

**Einfluss des onkogenen RAS-Signalweges
auf die Tumorerkennung durch zytotoxische
T-Lymphozyten und NK-Zellen**

Monika Braun

München 2008

Einfluss des onkogenen RAS-Signalweges auf die Tumorerkennung durch zytotoxische T-Lymphozyten und NK-Zellen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Angefertigt am
Institut für Molekulare Immunologie
Helmholtz Zentrum München
unter der Leitung von Frau Prof. Dr. D. J. Schendel

unter der Betreuung von PD Dr. C. S. Falk
NCT- Nationales Centrum für Tumorerkrankungen
am DKFZ und Institut für Immunologie
Heidelberg

vorgelegt von
Monika Braun
August 2008, München

1. Gutachter : **Frau PD Dr. Christine S. Falk**

2. Gutachter : **Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß**

Dissertation eingereicht am: 01. August 2008

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 2008

Inhalt

Inhalt	I
Abkürzungen	III
A Zusammenfassung	1
B Einleitung	3
1 Das Immunsystem.....	3
1.1 T-Lymphozyten als adaptive Effektorzellen.....	6
1.2 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen).....	7
1.2.1 Aktivierende und inhibitorische NK-Rezeptoren	10
1.2.2 Periphere NK-Subpopulationen.....	15
2 Tumorentstehung durch Umgehung zellinterner und externer Kontrollelemente.....	18
2.1 Überwindung zellinterner Kontrollmechanismen am Beispiel des Kolon-Karzinoms..	18
2.2 DNS-Methylierung und onkogene Signalwege im Kontext der Immunüberwachung .	25
3 Aufgabenstellung.....	31
C Material	33
1 Geräte.....	33
2 Chemikalien	34
3 Verbrauchsmaterial.....	34
3.1 Zellkultur	34
3.2 Multiplex-Analysen.....	36
3.3 Molekularbiologie.....	37
3.4 Allgemein	37
4 Zellen.....	37
4.1 Zelllinien.....	37
4.2 Normalspender PBMC.....	40
5 Antikörper	40
5.1 Primärantikörper	40
5.2 Sekundärantikörper	41
6 Kooperationspartner.....	41
7 Firmenverzeichnis.....	42
D Methoden.....	43
1 Allgemeine Methoden der Zellkultur	43
1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen	43
1.2 Bestimmung der Zellzahl	43
1.3 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC)	44
1.4 Kultivierung von adhärennten und Suspensions-Zellen	44
1.5 Behandlung der Kolon-Karzinom-Zelllinien mit unterschiedlichen Inhibitoren	45
1.6 Kultivierung und Restimulation des ZTL-Klons JB4 und von NK-Zellen	46
1.7 Isolierung von NK-Zellen aus PBMC	47
1.8 Separation von NK-Zellen anhand ihrer CD6-Expression.....	47
1.9 Klonierung von NK-Zellen.....	47
1.10 Rezeptorspezifische Untersuchungen.....	48
Kopplung von Antikörpern an Platten	48
2 Durchflusszytometrie.....	49
2.1 Allgemein	49
2.2 Messung und Auswertung	50
3 Messung der Zytotoxizität von T- und NK-Zellen.....	52
3.1 Chromfreisetzungstest.....	52
3.2 CD107a-Degranulations-Versuch.....	53
4 Molekularbiologische Methoden zur HLA/KIR-Typisierung	54
4.1 Isolierung genomischer DNS.....	54
4.2 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion).....	54
4.3 Gelelektrophorese	55

5	Multiplex-Analysen.....	56
5.1	Allgemein	56
5.2	Zytokinbestimmung.....	57
5.3	Phosphoproteinbestimmung.....	58
5.4	HLA/KIR-Typisierung	59
5.5	mRNS-Quantifizierung.....	60
E	Ergebnisse	63
1	Modulation von HLA-Klasse-I und ULBP2 durch DNMT-Methyltransferasen und den MAP-Kinase-Signalweg	63
1.1	Effekt der DNMT-Aktivität auf Proliferation und Expression immunrelevanter Marker	63
1.2	Effekte des MAPK-Signalweges auf Proliferation und Expression von HLA-Klasse-I und ULBP2	68
1.2.1	Abhängigkeit der Proliferation vom MAPK-Signalweg.....	68
1.2.2	Regulation der HLA-Klasse-I- und ULBP2-Expression durch den MAPK-Signalweg.....	70
1.3	Auswirkungen der B-Raf- bzw. MEK-Blockierung auf die nachfolgenden Signalwege	76
1.3.1	Konstitutives MEK/ERK-Signal in Kolon-Karzinom-Zelllinien	76
1.3.2	Kinetik der B-Raf- bzw. MEK-Inhibition	80
1.3.3	Auswirkung der Inhibitoren auf andere Kinasen und Transkriptionsfaktoren.....	84
1.4	Relevanz der MAPK- und DNMT-abhängigen Regulation für die Immunerkennung..	87
1.4.1	Relevanz der HLA-Klasse-I-Modulation für die ZTL-Erkennung.....	87
1.4.2	Relevanz der ULBP2- und HLA-Klasse-I-Modulation für die NK-Zell-Erkennung.....	91
2	Charakterisierung der NK-Zell-Plastizität auf phänotypischer und funktioneller Ebene	95
2.1	Phänotyp und Funktion peripherer NK-Zellen	95
2.1.1	Regulation der NK-vermittelten Zytotoxizität durch aktivierende und inhibitorische Signale	96
2.1.2	Vergleich der CD56 ^{bright} /CD6 ⁻ - und CD56 ^{dim} /CD6 ^{+/-} -NK-Zellen in Bezug auf die Degranulationsfähigkeit	98
2.1.3	Zytokin- und Chemokinproduktion von CD56 ^{bright} /CD6 ⁻ - und CD56 ^{dim} /CD6 ⁺ -NK-Zellen	104
2.1.4	Rezeptorabhängige Produktion von Zytokinen und Chemokinen in Kombination mit zytotoxischen Eigenschaften.....	108
2.2	Charakterisierung von Phänotyp und Funktion auf klonaler Ebene	115
F	Diskussion.....	121
1	Einfluss von onkogenem MAPK-Signalweg und DNMT-Aktivität auf Proliferation und Immunerkennung von Kolon-Karzinom-Zellen	121
1.1	Beteiligung onkogener K-RAS-Signale an der Apoptose-Resistenz durch Aktivierung der MEK/ERK- und PI3K-Signalwege	121
1.2	Auswirkungen des konstitutiv aktiven MEK/ERK-Weges und der DNMT-Aktivität auf die Expression von HLA-Klasse-I und ULBP2.....	126
1.3	Funktionelle Relevanz der HLA-A2- und ULBP2-Regulation für die Immunerkennung..	132
2	Phänotyp und Funktion peripherer NK-Zellen.....	134
2.1	Effektorfunktionen peripherer CD56 ^{dim} /CD16 ⁺ /CD6 ^{+/-} - und CD56 ^{bright} /CD16 ⁻ /CD6 ⁻ -NK-Zellen	136
2.2	Plastizität der rezeptorspezifischen Effektorfunktionen.....	141
G	Literatur	147
H	Anhang	162
I	Danksagung	170
J	Lebenslauf.....	171

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
⁵¹ Cr	radioaktives Chromisotop
Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität
aNKR	aktivierender NK-Rezeptor
APC	Allophycocyanin, Antigen präsentierende Zelle
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	ungefähr
CD	Differenzierungsantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
CML	Chromfreisetzungstest (<i>cell mediated lympholysis</i>)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E:T	Effektor-zu-Zielzell-Ratio (<i>effector cell to target cell ratio</i>)
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Di-Natriummethyldiamintetraacetat
ERK	Extrazellulär Signal-regulierte Kinase (<i>extracellular signal-regulated protein</i>)
FACS	fluoreszenzaktiviertes Zellsortiergerät (Durchflußzytometer)
FCS	fötales Rinderserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Vorwärts-Streulicht (<i>forward scatter</i>)
g	Gramm
HLA	humane Leukozytenantigene
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNKR	Inhibierender Rezeptor
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-enthaltendes aktivierendes Motiv
ITIM	Immunrezeptor Tyrosin-enthaltendes inhibierendes Motiv
JNK	c-Jun N-terminale Kinase (<i>c-Jun N-terminal kinase</i>)
kD	kiloDalton
KIR	Killerzell Immunglobulin-Rezeptor (<i>killer cell immunglobulin receptor</i>)
LRC	Leukozyten-Rezeptor-Komplex (<i>leucoyte receptor complex</i>)
mAk	monoklonale Antikörper
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MEK	MAPK/ERK aktivierende Kinase (<i>MAPK/ERK activating kinase</i>)
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
mRNS	Boten-RNS (<i>messenger-RNS</i>)
NCR	Natürlicher Zytotoxizitäts-Rezeptor (<i>natural cytotoxicity receptor</i>)
NK	Natürliche Killerzelle
PBMC	Periphere Blut-mononukleäre Zellen
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PHA	Phytohämagglutinin (Lektin)
PMA	Phorbol-12-Myristat 13-Acetat
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RPMI	Medium (<i>Rosewell Park Memorial Institut</i>)
SAPE	Streptavidin-PE
SM	Selektionsmedium
SSC	Seitwärts-Streulicht (<i>side scatter</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle
TM	Tumormedium
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T-Zellrezeptor
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>unit</i>)

u.a.	unter anderem
UV-Licht	ultraviolettes Licht
z. B.	zum Beispiel
ZTL	zytotoxische T-Zelle (<i>cytotoxic T lymphocyte</i>)

A Zusammenfassung

In Tumorzellen sind die genetischen und epigenetischen Veränderungen, die für das ungehemmte Wachstum, das Überleben der Zellen und ihre Fähigkeit, in andere Gewebe zu metastasieren, verantwortlich sind, sehr gut charakterisiert. Tumorzellen zeigen dabei häufig ein verändertes DNS-Methylierungsmuster, was zu veränderter Genaktivierung- bzw. -abschaltung im Vergleich zu Zellen des entsprechenden Normalgewebes führt. Daneben treten gehäuft Mutationen in Onkogenen auf, die meist an der Regulation des Zellzyklus und der Zell-Differenzierung beteiligt sind, und somit eine der Ursachen für die verstärkte Proliferation und das Überleben von Tumorzellen darstellen. Im Gegensatz dazu ist bis heute nicht detailliert verstanden, inwiefern diese Mechanismen es einer Tumorzelle darüber hinaus ermöglichen, der Erkennung durch Immunzellen, vor allem zytotoxische T- und NK-Zellen zu entgehen. Daher war es Teil dieser Arbeit, zu untersuchen, ob eine Onkogen-Aktivierung Konsequenzen für die DNS-Methylierung hat, die dann auch zu einer verringerten Immunerkennung der Tumorzellen beitragen. Um diese Frage beantworten zu können, wurden Kolon-Karzinom-Zelllinien, die aufgrund einer *K-RAS*- bzw. *B-Raf*-Mutation einen konstitutiv aktivierten MEK/ERK-Signalweg besitzen, bzgl. der Auswirkung dieser Onkogen-Aktivierung auf die Erkennung durch zytotoxische Effektorzellen untersucht. Durch spezifische Hemmung des konstitutiv aktiven Signalweges mit Inhibitoren der MEK-Kinase (U0126) bzw. der B-Raf-Kinase (Sorafenib) wurde die Rolle des onkogenen Signalweges analysiert. Für die Kombination mit DNS-Methylierungseffekten und deren Relevanz für die Immunerkennung standen DNS-Methyltransferase-(DNMT)-Deletions-Varianten der HCT116-Kolon-Karzinom-Zelllinie zur Verfügung. Bei Untersuchungen der Oberflächenexpression der Inhibitor-behandelten DNMT-Deletions-Varianten im Vergleich zu HCT116-Wildtyp-Zellen konnte gezeigt werden, dass der konstitutiv aktivierte MEK/ERK-Signalweg im Zusammenspiel mit der DNS-Methylierung die Oberflächenexpression von HLA-Klasse-I, im besonderen HLA-A, und eines NKG2D-Liganden, ULBP2, supprimiert. Damit konnte erstmals bewiesen werden, dass sich die onkogene RAS-Kaskade mit Hilfe einer veränderten DNS-Methylierung auf die Antigenpräsentation und die NK-Liganden-Expression der Tumorzellen auswirkt.

Die Relevanz dieser Veränderungen für die Immunerkennung wurde exemplarisch an einem HLA-A2-restringierten ZTL-Klon und peripheren NK-Zellen gezeigt. Die molekularen Mechanismen und die beteiligten Faktoren sind zwar noch nicht vollständig identifiziert, aber durch Analyse des ULBP2-Promotors durch C. Sers konnten wir einen direkten

Zusammenhang zwischen der DN5-Promotor-Methylierung und dem onkogenen RAS-Signalweg herstellen. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass MAPK-Inhibitoren, die bei Tumorpatienten bereits therapeutisch eingesetzt werden, immunologische Nebeneffekte besitzen, die ein Grund für die unterschiedlichen Ansprechraten sein könnten.

Ein weiterer Aspekt meiner Arbeit war die detaillierte funktionelle und phänotypische Charakterisierung peripherer NK-Zellen. Im peripheren Blut finden sich zwei NK-Subpopulationen, welche sich durch eine unterschiedliche Expression von CD56- und CD16-Molekülen auszeichnen und dementsprechend als CD56^{„bright“}/CD16⁻ und CD56^{„dim“}/CD16⁺ definiert sind. Bis heute ist die Relevanz der Existenz dieser beiden NK-Populationen nicht befriedigend geklärt, es werden aber verschiedene funktionelle Unterschiede postuliert. Die NK-Effektorfunktionen umfassen Zytotoxizität und/oder die Freisetzung von Zytokinen und damit die Modulation der nachfolgenden spezifischen Immunantwort. In dieser Arbeit wurden periphere NK-Zellen auf diese Funktionen hin untersucht, wobei neben CD56 und CD16 auch CD6, als neuer differentieller Marker, in die Analysen einbezogen wurde. CD6, das ursprünglich auf T-Zellen identifiziert wurde, kann durch die spezifische Expression auf CD56^{dim}-NK-Zellen als weiterer Unterscheidungsmarker der beiden Subpopulationen verwendet werden. Detaillierte Analysen auf klonaler Ebene konnten keine spezifische Zuordnung der NK-Effektorfunktionen zu einer der beiden Subpopulationen zeigen, vielmehr scheint die individuelle Stimulation darüber zu entscheiden, welche NK-Zelle aktiviert wird, und welche der Effektorfunktionen vorrangig ausgeführt wird. Durch eine umfangreiche Analyse der Zytokin-Muster konnte außerdem gezeigt werden, dass NK-Zellen durch bestimmte Rezeptorsignale ein viel größeres Zytokin-Repertoire sezernieren können als bisher beschrieben, weswegen ihre Rolle als „Killerzelle“ neu definiert werden muss. Möglicherweise dirigieren, analog zu T_H1/T_H2/T_H17-Zellen, auch NK1/NK2/NK17-Zellen die Immunreaktion indirekt über ihre Zytokin- und Chemokin-Produktion.

B Einleitung

1 Das Immunsystem

Höher entwickelte Lebewesen (Wirbeltiere) besitzen ein sehr effizientes Abwehrsystem, das Immunsystem, um sich vor dem Angriff pathogener Mikroorganismen, Viren und Parasiten zu schützen. Das Immunsystem setzt sich aus zwei Bausteinen zusammen, der angeborenen „unspezifischen“ und der erworbenen „spezifischen“ Immunabwehr. Schafft es ein Erreger die erste Barriere, die Haut oder Epithelien zu überwinden, dann setzt zunächst im peripheren Blut oder in den überwachenden Lymphknoten die Bekämpfung durch das angeborene System ein (Abb. 1). Dieses umfasst zelluläre Komponenten wie die Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Dendritische Zellen (DCs) und die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), aber auch Moleküle des Komplementsystems sowie „Kommunikationsfaktoren“ (Zytokine und Chemokine). Die Zellen des angeborenen Immunsystems besitzen keine individual-spezifischen Rezeptoren, sondern „unspezifische“ Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) über die sie pathogenassoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) erkennen können. Im Falle der NK-Zellen gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher aktivierender und inhibierender Rezeptoren, auf die später eingegangen wird. Ist die erste, sofortige Verteidigung nicht ausreichend, den Erreger zu eliminieren, dann produzieren Zellen der angeborenen Immunabwehr Zytokine und Chemokine die eine Entzündungsreaktion in Gang setzten, die letztendlich zu einer Aktivierung von Zellen der adaptiven Immunantwort, vor allem T- und B-Lymphozyten, führt (Abb. 1). Diese verfügen über individuelle, antigenspezifische Rezeptoren und können nach erfolgreicher Aktivierung expandieren und die Erreger gezielt beseitigen. Die Aktivierung von T-Lymphozyten erfolgt durch Zellen der angeborenen Immunabwehr, DCs und Makrophagen, welche die pathogenspezifischen Peptide (Antigene) auf Molekülen, die von Genen des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) auf Chromosom 6p21.3 kodiert werden, auf ihrer Oberfläche präsentieren, weswegen sie als Antigen-präsentierende Zellen (*antigen presenting cells*, APC) bezeichnet werden. Es gibt zwei Klassen der MHC-kodierten Humanen Leukozyten-Antigene (HLA), HLA-Klasse-I- und -II-Moleküle, wobei die Expression von HLA-Klasse-II auf APCs beschränkt ist, während HLA-Klasse-I auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert wird. Extrazelluläre Erreger, z. B. Bakterien, werden aktiv von APCs im Gewebe aufgenommen, in Lysosomen verdaut und die antigenen Peptide von 12-14 Aminosäuren Länge auf HLA-Klasse-II-Molekülen

präsentiert. Viren dagegen dringen direkt in Körperzellen ein, u.a. auch in die APCs, die anschließend diese viralen Peptide auf HLA-Klasse-I-Molekülen präsentieren. Diese unterschiedliche Art der Präsentation führt zu einer Aktivierung unterschiedlicher Zellen des adaptiven Immunsystems. HLA-Klasse-II-präsentierte extrazelluläre Antigene führen durch Bindung an den T-Zellrezeptor-Komplex (TZR) zur Aktivierung von $CD4^+$ -T-Zellen (T-Helferzellen). Deren „Hilfe“ resultiert in einer Expansion von B-Zellen und damit einer Antikörperproduktion gegen Antigen der Erreger, die durch diese Antikörperbindung zusätzlich für die Aufnahme durch Makrophagen markiert werden. HLA-Klasse-I-präsentierte endogene Peptide aktivieren dagegen vorrangig den TZR-Komplex auf $CD8^+$ -T-Zellen (zytotoxische T-Lymphozyten, ZTL), die dann infizierte Körperzellen zerstören können und so z.B. eine Verbreitung von Viren verhindern. HLA-Klasse-I-Moleküle sind jedoch nie leer, sondern präsentieren im „Normalfall“ Peptide zelleigener Proteine, wobei im Thymus durch Deletion „autoreaktiver“ T-Lymphozyten eine Toleranz, also Nicht-Reaktivität, garantiert wird, so dass solche Selbst-HLA-Komplexe nicht erkannt werden (Selbst-Toleranz). Nach Infektion oder maligner Transformation von Körperzellen führt das veränderte Peptidmuster jedoch zu einer Erkennung durch ZTLs. Von den klassischen HLA-Klasse-Ia-Molekülen HLA-A, -B und -C sind heute 649, 1029 bzw. 350 Allele bekannt (Robinson, Waller et al. 2003)(IMGT/HLA Datenbank), die nicht-klassischen HLA-Klasse-Ib-Moleküle HLA-E, -F und -G sind mit 3 bzw. 4 Allelen weitaus weniger polymorph und zeigen z.B. im Falle von HLA-G eine gewebespezifische Expression auf Trophoblasten und Keratinozyten (Ulbrecht, Rehberger et al. 1994).

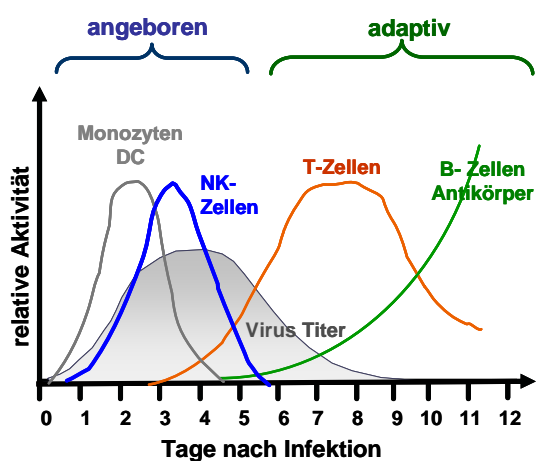


Abb. 1 Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs einer Immunantwort am Beispiel einer Virus-Infektion.

Bei einer Virus-Infektion werden zuerst die Zellen des angeborenen Immunsystems (Monozyten, DCs und NK-Zellen) aktiv. Können diese Immunzellen die Virus-infizierten Körperzellen nicht vollständig eliminieren, werden Zellen des adaptiven Immunsystems, durch ausgesandte Botenstoffe wie Zytokine und Chemokine, aktiviert und leiten zeitlich verzögert die spezifische Immunabwehr ein. Ist diese erfolgreich, bilden sich sogenannte Gedächtniszellen, die bei einer erneuten Infektion schnell eine spezifische und effektive Antwort einleiten können.

Vor ca. 15 Jahren wurde entdeckt, dass auch NK-Zellen über HLA-Klasse-I reguliert werden, was zu einer völlig neuen Betrachtung der HLA-Klasse-I-Moleküle, vor allem von HLA-E geführt hat (siehe 1.2, Einleitung). Auf die komplexe Regulation der HLA-Klasse-I-Oberflächenexpression und der Peptidbeladung wird in Kapitel 2.2 der Einleitung eingegangen. War die adaptive Abwehr erfolgreich, bilden sich antigenspezifische Gedächtniszellen (T- und B-Zellen), die über einen längeren Zeitraum erhalten bleiben und bei erneutem Antigenkontakt schnell und effektiv zu einer schützenden Antwort führen. Diese Gedächtniseigenschaft wird bei Impfungen ausgenutzt, da durch die Impfung Gedächtniszellen entstehen, die im Falle einer „echten“ Infektion sofort und erfolgreich eingreifen und das infektiöse Pathogen eliminieren, bevor Symptome auftreten.

NK-Zellen wurden bis vor kurzem als reine „Killerzellen“ betrachtet, die in der Lage sind, ohne vorherigen Stimulus schnell und effektiv Virus-infizierte oder auch transformierte Zellen zu erkennen und zu zerstören. In den letzten Jahren zeigte sich aber immer deutlicher, dass NK-Zellen auch einen entscheidenden Einfluss auf die nachfolgende adaptive Immunantwort ausüben, sei es durch Zytokinsekretion oder direkte Interaktion mit DCs, wodurch die nachfolgenden adaptiven T-Zell-Antworten beeinflusst werden können (Martin-Fontecha, Thomsen et al. 2004). Da NK-Zellen diese entscheidende richtungsweisende Funktion für Immunantworten besitzen, war es ein Teil dieser Arbeit, die Funktion und den Phänotyp dieser komplexen Immuneffektorzellen näher zu charakterisieren.

Das Immunsystem ist vorrangig darauf ausgelegt, körperfremde Strukturen zu erkennen und zu eliminieren. Deshalb stellt die Transformation von körpereigenen Zellen, im Falle einer Tumorentwicklung, eine große Herausforderung dar, da es hier wichtig ist eine korrekte Unterscheidung zwischen „normal“ und „verändert“ zu treffen. Durch das Auftreten von Tumor-spezifischen Peptiden aufgrund der zahlreichen Veränderungen in Folge der Transformation ist dies zwar theoretisch möglich, praktisch scheitert eine gute T-Zellerkennung jedoch zumeist an der Toleranz gegen Tumor-assoziierte Antigene, da hochreaktive T-Zellen im Thymus durch die positive und negative Selektion eliminiert werden. Dennoch spielen ZTLs, aber auch NK-Zellen, bei der frühen Eliminierung von transformierten Zellen eine Hauptrolle, wobei Tumorzellen offensichtlich über Mechanismen verfügen, die zu einer verminderten Erkennung durch diese Effektorzellen führen. Diese sind bis heute nicht vollständig charakterisiert, bieten aber ein hohes therapeutisches Potential, weswegen sie am Beispiel von Kolon-Karzinom-Zelllinien in dieser Arbeit näher untersucht wurden.

1.1 T-Lymphozyten als adaptive Effektorzellen

T-Lymphozyten (T-Zellen) entstehen aus undifferenzierten Vorläuferzellen im Knochenmark und wandern zur Ausreifung und Selektion in den Thymus, daher „T-“, ein. Sie besitzen einen individuellen, antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor (TZR), mit welchem sie HLA-Antigen-Komplexe auf körpereigenen Zellen erkennen können. Klassische T-Zellen können anhand von Oberflächenrezeptoren in funktionell unterschiedliche Typen unterteilt werden. T-Helferzellen besitzen das „*cluster of differentiation*“-CD4-Protein (CD4⁺-T-Zellen) und, zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL) das CD8αβ-Heterodimer (CD8⁺-T-Zellen). Diese Moleküle fungieren als Korezeptoren und erkennen zusammen mit dem TZR den MHC-Antigen-Komplex, wobei CD4⁺-T-Zellen HLA-Klasse-II- und CD8⁺-T-Zellen HLA-Klasse-I-Moleküle binden. Der TZR ist ein Heterodimer aus einer α- und einer β-Kette und ist mit dem sogenannten CD3-Komplex assoziiert (γε₂δ), der zusätzlich zwei CD3ζ-Ketten mit zytoplasmatischen ITAM-Motiven besitzt, die für die Signalweiterleitung nach Antigen-Erkennung verantwortlich sind.

Effektorfunktionen der CD8⁺-T-Zellen

Die Erkennung einer Zielzelle durch ZTL führt zum Abtöten dieser Zelle, aber auch zur Produktion entzündungsfördernder Zytokine, darunter IFN-γ und TNF-α. Zytokine wie IFN-γ verstärken die nachfolgende Immunantwort, z.B. durch eine Erhöhung der HLA-Klasse-I-Expression auf entarteten oder Virus-infizierten Zellen, und führen damit u.a. zu einer besseren ZTL-Aktivierung (Abb. 2).

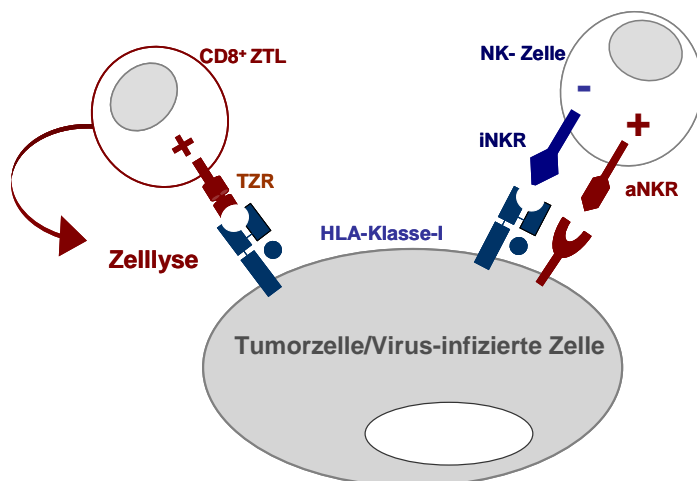


Abb. 2 Regulation der Effektorfunktionen von ZTL und NK-Zellen durch HLA-Klasse-I-Moleküle.

ZTL lysieren transformierte oder Virus-infizierte körpereigene Zellen, wenn diese auf HLA-Klasse-I-Molekülen spezifische, als „fremd“ erkannte Antigene präsentieren, die durch den TZR-Komplex erkannt werden. NK-Zellen werden dagegen durch die Expression aktivierender (aNKR) und inhibitorischer (iNKR) Rezeptoren in ihrer Aktivität reguliert, wobei HLA-Klasse-I-Moleküle im Normalfall zu einer „Ruhigstellung“ der NK-Zellen führen.

Das Abtöten einer Zielzelle erfolgt durch Induktion des programmierten Zelltods, der Apoptose, was entweder durch Bindung des ZTL-exprimierten Fas-Liganden (CD95L) an den auf der Zielzelle exprimierten Fas-Todesrezeptor (CD95) und/oder durch Ausschüttung zytotoxischer Effektormoleküle wie Perforin und Granzym A/B, erfolgen kann. Diese Zytotoxine sind in den ZTLs in speziellen sekretorischen Vesikeln, den lytischen Granula, gespeichert, und werden nach Zielzellerkennung in die immunologische Synapse entleert, wo sie nach Aufnahme ebenfalls zu Apoptose der Zielzelle führen. Dabei fusionieren die Vesikel- und die Zellmembran, wodurch das in der Vesikelmembran lokalisierte LAMP-1-Molekül (CD107a) transient auf der Oberfläche der ZTLs erscheint. Durch spezifische Antikörper kann die Quantität von CD107a auf der Effektorzelle nach Zielzellkontakt durchflusszytometrisch gemessen werden und gibt damit Aufschluss über die Stärke der Zielzellerkennung bzw. ZTL-Aktivierung auf Einzelzellniveau. Diese CD107a-Oberflächenmarkierung wurde verwendet, um Aussagen über die spezifische Erkennung von Tumorzellen durch ZTLs und NK-Zellen treffen zu können, welche z.T. über die gleichen Tötungsmechanismen verfügen wie die ZTLs (1.4.2, Ergebnisse). Darüber hinaus erfolgte mit dieser Methode auch die funktionelle Charakterisierung der verschiedenen NK-Zellpopulationen (Kapitel 2, Ergebnisse).

1.2 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

NK-Zellen sind große granuläre Lymphozyten, die im Gegensatz zu T-Zellen nicht über einen individuellen TZR reguliert werden, sondern ein breites Spektrum unterschiedlicher aktivierender und inhibitorischer Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen. NK-Zellen stellen keine homogene Zellpopulation dar, da die Expression der verschiedenen Rezeptoren für jede Zelle individuell ist. Ebenso wie ZTLs können NK-Zellen nach Erkennung ihrer Zielzellen durch die Ausschüttung zytotoxischer Moleküle, Perforin und Granzym A/B, Apoptose induzieren, was auch über den Rezeptor-vermittelten Fas-Ligand- bzw. TRAIL-(*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*)-Weg geschehen kann. Neben dieser natürlichen Zytotoxizität der NK-Zellen kann CD16, der niedrig-affine Fc γ -Rezeptor III (Fc γ RIIIA), durch Bindung des Fc-Teils von IgG-Antikörperkomplexen zu einer Aktivierung der NK-Effektorfunktionen führen. Dadurch können Antikörper-beladene Zielzellen erkannt und eliminiert werden (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC), was wieder die enge Verbindung der erworbenen und der angeborenen Immunabwehr, verdeutlicht. Neben der direkten Lyse von Zellen können NK-Zellen auch Zytokine und Chemokine freisetzen, u.a. IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-10, RANTES, MIP-1 α und -1 β (Cooper, Fehniger et al. 2001,

Robertson 2002), und damit die nachfolgende Immunantwort ähnlich wie T-Zellen beeinflussen, indem sie eine pro- oder anti-inflammatorische Richtung vorgeben.

NK-Zellen benötigen im Gegensatz zu ZTL keine regulierte Aktivierung (*priming*), um ihre Effektorfunktion ausüben zu können, und verfügen neben aktivierenden auch über inhibierende Rezeptoren. Der Aktivierungszustand einer NK-Zelle ergibt sich aus der Gesamtheit der eingehenden Signale und unterliegt damit einem fein regulierten Gleichgewicht. Die inhibierenden Rezeptoren erkennen vor allem HLA-Klasse-I-Moleküle, unabhängig von präsentierten Peptiden, und ermöglichen daher im Normalzustand eine Art „Toleranz“ der NK-Zellen gegenüber HLA-Klasse-I-positiven körpereigenen Zellen. Virus-infizierte oder transformierte Zellen, die sich häufig durch eine verminderte oder fehlende HLA-Expression auszeichnen und somit einer ZTL-Erkennung entgehen würden, können aufgrund dieser Regulation eliminiert werden, da das Wegfallen des inhibierenden HLA-Klasse-I-Signals zu einer Aktivierung der NK-Zellen führen kann. Dieses Konzept der NK-Zellregulation wurde von Klas Kärre in seiner „*missing self*“-Hypothese formuliert (Abb. 3B) (Ljunggren and Karre 1990). In neuester Zeit stellt sich aber heraus, dass diese Hypothese allein nicht ausreicht, um die NK-Zell-Selbsttoleranz zu erklären. Grund hierfür ist die Tatsache, dass HLA-Klasse-I-Moleküle (Chromosom 6p) und die entsprechenden inhibitorischen NK-Rezeptoren (Chromosom 19q13.4) unabhängig voneinander vererbt werden, es also theoretisch auch NK-Zellen geben müsste, die keinen passenden inhibierenden Rezeptor für Selbst-MHC-Moleküle exprimieren. Da aber keine bekannten autoimmunen Krankheiten beschrieben sind, die allein auf einer NK-Zell-Fehlregulation beruhen (Kumar and McNerney 2005), wurde das „*at least one*“ Konzept postuliert (Gasser and Raulet 2006). Danach reifen im Knochenmark nur diejenigen NK-Zellen heran, die mindestens einen inhibierenden Rezeptor für Selbst-HLA-Moleküle exprimieren. Der zugrunde liegende Selektionsprozess ist dabei noch nicht molekular aufgeklärt und wird derzeit kontrovers diskutiert, wobei drei theoretische Modelle vorstellbar sind. Bei dem als „*disarming*“ bezeichneten Modell von D. Raulet erfolgt eine „aktive Abschaltung“ von NK-Zellen während der Reifung, falls diese keinen inhibierenden Rezeptor exprimieren und somit durch ein Übermaß an aktivierenden Signalen in einen Zustand fallen, der an die in T-Zellen vorkommende Anergie erinnert (Raulet and Vance 2006). Im Gegensatz dazu fordert W. Yokoyama die Interaktion eines inhibierenden Rezeptors mit Selbst-MHC-Molekülen während der NK-Zell-Entwicklung, um dadurch ein positives Signal für die NK-Zell-Reifung zu erhalten und die NK-Zelle zu „lizenzieren“ („*licensing*“-Modell) (Yokoyama and Kim 2006). Grundvoraussetzung dafür wäre allerdings ein Funktionswechsel des Rezeptors je nach

Entwicklungsstadium der NK-Zellen, wobei zunächst ein aktivierendes Signal während der Entwicklung vermittelt wird, das danach in der reifen NK-Zelle zu einem inhibierenden Signal wird. Die dritte Theorie stammt von E. Vivier, der davon ausgeht, dass nur NK-Zellen, die während ihrer Entwicklung ein Signal durch Bindung eines inhibierenden Rezeptors an Selbst-HLA-Moleküle erhalten haben ihre volle funktionelle Kompetenz erreichen, indem erst danach effiziente Aktivierungssignalwege in der Zelle angeschaltet werden („education“-Modell) (Anfossi, Andre et al. 2006). In transformierten oder Virus-infizierten Zellen tritt neben einem Verlust von HLA-Klasse-I-Molekülen auch die Expression bestimmter aktivierender Moleküle, meist Liganden des aktivierenden NK-Rezeptors NKG2D, auf, was als „*induced self*“ bezeichnet wird. Dabei werden NK-Zellen, trotz Anwesenheit inhibitorischer HLA-Moleküle, durch diese Stress-induzierten Liganden aktiviert. Diese Mechanismen, die zu einer NK-Aktivierung führen, sind in Abb. 3 schematisch dargestellt.

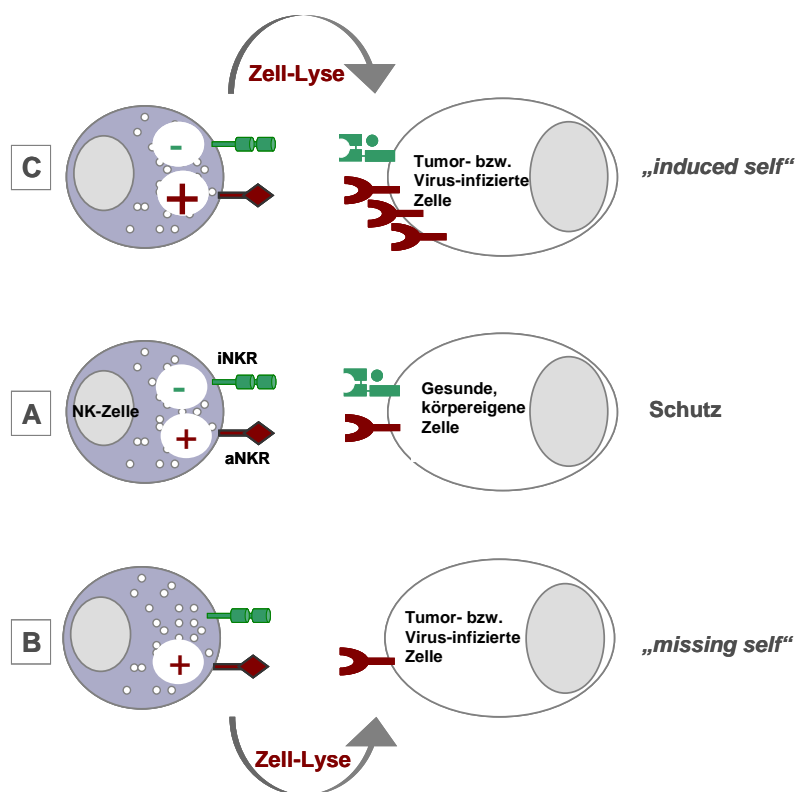


Abb. 3 Das Gleichgewicht inhibitorischer und aktivierender Signale bestimmt die Reaktivität der NK-Zellen.

Körpereigene Zellen sind im Normalfall vor einem NK-„Angriff“ geschützt, wenn sich die aktivierenden und inhibitorischen Signale, vermittelt durch die Bindung der entsprechenden Liganden auf der Zielzelle, das Gleichgewicht halten (A). Verringert sich nun die HLA-Klasse-I-Expression oder die Expression einzelner HLA-Klasse-I-Allele durch Transformation oder nach Virus-Infektion, dann entsteht ein Ungleichgewicht, da die aktivierenden Signale keine Gegenregulation mehr erhalten, und die NK-Zelle wird aktiviert, was u.a. zu Lyse der Zielzelle führen kann („*missing self*“) (B). Daneben kann es aber auch, aufgrund maligner Transformation oder Virus-Infektion, zu einer verstärkten Expression aktivierender Liganden kommen. Das inhibitorische Signal wird so „überstimmt“, was wiederum zu einer NK-Aktivierung und der Lyse der Zielzelle führt („*induced self*“) (C).

1.2.1 Aktivierende und inhibitorische NK-Rezeptoren

Inhibitorische Rezeptoren auf NK-Zellen

Die humanen inhibitorischen NK-Rezeptoren (iNKR) lassen sich in drei Gruppen unterteilen, nämlich die C-Typ-Lektin-, Ig-ähnlichen- und KIR-Rezeptoren, wobei die letzteren beiden der Ig-Superfamilie angehören (Abb. 4) (Andre, Biassoni et al. 2001). Alle iNKR besitzen in ihrem langen zytoplasmatischen Teil ein Tyrosin-haltiges inhibierendes ITIM-Motiv (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*, I/S/T/LxYxxL/V), das durch Src-Kinasen (Syk bzw. Fyn) phosphoryliert wird und so die SHP1- und SHP2-Phosphatasen an den Rezeptorkomplex rekrutiert. Diese werden wiederum durch Phosphorylierung aktiviert und führen durch eine Dephosphorylierung der Signaltransduktionskomponenten der aktivierenden Rezeptoren, wie NKG2D oder NCR, zu einer schnellen und effektiven Abschaltung aller Effektorfunktionen (Moretta, Mingari et al. 1996, Long 1999, Blery, Olcese et al. 2000, Moretta, Bottino et al. 2002, Lanier 2003).

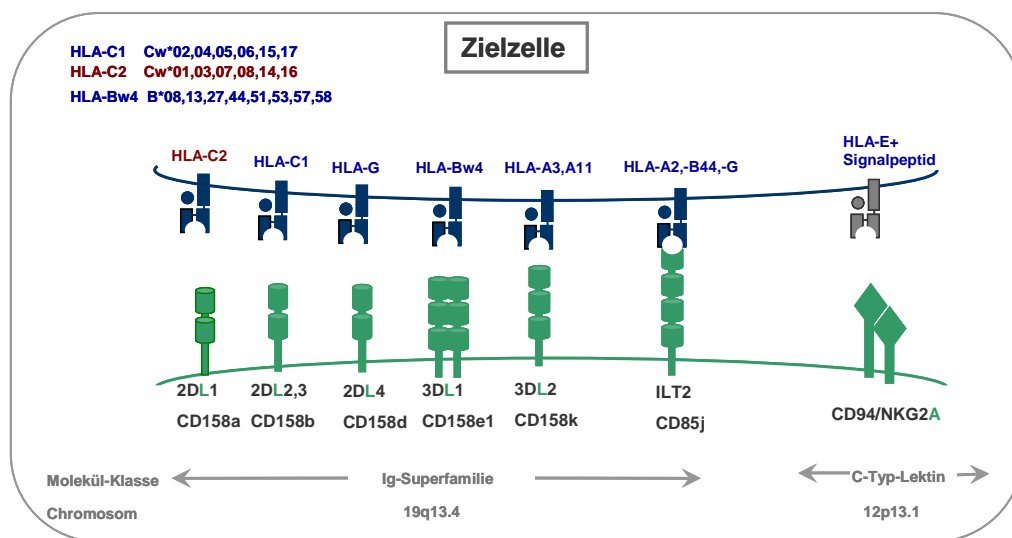


Abb. 4 Schematische Darstellung der inhibitorischen NK-Rezeptoren und ihrer Liganden.

Zur KIR-(CD158)-Familie gehören dabei 2DL1 und 2DL2,3 die an die HLA-C-Allele der C2- bzw. C1-Gruppe binden. 3DL1 erkennt die Bw4-Allele, während 3DL2 HLA-A3,11 bindet. KIR2DL4 ist ein untypischer Vertreter, da er über aktivierende und inhibierende Signalelemente verfügt. ILT2, ein Mitglied der ILT2-Familie erkennt HLA-A2, B44 und möglicherweise HLA-G. Das inhibierende Rezeptor-Heterodimer der C-Typ-Lektin-Familie CD94/NKG2A bindet das nicht-klassische-HLA-Ib-Molekül HLA-E. Alle Rezeptoren können neben NK-Zellen auch auf T-Zellen exprimiert sein, ILT2 darüber hinaus auch auf B-Zellen und Monozyten. Die Signalweiterleitung erfolgt über ITIM-Domänen im langen zytoplasmatischen Teil.

Mitglieder der KIR-(Killerzell-Immunglobulin-Rezeptoren)/CD158-Familie gehören zur Immunglobulinsuperfamilie und werden von 16 Genen kodiert, wobei KIR2DP1 und KIR3DP1 sogenannte Pseudogene sind, die nicht exprimiert werden. Die Nomenklatur dieser Rezeptoren orientiert sich an der Anzahl der extrazellulären Domänen (D) und der Länge des zytoplasmatischen Teils (*long*, L oder *short*, S). Die inhibitorischen Isoformen dieser

Rezeptoren (KIR2DL₁₋₃, KIR3DL_{1,2}) besitzen einen langen (L) zytoplasmatischen Teil und zwei bzw. drei extrazelluläre Domänen (D). KIR binden an die klassischen HLA-Klasse-Ia-Moleküle (HLA-A, -B, -C). HLA-C-Moleküle stellen die wichtigsten KIR-Liganden dar und können aufgrund zweier Aminosäuren in ihrer α 1-Domäne in zwei Gruppen eingeteilt werden (C1 und C2), die spezifisch von zwei KIR (2DL/S1 und 2DL/S2,3) erkannt werden (Abb. 5). HLA-C-Allele der C1-Gruppe (HLA-Cw*01, 03, 07, 08, 12, 14, 16) besitzen an Position 77 die Aminosäure Serin und an Position 80 Asparagin (N), bei HLA-C-Molekülen der C2-Gruppe (HLA-Cw*02, 04, 05, 06, 15, 17) befindet sich an Position 77 ein Asparagin und an Position 80 ein Lysin (K). C1-HLA-Allele werden spezifisch von KIR2DL/S2,3 erkannt, wohingegen alle C2-Allele von KIR2DL/S1 gebunden werden (Abb. 5).

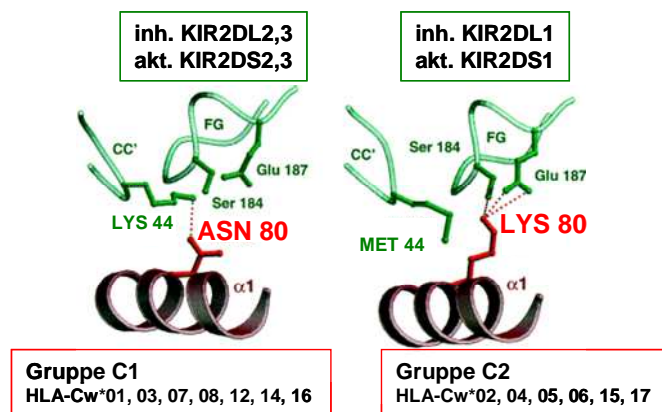


Abb. 5 Dimorphismus in der α 1-Domäne der HLA-C-Moleküle entscheidet über die KIR-Bindung.

HLA-C-Moleküle unterscheiden sich u.a. an Position 80 der α 1-Domäne, an der C1-Allele ein Asparagin und C2-Allele ein Lysin besitzen. Diese Aminosäure entscheidet, zusammen mit der Aminosäure an Position 44 der KIR-Moleküle, über die Interaktion von Rezeptor und Ligand. Die inhibitorischen KIR2DL2 und 2DL3 binden, genau wie die aktivierenden Isoformen 2DS2 und 2DS3, an HLA-C-Moleküle der C1-Gruppe. Der inhibitorische KIR2DL1 bindet, ebenso wie die aktivierende Isoform 2DS1, an HLA-C-Allele der C2-Gruppe. Dabei binden die inhibitorischen Isoformen der KIR stets mit höherer Affinität als die entsprechenden aktivierenden Isoformen. Adaptiert nach Boyington et al. (Boyington and Sun 2002).

Auch HLA-B-Allele können auf ähnliche Weise in zwei Gruppen eingeteilt werden, wobei sich die Supraepitope, HLA-Bw4 und HLA-Bw6, in der Aminosäuresequenz zwischen den Positionen 76 und 83 in der α 1-Domäne unterscheiden. KIR3DL1 bindet spezifisch an HLA-Bw4-Allele, für HLA-Bw6-Allele ist bisher noch kein Rezeptor identifiziert. KIR2DL4 besitzt sowohl eine zytoplasmatische ITIM-Domäne, aber auch einen Arginin-Rest in seiner TM, so dass es mit Fc ϵ R γ -Kette (ITAM) assoziieren kann und so inhibitorische aber auch aktivierende Signale liefern kann (Faure and Long 2002, Kikuchi-Maki, Catina et al. 2005). Der Ligand von KIR2DL4 ist das nicht-klassische-HLA-Ib-Molekül HLA-G, das möglicherweise als lösliches Monomer bindet (Rajagopalan, Bryceson et al. 2006). Die zweite Gruppe der iNKR bilden Mitglieder der C-Typ-Lektin-Rezeptoren. Der inhibitorische

Rezeptor dieser Gruppe besteht aus dem Heterodimer CD94/NKG2A, wobei CD94 das nicht-klassischen HLA-Klasse-Ib-Molekül HLA-E bindet und NKG2A mit seiner zytoplasmatischen ITIM-enthaltenden Domäne das Signal weiterleitet. HLA-E hat ein eingeschränktes Peptid-Repertoire und präsentiert einerseits die Signalpeptide der klassischen HLA-Klasse-I-Moleküle und des HLA-G-Moleküls, andererseits Peptide aus viralen Antigenen z.B. des Hepatitis-C-Virus und des humanen Cytomegalie-Virus (Falk, Mach et al. 2002, Nattermann, Nischalke et al. 2005). In der dritten Gruppe sind die Ig-ähnlichen Transkripte (*Ig-like transcripts*, ILT/LIR, CD85) zusammengefasst, die wie die KIR zur Ig-Superfamilie gehören. Diese Rezeptoren binden an mehrere, wenn nicht sogar an alle HLA-Klasse-Ia-Moleküle (HLA-A, -B, -C). Ihre genaue Spezifität ist allerdings noch nicht im Detail geklärt (Fanger, Cosman et al. 1998, Nakajima, Samaridis et al. 1999). Der auf NK-Zellen am häufigsten exprimierte Vertreter ist ILT2 (LIR-1), der unter anderem das HLA-Klasse-Ib-Molekül HLA-G erkennt und neben NK-Zellen auch auf manchen T-Zellen, B-Zellen und Monozyten exprimiert sein kann (Lopez-Botet, Navarro et al. 1999, Navarro, Llano et al. 1999, Hofmeister and Weiss 2003, Shiroishi, Tsumoto et al. 2003). Die Vielfalt an iNKR in Kombination mit ihrer unterschiedlichen Spezifität für HLA-Klasse-I-Liganden ermöglicht es NK-Zellen, geringe Unterschiede in der HLA-Klasse-I-Expression einer Zielzelle auf Allelniveau wahrzunehmen, und gegebenenfalls mit einem „Angriff“ in Form von Zytotoxizität und/oder Zytokinproduktion auf veränderte Zellen zu reagieren.

Aktivierende Rezeptoren auf NK-Zellen

Dieser Vielzahl an iNKR stehen mindestens ebenso viele aktivierende Rezeptoren (aNKR) gegenüber (Abb. 6) (Lanier 2005, Bottino, Moretta et al. 2006). Die Weiterleitung der positiven Signale nach Ligandenbindung erfolgt für die aktivierenden Rezeptoren nicht über rezeptorinterne Motive, wie es bei den inhibierenden Rezeptoren über die ITIM der Fall ist, sondern über eine Assoziation mit Signal-Adaptermolekülen durch positiv-geladene Aminosäuren in der Transmembrandomäne der aNKR. Zur Signalweiterleitung ins Zellinnere besitzen die Adaptermoleküle entweder ITAM-(*immunoreceptor tyrosin-based activating motifs*)-Domänen, die nach Tyrosin-Phosphorylierung zu einer Rekrutierung und Aktivierung von Kinasen und letztendlich einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen (Vivier, Nunes et al. 2004) oder andere Nicht-ITAM-Signalmotive (Bryceson, March et al. 2006).

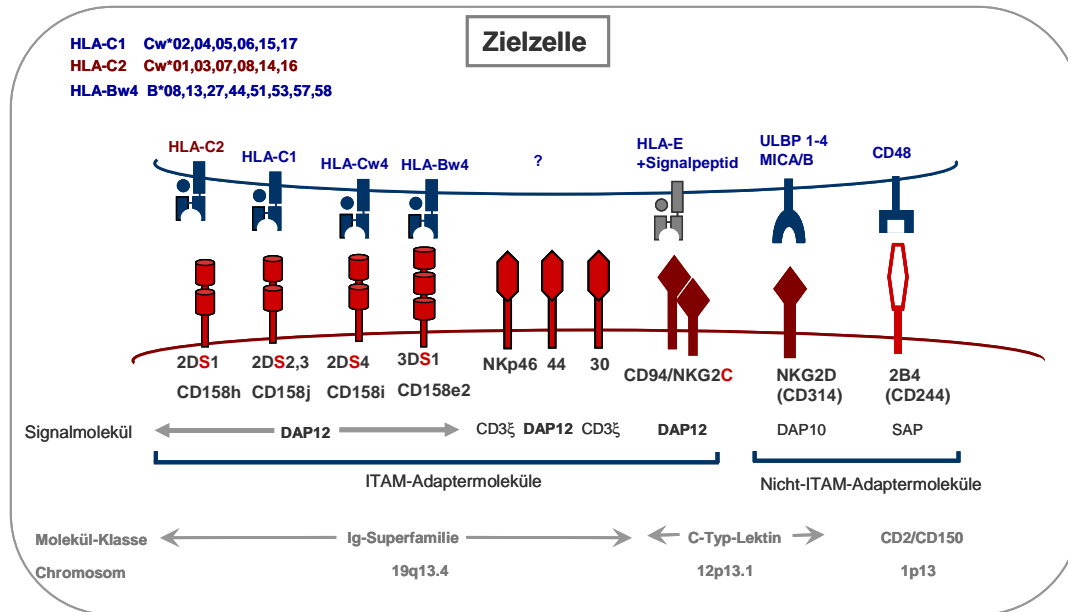


Abb. 6 Schematische Darstellung der aktivierenden Rezeptoren und ihrer Liganden.

Die kurzen Isoformen der KIR2DS/3DS-Moleküle erkennen, mit Ausnahme von 2DS4, dieselben HLA-C und B-Gruppen wie ihre inhibitorischen Pendanten. Für die NCRs ist die Ligandenspezifität nicht eindeutig geklärt. CD94 kann neben NKG2A auch mit dem aktivierenden NKG2C-Rezeptor Heterodimere bilden, wobei auch hier HLA-E erkannt wird. Zur Signalweiterleitung assoziieren diese aktivierenden Rezeptoren über geladene Aminosäuren in ihrer TM-Domäne mit Adaptermolekülen wie DAP12, die eine oder mehrere ITAM-Domänen besitzen. NKG2D erkennt die MHC-ähnlichen Moleküle MICA/B und ULBP1-4 und assoziiert mit DAP10, das über eine PI3K-Bindestelle verfügt. 2B4 bindet CD48 und leitet die Signale über SAP weiter. Auch diese Rezeptoren können auf T-Zell-Subpopulationen exprimiert werden.

Zu den ITAM-abhängigen Rezeptoren zählen Mitglieder der KIR-Familie (KIR2DS, KIR3DS), die im Gegensatz zu den inhibitorischen Isoformen nur einen kurzen zyttoplasmatischen Teil (short, S) besitzen, aber eine identische extrazelluläre Domäne aufweisen. Deshalb besitzen die aktivierenden KIR, bis auf wenige Ausnahmen, dieselbe Ligandenspezifität wie ihre inhibitorischen Gegenstücke, jedoch ist die Affinität der inhibitorischen KIR für ihre HLA-Klasse-Ia-Liganden im Vergleich zur Affinität der aktivierenden KIR höher (Abb. 5)(Saulquin, Gastinel et al. 2003). Zur Signalweiterleitung assoziieren aktivierende KIR mit dem ITAM-tragenden Adaptermolekül DAP12. Eine zweite Gruppe von ITAM-abhängigen Rezeptoren bildet das C-Typ-Lektin Rezeptor- Heterodimer CD94/NKG2C, welches ebenfalls das nicht-klassische HLA-E-Molekül erkennt (Lazetic, Chang et al. 1996, Braud, Allan et al. 1998, Lopez-Botet, Llano et al. 2000). NKG2C unterscheidet sich von seinem inhibitorischen Pendant NKG2A ebenfalls nur im zyttoplasmatischen Anteil, dem ITIM-Sequenzen fehlen. NKG2C bindet dafür mit seinen positiven Aminosäuren in der TM-Region an das Adaptermolekül DAP12. Die dritte Gruppe bildet die Familie der Natürlichen-Zytotoxizitäts-Rezeptoren (natural cytotoxicity receptors, NCR) (Moretta, Bottino et al. 2001), deren Vertreter zur Ig-Superfamilie gehören und die bisher einzig bekannten spezifischen NK-Zell-Rezeptoren darstellen. NKp46 (CD335) und NKp30 (CD337) werden auf allen NK-Zellen konstitutiv, NKp44 (CD336) dagegen nur nach

Aktivierung, z.B. mit IL-2, exprimiert (Vitale, Bottino et al. 1998). Liganden der NCR sind noch nicht eindeutig identifiziert, es gibt aber Anhaltspunkte für eine Bindung von viralem Hämagglutinin durch NKp46 (Mandelboim, Lieberman et al. 2001, Arnon, Achdout et al. 2004). Die Weiterleitung der aktivierenden Signale der NCR erfolgt über die Adaptermoleküle DAP12 (NKp44) bzw. CD3 ζ und Fc ϵ RI γ (NKp30 und NKp46). Der ursprünglich als NK-Marker definierte Fc γ RIIIA-Rezeptor (CD16) bindet mit niedriger Affinität an den Fc-Teil zellgebundener IgG-Moleküle bzw. Immunkomplexe und löst damit die sogenannte Antikörper-abhängige Zell-Zytotoxizität (*antibody-dependent cell cytotoxicity*, ADCC) aus. CD16 signalisiert genau wie NKp30 und NKp46 durch Fc ϵ RI γ - und CD3 ζ -Ketten (Radaev, Motyka et al. 2001). Eine weitere Gruppe bilden aktivierende Rezeptoren, die ITAM-unabhängig positive Signale weiterleiten. Dazu zählt das Homodimer NKG2D (CD314), das die MHC-Klasse-I-ähnlichen Moleküle MICA/B und ULBP1-4 bindet, und einen weiteren Vertreter der C-Typ-Lektin-Familie darstellt (Vivier, Tomasello et al. 2002, Cerwenka and Lanier 2003, Raulet 2003). NKG2D wird auf allen NK-Zellen, CD8 $^+$ $\alpha\beta^+$ - und $\gamma\delta^+$ -T-Zellen exprimiert (Raulet 2003). Dieser Rezeptor wirkt zwar auf NK-Zellen als autonomer aktivierender Rezeptor, auf T-Zellen scheint NKG2D jedoch nur kostimulierende Eigenschaften zu besitzen und kann alleine keine Aktivität vermitteln (Billadeau, Upshaw et al. 2003, Zompi, Hamerman et al. 2003). NKG2D ist mit dem DAP12 verwandten Adaptermolekül DAP10 assoziiert (Lanier 2005) und stellt im Maussystem einen wichtigen NK-Rezeptor in der Tumorüberwachung dar, da seine Liganden auf vielen Tumoren exprimiert werden. Im humanen System ist NKG2D von besonderem Interesse, da einige Tumore NKG2D-Liganden exprimieren und lösliche NKG2D-Liganden in Seren von Tumorpatienten nachweisbar sind, was mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Groh, Wu et al. 2002, Salih, Rammensee et al. 2002). Daher wurde in dieser Arbeit der Fokus in der Untersuchung der Tumor-NK-Zell-Interaktion auf die Regulation der NKG2D-Liganden auf den Tumorzellen gelegt.

Ein Vertreter der CD2/CD150-Familie ist 2B4 (CD244) mit seinem Liganden CD48, der auf allen hämatopoetischen Zellen exprimiert ist (Brown, Boles et al. 1998). 2B4 besitzt zytoplasmatische *immuno-tyrosine-based switch-motifs* (ITSMs), die das SLAM-assoziierte Protein (SAP) und die Kinase Fyn rekrutieren, und damit eigene Signalwege beschreiten können (Chen, Relouzat et al. 2004, Eissmann, Beauchamp et al. 2005). 2B4 wurde als Korezeptor für NK- und T-Zellen identifiziert, wobei sich die Signalübertragung von 2B4 grundlegend von der typischen Tyrosinphosphorylierungskaskade der anderen aNKR unterscheidet, da das Adaptermolekül SAP das Signal in den Phosphatidylinositol-3-Kinase-

(PI3K)-Weg weiterleitet. Neben diesen, in meiner Arbeit phänotypisch und funktionell untersuchten aNKR, existieren weitere z. B. CD2, NTB-A, DNAM-1, CD44, NKp80 (Bryceson, March et al. 2006), auf die jedoch nicht im Detail eingegangen wird.

Die meisten der bisher erwähnten iNKR und aNKR befinden sich im humanen Genom in zwei Genregionen. Alle Gene der KIR-Familie und der ILT-Familie (Young, Canavez et al. 2001) sowie die Adaptermoleküle DAP10 und DAP12 sind im Leukozyten-Rezeptor-Komplex (*leucocyte receptor complex*, LRC) auf Chromosom 19q13.4 kodiert. NKp46 und ein KIR-verwandter Rezeptor, LAIR-1, sind ebenfalls in dieser Gen-Region kodiert (Meyaard, Adema et al. 1997). Im Natürlichen-Killerzell-Komplex (*natural killer cell complex*, NKC) auf Chromosom 12p13.1 sind alle Gene der C-Typ-Lektin-Familie, einschließlich der beiden Aktivierungsrezeptoren CD161 und CD69, lokalisiert. Der Rezeptor 2B4 (CD244) wird nicht im LRC oder NKC, sondern auf Chromosom 1p13 kodiert.

1.2.2 Periphere NK-Subpopulationen

Humane NK-Zellen im peripheren Blut lassen sich aufgrund ihrer Expressionsdichte von CD56 (*neural cell adhesion molecule*, N-CAM) und CD16 in zwei Hauptpopulationen unterteilen (Lanier, Le et al. 1986, Gottschalk, Bray et al. 1990), die für unterschiedliche Effektorfunktionen verantwortlich sein sollen (Jacobs, Stoll et al. 1992, Cooper, Fehniger et al. 2001). CD56 selbst besitzt keine bekannte Funktion auf humanen NK-Zellen (Lanier, Testi et al. 1989), da kein homologes Protein auf murinen NK-Zellen vorhanden ist, kann die funktionelle Relevanz vernachlässigt werden (Cooper, Fehniger et al. 2001). Die CD56 hoch exprimierenden und hauptsächlich CD16 negativen „CD56^{bright}/CD16⁻“-NK-Zellen machen etwa 10 % der peripheren NK-Zellen aus und verfügen über ein schwaches zytotoxisches Potential, können aber hohe Mengen an Zytokinen wie IFN- γ und TNF- α sezernieren (Jacobs, Stoll et al. 1992, Cooper, Fehniger et al. 2001). Dadurch wird ihnen eine eher regulatorische Funktion durch die Zytokin-vermittelte Beeinflussung der nachfolgenden spezifischen Immunantwort zugeschrieben. Diese Subpopulation exprimiert hauptsächlich das inhibitorische Heterodimer CD94/NKG2A, selten jedoch KIR bzw. ILT2 (Abb. 7)(Colonna, Navarro et al. 1997, Cooper, Fehniger et al. 2001).

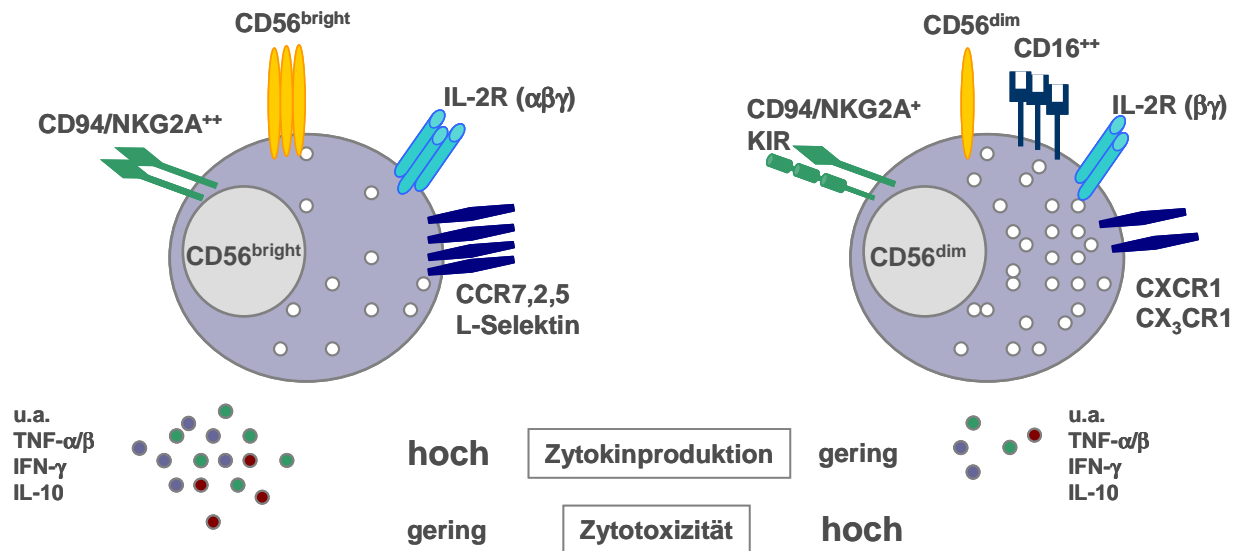


Abb. 7 Schematische Darstellung der unterschiedlichen Oberflächenexpression und Funktion der beiden NK-Zell-Subpopulationen $CD56^{bright}/CD16^{-}$ und $CD56^{dim}/CD16^{+}$.

Die beiden NK-Zell-Subpopulationen unterscheiden sich vor allem in der Expression von CD56, CD16 und den inhibitorischen Rezeptoren für Selbst-HLA-Klasse-I-Moleküle. Dabei exprimieren $CD56^{bright}$ -NK-Zellen das inhibitorische Heterodimer CD94/NKG2A für HLA-E, aber keine KIR. Die Expression von KIR ist, genau wie der CD16-Rezeptor, auf die $CD56^{dim}$ -NK-Population beschränkt. Daneben besitzen Zellen beider Populationen verschiedenen Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle, wobei hier nur die wichtigsten dargestellt sind, u.a. CCR7 und CXCR1. Aufgrund der höheren Expression von zytotoxischen Granula in den $CD56^{dim}$ -NK-Zellen wird ihnen eine vorrangig zytotoxische Funktion zugeschrieben, wogegen $CD56^{bright}$ -NK-Zellen vor allem für eine Zytokinproduktion verantwortlich sein sollen.

Daneben besitzen etwa 90 % der peripheren NK-Zellen, „ $CD56^{dim}$ “-NK-Zellen, eine geringere Expression von CD56, dafür aber in hoher Dichte den CD16-Rezeptor (Fc γ RIIIA) und ungefähr 10-mal mehr Perforin in den lytischen Granula als $CD56^{bright}$ -NK-Zellen (Jacobs, Hintzen et al. 2001). Die KIR-Rezeptoren und ILT2 sind fast ausschließlich auf $CD56^{dim}$ -NK-Zellen exprimiert, wofür diese eine geringere Expression des CD94/NKG2A-Heterodimers besitzen. Die komplementäre Funktion dieser inhibitorischen Rezeptoren für die Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz konnte auch auf klonaler Ebene gezeigt werden (Valiante, Uhrberg et al. 1997, Parham 2006). Die $CD56^{dim}/CD16^{+}$ -NK-Subpopulation besitzt vorrangig zytotoxische Eigenschaften und wird daher als Haupt-Effektorzelle in der Eliminierung von Virus-infizierten und entarteten Zellen betrachtet. Andere aktivierende NK-Rezeptoren wie NKG2D und die NCRs (NKp30, 44, 46) zeigen eine vergleichbare Expression auf beiden Subpopulationen (Bauer, Groh et al. 1999, Sivori, Parolini et al. 2000). Beide NK-Subpopulationen weisen auch ein unterschiedliches Repertoire an Zytokin- und Chemokinrezeptoren sowie Adhäsionsmolekülen auf. Die auf $CD56^{bright}$ -NK-Zellen beschränkte Expression von CCR7 (CC-Chemokin-Rezeptor 7) und CD62L (L-Selektin), welche die Migration von Zellen in sekundäre lymphatische Organe ermöglichen, ist für die Anreicherung dieser Subpopulation in Lymphknoten (75 %) und Milz (50 %) verantwortlich, wobei dies auch ohne eine Entzündungsreaktion der Fall ist (Frey, Packianathan et al. 1998,

Campbell, Qin et al. 2001, Ferlazzo, Thomas et al. 2004). Dabei sind die NK-Zellen auch in den perifollikulären T-Zellzonen zu finden, wo sie mit DCs und T-Zellen interagieren können (Fehniger, Cooper et al. 2003, Ferlazzo, Pack et al. 2004, Gregoire, Chasson et al. 2007). Die Tatsache, dass in Lymphknoten NK- und T-Zellen zusammentreffen, könnte die konstitutive Expression des hoch affinen IL-2-Rezeptors ($\alpha\beta\gamma$ -Ketten) auf CD56^{bright}-NK-Zellen erklären, da IL-2 vorrangig von T-Zellen produziert wird, und somit einen Hinweis auf eine Interaktion dieser Zellen bei der Immunantwort darstellen (Fehniger, Cooper et al. 2003). Aufgrund der exprimierten Chemokinrezeptoren, u.a. CCR2, CCR5 bzw. CX₃CR1 werden NK-Zellen darüber hinaus auch zu Entzündungsherden und Orten der Tumorentstehung rekrutiert, wobei das vorrangig für die CD56^{bright}/CD16⁻-Subpopulation der Fall ist (Dalbeth, Gundle et al. 2004, Ottaviani, Nasorri et al. 2006, Schleypen, Baur et al. 2006, Carrega, Morandi et al. 2008). Untersuchungen mit frischen unstimulierten NK-Zellen konnten zeigen, dass nur eine Minderheit aller NK-Zellen ohne vorherige Stimulation auf HLA-Klasse-I-negative Zielzellen mit Zytokinsekretion und/oder Zytotoxizität reagiert, wobei dabei fast alle der CD56^{dim}-Fraktion angehörten (Anfossi, Andre et al. 2006), so dass der Begriff der „Natürlichen“ Killerzelle in Frage zu stellen ist. Eine Voraktivierung mit IL-2 bzw. IL-12 induziert in CD56^{bright}-NK-Zellen eine den CD56^{dim}-NK-Zellen vergleichbare zytotoxische Aktivität (Caligiuri, Zmuidzinas et al. 1990, Nagler, Lanier et al. 1990, Robertson, Soiffer et al. 1992, Cooper, Fehniger et al. 2001). Prinzipiell sind alle NK-Zellen fähig, Zytokine zu produzieren, wobei die Art des dazu nötigen Stimulus sich unter den NK-Subpopulationen unterscheidet, da CD56^{bright}-NK-Zellen auf eine IL-12 bzw. IL-15-Stimulation sensibler reagieren, während dies bei CD56^{dim}-NK-Zellen für HLA-Klasse-I-negative Zielzellen der Fall ist. Daher werden die NK-Subpopulationen nun eher als „Zytokin-sensitiv“ und „Zielzell-sensitiv“ bezeichnet (Anfossi, Andre et al. 2006). Da CD56^{bright}-NK-Zellen *in vitro* nach Stimulation mit PMA/Ionomycin mehr Zytokine als CD56^{dim}-NK-Zellen produzieren, was auf eine höhere intrinsische Fähigkeit zur Zytokinproduktion hinweist, ist die Frage der unterschiedlichen Funktion in Abhängigkeit des Phänotyps noch nicht abschließend geklärt (Cooper, Fehniger et al. 2001). Trotz dieser vielen Rezeptoren fehlt immer noch ein differentieller Marker, der entweder für die Funktion oder die Migration in lymphatische oder entzündliche Gewebe charakteristisch ist. In dieser Arbeit wurde daher ein weiterer Marker, nämlich der auf T-Zellen seit langem bekannte Kostimulationsrezeptor CD6, in die Fragestellung der Korrelation von NK-Phänotyp und -Funktion einbezogen. CD6 ist ein Typ-B-Scavenger-Rezeptor-Glykoprotein, das vor allem auf T-Zellen, Thymozyten und einigen B-Zellen exprimiert ist (Mayer, Funke et al. 1990, Aruffo, Bowen et al. 1997, Singer, Fox et al. 2002)

und wahrscheinlich als kostimulierendes Molekül in der T-Zell-Aktivierung und Thymozyten-Reifung fungiert (Morimoto, Rudd et al. 1988, Singer, Richardson et al. 1996, Hassan, Barclay et al. 2004). CD6 besitzt in seiner extrazellulären Domäne drei Scavenger-Rezeptor-Cystein-reiche-(SRCR)-Domänen, wobei die membranständige Domäne mit ALCAM (*activated leukocyte cell adhesion molecule*) (CD166) interagiert (Bowen, Bajorath et al. 1996, Zimmerman, Joosten et al. 2006). ALCAM ist ein Adhäsionsmolekül der Ig-Superfamilie und wird u.a. auf aktivierten T- und B-Lymphozyten, Monozyten, aber auch Thymus-Epithel, Keratinozyten, Endothel und Neuronen exprimiert (Bowen, Patel et al. 1995), wobei die Expression von ALCAM auch durch pro-inflammatorische Zytokine induziert werden kann (Cayrol, Wosik et al. 2008). Die intrazellulären Signale, die nach Bindung von CD6 an ALCAM ablaufen, sind bis heute nicht eindeutig geklärt.

2 Tumorentstehung durch Umgehung zellinterner und externer Kontrollelemente

Die in Kapitel 1 beschriebenen Effektorzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems sind nicht nur für die Infektionsabwehr von Bedeutung, sondern spielen auch bei der Kontrolle maligner, entarteter Zellen eine große Rolle. Durch äußere Einflüsse induzierte oder spontane Mutationen führen nur in den seltensten Fällen zur Entstehung von Tumoren und damit zur Manifestation der malignen Transformation. Der Hauptgrund hierfür sind zunächst effiziente, zellinterne Systeme, die solche Veränderungen reparieren oder geschädigte Zellen eliminieren. Versagen diese zellinternen Mechanismen, kommt das Immunsystem als externe Kontrollinstanz zum Einsatz. Aber auch diese Systeme sind manchmal nicht ausreichend, um die Transformation normaler Körperzellen in bösartige und invasive Tumorzellen bzw. deren Verbreitung zu verhindern. Daher wurde in dieser Arbeit am Beispiel des Kolon-Karzinoms untersucht, ob die Mechanismen, die einer Tumorzelle Eigenschaften wie ungehemmtes Wachstum und Gewebewanderung vermitteln, auch direkt an der geringen Immunerkennung der Tumorzellen durch ZTL und NK-Zellen beteiligt sind.

2.1 Überwindung zellinterner Kontrollmechanismen am Beispiel des Kolon-Karzinoms

Die Umwandlung einer normalen Zelle in eine Tumorzelle ist keine Folge eines einmaligen Mutationsereignisses, sondern ein mehrstufiger Prozess (Hanahan and Weinberg 2000). In der Regel tritt dabei eine Aktivierung von Proto-Onkogenen, die regulatorische Proteine des Zellzyklus bzw. -Differenzierung kodieren, zusammen mit einer Inaktivierung von

Tumorsuppressoren und/oder pro-apoptotischen Genen auf. Daran sind sowohl epigenetische Veränderungen, wie DNS-Methylierungen und Histonmodifikationen, als auch genetische Veränderungen, wie DNS-Mutationen, beteiligt. Das DNS-Methylierungsmuster in Tumorzellen weist im Vergleich zu nicht malignen Gewebezellen Unterschiede auf, wobei neben einer geringen Gesamt-DNS-Methylierung lokal starke Methylierungen von CpG-Inseln in Promotorbereichen tumorsuppressiver Gene zu beobachten sind, die meist mit einer Geninaktivierung einhergehen (Jones and Laird 1999, Baylin and Herman 2000, Feinberg and Tycko 2004). Diese epigenetischen Veränderungen sind wahrscheinlich bereits an den initialen Schritten der Karzinogenese beteiligt und schaffen neben der veränderten Transkription von Genen die Voraussetzungen für DNS-Mutationen, die dann zur Manifestation des transformierten Phänotyps führen (Grady and Markowitz 2002, Baylin and Ohm 2006, Feinberg, Ohlsson et al. 2006). Bereits in präinvasiven Stadien des Kolon-Karzinoms werden einige normalerweise unmethylierte Gene, wie z.B. der Tumorsuppressor p16^{INK4A}, durch Methylierung inaktiviert und erlauben so ein unkontrolliertes Wachstum und die klonale Expansion transformierter Zellen. Der gleichzeitig auftretende Verlust der DNS-Methylierung in diesen Zellen führt zu genetischer Instabilität, da er in repetitiven Elementen, die normalerweise stark methyliert sind, zu erhöhter Transkription führt (Robertson 2001, Cadieux, Ching et al. 2006). Das unkontrollierte Wachstum und die genetische Instabilität erlauben ein vermehrtes Auftreten von Mutationen der DNS, die an der Aufrechterhaltung der Transformation beteiligt sind (Grady and Markowitz 2002, Jones and Baylin 2007).

In ihrem „Leitartikel“ der Tumorgenese fordern Hanahan und Weinberg das gleichzeitige Auftreten von mindestens sechs essentiellen Veränderungen, um eine normale Zelle in eine maligne und invasive Tumorzelle zu verwandeln (Hanahan and Weinberg 2000). Diese Veränderungen umfassen u.a. die Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen, was im Kolon-Karzinom hauptsächlich durch eine aktivierende Mutation in den Signalproteinen K-RAS bzw. B-Raf erreicht wird, und die Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden und Differenzierungs-Signalen bedeutet. Darüber hinaus wird eine Resistenz gegen den programmierten Zelltod (Apoptose) als Voraussetzung postuliert. Der Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens *APC* (*adenomatous polyposis coli*) durch Mutation, und die daraus resultierende Überaktivierung des Wingless/Wnt-Signalweges durch eine Anhäufung von β -Catenin, zählt zu den ersten manifestierten Veränderungen im Kolon-Karzinom (Grady and Markowitz 2002). In vielen Kolon-Karzinomen tritt zudem eine Mutation im Tumorsuppressorgen p53 auf, vor allem in der DNS-Bindungsdomäne, die den Zellen u.a. eine Apoptose-Resistenz verleiht. Durch das Ausschalten dieser wichtigen

Kontrollmechanismen besitzen transformierte Zellen dann die Fähigkeit zu unbegrenzter Zellteilung. In einem fortgeschrittenen Stadium der Tumorentwicklung muss die Versorgung der Tumorzellen mit Nährstoffen und Sauerstoff sichergestellt werden, wozu eine Neubildung von Gefäßen (Angiogenese) nötig ist, die zum Beispiel durch Sekretion des Wachstumsfaktors VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und Bindung an den VEGF-Rezeptor auf Endothelzellen vermittelt wird. Da in einem Gewebe mit der Zeit sowohl der Platz als auch die Versorgung mit Nährstoffen limitierende Faktoren für das Tumorwachstum darstellen, wandern Tumorzellen in andere Gewebe aus (Metastasierung), wobei nicht alle Tumorentitäten von Metastasenbildung begleitet sind. Die Gewebeauswanderung wird häufig durch einen Verlust von Zelladhäsionsmolekülen wie E-Cadherin ausgelöst, die normalerweise eine Einbindung in das umgebende Gewebe sicherstellen. Zusätzlich werden Matrix-abbauende Proteasen induziert, die eine Wanderung der Zellen durch Epithelschichten, Blutgefäße und Stroma erlauben (Hanahan and Weinberg 2000). Wurden durch Mutation und epigenetische Regulation all diese zellinternen Mechanismen überwunden und eine ungehinderte Proliferation der Tumorzellen möglich gemacht, dann kommt das Immunsystem als zweite große Barriere in der Verhinderung der Tumorentstehung zum Einsatz, dessen Effektorzellen bereits dargestellt wurden (Dunn, Old et al. 2004).

DNS-Methylierung und Transkriptionskontrolle

Die in der DNS kodierte Information wird durch epigenetische Modifikationen zusätzlich reguliert, indem diese vorgeben wann, wie und wo die genetische Information transkribiert und in Proteine translatiert, und damit erst für eine Zelle nutzbar gemacht wird (Robertson 2001). Dies geschieht in Säugerzellen hauptsächlich über eine Methylierung von Cytosin an der 5'-Position, vor allem in sogenannten CpG-Inseln, die in den Promotoren von ca. 60 % aller Gene vorhanden sind und im menschlichen Genom auf ca. 45.000 CpG-Inseln geschätzt werden (Robertson 2001, Takai and Jones 2002). Dabei lag der Fokus bis vor kurzem allein auf den CpG-Insel-haltigen Promotoren, da hier eine inverse Korrelation zwischen Methylierung und Transkriptionsrate bereits mechanistisch gezeigt werden konnte (Takai and Jones 2002). Es gibt aber Hinweise, dass auch Gene ohne CpG-Inseln im Promotor durch Methylierung reguliert werden (Futscher, Oshiro et al. 2002).

In Säugerzellen sind bisher drei DNS-Methyltransferasen (DNMT) identifiziert worden, die für die Cytosin-Methylierung verantwortlich sind: DNMT1 (Bestor, Laudano et al. 1988), DNMT3a und 3b (Okano, Xie et al. 1998), darüber hinaus existiert auch eine vierte, DNMT2, deren katalytische Aktivität aber bis heute weder *in vitro* noch *in vivo* gezeigt werden konnte

(Okano, Xie et al. 1998, Yoder and Bestor 1998). DNMT1, die in somatischen Zellen häufigste DNMT (Robertson, Uzvolgyi et al. 1999), zeigt eine 10- bis 40-fach höhere Präferenz für hemi-methylierte CpG-Inseln (Pradhan, Bacolla et al. 1999) und interagiert mit dem PCN-Antigen (*proliferating cell nuclear antigen*), weswegen sie an der Replikationsgabel und an DNS-Reparaturstellen lokalisiert ist (Leonhardt, Page et al. 1992, Chuang, Ian et al. 1997, Margot, Cardoso et al. 2001, Mortusewicz, Schermelleh et al. 2005). Aufgrund dieser Eigenschaften wird die DNMT1 als die sogenannte „*maintenance*“-DNMT bezeichnet, da sie das bestehende DNS-Methylierungs-Muster bei jeder Replikationsrunde an den neu-synthetisierten DNS-Strang weitergibt, weswegen sie für eine normale embryonale Entwicklung, die Zell-Differenzierung, das Gen-Imprinting und die X-Chromosom-Inaktivierung nötig ist (Beard, Li et al. 1995, Jackson, Krassowska et al. 2004). In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass DNMT3a und 3b für eine *de novo*-Methylierung im Zuge einer Embryo-Implantierung oder von neu in das Genom integrierten, retroviralen Sequenzen in Maus-Stammzellen benötigt werden (Okano, Bell et al. 1999). Dabei binden beide Enzyme gleichermaßen an hemi-methylierte und unmethylierte Sequenzen und werden deshalb als „*de novo*“-DNMT klassifiziert (Okano, Xie et al. 1998). Enzyme der DNMT3-Familie zeigen im Vergleich zu DNMT1 eine etwa 20-fach schwächere katalytische Aktivität (Okano, Xie et al. 1998).

In nicht transformierten Zellen liegen die meisten CpG-Motive in Promotorbereichen von Genen unmethyliert vor und sind dadurch frei zugänglich für die Bestandteile der Transkriptionsmaschinerie, wie Transkriptionsfaktoren (TFs) und RNS-Polymerasen (Yoder, Walsh et al. 1997, Robertson and Wolffe 2000). Eine Methylierung in den Promotorregionen führt meist zu einer Inaktivierung des nachgeschalteten Gens, wobei es dafür mehrere mechanistische Erklärungen gibt (Eden, Hashimshony et al. 1998, Jones and Laird 1999). Die Methylierung von CpG-Inseln kann die Bindung einiger TF verhindern, welche CpG-Dinukleotide in ihrer Bindungsdomäne tragen. Dieser Mechanismus ist aber eher als Ausnahme zu betrachten, da er nur wenige der bekannten TF betrifft und auch keine Erklärung für eine Inaktivierung großer Domänen oder ganzer Chromosomen, wie dem X-Chromosom bietet (Tate and Bird 1993). Ein weiterer Mechanismus ist die selektive Bindung einiger Proteine an methylierte DNS-Sequenzen. Diese Proteine besitzen eine sogenannte Methyl-CpG-Binde-Domäne (MBD) und eine Transkriptions-Repressions-Domäne (TRD) und können durch Bindung an die methylierten Promotoren den Zutritt anderer TFs sterisch blockieren (Lewis, Meehan et al. 1992, Robertson 2001). Einige dieser Proteine, z.B. MeCP2 und MBD1-3, können darüber hinaus Histon-Deacetylasen (HDACs) zu den methylierten

Promotoren rekrutieren (Jones, Veenstra et al. 1998, Nan, Ng et al. 1998). Acetylierung von ϵ -Amino-Gruppen in konservierten Lysin-(K)-Resten der Histone (z. B. Histon-H3-K(9,14,18,23) und Histon-H4-K(5,8,12,16)) verringert durch eine Neutralisierung der basischen Ladung, die Affinität der Histone zur umgebenden negativ-geladenen DNS, und führt damit zu einer offenen Chromatinstruktur (Euchromatin), was die Bindung des Transkriptionsapparates und eine Genablesung erlaubt (Peterson and Workman 2000, Becker and Horz 2002). Wird diese Acetylierung durch HDAC enzymatisch entfernt, erfolgt der gegenteilige Effekt, nämlich eine engere Packung der DNS in Nucleosomen (Heterochromatin) (Robertson and Wolffe 2000). Dieses Zusammenspiel von DNS-Methylierung und Histon-Acetylierung zeigt sich auch durch die drastische Steigerung der Transkription sonst stillgelegter Gene durch gleichzeitigen Einsatz von DNMT- und HDAC-Inhibitoren (Cameron, Bachman et al. 1999). DNMT1 kann darüber hinaus auch direkt mit HDACs interagieren, wobei die genaue Auswirkung auf die Regulation der Transkription noch nicht geklärt ist (Fuks, Burgers et al. 2000, Robertson, Ait-Si-Ali et al. 2000, Rountree, Bachman et al. 2000). Vorstellbar ist aber eine Histon-Acetylierung als Voraussetzung für eine DNS-Methylierung, oder eine doppelte Funktion der DNMT1 als „CpG-Methylierer“ und HDAC-rekrutierendes Protein. In beiden Fällen würde die DNS nach Methylierung von Methyl-Binde-Proteinen gebunden und damit weitere HDACs rekrutiert werden, die den repressiven Status aufrechterhalten. Welcher Mechanismus die veränderte spezifische CpG-Methylierung in Tumoren reguliert ist noch nicht genau bekannt, da DNMTs relativ unspezifisch sind und anscheinend nur auf das Vorhandensein von CpG-Dinukleotiden als Erkennungssequenz angewiesen sind (Robertson 2001). In dieser Arbeit wurde daher gezielt die Auswirkung der veränderten DNS-Methylierung in Tumorzellen auf die Immunerkennung durch ZTLs und NK-Zellen anhand verschiedener DNMT-Deletions-Varianten der Kolon-Karzinom-Zelllinie HCT116 untersucht.

RAS-Proteine und onkogene Signaltransduktion

Mitglieder der RAS-Familie (H-RAS, K-RAS, N-RAS) sind hoch-konservierte, 21 kDa große Proteine, welche die Weiterleitung extrazellulärer Signale zu zellinternen Signalkaskaden regulieren, und ein großes transformierendes Potential besitzen (Barbacid 1987, Bourne, Sanders et al. 1990, Lowy and Willumsen 1993). RAS-Proteine sind GTPasen und wechseln zwischen zwei Aktivierungszuständen, der aktiven, GTP-gebundenen und der inaktiven, GDP-gebundenen Form (Barbacid 1987, Lowy and Willumsen 1993, Herrmann 2003). Reguliert wird der Aktivierungszustand der durch GEF (*guanine nucleotide exchange*

factors), die eine Abkopplung von GDP herbeiführen, was durch die hohe GTP-Konzentration in der Zelle zu einer Bildung von RAS-GTP führt (Quilliam, Khosravi-Far et al. 1995, Repasky, Chenette et al. 2004, Dhillon, Hagan et al. 2007). RAS-GTP besitzt eine veränderte Konformation, wodurch die Bindung und Aktivierung verschiedenster Effektormoleküle erfolgen kann (Abb. 8). Das aktivierende Signal wird durch sogenannte GAPs (*GTPase activating proteins*) abgeschaltet, die zu einer Spaltung von GTP und damit der inaktiven RAS-GDP Form führen, indem sie die schwache intrinsische GTPase-Aktivität von RAS verstärken (Bollag and McCormick 1992, Repasky, Chenette et al. 2004). Die Aktivität der GEF und GAP wird von verschiedenen Oberflächenrezeptoren wie Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs), G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, Integrinen und Zytokin-Rezeptoren wie IL-2-Rezeptor reguliert (Sato, Endo et al. 1990, Rozakis-Adcock, Fernley et al. 1993, van Biesen, Hawes et al. 1995).

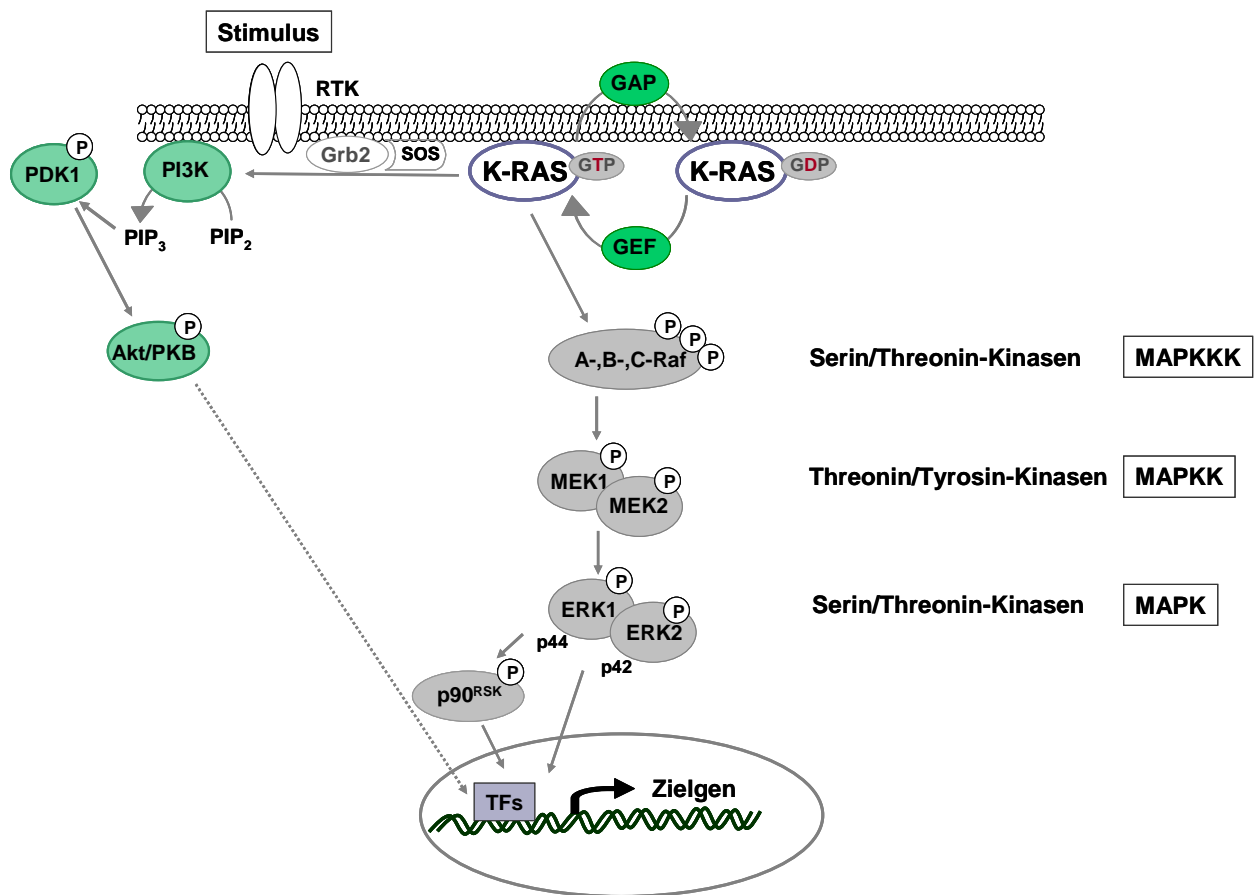


Abb. 8 Schematische, stark vereinfachte Darstellung der K-RAS-regulierten MEK/ERK-(MAPK)- und PI3K-Signalwege.

Das G-Protein K-RAS wird durch extrazelluläre Signale, die z.B. durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen in die Zelle weitergeleitet werden, aktiviert, und liegt dadurch in seiner GTP-Form vor. Durch die damit einhergehende Konformationsänderung kann RAS dann an unterschiedliche Signalmoleküle der Zelle binden. Die bekanntesten sind dabei die Raf-Kinasen und die PI3-Kinasen, die nach Aktivierung, andere Effektormoleküle, wie die ERK1/2-Kinasen bzw. die Akt-Kinase, aktivieren. Diese leiten das Signal dann u.a. in den Zellkern weiter und führen dort, über die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, zu einer veränderten Transkription zahlreicher Zielgene.

Die unterschiedlichen extrazellulären Signale von Wachstumsfaktoren, Hormonen und Zytokinen führen durch die Aktivierung einer Vielzahl von RAS-Effektormolekülen und Signalwegen zu Veränderungen der Transkription zahlreicher Gene. Alle direkt RAS-assoziierten Proteine besitzen eine von bisher drei identifizierten RAS-Binde-Domänen (RBD) von ca. 100 Aminosäuren (Repasky, Chenette et al. 2004). Bis heute sind dabei mindestens 10 funktionell unterschiedliche RAS-Effektormolekülklassen identifiziert worden, die darüber hinaus auch noch häufig verschiedene Isoformen besitzen (Repasky, Chenette et al. 2004). Zu den bestuntersuchten zählen dabei die Raf-Proteine (Raf-1/C-Raf, A-Raf, B-Raf), Serin-Threonin-Kinasen, die durch Phosphorylierung von MEK1/2 die MEK/ERK-Kaskade, eine MAPK-(*mitogen-activated protein kinase*)-Kaskade, aktivieren (Abb. 8). Ein weiteres RAS-Zielmolekül ist die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K: p110 $\alpha,\beta,\delta,\gamma$), die durch Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-(4,5)-Biphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Triphosphat (PIP₃), Kinasen wie PDK1 und Akt/PKB zur Membran rekrutiert, wodurch PDK1 die Kinase Akt aktivieren kann (Abb. 8) (Samuels and Velculescu, 2004, 17). Abb. 8 zeigt eine stark reduzierte Darstellung der K-RAS-regulierten Signalwege. Daneben sind zahlreiche „Querverbindungen“ zu anderen Signalmolekülen beschrieben, z.B. JNK, Ral-GEF, PLC- ϵ , auf die an dieser Stelle aber nicht näher eingegangen werden soll (Ellis and Clark 2000, Repasky, Chenette et al. 2004).

RAS-regulierte Signalwege, wie der MEK/ERK-Signalweg und die PI3K-Aktivierung von Akt, besitzen eine große Bedeutung für das geregelte Zellwachstum und die Apoptose-Induktion was u.a. durch das Auftreten einer Mutation in RAS in 50 % der Kolon-Karzinome bestätigt wird. Diese Mutationen sind vorrangig in K-RAS zu finden, wobei eine höhere Mutationsanfälligkeit oder eine unterschiedliche Funktion von K-RAS im Vergleich zu den beiden anderen Isoformen anzunehmen ist (Ellis and Clark 2000). Dabei treten am häufigsten Mutationen in Kodon 12 (G12), 13 (G13) und 61(Q61) auf (Bos 1989, Herrmann 2003), wobei in Kolon-Karzinom-Zellen die *missense*-Mutation in Kodon 12 die häufigste Veränderung ist und bereits sehr früh in der Tumorgenese auftritt (Bos, Fearon et al. 1987, Vogelstein, Fearon et al. 1988, Arber, Shapira et al. 2000, Grady and Markowitz 2002). Durch diese Mutationen wird das RAS-Protein unempfindlich gegenüber der GTPase-aktivierenden Funktion der GAPs und verbleibt somit, unabhängig von äußeren Signalen, ständig in seiner aktiven GTP-Form, was zu einer autonomen und konstitutiven Aktivierung des MAPK-Signalweges führt (Trahey and McCormick 1987). Dabei ist vor allem der B-Raf-regulierte MEK/ERK-Signalweg wichtig, da in 10 % der Kolon-Karzinome statt einer K-RAS-Mutation eine aktivierende B-Raf-Mutation vorliegt (Dhillon, Hagan et al. 2007, Roberts and Der

2007). Daneben konnte auch eine erhöhte PI3K-Aktivität und Mutationen der p110 α -Untereinheit der PI3K in Kolon-Karzinomen gezeigt werden (Phillips, St Clair et al. 1998).

Da diese Mutationen zu einer konstitutiven Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege führen, resultiert daraus im Vergleich zur „normalen“ Liganden-induzierten Signaltransduktion ein anderes Expressionsmuster, das zusätzliche Zielgene betrifft (Lund, Weisshaupt et al. 2006). Die Signalwege einer Zelle laufen normalerweise zeitlich koordiniert ab, so dass ein konstitutives Signal Querverbindungen zu anderen Signalwegen knüpfen kann, was die nachfolgende Genexpression stark verändert. Dies wird unter dem Begriff der „onkogenen Signaltransduktion“ zusammengefasst und erschwert eine Vorhersage der regulierten Gene zusätzlich dadurch, dass die Konsequenzen von Zelle zu Zelle unterschiedlich sein können. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der K-RAS- bzw. B-Raf-Mutation in Kolon-Karzinom-Zelllinien auf die Immunerkennung untersucht, indem der MAPK-Signalweg durch Einsatz spezifischer MEK1/2-Kinase- bzw. B-Raf-Kinase-Inhibitoren blockiert und die Auswirkung auf die ZTL- und NK-Erkennung bestimmt wurde.

2.2 DNS-Methylierung und onkogene Signalwege im Kontext der Immunüberwachung

Die Beteiligung des Immunsystems an der Eliminierung von transformierten Zellen wurde bereits von L. Thomas und FM. Burnet (Burnet 1957) in der sogenannten „*immunosurveillance*“- (Immunüberwachungs)-Hypothese formuliert und konnte in den letzten Jahren auch experimentell bewiesen werden. Durch das gezielte Ausschalten verschiedener Zellpopulationen konnte nicht nur eine Beteiligung von Zellen des adaptiven Immunsystems, vor allem ZTL, sondern auch die Relevanz des angeborenen Immunsystems, vorrangig durch NK-Zellen, gezeigt werden. In Abwesenheit dieser Effektorzellen oder ihrer Effektormoleküle, wie IFN- γ und Perforin/Granzym, kommt es zu einer vermehrten Entwicklung von spontanen bzw. chemisch-induzierten Tumoren (Dunn, Bruce et al. 2002, Dunn, Bruce et al. 2005). Dennoch wird die kausale Beziehung zwischen Immunüberwachung und Tumorentstehung bzw. -Manifestation immernoch kontrovers diskutiert. NK-Zellen scheinen dabei vor allem zu Beginn einer Anti-Tumorreaktion wichtig, da sie Tumorzellen über die Expression der NKG2D-Liganden MICA/B und ULBP1-4 direkt erkennen und lysieren können, was zu einer Freisetzung spezifischer Tumor-Antigene führt, oder durch Interaktion mit DC die Induktion der T-Zellantwort unterstützen können (Adam, King et al. 2005). Die freigesetzten Antigene können von DC in den Lymphknoten transportiert werden, wo sie über eine Aktivierung von CD4⁺-T-Helferzellen und eine

Präsentation der Antigene auf HLA-Klasse-I-Molekülen (*cross-presentation*) eine ZTL-Antwort induzieren können, welche dann zu einer spezifischen Lyse Tumor-Antigen-präsentierender Tumorzellen führt (Ferris, Whiteside et al. 2006). Diese „Überwachungsfunktion“ des Immunsystems erklärt jedoch nicht die Entstehung von Tumoren in immunkompetenten Individuen und wurde deshalb im sogenannten „*cancer immunoediting*“-Konzept vervollständigt, das drei Phasen in der Tumor-Immunsystem-Interaktion unterscheidet: „Eliminierung, Equilibrium und Entkommen“ („*elimination, equilibrium* und *escape*“) (Abb. 9).

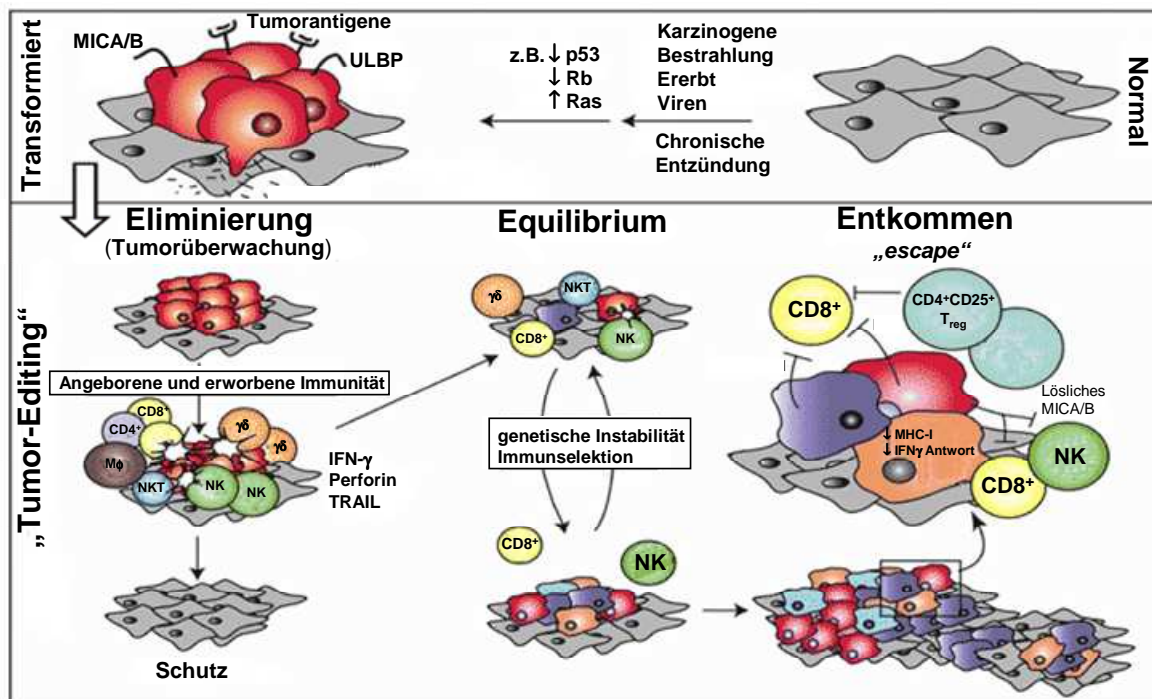


Abb. 9 Schematische Darstellung der drei Phasen (*three E's*) des „*Cancer Immunoediting*“-Prozesses.

Wenn gesunde Körperzellen (grau) onkogenen Stimuli ausgesetzt sind, können sie in einem Transformationsprozess zu Tumorzellen (rot) werden (obere Zeile). Bereits relativ früh im Prozess der Tumorgenese senden die Zellen Signale aus, die den *Tumor-Editing*-Prozess in Gang setzen (untere Reihe). In der „Eliminierungs“-Phase können Zellen und Moleküle der angeborenen und adaptiven Immunabwehr die Tumorzellen vollständig eliminieren, was in der eigentlichen *immunosurveillance*-Hypothese postuliert wird. Falls das nicht geschieht, tritt die „Equilibrium“- (Gleichgewichts)-Phase ein, in der die Tumorzellen durch das Immunsystem „geformt“ werden und neue Varianten ausbilden. Diese Varianten können dann der Erkennung durch das Immunsystem entkommen, *escape*-Phase, und werden klinisch relevant. Adaptiert nach Dunn et al. (Dunn, Old et al. 2004).

Das Immunsystem besitzt nach diesem Konzept zwei Funktionen in der Immunüberwachung, zum einen die komplette Eliminierung transformierter Zellen in frühen Stadien, was dem ursprünglichen Begriff der Immunüberwachung („*immunosurveillance*“) entspricht, zum anderen können Immunzellen auch den Phänotyp der transformierten Zellen beeinflussen. Da in Tumorgewebe aufgrund der genetischen Instabilität früh eine große Variabilität bzgl. unterschiedlicher Geno- und Phänotypen existiert, kann das „angreifende“ Immunsystem zu einer Selektion wenig-immunogener Tumorzellen führen. Diese Hypothese wird als

Gleichgewichtsphase („Equilibrium“) bezeichnet, in der ein Selektionsprozess zur Anreicherung maligner Zellen führt, die der Erkennung durch das Immunsystem entgehen konnten und in Folge ungehemmt proliferieren können. Dieses Stadium wird als sogenannter *escape* der Tumorzellen, also dem „Entkommen“ der Immunerkennung bezeichnet. Der in der Literatur gebräuchliche Begriff der „Tumorflucht“ (*tumor-escape*) ist daher etwas irreführend, da es sich nicht um eine aktive Veränderung des Tumors handelt, sondern um eine passive, selektionsbedingte Anreicherung bestimmter Tumorzellen aufgrund ihres durch Zufall entstandenen Phänotyps. Tumorzellen aus manifestierten Tumoren besitzen tatsächlich einen wenig immunogenen Phänotyp (*tumor-escape*-Phänotyp) und da ZTL die „Hauptakteure“ in der spezifischen Antitumor-Antwort sind, ist dieser vor allem durch einen Verlust oder Minderung der HLA-Klasse-I- und Tumor-Antigen-Expression gekennzeichnet. Daneben treten auch Defekte im Fas/TRAIL-Apoptoseweg und im IFN- γ -Signalweg auf, die zu Resistenz gegen Apoptose und IFN- γ -vermittelter Signale führen. Darüber hinaus können Tumorzellen auch immunsuppressive Zytokine wie TGF- β und IL-10 freisetzen (Dunn, Bruce et al. 2002, Khong and Restifo 2002, Dunn, Old et al. 2004, Kim, Emi et al. 2007).

Veränderungen der HLA-Klasse-I-Oberflächenexpression

Die Oberflächenexpression von HLA-Klasse-I-Molekülen ist ein sehr komplexer Prozess und benötigt zahlreiche Komponenten, die als die sogenannte Antigen-Präsentations-Maschinerie (APM) bezeichnet werden. Der Prozess besteht aus vier Schritten: (1) Herstellung geeigneter Peptide, (2) anschließender Transport in das Endoplasmatische Retikulum (ER) durch TAP-Proteine (*transporter associated with antigen processing*), (3) im ER stattfindende korrekte Faltung der schweren HLA-Kette (*heavy chain*, HC) und dem β_2 -Mikroglobulin (β_2m), gefolgt von der Peptidbeladung der HLA-Klasse-I-Moleküle und dem (4) Transport der Peptid-MHC-Komplexe an die Oberfläche. Dieser Prozess und die daran beteiligten APM-Komponenten sind in Abb. 10 schematisch dargestellt.

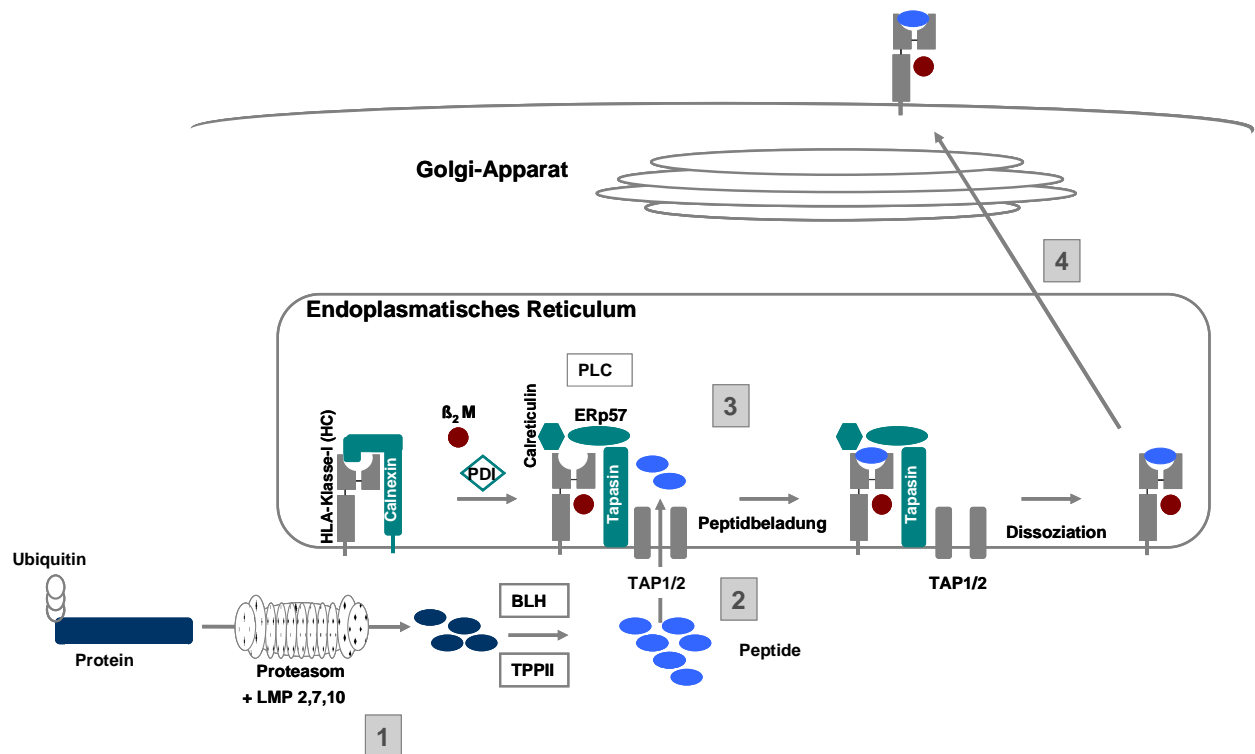


Abb. 10 Schematische Darstellung der HLA-Klasse-I-Oberflächenpräsentation und der beteiligten APM-Komponenten.

1 Ubiquitinylierte Proteine werden durch das Proteasom in Peptide gespalten und durch Peptidasen im Zytoplasma (BLH, TPPII) weiter prozessiert. 2 Über einen ATP-abhängigen Prozess werden die Peptide durch TAP1/2 ins ER transportiert. 3 HLA-Klasse-I schwere Kette (*heavy chain*, HC) und β_2 -Mikroglobulin (β_2m) werden durch Chaperone stabilisiert und korrekt gefaltet, wonach sich der PLC (*peptide loading complex*) bildet und die Peptidbeladung erfolgt. 4 Nach Dissoziation des PLC findet der Transport durch den trans-Golgi-Apparat an die Oberfläche statt.

Endogene Proteine, deren Peptide auf HLA-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden sollen, werden für den Abbau im Proteasom, einer multikatalytischen Protease, durch Ubiquitinylierung markiert. Durch IFN- γ , das zum Beispiel bei viralen Infektionen produziert wird, entsteht das sogenannte Immunproteasom, das neben den konstitutiven Komponenten auch die induzierbaren Untereinheiten LMP2, 7 und 10 (*low molecular weight proteins*) besitzt, und durch veränderte Spaltungsaktivität andere Peptide mit einer erhöhten Affinität für HLA-Klasse-I-Moleküle und den TAP-abhängigen Transport in das ER generiert (Abb. 10). Das Proteasom erzeugt Peptide mit einer Länge von 2 - 25 Aminosäuren und korrektem C-Terminus, die durch zytosolische Proteasen wie Tripeptylpeptidase II (TPPII) und Bleomycin Hydrolase (BLH), aber auch ER-lokalisierte Proteasen, wie ERAP (ER-Aminopeptidase assoziiert mit Antigen-Pro-zessierung 1/2) N-terminal modifiziert werden (Hammer, Kanaseki et al. 2007, Seliger 2008). Diese Peptide werden dann in einem ATP-abhängigen Prozess mit Hilfe des Heterodimers TAP1/2 in das ER transportiert, wo der korrekte Zusammenbau der HLA-Klasse-I schweren Kette ($\alpha 1-3$ -Domäne) mit dem zur Stabilisierung wichtigen β_2 -Mikroglobulin (β_2m) stattfindet. Dieser Prozess wird durch Chaperone wie Calreticulin, Calnexin, Tapasin, Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) und der

Thiol-Oxidoreduktase Erp57 koordiniert. Diese Chaperone bilden den multimeren Peptidbeladungskomplex (*peptide loading complex*, PLC), wobei Tapasin, ERp57 und/oder PDI zusätzlich eine Stabilisierung von TAP1/2 und die Peptidbeladung der HLA-Moleküle unterstützen (Cabrera 2007, Kienast, Preuss et al. 2007). Nach korrekter Beladung von HLA-Klasse-I-Molekülen dissoziiert der PLC, so dass der Transport über den Golgi-Apparat an die Oberfläche stattfinden kann (Seliger 2008).

Vor allem in soliden Tumoren ist häufig eine veränderte HLA-Klasse-I-Expression zu beobachten. Dabei kann es aufgrund von Mutationen, Verlust ganzer Chromosomen, aber auch durch Veränderungen auf Transkriptionsniveau durch onkogene oder virale Transformation zu einem Total-, Haplotyp- oder Allel-Verlust der schweren Kette kommen (Ritz, Momburg et al. 2001, Atkins, Ferrone et al. 2004). Auch das zur Stabilisierung wichtige β_2m ist in vielen Tumoren mutiert, was zu einem kompletten Verlust aller HLA-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche führt (Seliger 2008). Daneben können verschiedene APM-Komponenten, wie z.B. Tapasin oder der TAP1/2-Transporter, aufgrund epigenetischer, transkriptioneller und posttranskriptioneller Fehlregulationen eine veränderte Expression zeigen (Blanchet, Bourge et al. 1992, Seliger 2008). Ein kausaler Zusammenhang zwischen der onkogenen Signalweiterleitung, dem MAPK-Signalweg, und der verminderten HLA-Klasse-I-Expression war zu Beginn der Arbeit nicht bekannt.

Veränderung der Expression von NKG2D-Liganden

Wie bereits beschrieben, sind auch NK-Zellen in die Immunüberwachung und die Eliminierung transformierter Zellen involviert, wobei sie die entarteten Zellen prinzipiell durch zwei Mechanismen erkennen können. Zum einen durch den Verlust von HLA-Klasse-I-Molekülen auf vielen Tumoren, was zu einem geringeren inhibitorischen Signal über die KIR und damit zu NK-Zellaktivierung (*missing self recognition*) führt. Zum anderen können auf transformierten Zellen auch Liganden des aktivierenden NK-Rezeptors NKG2D induziert werden, die zu einer zusätzlichen NK-Aktivierung führen und auch auf ZTL kostimulierend wirken können („*induced self*“) (Abb. 3). Dabei besitzt der NKG2D-Rezeptor sechs Liganden, MICA/B (*MHC-class-I-related chain*) und ULBP1-4 (*UL-16-binding proteins*) (Lopez-Larrea, Suarez-Alvarez et al. 2008). MIC-Proteine sind Glykoproteine mit drei extrazelluläre Domänen (α 1 -3) und einem Transmembranbereich (TM). Sie sind im MHC-Lokus auf Chromosom 6p21.3 kodiert, binden jedoch kein β_2m und präsentieren auch keine Peptide (Groh, Bahram et al. 1996). MIC sind hoch polymorphe Gene, wobei für MICA ca. 60 Allele

und für MICB ca. 25 Allele bekannt sind (Bahram, Inoko et al. 2005). Die ULBPs besitzen keine $\alpha 3$ -Domäne und sind außerhalb des MHC-Lokus auf Chromosom 6q24.2-9/25.3 kodiert. Dabei besitzt ULBP4 eine Transmembrandomäne, wohingegen ULBP1-3-Moleküle über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) in der Membran verankert sind. Inwieweit die verschiedenen Liganden eine unterschiedliche Fähigkeit besitzen NKG2D zu aktivieren, ist immer noch nicht eindeutig geklärt (Lopez-Larrea, Suarez-Alvarez et al. 2008). In gesundem Gewebe sind NKG2D-Liganden, mit Ausnahme von intestinalen und Thymus-Epithelzellen, selten exprimiert, wogegen sie verbreitet auf Tumoren und Virus-infizierten Zellen zu finden sind. Die genauen Mechanismen der Expressionsregulation sind nur ansatzweise verstanden, wobei offenbar eine gewebespezifische Regulation existiert, da die Expressionsmuster der verschiedenen Liganden auch in Tumoren stark variieren können (Cerwenka and Lanier 2003, Gasser, Orsulic et al. 2005, Bottino, Moretta et al. 2006, Lopez-Larrea, Suarez-Alvarez et al. 2008). Neben Transformation und Virus-Infektion scheint auch Zell-Stress, z.B. oxidativer Stress, die Expression der NKG2D-Liganden zu induzieren (Yamamoto, Fujiyama et al. 2001, Mistry and O'Callaghan 2007, Venkataraman, Suciu et al. 2007).

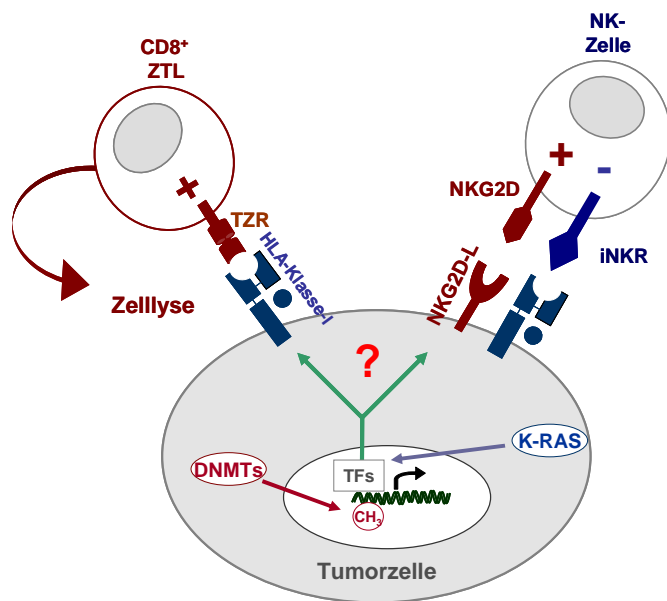


Abb. 11 Schematische Darstellung der Interaktion von ZTL und NK-Zellen mit der Tumorzelle: Möglicher Einfluss von onkogenem RAS-Signalweg und veränderter DNS-Methylierung auf die HLA-Klasse-I- und NKG2D-Expression. ZTL erkennen maligne, transformierte körpereigene Zellen, die Tumor-spezifische Antigene auf HLA-Klasse-I-Molekülen präsentieren, durch Bindung mit ihrem TZR und können diese Zellen lysieren. NK-Zellen binden HLA-Klasse-I-Moleküle vorrangig mit ihren KIR und werden dadurch inhibiert, gleichzeitig können sie aber auch aktivierende Signale u.a. durch Expression von NKG2D-Liganden auf den Tumorzellen erhalten. Ob und in welcher Weise die Veränderungen durch das onkogene RAS-Signal und die veränderte DNS-Methylierung in Kolon-Karzinom-Zellen einen Einfluss auf die Oberflächenexpression von HLA-Klasse-I-Molekülen und NKG2D-Liganden besitzen, wurde in dieser Arbeit untersucht.

Die Tatsache, dass NKG2D-Liganden aufgrund verschiedener Mechanismen induziert werden können, und die Tumor-spezifischen Expressionsunterschiede sind ein Zeichen dafür, dass NKG2D-Liganden einer fein-regulierten Expressionskontrolle auf Transkriptions- und

Protein-Ebene unterliegen, und dadurch die Erkennung durch NK-Zellen beeinflussen können. Die in der Literatur beschriebenen Mechanismen der Veränderung der HLA- bzw. NK-Liganden-Expression auf Tumorzellen wurden bisher als Folge von Mutation und Selektion angesehen, aber nicht in einem kausalen Zusammenhang mit der onkogenen Signaltransduktion in Kombination mit den nachgeschalteten epigenetischen Veränderungen gebracht. Daher lag ein weiterer Fokus dieser Arbeit auf der Untersuchung der HLA- und NKG2D-Liganden-Expression in Abhängigkeit des onkogenen RAS-Signalweges und der DNMT-Aktivität.

3 Aufgabenstellung

Seit langem ist bekannt, dass Tumorzellen häufig ein verändertes DNS-Methylierungsmuster zeigen, womit Veränderungen der Genexpression verbunden sind, welche zu den malignen Eigenschaften, wie z.B. ungehemmter Proliferation, beitragen. Diese tumorspezifischen Eigenschaften sind häufig durch Mutationen in Onkogenen, wie z. B. dem Signalprotein K-RAS, verursacht. Die bis heute ungeklärte Frage, inwieweit diese zellbiologischen Veränderungen auch einen direkten Einfluss auf das Immunsystem in Form der geringen Erkennung von Tumorzellen durch zytotoxische Effektorzellen besitzen, sollte am *in vitro*-Modell mit Kolon-Karzinom-Zelllinien analysiert werden. Die HCT116-Kolon-Karzinom-Zelllinie zeichnet sich durch ein verändertes DNS-Methylierungsmuster und eine aktivierende Mutation in K-RAS (G13D) aus. Für eine Untersuchung des DNS-Methylierungseffektes auf die Immunerkennung standen einzigartige DNS-Methyltransferase-(DNMT)-Deletions-Varianten der HCT116-Tumorzelle zur Verfügung. Die Auswirkungen der aktivierenden K-RAS-Mutation in Kombination mit den Methylierungseffekten sollten durch Blockierung des K-RAS-regulierten MEK/ERK-Signalweges mit Hilfe spezifischer Inhibitoren analysiert werden. Neben durchflusszytometrischen Analysen der Veränderung der Oberflächenexpression verschiedener immunrelevanter Marker, wie HLA-Moleküle und NKG2D-Liganden, durch die DNMT-Deletion bzw. den Einsatz der MEK/ERK-Inhibitoren sollte vor allem die funktionelle Relevanz für die Immunerkennung untersucht werden. Da zytotoxische T-Lymphozyten und NK-Zellen die Haupt-Effektorzellen einer Anti-Tumor-Antwort sind, sollte das Hauptaugenmerk auf die Erkennung der Kolon-Karzinom-Zellen durch diese beiden Effektorzellen gerichtet werden. Darüber hinaus sollten durch detaillierte Analysen der Phosphorylierung wichtiger Signalmoleküle der MAPK-Kaskade und anderer

Signalwege die intrazellulären Auswirkungen der Inhibitoren untersucht werden, um so präzise Einblicke in das onkogene „Signalnetzwerk“ zu erhalten.

Für die detaillierte Betrachtung der Tumorzellerkennung durch NK-Zellen sollte ein weiterer Fokus auf die enorme Plastizität dieser Effektorzellen bzgl. ihres Phänotyps und ihrer Funktion gelegt werden, um so ihr Potential zur Regulation der Immunantwort, speziell der Anti-Tumor-Antwort, besser verstehen zu können. NK-Zellen können in peripherem Blut aufgrund verschiedener Oberflächenmarker in zwei Hauptpopulationen eingeteilt werden, wobei damit bis vor kurzem auch eine funktionelle „Arbeitsteilung“ in Zytokinproduzenten und Killerzellen postuliert wurde. Neuere Daten zeigen aber, dass diese Klassifizierung zu einfach ist, wobei der Grund für die Existenz dieser beiden NK-Populationen immer noch nicht eindeutig geklärt ist. In dieser Arbeit sollte daher die Funktion dieser peripheren NK-Populationen, also Zytokinfreisetzung und Zytotoxizität, auch auf klonaler Ebene untersucht werden, um eine mögliche Korrelation zwischen Phänotyp und Funktion zu definieren. Dazu sollte neben den ca. 20 bekannten NK-Rezeptoren auch CD6, ein ursprünglich für T-Zellen beschriebener Rezeptor, als differentieller Marker für die beiden NK-Subpopulationen verwendet werden, um die Frage nach einer funktionellen Relevanz dieses Markers für die NK-Zellen zu untersuchen.

Die Kombination der tumorspezifischen Veränderungen durch das onkogene „Signalnetzwerk“ mit den detaillierten Untersuchungen zur NK-Funktion sollten es ermöglichen, ein differenzierteres Bild der Tumorabwehr zu erhalten, um auf lange Sicht neue therapeutische Wege im Bereich der Immuntherapie aufzuzeigen.

C Material

1 Geräte

Gerät	Hersteller
Thermoshaker (Vortemp)	Labnet
Bestrahlungsanlage Gammacell 40	Atomic Energy of Canada
Durchflusszytometer, Luminex™	Bio-Rad
Durchflusszytometer, FACSCalibur™	Becton Dickinson
Durchflusszytometer, LSRII™	Becton Dickinson
Einfrierbox	Nalgene
Eismaschine AF-30	Scotsman
Elektrophoresekammer	Invitrogen
Gefrierschrank, -20 °C	Liebherr
Gefrierschrank, -80 °C	Heraeus
Geldokumentationssystem, Syngene	VWR International
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf
Inkubationsschrank	Heraeus
Kühlschränke, 4 °C	Liebherr
Magnet	Dynal
Mehrkanalpipetten (25 - 200 µl)	Buddeberg
Mikropipetten (0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 20 - 200 µl, 100 -1000µl)	Buddeberg
Mikroskop	Leica DMIL
Mikrowelle	SHARP
Millipore-Wasser Anlage Milli-Q	Millipore
Neubauerzählkammer	Hecht-Assistent
Pipettierhilfe Pipetus-Akku	Hirschmann
PCR Gerät	Whatman Biometra
Rollmischer	Coulter Electronics
Spannungsgerät LK3 GPS 200/400	Pharmacia
Spektralphotometer	Amersham Biosciences
Sterilwerkbank	BDK Luft- und Klimatechnik
Stickstofftank Chronos Biosafe	Messer Griesheim
Stoppuhr	NeoLab
Vortexer VF2	IKA-Labortechnik
Analysewaage	Mettler PC440
Präzisionswaage	Mettler AE166
Wasserbad	GFL
Eppendorfszentrifuge	Heraeus
Kühlzentrifuge	Heraeus

2 Chemikalien

Chemikalie	Firma
Natrium-Azid	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
DEPC (Diethylpyrocarbonat) Wasser	Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Invitrogen
Isopropanol (2-Propanol)	Sigma
Methanol	Merck
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma
PBS (Phosphat-gepufferte Saline)	Invitrogen

3 Verbrauchsmaterial

3.1 Zellkultur

Plastik- und Glaswaren

Bezeichnung	Firma
Einfrierröhrchen	Nunc
Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Falcon
Lumaplaten	PerkinElmer
Magnet für Zellseparation	Dynal
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Falcon
Zellkulturplatten (6-Loch, 24-Loch, 96-Loch)	Falcon
Zellkulturschalen (100 mm)	Greiner

Lösungen, Medienzusätze und Verbrauchsmedien

Bezeichnung	Firma
5-Aza-2'-Deoxycytidin	Sigma
DMEM	Cambrex
FACS-Flow	Becton Dickinson
FACS-Puffer: PBS, 0,1 % NaN ₃ , 5 % FCS	Labor C.S. Falk
FACS-Rinse	Becton Dickinson
FCS (Fötale Kälberserum)	Invitrogen
Ficoll, Biocoll Separationslösung	Biochrom AG
Geneticin (G418-Sulfat) 100 mg/ml	Pan Biotech GmbH
Heparin	Braun
Humanserum	Labor C.S. Falk
Hygromycin B 50 mg/ml	Invitrogen
IL-2, rekombinant, human (Proleukin)	Ceutus
Ionomycin/Kaliumsalz	Sigma
L-Glutamin 200 mM	Invitrogen
M450 Schaf- α -Maus-IgG (magn. Mikrosphären)	Nexell (Dynal)
McCoy5A-Medium	Sigma
MEM (Nicht-essentielle Aminosäuren) 100x	Invitrogen
Natriumpyruvat 100mM	Invitrogen

Negativer Isolationskit für NK-Zellen	Dynal
PD98059	Alexis
Penicillin/ Streptomycin (P/S)	Invitrogen
Propidiumiodid (PI)	Beckman Coulter
RPMI 1640	Invitrogen
Sorafenib (Nexavar, Bay-43-9006)	Bayer
Trypanblaulösung (0,4 % in physiolog. Saline)	Invitrogen
Trypsin/EDTA-Lösung (10 x in PBS lösen)	Sigma
U0126	Promega
Z-VAD-FMK	R&D

Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bezeichnung	Zusammensetzung
RPMI III	RPMI 1640 2 mM L-Glutamin 100 U/ml P/S 1 mM Natriumpyruvat	DMEM-Medium	DMEM 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 10 % FCS
TM-Medium	RPMI 1640 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 1 x MEM 10 % FCS	NKL-Medium	RPMI III 15 % FCS 100 U/ml IL-2 5 % TCGF
McCoy-Medium	McCoy 5A 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 10 % FCS	T-Zell-Medium (TZ-M)	RPMI III 10 % FCS 5 % HS 50 U/ml IL-2
L-15 Medium	Leibovitz (L15) 200 mM L-Glutamin + MEM 2,5 ml Transferrin +Insulin (40 iE) 0,5 ml Trasylol 100 U/ml P/S 7,5 % NaHCO ₃ 0,5 ml Glucose (50 % Lsg.) 10 % FCS	Selektions-Medien (SM)	<u>L721.221-Cw*06,Cw*07</u> TM + 0,5 mg/ml Hygromycin B <u>L721.221-Cw*01</u> TM + 1 mg/ml G418 <u>K-562-E/-G</u> TM + 0,5 mg/ml G418

3.2 Multiplex-Analysen

Zytokinbestimmung

Bezeichnung	Firma
Reagenzien Kit A	Bio-Rad
Humanes 8-Plex Zytokin-Repertoire (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ , GM-CSF)	Bio-Rad
Humanes 17-Plex Zytokin-Repertoire (IL-1 β , -2, -4, -5, -6, -7, -8, -10, -12, -13, -17 ; G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1 β , TNF- α)	Bio-Rad
Bio-Plex Human IL-5 Test	Bio-Rad
Bio-Plex Human IL-13 Test	Bio-Rad
Bio-Plex Human MIP-1 β Test	Bio-Rad
96-Loch-Filterplatten	Millipore

Phosphoproteinbestimmung

Bezeichnung	Firma
Zell-Lyse Kit	Bio-Rad
PMSF (Phenylmethylsulfonfluorid)	Sigma
Phospho-Protein Reagenzien Kit	Bio-Rad
Kontroll-Lysate	Bio-Rad
Total-Protein-Test p38-MAPK, p53, ATF-2, MEK1, p90 ^{RSK} , JNK, I κ B α , Akt, ERK1/2, c-Jun	Bio-Rad
Phospho-Protein-Test p38-MAPK ^{T180/Y182} , p-53 ^{S46} , ATF-2, MEK1 ^{S217/S221} , p90 ^{RSK(T359/S363)} , JNK ^{T183/Y185} , I κ B α ^{S32/S36} , Akt ^{Ser473} , ERK1/2 ^{T202/Y204, T185/Y187} , c-Jun ^{S63} , Histone-H3 ^{S10} , NF κ B p65 ^{S536} , GSK-3 α/β ^{Ser21/Ser9}	Bio-Rad

HLA/KIR-Typisierung

Bezeichnung	Firma
LABType® SSO A,B,C Locus 100 Tests (Lot004/006)	BMT onelambda
KIR SSO Genotyping Test RSSOKIR (Lot001/002)	BMT onelambda
96-Loch-Filterplatten	Millipore

mRNS-Quantifizierung

Bezeichnung	Firma
QuantiGene Plex Assay Kit	Panomics
QuantiGene Plex Set (Probe Set und Mikrosphären)	Panomics
Humanes Zytokin-Repertoire (aus Plex Set 1127) (IL-1 β , -2, -6, -10, -8, VEGF, CSF2, IFN- γ , TNF, GAPDH)	Panomics
96-Loch-Filterplatten	Millipore

3.3 Molekularbiologie

Genomische DNS-Isolierung und HLA/KIR-PCR

Chemikalie	Firma
QIAamp DNS Mini Kit (50 Tests)	Qiagen
Taq Polymerase 5 U/μl	Invitrogen
LABType® SSO A,B,C Locus 100 Tests (Lot004/006)	BMT onelambda
KIR SSO Genotyping Test RSSOKIR (Lot001/002)	BMT onelambda

Gelelektrophorese

Chemikalie	Firma
TAE-Puffer 50x	Invitrogen
Agarose SeaKem	BMA Biozym
1 kb Plus DNS Leiter	Invitrogen

3.4 Allgemein

Bezeichnung	Firma
Einmalküvetten	NeoLab
FACS-Platten	Greiner
FACS-Röhrchen	Greiner
Glasware	Schott Duran
Handschuhe	Kimberly-Clark
Pipettenspitzen (10, 100, 1000 μl)	Corning
Pipettenspitzen, gestopft (10, 200, 1000 μl)	Starlab
Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Sarsted
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Greiner, Eppendorff
Spritzen, Kanülen	BD; Braun
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon; Greiner

4 Zellen

4.1 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Medium	Herkunft
Daudi	Burkitt-B-Zelllymphom, homozygote β_2m -Deletion	TM	ATCC
JB-LCL	Lymphoblastoide B-Zelllinie, Spender JB	TM	D. Schendel
K-562	Erythroleukämiezelllinie, HLA-Klasse-I-negativ	TM	ATCC
K-562-E (2B4)	K-562, transfiziert mit HLA-E ^G + B8-L- β_2m	SM	E. Weiß
K-562-G	K-562 transfiziert mit HLA-G, Signalpeptid	SM	E. Weiß

	mutiert		
Klon JB4	CD8 ⁺ -T-Zell-Klon	TZ-M	D. Schendel
L721.221	EBV-transformierte B-Zelllinie, HLA-Klasse-I-negativ	TM	D. Schendel
L721.221-Cw1	transfiziert mit HLA-Cw*01	SM	D. Schendel
L721.221-Cw6	transfiziert mit HLA-Cw*06	SM	D. Schendel
L721.221-Cw7	transfiziert mit HLA-Cw*07	SM	D. Schendel
NKL	NK-Leukämiezelllinie	NKL-M	M.Lopez-Botet
P815	murine Mastozytomzelllinie	TM	D. Schendel
HCT116wt	Kolon-Karzinom-Zelllinie, <i>K-RAS (G13D)</i>	McCoy5A	C. Sers
HCT116/1 ^{-/-}	Kolon-Karzinom-Zelllinie, <i>K-RAS (G13D)</i> DNMT1-hypomorphe-Variante	McCoy5A	C. Sers
HCT116/3b ^{-/-}	Kolon-Karzinom-Zelllinie, <i>K-RAS (G13D)</i> DNMT3b-Deletions-Variante	McCoy5A	C. Sers
HCT116DKO	Kolon-Karzinom-Zelllinie, <i>K-RAS (G13D)</i> DNMT1- und 3b-Deletions-Variante	McCoy5A	C. Sers
SW480	Kolon-Karzinom-Zelllinie, <i>K-RAS (G12V)</i>	DMEM	ATCC
SW620	Kolon-Karzinom-Zelllinie, <i>K-RAS (G12V)</i>	L-15	ATCC
HT29	Kolon-Karzinom-Zelllinie, <i>B-Raf (V600E)</i>	DMEM	ATCC
SW948	Kolon-Karzinom-Zelllinie, <i>K-RAS (Q61L)</i>	L-15	ATCC
SW707	Kolon-Karzinom-Zelllinie, <i>K-RAS (n.d)</i>	L-15	ATCC
Cx2	Kolon-Karzinom-Zelllinie, <i>K-RAS (n.d)</i>	L-15	ATCC

n.d.: nicht definiert

Tabelle 1 HLA-A1/A2-Expression und p53-Status der Kolon-Karzinom-Zelllinien

Zelllinie	HLA-A	p53-Status	Zelllinie	HLA-A	p53-Status
HCT116wt	HLA-A1/ -A2	wt ^{+/+}	SW620	HLA-A2/ -A2	His ²⁷³ mut.
HCT116/1 ^{-/-}	HLA-A1/ -A2	wt ^{+/+}	HT29	HLA-A1/ n.d	His ²⁷³ mut.
HCT116/3b ^{-/-}	HLA-A1/ -A2	wt ^{+/+}	SW948	HLA-A2/ n.d	His ²⁷³ mut.
HCT116DKO	HLA-A1/ -A2	wt ^{+/+}	SW707	HLA-A2/ n.d.	n.d.
SW480	HLA-A2/ -A2	mut. His ²⁷³	Cx2	HLA-A2/ n.d	n.d.

n.d.: nicht definiert

HCT116 ist eine humane Kolon-Karzinom-Zelllinie mit einer K-RAS-Mutation in Kodon 13, die zu einem Aminosäureaustausch (Glycin zu Aspartat) führt und eine konstitutive Aktivierung von K-RAS zur Folge hat. Die DNMT-Deletions-Varianten sind durch Deletion der Exons 3-5 durch homologe Rekombination entstanden, wobei die HCT116DKO-Variante zur Aufrechterhaltung ihres Phänotyps mit 0,1 mg/ml Hygromycin B kultiviert werden muss (Rhee, Jair et al. 2000, Rhee, Bachman et al. 2002). Alle DNMT-Deletions-Varianten wurden nicht länger als 20 Passagen lang kultiviert, da ihr Phänotyp nicht stabil ist. In den HCT116/1^{-/-}-Zellen konnte kürzlich eine, durch alternative Spleißvorgänge entstandene, verkürzte Form der DNMT1 nachgewiesen werden, die über eine Restaktivität verfügt und so fast 80 % der DNS-Methylierung aufrechterhält (Egger, Jeong et al. 2006, Spada, Haemmer et al. 2007)(C. Sers). Die anderen Kolon-Karzinom-Zelllinien besitzen entweder eine Mutation in K-RAS oder der im Signalweg darüberliegenden B-Raf-Kinase (HT29). SW480 und SW620 stammen

aus demselben Patienten, wobei SW480 aus dem Primärtumor und SW620 aus der später entstandenen Metastase etabliert wurde (Leibovitz, Stinson et al. 1976).

Verschiedene Varianten der EBV-transformierten B-Zelllinie L721 wurden nach Bestrahlung auf den Verlust der HLA-Klasse-I- bzw. II-Expression selektioniert, wodurch u.a. die Sublinie L721.221 entstand. Die L721.221-Linie zeichnet sich durch große Deletionen in beiden auf Chromosom 6 kodierten HLA-Klasse-I-Regionen aus und exprimiert daher keine HLA-Klasse-I-Moleküle mehr (Ceman, Rudersdorf et al. 1992). Die L721.221-Transfektanten mit HLA-Cw*06, -Cw*07 und -Cw*01 wurden als genomische DNS-Fragmente in den EBV-getriebenen pHebo-Vektor kloniert und in Selektionsmedium (0,5 mg/ml Hygromycin B, bzw. G418) kultiviert. Die HLA-Expression aller Transfektanten wurde zu jedem Experiment mittels FACS-Analysen kontrolliert. Die Erythroleukämieinie K-562 exprimiert gemäß ihrem Differenzierungsstadium keine HLA-Klasse-I-schweren Ketten. Im Labor von Frau Prof. Weiß entstand die als K-562-E (2B4) bezeichnete Transfektante durch Doppeltransfektion mit zwei Vektoren, wobei der erste pcDNA3(+)-Vektor nur die schwere Kette des HLA-E-Allels enthält. Da HLA-E jedoch ohne zusätzliche Hilfe durch ein stabilisierendes Peptid und β_2 -Mikroglobulin (β_2m) an der Oberfläche nicht stabil und damit nur schwach exprimiert ist, wurde diese HLA-E-Transfektante (B5 genannt) zusätzlich mit einem zweiten Konstrukt transfiziert. Dieses Konstrukt bestand aus der in den pcDNA3.1(+)-Vektor klonierten Fusionssequenz des stabilisierenden B8-Signalpeptids (VMAPRTVLL) und der durch einen Linker getrennten β_2m -Sequenz (B8-L- β_2m). Die HLA-E-Oberflächenexpression war durch die Koexpression der schweren Kette mit dem Peptid- β_2m -Fusionsprotein stabil. Für die als K562-G bezeichnete Transfektante wurde die schwere HLA-G-Kette dahingehend modifiziert, dass die Sequenz des Signalpeptides (VMAPRTLFL) durch VTAPRTLFL ersetzt wurde und diese Sequenz in den pcDNA3(+)-Vektor kloniert wurde. Durch den M-T-Austausch ist das Signalpeptid nicht mehr in der Lage, die HLA-E Oberflächenexpression zu stabilisieren. HLA-G-Effekte können so erstmals ohne Überlappung mit HLA-E-Effekten analysiert werden. Die NK-Leukämieinie NKL wurde freundlicherweise von Prof. Miguel Lopez-Botet und Prof. Peter Parham (Universität Stanford) zur Verfügung gestellt und in IL-2-supplementiertem Medium kultiviert.

4.2 Normalspender PBMC

Die Normalspender für die funktionellen NK-Experimente wurden HLA-C- und KIR-typisiert, um mögliche Rückschlüsse auf die Funktionalität der genetischen Konstellation ziehen zu können. Dabei ist hier neben den HLA-C-Allelen und deren Einteilung in die HLA-C-Gruppen C1 bzw. C2 auch der KIR-Haplotyp relevant.

Spenderkürzel	Nr.	HLA-C-Allele	C-Gruppen	KIR-Haplotyp*
AM	1	Cw*06, *07	C2/C1	B/B
BF	2	n.d.	n.d.	n.d.
BW	3	Cw*04, *04	C2/C2	A/A
CF	4	Cw*07, *07	C1/C1	AΔ/B
FA	5	Cw*04, *07	C2/C1	AΔ/AΔ
HaB	6	Cw*12, *14	C1/C1	A/B
HB	7	Cw*03, *07	C1/C1	A/B
JB	8	Cw*06, *15	C2/C2	AΔ/B
KK	9	Cw*04, *07	C2/C1	A/B
MH	10	Cw*04, *07	C2/C1	AΔ/B
MS	11	Cw*03, *04	C2/C1	A/B
MW	12	n.d.	n.d.	n.d.
PR	13	Cw*06, *07	C2/C1	n.d.
TA	14	Cw*04, *07	C2/C1	AΔ/B
TR	15	Cw*06, *07	C2/C1	AΔ/A
WG	16	Cw*04, *05	C2/C2	AΔ/A

* Die zwei Haplotypgruppen A und B unterscheiden sich durch die Anzahl und die Allele der Gene, die sie beinhalten. Die Rahmen-KIR-Gene (3DL3, 3DP1, 2DL4 und 3DL2) sind in jedem Haplotyp vorhanden. Haplotyp A besitzt 6 inhibierende KIR-Gene (2DL1, 2DL3, 2DL4, 3DL1, 3DL2 und 3DL3) und ein aktivierendes KIR-Gen (KIR2DS4), welches im Haplotyp AΔ ein nicht exprimierbares Nullallel aufweist. Haplotyp B kann sich aus einer Vielzahl aktivierender und inhibierender KIR-Gene in verschiedenen Kombinationen zusammensetzen. n.d.: nicht definiert

5 Antikörper

5.1 Primärantikörper

Spezifität	Konjugation	Isotyp	Klon	Einsatz/Konz.	Hersteller
Isotypkontrolle	keine	IgG1	MOPC21	FACS/ 5 µg/ml	Sigma
Isotypkontrolle	keine	IgG2a	UPC10	FACS/ 5 µg/ml	Sigma
Isotypkontrolle	keine	IgM	MOPC104E	FACS/ 5 µg/ml	Sigma
HLA-Klasse-I	keine	IgG2a	W6/32	FACS/ Hybridom	J.Johnson
HLA-A2 + B17	keine	IgG1	HB54	FACS/ Hybridom	ATCC
HLA-A2 + A69	keine	IgG2b	HB117	FACS/ Hybridom	ATCC
HLA-A1	keine	IgM		FACS/ 20:1	BMT
ULBP1	keine	IgG2a	170818	FACS/ 5 µg/ml	R&D
ULBP2	keine	IgG2a	165903	FACS/ 5 µg/ml	R&D
ULBP3	keine	IgG2a	JFY02	FACS/ 5 µg/ml	R&D
ULBP4	keine	IgG2a	7H7, Ratte	FACS/ Hybridom	E.Kremmer
MICA	keine	IgG2b	159227	FACS/ 5 µg/ml	R&D

MICB	keine	IgG2b	236511	FACS/ 5 µg/ml	R&D
ICAM-1	keine	IgG2a		FACS/ Hybridom	J.Johnson
Isotypkontrolle	FITC	IgG2b	MOPC19	FACS/ 2 µl	BD
Isotypkontrolle	PE	IgG2a	7T4-1F5	FACS/ 2 µl	BC
Isotypkontrolle	PerCP	IgG2a	X39	FACS/ 2 µl	BD
Isotypkontrolle	APC	IgG2a	X39	FACS/ 2 µl	BD
CD3	FITC	IgG1	UCHT1	FACS/ 2 µl	BC
CD4	APC	IgG1	13B8.2	FACS/ 2 µl	BC
CD6	PE, keine	IgG1	M-T605	FACS/ Separation	BD
CD8	PE	IgG1	B9.11	FACS/ 2 µl	BC
CD14	FITC	IgG1	M5E2	FACS/ 2 µl	BD
CD16	FITC, keine	IgG1	3G8	FACS/ Stimulation	BC
CD25	FITC	IgG2a	B1.49.9	FACS/ 2 µl	BC
CD44	FITC	IgG1	37.51.1	FACS/ 2 µl	BC
CD45RA	FITC	IgG1	ALB11	FACS/ 2 µl	BC
CD45RO	PE	IgG2a	UCHL1	FACS/ 2 µl	BC
CD56	APC, PE	IgG1	NKH-1	FACS/ 2 µl	BC
CD85j	PE	IgG1	HP-F1	FACS/ 2 µl	BC
CD94	FITC, PE	IgG1	HP-3D9	FACS/ 2 µl	BD
CD107a	FITC, PE	IgG1	H4A3	Degranulation/10µl	BD
CD158a/h(p58.1)	PE	IgG1	EB6	FACS/ 2 µl	BC
CD158b/j (p58.2)	PE	IgG1	GL183	FACS/ 2 µl	BC
CD158e1 (p70)	PE	IgG1	Z27.3.7	FACS/ 2 µl	BC
CD158i (p50.3)	PE	IgG2a	FES172	FACS/ 2 µl	BC
CD161	PE	IgG2a	191B8	FACS/ 2 µl	BC
CD166 (ALCAM)	PE	IgG1	3A6	FACS/ 2 µl	BC
2B4 (CD244)	PC5, keine	IgG1	C1.7	FACS/ Stimulation	BC
NKG2D	PE, keine	IgG1	149810	FACS/ Stimulation	R&D
NKG2C	keine	IgG1	134591	Stimulation	R&D
NKG2A	PE	IgG2b	Z177	FACS/ 2 µl	BC
Nkp30	PE, keine	IgG1	Z25	FACS/ Stimulation	BC
Nkp44	PE, keine	IgG1	Z231	FACS/ Stimulation	BC
Nkp46	PE, keine	IgG1	BAB281	FACS/ Stimulation	BC

BD: Becton Dickinson, BC: Beckman Coulter

5.2 Sekundärantikörper

Spezifität	Konjugation	Organismus	Einsatz	Hersteller
αMaus-IgG	PE	Ziege	1:100	Jackson ImmunoResearch
αMaus-IgG/M	PE, FITC	Ziege	1:100	Jackson ImmunoResearch
αMaus-IgG F(ab') ₂ -Fragment	keine	Ziege	20 µg/ml	Beckman Coulter

6 Kooperationspartner

Dr. Christine Sers, Institut für Pathologie, Charité, Berlin

Dr. Ruprecht Kuner, DKFZ, Heidelberg

Prof. Dr. Elisabeth Weiß, Institut für Anthropologie und Humangenetik, LMU München

7 Firmenverzeichnis

Agfa-Gevaert, Leverkusen
Alexis, Laufelingen, Schweiz
Amersham, Little Chalfont, England
ATCC, Rockville, Maryland, USA
Atomic Energy of Canada, Ontario, Kanada
Avidity, Denver, USA
Bayer, Health Care, West Haven CT
BDK Luft- u Reinraumtechnik, Sonnenbühl
Beckman Coulter/Immunotech, USA
Becton Dickinson Biosciences (BD), USA
Bibby Dunn Labortechnik, Asbach
Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA
Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen
Biozym, Hess, Oldendorf
BMT, Meerbusch-Osterath
Brand, Wertheim
Branson Ultrasonics, Danbury, USA
Braun, Melsungen
Buddeberg
Corning, New York, USA
DAKO, Glostrup, Dänemark
Dianova, Hamburg
Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Dynal, Oslo, Norwegen
Eppendorf, Hamburg
Falcon, Oxnard, Kalifornien, USA
Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Greiner, Nürtingen
Heraeus, Hanau
IKA Labortechnik, Staufen
Invitrogen/Life Technologies, Karlsruhe
Julabo, Seelbach
Leica, Wetzlar
Liebherr, Biberach an der Riss
Merck, Darmstadt
Messer Griesheim, Krefeld
Mettler, Gießen
Millipore, Bradford, Massachusetts, USA
Miltényi Biotech, Bergisch Gladbach
Nalgene, Rochester, New York, USA
NeoLab, Heidelberg
Novagen, Wisconsin, USA
Nunc, Naperville, USA
PAN Biotech, Aidenbach
Panomics
PerkinElmer, Massachusetts, USA
Pharmacia, Uppsala, Schweden
Promega, Madison, USA
PromoCell, Heidelberg
Qiagen, Chatsworth, Kalifornien, USA
R&D Systems, Minneapolis, USA
Roche, Mannheim
Sartorius, Göttingen
Serotec, Oxford, UK
Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Starlab, Ahrensburg
Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA
VWR International GMBH, Darmstadt

D Methoden

1 Allgemeine Methoden der Zellkultur

Alle Schritte der Zellkultivierung wurden mit sterilen Medien, Lösungen und Materialien an einer Sterilwerkbank durchgeführt, um eine Kontamination mit Pilzen und Bakterien zu vermeiden. Die Zellkulturen wurden bei 37°C mit 6 % CO₂ inkubiert.

1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für eine längerfristige Lagerung von Zellen in flüssigem Stickstoff wurde das Gefrierschutzmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) zugesetzt. DMSO dringt in die Zellen ein und führt dabei zu einer Verminderung des Wassergehaltes. Dadurch wird die Bildung von Eiskristallen und damit eine Schädigung der Zellen verhindert. Da DMSO auf stoffwechselintakte Zellen toxisch wirkt, wurden alle Arbeitsschritte zügig auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (8' bei 540 g) sedimentiert und das Pellet anschließend in 0,5 ml kaltem FCS resuspendiert. Nach Zugabe desselben Volumens an DMSO wurde die Suspension in ein vorgekühltes Einfrierröhrchen pipettiert. Das Röhrchen wurde in mehrere Lagen von Papiertüchern eingewickelt um ein langsames Einfrieren zu gewährleisten und bei -80°C gelagert. Für eine längerfristige Lagerung wurden die Zellen in Stickstoff (-196°C) überführt. Das Auftauen der Zellen erfolgte durch schnelles Erwärmen der Kryoröhrchen in einem 37°C warmen Wasserbad. Waren die Zellen fast vollständig aufgetaut, wurden sie in einer 1:1 Mischung aus FCS und RPMI III aufgenommen und sofort abzentrifugiert (8' bei 540 g). Um das zelltoxische DMSO vollständig zu entfernen wurden die Zellen nochmals mit 5 ml RPMI III gewaschen, anschließend konnten sie in ihrem jeweiligen Medium aufgenommen und in Zellkulturflaschen überführt werden.

1.2 Bestimmung der Zellzahl

Aus einer Zellsuspension wurden 50 µl steril entnommen, 1:1 mit Trypanblau gemischt und davon 10 µl in eine Neubauerzählkammer pipettiert und am Lichtmikroskop ausgezählt. Trypanblau durchdringt nur beschädigte Plasmamembranen und färbt somit tote Zellen blau an. Durch diese Unterscheidung konnten die lebenden Zellen in einem Großquadrat (16 Kleinquadrate) ausgezählt werden. Die Zellzahl pro ml Suspension ergibt sich aus der Formel: mittlere Zahl pro Großquadrat x Verdünnungsfaktor x 10⁴

1.3 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC)

Die Isolierung von PBMC aus Vollblut gesunder Spender erfolgte mit Hilfe des Polysaccharides Ficoll (Dichte 1077 g/ml). Dabei werden die Blutbestandteile aufgrund der Zentrifugalkraft im Ficoll-Gradienten entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Die Abnahmeröhrchen wurden vor Blutentnahme zur Gerinnungshemmung mit 0,1 ml Heparin pro 10 ml Blut versetzt. Nach der Abnahme wurde das Blut im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt und langsam auf 15 ml Ficoll in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen geschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 25' bei 840 g ohne zugeschaltete Bremse, wodurch eine Auftrennung der Blutbestandteile gemäß ihrer spezifischen Dichte erreicht werden konnte. Die PBMC bilden eine weiße Grenzschicht (Interphase) zwischen dem darüber liegenden Blutplasma und der Ficoll-Lösung, die Erythrozyten und die Granulozyten bilden das Sediment. Die PBMC wurden in ein frisches Röhrchen überführt und zweimal mit dem 5-fachen Volumen an PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in RPMI III aufgenommen und gezählt.

1.4 Kultivierung von adhärenenten und Suspensions-Zellen

Die Kultivierung von adhärenent wachsenden Zellen erfolgte in dem für die Zellen optimalen Medium in liegenden Kulturflaschen. Transfizierte Zelllinien mit definierter Antibiotikaresistenz als Selektionsmarker wurden in entsprechendem Selektionsmedium kultiviert. In kleinen Kulturflaschen (KKF, 25 cm²) wurden 8 - 9 ml Medium verwendet, in mittleren Kulturflaschen (MKF, 75 cm²) 10 - 12 ml. Alle drei bis vier Tage wurde das Medium abgesaugt und durch frisches ersetzt. Waren die Zellen dicht gewachsen (Konfluenz von >80 %) wurden sie auf zwei Kulturflaschen aufgeteilt, wozu die Zellen in Suspension gebracht werden mussten. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, um das im Medium enthaltene FCS vollständig zu entfernen. Anschließend wurde Trypsin/EDTA zugegeben (10 µl/cm²) und die Flaschen bei 37°C im Brutschrank für ca. 5' inkubiert. Trypsin/EDTA führt durch proteolytische Spaltung von Bindeproteinen und Komplexierung von zweiwertigen Kationen zu einer Ablösung der Zellen, was unter dem Mikroskop kontrolliert wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Medium abgestoppt, da FCS die Aktivität von Trypsin hemmt. Danach konnte die Zellsuspension auf zwei Flaschen verteilt oder für Experimente verwendet werden. Suspensionszellen wurden in entsprechendem Medium in kleinen oder mittleren Kulturflaschen kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurde die Hälfte des Mediums abgesaugt und durch frisches ersetzt.

1.5 Behandlung der Kolon-Karzinom-Zelllinien mit unterschiedlichen Inhibitoren

Das konstitutive MAPK-Signal in den Kolon-Karzinom-Zelllinien konnte durch Kinase-Inhibitoren gehemmt werden, um somit den Effekt auf die Immunerkennung zu untersuchen. Der MEK Inhibitor U0126 ist eine organische Verbindung (1,4-Diamino-2,3-Dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadien) und bindet an die MAPK-Kinase MEK1/2, wodurch deren katalytische Aktivität gehemmt wird und so eine Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 verhindert wird. U0126 wurde in DMSO gelöst (10 mM), in Medium vorverdünnt, und in einer Endkonzentration von 10 bzw. 20 μM eingesetzt. Der MEK-Inhibitor PD98059 verhindert eine Aktivierung von unphosphorylierten MEK1/2-Kinasen durch die Kinase B-RAF, wobei bereits aktiviert vorliegende MEK-Kinasen nicht gehemmt werden, weshalb die Inhibition nicht so stringent ist im Vergleich zu U0126. PD wurde in DMSO gelöst (10 mM) und in einer Endkonzentration von 50 μM eingesetzt. Sorafenib (Nexavar, BAY 43-9006) hemmt die Kinasen Raf-1, B-RAF sowie einige Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (u.a. VEGFR-2,3; PDGFR- β , Flt-3 und c-KIT) (Wilhelm, Carter et al. 2004) und führt daher auch zu einer Hemmung des MEK/ERK-Signalweges. Eine Tablette wurde in 31,4 ml DMSO gelöst (10 mM) und zelltypabhängig in einer Endkonzentration von 5 – 10 μM eingesetzt. Der Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK wurde in DMSO gelöst (10 mM) und in einer Konzentration von 40 μM eingesetzt. Um die Auswirkungen auf die Oberflächenexpression immunrelevanter Marker zu untersuchen wurden $0,6 \times 10^6$ Zellen pro MKF ausgesät, wobei die Zugabe des jeweiligen Inhibitors 24 h später erfolgte. Da die Inhibitoren bei 37°C nicht stabil sind, wurde das Medium alle 48 h gewechselt. Für die Herstellung von Zelllysaten zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades von Kinasen und Transkriptionsfaktoren wurden $0,1 \times 10^6$ Zellen in 6-Lochplatten ausgesät und wie beschrieben behandelt. Die Lyse der Zellen erfolgte dann ohne vorheriges Ernten der Zellen direkt in den Platten (vgl. Methoden 5.3).

Um den Effekt der DNS-Methylierung auf die Expression immunrelevanter Marker auch in Kolon-Karzinom-Zelllinien untersuchen zu können, von denen keine DNMT-Deletions-Varianten zur Verfügung standen, wurden diese Zellen mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-C) behandelt. 5-Aza-C ist ein chemisches Analog des Nukleosids Cytidin und hemmt nach DNS-Einbau durch Bildung stabiler Komplexe mit DNS-Methyltransferasen die weitere Methylierung der DNS. Für eine Behandlung wurden 1×10^6 Zellen in einer MKF ausgesät und 24 h später mit 0,5 μM 5-Aza-C behandelt. Die geringe Zelldichte (Konfluenz < 20 %) ist wichtig, da für eine DNS-Demethylierung Zellteilung und DNS-Neusynthese nötig sind. Das

Medium wurde während der Behandlungsdauer (96 h – 120 h) alle 24 h gewechselt. Da alle eingesetzten Inhibitoren in DMSO gelöst waren, wurde in jedem Experiment eine entsprechende DMSO-Kontrolle mitgeführt, wobei DMSO immer im selben Volumen wie der in DMSO-gelöste Inhibitor zugegeben wurde. Eine Zugabe von z.B. 10 µl DMSO auf 10 ml Medium wurde als 0,1 % angegeben.

1.6 Kultivierung und Restimulation des ZTL-Klons JB4 und von NK-Zellen

Der allo-HLA-A2-restringierte T-Zellklon JB4 wurde in T-Zellmedium mit 50 U/ml Interleukin-2 (IL-2) in 24-Lochplatten in einem Volumen von 1,5 ml kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurde die Hälfte des Mediums abgenommen und durch frisches T-Zell-Medium ersetzt (100 U/ml IL-2), so dass konstant eine Konzentration von 50 U/ml IL-2 gehalten wurde. Waren die Zellen sehr dicht gewachsen wurden sie durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vom Boden gelöst, und die Hälfte in ein neues Loch der Platte überführt und frisches Medium zugegeben. Um T-Zellklone am Leben zu halten, benötigen sie neben IL-2, alle 10-14 Tage einen weiteren Stimulus durch eine Restimulation. Dabei werden Antigen⁺ (HLA-A2)-Zielzellen (RCC-26) und Antigen⁻-Zellen (JB-LCL), sogenannte *feeder*-Zellen, zusammen mit den T-Zellen kultiviert, wobei für 1×10^6 T-Zellen je $0,1 \times 10^6$ *feeder*-Zellen eingesetzt wurden. Um eine Proliferation von Stimulationszellen zu verhindern, wurden sie in einer Bestrahlungsanlage mit dem Caesium-Isotop ¹³⁷Cs (β- und γ- Strahler) bestrahlt. Die jeweilige Bestrahlungsdosis ist dabei abhängig vom Zelltyp (vgl. Tabelle 2). NK-Zellen wurden nach der Isolierung bzw. CD6-Separation (vgl. Methoden 1.7 und 1.8) in RPMI III, 10 % HS und 100 U/ml IL-2 in 24-Lochplatten ausgesät (1×10^6 Zellen/ 1,5 ml). Alle drei bis vier Tage wurde das Medium zur Hälfte abgesaugt und durch frisches ersetzt. Zum Expandieren der Zellen wurden diese mit einer Pasteurpipette aufgewirbelt und auf zwei Löcher verteilt. Wurden die NK-Zellen länger als eine Woche kultiviert, erfolgte alle 10 – 14 Tage eine Restimulation mit allogenen, bestrahlten PBMC eines zweiten Spenders.

Tabelle 2 Bestrahlungsdosis der verschiedenen Stimulationszellen für T- bzw. NK-Zell-Kultivierung

Restimulationszelle	Bestrahlungsdosis (Gy)
RCC-26 ¹	100
JB-LCL ¹	90
PBMC ²	50

¹ Stimulationszellen für ZTL-Klon JB4, ² Stimulationszellen für NK-Zell-Kultivierung.

1.7 Isolierung von NK-Zellen aus PBMC

Die Isolierung von NK-Zellen aus PBMC gesunder Spender erfolgte mittels der negativen Isolationsmethode von Dynal. Diese basiert auf einer Aufreinigung der gewünschten Zellpopulation durch Depletion der unerwünschten Zellen. Hierfür enthält das Kit ein Antikörpermisch, sowie magnetische Mikrosphären. An diese sind Antikörper gegen den Fc-Teil der zur Depletion eingesetzten Antikörper gekoppelt. Das Gemisch enthält Antikörper gegen CD14, CD36 und CDw123 zur Depletion von Monozyten und Granulozyten, sowie Antikörper gegen CD3 und HLA-Klasse-II DR/DP zur T- und B-Zell-Depletion. Die negative Isolation erfolgte nach Anleitung, wobei für 1×10^7 PBMC 20 μ l Antikörpermisch und 100 μ l der magnetischen Mikrosphären verwendet wurden. Die Inkubationsschritte mit den Antikörpern bzw. den Mikrosphären erfolgte jeweils für 10' bei 4°C auf einem Roller. Durch Einsatz eines Magneten konnten die nicht gebundenen NK-Zellen von den Mikrosphären abgetrennt und in ein neues Röhrchen überführt werden. Anschließend wurden die Zellen gezählt, abzentrifugiert und in entsprechendes Medium überführt.

1.8 Separation von NK-Zellen anhand ihrer CD6-Expression

Nach einer negativen Isolation von NK-Zellen aus PBMC konnte für spezielle Fragestellungen eine weitere Separation der Zellen in verschiedene Subpopulationen angeschlossen werden. Die mit der negativen Isolationsmethode gewonnenen NK-Zellen wurden in PBS /1 % FCS resuspendiert (10×10^6 /ml) und mit 20 μ g Anti-CD6 Antikörper (M-T605) eine halbe Stunde rollend bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml PBS/1 % FCS gewaschen (8' bei 540 g) und wieder in 2 ml aufgenommen. Magnetische IgG-gekoppelte Mikrosphären von Dynal (4×10^8 / ml) wurden in einer Konzentration von ca. 6 Kügelchen pro Zelle zugegeben, wobei von 50 % CD6⁺-NK-Zellen ausgegangen wurde. Nach halbstündiger Inkubation bei 4°C erfolgte die Separation der beiden Fraktionen durch Einsatz eines Magnets, wonach die CD6⁻-Fraktion im Überstand in ein neues Röhrchen überführt werden konnte. Um die CD6⁺-Zellen von den Kügelchen zu lösen, wurde der Magnet entfernt und die Zellen mehrfach auf- und abpipettiert und danach die Mikrosphären mit dem Magnet entfernt. Beide Fraktionen wurden gezählt und in entsprechendem Medium aufgenommen.

1.9 Klonierung von NK-Zellen

Die NK-Zellen wurden mit Hilfe der Dynal-Methode (vgl. Methoden 1.7) aus PBMC isoliert, in RPMI III/ 10 % HS aufgenommen und gezählt. Anschließend wurden sie 1:100 in Medium

verdünnt. Um die Verdünnung zu testen, wurde ein kleiner Teil der 1:100 Verdünnung so eingestellt, dass sich 100 Zellen in 100 μl befinden. Danach wurden 100, 50, 30 bzw. 10 μl in eine 96-Lochbodenplatte pipettiert und unter dem Mikroskop gezählt. Wenn die erwartete Zellzahl vorhanden war, wurde die 1:100 Verdünnung auf 5 Zellen/100 μl bzw. 1 Zelle/100 μl eingestellt und in 96-Lochbodenplatten pipettiert. Anschließend wurden bestrahlte, allogene PBMC als *feeder*-Zellen zugegeben (20.000 Zellen in 50 μl) und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach 24 h wurde IL-2 in einer Endkonzentration von 100 U/ml zugegeben. Die NK-Zellklone wurden 14 Tage später durch Zugabe von 20.000 *feeder*-Zellen restimuliert und weiter expandiert.

1.10 Rezeptorspezifische Untersuchungen

Kopplung von Antikörpern an Platten

Um einen Effekt der Stimulation bestimmter Rezeptoren auf die Degranulation (vgl. Meth. 3.2) und die Zytokinsekretion (vgl. Meth. 5.2) von NK-Zellen zu untersuchen, wurden spezifische Platten-gebundene Antikörper benutzt. Das Koppeln der Antikörper ist notwendig, da für eine erfolgreiche Stimulation von Rezeptoren eine Quervernetzung stattfinden muss, die durch lösliche Antikörper nicht erreicht werden kann. Für die Kopplung wurde als Primäantikörper ein α Maus-IgG F(ab)₂-Fragment (20 $\mu\text{g/ml}$ in PBS) über Nacht bei 4°C an eine 96-Lochbodenplatte gebunden. Nach zweimaligem Waschen mit 100 μl PBS wurde der entsprechende Maus-IgG-Sekundäantikörper (10 $\mu\text{g/ml}$) zugegeben und eine halbe Stunde bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift konnten die NK-Zellen in einem Volumen von 200 μl zugegeben und je nach Fragestellung unterschiedlich lang inkubiert werden.

Blockieren von HLA-Klasse-I-Molekülen auf Zielzellen

Um den inhibierenden Effekt von HLA-Klasse-I-Molekülen auf die NK-Aktivierung zu untersuchen, wurde HLA-Klasse-I auf den Zielzellen mit Hilfe von W6/32 F(ab)₂-Fragment blockiert. Der blockierende Antikörper darf hierfür keinen Fc-Teil besitzen, da dadurch eine Aktivierung der NK-Zellen über den Fc γ RIIIA-Rezeptor CD16 stattfinden würde. Zu 200.000 Zellen wurden 200 μl Antikörper in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ pipettiert und für 30' bei RT inkubiert. Als Kontrolle wurde in einem weiteren Ansatz ein Isotypantikörper in selber Konzentration zu den Zielzellen gegeben.

2 Durchflusszytometrie

2.1 Allgemein

Die Durchflusszytometrie am *fluorescence activated cell scanner* (FACS) ermöglicht eine gleichzeitige Analyse der Oberflächenexpression mehrerer Moleküle auf Zellen. Dazu werden monoklonale Antikörper (Primärantikörper) genutzt, die spezifisch gegen das jeweilige Molekül gerichtet sind. Diese Antikörper können direkt Fluoreszenz-markiert sein oder mit einem zweiten, isotyp- oder speziesspezifischen Fluoreszenz-markierten Antikörper (Sekundärantikörper) nachgewiesen werden. Bei der Messung am Durchflusszytometer werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom durch die Messküvette aufgenommen und dabei vereinzelt. Die im Gerät befindlichen Laser regen, bei passender Extinktionswellenlänge, die an den Antikörpern konjugierten Farbstoffe an. Diese absorbieren die Energie des Laserlichtes und geben sie in Form eines Photons bestimmter Wellenlänge (Emissionswellenlänge) wieder ab, was durch einen Photodetektor registriert wird. Dabei ist die Anzahl der gemessenen Photonen proportional zur Anzahl der an einer Zelle gebundenen Antikörper. Dadurch ist es möglich die Qualität und die Quantität eines exprimierten Moleküls zu bestimmen. Zusätzlich erlaubt das entstehende Vorwärtsstreulicht (FSC) eine Aussage über die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (SSC) ist ein Maß der Zell-Granularität.

In der vorliegenden Arbeit wurde der FACSCalibur, der mit zwei Lasern (Argonlaser, Heliumneonlaser) ausgestattet ist und der LSRII, der mit vier Lasern (Argonlaser, Heliumneonlaser, UV-Laser und violetter Laser) ausgestattet ist, verwendet. Monoklonale Antikörper die für FACS Analysen verwendet wurden, waren entweder mit FITC (Fluorescein-Isothiocyanat, FL-1, Emissionsmaximum bei 530 nm), PE (Phycoerythrin, FL-2, Emissionsmaximum bei 585 nm), PC5 (FL-3, Emissionsmaximum bei 660-680 nm), PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein FL-3, Emissionsmaximum bei 675 nm) oder APC (Allophycocyanin, FL-4, Emissionsmaximum bei 767 nm) markiert.

Direkte Färbungen

Die zu messenden Zellen wurden abzentrifugiert und in FACS-Puffer aufgenommen. Pro Ansatz wurden 50 µl Zellsuspension (50.000 – 200.000 Zellen) mit jeweils 2 µl, von bis zu vier verschiedenen direkt markierten, Antikörper für 30' im Dunkeln auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und die markierten Zellen entweder in 100 - 150 µl FACS-Puffer aufgenommen und sofort gemessen, oder mit 100 - 150 µl 1 % PFA in PBS fixiert und

innerhalb der nächsten Tage gemessen. Zu jeder Messung wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Als Negativkontrollen dienten nicht-spezifisch-bindende Antikörper mit den jeweils in der Messung verwendeten Isotypen (Isotypkontrollen). Die fixierten FACS-Proben wurden bis zur Messung im Dunklen bei 4°C aufbewahrt, um ein Ausbleichen der Farbstoffe zu vermeiden.

Indirekte Färbungen

Unmarkierte Antikörper mussten indirekt nachgewiesen werden. Hierfür wurden 50.000 bis 200.000 Zellen in 50 µl FACS-Puffer aufgenommen und mit 40 - 50 µl des ersten unmarkierten Antikörpers (Primärantikörper) für 45' auf Eis inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 120 µl FACS-Puffer wurden 50 µl des spezifischen Sekundärantikörpers (PE- oder FITC-markiert) zugegeben und die Zellen weitere 20' im Dunkeln auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, wie bereits für die direkte Färbung beschrieben, weiterbehandelt. Als Isotypkontrollen dienten nicht-bindende und ebenfalls unmarkierte Primärantikörper.

Markierung toter Zellen

Um eine Unterscheidung toter und lebender Zellen treffen zu können, wurde Propidiumiodid (PI) verwendet. PI kann die beschädigte Membran toter Zellen durchdringen und in die DNS interkalieren, lebende Zellen werden nicht angefärbt. Die Zellen durften dafür nicht mit PFA fixiert werden, sondern wurden sofort nach Zugabe von 0,2 µg/ml PI gemessen, wobei das Emissionsmaximum von PI bei 619 nm liegt.

2.2 Messung und Auswertung

Die Software im Fluoreszenzzytometer ordnet jeder gemessenen Zelle einen Wert für SSC und FSC, sowie eine Fluoreszenzintensität für die exprimierten Moleküle zu. Diese Werte lassen sich als Histogramm (eindimensional, Fluoreszenzintensität gegen Zellzahl) oder als Punktwolkendiagramm „Dot Plot“ (zweidimensional, beliebige Parameter) darstellen.

Durch die Darstellung der FSC/SSC-Werte wurde bei jeder Messung zunächst die gewünschte Zellpopulation aufgrund der Größe und Granularität für weitere Analysen ausgewählt. Im Anschluss wurden Zellansätze mit den jeweiligen Fluoreszenz-markierten Isotypkontrollen gemessen und diese als Histogramme dargestellt. Die Kurve der jeweiligen Isotyp-Fluoreszenzintensität wurde am linken Rand des Histogramms positioniert, und in den anschließenden Analysen als negativ gewertet. Die einzelnen Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe können überlappen, so dass z.B. FITC-Signale im PE-Kanal gemessen

werden würden. Um dies zu verhindern, war es bei Verwendung mehrerer Farben nötig eine Korrektur der Überlappung (Kompensation) durchzuführen. Dies musste am FACSCalibur manuell durchgeführt werden, bei Messungen am LSRII erfolgte die Kompensation automatisiert. Dazu wurden Zellansätze, die nur einen spezifischen Fluoreszenz-markierten Antikörper enthielten, gemessen. Konnte dennoch ein Signal in einem der anderen Fluoreszenzkanäle detektiert werden, dann musste dieses falschpositive Signal korrigiert werden. Dazu wurde von der Fluoreszenzintensität im nicht besetzten Kanal prozentual die überlappende Fluoreszenzintensität abgezogen, bis nur im tatsächlich besetzten Fluoreszenzkanal ein Signal detektiert wurde. Anschließend konnten die Proben gemessen werden.

Indirekte Färbungen

Bei dieser Färbung liegt nur eine Fluoreszenz durch den Sekundärantikörper pro Zellansatz vor, daher konnte die Auswertung in Histogrammen dargestellt werden. Bei jeder Messung wurde eine Isotypkontrolle mit der entsprechenden Fluoreszenz mitgeführt, so dass ein Vergleich der Fluoreszenzintensitäten beider Kurven (Isotyp und spezifischer Antikörper) die Expressionsstärke des untersuchten Moleküls angibt. Dazu kann die Differenz der mittleren Fluoreszenzintensitäten (ΔMFI) der beiden Kurven benutzt werden, oder die Kurven in einem Histogramm überlagert dargestellt werden (*overlay*).

Direkte Färbungen

Wurde mehr als ein Antikörper benutzt, dann wurden die Daten in Punktediagrammen dargestellt und mit Hilfe der Boole'schen Algebra ausgewertet. Dazu wurde für jede Fluoreszenz im entsprechenden Histogramm, anhand der Isotypkontrolle, die als negativ zu bewertende Fluoreszenzintensität festgelegt. Die entsprechenden positiven Fluoreszenzen konnten als Regionen definiert werden (z.B. $R1 = \text{FL1}^+$, $R2 = \text{FL2}^+$). Die Boole'sche Algebra verwendet nun die Operatoren UND und NICHT, um die Expression der untersuchten Marker auf einer Zelle zu definieren. Eine Zelle, die positiv für Marker in FL1^+ ($R1$), FL2^+ ($R2$), FL3^+ ($R3$) aber nicht FL4^+ ($R4$) ist, wird folgendermaßen definiert: $R1 \text{ UND } R2 \text{ UND } R3 \text{ und NICHT } R4$. Jeder möglichen Kombination dieser vier Regionen kann eine Farbe zugeordnet werden, wodurch bei einer Auftragung zweier Parameter im Punktediagramm zusätzlich eine Zuordnung der Zellen anhand der anderen Marker möglich ist, was in der Software auch prozentual angegeben wurde.

Zur Auswertung und Messung verwendete Software:

FACSCalibur: CellQuest Software 5.2.1 (BD Bioscience)

LSRII: FACSDiva Software 5.0.2 (BD Bioscience)

3 Messung der Zytotoxizität von T- und NK-Zellen

3.1 Chromfreisetzungstest

Zur Untersuchung der zellvermittelten Lyse (*cell mediated lysis*, CML) wurden Chromfreisetzungstests durchgeführt. Hierfür wurden die Zielzellen mit radioaktivem Chrom (Na_2CrO_4) markiert, das bei einer Lyse der Zielzelle durch die Effektorzelle in den Überstand freigesetzt wird und dort nachgewiesen werden konnte. Etwa 3×10^6 Zellen wurden in 200 μl FCS aufgenommen und mit 40 - 50 μl radioaktivem Natriumchromat (ca. 85 μCi , in RPMI III verdünnt) für 90' bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit wurde das radioaktive Nuklid von den Zellen aufgenommen. Die Zellen wurden dann zweimal mit 2 ml RPMI III/ 15 % FCS (CML-Medium) für 5' bei 540 g gewaschen, gezählt und in das berechnete Endvolumen in entsprechender Zellzahl (2000 Zellen/ 50 μl) überführt.

Direkte zellvermittelte Lyse

Für die direkte zellvermittelte Lyse wurden die Killerzellen und die radioaktiv markierten Zielzellen in verschiedenen Verhältnissen (20:1 bis 5:1) in 96-Loch-Rundbodenplatten miteinander bei 37°C inkubiert. Von den Zielzellen wurde hierbei eine konstante Zahl von 2000 Zellen in 50 μl CML-Medium pro Loch eingesetzt. Zuvor wurden die Killerzellen vierfach titriert. Hierzu wurden in die oberste Reihe der Platte 20 x mehr Killerzellen als Zielzellen in 100 μl (40.000 Zellen) pipettiert, in die weiteren Reihen wurden 50 μl CML-Medium vorgelegt. Anschließend wurden 50 μl aus der obersten Reihe in die nächste pipettiert, und aus dieser wieder 50 μl in die folgende Reihe überführt, wodurch sich die abnehmenden Killer- zu Zielzell-Verhältnisse ergaben. Zur Bestimmung der spontanen Chromfreisetzung wurde ein Ansatz nur mit Zielzellen und 50 μl CML-Medium angesetzt. Für die maximale Chromfreisetzung wurden 50 μl der Zielzellen direkt auf die Messplatte (Lumaplatte) übertragen. Nach Ablauf der vierstündigen Inkubation bei 37°C wurden 50 μl des Überstandes pro Ansatz auf die Messplatten übertragen und über Nacht getrocknet.

Redirigierte Lyse

Um die Balance zwischen aktivierendem und inhibierendem Signal auf die NK-Effektorfunktionen zu untersuchen, wurde mit der NKL-Tumorlinie und der murinen Mausmastozytomlinie P815 als Zielzelle eine redirigierte Lyse durchgeführt. Die P815-Zelllinie exprimiert Fc-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, so dass sie mit IgG-Antikörpern aus der Maus beladen werden kann. Dafür wurden Antikörper gegen inhibierende NK-Rezeptoren in 8 Titrationsstufen eingesetzt (EK: 100 ng/ml – 0,78 ng/ml in je 12,5 µl). Anschließend erfolgte die Zugabe von 12,5 µl Antikörper gegen aktivierende Rezeptoren in konstanter Menge von 100 ng/ml. Nach 30' Inkubation bei RT mit 2000 ⁵¹Cr-markierten P815-Zellen (50 µl) wurden 40.000 NKL-Zellen (25 µl) zu jedem Ansatz pipettiert, so dass sich ein Gesamtvolumen von 100 µl ergab. Alle weiteren Schritte erfolgten wie für die direkte zellvermittelte Lyse beschrieben.

Messung und Auswertung

Die Messplatten wurden mit Folie abgeklebt und im *TOPCount*-Zählgerät gemessen. Die radioaktive Strahlung wurde durch die Beschichtung der Messplatten in Lichtquanten umgewandelt, die das Zählgerät in Lichtemissionen pro Minute (*counts per minute*, cpm) berechnet. Der Prozentsatz spezifischer Lyse ergab sich aus der Formel:

$$\frac{\text{Gemessene } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}}{(\text{maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} : 2) - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}} \times 100$$

Der Wert der maximalen Chromfreisetzung musste durch zwei geteilt werden, um die Verdünnung der restlichen Proben zu berücksichtigen, da die Zielzellen für diesen Wert direkt und unverdünnt auf die Messplatte pipettiert wurden.

3.2 CD107a-Degranulations-Versuch

Erkennen NK-Zellen bzw. ZTLs ihre spezifischen Zielzellen dann kommt es zu einer Entleerung der zytotoxischen Granula in die immunologische Synapse. Dabei gelangt LAMP-1 (CD107a), ein Bestandteil der Granulamembran, transient an die Zelloberfläche der Effektorzellen. Durch Zugabe Fluoreszenz-markierter Antikörper gegen CD107a während der Koinkubation von Effektor- und Zielzellen werden alle durch Degranulation auf der Oberfläche exprimierten CD107a-Moleküle markiert. Die resultierende Fluoreszenzintensität der ZTL bzw. NK-Zellen ist somit proportional zum Ausmaß der Degranulation.

Durchführung

Die PBMCs wurden nach 48 h Stimulation mit 500 U/ml IL-2 verwendet, der T-Zellklon JB4 wurde an Tag 8 bzw. 9 nach Restimulation für die Versuche eingesetzt. Die jeweiligen Effektor- und Zielzellen wurden in 96-Lochplatten in einem Gesamtvolumen von 200 µl TM-Medium insgesamt 4 h bei 37°C inkubiert. Dabei wurden $0,3 \times 10^6$ PBMCs oder $0,1 \times 10^6$ ZTL-Zellen mit je $0,1 \times 10^6$ Zielzellen und 10 µl CD107a-Antikörper (PE oder FITC) eingesetzt. Um die spontane Degranulation quantifizieren zu können, wurde ein Kontrollansatz ohne Zugabe von Zielzellen mitgeführt. Nach 1 h wurden 5 µl Monensin (2 mM) zupipettiert, um eine Internalisierung von CD107a während der Inkubation zu verhindern, nach weiteren 3 h erfolgte dann eine AK-Färbung der Effektorzellen um die spezifische Degranulation einzelner Subpopulationen analysieren zu können, wobei NK-Zellen, definiert durch ihren CD3⁻ und CD56⁺-Phänotyp, von den übrigen PBMC zu unterscheiden waren. Die Zielzellen konnten anhand ihrer Größe von den Effektorzellen bei der durchflusszytometrischen Messung unterschieden werden und wurden in parallelen Ansätzen auf ihre Liganden-Expression hin untersucht.

4 Molekularbiologische Methoden zur HLA/KIR-Typisierung

4.1 Isolierung genomischer DNS

Die Isolierung genomischer DNS zur Bestimmung der HLA- und KIR-Allele erfolgte mit Hilfe des QIAmp DNA Mini Kits nach Herstellerangaben. Dabei wird die Zellwand durch ein Detergenz aufgeschlossen und die Proteine anschließend durch Zugabe einer Protease (Proteinkinase K) abgebaut. Durch Zentrifugationen in Spinsäulchen wird die DNS an eine Membran gebunden, gewaschen und dann in DEPC-Wasser eluiert. Die Konzentration der isolierten DNS wurde bei 260 nm an einem Spektralphotometer bestimmt, und auf eine Konzentration von 20 ng/µl in sterilem Wasser eingestellt. Die DNS konnte bei -20°C gelagert werden

4.2 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Durch die PCR konnten spezifische Sequenzen genomischer DNS amplifiziert werden. Im Falle der HLA-Klasse-I- und KIR-Typisierung sind das die variablen Regionen, so dass eine allelspezifische Unterscheidung möglich wird. Als Positivkontrolle für den intakten Zustand der DNS wurde β-Actin amplifiziert. Hierbei handelt es sich um ein sogenanntes

„Haushaltsgen“, das immer von jeder Zelle exprimiert wird. Als Negativkontrolle wurde in einem Ansatz die DNS durch Wasser ersetzt.

Komponenten	μl	Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklen
D-Mix	13,8	Schritt 1	3'	96 °C	1
Primer	4	Schritt 2	20''	96°C	5
Taq-polymerase	0,2		20''	60°C	
DNS (20ng/ μl)	2		20''	72°C	
μl	Σ 20	Schritt 3	10''	96°C	30
			15''	60°C	
			20''	72°C	
			1'	72 °C	
		Schritt 4	10'	72 °C	1
		Schritt 5	∞	4 °C	1

Abb. 12 Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes für die HLA- bzw. KIR-Typisierung und das entsprechende PCR-Programm.

4.3 Gelelektrophorese

Die amplifizierte DNS wurde über ein 1,5%iges Agarosegel aufgetrennt. Für die Herstellung eines Gels wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 1x TAE Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht. Nachdem die gelöste Agarose etwas abgekühlt war, wurden 6 μl 1%ige Ethidiumbromidlösung zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäuren und emittiert unter UV-Bestrahlung sichtbares Licht. Nach der Polymerisation des Gels wurde es in eine mit Laufpuffer (1 x TAE Puffer) gefüllte Kammer gelegt und die Proben aufgetragen. Hierfür wurden 5 μl der Probe sowie der Standard mit Wasser und Auftragspuffer (1x) gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 Volt, wobei die negativ geladene DNS in Richtung des positiven Pols läuft. Nach Auftrennung der Proben wurde das Gel unter UV-Licht mit einer Digitalkamera fotografiert und dokumentiert.

5 Multiplex-Analysen

5.1 Allgemein

Die Multiplex-Technologie ermöglicht eine simultane Analyse von zahlreichen Parametern aus einem sehr kleinen Probenvolumen. Es werden Polymerkügelchen (\varnothing 5 μ m) mit individueller Eigenfluoreszenz verwendet, an die spezifische Moleküle gekoppelt sind. Durch abgestufte Mischverhältnisse zweier fluoreszierender Rot-Töne stehen somit bis zu 100 farblich unterschiedlicher Mikrosphären zur Verfügung, die alle gemeinsam in einer Probe verwendet werden können. An diese Mikrosphären können Antikörper, die spezifisch für jegliche Art von Proteinen, u.a. Zytokine, Transkriptionsfaktoren bzw. Kinasen oder auch Oligonukleotidsonden für eine HLA- bzw. KIR-Typisierung und eine Quantifizierung von mRNA gekoppelt werden. Bindet ein Zielmolekül an den gekoppelten Antikörper wird das über einen Biotin-markierten sekundären Antikörper nachgewiesen (vgl. Abb. 13). Die Quantifizierung des Zielmoleküls erfolgt dann durch Zugabe von Phycoerythrin-(PE)-gekoppeltem Streptavidin (SAPE), welches das biotinylierte Molekül bindet. Die Analyse erfolgt an einem Multiplex-Array-Gerät (Luminex-Durchflussanalysegerät (LabScanTM100)), das über zwei Laser verfügt und auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie basiert. Der erste Laser detektiert das PE-Signal des SAPE (Quantität), der zweite die Eigenfluoreszenz der Mikrosphären (Qualität), so dass beide Signale einander zugeordnet werden können (Abb. 13A). Durch das spezielle Mischungsverhältnis der Rot-Töne können die Mikrosphären durch den zweiten Laser voneinander unterschieden werden (Abb. 13B) und das SAPE-Signal jeder einzelnen Mikrosphäre individuell detektiert werden (Abb. 13C).

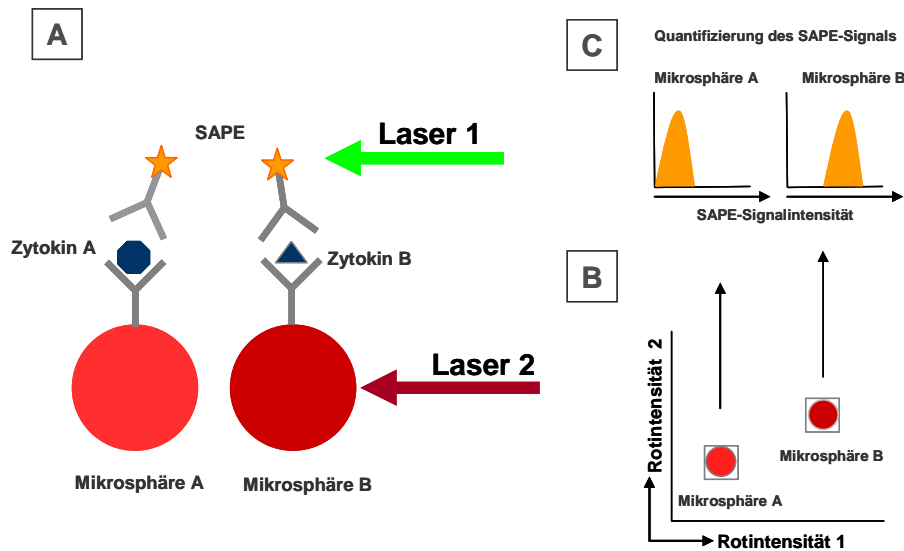


Abb. 13 Schematische Darstellung der Multiplex-Technologie am Beispiel der Zytokinbestimmung.

A Mikrosphären mit gebundenen spezifischen Antikörpern, an welche die Zytokine binden können. Diese werden anschließend von den biotinylierten Detektionsantikörpern an einem weiteren Epitop erkannt. Die Quantifizierung erfolgt durch Zugabe von SAPE. **B** Die verschiedenen Mikrosphären können aufgrund der individuellen Farbgebung durch Laser 2 unterschieden werden, wodurch die Zuordnung des SAPE-Signals mit Laser 1 für jede Mikrosphäre individuell erfolgen kann und eine Aussage über die Quantität der jeweiligen Zytokine ermöglicht (**C**).

5.2 Zytokinbestimmung

Bei der Bestimmung von Zytokinen aus Kulturüberstand konnten die enthaltenen Zytokine über im Reagenziensystem enthaltenen Standardkonzentrationen quantifiziert werden (pg/ml).

Durchführung

Die Durchführung erfolgte laut Herstellerprotokoll. Der lyophilisierte Zytokinstandard wurde in 500 μ l RPMI III resuspendiert und 30' auf Eis inkubiert. Danach wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, wobei die einzelnen Zytokine im Standard eine individuelle Höchstkonzentration besitzen. Alle folgenden Inkubationen erfolgten schüttelnd bei 300 rpm und im Dunklen um ein Ausbleichen der Mikrosphären und der Detektionsantikörper zu verhindern. Die Antikörper-gekoppelten Mikrosphären wurden in einer 96-Loch-Filterplatte mit je 50 μ l Probe für 30' inkubiert, als Negativkontrolle dienten die verwendeten Medien. Mehrmaliges Waschen entfernte die ungebundene Zytokine/Chemokine, was mit einem Vakuum-Absaugegerät erfolgen konnte, da die Mikrosphären größer sind als die Poren der Filterplatte. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären, biotinylierten Detektionsantikörper, welcher nach einigen Waschschritten mit SAPE quantifiziert wurde. Vor der Messung wurden die Platten bei 1000 rpm aufgeschüttelt um ein Verklumpen der Kügelchen zu verhindern. Das Luminex-Gerät musste vor jeder Messung mit beigefügten Kalibrierungskügelchen kalibriert werden, die Messung erfolgte automatisiert.

Messung und Auswertung

Die einzelnen Standardkurven der verschiedenen Zytokine/Chemokine wurden von der Software (Bioplex-Manager 4.1.1) automatisch berechnet. Anhand dieser Standardkurven wurde die jeweilige Zytokin- oder Chemokin-Konzentration in der Probe berechnet (pg/ml). Das Programm erlaubt es bis zu zwei Einzelwerte, die stark aus dem Standardkurvenbereich fallen, aus der Berechnung herauszunehmen. Hierbei handelte es sich meist um sehr hohe oder sehr niedrige Konzentrationen, so dass nur die Probenwerte, die im linearen Bereich zwischen diesen Randwerten und somit im Standardkurvenbereich lagen, ausgewertet wurden. Die genaue Durchführung des Protokolls und der Messung finden sich in der Anleitung des Herstellers.

5.3 Phosphoproteinbestimmung

Mit der Multiplex-Technologie konnte auch der Phosphorylierungsstatus von Proteinen aus Gesamtzell-Lysaten bestimmt werden. Diese Methode wurde zur Analyse von Signalwegen in Tumorzellen nach Behandlung mit spezifischen Inhibitoren genutzt. Dabei wird in getrennten Ansätzen zum einen der Gesamtgehalt eines Proteins (*Total Target*) als auch der Anteil an davon phosphoryliert vorliegenden Molekülen (*Phospho Target*) bestimmt.

Durchführung

Vor Herstellung der Zelllysate wurden die Kolon-Karzinom-Zellen in einer Zellzahl von 600.000 in Zellkulturschalen (75 cm²) bzw. 100.000 Zellen in 6-Lochplatten ausgesät, und nach 24 h mit den Inhibitoren bzw. dem Lösungsmittel DMSO als Kontrolle behandelt. Die Behandlung der Zellen wurde durch Waschen mit eiskaltem PBS gestoppt, und die Zellen von da an auf Eis inkubiert. Zur Lyse wurde *cell lysis buffer* (Bio-Rad) zugegeben, die Zellen mit Zellschabern abgekratzt, und in ein Eppendorfgefäß überführt, welches 20' bei 4°C auf einem Roller inkubiert wurde. Zur Optimierung des Zellaufschlusses wurden die Lysate kurz bei -80°C durchgefroren, und nach Auftauen auf Eis 25' bei 17.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels der Biuret-Reaktion (Pierce-Kit) bestimmt. Alle zu vergleichenden Zelllysate wurden durch Zugabe von *assay-buffer* (Bio-Rad) auf dieselbe Proteinkonzentration eingestellt (200 – 900 µg/ml). 50 µl der Lysate wurden mit den spezifischen Mikrosphären über Nacht schüttelnd bei RT inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte, nach mehrmaligem Waschen, die Zugabe der biotinylierten Detektionsantikörper und eine 30-minütige Inkubation bei RT. Zur Quantifizierung wurde SAPE zugegeben und die Messung und Auswertung anschließend am Luminex-Gerät mit der Bioplex-Manager-Software 4.1.1 durchgeführt.

Messung und Auswertung

Bei einer Phosphoproteinbestimmung gibt es keinen Standard mit klar definierten Konzentrationsangaben, sondern Kontroll-Lysate (Bio-Rad), die aus unterschiedlich behandelten Zellen hergestellt wurden, und für die entsprechenden Phospho-Proteine als Positivkontrollen verwendet werden. Lysate aus unbehandelten HeLa Zellen dienen als Negativkontrolle für die Phospho-Proteine der stimulierten Kontrollzellen, und als Positivkontrolle für den totalen Proteingehalt der einzelnen Analyten. Die Rohfluoreszenzwerte (*mean fluorescence intensity*, MFI) sind dabei ein Maß für die Gesamtmengen an Kinasen (*total*, t) und der entsprechenden phosphorylierten Form (*phospho*, p). Wichtig ist hierbei auch immer die Veränderungen im Phosphorylierungsstatus eines untersuchten Proteins im Vergleich zum Gesamtgehalt dieses Proteins im Zelllysat zu betrachten, da eine Ab- oder Zunahme von Phospho-Protein nur bei gleichbleibendem Gesamtproteingehalt gewertet werden kann.

5.4 HLA/KIR-Typisierung

Für die HLA-Klasse-I- und KIR-Typisierungen wurden die Multiplex-Assays der Firma OneLambda verwendet. Hierbei sind an die Mikrosphären sequenzspezifische Oligonukleotidsonden gebunden, an die bestimmte Allelsequenzen der HLA-Klasse-I und KIR Gene binden können. In dieser Arbeit wurden so die HLA bzw. KIR-Typisierungen der verwendeten Normalspender für die Analysen der NK-Zellen, sowie die HLA-Ausstattung der HCT116-Zelle bestimmt.

Durchführung

Die Typisierung wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die zu untersuchende DNS wird in einer Polymerase-Kettenreaktion mit spezifischen biotinylierten Primern amplifiziert (vgl. Meth. 4.2). Hierbei werden mit den generischen Primern Exon 2 und Exon 3 der HLA-Klasse-I-Gene und Exon 3+4, Exon 5 und Exon 7-9 des KIR Locus amplifiziert. Exon 2 und 3 von HLA kodieren für die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domäne der Peptidbindungsfurche und stellen so die variablen Sequenzen der HLA-Moleküle dar, in denen sich die verschiedenen Allele unterscheiden. Die amplifizierten Exons der KIR Gene kodieren für die verschiedenen extra- und intrazellulären Domänen der KIR-Moleküle in denen sich ebenfalls die allelspezifischen Unterschiede befinden. Nach der PCR erfolgten eine Denaturierung der doppelsträngigen DNS-Amplifikate und eine Neutralisierung dieser Reaktion. Während eines Hybridisierungsschrittes können die biotinylierten einzelsträngigen DNS-Amplifikate über ihre komplementären Oligonukleotidsonden an die Mikropartikel

binden. Durch mehrmaliges stringentes Waschen werden nicht spezifisch gebundene DNS-Stränge entfernt. Anschließend werden die, über die Primer biotinylierten, DNS-Stränge mit SAPE markiert. Die Hybridisierungsintensität stellt ein Maß für Hybridisierung dar und kann durch die Messung an einem Luminex-Gerät detektiert werden.

Messung und Auswertung

Die Messung wurde mit der Software Luminex 100 IS 2.3 durchgeführt. Zur Auswertung wurden die Dateien mit der HLA-Visual Software (Version 2.2.0, OneLambda) analysiert. Die Software erlaubt eine intermediäre Auflösung der typisierten Allele. Von HLA-C, das besonders wichtig ist für die NK-Zell-Regulation, sind heute 350 Allele bekannt, die 274 Proteine kodieren (IMGT/HLA Datenbank). Von den 16 KIR Genen sind mittlerweile über 100 Allele bekannt. HLA-C- und KIR-Allele werden in ähnlicher Weise benannt, indem ein mehrstelliger Zahlencode nach den Richtlinien der NMDP (*National Marrow Donor Program*) verwendet wird. HLA-Gene werden durch einen 8-stelligen Zahlencode unterschieden. Die ersten zwei Ziffern beschreiben immer das Allel und die beiden nächsten Ziffern den Subtyp des Allels. Allele deren Zahlencode sich in den ersten vier Stellen unterscheidet, weisen immer eine Nukleotidaustausch auf, der zu einer veränderten Aminosäuresequenz des kodierten Proteins führt. Allele die sich nur durch stille, also nicht-kodierende Nukleotidaustausche unterscheiden, werden durch Unterschiede an vierter und fünfter Stelle des Codes beschrieben. Die letzten Ziffern bezeichnen Allele, die nur Veränderungen in nicht-kodierenden Bereichen, wie Introns oder Promotorregionen, aufweisen. Bei den KIR-Genen unterscheiden die ersten drei Zahlen Exonsequenzen, die zu einer veränderten Aminosäuresequenz führen. Die nächsten zwei Zahlen bezeichnen Allele, die nicht-kodierende Veränderungen aufweisen. Die letzten Ziffern bezeichnen wieder Allele, die nur Veränderungen in nicht-kodierenden Bereichen aufweisen. Die HLA-Visual Software erlaubt diese genaue Auflösung.

5.5 mRNA-Quantifizierung

Für eine Quantifizierung spezifischer Zytokin-mRNS wurden die Multiplex-Assays der Firma Panomics verwendet. Durch eine Kopplung sequenzspezifischer Oligonukleotidsonden an die verschiedenen Mikrosphären ist ein quantitativer Nachweis spezifischer mRNS aus Gesamt-Zelllysaten möglich, wobei das Detektionslimit bei 24.000 RNS-Molekülen liegt. Eine spezielle Signal-Amplifizierung, mit Hilfe von verzweigten DNS-„Bäumchen“, macht eine PCR-Reaktion zur Anreicherung der untersuchten mRNS überflüssig. An die jeweiligen Mikrosphären sind spezifische Oligonukleotidsonden (Abb. 14A, 1) gekoppelt, die vom 3'-

Ende sogenannter *capture extender CEs* (2) gebunden werden. Am 5'-Ende binden diese *CEs* sequenzspezifisch an die mRNA, wobei für eine Mikrosphäre mehrere unterschiedliche *CEs* vorhanden sind, so dass die mRNA in voller Länge abgegriffen wird. Für eine spätere Detektion der gebundenen mRNA sind zusätzlich *label extender LEs* (4) vorhanden, die an andere Sequenzen der mRNA binden, unspezifische Bindungen werden durch Zugabe spezifischer *blockers BLs* (3) vermieden. Zur Signalverstärkung werden nach Hybridisierung der mRNA sogenannte *branched DNA amplifiers* (Abb. 14B, 5) benutzt, die an die *LEs* (4) binden. Dabei handelt es sich um verzweigte DNS-Strukturen, die von biotinylierten Sonden (6) an all diesen Verzweigungen gebunden werden können, wobei durch die vergrößerte Oberfläche eine Verstärkung des Signals erreicht wird. Anschließend erfolgt die Quantifizierung mit Hilfe von SAPE.

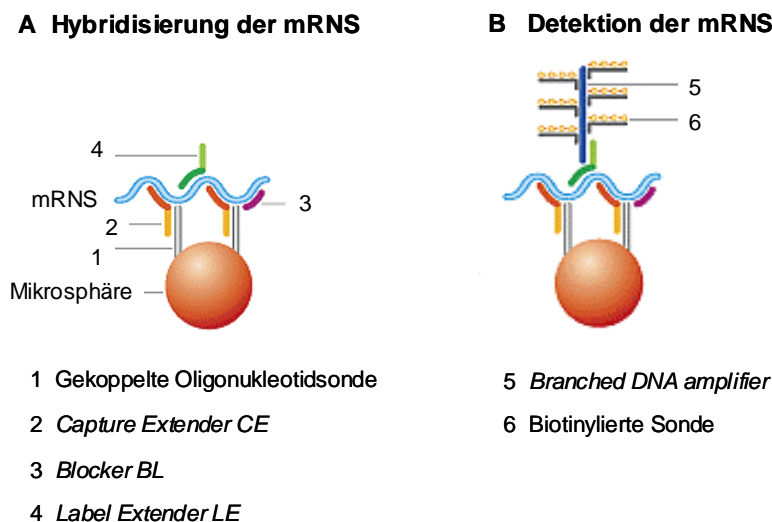


Abb. 14 Prinzip der mRNA-Quantifizierung aus Zelllysaten mit dem Multiplex-Verfahren.

A Die mRNA wird über Nacht an die entsprechenden Mikrosphären, die mit mRNA-spezifischen Oligonukleotidsonden gekoppelt sind, hybridisiert. **B** Die Quantifizierung der gebundenen mRNA erfolgt mit DNS-„Bäumchen“ (*branched DNA-amplifier*) und daran gebundenen biotinylierten Sonden, die durch SAPE detektiert werden.

Durchführung

Die Durchführung erfolgte laut Herstellerprotokoll. Zur Lysat-Herstellung wurden 50.000 Zellen in 100 µl Medium mit 50 µl Lysepuffer gemischt und 30' bei 37°C inkubiert. Der Zellaufschluss wurde am Mikroskop kontrolliert. Die Lysate konnten sofort verwendet, oder bei -80°C gelagert werden. 80 µl dieses Lysats wurden mit 20 µl der Arbeitslösung, bestehend aus Lysepuffer, den spezifischen Mikrosphären und den in Abb. 14/A gezeigten Komponenten (1- 4), gemischt, und über Nacht bei 54°C und 600 rpm zur Hybridisierung inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben auf Filterplatten überführt, und die an die

Mikropartikel gebundene mRNA nach oben beschriebenem Prinzip (Abb. 14B) nachgewiesen. Die Quantifizierung des SAPE-Signals erfolgte durch Messung der Proben in der Bioplex-Manager-Software 4.1.1 am Luminex-Gerät.

Messung und Auswertung

Die Quantifizierung des SAPE-Signals erfolgte durch Messung der Proben in der Bioplex-Manager-Software 4.1.1 am Luminex-Gerät. Da keine mRNA-Konzentrationsbestimmung der Zellysate erfolgt, wird in jedem Versuch auch die mRNA-Expression eines „Haushaltsgens“, z.B. GAPDH, mitanalysiert, um das Expressionsniveau der Zellen miteinander in Bezug setzen zu können. Die Quantifizierung der mRNA erfolgt durch Berechnung der Fluoreszenzänderung bezogen auf eine Negativkontrolle (unstimulierte Zelle), nach Normalisierung des gemessenen Wertes mit der Fluoreszenzstärke des Haushaltsgens GAPDH:

$$\text{Normalisierter Wert} = \frac{\text{MFI (Zytokin - mRNA)}}{\text{MFI (GAPDH)}}$$

$$\text{Relative mRNA - Änderung} = \frac{\text{Normalisierter Wert (Zytokin - mRNA)}}{\text{normalisierter Wert (Negativkontrolle)}}$$

MFI: mittlere Fluoreszenzintensität des SAPE-Signals.

E Ergebnisse

1 Modulation von HLA-Klasse-I und ULBP2 durch DNS-Methyltransferasen und den MAP-Kinase-Signalweg

Die malignen Eigenschaften transformierter Zellen, wie ungehinderte Proliferation, Gewebeeinfiltration und Metastasierung beruhen maßgeblich auf der Aktivierung von Onkogenen und der gleichzeitigen Inhibition von Tumorsuppressoren. Dabei spielen, neben genetischen Veränderungen der DNS, auch epigenetische Faktoren, wie Promotor-Methylierungen von CpG-Inseln durch DNS-Methyltransferasen (DNMTs), eine große Rolle. Inwiefern diese Veränderungen auch Einfluss auf die Erkennung und Eliminierung eines Tumors durch das Immunsystem haben ist noch nicht eindeutig gezeigt. Die Kolon-Karzinom-Zelllinie HCT116 zeichnet sich durch eine „globale“ DNS-Demethylierung aus, wobei lokal auch stark methylierte CpG-Inseln in Promotoren zu finden sind, wodurch vor allem tumorsuppressive Gene stumm geschaltet werden. Durch eine Mutation in dem Onkogen K-RAS (G13D) ist der nachfolgende MEK/ERK-Signalweg, ein MAPK-Signalweg (*mitogen-activated protein kinase*), konstitutiv aktiviert, und durch seinen Einfluss auf Proliferation, Zellzykluskontrolle und Apoptose-Regulation mitverantwortlich für das ungehemmte Wachstum der Tumorzellen. Daher ist diese Zelllinie ideal, um die Effekte der DNS-Methylierung und der Onkogen-Aktivierung auf die Immunerkennung zu untersuchen. Um zellspezifische Effekte ausschließen zu können, wurden die Auswirkungen des onkogenen MAPK-Signalweges auf die Immunerkennung auch in anderen Kolon-Karzinom-Zelllinien analysiert, welche Mutationen in K-RAS oder B-Raf aufwiesen.

1.1 Effekt der DNMT-Aktivität auf Proliferation und Expression immunrelevanter Marker

Um die Beteiligung der veränderten DNS-Methylierung in der Kolon-Karzinom-Zelllinie HCT116 an den tumorspezifischen Eigenschaften zu untersuchen, konnten DNS-Methyltransferase-Deletions-Varianten (ursprünglich von B. Vogelstein hergestellt; Kooperation C. Sers, Charité Berlin) benutzt werden, in welchen durch homologe Rekombination die beiden DNS-Methyltransferasen, DNMT1 und/oder 3b, ausgeschaltet wurden. HCT116 DNMT1^{-/-} (= HCT116/1^{-/-}) und HCT116 DNMT3b^{-/-} (= HCT116/3b^{-/-}) zeigen nur eine geringe Reduktion im Gesamt-DNS-Methylierungsgehalt von ca. 20 % bei HCT116/1^{-/-} und < 4 % bei HCT116/3b^{-/-} im Vergleich zur HCT116 DNMT1^{-/-} + 3b^{-/-} (=

HCT116DKO) mit mehr als 95 % (Kooperation C. Sers). In den HCT116/1^{-/-} und HCT116/3b^{-/-} Zellen sind vor allem die spezifischen CpG-Methylierungen in tumorrelevanten Genen, wie z.B. dem Tumorsuppressorgen *p16^{INK4a}* erhalten. Durch die fast vollständige Demethylierung der DNS in den HCT116DKO-Zellen kommt es zum Verlust einiger tumorspezifischer Eigenschaften, was sich bereits deutlich in der stark verringerten Wachstumsrate dieser Zellen im Vergleich zu den Anderen zeigt (Abb. 15). Das konstitutiv aktive MEK/ERK-Signal kann also nur in Zusammenhang mit einer gleichzeitig veränderten DNS-Methylierung eine ungehemmte Proliferation auslösen.

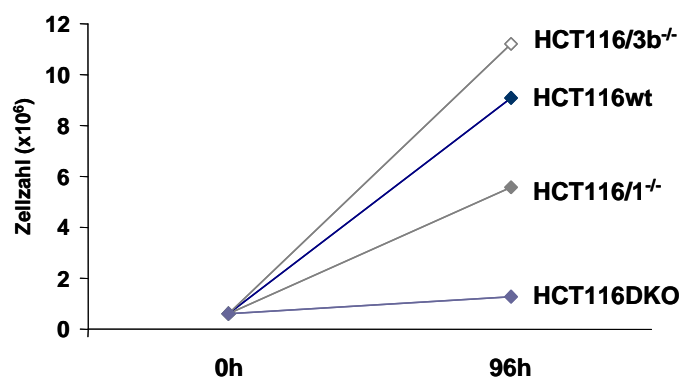


Abb. 15 Wachstumsrate der Kolon-Karzinom-Zelllinie HCT116wt und der drei DNMT-Deletions-Varianten.

Die verschiedenen Zelllinien wurden zum Zeitpunkt 0 in identischer Zellzahl eingesetzt ($0,9 \times 10^6$), nach 96 h geerntet und gezählt. Zur Unterscheidung von toten Zellen wurde eine Trypanblau-Färbung durchgeführt.

DNMT-Aktivität und Expression immunrelevanter Marker

Eine Tumorzelle muss spezifische Liganden für T- und NK-Zellen auf ihrer Oberfläche tragen, um von Zellen des Immunsystems erkannt zu werden. Um den Einfluss der DNMT-Aktivität auf die Immunerkennung von Kolon-Karzinom-Zellen festzustellen, wurde die Expression wichtiger Liganden für die Aktivierung von ZTL- bzw. NK-Zellen auf den verschiedenen HCT116-Varianten durchflusszytometrisch untersucht. Die Expressionsdaten der anderen untersuchten Kolon-Karzinom-Zelllinien befinden sich im Anhang (Abb. 60 und Abb. 61). Da bekannt ist, dass transformierte Zellen oft eine erniedrigte HLA-Klasse-I-Expression aufweisen und somit vermindert von ZTL erkannt werden, wurde die Gesamt-HLA-Klasse-I-Expression und die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in Abhängigkeit von der DNMT-Aktivität untersucht (Abb. 16). Zusätzlich wurde die HLA-A1- und -A2-Expression analysiert, da wir in Kooperation mit C. Sers auf mRNS-Ebene eine differentielle Regulation speziell dieser beiden HLA-Gene zeigen konnten (Sers et al., eingereicht). Die allelspezifische Untersuchung war dabei aufgrund der von uns

durchgeführten HLA-Typisierungen möglich (siehe Methoden, 5.4). Bezüglich der NK-Erkennung wurde der Fokus auf den aktivierenden NK-Rezeptor NKG2D gelegt, dessen 6 Liganden, ULBP1-4 und MICA/B, ebenfalls analysiert wurde (Abb. 17).

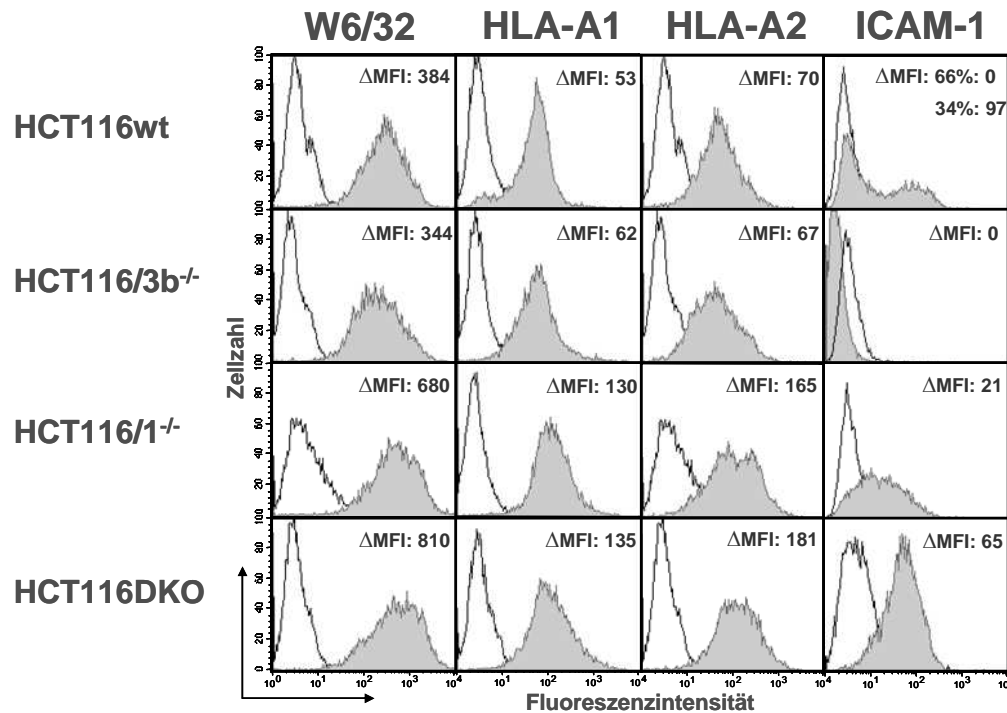


Abb. 16 Oberflächenexpression von HLA-Klasse-I-Molekülen und ICAM-1 in HCT116-Kolon-Karzinom-Zellen

Die graue Kurve zeigt die Expression des spezifischen Markers, die schwarze ungefüllte Kurve stellt die Isotypkontrolle dar. Angegeben ist der Δ MFI: MFI (spezifischer Antikörper) – MFI (Isotypkontrolle), gezeigt ist eines von > 10 repräsentativen Experimenten. W6/32 ist ein pan-HLA-Klasse-I-Antikörper (Hybridom).

Die HCT116DKO-Zellen zeigen eine deutlich gesteigerte Expression von HLA-Klasse-I, HLA-A1 und HLA-A2 im Vergleich zum Wildtyp und HCT116/3b^{-/-}-Zellen (Abb. 16). Die HCT116/1^{-/-}-Variante zeigt ebenso eine erhöhte Expression, erreicht dabei aber nicht das Niveau der HCT116DKO. Das führte zunächst zu der Hypothese, dass in den HCT116wt-Tumorzellen aufgrund von DNS-Methylierungsereignissen eine niedrigere HLA-Klasse-I-Expression zu beobachten ist. Umfangreiche Analysen der Promotoren von HLA-A1 und -A2 (siehe Anhang Abb. 62) haben gezeigt, dass beide Promotorregionen bereits in der Wildtyp-Zelle vollständig demethyliert sind, weswegen die erhöhte Expression nach DNMT-Verlust nicht direkt durch einen Verlust der CpG-Methylierung im HLA-A-Promotor selbst erklärt werden kann. Die Oberflächenexpression von HLA-Klasse-I hängt aber nicht nur von der Expression der schweren HLA-Kette ab, sondern benötigt viele weitere Faktoren, wie die TAP-Transporter TAP1/2 und die Proteasom-Untereinheiten LMP2/7 und 10 (siehe Einleitung, Abb. 10), so dass eine Promotor-Methylierung in Genen anderer Komponenten

der HLA-Klasse-I-Maschinerie wahrscheinlich ist. Eine methylierungsabhängige Regulation dieser Faktoren auf mRNA-Ebene konnte in Kooperation mit R. Kuner (DKFZ) tatsächlich bereits gezeigt werden, und wird zurzeit auf dem Protein-Niveau weiter untersucht (Sers et al., eingereicht).

Die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1, das wichtig für eine Bindung von T- und NK-Zellen an die Zielzellen, und damit für eine Erkennung der Tumorzellen ist, ist in der HCT116wt-Linie heterogen, und fehlt vollständig in der HCT116/3b^{-/-} (Abb. 16). Da auch eine Behandlung der Zellen mit IFN- γ (500 U/ml), dem stärksten Signal zur Induktion von HLA-Klasse-I- bzw. ICAM-1-Expression, zu keiner gesteigerten Expression führte (Daten nicht gezeigt), handelt es sich bei der HCT116/3b^{-/-} offensichtlich um die Selektion einer ICAM-1-negativen Variante aus der heterogenen HCT116wt-Zelllinie.

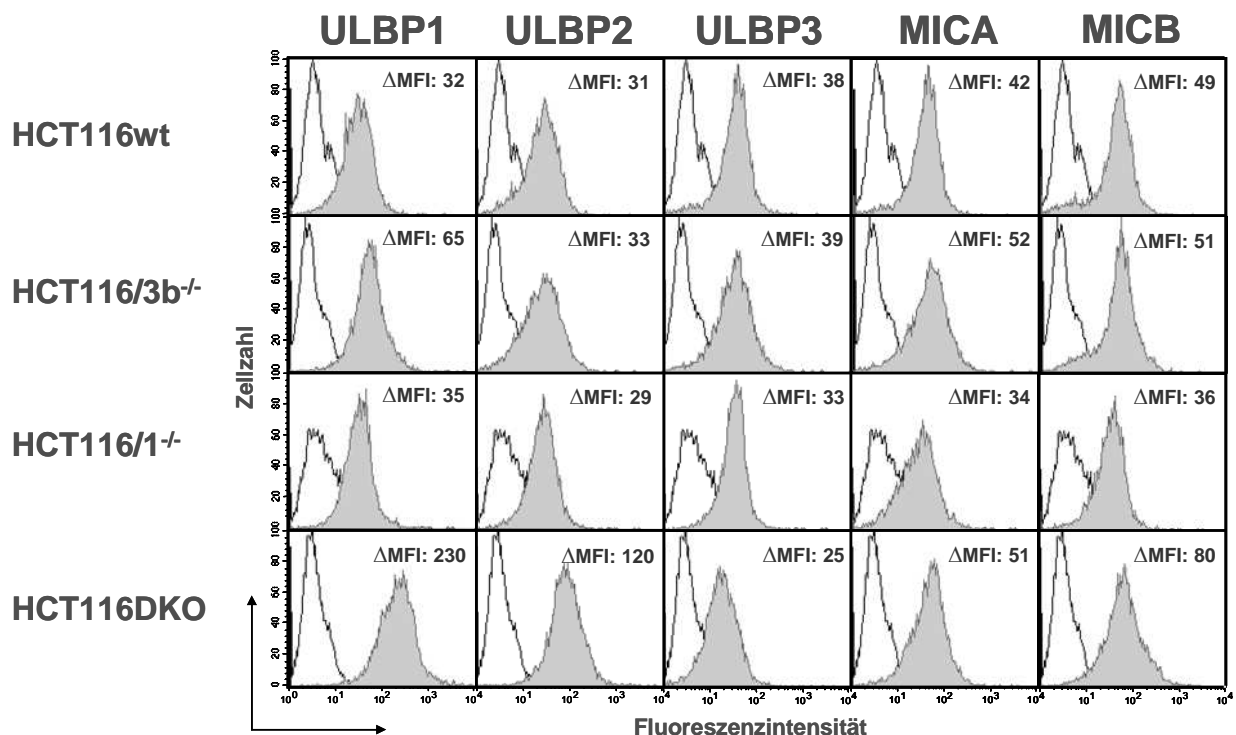


Abb. 17 Oberflächenexpression der Liganden des aktivierenden NK-Rezeptors NKG2D auf HCT116-Kolon-Karzinom-Zellen.

Die graue Kurve zeigt die Expression des spezifischen Markers, die schwarze ungefüllte Kurve zeigt die Isotypkontrolle. Angegeben ist der Δ MFI: MFI (spezifischer Antikörper) - MFI (Isotypkontrolle), dargestellt ist eines von mehr als 10 repräsentativen Experimenten.

Die Expression der Liganden für den aktivierenden NK-Rezeptor NKG2D zeigen eine unterschiedliche Regulation in An- bzw. Abwesenheit der DNMT (Abb. 17). ULBP1 und -2 sind in der HCT116DKO signifikant höher exprimiert als in den Wildtyp-Zellen, während die Expression der anderen Liganden weitestgehend unbeeinflusst ist. Für ULBP4 waren alle

HCT116-Deletions-Varianten und die Wildtyp-Zellen negativ, was mit einem eigenen Antikörper der AG Falk untersucht wurde (Daten nicht gezeigt). Eine detaillierte Analyse mehrerer Promotorbereiche von ULBP2 und ULBP3 konnte klar zeigen, dass sich hier der beobachtete Unterschied direkt im Methylierungsmuster der CpG-Inseln der entsprechenden Promotoren zeigt (Abb. 63, Anhang). ULBP3 besitzt bereits in der Wildtyp-Zelle einen völlig unmethylierten Promotorbereich, wohingegen der ULBP2-Promotor zu > 90 % methyliert ist, und erst durch vollständigen Verlust der DNMT-Aktivität in der HCT116DKO demethyliert vorliegt (Abb. 63, Anhang). Während die methylierungsabhängige Suppression von HLA-Klasse-I auf Tumorzellen bereits länger bekannt ist, konnte die Regulation von ULBP2 durch epigenetische Mechanismen dagegen erst kürzlich auf mRNA-Ebene gezeigt werden (Yamashita, Tsujino et al. 2006). Eine Erhöhung der ULBP2-Oberflächenexpression durch direkte Promotor-Demethylierung ist dagegen noch nicht beschrieben.

Um einen methylierungsabhängigen Effekt auf die HLA-Klasse-I- und ULBP2-Expression auch in anderen Zellen zu untersuchen, wurde die Kolon-Karzinom-Zelllinie SW480, die eine G12V-Mutation in K-RAS besitzt, für 120 h mit dem demethylierenden Agens 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-C) behandelt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 18). Dabei ist zu sehen, dass es auch hier zu einer erhöhten Expression von HLA-Klasse-I, im speziellen HLA-A2, und ULBP2 kommt. Neben diesen Veränderungen zeigten die behandelten Zellen auch ein deutlich vermindertes Wachstum (Daten nicht gezeigt).

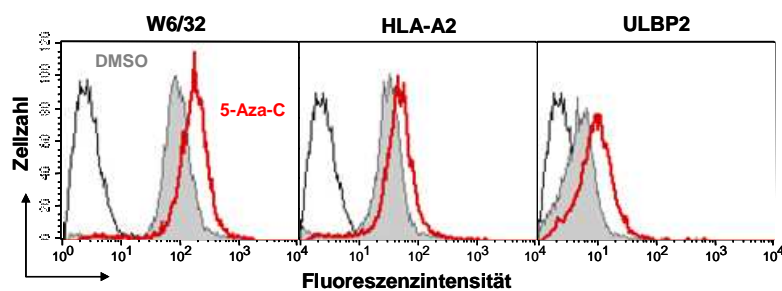


Abb. 18 HLA-Klasse-I-, HLA-A2- und ULBP2-Expression in SW480-Zellen nach 120 h 5-Aza-2'-Deoxycytidin-Behandlung.

In grau ist die Expression nach 120 h DMSO-Kontrollbehandlung (0,05 %) dargestellt, die rote Kurve zeigt die erhöhte Expression nach 5-Aza-C-Behandlung (5 μ M). Die schwarze, ungefüllte Kurve stellt die Isotypkontrolle dar.

Ein Verlust beider DNS-Methyltransferasen (DNMT1 und 3b) und die dadurch bedingte Demethylierung führt in Kolon-Karzinom-Zelllinien zu einer verringerten Proliferationsrate und gleichzeitig zu einer gesteigerten Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen, im speziellen HLA-A, sowie ULBP1 und ULBP2. Für ULBP2 besteht dabei ein direkter Zusammenhang zwischen gesteigerter Expression und Verlust der CpG-Methylierung in verschiedenen Promotorregionen.

1.2 Effekte des MAPK-Signalweges auf Proliferation und Expression von HLA-Klasse-I und ULBP2

Neben dem veränderten DNS-Methylierungsmuster besitzen ca. 50 % der Kolon-Karzinome auch eine aktivierende Mutation in dem Signalprotein K-RAS, was zu einer konstitutiven Aktivierung des nachgeschalteten MEK/ERK-Signalweges führt. Diese Aktivierung wird in ca. 10 % der Kolon-Karzinome auch durch eine Mutation in B-Raf, der aktivierenden Kinase von K-RAS, hervorgerufen (Roberts and Der 2007). Die Beteiligung des onkogenen MEK/ERK-Signalweges am Transformationsprozess und vor allem am Prozess der Kolon-Karzinom-Progression ist bereits seit langem bekannt (Vogelstein and Kinzler 1993). Um die Rolle dieses Signalweges in der Interaktion des Tumors mit dem Immunsystem und in der Zellproliferation zu analysieren, wurde das Zellwachstum und die Oberflächenexpression relevanter Immunmarker unter spezifischer MEK/ERK-Inhibition untersucht.

1.2.1 Abhängigkeit der Proliferation vom MAPK-Signalweg

Zunächst wurde der Effekt einer spezifischen Hemmung des MEK/ERK-Signalweges auf die Proliferation untersucht. Dazu wurden der spezifische MEK-Inhibitor U0126 und der B-Raf-Inhibitor Sorafenib (Nexavar) verwendet. Da vor allem Sorafenib Apoptose induzieren kann (Panka, Wang et al. 2006), musste für alle Zelllinien die maximal verträgliche Konzentration bestimmt werden, um einen ausreichend inhibierenden Effekt auf den MEK/ERK-Signalweg zu garantieren und gleichzeitig noch genügend intakte Zellen für weitere Analysen zur Verfügung zu haben. Daher wurde als Kriterium ein Zellüberleben von mehr als 50 % festgelegt. Die Kolon-Karzinom-Zellen wurden mit verschiedenen Sorafenib-Konzentrationen zwischen 5 μ M und 10 μ M behandelt und anschließend eine Lebendzellzahlbestimmung mit Trypanblau und durchflusszytometrisch mit Propidiumiodid durchgeführt. Die verschiedenen Kolon-Karzinom-Zelllinien reagieren unterschiedlich empfindlich auf Sorafenib und wurden im Vergleich zu U0126 meist mit geringeren Konzentrationen behandelt (Tabelle 3). Der

MEK-Inhibitor U0126 konnte für alle Zelllinien mit einer Endkonzentration von 10 μM bzw. 20 μM eingesetzt werden, die entsprechende Konzentration wurde innerhalb eines Experimentes für alle Zellen verwendet.

Tabelle 3 Maximal verträgliche Konzentrationen des B-Raf-Inhibitors Sorafenib und des MEK-Inhibitors U0126 für verschiedene Kolon-Karzinom-Zelllinien.

Zelllinie	Sorafenib	U0126	Zelllinie	Sorafenib	U0126
HCT116wt	5 μM	10 μM / 20 μM	SW480	10 μM	10 μM / 20 μM
HCT116/1 ^{-/-}	5 μM	10 μM / 20 μM	SW620	10 μM	10 μM / 20 μM
HCT116/3b ^{-/-}	5 μM	10 μM / 20 μM	SW948	10 μM	10 μM / 20 μM
HCT116DKO	5 μM	10 μM / 20 μM	SW707	10 μM	10 μM / 20 μM
HT29	7,5 μM	10 μM / 20 μM	Cx2	10 μM	10 μM / 20 μM

Die Behandlung mit Sorafenib führt zu einer deutlich verringerten Proliferation und in manchen Zelllinien sogar zu einem Absterben (Abb. 19), weswegen eine Behandlung nicht länger als 72 h durchgeführt werden konnte, um genügend unversehrtes Zellmaterial für anschließende Untersuchungen zur Verfügung zu haben. Der Einsatz von U0126 führte ebenso zu einer verminderten Wachstumsrate, im Vergleich zu Sorafenib aber in geringerem Maße, und konnte daher bis zu 96 h durchgeführt werden. Eine Validierung der Inhibition des MEK/ERK-Signalweges durch die Behandlung wurde mit Multiplex-Analysen der Phosphorylierung von MEK/ERK-Proteinen durchgeführt (vgl. Kapitel 1.3).

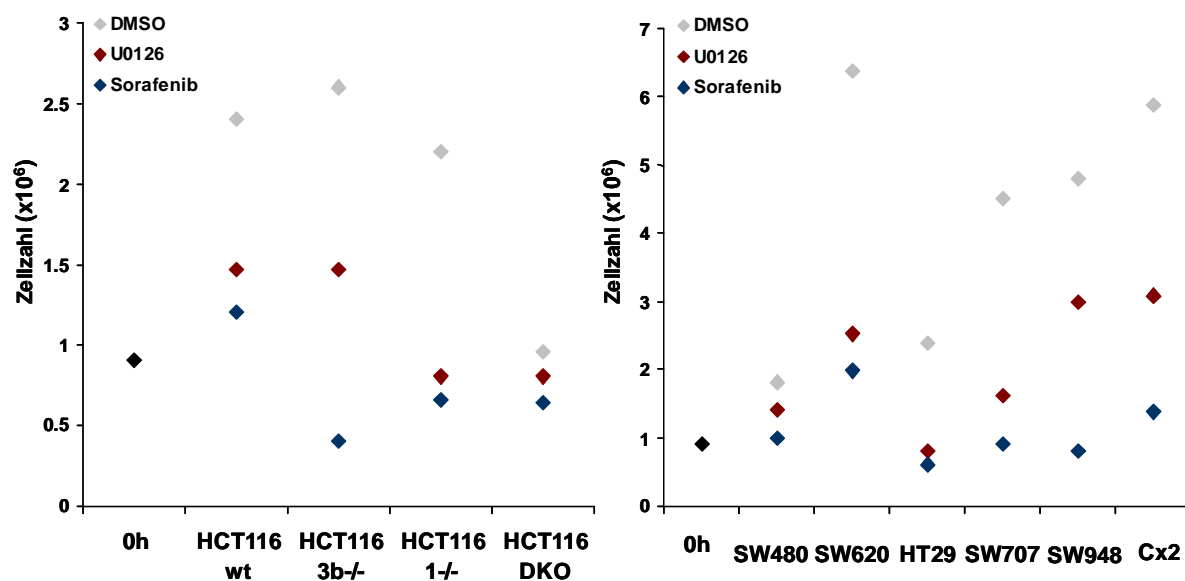


Abb. 19 Wachstumsraten verschiedener Kolon-Karzinom-Zellen nach 48 h Behandlung mit U0126 und Sorafenib. Die U0126-Konzentration war für alle Zellen gleich (10 μM), die Sorafenib-Konzentration individuell (vgl. Tabelle 3), DMSO als Lösungsmittel wurde als Kontrolle mitgeführt und in entsprechenden Konzentrationen eingesetzt. Die Ausgangszellzahl lag bei allen Zelllinien zum Zeitpunkt 0 h bei $0,9 \times 10^6$.

Bei den HCT116-Zellen zeigt sich, dass vor allem die HCT116/1^{-/-}- und DKO-Varianten auf beide Inhibitoren mit einem Wachstumsarrest und im Falle von Sorafenib sogar mit einem Absterben reagieren, wobei dies bei Sorafenib besonders für die 3b^{-/-}-Variante gilt. Dagegen reagieren HCT116wt-Zellen weniger empfindlich auf eine Inhibition des MEK/ERK-Signals. Bei den anderen Kolon-Karzinom-Zelllinien zeigen sich unterschiedliche Reaktionen auf die Inhibitoren, generell reagieren diese jedoch sensitiver auf die Behandlung mit Sorafenib. Verglichen mit der jeweiligen DMSO-Kontrolle zeigt sich für alle Zellen aber eine vergleichbare Reduktion der Proliferation nach MEK/ERK-Inhibition.

Der vollständige Verlust der DNMTs, wie es in der HCT116DKO der Fall ist, führt zu verringertem Wachstum, was ebenfalls der Fall ist, wenn der konstitutive MEK/ERK-Signalweg durch spezifische Inhibitoren gehemmt wird. Dabei zeigt die Behandlung mit Sorafenib in den verschiedenen Kolon-Karzinom-Zelllinien eine stärkere Auswirkung auf die Proliferation und das Überleben der Zellen als die U0126-Behandlung, was darauf hindeutet, dass dieser Inhibitor zusätzlich zur B-Raf-Hemmung weitere Effekte auf die Zellteilung besitzt.

1.2.2 Regulation der HLA-Klasse-I- und ULBP2-Expression durch den MAPK-Signalweg

Um die Frage zu beantworten, ob der MAPK-Signalweg auch einen Effekt auf die Erkennung der Tumorzellen durch Immuneffektorzellen besitzt, wurden die Kolon-Karzinom-Zelllinien mit den beiden Inhibitoren U0126 und Sorafenib behandelt, und die Expression immunrelevanter Marker untersucht. Dabei lag der Fokus für weitere Analysen nur auf den Markern, die bereits eine DNMT-methylierungsabhängige Regulation gezeigt haben, da der Zusammenhang beider Systeme untersucht werden sollte. In Abb. 20 sind diejenigen Moleküle, die sowohl durch einen Verlust der DNMT-Aktivität, als auch durch Hemmung des konstitutiven MEK/ERK-Signals in den HCT116-Zell-Varianten eine gesteigerte Expression zeigten, dargestellt.

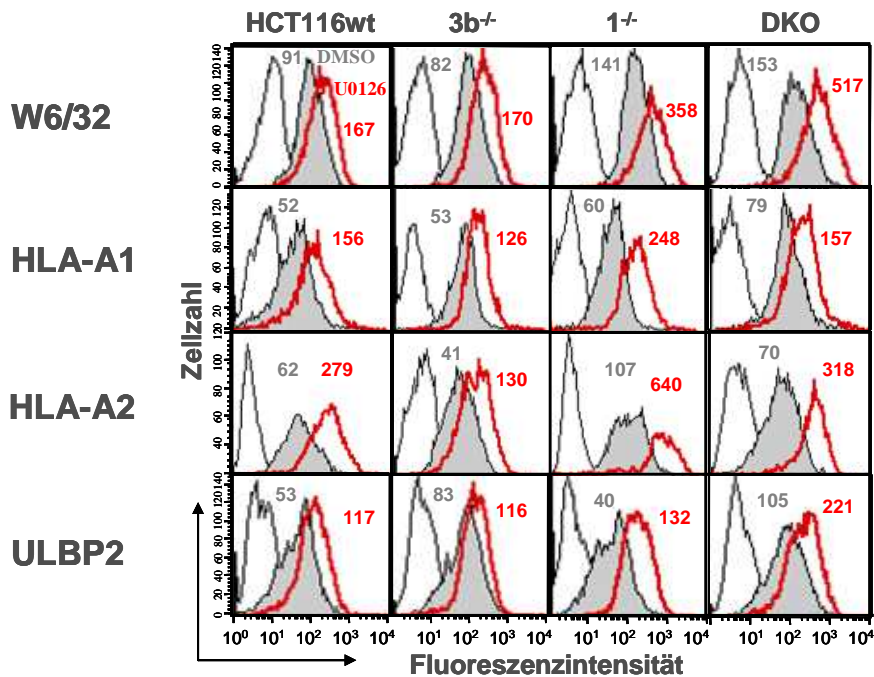


Abb. 20 Oberflächenexpression der HCT116wt und DNMT-Deletions-Varianten nach 96 h Behandlung mit U0126 bzw. DMSO.

Die grau gefüllte Kurve zeigt die Expression der DMSO-behandelten Zellen (0,1 %), die rote Kurve die Expression nach MEK-Inhibition durch U0126 (10 μ M). Die schwarzen, ungefüllten Kurven zeigen die Isotypkontrollen. Angegeben sind die Δ MFI-Werte (grau, DMSO; rot, U0126). Dargestellt ist eines von mehr als 10 repräsentativen Experimenten.

Die Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen, im besonderen HLA-A1 und -A2, sowie ULBP2 ist nach MEK-Inhibition durch U0126 deutlich gesteigert. Dabei ist dieser Effekt unabhängig von der DNMT-Aktivität zu beobachten, da die in der HCT116DKO bereits erhöhte Expression von HLA-Klasse-I und ULBP2 im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen durch U0126 noch weiter gesteigert werden konnte. Da in DKO-Zellen keine messbare DNMT-Aktivität vorliegt, gibt es offensichtlich einen Effekt der MEK/ERK-Signale, der unabhängig von Promotor-Methylierungen zu einer verminderten Oberflächenexpression führt. Bei detaillierter Analyse des ULBP2-Promotorbereichs mittels Bisulfit-Sequenzierung in HCT116wt-Zellen vor bzw. nach U0126-Behandlung konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des MEK/ERK-Signals nach 48 h zu einer Demethylierung des Promotors führt (Abb. 63, Anhang). Damit konnte die Hypothese, dass der konstitutiv aktive MEK/ERK-Signalweg direkt die Promotor-Methylierung von immunologisch relevanten Molekülen bewirken kann, erstmals experimentell eindeutig bestätigt werden. Es gibt offensichtlich eine direkte Interaktion zwischen dem konstitutiv aktiven MEK/ERK-Signalweg und der Methylierungsmaschinerie. Um U0126-verursachte Nebeneffekte auf andere Moleküle des onkogenen Signalweges als Ursache der beobachteten Regulation ausschließen zu können, wurden HCT116wt- und DKO-Zellen mit einem weiteren spezifischen MEK-Inhibitor,

PD98059, behandelt und die Expression von HLA-A und ULBP2 im Vergleich zur U0126-Behandlung untersucht (Abb. 21).

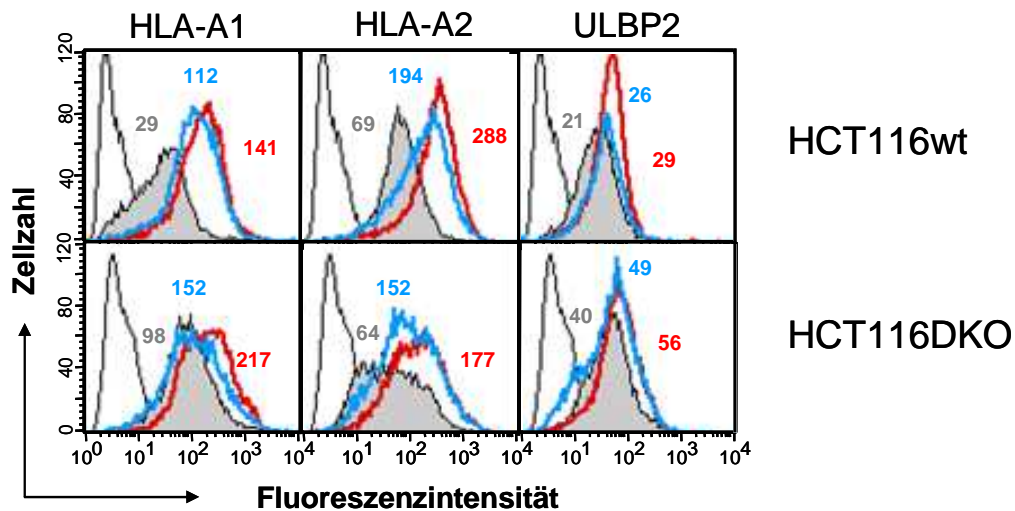


Abb. 21 Oberflächenexpression nach 96 h Behandlung der HCT116wt- und DKO-Zellen mit den MEK-Inhibitoren U0126 und PD98059.

HCT116wt- und DKO-Zellen wurden 96 h mit U0126 (rot, 20 μ M), PD98059 (blau, 50 μ M) und DMSO als Kontrolle (grau) behandelt. Anschließend wurde die Oberflächenexpression von HLA-A1, -A2 und ULBP2 durchflusszytometrisch untersucht. Die Δ MFI-Werte sind angegeben (grau, DMSO; rot, U0126; blau PD98059).

Die Behandlung von HCT116wt- und DKO-Zellen mit U0126 (20 μ M) bzw. PD98059 (50 μ M) zeigt deutlich, dass PD98059 ebenso zu einer erhöhten Oberflächenexpression führt, die aber im Vergleich zu U0126 etwas geringer ausfällt, was möglicherweise mit der unterschiedlichen Art der MEK-Inhibition zusammenhängt. PD98059 verhindert im Gegensatz zu U0126 nur eine weitere Phosphorylierung der MEK-Kinase, hindert aber bereits aktiviert vorliegende, phosphorylierte MEK-Kinasen nicht daran den nachfolgenden Signalweg durch die ERK-Phosphorylierung zu aktivieren. Im Gegensatz dazu hemmt U0126 sowohl aktive, phosphorylierte, als auch inaktive, nicht-phosphorylierte MEK-Proteine, so dass der nachfolgende Signalweg stärker beeinflusst wird. Diese Unterschiede in der Stringenz der Hemmung des MEK/ERK-Signalweges zeigen sich auch in der Oberflächenexpression.

Eine Kinetik mit HCT116wt-Zellen mit dem B-Raf-Inhibitor Sorafenib zeigte, dass die Oberflächenexpression von HLA-Klasse-I, im besonderen HLA-A2, und ULBP2 erst nach 48 h im Vergleich zur DMSO-Kontrolle gesteigert ist (Abb. 22). Bei den DNMT-Deletions-Varianten waren nach 48 h Sorafenib-Behandlung nicht mehr genügend intakte Zellen vorhanden, da sie extrem sensitiv auf diesen Inhibitor reagierten. Um die Vergleichbarkeit zwischen den vier HCT116-Varianten zu gewährleisten, wurde die eingesetzte Konzentration

von Sorafenib dennoch nicht verringert, so dass die Auswirkung der Sorafenib-Behandlung auf die Oberflächenexpression nur für HCT116wt-Zellen dargestellt ist (Abb. 22).

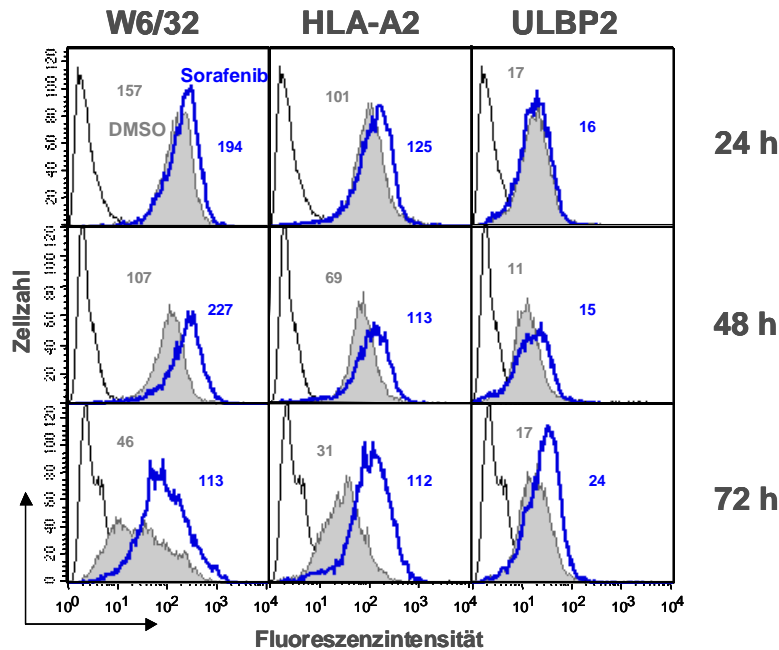


Abb. 22 Kinetik der Sorafenib-Wirkung auf die Oberflächenexpression in HCT116wt-Zellen.

Die Zellen wurden 24 h, 48 h bzw. 72 h lang mit Sorafenib (5 μ M) behandelt und die Expression von HLA-Klasse-I, HLA-A2 und ULBP2 analysiert. Die schwarze, ungefüllte Kurve ist die Isotypkontrolle, in grau sind DMSO behandelte (0,05 %) Zellen dargestellt, die blaue Kurve zeigt die Expression nach Sorafenib-Behandlung (5 μ M). Angegeben sind die Δ MFI-Werte (grau, DMSO; blau Sorafenib).

Auch der B-Raf-Inhibitor Sorafenib führt zeitabhängig zu einer gesteigerten Expression von HLA-Klasse-I, HLA-A2 und ULBP2 in HCT116wt-Zellen. Nach 72 h DMSO-Behandlung sieht man einen leichten Verlust von HLA-Klasse-I auf den HCT116wt-Zellen. Dieser DMSO-Effekt zeigt sich nicht für ULBP2 und war auch für HLA-Klasse-I in verschiedenen Experimenten und Zelltypen zu einem unterschiedlichen Grad zu beobachten. Für eine korrekte Beurteilung der Auswirkungen einer Inhibitor-Behandlung auf die Oberflächenexpression war es demnach äußerst wichtig in jedem Experiment eine entsprechende DMSO-Kontrolle mitzuführen.

Um zu untersuchen, ob der konstitutiv aktive MEK/ERK-Signalweg auch in anderen Kolon-Karzinom-Zelllinien eine Auswirkung auf die Oberflächenexpression hat, wurden diese ebenfalls mit U0126 und Sorafenib behandelt und die Oberflächenexpression von HLA-Klasse-I, HLA-A und ULBP2 durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 23 und Abb. 24).

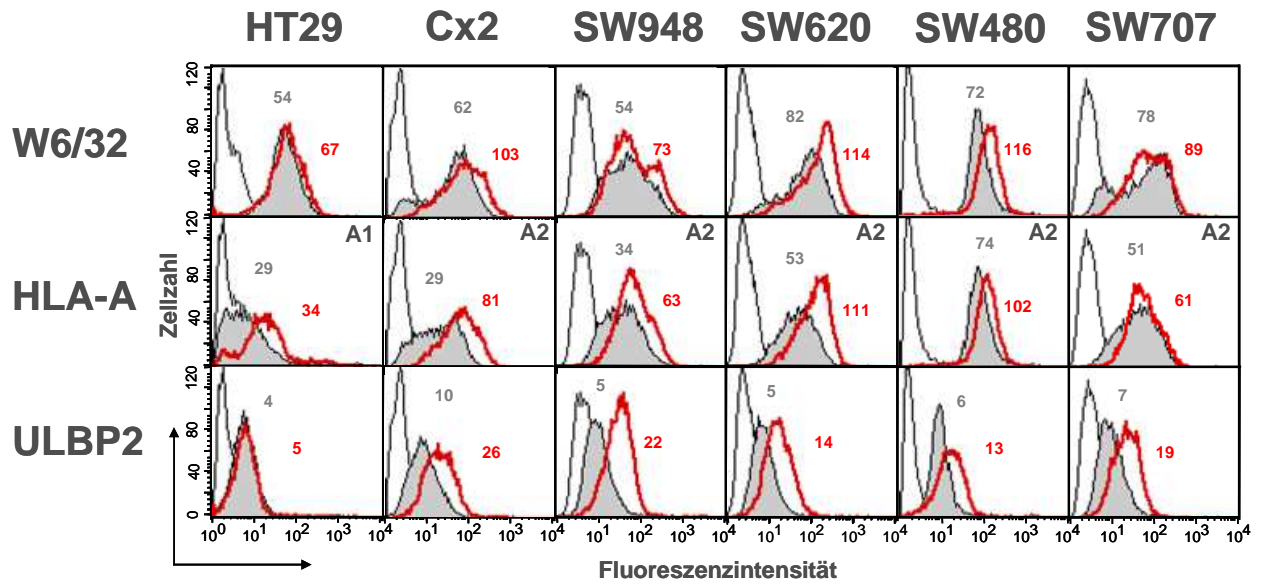


Abb. 23 Oberflächenexpression nach 96 h Behandlung mit dem MEK-Inhibitor U0126.

Die verschiedenen Kolon-Karzinom-Zelllinien wurden mit U0126 (rot, 20 μ M) und DMSO als Kontrolle behandelt (grau, 0,2 %). Die schwarze, ungefüllte Kurve zeigt die Isotypkontrolle. Alle Kolon-Karzinom-Zellen, mit Ausnahme von HT29, exprimieren das HLA-A2-Molekül, HT29 dagegen das HLA-A1-Molekül. Angegeben sind die Δ MFI-Werte. Dargestellt ist eines von mehr als 5 repräsentativen Experimenten.

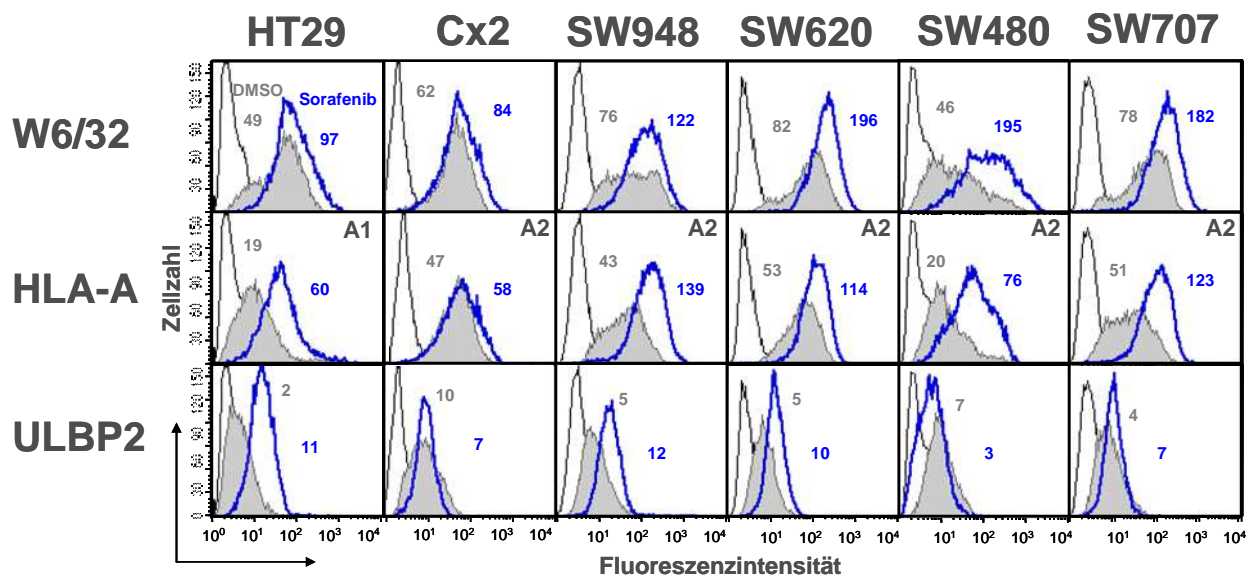


Abb. 24 Oberflächenexpression nach 72 h Sorafenib-Behandlung.

Die Kolon-Karzinom-Zelllinien wurden mit individuellen Sorafenib-Konzentrationen (vgl. Tabelle 3) behandelt. Die graue Kurve zeigt die Expression von DMSO-behandelte Zellen, die blaue Kurve die Expression nach B-Raf-Inhibition durch Sorafenib. Alle Kolon-Karzinom-Zellen, mit Ausnahme von HT29, exprimieren das HLA-A2-Molekül, HT29 dagegen das HLA-A1-Molekül. Angegeben sind die Δ MFI-Werte. Dargestellt ist eines von mehr als 5 repräsentativen Experimenten.

Nach Behandlung der sechs Kolon-Karzinom-Zelllinien mit dem spezifischen MEK-Inhibitor U0126 (96 h) bzw. dem B-Raf-Inhibitor Sorafenib (72 h) können verschiedene Regulations-Muster beobachtet werden. In der ersten Gruppe sind die beiden Zelllinien HT29 und Cx2 zusammengefasst, da diese nur auf einen der Inhibitoren mit einer erhöhten Expression von HLA-Klasse-I bzw. ULBP2 reagieren, wobei die Zelllinie Cx2 stärker auf U0126 und HT29

stärker auf Sorafenib anspricht. SW948 und SW620 zeigen vergleichbare Reaktionen auf beide Inhibitoren, da in beiden Fällen sowohl HLA-Klasse-I-Moleküle, als auch ULBP2 eine gesteigerte Expression aufweisen. Diese Zelllinien zeigen also das gleiche Muster wie die bereits untersuchten HCT116wt-Zellen. SW480 und SW707 können einer dritten Gruppe zugeordnet werden, da in beiden die HLA-Klasse-I-Expression durch eine Sorafenib-Behandlung stärker gesteigert wird als mit U0126. Umgekehrt zeigen beide Zelllinien eine deutlich stärkere Expression von ULBP2 nach U0126-Behandlung im Vergleich zu Sorafenib-behandelten Zellen. SW620 und SW480 sind Kolon-Karzinom-Zelllinien, die aus derselben Patientin isoliert wurden, wobei SW480 aus dem Primär-Kolon-Karzinom und SW620 aus der später aufgetretenen Metastase entstanden ist. Interessant ist, dass beide Zelllinien unterschiedlich auf die MAPK-Inhibition reagieren, so dass sich möglicherweise im Verlauf der Metastasierung auch die Reaktionsmuster der Zellen verändern. Da außer HT29-Zellen, die eine B-Raf-Mutation tragen, alle Zelllinien eine aktivierende Mutation in K-RAS besitzen, scheint eine Vorhersage der Reaktion auf die Behandlung mit einem der beiden Inhibitoren nicht allein durch eine Bestimmung des K-RAS- oder B-Raf-Mutationsstatus möglich zu sein.

In HCT116DKO-Zellen konnten DNMT-unabhängige Effekte des MEK/ERK-Signalweges gezeigt werden. Ob diese Effekte auch in anderen Kolon-Karzinom-Zelllinien existieren, wurde an der SW480-Zelllinie untersucht. Dazu erfolgte zunächst eine Behandlung der SW480-Zellen mit dem DNMT-Inhibitor 5-Aza-C für 120 h, wobei nach 48 h zusätzlich der MEK/ERK-Signalweg durch U0126-Zugabe inhibiert wurde. Parallel wurden Zellen mit U0126 bzw. 5-Aza-C allein behandelt. Anschließend wurde die Expression von HLA-Klasse-I, HLA-A2 und ULBP2 durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 25).

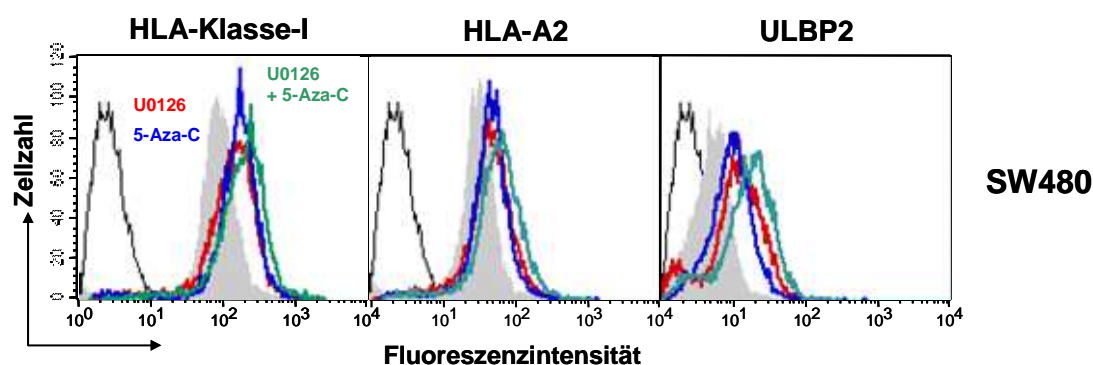


Abb. 25 Expression von HLA-Klasse-I, HLA-A2 und ULBP2 in behandelten SW480-Zellen.

Die Behandlung mit U0126 (rot, 20 μ M) erfolgte für 72 h, die Behandlung mit 5-Aza-C (blau, 0,5 μ M) für 120 h. Bei einer Behandlung der Zellen mit U0126 und 5-Aza-C (grün) wurde U0126 nach 48 h der 5-Aza-C-Behandlung zugegeben. Das Medium wurde alle 24 h durch frisches ersetzt. Die schwarze, ungefüllte Kurve zeigt die Isotypkontrolle, die graue gefüllte Kurve die Oberflächenexpression der DMSO-Kontrollen.

Durch Übereinanderlegen der Kurven sieht man, dass eine Behandlung der Zellen mit 5-Aza-C (blau) oder U0126 (rot) zu einer vergleichbaren Steigerung der Oberflächenexpression der untersuchten Moleküle führt. Bei ULBP2 lässt sich, im Vergleich zwischen 5-Aza-C- und U0126-Behandlung, eine leicht höhere Expression durch die MEK-Inhibition erkennen. Die Expression in Zellen, in denen sowohl die DNS-Methylierung, als auch der MEK/ERK-Signalweg gehemmt wurde, zeigt eine weitere Steigerung im Vergleich zu U0126- bzw. 5-Aza-C-behandelten Zellen. Daher kann man postulieren, dass der MEK/ERK-Signalweg in SW480-Zellen auch ohne DNMT-Beteiligung zu einer verminderten Expression von HLA-Klasse-I, im besonderen HLA-A2, und ULBP2 führt.

Eine Inhibition des MAPK-Signalweges an der MEK- oder B-Raf-Position durch U0126 bzw. Sorafenib führt in allen untersuchten Kolon-Karzinom-Zelllinien zu einer gesteigerten Expression von HLA-Klasse-I und ULBP2, wobei diese abhängig von Zelllinie und Inhibitor unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann. Der konstitutiv aktive MEK/ERK-Signalweg bewirkt, unabhängig von DNS-Promotor-Methylierungen, eine verminderte Expression von HLA-Klasse-I und ULBP2, da auch in HCT116DKO-Zellen die MEK-Inhibition zu einer gesteigerten Expression führt. Die spezifische Demethylierung des ULBP2-Promotors nach U0126-Behandlung stellt einen einzigartigen Hinweis auf die direkte Interaktion des DNS-Methylierungsapparates mit dem MAPK-Signalweg dar.

1.3 Auswirkungen der B-Raf- bzw. MEK-Blockierung auf die nachfolgenden Signalwege

1.3.1 Konstitutives MEK/ERK-Signal in Kolon-Karzinom-Zelllinien

Eine Mutation in K-RAS oder B-Raf ist eines der frühen Ereignisse im Prozess der Kolon-Karzinogenese. Beide Mutationen führen zu einer Aktivierung des nachfolgenden MEK/ERK-Signalweges und einer damit verbundenen autonomen, unkontrollierten Proliferation. Aufgrund der Kultivierung der Tumorzellen in FCS-haltigem Medium kommt es durch die Anwesenheit von verschiedenen Wachstumsfaktoren (Serum-Proteinen) zu einer konstitutiven Aktivierung des MAPK-Signalweges, zum Beispiel durch Bindung dieser Proteine an Wachstumsrezeptoren wie den EGF-Rezeptor (*epidermal-growth factor*). Die aktivierende Mutation in K-RAS bzw. B-Raf führt überdies dazu, dass dieses Signal auch

ohne Ligandenbindung konstitutiv abläuft. Für die Fragestellung der Auswirkung der MAPK-Inhibition auf die Oberflächenexpression verschiedener Immunstrukturen ist diese zusätzliche, kulturbedingte Signalaktivierung aber nicht relevant. In den vorhergehenden Experimenten (Kapitel 1.2.2) konnte bereits die Auswirkung einer MAPK-Inhibition auf die Oberflächenexpression immunrelevanter Marker wie HLA-Klasse-I und ULBP2 gezeigt werden. Um die Wirkung der Inhibitoren U0126 und Sorafenib auf den Phosphorylierungsstatus des MEK/ERK-Signalweges zu untersuchen, wurde zunächst der Aktivierungsgrad (= Phosphorylierung) des MEK-Signalweges in den Kolon-Karzinom-Linien bestimmt. Dazu wurde aus HCT116-Proteinlysaten der Phosphorylierungsstatus der ERK1/2-Kinasen, den Zielmolekülen der MEK1/2-Kinasen, bestimmt (Abb. 26).

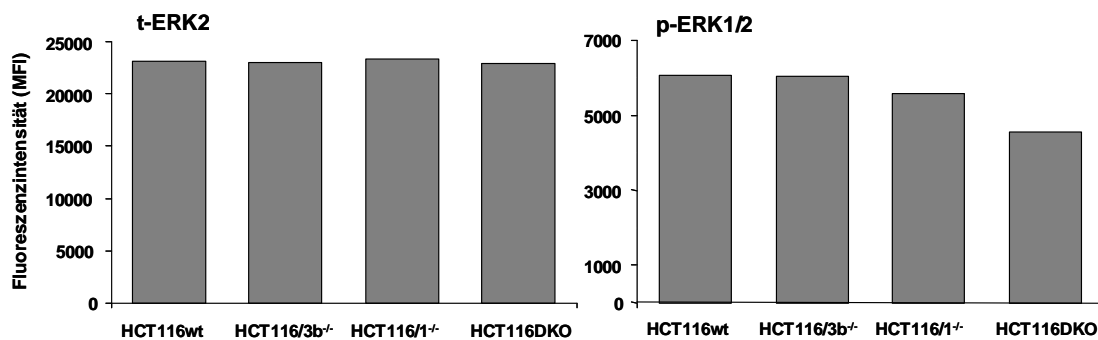


Abb. 26 Gehalt an Total- und phosphoryliertem ERK-Protein (t- und p-ERK) in HCT116-Zelllysaten.

Die Zellen wurden vor Lysatherstellung 48 h in FCS-haltigem Medium in 6-Lochplatten kultiviert, wobei die eingesetzten Zellzahlen dabei für alle vier HCT116-Varianten gleich waren ($0,1 \times 10^6$). Die Zelllysate (500 $\mu\text{g/ml}$) wurden mit dem Multiplex-Verfahren analysiert, wobei die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ein Maß der vorhandenen Kinasenmengen ist.

Der Totalgehalt an ERK2-Protein war in allen HCT116-Zell-Varianten vergleichbar und der hohe Gehalt an p-ERK1/2 zeigt die konstitutive Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges an, wobei die Menge an p-ERK1/2 in HCT116DKO-Zellen leicht vermindert ist. Zusätzlich zu der Phosphorylierung von ERK1/2 wurde in sechs weiteren Kolon-Karzinom-Zelllinien ebenfalls der Phosphorylierungsgrad der, in der Signalkaskade vorgeschalteten, MEK1-Kinase untersucht (Abb. 27). Die Zelllysate weisen unterschiedliche Gesamtproteinkonzentrationen auf und wurden in aufsteigender Konzentration angeordnet. Ein direkter Vergleich der unterschiedlichen Phosphorylierung der MEK1- und ERK1/2-Proteine ist zwischen den Zelllinien nur dann möglich, wenn sie einen vergleichbaren Gehalt an Gesamtprotein des jeweiligen Analyten besitzen.

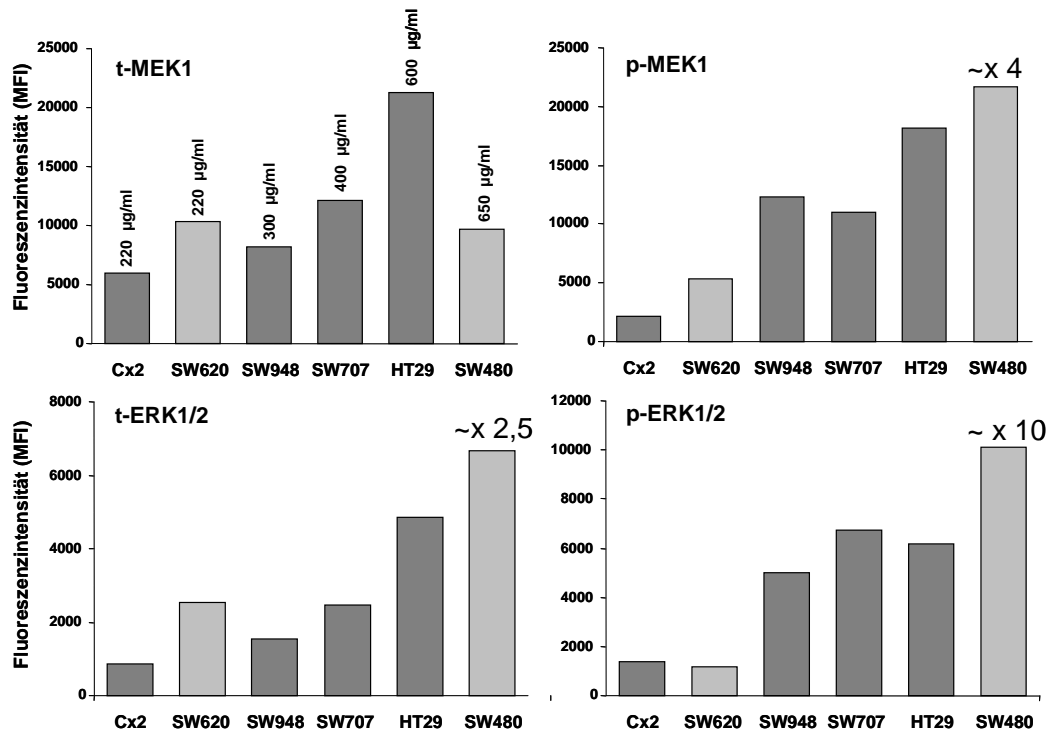


Abb. 27 Fluoreszenzintensität (MFI) der Total- und Phospho-MEK1- und -ERK1/2-Kinasen in sechs Kolon-Karzinom-Zelllinien.

Die Gesamt-Proteinkonzentrationen der Zelllysate sind angegeben ($\mu\text{g/ml}$) und die Zelllinien nach aufsteigender Konzentration angeordnet. Trotz der unterschiedlichen Proteinkonzentrationen sind individuelle Unterschiede in Gehalt und Phosphorylierung der beiden Kinasen zu beobachten. Die im Folgenden näher beschriebenen SW480- und SW620-Zellen sind zur besseren Übersicht in hellgrau dargestellt und der x-fache Anstieg der Fluoreszenzintensität in den SW480-Zellen im Vergleich zu den SW620-Zellen angegeben.

Alle Zelllinien besitzen zwar eine aktivierende Mutation in K-RAS bzw. B-Raf (HT29), die MEK/ERK-Aktivierung ist jedoch unterschiedlich ausgeprägt. Vergleicht man zum Beispiel die Primärtumorzelllinie SW480 und die dazu korrespondierende Metastasen-Zelllinie SW620 (hellgrau), so besitzen beide vergleichbare Gesamtmengen der MEK-1-Kinase, davon liegen aber in SW480-Zellen ca. 4-fach mehr phosphoryliert, also aktiviert, vor. Der Proteingehalt der Kinasen ERK1/2 ist in SW480-Zellen bereits um einen Faktor von ca. 2,5 im Vergleich zu den SW620-Zellen erhöht, der Phosphorylierungsgrad von ERK1/2 in SW480 übersteigt den in der SW620-Zelllinie aber um das 10-fache. Diese zellspezifischen Unterschiede in der MEK/ERK-Phosphorylierung deuten auf eine K-RAS-unabhängige Einstellung des MAPK-Weges hin, was unter dem Begriff „onkogenes signaling“ subsumiert werden kann.

Einfluss der EDTA/Trypsinbehandlung auf die ERK1/2-Phosphorylierung

Um einen Zusammenhang zwischen der Behandlung mit den Inhibitoren U0126 bzw. Sorafenib, dem Phosphorylierungsstatus der MEK/ERK-Proteine und der Oberflächenexpression von HLA-Klasse-I und ULBP2 zu untersuchen, sollten Kolon-

Karzinom-Zellen aus einem Ansatz heraus sowohl für eine durchflusszytometrische Analyse, als auch für die Herstellung eines Proteinlysates genutzt werden. Da hierfür die adhärenen Zellen mit Trypsin/EDTA gelöst werden müssen, anstatt sie direkt in Lyse-Puffer aufzunehmen, wurde in einem Vorexperiment der Effekt dieser Behandlung auf die ERK1/2-Phosphorylierung untersucht. Dazu wurden SW480-Zellen 96 h lang mit DMSO (0,2 %) und U0126 (20 μ M) behandelt und anschließend direkt in Lysepuffer aufgenommen bzw. zuerst durch Trypsin/EDTA-Behandlung (5 min bei 37°C) abgelöst und erst dann in Lysepuffer aufgenommen. Die Zelllysate wurden auf dieselbe Gesamtproteinkonzentration eingestellt und im Multiplex-Verfahren analysiert (Abb. 28).

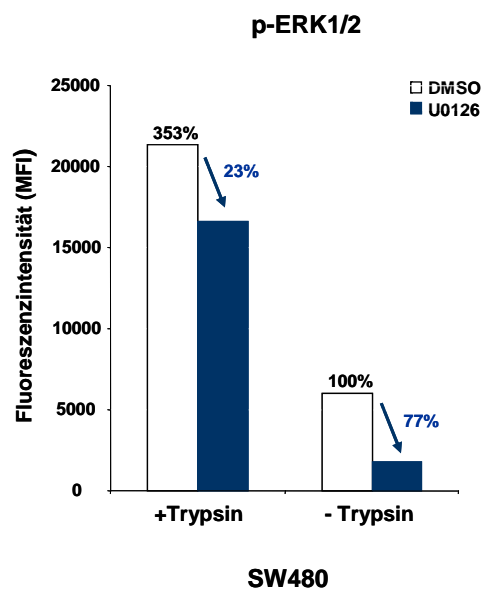


Abb. 28 Intensität an phosphoryliertem ERK1/2-Protein in Zelllysaten der SW480-Zelllinie.

Die Zellen wurden 96 h mit DMSO (0,2 %, weiß) bzw. U0126 (20 μ M, blau) behandelt und anschließend Zelllysate (600 μ g/ml) hergestellt. Dazu wurden die Zellen ohne bzw. mit vorheriger Trypsin/EDTA-Behandlung (-/+ Trypsin/EDTA) in Lysepuffer aufgenommen. Der p-ERK1/2-Gehalt in den Kontrollzellen (DMSO) ohne Trypsinbehandlung wurde als 100 % festgelegt und die Steigerung durch Trypsin/EDTA-Behandlung prozentual dazu berechnet (353 %). Die prozentuale p-ERK1/2-Inhibition durch die U0126-Behandlung ist immer auf die jeweilige DMSO-Kontrolle bezogen. Die Fluoreszenzintensität ist ein Maß für die ERK1/2-Phosphorylierung.

Der Vergleich der ERK1/2-Phosphorylierungsmenge in Abb. 28 zeigt, dass eine Behandlung der Zellen mit Trypsin/EDTA zu ERK1/2-Phosphorylierung führt. Dabei zeigt der Vergleich der Fluoreszenzintensitäten in den DMSO-behandelten Zellen (weiß) mit und ohne Trypsin, dass die Trypsin-Behandlung von 5 Minuten zu einer 3,5-fachen Steigerung der ERK1/2-Phosphorylierung führt, wobei die Inhibition durch U0126 entsprechend schwach ausfällt (23 %). Dagegen zeigt die Behandlung mit U0126 in den Zellen die sofort lysiert wurden eine Reduktion des p-ERK1/2-Signals um 77 %.

Aus diesem Grund wurden alle weiteren Analysen der Oberflächenexpression und des Phosphorylierungsmusters aus parallelen Ansätzen durchgeführt, die mit Trypsin/EDTA geerntet bzw. direkt lysiert wurden.

1.3.2 Kinetik der B-Raf- bzw. MEK-Inhibition

Um die Auswirkung der beiden Inhibitoren U0126 und Sorafenib auf den MEK/ERK-Signalweg (Abb. 29) zu untersuchen, wurde eine vergleichende Kinetik in HCT116wt- und DKO-Zellen durchgeführt (Abb. 30 und Abb. 31).

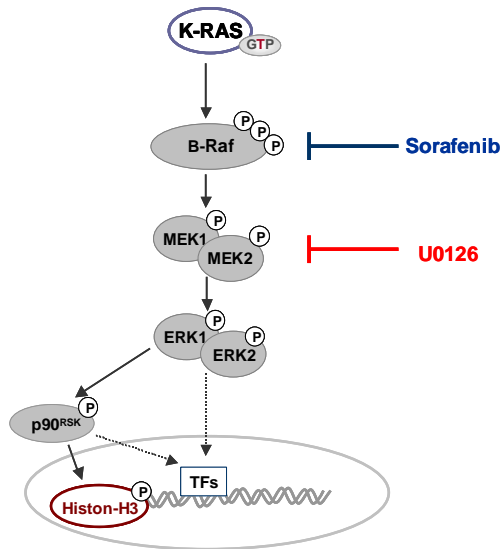


Abb. 29 Schematische Darstellung des MEK/ERK-Signalweges und der Blockierungsstellen durch den MEK-Inhibitor U0126 und den B-Raf-Inhibitor Sorafenib.

Dargestellt sind die Komponenten des MEK/ERK-Signalweges, deren Proteinmenge und Phosphorylierungsgrad im Folgenden in den Proteinlysaten der Kolon-Karzinom-Zelllinien HCT116wt und der DKO-Variante im Multiplex-Verfahren mit und ohne Einsatz der beiden Inhibitoren untersucht wurden. Daneben besitzen ERK1/2-Kinasen und auch die Kinase p90^{RSK} zahlreiche andere Zielmoleküle, meist Transkriptionsfaktoren (TFs), was durch die gestrichelten Pfeile ausgedrückt werden soll.

HCT116wt- und DKO-Zellen wurden maximal 96 h mit den Inhibitoren U0126 bzw. Sorafenib und DMSO behandelt, und zu verschiedenen Zeitpunkten Lysate hergestellt (Abb. 30 und Abb. 31). Nach Einstellung der Proteinkonzentration wurden die Lysate bezüglich der Veränderungen im Total-Kinase-Gehalt bzw. der Phosphorylierung von MEK1 und ERK1/2, und der im MAPK-Weg nachgeschalteten Kinase p90^{RSK}, sowie Histone H3 im Multiplex-Verfahren analysiert. Der Vorteil der Multiplex-Methode zur Bestimmung von Phospho-Proteinen ist die gleichzeitige Semiquantifizierung der Total-Protein-Menge und dem phosphorylierten Anteil verschiedener Kinasen aus einem Lysat, was einen direkten Vergleich der unterschiedlichen Komponenten erlaubt.

HCT116wt

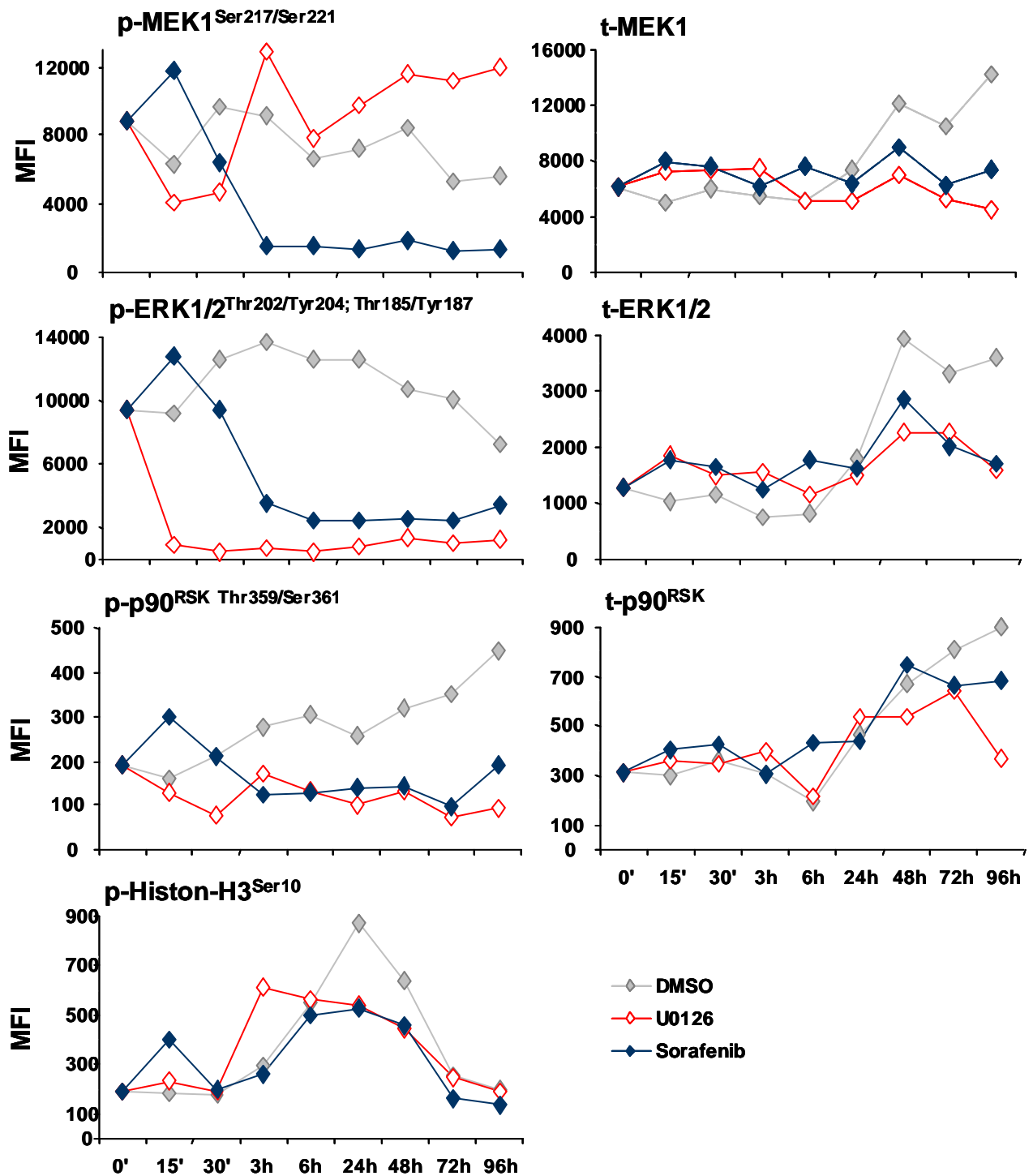


Abb. 30 Kinetik der Signalproteine des MEK/ERK-Signalweges nach 96 h Inhibitor-Behandlung der HCT116wt-Zelllinie.

Links sind die phosphorylierten Kinasen dargestellt, rechts als Pendant die Total-Kinase-Mengen, wobei die Semiquantifizierung als Mittlere-Fluoreszenz-Intensität (MFI) angegeben wird. Die Zellen wurden mit U0126 (rot, 20 μ M), Sorafenib (blau, 5 μ M) und DMSO als Kontrolle behandelt und zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden die Lysate hergestellt. Die Lysate wurden auf eine Konzentration von 350 μ g/ml eingestellt. Nach 48 h erfolgte ein Mediumwechsel, da die Inhibitoren bei 37°C relativ instabil sind. Die analysierten Phosphorylierungsstellen sind angegeben.

HCT116DKO

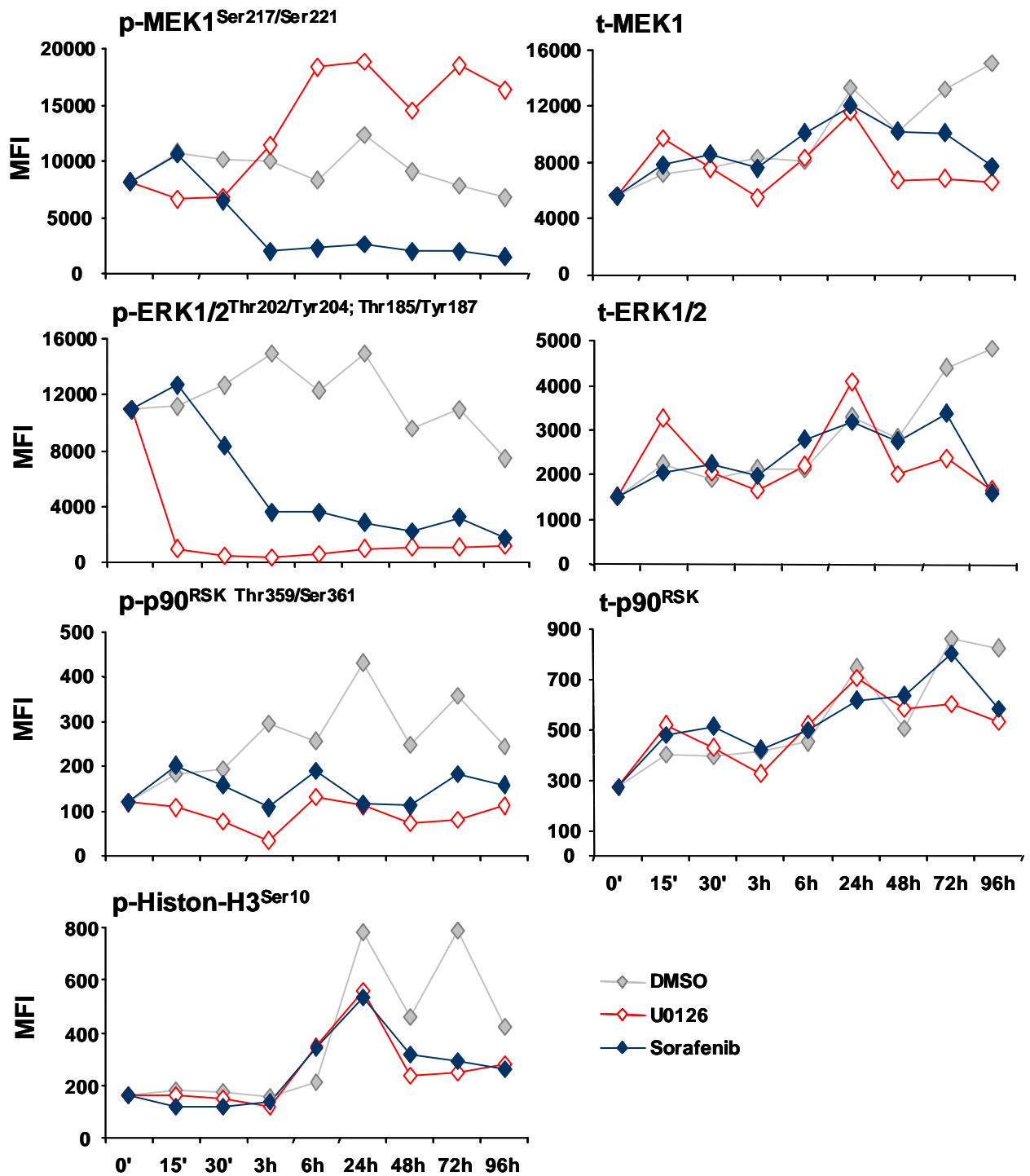


Abb. 31 Kinetik der Signalproteine des MEK/ERK-Signalweges nach 96 h Inhibitor-Behandlung der HCT116DKO-Zelllinie.

Links sind die phosphorylierten Kinasen dargestellt, rechts als Pendant die Total-Kinase-Mengen, wobei die Semiquantifizierung als Mittlere-Fluoreszenz-Intensität (MFI) angegeben wird. Die Zellen wurden mit U0126 (rot, 20 μ M), Sorafenib (blau, 5 μ M) und DMSO als Kontrolle behandelt und zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden die Lysate hergestellt. Die Lysate wurden auf eine Konzentration von 400 μ g/ml eingestellt. Nach 48 h erfolgte ein Mediumwechsel, da die Inhibitoren bei 37°C relativ instabil sind. Die analysierten Phosphorylierungsstellen sind angegeben.

Die HCT116wt- und DKO-Zellen zeigen ein vergleichbares Muster bezüglich der Veränderungen im Total- bzw. Phospho-Proteingehalt. Von oben nach unten sind die Analyte nach ihrer Abfolge im MEK/ERK-Signalweg angeordnet (vgl. Abb. 29). Die Behandlung beider Zellvarianten mit dem MEK-Inhibitor U0126 bzw. dem B-Raf-Inhibitor Sorafenib zeigt in den ersten 72 h keinen Einfluss auf den Gesamt-Proteingehalt von MEK1, ERK1/2 und p-90^{RSK} im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, wobei für Histon-H3 kein Gesamtprotein-Test erhältlich ist. Nach 96 h ist bei beiden Zellen nach U0126- und Sorafenib-Behandlung ein Absinken der Total-Mengen von MEK1, ERK1/2 und p90^{RSK} im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu beobachten. Dieser Effekt ist nicht sehr stark ausgeprägt und tritt verglichen mit Melanom- bzw. Leberkarzinom-Zelllinien verzögert auf (Daten nicht gezeigt; Dissertation S. Maßen bzw. C. Quack). Die Phosphorylierung von MEK1 und ERK1/2 wird durch beide Substanzen unterschiedlich beeinflusst, wobei unter Sorafenib-Behandlung (blaue Rauten) p-MEK1 und p-ERK1/2 mit identischer Kinetik zunächst kurz ansteigen, bevor sie schrittweise über die Zeit abnehmen und nach 3 h ein Niveau erreicht ist, das dann konstant niedrig bleibt. Dies ist ein zu erwartender Effekt, da Sorafenib ein Inhibitor der MEK-aktivierenden Kinase B-Raf ist. Anders verhält es sich bei U0126-behandelten Zellen, denn hier kommt es nach 3 h sogar zu einer Anreicherung von p-MEK1 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt ist die Tatsache, dass U0126 neben der Bindung an unphosphoryliertes MEK1-Protein auch an bereits aktiviertes MEK1 bindet, und anscheinend zu einer Stabilisierung der p-MEK1-Proteine beiträgt. Trotz dieser Stabilisierung von p-MEK1 durch U0126 kommt es bereits nach 15' zu einem drastischen Abfall der ERK1/2-Phosphorylierung, was die Hemmung der MEK1-Kinase durch U0126 anzeigt. Dieser Effekt ist auch in den Sorafenib behandelten Zellen zu sehen, wenn auch erst nach 3 h eine ähnliche Reduktion im p-ERK1/2-Gehalt auftritt. Die Reduktion von p-ERK1/2 tritt also nach beiden Behandlungen auf, basiert aber auf verschiedenen Mechanismen. Die Inhibition des MEK/ERK-Signalweges setzt sich auch in der verminderten Phosphorylierung von p90^{RSK}, einer nachgeschalteten ERK-regulierten Kinase, fort. p90^{RSK} phosphoryliert u.a. auch Histon-H3 am N-Terminus, wobei in diesem Fall die Phosphorylierung an Serin 10 untersucht wurde. Die Inhibition durch U0126 oder Sorafenib scheint sich in der Kaskade jedoch nicht mehr weit genug nach unten durchsetzen zu können, da keine Veränderung der Histon-H3^{Ser10}-Phosphorylierung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle sichtbar ist. Die auch in der DMSO-Kontrolle beobachteten Schwankungen über die Zeit sind eher mit dem Zellzyklus zu korrelieren. Die Blockierung des MEK/ERK-Signalweges ist also auch in der verminderten Aktivierung verschiedener nachfolgender Kinasen zu verfolgen.

1.3.3 Auswirkung der Inhibitoren auf andere Kinasen und Transkriptionsfaktoren

In den Zelllysaten der Kinetik mit HCT116wt- und DKO-Zellen (vgl. Abb. 30 und Abb. 31) wurden neben den bereits dargestellten Proteinen des MEK/ERK-Signalweges auch Komponenten anderer Signalwege, z.B. des JNK-Signalweges, analysiert. Dabei zeigten weder JNK selbst, noch die Transkriptionsfaktoren ATF-2 und c-Jun eine relevante Veränderung nach Inhibition des MEK/ERK-Signalweges im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen, was exemplarisch für JNK im Anhang dargestellt ist (Abb. 64). Auch die NF κ B-p65/I κ B α -Komponenten wurden nicht durch die Inhibitoren beeinflusst. Dieser Befund deutet darauf hin, dass weder in HCT116wt- noch in DKO-Zellen eine Querverbindung zu dem JNK- und dem NF κ B-Signalweg besteht. Der durch RAS-regulierte PI3K-Signalweg, der vor allem zu der Aktivierung der Kinase Akt/PKB führt, zeigt in HCT116wt-Zellen eine Hemmung durch beide Inhibitoren, die sich in einer verringerten Phosphorylierung der Akt-Kinase im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle zeigt, wobei die Gesamt-Kinase menge unverändert ist (Daten im Anhang, Abb. 65). Dies deutet darauf hin, dass in den HCT116wt-Zellen der konstitutiv aktive MEK/ERK-Signalweg zu einer Aktivierung des PI3K-Weges beiträgt.

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Analyse der p38-MAPK-Kinase durch die Behandlung mit beiden Inhibitoren nach 48 h eine Veränderung der Total-Protein-Menge (Abb. 32), wobei die konstitutiv bereits schwache Phosphorylierung von p38-MAPK nicht beeinflusst wird (Daten nicht gezeigt). Während der Gehalt an Total-p38-MAPK in der DMSO-Kontrolle ansteigt, führt die Inhibitorgabe zu einem fast vollständigen Proteinverlust nach 96 h, wobei dieser Effekt unter Sorafenib-Behandlung vor allem in HCT116wt-Zellen stark ausgeprägt ist.

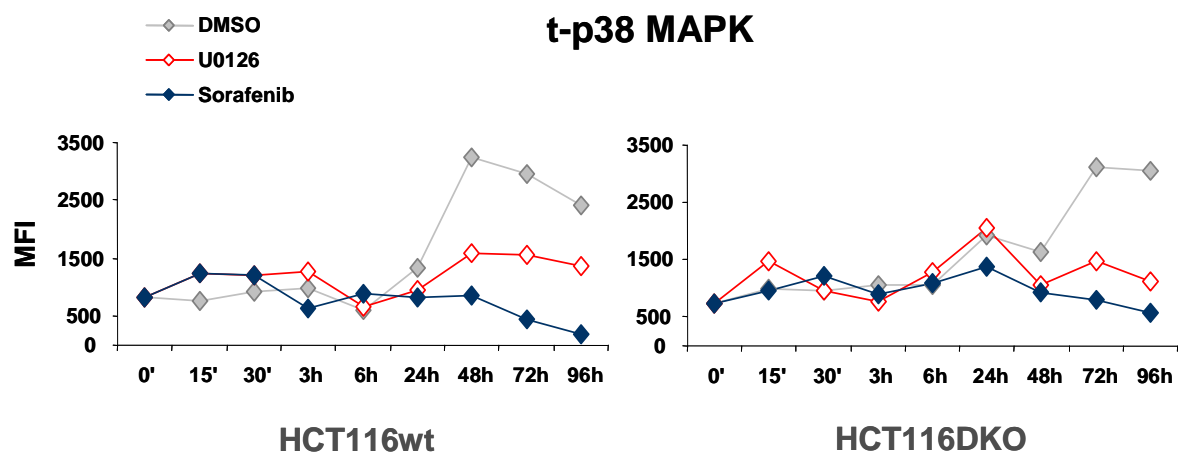


Abb. 32 Veränderung des Total-Proteingehaltes der p38-MAP-Kinase nach Behandlung der HCT116wt- und DKO-Zellen mit U0126 und Sorafenib.

Die Zellen wurden in einer Kinetik von 0 h bis 96 h mit den beiden Inhibitoren U0126 (rot, 20 μ M) bzw. Sorafenib (5 μ M) und DMSO als Kontrolle behandelt und die Zelllysate (350 μ g/ml bzw. 400 μ g/ml) im Multiplex-Verfahren analysiert. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist dabei ein Maß für die Kinasemenge.

Um zu untersuchen, ob der Abbau der p38-MAP-Kinase in U0126- bzw. vor allem Sorafenib-behandelten Zellen durch Caspase-abhängige Apoptose-Ereignisse bedingt ist, wurden HCT116wt- und DKO-Zellen 48 h mit den Inhibitoren bzw. kombiniert mit dem Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK (40 μ M) behandelt, und der p38-MAPK-Proteingehalt untersucht (Abb. 33).

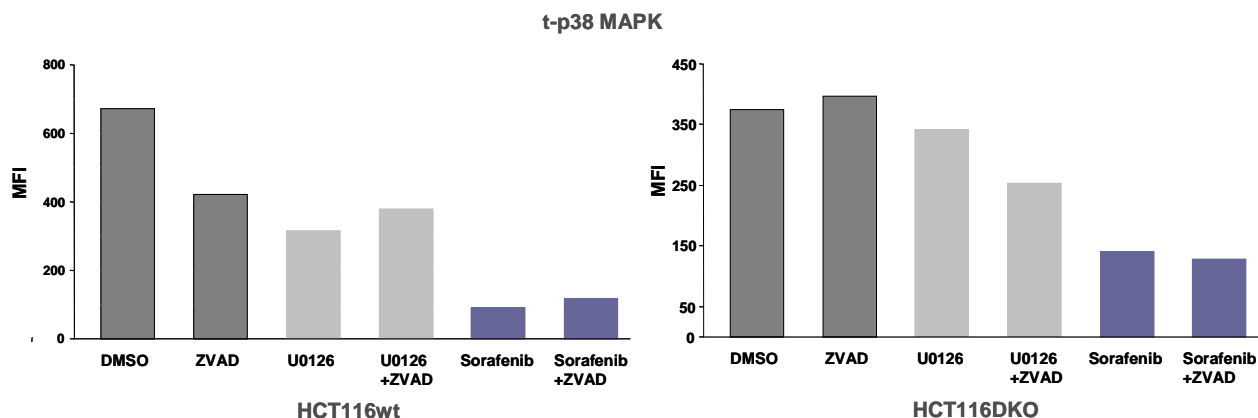


Abb. 33 Total-Proteingehalt der p38-MAP-Kinase in HCT116wt- und DKO-Zelllysaten nach 48 h Behandlung mit den jeweiligen Inhibitoren.

Die Zellen wurden 48 h lang mit DMSO (0,2 %), Z-VAD-FMK (40 μ M), U0126 (20 μ M) und Sorafenib (5 μ M) bzw. den entsprechenden Kombinationen behandelt und die Zelllysate (500 μ g/ml) im Multiplex-Verfahren analysiert. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist ein Maß für die Kinasemenge.

Weder in HCT116wt- noch in DKO-Zellen kann der Abbau der p38-MAP-Kinase durch eine gleichzeitige Behandlung der Zellen mit Z-VAD-FMK verhindert werden. Daher ist der Abbau nicht auf ein Caspase-abhängiges Apoptose-Ereignis zurückzuführen. Neben einer naheliegenden Caspase-Aktivität werden auch proteasomale und lysosomale

Degradationsmechanismen kontrovers diskutiert (Yu, Bruzek et al. 2005, Plaza-Menacho, Mologni et al. 2007) und stellen somit einen Aspekt zukünftiger Arbeiten in diesem Kontext dar.

Die Behandlung der Kolon-Karzinom-Zellen mit beiden Inhibitoren führt zu einem verringerten Zellwachstum bzw. einem Absterben der Zellen. Ob dieser Effekt auch durch Veränderungen des pro-apoptotischen Zellzyklus-Regulators p53 beeinflusst wird, wurde in den HCT116wt- und DKO-Zellen untersucht, da diese das p53-Wildtyp-Protein besitzen (Abb. 34). Die in den anderen Kolon-Karzinom-Zellen vorliegenden p53-Proteine zeigen eine Mutation, die eine Bindung an die DNS verhindert, und diese somit funktionslos sind (siehe Material, Tabelle 1).

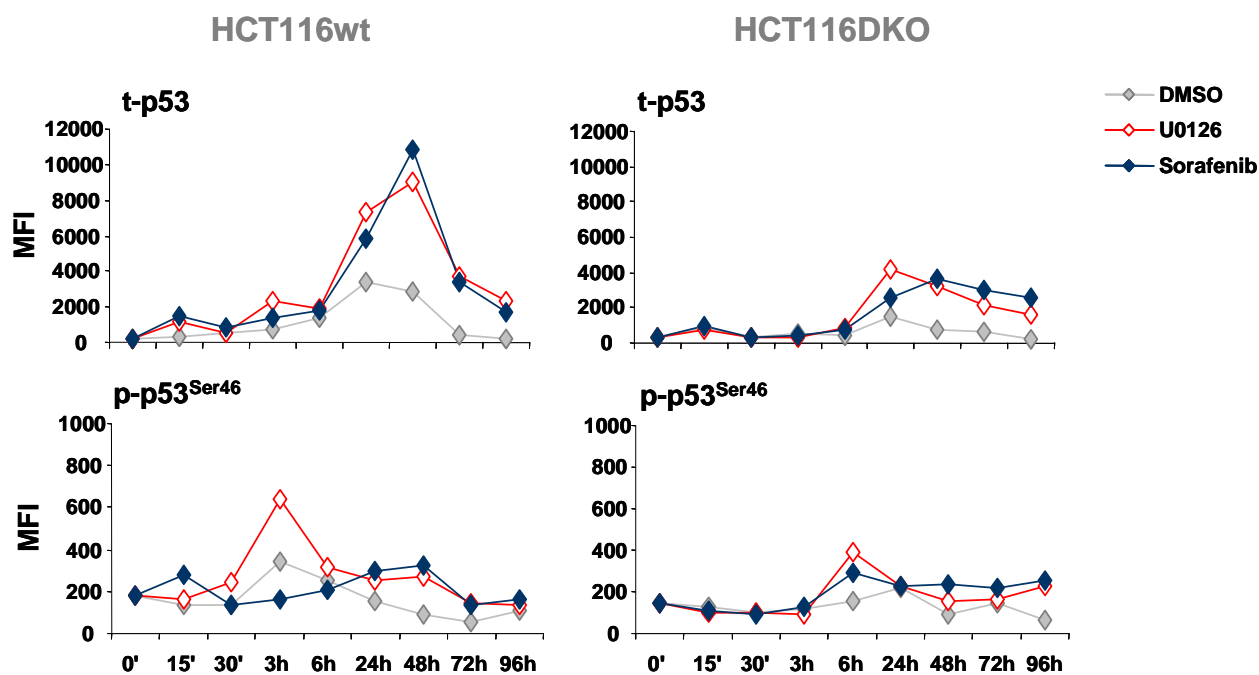


Abb. 34 Kinetik des p53-Proteingehalts und der an Serin⁴⁶-phosphorylierten Form in HCT116wt- und DKO-Zellysaten mit und ohne Inhibitorbehandlung.

Die Zellen wurden insgesamt 96 h mit DMSO (grau, 0,2 %), U0126 (rot, 20 μ M) bzw. Sorafenib (blau, 5 μ M) behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proteinlysate hergestellt, die im Multiplex-Verfahren analysiert wurden. Die Fluoreszenzintensität ist ein Maß der Proteinmengen.

Das p53-Protein (t-p53) wird im Vergleich zur DMSO-Kontrolle durch die Behandlung mit Sorafenib und U0126 nach 24 h in beiden Zelllinien offensichtlich stabilisiert und in der Zelle angereichert, bevor nach 72 h bzw. 96 h ein substanzieller Abbau einsetzt. Die Anreicherung von p53 ist möglicherweise durch eine verringerte MDM2-Expression, einem Protein, das den proteasomalen p53-Abbau induziert, zu erklären. Die Expression von MDM2 wird positiv durch den MEK/ERK-Signalweg beeinflusst, wobei eine Inhibition dieses Weges zu weniger

MDM2-Protein und damit zu einem geringeren Abbau von p53 führen kann (Ries, Biederer et al. 2000). Da es sich um die nicht-mutierte p-53-Form handelt, kann eine Anreicherung in der Zelle Auswirkungen auf die Apoptose-Induktion haben. Der länger anhaltende stabilisierende Effekt von Sorafenib auf das p53-Protein in HCT116DKO-Zellen ist eine mögliche Erklärung für die höhere Sensitivität dieser Zellen für Apoptose durch die Behandlung. Der Mechanismus des daraufhin erfolgenden Abbaus wird in weiterführenden Arbeiten untersucht. Im Gegensatz zur Veränderung des p53-Gehalts wird die Phosphorylierung an Ser⁴⁶ durch keinen der beiden Inhibitoren beeinflusst. Das schließt jedoch nicht aus, dass andere Phosphorylierungsstellen, wie das Ser¹⁵ an der Regulation beteiligt sind, was ebenfalls Gegenstand weiterer Untersuchungen ist.

1.4 Relevanz der MAPK- und DNMT-abhängigen Regulation für die Immunerkennung

Eine Hemmung des MEK/ERK-Signalweges und/oder der DNMT-Aktivität führt zu einer erhöhten Oberflächenexpression immunrelevanter Marker wie HLA-Klasse-I und ULBP2. Die entscheidende Frage ist aber, ob diese Veränderungen tatsächlich eine Auswirkung auf die Erkennung der Tumorzellen durch Immuneffektorzellen haben. Um das beantworten zu können, wurde die Erkennung der Kolon-Karzinom-Zelllinien mit und ohne Inhibitor-Behandlung durch einen allo-HLA-A2-restringierten zytotoxischen T-Zellklon (ZTL) und periphere NK-Zellen untersucht.

1.4.1 Relevanz der HLA-Klasse-I-Modulation für die ZTL-Erkennung

Um zu untersuchen, ob die gesteigerte Expression von HLA-A2 nach MEK/ERK-Inhibition bzw. durch DNMT-Defekt auf den Kolon-Karzinom-Zellen auch Relevanz für die Lyse der Zellen durch zytotoxische T-Zellen besitzt, wurden zunächst Standard-Chromfreisetzungsversuche mit dem allo-reaktiven, HLA-A2-spezifischen ZTL-Klon (JB4) durchgeführt. Dazu wurden die HCT116wt-Zellen und die drei DNMT-Deletions-Varianten 96 h mit den entsprechenden Inhibitoren bzw. DMSO als Kontrolle behandelt, und anschließend als Zielzellen eingesetzt, wobei parallel dazu die HLA-A2-Expression durchflusszytometrisch analysiert wurde (Abb. 35).

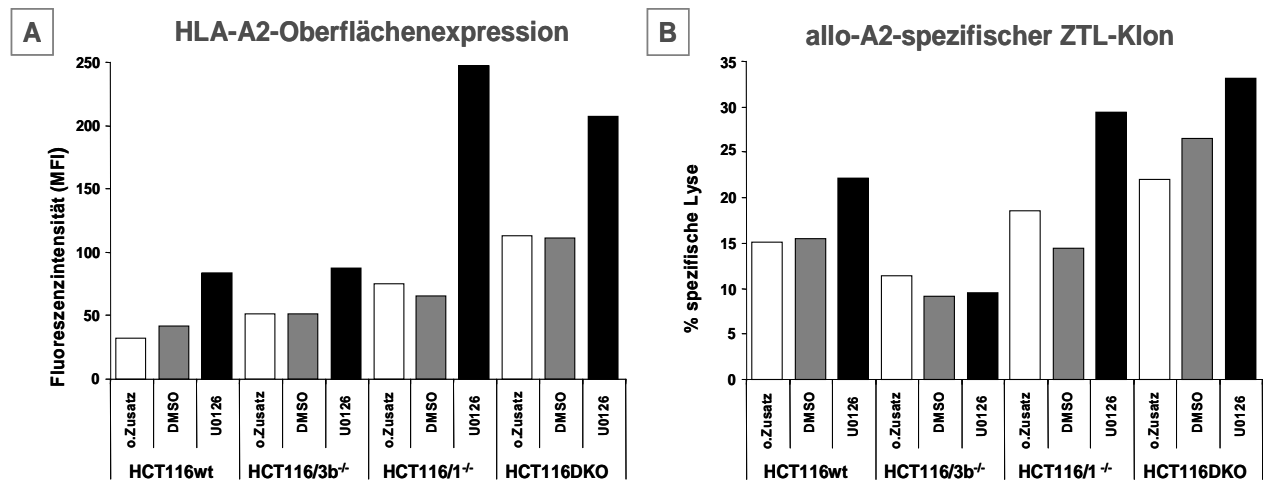


Abb. 35 Untersuchung der HLA-A2-Expression auf 96 h behandelten HCT116-Zell-Varianten und der Lyse durch den ZTL-Klon JB4.

A HLA-A2-Oberflächenexpression der HCT116-Zellvarianten. **B** % Spezifische Lyse der Zielzellen im Chromfreisetzungstest durch den allo-A2-spezifischen ZTL-Klon JB4. Weiß: HCT116-Zellvarianten ohne Zusatz kultiviert, grau: DMSO-Kontrolle (0,1 %), schwarz: U0126-Behandlung (10 μ M). Dargestellt ist eines von mehr als 3 unabhängigen Experimenten.

Wie in Abb. 35 nochmals bestätigt wurde, führt die MEK-Inhibition bzw. der DNMT-Defekt zu einer erhöhten HLA-A2-Expression und spiegelt sich in der spezifischen Lyse der Zellen durch den JB4-ZTL-Klon wider. Dabei werden unbehandelte HCT116DKO-Zellen bereits besser lysiert als HCT116wt-Zellen, was durch Behandlung mit U0126 noch weiter gesteigert werden kann. Eine ähnlich gute Steigerung der Lyse kann bereits bei der DNMT1-Deletions-Variante beobachtet werden, wobei auch hier die MEK-Inhibition durch U0126 die Zelllyse noch verbessert. Damit korreliert die Lyse durch den allo-A2-spezifischen ZTL-Klon gut mit der HLA-A2-Expression auf den Zielzellen. Auffällig ist dagegen die schlechtere Lyse der HCT116/3b^{-/-}-Variante, welche unabhängig von der MEK-Inhibitor-Behandlung, trotz der höheren HLA-A2-Expression im Vergleich zu HCT116wt-Zellen, stattfindet. Da es sich bei der HCT116/3b^{-/-}-Variante um eine ICAM-1-negative Zelllinie handelt (Abb. 16), liegt diese schlechtere Erkennung durch den T-Zellklon wahrscheinlich an der deutlich schwächeren Ausbildung der immunologischen Synapse, die durch die fehlenden ICAM-1/LFA-1-Adhäsion verursacht wird. Diese Bedeutung der ICAM-1/LFA-1-Interaktion sowohl für die ZTL- als auch für die NK-Zell-Erkennung wurde bereits in mehreren Publikationen gezeigt (Sirim, Zeitlmann et al. 2001, Bryceson, March et al. 2006). Da in diesen klassischen Zytotoxizitätsversuchen die Lyse der Zielzelle anhand der Chromfreisetzung gemessen wird, kann mit diesem Verfahren zwischen der Sensitivität der Zielzelle und der Aktivierung der zytotoxischen Effektorzelle nicht unterschieden werden. Durch die Bestimmung der CD107a-Moleküle auf der Killerzelle, die als Membranmoleküle der zytotoxischen Granula bei

Degranulation der Effektorzelle durch Zielzell-Kontakt transient auf der Oberfläche erscheinen, ist es aber möglich die Aktivierung der Killerzellen parallel mit dem Phänotyp durchflusszytometrisch zu quantifizieren (siehe Methoden 3.2). Mit diesem experimentellen Aufbau ist die Frage zu beantworten, ob die erhöhte Lyse der U0126-behandelten Zielzellen bzw. der DNMT-Deletions-Varianten tatsächlich an der, aufgrund der erhöhten HLA-A2-Expression, gesteigerten Aktivierung des ZTL-Klons liegt, oder, ob im Chromfreisetzungstest die Zielzellen lediglich sensitiver auf die lytischen Signale reagieren. Dies bietet den großen Vorteil, dass nicht andere Effekte, wie Apoptose-Resistenzmechanismen bzw. höhere Apoptose-Sensitivität der Zielzellen, das Ergebnis der Immunerkennung beeinflussen. Dazu wurden die Zielzellen, wie bei den Chromfreisetzungstests, 96 h mit U0126 bzw. DMSO behandelt und dann mit dem ZTL-Klon 4 h inkubiert. Als Aktivitäts-Kontrolle wird in allen Versuchen auch die spontane Degranulation durch Inkubation der Effektorzellen ohne Zielzellen untersucht (Abb. 36).

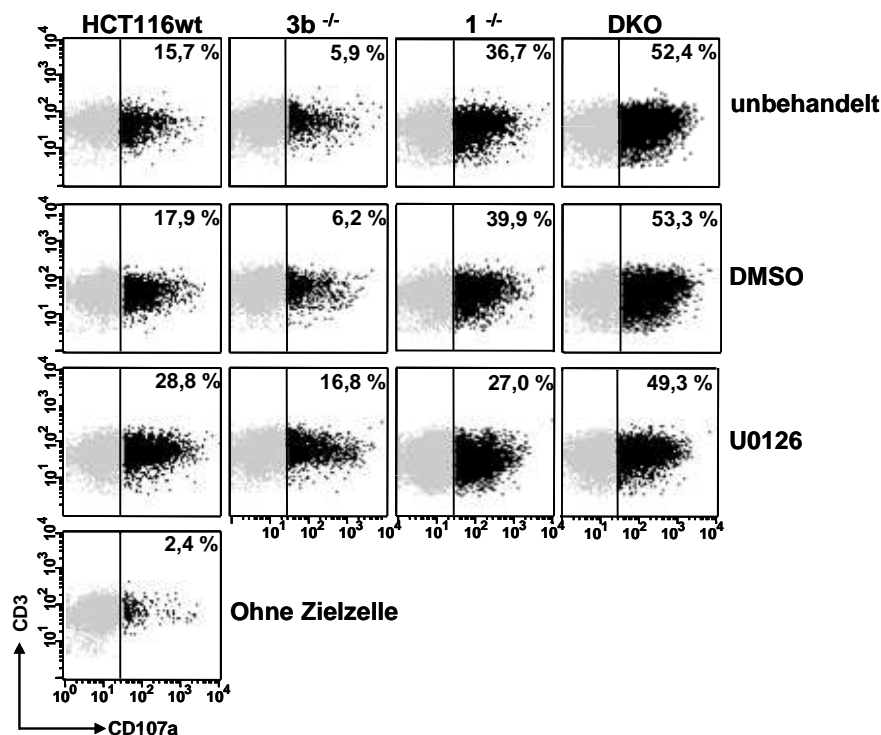


Abb. 36 Transiente CD107a-Expression auf dem ZTL-Klon (JB4) nach Aktivierung durch verschieden behandelte Zielzellen.

Von links nach rechts ist der ZTL-Klon nach Inkubation mit den verschiedenen HCT116-Zellvarianten aufgetragen, die 96 h lang mit Medium (oberste Reihe), mit dem Lösungsmittel DMSO (0,1%) oder mit dem MEK-Inhibitor U0126 (10 μ M) behandelt wurden. Unten ist die spontane Degranulation von JB4-T-Zellen gezeigt. Der prozentuale Anteil der CD107a⁺-ZTL-Zellen ist angegeben. Dargestellt ist eines von mehr als 3 repräsentativen Experimenten.

Auch die Degranulation, als Maß der Zielzellerkennung durch den ZTL-Klon, zeigt eine deutliche Steigerung nach Kontakt mit unbehandelten HCT116DKO-Zellen (52,4 %) im Vergleich zu HCT116wt-Zellen (15,7 %, oberste Zeile). Ebenso führt eine Inhibition des MEK/ERK-Signalweges durch U0126 in den Wildtyp-Zellen zu einer gesteigerten Degranulation des T-Zell-Klons (28,8 %). Die ICAM-1-negative HCT116/3b^{-/-}-Zelllinie wird nicht nur, wie bereits im Chromfreisetzungstest gezeigt, schlechter lysiert, sondern führt offensichtlich auch zu einer schlechteren Aktivierung des ZTL-Klons, so dass ein Apoptose-Resistenzmechanismus für diese Beobachtung ausgeschlossen werden kann.

Um weiterhin experimentell auszuschließen, dass diese bessere Erkennung nach Inhibitor-Behandlung zellspezifisch erfolgt, aufgrund anderer Oberflächenveränderungen, wurden zwei weitere HLA-A2-positive Kolon-Karzinom-Zelllinien, SW480 und SW948, als Zielzellen für den ZTL-Klon JB4 in Degranulationsversuchen eingesetzt. Hierbei wurde zusätzlich eine Behandlung der Zielzellen mit Sorafenib durchgeführt, was bei den beiden Zelllinien möglich war, da sie, wie bereits in Abb. 19 gezeigt, in Bezug auf das Überleben weniger sensitiv auf eine U0126- bzw. Sorafenib-Behandlung reagieren, aber dennoch eine gesteigerte HLA-A2-Expression zeigen (Abb. 37/A).

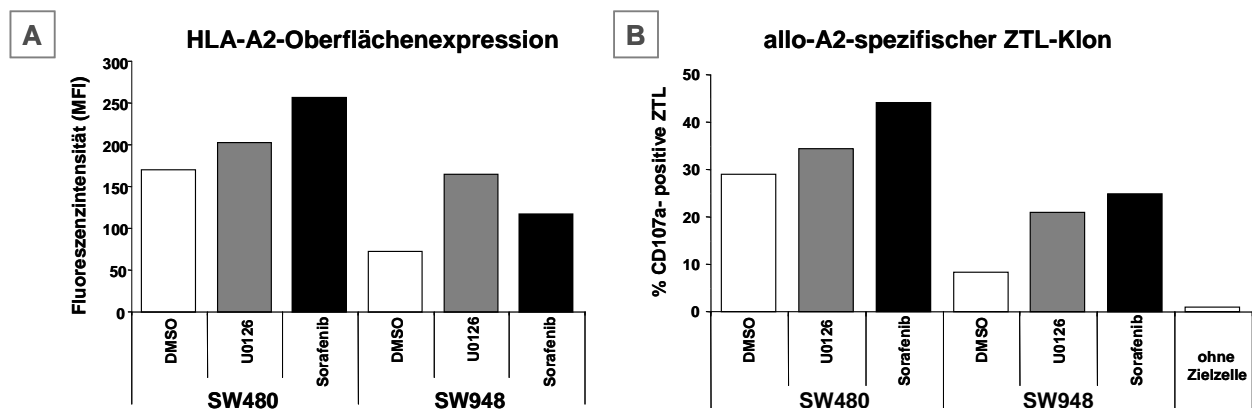


Abb. 37 Quantifizierung der HLA-A2-Expression auf SW480 und SW948-Zellen und der Degranulation des JB4-ZTL-Klons.

A HLA-A2-Expression auf den Zielzellen SW480 und SW948 nach 96 h Behandlung mit den Inhibitoren **B** % CD107a-positive JB4-T-Zellen nach Aktivierung durch die unterschiedlich behandelten Zielzellen. DMSO (0,2 %, weiß), U0126 (20 μ M, grau) und Sorafenib (10 μ M, schwarz). Der Ansatz ohne Zielzelle zeigt die spontane Degranulation des ZTL-Klons.

Auch in den beiden Kolon-Karzinom-Zelllinien SW480 und SW948 führt eine gesteigerte HLA-A2-Expression, als Folge der MEK/ERK-Inhibition, zu einer besseren Erkennung durch den ZTL-Klon JB4. Dabei spiegelt die geringere Degranulation von JB4 nach Aktivierung durch SW948 im Vergleich zu SW480-Zellen nicht nur die quantitativen Unterschiede im

HLA-A2-Expressionsniveau wider. Zusätzlich zeichnet sich SW948 auch durch eine geringe ICAM-1-Expression aus (Daten im Anhang, Abb. 60), was ebenfalls zu der schwächeren Degranulation beiträgt. Obwohl die Sorafenib-Behandlung der SW948-Zellen zu einer geringeren Erhöhung der HLA-A2-Expression im Vergleich zu U0126 führt, erreicht die Degranulation des ZTL-Klons gegen Sorafenib-behandelte Zellen das gleiche Niveau. Die durchflusszytometrische Analyse der Zielzellen zeigte, dass die ICAM-1-Expression durch Sorafenib leicht gesteigert wurde (Daten nicht gezeigt), was eine Erklärung für die bessere Aktivierung bietet.

1.4.2 Relevanz der ULBP2- und HLA-Klasse-I-Modulation für die NK-Zell-Erkennung

Neben den zytotoxischen T-Zellen spielen auch NK-Zellen eine Rolle in der Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen. Neben HLA-spezifischen inhibitorischen Rezeptoren besitzen alle NK-Zellen den aktivierenden NK-Rezeptor NKG2D, wobei ein Ligand, ULBP2, genau wie HLA-Klasse-I durch MEK/ERK-Signale und DNS-Methylierung reguliert wird (Abb. 20). Daher wurde im Folgenden untersucht, wie sich die Oberflächenveränderung durch DNS-Methylierung und MEK/ERK-Hemmung auf die NK-Aktivierung auswirkt (Abb. 38).

PBMC von Normal Spendern wurden 48 h mit 500 U/ml IL-2 aktiviert und anschließend als NK-Effektorzellen eingesetzt. Eine NK-Zell-Isolation war nicht nötig, da der CD107a-Degranulationsversuch eine durchflusszytometrische Methode darstellt, die eine gleichzeitige phänotypische und funktionelle Analyse der Effektorzellen erlaubt. Dabei wurden, wie in Kapitel 2.1.2 ausführlich beschrieben, die NK-Populationen als $CD3^+/CD56^+$ definiert und der prozentuale Anteil CD107a-positiver Zellen an dieser Gesamt-NK-Population berechnet.

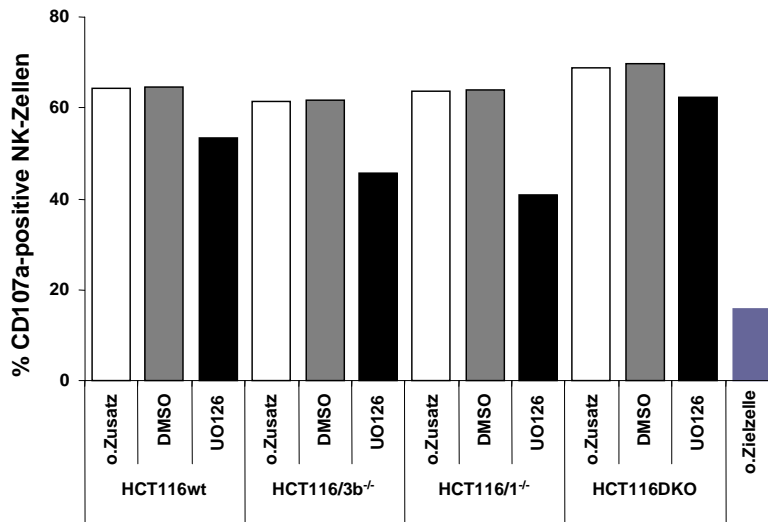


Abb. 38 Degranulation peripherer, IL-2-aktivierter NK-Zellen gegen behandelte HCT116-Zellvarianten.

Die HCT116-Zellvarianten wurden 96 h in Medium kultiviert (weißer Balken), mit DMSO (0,1 %, grau) bzw. mit dem MEK-Inhibitor U0126 (10 μ M, schwarz) behandelt. Die spontane Degranulation der NK-Zellen ist durch den Ansatz ohne Zielzelle quantifiziert. Dargestellt ist eines von 3 unabhängigen Experimenten.

Eine Hemmung des MEK/ERK-Signalweges durch U0126 führt in HCT116-Kolon-Karzinom-Zellen zu einer leicht verminderten Degranulation der NK-Zellen nach Zielzellkontakt (Abb. 38). Dieser Effekt ist unabhängig von der DNMT-Aktivität, da er in allen vier HCT116-Varianten zu beobachten ist, wobei die DKO interessanterweise die geringsten Unterschiede aufweist, was möglicherweise an der gleichzeitigen Steigerung der ULBP2-Expression durch U0126 liegt, die in den DKO-Zellen zu der stärksten Expression dieses aktivierenden NKG2D-Liganden führt (Abb. 20). Da NK-Zellen durch eine Bindung von HLA-Klasse-I, im Besonderen HLA-C, mit ihren KIR-Rezeptoren in ihrer Aktivität gehemmt werden, wurde die Oberflächenexpression von HLA-Klasse-I blockiert, um zu sehen, ob die verminderte NK-Zell-Degranulation gegen U0126-behandelte Zellen tatsächlich durch die gesteigerte HLA-Klasse-I-Expression zu erklären ist. Dazu wurden W6/32-F(ab)₂-Fragmente benutzt, die keinen Fc-Teil besitzen, um eine Aktivierung der NK-Zellen über ihren CD16-Rezeptor (Fc γ RIIIA) (ADCC, *antibody-dependent cell cytotoxicity*) auszuschließen (Abb. 39).

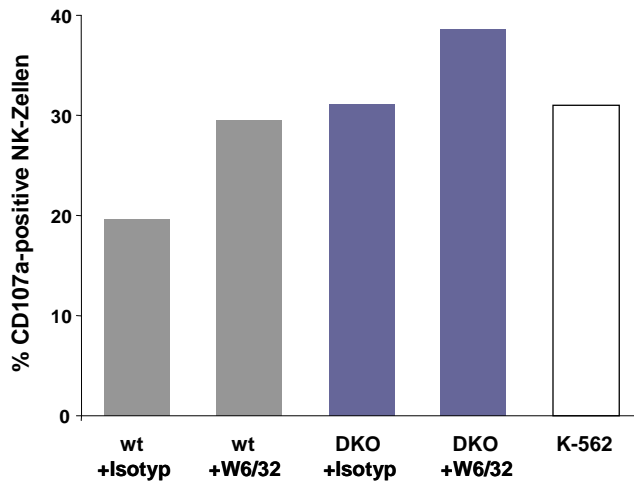


Abb. 39 Degranulation peripherer, IL-2-aktivierter NK-Zellen gegen HCT116wt- und DKO-Zellen mit und ohne Blockierung der HLA-Klasse-I-Oberflächenexpression.

Die HLA-Klasse-I-Expression auf den HCT116wt- und DKO-Zellen wurde durch das pan-HLA-Klasse-I-spezifische W6/32-F(ab)₂-Fragment blockiert, als Kontrolle wurde ein Isotyp-AK verwendet. Die CD107a-Degranulation wurde auf die Gesamtheit der CD3⁺/CD56⁺-NK-Zellen berechnet und die HLA-Klasse-I-negative Tumorzelllinie K-562 als Positiv-Kontrolle der NK-Zell-Reaktivität eingesetzt. Gezeigt ist eines von 4 unabhängigen Experimenten.

Die geringere Degranulation in diesem Experiment verglichen mit Abb. 38 stellt eine spenderspezifische Variable dar, die im Vergleich verschiedener Spender deutlich wird. Die Blockierung von HLA-Klasse-I-Molekülen führt zu einer gesteigerten Degranulation der NK-Zellen, so dass die verminderte NK-Zell-Degranulation gegen U0126-behandelte HCT116-Zellen aus Abb. 38 tatsächlich durch die erhöhte HLA-Klasse-I-Expression zu erklären ist. Da je nach Intensität Signale von inhibierenden NK-Rezeptoren stärker sein können als Signale aktivierender Rezeptoren, wie NKG2D, kann die erhöhte ULBP2-Expression in Folge der MEK-Inhibition den hemmenden Effekt von HLA-Klasse-I nicht vollständig kompensieren. Die fein-regulierte Balance der NK-Aktivität aus aktivierenden und inhibierenden Signalen wird besonders deutlich, wenn man den in Abb. 40 dargestellten Vergleich zwischen U0126- und Sorafenib-behandelten Kolon-Karzinom-Zellen betrachtet. Entsprechend der Steigerung der HLA-Klasse-I-Expression auf U0126- und Sorafenib-behandelten SW480-Zellen wird die NK-Zell-Degranulation reduziert. Dieser Effekt ist in behandelten SW948-Zellen nicht sichtbar, vielmehr ist hier eine leicht stärkere Degranulation zu beobachten, was auf eine Verschiebung zugunsten der positiven Signale hindeutet.

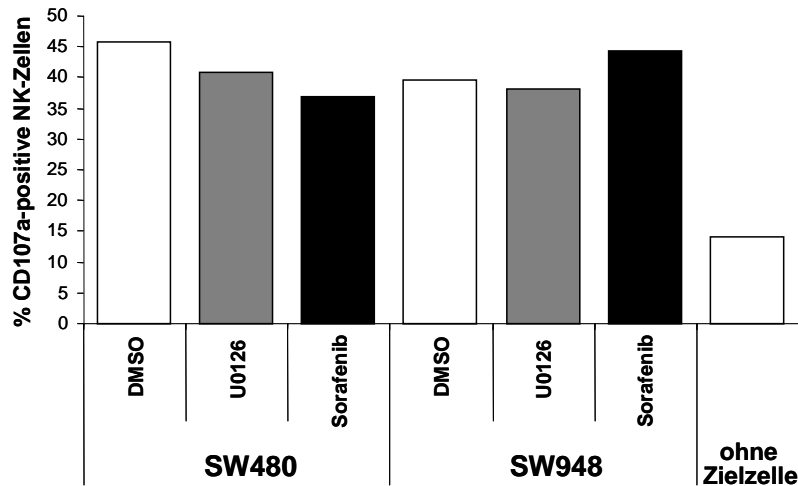


Abb. 40 Degranulation peripherer, IL-2-aktivierter NK-Zellen gegen SW480- und SW948-Zellen.

Die beiden Kolon-Karzinom-Zelllinien wurden 96 h mit DMSO (0,2 %, weißer Balken), mit U0126 (20 μ M, grau) bzw. mit Sorafenib (10 μ M, schwarz) behandelt. Die spontane Degranulation der NK-Zellen ist durch den Ansatz ohne Zielzelle quantifiziert, wobei die CD107a-Degranulation auf die Gesamtheit der CD3⁺/CD56⁺-NK-Zellen berechnet wurde.

Eine DNS-Demethylierung aufgrund von DNMT-Verlust oder -Inhibition, und die Inhibition des konstitutiv aktiven MEK/ERK-Signals führen zu einer gesteigerten HLA-Klasse-I-Expression, besonders von HLA-A1 und -A2. Diese erhöhte Expression resultiert in einer besseren Erkennung der Tumorzellen durch einen HLA-A2-restringierten ZTL-Klon. Die ebenfalls gesteigerte Expression des NKG2D-Liganden ULBP2 nach DNMT-Verlust und/oder MEK/ERK-Inhibition spiegelt sich in einer Demethylierung des ULBP2-Promotors wider. Dabei wird der aktivierende Effekt der gesteigerten ULBP2-Expression auf die NK-Zell-Erkennung durch den inhibierenden HLA-Klasse-I-Effekt kompensiert.

Die Oberflächenexpression von HLA-Klasse-I und ULBP2 zeigt in den untersuchten Kolon-Karzinom-Zelllinien eine unterschiedliche Reaktion auf MEK- bzw. B-Raf-Inhibition, so dass zellspezifische Unterschiede der Vernetzung des onkogenen K-RAS- und B-Raf-Signalweges zu existieren scheinen.

2 Charakterisierung der NK-Zell-Plastizität auf phänotypischer und funktioneller Ebene

NK-Zellen exprimieren, im Gegensatz zu T- und B-Zellen, nicht einen spezifischen aktivierenden Rezeptor (TZR bzw. BZR), sondern eine Vielzahl unterschiedlicher, Keimbahn-kodierter Rezeptoren. Diese führen nicht nur zur Aktivierung, sondern können auch inhibierende Signale vermitteln und damit Effektorfunktionen aktiv abschalten. Durch diese komplexe Regulation ist die NK-Reaktivität nicht vorhersagbar und eine präzise Beschreibung wird weiter dadurch erschwert, dass jede NK-Zelle ein individuelles Rezeptor-Repertoire aufweist. Diese klonale Diversität wird mit dem Begriff der NK-Plastizität zusammengefasst, wobei dies Phänotyp- auch Funktionsunterschiede beinhaltet. Darüber hinaus ist bis heute nicht genau geklärt, welche Rezeptoren bzw. Signalwege für die beiden NK-Effektorfunktionen Zytotoxizität und/oder Zytokinproduktion verantwortlich sind und wie sie zusammenspielen. Das zu klären würde dazu beitragen, die Reaktionen von NK-Zellen besser steuern zu können und damit möglicherweise bestehende Therapieansätze in Bezug auf Autoimmunität oder Tumorerkrankungen zu unterstützen.

2.1 Phänotyp und Funktion peripherer NK-Zellen

In peripherem Blut sind spenderabhängig ca. 10 - 20 % der Lymphozyten NK-Zellen, die aufgrund ihrer Rezeptorausstattung zunächst in zwei Hauptgruppen unterteilt werden. Ungefähr 90 % der NK-Zellen besitzen eine niedrige Expression von CD56 (N-CAM), und werden daher als CD56^{dim}-NK-Zellen bezeichnet, die darüber hinaus eine deutliche Expression des CD16-(FcγIIIa)-Rezeptors aufweisen. Aufgrund der Sekretion proinflammatorischer Zytokine wird CD56^{bright}/CD16⁻-NK-Zellen eine immunmodulatorische Funktion zugeschrieben, da sie dadurch die nachfolgende adaptive Immunantwort beeinflussen können. Neben dieser Einteilung der NK-Zellen nach ihrer CD56/CD16-Expression konnte in unserer Arbeitsgruppe CD6 als ein weiterer differentieller Unterscheidungsmarker auf den beiden NK-Populationen identifiziert werden. Wie CD16 ist auch CD6 nicht auf CD56^{bright}-NK-Zellen exprimiert und zeigt in der CD56^{dim}-NK-Subpopulation eine schwache, daher heterogene Expression. NK-Zellen weisen also ein großes Repertoire unterschiedlicher aktivierender und inhibierender Rezeptoren auf, die in einem komplex regulierten Gleichgewicht darüber entscheiden, in welcher Situation die NK-Zytotoxizität an- oder abgeschaltet wird, was zunächst unter 2.1.1 genauer untersucht wird. Dieses Regulationsprinzip trifft zwar auf alle NK-Zellen zu, die Anwesenheit der beiden Subpopulationen wirft jedoch zusätzlich die Frage einer unterschiedlichen Funktion auf, was

durch Kombination von phänotypischen und funktionellen Test in 2.1.2 und 2.1.3 im Detail untersucht wird.

2.1.1 Regulation der NK-vermittelten Zytotoxizität durch aktivierende und inhibitorische Signale

NK-Zellen befinden sich ständig in einem leicht aktivierbaren Zustand, weshalb sie im Körper in ihren Effektorfunktionen gehemmt werden, um nicht autoreaktiv gegen eigene Zellen vorzugehen. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von aktivierenden und inhibierenden Liganden entscheidet die Stärke der jeweiligen Signale über die Effektorfunktionen wie Zytotoxizität oder Zytokinfreisetzung. Um diese Balance zwischen Aktivierung und Inhibition experimentell zu zeigen, wurde eine redirigierte Lyse (Abb. 41 und Abb. 42) mit der NK-Zell-Tumorlinie NKL durchgeführt, welche die inhibitorischen Rezeptoren CD94/NKG2A und ILT2, sowie die aktivierenden Rezeptoren NKG2D und 2B4 (CD244) exprimiert.

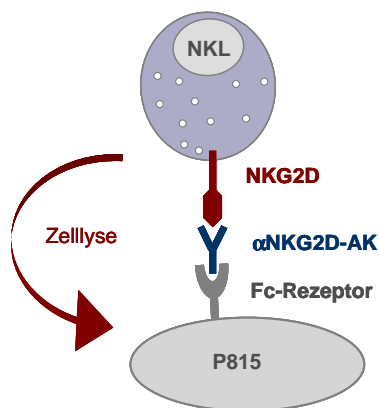


Abb. 41 Schematische Darstellung der redirigierten Lyse mit AK-beladenen P815-Zielzellen und der NKL-Effektorzelle.

Exemplarisch ist die Kopplung des α NKG2D-mAK an den Fc-Rezeptor der P815-Mausmastozytom-Zelllinie gezeigt. Der gekoppelte Antikörper bindet den aktivierenden NKG2D-Rezeptor auf der NK-Tumorzelle NKL und löst die Lyse der P815-Zelle aus.

Als aktivierendes Signal wird eine konstante Menge an Antikörper (100 ng/ml), der für die aktivierenden NK-Rezeptoren NKG2D bzw. 2B4 spezifisch ist, an die FcRII⁺-P815-Zelllinie gebunden. Die inhibitorischen Signale werden durch Antikörper gegen CD94 bzw. ILT2 und KIR2DL4 in absteigender Konzentration dazu titriert, um das Gleichgewicht zwischen positiven und negativen Signalen zu imitieren (Abb. 42).

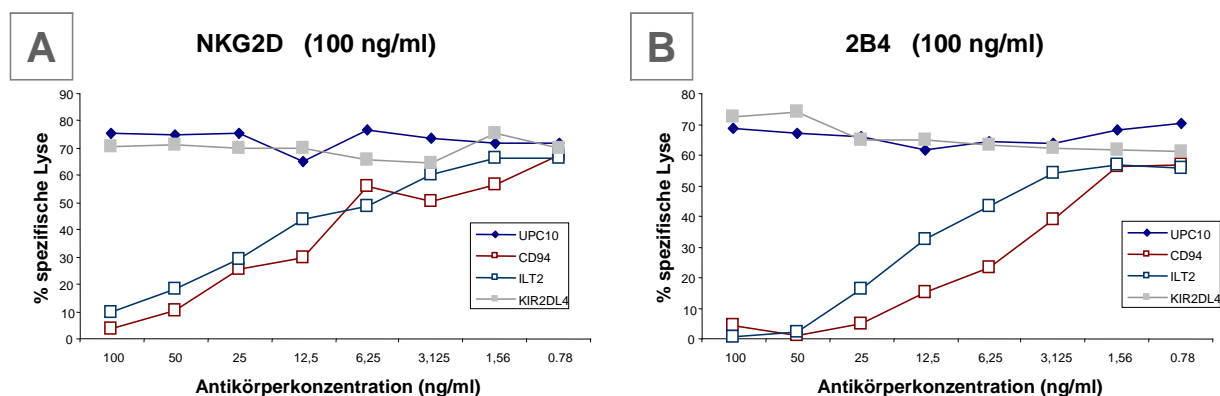


Abb. 42 Redirigierte Lyse im Chromfreisetzungstest mit NKL-Zellen und AK-beladenen P815-Zielzellen.

A α NKG2D-Antikörper konstant (100 ng/ml) **B** α 2B4-Antikörper konstant (100 ng/ml). Die Antikörper gegen die inhibierenden NK-Rezeptoren, CD94, ILT2 bzw. KIR2DL4 wurden in absteigender Konzentration zugegeben. Als Isotypkontrolle für die Titration der inhibitorischen Antikörper wurde UPC10 in identischer Konzentration eingesetzt.

Während die NKG2D- bzw. 2B4-vermittelte Lyse durch 100 ng/ml α CD94 bzw. α ILT2-Antikörper komplett inhibiert wurde, lässt sich eine Konzentrations-abhängige Wiederherstellung beobachten. Dabei reicht eine Antikörperkonzentration von 12,5 ng/ml für CD94 bzw. 25 ng/ml für ILT2 um die NKG2D-vermittelte Lyse, bzw. 6,25 ng/ml für CD94 und 12,5 ng/ml für ILT2, um die 2B4-vermittelte Lyse zur Hälfte wiederherzustellen. Damit lässt sich die Balance zwischen Aktivierung und Inhibition experimentell darstellen. Da NKG2D und 2B4 zwei unterschiedliche Signalwege benutzen, zeigen die Titrationen der inhibitorischen Signale leichte Unterschiede, wobei dies auch durch Unterschiede in der Affinität bzw. Avidität der Antikörper bedingt sein kann. Für den KIR2DL4-Rezeptor sind sowohl aktivierende als auch inhibierende Signale beschrieben (Bryceson, March et al. 2006). KIR2DL4 ist auf NKL-Zellen nur schwach exprimiert und scheint weder inhibierende noch aktivierende Signale zu vermitteln. Somit ist die KIR2DL4-Expression auf den NKL-Zellen als funktionslos zu betrachten.

NK-Zellen werden im Normalfall durch die Expression inhibierender Rezeptoren, hauptsächlich für HLA-Klasse-I, in ihrer Aktivität kontrolliert. Neben inhibierenden gibt es auch aktivierende Rezeptoren, so dass die NK-Reaktivität durch die Integration aller erhaltenen Signale in einem komplexen Gleichgewicht reguliert wird. Da die Signalstärke nicht nur durch die Anzahl der Rezeptoren, sondern auch deren Liganden-Affinität bestimmt wird, muss für eine Vorhersage der NK-Effektorfunktion neben rein phänotypischen Analysen auch eine funktionelle Untersuchung erfolgen.

2.1.2 Vergleich der CD56^{bright}/CD6⁻- und CD56^{dim}/CD6^{+/-}-NK-Zellen in Bezug auf die Degranulationsfähigkeit

Um zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen der CD56- und CD6-Expression und den zytotoxischen Eigenschaften der NK-Zellen gibt, wurden PBMC 48 h mit IL-2 (500 U/ml) voraktiviert, und nach Aktivierung durch HLA-Klasse-I-negative Zielzellen in CD107a-Degranulationsexperimenten analysiert. Die IL-2-Aktivierung der NK-Zellen war nötig, da Vorexperimente gezeigt haben, dass frische, unstimulierte NK-Zellen auch nach 16 h Inkubation mit HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen nur eine Degranulation von < 5 % zeigten (Daten nicht gezeigt). Die Stimulation mit IL-2 führte in einigen Spender zu einer leichten Erhöhung der CD56-Oberflächenexpression, die Expression der anderen Rezeptoren blieb hingegen unverändert (Daten nicht gezeigt), so dass eine klare Unterscheidung der Subpopulationen auch nach IL-2-Stimulation möglich war. Jacobs et al. konnten zeigen, dass sich die Perforin-Expression zwar durch IL-2 leicht erhöht, dass dies aber in beiden NK-Subpopulationen, CD56^{bright} und CD56^{dim}, gleichermaßen auftritt und sich somit das Verhältnis zueinander nicht verändert (Jacobs, Hintzen et al. 2001). Neben der Anfärbung von CD107a wurden zusätzlich CD3, CD56, CD6 oder CD16 gefärbt, um zum einen die CD3⁻CD56⁺-NK-Zellen zu identifizieren und zum anderen eine genaue Zuordnung der CD107a-positiven Zellen zu den beiden NK-Subpopulationen zu gewährleisten. Die Zielzellen wurden parallel auf ihre Ligandenexpression hin untersucht.

Die Quantifizierung der Degranulation der beiden NK-Populationen beruht auf der Stabilität der Unterscheidungsmarker während des Degranulationsvorganges. Während diese Voraussetzung für CD56 und CD6 gegeben ist, verändert sich die CD16-Expression in Abhängigkeit von der Aktivierung durch die Zielzelle. Exemplarisch ist diese Modulation für einen Spender und die HLA-Klasse-I-negative Zielzelle K-562 in Abb. 43 gezeigt.

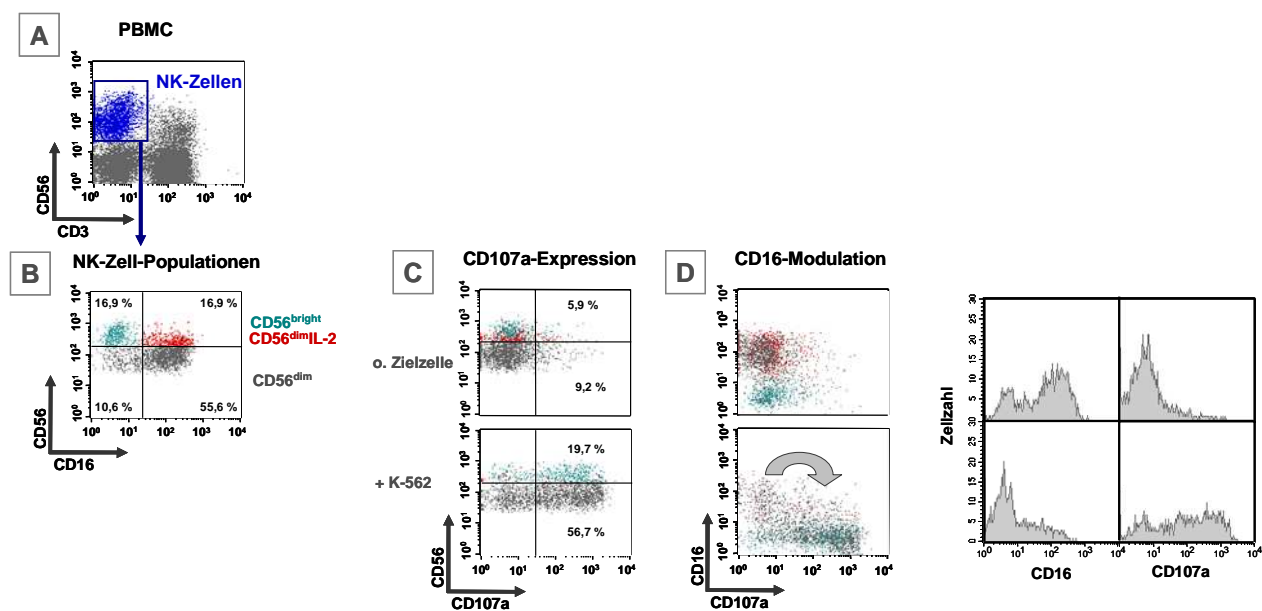


Abb. 43 Nachweis der CD16-Modulation nach Aktivierung mit K-562.

A IL-2-aktivierte PBMC (500 U/ml, 48 h) eines Spenders sind nach ihrer CD3/CD56-Expression aufgetragen. NK-Zellen (CD3-negativ/CD56-positiv) sind in dunkelblau dargestellt. **Abb. B-D** Subgruppierung der NK-Zellen anhand der Expression verschiedener Marker (CD16, CD56, CD107a). **B** zeigt die in einigen CD56^{dim}NK-Zellen erhöhte CD56-Expression nach IL-2-Aktivierung in rot. **C** und **D** zeigen die Veränderung von CD107a und CD16 auf den NK-Zellen ohne Zielzelle (obere Zeile) und nach Kontakt mit K-562 (untere Zeile).

In Abb. 43A sind IL-2-aktivierte PBMC ohne Zielzellen, aufgetragen nach ihrer CD3/CD56-Expression, dargestellt, wobei die NK-Zellen in dunkelblau markiert sind. Diese sind in den folgenden Abbildungen im Detail auf die Expression der dargestellten Marker untersucht worden. Die Aktivierung mit IL-2 lässt die Separation der NK-Zellen in die CD56^{bright}- und CD56^{dim}-Population weitestgehend unverändert (Abb. 43B). Durch die Aktivierung mit IL-2 zeigen einige CD56^{dim}/CD16⁺-NK-Zellen zwar eine erhöhte CD56-Expression, können aber aufgrund der unveränderten CD16-Expression eindeutig von den CD56^{bright}/CD16⁻-NK-Zellen unterschieden werden, und werden im Folgenden als CD56^{dim}IL-2 bezeichnet (Abb. 43B). Die Analyse der CD107a-Expression nach vier Stunden Aktivierung mit K-562 (Abb. 43C) zeigt eine deutliche Degranulation beider NK-Subpopulationen, 19,7 % der CD56^{bright} und 56,7 % der CD56^{dim}. Trägt man in dieser Farbkodierung nun die CD16- gegen die CD107a-Expression der NK-Zellen auf (Abb. 43D), so sieht man deutlich, dass die degranulierenden CD16⁺-NK-Zellen ihren CD16-Rezeptor verlieren, da es kaum doppelt-positive CD16⁺/CD107a⁺-NK-Zellen gibt. Stattdessen kommt es zu einer deutlichen Abnahme der CD16⁺/CD107a⁻-NK-Zellen und gleichzeitigen Zunahme der CD16⁻/CD107a⁺-NK-Population. Stellt man die Expression beider Marker in Histogrammen dar, dann ist diese Korrelation zwischen CD107a-Zunahme bei gleichzeitigem CD16-Verlust deutlich zu sehen. Möglicherweise kommt es während der Degranulation zu einer Rekrutierung des CD16-Rezeptors in die immunologische Synapse, die sich bei Kontakt der NK-Zelle mit der

Zielzelle bildet, und zu einer anschließenden CD16-Internalisierung, die als CD16-Verlust detektiert wird. Die Oberflächenmarker CD56 und CD16 zeigen also folgende Veränderungen:

1. Leicht erhöhte CD56-Expression nach IL-2-Stimulation in einigen NK-Zellen (**CD56^{dim}IL-2**)
2. CD16-Verlust bei Degranulation der CD56^{dim}-NK-Population

Um trotz dieser Veränderungen eine möglichst genaue Zuordnung der NK-Zellen zu den beiden untersuchten Subpopulationen zu gewährleisten, wurde für alle Degranulationsversuche ein, auf der Boole'schen Logik basierendes, Auswerteschema entwickelt, das im Anhang exemplarisch an einem Spender gezeigt wird (Tabelle 7 und Abb. 66).

Degranulation von CD56^{bright}/CD6⁻-bzw. CD56^{dim}/CD6^{+/-}-NK-Zellen

Neben CD56 und CD16 konnte in unserer Arbeitsgruppe ein weiterer Rezeptor auf NK-Zellen identifiziert werden, der als differentieller Marker für die beiden Subpopulationen dient. Dabei handelt es sich um CD6, ein zunächst nur auf T-Zellen beschriebener Rezeptor, der an ALCAM (CD166) bindet. Wir konnten zeigen, dass CD6 nur auf CD56^{dim}-Zellen exprimiert wird und in dieser NK-Population eine heterogene Verteilung zeigt (Abb. 44A). CD56^{bright}/CD16⁻-NK-Zellen sind dagegen CD6-negativ, wobei dieses Muster an PBMC von mehr als 50 Normalspendern sowie Autoimmunpatienten bestätigt wurde (B. Simm). CD6 bleibt im Gegensatz zu CD16 während der Degranulation stabil und verändert seine Expression auch nicht durch IL-2-Stimulation (Abb. 44B). Daher war hier die Zuordnung der CD107a⁺-Zellen zu den Subpopulationen (CD6⁺/CD6⁻) linear nachvollziehbar. Um zu untersuchen, ob diese differentielle CD6-Expression überdies auch funktionelle Relevanz besitzt, wurden mit PBMC von 13 Normalspendern CD107a-Degranulationsversuche durchgeführt, wobei in Abb. 44 exemplarisch ein Spender gezeigt ist. Die Berechnung der degranulierenden Subpopulationen wurde dem Schema im Anhang entsprechend durchgeführt (Tabelle 7, Abb. 66).

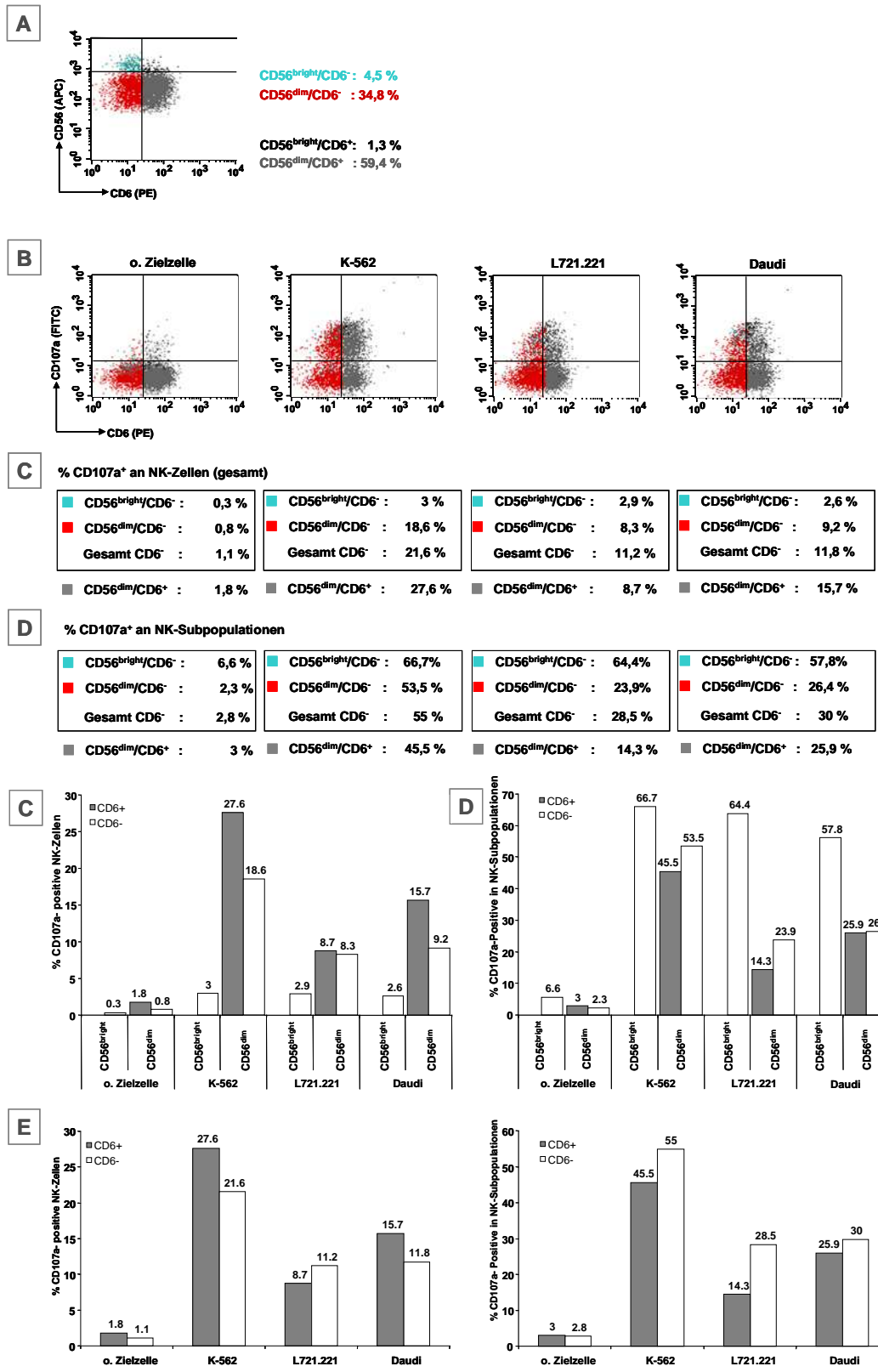


Abb. 44 Quantifizierung der degranulierenden CD6⁺/CD6⁻ NK-Zellen nach Aktivierung mit HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen.

Dargestellt sind IL-2-aktivierte NK-Zellen (48 h, 500 U/ml). **A** CD56/CD6-Verteilung nach 4 h Inkubation ohne Zielzelle. **B** CD6/CD107a-Verteilung von NK-Zellen nach 4 h Inkubation ohne bzw. mit HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen. **C** Prozentualer Anteil der CD107a⁺-Zellen an den Gesamt-NK-Zellen (+ Balkendiagramm). **D** Prozentualer Anteil der CD107a⁺-Zellen an den jeweiligen NK-Subpopulationen (+ Balkendiagramm). **E** Einteilung der NK-Zellen nach ihrer CD6-Expression, links Prozentualer Anteil der CD107a⁺-Zellen an den Gesamt-NK-Zellen, rechts Prozentualer Anteil an den jeweiligen NK-Subpopulationen.

Abb. 44A zeigt die NK-Zellen aufgetragen nach ihrer CD56/CD6-Expression. In Abb. 44B sieht man die NK-Zellen nach ihrer CD6- und CD107a-Expression aufgetragen, einmal ohne Zielzelle, um die spontane Degranulation zu dokumentieren, und nach Stimulation mit den drei HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen. Die CD6-Verteilung wird durch die Degranulation nicht verändert. In Abb. 44C sind die prozentualen Anteile der CD107a⁺-NK-Zellen an der Gesamtheit der NK-Zellen angegeben, in Abb. 44D dann die prozentualen Anteile der CD107a⁺-Zellen an den jeweiligen NK-Subpopulationen. Die Werte aus C und D sind zusätzlich als Balkendiagramme dargestellt. Um die Relevanz einer CD6-Expression für die zytotoxischen Eigenschaften der NK-Zellen zu analysieren, wurden die CD107a⁺-NK-Zellen auch entsprechend ihrer CD6-Expression ausgewertet (Abb. 44E). Aus dieser detaillierten Auswertung geht eindeutig hervor, dass der CD6-Marker keine Auswirkung auf die Degranulation der NK-Zellen gegen HLA-Klasse-I-negative Zielzellen zeigt.

Um diese Befunde an einem großen Spenderkollektiv zu bestätigen, wurden NK-Zellen von insgesamt 23 Normal Spendern auf ihre Zytotoxizität, gemessen als Degranulation gegen HLA-Klasse-I-negative Zielzellen, untersucht. Dabei wurden die NK-Zellen einerseits nach ihrer CD56/CD16-Expression eingeteilt, also in CD56^{bright}/CD16⁻ und CD56^{dim}/CD16^{+/-} (n = 10), und zusätzlich in 13-Experimenten außerdem über ihre CD6-Expression charakterisiert. Aus allen Daten wurden der Mittelwert und die Standardabweichung der Degranulationen berechnet, was in Abb. 45 als Balkendiagramm dargestellt ist.

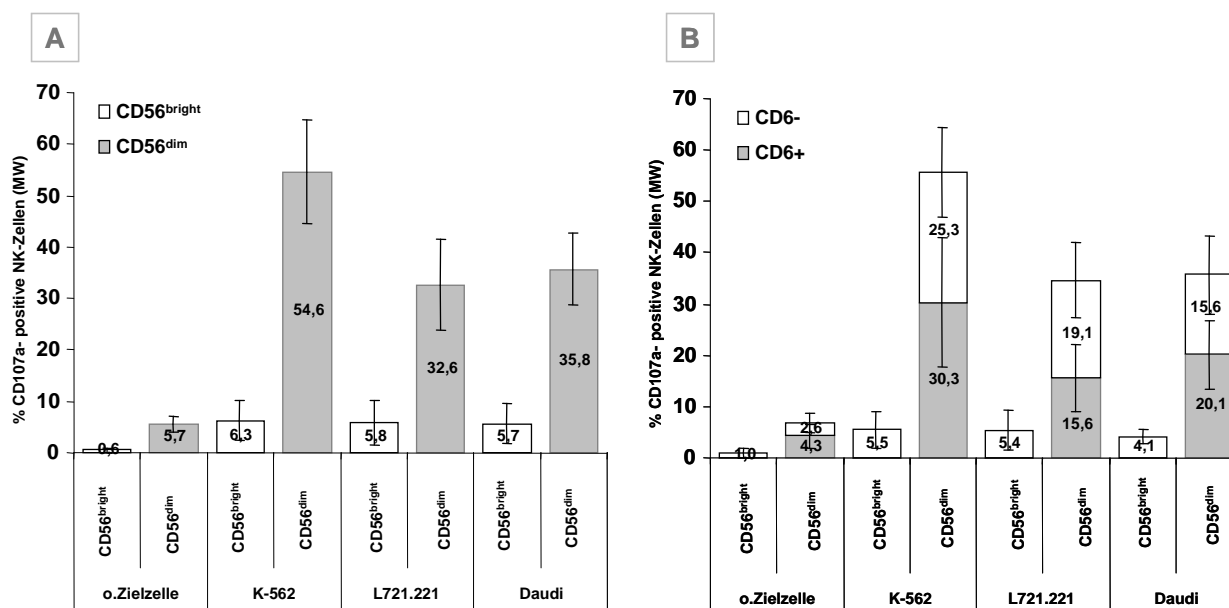


Abb. 45 Graphische Darstellung der Degranulation der NK-Subpopulationen von 23 Normal Spendern.

A Mittelwerte und Standardabweichung (n = 10) der CD107a⁺-NK-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen, eingeteilt nach ihrer CD56-Expression. **B** Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 13) der CD107a⁺-NK-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen charakterisiert nach CD56- und CD6-Expression.

Die Einteilung der CD56^{bright}- und CD56^{dim}-NK-Zellen in Abb. 45A erfolgte unter Berücksichtigung der CD16-Expression, bzw. der Modulation während der Degranulation, analog zu dem Berechnungsschema im Anhang (Tabelle 7 und Abb. 66). Geht man davon aus, dass in peripheren NK-Zellen eine Verteilung der beiden NK-Subpopulationen CD56^{bright}/CD6⁻ und CD56^{dim}/CD6^{+/-} von im Mittel 10 % zu 90 % vorliegt, dann zeigen beide Subpopulationen ein vergleichbares zytotoxisches Potential, da gegen K-562 6,3 % (Abb. 45A) bzw. 5,5 % (Abb. 45B) der CD56^{bright}/CD6⁻-NK-Zellen degranulieren, was ca. 50 % aller CD56^{bright}-NK-Zellen entspricht. Von den CD56^{dim}-NK-Zellen degranulieren 54,6 % (Abb. 45A) bzw. 55,6 % (Abb. 45B) der CD56^{dim}/CD6^{+/-}-NK-Zellen nach Aktivierung durch K-562, was ebenfalls ca. 50 % aller CD56^{dim}-NK-Zellen entspricht. Dabei ist es in Bezug auf die Degranulation irrelevant, ob die CD56^{dim}-NK-Zellen den CD6-Marker exprimieren oder nicht. Der hohe Schwankungsbereich der Werte lässt sich durch individuelle Unterschiede zwischen den Spendern erklären, was unter anderem durch die individuelle Rezeptor-Ausstattung der NK-Zellen bedingt ist. Aus Abb. 45 geht außerdem hervor, dass die Zielzelle für die Induktion der Degranulation ebenfalls entscheidend ist.

Der Vergleich zwischen L721.221, Daudi und K-562 zeigt, dass vor allem der Anteil an degranulierten CD56^{dim}-NK-Zellen variiert. Deshalb wurden diese drei HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen auf Unterschiede bezüglich der Expression von NK-Liganden und Adhäsionsmolekülen untersucht (Tabelle 4).

Tabelle 4 Expression von NK-Rezeptor-Liganden auf drei HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen

NK-Rezeptor	Ligand	K-562	L721.221	Daudi
CD40L	CD40	-	-	+
2B4 (CD244)	CD48	-	++	(+)
LFA-1	ICAM-1	+++	+++	+++
LFA-2	LFA-3	+	++	(+)
NKG2D	ULBP1	(+)	-	-
NKG2D	ULBP2	+	+	-
NKG2D	ULBP3	-	-	-
NKG2D	MICA	-	-	-
NKG2D	MICB	-	-	-
CD6	ALCAM (CD166)	-	(+)	+
CD94/NKG2A,C	HLA-E	-	(+)	-

+++ , ++ , + und (+) zeigen eine Expression der Liganden in absteigender Stärke an; - bedeutet keine Expression.

Obwohl L721.221 im Vergleich zu Daudi und K-562 eine höhere Liganden-Expression zeigt, stimuliert diese EBV-transformierte B-Zelllinie CD56^{dim}-NK-Zellen weniger effizient als die beiden anderen Zielzellen. Interessanterweise lässt sich eine geringe HLA-E-Expression auf L721.221 nachweisen, was möglicherweise für diesen Effekt verantwortlich ist (unpublizierte Beobachtung der AG Weiß und AG Falk). Bemerkenswert ist auch die Anwesenheit von zwei NKG2D-Liganden auf K-562, die eine zusätzliche Stimulation vermitteln können und mitverantwortlich für die gute Aktivierung der NK-Zellen durch K-562 sein können. Die Expression des CD6-Liganden ALCAM (CD166) auf Daudi und schwächer auf L721.221-Zellen scheint keinen Einfluss auf eine bessere Aktivierung der CD6⁺-NK-Zellen zu haben.

Beide NK-Subpopulationen, CD56^{bright}/CD6⁻ und CD56^{dim}/CD6^{+/-}, besitzen ein vergleichbares zytotoxisches Potential gegen HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen. Dabei werden diese Zielzellen unterschiedlich stark erkannt, was durch eine variable Expression von NK-Rezeptor-Liganden zu erklären ist, wobei die Stärke der Reaktion zusätzlich von dem individuellen NK-Repertoire abhängig ist.

2.1.3 Zytokin- und Chemokinproduktion von CD56^{bright}/CD6⁻ und CD56^{dim}/CD6⁺-NK-Zellen

Da die Signalwege für die beiden NK-Effektorfunktionen, Zytokinproduktion und Zytotoxizität, nicht notwendigerweise parallel verlaufen (Colucci, Di Santo et al. 2002), wurde im Folgenden untersucht, ob sich die beiden NK-Subpopulationen in ihrer Fähigkeit zur Zytokinproduktion unterscheiden. Dabei wurde sowohl die Rezeptor-vermittelte, als auch die durch IL-2 stimulierte Zytokinproduktion mit der Multiplex-Methode quantifiziert (vgl.

Methoden 5.2), wobei für die Analyse der Rezeptor-vermittelten Zytokin/Chemokin-Freisetzung 16 und für die Analyse der IL-2-vermittelten Produktion 8 Zytokine/Chemokine untersucht wurden.

Kinetik der Zytokinproduktion

Wie in Chromfreisetzungsversuchen gezeigt wurde (z.B. Abb. 42), findet die Lyse von Zielzellen nach Erkennung durch NK-Zellen bereits innerhalb von 4 h statt. Grund hierfür ist, dass Perforin und Granzyme bereits in den zytotoxischen Granula gespeichert vorliegen, und nicht erst auf transkriptioneller Ebene hergestellt werden müssen. Im Gegensatz dazu ist für eine Produktion und Sekretion von Zytokinen meist Transkription und Protein-Neusynthese nötig. Um die Kinetik zwischen mRNS-Induktion und Proteinsekretion zu untersuchen, wurden PBMC mit dem maximalen Stimulus PMA/Ionomycin für 6 h bzw. 24 h behandelt und anschließend die mRNS (vgl. Methoden 5.5) bzw. die entsprechenden Zytokine/Chemokine im Überstand quantifiziert (Abb. 46).

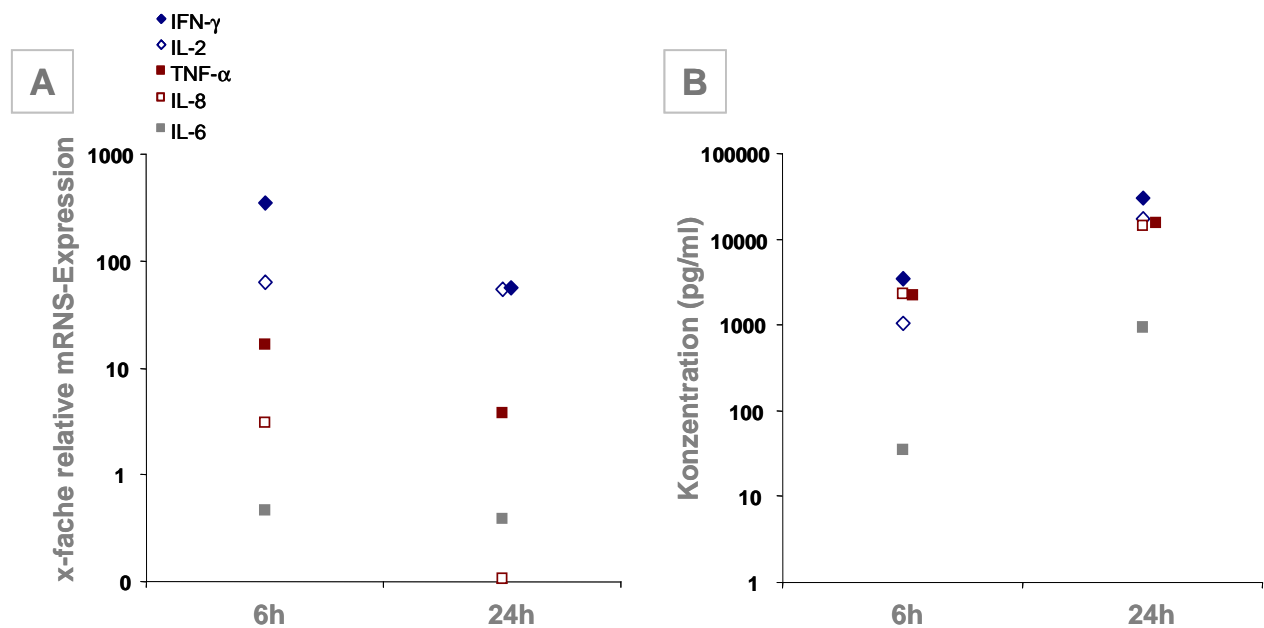


Abb. 46 Nachweis von Zytokin/Chemokin-mRNS und dem entsprechenden Protein nach 6 bzw. 24 h PMA/Ionomycin-Stimulation von PBMC.

A Der Nachweis der mRNS erfolgte mit Hilfe des Quantigene-Multiplex-Verfahrens aus dem Gesamt-Zelllysate. Die relative mRNS-Expression bezieht sich auf die mRNS-Menge in unstimuliertem Zustand. **B** Die Zytokine/Chemokine wurden aus dem Zellüberstand bestimmt (pg/ml). Es wurden $0,2 \times 10^6$ frische PBMC in 200 μ l Medium kultiviert und nach Abnahme der Überstände aus diesen Zellen ein Gesamt-Zelllysate hergestellt.

Die IFN- γ -, IL-2- und TNF- α -Transkription wird durch PMA/Ionomycin sehr schnell induziert und der mRNS-Gehalt sinkt nach 24 h trotz anhaltendem Stimulus zum Teil bereits wieder ab (Abb. 46A). Dabei gibt es einen Unterschied in der Stabilität der mRNS, wobei z.B.

IL-8 einen drastischen Abbau nach 24 h zeigt, während IL-2 und IL-6 konstant bleiben. Die Zytokin/Chemokin-Proteine hingegen werden erst zeitlich versetzt nach 24 h nachgewiesen, was durch die Translation zu erklären ist (Abb. 46B). Der Nachweis dieser Zytokin/Chemokin-Proteine ist zwar bereits nach 24 h möglich, um aber den idealen Zeitpunkt zum Nachweis von Zytokinen und Chemokinen im Überstand festzustellen, wurden separierte NK-Zellen mit IL-2 (1000 U/ml) aktiviert und insgesamt 96 h kultiviert. Im 24 h-Rhythmus wurden Überstände entnommen bzgl. verschiedener Zytokine/Chemokine analysiert, wovon nur einige exemplarisch dargestellt sind (Abb. 47).

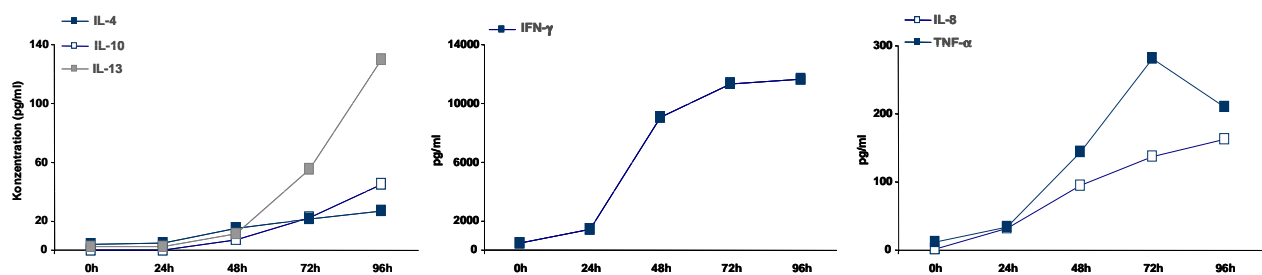


Abb. 47 Kinetik der Zytokin/Chemokinproduktion IL-2-aktivierter NK-Zellen.

Für die Zytokin/Chemokinbestimmung wurden 1×10^6 isolierte NK-Zellen von Spender #7, mit einer Reinheit von 97 % ($CD3^+/CD56^+$), in 1,5 ml mit 1000 U/ml IL-2 kultiviert. Im 24 h-Rhythmus wurden Überstände genommen und die Zytokine/Chemokine bestimmt. Die Konzentrationen der Zytokine/Chemokine sind in pg/ml angegeben.

Alle in Abb. 47 dargestellten Zytokine zeigen einen Konzentrationsanstieg mit zunehmender Dauer der Kultivierung, wobei das Maximum bei 72 bzw. 96 h liegt. Interessanterweise sind die T_H2 -Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 erst ab 72 h in biologisch relevanten Mengen nachzuweisen, während die T_H1 -Zytokine IFN- γ und TNF- α , sowie das Chemokin IL-8 (CXCL8) bereits nach 24 bzw. 48 h einen deutlichen Anstieg zeigen. Diese Kinetik ist sicher auch ein Grund dafür, dass NK-Zellen ein T_H1 -Muster zugesprochen wird. Um in den folgenden NK-Zell-Experimenten ein möglichst großes Zytokin- bzw. Chemokin-Repertoire nachweisen zu können, wurde die Kinetik auf 96 h ausgedehnt.

Vergleich der Zytokinmuster der $CD56^{bright}/CD6^-$ und $CD56^{dim}/CD6^+$ -NK-Subpopulationen

Für eine Analyse der Zytokinsekretion der beiden NK-Subpopulationen wurden NK-Zellen aus PBMC isoliert und anschließend in einer weiteren Separation in eine $CD6^+$ - und $CD6^-$ -Fraktion getrennt (vgl. Methoden 1.8). Da das $CD6$ -Molekül durch den für die Separation verwendeten Antikörper blockiert ist, konnte das Ergebnis der Fraktionierung nicht durch eine direkte $CD6$ -Färbung überprüft werden. Eine Färbung der NK-Zellen mit $CD56$ und $CD16$

zeigte aber eine mehr als 10-fache Anreicherung der $CD56^{\text{bright}}/CD16^-$ -NK-Zellen in der $CD6^-$ -Fraktion (17,75 %) im Vergleich zur $CD6^+$ -Fraktion (1,7 %). Beide Fraktionen wurden für 96 h mit 100 U/ml IL-2 kultiviert, wobei im 24 h-Rhythmus Überstände für eine Zytokinbestimmung entnommen wurden (Abb. 48).

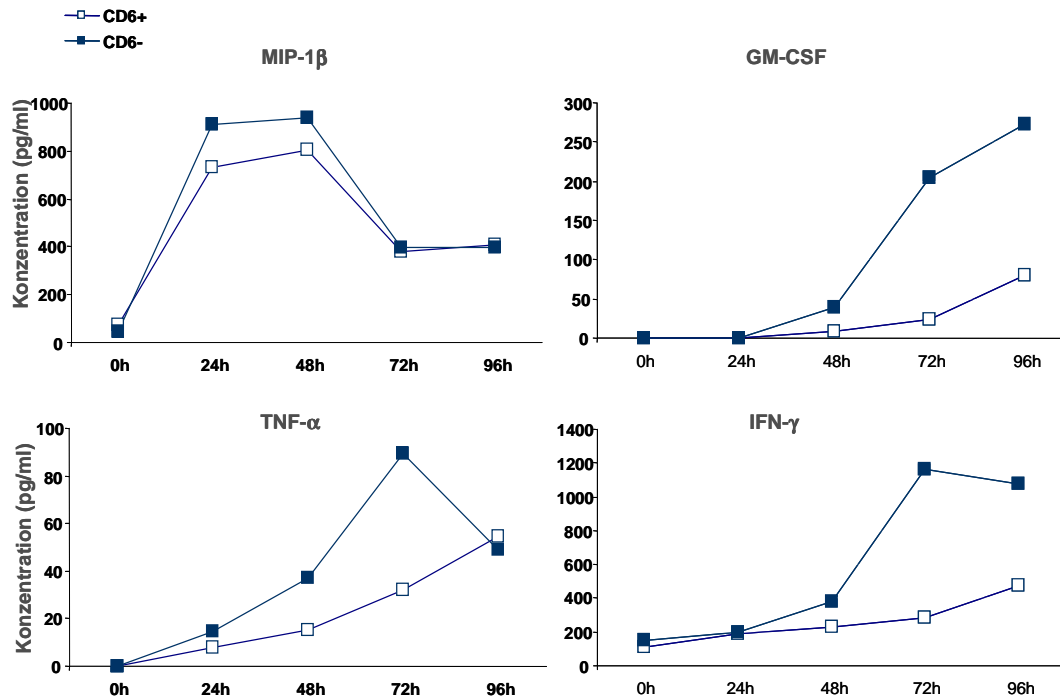


Abb. 48 Zytokinproduktion der $CD6^+$ - und $CD6^-$ -NK-Subpopulationen.

Separierte NK-Zellen (Spender #7, 96 % Reinheit) wurden 96 h mit 100 U/ml IL-2 kultiviert, wobei von beiden Fraktionen je 1×10^6 Zellen/ 1,5 ml Medium eingesetzt wurden. Alle 24 h wurde Kulturüberstand zur anschließenden Zytokin/Chemokin-Bestimmung entnommen. Die Konzentrationen der Zytokine/Chemokine sind in pg/ml angegeben.

Beide NK-Zell-Populationen zeigen unabhängig von der CD6-Expression nach IL-2-Aktivierung ein vergleichbares Muster für die analysierten Zytokine/Chemokine, wobei die $CD6^-$ -NK-Zell-Fraktion meist höhere Mengen in einer schnelleren Kinetik produziert (Abb. 48). Das liegt aber nicht an einem generell verminderten Aktivierungszustand der $CD6^+$ -NK-Zellen z.B. aufgrund eines Nebeneffekts der Separationsmethode, da MIP-1 β (CCL4) nach 72 bzw. 96 h in gleichen Mengen von beiden Populationen produziert wird. Dies bedeutet darüber hinaus, dass NK-Zellen beider Subpopulationen das Chemokin MIP-1 β sezernieren und somit für CCR5-positive Lymphozyten chemotaktisch wirken können. Neben den T_H1 -Zytokinen IFN- γ und TNF- α konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass auch das proinflammatorische Zytokin GM-CSF verstärkt von $CD56^{\text{bright}}/CD6^-$ -NK-Zellen sezerniert wird und diese somit richtungsweisend für eine Inflammation sein können. Obwohl es sich hier um NK-Zellen desselben Spenders (#7) wie aus Abb. 47 handelt, wurden hier die T_H2 -Zytokine

IL-4, IL-10 und IL-13 ebenso wie das Chemokin IL-8 (CXCL8), nur in Mengen unterhalb des Detektionsniveaus des Multiplex-Verfahrens (< 2 pg/ml) sezerniert. Der Hauptgrund hierfür liegt wahrscheinlich in der 10-fach geringeren IL-2-Konzentration, die in diesem Versuch zur Stimulation der NK-Zellen eingesetzt wurde. Das wird z.B. bei der Betrachtung der produzierten IFN- γ -Mengen deutlich, die bei einer 72-stündigen Stimulation mit 100 U/ml IL-2 in der CD6 $^-$ -Fraktion bei ca. 1000 pg/ml (Abb. 48) und bei Stimulation mit 1000 U/ml bereits bei mehr als 10.000 pg/ml lagen (Abb. 47), obwohl die Zellzahl und das Kulturvolumen identisch waren.

Die beiden, über ihre CD56-, CD6- und CD16-Expression definierten, NK-Subpopulationen, zeigen keine klare funktionelle „Arbeitsteilung“ in Bezug auf Zytokinproduktion und Zytotoxizität. NK-Zellen beider Subpopulationen produzieren nach IL-2-Aktivierung, unabhängig von ihrer CD6-Expression, pro-inflammatorische Zytokine wie IFN- γ und TNF- α , jedoch in unterschiedlicher Kinetik. Die Menge der sezernierten Zytokine/Chemokine wird dabei u.a. durch die Höhe der zur Aktivierung eingesetzten IL-2-Konzentration bestimmt. NK-Zellen können auch T $_H$ 2-Zytokine und -Chemokine produzieren, womit sich neue Aspekte für die Rolle der NK-Zellen in der Regulation von Entzündungsreaktionen ergeben.

2.1.4 Rezeptorabhängige Produktion von Zytokinen und Chemokinen in Kombination mit zytotoxischen Eigenschaften

Die Analyse der beiden NK-Subpopulationen CD56 $^{\text{bright}}$ /CD16 $^-$ /CD6 $^-$ und CD56 $^{\text{dim}}$ /CD16 $^+$ /CD6 $^+$ ergab keine klare Arbeitsteilung in Zytokinproduzenten und Killerzellen, weshalb eine zusätzliche Abhängigkeit dieser Effektorfunktionen von einzelnen aktivierenden Rezeptoren untersucht wurde. Da die NK-Subpopulationen auch aufgrund ihrer unterschiedlichen Chemokin-Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen in unterschiedlichen Kompartimenten, z.B. Lymphknoten und Tonsillen, lokalisiert sein können, ist es möglich, dass dort auftretende Signale einen Einfluss auf die Effektorfunktionen besitzen, indem sie z.B. unterschiedliche Rezeptoren und deren individuelle Signalwege stimulieren. Um die Funktion der einzelnen Rezeptoren bezüglich der Zytokinproduktion und Zytotoxizität genauer zu definieren, wurden zur Stimulation rezeptorspezifische Antikörper durch Bindung über ein F(ab) $_2$ -Fragment an Platten gekoppelt und anschließend die Degranulation nach 4 h (Abb. 49) bzw. die Sekretion von Zytokinen nach 96 h untersucht (Abb. 50). Für die detaillierte Analyse der Zytokine und Chemokine wurde eine Separation der NK-Zellen in

CD6⁺/CD6⁻-Fraktionen vorgenommen und zusätzlich zu der spezifischen Antikörperstimulation IL-2 zugesetzt (100 U/ml). Die Färbung mit CD56 und CD16 ergab eine mehr als 10-fache Anreicherung der CD56^{bright}/CD16⁻-NK-Zellen in der CD6⁻-Fraktion verglichen mit der CD6⁺-Fraktion.

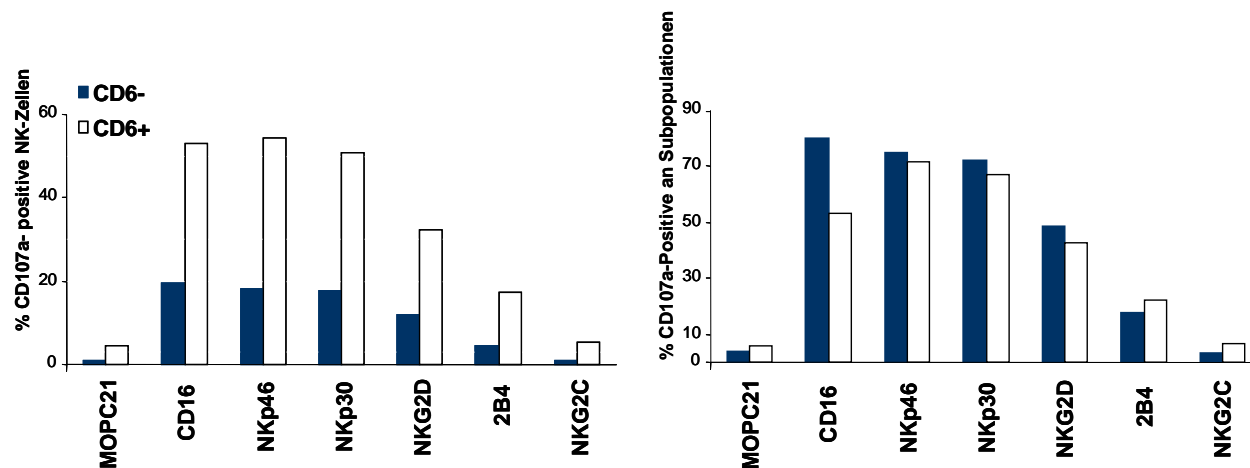


Abb. 49 Degranulation IL-2-aktivierter CD6⁺- und CD6⁻-NK-Zellen nach Rezeptor-Stimulation.

Periphere NK-Zellen wurden 48 h mit IL-2 aktiviert und nach 4 h Stimulation mit Platten-gekoppelten mAK gegen spezifische aktivierende NK-Rezeptoren (1 µg/Ansatz) durchflusszytometrisch auf ihre CD107a-Oberflächenexpression untersucht. Das linke Diagramm zeigt die CD107a⁺-Zellen der CD6⁻- bzw. CD6⁺-Subpopulation als prozentualen Anteil an der Gesamt-NK-Population, rechts sind die CD107a⁺-NK-Zellen als prozentualer Anteil der jeweiligen Subpopulation angegeben, wobei der Anteil der CD6⁺-Population bei 75,6 % und der der CD6⁻-Population bei 24,4 % lag. Gezeigt ist eines von 6 repräsentativen Experimenten.

Abb. 49 zeigt die rezeptorspezifische Degranulation IL-2-aktivierter NK-Zellen, wobei die Degranulation in Kombination mit der CD6-Expression ausgewertet und nach der Stärke der Reaktion aufgetragen wurde. Der Fc-Rezeptor CD16, NKp46 und NKp30 lösen dabei die stärkste Degranulation in beiden Subpopulationen aus. Die NKG2D-Stimulation führt zu schwächerer Degranulation, die im Vergleich zur 2B4- und NKG2C-Stimulation trotzdem noch deutlich über dem Hintergrund der Isotypkontrolle (MOPC21) liegt. Die Stimulation des mit CD94 dimerisierten NKG2C-Rezeptors induziert in keiner der beiden Subpopulationen Zytotoxizität, eine Beobachtung, die vor allem bezüglich der Zytokinproduktion noch von Bedeutung sein wird. Da CD16, NKp30 und NKp46 über dieselben ITAM-tragenden Adaptermoleküle, CD3ζ und FcεRIγ, signalisieren, ist die Zytotoxizität, also die Ausschüttung der zytotoxischen Granula in die immunologische Synapse, durch redundante ITAM-vermittelte Signalwege garantiert, und stellt somit ein „robustes“ System dar. Zusätzlich vermitteln auch ITAM-unabhängige Signalwege Zytotoxizität, z.B. nach NKG2D- bzw. 2B4-Aktivierung, wobei diese Signale über die Adaptermoleküle DAP10 bzw. SAP weitergeleitet werden und weniger effizient sind. Betrachtet man die Anteile der degranulierenden NK-Zellen in den jeweiligen Subpopulationen, dann wird deutlich, dass die

zytotoxischen Eigenschaften der beiden NK-Subpopulationen, CD6⁺ und CD6⁻, jedoch vergleichbar sind (Abb. 49, rechtes Diagramm).

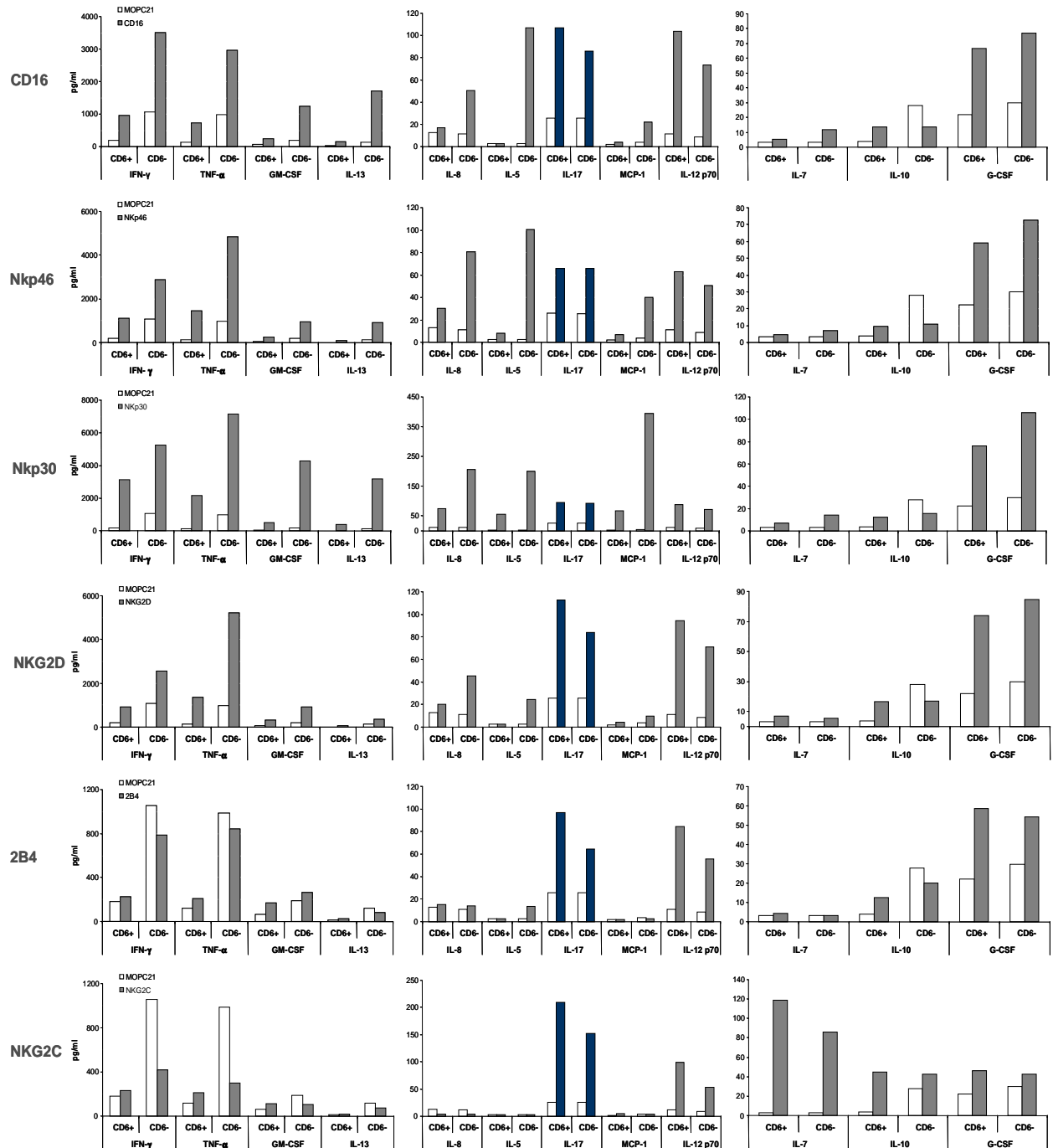


Abb. 50 Zytokinproduktion IL-2-aktivierter CD6⁺- und CD6⁻-NK-Zellen nach Stimulation der einzelnen Rezeptoren.

NK-Zellen (Spender #11), mit einer Reinheit von 97 % (CD3⁺/CD56⁺), wurden nach Separation in CD6⁺- und CD6⁻-Fraktionen 96 h mit Platten-gekoppelten mAK (1 µg/Ansatz) gegen aktivierende NK-Rezeptoren und mit 100 U/ml IL-2 stimuliert und die Zytokin/Chemokinfreisetzung im Zellkulturüberstand quantifiziert (pg/ml). Dabei wurden für jeden Ansatz 150.000 NK-Zellen der jeweiligen Fraktion in 200 µl Medium eingesetzt. Der weiße Balken zeigt die Isotypkontrolle (MOPC21), IL-17 ist in blau dargestellt. Die einzelnen Rezeptoren sind absteigend nach ihrem zytotoxischen Potential (vgl. Abb. 49) angeordnet. Gezeigt ist eines von drei repräsentativen Experimenten.

Abb. 50 zeigt die rezeptorabhängige Zytokinproduktion der Subpopulationen nach 96 h Inkubation exemplarisch an einem von drei Spendern. Die weißen Balken stellen dabei die Zytokinmengen der mit Isotypantikörper-stimulierten NK-Zellen dar, um einen Nebeneffekt der Antikörper über Bindung an den Fc-Rezeptor CD16 auszuschließen, bzw. die nur durch IL-2-induzierten Zytokine nachzuweisen. Alle NK-Zellen produzieren nach IL-2-Stimulation konstitutiv MIP-1 β , wobei die Mengen über dem exakt zu quantifizierenden, linearen Bereich der Standardkurve (>2600 pg/ml) lagen. IL-1 β , IL-4 und IL-6 werden dagegen nicht in biologisch relevanten Mengen sezerniert und sind daher, genau wie MIP-1 β , nicht dargestellt. Die Stimulation von CD16, NKp46, NKp30 und NKG2D induziert die Sekretion von IFN- γ , TNF- α , GM-CSF und IL-13 über das Niveau nach IL-2-Stimulation hinaus. Die Degranulation wird dabei durch diese Rezeptoren in beiden NK-Subpopulationen in vergleichbarer Stärke induziert (Abb. 49), die Zytokine werden verstärkt durch CD6⁻-NK-Zellen produziert (Abb. 50). Für diese Rezeptoren kann von gemeinsamen Signalweiterleitungen ausgegangen werden, die bei Aktivierung sowohl zu einer Ausschüttung zytotoxischer Granula, als auch zu der Freisetzung von IFN- γ , TNF- α , GM-CSF und IL-13 führen. Interessant ist darüber hinaus, dass NKp46 und NKp30 die eine vergleichbare Degranulation von NK-Zellen auslösen, Zytokine und Chemokine aber stets in höhere Mengen nach NKp30-Aktivierung produziert werden (Daten im Anhang, Abb. 67). Das bedeutet, dass bezüglich der Degranulation eine ähnliche Signalweiterleitung stattfindet, die Zytokinsekretion aber durch NKp30-Signale verstärkt aktiviert wird, so dass hier ein fein abgestimmter Mechanismus existiert, der diese graduellen Unterschiede der NK-Reaktion hervorrufen kann.

Interessanterweise führt die Stimulation der Rezeptoren 2B4 und NKG2C weder zu Degranulation (Abb. 49) noch zu Sekretion von IFN- γ , TNF- α und IL-13, die im Vergleich zur Isotypkontrolle sogar vermindert ist (Abb. 50). Stattdessen induzieren diese beiden Rezeptoren IL-12 (p70) und IL-17 stärker als die NCRs. Auffällig ist dabei, dass CD6⁺-NK-Zellen höhere Mengen an IL-12 (p70) und vor allem IL-17 (blau markiert) produzieren als dies für CD6⁻-NK-Zellen der Fall ist. Dieser Unterschied ist unabhängig von der Rezeptorstimulation in allen Ansätzen zu beobachten, am stärksten jedoch durch NKG2C. Bisher wurde die IL-17-Sekretion hauptsächlich für CD4⁺-T_H17-Zellen beschrieben, die dadurch die T_H1-Antwort verstärken und an Autoimmunreaktionen beteiligt sind (Weaver, Harrington et al. 2006). Die Beobachtung, dass auch NK-Zellen IL-17 produzieren können, eröffnet eine völlig neue Rolle dieser Effektorzellen als potentielle Regulatoren der Autoimmunität. Welche der beiden NK-Subpopulationen vermehrt Zytokine produziert, ist

nach diesen Ergebnissen also Zytokin-abhängig unterschiedlich und kann nicht verallgemeinert werden.

Neben diesen Zytokinen, die durch mehrere Rezeptoren induziert werden, gibt es auch Zytokine, deren Produktion hauptsächlich durch einen spezifischen Rezeptor vermittelt wird. Zur besseren Übersicht wurden diese rezeptorspezifischen Zytokine aus dem in Abb. 50 gezeigten Experiment in anderer Form dargestellt (Abb. 51). Die Produktion von IL-7, IL-10 und IL-17 wird vorrangig durch NKG2C in CD6⁺-NK-Zellen induziert, das Chemokin MCP-1 (CCL2) wird nach NKp30-Stimulation vorrangig von CD6⁻-NK-Zellen freigesetzt (Abb. 51).

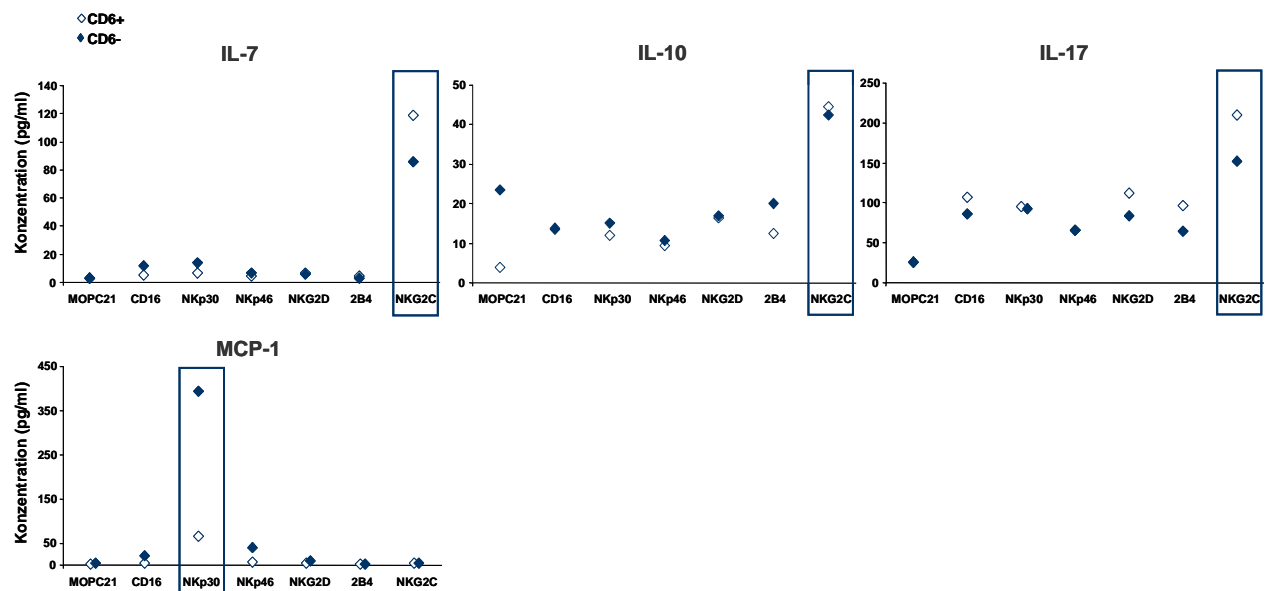


Abb. 51 Induktion von IL-7, IL-10, IL-17 und MCP-1 durch NKG2C- bzw. NKp30-Rezeptorsignale.

NK-Zellen (Spender #11), mit einer Reinheit von 97 % (CD3/CD56⁺), wurden nach Separation in CD6⁺- und CD6⁻-Fraktionen 96 h mit Platten-gekoppelten mAK (1 μ g/Ansatz) gegen aktivierende NK-Rezeptoren und mit 100 U/ml IL-2 stimuliert und die Zytokin/Chemokinfreisetzung im Zellkulturüberstand quantifiziert (pg/ml). Gezeigt ist eines von drei repräsentativen Experimenten.

Die in Abb. 51 dargestellte rezeptorspezifische Produktion von Zytokinen zeigt im Falle von NKG2C, dass der Rezeptor auf den NK-Zellen vorhanden und funktionell ist, und darüber hinaus, dass der experimentelle Ansatz nicht der Grund für die geringe Zytotoxizität ist (vgl. Abb. 49). Der Anteil CD94/NKG2C-positiver NK-Zellen in beiden Populationen (CD6⁺ und CD6⁻) konnte leider nicht bestimmt werden, da kein direkt markierter mAK zur Verfügung stand. NKG2C signalisiert durch Assoziation mit dem ITAM-tragenden DAP12-Molekül, und unterscheidet sich damit von den anderen hier untersuchten Rezeptoren, die ihre Signale über

CD3 ζ und Fc ϵ RI γ (CD16, NKp30 und NKp46), DAP10 (NKG2D) bzw. SAP (2B4) vermitteln.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation der einzelnen aktivierenden NK-Rezeptoren nicht zwangsläufig beide Effektorfunktionen gleichermaßen auslösen muss. Während bei Stimulation von CD16, NKp46, NKp30 beide Effektorfunktionen induziert werden, führt die Signaltransduktion bei Stimulation von 2B4 und NKG2C vorrangig zu einer Produktion von Zytokinen, u.a. IL-12 (p70), IL-17, IL-7 und IL-10.

Parallel zur Analyse der freigesetzten Zytokine/Chemokine wurde der Phänotyp der NK-Zellen nach 96-stündiger AK-Stimulation durchflusszytometrisch bestimmt, wobei sich ein Verlust der CD16-Expression zeigt (Tabelle 5), wie er bereits bei Degranulation nach Aktivierung durch HLA-Klasse-I-negative Zielzellen zu beobachten war (Abb. 43). Dabei ist diese CD16-Modulation vor allem bei Stimulation der NK-Zellen mit NKp46, NKp30 und NKG2D zu beobachten, so dass der Verlust an CD16-Oberflächenexpression direkt proportional zur Stärke der Degranulation zu sein scheint. Dagegen zeigt sich keine Korrelation zwischen der Freisetzung von Zytokinen und der CD16-Expression, da nach Stimulation von NKG2C keine Modulation von CD16 auftritt. Die Ausbildung der immunologischen Synapse, die für eine zielgerichtete Sekretion von Zytotoxinen und Zytokinen/Chemokinen nötig ist, scheint sich also in der Zusammensetzung der rekrutierten Moleküle zu unterscheiden. Die CD16-Expression auf NK-Zellen, die mit α CD16-Antikörper stimuliert wurden, konnte dabei nicht untersucht werden, da der Rezeptor durch die zur Stimulation benutzten Antikörper maskiert wurde.

Tabelle 5 CD16-Expression auf CD6⁺- und CD6⁻-NK-Zellen nach 96 h Stimulation der jeweiligen Rezeptoren mit spezifischen mAK

	CD6⁺-NK-Zellen	CD6⁻-NK-Zellen
mAK	% CD16-positiv	% CD16-positiv
α MOPC21 (Isotyp)	57	36
α NKp46	15,1	8
α NKp30	11	5,8
α NKG2D	27,9	13,6
α 2B4	32,7	28
α NKG2C	63	40

Die Rolle des CD6-Rezeptors für die NK-Effektorfunktionen

Um direkte CD6-Effekte zu untersuchen, wurden NK-Zellen mit Platten-gebundenem CD6-Antikörper stimuliert. Anschließend wurde die Degranulation nach 16 h (Abb. 52A) und parallel die Zytokinproduktion nach 48 h bestimmt (Abb. 52B), wobei die phänotypische Charakterisierung der NK-Zellen im Degranulationsversuch ergab, dass 95 % der NK-Zellen CD6⁺ waren. Neben dem CD6-Molekül wurde auch der Fc-Rezeptor CD16 durch Antikörper stimuliert, um mögliche Effekte des Fc-Rezeptors selbst quantifizieren zu können. In diesem Experiment waren die NK-Zellen nicht mit IL-2 vorstimuliert, sondern wurden nur während der 16 bzw. 48 h der Versuchsdauer in IL-2-haltigem Medium (100 U/ml) kultiviert, was die niedrige Degranulationsrate erklärt (Abb. 52A). Die Zytokin/Chemokin-Freisetzung hingegen war dadurch nicht beeinflusst (Abb. 52B).

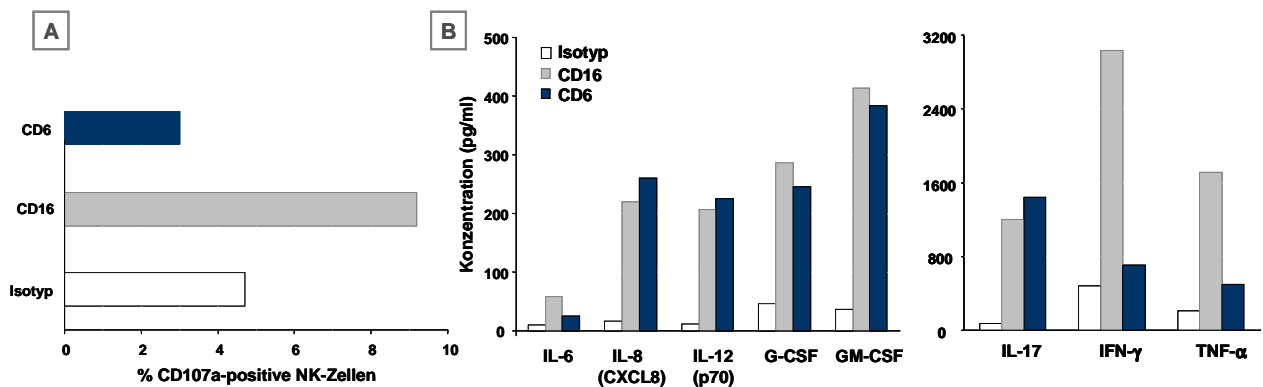


Abb. 52 Vergleich der CD6- und CD16-Stimulation in Bezug auf Degranulation und Zytokinproduktion frischer NK-Zellen.

A Frische NK-Zellen (Spender #8) wurden 16 h mit den entsprechenden Platten-gekoppelten mAK (1 μ g) und 100 U/ml IL-2 stimuliert und der prozentuale Anteil an CD107a⁺-Zellen bestimmt. **B** Die frischen NK-Zellen wurden mit entsprechenden mAK und 100 U/ml IL-2 48 h stimuliert und anschließend die Zytokine/Chemokine aus dem Überstand bestimmt (pg/ml). Die NK-Zellen, mit einer 96 %-igen Reinheit (CD3⁺/CD56⁺), waren zu 95 % CD6 positiv. Für die Zytokin/Chemokin-Bestimmung wurden 180.000 Zellen/Ansatz/200 μ l eingesetzt.

Die Stimulation von CD6 führt nicht zur Degranulation von frischen NK-Zellen (Abb. 52A), wobei auch in Experimenten mit IL-2-stimulierten NK-Zellen (48 h, 500 U/ml) spenderunabhängig nur eine geringe Degranulation nach CD6-Stimulation zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). Das spricht dafür, dass CD6 keine Funktion in der Vermittlung zytotoxischer Eigenschaften besitzt, was zu den bereits gezeigten Daten passt, die keine Korrelation der Degranulation und der CD6-Expression auf den CD56^{dim}-NK-Zellen zeigen konnten (Abb. 44 und Abb. 45). Im Gegensatz dazu induziert die CD6-Stimulation die Sekretion von IL-8, IL-12 (p70), G-CSF, GM-CSF und IL-17 vergleichbar zu CD16-Stimulation. Die Sekretion von IFN- γ und TNF- α wird dagegen durch CD6 weniger effizient ausgelöst (Abb. 52B).

Die Zytokine IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-13, MCP-1 und MIP-1 β liegen nicht über dem Niveau des Isotyps, werden also weder durch CD6 noch CD16 induziert, und sind daher hier nicht dargestellt (Daten nicht gezeigt). Die „negative Korrelation“ zwischen IFN- γ - und TNF- α -Freisetzung und Zytotoxizität, die bereits für die Rezeptoren 2B4 und NKG2C gezeigt wurde (Abb. 49, Abb. 50) gilt wohl auch für den CD6-Rezeptor. Diese drei Rezeptoren zeichnen sich dadurch aus, dass eine Aktivierung nur geringe Degranulation auslöst, aber dennoch zur Freisetzung von Zytokinen wie IL-12 (p70), IL-17, IL-10 und IL-7 führt, wobei die „klassischen“ NK-Zytokine IFN- γ oder TNF- α nicht, oder nur schwach sezerniert werden. Durch das hier erstmals definierte „nicht-klassische“ Zytokinmuster wird deutlich, dass CD56^{dim}-NK-Zellen ebenso zu einer Modulation der nachfolgenden Immunantwort beitragen können, und dass die Stärke der Zytokinfreisetzung maßgeblich von den individuell aktivierten Rezeptoren abhängig ist.

Beide NK-Subpopulationen, CD6⁺ und CD6⁻, sind gleichermaßen, abhängig von der Rezeptor-Stimulation, in der Lage ihre zytotoxischen Granula auszuschütten, und somit Zielzellen zu lysieren. Stimuliert man einzelne NK-Rezeptoren in Anwesenheit von IL-2, dann zeigt sich eine rezeptorabhängige Zytokin-Sekretion, die je nach Zytokin vermehrt durch CD6⁺- oder CD6⁻-NK-Zellen verursacht ist. Die Einteilung in zwei phänotypisch und funktionell unterschiedliche Subpopulationen muss darüber hinaus um T_H2- und T_H17-Zytokine erweitert werden. Die Produktion wird durch Rezeptoren vermittelt, deren Signalwege von den klassischen IFN- γ - und Degranulationswegen abgekoppelt sind.

2.2 Charakterisierung von Phänotyp und Funktion auf klonaler Ebene

Wie an den gemischten NK-Populationen deutlich abzulesen war, sind die Effektorfunktionen von NK-Zellen abhängig von dem Zusammenspiel zahlreicher Rezeptoren und somit auch von der jeweiligen „Stimulationsumgebung“. Um zu untersuchen ob es einen direkten Zusammenhang von Oberflächenexpression und Funktion einer individuellen NK-Zelle gibt, wurden NK-Klone aus der NK-Linie eines Spenders (#10) hergestellt und phänotypisch, sowie funktionell charakterisiert, wozu die NK-Klone durch mehrfache Restimulationen mit allogenen Zielzellen expandiert wurden. Um eine allogene Situation bezüglich der HLA-C- und KIR-Gruppen zu simulieren, wurde der NK-Zell-Spender so ausgewählt, dass seine HLA-C-Typisierung mit HLA-Cw*04 (K80) und HLA-Cw*07 (N80), C2/C1-heterozygot war, und

die allogenen Restimulationszellen (Spender #3) homozygot für HLA-Cw*04 (K80) und daher C2/C2 waren. Das bedeutet theoretisch, der „missing self“-Hypothese zu Folge, dass hier Spender-NK-Klone, welche die Expression des inhibitorischen KIR2DL1 (C2) zeigen, durch die Bindung des entsprechenden HLA-Cw*04-Moleküls inhibiert werden. KIR2DL3⁺-NK-Zellen finden dagegen kein passendes HLA-C1-Allel und werden dementsprechend nicht über KIR2DL3 gehemmt. Da NK-Zell-Spender und -Stimulator homozygot für das Bw6-Supraepitop sind, spielt der Bw4-spezifische Rezeptor KIR3DL1 in dieser Kombination keine Rolle (Abb. 53).

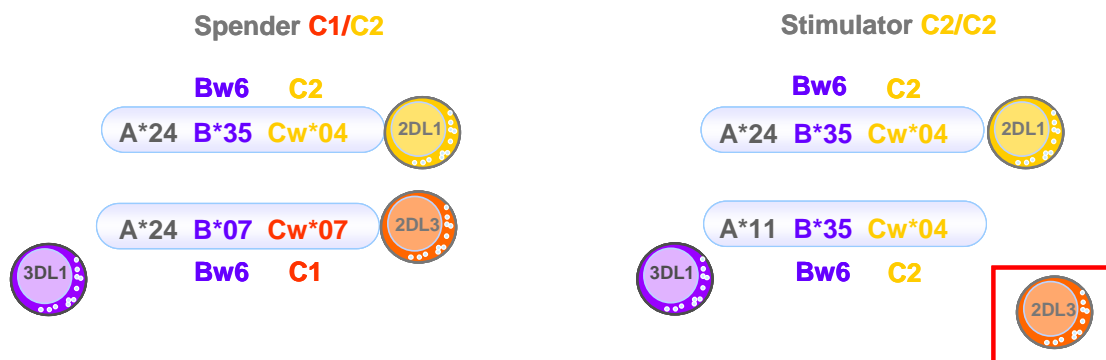


Abb. 53 Schematische Darstellung der allogenen HLA-Klasse-I- und KIR-Situation zwischen NK-Zell-Spender und -Stimulator bei der NK-Klonierung.

Die NK-Klone wurde aus NK-Zellen von Spender #10 hergestellt, der in Bezug auf die HLA-C-Allele heterozygot C1/C2 ist und homozygot für das Supraepitop Bw6. NK-Zellen welche die inhibitorischen KIR2DL1 und 2DL3 exprimieren, werden durch die entsprechenden HLA-C-Allele inhibiert. Bei Restimulation dieser NK-Klone mit Zellen von Spender #3, der homozygot C2/C2 ist, werden 2DL3⁺-NK-Zellen weniger gehemmt. Die Expression von 3DL1 hat in dieser allogenen Situation keine Relevanz, da beide Spender negativ für das entsprechende Supraepitop Bw4 sind.

Bei der NK-Klonierung konnten insgesamt 47 NK-Klone phänotypisch auf die Expression von 23 Markern untersucht werden (Abb. 54), wobei 28 dieser NK-Klone zusätzlich funktionell in Chromfreisetzungstests auf ihre zytotoxischen Eigenschaften (Abb. 55) und parallel auf die Produktion von 9 Zytokinen untersucht wurden, wobei diese Daten hier nur exemplarisch für 4 NK-Klone gezeigt sind (Abb. 56). In Abb. 54 sind die Ergebnisse der phänotypischen Analyse der 47 NK-Klone dargestellt und diese nach ihrer KIR-Expression eingeteilt. 32 Klone exprimieren mindestens einen KIR, wobei auf 5 Klonen zusätzlich der inhibitorische Rezeptor ILT2 (CD85j) nachweisbar war. Dem gegenüber sind 15 NK-Klone KIR-negativ und exprimieren dafür als inhibitorische Rezeptoren entweder ILT2 oder CD94/NKG2A.

KIR-positive Klone				KIR-negative Klone			
Anzahl der Klone N = 32	p58.1 KIR2DL/S 1	p58.2 KIR2DL 3	p70 KIR3DL 1	Anzahl der Klone N = 15	CD94/ NKG2A <u>oder</u> C	CD94/ NKG2A	CD94/ NKG2A <u>und</u> C
1 KIR (N = 27)	9	8	10	KIR-negativ	7 Klon D	7 Klon B	1 Klon C
1 KIR + ILT2 (N = 4)	1	1	2		ILT2-positiv	ILT2-negativ	
2 KIR + ILT2	1 Klon A						

Abb. 54 Zusammenfassung der phänotypischen Charakterisierung von 47 NK-Klonen.

Die NK-Klone (Spender #10) wurden durch mehrfache Restimulation mit PBMC eines zweiten Spenders (#3) expandiert. 32 der 47 Klone exprimieren dabei mindestens einen KIR, die KIR-negativen NK-Klone (n = 15) dafür entweder das inhibierende Heterodimer CD94/NKG2A oder ILT2. Alle NK-Klone exprimieren CD16, CD56, 2B4, NKG2D, NCRs, CD94, CD161, CD48 und HLA-Klasse-I. Dagegen sind alle Klone negativ für ILT3, CD25, p50.3, CD3. Die im Folgenden näher charakterisierten NK-Klone A-D sind den jeweiligen Gruppen in der Tabelle zugeordnet.

Bei der anschließenden funktionellen Analyse von 28 dieser 47 NK-Klone auf ihre zytotoxischen Eigenschaften hin (Abb. 55), zeigte sich deutlich, dass unabhängig von der KIR-Expression, einige NK-Klone die beiden HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen K-562 bzw. L721.221 lysieren konnten, andere NK-Klone besaßen hingegen kein zytotoxisches Potential. Dabei waren die Zytokinmuster, die nach 24 h Zielzellkontakt im Überstand nachgewiesen werden konnten, bei den zytotoxischen und den nicht-zytotoxischen NK-Klonen vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

Anzahl der Klone N = 28	Lyse von K-562 oder L721.221	Keine Lyse von K-562 oder L721.221	spezieller Phänotyp
KIR +	14	3 →	schwach NKp30/46, 2B4 ⁺⁺ / NKG2D ⁺⁺
KIR -	7	4 →	schwach NKp30/46, 2B4 ⁺⁺ / NKG2D ⁺⁺

Abb. 55 Charakterisierung der zytotoxischen Eigenschaften von 28 NK-Klonen gegen HLA-Klasse-I-negative Zielzellen.

28 NK-Klone, darunter 17 KIR-positive und 11 KIR-negative Klone, wurden in vergleichbarer Effektor/Zielzellratio auf ihr zytotoxisches Potential in Chromfreisetzungstests gegen die HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen K-562 und L721.221 hin untersucht. Dabei gab es zytotoxische und nicht-zytotoxische NK-Klone in beiden KIR-Gruppen. Die nicht-zytotoxischen NK-Klone zeigten, unabhängig von ihrer KIR-Expression, eine schwächere Expression der NCRs NKp30 und NKp46 im Vergleich zu den zytotoxischen Klonen. Die Expression von NKG2D und 2B4 (CD244) war bei allen NK-Klonen vergleichbar.

Auffällig war vor allem die deutlich schwächere Expression der NCRs, NKp30 und NKp46, auf denjenigen NK-Klonen, die kein zytotoxisches Potential zeigten, wobei die Expression der anderen aktivierenden Rezeptoren wie NKG2D und 2B4 vergleichbar war (Daten nicht gezeigt). Die detaillierte funktionelle und phänotypische Analyse ist exemplarisch an vier repräsentativen NK-Klonen (A – D) aus verschiedenen Gruppen aus Abb. 54 dargestellt. Die Expression der wichtigsten NK-Marker auf den vier NK-Klonen ist in Tabelle 6 zusammengefasst, die funktionelle Charakterisierung ist in Abb. 56 dargestellt.

Tabelle 6 Rezeptorexpression von vier repräsentativen NK-Klonen (A - D).

Rezeptor	Klon A	Klon B	Klon C	Klon D
CD56	+++	+++	+++	+
CD16	+	+	+	+
CD6	-	-	-	(+)
CD94	+	+	+	(+)
NKG2A	+++	+	++	-
NKG2C	-	-	+	(+)
NKG2D	+	+	++	++
2B4 (CD244)	++	++	++	++
p58.1 (KIR2DL1)	+	-	-	-
p58.2 (KIR2DL3)	+	-	-	-
p70 (KIR3DL1)	-	-	-	-
KIR2DL4	+	(+)	(+)	-
ILT2 (CD85j)	+	-	-	++
Nkp30	++	+	++	(+)
Nkp44	+	+	++	+
NKp46	++	+	++	(+)
CD161	+++	+	++	++
CD45RA	-	-	-	+

+++ , ++ , + und (+) zeigen die relative Expression (MFI) des Markers in absteigender Stärke an; - Marker wird nicht exprimiert.

Klon A besitzt zwei KIR-Rezeptoren (Tabelle 6, blau) sowie CD94/NKG2A (grün) und weist im Vergleich zu Klon B und D eine höhere NCR-Expression auf (Tabelle 6, grau). Klon B und C sind dagegen negativ für KIR, wobei beide dafür das inhibitorische Heterodimer CD94/NKG2A exprimieren (grün). NK-Klon D besitzt weder KIR noch CD94/NKG2A, müsste also theoretisch einen nicht-reaktiven Zustand besitzen um „Selbsttoleranz“ zu gewährleisten. Mit diesen NK-Klonen wurden funktionelle Tests bzgl. der zytotoxischen Eigenschaften gegen HLA-Klasse-I-negative Zielzellen und entsprechende HLA-Transfektanten, sowie bzgl. der Zytokin-Sekretion im Kulturüberstand nach 24 h Restimulation durchgeführt (Abb. 56).

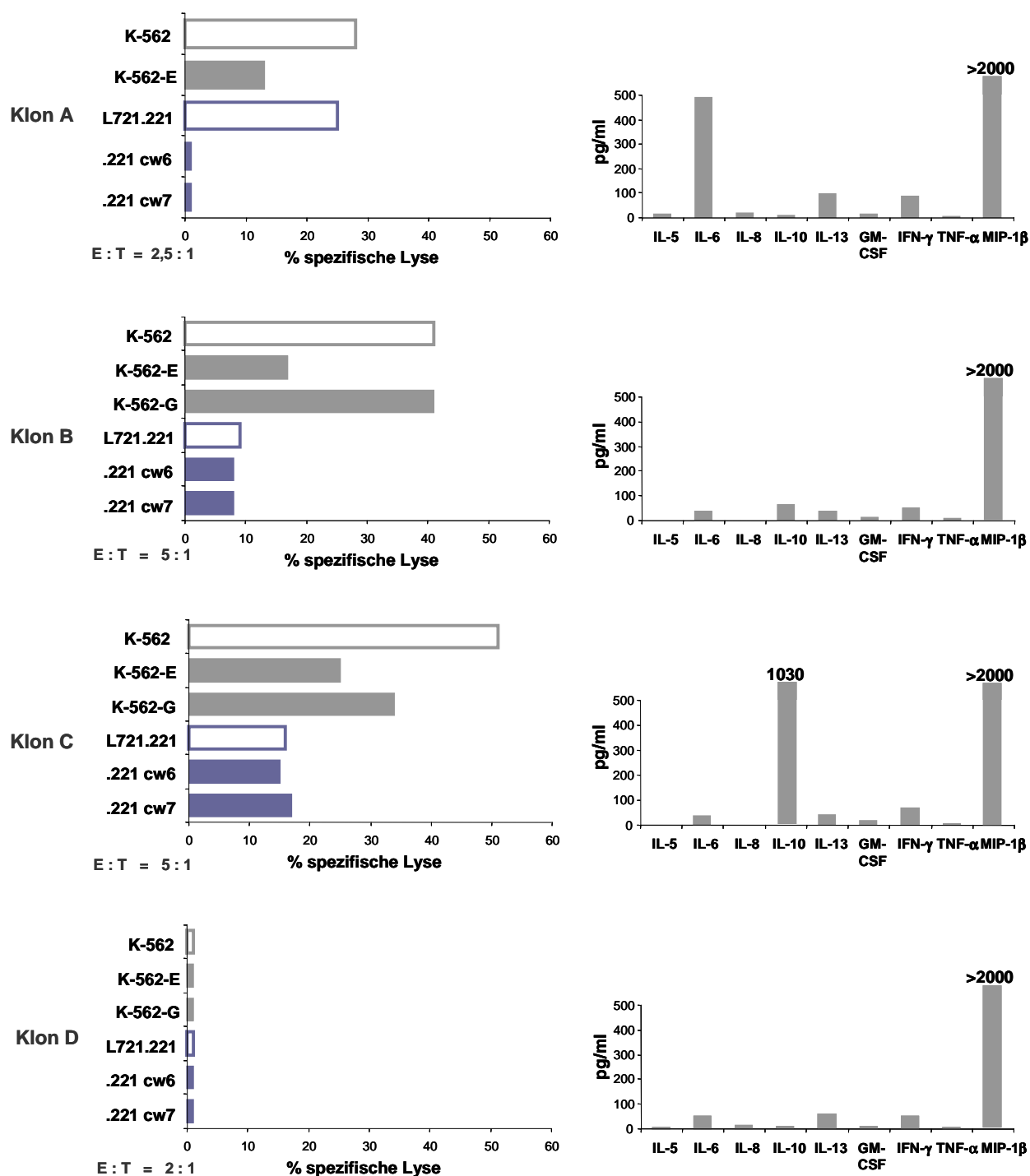


Abb. 56 Funktionelle Charakterisierung von vier repräsentativen NK-Klonen (A - D) im Bezug auf Zytotoxizität und Zytokinfreisetzung.

Gezeigt ist die spezifische Lyse von HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen und entsprechenden HLA-Klasse-I-Transfektanten im Chromfreisetzungstest. Daneben ist die Zytokinsekretion der NK-Klone 24 h nach Restimulation mit allogenen Stimulatorzellen dargestellt. MIP-1 β wurde konstitutiv von allen NK-Klonen über dem exakt quantifizierbaren Niveau sezerniert, wobei die Zellzahl der NK-Klone dabei unter 30.000 Zellen pro Ansatz lag.

NK-Klon A ist der einzige der vier Klone, der KIR exprimiert, nämlich KIR2DL1 und KIR2DL3 (Tabelle 6), weswegen die Expression von HLA-Cw*06 und HLA-Cw*07 auf der

HLA-Klasse-I-negativen Zielzelle L721.221 zu einer Hemmung der Zytotoxizität führt. Auch die Expression von CD94/NKG2A auf Klon A besitzt inhibitorische Funktion, da die Lyse der HLA-E-Transfektante im Vergleich zur HLA-Klasse-I-negativen K-562-Zelle vermindert ist. Nach 24-stündiger Restimulation sezerniert Klon A IL-6, IL-13, IFN- γ und, wie alle Klone, MIP-1 β . Klon B und C sind beide KIR-negativ, aber besitzen sonst einen vergleichbaren Phänotyp zu NK-Klon A, wobei beide das inhibitorische Heterodimer CD94/NKG2A exprimieren (Tabelle 6), weshalb sie ebenfalls durch die HLA-E-Transfektante abgeschaltet werden. NK-Klon C besitzt interessanterweise neben NKG2A auch das aktivierende NKG2C, das aber in dieser Situation durch das inhibierende Signal von NKG2A „überstimmt“ wird. Da keine KIR für die HLA-C-Gruppen C1 und C2 vorhanden sind, werden beide NK-Klone B und C nicht durch Expression der entsprechenden HLA-C-Allele auf L721.221 inhibiert. Die Expression von HLA-G in der K-562-G-Transfektante führt nur bei Klon C, nicht aber bei Klon B zu einer verminderten Lyse. Beide Klone zeigen eine schwache KIR2DL4-Expression (Tabelle 6, gelb), dem Rezeptor für HLA-G, wobei diese nur für Klon C eine funktionelle Relevanz zu besitzen scheint. Klon C besitzt außerdem im Vergleich zu Klon B eine höhere Expression von NKp30, NKp44 und NKp46 (Tabelle 6, grau), was auch in einer höheren Zytotoxizität gegen die HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen zu sehen ist. Beide Klone, B und C, zeigen einen vergleichbaren Phänotyp und auch zytotoxische Eigenschaften, dennoch produziert Klon C mehr als das 10-fache des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10. Diese IL-10-Produktion stellt eine Besonderheit dar, da sie in der Literatur selten auf klonaler Ebene gezeigt werden konnte. Beide NK-Klone, B und C, sezernieren MIP-1 β , IFN- γ und geringe Mengen an IL-6 und IL-13. Klon D ist sowohl negativ für KIR, als auch für CD94/NKG2A, besitzt somit außer ILT2 keinen inhibierenden Rezeptor für HLA-Klasse-I-Moleküle und sollte deshalb, um die „Selbsttoleranz“ aufrechtzuerhalten, einen Zustand der Nicht-Reaktivität besitzen. Das trifft auf die zytotoxischen Eigenschaften zu, da dieser Klon keine Zielzell-Lyse auslöst (Abb. 56). Dagegen kann er aber Zytokine, nämlich MIP-1 β , IFN- γ , IL-6 und IL-13, produzieren und zeigt damit ein ähnliches Zytokinmuster wie Klon B. Diese vier NK-Klone belegen deutlich, dass der Phänotyp keine klare, voraussagbare Zuordnung zu einer bestimmten Effektorfunktion zulässt. NK-Zellen sind darüber hinaus mehr als nur Killerzellen, da sie durch ihrer Zytokinproduktion auch indirekte Regulatoren der Immunantwort sind. Im Bezug auf die zytotoxischen Eigenschaften zeigt sich eine Korrelation zwischen NCR-Expressionsstärke, der KIR- bzw. NKG2A-Expression und der Stärke der Zielzelllyse. Dies trifft aber nicht auf die Fähigkeit zu Zytokine zu produzieren.

F Diskussion

1 Einfluss von onkogenem MAPK-Signalweg und DNMT-Aktivität auf Proliferation und Immunerkennung von Kolon-Karzinom-Zellen

Neben den Kolon-Karzinomen zeichnen sich mehrere Tumorentitäten, wie z.B. das Melanom oder Ovarial- und Pankreas-Karzinom, durch RAS- oder Raf-Mutationen aus und sind deshalb Ziel therapeutischer Ansätze mit MAPK-Inhibitoren. Einer der klinisch am häufigsten eingesetzten MAPK-Inhibitoren ist dabei Sorafenib (Nexavar), das je nach Tumorentität zu Ansprechraten von bis zu 30 % führen kann (Schreck and Rapp 2006). Bei anderen Tumoren, wie z.B. dem Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, wird jedoch keine Wirkung erzielt. Die Gründe für diese enorme Variabilität sind unzureichend verstanden, weshalb eine detaillierte Analyse der onkogenen Signalwege notwendig ist. In dieser Arbeit wurde neben den reinen MAPK-Signaltransduktionseffekten der Zusammenhang zwischen MAPK-Inhibition und DNS-Methylierung untersucht und bzgl. immunologischer Nebenwirkungen auf die ZTL- oder NK-Erkennung charakterisiert.

1.1 Beteiligung onkogener K-RAS-Signale an der Apoptose-Resistenz durch Aktivierung der MEK/ERK- und PI3K-Signalwege

In der Kolon-Karzinom-Zelllinie HCT116 ist durch die Mutation in *K-RAS* (G13D) der nachfolgende MEK/ERK-(MAPK)-Signalweg konstitutiv aktiviert, was in dieser Arbeit durch den Nachweis der permanent starken Phosphorylierung der Kinasen MEK1 und ERK1/2 unter serumhaltigen Kulturbedingungen gezeigt wurde (Abb. 28, Abb. 30 und Abb. 31). Diese Aktivierung bleibt auch nach dem fast vollständigen Verlust der DNS-Methylierung in den HCT116DKO-Zellen erhalten, wobei der wachstumsfördernde Effekt des konstitutiven MAPK-Weges in Abwesenheit der DNMT1 und 3b aufgehoben wird, da die HCT116DKO-Zellen eine stark verringerte Proliferationsrate besitzen (Abb. 19). Der Haupteffekt einer konstitutiven MAPK-Aktivierung scheint das Überleben der Zellen und die ungehemmte Proliferation zu sein, da Inhibition dieses Signalweges durch den spezifischen MEK1/2-Inhibitor U0126 bzw. den B-Raf-Inhibitor Sorafenib zu einer verminderten Proliferation bzw. zu einem Absterben der Zellen führte, wobei diese Effekte Konzentrations- und Zeit-abhängig waren. Dabei zeigte sich bei Untersuchung der Komponenten wichtiger Signalwege, dass eine Behandlung der HCT116wt- und DKO-Zellen mit beiden Inhibitoren neben dem MEK/ERK-

Signalweg in einigen Signalkaskaden zu Veränderungen führte, wohingegen andere Signalwege nicht beeinflusst wurden. Die in dieser Arbeit analysierten Signalkomponenten sind in Abb. 57 unter Angabe der untersuchten Phosphorylierungsstellen dargestellt. Proteine, die durch die Inhibitoren eine Veränderung der Phosphorylierung oder des Gesamt-Protein-Gehalts zeigten, sind durch verschieden-farbige Sterne markiert.

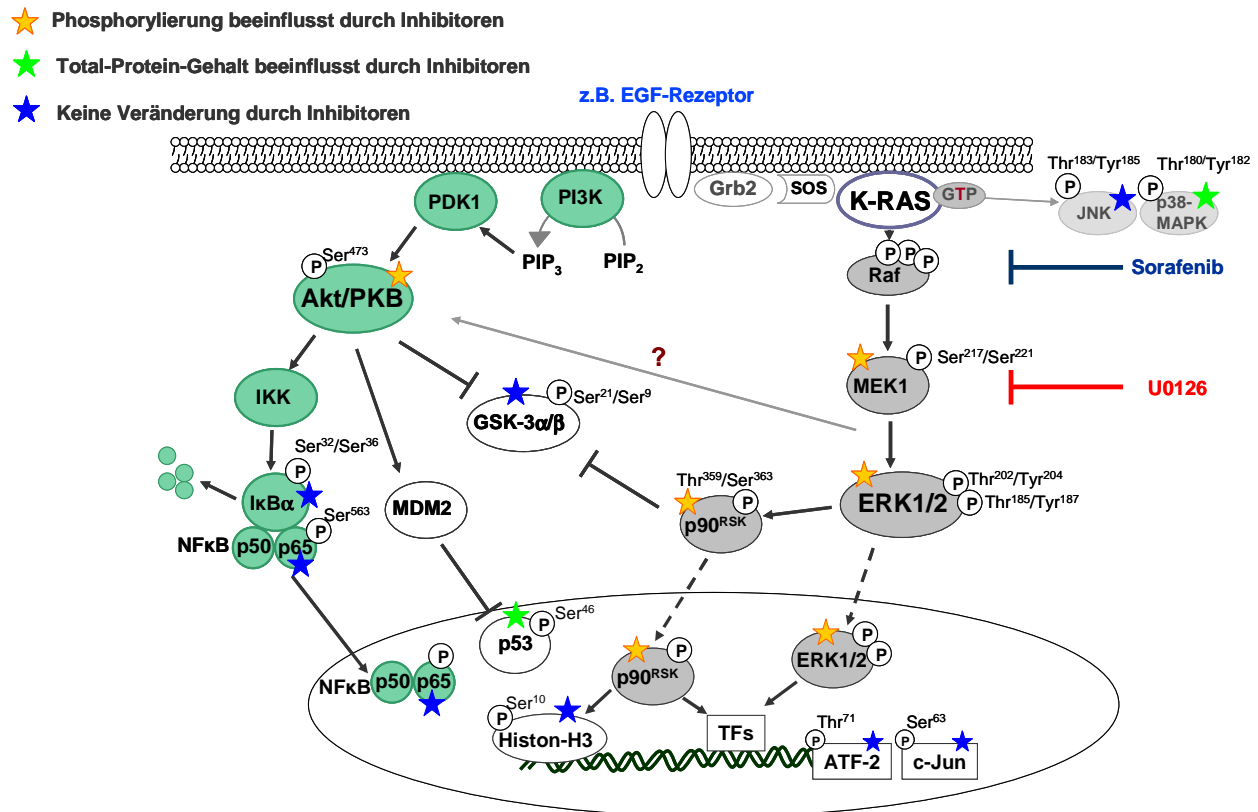


Abb. 57 Schematische, stark vereinfachte Darstellung des K-RAS-regulierten MEK/ERK- und PI3K-Signalweges und der durch U0126- bzw. Sorafenib-Behandlung bedingten Veränderungen in HCT116-Zellen. HCT116-Zellen weisen eine aktivierende Mutation in K-RAS (G13D) auf, die zu einer konstitutiven Aktivierung der MEK/ERK-Kaskade führt. Dabei kann dieses Signal durch Bindung von z.B. Serum-Proteinen an die entsprechenden Rezeptoren noch gesteigert werden. Alle Komponenten wurden sowohl auf ihren Gesamt-Protein-Gehalt, als auch auf ihre Phosphorylierung hin analysiert, wobei die Phosphorylierungsstellen angegeben sind. Der Effekt der U0126- bzw. Sorafenib-Behandlung auf die Proteine ist durch farbige Sterne dargestellt, wobei orange eine Änderung der Phosphorylierung, grün eine Änderung des Protein-Gehalts und blau keine Veränderung durch Inhibitor-Zugabe angibt. Eine Behandlung der Zellen mit dem MEK-Inhibitor U0126 bzw. dem B-Raf-Inhibitor Sorafenib führt zu einer drastischen Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung, was sich auch in der Dephosphorylierung der nachfolgenden p90^{RSK}-Kinase zeigt. Ebenso zeigt die Akt-Kinase eine Reduktion der Phosphorylierung durch Inhibitor-Behandlung in HCT116wt-Zellen, so dass eine Querverbindung zwischen MEK/ERK- und PI3K-Signalweg zu existieren scheint. Eine Änderung im Gesamt-Protein-Gehalt wurde für die p38-MAPK und p53 beobachtet. Die Inhibitor-Behandlung zeigte keinen Effekt auf JNK, IκBα, NFκB-p65, Histon-H3 und GSK-3α/β, sowie die Transkriptionsfaktoren ATF-2 und c-Jun.

Beide Inhibitoren zeigten eine vergleichbare Wirkung auf die Aktivierung der Signalproteine, wobei die geringen Unterschiede in der Kinetik und Effektivität der Inhibitoren möglicherweise die unterschiedlichen Effekte auf die Proliferations- und Überlebensrate der

HCT116-Zellen erklären. Die Behandlung der Zellen führte bei beiden Inhibitoren, im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, zu einer drastischen Hemmung der ERK1/2-Phosphorylierung, wobei diese Hemmung durch unterschiedliche Effekte der Inhibitoren auf die MEK1-Kinase verursacht wurde. Eine U0126-Behandlung resultierte in einer Stabilisierung der phosphorylierten MEK-Form, wohingegen die Sorafenib-Behandlung zu einem Verlust der MEK-Phosphorylierung führte. Da U0126 unabhängig von der Phosphorylierung direkt an die MEK1-Kinase bindet und deren Aktivität hemmt, scheint diese Bindung das MEK-Protein in seiner phosphorylierten Form zu stabilisieren. Sorafenib dagegen verhindert durch Hemmung der B-Raf-Kinase die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von MEK1. Die Dephosphorylierung der ERK1/2-Kinasen nach Inhibitor-Behandlung führt zu einer Hemmung der nachgeschalteten p90^{RSK}-Kinase, was sich in einer verminderten Phosphorylierung dieser Kinase im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zeigte (Abb. 30, Abb. 31). Studien an Melanom-Zelllinien konnten zeigen, dass die p90^{RSK}-Inhibition einen entscheidenden Aspekt der pro-apoptotischen Eigenschaften der MEK-Inhibition darstellt, da die Dephosphorylierung mit einer Aktivierung des pro-apoptotischen Bcl-2-Familien-Mitglieds Bad einhergeht (Eisenmann, VanBrocklin et al. 2003, Panka, Wang et al. 2006). Bad bindet nach Translokation in die Mitochondrien an die anti-apoptotischen Bcl-2- und Bcl-X_L-Proteine und verhindert so die Bildung inhibitorischer Heterodimere mit den pro-apoptotischen Bcl-2-Familien-Mitgliedern Bak und Bax (Borner 2003, Cartron, Gallenne et al. 2004, Kaufmann, Schinzel et al. 2004). Andere Studien zeigen, dass die Stabilität des Mcl-1-Proteins und die Expression anderer Bcl-2-Proteine von einer ERK-vermittelten Phosphorylierung abhängen, so dass eine Inhibition der ERK-Signale auch direkt Einfluss auf Apoptose-regulierende Proteine nehmen kann (Boucher, Morisset et al. 2000, Domina, Smith et al. 2000, Milella, Kornblau et al. 2001, Meng, Chandra et al. 2003, Domina, Vrana et al. 2004). Weitere Untersuchungen zeigen einen proteasomalen Abbau des anti-apoptotischen Mcl-1 nach 6-stündiger Sorafenib-Behandlung, wohingegen eine U0126-Behandlung trotz ERK-Hemmung auch nach 12 h nicht zu einem Abbau führt (Yu, Bruzek et al. 2005). Daher existiert wohl auch ein zusätzlicher ERK-unabhängiger Effekt, der möglicherweise auch die in meiner Arbeit beobachtete, schwächere und zeitverzögerte, Apoptose-Induktion durch U0126 im Vergleich zu Sorafenib in den Kolon-Karzinom-Zelllinien erklären kann.

Die konstitutive Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges stellt somit einen wichtigen Faktor für das Überleben und das unkontrollierte Wachstum der Kolon-Karzinom-Zellen dar. Das konnte kürzlich auch in einer Studie an Brustkrebs-Zelllinien gezeigt werden, da eine

Resistenzentwicklung gegen das DNS-schädigende, Apoptose-induzierende, Cisplatin von einer gesteigerten EGF-Rezeptor-Phosphorylierung und damit auch Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges begleitet war (Eckstein, Servan et al. 2008). Dabei zeigten die nach 6 Monaten Behandlung resistenten Tumorzellen eine gesteigerte Expression von Amphiregulin, einem endogenen Liganden des EGF-Rezeptors. Dies weist auf eine essentielle Bedeutung des MEK/ERK-Signalweges für das Überleben bestimmter Tumorzellen hin, da bei fehlender Mutation von K-RAS bzw. B-Raf ein „alternativer“ Weg zur konstitutiven Aktivierung, nämlich die Überexpression eines endogenen Liganden (Amphiregulin), eingeschlagen wird. Neben einer Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges war auch die Aktivität der PI3K-aktivierten Kinase Akt1 in diesen Apoptose-resistenten Brustkrebszellen gesteigert, was durch die Rekrutierung von PI3K über das „docking“-Protein GAB1 an den aktivierten EGF-Rezeptor zu erklären ist (Mattoon, Lamothe et al. 2004). Neben vielen anderen Effekten induziert Akt den Kerntransport von MDM2 und ermöglicht somit den Abbau von p53, was die Apoptose verhindert, da p53 unter anderem an das anti-apoptotische Bcl-2 binden und dessen Aktivität hemmen kann, und zugleich ein negativer Regulator der Bcl-2-Expression ist (Wu, Mehew et al. 2001, Zhou, Liao et al. 2001, Tomita, Marchenko et al. 2006). In meiner Arbeit konnte auch in der Kolon-Karzinom-Zelllinie HCT116wt eine MEK/ERK-abhängige Aktivierung von Akt gezeigt werden, da der beobachtete Anstieg der Akt-Phosphorylierung im Laufe einer 96 h-Kultivierung in der DMSO-Kontrolle durch die Behandlung der Zellen mit dem MEK-Inhibitor U0126 bzw. dem B-Raf-Inhibitor Sorafenib verringert wurde (Abb. 65). Die kurzfristige Stabilisierung des p53-Proteins in den Inhibitor-behandelten HCT116wt-Zellen stellt möglicherweise eine Folge der Akt-Inhibition und der daraus resultierenden verminderten Kernlokalisierung von MDM2 dar. Die p53-Stabilisierung fällt in den HCT116DKO geringer aus, was möglicherweise durch den weniger ausgeprägten Effekt der Inhibitoren auf die Akt-Aktivierung erklärt werden kann (Abb. 34, Abb. 65). Die p53-Expression kann auch direkt durch ERK1/2 reguliert sein, da die ERK-aktivierten Transkriptionsfaktoren AP-1 und Ets an den MDM2-Promotor binden und die Expression steigern (Ries, Biederer et al. 2000). Die Dephosphorylierung von ERK1/2 nach Inhibitor-Behandlung führt also zu verminderter MDM2-Expression und kann somit zusätzlich zu einer p53-Stabilisierung führen. p53 unterliegt einem negativen Regulationsmechanismus, da es an den MDM2-Promotor bindet und damit dessen Expression und seine eigene Degradation fördert. Dies könnte den von mir beobachteten p53-Verlust in HCT116wt- und DKO-Zellen erklären, der nach 48 h der Behandlung einsetzt (Abb. 34). Dabei ist die Phosphorylierung von p53 an Serin⁴⁶ in den HCT116-Zellen sehr gering und zeigt keine deutlichen

Veränderungen unter Inhibitor-Behandlung. Mayo et al. konnten zeigen, dass die Stärke der Serin⁴⁶-Phosphorylierung die Promotorspezifität von p53 beeinflusst (Mayo, Seo et al. 2005). Bei geringer Phosphorylierung von p53, wie es in den HCT116-Zellen der Fall ist, bindet p53 bevorzugt an den MDM2-Promotor und fördert so seinen eigenen Abbau.

Im Gegensatz zum MEK/ERK-Signalweg sind die Stress-induzierbaren Signalkaskaden, wie die p38-MAPK-Kaskade und der JNK-Signalweg, die u.a. durch pro-inflammatorische Zytokine, UV-Bestrahlung, aber auch DNS-Schäden aktiviert werden, in den HCT116wt- und DKO-Zellen nicht, oder nur auf geringem Niveau aktiviert. Die Inhibition des MEK/ERK-Signalweges hat keine Veränderung der Phosphorylierung dieser beiden Kinasen zur Folge, so dass in diesen Zellen wohl keine direkte Querverbindung zwischen diesen Signalwegen besteht (Abb. 64). Auch in den Cisplatin-resistenten Brustkrebszellen korreliert die Apoptose-Resistenz nicht mit einer Aktivierung der p38-MAPK- bzw. JNK-Kaskade (Eckstein, Servan et al. 2008), so dass die MEK/ERK- und Akt-Aktivierung weniger zelltypabhängig, sondern einen allgemeineren Mechanismus der Apoptose-Resistenz in Tumorzellen darzustellen scheint. Die Induktion der Apoptose-Resistenz durch eine konstitutive Aktivierung des MEK/ERK- und Akt-Signalweges stellt daher ein wichtiges therapeutisches Ziel dar, und die in meiner Arbeit gezeigten Auswirkungen der Sorafenib bzw. U0126-Behandlung zeigen deutlich das Potential dieser Substanzen, beide Signalwege zu hemmen. Dabei ist vor allem die trotz verschiedener Zelltypen einheitliche Einbindung unterschiedlicher Signalwege hervorzuheben, die eine Apoptose-Induktion durch Inhibitoren des MEK/ERK-Weges in vielen Tumoren möglich machen kann.

Für den p38-MAPK-Abbau in HCT116-Zellen nach Inhibitor-Behandlung (Abb. 32), vor allem durch Sorafenib, sind theoretisch zwei Mechanismen vorstellbar, nachdem in dieser Arbeit ein Caspase-abhängiger Abbau durch Anwendung des allgemeinen Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK ausgeschlossen werden konnte (Abb. 33). Zum einen kann, wie bei dem bereits beschriebenen Mcl-1 Protein, ein proteasomaler Abbau erfolgen, wobei die Mechanismen noch nicht eindeutig geklärt sind (Yu, Bruzek et al. 2005). Zum anderen wurde für die Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) RET ein lysosomaler Abbau in Melanom-Zelllinien beschrieben, der wahrscheinlich durch direkte Bindung von Sorafenib an RET und die damit einhergehende Konformationsänderung und Inaktivierung verursacht wird (Plaza-Menacho, Mologni et al. 2007). Rezeptor-Tyrosin-Kinasen zirkulieren ständig zwischen der Oberfläche und den Endosomen, und werden entweder an die Oberfläche zurücktransportiert oder in Lysosomen degradiert (Le Roy and Wrana 2005). Die durch Sorafenib verursachte Konformationsänderung scheint das Gleichgewicht hin zu einer schnelleren Degradation zu

verschieben (Plaza-Menacho, Mologni et al. 2007). Durch welche Mechanismen der Abbau der p38-MAP-Kinase in den HCT116-Zellen stattfindet, wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht, da der p38-MAPK-Weg in den Kolon-Karzinom-Zellen weniger eine Rolle zu spielen scheint, was durch das konstitutiv niedrige Aktivierungs-Niveau zum Ausdruck kommt (Daten nicht gezeigt).

1.2 Auswirkungen des konstitutiv aktiven MEK/ERK-Weges und der DNMT-Aktivität auf die Expression von HLA-Klasse-I und ULBP2

Der onkogene Signalweg in Kolon-Karzinom-Zellen trägt nicht nur zur unkontrollierten Proliferation bei, sondern beeinflusst auch die Oberflächenexpression von immunrelevanten Molekülen. Dabei konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die veränderte Oberflächenexpression von HLA-A2 und ULBP2, einem von sechs NKG2D-Liganden, Einfluss auf die Immunerkennung der Tumorzellen durch ZTL und NK-Zellen hat.

Für HLA-A und ULBP2 konnte in meiner Arbeit die gleichzeitige Suppression der Oberflächenexpression durch DNS-Methylierung und onkogenes MEK/ERK-Signal in Kolon-Karzinom-Zellen gezeigt werden, was in Zusammenarbeit mit C. Sers und R. Kuner für HLA-A1 und -A2 auch auf mRNA-Niveau bestätigt werden konnte. Dabei ist die HLA-Klasse-I-Expression durch eine synergistische Interaktion von DNMT-Aktivität und MAPK-Signal in HCT116wt-Zellen vermindert, da die Expression in den DNMT-Deletions-Varianten HCT116/1^{-/-} und HCT116DKO bereits ohne Inhibitorbehandlung erhöht war (Abb. 16), und durch MEK/ERK-Inhibition mittels U0126 nochmals gesteigert werden konnte (Abb. 20). Dabei scheint die DNMT3b keine entscheidende Rolle zu spielen, da ihr Verlust in der HCT116/3b^{-/-} keine gesteigerte Expression von HLA-Klasse-I nach sich zog. Der geringere Effekt der DNMT1-Deletion im Vergleich zur Deletion beider DNMT-Aktivitäten in den DKO-Zellen erklärt sich möglicherweise durch die in HCT116/1^{-/-}-Zellen vorhandene DNMT1-Restaktivität, die trotz einer Deletion der Exons 3 - 5 durch homologe Rekombination kürzlich gezeigt werden konnte (Rhee, Jair et al. 2000, Egger, Jeong et al. 2006, Spada, Haemmer et al. 2007)(C. Sers). In HCT116/1^{-/-}- und DKO-Zellen findet ein alternativer Spleißvorgang statt, der zu einer Expression von verkürztem DNMT1-Protein führt, das keine PCNA-(*proliferating cell nuclear antigen*)-Bindedomäne mehr besitzt. Die verkürzte DNMT1 ist dennoch im Kern lokalisiert und zu einer post-replikativen Methylierung der DNS fähig, was die Aufrechterhaltung von ca. 80 % der DNS-Methylierung in HCT116/1^{-/-}-Zellen erklärt (Spada, Haemmer et al. 2007). Dabei besitzt die DKO zwar auch diese hypomorphe DNMT1-Aktivität, aber in Kombination mit einer homozygoten

DNMT3b-Deletion findet ein fast vollständiger Verlust der DNS-Methylierung statt, was auch in murinen Modellen gezeigt werden konnte (Gaudet, Hodgson et al. 2003). Die methylierungsabhängige Steigerung der HLA-Expression ist dabei indirekter Natur, da wir in Zusammenarbeit mit C. Sers zeigen konnten, dass die HLA-A1 bzw. -A2-Promotoren bereits in HCT116wt-Zellen unmethyliert vorliegen (Anhang, Abb. 62). Die erhöhte Oberflächenexpression von HLA-Klasse-I nach DNMT-Verlust bzw. MEK-Inhibition hängt nicht nur von der erhöhten Expression der schweren Kette ab, sondern ist auch durch die gesteigerte Expression der TAP1/2-Transporter, Tapasin und den Immunproteasom-Untereinheiten LMP2/7 zu erklären, was auf mRNA-Ebene bereits gezeigt wurde (R. Kuner, DKFZ) und derzeit in Berlin auf Protein-Niveau untersucht wird. Eine epigenetische Regulation der HLA-Klasse-I-Expression konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden, wobei die Inhibition der DNS-Methylierung durch 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-C) aber auch die Hemmung der Histon-Deacetylasen zu einer gesteigerten Expression der HLA-Klasse-I schweren Kette bzw. der APM-Komponenten wie TAP1/2 und LMP2/7 führte (Nie, Yang et al. 2001, Fonsatti, Nicolay et al. 2007, Khan, Gregorie et al. 2008, Manning, Indrova et al. 2008). Die in dieser Arbeit untersuchte HLA-Klasse-I-Regulation durch Interaktion onkogener RAS-Signale mit der DNMT-Aktivität in Kolon-Karzinom-Zellen erweitert die bereits bestehenden Daten zur Korrelation zwischen K-RAS-Mutation und dem Verlust von TAP1, LMP2 und Tapasin-Expression in Kolon-Karzinomen (Atkins, Breuckmann et al. 2004). Die HLA-Klasse-I-Expression wurde sowohl in HCT116DKO-Zellen als auch in 5-Aza-C-behandelten SW480-Zellen durch die gleichzeitige Inhibition des MAPK-Signalweges noch gesteigert (Abb. 20, Abb. 25).

NK-Zellen sind ebenso wie T-Zellen an der Tumor-Abwehr beteiligt, wobei auch NK-Zellen ein aktivierendes Signal benötigen, um ihre Effektorfunktionen ausüben zu können. Hierbei spielt neben den NCRs vor allem der aktivierende NK-Rezeptor NKG2D eine entscheidende Rolle, da er die, auf vielen transformierten und Virus-infizierten Zellen exprimierten, MICA/B- und ULBP1-4-Moleküle, erkennt. Der Fokus meiner Arbeit lag dabei auf ULBP2, da nur bei diesem NKG2D-Liganden in den HCT116-Zellen eine einheitliche Regulation durch MAPK-Signale und DNMT-Aktivität beobachtet werden konnte. Wie in Abb. 17 gezeigt, werden nicht alle Liganden durch den Verlust der DNMT-Aktivität in den DKO-Zellen in ihrer Oberflächenexpression gesteigert. Für ULBP2 und ULBP3 konnte dies durch Promotor-Analysen bestätigt werden, da nur der ULBP2-Promotor eine DNS-Methylierung in den HCT116wt-Zellen zeigt (Anhang, Abb. 63). Dass diese methylierungsabhängige ULBP2-Regulation nicht zellspezifisch ist, zeigt die 5-Aza-C-vermittelte Steigerung der ULBP2-

Expression in der Kolon-Karzinom-Zelllinie SW480 (Abb. 25). Wie bereits für HLA-Klasse-I-Moleküle gezeigt, führt der gleichzeitige Verlust von DNS-Methylierung und konstitutivem MEK/ERK-Signal durch Inhibitor-Behandlung auch bei ULBP2 zu einer zusätzlichen Steigerung der Expression. Dabei konnte hier durch detaillierte Promotor-Analysen in Zusammenarbeit mit C. Sers eine direkte Verbindung zwischen Promotor-spezifischer Methylierung und onkogenem RAS-Signal gezeigt werden, da nach 48-stündiger U0126-Behandlung der ULBP2-Promotor in den HCT116wt-Zellen demethyliert wurde (Anhang, Abb. 63).

In der Literatur sind die genauen Regulationsmechanismen der Expression der NKG2D-Liganden zwar punktuell in murinen und humanen Modellen beschrieben, diese wurden aber bislang nur unzureichend in ein Gesamt-Konzept eingeordnet (Cerwenka and Lanier 2003, Gasser, Orsulic et al. 2005, Bottino, Moretta et al. 2006, Lopez-Larrea, Suarez-Alvarez et al. 2008). Dabei bieten die unterschiedlich aufgebauten und regulierten Promotoren der MIC- und ULBP-Gene eine erste Erklärung für die unterschiedliche Expression dieser NKG2D-Liganden auf verschiedenen Tumoren (Eagle, Traherne et al. 2006). NKG2D-Liganden, vor allem aber MICA und MICB, scheinen durch Stress induzierbar, da z.B. oxidativer Stress zu einer MICA/B-Expression in Kolon-Karzinom-Zelllinien führte (Yamamoto, Fujiyama et al. 2001) und MICA- und MICB-Promotoren darüber hinaus auch über potentielle Hitzeschockprotein-Transkriptionselemente (*heat shock elements*, HSE) verfügen (Venkataraman, Suciú et al. 2007). Ebenso können DNS-Schäden, wie sie u.a. in transformierten Zellen auftreten, zu einer anhaltende Aktivierung des DNS-Reparaturweges führen und in Folge dessen zu einer Expression von NKG2D-Liganden (Gasser, Orsulic et al. 2005). Einen weiteren Hinweis auf die NKG2D-Liganden-Expression im Zuge der Transformation liefert ein murines Modell, das die Beteiligung des Onkogens c-Myc an der Regulation der NKG2D-Liganden zeigen konnte (Unni, Bondar et al. 2008). Das spricht für einen zellintrinsischen Mechanismus, der eine onkogene Transformation detektieren kann und darauf mit einer gesteigerten NKG2D-Liganden-Expression reagiert, wobei die genauen Mechanismen nicht eindeutig charakterisiert sind.

Im Gegensatz zu diesen Mechanismen, die eine gesteigerte NKG2D-Liganden-Expression verursachen, sind in vielen Tumoren verschiedene epigenetische und post-transkriptionelle Mechanismen identifiziert worden, die eine verminderte Expression von NKG2D-Liganden zur Folge haben und so eine Erkennung des Tumors durch NK-Zellen und ZTLs verringern. Studien haben gezeigt, dass die Expression von ULBP2, MICA und MICB durch DNMT-Inhibition mit 5-Aza-C aber auch nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren auf mRNA- und

Protein-Ebene gesteigert werden konnte (Yamashita, Tsujino et al. 2006, Tang, He et al. 2008, Vales-Gomez, Chisholm et al. 2008). Eine Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren steigerte dagegen spezifisch die ULBP2-Oberflächenexpression, was auf eine zusätzliche post-transkriptionelle Regulation der ULBP2-Expression hinweist. Die Tatsache, dass MICA und MICB nicht beeinflusst wurden, zeigt wiederum die unterschiedliche Regulation der NKG2D-Liganden (Vales-Gomez, Chisholm et al. 2008). Die Anwesenheit der verschiedenen NKG2D-Liganden und deren unterschiedliche Regulation ist möglicherweise ein Mechanismus der Zellen, auf unterschiedliche „Stress“-Situationen reagieren zu können. Die für ULBP2 und HLA-A2 beobachtete Interaktion von onkogenen K-RAS-Signalen und DNMT-Aktivität auf die Gen-Expression ist bereits für andere Gene beschrieben, aber in dieser Arbeit das erste Mal im Kontext der Immunerkennung gezeigt worden. Die genauen molekularen Mechanismen sind dabei aber noch nicht eindeutig charakterisiert, werden aber in weiterführenden Arbeiten in Zusammenarbeit mit C. Sers näher untersucht.

Zusammenspiel von DNMT-Aktivität und onkogenem K-RAS in der Suppression von Genen

Bereits in früheren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen der DNMT1-Protein-Expression und RAS-abhängigen Signalen gezeigt werden (MacLeod, Rouleau et al. 1995), was auch die geringe Verminderung der DNMT1-Expression nach MEK-Inhibition durch U0126 in HCT116wt-Zellen belegt (Egger, Jeong et al. 2006)(C. Sers). Diese leichte Verminderung der DNMT1-Expression nach MEK-Inhibition kann aber nicht den spezifischen Verlust der Methylierung im ULBP2-Promotor erklären, da sogar in der DNMT1-Deletions-Variante, die nur noch über eine geringe DNMT1-Restaktivität verfügt, die ULBP2-Promotor-Methylierung beibehalten wird (Daten im Anhang, Abb. 63). Darüber hinaus konnte in Zusammenarbeit mit C. Sers gezeigt werden, dass eine Inhibition des MEK/ERK-Weges nicht „wahllos“ zu einer Demethylierung führt, da das auf Chromosom 6p lokalisierte HLA-Pseudogen *HCG4* (*HLA-V*) trotz U0126-Behandlung keine Veränderung seiner vollständigen Promotor-Methylierung zeigte, wohingegen der auf Chromosom 6q lokalisierte ULBP2-Promotor demethyliert wurde (Anhang, Abb. 62 und Abb. 63). Da die DNMT1-Erkennungssequenz relativ unspezifisch auf der Anwesenheit von CpG-Motiven in Promotoren beruht, kann diese spezifische Regulation von Genen nicht durch DNMT1-spezifische Bindungsmotive in den Promotoren erklärt werden. Eine Promotor-spezifische Aktivität der DNMT1 wurde auch von Egger et al. beobachtet und mit dem unterschiedlichen

Gehalt an CpG-Dinukleotiden in den Promotoren erklärt, wonach die Hauptaufgabe der DNMT1 eine Methylierung von CpG-armen Regionen ist (Egger, Jeong et al. 2006). Da der CpG-Gehalt der Promotoren von *ULBP2* und dem Pseudogen *HCG4 (HLA-V)* aber sehr ähnlich ist, kann allein dadurch die Promotor-Spezifität der DNMT1 nicht erklärt werden. Eine Interaktion von onkogenem RAS-Signal und der epigenetischen Stummschaltung von Genen konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden. Ein gutes Beispiel ist die, in murinen Modellen gezeigte, methylierungsabhängige Suppression des Fas-Rezeptors durch onkogenes RAS, was zu einer Unempfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber Fas-Ligand-induzierter Apoptose führt (Gazin, Wajapeyee et al. 2007). Diese Suppression beruht auf der direkten Fas-Promotor-Methylierung, wobei neben dem DNMT1-Protein 27 weitere Faktoren identifiziert wurden, die für die Aufrechterhaltung der RAS-induzierten Promotor-Methylierung nötig sind. Ein Großteil dieser Faktoren erwies sich auch als essentiell für die Suppression anderer Gene wie *Lox*, *Par4/Pawr* und *Sfrp1*, deren Relevanz für die Transformation gezeigt werden konnte (Gazin, Wajapeyee et al. 2007). Einer dieser Faktoren ist die PI3K-regulierte Kinase PDK1, die nach Aktivierung zu einer Phosphorylierung von Akt führt (Abb. 57). Wie im Anhang in Abb. 65 dargestellt, konnte in HCT116wt-Zellen ebenfalls eine MEK/ERK-abhängige Akt-Aktivierung gezeigt werden, was darauf hinweist, dass auch in dieser Zelllinie ähnliche Faktoren an der epigenetischen Regulation des *ULBP2*-Promotors und möglicherweise Promotoren der verschiedenen APM-Komponenten beteiligt sein könnten. Als weiterer essentieller Faktor der Fas-Suppression wird von Gazin et al. die Histon-Methyltransferase *EZH2* beschrieben (Gazin, Wajapeyee et al. 2007), die ebenfalls von C. Sers als positiv-reguliertes MAPK-Zielmolekül in Kolon-Karzinomen u.a. HCT116 identifiziert wurde. Die Histon-Modifikation scheint dabei ein initialer Schritt für eine anschließende DNS-Methylierung zu sein, indem sie „repressive regulatorische Bedingungen“ schafft. Das wird durch Studien von Lund und Sers et al. unterstützt, in denen die induzierte H-RAS-Expression eine verminderte Clusterin-Expression zur Folge hat, die aber anfänglich noch nicht von der Promotor-Methylierung begleitet war, sondern erst durch längerfristige RAS-Expression als Promotor-Methylierung stabil manifestiert wurde (Lund, Weisshaupt et al. 2006). Diese Abfolge der Ereignisse und die Faktoren „Zeit“ und „Zellzyklus“ konnten auch von Bachman et al. für das Tumorsuppressorgen $p16^{\text{INK4a}}$ gezeigt werden, das in DKO-Zellen im Gegensatz zu HCT116wt-Zellen unmethyliert und an der verringerten Proliferationsrate beteiligt ist (Bachman, Park et al. 2003). DKO-Zellen reagieren nach 22 Passagen mit einer verstärkten Proliferation, die von der verminderten $p16^{\text{INK4a}}$ -Expression begleitet wird, welche auf der Histon-H3-K9-Methylierung beruht. Diese $p16^{\text{INK4a}}$ -

Suppression wurde jedoch erst nach Passage 87 durch die Promotor-Methylierung manifestiert. Solche Histon-Modifikationen und die nachfolgende Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren und Suppressoren, mögen eine Erklärung für die DNMT-unabhängigen Effekte des aktivierten MAPK-Signalweges auf die Expression von HLA-Klasse-I und ULBP2 sein.

In den neben HCT116 untersuchten Kolon-Karzinom-Zelllinien zeigte sich zwar größtenteils derselbe Effekt der DNMT-Inhibition bzw. der MEK/ERK-Inhibition auf die Oberflächenexpression, trotzdem kristallisierten sich sowohl im MEK/ERK-Aktivierungsgrad, als auch in der Inhibitor-abhängigen Regulation der HLA-Klasse-I- und ULBP2-Oberflächenexpression zellspezifische Unterschiede heraus. Die intrazellulären Signalwege in „normalen,“ nicht transformierten Zellen sind seit Jahren erforscht, wohingegen über die tumorspezifischen Störungen durch eine konstitutive MAPK-Aktivierung und die damit verbundenen Veränderungen der zellulären Transkriptions- und Proteinmaschinerie relativ wenig bekannt ist. Die Auswirkung dieser massiven Veränderungen wird deutlich, wenn man bedenkt, wie fein abgestimmt die Signalweg-Aktivierung durch Liganden-induzierte Rezeptor-Aktivierung und auch während des Zellzyklus normalerweise abläuft, und welche Folgen ein gleichzeitiges und konstitutives Auftreten ansonsten zeitlich und „räumlich“ getrennter Signalwege haben kann. In Studien von Keller et al. konnte an zwei Kolon-Karzinom-Zelllinien gezeigt werden, dass der transformierte Phänotyp durch K-RAS-Mutation nicht durch Aktivierung derselben Signalwege entstehen muss, da HCT116-Zellen die bekannte konstitutive MEK- und ERK1/2-Phosphorylierung zeigen, DLD-1-Zellen hingegen trotz gleicher K-RAS-Mutation keinen aktivierten MAPK-Signalweg besitzen (Bryceson, March et al. 2006, Keller, Franklin et al. 2007). Individuelle Tumore desselben epithelialen Ursprungs können offensichtlich unterschiedliche Aspekte des K-RAS-regulierten Signalweges für die Transformation nutzen. Aufgrund dieser komplexen Zusammenhänge ist die Analyse einzelner Signalwege für die Definition des onkogenen „Signalings“ unzureichend. Die erweiterte simultane Betrachtung mehrerer Signalwege liefert einen besseren Einblick in individuelle „Ausweichwege“ der Tumorzelle, und kann schlussendlich dazu beitragen neue Ansatzpunkte für therapeutische Interventionen im Bereich der Signaltransduktion zu finden.

1.3 Funktionelle Relevanz der HLA-A2- und ULBP2-Regulation für die Immunerkennung

Ein immunologisch relevanter Zusammenhang zwischen onkogenen K-RAS-Signalen und der epigenetischen Suppression spezifischer Gene konnte in meiner Arbeit erstmals durch zusätzliche Analysen der funktionellen Konsequenz für die Erkennung durch zytotoxische Effektorzellen ergänzt werden. Die gesteigerte HLA-A2-Expression auf HCT116DKO- im Vergleich zu HCT116wt-Zellen resultiert in erhöhter Lyse durch einen HLA-A2-restringierten ZTL-Klon (Abb. 35). Darüber hinaus konnte ich zeigen, dass die Inhibition des konstitutiven MAPK-Signalweges ebenfalls zu einer gesteigerten Lyse der Tumorzellen durch diesen ZTL-Klon führte, was an zwei weiteren Kolon-Karzinom-Zelllinien bestätigt werden konnte (Abb. 37). Unabhängig durch welchen Mechanismus die Tumorzellen eine gesteigerte HLA-A2-Expression zeigten, korrelierte diese direkt mit einer effizienteren Lyse durch den ZTL-Klon, wobei dies durch den Vergleich zwischen dem Zielzell-orientierten Chromfreisetzungstest und dem Killerzell-orientierten Degranulationsnachweis eindeutig auf eine bessere ZTL-Aktivierung zurückzuführen war (Abb. 35, Abb. 36). Ein weiterer wichtiger Befund besteht in der Beobachtung, dass die gemeinsame Inhibition beider Systeme, des MAPK-Signalweges und der DNMT-Aktivität, zu einer zusätzlichen Steigerung der Tumorzelllyse führte. Diese Ergebnisse werden durch Publikationen mit humanen HPV-transformierten Zellen bestätigt, in denen eine erhöhte HLA-Klasse-I-Oberflächenexpression nach 5-Aza-C-Behandlung durch eine gesteigerte APM-Komponenten-Expression erzielt wurde, was zu einer gesteigerten Lyse der Tumorzellen durch spezifische ZTLs führte (Manning, Indrova et al. 2008). In einer weiteren Publikation von Drosopoulos et al. wurde in Kolon-Karzinom-Zelllinien die gesteigerte Expression der TRAIL-(*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*)-Rezeptoren 4 und 5 (*death receptors*, DR4, 5) beschrieben, welche durch ein anhaltendes K-RAS-Signal verursacht war und zur Apoptoseinduktion in den Tumorzellen führte (Drosopoulos, Roberts et al. 2005). Während sich diese Arbeit auf das Überleben der Tumorzellen beschränkt, lag der Fokus meiner Arbeit auf der Bedeutung der DNMT-Aktivität bzw. des onkogenen MAPK-Signalweges für die Erkennung der Tumorzellen durch T- und NK-Zellen. In diesem Kontext war die Beobachtung, dass die HCT116/3b^{-/-}-Variante trotz vergleichbarer HLA-A2-Expression schlechter lysiert wurde, zunächst nicht in die lineare Beziehung zwischen HLA-A2-Expressionsdichte und Lyse einzuordnen. Das erweiterte Expressionsprofil an Oberflächenmarkern zeigte jedoch einen auffälligen Defekt in der ICAM-1-Expression bei diesen Zellen (Abb. 16), der wahrscheinlich aus der Selektion dieser Variante aus der ICAM-

1-heterogenen HCT116wt entstanden ist. Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 sind für die stabile Ausbildung der immunologischen Synapse wichtig (Sirim, Zeitlmann et al. 2001) und so spiegelt die geringe Erkennung und Lyse der ICAM-1-negativen HCT116/3b^{-/-} durch den ZTL-Klon diesen Unterschied wider. ICAM-1 wird in der HCT116DKO dagegen verstärkt exprimiert, was mit der von Fonsatti et al. gezeigten verstärkten Expression nach 5-Aza-C-Behandlung korreliert und somit einen weiteren Beitrag zu der besseren Erkennung der Zellen nach DNMT-Inhibition leistet (Fonsatti, Nicolay et al. 2007).

Ein anderes Szenario wird bei der Betrachtung der NK-Tumorzell-Erkennung deutlich. Trotz der inhibierenden Effekte der HLA-Klasse-I-Moleküle auf die Aktivität von NK-Zellen, findet eine starke Erkennung der HCT116wt und der DNMT-Deletions-Varianten durch NK-Zellen statt (Abb. 38). Die gesteigerte Expression von ULBP2 durch DNMT-Verlust und MAPK-Inhibition hat per se keinen Effekt auf die NK-Zell-Erkennung, da sie durch die gleichzeitige Steigerung der HLA-Klasse-I-Expression kompensiert wird. Dies wurde durch die gesteigerte Aktivierung von NK-Zellen nach Blockierung der HLA-Klasse-I-Moleküle auf den Tumorzellen bewiesen (Abb. 39). Verschiedene Arbeiten beschreiben den Einfluss von NKG2D-Liganden auf die NK- und T-Zell-Aktivität. So führt die lokal hohe NKG2D-Liganden-Expression zur Hemmung der NK-Zellfunktionen, da NKG2D-vermittelte Signale verändert werden und die NKG2D-Expression vermindert wird (Oppenheim, Roberts et al. 2005). Interessanterweise besitzen lösliche Formen der NKG2D-Liganden, die durch Metalloproteasen der MMP- und der membrangebundenen ADAM-Familie entstehen, einen großen Einfluss auf die NK-Effektorfunktionen. Die Anwesenheit löslicher MICA- bzw. ULBP2-Moleküle (sMICA, sULBP2) in Seren von Patienten wird als Grund für die verminderte NKG2D-Expression auf NK- und T-Zellen angesehen (Groh, Wu et al. 2002, Salih, Rammensee et al. 2002, Waldhauer and Steinle 2006)(Steinle, 2008, NK-Kongress, Bad Herrenalb). Im Gegensatz zu sMICA, das zu einer verringerten Expression von NKG2D auf peripheren ZTL und NK-Zellen führt, verändert sULBP2 die NKG2D-Expression nicht (Groh, Wu et al. 2002, Raffaghello, Prigione et al. 2004, Wu, Higgins et al. 2004, Waldhauer and Steinle 2006). Die Frage nach der Variabilität der löslichen NKG2D-Liganden bei verschiedenen Tumorentitäten ist bisher nicht geklärt, da z. B. sULBP2 in Seren von Leukämiepatienten, aber nicht bei Patienten mit Gastrointestinalen-Tumoren detektiert werden kann (Waldhauer and Steinle 2006). Einen wichtigen Hinweis liefert die Arbeit von Lund und Sers et al., die eine Suppression der Metalloprotease2 (MMP2) durch DNS-Methylierung und onkogenen MEK/ERK-Signalweg in Ratten-Fibroblasten zeigen konnten (Lund, Weisshaupt et al. 2006). Dieser Einfluss des MEK/ERK-Signalweges auf die

Metalloproteasen liefert möglicherweise auch eine Erklärung für die unterschiedliche Oberflächenexpression von ULBP2 nach Inhibitor-Behandlung, die in dieser Arbeit in den verschiedenen Kolon-Karzinom-Zelllinien beobachtet werden konnte (Abb. 23, Abb. 24). Ob auch in den Kolon-Karzinom-Zelllinien eine Abspaltung der NKG2D-Liganden durch Metalloproteasen einen Einfluss auf deren Oberflächenexpression besitzt, wird durch Analyse löslicher NKG2D-Liganden Gegenstand weiterführender Arbeiten sein, da bisher keine kommerziellen sULBP-ELISA-Tests erhältlich sind. Deshalb kann momentan nicht ausgeschlossen werden, dass in allen untersuchten Kolon-Karzinom-Zelllinien eine gesteigerte ULBP2-Expression durch die Inhibitor-Behandlung auftritt, diese aber durch unterschiedlich starke Aktivierung der Metalloproteasen nicht auf der Oberfläche detektierbar ist. Darüber hinaus sind auch post-transkriptionelle Regulationen denkbar, wie eine proteasomale Degradation von ULBP2, die an der Regulation der Expression in manchen Zelllinien beteiligt ist (Vales-Gomez, Chisholm et al. 2008).

2 Phänotyp und Funktion peripherer NK-Zellen

Die Rolle der NK-Zellen als Regulatoren der Immunantwort wird im Lichte ihrer zunehmenden Plastizität auf phänotypischer und funktioneller Ebene derzeit äußerst kontrovers diskutiert. In lymphatischen wie nicht-lymphatischen Geweben findet sich häufig ein im Vergleich zu peripherem Blut verändertes NK-Zell-Repertoire, dessen Relevanz für die Autoimmunität bzw. Tumormunität erst ansatzweise bekannt ist. Deshalb lag der Fokus dieser Arbeit auf der detaillierten Analyse verschiedener NK-Phänotypen, u.a. auch auf klonaler Ebene. In diesem Kontext konnte ich zeigen, dass NK-Zellen sich nicht allein nach ihren phänotypischen Merkmalen in funktionell unterschiedliche Populationen, also Zytokinproduzenten bzw. zytotoxische NK-Zellen, einteilen lassen. Vielmehr ist die Charakterisierung der NK-Aktivität, die von einem fein abgestimmten Gleichgewicht unterschiedlicher inhibitorischer und aktivierender Signale bestimmt wird, sehr abhängig von der momentan betrachteten „Situation“. Diese wird durch die Art der Stimulation bzw. den Aktivierungszustand der NK-Population bestimmt, sowie der spenderabhängigen Expression der unterschiedlichen Rezeptoren und der Anwesenheit der jeweiligen Liganden, die durch ihre Expressionsdichte entscheidend daran beteiligt sind, in welche Richtung die NK-Aktivität bzw. -Hemmung verläuft. Dabei wurden neben den beiden peripheren NK-Populationen, die sich vor allem durch die unterschiedliche Expression von CD56, CD16 und CD6 auszeichnen, auch Analysen der NK-Funktionen auf klonaler Ebene durchgeführt. Neben der Lyse von

Zielzellen ist eine weitere wichtige Funktion der NK-Zellen die Freisetzung verschiedener Zytokine und die damit verbundene Beeinflussung der nachfolgenden Immunantwort. Dabei wird vor allem die Sekretion der T_H1 -Zytokine IFN- γ und TNF- α und die damit verbundene Polarisierung der T-Zell-Antwort in die Zell-vermittelte T_H1 -Richtung als eine der Hauptaufgaben der „NK-Zytokine“ betrachtet. In IL-2-Stimulationen, aber auch nach spezifischer Rezeptor-Aktivierung, konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass NK-Zellen darüber hinaus auch T_H2 -Zytokine wie IL-5 und IL-13 und interessanterweise auch IL-17 sezernieren, was ihre Rolle in der Immunantwort um einen weiteren Aspekt bereichert (Abb. 47 und Abb. 50).

Humane periphere NK-Zellen lassen sich aufgrund ihrer Expressionsdichte von CD56 und CD16 in zwei Subpopulationen unterteilen (Lanier, Le et al. 1986, Gottschalk, Bray et al. 1990), die für unterschiedliche Effektorfunktionen verantwortlich sein sollen. Die Funktion von CD56 auf NK-Zellen ist nicht eindeutig geklärt (Lanier, Testi et al. 1989), wobei es Hinweise gibt, dass es an der neuronalen Entwicklung beteiligt ist und eine homophile Adhäsion zwischen NK-Zellen vermitteln kann (Nitta, Yagita et al. 1989). Darüber hinaus wird zurzeit noch kontrovers über die Entwicklung der NK-Zellen und die Verwandtschaft der beiden Subpopulationen diskutiert, die möglicherweise nicht funktionell unterschiedliche Populationen, sondern vielmehr verschiedene Differenzierungsstadien darstellen. Aufgrund der fehlenden CD56-Expression auf murinen NK-Zellen sind viele Daten, welche die Entwicklung der beiden NK-Subpopulationen betreffen, *in vitro* generiert und daher teilweise recht spekulativ. Studien konnten aber zeigen, dass sich NK-Zellen unter IL-15 Einfluss aus hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark entwickeln, wobei sich dabei zwei Stadien unterscheiden lassen (Mrozek, Anderson et al. 1996, Fehniger and Caligiuri 2001). In der frühen Phase existieren sogenannte NK-Progenitor-Zellen ($CD34^+Lin^-$), die auf Wachstumsfaktoren im Knochenmark reagieren und sich zu $CD34^+$ -NK-Vorläuferzellen entwickeln, die den IL-15-Rezeptor exprimieren. IL-15 führt dann zu einer Reifung zu Zellen mit $CD56^{bright}$ -ähnlichem Phänotyp, die Zielzellen lysieren und auf Stimulation Zytokine und Chemokine sezernieren können (Yu, Fehniger et al. 1998). Ob $CD56^{bright}$ -NK-Zellen nun, durch dieses frühe Auftreten in der Differenzierung, tatsächlich ein weniger differenziertes NK-Stadium darstellen als $CD56^{dim}$ -NK-Zellen, wird noch kontrovers diskutiert, da möglicherweise die *in vitro*-Stimulationen eine $CD56^{bright}$ -NK-Zellentwicklung begünstigen oder die $CD56^{dim}$ -Vorläuferzellen noch nicht charakterisiert sind. Diese Frage ist bis jetzt ungeklärt, da auch neueste Studien zu kontroversen Ergebnissen führen. Abhängig von der Art und Dauer des Stimulus können $CD56^{bright}/CD16^-$ -NK-Zellen in $CD56^{dim}/CD16^+$ -NK-

Zellen, aber auch umgekehrt differenzieren (Loza and Perussia 2004, Freud, Becknell et al. 2005, Mailliard, Alber et al. 2005, Chan, Hong et al. 2007, Romagnani, Juelke et al. 2007). Die Beobachtung, dass nach einer Knochenmarktransplantation CD56^{bright}-NK-Zellen schneller im peripheren Blut auftreten als CD56^{dim}-NK-Zellen, kann bedeuten, dass CD56^{dim}-NK-Zellen entweder längere Zeit den Reifungsfaktoren im Knochenmark ausgesetzt sein müssen, oder dort aus CD56^{bright}-NK-Zellen entstehen (Gottschalk, Bray et al. 1990, Jacobs, Stoll et al. 1992).

Da in dieser Arbeit aber die Frage nach der möglichen Korrelation von Funktion und Phänotyp peripherer NK-Zellen untersucht wurde, war der Ursprung der beiden NK-Subpopulationen nicht von großer Relevanz, sondern vielmehr deren charakteristische Funktionen, die möglicherweise auch die unterschiedliche Gewebeverteilung erklären können.

2.1 Effektorfunktionen peripherer CD56^{dim}/CD16⁺/CD6^{+/-}- und CD56^{bright}/CD16⁻/CD6⁻-NK-Zellen

Degranulation als Gradmesser der „destruktiven“ NK-Funktion

In meiner Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass die beiden peripheren NK-Subpopulationen CD56^{bright}/CD16⁻/CD6⁻ und CD56^{dim}/CD16⁺/CD6^{+/-} nach IL-2-Stimulation eine vergleichbare Degranulation nach Aktivierung durch verschiedene HLA-Klasse-I-negative Zielzellen zeigen. Die Degranulations-Analyse von frischen, unstimulierten NK-Zellen war dabei nur schlecht möglich, da NK-Zellen, um eine zuverlässig quantifizierbare zytotoxische Funktion ausüben zu können, einen initialen Stimulus, in diesem Fall über den IL-2-Rezeptor, benötigen. Ruhende NK-Zellen können zwar auch nach Liganden-Bindung Rezeptor-Signale weiterleiten, die „Schwelle“ der Aktivierung ist aber stringenter reguliert und bedarf mehrerer gleichzeitig aktivierender Signale (Bryceson, March et al. 2006). Dieser „Schwellenwert“ stellt möglicherweise eine zusätzliche Kontrollinstanz für NK-Zellen dar, um autoreaktive „Angriffe“ auf körpereigene Zellen zu verhindern. Zusätzlich führt die IL-2-Stimulation auch zur Induktion des NKp44-Rezeptors auf beiden Subpopulationen, dem einzigen bekannten NK-spezifischen Aktivierungsmarker (Moretta, Bottino et al. 2001). Die induzierte NKp44-Expression mag auch einen Grund für die erhöhte Reaktivität IL-2-aktivierter NK-Zellen gegen bestimmte Zielzellen, die den bis heute unbekanntes NKp44-

Liganden exprimieren, darstellen. Der durch IL-2-Vorstimulation erniedrigte Schwellenwert ermöglicht es jedoch, die zytotoxischen Effektorfunktionen peripherer NK-Zellen, bezogen auf ihre Zugehörigkeit zu einer der beiden Subpopulationen, zu definieren.

Dazu wurden auf den IL-2-aktivierten NK-Zellen neben der CD107a-Expression, als Maß für die Degranulation, auch andere Oberflächenmarker durchflusszytometrisch untersucht. Dabei zeigte sich neben NKp44 eine leichte Erhöhung der CD56-Expression auf CD56^{dim}/CD16⁺-NK-Zellen, die in ihrem Ausmaß spenderabhängig war. Diese CD56-Modulation durch Aktivierung ist bekannt und macht CD56 damit zu keinem stabilen Differenzierungsmarker der beiden NK-Populationen (Robertson, Caligiuri et al. 1990, Caligiuri, Murray et al. 1993, Robertson, Cameron et al. 1999). Andere Marker wie CD16, CD6, KIR, NKG2D, NKp30 und NKp46, zeigten dagegen durch die IL-2-Stimulation keine Veränderung auf den beiden Populationen, was durch vergleichende Analysen stimulierter und unstimulierter NK-Zellen desselben Spenders gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Daher war eine eindeutige Zuordnung der NK-Zellen in den Degranulationsversuchen zu den Subpopulationen trotz CD56-Modulation möglich. Neuere Studien haben gezeigt, dass auch die Expression von CD16, NCRs und KIR nach 3 bis 7 Tagen IL-2-Stimulation auf CD56^{bright}/CD16⁻-NK-Zellen aus dem Lymphknoten und Mandeln induziert werden kann, was auch bei peripheren NK-Zellen gezeigt werden konnte (Ferlazzo, Thomas et al. 2004, Romagnani, Juelke et al. 2007). Dabei zeigen diese NK-Zellen dann auch, aufgrund erhöhter Perforin-Expression, zytotoxisches Potential. Es kann in dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden, dass einige CD56^{bright}/CD16⁻-NK-Zellen ihren Phänotyp durch die IL-2-Stimulation auf ähnliche Weise verändert haben, da sie dann aber durchweg als CD56^{dim}/CD16⁺-NK-Zellen gewertet worden sind, besitzt diese mögliche Veränderung mancher NK-Zellen keine Relevanz für die Aussage nach der zytotoxischen Fähigkeit der Subpopulationen.

Obwohl CD16 nicht durch die IL-2-Aktivierung in seiner Expression verändert wird, konnte ich in dieser Arbeit eindeutig zeigen, dass eine Degranulation von NK-Zellen nach Stimulation mit monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene andere Rezeptoren bzw. durch HLA-Klasse-I-negative Zielzellen zu einem „kollateralen“ Verlust an CD16-Oberflächenexpression führt (Abb. 43, Tabelle 5). Dabei zeigte sich auf CD56^{dim}-NK-Zellen eine direkte Korrelation zwischen CD16-Verlust und gesteigerter CD107a-Expression nach Degranulation. Da dieser Effekt auch durch Stimulation mit Antikörpern gegen alle Degranulations-induzierenden NK-Rezeptoren, z.B. NKp46 und NKp30 auftrat, kann eine direkte CD16-Aktivierung als Grund für den Verlust durch Internalisierung ausgeschlossen werden. Interessanterweise zeigte sich dieser CD16-Verlust nicht nach Stimulation des

CD94/NKG2C-Rezeptors, wobei zwar keine Degranulation, jedoch eine Zytokinfreisetzung ausgelöst wurde. Der CD16-Verlust ist also kein allgemeines Phänomen des Sekretionsprozesses, sondern ein „Nebeneffekt“ der zytotoxischen Degranulation. Eine Bindung der zur Stimulation- bzw. CD107a-Färbung genutzten Antikörper mit ihrem Fc-Teil an CD16 kann somit ebenfalls als Grund für eine verminderte CD16-Expression ausgeschlossen werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass Bestandteile des CD16-Rezeptorkomplexes nach Aktivierung durch Ubiquitylierung und anschließenden lysosomalen und proteasomalen Abbau degradiert werden, um so das Signal zu beenden (Paolini, Molfetta et al. 2001). Möglicherweise erfolgt eine ähnliche Internalisierung auch nach Aktivierung anderer Rezeptoren und führt nach Rekrutierung des CD16-Rezeptors in die Nähe der aktivierten Rezeptoren zu einer Internalisierung von CD16. Andere Marker wie NKG2D, CD56 und KIR werden nicht durch Degranulation moduliert (Daten nicht gezeigt), weshalb offensichtlich keine „wahllose“ Rekrutierung der Rezeptoren stattfindet. Da diese CD16-Modulation auch nach Stimulation einzelner Rezeptoren auftritt (Tabelle 5), die nach Studien von Bryceson und Long nicht zu einer gerichteten Degranulation führen, da die Polarisierung der NK-Zellen erst durch zusätzliche Signale, wie eine LFA-1/ICAM-1-Interaktion, stattfindet, scheint eine zielgerichtete Ausschüttung der Granula für diese Modulation nicht notwendig zu sein (Bryceson, March et al. 2006). Für CD16 konnte in der Literatur auch eine verminderte Expression nach Zytokin-Aktivierung gezeigt werden, da dies aber erst nach tagelanger Kultivierung mit IL-15 und IL-12 der Fall war, kann eine Aktivierung der NK-Zellen als Grund für den bereits nach vier Stunden sichtbaren CD16-Verlust ausgeschlossen werden (Loza and Perussia 2004).

Neben CD56 und CD16 wurde der, ursprünglich als T-Zell-Marker charakterisierte, CD6-Rezeptor als differentieller Marker auf den beiden NK-Subpopulationen identifiziert und dessen Relevanz für die NK-Funktion untersucht. CD6 ist ein Typ-B-Scavenger-Rezeptor-Glykoprotein, das vor allem auf T-Zellen exprimiert wird und das Adhäsionsmolekül ALCAM (CD166) bindet (Singer, Richardson et al. 1996, Aruffo, Bowen et al. 1997). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass CD6 auf CD56^{dim}-NK-Zellen exprimiert wird, wobei die Expression im Vergleich zu T-Zellen schwächer ist. CD56^{bright}-NK-Zellen sind dagegen immer CD6-negativ. Da sich dieser Marker weder durch IL-2-Aktivierung, noch im Zuge der Degranulation in seiner Expression verändert (Abb. 44), stellt er einen weitaus konstanteren Unterscheidungsmarker für die beiden NK-Subpopulationen dar. Daher wurde auch eine mögliche Korrelation der CD6- und CD56-Expression mit der NK-Zellzytotoxizität untersucht, die sich aber nicht experimentell beweisen ließ. In Analysen mit IL-2-aktivierten

NK-Zellen von 13 Spendern konnte ich zeigen, dass nach Aktivierung durch die HLA-Klasse-I-negative L721.221-Zelllinie tendenziell mehr CD6⁻-NK-Zellen degranulieren, was bei Aktivierung durch die ebenfalls HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen Daudi und K-562 eher für die CD6⁺-NK-Zellen der Fall ist (Abb. 44 und Abb. 45). Der CD6-Ligand ALCAM (CD166) wird auf Daudi-Zellen und schwach auf L721.221-Zellen exprimiert, dagegen sind K-562-Zellen negativ für ALCAM (Tabelle 4). Daher kann die effizientere Erkennung der Daudi-Zellen durch CD6⁺-NK-Zellen nicht allein auf die ALCAM-Expression, sondern auf andere Unterschiede, z.B. in Adhäsionsmolekülen zurückgeführt werden.

Der Vergleich der drei HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen, K-562, Daudi und L721.221 ergab zielzellabhängige Unterschiede in der Aktivierung der beiden Subpopulationen, die sich sowohl in der Gesamtstärke der Reaktion, als auch im Verhältnis der NK-Zellen beider Subpopulationen zueinander darstellen ließen, was an 23 Normalspendern gezeigt werden konnte (Abb. 45). Diese zielzellabhängigen Unterschiede der NK-Aktivierung sprechen auch dafür, dass die IL-2-Aktivierung nicht einfach „wahllos“ alle NK-Zellen zytotoxischer macht, sondern, dass phänotypische Unterschiede der NK-Zellen je nach Zielzelle entscheidend sind für eine Aktivierung. Berechnet man die relative Degranulation der beiden NK-Subpopulationen, degranulieren NK-Zellen der CD56^{bright}/CD16⁻/CD6⁻-Subpopulation sogar zu einem höheren Prozentsatz als CD56^{dim}/CD16⁺/CD6^{+/-}-NK-Zellen (Abb. 44 und Abb. 66, Anhang). Da CD56^{bright}-NK-Zellen in der Peripherie einen sehr geringen Anteil der NK-Zellpopulation ausmachen (5 % - 20 %), ist hier der Beitrag der zytotoxischen Zellen an der Gesamt-NK-Zell-Antwort logischerweise immer geringer, das zytotoxische Potential jeder einzelnen NK-Zelle ist aber in beiden NK-Subpopulationen vergleichbar. Bedenkt man jedoch die gewebespezifische Umkehrung der peripheren Verteilung, so repräsentieren die, in Lymphknoten und anderen sekundären lymphatischen Organen lokalisierten, CD56^{bright}-NK-Zellen die Mehrheit der reaktionsfähigen Zellen, da 40 % der Lymphozyten in Lymphknoten lokalisiert sind, während nur 2 % aller Lymphozyten in peripherem Blut zu finden sind (Trepel 1974, Westermann and Pabst 1992, Ferlazzo and Munz 2004). Auch auf klonaler Ebene konnte diese Beobachtung der vergleichbaren zytotoxischen Fähigkeit beider NK-Subpopulationen bestätigt werden. Unabhängig der KIR- bzw. CD94/NKG2A-Expression, gab es NK-Klone die HLA-Klasse-I-negative Zielzellen lysieren konnten und durch die entsprechenden HLA-Klasse-I-Moleküle abschaltbar waren. Daneben gab es aber auch NK-Klone die keine zytotoxische Aktivität besaßen (Abb. 55). Dabei besaßen die zytotoxischen NK-Klone entweder KIR oder das inhibitorische Heterodimer NKG2A/CD94, weswegen sie nach der „at least one“-Theorie potentiell reaktiv sind. Die nicht-zytotoxischen NK-Klone

zeichneten sich dagegen durch eine niedrige NCR-Expression aus, die in der Literatur bereits mit einem niedrigen zytotoxischen Potential assoziiert wurde (Pende, Parolini et al. 1999, Sivori, Pende et al. 1999). Dagegen waren alle NK-Klone in der Lage, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, Zytokine zu produzieren, wodurch ihre Rolle als Regulatoren der Immunantwort deutlich wird.

Zytokinfreisetzung als Gradmesser der regulatorischen NK-Funktion

Bei einer unspezifischen Stimulation peripherer NK-Zellen durch IL-2 zeigen sich keine Unterschiede im Zytokin-Repertoire der CD6⁺- und CD6⁻-NK-Zellen, wohl aber in der Kinetik und Menge der Zytokinfreisetzung, da vorrangig CD6⁻-NK-Zellen schneller höhere Menge an Zytokinen produzieren, was die vorrangige Funktion der CD56^{bright}-NK-Zellen in der Zytokinproduktion unterstreicht (Abb. 48).

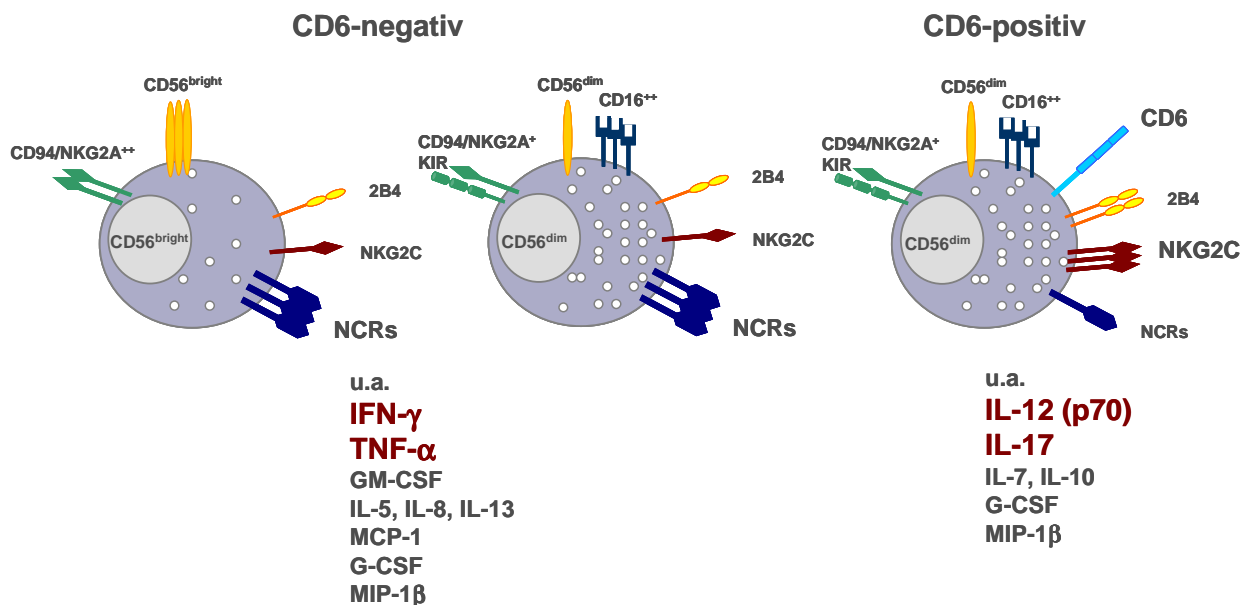


Abb. 58 Schematische Darstellung der Zytokinproduktion der peripheren CD6⁻- und CD6⁺-NK-Subpopulationen.

Die CD6⁻-NK-Subpopulation umfasst CD56^{bright}/CD16⁻- und CD56^{dim}/CD16⁺-NK-Zellen, wohingegen die CD6⁺-NK-Subpopulation nur durch CD56^{dim}/CD16⁺-NK-Zellen repräsentiert wird. CD6⁻-NK-Zellen zeichnen sich durch eine verstärkte Produktion der T_H1-Zytokine IFN- γ und TNF- α aus, wobei dies vor allem nach einer Stimulation der NCR-Rezeptoren NKp30 und NKp46 der Fall ist. CD6⁺-NK-Zellen produzieren dagegen verstärkt IL-12 (p70) und IL-17, nach NKG2C-Aktivierung zusätzlich auch IL-7 und IL-10. Dabei zeigen CD6⁻-NK-Zellen im Allgemeinen ein höheres Potential zur Zytokinfreisetzung.

Neben den klassischen, seit langem bekannten T_H1-Zytokinen, wie IFN- γ und TNF- α , können NK-Zellen aber auch T_H2-Zytokine wie IL-4, IL-10 und IL-13 sezernieren, wenn auch mit

verzögerter Kinetik von 3 - 4 Tagen. Diese zeitliche Abfolge bedeutet dabei, dass NK-Zellen in der „ersten Instanz“ zu einer T_H1 -Polarisierung der T-Zell-Antwort beitragen, was durch den Einfluss auf undifferenzierte T-Zellen oder Aktivierung von DCs in Lymphknoten während einer Entzündungsreaktion stattfinden kann (Martin-Fontecha, Thomsen et al. 2004, Morandi, Bougras et al. 2006). Zu späteren Zeitpunkten der Immunantwort können NK-Zellen dann auch die Entwicklung einer T_H2 -Antwort begünstigen, die eine AK-vermittelte Immunantwort fördert. NK-Zellen lassen sich, nach der „richtigen“ Zytokin-Stimulation mit $IFN-\gamma$ bzw. IL-4, in NK1- bzw. NK2-Zellen unterteilen, die der Klassifizierung der T_H1 - bzw. T_H2 -Zellen entspricht, wobei die Richtung hier durch die Zytokinaktivierung vorgegeben wird (Aktas, Akdis et al. 2005). Diese Untersuchung erklärt, warum NK-Zellen nach der üblichen IL-2- bzw. IL-12-Stimulation vorrangig $IFN-\gamma$ produzieren, wohingegen sie in einem T_H2 -Milieu vor allem IL-13 und IL-5 sezernieren. Die bisher vorherrschende Meinung, dass NK-Zellen eine T_H1 -Zytokin-Antwort unterstützen liegt, neben der Stimulationsbedingungen, mit Sicherheit auch daran, dass diese Zytokine in schnellerer Kinetik und in höherem Ausmaß sezerniert werden, und die Standard-Zytokinexperimente in der Literatur meist nur eine 24 h-Kultivierung für eine Zytokin-Bestimmung beinhalten. Aus der hier gezeigten langen Kinetik geht hervor, dass die meisten „nicht-klassischen“-NK-Zytokine erst nach 48 h nachweisbar sind (Abb. 47, Abb. 48). Die Relevanz von $CD56^{bright}$ -NK-Zellen, die auch in Tumorgewebe einwandern können, ist aufgrund ihrer Lokalisation im Tumorstroma, also nicht in direktem Kontakt mit den Tumorzellen, nicht eindeutig geklärt (Carrega, Morandi et al. 2008). Die Beobachtung, dass NK-Zellen nach IL-2-Stimulation neben $IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$ auch Zytokine wie IL-4 und IL-10 sezernieren (Abb. 47, Abb. 56), gibt ihnen möglicherweise eine zusätzliche Rolle bei der Eliminierung von Tumoren, indem sie die Stroma-Bildung und die Angiogenese verhindern können (Blankenstein 2005, Carrega, Morandi et al. 2008).

2.2 Plastizität der receptorspezifischen Effektorfunktionen

Die bisher diskutierten Unterschiede bzgl. der Zytotoxizität und Zytokinfreisetzung peripherer NK-Zellen bezogen sich auf die komplexe Stimulation mit verschiedenen Zielzellen bzw. des IL-2-Rezeptors. Um eine individuelle Beteiligung der NK-Rezeptoren definieren zu können, wurden ITAM-abhängige aktivierende Rezeptoren wie die NCRs, NKG2C und CD16, aber auch ITAM-unabhängige Rezeptoren wie NKG2D (DAP10) und 2B4 (SAP) bzgl. ihrer Effektorfunktionen in den beiden NK-Subpopulationen $CD6^+$ und $CD6^-$ verglichen. Dabei führte die receptorspezifische Stimulation zu einer vergleichbaren Degranulation in beiden Subpopulationen, wobei die Stärke der Degranulation zwischen den untersuchten Rezeptoren

stark variierte (Abb. 49). Bei der Zytokinfreisetzung zeigten sich dagegen sowohl Unterschiede zwischen den verschiedenen Rezeptoren, als auch den NK-Subpopulationen, so dass eine hierarchische Ordnung für die Effektorfunktionen auf der Basis der klonalen Analysen erstellt werden konnte (Abb. 50 und Abb. 51).

Kombinierte Zytotoxizität und Zytokinfreisetzung durch NCRs und CD16

Die Stimulation von NKp30 und NKp46 mit spezifischen Antikörpern löste eine vergleichbar starke Degranulation in IL-2-aktivierten peripheren NK-Zellen, unabhängig von ihrer CD6-Expression aus (Abb. 49). NKp44 induziert dagegen eine schwächere Degranulation (Daten nicht gezeigt), was neben der induktionsabhängigen Expression auch an der Signalweiterleitung von NKp44 über DAP12, anstatt über die CD3 ζ - und FcR γ -Ketten im Falle der anderen NCRs, liegen kann. Laut Literatur ist CD16 der einzige Rezeptor, der auch auf ruhenden NK-Zellen zu Degranulation führen kann, was meine Ergebnisse bestätigen, auch wenn die Stärke der Degranulation relativ schwach war (Abb. 52) (Bryceson, March et al. 2006, Bryceson, March et al. 2006). CD16 scheint somit auch ohne vorherige IL-2-Stimulation zu einer Degranulation der NK-Zellen zu führen, obwohl es über dieselben Adaptermoleküle wie NKp46 und NKp30 signalisiert. Der Grund hierfür mag darin liegen, dass der CD16-Rezeptor Antikörper-beladene Zielzellen erkennt (ADCC) und daher eine weniger stringente Kontrolle der NK-Aktivität stattfinden muss, da bereits eine spezifische Immunantwort abläuft. Bei der Induktion von Zytokinen zeigen diese Rezeptoren ein vergleichbares Muster, indem sie vorrangig in CD6⁻-NK-Zellen eine Produktion von IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-5 und IL-13 induzieren (Abb. 50). Interessant ist dabei die unterschiedliche Zytokinfreisetzung nach NKp30- bzw. NKp46-Aktivierung, da das Chemokin MCP-1 nur nach NKp30-Aktivierung in CD6⁻-NK-Zellen induziert wird (Abb. 51) und die NKp30-Stimulation auch generell höhere Mengen an Zytokinen induziert (Abb. 67, Anhang). Das liegt möglicherweise daran, dass NKp30 ausschließlich mit CD3 ζ -Adaptermolekülen assoziiert, wohingegen NKp46 neben CD3 ζ auch mit FcR γ assoziieren kann (Moretta, Bottino et al. 2001). Dies kann eine unterschiedliche Signalweiterleitung bedeuten, die sich weniger in der Degranulation, als vielmehr in der Produktion hoher Mengen an T_H1-Zytokinen und T_H2-Zytokinen wie IL-13 in CD6⁻-NK-Zellen niederschlägt.

Trennung von Degranulation und Zytokinproduktion bei den aktivierenden Rezeptoren NKG2D, 2B4, NKG2C und CD6

Die Stimulation von NKG2D mit spezifischen Antikörpern löst, verglichen mit der Aktivierung von NKp30, NKp46 und CD16 nur eine schwache Degranulation aus (Abb. 49). Die Induktion von Zytokinen lag dabei in der Größenordnung der NKp46-Stimulation, wobei auch hier IFN- γ und TNF- α hauptsächlich in der CD6⁻-Fraktion dominierten (Abb. 50). Die DAP10-vermittelte Signalweiterleitung nach NKG2D-Stimulus führt also zu einer starken T_H1-Zytokinfreisetzung, aber zu einer weitaus schwächeren Degranulation. Das kann als Hinweis auf eine „Abzweigung“ des Signalweges gewertet werden. In der Literatur gibt es widersprüchliche Daten zu NKG2D-vermittelten Effektorfunktionen, deren unzureichende Angaben jedoch keinen direkten Vergleich zu meinen Befunden zulassen (Wu, Cherwinski et al. 2000, Billadeau, Upshaw et al. 2003, Lanier 2008).

Die Stimulation von 2B4 (CD244) löst in peripheren NK-Zellen ebenfalls nur schwache Degranulation aus (Abb. 49), dafür aber die Produktion von IL-17, IL-12 (p70) und G-CSF, wenn auch nur in geringen Mengen und vorrangig in CD6⁺-NK-Zellen (Abb. 50). Auf die Bedeutung dieses, für NK-Zellen erstmals nachgewiesenen, ungewöhnlichen Zytokinmusters wird später noch näher eingegangen. In der Literatur wird 2B4 (CD244) häufig als Korezeptor bezeichnet, da Studien u.a. von Sivori et al. zeigen, dass 2B4 nur im Zusammenspiel mit anderen aktivierenden Rezeptoren, z.B. NCRs eine Aktivierung auslöst (Sivori, Parolini et al. 2000). Dabei sind diese Daten aus heutiger Sicht neu zu bewerten, da auf den Zielzellen bisher nicht identifizierte NCR-Liganden postuliert wurden. Die Bezeichnung als Korezeptor wird auch von jüngeren Studien in Frage gestellt, die zeigen, dass die Expression von CD48, dem Liganden von 2B4, in BaF3-Mauszellen, die keinen bekannten aktivierenden NK-Liganden exprimieren, zu einer Lyse durch 2B4-positive NK-Zellen führt (Stark and Watzl 2006). Über die beteiligten Signalwege wird zurzeit noch kontrovers diskutiert, da verschiedene Arbeitsgruppen die Aktivierung unterschiedlicher Moleküle in der Signalweiterleitung postulieren. Nach Aktivierung von 2B4 durch mA-K-Quervernetzung wurde eine Phosphorylierung von u.a. Vav1, p38 MAPK, ERK1/2 und PLC- γ beschrieben (Lanier 2008).

Ein ähnliches Szenario wird für NKG2C sichtbar, dessen Aktivierung allein keine Degranulation induziert (Abb. 49). Die NKG2C-Stimulation führt zu einer Inhibition der IFN- γ - und TNF- α -Sekretion im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle, wohingegen verstärkt eine Freisetzung von IL-17, IL-12 (p70), IL-7 und IL-10 in CD6⁺-NK-Zellen ausgelöst wird (Abb.

50 und Abb. 51). Somit ist der NKG2C-Rezeptor vorrangig auf CD6⁺, also CD56^{dim}-NK-Zellen exprimiert und löst dabei aber nur eine Zytokinfreisetzung aus. Leider konnte der Anteil an NKG2C-positiven NK-Zellen nicht direkt bestimmt werden, da damals kein direktmarkierter NKG2C-AK zur Verfügung stand. NKG2C bildet, genau wie sein inhibitorisches Gegenstück NKG2A, mit CD94 ein Heterodimer und erkennt das nicht-klassische HLA-E-Molekül. Dabei werden die Signale über das ITAM-tragende Adaptermolekül DAP12 weitergeleitet. Da auch NKp44 über DAP12 Signale vermittelt, müssen nachfolgende Signalwege unterschiedlich verlaufen, da NKp44 sehr wohl eine Degranulation induziert, dagegen aber keine IL-7- oder IL-10-Produktion auslöst (Daten nicht gezeigt).

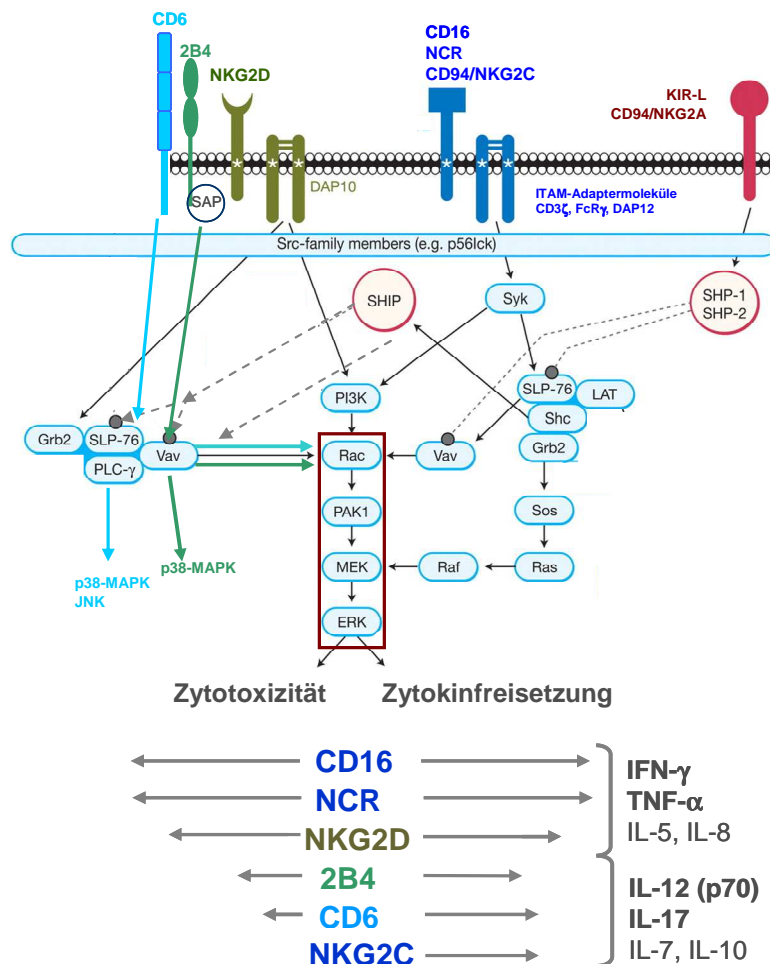


Abb. 59 Stark vereinfachte Darstellung der Rezeptor-spezifischen Signalwege in NK-Zellen und der resultierenden Effektorfunktionen Zytotoxizität und/oder Zytokinfreisetzung.

Die aktivierende NK-Rezeptoren CD16, NKp30, NKp46 und CD94/NKG2C signalisieren über ITAM-tragende Adaptermoleküle wie DAP12 oder CD3 ζ - und FcR γ -Ketten (dunkelblau). NKG2D (olivgrün) vermittelt die Signale über DAP10, das kein ITAM besitzt, 2B4 (grün) assoziiert mit dem Signalmolekül SAP. Für CD6 (hellblau) ist eine Signalweiterleitung in T-Zellen über SLP-76 beschrieben, die Signalwege in NK-Zellen sind nicht identifiziert. Neben aktivierenden Rezeptoren gibt es auch inhibitorische, z.B. KIR, die über rekrutierte Phosphatasen (SHP-1,2) die Signalwege abschalten können (rot). Der MEK/ERK-Signalweg (roter Kasten) stellt ein zentrales Element aller aktivierender Signalwege dar, wobei die Entscheidung zwischen Zytotoxizität und Zytokinsekretion nach Aktivierung nicht geklärt ist. Die Ergebnisse der Rezeptor-Stimulationen auf die Effektorfunktionen sind dargestellt, wobei die Länge der Pfeile ein Maß für die Stärke NK-Funktion ist. Die hauptsächlich produzierten Zytokine sind hervorgehoben. Adaptiert nach Vivier et al. (Vivier, Nunes et al. 2004).

Nach Identifikation von CD6 als differentiell exprimiertem Marker auf CD56^{dim}/CD16⁺-NK-Zellen, wurde dessen funktionelles Potential untersucht, wobei in unserer Arbeitsgruppe bereits früher gezeigt werden konnte, dass eine alleinige Stimulation von CD6 auf T-Zellen weder Zytokine noch zytotoxische Aktivität auslöste (unpublizierte Daten). Die CD6-Stimulation führte weder bei unaktivierten CD6⁺-NK-Zellen (Abb. 52), noch bei 48 h IL-2-aktivierten NK-Zellen zu einer relevanten Degranulation (Daten nicht gezeigt), so dass CD6 in Bezug auf die Zytotoxizität nicht als autonomer, aktivierender NK-Rezeptor fungiert. Dies stimmt auch mit den bereits diskutierten Daten überein, die keine Korrelation der CD6-Expression und der zytotoxischen Eigenschaften peripherer NK-Zellen zeigen konnten (Abb. 44 und Abb. 45). Dagegen induzierte CD6 auf NK-Zellen die Freisetzung von Zytokinen, die dem 2B4-Muster ähneln (Abb. 52), wobei IFN- γ und TNF- α nur gering induziert werden, IL-17, IL-12 (p70), G-CSF, GM-CSF und IL-8 dagegen deutlich. Der CD6-Rezeptor auf NK-Zellen löst also vorrangig ein „nicht-klassisches“ Zytokinmuster in CD56^{dim}-NK-Zellen aus, das von IL-17 und IL-12 (p70) als Leitzytokine der T_H1/T_H17-Antwort geprägt wird.

Eine Funktion von CD6 wurde bisher nur für T-Zellen gezeigt, in welchen das Blockieren von CD6 die IL-2-Produktion in einer Ag-spezifischen Immunantwort verringern kann (Hassan, Barclay et al. 2004). Die Interaktion von CD6 mit seinem Ligand ALCAM (CD166) wirkt kostimulierend auf eine T-Zell-Antwort, wobei die Signalkaskade über SLP-76 läuft (Hassan, Simmonds et al. 2006). Außerdem wurde nach CD6-Stimulation eine Aktivierung von ERK1/2, JNK und p38 MAPK über die Protein-Tyrosin-Kinase (PTK) p56-Lck beobachtet, wobei sich synergistische Effekte in der Aktivierungsstärke der MAPK bei gleichzeitiger CD3/CD6-Stimulation zeigten (Ibanez, Sarrias et al. 2006). Inwieweit solche Signalwege in NK-Zellen Relevanz besitzen, ist derzeit noch unklar, es scheint aber substantielle Unterschiede zu geben, da CD6, wie ich hier gezeigt habe, auch autonom, ohne zusätzliches kostimulierendes Signal, zu einer Effektorfunktion der NK-Zellen führt. Das durch CD6-Stimulation induzierte Zytokinmuster stimmt auch mit der Beobachtung überein, dass IL-17, IL-12 (p70) und G-CSF durch 2B4- und NKG2C-Stimulation vorrangig von CD6⁺-NK-Zellen sezerniert werden, wohingegen IFN- γ und TNF- α vorrangig von NCRs und CD16 in CD6⁻-NK-Zellen induziert werden, wobei beide Subpopulationen konstitutiv MIP-1 β (CCL-4) produzieren. Möglicherweise unterscheiden sich CD6⁺- und CD6⁻-NK-Populationen in der intrinsischen Fähigkeit zur Zytokinfreisetzung. Ein und derselbe NK-Rezeptor kann offensichtlich, je nach intrazellulärer Verschaltung, entweder vorrangig Zytotoxizität oder verschiedenen Zytokine oder auch beide Effektorfunktionen auslösen. Die molekulare Basis

für die individuelle „Entscheidungsfindung“ ist Gegenstand weiterer Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen.

NK-Zellen als neue Regulatoren der T_H17-Antwort

Wie in Abbildung Abb. 58 und Abb. 59 gezeigt, wird IL-17 vorrangig nach NKG2C-Aktivierung und von CD6⁺-NK-Zellen produziert. Bisher wurden CD4⁺ T_H17-Zellen, die erst kürzlich als dritte Gruppe neben den seit langem bekannten T_H1- und T_H2-Zellen definiert wurden, als Hauptproduzenten von IL-17, einem pro-inflammatorisches Zytokin, angesehen (Weaver, Harrington et al. 2006). Daneben wird IL-17 auch von CD8⁺-T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie Granulozyten und Neutrophilen sezerniert (Ferretti, Bonneau et al. 2003, Happel, Zheng et al. 2003, Stark, Huo et al. 2005). Eine IL-17-Produktion durch NK-Zellen konnte dagegen an gereinigten NK-Zelllinien oder Klonen noch nicht eindeutig gezeigt werden, was möglicherweise an der zu kurzen 24-stündigen Kultivierung lag. IL-17 repräsentiert das Leitzytokin der T_H1-getriebenen Entzündungsreaktion und induziert die Produktion von IFN- γ und IL-12 in verschiedenen Immunzellen, wodurch wiederum die NK-Zell-Antwort unterstützt wird (Hurst, Muchamuel et al. 2002). Da der IL-17-Rezeptor auf verschiedenen Immunzellen und Geweben exprimiert ist, resultiert aus der Anwesenheit von IL-17 ein dadurch vermitteltes pro-inflammatorisches Zytokin- bzw. Chemokinmilieu, dass u.a. durch IL-6, G-CSF bzw. IL-8 (CXCL8) und IP10 (CXCL10) repräsentiert wird. Die Fähigkeit von CD56^{dim}/CD6⁺-NK-Zellen zur IL-17-Produktion mag so einen zusätzlichen Mechanismus darstellen eine T_H1-Entzündungsreaktion zu verstärken und damit die gesamte Immunreaktion in eine pro-inflammatorische, unter bestimmten Bedingungen sogar autoimmune, Richtung zu polarisieren. Aus der Analogie verschiedener Mausmodelle zur Autoimmunität und humanen Autoimmunerkrankungen geht hervor, dass die Initiation häufig nur deshalb von IL-23 abhängig ist, weil daraus eine nachhaltige IL-17-Produktion resultiert, die bislang CD4⁺-T-Helferzellen zugeschrieben wurde. Dabei repräsentieren die T_H17-Zellen, je nach Stimulationsart mit IL-6 oder IL-1 β , nur einen kleinen Anteil.

Als kleines „Rädchen“ im Uhrwerk des Zytokin/Chemokin-Netzwerkes wird ihnen jedoch eine große Bedeutung im Antrieb der „großen“ Räder wie TNF- α und der Typ I- und II-Interferone zugeschrieben. Wenngleich NK-Zellen, auch aufgrund ihrer phänotypischen Heterogenität, nur eine kleine Fraktion der Lymphozyten darstellen, so werden zukünftige Untersuchungen zur Aufgabe haben, ihnen, u.a. wegen ihrer außergewöhnlichen Zytokinproduktion, z.B. als NK17-Zellen, eine vergleichbar große Bedeutung einzuräumen.

G Literatur

- Adam, C., King, S.et al.** (2005). DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood* 106 (1).338-44
- Aktas, E., Akdis, M.et al.** (2005). Different natural killer (NK) receptor expression and immunoglobulin E (IgE) regulation by NK1 and NK2 cells. *Clin Exp Immunol* 140 (2).301-9
- Andre, P., Biassoni, R.et al.** (2001). New nomenclature for MHC receptors. *Nat Immunol* 2 (8).661
- Anfossi, N., Andre, P.et al.** (2006). Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25 (2).331-42
- Arber, N., Shapira, I.et al.** (2000). Activation of c-K-ras mutations in human gastrointestinal tumors. *Gastroenterology* 118 (6).1045-50
- Arnon, T. I., Achdout, H.et al.** (2004). The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46. *Blood* 103 (2).664-72
- Aruffo, A., Bowen, M. A.et al.** (1997). CD6-ligand interactions: a paradigm for SRCR domain function? *Immunol Today* 18 (10).498-504
- Atkins, D., Breuckmann, A.et al.** (2004). MHC class I antigen processing pathway defects, ras mutations and disease stage in colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 109 (2).265-73
- Atkins, D., Ferrone, S.et al.** (2004). Down-regulation of HLA class I antigen processing molecules: an immune escape mechanism of renal cell carcinoma? *J Urol* 171 (2 Pt 1).885-9
- Bachman, K. E., Park, B. H.et al.** (2003). Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer Cell* 3 (1).89-95
- Bahram, S., Inoko, H.et al.** (2005). MIC and other NKG2D ligands: from none to too many. *Curr Opin Immunol* 17 (5).505-9
- Barbacid, M.** (1987). ras genes. *Annu Rev Biochem* 56 779-827
- Bauer, S., Groh, V.et al.** (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285 (5428).727-9
- Baylin, S. B. and Herman, J. G.** (2000). DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 16 (4).168-74
- Baylin, S. B. and Ohm, J. E.** (2006). Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 6 (2).107-16
- Beard, C., Li, E.et al.** (1995). Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. *Genes Dev* 9 (19).2325-34
- Becker, P. B. and Horz, W.** (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem* 71 247-73

- Bestor, T., Laudano, A. et al.** (1988). Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J Mol Biol* 203 (4).971-83
- Billadeau, D. D., Upshaw, J. L. et al.** (2003). NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nat Immunol* 4 (6).557-64
- Blanchet, O., Bourge, J. F. et al.** (1992). Altered binding of regulatory factors to HLA class I enhancer sequence in human tumor cell lines lacking class I antigen expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (8).3488-92
- Blankenstein, T.** (2005). The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system. *Curr Opin Immunol* 17 (2).180-6
- Blery, M., Olcese, L. et al.** (2000). Early signaling via inhibitory and activating NK receptors. *Hum Immunol* 61 (1).51-64
- Bollag, G. and McCormick, F.** (1992). GTPase activating proteins. *Semin Cancer Biol* 3 (4).199-208
- Borner, C.** (2003). The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 39 (11).615-47
- Bos, J. L.** (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49 (17).4682-9
- Bos, J. L., Fearon, E. R. et al.** (1987). Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327 (6120).293-7
- Bottino, C., Moretta, L. et al.** (2006). NK cell activating receptors and tumor recognition in humans. *Curr Top Microbiol Immunol* 298 175-82
- Boucher, M. J., Morisset, J. et al.** (2000). MEK/ERK signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells. *J Cell Biochem* 79 (3).355-69
- Bourne, H. R., Sanders, D. A. et al.** (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348 (6297).125-32
- Bowen, M. A., Bajorath, J. et al.** (1996). The amino-terminal immunoglobulin-like domain of activated leukocyte cell adhesion molecule binds specifically to the membrane-proximal scavenger receptor cysteine-rich domain of CD6 with a 1:1 stoichiometry. *J Biol Chem* 271 (29).17390-6
- Bowen, M. A., Patel, D. D. et al.** (1995). Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *J Exp Med* 181 (6).2213-20
- Boyington, J. C. and Sun, P. D.** (2002). A structural perspective on MHC class I recognition by killer cell immunoglobulin-like receptors. *Mol Immunol* 38 (14).1007-21
- Braud, V. M., Allan, D. S. et al.** (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391 (6669).795-9
- Brown, M. H., Boles, K. et al.** (1998). 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J Exp Med* 188 (11).2083-90
- Bryceson, Y. T., March, M. E. et al.** (2006). Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev* 214 73-91

- Bryceson, Y. T., March, M. E. et al.** (2006). Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107 (1).159-66
- Burnet, M.** (1957). Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br Med J* 1 (5023).841-7
- Cabrera, C. M.** (2007). The double role of the endoplasmic reticulum chaperone tapasin in peptide optimization of HLA class I molecules. *Scand J Immunol* 65 (6).487-93
- Cadieux, B., Ching, T. T. et al.** (2006). Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation. *Cancer Res* 66 (17).8469-76
- Caligiuri, M. A., Murray, C. et al.** (1993). Selective modulation of human natural killer cells in vivo after prolonged infusion of low dose recombinant interleukin 2. *J Clin Invest* 91 (1).123-32
- Caligiuri, M. A., Zmuidzinas, A. et al.** (1990). Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med* 171 (5).1509-26
- Cameron, E. E., Bachman, K. E. et al.** (1999). Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 21 (1).103-7
- Campbell, J. J., Qin, S. et al.** (2001). Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J Immunol* 166 (11).6477-82
- Carrega, P., Morandi, B. et al.** (2008). Natural killer cells infiltrating human nonsmall-cell lung cancer are enriched in CD56 bright CD16(-) cells and display an impaired capability to kill tumor cells. *Cancer* 112 (4).863-75
- Cartron, P. F., Gallenne, T. et al.** (2004). The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol Cell* 16 (5).807-18
- Cayrol, R., Wosik, K. et al.** (2008). Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol* 9 (2).137-45
- Ceman, S., Rudersdorf, R. et al.** (1992). MHC class II deletion mutant expresses normal levels of transgene encoded class II molecules that have abnormal conformation and impaired antigen presentation ability. *J Immunol* 149 (3).754-61
- Cerwenka, A. and Lanier, L. L.** (2003). NKG2D ligands: unconventional MHC class I-like molecules exploited by viruses and cancer. *Tissue Antigens* 61 (5).335-43
- Chan, A., Hong, D. L. et al.** (2007). CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol* 179 (1).89-94
- Chen, R., Relouzat, F. et al.** (2004). Molecular dissection of 2B4 signaling: implications for signal transduction by SLAM-related receptors. *Mol Cell Biol* 24 (12).5144-56
- Chuang, L. S., Ian, H. I. et al.** (1997). Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* 277 (5334).1996-2000

- Colonna, M., Navarro, F.et al.** (1997). A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* 186 (11).1809-18
- Colucci, F., Di Santo, J. P.et al.** (2002). Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons? *Nat Immunol* 3 (9).807-13
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A.et al.** (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22 (11).633-40
- Dalbeth, N., Gundle, R.et al.** (2004). CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. *J Immunol* 173 (10).6418-26
- Dhillon, A. S., Hagan, S.et al.** (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26 (22).3279-90
- Domina, A. M., Smith, J. H.et al.** (2000). Myeloid cell leukemia 1 is phosphorylated through two distinct pathways, one associated with extracellular signal-regulated kinase activation and the other with G2/M accumulation or protein phosphatase 1/2A inhibition. *J Biol Chem* 275 (28).21688-94
- Domina, A. M., Vrana, J. A.et al.** (2004). MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene* 23 (31).5301-15
- Drosopoulos, K. G., Roberts, M. L.et al.** (2005). Transformation by oncogenic RAS sensitizes human colon cells to TRAIL-induced apoptosis by up-regulating death receptor 4 and death receptor 5 through a MEK-dependent pathway. *J Biol Chem* 280 (24).22856-67
- Dunn, G. P., Bruce, A. T.et al.** (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3 (11).991-8
- Dunn, G. P., Bruce, A. T.et al.** (2005). A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat Immunol* 6 (7).722-9
- Dunn, G. P., Old, L. J.et al.** (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22 329-60
- Eagle, R. A., Traherne, J. A.et al.** (2006). Regulation of NKG2D ligand gene expression. *Hum Immunol* 67 (3).159-69
- Eckstein, N., Servan, K.et al.** (2008). Epidermal growth factor receptor pathway analysis identifies amphiregulin as a key factor for cisplatin resistance of human breast cancer cells. *J Biol Chem* 283 (2).739-50
- Eden, S., Hashimshony, T.et al.** (1998). DNA methylation models histone acetylation. *Nature* 394 (6696).842
- Egger, G., Jeong, S.et al.** (2006). Identification of DNMT1 (DNA methyltransferase 1) hypomorphs in somatic knockouts suggests an essential role for DNMT1 in cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (38).14080-5
- Eisenmann, K. M., VanBrocklin, M. W.et al.** (2003). Mitogen-activated protein kinase pathway-dependent tumor-specific survival signaling in melanoma cells through inactivation of the proapoptotic protein bad. *Cancer Res* 63 (23).8330-7

- Eissmann, P., Beauchamp, L. et al.** (2005). Molecular basis for positive and negative signaling by the natural killer cell receptor 2B4 (CD244). *Blood* 105 (12).4722-9
- Ellis, C. A. and Clark, G.** (2000). The importance of being K-Ras. *Cell Signal* 12 (7).425-34
- Falk, C. S., Mach, M. et al.** (2002). NK cell activity during human cytomegalovirus infection is dominated by US2-11-mediated HLA class I down-regulation. *J Immunol* 169 (6).3257-66
- Fanger, N. A., Cosman, D. et al.** (1998). The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor-mediated signaling in monocytes. *Eur J Immunol* 28 (11).3423-34
- Faure, M. and Long, E. O.** (2002). KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *J Immunol* 168 (12).6208-14
- Fehniger, T. A. and Caligiuri, M. A.** (2001). Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 97 (1).14-32
- Fehniger, T. A., Cooper, M. A. et al.** (2003). CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 101 (8).3052-7
- Feinberg, A. P. and Tycko, B.** (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 4 (2).143-53
- Ferlazzo, G. and Munz, C.** (2004). NK cell compartments and their activation by dendritic cells. *J Immunol* 172 (3).1333-9
- Ferlazzo, G., Pack, M. et al.** (2004). Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (47).16606-11
- Ferlazzo, G., Thomas, D. et al.** (2004). The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* 172 (3).1455-62
- Ferretti, S., Bonneau, O. et al.** (2003). IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol* 170 (4).2106-12
- Ferris, R. L., Whiteside, T. L. et al.** (2006). Immune escape associated with functional defects in antigen-processing machinery in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 12 (13).3890-5
- Fonsatti, E., Nicolay, H. J. et al.** (2007). Functional up-regulation of human leukocyte antigen class I antigens expression by 5-aza-2'-deoxycytidine in cutaneous melanoma: immunotherapeutic implications. *Clin Cancer Res* 13 (11).3333-8
- Freud, A. G., Becknell, B. et al.** (2005). A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity* 22 (3).295-304
- Frey, M., Packianathan, N. B. et al.** (1998). Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J Immunol* 161 (1).400-8
- Fuks, F., Burgers, W. A. et al.** (2000). DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet* 24 (1).88-91

- Futscher, B. W., Oshiro, M. M. et al.** (2002). Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. *Nat Genet* 31 (2).175-9
- Gasser, S., Orsulic, S. et al.** (2005). The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 436 (7054).1186-90
- Gasser, S. and Raulet, D. H.** (2006). Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunol Rev* 214 130-42
- Gaudet, F., Hodgson, J. G. et al.** (2003). Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 300 (5618).489-92
- Gazin, C., Wajapeyee, N. et al.** (2007). An elaborate pathway required for Ras-mediated epigenetic silencing. *Nature* 449 (7165).1073-7
- Gottschalk, L. R., Bray, R. A. et al.** (1990). Two populations of CD56 (Leu-19)+/CD16+ cells in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 5 (4).259-64
- Grady, W. M. and Markowitz, S. D.** (2002). Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3 101-28
- Gregoire, C., Chasson, L. et al.** (2007). The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* 220 169-82
- Groh, V., Bahram, S. et al.** (1996). Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (22).12445-50
- Groh, V., Wu, J. et al.** (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419 (6908).734-8
- Hammer, G. E., Kanaseki, T. et al.** (2007). The final touches make perfect the peptide-MHC class I repertoire. *Immunity* 26 (4).397-406
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (1).57-70
- Happel, K. I., Zheng, M. et al.** (2003). Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Immunol* 170 (9).4432-6
- Hassan, N. J., Barclay, A. N. et al.** (2004). Frontline: Optimal T cell activation requires the engagement of CD6 and CD166. *Eur J Immunol* 34 (4).930-40
- Hassan, N. J., Simmonds, S. J. et al.** (2006). CD6 regulates T-cell responses through activation-dependent recruitment of the positive regulator SLP-76. *Mol Cell Biol* 26 (17).6727-38
- Herrmann, C.** (2003). Ras-effector interactions: after one decade. *Curr Opin Struct Biol* 13 (1).122-9
- Hofmeister, V. and Weiss, E. H.** (2003). HLA-G modulates immune responses by diverse receptor interactions. *Semin Cancer Biol* 13 (5).317-23
- Hurst, S. D., Muchamuel, T. et al.** (2002). New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J Immunol* 169 (1).443-53
- Ibanez, A., Sarrias, M. R. et al.** (2006). Mitogen-activated protein kinase pathway activation by the CD6 lymphocyte surface receptor. *J Immunol* 177 (2).1152-9

- Jackson, M., Krassowska, A. et al.** (2004). Severe global DNA hypomethylation blocks differentiation and induces histone hyperacetylation in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 24 (20).8862-71
- Jacobs, R., Hintzen, G. et al.** (2001). CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol* 31 (10).3121-7
- Jacobs, R., Stoll, M. et al.** (1992). CD16- CD56+ natural killer cells after bone marrow transplantation. *Blood* 79 (12).3239-44
- Jones, P. A. and Baylin, S. B.** (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* 128 (4).683-92
- Jones, P. A. and Laird, P. W.** (1999). Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21 (2).163-7
- Jones, P. L., Veenstra, G. J. et al.** (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19 (2).187-91
- Kaufmann, T., Schinzel, A. et al.** (2004). Bcl-w(adding) with mitochondria. *Trends Cell Biol* 14 (1).8-12
- Keller, J. W., Franklin, J. L. et al.** (2007). Oncogenic KRAS provides a uniquely powerful and variable oncogenic contribution among RAS family members in the colonic epithelium. *J Cell Physiol* 210 (3).740-9
- Khan, A. N., Gregorie, C. J. et al.** (2008). Histone deacetylase inhibitors induce TAP, LMP, Tapasin genes and MHC class I antigen presentation by melanoma cells. *Cancer Immunol Immunother* 57 (5).647-54
- Khong, H. T. and Restifo, N. P.** (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 3 (11).999-1005
- Kienast, A., Preuss, M. et al.** (2007). Redox regulation of peptide receptivity of major histocompatibility complex class I molecules by ERp57 and tapasin. *Nat Immunol* 8 (8).864-72
- Kikuchi-Maki, A., Catina, T. L. et al.** (2005). Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK cells through association with the Fc receptor gamma protein. *J Immunol* 174 (7).3859-63
- Kim, R., Emi, M. et al.** (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121 (1).1-14
- Kumar, V. and McNerney, M. E.** (2005). A new self: MHC-class-I-independent natural-killer-cell self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 5 (5).363-74
- Lanier, L. L.** (2003). Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 15 (3).308-14
- Lanier, L. L.** (2005). NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23 225-74
- Lanier, L. L.** (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 9 (5).495-502
- Lanier, L. L., Le, A. M. et al.** (1986). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 136 (12).4480-6

- Lanier, L. L., Testi, R. et al.** (1989). Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med* 169 (6).2233-8
- Lazetic, S., Chang, C. et al.** (1996). Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol* 157 (11).4741-5
- Le Roy, C. and Wrana, J. L.** (2005). Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2).112-26
- Leibovitz, A., Stinson, J. C. et al.** (1976). Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 36 (12).4562-9
- Leonhardt, H., Page, A. W. et al.** (1992). A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 71 (5).865-73
- Lewis, J. D., Meehan, R. R. et al.** (1992). Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 69 (6).905-14
- Ljunggren, H. G. and Karre, K.** (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11 (7).237-44
- Long, E. O.** (1999). Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol* 17 875-904
- Lopez-Botet, M., Llano, M. et al.** (2000). NK cell recognition of non-classical HLA class I molecules. *Semin Immunol* 12 (2).109-19
- Lopez-Botet, M., Navarro, F. et al.** (1999). How do NK cells sense the expression of HLA-G class Ib molecules? *Semin Cancer Biol* 9 (1).19-26
- Lopez-Larrea, C., Suarez-Alvarez, B. et al.** (2008). The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends Mol Med* 14 (4).179-89
- Lowy, D. R. and Willumsen, B. M.** (1993). Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem* 62 851-91
- Loza, M. J. and Perussia, B.** (2004). The IL-12 signature: NK cell terminal CD56+high stage and effector functions. *J Immunol* 172 (1).88-96
- Lund, P., Weisshaupt, K. et al.** (2006). Oncogenic HRAS suppresses clusterin expression through promoter hypermethylation. *Oncogene* 25 (35).4890-903
- MacLeod, A. R., Rouleau, J. et al.** (1995). Regulation of DNA methylation by the Ras signaling pathway. *J Biol Chem* 270 (19).11327-37
- Mailliard, R. B., Alber, S. M. et al.** (2005). IL-18-induced CD83+CCR7+ NK helper cells. *J Exp Med* 202 (7).941-53
- Mandelboim, O., Lieberman, N. et al.** (2001). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409 (6823).1055-60
- Manning, J., Indrova, M. et al.** (2008). Induction of MHC class I molecule cell surface expression and epigenetic activation of antigen-processing machinery components in a murine model for human papilloma virus 16-associated tumours. *Immunology* 123 (2).218-27

- Margot, J. B., Cardoso, M. C. et al.** (2001). Mammalian DNA methyltransferases show different subnuclear distributions. *J Cell Biochem* 83 (3).373-9
- Martin-Fontecha, A., Thomsen, L. L. et al.** (2004). Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 5 (12).1260-5
- Mattoon, D. R., Lamothe, B. et al.** (2004). The docking protein Gab1 is the primary mediator of EGF-stimulated activation of the PI-3K/Akt cell survival pathway. *BMC Biol* 2 24
- Mayer, B., Funke, I. et al.** (1990). Expression of the CD6 T lymphocyte differentiation antigen in normal human brain. *J Neuroimmunol* 29 (1-3).193-202
- Mayo, L. D., Seo, Y. R. et al.** (2005). Phosphorylation of human p53 at serine 46 determines promoter selection and whether apoptosis is attenuated or amplified. *J Biol Chem* 280 (28).25953-9
- Meng, X. W., Chandra, J. et al.** (2003). Central role of Fas-associated death domain protein in apoptosis induction by the mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor CI-1040 (PD184352) in acute lymphocytic leukemia cells in vitro. *J Biol Chem* 278 (47).47326-39
- Meyaard, L., Adema, G. J. et al.** (1997). LAIR-1, a novel inhibitory receptor expressed on human mononuclear leukocytes. *Immunity* 7 (2).283-90
- Milella, M., Kornblau, S. M. et al.** (2001). Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest* 108 (6).851-9
- Mistry, A. R. and O'Callaghan, C. A.** (2007). Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D. *Immunology* 121 (4).439-47
- Morandi, B., Bougras, G. et al.** (2006). NK cells of human secondary lymphoid tissues enhance T cell polarization via IFN-gamma secretion. *Eur J Immunol* 36 (9).2394-400
- Moretta, A., Bottino, C. et al.** (2002). What is a natural killer cell? *Nat Immunol* 3 (1).6-8
- Moretta, A., Bottino, C. et al.** (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 19 197-223
- Moretta, L., Mingari, M. C. et al.** (1996). The molecular basis of natural killer (NK) cell recognition and function. *J Clin Immunol* 16 (5).243-53
- Morimoto, C., Rudd, C. E. et al.** (1988). 2H1--a novel antigen involved in T lymphocyte triggering. *J Immunol* 140 (7).2165-70
- Mortusewicz, O., Schermelleh, L. et al.** (2005). Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (25).8905-9
- Mrozek, E., Anderson, P. et al.** (1996). Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 87 (7).2632-40
- Nagler, A., Lanier, L. L. et al.** (1990). Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16-natural killer cells in vivo. *J Exp Med* 171 (5).1527-33
- Nakajima, H., Samaridis, J. et al.** (1999). Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor gamma-chain. *J Immunol* 162 (1).5-8
- Nan, X., Ng, H. H. et al.** (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393 (6683).386-9

- Nattermann, J., Nischalke, H. D. et al.** (2005). The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytotoxicity mediated by natural killer cells. *Am J Pathol* 166 (2).443-53
- Navarro, F., Llano, M. et al.** (1999). The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur J Immunol* 29 (1).277-83
- Nie, Y., Yang, G. et al.** (2001). DNA hypermethylation is a mechanism for loss of expression of the HLA class I genes in human esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis* 22 (10).1615-23
- Nitta, T., Yagita, H. et al.** (1989). Involvement of CD56 (NKH-1/Leu-19 antigen) as an adhesion molecule in natural killer-target cell interaction. *J Exp Med* 170 (5).1757-61
- Okano, M., Bell, D. W. et al.** (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99 (3).247-57
- Okano, M., Xie, S. et al.** (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 19 (3).219-20
- Okano, M., Xie, S. et al.** (1998). Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 26 (11).2536-40
- Oppenheim, D. E., Roberts, S. J. et al.** (2005). Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat Immunol* 6 (9).928-37
- Ottaviani, C., Nasorri, F. et al.** (2006). CD56brightCD16(-) NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation. *Eur J Immunol* 36 (1).118-28
- Panka, D. J., Wang, W. et al.** (2006). The Raf inhibitor BAY 43-9006 (Sorafenib) induces caspase-independent apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res* 66 (3).1611-9
- Paolini, R., Molfetta, R. et al.** (2001). Ubiquitination and degradation of Syk and ZAP-70 protein tyrosine kinases in human NK cells upon CD16 engagement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (17).9611-6
- Parham, P.** (2006). Taking license with natural killer cell maturation and repertoire development. *Immunol Rev* 214 155-60
- Pende, D., Parolini, S. 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 (10).1505-16
- Peterson, C. L. and Workman, J. L.** (2000). Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr Opin Genet Dev* 10 (2).187-92
- Phillips, W. A., St Clair, F. et al.** (1998). Increased levels of phosphatidylinositol 3-kinase activity in colorectal tumors. *Cancer* 83 (1).41-7
- Plaza-Menacho, I., Mologni, L. et al.** (2007). Sorafenib functions to potently suppress RET tyrosine kinase activity by direct enzymatic inhibition and promoting RET lysosomal degradation independent of proteasomal targeting. *J Biol Chem* 282 (40).29230-40

- Pradhan, S., Bacolla, A. et al.** (1999). Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem* 274 (46).33002-10
- Quilliam, L. A., Khosravi-Far, R. et al.** (1995). Guanine nucleotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins. *Bioessays* 17 (5).395-404
- Radaev, S., Motyka, S. et al.** (2001). The structure of a human type III Fcγ receptor in complex with Fc. *J Biol Chem* 276 (19).16469-77
- Raffaghello, L., Prigione, I. et al.** (2004). Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia* 6 (5).558-68
- Rajagopalan, S., Bryceson, Y. T. et al.** (2006). Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. *PLoS Biol* 4 (1).e9
- Raulet, D. H.** (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 3 (10).781-90
- Raulet, D. H. and Vance, R. E.** (2006). Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* 6 (7).520-31
- Repasky, G. A., Chenette, E. J. et al.** (2004). Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol* 14 (11).639-47
- Rhee, I., Bachman, K. E. et al.** (2002). DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 416 (6880).552-6
- Rhee, I., Jair, K. W. et al.** (2000). CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature* 404 (6781).1003-7
- Ries, S., Biederer, C. et al.** (2000). Opposing effects of Ras on p53: transcriptional activation of mdm2 and induction of p19ARF. *Cell* 103 (2).321-30
- Ritz, U., Momburg, F. et al.** (2001). Deficient expression of components of the MHC class I antigen processing machinery in human cervical carcinoma. *Int J Oncol* 19 (6).1211-20
- Roberts, P. J. and Der, C. J.** (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26 (22).3291-310
- Robertson, K. D.** (2001). DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 20 (24).3139-55
- Robertson, K. D., Ait-Si-Ali, S. et al.** (2000). DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* 25 (3).338-42
- Robertson, K. D., Uzvolgyi, E. et al.** (1999). The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res* 27 (11).2291-8
- Robertson, K. D. and Wolffe, A. P.** (2000). DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* 1 (1).11-9
- Robertson, M. J.** (2002). Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol* 71 (2).173-83

- Robertson, M. J., Caligiuri, M. A. et al.** (1990). Human natural killer cell adhesion molecules. Differential expression after activation and participation in cytotoxicity. *J Immunol* 145 (10).3194-201
- Robertson, M. J., Cameron, C. et al.** (1999). Immunological effects of interleukin 12 administered by bolus intravenous injection to patients with cancer. *Clin Cancer Res* 5 (1).9-16
- Robertson, M. J., Soiffer, R. J. et al.** (1992). Response of human natural killer (NK) cells to NK cell stimulatory factor (NKSF): cytotoxic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF. *J Exp Med* 175 (3).779-88
- Robinson, J., Waller, M. J. et al.** (2003). IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Res* 31 (1).311-4
- Romagnani, C., Juelke, K. et al.** (2007). CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol* 178 (8).4947-55
- Rountree, M. R., Bachman, K. E. et al.** (2000). DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* 25 (3).269-77
- Rozakis-Adcock, M., Fernley, R. et al.** (1993). The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* 363 (6424).83-5
- Salih, H. R., Rammensee, H. G. et al.** (2002). Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 169 (8).4098-102
- Satoh, T., Endo, M. et al.** (1990). Platelet-derived growth factor stimulates formation of active p21ras.GTP complex in Swiss mouse 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (15).5993-7
- Saulquin, X., Gastinel, L. N. et al.** (2003). Crystal structure of the human natural killer cell activating receptor KIR2DS2 (CD158j). *J Exp Med* 197 (7).933-8
- Schleypen, J. S., Baur, N. et al.** (2006). Cytotoxic markers and frequency predict functional capacity of natural killer cells infiltrating renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 12 (3 Pt 1).718-25
- Schreck, R. and Rapp, U. R.** (2006). Raf kinases: oncogenesis and drug discovery. *Int J Cancer* 119 (10).2261-71
- Seliger, B.** (2008). Molecular mechanisms of MHC class I abnormalities and APM components in human tumors. *Cancer Immunol Immunother*
- Shiroishi, M., Tsumoto, K. et al.** (2003). Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (15).8856-61
- Singer, N. G., Fox, D. A. et al.** (2002). CD6: expression during development, apoptosis and selection of human and mouse thymocytes. *Int Immunol* 14 (6).585-97
- Singer, N. G., Richardson, B. C. et al.** (1996). Role of the CD6 glycoprotein in antigen-specific and autoreactive responses of cloned human T lymphocytes. *Immunology* 88 (4).537-43

- Sirim, P., Zeitlmann, L.et al.** (2001). Calcium signaling through the beta 2-cytoplasmic domain of LFA-1 requires intracellular elements of the T cell receptor complex. *J Biol Chem* 276 (46).42945-56
- Sivori, S., Parolini, S.et al.** (2000). 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation. *Eur J Immunol* 30 (3).787-93
- Sivori, S., Parolini, S.et al.** (2000). Involvement of natural cytotoxicity receptors in human natural killer cell-mediated lysis of neuroblastoma and glioblastoma cell lines. *J Neuroimmunol* 107 (2).220-5
- Sivori, S., Pende, D.et al.** (1999). NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol* 29 (5).1656-66
- Spada, F., Haemmer, A.et al.** (2007). DNMT1 but not its interaction with the replication machinery is required for maintenance of DNA methylation in human cells. *J Cell Biol* 176 (5).565-71
- Stark, M. A., Huo, Y.et al.** (2005). Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 22 (3).285-94
- Stark, S. and Watzl, C.** (2006). 2B4 (CD244), NTB-A and CRACC (CS1) stimulate cytotoxicity but no proliferation in human NK cells. *Int Immunol* 18 (2).241-7
- Takai, D. and Jones, P. A.** (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (6).3740-5
- Tang, K. F., He, C. X.et al.** (2008). Induction of MHC class I-related chain B (MICB) by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biochem Biophys Res Commun* 370 (4).578-83
- Tate, P. H. and Bird, A. P.** (1993). Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 3 (2).226-31
- Tomita, Y., Marchenko, N.et al.** (2006). WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem* 281 (13).8600-6
- Trahey, M. and McCormick, F.** (1987). A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* 238 (4826).542-5
- Trepel, F.** (1974). Number and distribution of lymphocytes in man. A critical analysis. *Klin Wochenschr* 52 (11).511-5
- Ulbrecht, M., Rehberger, B.et al.** (1994). HLA-G: expression in human keratinocytes in vitro and in human skin in vivo. *Eur J Immunol* 24 (1).176-80
- Unni, A. M., Bondar, T.et al.** (2008). Intrinsic sensor of oncogenic transformation induces a signal for innate immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (5).1686-91
- Vales-Gomez, M., Chisholm, S. E.et al.** (2008). Selective induction of expression of a ligand for the NKG2D receptor by proteasome inhibitors. *Cancer Res* 68 (5).1546-54
- Valiante, N. M., Uhrberg, M.et al.** (1997). Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 7 (6).739-51

- van Biesen, T., Hawes, B. E. et al.** (1995). Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature* 376 (6543).781-4
- Venkataraman, G. M., Suci, D. et al.** (2007). Promoter region architecture and transcriptional regulation of the genes for the MHC class I-related chain A and B ligands of NKG2D. *J Immunol* 178 (2).961-9
- Vitale, M., Bottino, C. et al.** (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 (12).2065-72
- Vivier, E., Nunes, J. A. et al.** (2004). Natural killer cell signaling pathways. *Science* 306 (5701).1517-9
- Vivier, E., Tomasello, E. et al.** (2002). Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? *Curr Opin Immunol* 14 (3).306-11
- Vogelstein, B., Fearon, E. R. et al.** (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319 (9).525-32
- Vogelstein, B. and Kinzler, K. W.** (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9 (4).138-41
- Waldhauer, I. and Steinle, A.** (2006). Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res* 66 (5).2520-6
- Weaver, C. T., Harrington, L. E. et al.** (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 24 (6).677-88
- Westermann, J. and Pabst, R.** (1992). Distribution of lymphocyte subsets and natural killer cells in the human body. *Clin Investig* 70 (7).539-44
- Wilhelm, S. M., Carter, C. et al.** (2004). BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 64 (19).7099-109
- Wu, J., Cherwinski, H. et al.** (2000). DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells. *J Exp Med* 192 (7).1059-68
- Wu, J. D., Higgins, L. M. et al.** (2004). Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer. *J Clin Invest* 114 (4).560-8
- Wu, Y., Mehew, J. W. et al.** (2001). Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene* 20 (2).240-51
- Yamamoto, K., Fujiyama, Y. et al.** (2001). Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochim Biophys Acta* 1526 (1).10-2
- Yamashita, S., Tsujino, Y. et al.** (2006). Chemical genomic screening for methylation-silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray. *Cancer Sci* 97 (1).64-71
- Yoder, J. A. and Bestor, T. H.** (1998). A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. *Hum Mol Genet* 7 (2).279-84

- Yoder, J. A., Walsh, C. P.et al.** (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 13 (8).335-40
- Yokoyama, W. M. and Kim, S.** (2006). Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol Rev* 214 143-54
- Young, N. T., Canavez, F.et al.** (2001). Conserved organization of the ILT/LIR gene family within the polymorphic human leukocyte receptor complex. *Immunogenetics* 53 (4).270-8
- Yu, C., Bruzek, L. M.et al.** (2005). The role of Mcl-1 downregulation in the proapoptotic activity of the multikinase inhibitor BAY 43-9006. *Oncogene* 24 (46).6861-9
- Yu, H., Fehniger, T. A.et al.** (1998). Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood* 92 (10).3647-57
- Zhou, B. P., Liao, Y.et al.** (2001). HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 3 (11).973-82
- Zimmerman, A. W., Joosten, B.et al.** (2006). Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T-cell proliferation induced by dendritic cells. *Blood* 107 (8).3212-20
- Zompi, S., Hamerman, J. A.et al.** (2003). NKG2D triggers cytotoxicity in mouse NK cells lacking DAP12 or Syk family kinases. *Nat Immunol* 4 (6).565-72

H Anhang

1 Oberflächenexpression der Kolon-Karzinom-Zelllinien

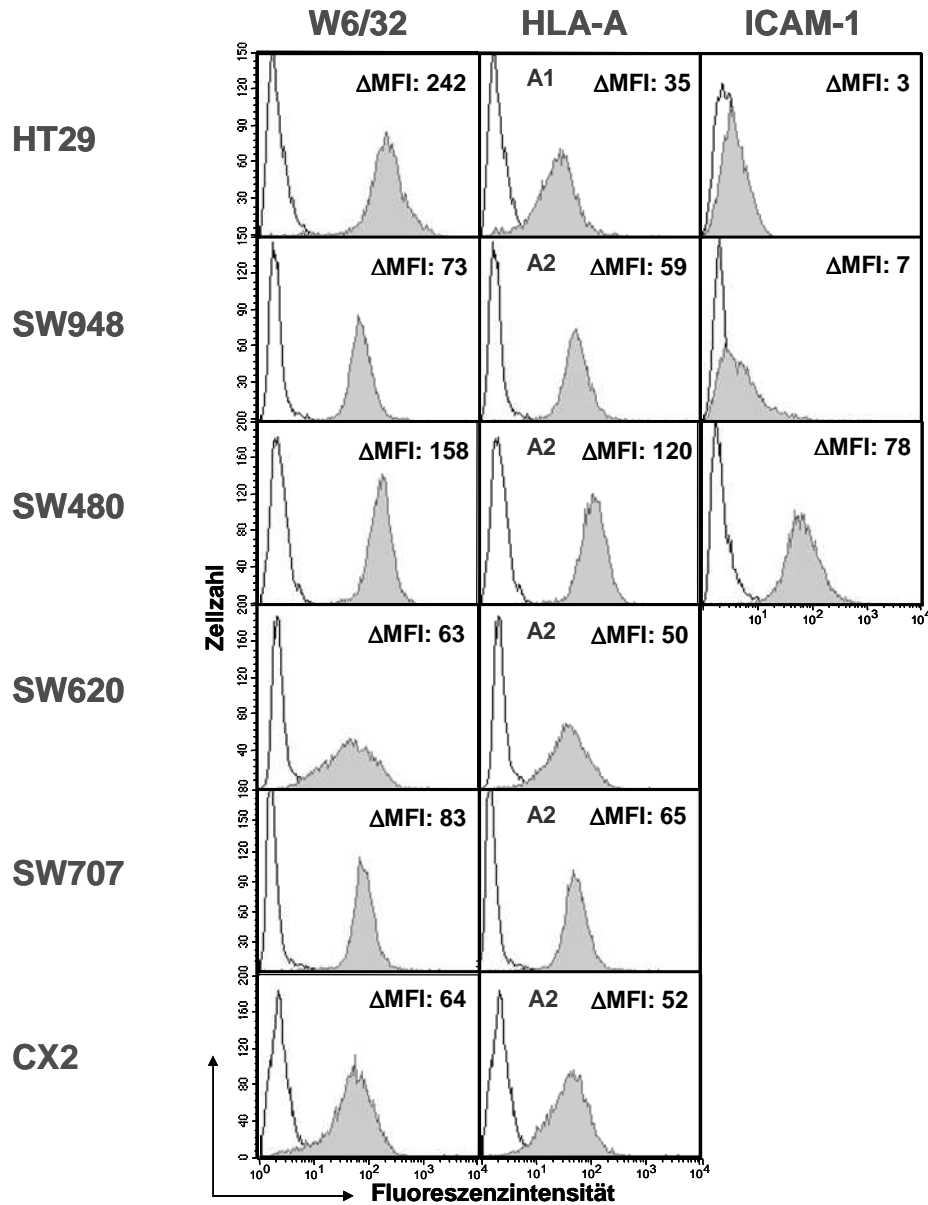


Abb. 60 Oberflächenexpression von HLA-Klasse-I-Molekülen und ICAM-1 in Kolon-Karzinom-Zelllinien.

Alle Zellen, mit Ausnahme der HT29-Linie, exprimieren HLA-A2, HT29 besitzt das HLA-A1-Allel. Die graue Kurve zeigt die Expression des spezifischen Markers, die schwarze ungefüllte Kurve stellt die Isotypkontrolle dar. Angegeben ist der Δ MFI: MFI (spezifischer Antikörper) – MFI (Isotypkontrolle), gezeigt ist eines von > 5 repräsentativen Experimenten.

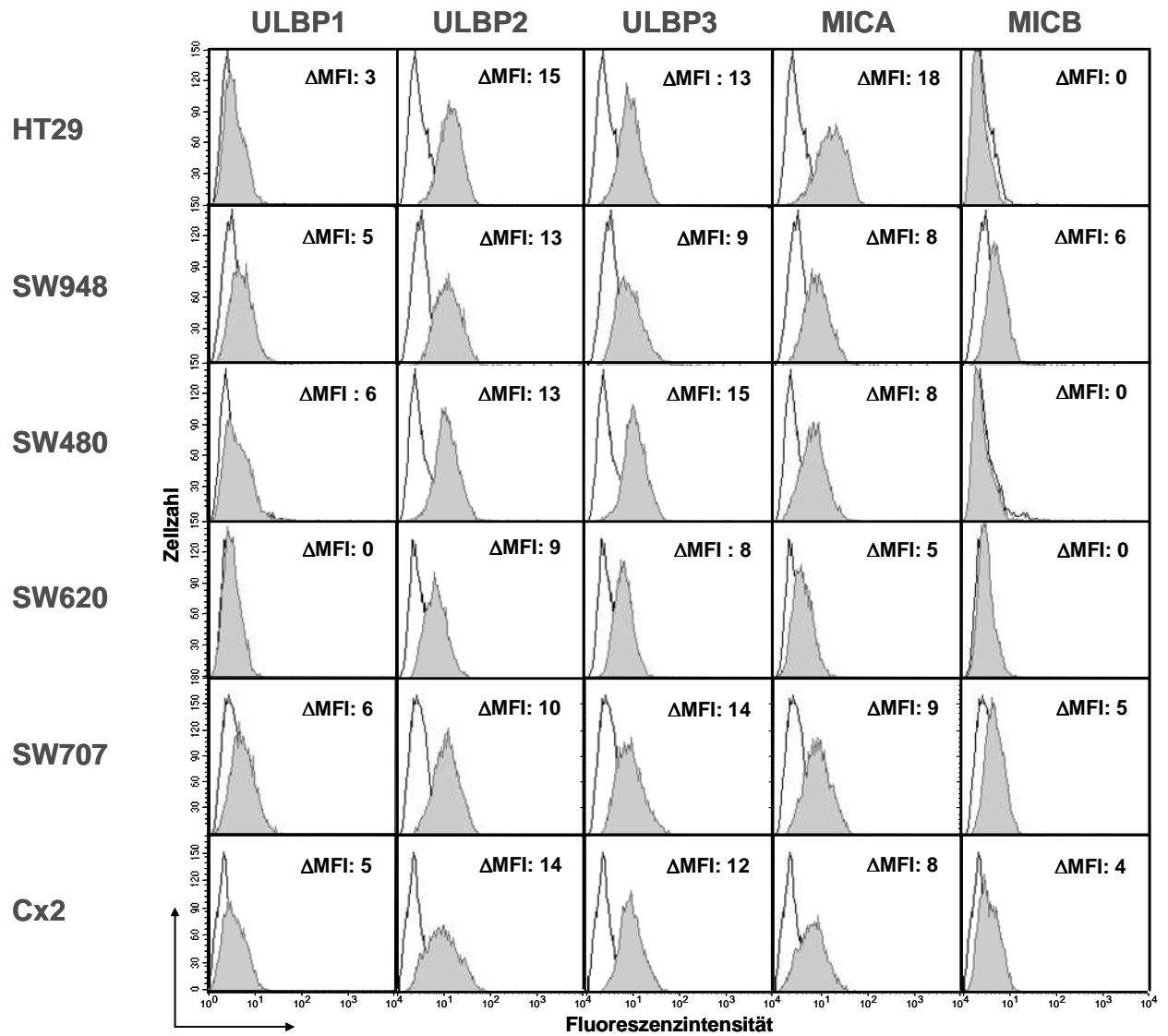


Abb. 61 Oberflächenexpression der Liganden des aktivierenden NK-Rezeptors NKG2D auf Kolon-Karzinom-Zellen.

Die graue Kurve zeigt die Expression des spezifischen Markers, die schwarze ungefüllte Kurve zeigt die Isotypkontrolle. Angegeben ist der Δ MFI: MFI (spezifischer Antikörper) - MFI (Isotypkontrolle), dargestellt ist eines von mehr als 5 repräsentativen Experimenten.

2 Promotor-Analysen in HCT116-Zellen

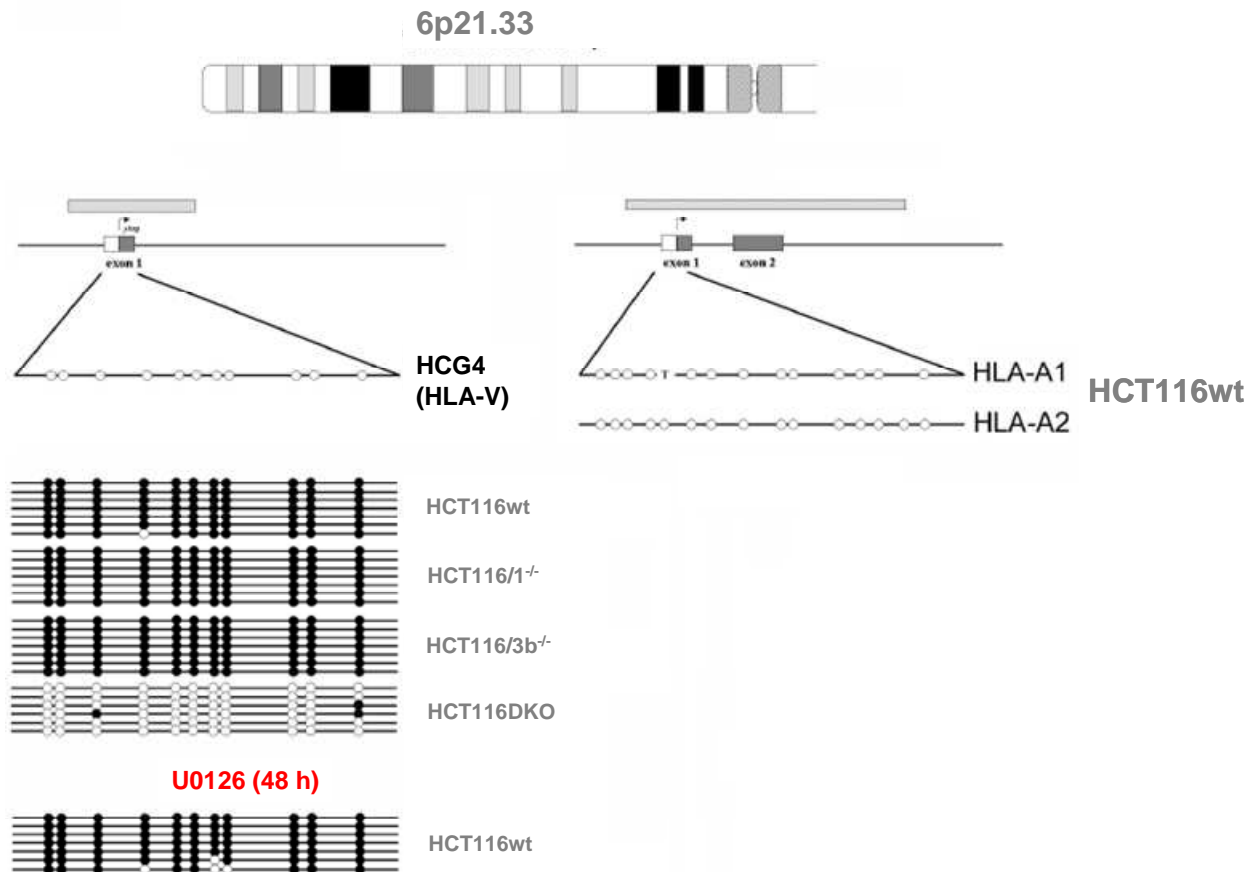


Abb. 62 Schematische Darstellung des CpG-Methylierungsstatus der HLA-A1- und -A2-Promotoren bzw. des HCG4-Promotors auf Chromosom 6p21.33 in HCT116-Zellen.

Analyse des Methylierungsstatus der CpG-Dinukleotide im HLA-A1- und HLA-A2-Promotor bzw. im Promotor des Pseudogens *HCG4* auf Chromosom 6p21.33 durch Sequenzierung des entsprechenden Bereichs nach Bisulfit-Behandlung. Die ungefüllten Kreise stellen dabei die einzelnen unmethylierten CpGs dar, die schwarzen Kreise zeigen eine CpG-Methylierung an. Die HCT116wt-Zellen wurden 48 h mit U0126 behandelt (10 μ M) und die CpG-Methylierung im HCG4-Promotor analysiert. (Abb. Sers et al.; Manuskript eingereicht).

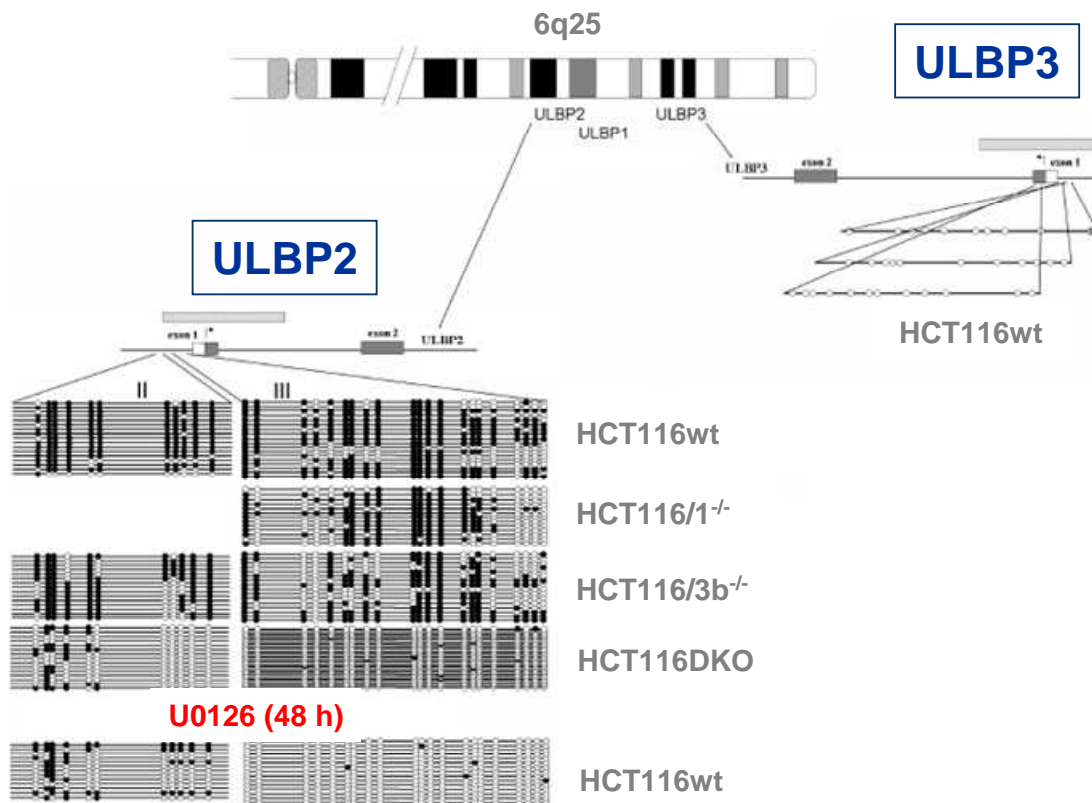


Abb. 63 Schematische Darstellung des CpG-Methylierungsstatus der ULBP2- und ULBP3-Promotorbereiche auf Chromosom 6q25.1 in HCT116-Zellen.

Analyse des Methylierungsstatus der CpG-Dinukleotide im ULBP2-(Region II und III) und ULBP3-Promotorbereich auf Chromosom 6q25.1 in HCT116-Zellen durch Sequenzierung des entsprechenden Bereichs nach Bisulfit-Behandlung. Die ungefüllten Kreise stellen dabei die einzelnen unmethylierten CpGs dar, die schwarzen Kreise stehen für methylierte CpGs. Der analysierte ULBP3-Promotorbereich ist bereits in HCT116wt-Zellen vollständig unmethyliert. Wohingegen der ULBP2-Promotor methyliert ist. Für ULBP2 ist zusätzlich die Analyse der CpG-Methylierung nach 48 h U0126-Behandlung (10 μ M) in HCT116wt-Zellen dargestellt, die zu einem fast vollständigen Verlust der Methylierung führt (Abb. Sers et al.; Manuskript eingereicht).

3 Einfluss der Inhibitoren auf Signalmoleküle in HCT116-Zellen

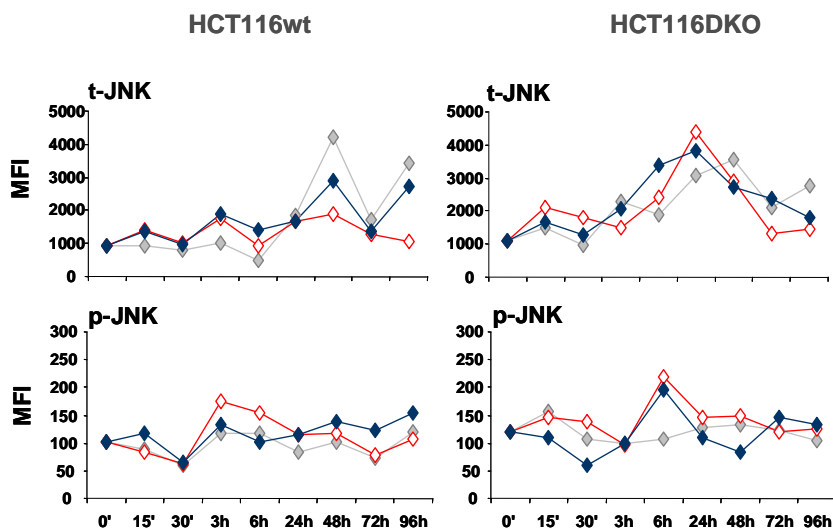


Abb. 64 Kinetik der Gesamtmenge und der phosphorylierten Form von JNK nach Inhibitor-Behandlung der HCT116wt- und DKO-Zelllinie.

Links sind die HCT116wt-Zellen dargestellt, rechts die HCT116DKO-Zellen, wobei jeweils die Total-Kinase-Mengen und die Menge der phosphorylierten Form der JNK (T^{183}/Y^{185}) gezeigt sind. Die Semiquantifizierung ist als Mittlere-Fluoreszenz-Intensität (MFI) angegeben. Die Lysate wurden auf eine Konzentration von 350 $\mu\text{g/ml}$ (wt) bzw. 400 $\mu\text{g/ml}$ (DKO) eingestellt. Die Zellen wurden mit U0126 (rot, 20 μM), Sorafenib (blau, 5 μM) und DMSO als Kontrolle behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten die Lysate hergestellt. Nach 48 h erfolgte ein Mediumwechsel, da die Inhibitoren bei 37°C relativ instabil sind.

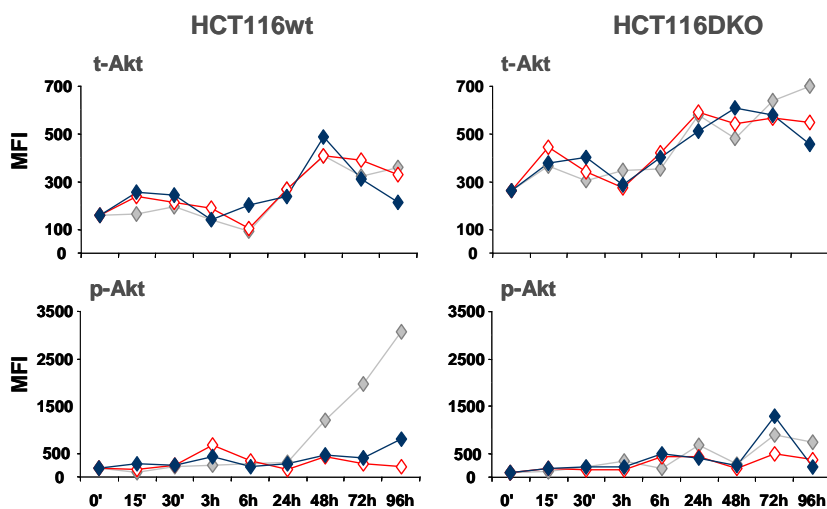


Abb. 65 Kinetik der Gesamtmenge und der phosphorylierten Form der Akt-Kinase nach Inhibitor-Behandlung der HCT116wt- und DKO-Zelllinie.

Links sind die HCT116wt-Zellen dargestellt, rechts die HCT116DKO-Zellen, wobei jeweils die Total-Kinase-Mengen und die Menge der phosphorylierten Form der Akt-Kinase (Ser^{473}) gezeigt sind. Die Semiquantifizierung ist als Mittlere-Fluoreszenz-Intensität (MFI) angegeben. Die Lysate wurden auf eine Konzentration von 350 $\mu\text{g/ml}$ (wt) bzw. 400 $\mu\text{g/ml}$ (DKO) eingestellt. Die Zellen wurden mit U0126 (rot, 20 μM), Sorafenib (blau, 5 μM) und DMSO als Kontrolle behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten die Lysate hergestellt. Nach 48 h erfolgte ein Mediumwechsel, da die Inhibitoren bei 37°C relativ instabil sind.

4 Berechnung der NK-Zell-Degranulation unter Berücksichtigung der CD56- und CD16-Oberflächenexpression

Im Folgenden ist exemplarisch an einem Spender die korrekte Berechnung der degranulierenden CD56^{bright}/CD16⁻-NK-Zellen, unter Berücksichtigung der CD16-Modulation in Folge der Degranulation und der durch IL-2-Aktivierung gesteigerten CD56-Expression, dargestellt (Tabelle 7 und Abb. 66).

Tabelle 7 Korrekte Berechnung des Anteils der CD56^{bright}/CD107a⁺ NK-Zellen

1	Bestimmung des Anteils der CD56^{bright}-NK-Zellen an den Gesamt-NK-Zellen aus Ansatz ohne Zielzelle			6,6 %
2	Bestimmung der spontanen Degranulation der CD56 ^{bright} -NK-Zellen aus Ansatz ohne Zielzelle	CD56 ^{bright} CD107a ^{pos} CD16 ^{neg}		0,9 %
3	Berechnung der potentiell reaktionsfähigen CD56 ^{bright} -NK-Zellen	CD56 ^{bright} CD107a ^{neg} CD16 ^{neg}	6,6 % - 0,9 %	5,7 %
4	Bestimmung der CD107a-positiven CD56^{bright} und CD56^{dim}IL-2 aus Ansatz mit K-562	CD56 ^{bright} CD107a ^{pos} CD16 ^{neg}		5,1 %
5	Bestimmung der CD107a-negativen CD56 ^{bright} -NK-Zellen aus Ansatz mit K-562	CD56 ^{bright} CD107a ^{neg} CD16 ^{neg}		1,8 %
6	Berechnung des Anteils der degranulierten CD56^{bright}-NK-Zellen nach Zielzellkontakt	CD56 ^{bright} CD107a ^{pos} CD16 ^{neg}	5,7 % - 1,8 %	3,9 %
7	Berechnung des Anteils der degranulierten CD56^{dim}IL-2-NK-Zellen	CD56 ^{dim} IL-2 CD107a ^{pos} CD16 ^{neg}	5,1 % - (3,9 % + 0,9%)	0,3 %

In Schritt 1 bis 3 wird der korrekte Anteil tatsächlich reaktionsfähiger CD56^{bright}-NK-Zellen bestimmt, indem von dem prozentualen Anteil der CD56^{bright}/CD16⁻-NK-Subpopulation in den unstimulierten, also ohne Zielzelle inkubierten, NK-Zellen (6,6 %), die spontan bereits degranulierten CD56^{bright}-NK-Zellen (0,9 %) abgezogen werden. Da noch kein Zielzellkontakt stattgefunden hat, sind die CD56^{dim}IL-2-NK-Zellen noch durch ihre CD16-Expression zu identifizieren. Der tatsächliche Anteil der CD56^{bright}-NK-Zellen, die nach Zielzellkontakt degranulieren ist unter Punkt 6 berechnet, wobei die nach Zielzellkontakt immer noch CD107a-negativen CD56^{bright}-NK-Zellen von den potentiell reaktionsfähigen CD56^{bright}-NK-Zellen aus Punkt 3 abgezogen werden. Dieser Wert (3,9 %) ist dann in Abb. 66C dargestellt (blau). Der Anteil der degranulierten CD56^{dim}IL-2-NK-Zellen ist unter Punkt 7 berechnet. Dazu wird der Anteil der tatsächlichen CD107a⁺/CD56^{bright}-NK-Zellen aus Punkt 6 und der spontan bereits degranulierten CD56^{bright}-NK-Zellen aus Punkt 2 von den gesamt

CD107a⁺/CD56^{bright}-NK-Zelle aus Punkt 4 abgezogen. Dieser Anteil (0,3 %) wird zu den CD56^{dim}/CD107a⁺-Zellen dazugerechnet und erscheint daher nicht als Wert in Abb. 66.

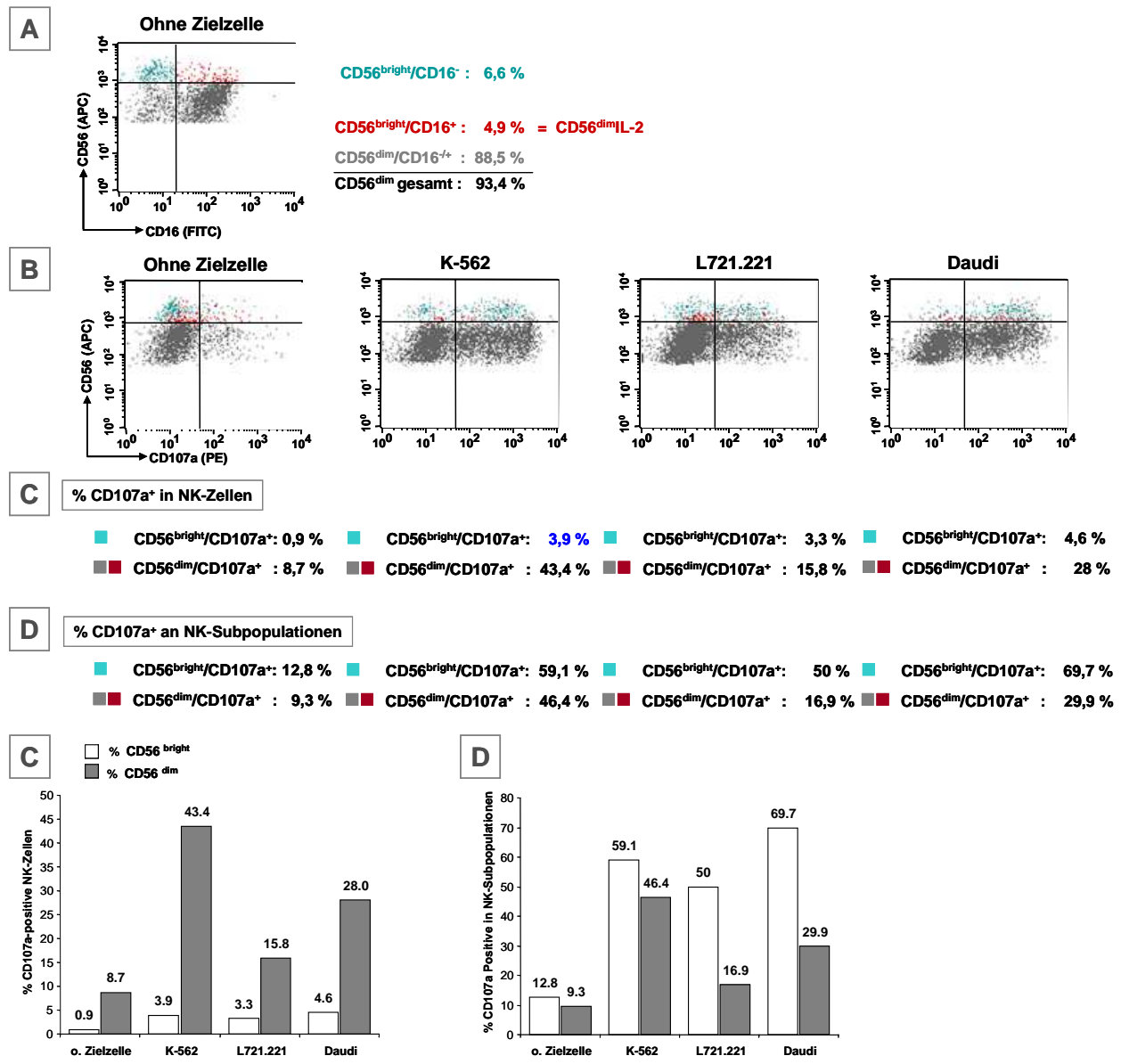


Abb. 66 Quantifizierung der degranulierenden NK-Subpopulationen unter Berücksichtigung der CD16-Modulation und der CD56^{dim}IL-2-Population.

Dargestellt sind IL-2-aktivierte NK-Zellen (48 h, 500 U/ml). **A** CD56/CD16-Verteilung nach 4 h Inkubation ohne Zielzelle. **B** NK-Zellen nach 4 h Inkubation ohne bzw. mit HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen nach ihrer CD56/CD107a-Expression aufgetragen. **C** Prozentualer Anteil der CD107a⁺-Zellen an den Gesamt-NK-Zellen (+ Balkendiagramm). **D** Prozentualer Anteil der CD107a⁺-Zellen an der jeweiligen NK-Subpopulation (+ Balkendiagramm).

Abb. 66A zeigt die CD56/CD16-Verteilung der NK-Zellen nach 48 h IL-2-Aktivierung, wobei die CD56^{bright}-NK-Population blau und die CD56^{dim}IL-2-Population rot markiert ist. Diese NK-Zellen sind unter Beibehaltung des Farbkodes in Abb. 66B nach ihrer CD56- und CD107a-Expression aufgetragen, einmal ohne Zielzelle als Kontrolle für die spontane Degranulation, und daneben nach vierstündiger Inkubation mit drei HLA-Klasse-I-negativen

Zielzellen. Darunter ist der prozentuale Anteil der CD107a⁺-Zellen bezogen auf die Gesamtheit der NK-Zellen angegeben (Abb. 66C). Dabei wurden die degranulierten CD56^{dim}IL-2-NK-Zellen bereits wie Tabelle 7 gezeigt zu der CD56^{dim}-Subpopulation dazugerechnet. Die drei HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen werden unterschiedlich gut von den Subpopulationen erkannt, wobei L721.221-Zellen die Degranulation beider NK-Populationen am schlechtesten stimulieren, gefolgt von Daudi und K-562. Da sich die prozentualen Angaben der CD107a⁺-Zellen auf die NK-Gesamtheit beziehen, und die CD56^{bright}-NK-Zellen in diesem Fall nur 6,6 % ausmachen, ist eine Angabe der CD107a⁺-NK-Zellen im Bezug auf die entsprechende NK-Subpopulation viel aussagekräftiger. Diese Werte sind unter Abb. 66D dargestellt. Dabei wurde der prozentuale Anteil der beiden NK-Subpopulation als jeweils 100 % angenommen und daraus der prozentuale Anteil der CD107a⁺-Zellen berechnet. Beide Angaben sind auch als Balkendiagramme dargestellt (Abb. 66C und D). Bei Angabe der CD107a⁺-Zellen in den NK-Subpopulationen in Abb. 66D wird deutlich, dass CD56^{bright}-NK-Zellen zu einem viel höheren Prozentsatz degranulieren und dass das Verhältnis von CD107a⁺/CD56^{bright}- zu CD107a⁺/CD56^{dim}-NK-Zellen für die verschiedenen Zielzellen variiert. Aus dieser komplizierten Auswertung geht eindeutig hervor, dass sowohl CD56^{dim}- als auch CD56^{bright}-NK-Zellen nach Stimulation mit HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen degranulieren. Darüber hinaus entscheidet die Zielzelle über die Beteiligung der beiden NK-Populationen an der Degranulation mit.

5 Rezeptorspezifische Zytokinproduktion von NK-Zellen

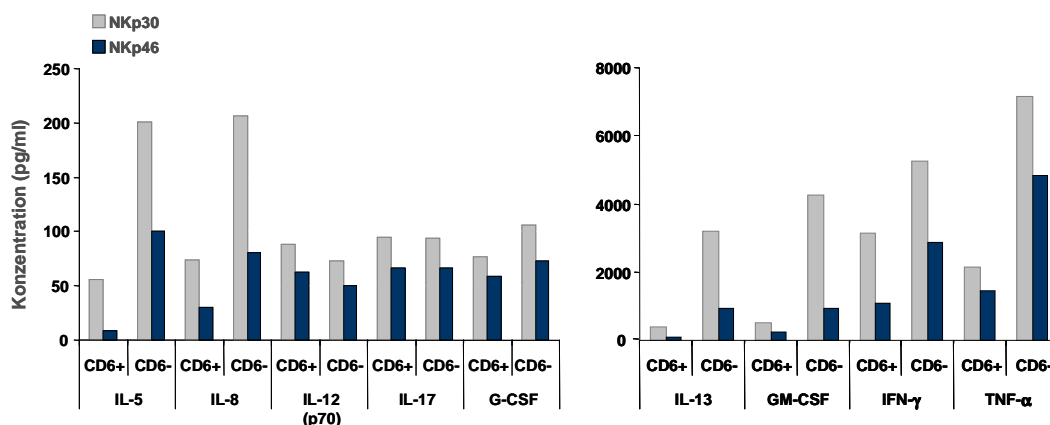


Abb. 67 Zytokinproduktion IL-2-aktivierter CD6⁺- und CD6⁻-NK-Zellen nach 96 h Stimulation von NKp30 und NKp46. NK-Zellen (Spender #11), mit einer Reinheit von 97 % (CD3⁺/CD56⁺), wurden nach Separation in CD6⁺- und CD6⁻-Fraktionen 96 h mit Platten-gekoppelten mAK (1 µg) gegen die aktivierenden NK-Rezeptoren NKp30 und NKp46 und mit 100 U/ml IL-2 stimuliert und die Zytokin/Chemokinfreisetzung im Zellkulturüberstand im Multiplex-Verfahren quantifiziert (pg/ml). Dabei wurden für jeden Ansatz 150.000 NK-Zellen der jeweiligen Fraktion in 200 µl Medium eingesetzt. Dargestellt sind nur diejenigen Zytokine, die durch die Rezeptor-Aktivierung über das Niveau der Isotypkontrolle induziert wurden (vgl. Ergebnisse Abb. 50).

I Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Christine Falk bedanken, die mir dieses interessante Projekt und damit die Anfertigung dieser Doktorarbeit ermöglicht hat. Vor allem aber möchte ich mich dafür bedanken, dass ich von ihr die Begeisterung für die Wissenschaft lernen durfte. Sie hatte stets ein offenes Ohr und konnte mich auch in schwierigen Phasen immer wieder aufs Neue motivieren. Besonders möchte ich mich aber dafür bedanken, dass sie neben der Arbeit auch immer ein riesiges Interesse und Verständnis für private Dinge zeigte, was sicher nicht selbstverständlich ist!

Liebe Chris, vielen Dank für Alles!!

Mein weiterer Dank gilt Frau Prof. D. J. Schendel dafür, dass ich die ersten zwei Jahre meiner Doktorarbeit an ihrem Institut verbringen durfte. Ich möchte mich auch ganz herzlich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Immunologie für die gute Arbeitsatmosphäre bedanken, besonders aber bei Barbara Mosetter. Liebe Babs, als „Zellkultur-Neuling“ habe ich alle wichtigen Dinge von Dir gelernt, wobei mich vor allem Dein Organisationstalent beeindruckt hat, Danke!

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meiner Arbeitsgruppe bedanken, zu der Stefan Maßen, Barbara Simm, Christian Quack und seit kurzem Ludmila Umansky und Tina Lerchl gehören. Liebe Kollegen, was soll ich sagen? Danke für die tolle Atmosphäre, den Spaß und die Unterstützung, nicht nur bei der Arbeit!!

Darüber hinaus möchte ich mich bei Allen bedanken, die mich in dieser Zeit begleitet haben!

Zum Schluß möchte ich mich bei meinen Schwestern und besonders meinen Eltern bedanken. Zum einen natürlich dafür, dass ihr mir diese Doktorarbeit ermöglicht habt, zum anderen aber vor allem für Euren riesigen Rückhalt und die Unterstützung in allen Lebenslagen!!! Ihr habt mir immer das Gefühl gegeben, dass ich alles schaffen kann! Danke!!

J Lebenslauf

Name Monika Braun
Geburtsdatum 16.11.1979
Geburtsort München
Familienstand ledig
Email monika_braun79@yahoo.de

Ausbildung

09/1990 - 06/1999 Werner-Heisenberg-Gymnasium in Garching bei München
Abiturnote: 1,6

10/1999 - 12/2004 **Studium Diplom Biologie**, Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München

Abschlussnote: 1,1

Hauptfach: Genetik

Nebenfächer: Immunologie, Biochemie, Mikrobiologie

Diplomarbeit unter Anleitung von Frau Prof. B. Averhoff am Institut für Mikrobiologie und Genetik (Departement I) der LMU „Identifizierung und Charakterisierung von Komponenten des Konjugationsapparates des linearen Plasmides pBD2 in *Rhodococcus erythropolis* BD2“

04/2005 – heute

Promotion

Helmholtz Zentrum München, Prof. Dr. Schendel

Institut für Molekulare Immunologie (04/2005 – 03/2007),

und NCT Heidelberg, AG Immunmonitoring (04/2007- heute)

Betreuerin: PD Dr. C.S. Falk

Thema: „Einfluss des onkogenen RAS-Signalweges auf die Tumorerkennung durch zytotoxische T-Lymphozyten und NK-Zellen“.

- Teilnahme** **“Spring School on Immunology”**
der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Ettal, 2006
„Autumn School Epigenetics“
Charité, Humboldt Universität Berlin, 2007
- Posterpräsentation** **Hengstenberger Symposium “Natural Killer Cells”**
Heidelberg, 2006
10th Meeting of the Society for Natural Immunity
Cambridge, 2007
Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie
Heidelberg, 2007
Luminex “Planet xMAP Europe Seminar”
Amsterdam, 2007
- Vortrag** **Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie**
Heidelberg, 2007
- Lehrgänge** Rhetorik Vortragscoaching
Statistik Fortbildung in S-Plus
- Sprachen** Englisch (fließend), Französisch (sehr gute Kenntnisse)
- Publikationen** von Geldern M, Simm B, **Braun M**, Weiss EH, Schendel DJ,
Falk CS. *TCR-independent cytokine stimulation induces non-
MHC-restricted T cell activity and is negatively regulated by
HLA class I*. Eur J Immunol. 2006 Sep;36(9):2347-58

Sers C, Kuner R, Falk C, Lund P, Sueltmann H, **Braun M**,
Buness A, Ruschhaupt M, Conrad J, Mang-Fatehi S, Stelniec I,
Krapfenbauer U, Poustka A, Schäfer R. *Downregulation of HLA
class I and NKG2D ligands through a concerted action of MAPK
and DNA methyltransferases in colorectal cancer cells*.
Manuskript eingereicht.

Simm B, **Braun M**, Witt M, Gruber R, Marintschev I, Schendel DJ, Marticke J, Hofmann GO, Falk CS. *The Th17 response dominates the hierarchy of the synovial cytokine/chemokine patterns that discriminate autoimmune rheumatic arthritis from non-autoimmune osteoarthritis and correlates with the selective infiltration of CD56^{bright} CD6⁻ synovial NK cells.* Manuskript in Vorbereitung.

Erklärung

Hiermit versichere ich ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde.

München, 31.07.2008
