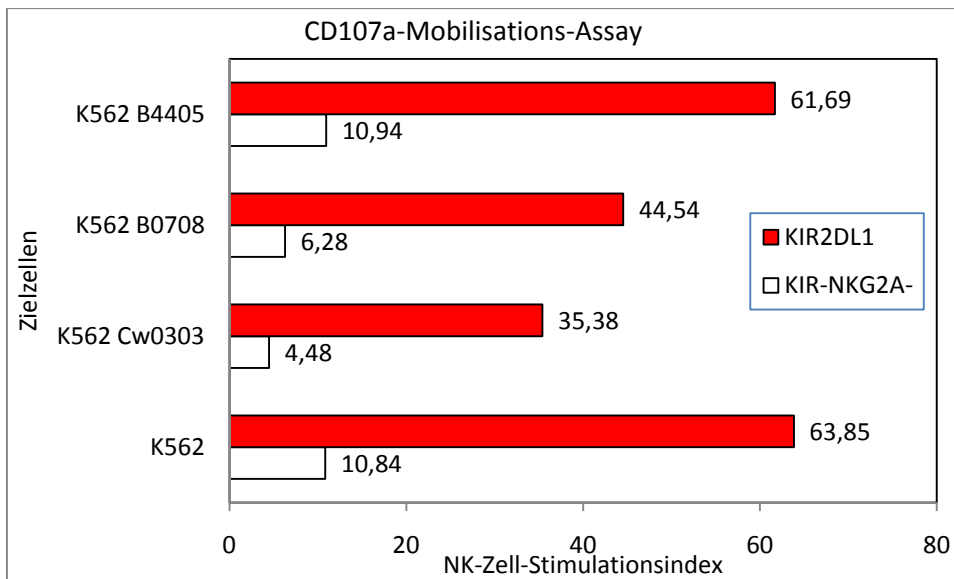


Abbildung 13: Nachweis der Hyporeaktivität KIR^{NKG2A}⁻ NK-Zellen: CD107a-Mobilisations-Assay mit Darstellung der NK-Zell-Stimulationsindices bei Stimulation mit den angezeigten Zielzellen; KIR^{NKG2A}⁻ NK-Zellen zeigen signifikant geringere Aktivität gegen alle Zielzellen als die KIR2DL1-Fraktion; repräsentative Daten von Donor 3 aus Gruppe A, zweimal reproduziert.

Gruppe A	Zielzellen:	K562	K562 Cw0303	K562 B0708	K562 B4405
KIR2DL1	Mittelwert	67,55	45,54	54,32	66,6
	SD	6,06	9,14	8,49	11,71
KIR-NKG2A-	Mittelwert	32,37	18,37	25,18	33,04
	SD	21,96	13,96	18,74	23,29
p (T-Test)		0,068	0,014	0,049	0,061

Tabelle 15: Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen (SD), Angabe der T-Tests (gepaart, zweiseitig) der durchgeführten CD107a-Mobilisations-Assays von der KIR2DL1- und der KIR^{NKG2A}⁻ Fraktion der Gruppe A bei Stimulation mit den angegebenen Zielzellen. Die Mittelwerte sind als NK-Zell-Stimulationsindices aufgeführt.

Dieser Effekt ist jedoch nicht bei Interaktion mit den Zielzellen B-LCL zu beobachten. Weiterhin ist kein signifikanter Aktivitätsunterschied der KIR^{NKG2A}⁻ NK-Zellen im Vergleich mit der KIR2DL1-Fraktion bei der Interaktion mit den Zielzellen K562 Cw0505 zu beobachten, welche den korrespondierenden Liganden von KIR2DL1 exprimieren. Dasselbe gilt beim Vergleich der KIR^{NKG2A}⁻ NK-Zellen mit der KIR2DL2/3-Fraktion bei den Zielzellen K562 Cw0303, welche den korrespondierenden Liganden von KIR2DL2/3 exprimieren.

Hyporeaktivität potentiell autoreaktiver NK-Zellen

Die NK-Zellen mit einer KIR/KIR-Liganden-Inkompatibilität sind gegenüber der KIR2DL2/3-Fraktion bei der Interaktion mit allen eingesetzten Zielzellen hyporeaktiv. So ist ihre Maximalaktivität sowohl gegenüber den HLA-negativen K562 wie auch den mit HLA Klasse-I transfizierten K562 signifikant niedriger. Trotz ihres irrelevanten Mono-KIR kommt es durch den, im Donor nicht vorhandenen, HLA-Liganden (Cw0505, Gruppe B) zu einer verminderten Aktivität, während die Aktivität von der KIR2DL2/3-Fraktion durch den irrelevanten Liganden Cw0505 geringer gehemmt wird. Auch gegenüber den nicht-passenden HLA-Liganden von K562 Cw0303 zeigt die inkompatible KIR2DL1-Fraktion eine signifikant geringere Aktivität als die KIR2DL2/3-Fraktion. Der Unterschied ist jedoch erwartungsgemäß geringer als bei den K562 Cw0505. Die geringste Aktivität zeigen alle NK-Zell-Fraktionen bei Stimulation mit der B-LCL-Zelllinie (siehe Abbildung 14, Tabelle 16).

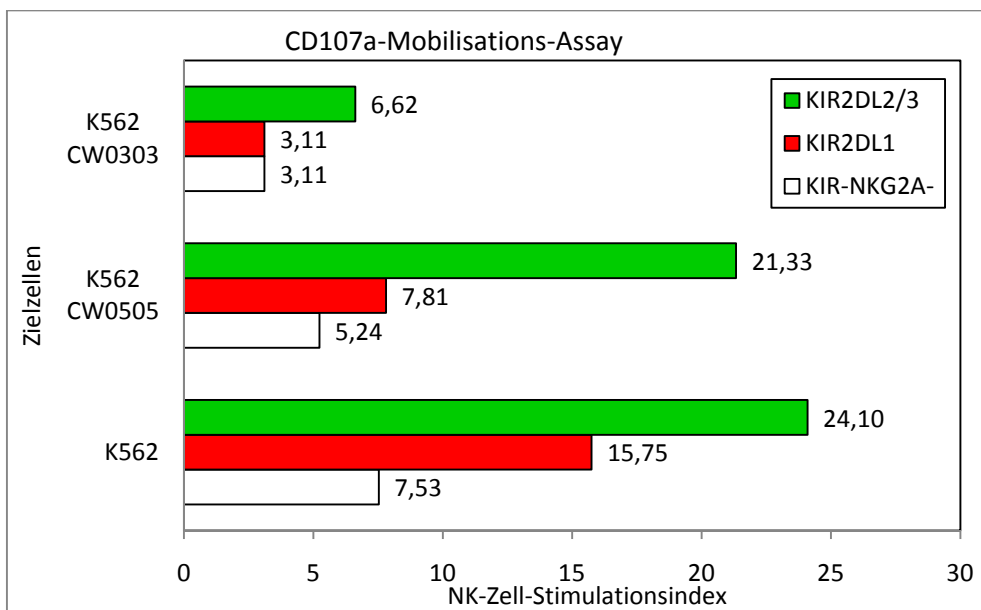


Abbildung 14: Nachweis der Hyporeaktivität potentiell autoreaktiver NK-Zellen: CD107a-Mobilisations-Assay mit Darstellung der NK-Zell-Stimulationsindices bei Stimulation mit den angezeigten Zielzellen; Mono-KIR NK-Zellen mit fehlendem KIR-Liganden im Donor zeigen signifikante Aktivität gegenüber Zielzellen, sind aber hyporeaktiv im Vergleich mit Mono-KIR NK-Zellen mit vorhandenem HLA-Liganden im Donor; Die Aktivität ist vergleichbar mit der der KIR^{NKG2A}-NK-Zellen; repräsentative Daten von Donor 4 der Gruppe B, zweimal reproduziert.

Gruppe B	Zielzellen:	K562	K562 Cw0303	K562 Cw0505	K562 B0708	K562 B4405	B-LCL
KIR2DL2/3	Mittelwert	20,52	5,35	13,54	15,24	25,6	2,92
	SD	3,67	1,13	7,19	6,57	10,04	1,37
KIR2DL1	Mittelwert	11,85	2,74	4,52	7,38	8,74	0,31
	SD	3,38	0,34	3,04	2,12	4,55	0,54
p (T-Test)		0,017	0,029	0,064	0,097	0,035	0,037

Tabelle 16: Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen (SD), Angabe der T-Tests (gepaart, zweiseitig) der durchgeführten CD107a-Mobilisations-Assays von der KIR2DL2/3- und der KIR2DL1-Fraktion der Gruppe B. Die Mittelwerte sind als NK-Zell-Stimulationsindices aufgeführt.

Um festzustellen, wie die KIR-positiven, potentiell autoreaktiven NK-Zellen aus den Donoren der Gruppe B sich verhalten, wurde die inkompatible KIR2DL1-Fraktion der Gruppe B mit der KIR2DL2/3-Fraktion derselben Donoren verglichen, bei welcher im Gegensatz zur KIR2DL1-Fraktion ein passender HLA-Ligand im Donor vorhanden ist. Weiterhin wurde die Aktivität der potentiell autoreaktiven Fraktion mit den KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen gemessen, um Unterschiede dieser beiden Gruppen zu analysieren. Vergleicht man die beiden hyporeaktiven Fraktionen KIR2DL1 (inkompatibel) und KIR⁺NKG2A⁻, zeigt sich ein ähnliches Verhalten gegenüber fast allen Zielzellen. Die Maximalaktivität gegenüber den HLA-negativen K562 ist ohne signifikante Unterschiede, aber immer deutlich geringer als die Maximalaktivität der kompatiblen KIR2DL2/3. Die geringste Aktivität von allen eingesetzten NK-Zellen findet sich bei der Interaktion mit den B-LCL.

3.3.3 Unspezifische Hemmung der NK-Zellen durch HLA-Klasse-I (HLA-C)

Im Weiteren wurde überprüft, ob auch inkompatible HLA-Liganden zur Hemmung der NK-Zell-Aktivität beitragen können. Wie oben gezeigt sind HLA-Klasse-I-Moleküle Liganden für inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren. Es wurde nun untersucht, ob HLA-Klasse-I-Moleküle NK-Zellen auch in ihrer Aktivität hemmen, wenn diese keinen bekannten korrespondierenden Rezeptor zu dem jeweiligen Liganden tragen. Die Daten werden in Form des NK-Zell-Stimulationsindex aufgeführt. Zunächst wurden die Mono-KIR-Fraktionen von Donoren der Gruppe A auf diese Frage hin untersucht. Die KIR2DL1-Fraktion wird, neben der Inhibition durch den passenden HLA-Liganden der Zelllinie K562 Cw0505, auch im geringeren, aber signifikanten Maße durch die Zelllinie K562 Cw0303 gehemmt, welche nur den korrespondierenden Liganden zu KIR2DL2/3 exprimiert.

Ebenfalls findet sich eine Inhibition durch die K562 B0708. Keine signifikante Inhibition konnte durch K562 B4405 beobachtet werden (siehe Abbildung 15a, Tabelle 18). Bei der KIR2DL2/3-Fraktion zeigt die Analyse ein fast identisches Bild. Hier ist die stärkste Hemmung erwartungsgemäß bei den K562 Cw0303 zu beobachten. Eine geringere, aber signifikante Inhibition zeigt auch die Stimulation mit K562 Cw0505. Auch die Stimulation mit K562 B0708 führt zu einer signifikanten Inhibition der KIR2DL2/3-Fraktion. Keine Inhibition konnte durch die K562 B4405 beobachtet werden (siehe Abbildung 15b, Tabelle 18).

Nun wurden die potentiell autoreaktiven NK-Zellen auf diese Eigenschaft hin untersucht. Weiterhin interessierte, ob auch KIR⁻NKG2A⁻ NK-Zellen trotz fehlendem KIR durch HLA-Klasse-I inhibiert werden können. Die Ergebnisse zeigen, dass die inkompatible KIR2DL1-Fraktion sich ähnlich der KIR2DL1-Fraktion der Gruppe A verhält, jedoch auf hyporeaktivem Funktionsniveau (Abbildung 15c, Tabelle 17).

Die KIR⁻NKG2A⁻ NK-Zellen werden signifikant durch HLA-I-exprimierende Zielzellen inhibiert, obwohl kein bekannter inhibitorischer HLA-Rezeptor auf diesen Zellen exprimiert wird. Das Bild entspricht dem der anderen untersuchten NK-Zellen nur auf einem geringeren Stimulationsniveau (Hyporeaktivität). Die stärkste Inhibition ist durch die B-LCL zu beobachten, gefolgt durch die K562 Cw0505 und K562 CW0303. Die K562 B0708 führen zu einer geringen, aber immer noch signifikanten, Inhibition der KIR⁻NKG2A⁻ NK-Zellen, während keine signifikante Inhibition durch K562 B4405 nachgewiesen werden kann (Abbildung 15d, Tabelle 18).

Zusammenfassend betrachtet, werden alle untersuchten NK-Zell-Fraktionen auch durch nicht passende HLA-Liganden gehemmt. Die stärkste Inhibition wird also durch die adäquaten HLA-Liganden bei vorhandenem KIR erreicht, eine geringere Inhibition findet durch nicht korrespondierende bzw. bei nicht vorhandenem KIR bei Liganden mit der Expression von HLA-C (K562 Cw0505 und K562 Cw0303) und HLA-B0708 (Bw6) statt. Keine Inhibition ist bei Zielzellen mit Expression von HLA-B4405 (Bw4) zu beobachten.

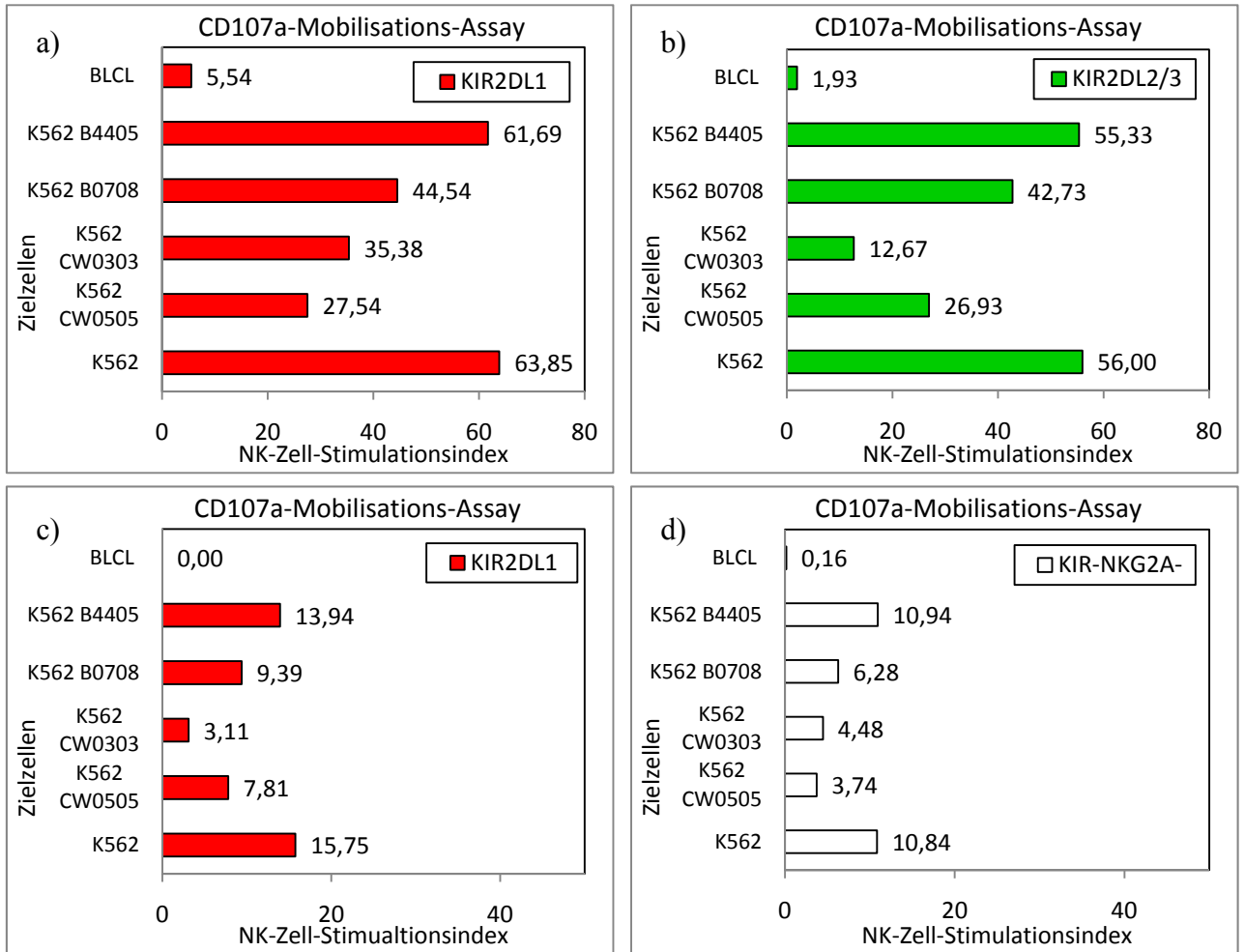


Abbildung 15: Unspezifische Hemmung der NK-Zellen durch HLA-I: CD107a-Mobilisations-Assay mit Darstellung der NK-Zell-Stimulationsindices bei Stimulation mit den angezeigten Zielzellen; Darstellung von vier verschiedenen NK-Zell Fraktionen: KIR2DL1-positive (Abb. 15a) bzw. KIR2DL2/3-positive (Abb. 15b) Fraktion mit korrespondierenden Liganden im Donor, 15c = KIR2DL1-positive Fraktion ohne korrespondierenden Liganden im Donor, 15d = KIR-NKG2A-Fraktion; repräsentative Daten von Donor 3 der Gruppe A (Abb. 14a,b,d) und Donor 5 der Gruppe B (Abb. 14c), jeweils zweimal reproduziert.

	NK-Zellen	KIR2DL1 Gruppe A	KIR2DL1 Gruppe B	KIR2DL2/3 Gruppe A+B	KIR-NKG2A- Gruppe A+B
Zielzellen	K562	67,55	11,85	45,1	21,55
	K562 Cw0505	-	-	31,25	10,81
	K562 Cw0303	45,54	2,74	-	10,59
	K562 B0708	54,32	7,38	39,05	16,61
p (T-Test) K562 versus	K562 Cw0505	-	-	0,017	0,024
	K562 Cw0303	0,025	0,036	-	0,009
	K562 B0708	0,082	0,065	0,064	0,028

Tabelle 17: Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen (SD), sowie Angabe der T-Tests (gepaart, zweiseitig) der durchgeführten CD107a-Mobilisations-Assays von den aufgeführten NK-Zell-Fraktionen. Die Mittelwerte sind als NK-Zell-Stimulationsindices aufgeführt.

3.3.4 Aktivität der KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen in Co-Kultur im Vergleich mit den Monokulturen

Die KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen lagen nach Aufreinigung in der Versuchsreihe in zwei verschiedenen Fraktionen vor. Einmal wurde eine Fraktion aufgereinigt, in der nur KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen mit einer durchschnittlichen Reinheit von 97,76% vorlagen. In den Fraktionen der KIR-positiven NK-Zellen waren jeweils auch KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur Depletion zu finden (Abbildung 11). Diese NK-Zellen waren in Co-Kultur mit Mono-KIR-NK-Zellen, die durch immunfluoreszenzmarkierte Antikörper voneinander unterschieden werden konnten. Die Daten werden in Form des NK-Zell-Stimulationsindex aufgeführt.

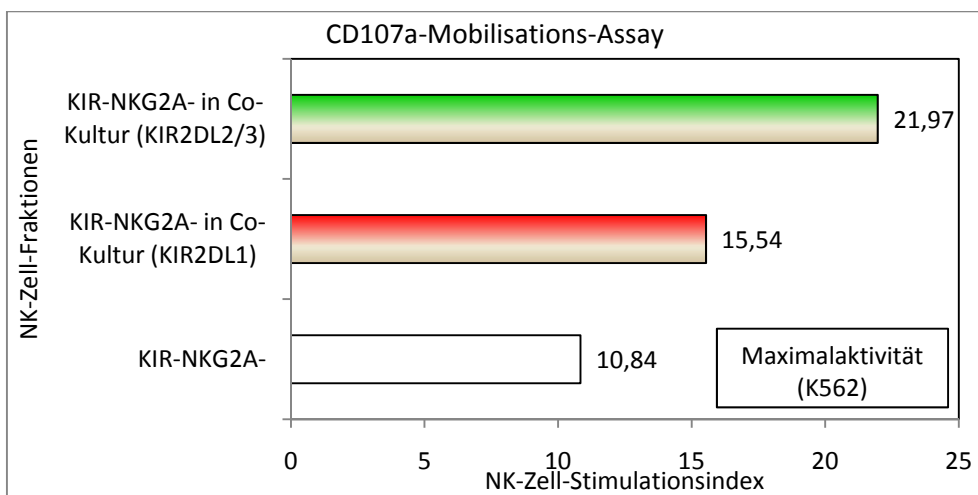


Abbildung 16: Vergleich zweier Subpopulationen von KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen: Darstellung des NK-Zell-Stimulationsindex (x-Achse) aller eingesetzten KIR⁺NKG2A⁻-Fraktionen. Vergleich der KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen in Solo- und in Co-Kultur; Daten von Donor 3 aus Gruppe A, zweimal reproduziert.

KIR ⁺ NKG2A ⁻		K562	K562	KIR ⁺ NKG2A ⁻
in Co-Kultur mit KIR2DL1	MW	30,59	34,08	in Co-Kultur mit KIR2DL2/3
	SD	23,8	23,59	
in Mono-Kultur	MW	21,55		in Mono-Kultur
	SD	18,38		
	p (T-Test)	0,066	0,075	

Tabelle 18: Vergleich der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD), sowie Angabe der T-Tests (gepaart, zweiseitig) der durchgeführten CD107a-Mobilisations-Assays von den aufgeführten NK-Zell-Fraktionen bei Stimulation mit K562. Die Mittelwerte sind als NK-Zell-Stimulationsindices aufgeführt.

Beim Vergleich von diesen beiden KIR⁺NKG2A⁻ Populationen aller Donoren kann festgestellt werden, dass ein Unterschied bei der Maximalaktivität (Aktivität der NK-Zellen bei Stimulation mit K562) vorliegt. Die Maximalaktivität der KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen in Co-

Kultur mit KIR2DL1 lag signifikant über der Maximalaktivität der KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen in Solo-Kultur, aber deutlich unter der Maximalaktivität der KIR-tragenden NK-Zellen. Auch die Maximalaktivität der KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen in Co-Kultur mit KIR2DL2/3 lag zwischen der Maximalaktivität der KIR-tragenden NK-Zellen und der KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen in Solo-Kultur (Abbildung 16, Tabelle 18). Die Aktivität bei Stimulation mit anderen Zielzellen zeigt eine ähnliche Tendenz, welche jedoch nicht das statistische Signifikanzniveau erreicht.

4 Diskussion

In dieser Versuchsreihe wurden zwei Subpopulationen von NK-Zellen mit fehlender Expression von selbst-HLA-I-spezifischen inhibitorischen Rezeptoren identifiziert. Nach dem vielfach beim Menschen akzeptierten Erklärungsmodell der Reaktivität und Selbsttoleranz von NK-Zellen, wäre somit eine potentielle Autoreaktivität der hier beschriebenen NK-Zellen möglich. Jedoch wurden diese in gesunden Probanden ohne Anzeichen einer Autoimmunerkrankung untersucht.

Die eine Subpopulation exprimiert keinen der untersuchten inhibitorischen HLA-I-spezifischen Rezeptoren. In allen untersuchten Individuen waren diese KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen nachzuweisen. Der Anteil variierte zwischen 7,53% und 37% am Gesamtrepertoire. Diese Ergebnisse decken sich sowohl mit den Ergebnissen im murinen Modell von Fernandez et al. (2005) und Kim et al. (2005) als auch mit denen von Anfossi et al. (2006) und Cooley et al. (2007) mit humanen NK-Zellen. Die andere, bis dato nicht beschriebene, Subpopulation exprimiert keinen, für den Donor relevanten, HLA-I-spezifischen inhibitorischen Rezeptor. So wird beim Vergleich des HLA-I-Typs mit dem KIR-Repertoire bei drei von sechs Donoren in einer Subpopulation zwar ein spezifischer KIR exprimiert, dieser findet jedoch keinen adäquaten Liganden im Donor, womit eine spezifische Hemmung durch den KIR nicht möglich ist.

Beide Subpopulationen waren jedoch nicht komplett anergisch, wie man es von anderen Lymphozyten in bestimmten Situationen kennt. So führt beispielsweise die fehlende Ko-Stimulation von den T-Zell Rezeptoren CD28 und CD152 durch Antigen-präsentierende Zellen auch bei Stimulation des TCR (T-Zell-Rezeptor) durch Antigene zu einer kompletten Anergie der T-Zellen (Najafian und Sayegh 2000). Die beiden NK-Zell-Subpopulationen hingegen zeigen eine, wenn gleich erniedrigte, zytotoxische Aktivität gegenüber verschiedenen Zielzellen. Das verminderte Funktionsniveau wurde entsprechend den

Ergebnissen der anderen Forschungsgruppen mit dem Begriff Hyporesponsivität belegt. Doch auch bei den NK-Zellen mit vorhandenen selbst-HLA-I-spezifischen inhibitorischen Rezeptoren konnten nicht alle eingesetzten NK-Zellen durch Wildtyp-K562 stimuliert werden. Diese Beobachtung könnte durch eine limitierte Sensitivität des CD107a-Mobilisations-Assays oder auch durch das Fehlen anderer Kostimulatoren als IL-2 zu erklären sein (Anfossi et al. 2006). Die Beschreibung von KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen widerspricht, wie die Ergebnisse der oben genannten Forschungsgruppen, dem weithin akzeptierten Modell der Selbsttoleranz, dem bereits oben vorgestellten „*at-least-one*“-Modell. Die hier gezeigten Ergebnisse lassen Zweifel an diesem Modell aufkommen, wenngleich die folgenden methodischen Einschränkungen diskutiert seien:

Einige bekannte inhibitorische Rezeptoren wurden in den Experimenten nicht berücksichtigt, darunter KIR3DL2, LIR-1/ILT2/CD85j und KIR2DL4, welche spezifisch für HLA-A3/11 und HLA-G sind. Doch wurden KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen auch in HLA-A3 und HLA-A11 negativen Donoren beschrieben (nur die Probanden zwei und vier waren positiv). HLA-G wird zwar von allen Donoren exprimiert, aber in gesunden Individuen nur in bestimmten Geweben, wie Kornea oder thymischen Epithelzellen, exprimiert und kann damit nicht alleinig für die Selbsttoleranz verantwortlich sein.

Erwähnenswert ist auch, dass alle verwendeten monoklonalen Antikörper selektiv auch die aktivierenden KIR detektieren. Doch durch die monoklonale Antikörpermarkierung wurde gezeigt, dass die entsprechenden KIR überhaupt nicht exprimiert wurden, sowohl die aktivierenden als auch die inhibierenden Subtypen. Außerdem konnte Cooley et al. (2007) auch mit Q-RT-PCR (*quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction*)-Assays die relative Abwesenheit von inhibitorischen KIR bestätigen. Beide methodischen Einschränkungen widersprechen also nicht dem Befund KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen detektiert zu haben. Wie kann alternativ die Selbsttoleranz der beschriebenen NK-Zellen erklärt werden, wenn sie offenbar keinen selbst-HLA-I-spezifischen Rezeptor exprimieren?

Es ist nicht auszuschließen, dass die Selbsttoleranz einem bisher unbekanntem HLA-spezifischen Rezeptor zuzuschreiben ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein unbekannter nicht-HLA-spezifischer inhibitorischer Rezeptor die Selbsttoleranz bewirkt, ist gering, da die eingesetzten Zielzellen, mit Ausnahme der B-LCL, welche zur Kontrolle eingesetzt wurden, entweder keine bzw. alle dieselben inhibierenden Liganden oder nur zusätzliche transfizierte HLA-I-Moleküle exprimieren. Außerdem wäre es fraglich, dass bei vorhandenem suffizientem Rezeptor ein vermindertes Aktivitätsniveau auftreten würde.

Aufgrund des übereinstimmenden Nachweises von KIR⁻NKG2A⁻ NK-Zellen wurden andere Modelle der Selbsttoleranz entwickelt, welche mit den neuen Forschungsergebnissen vereinbar sind. Vor allem zwei Modelle werden dabei bevorzugt diskutiert: Das „*disarming*“ bzw. „*calibration*“ Modell und das „*arming*“ bzw. „*licensing*“ Modell. Ursprünglich für das murine Modell mit Ly49⁻NKG2A⁻ NK-Zellen entwickelt, lassen sich die Modelle jedoch auch auf Menschen mit KIR⁻NKG2A⁻ NK-Zellen übertragen.

Das „*disarming*“ Modell: NK-Zellen, welche in ihrer Entwicklung keine HLA-I-spezifischen inhibitorischen Rezeptoren exprimieren, sind aufgrund normaler Expression stimulierender Rezeptoren einer kontinuierlichen Aktivierung durch körpereigene Zellen ausgesetzt. Diese chronische Stimulation führt zu einer Verminderung der Aktivitätsstufe, ein hyporesponsiver Phänotyp wird ausgebildet (Fernandez et al. 2005). Ähnlichkeiten sind vor allem zur Anergie von B- und T-Lymphozyten zu sehen (Gasser und Raulet 2006). Anfossi et al. (2006) modifiziert das Modell im Sinne einer Kalibrierung. Eine in Entwicklung befindliche NK-Zelle erhält je nach Rezeptorexpression mehrere aktivierende wie inhibierende Signale. Die Summe dieser Signale bestimmt das Aktivitätsniveau der NK-Zelle. Erhält eine Zelle nur aktivierende Signale, wird das Aktivitätsniveau so weit herunterreguliert, bis Selbsttoleranz erreicht ist (Anfossi et al. 2006).

Das „*arming*“ Modell: Um ein hohes Funktionsniveau zu erreichen, müssen HLA-spezifische Rezeptoren der NK-Zellen in ihrer Entwicklung mit ihren Liganden interagieren. Bleibt die Interaktion aufgrund fehlender Expression von selbst-HLA-I-spezifischen inhibitorischen Rezeptoren aus, fehlt das „lizenzierende“ Signal dieses Rezeptors. Die NK-Zelle bleibt auf ihrem hyporesponsiven Funktionsniveau (Kim et al. 2005; Yokoyama und Kim 2006). Letztendlich ist das „*arming*“ Modell eine Weiterentwicklung des „*at-least-one*“-Modells unter Berücksichtigung der neuen Erkenntnisse über die Existenz von NK-Zellen ohne selbst-HLA-I-spezifische inhibitorische Rezeptoren. Eine NK-Zelle muss weiterhin mindestens einen HLA-I-spezifischen inhibitorischen Rezeptor exprimieren, um ein hohes Funktionsniveau zu erreichen.

Neben diesen beiden Modellen gibt es noch andere, aber weniger diskutierte Modelle der Selbsttoleranz, welche durch neue Forschungsergebnisse teils in den Hintergrund, teils widerlegt worden sind. Nach einem Modell führt ein unbekannter nicht-HLA-I-spezifischer inhibitorischer Rezeptor zur Selbsttoleranz der NK-Zelle. Ligand müsste ein häufig auf Zellen vorkommendes Oberflächenmerkmal sein. Selbsttoleranz wird erreicht, indem die Expression dieses Rezeptors höher oder das Signal stärker bei KIR⁻NKG2A⁻ NK-Zellen ist als bei KIR⁺NKG2A⁺ Zellen.

Dieses Modell erscheint zunächst unwahrscheinlich, da hyporeaktive NK-Zellen auch dann hyporeaktiv sind, wenn sie mit für aktivierenden Rezeptoren spezifischen Antikörpern stimuliert werden, bei gleichzeitiger Abwesenheit inhibitorischer Liganden exprimierender Zielzellen (Fernandez et al. 2005; Kim et al. 2005).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Selbsttoleranz wäre eine niedrigere Expression von stimulierenden Rezeptoren in KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen. Es konnte im murinen Modell jedoch gezeigt werden, dass hyporeaktive NK-Zellen eine normale Expressionsdichte von stimulierenden Rezeptoren haben (NKR-P1C, NKG2D, Ly49D, CD16) (Fernandez et al. 2005; Kim et al. 2005). Inzwischen konnten ähnliche Ergebnisse auch im Menschen gezeigt werden. Abgesehen von CD226 (DNAM-1) traten sowohl bei Anfossi et al. (2006) wie auch bei Hasenkamp et al. (2008) keine Unterschiede in der Expression von stimulierenden Rezeptoren auf (u.a. NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, CD85j).

Weiterhin wurde festgestellt, dass die intrazelluläre Konzentration von den aktivierenden Adapterproteinen DAP10 und DAP12 nicht erniedrigt ist (Fernandez et al. 2005). Unwahrscheinlich ist auch eine erhöhte Aktivität bzw. Konzentration von der Phosphatase SHP1, da SHP1-defiziente NK-Zellen und NK-Zellen mit dominant-negativem SHP1 nicht autoreaktiv sind (Lowin-Kropf et al. 2000; Raulet und Vance 2006). Unabhängig von der Betrachtung einzelner Modelle, ist letztlich nicht auszuschließen, dass mehrere Mechanismen zusammenwirken, um zu Selbsttoleranz zu führen. So könnten am Ende alle Modelle einen Teil zur Selbsttoleranz beitragen.

Auch die Steuerung der Aktivität von NK-Zellen durch regulatorische Zellen kann einen Einfluss auf die Selbsttoleranz haben, ähnlich den T-Helferzellen bei Lymphozyten. So gibt es zwar Veröffentlichungen, in denen die regulatorischen T-Zellen NK-Zellen funktionell inhibieren können (Barao et al. 2006; Ghiringhelli et al. 2005). Doch wurden die KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen in immundefizienten (SCID) Mäusen beschrieben, welche keine T-Zellen besitzen. Ein Anteil in T-Zell-kompetenten Mäusen oder Menschen ist jedoch nicht auszuschließen.

Neben der Detektion von hyporeaktiven NK-Zellen wurden im Rahmen dieser Dissertation jedoch noch weitere, bisher unbekannte, Beobachtungen gemacht. Neben der erwarteten HLA-I-spezifischen Inhibition durch den korrespondierenden Liganden fiel ein weiteres Phänomen auf. NK-Zellen wurden auch von Zielzellen inhibiert, welche einen nicht-korrespondierenden Liganden exprimierten.

Da die Zielzellen, mit Ausnahme der B-LCL, lediglich ein transfiziertes, spezifisches HLA-I als mögliche inhibitorische Liganden auf ihrer Oberfläche exprimieren, ist die Inhibition mit

hoher Wahrscheinlichkeit auf HLA-I zurückzuführen. So wurden beispielsweise NK-Zellen, welche KIR2DL1 als einzigen inhibitorischen Rezeptor exprimieren, auch von HLA-Cw03 inhibiert, dem eigentlichen Liganden von KIR2DL2/3. Die Inhibition der nicht kompatiblen Mono-KIR-Fraktionen ist in der Regel geringer als bei passendem Liganden. Das gleiche Phänomen ist auch bei den potentiell autoreaktiven KIR2DL1-Fraktionen zu beobachten. Da auch hier die Inhibition bei HLA-Cw05 stärker als bei HLA-Cw03 ist, kann man davon ausgehen, dass der im Probanden irrelevante KIR-Rezeptor (hier KIR2DL1) funktionell aktiv ist und somit außerhalb des Probanden zur Inhibition von NK-Zellen beitragen kann. Auch die KIR^{NKG2A} NK-Zellen wurden von HLA-I inhibiert, obwohl sie keinen bekannten HLA-I-spezifischen Rezeptor exprimieren.

Die Inhibition der NK-Zellen durch HLA-I ohne vorhandenen spezifischen Rezeptor ist nicht einheitlich, sondern zeigt zwischen den verschiedenen Zielzellen quantitative Unterschiede. Die besonders starke Inhibition aller NK-Zellen durch die B-LCL lässt sich mit der deutlich höheren Expressionsdichte von, mit NK-Zell-Rezeptoren korrespondierenden, HLA-I als bei den HLA-transfizierten, ansonsten HLA-negativen Zielzellen erklären, da die inhibitorischen Rezeptoren so maximal stimuliert werden konnten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die eingesetzten B-LCL eine geringere Expressionsdichte des stimulierenden Liganden MIC-A/B im Vergleich mit den verschiedenen K562 haben. Dass eine unspezifische Inhibition durch HLA-I gezeigt werden konnte, ist eine weitere Erklärung für die niedrige Aktivität der NK-Zellen bei diesen Zielzellen. Denn es wurden B-LCL ausgewählt, die eine große Bandbreite an KIR-Liganden exprimieren und sich so die inhibitorischen Signale summieren. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass auf diesen Zellen noch andere unbekannte Liganden exprimiert werden, welche zur Inhibition beitragen.

Im Gegensatz dazu kann man eine deutlich höhere Aktivität der NK-Zellen bei den Zielzellen K562 B708 und B4405 beobachten. Eine unspezifische Inhibition durch HLA-I ist hier nicht zu beobachten. Hierzu mit beitragen könnte die höhere Expression des potenten Liganden MIC-A/B zum aktivierenden NK-Zell-Rezeptor NKG2D auf diesen Zielzellen sein. Der andere untersuchte aktivierende Ligand PRR2 spielt bei diesen Überlegungen keine Rolle, da die Expression in allen Zielzellen homogen war. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass bisher kein Rezeptor für HLA-Bw6 auf NK-Zellen nachgewiesen werden konnte, dieser also nach heutigem Kenntnisstand irrelevant für die NK-Zell-Funktion ist. Die unspezifische Inhibition könnte auf relevante HLA-Liganden beschränkt sein bzw. die unspezifische Inhibition nicht auf die HLA-Bw6-Moleküle zutreffen, da nicht einmal ein spezifischer Rezeptor existiert.

Die bei allen eingesetzten NK-Zellen beobachtete unspezifische Inhibition durch HLA-I könnte ein Hinweis auf einen, bisher unbekanntem, unselektiven HLA-I-spezifischen inhibitorischen Rezeptor sein. Doch kann diese Hypothese nicht als alleiniges Erklärungsmodell für die Selbsttoleranz eingesetzt werden. Die KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen sind hyporeaktiv gegenüber sonst maximal stimulierenden Zielzellen, was auf eine insuffiziente Inhibition durch einen unbekanntem Rezeptor hinweisen könnte. Weiterhin sprechen die oben genannten Ergebnisse von Fernandez et al. (2005) und Kim et al. (2005) dagegen. Aber ein Teileffekt ist durchaus vorstellbar. Zuerst wäre aber zur Bestätigung dieser Theorie die Identifikation des Rezeptors notwendig. Doch zeigen die bisher diskutierten Ergebnisse zumindest die große Bedeutung von HLA-Klasse-I-Molekülen in der Selbsttoleranz von NK-Zellen. Sie sind nicht nur spezifischer Ligand für KIR, entscheidend bei Stimulation durch Zielzellen, sondern scheinen auch unspezifisch die Aktivität von NK-Zellen hemmen zu können. Zu berücksichtigen ist auch die Möglichkeit, dass die einzelnen KIR nicht vollständig spezifisch sind, sondern durch mehrere Liganden stimuliert werden mit maximaler Aktivität bei dem adäquaten Liganden.

Eine weitere Ergänzung zum Verständnis der Funktion von NK-Zellen stellt die Beobachtung dar, dass die Hyporeaktivität von KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen in Co-Kultur mit KIR-tragenden NK-Zellen geringer ist als in einer Mono-Kultur. Dies könnte auf die Sekretion von Stimulationsfaktoren wie Interleukinen oder Zytokinen durch KIR-tragende, normofunktionelle NK-Zellen zurückzuführen sein, welche die hyporeaktiven NK-Zellen stärker stimulieren, ohne jedoch dessen Funktionsniveau zu erreichen. Dadurch wird auch noch einmal die Beobachtung gestützt, dass KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen durch Stimulation eine adäquate Aktivierung zeigen und somit als reif einzuordnen sind. Doch wie sind die neu gewonnenen Ergebnisse mit den „*arming*“ und „*disarming*“ Modellen zu vereinbaren oder zu integrieren? Welches Modell erscheint wahrscheinlicher?

Bevor dies genauer beantwortet werden kann, muss man sich zunächst die wesentlichen Unterschiede der beiden Modelle verdeutlichen, wenn auch beide konkurrierenden Modelle mit dem Nachweis KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen vereinbar sind. So messen die beiden Modelle den verschiedenen Rezeptoren unterschiedliche Bedeutung bei. Hebt das „*arming*“ Modell vor allem die Rolle von HLA-I-spezifischen Rezeptoren hervor, steht bei dem „*disarming*“ Modell die Summe aller Signale im Vordergrund. Meine Ergebnisse unterstützen in diesem Punkt das „*arming*“ Modell, da durch die Verwendung von, nur HLA-I tragenden, Zielzellen die herausragende Bedeutung von HLA-I für die Selbsttoleranz gezeigt werden konnte.

Weitere Besonderheiten des „*arming*“ Modells sind die wechselnde Signalantwort bzw. Verarbeitung und der Reifegrad der NK-Zelle. Nach dem „*arming*“ Modell müsste die Signalantwort vorhandener HLA-I-spezifischer inhibitorischer Rezeptoren in der Entwicklung zunächst, im Sinne der Lizenzierung, aktivierend und nach Abschluss des Reifungsprozesses dann letztlich inhibierend sein. Als Weiterentwicklung des „*at least one*“-Modells wären die KIR⁻NKG2A⁻ NK-Zellen als unreife Zellen anzusehen (Gasser und Raulet 2006; Raulet und Vance 2006). Da die NK-Zellen eine deutlich höhere Aktivität bei Zielzellen mit hoher MIC-A/B Expression zeigen, scheinen sie reif zu sein. Nur das Aktivitätsniveau scheint nach unten reguliert zu sein. Weiterhin widerlegt diese Beobachtung erneut das oben beschriebene Selbsttoleranz-Modell, nach dem die stimulatorische Antwort herunterreguliert sein müsste, um Selbsttoleranz zu erreichen.

Letztendlich ist jedoch auch die Frage nach dem Reifegrad der KIR⁻NKG2A⁻ NK-Zellen noch nicht abschließend geklärt. So ordnen Cooley et al. (2007) diese Zellen als unreif ein. Es seien Vorläuferzellen, welche durch Stimulation in reife NK-Zellen transformiert werden könnten mit Expression eines KIR oder von NKG2A (Cooley et al. 2007). In Kultur mit IL-15 und einer stromalen Zelllinie entwickelten in ihren Versuchen einige KIR⁻NKG2A⁻ NK-Zellen spezifische Effektorfunktionen mit Expression von KIR oder NKG2A. Vorher waren die KIR⁻NKG2A⁻ NK-Zellen unselektiv hyporeaktiv (Cooley et al. 2007). Dieses Ergebnis widerspricht den Ergebnissen dieser Dissertation, in dessen Versuchen trotz mangelnder KIR- und NKG2A-Expression eine selektive Inhibition beobachtet werden konnte. Doch gibt es neben den bereits oben erwähnten Punkten (selektive Funktion, normale Expression stimulierender Rezeptoren, normale intrazelluläre Konzentration von Adapterproteinen) noch weitere Erkenntnisse, welche gegen die Einstufung von KIR⁻NKG2A⁻ NK-Zellen als unreife Zellen sprechen:

Im murinen Modell zeigten die hyporesponsiven NK-Zellen eine Expression von Oberflächenmolekülen, welche mit einem reifen Phänotyp assoziiert sind. Sie waren CD11b und DX5 positiv und exprimierten Ly49-Moleküle, welche nicht-spezifisch für HLA-I sind (Fernandez et al. 2005). Cooley et al. (2007) halten jedoch dagegen, dass der Phänotyp erst als reif definiert werden könne, wenn KIR/NKG2A exprimiert werden würde. Jedoch konnte im murinen Modell eine normale Produktion von Interferon gamma bei pharmakologischer Stimulation der Proteinkinase C durch Phorbolester mit Kalziumionophoren (wie Ionomycin) nachgewiesen werden (Fernandez et al. 2005; Kim et al. 2005). Auf diese Weise konnten die Oberflächenrezeptoren umgangen werden. Anfossi et al. (2006) und Hasenkamp et al. (2008) konnten ähnliche Effekte auch im Menschen nachweisen. Sowohl die Interferon-gamma-

Produktion als auch die Degranulation (CD107a) waren unter Stimulation mit Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA) und Ionomycin in Höhe anderer reifer NK-Zellen (Anfossi et al. 2006). KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen zeigten bei Stimulation mit Phytohämagglutinin (PHA) eine mit reifen NK-Zellen vergleichbare Granzyme B (GrB)-Degranulation im ELISPOT (*enzyme-linked immunospot*) (Hasenkamp et al. 2008).

Nach der oben aufgeführten Datenlage sind die KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen als reif einzuschätzen. Ob und wenn welches der anderen Erklärungsmodelle der Selbsttoleranz von NK-Zellen zutreffend ist, scheint zurzeit noch nicht beantwortbar zu sein. Die Ergebnisse dieser Dissertation können weder eines der bevorzugt diskutierten Modelle beweisen noch widerlegen.

In den letzten Jahren sind viele neue Erkenntnisse über die Selbsttoleranz von NK-Zellen gesammelt worden. Es stellt sich die Frage, wie diese Erkenntnisse in der Klinik genutzt werden können. Der Bereich, dem in den letzten Jahren die meiste Aufmerksamkeit zuteil wurde, ist das KIR-Missverhältnis von NK-Zellen zwischen Spender und Empfänger bei allogenen Stammzelltransplantationen. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, weisen retrospektive klinische Beobachtungen darauf hin, dass ein Missverhältnis der KIR-Liganden zu einem besseren Ergebnis führen könnte. Die besseren Ergebnisse wurden von Autoren auf verschiedene Faktoren zurückgeführt. Die Alloreaktivität der transplantierten bzw. im Empfänger neu gebildeten NK-Zellen sei Ursache für einen verstärkten Graft-versus-Lymphoma-Effekt (GvL). Weiterhin bewirke die Alloreaktivität das (beobachtete) verminderte Auftreten einer Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) und die geringere Anzahl an Rezidiven (Giebel et al. 2003; Ruggeri et al. 1999; Ruggeri et al. 2002; Hsu et al. 2006). Nicht in allen angegebenen Studien konnten sämtliche positiven Effekte nachgewiesen werden.

Betrachtet man jedoch die gesamte Bandbreite an durchgeführten Studien, ergibt sich ein differenzierteres Bild. Manche Studien zeigen andere bzw. gegenteilige Aussagen. Mehrere Studien untersuchten retrospektiv die Auswirkung einer KIR-Inkompatibilität der NK-Zellen zwischen Spender und Empfänger bei allogenen haploidentischen Stammzelltransplantationen. Im Vergleich zu Transplantationen mit passendem KIR-Repertoire zeigten manche Studien keine signifikanten Unterschiede im Gesamtüberleben, andere sogar ein schlechteres Abschneiden als in der Vergleichsgruppe (Bishara et al. 2004; Bornhauser et al. 2004; Davies et al. 2002; De Santis et al. 2005). Manche Studien zeigten auch eine Assoziation von KIR-Inkompatibilität und dem vermehrten Auftreten einer Graft-

versus-Host-Erkrankung (GvHD) bzw. dem gehäuften Auftreten von Rezidiven (Bishara et al. 2004; Bornhauser et al. 2004; De Santis et al. 2005).

Diese Ergebnisse stehen in direktem Widerspruch zu den oben erwähnten Ergebnissen. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten auf die Heterogenität der Transplantationsprotokolle zurück zu führen sein. Es gibt eine Vielzahl von Variablen, welche das Ergebnis beeinflussen können. Unterschiedliche Erkrankungen bzw. unterschiedliche Kombinationen von Erkrankungen wurden in die Studien eingeschlossen (z.B. nur die akute myeloide Leukämie (AML) bei Ruggeri et al. (1999), bei Davies et al. (2002) zusätzlich die chronische myeloide Leukämie (CML)). Zu berücksichtigen ist auch das Krankheitsstadium bei Durchführung der haploidentischen Stammzelltransplantation. Manche Zentren stellen die Indikation dafür nur bei Hochrisiko-Patienten. Die eingesetzte Medikation (z.B. unterschiedliche Zytostatika, anti-T-Globuline als GvHD-Prophylaxe, die Gabe von G-CSF oder Immunsuppressiva nach der Transplantation) im Verlauf der gesamten Behandlungsdauer variierte in den verschiedenen Zentren. Auch der Grad der T-Zell-Depletion ist zu beachten, da eine geringere Depletionsrate zu einer erhöhten Rezidivrate führt (Nguyen et al. 2005; Bishara et al. 2004).

Die Aussagen der Autoren mit deutlich besserem Ergebnis bei einer KIR-Inkompatibilität können nicht verallgemeinert werden und müssen in jedem Transplantationszentrum unter Berücksichtigung aller Variablen und Faktoren validiert werden. Doch gibt es noch andere Studien, welche eine Begründung für schlechte Ergebnisse im GvL-Effekt aufzeigen könnten. Es wurden haploidentische Stammzelltransplantate untersucht mit einem KIR-Missverhältnis zwischen Spender und Empfänger. Die nach der Transplantation gebildeten Zellen zeigten einen unreifen Phänotyp. Die Expression von KIR war stark vermindert, während NKG2A vermehrt exprimiert wurde. Dieser Phänotyp war in vitro assoziiert mit einer verminderten Zytotoxizität gegenüber AML-Blasten. Die Inhibition von NKG2A führte zur Wiedergewinnung der Zytotoxizität. NKG2A bindet HLA-E, welches auch von myeloiden Blasten exprimiert wird. Dies verhindert sowohl Autoreaktivität wie auch den GvL-Effekt der NK-Zellen. Dieser Phänotyp bestand in der Studie für mindestens sechs Monate, der Zeitraum in dem die Rezidiv-Rate am höchsten ist (Nguyen et al. 2005). Die Ergebnisse von Shilling et al. (2003) decken sich mit denen von Nguyen et al. (2005).

Auch wenn man die neuen Modelle zur Selbsttoleranz von NK-Zellen berücksichtigt, ergeben sich, zumindest theoretisch, Zweifel an der positiven Wirksamkeit von Stammzelltransplantationen mit KIR-Missverhältnis. So stellt sich die Frage, ob bei einer Transplantation mit KIR-Inkompatibilität die NK-Zellen in der Reifung, aufgrund des Fehlens eines adäquaten Stimulus durch HLA-Klasse-I, nicht ausreichend inhibiert werden („arming“

Modell) bzw. durch fehlende Interaktion mit HLA-Molekülen kein lizenzierendes Signal erhalten („*disarming*“ Modell). Die Folge wären hyporeaktive NK-Zellen mit einem insuffizienten Aktivitätsniveau und möglicherweise schlechteren Ergebnis als bei korrespondierenden KIR-Liganden. Abschließend bleibt die Frage offen, ob man Spender mit korrespondierendem KIR-Repertoire einsetzen oder Spender mit einem Missverhältnis bevorzugen sollte. Weitere Forschung im Bereich der klinischen Anwendung wird notwendig sein, um den Nutzen von KIR-inkompatiblen NK-Zellen bei Stammzelltransplantationen genau evaluieren zu können.

5 Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden, neben vielen bisher unbekanntem Rezeptoren, im murinen Modell NK-Zellen detektiert, welche keinen bekannten HLA-spezifischen inhibitorischen Rezeptor exprimieren. Diese Entdeckungen widersprachen dem bisher gültigen „*at-least-one*“-Modell, nach dem die Selbsttoleranz durch mindestens einen inhibitorischen Rezeptor gewährleistet würde. In dieser Dissertation wird gezeigt, dass auch im humanen Modell NK-Zellen vorliegen, welche keinen bekannten inhibitorischen HLA-spezifischen Rezeptor exprimieren. Dabei decken sich die Ergebnisse mit denen von Anfossi et al. (2006) und Cooley et al. (2007). Das funktionelle Niveau liegt unter dem der KIR-tragenden NK-Zellen, jedoch sind sie nicht anerg. Für diesen Funktionszustand wurde von anderen der Begriff „*Hyporesponsivität*“ geprägt.

Weiterhin wurde in drei Donoren eine Zellpopulation identifiziert, welche zwar einen inhibitorischen KIR exprimiert, aber im Donor der korrespondierende HLA-I-Ligand nicht nachzuweisen war. Auch diese Zellen waren hyporesponsiv. Dabei ist der irrelevante KIR funktionell aktiv. Eine weitere neue Beobachtung war die unspezifische Hemmung aller untersuchten NK-Zellen durch HLA-I-Liganden. NK-Zellen mit KIR für ein spezifisches HLA-I wurden, genauso wie KIR^+NKG2A^- NK-Zellen, auch durch nicht-korrespondierende HLA-I-Liganden inhibiert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei KIR^+NKG2A^- NK-Zellen in Kultur mit KIR-tragenden normoresponsiven Zellen die Hyporesponsivität geringer war als bei den gleichen NK-Zellen in einer Solokultur. Alle Ergebnisse zusammen betrachtet, wird die zentrale Bedeutung von HLA-I bei der Selbsttoleranz und dem funktionellen Aktivitätsniveau von NK-Zellen deutlich.

Alle im Rahmen dieser Dissertation produzierten Ergebnisse sind vereinbar mit den beiden zurzeit diskutierten Selbsttoleranzmodellen, dem „*arming*“ Modell und dem „*disarming*“

Modell. Weitere Versuche werden nötig sein, um das letztlich zutreffende Modell zu identifizieren. Möglich ist aber auch eine Kombination aus verschiedenen Lösungsmodellen. Klinische Bedeutung kommt der Selbsttoleranz von NK-Zellen auf dem Gebiet der allogenen Stammzelltransplantation zu. Durch Verständnis der Selbsttoleranz und Funktionsweise von NK-Zellen könnte die Auswahl von Donor und Empfänger modifiziert und möglicherweise ein besseres Ergebnis erzielt werden. Auch hier werden aufgrund von widersprüchlicher Datenlage weitere Studien vonnöten sein.

6 Literaturverzeichnis

- Alter G, Malenfant JM, Altfeld M (2004): CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity
J Immunol Methods 294, 15-22
- Anderson P, Caligiuri M, Ritz J, Schlossman SF (1989): CD3-negative natural killer cells express zeta TCR as part of a novel molecular complex
Nature 341, 159-162
- Andre P, Castriconi R, Espeli M, Anfossi N, Juarez T, Hue S, Conway H, Romagne F, Dondero A, Nanni M et al. (2004): Comparative analysis of human NK cell activation induced by NKG2D and natural cytotoxicity receptors
Eur J Immunol 34, 961-971
- Anfossi N, Andre P, Guia S, Falk CS, Roeytynck S, Stewart CA, Bresciani V, Frassati C, Revirion D, Middleton D et al. (2006): Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I
Immunity 25, 331-342
- Barao I, Hanash AM, Hallett W, Welniak LA, Sun K, Redelman D, Blazar BR, Levy RB, Murphy WJ (2006): Suppression of natural killer cell-mediated bone marrow cell rejection by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells
Proc Natl Acad Sci U S A 103, 5460-5465
- Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T (1999): Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA
Science 285, 727-729
- Bertone S, Schiavetti F, Bellomo R, Vitale C, Ponte M, Moretta L, Mingari MC (1999): Transforming growth factor-beta-induced expression of CD94/NKG2A inhibitory receptors in human T lymphocytes
Eur J Immunol 29, 23-29
- Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP (1999): Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines
Annu Rev Immunol 17, 189-220

- Bishara A, De Santis D, Witt CC, Brautbar C, Christiansen FT, Or R, Nagler A, Slavin S (2004): The beneficial role of inhibitory KIR genes of HLA class I NK epitopes in haploidentically mismatched stem cell allografts may be masked by residual donor-alloreactive T cells causing GVHD
Tissue Antigens 63, 204-211
- Bornhauser M, Schwerdtfeger R, Martin H, Frank KH, Theuser C, Ehninger G (2004): Role of KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation using unrelated donors
Blood 103, 2860-2861
- Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, Brooks AG (1998): Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis
J Exp Med 187, 813-818
- Bottino C, Moretta L, Pende D, Vitale M, Moretta A (2004): Learning how to discriminate between friends and enemies, a lesson from Natural Killer cells
Mol Immunol 41, 569-575
- Colonna M, Samaridis J (1995): Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells
Science 268, 405-408
- Cooley S, Xiao F, Pitt M, Gleason M, McCullar V, Bergemann TL, McQueen KL, Guethlein LA, Parham P, Miller JS (2007): A subpopulation of human peripheral blood NK cells that lacks inhibitory receptors for self-MHC is developmentally immature
Blood 110, 578-586
- Davies SM, Ruggieri L, DeFor T, Wagner JE, Weisdorf DJ, Miller JS, Velardi A, Blazar BR (2002): Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor
Blood 100, 3825-3827
- De Santis D, Bishara A, Witt CS, Nagler A, Brautbar C, Slavin S, Christiansen FT (2005): Natural killer cell HLA-C epitopes and killer cell immunoglobulin-like receptors both influence outcome of mismatched unrelated donor bone marrow transplants
Tissue Antigens 65, 519-528

- Fernandez NC, Treiner E, Vance RE, Jamieson AM, Lemieux S, Raulet DH (2005): A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules
Blood 105, 4416-4423
- Gasser S, Raulet DH (2006): Activation and self-tolerance of natural killer cells
Immunol Rev 214, 130-142
- Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig PE, Novault S, Escudier B, Vivier E et al. (2005): CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner
J Exp Med 202, 1075-1085
- Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, Velardi A, Davies S, Frumento G, Maccario R, Bonetti F, Wojnar J, Martinetti M et al. (2003): Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors
Blood 102, 814-819
- Gumperz JE, Valiante NM, Parham P, Lanier LL, Tyan D (1996): Heterogeneous phenotypes of expression of the NKB1 natural killer cell class I receptor among individuals of different human histocompatibility leukocyte antigens types appear genetically regulated, but not linked to major histocompatibility complex haplotype
J Exp Med 183, 1817-1827
- Hasenkamp J, Borgerding A, Wulf G, Uhrberg M, Jung W, Dingeldein S, Truemper L, Glass B (2006): Resistance against natural killer cell cytotoxicity: analysis of mechanisms
Scand J Immunol 64, 444-449
- Hasenkamp J, Borgerding A, Uhrberg M, Falk C, Chapuy B, Wulf G, Jung W, Trümper L, Glass B (2008): Self-tolerance of human natural killer cells lacking self-HLA-specific inhibitory receptors
Scand J Immunol 67, 218-29.
- Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH (1975 a): Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity
Int J Cancer 16, 216-229

- Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH (1975 b): Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells
Int J Cancer 16, 230-239
- Hibbs ML, Selvaraj P, Carpen O, Springer TA, Kuster H, Jouvin MH, Kinet JP (1989): Mechanisms for regulating expression of membrane isoforms of Fc gamma RIII (CD16)
Science 246, 1608-1611
- Hoglund P, Glas R, Menard C, Kase A, Johansson MH, Franksson L, Lemmonier F, Karre K (1998): Beta2-microglobulin-deficient NK cells show increased sensitivity to MHC class I-mediated inhibition, but self tolerance does not depend upon target cell expression of H-2Kb and Db heavy chains
Eur J Immunol 28, 370-378
- Houchins JP, Lanier LL, Niemi EC, Phillips JH, Ryan JC (1997): Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C
J Immunol 158, 3603-3609
- Hsu KC, Gooley T, Malkki M, Pinto-Agnello C, Dupont B, Bignon JD, Bornhauser M, Christiansen F, Gratwohl A, Morishima Y et al. (2006): KIR ligands and prediction of relapse after unrelated donor hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy
Biol Blood Marrow Transplant 12, 828-836
- Karre K (2002): NK cells, MHC class I molecules and the missing self
Scand J Immunol 55, 221-228
- Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R (1986): Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy
Nature 319, 675-678
- Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song YJ, Yang L, French AR, Sunwoo JB, Lemieux S, Hansen TH et al. (2005): Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules
Nature 436, 709-713

- Lanier LL (1998): NK cell receptors
Annu Rev Immunol 16, 359-393
- Lanier LL (2005): NK cell recognition
Annu Rev Immunol 23, 225-274
- Lanier LL, Corliss B, Wu J, Phillips JH (1998 a): Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors
Immunity 8, 693-701
- Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips JH (1998 b): Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells
Nature 391, 703-707
- Laskay T, Rollinghoff M, Solbach W (1993): Natural killer cells participate in the early defense against Leishmania major infection in mice
Eur J Immunol 23, 2237-2241
- Lazetic S, Chang C, Houchins JP, Lanier LL, Phillips JH (1996): Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits
J Immunol 157, 4741-4745
- Le Drean E, Vely F, Olcese L, Cambiaggi A, Guia S, Krystal G, Gervois N, Moretta A, Jotereau F, Vivier E (1998): Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases
Eur J Immunol 28, 264-276
- Lee N, Llano M, Carretero M, Ishitani A, Navarro F, Lopez-Botet M, Geraghty DE (1998): HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A
Proc Natl Acad Sci U S A 95, 5199-5204
- Lepin EJ, Bastin JM, Allan DS, Roncador G, Braud VM, Mason DY, van der Merwe PA, McMichael AJ, Bell JI, Powis SH et al. (2000): Functional characterization of HLA-F and binding of HLA-F tetramers to ILT2 and ILT4 receptors
Eur J Immunol 30, 3552-3561

- Liao NS, Bix M, Zijlstra M, Jaenisch R, Raulet D (1991): MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity
Science 253, 199-202
- Ljunggren HG, Van Kaer L, Ploegh HL, Tonegawa S (1994): Altered natural killer cell repertoire in Tap-1 mutant mice
Proc Natl Acad Sci U S A 91, 6520-6524
- Llano M, Lee N, Navarro F, Garcia P, Albar JP, Geraghty DE, Lopez-Botet M (1998): HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer
Eur J Immunol 28, 2854-2863
- Lowin-Kropf B, Kunz B, Beermann F, Held W (2000): Impaired natural killing of MHC class I-deficient targets by NK cells expressing a catalytically inactive form of SHP-1
J Immunol 165, 1314-1321
- Moretta A (2005): The dialogue between human natural killer cells and dendritic cells
Curr Opin Immunol 17, 306-311
- Moretta L, Bottino C, Pende D, Castriconi R, Mingari MC, Moretta A (2006): Surface NK receptors and their ligands on tumor cells
Semin Immunol 18, 151-158
- Najafian N, Sayegh MH (2000): CTLA4-Ig: a novel immunosuppressive agent
Expert Opin Investig Drugs 9, 2147-2157
- Nguyen S, Dhedin N, Vernant JP, Kuentz M, Al Jijakli A, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Boudifa A, Debre P, 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, 4135-4142
- O'Connor GM, Hart OM, Gardiner CM (2006): Putting the natural killer cell in its place
Immunology 117, 1-10
- Penack O, Gentilini C, Fischer L, Asemussen AM, Scheibenbogen C, Thiel E, Uharek L (2005): CD56dimCD16neg cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets
Leukemia 19, 835-840

- Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, Marcenaro E, Accame L, Malaspina A, Biassoni R et al. (1999): Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells
J Exp Med 190, 1505-1516
- Perussia B (1996): The Cytokine Profile of Resting and Activated NK Cells
Methods 9, 370-378
- Pessino A, Sivori S, Bottino C, Malaspina A, Morelli L, Moretta L, Biassoni R, Moretta A (1998): Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity
J Exp Med 188, 953-960
- Raulet DH (2003): Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands
Nat Rev Immunol 3, 781-790
- Raulet DH, Vance RE (2006): Self-tolerance of natural killer cells
Nat Rev Immunol 6, 520-531
- Raulet DH, Vance RE, McMahon CW (2001): Regulation of the natural killer cell receptor repertoire
Annu Rev Immunol 19, 291-330
- Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL, Chang AE, Schwartzentruber DJ, Aebersold P, Leitman S, Linehan WM, Seipp CA (1993): Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer
J Natl Cancer Inst 85, 622-632
- Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, Urbani E, Negrin RS, Martelli MF, Velardi A (1999): Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation
Blood 94, 333-339
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F et al. (2002): Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants
Science 295, 2097-2100

- Shilling HG, Young N, Guethlein LA, Cheng NW, Gardiner CM, Tyan D, Parham P (2002): Genetic control of human NK cell repertoire
J Immunol 169, 239-247
- Shilling HG, McQueen KL, Cheng NW, Shizuru JA, Negrin RS, Parham P (2003): Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation
Blood 101, 3730-3740
- Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, Shlomchik MJ, Emerson SG (1999): Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells
Science 285, 412-415
- Tosato G, Cohen JI (2007): Generation of Epstein-Barr Virus (EBV) –Immortalized B Cell Lines
Curr Protoc Immunol 7.22, 1-3
- Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, Tyan D, Lanier LL, Parham P (1997): Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes
Immunity 7, 753-763
- Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Arnett KL, D'Andrea A, Phillips JH, Lanier LL, Parham P (1997): Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors
Immunity 7, 739-751
- Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, Augugliaro R, Moretta L, Moretta A (1998): NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis
J Exp Med 187, 2065-2072
- Winter CC, Gumperz JE, Parham P, Long EO, Wagtmann N (1998): Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition
J Immunol 161, 571-577
- Yokoyama WM, Kim S (2006): How do natural killer cells find self to achieve tolerance?
Immunity 24, 249-257

Yusa S, Campbell KS (2003): Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP-2) can play a direct role in the inhibitory function of killer cell Ig-like receptors in human NK cells

J Immunol 170, 4539-4547

Yusa S, Catina TL, Campbell KS (2002): SHP-1- and phosphotyrosine-independent inhibitory signaling by a killer cell Ig-like receptor cytoplasmic domain in human NK cells

J Immunol 168, 5047-5057

7 Anhang: Materialien

Laborgeräte	
Casy Zellzähler	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Dispenser	Dispensette, Brand Laborbedarf, Gießen, Deutschland
Eismaschine	Ziegra Eismaschine, Ziegra, Isernhagen, Deutschland
FACS (Fluorescence activated cell sorting)	FACSscan, Becton Dickinson, New Jersey, USA
Handystep, Multistep Pipette	Brand Laborbedarf, Gießen, Deutschland
Inkubator	Biocenter 2001, Tecnomara, Fernwald, Deutschland
MACS Separator	Macs Separator, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Photometer	Rainbow, Tecan Spectra, Crailsheim, Deutschland
Pipetten	
für 0,1 – 10 µl und 2 – 20 µl	Reference, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
für 2 – 100 µl	Pipetman, Gilson, Middleton, USA
für 20 – 200 µl und 100 – 1000 l	Discovery, ABIMED, Langenfeld, Deutschland
Pipettus	Accu – Jet Pro, Brand Laborbedarf, Gießen, Deutschland
Rollschüttler	RM5, Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sodenheim, Deutschland

Laborgeräte (Fortsetzung)	
Sterilbänke	
NuAire, ClassII Type A/B3	GMI Inc.(Global Medical Instrumentation), Ramsey, Minnesota, USA
Hera Save	Heraeus Instruments, Hannover, Deutschland
Vortex	Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland
Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	
GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Zentrifugen	
Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multifuge 3L-R	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
Megafuge 1.0 R	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
Biofuge 13	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland

Laborbedarf	
6-Loch und 12-Loch Platten	Cellstar, Greiner Bio – One, Kremsmünster, Deutschland
Casy Röhrchen	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Combitips (2,5 ml; 5 ml; 12,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Cups	
1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
2 ml	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
FACS-Röhrchen	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Kleenex	KimTech Science, Kimberly Clark Professional, Roswell, USA
Latex Einmalhandschuhe	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
MACS-Säulen (MS, LS, LD)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland
Parafilm	American National Can Company, Greenwich, USA
Petrischalen	Greiner Bio – One, Kremsmünster, Deutschland
Pipettenspitzen	
für 0,1 – 10 µl	
für 100 – 1000 µl	
für 2 – 100 µl	
Röhrchen, 13ml	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Stangenpipetten	
5 ml und 10 ml	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
25 ml	Falcon BD Labware, New Jersey, USA
Zellfilter	Falcon BD Labware, New Jersey, USA
Zellkulturflaschen	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Deutschland

Klinikbedarf	
Heparin-Natrium	Rotexmedica GmbH, Trittau, Deutschland
Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Perfusorspritzen (50ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Spritzen (2ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
	Deutschland

Reagenzien	
Ameisensäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ampuwa	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Chemical Company, St. Louis, USA
Essigsäure	Merck, KgaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	GeReSombH, Einbeck, Deutschland J.T. Backer, Phillipsburg, USA
Facs Staining solution	BD Biosciences, San Diego, USA
FCS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Ficoll Separationslösung	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Golgi Stopp	BD Biosciences, San Diego, USA
H ₂ O ₂	Merck, KgaA, Darmstadt, Deutschland
IgG	Octagam, Octapharma Pharmaceutica, Wien, Österreich
Interleukin – 2	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Lymphoprep	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
MACS Antikörper	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, BRD
Anti-Biotin MicroBeads	
Anti-PE MicroBeads	
CD3 MicroBeads	
CD56+ MicroBeads	
Isolation Kit 2 (alle Biotin- gekoppelt):	
Cell Biotin-Antibody Cocktail:	
	CD3, CD4, CD14, CD15, CD19, CD36, CD123, CD235a
Monensin	Sigma Chemical Company, St. Louis, USA
PBS (phosphate buffer saline)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin / Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Auckland, Neuseeland
RPMI 1640 Medium	Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

Verwendete Antikörper (außer der im Isolation-Kit 2 enthaltenen)			
Antikörper	Klon	Markierung	Hersteller
CD3	UCHT1	FITC	BD Pharmingen
CD3	UCHT1	PE	Beckman Coulter
CD16	3G8	keine	BD Pharmingen
CD16	3G8	PE	BD Pharmingen
CD20	2H7	PE	BD Pharmingen
CD56	B195	FITC	BD Pharmingen
CD56	B195	Alexa Fluor	BD Pharmingen
CD56	B195	PE	BD Pharmingen
CD107a	H4A3	Cy5	BD Pharmingen
CD158a	EB6B	PE	Beckman Coulter
CD158a	HP-3E4	FITC	BD Pharmingen
CD226 (D-NAM1)	DX11	PE	BD Pharmingen
CD314	CX5	PE	BD Pharmingen
HLA-ABC Antigen	W6/32	Keine	DakoCytomation
HLA-ABC Antigen	W6/32	PE	DakoCytomation
IgG Isotyp	G18-145	PerCP	BD Pharmingen
MICA/B	6D4	PE	BD Pharmingen
NKG2A	Z199	PE	Beckman Coulter
NKAT2	DX27	PE	BD Pharmingen
NKB1	DX9	Biotin	BD Pharmingen
NKB1	DX9	PE	BD Pharmingen
NKp30 (CD337)	P30-15	PE	BD Pharmingen
NKp46	9E2	PE	BD Pharmingen
PRR2	R2.525	PE	BD Pharmingen

Puffer zur NK Zell Isolierung	
Casy-Puffer	NaCl EDTA KCl NaH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ NaF
MACS-Puffer	PBS 2mM EDTA 0,5% BSA

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Bertram Glaß danke ich für die Überlassung des Themas und die mir gewährte Unterstützung sowie konstruktive Kritik, die diese Arbeit zustande kommen ließen.

Besonderer Dank gilt weiterhin Dr. med. Justin Hasenkamp, der mir während der gesamten Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Susan Dingeldein sowie Tobias Wommelsdorf danke ich für die Einführung, tatkräftige Unterstützung und freundliche Aufnahme im Labor.