
**Induktion der nicht-MHC-restringierten T-Zell-Aktivität
durch T-Zell-Rezeptor-unabhängige Zytokinstimulation und
negative Regulation durch HLA-Klasse-I-Moleküle**

Marion von Geldern



München 2005

**Induktion der nicht-MHC-restringierten T-Zell-Aktivität
durch T-Zell-Rezeptor-unabhängige Zytokinstimulation und
negative Regulation durch HLA-Klasse-I-Moleküle**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Aus dem Institut für Molekulare Immunologie
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
unter der Leitung von
Frau Prof. Dr. D. J. Schendel

Betreuerin Dr. C. S. Falk
Institut für Molekulare Immunologie
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

vorgelegt von Marion Andrea von Geldern
am 30.09.2004

<u>Erstgutachter:</u>	Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß
<u>Zweitgutachter:</u>	Herr Prof. Dr. Thomas Cremer
<u>Mitgutachter:</u>	Herr Prof. Dr. Dirk Eick Herr Prof. Dr. Matthias Starck
<u>Dissertation eingereicht am:</u>	30.09.2004
<u>Tag der mündlichen Prüfung:</u>	04.03.2005

Für Hans, Lilian und Anja von Geldern

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG	1
<hr/>	
1. Natürliche-Killerzellen und ihre Regulation durch HLA-Klasse-I-Moleküle	1
1.2 CD4 ⁺ und CD8 ⁺ klassische T-Lymphozyten	4
1.3 Nicht-MHC-restringierte Zytotoxizität von T-Zellen	5
1.4 Inhibierende und Aktivierende Rezeptoren	7
1.5 Aufgabenstellung	14
B. MATERIAL	15
<hr/>	
1. Geräte	15
2. Chemikalien	17
3. Verbrauchsmaterial Molekularbiologie	19
3.1 RNS Isolierung und Reverse Transkription	19
3.2 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)	19
3.3 Gelelektrophorese	21
3.4 Isolierung von Nukleinsäuren aus dem Agarosegel	21
3.5 Klonierung der extrazellulären Domänen des 2B4-Rezeptors	22
4. Verbrauchsmaterial Biochemie	23
4.1 Protein Expression und Aufreinigung	23
4.1.1 Proteinexpression	23
4.1.2 Aufreinigung der Einschlusskörper	24
4.2 Proteinrückfaltung	25
4.2.1 In vitro Biotinylierung	26
4.2.2 Streptavidin-Bindungstest	26
4.2.3 Western-Analysen	26
4.3 Multiplex Protein-Analysen	27
5. Verbrauchsmaterial Zellkultur	27
6. Verbrauchsmaterial Allgemein	30

INHALTSVERZEICHNIS

7. Zellen	31
7.1 Zelllinien	31
7.2 Spender Blut	34
8. Antikörper	35
8.1 Primärantikörper	35
8.2 Sekundärantikörper	36
9. Personen- und Firmenverzeichnis	37
C. METHODEN	40
1. Methoden der Molekularbiologie	40
1.1 mRNA Isolierung	40
1.2 Reverse Transkription	41
1.3 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)	41
1.4 Gelelektrophorese	42
1.5 Isolierung von Nukleinsäuren aus dem Agarosegel	43
1.6 Klonierung von PCR-Produkten in den pET23a Vektor	43
1.6.1 TA-Klonierung	44
1.6.2 Klonierung in den pET23a Vektor	46

2. Methoden der Biochemie	48
2.1 Proteinexpression und Aufreinigung	48
2.1.1 Miniproteinexpression	48
2.1.3 Aufreinigung der Einschlusskörper	50
2.2 Proteinrückfaltung	52
2.2.1 Faltung	52
2.2.2 Aufreinigung des gefalteten Proteins	52
2.2.3 <i>In vitro</i> -Biotinylierung	53
2.2.4 Reinigung der biotinylierten Proteine über eine FPLC	53
2.2.5 Streptavidin-Bindungstest	54
2.3 Western Blot-Analyse	54
2.4 Multiplex-Protein-Analysen	55
2.4.1 Allgemein	55
2.4.2 Durchführung	56
2.4.3 Auswertung	57
3. Methoden der Zellkultur	57
3.1 Allgemeine Bedingungen der Zellkultivierung	57
3.2 Isolierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)	57
3.3 Bestimmung der Zellzahl	58
3.4 Einfrieren von Zellen	58
3.5 Auftauen von Zellen	59
3.6 Kultivierung adhärenter Zellen	59
3.7 Kultivierung nicht adhärenter Zellen	60
3.8 Kultivierung von T- und NK-Zellen	60
3.9 Separation verschiedener Zellpopulationen	60
4. Durchflusszytometrie	61
4.1 Allgemein	61
4.2 Direkte Färbungen	62
4.3 Indirekte Färbungen	62
4.4 Intrazelluläre Färbung	63

5. Chromfreisetzungstest	63
5.1 Behandlung der Zielzellen	63
5.2 Direkte zellvermittelte Lyse	64
5.3 Redirigierte Lyse	64
5.4 Messung und Auswertung	65
<u>D. ERGEBNISSE</u>	<u>66</u>
1. Isolierte T-Zellen zeigen nicht-MHC-restringierte Zytotoxizität, die durch HLA-Klasse-Ia und -Ib Moleküle inhibiert wird	66
2. Die HLA-Klasse-I-vermittelte Inhibition gereinigter CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ist nicht abhängig von der Expression bekannter inhibitorischer Rezeptoren	79
2. Die HLA-Klasse-I-vermittelte Inhibition gereinigter CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ist nicht abhängig von der Expression bekannter inhibitorischer Rezeptoren	80
3. NKG2D, 2B4 und DNAM-1 induzieren in NK-ähnlichen T-Zellen weder Zytotoxizität noch Zytokinsekretion	84
3. NKG2D, 2B4 und DNAM-1 induzieren in NK-ähnlichen T-Zellen weder Zytotoxizität noch Zytokinsekretion	85
4. Die Oberflächenexpression der IR und AR korreliert nicht immer mit der Expression auf mRNA-Ebene	88
5. Tetramer-Herstellung des AR 2B4	98
6. NK-ähnliche Aktivität der T-Zellen kann durch IL-2 oder IL-15 in Abwesenheit anderer Rezeptor-abhängiger Signale induziert werden	106
7. CD8⁺ aber nicht CD4⁺ NK-ähnliche T-Zellen exprimieren intrazellulär Perforin	112
8. NK-ähnliche T-Zellen sezernieren ein breites Spektrum an Zytokinen	114

E. DISKUSSION	121
1. Nicht-MHC-restringierte Aktivität NK-ähnlicher T-Zellen und Inhibition durch HLA-Klasse-Ia und -Ib Moleküle	122
2. Expressionsmuster und Funktionalität bekannter inhibitorischer und aktivierender Rezeptoren auf NK-ähnlichen T-Zellen	125
3. Stimulation der NK-ähnlichen T-Zellen durch IL-2 oder IL-15 in niedriger Dosis und in Abwesenheit von Lektin.	128
4. Perforin-Expression CD8 ⁺ NK-ähnlicher T-Zellen	130
5. Zytokinsekretion der NK-ähnlichen T-Zellen	131
6. NK-ähnliche T-Zellen und ihre Bedeutung für die Tumorthherapie	132
F. ZUSAMMENFASSUNG	133
G. REFERENZEN	136
H. DANKSAGUNG	152
I. ANHANG	154

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AICD	Aktivierungsinduzierter Zelltod (<i>activation induced cell death</i>)
APC	Allophycocyanin
AR	aktivierender Rezeptor
B-LCL	lymphoblastoide (EBV-transformierte) B-Zelllinie
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	ungefähr
CD	Differenzierungsantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNS	zur mRNA komplementäre (<i>complementary</i>) DNS
CML	Chromfreisetzungstest (<i>cell mediated lympholysis</i>)
⁵¹ Cr	radioaktives Chromisotop
CTL	zytotoxische T-Zelle (<i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Didesoxy-Nukleotid-tri-Phosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Di-Natriummethylenediamintetraacetat
E:T	Effektor-zu-Zielzell-Ratio (<i>effector cell to target cell ratio</i>)
FACS	fluoreszenzaktiviertes Zellsortiergerät (Durchflußzytometer)
FBS	fötale Rinderserum
FSC	Vorwärts-Streulicht (<i>forward scatter</i>)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm
HLA	humane Leukozytenantigene
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILT	Ig-ähnliche Transkripte
IR	Inhibierender Rezeptor
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-enthaltendes aktivierendes Motiv (<i>immunoreceptor tyrosin-based activating motif</i>)
ITIM	Immunrezeptor Tyrosin-enthaltendes inhibierendes Motiv (<i>immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif</i>)
kb	Kilobasenpaare
kD	kiloDalton
KIR	Killerzell Immunglobulin-Rezeptor (<i>killer cell immunglobulin receptor</i>)
LRC	Leukozyten-Rezeptor-Komplex (<i>leucoyte receptor complex</i>)
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
mAk	monoklonale Antikörper
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
NCR	Natürliche-Zytotoxizitätsrezeptor (<i>natural cytotoxicity receptor</i>)
NK	Natürliche Killerzelle
NKC	Natürliche-Killerzell-Komplex (<i>natural killer cell complex</i>)

ABKÜRZUNGEN

mRNS	Boten-RNS (<i>messenger-RNS</i>)
OD	optische Dichte
PBL	Lymphozyten des peripheren Blutes
PBMC	Periphere Blut-mononukleäre Zellen
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PHA	Phytohämagglutinin (Lektin)
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
POX	Peroxidase
RCC	Nierenzellkarzinom (<i>renal cell carcinoma</i>)
RPMI	Medium (<i>Rosewell Park Memorial Institut</i>)
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
SSC	Seitwärts-Streulicht (<i>side scatter</i>)
Strep	Streptavidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCGF	T-Zell-Wachstumsfaktor (<i>T cell growth factor</i>)
TH-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
TZR	T-Zellrezeptor
u.a.	unter anderem
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>unit</i>)
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
z. B.	zum Beispiel

A. EINLEITUNG

1. Natürliche-Killerzellen und ihre Regulation durch HLA-Klasse-I-Moleküle

Interessante Entdeckungen in den letzten Jahren haben ergeben, dass die Grenzen zwischen angeborener und spezifischer Immunantwort nicht statisch sind. Die beiden Systeme beeinflussen sich gegenseitig, um eine Immunantwort zu optimieren, und Zellen aus dem Antigen-spezifischen Weg sind in der Lage in beiden Systemen mitzuwirken. Natürliche Killer (NK)-Zellen prägen neben anderen Zellen, wie Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen oder Granulozyten, das Bild der angeborenen Immunität. Es handelt sich hierbei um Zellen, die sofort auf Angriffe auf den Organismus reagieren können. NK-Zellen sind große granuläre Lymphozyten, die aus einer hämatopoetischen Stammzelle unter anderem im Thymus entstehen [Colucci *et al.* 2003]. Sie exprimieren keinen T-Zell-Rezeptor (TZR), sondern werden über inhibierende (IR) und aktivierende (AR) Rezeptoren reguliert. NK-Zellen können durch Zytokine, wie Interleukin (IL)-2, IL-12, IL-15, IL-18, Interferon (IFN)- α und IFN- β aktiviert werden und sezernieren selbst eine Vielfalt an Zytokinen und Chemokinen, wie z.B. IFN- γ , den Tumornekrosefaktor (TNF)- α und den Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) [Moretta 2002]. Im Zentrum der Regulation der NK-Zellen stehen die humanen Leukozyten-Antigene (HLA). HLA-Moleküle werden in dem Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC), der auf Chromosom 6 lokalisiert ist, kodiert. Sie lassen sich in zwei Klassen unterteilen: HLA-Klasse-I-Moleküle präsentieren intrazelluläre Antigene in Form von Nonamerpeptiden, die aus endogenen Proteinen, einschließlich normalen Zellproteinen stammen sowie endogene virale oder tumorassoziierte Antigene beinhalten können [Dunlop *et al.* 1977, Rammensee 1995]. HLA-Klasse-II-Moleküle hingegen präsentieren 12-14 Aminosäuren lange Peptide extrazellulärer Antigene, wie Bakterien oder Toxine, die erst durch Endozytose aufgenommen werden müssen [Germain 1986]. HLA-Klasse-I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen, Klasse-II-Moleküle dagegen nur von immunregulatorischen Zellen, wie antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cell*, APC), z.B. Dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen sowie aktivierten T-Zellen,

exprimiert. In der vorliegenden Arbeit spielen ausschließlich HLA-Klasse-I-Moleküle eine Rolle, da nur für diese eine Bedeutung für die NK-Zellregulation bekannt ist [Lanier 1998, Moretta *et al.* 2000b, Vivier *et al.* 2004]. Strukturell bestehen HLA-Klasse-I-Moleküle aus einer schweren Kette mit drei extrazellulären Domänen, einer Transmembranregion und einem kurzen zytoplasmatischen Teil [Janeway, Jr. *et al.* 2004]. Die schwere Kette assoziiert nicht-kovalent mit β 2-Mikroglobulin (β_2m), das selbst keinen Transmembranbereich besitzt. Humane Vertreter der MHC-Moleküle sind die klassischen HLA-Klasse-Ia-Moleküle, HLA-A, -B, und -C, von denen jeweils bis zu 60 Allele bekannt sind [Parham *et al.* 1996]. Die zweite Gruppe bilden die HLA-Klasse-Ib-Moleküle HLA-E, -F und -G. HLA-G Moleküle werden beispielsweise während der Embryonalentwicklung auf Amnionzellen [Houlihan *et al.* 1995] und auf Plazentagewebe exprimiert [Yelavarthi *et al.* 1991], wodurch der Fötus vor dem Immunsystem der Mutter geschützt wird [Le *et al.* 1999]. Darüber hinaus kann HLA-G auch auf anderen Geweben exprimiert sein, wobei die genaue Rolle in der Interaktion des HLA-G-exprimierenden Gewebes mit dem Immunsystem nicht endgültig geklärt ist [Wiendl *et al.* 2000, Carosella *et al.* 2001, Wiendl *et al.* 2002, Wiendl *et al.* 2003, Hofmeister *et al.* 2003, Ulbrecht *et al.* 2004]. Während die zentrale Rolle der HLA-Klasse-I-Moleküle als Liganden für spezifische T-Lymphozyten seit Jahrzehnten bekannt ist [Dunlop *et al.* 1977], hat sich ihre Bedeutung für die Regulation von NK-Zellen erst in den letzten Jahren herauskristallisiert.

Ljunggren und Kärre postulierten 1990 die *missing self*-Hypothese, wonach NK-Zellen alle Zielzellen lysieren können, die keine HLA-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche exprimieren. Eine Expression der HLA-Klasse-I-Moleküle verleiht dagegen Resistenz gegen die Zytotoxizität der NK-Zellen [Ljunggren *et al.* 1990]. Karlhofer *et al.* entdeckten zwei Jahre später den ersten murinen MHC-spezifischen inhibitorischen NK-Rezeptor (IR) (Ly-49) auf NK-Zellen, über den diese abgeschaltet werden können [Karlhofer *et al.* 1992]. Auf humanen NK-Zellen entdeckte man ebenfalls eine Reihe von IR, die unter anderem spezifisch für bestimmte HLA-Klasse-I-Allele sind [Moretta *et al.* 2000a]. Die Inhibition durch HLA-Klasse-I-Moleküle repräsentiert allerdings nur die negativ-regulatorische Seite der NK-Funktion. Die positive Seite wird durch die Expression aktivierender Rezeptoren (AR) dargestellt. Die Aktivierung bzw. Inhibition einer NK-Zelle ergibt sich aus dem Gleichgewicht der aktivierenden bzw. inhibierenden Signale über diese Rezeptoren [Moretta *et al.*

1996a, Lanier 1998, Long 1999, Ravetch *et al.* 2000]. Diese Dichotomie beeinflusst die NK-Regulation sowohl auf qualitativem (Expressionsmuster) als auch auf quantitativem Niveau (Expressionsstärke). Exprimiert die NK-Zelle also mehr aktivierende als inhibitorische Rezeptoren auf der Oberfläche oder exprimiert die Zielzelle mehr Liganden für AR als für IR wird die NK-Zelle stimuliert und kann die betreffende Zielzelle eliminieren.

HLA-Klasse-I-Moleküle zeigen den immunologischen Status jeder Körperzelle an: im Normalzustand werden Selbst-Peptide aus zelleigenen Proteinen im HLA-Klasse-I-Kontext präsentiert. Gegen diese Selbst-Komplexe sind die T-Zellen durch die vorangegangene Selektion im Thymus tolerant. Sobald eine Zelle jedoch viral infiziert oder tumorigen verändert ist, präsentiert sie auch virale bzw. tumorassoziierte Antigene im Kontext mit HLA-Klasse-I auf der Oberfläche. Durch diese Veränderung werden zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic T lymphocytes*, CTL) aktiviert und attackieren bzw. zerstören die Zielzelle. Bei einigen Tumoren bzw. Virus-infizierten Zellen ist interessanterweise eine Verminderung der HLA-Klasse-I-Oberflächenexpression zu beobachten, so dass solche Tumorzellen von CTL nicht mehr erkannt werden können und somit ihrer Entdeckung durch das Immunsystem zu entkommen versuchen [Natali *et al.* 1989, Pantel *et al.* 1991, Alcami *et al.* 2000, Seliger *et al.* 2002, Falk *et al.* 2002a]. Möglicherweise können in solchen Situationen NK-Zellen oder Effektorzellen mit NK-ähnlichen Eigenschaften aktiv werden, da diese gerade nicht auf die Anwesenheit von HLA-Peptidkomplexen angewiesen sind, sondern im Gegenteil gemäß der *missing self*-Hypothese sogar Zellen mit verminderter HLA-Klasse-I-Expression besser erkennen können. Durch die fehlende Inhibition werden NK- oder NK-ähnliche Zellen also aktiviert und können diese Tumorzellen eliminieren.

1.2 CD4⁺ und CD8⁺ klassische T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind immer durch die Expression des TZR/CD3-Komplexes charakterisiert. Im Falle dieser Lymphozyten prägen ihre Rezeptoren (TZR/CD3) sowie die Qualität und Quantität der aktivierenden Signale über diese Erkennungsstrukturen entscheidend ihre Funktionalität und Reaktivität. Klassische T-Zellen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: T-Helfer-Zellen exprimieren das CD4-Glykoprotein als Korezeptor mit dem TZR/CD3-Komplex, der in Kombination mit CD4 als Rezeptor für HLA-Klasse-II-Moleküle fungiert. Zytotoxische T-Zellen exprimieren dagegen das CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer im Kontext mit dem TZR/CD3-Komplex; diese Kombination dient als Rezeptor für HLA-Klasse-I-Moleküle. Durch die differenzielle Präsentation und Erkennung unterschiedlicher Antigene über HLA-Klasse-I- und -II-Moleküle wird eine „intelligente“ Immunabwehr ermöglicht: CD8⁺ CTL erkennen und eliminieren Körperzellen mit intrazellulären Pathogenen sowie Tumorzellen, deren Antigene als Peptide auf den HLA-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden. CD4⁺ T-Helfer-Zellen werden dagegen durch HLA-Klasse-II/Peptid-Komplexe stimuliert, die extrazelluläre Antigene auf APC präsentieren. Diese T-Helfer-Zell-Stimulation resultiert in der Sekretion von Zytokinen wie IL-4 und IL-15, die wiederum antikörperproduzierende B-Zellen aktivieren und die spezifische Antikörper (Ak)-Produktion einleiten. Auch CTL benötigen zur Induktion ihrer Zytotoxizität gegen Zielzellen eine Stimulation durch T-Helfer-Zellen, z.B. durch Sekretion des Wachstumszytokins Interleukin (IL)-2. Die überwiegende Mehrheit aller T-Zellen besitzt einen TZR, der sich aus einer α - und einer β -Kette zusammensetzt ($\alpha\beta^+$ TZR), während der TZR der verbleibenden T-Zellpopulation aus einem $\gamma\delta$ -Heterodimer besteht, dessen Spezifität und Funktion noch nicht abschließend geklärt ist [Hayday *et al.* 2003]. Da $\gamma\delta$ T-Zellen eine komplett andere Regulation besitzen und sich ihr Antigen-Repertoire grundlegend von $\alpha\beta^+$ T-Zellen unterscheidet, habe ich mich in dieser Arbeit ausschließlich auf $\alpha\beta^+$ T-Zellen konzentriert.

1.3 Nicht-MHC-restringierte Zytotoxizität von T-Zellen

Der klassische Weg der Antigen-spezifischen Aktivierung von $\alpha\beta^+$ T-Zellen durch den TZR/CD3-Komplex führt zu einer spezifischen MHC-restringierten T-Zell-Aktivierung, die bei $CD4^+$ T-Zellen als Zytokinproduktion und bei $CD8^+$ CTL als Zytotoxizität messbar ist. Im Gegensatz dazu wurden experimentelle Protokolle erarbeitet, die auf eine TZR-unabhängigen Zytokin-vermittelten Aktivität aufbauen und in der Induktion einer Antigen-unabhängigen T-Zellantwort resultieren. Eine Möglichkeit der Herstellung solcher nicht-MHC-restringierter (NK-ähnlicher) T-Zellen *in vitro* ist die allogene Stimulation, also die Stimulation mit Zellen eines anderen Individuums. Durch fast jede Spenderkombination ist es möglich, alloreaktive HLA-Klasse-I/Peptid-restringierte CTL, alloreaktive NK-Zellen und NK-ähnliche T-Zellen zu induzieren. So wurde unter anderem durch unsere Arbeitsgruppe erstmals gezeigt, dass durch Alloreaktionen *in vitro* nicht-MHC-restringierte T-Zellen entstehen, die zwar einen klassischen T-Zellphänotyp aufweisen, aber wie NK-Zellen durch HLA-Klasse-I-Moleküle negativ reguliert werden [Falk *et al.* 1995, Falk *et al.* 2000, Falk *et al.* 2002c].

Die ersten Versuche, alternative Strategien der Lymphozyten-Stimulation in klinischen Studien zu verwenden wurden schon 1982, weit vor der Entdeckung der IR und AR, von Rosenberg und Mitarbeitern initiiert [Grimm *et al.* 1982, Rosenberg 1986]. Sie generierten über die Stimulation peripherer Lymphozyten mit einer hohen Dosis IL-2 und Phytohämagglutinin (PHA, ein Lektin) Lymphokin-aktivierte Killer (LAK)-Zellen und setzten sie in einem adoptiven Transfer bei Tumor-Patienten ein. Die adoptive Immuntherapie mit LAK-Zellen führte zu einer Regression der Tumore mancher Patienten, war aber meist mit hoher Toxizität, bedingt durch die systemische Gabe von IL-2 zur Erhaltung der LAK-Aktivität, verbunden. Die molekulare Basis der Variabilität der klinischen Erfolge nach einer LAK-Immuntherapie blieb lange ungeklärt. In neueren Studien wurde in unserem Labor sowie durch andere Arbeitsgruppen gezeigt, dass die Dichte der MHC-Klasse-I-Expression auf Tumorzellen ein Hauptelement der Regulation der LAK-Aktivität darstellt [Pende *et al.* 1998, Falk *et al.* 2002b]. Tumorzellen mit einer hohen MHC-Klasse-I-Expression waren gegen Zytotoxizität durch LAK-Zellen resistent, während eine Verminderung der HLA-Klasse-I-Moleküle zu einer besseren Erkennung durch LAK-Zellen führte. Diese Ergebnisse waren für NK-Zellen nicht überraschend, trafen aber nun auch auf LAK-Zellen zu, die sich zu 90-95% aus T-Zellen und zu nur 5-10% aus NK-Zellen zusammensetzten [Schendel *et al.* 2000, Falk *et al.* 2002b].

Auch neuere Studien zeigten, dass durch die Stimulation peripherer Blut-Lymphozyten (PBL) mit IL-2, IFN- γ und CD3-spezifischen Antikörpern so genannte zytokininduzierte Killer (CIK)-Zellen generiert werden können. Diese Lymphozytenpopulation, die hauptsächlich aus aktivierten T-Zellen besteht, zeigte ebenfalls nicht-MHC-restringierte Zytotoxizität gegen verschiedene Tumorzellen, eingeschlossen autologe Leukämie-Zellen [Schmidt-Wolf *et al.* 1993, Linn *et al.* 2003]. Merkmale, die nicht-MHC-restringierten T-Zellen, wie z.B. LAK- oder CIK-Zellen, gemeinsam sind, schließen zum einen die polyklonale Aktivierung über Zytokin-Rezeptoren mit oder ohne TZR-Beteiligung, die Produktion großer Mengen an Zytokinen wie IFN- γ und die MHC-Klasse-I-unabhängige Zytotoxizität ein. Diese nicht-MHC-restringierten T-Zellen haben allerdings keine Gemeinsamkeiten mit Typ I oder II NKT-Zellen, die eine eigene T-Zellpopulation darstellen und über ihre CD1d- α -Gal-Cer-Spezifität, die Expression einer invarianten V α 24-J α 18 TZR α -Kette sowie ihre Unfähigkeit, natürliche Zytotoxizität auszuüben, definiert werden [Godfrey *et al.* 2004].

In der vorgelegten Arbeit wurden erstmals von Anfang an aufgereinigte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen TZR-unabhängig über Zytokine stimuliert und zu einer nicht-MHC-restringierten Aktivität gegen HLA-Klasse-I-negative Zielzellen angeregt (im Folgenden als NK-ähnliche oder nicht-MHC-restringierte T-Zellen bezeichnet). Dies wurde durch die initiale Stimulation peripherer T-Zellen mit IL-2 oder IL-15 in An- oder Abwesenheit von Lektin erreicht. Neben IL-2 bindet auch IL-15 an Rezeptorkomplexe, welche die γ - (CD132) und die β -Kette (CD122) gemeinsam haben. Beide Zytokine induzieren auf Antigen-unabhängige Weise T-Zellproliferation und die Entwicklung von Gedächtnis-T-Zellen [Waldmann *et al.* 2001, Sallusto *et al.* 2004]. Daher wurde neben IL-2 auch IL-15 als Stimulus verwendet und so in CD4⁺- sowie CD8⁺ T-Zellen eine nicht-MHC-restringierte Zytotoxizität induziert. Für CD8⁺ NK-ähnliche T-Zellen konnte ein Effektormechanismus identifiziert werden, der mit der Zytokinstimulation korrelierte. So steigerte sich die Expression des Effektormoleküls Perforin deutlich nach Zytokinaktivierung. Dies spricht für eine Beteiligung des Moleküls an der zytotoxischen Aktivität der CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen. Perforin, das nur von CD8⁺-, aber nicht von CD4⁺ NK-ähnlichen T-Zellen exprimiert wird, vermittelt den Kontakt zur Zielzellmembran und ermöglicht es anderen Effektormolekülen, wie z.B. Granzymen, über eine induzierte Endozytose in die Zelle zu gelangen. Dort degradieren sie unter anderem die DNS der Zielzelle

[Catalfamo *et al.* 2003]. Die molekularen Grundlagen der zytotoxischen Eigenschaften von CD4⁺ NK-ähnlichen T-Zellen sind noch nicht geklärt. Bei CD4⁺ NK-ähnlichen T-Zellen haben sich Hinweise darauf ergeben, dass der CD95/FAS-Signalweg eine Rolle bei der Induktion des programmierten Zelltodes spielt.

1.4 Inhibierende und Aktivierende Rezeptoren

Der Fortschritt bei der Erforschung der NK-Zell-Regulation über aktivierende und inhibitorische Rezeptoren hat eine mögliche Beziehung zwischen NK-Zellen und nicht-MHC-restringierten T-Zellen impliziert. Die funktionellen Ähnlichkeiten zwischen NK-Zellen und nicht-MHC-restringierten T-Zellen haben die Frage aufgeworfen, ob möglicherweise die gleichen NK-Rezeptoren bei beiden Zelltypen mit NK-ähnlicher Funktion assoziiert sind. Von einigen NK-Rezeptoren wurde bereits angenommen, dass sie für TZR-unabhängige Funktionen von zytotoxischen T-Zellen verantwortlich sind [Mingari *et al.* 1995, Verneris *et al.* 2004]. AR und IR der NK-Zellen, die meist von Genen des Leukozyten-Rezeptor-Komplexes (*leukocyte receptor complex*, LRC) auf Chromosom 19 und dem Natürlichen-Killerzell-Komplex (*natural killer cell complex*, NKC) auf Chromosom 12 kodiert werden, repräsentieren daher mögliche Kandidaten für Rezeptoren, die in die Regulation Zytokin-aktivierter NK-ähnlicher T-Zellen involviert sind.

Die Charakteristika der bisher identifizierten IR sind schematisch in Abbildung A1 zusammengestellt (Übersicht im Anhang, Tab. I1.1). Die Nomenklatur der KIR-Familie wurde von André *et al.* beschrieben [André *et al.* 2001]. Die Bezeichnung orientiert sich an der Anzahl der extrazellulären Domänen (D) und der Länge des zytoplasmatischen Teils (*long*, L oder *short*, S). Die humanen IR werden in drei Familien unterteilt:

Die KIR (Killerzell-Immunglobulin-Rezeptor)-Familie setzt sich aus den langen (L) Isoformen KIR2DL und KIR3DL der CD158-Familie mit zwei bzw. drei Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen (D) zusammen. KIR mit langen zytoplasmatischen Domänen (KIRL) binden an die klassischen HLA-Klasse-Ia-Moleküle wie HLA-A, -B und -C. Der KIR2DL2-Rezeptor erkennt die Gruppe 1 der HLA-C-Moleküle, vertreten durch HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7, -Cw8 und -Cw12. Der KIR2DL1-Rezeptor erkennt die andere Gruppe repräsentiert durch HLA-Cw2, -Cw4, -Cw5 und -Cw6. Beide HLA-C-Allelgruppen unterscheiden sich in der α 1-Domäne durch den Austausch von zwei Aminosäuren an den Positionen 77 und 80 [Cicccone *et al.* 1992, Biassoni *et al.*

1995, Winter *et al.* 1998, Colonna *et al.* 2000, Natarajan *et al.* 2002]. Damit wird gewährleistet, dass für alle HLA-C-Allele ein passender Rezeptor existiert. Ein weiterer Vertreter der KIR-Familie ist KIR3DL1, dessen Spezifität für das HLA-Bw4-Molekül bekannt ist. Die HLA-Bw4- und Bw6- Allele unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz zwischen den Positionen 76 und 83 in der α 1-Domäne. Für Bw6-Allele ist jedoch noch kein spezifischer Rezeptor bekannt [Gumperz *et al.* 1997].

Die Mitglieder der C-Typ-Lektin-Rezeptoren bilden die zweite Gruppe der inhibitorischen Rezeptoren. Das Heterodimer CD94/NKG2A repräsentiert dabei den inhibitorischen Rezeptorkomplex, wobei CD94 für die Bindung an das nicht-klassische MHC-Klasse-Ib-Molekül HLA-E verantwortlich ist. NKG2A vermittelt über seine zytoplasmatische Domänenstruktur das inhibitorische Signal.

In der dritten Gruppe sind die Ig-ähnlichen Transkripte (*Ig-like transcripts*, ILT/LIR, CD85) zusammengefasst, die ebenfalls zur Ig-Superfamilie gehören. Diese Rezeptoren binden an mehrere, wenn nicht sogar an alle HLA-Klasse-Ia-Moleküle (HLA-A, -B, -C). Ihre Fein-Spezifität ist allerdings noch nicht im Detail geklärt [Fanger *et al.* 1998, Nakajima *et al.* 1999]. Ein auf NK-Zellen exprimierter Vertreter ist ILT2 (LIR-1), der unter anderem das HLA-Klasse-Ib-Molekül HLA-G zu erkennen scheint [Fanger *et al.* 1998, Lopez-Botet *et al.* 1999, Navarro *et al.* 1999, Shiroishi *et al.* 2003, Hofmeister *et al.* 2003] und neben NK-Zellen auch auf manchen T-Zellen, B-Zellen und Monozyten exprimiert sein kann.

Alle IR besitzen in ihrem langen zytoplasmatischen Teil ein Tyrosin-haltiges inhibitorisches Motiv (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*, ITIM), das durch src-Kinasen (syk und fyn) phosphoryliert wird. Dadurch werden die SHP1- und SHP2-Phosphatasen an den Rezeptorkomplex rekrutiert, die durch Dephosphorylierung der Signalkomponenten eine Abschaltung aller Effektorfunktionen bewirken [Moretta *et al.* 1996b, Long 1999, Blery *et al.* 2000, Lanier 2003]. Die Vielfalt an IR in Kombination mit ihrer unterschiedlichen Spezifität für HLA-Klasse-I-Liganden ermöglicht es z.B. NK-Zellen, geringe Unterschiede in der HLA-Klasse-I-Expression einer Zielzelle auf Allelniveau wahrzunehmen und gegebenenfalls mit einem Angriff auf veränderte Zellen zu reagieren. Durch diese Feinregulierung ist das Immunsystem in der Lage, nicht nur die Herabregulierung einzelner HLA-Klasse-I-Moleküle zu erkennen, sondern sogar zwischen einzelnen, von verschiedenen HLA-Allelen kodierten Proteinen, zu unterscheiden.

A. EINLEITUNG

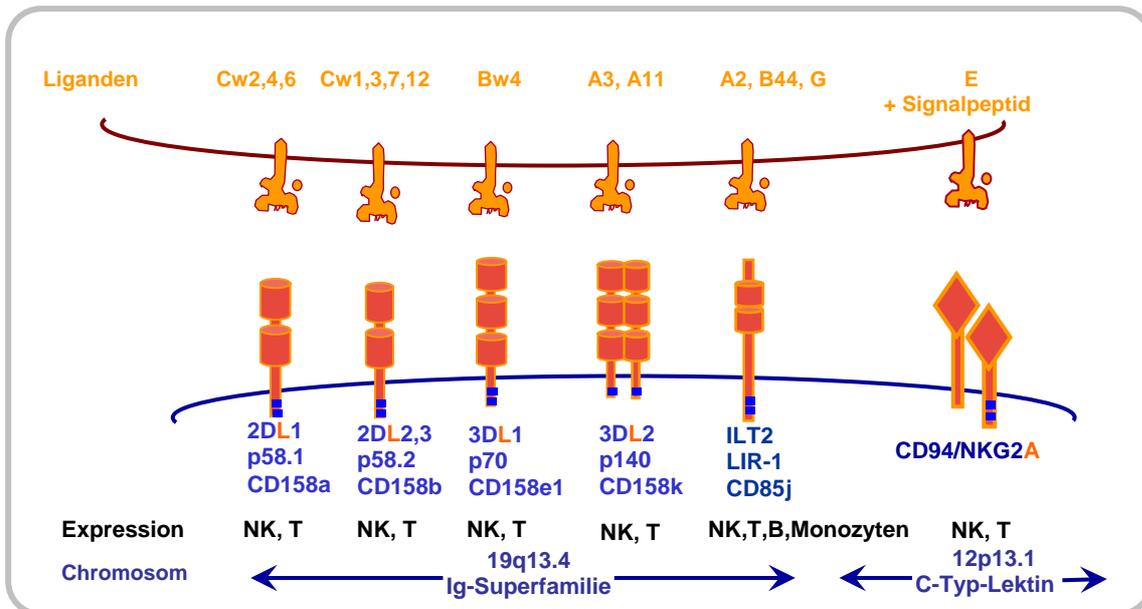


Abb. A1: Schematische Darstellung der inhibierenden Rezeptoren und ihrer Liganden. Zur KIR2/3DL- (CD158) Familie gehören die beiden KIR2DL-Rezeptoren, welche die beiden HLA-C-Gruppen erkennen und die beiden KIR3DL-Rezeptoren, die Bw4- bzw. HLA-A3,11-Moleküle binden. Zur ILT-Familie gehört ILT2, dessen Spezifität für HLA-G umstritten ist. Aus der C-Typ-Lektin-Familie ist das Heterodimer CD94/NKG2A als IR für NK- und T-Zellen bekannt, dessen Ligand HLA-E ist. In ihren langen zyttoplasmatischen Domänen befinden sich die ITIM (blaue Kästchen), über die inhibitorische Signale weitergeleitet werden.

Allein die Vielzahl an IR mit ihrer negativen Regulation verlangt nach der Existenz eines Gegengewichts in Form von AR (siehe Anhang, Tab. I1.2). AR können ebenso wie IR in verschiedene Gruppen eingeteilt werden, die sich zum Teil in denselben Familien wie die IR wieder finden. Die Charakteristika der bisher identifizierten AR sind schematisch in Abbildung A2 zusammengestellt. Bei den kurzen (S) aktivierenden Formen der CD158-Familie, KIR2DS und KIR3DS sind die extrazellulären Domänen identisch mit den inhibitorischen KIRL Isoformen, obwohl sie im LRC einen eigenen Gen-Lokus besitzen. Im Unterschied zu KIRL besitzen die aktivierenden KIR (KIRS) keine ITIM-Domäne, da sowohl die Transmembran (TM) als auch die kurzen zyttoplasmatischen Anteile der KIRS-Rezeptoren verändert sind. Die TM-Region besitzt positiv geladene Aminosäuren, welche die Bindung an Adaptermoleküle ermöglichen, die wiederum in ihrem eigenen langen zyttoplasmatischen Anteil aktivierende ITAM (*immunoreceptor tyrosin-based activating motifs*)-Domänen besitzen und positive Signale weiterleiten können [Vivier *et al.* 2004].

Aufgrund der identischen extrazellulären Domänen ist die Ligandenspezifität der aktivierenden KIRS bis auf wenige Ausnahmen identisch zur weitaus besser untersuchten KIRL-Spezifität. Bemerkenswert ist jedoch die deutlich höhere Affinität

der KIRL für ihre HLA-Klasse-Ia-Liganden im Vergleich zur Affinität der KIRS [Saulquin *et al.* 2003].

Die zweite Gruppe der AR beinhaltet die C-Typ-Lektin Rezeptoren und wird z.B. durch das Heterodimer CD94/NKG2C repräsentiert, welches das nicht-klassische HLA-E-Molekül erkennt [Lazetic *et al.* 1996, Braud *et al.* 1998, Lopez-Botet *et al.* 2000]. NKG2C unterscheidet sich von seinem inhibitorischen Pendant NKG2A ebenfalls nur im zytoplasmatischen Anteil, dem ITIM-Sequenzen fehlen. NKG2C bindet an die positiven Aminosäuren der TM-Region des Adaptermoleküls DAP12, welches die positive Signalkaskade initiiert. Das Homodimer NKG2D, das die MHC-Klasse-I-ähnlichen Moleküle MICA, MICB und ULBP 1-3 bindet, stellt einen weiteren Vertreter der C-Typ-Lektin-Familie dar [Vivier *et al.* 2002, Raulet 2003, Cerwenka *et al.* 2003]. NKG2D wird auf allen NK-Zellen und CD8⁺αβ⁺TZR und γδ⁺TZR T-Zellen exprimiert [Raulet 2003]. Dieser AR wirkt zwar auf NK-Zellen als autonomer aktivierender Rezeptor, auf T-Zellen scheint NKG2D jedoch nur kostimulierende Eigenschaften zu besitzen und alleine keine Aktivität vermitteln zu können [Zompi *et al.* 2003, Billadeau *et al.* 2003]. Im Gegensatz zu NKG2C ist NKG2D nicht an das Adaptermolekül DAP12 gekoppelt, sondern an den verwandten Adapter DAP10.

Die dritte Gruppe bildet die Familie der Natürlichen-Zytotoxizitäts-Rezeptoren (*natural cytotoxicity receptors*, NCR) [Moretta *et al.* 2001], deren Vertreter zur Ig-Superfamilie gehören. Unter ihnen befinden sich die bisher einzigen bekannten NK-Zell-spezifischen Rezeptoren. NKp46 und NKp30 werden auf allen NK-Zellen konstitutiv, NKp44 dagegen nur nach Aktivierung exprimiert [Vitale *et al.* 1998]. Die jeweilige Beteiligung dieser Rezeptoren an der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität konnte durch Blockierung der AR nachgewiesen werden. Durch Stimulation einzelner NCR mittels spezifischer Antikörper lässt sich Zytotoxizität in NK-Zellen induzieren. Die Weiterleitung der aktivierenden Signale der NCR erfolgt über die Adaptermoleküle DAP12 bzw. CD3ζ, die ITAM besitzen. Nach Aktivierung über den entsprechenden NCR werden die Tyrosinreste von Tyrosinkinasen der ZAP70/Syk-Familie phosphoryliert, wodurch die Signalkaskade initiiert und weitergeleitet wird.

Die bisher erwähnten IR und AR befinden sich im humanen Genom in zwei Genregionen. Alle Gene der KIR-Familie und der ILT-Familie [Young *et al.* 2001] sowie die Adaptermoleküle DAP10 und DAP12 sind im LRC auf Chromosom 19q13.4 kodiert. NKp46 und ein KIR-verwandter Rezeptor, LAIR-1, sind ebenfalls in dieser Gen-Region kodiert [Meyaard *et al.* 1997, Trowsdale *et al.* 2001]. Im NKC auf

Chromosom 12p13.1 sind alle Gene der C-Typ-Lektin-Familie, einschließlich der beiden Aktivierungsrezeptoren CD161 und CD69, lokalisiert [Ryan *et al.* 2001]. Neben diesen AR aus der KIR/C-Typ-Lektin- bzw. NCR-Familie wurde ein ungewöhnlicher AR aus der CD2/CD150-Familie als Korezeptor für NK- und T-Zellen identifiziert. Der Rezeptor 2B4 (CD244), dessen Ligand CD48 ist, besitzt zwei Ig-ähnliche Domänen und einen langen zytoplasmatischen Teil. Die Signalübertragung von 2B4 unterscheidet sich grundlegend von der typischen Tyrosinphosphorylierungskaskade der anderen AR. Grund dafür ist die intrazelluläre Bindungsdomäne des Adaptermoleküls SAP, die das Signal in den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Weg weiterleitet. Zudem wird 2B4 nicht im LRC oder NKC, sondern auf Chromosom 1p13 kodiert. Der Defekt des X-chromosomal lokalisierten SAP-Moleküls wurde als Ursache des X-verbundenen lymphoproliferativen (XLP)-Syndroms identifiziert, wodurch die Bedeutung SAP-verbundener Rezeptoren stark zunahm [Boles *et al.* 2001, Veillette *et al.* 2003, Romero *et al.* 2004, Veillette 2004].

Jede NK-Zelle exprimiert ein individuelles Repertoire an AR und IR und die Gesamtheit der Rezeptoren bestimmt die Aktivität und Spezifität der NK-Zelle. Die Selbst-Toleranz wird durch die Expression von jeweils mindestens einem IR gewährleistet, der spezifisch für Selbst-HLA-Klasse-I-Moleküle ist [Valiante *et al.* 1997]. NK-Zellen detektieren Zielzellen, die aufgrund einer malignen Transformation oder viralen Infektion eine aberrante HLA-Oberflächenexpression zeigen, üben sofort die Effektorfunktionen Zytotoxizität und Zytokinsekretion aus. Dabei ist beispielsweise im Falle einer Koexpression von CD94/NKG2A und CD94/NKG2C das inhibierende Signal durch NKG2A gegenüber dem aktivierenden NKG2C-Signal dominant, da NKG2A mit höherer Affinität an HLA-E bindet und eine Dephosphorylierung aller anderen AR und somit deren Abschaltung bewirkt [Augugliaro *et al.* 2003]. Die Dominanz des inhibierenden über das aktivierende Signal stellt einen wichtigen Mechanismus des Immunsystems gegen autoimmune Reaktionen dar. So werden potentiell autoreaktive NK-Zellen, die keinen HLA-B- oder -C-Liganden für einen KIR-Rezeptor vorfinden, über den CD94/NKG2A-Komplex abgeschaltet [Valiante *et al.* 1997].

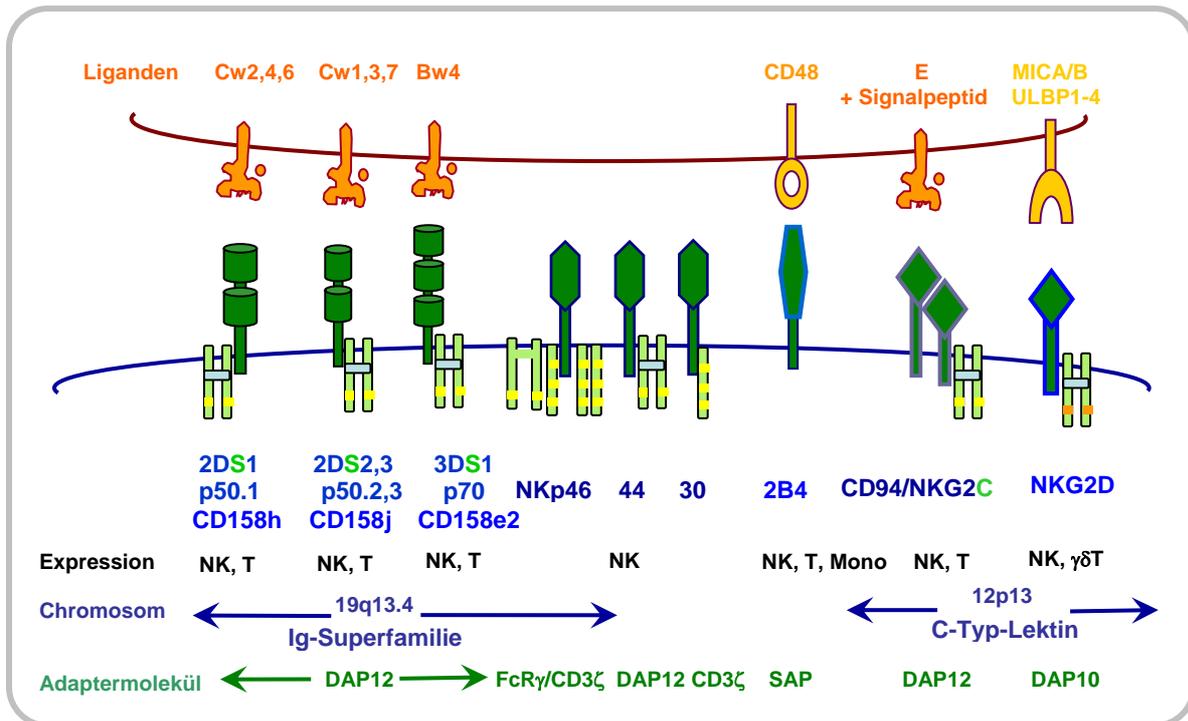


Abb. A2: Schematische Darstellung der aktivierenden Rezeptoren und ihrer Liganden. Die kurzen Isoformen der KIR2/3DS-Moleküle erkennen dieselben HLA-C- und -B-Gruppen wie ihre langen KIR2/3DL-Pendants. Da ihre kurzen intrazellulären Anteile keine Signaldomänen besitzen, wird für die positive Signaltransduktion die Hilfe von ITAM (gelbe Kästchen)-tragenden Adaptermolekülen wie CD3 ζ benötigt. CD94 bindet neben dem inhibierenden NKG2A auch den aktivierenden NKG2C-Rezeptor, der ebenso an HLA-E bindet. NKG2D signalisiert über DAP10 (PI3K Bindungsstelle, orangene Kästchen), bindet MICA/B, ULBP1-3 und fungiert als Korezeptor für CD8⁺ CTL. Der Korezeptor 2B4 erkennt den hämatopoietischen Zellmarker CD48 und signalisiert über den SAP-PI3K-Weg. Für die NKp der NCR-Familie sind bislang keine Liganden bekannt.

Die IR spielen nicht nur auf NK-ähnlichen T- oder NK-Zellen eine Rolle. Auch MHC-restringierte T-Zellen können IR exprimieren. Auf CTL wurde unter anderem nach einer Pathogeninfektion die Expression von NK-Rezeptoren der KIR-, ILT- und CD94/NKG2A-Familie detektiert [Ferrini *et al.* 1994, Mingari *et al.* 1996, Mingari *et al.* 1997a, Mingari *et al.* 1997b, Mingari *et al.* 1998a, Mingari *et al.* 1998b, Mingari *et al.* 2000]. Bei diesen T-Zellen herrscht ein Gleichgewicht zwischen den Signalen über die IR und den MHC-restringierten TZR. Bei tumorspezifischen KIR⁺ CTL wird angenommen, dass die inhibierenden Signale über die TZR-vermittelten tumorspezifischen aktivierenden Signale dominieren, womit eine effektive Tumoreliminierung verhindert wird [Guerra *et al.* 2002, Gati *et al.* 2004]. Die molekulare Basis der Induktion der IR Expression und die Funktion dieser KIR⁺ T-Zellen sind noch nicht geklärt. In Abbildung A3 ist ein Überblick über die verschiedenen Effektorzellpopulationen dargestellt.

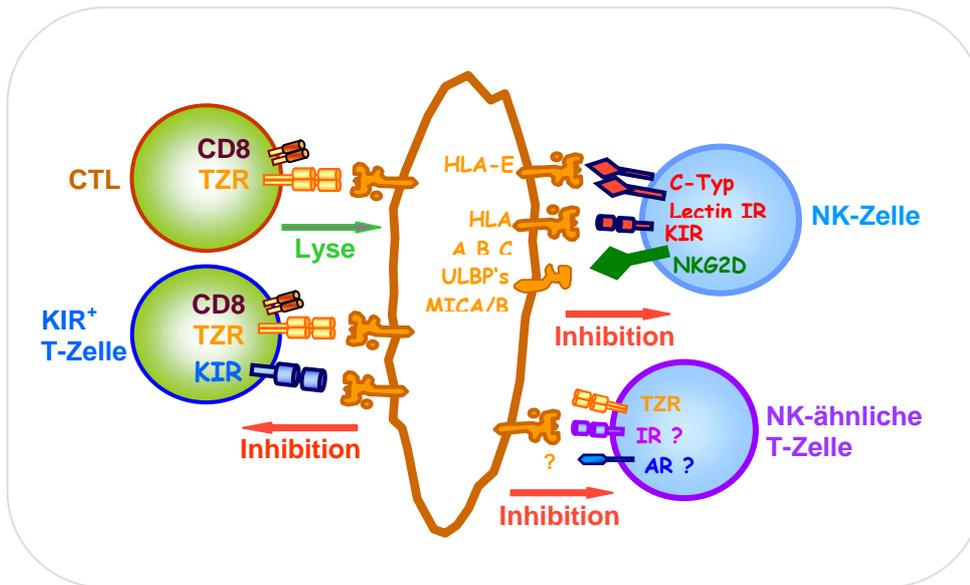


Abb. A3: Verschiedene Effektorzellpopulationen. Dargestellt sind CTL, die über den TZR an HLA-Peptid-Komplexe binden und die Zielzelle lysieren können. KIR⁺T-Zellen werden über die Bindung ihres KIR an ein HLA-Klasse-I-Molekül inhibiert. Im Falle der NK-Zellen erfolgt dann eine Inhibition, wenn inhibitorische Signale überwiegen. NK-ähnliche T-Zellen exprimieren bisher noch unbekannte IR und AR. Diese nicht-MHC-restringierten T-Zellen besitzen zwar einen funktionellen TZR, verwenden diesen aber nicht für die Lyse der Zielzellen, sondern werden über bisher unbekannte Liganden über ihre AR aktiviert und über HLA-Klasse-I-Moleküle abgeschaltet.

Neben zytotoxischen Eigenschaften sind NK-Zellen auch in der Lage, eine Reihe von Zytokinen zu sezernieren [Morris *et al.* 2004]. Auch CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnliche T-Zellen sezernieren nach Zytokinstimulation ein gemischtes Muster an TH1-verwandten Zytokinen (IL-2, IFN- γ und TNF- α) und TH2-verwandten Zytokinen (IL-5 und IL-13). Bei Immunreaktionen spielt die TH1- bzw. TH2-Polarisierung eine entscheidende Rolle für den Verlauf der Immunantwort. TH1-verwandte Zytokine stimulieren erstrangig CTL, wohingegen TH2-verwandte Zytokine (besonders IL-4 und IL-10) die Immunantwort in Richtung B-Zellantwort und Antikörperproduktion lenken. Somit könnten NK-ähnliche T-Zellen neben ihrer Zytotoxizität auch immunregulatorische Funktion besitzen und die Immunantwort zusammen mit NK-Zellen und CTL beeinflussen.

1.5 Aufgabenstellung

Im Rahmen immunologischer Therapieentwicklungen gegen solide Tumore, wie beispielsweise das Nierenzellkarzinom, gab es bereits vor einigen Jahren Versuche, zytokinstimulierte Lymphozyten als Alternative zu einer tumorspezifischen Immunisierung therapeutisch einzusetzen. Dabei wurden aus dem peripheren Blut von Patienten polyklonale Lymphozytenpopulationen mit einer hohen Dosis des Zytokins IL-2 aktiviert (Lymphokin-aktivierte Killerzellen, LAK-Zellen), die nach Rückgabe in den Patienten autologe Tumore eliminieren sollten. In vorangegangenen Arbeiten unseres Labors, wurde am Modell des Nierenzellkarzinoms und an Normal Spendern erstmals gezeigt, dass LAK-Zellen nicht wie bisher angenommen aus aktivierten NK-Zellen sondern hauptsächlich aus unspezifisch aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bestehen (90-99%). Darüber hinaus werden diese NK-ähnlichen T-Zellen über HLA-Klasse-I-Moleküle negativ reguliert, wobei die Zytotoxizität durch die Interaktion zwischen HLA-Klasse-I-Molekülen und inhibitorischen Rezeptoren abgeschaltet wird. In der vorliegenden Arbeit sollten NK-ähnliche T-Zellen detailliert charakterisiert werden. Voraussetzung dazu war zunächst die Isolierung sauberer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen aus PBMC. Des Weiteren sollte festgestellt werden, über welche HLA-Moleküle diese Zellen reguliert werden und ob für die Regulation ihrer Zytotoxizität, bereits von den NK-Zellen bekannte, inhibitorische oder aktivierende Rezeptoren exprimiert werden. In einem weiteren Punkt sollte die Zytokinsekretion der NK-ähnlichen T-Zellen überprüft werden. Bei verschiedenen Stimulationsansätzen sollte zudem untersucht werden, wodurch die nicht-MHC-restringierten Eigenschaften der T-Zellen beeinflusst werden.

Die Schwankungsbreite der klinischen Wirksamkeit einer LAK-Immuntherapie sowie die Unvorhersagbarkeit, welche Patienten von dieser LAK-Therapie profitieren würden, führte dazu, dass der adoptive Transfer von LAK-Zellen im Vergleich zu anderen immunologischen Ansätzen in den Hintergrund getreten ist. Die therapeutischen Ansätze konzentrieren sich nun verstärkt auf Immuntherapien mit spezifischen CTL. Ein großes Problem dieser Immuntherapien stellt die Entwicklung von Tumor-Varianten *in vivo* dar, die ihre HLA-Klasse-I-Oberflächenexpression herunterregulieren und somit durch zytotoxische T-Zellen nicht mehr erkannt werden können. Eine Verwendung von Lymphozyten mit NK-ähnlicher Aktivität zusätzlich zu spezifischen T-Zellen, könnte diesem Problem entgegentreten.

B. MATERIAL

1. Geräte

Gerät	Firma
Automatischer Zellsortierer autoMACS™	Miltenyi Biotech
Bakterienschüttler	Infors AG
Bestrahlungsanlage Gammacell 40	Atomic Energy of Canada
Didestilliergerät Easypure RF	Barnstead
Durchflusszytometer Luminex™	Bio-Rad
Durchflusszytometer, FACSCalibur™	Becton Dickinson
Einfrierbox	Nalgene
Eismaschine AF-30	Scotsman
Elektrophoresekammern EI19001, vertikal mit Zubehör	Novex-Invitrogen
Elektrophoresekammern, horizontal	Invitrogen
Filmentwicklungsmaschine M35 X-OMAT	Kodak
FPLC (<i>fast protein liquid chromatography</i>)	Amersham
Gefrierschrank, -20 °C	Liebherr
Gefrierschrank, -80 °C	Heraeus
Geldokumentationssystem, Syngene	VWR International
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf
Heizplatte mit Magnet	IKA-Labortechnik
Inkubationsschrank	Heraeus
Kühlschränke, 4 °C	Liebherr
Magnet	Dynal
Mehrkanalpipetten (25-200 µl)	Bibby Dunn Labortechnik GmbH
Mikropipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Gilson, Socorex
Mikroskop	Leica DMIL
Mikrowelle	SHARP
Millipore-Wasser Anlage Milli-Q	Millipore
Neubauerzählkammer	Hecht-Assistent

B. MATERIAL

pH-Meßgerät	WTW
Pipettierhilfe Pipetus-Akku	Hirschmann
PCR Gerät	Whatman Biometra
PCR Gerät	Hybaid (MWG Biotech)
Rollmischer	Coulter Electronics
Schüttler	Biotec-Fischer
Sonicator 250-D	Branson
Spannungsgerät LK3 GPS 200/400	Pharmacia
Spannungsgerät für vertikale Kammern	Novex-Invitrogen
Spektralphotometer	Amersham Biosciences
Sterilwerkbank	BDK Luft- und Klimatechnik
Stickstofftank Chronos Biosafe	Messer Griesheim
Stoppuhr	NeoLab
Vortexer VF2	IKA-Labortechnik
Waagen:	
Analysewaage	Mettler PC440
Präzisionswaage	Mettler AE166
Ultrafiltrationssystem Typ A 8400	Millipore-Amicon
Wasserbad	GFL
Zentrifugen:	
Eppendorfszentrifuge	Heraeus
Kühlzentrifuge	Heraeus
Bakterienzentrifuge IEC 6000B	Nunc
Sorvall RC-5B Zentrifuge	Sorvall
Ultrazentrifuge L8-70M	Beckman

2. Chemikalien

Chemikalie	Firma
Ampicillin	Sigma
Natrium-Azid	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma
Chloroform	Sigma
DEPC (Diethylpyrocarbonat) Wasser	Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
DTT (Dithiothreitol)	Sigma
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Sigma
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Invitrogen
Glucose	Merck
Glycerin 87%	Merck
Guanidin HCl	Sigma
Isopropanol (2-Propanol)	Sigma
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	Invitrogen
L-Lectin 100 μ g/ml	Sigma
Leupeptin	Sigma
Lysozym	Sigma
L-Gluthation oxidiert	Sigma
L-Gluthation reduziert	Sigma
L-Arginin HCl	Sigma
Magnesiumchlorid	Sigma
MES (2-N-Morpholinomethansulfonazid)	Sigma
Methanol	Merck
Paraformaldehyd	Sigma
PBS (Phosphat-gepufferte Saline)	Invitrogen
Pepstatin A	Sigma
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma

B. MATERIAL

Natrium Acetat trihydrat	Sigma
Natrium desoxycholat	Sigma
Saccharose	Sigma
TBS (Tris gepufferte Saline)	Sigma
<i>Tri Reagent</i>	MCR (<i>Molecular Research Center</i>), Inc.
Triton X-100	Sigma
TRIZMA HCl	Sigma
Trypanblau 0,4%	Invitrogen
Trypsin/ EDTA	Sigma
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Sigma
Harnstoff (Urea)	Sigma
X-Gal	Invitrogen

3. Verbrauchsmaterial Molekularbiologie

3.1 RNS Isolierung und Reverse Transkription

RNS

Tri Reagent

Chloroform

Isopropanol

Ethanol

DEPC Wasser

Reverse Transkription

dNTP-Mix 10 mM	Invitrogen
DTT 0,1 M	Invitrogen
1 st <i>strand buffer</i> 5x	Invitrogen
Oligo dT Primer 0,5 µg/µl	Invitrogen
Superscript II 200 U/ml	Invitrogen
DEPC Wasser	

3.2 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Tabelle B3.1 Verwendete Primer

Spezifität	Sense Primer (5'-3')	Antisense Primer (5'-3')	Länge bp
2DL1	GCAGCACCATGTCGCTCT	GTCACTGGGAGCTGACAC	356
2DL2	CCACTGCTTGTCTGTGCAT	CAGCATTGGAAGTTCCGC	370
2DL3	CCACTGAACCAAGCTCCG	CAGGAGACAACCTTTGGATCA	352
2DL4	CTGTCCCTGAGCTCTACAA	CACTGAGTACCTAATCACAG	541
2DL5	TGTGGTGCCTCGAGGAGGACA	GGAAGGTGGAACAGCACGTGTC TC	1307
3DL1	ACATCGTGGTCACAGGTCC	TGCGTATGTCACCTCCTC	556
3DL2	CGGTCCCTTGATGCCTGT	GACCACACGCAGGGCAG	368
2DS1	TCTCCATCAGTCGCATGAA/G	AGGGCCCAGAGGAAAGTT	313

B. MATERIAL

2DS2	TGCACAGAGAGGGGAAGTA	CACGCTCTCTCCTGCCAA	256
2DS3	TCACTCCCCCTATCAGTTT	GCATCTGTAGGTTCCCTCCT	279
2DS4	CTGGCCCTCCCAGGTCA	GGAATGTTCCGTTGATGC	450
3DS1	GGCACCCAGCAACCCCA	AAGGGCACGCATCATGGA	246
CD94	GCAGTGTTTAAGACCACTCT	CTGTTGCTTACAGATATAACG	527
NKG2A	CCAGAGAAGCTCATTGTTGG	CCAATCCATGAGGATGGTG	315
NKG2C	GGAAATATTCCAAGTAGAATTA AAT	CTGATGCACTGTAAACGCAAAT	619
NKG2E	CTGTGCTTCAAAGAACTCTTCT	CTGGTCTGATATAAGTCCACGT	225
NKG2D	CTGGGAGATGAGTGAATTTTCAT A	GACTTCACCAGTTTAAGTAAATC	416
Nkp30	TTCCGACATGGCCTGGATGCT GTTG	GATTTATTGGGGTCTTTTGAAG	608
Nkp44	CCACGAGCGCACAGGAAAAGG	TCACAAAGTGTGTTTCATCATC ATCATCGCTTATCTTAGTCC	857
Nkp46	CTGAGCGATGTCTTCCACAC	CCGCCCAGGCTCAACACC	984
Nkp80	ACTCACATTGAAGATGCAAGAT G	GCTAGACCAGTGTGCGATGATGG	856
DAP10	ATGATCCATCTGGGTCACATC	TCAGCCCCTGCCTGGCAT	285
DAP12	TCATGGGGGGACTTGAACC	GATTCGGGCTCATTTGTAATAC	353/200
β -Actin	TGACGGGGTCACCCCACTGT GCCCATCTA	CTAGAAGCATTTCGGGTGGACG ATGGAGGG	662

Reagenzien

dNTP 100mM aus dATP, dTTP, dGTP, dCTP je Invitrogen

100mM

PCR PreMix Puffer B 10x Failsafe

Biozym

Enzym-Mix 2,5 U/ μ l Failsafe

Biozym

Wasser bidest

3.3 Gelelektrophorese

DNA-Gel

TAE-Puffer 50x	Invitrogen
Agarose SeaKem	BMA Biozym
1 kb Plus DNA Leiter	Invitrogen
Bromphenolblau	

Polyacrylamidgel

Bis-Tris Gele 10%	Novex-Invitrogen
Transferpuffer 20x	Novex-Invitrogen
Laufpuffer MOPS 20x	Novex-Invitrogen
<i>MagicMark Western Blot</i> Standard	Invitrogen
Proben Puffer LDS 4x	Novex-Invitrogen
Färbung: <i>SimplyBlue</i>	Invitrogen
Trocknung: Ethanol 20%/ Glycerin 10%	
Folien	Roth
Rahmen	Roth

3.4 Isolierung von Nukleinsäuren aus dem Agarosegel

QIAquick Gelextraktionskit	Qiagen
----------------------------	--------

3.5 Klonierung der extrazellulären Domänen des 2B4-Rezeptors

Spezifität	Sense Primer (5'-3')	Antisense Primer (5'-3')
2B4	ATATGGGCAAAGGATGCC AGGGAT	GGATCCCTGATGGG

Enzyme

Taq DNA-Polymerase 5000 U/ml	Pharmacia
T4 DNA-Ligase <i>Rapid DNA Ligation Kit</i>	Roche
Nde I 10 U/μl	Roche
BamH I 10 U/μl	Roche
T4 DNA Ligase TA Klonierungskit	Invitrogen

Medien und Puffer

S.O.C. Medium	Invitrogen
LB (Luria-Bertani)-Medium	Sigma
Ligationspuffer 10x TA Klonierungskit	Invitrogen
Restriktionspuffer B 10x	Roche
Restriktionspuffer H 10x	Roche
Vedünnungspuffer 5x <i>Rapid DNA Ligation Kit</i>	Roche
Ligationspuffer 2x <i>Rapid DNA Ligation Kit</i>	Roche

Sonstiges

dATP 100mM	Invitrogen
Ampicillin 100 mg/ml	
Agar	Sigma
Petrischalen	Greiner
Qiaprep Spin Minipräp Kit	Qiagen
QIAquick Gelektaktionskit	Qiagen
X-Gal 40 mg/ml (in DMF)	

Bakterien

One Shot Bakterien INV α F' aus *TA-Cloning Kit* Invitrogen
DH5 α -T1 Bakterien Invitrogen

Vektoren

pCR 2.1 Invitrogen
pET 23a Novagen, modifiziert von D. Busch

4. Verbrauchsmaterial Biochemie

4.1 Protein Expression und Aufreinigung

4.1.1 Proteinexpression

Medien und Puffer

S.O.C. Medium
LB (Luria-Bertani) Medium
PBS

Sonstiges

Ampicillin
Glucose 40%
IPTG 100 mg/ml
Quarzküvette Amersham
Einmalküvetten Brand

Bakterien

BL 21 (DE3) Codon plus Stratagene

4.1.2 Aufreinigung der Einschlusskörper

Lösungen und Zusätze

DNAseI 2 mg/ml in Glycerin 50%/ NaCl 75 mM

Glucose 0,4%

IPTG 100 mg/ml

LB Medium

Lysozym 50 mg/ml

Lösungspuffer I, pH 6

- Tris-HCl 50 mM
- Saccharose 25%
- Natrium-Azid 1 mM
- DTT 10 mM

Lysepuffer, pH 8

- Tris-HCl 50 mM
- Triton X-100 1%
- Natriumdesoxycholat 0,1%
- NaCl 100 mM
- Natrium-Azid 0,1%
- DTT 10 mM

Waschpuffer I, pH 8

- Tris-HCl 50 mM
- Triton X-100 0,5%
- NaCl 100 mM
- EDTA 1 mM
- Natrium-Azid 0,1%
- DTT 1 mM

Waschpuffer II, pH 8

- Tris-HCl 50 mM
- NaCl 100 mM
- EDTA 1 mM
- Natrium-Azid 0,1%
- DTT 1 mM

4.2.1 In vitro Biotinylierung

Biotin-Protein Ligase BirA	Avidity
Lösung A (Bicin Puffer)	Avidity
Lösung B (ATP, Biotin)	Avidity
Extra d-Biotin	Avidity

4.2.2 Streptavidin-Bindungstest

Streptavidin 20 mg/ml in PBS, Natrium-Azide 0,02%	IBA Göttingen
--	---------------

4.2.3 Western-Analysen

Zusätzlich zu den Reagenzien für ein Polyacrylamidgel:

<i>Enhanced Luminol Reagent and Oxidizing Reagent</i>	PerkinElmer
PVDF Membran Invitrolon, 0,45 µm Porengröße	Invitrogen
Autoradiographiekassette Gevamic	AGFA-Gevaert
Autoradiographiefilm VA 990 G-T	Valmex
Streptavidin-biotinylierter Merrettich-Peroxidase-Komplex	Amersham

4.3 Multiplex Protein-Analysen

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
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
Bio-Plex Kalibrierungskit	Bio-Rad
96-Loch- <i>Multiscreen</i> -Platten	Millipore

5. Verbrauchsmaterial Zellkultur

Plastik/Glasware

Abklebefolien für Mikrotiterplatten	ABgene
Einfrierröhrchen	Nunc
Glaspipetten	Hirschmann
Lumaplatten	PerkinElmer
Magnet für Zellseparation	Dynal
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 17 cm ²)	Falcon
Zellkulturplatten (6-Loch, 24-Loch)	Falcon
Zellkulturplatten (96-Loch, Rundboden)	Falcon

Lösungen, Verbrauchsmedien und Zusätze

FACS-Flow	BD
FACS-Rinse	BD
FACS-Puffer: PBS, 0,1% NaN ₃ , 5% FBS	Labor C.S Falk
Ficoll, Biocoll Separationslösung	Biochrom AG
FBS (Fötales Kälberserum)	Invitrogen
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
IL-15	PromoCell
L-Glutamin 200 mM	Invitrogen
MEM (Nicht-essentielle Aminosäuren) 100x	Invitrogen
Natriumpyruvat 100mM	Invitrogen
Negativer Isolationskit für CD4, CD8 T oder NK Zellen	Dynal
Penicillin/ Streptomycin 100 U/ml	Invitrogen
RPMI 1640	Invitrogen
Trypanblaulösung (0,4% in physiolog. Saline)	
Trypsin/EDTA-Lösung (10 x in PBS lösen)	

Medien

RPMI III Medium

- RPMI 1640
- 2 mM L-Glutamin
- 100 U/ml Penicillin/ Streptomycin
- 1mM Natriumpyruvat

Tumormedium (TM)

- RPMI 1640
- 2 mM L-Glutamin
- 1 mM Natriumpyruvat
- 1x MEM
- 10% FBS

Selektionsmedium (SM)

- 0,5 mg/ml Hygromycin B in TM (L721.221-Cw6, -Cw7, -B27, -B35, -B37, -GmF15)
- 0,5 mg/ml G418 in TM (K562-Cw*0304, -E, -G)
- 1 mg/ml G418 in TM (L721.221-Cw1)
- 0,7 mg/ml G418 in TM (RCC-26 endo- γ 1)

NKL-Medium (NKL-M)

- RPMI 1640
- 100 U/ml IL-2
- 7,5% HS + 7,5% FBS

NK-Medium

- RPMI III
- 300 U/ml IL-2
- 7,5% HS + 7,5% FBS

CML-Medium

- RPMI III
- 15 % FBS

Einfriermedium

- RPMI III
- 10 % DMSO
- 50 % FBS

T Zell-Medium (TZ-M)

- RPMI III
- 500 oder 50 U/ml IL-2 bzw. 5 ng/ml IL-15
- 7,5% HS + 7,5% FBS
- für LAK Zellen: einmalig über Nacht L-Lectin 5 µg/ml (PHA)

6. Verbrauchsmaterial Allgemein

FACS-Röhrchen	Greiner
Handschuhe	Kimberly-Clark
Einmalküvetten	NeoLab
Einwegpipetten	Falcon; Greiner
Glasware (Bechergläser, Erlenmeyerkolben, Meß-Zylinder)	Schott Duran
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Greiner; Starlab
Pipettenspitzen, gestopft (10, 200, 1000 µl)	Starlab
Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Sarsted
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Greiner, Eppendorff
Rührfische	NeoLab
Skalpelle	Braun
Spritzen, Kanülen	BD; Braun
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon; Greiner

7. Zellen

7.1 Zelllinien

Tabelle B7.1 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Medium
BW-LCL	Lymphoblastoide B Zell-Linie	TM
Daudi	Burkitt B-Zell-Lymphom, homozygoter β_2m -Gendefekt	TM
Daudi- β_2m	Daudi transfiziert mit β_2m -Gen	TM
Jurkat	T-Zellymphomlinie	TM
K562	Erythroleukämiezelllinie, MHC-Klasse-I-negativ	TM
K562-Cw*0304	K562, transfiziert mit HLA-Cw*0304	SM
K562-E	K562, transfiziert mit HLA-E ^G B8-L- β_2m	SM
K562-G	K562, transfiziert mit HLA-G	SM
Klon 234	CD4 T Zellklon	TZ-M + IL-2 50 U/ml
L721.221	EBV-transformierte B Zelllinie, HLA-Klasse I negativ	TM
L721.112	hemizygot für HLA-A1, -B8, -Cw7	TM
L721.221-Cw1	transfiziert mit Cw1	SM
L721.221-Cw6	transfiziert mit Cw6*0602	SM
L721.221-Cw7	transfiziert mit Cw7*0702	SM
L721.221-B27	transfiziert mit B*2705	SM + HB
L721.221-B35	transfiziert mit B*3501	SM
L721.221-B37	transfiziert mit B*3701	SM
L721.221-G (mF15)	transfiziert mit G, die vollständige cDNA von HLA-G wurde kloniert.	SM + HB
Molt4	T-Zellymphomlinie	TM
NKL	NK-Leukämiezelllinie	NKL-M
RCC-26	Nierenzellkarzinomlinie	TM
RCC-26 endo γ 1	IFN- γ -Transduktante von RCC-26	SM + G418 0,7 mg/ml

B. MATERIAL

P815	murine Mastrozytomzelllinie	TM
YT	NK-Leukämiezelllinie	TM

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 Sublinien L721.221 und L721.112 entstanden. 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. Die hemizygote Variante L721.112 der L721-Ausgangslinie besitzt nur noch den HLA-Haplotyp A2, B8, Cw7, DR3, DQ2, DP4, da das zweite Chromosom 6 deletiert wurde [Ceman et al. 1992]. Die L721.221-Transfektanten mit HLA-Cw*0602, -*Cw0702, -B*2705, -B*3501 und -B*3701 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 L721.221-G-Transfektante (GmF15) stammt aus dem Labor von Frau Prof. Weiß [Ulbrecht et al. 2004], wobei die komplette Sequenz der schweren HLA-G-Kette in den pcDNA3(+)-Vektor kloniert wurde. Die HLA-Expression aller Transfektanten wurde zu jedem Experiment mittels FACS-Analysen kontrolliert. Die Erythroleukämieinie K562 exprimiert gemäß ihrem Differenzierungsstadium keine HLA-Klasse-I-schweren Ketten. Im Labor von Frau Prof. Weiß (Valeska Hofmeister und Nicole Kotzias) wurden K562-Zellen mit verschiedenen, HLA-E-, -G- und -Cw*0304-kodierenden Konstrukten transfiziert und uns freundlicherweise als Zielzellen für die NK- und T-Zellen zur Verfügung gestellt. 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 wurde in den pcDNA3(+)-Vektor kloniert. 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 als K562-E bezeichnete Transfektante entstand durch Doppeltransfektion mit zwei Vektoren, wobei der erste pcDNA3(+)-Vektor nur die schwere Kette des HLA-EG-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. Die HLA-Cw*0304-Transfektante entstand durch Klonierung der Sequenz für HLA-Cw*0304 in den pcDNA3(+)-Vektor.

Die β_2m -Transfektante der durch eine Deletion beider β_2m -Gene HLA-Klasse-I-negativen Burkittlymphomlinie Daudi wurde freundlicherweise von P. Parham (Universität Stanford, Palo Alto, USA) zur Verfügung gestellt. Durch die Anwesenheit des β_2m -Proteins werden die in Daudi kodierten HLA-A14, -A66, -B58, -Cw6 und -Cw3 Allelprodukte an der Oberfläche exprimiert. Die Nierenzellkarzinomlinie RCC26 wurde im Labor von Frau Prof. Schendel (Barbara Mosetter) aus frischem Tumorgewebe hergestellt und exprimiert die A*0201, A*3303, B*4101, B*5101, Cw*1502 und Cw*1701 Allelprodukte. Die RCC26-endo γ -Transduktante entstand durch Transduktion der Zellen mit einem, das IFN- γ -Gen tragenden retroviralen Vektor und Kultur in G418-haltigem Medium (0,5 mg/ml) [Schendel et al. 2000]. Die im Vergleich zur nicht-transduzierten RCC26-Linie erhöhte HLA-Klasse-I-Expression wurde ebenfalls parallel zu jedem Zytotoxizitätstest überprüft.

Die Jurkat- und Molt4-T-Zelllymphomlinien wurden von der internationalen Zellbank (ATCC, USA) erhalten und ohne Selektionsmedium kultiviert. Die NK-Leukämielinien NKL und YT wurden freundlicherweise von Prof. Miguel Lopez-Botet und Prof. Peter Parham (Universität Stanford) zur Verfügung gestellt und in IL-2-supplementiertem Medium kultiviert.

7.2 Spender Blut

Tabelle B7.2 Verwendete Blutproben

Spenderkürzel	Kontrollspender Nr.
AM	216
CF	209
HB	217
JB	187
MH	218
RP	219
RT	220
UK	221

8. Antikörper

8.1 Primärantikörper

Tabelle B8.1 Verwendete Primärantikörper

Spezifität	Klon	Isotyp	Synonym	Konjugation	Hersteller
Isotypkontrolle	MOPC21	IgG1		-	Sigma
Isotypkontrolle	UPC10	IgG2a		-	Sigma
HLA-Klasse I	W6/32	IgG2a		-	J. Johnson
CD3	UCHT1	IgG1		FITC	Beckman
				Cychrome 5	BD
CD4	13B8.2	IgG1		PE	Beckman
				APC	J. Mysliwietz
CD8	B9.11	IgG1		PE	Beckman
CD16	3G8	IgG1		FITC	Beckman
CD19	J4.119	IgG1		FITC	Beckman
CD25	B1.49.9	IgG2a	IL-2R α	FITC	Beckman
				PC5	Beckman
CD45RA	ALB11	IgG1		FITC	Beckman
CD45RO	UCHL1	IgG2a		PE	Beckman
CD56	NKH-1	IgG1		APC	Beckman
CD69	TP1.55.3	IgG2b		PE	Beckman
CD85j	VMP55.1	IgG1	ILT-2	FITC	DAKO
	HP-F1	IgG1		PE	Beckman
CD94	HP-3D9	IgG1		FITC	BD
CD94				PE	Beckman
CD122	2RB	IgG1	IL-2R β	FITC	Beckman
CD158a	EB6	IgG1	2DL1; p58.1	PE	Beckman
CD158b	GL183	IgG1	2DL2,3; p58.2	PE	Beckman
CD158e1	Z27.3.7	IgG1	3DL1; p70; NKB1	PE	Beckman
CD158i	FES172	IgG2a	2DS4; p50.3	PE	Beckman
CD159	Z177	IgG2b	NKG2A	PE	Beckman

B. MATERIAL

CD161	191B8	IgG2a	NKRP-1A	PE	Beckman
CD244	C1.7	IgG1	2B4	PC5	Beckman
CD266	DX11	IgG1	DNAM-1	-	BD
LAIR-1	DX26	IgG1		PE	BD
NKG2D	149810	IgG1		PE	R&D
Nkp30	Z25	IgG1		PE	Beckman
Nkp44	Z231	IgG1		PE	Beckman
Nkp46	BAB281	IgG1		PE	Beckman
Nkp46	33F7	IgG1		-	Colonna M.
	45G8	IgG1		-	Colonna M.
TZR $\alpha\beta$	BMA031	IgG2b		PC5	Beckman
Perforin	δ G9	IgG2b		FITC	BD
Perforin- Isotyp	27-35	IgG2b		FITC	BD

8.2 Sekundärantikörper

Tabelle B8.2 Verwendete Sekundärantikörper

Spezifität	Organismus	Konjugation	Hersteller
α Maus	Ziege	PE	Dianova

9. Personen- und Firmenverzeichnis

Busch, Dirk, Dr., Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Technische Universität München

Colonna, Marco, Prof. Dr., Washington University Medical School, St. Louis

Kremmer, Elisabeth, Dr., Institut für Molekulare Immunologie, GSF, München

Weiß, Elisabeth, Prof. Dr., Institut für Anthropologie und Humangenetik, Ludwig-Maximilians-Universität München

Agfa-Gevaert, Leverkusen

Amersham, Little Chalfont, England

ATCC, Rockville, Maryland, USA

Atomic Energy of Canada, Ottawa, Ontario, Kanada

Avidity, Denver, USA

BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl

Bibby Dunn Labortechnik, Asbach

Beckman Coulter/ Immunotech, Palo Alto, Kalifornien, USA

Becton Dickinson Biosciences (BD), San Jose, Kalifornien, USA

Biochrom, Berlin

Bio-Rad Laboratories, Richmond, Kalifornien, USA

Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen

Biozym, Hess, Oldendorf

Brand, Wertheim

Branson Ultrasonics, Danbury, USA

Braun, Melsungen

Corning, New York, USA

DAKO, Glostrup, Dänemark

Dianova, Hamburg

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Dynal, Oslo, Norwegen

Eppendorf, Hamburg

Falcon, Oxnard, Kalifornien, USA

Invitrogen, Gaithersburg, Maryland, USA
GFL Gesellschaft für Labortechnik, Großburgwedel
Greiner, Nürtingen
Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Hecht-Assistent, Sondheim-Rhön
Heraeus, Hanau
Hirschman, Unterhaching
Hybaid, Teddington, UK
IBA GmbH, Göttingen
IKA Labortechnik, Staufen
Immunotech, Minnesota, USA
Invitrogen/ Life Technologies, Karlsruhe
Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Julabo, Seelbach
Kodak, Stuttgart
Leica, Wetzlar
Liebherr, Biberach an der Riss
Merck, Darmstadt
Messer Griesheim, Krefeld
Mettler, Gießen
Millipore, Bedford, Massachusetts, USA
Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Nalgene, Rochester, New York, USA
NeoLab, Heidelberg
Novagen, Wisconsin, USA
Nunc, Naperville, USA
PAN Biotech, Aidenbach
PerkinElmer, Wellesley, Massachusetts, USA
Pharmacia, Uppsala, Schweden
PromoCell, Heidelberg
Qiagen, Chatsworth, Kalifornien, USA
R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Roche, Mannheim
Sartorius, Göttingen

B. MATERIAL

Scotsman, Vernon Hills, Illinois, USA

Sharp Electronics Corporation, Mahwa, New Jersey, USA

Serotec, Oxford, UK

Sigma, St. Louis, Missouri, USA

Starlab, Ahrensburg

Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA

VWR Internacional GMBH, Darmstadt

Whatman Biometra, Göttingen

WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim

C. METHODEN

1. Methoden der Molekularbiologie

1.1 mRNS Isolierung

Für die Isolierung von mRNS aus lebenden Zellen wurden mindestens 1×10^6 Zellen sedimentiert und mit 0,2 ml *Tri Reagent* pro 1×10^6 Zellen durch auf- und abpipettieren gemischt. Nach 5 Minuten wurden 40 μ l Chloroform pro 200 μ l *Tri Reagent* zugefügt, 15 Sekunden gevortext und anschließend bei Raumtemperatur 2-15 Minuten stehengelassen. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 12000 g und 4 °C bildete sich eine obere, farblose, wässrige Phase, welche die RNS enthielt, und eine untere rote organische Phenolphase mit Proteinen sowie eine die DNS enthaltende Interphase. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 100 μ l Isopropanol pro 200 μ l *Tri Reagent* gevortext und anschließend 5-10 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 Minuten, bei 4 °C und 12000 g, wurde der Überstand verworfen und die RNS als weißliches Sediment erhalten. Dieses Sediment wurde mit 500 μ l Ethanol in DEPC-Wasser durch vortexen und folgender Zentrifugation für 8 Minuten bei 4 °C und 12000 g gewaschen. Nach Abnehmen des Überstands wurde das RNS-Sediment 3 Minuten luftgetrocknet, allerdings ohne das Sediment völlig auszutrocknen, und anschließend in 20 μ l DEPC Wasser durch mehrmaliges auf- und abpipettieren resuspendiert. Der Gehalt an RNS wurde bei einer Verdünnung von 1:50-1:200 und einer OD (optische Dichte) von 260 nm am Spektrometer gemessen. Hierfür sollte die OD₂₆₀/ 280-Ratio zwischen 1,6 und 1,9 liegen. Die RNS wurde bis zum Umschreiben in cDNA bei -20 °C aufbewahrt.

1.2 Reverse Transkription

Isolierte mRNS wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Zunächst wurden dafür 1-5 µg der mRNS mit 0,5 µg/µl Oligo-dT Primern ad 12 µl DEPC Wasser für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Die Oligo-dT Primer binden hierbei an die polyA-Reste der mRNS. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gegeben und mit einem Reaktionsgemisch versetzt. Dieses bestand aus dem 1 x 1st *strand buffer*, 10 mM DTT, 0,5 µM dNTP und 200 U der reversen Transkriptase Superscript II in einem Endvolumen von 8 µl. Dieser 20 µl-Ansatz wurde in einem PCR-Gerät für 70 Minuten bei 42 °C inkubiert, wodurch die mRNS in cDNS umgeschrieben wurde. Im nächsten Inkubationsschritt von 5 Minuten bei 90 °C wurde das Enzym deaktiviert und die Reaktion danach durch Abkühlen auf 4 °C gestoppt. Die enthaltene cDNA wurde bis zur Verwendung in einer PCR bei -20 °C gelagert.

1.3 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Durch die PCR konnten spezifische Sequenzen der cDNS amplifiziert werden, um zu testen, ob diese in der Probe enthalten waren. Dies wurde mit spezifischen Primern für bestimmte Gene, sowie der positiven Kontrolle β-Actin durchgeführt, das von jeder Zelle exprimiert wurde. Als negative Kontrolle diente ein Ansatz mit Wasser anstelle der cDNS.

Ein PCR-Ansatz stellte sich aus folgenden Reagenzien mit folgenden Endkonzentrationen zusammen:

1-2 µl DNS

1 x PreMix B Puffer (enthält u.a. dNTP, MgCl₂)

15 pMol Primer *sense*

15 pMol Primer *antisense*

2,5 U PreMix Enzym (Taq-Polymerase)

ad 25 µl Wasser

Die Amplifikation erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	5 Minuten	94 °C	1
Amplifikation	30 Sekunden	94 °C	30-37
	30 Sekunden	60-62 °C	
	1 Minute	72 °C	
Endpolymerisation	10 Minuten	72 °C	1
Stopp		4 °C	

Die Proben wurden anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen, siehe Punkt 1.4.

1.4 Gelelektrophorese

Die amplifizierte cDNS wurde über ein 1,5%-iges Agarosegel aufgetrennt. Um ein Gel zu gießen wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 1 x TAE Puffer gelöst, in einer Mikrowelle aufgekocht und auf Handwärme abgekühlt. Anschließend wurden 2 µl 1%ige Ethidiumbromidlösung zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäuren und emittiert unter UV-Bestrahlung sichtbares Licht. Das Gel wurde in einer Elektrophoresekammer gegossen und Luftbläschen entfernt. Nach Polymerisation des Gels wurde der Laufpuffer (1 x TAE Puffer) in die Kammer gegossen und die Proben auf das Gel aufgetragen. Hierfür wurden die 8 µl Probe sowie der Standard (DNS-Fragmente definierter Länge) mit Auftragspuffer versetzt (1x) und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 Volt, wobei die negativ geladene DNS in Richtung des positiven Pols lief. Nach ausreichender Auftrennung der Proben wurde das Gel unter UV-Licht mit einer Digitalkamera fotografiert und dokumentiert.

1.5 Isolierung von Nukleinsäuren aus dem Agarosegel

Zur Isolierung bestimmter DNS-Fragmente aus dem Agarosegel wurde der QIAquick Gelelektaktionskit von Qiagen verwendet. Die Fragmente wurden hierfür aus dem Gel ausgeschnitten und in einem Qiagen-Reaktionsgefäß aufgereinigt. Das Prinzip basiert auf einer Bindung der DNS an eine Siliziumgel-Membran in den Reaktionsgefäßen. Die zugehörigen Puffer besitzen bestimmte Salzkonzentrationen und pH-Werte, die das Binden und Eluieren der DNS ermöglichen. Die Bindung erfolgte hierbei bei einer hohen Konzentration an chaotrophischen Salzen, welche die Wasserstruktur modifizieren. Der Puffer QG löst die Agarose und schafft die Bedingungen für die Bindung der DNS an die Membran. Puffer PE wäscht die Salze, Primer, Ethidiumbromid, Enzyme und Detergenzien heraus und mit dem Puffer EB kann die DNS anschließend eluiert werden. Der Kit eignet sich für Konstrukte mit einer Größe von 70 bp bis 10 kb. Die Aufarbeitung wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

1.6 Klonierung von PCR-Produkten in den pET23a Vektor

Das zu klonierende DNS Fragment wurde zunächst in zwei 25 µl Ansätzen mittels PCR amplifiziert. Um die Klonierungseffizienz zu erhöhen, wurde vor der Klonierung in den pET23a Vektor eine TA-Klonierung durchgeführt. Als Restriktionsschnittstellen wurden die Nde I- und BamH I-Schnittstellen ausgewählt.

Sequenz des Klonierungsprodukts 2B4: 5'-3'

CATATGGGCAAAGGATGCCAGGGATCAGCTGACCATGTGGTTAGCATCTCGGGAGTGCCTCTTC
AGTTACAACCAAACAGCATAACAGACGAAGGTTGACAGCATTGCATGGAAGAAGTTGCTGCCCTCA
CAAAATGGATTTCATCACATATTGAAGTGGGAGAATGGCTCTTTGCCTTCCAATACTTCCAATGAT
AGATTCAGTTTTATAGTCAAGAACTTGAGTCTTCTCATCAAGGCAGCTCAGCAGCAGGACAGTGG
CCTCTACTGCCTGGAGGTCACCAAGTATATCTGGAAAAGTTCAGACAGCCACGTTCCAGGTTTTTG
TATTTGATAAAGTTGAGAAACCCCGCCTACAGGGGCAGGGGAAGATCCTGGACAGAGGGAGATG
CCAAGTGGCTCTGTCTTGGCTTGGTCTCCAGGGATGGCAATGTGTCCTATGCTTGGTACAGAGGG
AGCAAGCTGATCCAGACAGCAGGGAACCTCACCTACCTGGACGAGGAGGTTGACATTAATGGCA
CTCACACATATACCTGCAATGTCAGCAATCCTGTTAGCTGGGAAAGCCACACCCTGAATCTCACT
CAGGACTGTCAGAATGCCATCAGGGATCC

Primer; Restriktionsschnittstellen 5' Nde I und 3' BamH I, erste Domäne, zweite Domäne

1.6.1 TA-Klonierung

Der *TA-Cloning* Kit diente der effizienten Klonierung Taq-amplifizierter PCR-Produkte. Der TA-Vektor pCR 2.1 besitzt überhängende 3'-T-Enden, in die das PCR-Produkt mit einer Effizienz von über 80% kloniert wurde. Die Vektorkarte ist unter 1.6.2 dargestellt.

TAQ-Schritt

50 µl der PCR Reaktion wurden mit 10 mM dATP und 5 U Taq-Polymerase 10 Minuten bei 37 °C inkubiert, wodurch an die PCR-Produkte polyA-Schwänze gehängt wurden. Das Gemisch wurde anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen und mit dem *QIAquick* Gelextraktionskit aus dem Gel extrahiert.

TAQ-Ligation

Das extrahierte PCR-Produkt wurde anschließend in den TA-Vektor (pCR 2.1) kloniert. Dafür wurde folgender Ligationsansatz mit den Reagenzien des *TA-Cloning* Kits pipettiert:

2 µl extrahiertes PCR-Produkt

1x Ligationspuffer (10x)

2 µl pCR 2.1 Vektor

4 µl Wasser

1 µl T4 DNA-Ligase

Inkubation erfolgte bei 16 °C über Nacht.

Transformation

Für das Ausplattieren der transformierten Bakterien wurden Agar-Platten gegossen. Hierzu wurden 10 g LB in 500 ml destilliertes Wasser in einem Erlenmeyerkolben gelöst und 7,5 g Agar zugegeben. Diese Mischung wurde autoklaviert und nach Abkühlen auf etwa 50 °C mit Ampicillin versetzt (0,1 mg/ml). Danach wurden Petrischalen mit jeweils 25 ml des noch flüssigen Agars befüllt und zum Aushärten unter der Sterilbank stehengelassen.

5 µl des Ligationsmixes wurden mit kompetenten *One Shot* Bakterien 30 Minuten auf Eis inkubiert, 30 Sekunden bei 42 °C erwärmt, 2 Minuten auf Eis gegeben und anschließend in 250 µl S.O.C. Medium aufgenommen. Dieser Ansatz wurde 1

Stunde bei 37 °C geschüttelt und daraufhin auf, mit 40 µl X-Gal (40 mg/ml) beschichteten, Ampicillin-Platten ausplattiert.

Selektion positiver Kolonien

Die Selektion positiver Kolonien erfolgte durch den sogenannten Blau/Weiß-Test. Der Test beruht darauf, dass Insertionen in die Multiklonierungsstelle des Vektors die Bildung des Enzyms β -Galaktosidase verhindern. β -Galaktosidase spaltet neben dem eigentlichen Substrat Laktose auch 5-Brom-4-Chlor-indoyl- β -D-Galaktosid (X-Gal). Dabei entsteht der Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo, der sich in Anwesenheit von Sauerstoff blau verfärbt. Im X-Gal Test werden Bakterien eingesetzt, die durch Deletion im Chromosom nur eine inaktive β -Galaktosidase ohne N-Terminus bilden können. Dieser Effekt wird durch Plasmide, die das *lac* POZ'-Operon tragen (Promotor, Operator, 5'-Ende des *lacZ*-Gens) kompensiert. Das hiervon codierte α -Peptid kann die inaktive β -Galaktosidase zum aktiven Enzym komplementieren (α -Komplementation). Erfolgt die Insertion in die Multiklonierungsstelle des Vektors, also innerhalb des *lacZ*-Gens, wird die Bildung des α -Peptides verhindert und die Kolonien bleiben weiß. Klone ohne Insertion zeigen dagegen eine Blaufärbung. Es wurden Kolonien ausgewählt, die aussen weiß und in der Mitte blau waren, da komplette Weißfärbung meist auf eine mutierte Insertion hinweist. Die unvollständige Weißfärbung erklärt sich daraus, dass die sehr kleine Insertion das Ablesen des *lacZ*-Gens nicht komplett verhindern kann. Da der hier verwendete Vektor kein *lac I*-Gen für den Repressor des *lacZ*-Gens besaß, war es nicht nötig IPTG als Inaktivator des Repressors einzusetzen, um die Transkription der Insertion möglich zu machen. Nach der Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden 6 positive Kolonien mit einer Impföse von der Platte genommen (gepickt) und in 6 ml LB-Medium mit 0,6 mg Ampicillin, in 15 ml Zentrifugationsröhrchen über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

Minipräparation der Plasmide

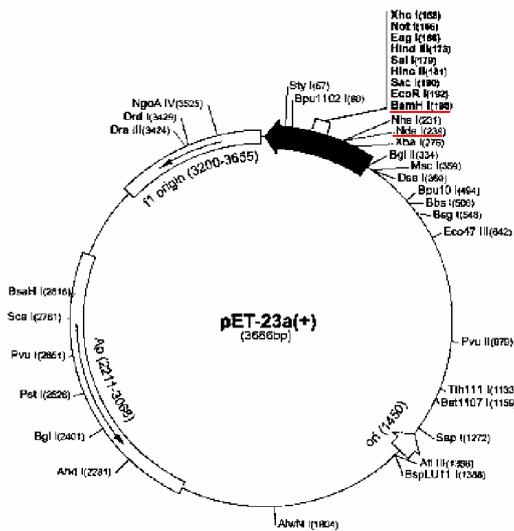
Die Minipräparation basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakterien und anschließender Adsorption der DNS an eine Silizium-Membran in Anwesenheit einer hohen Konzentration von Salzen. Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll.

Der TA-Vektor wurde aufgereinigt und in einem analytischen Kurzverdau daraufhin untersucht, ob die Insertion eingebaut wurde. Hierzu wurden 3 µl Vektor mit Nde I

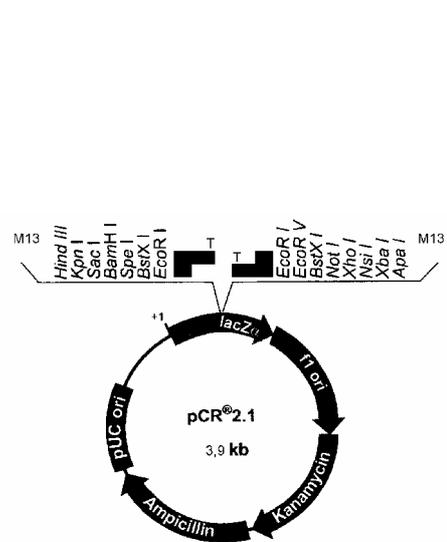
und BamH I sowie Restriktionspuffer B nur 3 Stunden bei 37 °C verdaut. Dies ermöglicht die Kontrolle auf dem Agarosegel, ob die Insertion überhaupt eingebaut wurde. Bei erfolgreicher TA-Klonierung wurde die Insertion aus dem pCR2.1-Vektor herausgeschnitten und in den pET23a Vektor kloniert.

1.6.2 Klonierung in den pET23a Vektor

Vektorkarte pET23a



Vektorkarte pCR 2.1



Von D. Busch wurde zwischen der BamH I und der Hind III Schnittstelle in pET23a eine Sequenz, die für eine Biotinylierungsstelle kodiert eingefügt. Mit dem folgenden Enzym-Verdau wurde die Insertion aus dem TA-Vektor geschnitten:

Nde I-Verdau

Ansatz I	Ansatz II
8 µl PCR Produkt	2 µl pET23a
1x Restriktionspuffer H	6.5 µl Wasser
10 U Nde I	1x Restriktionspuffer H
	5 U Nde I

Die beiden Ansätze wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Anschließend konnte der Verdau mit dem zweiten Enzym erfolgen. Da die beiden Restriktionsenzyme verschiedene Puffer benötigen, musste im Gegensatz zum Kurzverdau, für den vollständigen Verdau ein Pufferaustausch vorgenommen werden. Dies wurde mit Hilfe des *QIAquick*-Gelextraktionskit durchgeführt.

BamH I-Verdau

Nach dem Pufferaustausch wurde die gesamte Probe mit 1x Restriktionspuffer B und 20 U BamH I 3 Stunden bei 37 °C inkubiert, auf ein Agarosegel aufgetragen und das DNS-Fragment mit der Größe der Insertion extrahiert. Die so aus dem pCR2.1 Vektor geschnittene Insertion wurde nun in den pET23a Vektor ligiert.

Ligation

Für die Ligation wurde folgender Ansatz mit den Reagenzien des *Rapid Ligation Kits* ausgeführt:

5-7 µl Insertion (3x Vektor Menge)

1-2 µl pET23a 4 µg

1x Verdünnungspuffer (10x)

ad 10 µl Wasser

1x Ligationspuffer (2x)

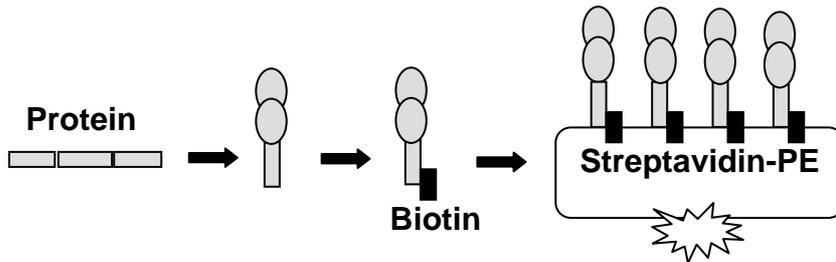
1 µl T4 DNA-Ligase

Dieses Ligationsgemisch wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle ohne Insertion mitgeführt.

Transformation, Minipräparation und Kurzverdau wurden wie unter 1.6.1 beschrieben durchgeführt. Die Transformation erfolgte in die kompetenten DH5 α -Bakterien. Die Kontrolle über den Einbau der Insertion erfolgte durch Einsetzen einer in 50 µl Wasser gelösten Kolonie in einer PCR mit 2B4-spezifischen Primern. Bei erfolgreicher Klonierung wurde eine Minipräparation durchgeführt und nach dem analytischen Kurzverdau ein Teil zum Sequenzieren geschickt. Wurde die Sequenz der Insertion bestätigt, konnte die Minipräparation für die Proteinexpression weiter verwendet werden.

2. Methoden der Biochemie

2.1 Proteinexpression und Aufreinigung



Aufreinigung, Faltung, Biotinylierung, Multimerisierung

Vor der Expression in Bakteriengroßkulturen, wurde in einem Miniexpressionsversuch getestet, ob die mit dem Vektor transformierten Bakterien, das von der Insertion kodierte Protein exprimierten.

2.1.1 Miniproteinexpression

Daher wurde zunächst eine **Transformation** mit dem Endprodukt aus 1.6.2 durchgeführt:

2 µl Minipräparation (pET23a und Insert)

25 µl BL21 Bakterien

30 Minuten auf Eis, 30 Sekunden bei 42 °C

250 µl S.O.C. Medium

1 Stunde bei 37 °C

Die transformierten Bakterien wurden auf Ampicillin-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

IPTG-Induktion

Durch IPTG, ein nicht fermentierbares Lactose Analogon, das den *lac* Repressor inhibiert, wurde die Proteinexpression in den transformierten BL21 Bakterien induziert. IPTG wird im Gegensatz zur Klonierung bei diesen Bakterien benötigt, da BL21 Bakterien den *lac* Repressor exprimieren, DH5 α Bakterien dagegen nicht.

20 ml LB-Medium in 50 ml Zentrifugationsröhrchen

0,4% Glucose

2 mg Ampicillin

6 Kolonien aus obiger Transformation

2-3 Stunden schütteln bei 37 °C

Anschließend wurde die OD bei 600 nm gemessen. Bei einer OD von 0,3-0,4 wurde 1 ml eingefroren (800 μ l Bakterien plus 200 μ l Glycerin), bei einem Wert zwischen 0,7-0,8 wurde 1 ml als 0-Wert entnommen und 100 mg IPTG pro ml Medium (0,4 mM) zu der restlichen Kultur zugegeben. Nach 3 Stunden wurde 1 ml als 3-Stunden-Wert entnommen. Anschließend wurden der 0- und der 3-Stunden-Wert 3 Minuten bei 10000 rpm in einer Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert, mit 1 ml PBS gewaschen, erneut abzentrifugiert und das Sediment bei -20 °C bis zur Verwendung für das Polyacrylamidgel eingefroren.

Polyacrylamidgel

Um die Expression zu überprüfen, wurden Proben der 0- und 3-Stunden-Werte auf ein Polyacrylamidgel (10% Bis-Tris-haltiges Gel zum Auftrennen von Proteinen) aufgetragen. Das fertige Polyacrylamidgel von NuPAGE wurde in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Kammer mit Laufpuffer aufgefüllt. Das Proteinsediment wurde aufgetaut und in 100 μ l Wasser gelöst. Davon wurden 13 μ l entnommen und mit 6,5 μ l Probenpuffer und 6,5 μ l Wasser versetzt. Nach 5 Minuten bei 95 °C wurde das Gemisch zusätzlich zu einem Marker (definierte Proteingrößen), auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Danach wurde eine Spannung von 80 Volt angelegt.

Das Gel mit den aufgetrennten Proteinen wurde 3 mal 5 Minuten mit Wasser gewaschen und 1 Stunde in *SimplyBlue* gefärbt. Nach Entfärbung über Nacht in Wasser auf dem Schüttler, musste das Gel dehydriert werden. Hierfür wurde das Polyacrylamidgel 30 Minuten in einem Gemisch aus 20%-igen Ethanol und 10%-igen

Glycerin inkubiert und mit vorher mit Wasser benetzten Folien in entsprechenden Rahmen eingespannt und über Nacht getrocknet. Das Gel wurde auf Expression der spezifischen Proteinbande hin untersucht. Dabei sollte bei dem 0-Wert keine, bei dem 3-Stunden-Wert eine starke Bande sichtbar sein. War die analytische Expression erfolgreich, wurde eine präparative Proteinexpression durchgeführt.

2.1.2 Proteinexpression

Die präparative Proteinexpression wurde ähnlich der Miniexpression, allerdings mit größeren Volumina durchgeführt. Die **IPTG-Induktion** erfolgte wie unter 2.1.1 beschrieben in einem Volumen von 6 Liter LB-Medium. Zu dem Ansatz wurden entsprechende Mengen Glucose und Ampicillin gegeben (2.2.1). 20 µl der eingefrorenen Bakterienkultur aus der Miniexpression wurden in 7 ml LB-Medium verdünnt und davon 1 ml in die 1 Liter Ansätze gegeben. Nach etwa 8-10 Stunden auf dem Bakterienrührer bei 37 °C, wurde mit der IPTG-Zugabe und den Messungen begonnen (wie unter 2.2.1 beschrieben). Nach dem 3 Stunden-Wert wurde die Bakterienkultur in 250 ml Zentrifugengefäße umgefüllt und 20 Minuten bei 4 °C und 2000 g in einer Bakterienzentrifuge abzentrifugiert (Sorvall SLA Rotor). Das Pellet wurde bei -80 °C für die weitere Verwendung aufbewahrt. Auch hier wurde 1 ml des 0- und 1 ml des 3 Stunden-Wertes für ein **Polyacrylamidgel** entnommen, um die Expression des gewünschten Proteins zu überprüfen. Es wurde wie unter 2.1.1 beschrieben vorgegangen.

2.1.3 Aufreinigung der Einschlusskörper

Bakterien bauen einen großen Teil der Proteine in Einschlusskörper ein. Die eingefrorenen Bakterien sedimente des präparativen Ansatzes wurden für die Aufreinigung in jeweils 13 ml Lösungspuffer pro Liter Bakterienkultur aufgenommen und in 30-ml-Zentrifugenbehälter überführt. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Hinterher wurde die Suspension mit Hilfe eines Ultraschallhomogenisator (Sonikator) homogenisiert (70%, 15 Pulse). Pro Suspension wurden 100 µl Lysozym (Stock 50 mg/ml), 250 µl DNaseI (Stock 2 mg/ml) und MgCl₂ (Stock 0,5 M) zugegeben und vorsichtig gemischt, bevor 12,5 ml Lyse-Puffer dazu pipettiert wurden.

Nach etwa einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur nahm die Viskosität der Suspension ab, woraufhin die Suspension 20 Minuten bei -80 °C und anschließend 30 Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert wurde. Nach Zugabe von 50 µl MgCl₂

wurde etwa 30 Minuten gewartet bis die Viskosität weiter abnahm und 350 μ l NaEDTA zugegeben. Die Suspension wurde dann 20 Minuten bei 11000 g sedimentiert und in Waschpuffer I resuspendiert. Nach erneuter Homogenisierung (immer auf Eis) erfolgte erneut eine Zentrifugation von 20 Minuten bei 11000 g in einer Sorvall-Zentrifuge (Sorvall SS34 Rotor) und Resuspension von dem Sediment in 10 ml Waschpuffer II. Homogenisierung und Zentrifugation wurden nochmals wiederholt und das Sediment je nach Volumen in 2-4 ml 8 molaren Harnstoffs gelöst. Das Lösen kann mehrere Stunden dauern und wurde im Kühlraum mit einem Rührfisch über Nacht durchgeführt. Nach Lösen des Protein-Sediments, wurde die Suspension in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und 20 Minuten bei 45000 UpM in der Ultrazentrifuge (Beckman Ti 70.1 Rotor) zentrifugiert. Die Protein-haltigen Überstände wurden anschließend zusammengeführt und in Aliquots zu je 2 ml bei -80 °C weggefroren.

Für eine Qualitätskontrolle wurde vor dem Einfrieren von dem Überstand der Proteinexpression 1 μ l der Probe auf ein **Polyacrylamidgel** aufgetragen. Zusätzlich wurden 3 μ l des Überstandes 1:10 mit Harnstoff verdünnt und für die Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des BCA-Protein-Tests herangezogen. Dafür wurde eine Standardreihe von 0; 0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5 und 10 mg/ml mit BSA hergestellt. Von jedem Wert dieser Verdünnungsreihe und der 1:10 verdünnten Probe wurden jeweils 20 μ l entnommen und mit 1 ml der Arbeitslösungen A und B aus dem BCA Kit vermengt. Nach 30 Minuten bei 37 °C wurde bei einer OD von 562 nm die Proteinkonzentration im Vergleich zu den Standards bestimmt. Dabei wurde der Wert der gemessenen OD durch den am nächstliegenden OD-Wert des Standards geteilt und mit der Proteinkonzentration dieses Standard-Wertes multipliziert. Der Wert sollte zwischen 15 und 50 mg/ml liegen.

2.2 Proteinrückfaltung

2.2.1 Faltung

Da das Protein nun denaturiert vorlag, musste es für Bindungsstudien wieder rückgefaltet werden. Für diesen Schritt wurden 200 ml Faltungspuffer in einem 300 ml Erlenmeyerkolben im Kühlraum auf eine Rührplatte gestellt und ein Rührfisch hineingegeben. Um die Degradation der Proteine zu verringern wurden in den Puffer die Protease-Inhibitoren PMSF (2 ml aus 100 mM Stock), Pepstatin (100 µl aus 2 mg/ml Stock) und Leupeptin (100 µl aus 2 mg/ml Stock) gegeben. Bevor die Proteinlösung zugegeben wurde, wurde sie 1:2 mit einer Guanidinlösung verdünnt. Der Faltungspuffer wurde so stark gerührt, dass sich ein „Trichter“ in der Mitte der Lösung bildete. Mit einer 1-ml-Spritze und einer Nadel der Größe Nr. 27 wurden 400 µl der Protein/Guanidinlösung in den Trichter getropft. Nach der Injektion wurde die Mischgeschwindigkeit wieder verringert. Nach 8 Stunden folgte die zweite und nach 6-12 Stunden die dritte Injektion. Jedes Mal wurde die Guanidinverdünnung kurz vor der Injektion hergestellt und die Drehgeschwindigkeit wieder erhöht. Um eine möglichst gleichbleibende Temperatur der Faltungslösung zu erreichen, wurde sie über den gesamten Zeitraum in einer geschlossenen Styroporbox plaziert.

2.2.2 Aufreinigung des gefalteten Proteins

Für die Aufreinigung und Aufkonzentration des gefalteten Proteins wurde ein Ultrafiltrationssystem verwendet. Hierfür wurde die Faltungslösung zunächst 20 Minuten bei 4 °C und 3400 g abzentrifugiert (Sorvall SLA 3000 Rotor) und der Überstand in die Rührzelle transferiert. Hierbei wurde durch Unterdruck (mit Hilfe von gasförmigen Stickstoff) die Lösung über eine 10000 MWCO-Membran zweimal auf etwa 10 ml konzentriert und mit je 90 ml PBS wieder verdünnt. Um Aggregate zu beseitigen wurden anschließend die 10 ml der Lösung über eine Spritze durch eine 0,22 µm Membran gedrückt und in ein Microspin-Röhrchen mit einer 10000 MCWO Membran überführt. Die Probe wurde bei 2000 g auf 700 µl konzentriert und konnte in die Biotinylierungsreaktion eingesetzt werden.

2.2.3 *In vitro*-Biotinylierung

Die Biotinylierung wurde mit dem Biotinylierungskit von Avidity durchgeführt. Folgendes Reagenziengemisch (700 µl Probenvolumen nach Konzentration) wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert:

100 µl Lösung A

100 µl Lösung B

100 µl Extra d-Biotin

10 µl BirA Enzym

0,5 µl Pepstatin

0,5 µl Leupeptin

Hierbei wurde durch das Enzym an die Biotinylierungsseite der Insertion Biotin gehängt. Die Durchführung erfolgte laut Hersteller-Angaben.

2.2.4 Reinigung der biotinylierten Proteine über eine FPLC

Das FPLC-Verfahren wurde im Labor von Dirk Busch durchgeführt. Die Probe wurde auf eine Superdex 200HR Gelfiltrations-Säule gegeben und bei 0,5 ml/ Minute in 500 µl Fraktionen gesammelt. Die Größe der Proteine wurde über einen UV-Detektor bei einer OD von 280 nm gemessen. Anschließend wurden die Fraktionen, in denen sich das gewünschte Protein befand gesammelt. Über ein 15 ml Microspin-Röhrchen, mit einer 10000 MWCO Membran, konnten die Proben auf 1 ml konzentriert werden, bevor 0,5 µl Pepstatin (Stock 2 mg/ml), 0,5 µl Leupeptin (Stock 2 mg/ml), 1 µl Natrium-Azid (Stock 30%ig) und 1 µl NaEDTA (Stock 0,5 M) auf Eis zugegeben wurde. Anschließend wurde das Gemisch mit PBS auf 4 ml aufgefüllt und erneut abzentrifugiert, so dass das Probenvolumen danach 250 µl betrug. Es wurde eine Standardreihe von 0; 0,15; 0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5 und 10 mg/ml wurde mit BSA hergestellt, und von jedem Wert dieser Verdünnungsreihe sowie der Probe 20 µl entnommen und mit je 1 ml der Arbeitslösungen A und B aus dem BCA Kit vermischt. Wie bereits oben beschrieben wurde mit dem BCA-Test die Proteinkonzentration bestimmt. Es wurden 30 µl der restlichen Probe für den Streptavidin-Bindungstest verwendet.

2.2.5 Streptavidin-Bindungstest

Dieser Test wurde durchgeführt, um zu kontrollieren, ob die Biotinylierung erfolgreich war. Für den Assay wurden drei verschiedene Ansätze angesetzt:

Ansatz I: 10 µl Streptavidin und 15 µl PBS

Ansatz II: 10 µl Streptavidin und 15 µl Probe

Ansatz III: 10 µl PBS und 15 µl Probe

Diese Ansätze wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert und am nächsten Tag auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Wichtig war hierbei, dass die Proben nicht erwärmt werden dürfen, um die Faltung des Proteins nicht zu zerstören.

2.3 Western Blot-Analyse

Um nachzuweisen, ob es sich bei dem exprimierten Protein tatsächlich um das gewünschte Protein handelte, wurde eine Western-Analyse durchgeführt.

Zunächst musste die Membran, auf welche die Proteine übertragen werden sollten vorbereitet werden, indem sie mit Ethanol benetzt, 5 Minuten ausgetrocknet und 5 Minuten in Transferpuffer inkubiert wurde. Diese vorbehandelte Membran wurde mit dem Polyacrylamidgel nach dessen Elektrophorese zur Proteinauftrennung in einer vertikalen Elektrophoresekammer eingespannt und durch die angelegte Spannung wurden die Proteine aus dem Gel auf die Membran transferiert (geblottet). Nach dem Blotten wurde die Membran in einer Blockierungslösung (3% BSA in 1x TBS-Tween) auf dem Schüttler bei 4 °C über Nacht inkubiert. Für die Chemolumineszenz wurde am nächsten Tag ein mit Peroxidase gekoppelter Straptavidin Antikörper zu der Membran gegeben, der biotinylierte Proteine bindet:

Die Membran wurde 6 x 5 Minuten in TBS-Tween bei Raumtemperatur geschüttelt, in 12 ml 1:60000 Strep-POX (verdünnt in TBS-Tween 01%) 1 Stunde inkubiert und anschließend 6 x 5 Minuten gewaschen.

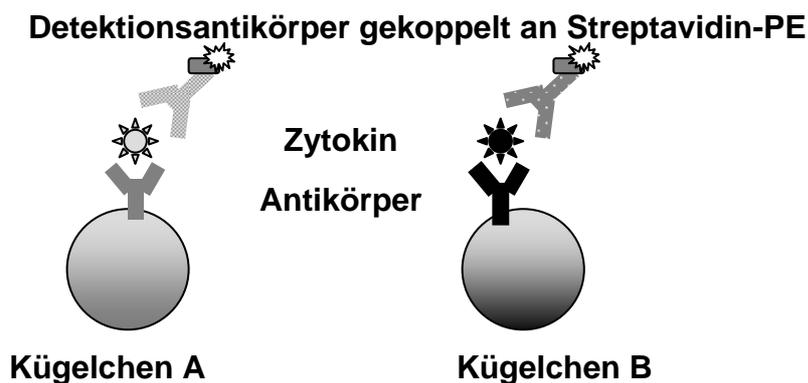
Danach wurde die Membran mit den Lösungen für die verstärkte Chemolumineszenz (*enhanced chemiluminescence*, ECL) benetzt. Das System basiert auf der Oxidation der Peroxidase durch Persäure, wodurch das oxidierte Enzym wiederum Luminol, ein zyklisches Diacylhydrazid, mit Hilfe von Phenol oxidiert. Dadurch befindet sich das Luminol in einem Anregungszustand, der in den Grundzustand zurückkehrt, wobei Licht emittiert wird. Die maximale Licht-Emission findet bei einer Wellenlänge von 428 nm statt und kann auf einem für blaues Licht

sensitivem Autoradiographiefilm als schwarze Verfärbung sichtbar gemacht werden. Lichtblitze erzeugten nur dort ein positives Signal auf dem Autoradiographiefilm, wo der zweite, mit Peroxidase gekoppelte Antikörper das entsprechende Protein auf der Membran bindet.

2.4 Multiplex-Protein-Analysen

2.4.1 Allgemein

Das Luminex-Gerät ermöglicht die simultane Messung (Multiplex-Analyse) mehrerer Zytokine und Chemokine im Überstand einer Zellsuspension. Das System basiert auf Antikörpern, die spezifisch an bestimmte Zytokine/Chemokine binden und an Kügelchen mit jeweils unterschiedlichen Eigenfluoreszenzen gebunden sind. In einem weiteren Schritt bindet ein Biotin-markierter Antikörper an ein anderes Epitop des Zytokins/Chemokins. Diese Bindung wird wiederum über Phycoerythrin-(PE)-gekoppeltes Streptavidin quantifiziert. Hierdurch kann die Photozelle im Gerät über die erste Fluoreszenz der Kügelchen die Art des Zytokins/Chemokins (Qualität), und über die Intensität der zweiten Fluoreszenz des PE, die Menge des vorhandenen Zytokins/Chemokins ermitteln (Quantität). Im Reagenziensystem enthaltene Standardkonzentrationen jedes Zytokins/Chemokins ermöglichen die Quantifizierung jedes Analyten über individuelle Standardkurven.



2.4.2 Durchführung

Die Durchführung erfolgte laut Herstellerprotokoll.

Der lyophilisierte Zytokinstandard wurde in 50 µl Wasser resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde eine Verdünnungsreihe von 32000; 16000; 8000; 2000; 500; 125; 31,5; 7,8 pg/ml in RPMI III/10% FBS hergestellt. Hierfür wurden 25,6 µl Standard mit 374,4 µl Medium verdünnt und je 200 bzw. 100 µl in 200 bzw. 300 µl vorgelegtes Medium titriert. Die benötigten Löcher einer 96-Loch-Bio-Plex MCV-Platte wurden mit je 100 µl *Assay Diluent A* gewaschen, die restlichen Löcher mit Folie abgeklebt. Die Flüssigkeit wurde dazu mit einem Vakuum-Absaugegerät durch die Filter am Plattenboden abgesaugt. Im Anschluß wurden die gut gevortexten Kügelchen (2 µl pro Kügelchen pro Analyt und Loch, in *Assay Buffer A* verdünnt) in einem Volumen von je 50 µl in die Löcher pipettiert und die Platte zweimal mit 100 µl *Wash Buffer A* gewaschen. Da die Kügelchen größer als die Poren der Filter sind, werden diese nicht abgesaugt. Nun wurden 50 µl der Standardverdünnungen und der Zellüberstände aufgetragen. Als Negativkontrolle wurden die verwendeten Medien eingesetzt. Für die Inkubation wurde die Platte abgeklebt, mit Alufolie umwickelt und für 30 Sekunden bei 1100 UpM, danach 45-60 Minuten bei 300 UpM geschüttelt. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Platte dreimal mit *Wash Buffer A* gewaschen und abgesaugt. Kurz vor dem Auftragen wurden die Detektionsantikörper gemischt und je nach Konzentration des Antikörpers 1:50 oder 1:100 in *Ab Diluent* verdünnt. Es wurden 25 µl pro Loch aufgetragen und wie oben beschrieben inkubiert. Im Anschluß an die Waschschrte wurden die Streptavidin-PE-Moleküle 1:100 in *Ab Diluent* verdünnt und in einem Volumen von 50 µl pro Loch aufgetragen. Die Platten wurden wie schon beschrieben für 10 Minuten inkubiert und gewaschen. Zuletzt wurden je 125 µl *Assay Buffer A* auf die Proben gegeben und die Platten bis zur Messung im Kühlschrank aufbewahrt. Vor der Messung wurden die Platten nochmals 30 Sekunden bei 1100 UpM geschüttelt.

Das Bio-Plex-Gerät muss vor jeder Messung mit beigefügten Kalibrierungskügelchen kalibriert werden; die Messung erfolgte automatisiert.

2.4.3 Auswertung

Die einzelnen Standardkurven der verschiedenen Zytokine/Chemokine (Analyten) wurden von der Software automatisch berechnet. Anhand dieser Standardkurven konnte die jeweilige Zytokin oder Chemokin Konzentration in der Probe berechnet werden. Das Programm erlaubt 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.

3. Methoden der Zellkultur

3.1 Allgemeine Bedingungen der Zellkultivierung

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

3.2 Isolierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Es wurden mononukleäre Zellen aus dem venösen peripheren Blut freiwilliger gesunder Spender isoliert. 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 Minuten bei 840 g, ohne zugeschaltete Bremse. Dadurch ergaben sich vier Schichten. Die Dichte des Ficoll erlaubt eine Auftrennung der Blutbestandteile gemäß ihrer Dichtegradienten. Die oberste Schicht setzt sich aus dem Blutplasma zusammen, die mittlere aus Lymphozyten (farbloser Ring, Interphase, darunter das Ficoll, und zu unterst die Erythrozyten und Granulozyten.

Die Interphase wurde in ein frisches Röhrchen überführt und zweimal mit dem fünffachen Volumen an PBS gewaschen. Hierfür erfolgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 540 g mit Bremse. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment durch Aufschütteln resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen (Lymphozyten und Monozyten) in RPMI III aufgenommen und gezählt.

3.3 Bestimmung der Zellzahl

Aus einer Zellsuspension wurden 50 μ l steril entnommen, 1:1 mit Trypanblau gemischt und davon 10 μ l in eine Neubauerzählkammer pipettiert und am Lichtmikroskop ausgezählt. Gezählt wurden nur die lebenden, d.h. nicht mit Trypanblau gefärbten Zellen. Da sich oftmals noch Erythrozyten in der Suspension befanden, wurde darauf geachtet nicht die abgeplatteten sondern nur die kernhaltigen Zellen zu zählen. Die Zellen wurden in einem Großquadrat (16 Kleinquadrate) ausgezählt. Die Zellzahl pro ml Suspension ergibt sich aus der Formel: mittlere Zahl pro Großquadrat x Verdünnungsfaktor x 10^4

3.4 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden für die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dafür musste beim Einfrieren DMSO zugesetzt werden, das die Bildung von Eiskristallen verhindert, welche die Zellen zum Platzen bringen würden. Da DMSO auf stoffwechselaktive Zellen toxisch wirkt, wurden alle Arbeitsschritte zügig und mit gekühlten Medien sowie vorgekühlten Einfrierröhrchen durchgeführt. Die abzentrifugierte Zellsuspension wurde in kaltem FBS resuspendiert und unter Schütteln langsam das gleiche Volumen des kalten Einfriermediums zugetropft (0,5 ml FBS/0,5 ml Einfriermedium/Ampulle und $2-10 \times 10^6$ Zellen). Die Röhrchen wurden zum Transport in eine Einfrierbox überführt, anschließend in Zellstoff verpackt (dies sorgt für eine langsame und schonende Absenkung der Temperatur) und mehrere Tage bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Für die endgültige Aufbewahrung wurden die Zellen in der Gasphase über flüssigem Stickstoff ($-196\text{ }^\circ\text{C}$) in einem Stickstofftank eingelagert.

3.5 Auftauen von Zellen

Die eingefrorenen Ampullen wurden auf Trockeneis ins Labor transportiert und anschließend in einem 37 °C warmen Wasserbad unter leichtem Schwenken aufgetaut. Die bis auf einen erbsengroßen Rest aufgetauten Zellsuspensionen wurden in je 2 ml RPMI III und 2 ml FBS aufgenommen und 5 Minuten bei 540 g abzentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend mit 2 ml RPMI III gewaschen, erneut 8 Minuten bei 540 g abzentrifugiert und im jeweiligen Zellkulturmedium aufgenommen.

3.6 Kultivierung adhärenter Zellen

Die Kultivierung adhärenter Zellen erfolgte in dem für den jeweiligen Zelltyp erforderlichen Medium in liegenden Kulturflaschen. Das Medienvolumen in kleinen Kulturflaschen (25 cm² Adhärenzfläche) betrug 10-12 ml, in mittleren Kulturflaschen (75 cm² Adhärenzfläche) 12-15 ml und in großen Kulturflaschen (125 cm² Adhärenzfläche) 20-25 ml. Transfizierte Zelllinien mit definierter Antibiotikaresistenz als Selektionsmarker wurden in entsprechendem Selektionsmedium kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt oder die Zellen auf mehrere Kulturflaschen aufgeteilt (gesplittet). Für letzteres wurde das Medium abgesaugt, die Kulturflasche mit PBS gespült um letzte, Trypsin-inhibierende FBS Reste zu beseitigen. Dann wurden 10 µl/cm² Zellfläche Trypsin-EDTA zugegeben und für 1-2 Minuten bei RT oder im Falle von schlecht ablösbaren Zellen bei 37 °C inkubiert. Trypsin verdaut die interzellulären Brücken an und EDTA komplexiert Ca²⁺. Nach kräftigem Klopfen der Kulturflasche konnten die so abgelösten Zellen in dem entsprechenden Medium aufgenommen und auf zwei neue Kulturflaschen verteilt werden.

3.7 Kultivierung nicht adhärenter Zellen

Nicht adhärenente Zellen wurden in liegenden kleinen Kulturflaschen in den entsprechenden Medien kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurde die Hälfte der Zellsuspension abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt.

3.8 Kultivierung von T- und NK-Zellen

T- und NK-Zellen wurden nach der Separation in T- bzw. NK-Zell-Medium in 24-Loch Platten ausgesät (1×10^6 Zellen/ Loch/ ml). Lymphokin-aktivierten T-Zellen wurden über Nacht $5 \mu\text{g/ml}$ Lectin zugegeben und für die weitere Kultivierung IL-2 1000 U/ml in das T-Zell-Medium gegeben. Für verschiedene Stimulationsansätze wurde das Lektin weggelassen und verschieden Zytokine in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. NK-Zellen wurden in NK-Zell-Medium kultiviert. Die Löcher am Rand der Platten wurden mit PBS befüllt und nur die inneren Reihen für die Kultivierung der Zellen genutzt, um ein Austrocknen und Kontaminationen zu vermeiden. Da T- und NK-Zellen relativ fest am Boden der Platte wachsen, konnte für den Medienwechsel alle drei bis vier Tage das alte Medium zur Hälfte abgesaugt und neues dazu pipettiert werden, ohne Zellen zu verlieren. Zum Expandieren der Zellen wurden diese mit einer Pasteurpipette aufgewirbelt und auf zwei Löcher verteilt.

3.9 Separation verschiedener Zellpopulationen

Die Separation der PBMC in CD4 oder CD8 positive T-Zellen und NK-Zellen erfolgte mittels der negativen Isolationsmethode von Dynal. Diese basiert auf einer Aufreinigung der gewünschten Zellpopulation durch Depletion der unerwünschten Zellen. Hierfür enthält der Kit ein Antikörpergemisch sowie magnetische Kügelchen, an welche die Antikörper gekoppelt sind. Hierfür wurden 1×10^7 Zellen in $100 \mu\text{l}$ PBS/0,1% FBS resuspendiert und $20 \mu\text{l}$ Kügelchen sowie $20 \mu\text{l}$ Antikörpergemisch zugegeben. Dieses enthielt 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. Anschließend erfolgte für die negative Isolation von NK-Zellen eine Inkubation der PBMC für 10 Minuten bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ auf dem

Roller, für die negative Isolation von T-Zellen 10 Minuten bei 4 °C. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml PBS/ FBS gewaschen und für 8 Minuten bei 500 g abzentrifugiert. NK-Zellen wurden in 0,95 ml, T-Zellen in 0,9 ml PBS/FBS aufgenommen. Zu den NK-Zellen wurden anschließend 50 µl der Kügelchen gegeben, zu den T Zellen 100 µl und es folgte für 10 Minuten bei 4 °C bzw. 15 Minuten bei 20 °C die Inkubation. Anschließend wurde die Suspension mehrmals vorsichtig auf und abpipettiert und 0,5 bzw. 1 ml PBS/FBS hinzugegeben, bevor sie in den Magneten eingespannt wurde. Die nicht an den Magneten gebundene T- und NK-Zell Suspension wurde nach 2 Minuten, während das Röhrchen sich noch am Magneten befand, in ein neues Röhrchen überführt. Zu der NK-Zell-Suspension wurden nochmals 50 µl Kügelchen gegeben und die letzten Schritte wiederholt. Schließlich konnten die Zellen gezählt, abzentrifugiert und in entsprechendes Medium überführt werden.

4. Durchflusszytometrie

4.1 Allgemein

Die Durchflusszytometrie am *fluorescence activated cell scanner* (FACS) ermöglicht eine Analyse der Expression von bestimmten Zellmolekülen über Fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper. Diese Antikörper sind spezifisch für Proteine auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren. Der FACSCalibur ist mit zwei Lasern ausgestattet (488 nm Argon und 633 nm He/Ne), die verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe anregen können. Diese emittieren durch die Anregung Licht bestimmter Wellenlänge, das von Photozellen im FACS qualitativ und quantitativ gemessen wird. Dadurch kann die Art der Markierung (Expression eines spezifischen Moleküls) und deren Intensität (Expressionsstärke des spezifischen Moleküls) auf jeder einzelnen Zelle bestimmt werden. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) ermöglicht zusätzlich eine Aussage über die Größe, das Seitenstreulicht (*side scatter*, SSC) über die Granularität der Zelle. Somit ist es möglich die Zellen nach Größe, Granularität und Expression bestimmter Moleküle einzuteilen.

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), CyChrome (FL-3, Emissionsmaximum bei 675 nm) oder APC (Allophycocyanin, FL-4, Emissionsmaximum bei 767 nm) markiert.

4.2 Direkte Färbungen

Die zu messenden Zellen wurden abzentrifugiert und in FACS-Puffer (PBS/1% FBS/0,1% NaN₃) aufgenommen. Pro Ansatz wurden 40 µl der Zellsuspension mit jeweils 2 µl von bis zu vier verschiedenen direkt markierten Antikörper für 60 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Pro Ansatz wurden zwischen 50.000 und 200.000 Zellen verwendet. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer für 5 Minuten bei 540 g gewaschen. Der Überstand wurde abgegossen und die markierten Zellen entweder in 100-150 µl FACS-Puffer aufgenommen und sofort gemessen oder mit 100-150 µl 1% PFA/PBS fixiert und innerhalb der nächsten Tage gemessen. Zu jeder Messung wurden positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Für die Negativkontrollen dienten nicht-spezifisch-bindende Antikörper mit den jeweils in der Messung verwendeten Isotypen (Isotypkontrollen). Die fixierten FACS Proben wurden im Kühlschrank aufbewahrt, um ein Ausbleichen der Farbstoffe zu vermeiden.

4.3 Indirekte Färbungen

Unmarkierte Antikörper mussten indirekt nachgewiesen werden. Hierfür wurden die 50.000-200.000 Zellen wie unter 4.2 beschrieben mit 30 µl des ersten unmarkierten Antikörpers (Primärantikörper) für 30-45 Minuten inkubiert, gewaschen und mit einem gegen den ersten Antikörper gerichteten PE-markierten Antikörper (Sekundärantikörper) wie unter 4.2 erklärt inkubiert und wiederum gewaschen. Als Isotypkontrollen dienten nicht bindende und ebenfalls unmarkierte Primärantikörper.

4.4 Intrazelluläre Färbung

Um Proteine wie Perforin im Zellinneren zu färben, wurden die Zellen zur Charakterisierung zunächst wie unter 4.2 geschildert mit klassischen T-Zellmarkern wie CD3 und CD4 direkt gefärbt. Anschließend wurden die Zellen 30 Minuten mit 1% PFA fixiert und durch einen Waschschrift mit 500 μ l 0,1% Saponin permeabilisiert. Die Zellen wurden dann in 100 μ l 0,025% Saponin aufgenommen und mit je 2 μ l des FITC markierten Perforin Antikörpers oder der Isotypkontrolle für 60 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit 0,1% Saponin gewaschen, in 100 μ l PBS aufgenommen und sofort gemessen.

5. Chromfreisetzungstest

5.1 Behandlung der Zielzellen

Zur Untersuchung der zellvermittelten Lyse (*cell mediated lysis*, CML) wurden Chromfreisetzungstests durchgeführt. Hierfür wurden die Zielzellen mit radioaktivem Chrom (NaCrO_4) markiert, das bei einer Lyse der Zielzelle durch die Effektorzelle in den Überstand freigesetzt wird und somit in diesem nachgewiesen werden konnte. Etwa 3×10^6 Zellen wurden in 200 μ l FBS aufgenommen und mit 40-50 μ l radioaktivem Natriumchromat (ca. 85 μ Ci, in RPMI III verdünnt) für 90 Minuten 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 CML-Medium für 5 Minuten bei 540 g gewaschen und gezählt. Die Zielzellen wurden dann in das berechnete Endvolumen in entsprechender Zellzahl (2000 Zellen/50 μ l)überführt.

5.2 Direkte zellvermittelte Lyse

Für die direkte zellvermittelte Lyse wurden die Killerzellen auf 96-Loch-Rundboden-Platten in abnehmenden Zellzahlen in einem Volumen von 50 μl vierfach titriert. Hierfür wurden in ein Loch 100 μl der Killerzellen, mit der zweifachen Zellzahl für eine bestimmte Effektor-zu-Zielzellratio, pipettiert. Diese Ratio lag zwischen 10:1 und 80:1. Anschließend erfolgte eine Titration von je 50 μl in 50 μl vorgelegtes CML-Medium. Die Chrom-markierten und gewaschenen Zielzellen wurden in konstanter Zahl von 2000 Zellen pro 50 μl und Loch auf die Effektorzellen verteilt, so dass sich abnehmende Effektor-zu-Zielzell Verhältnisse ergaben. Für jede Probe ergab sich dadurch ein Gesamtvolumen von 100 μl . Nach Ablauf der vierstündigen Inkubationszeit bei 37 °C wurden 50 μl des Überstandes pro Ansatz auf die Messplatten (Lumaplaten) übertragen. Alle Ansätze wurden als Duplikate angefertigt. Zur Bestimmung der spontanen Chromfreisetzung der Zielzellen wurde ein Ansatz nur mit Zielzelle und 50 μl CML-Medium inkubiert. Für die maximale Chromfreisetzung wurden 50 μl der Zielzelle direkt auf die Messplatte übertragen und dieser Wert wurde durch zwei geteilt, da aus dem Gesamtvolumen 50% auf die Messplatte übertragen wurde.

5.3 Redirigierte Lyse

Für die redirigierte Lyse wurde die murine Mausmastozytomlinie P815 als Zielzelle verwendet, die Fc-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimiert. Da die verwendeten Antikörper aus der Maus stammen und einen IgG-Isotyp besaßen, konnte die Zielzelle P815 mit ihnen beladen werden. Hierfür wurden 25 μl Antikörper in einer 96-Loch-Platte in absteigender Konzentration vierfach titriert, wobei 25 μl Medium vorgelegt wurden und 50 μl Antikörper ins erste Loch pipettiert und von oben nach unten titriert wurden. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur mit jeweils 1000 ^{51}Cr markierten P815 Zellen (in 50 μl) wurden 25 μl Killerzellen in konstanter Zellzahl zu den Ansätzen gegeben, so dass sich ein Gesamtvolumen von 100 μl ergab, von dem nach Ablauf der vierstündigen Inkubationszeit je 50 μl des Überstands auf die Messplatten überführt wurde. Bei diesem Versuch konnten also die Effekte verschiedener Antikörperkonzentrationen bei einem gleich bleibenden Effektor-zu-Zielzell Verhältnis verglichen werden. Die Ansätze wurden in Duplikaten

pipettiert und die spontane Lyse sowie die maximale Chromfreisetzung wurden wie unter 5.2 beschrieben pipettiert.

5.4 Messung und Auswertung

Die Messplatten wurden über Nacht zum Trocknen unter den Abzug gestellt und am nächsten Tag mit Folie beklebt 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.

D. ERGEBNISSE

Bereits in früheren Arbeiten wurde die nicht-MHC-restringierte Zytotoxizität von CD3⁺ αβ⁺TZR T-Zellen für gemischte Populationen beschrieben, die über allogene oder zytokininduzierte TZR-unabhängige Stimulation generiert worden waren und Zytotoxizität gegen HLA-Klasse-I-negative Zielzellen zeigten. Ein Ziel dieser Arbeit war es zu beweisen, dass nicht-MHC-restringierte Aktivität von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen einen alternativen funktionellen Status darstellt, der unabhängig von Signalen über den TZR auftritt. Als Charakterisierung dieser nicht-MHC-restringierten Aktivität habe ich zunächst funktionelle Analysen mit hochaufgereinigten Populationen peripherer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durchgeführt.

1. Isolierte T-Zellen zeigen nicht-MHC-restringierte Zytotoxizität, die durch HLA-Klasse-Ia und -Ib Moleküle inhibiert wird

αβ⁺T-Zellen von fünf gesunden Spendern wurden durch negative Isolierung über eine Depletion von Monozyten, Granulozyten, B-Zellen, NK-Zellen, γδT-Zellen sowie entsprechend CD4⁺ bzw. CD8⁺ αβ⁺TZR T-Zellen gewonnen. Als Kontrolle wurden zusätzlich alle Experimente mit einer unseparierten gemischten Population und mit separierten NK-Zellen durchgeführt. Die Qualität der Separation wurde an Tag drei, sieben und 14 durch durchflusszytometrische Analysen überprüft. Abbildung D1 zeigt ein für alle Spender repräsentatives Beispiel.

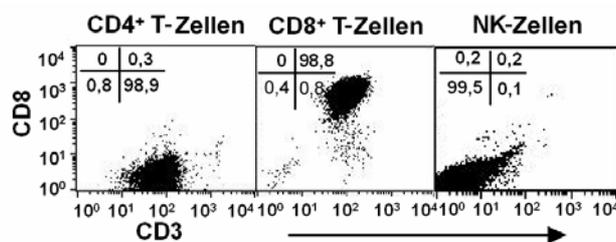


Abb. D1.1: Reinheit der isolierten, aus PBMC angereicherten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie NK-Zellen. Gezeigt ist eine Oberflächenfärbung von CD3 und CD8 auf isolierten Zellen von Spender JB an Tag drei (CD4⁺ T-Zellen, NK-Zellen) und Tag 14 (CD8⁺ T-Zellen). Links oben sind die Prozentsätze der gefärbten Zellen für jeden Quadranten angegeben.

Der Reinheitsgrad der Isolierung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen lag zwischen 98% und 100% für jede Population bei allen Spendern über einen Kultivierungszeitraum von 14 Tagen. Im Gegensatz dazu zeigten die NK-Populationen zwar an Tag drei noch eine Sauberkeit von 98-99%, an Tag sieben akkumulierten jedoch bereits bis zu 10%, nach 14 Tagen oft bis zu 40% αβ⁺TZR T-Zellen in der Kultur. Die konstanten Phänotypdaten der T-Zellen bestätigten damit, dass die jeweilige zytotoxische Aktivität zweifelsfrei auf *bona fide* CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zurückzuführen ist und nicht auf kontaminierende NK-Zellen.

Nach Stimulation der T-Zellen und der unseparierten Population mit IL-2 (1000 U/ml) und Lektin (Phytohämagglutinin) wurde die Zytotoxizität der Zellen an Tag drei, sieben und 14 gegen eine Reihe **HLA-Klasse-I-negativer** bzw. niedrig HLA exprimierender Zielzellen und ihre **HLA-Klasse-I-positiven** Transfektanten oder Varianten getestet.

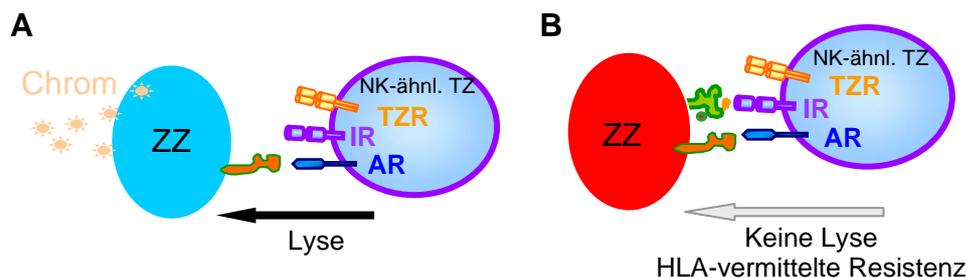


Abb. D1.2: Schematische Darstellung der Zell-vermittelten-Lyse. ZZ Zielzelle, NK-ähnliche TZ NK-ähnliche T-Zelle, TZR T-Zell-Rezeptor, IR Inhibitorischer Rezeptor, AR Aktivierender Rezeptor. **A)** Besitzt die ZZ kein HLA auf der Oberfläche, so kann sie die NK-ähnliche TZ nicht abschalten. Besitzt die NK-ähnliche TZ aber entsprechende AR für Liganden auf der ZZ wird sie aktiviert und lysiert die ZZ, was durch die Chromfreisetzung nachgewiesen werden kann. **B)** Exprimiert die ZZ HLA auf der Oberfläche und besitzt die NK-ähnliche TZ einen spezifischen IR kann dieses inhibitorische Signal dem aktivierenden entgegenwirken und die Lyse abschalten.

Zu den HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen gehören die Erythroleukämiezelllinie K562, das B-Zell-Lymphom Daudi und die EBV-transformierte B-Zelllinie L721.221. Die Nierenzellkarzinomlinie RCC26 repräsentiert eine nicht-hämatopoietische Tumorzelllinie mit niedriger HLA-Klasse-I-Expression, deren HLA-Expressionsmuster z.B. durch IFN-γ-Stimulation deutlich gesteigert werden konnte. Als negative Regulatoren der Zytotoxizität der NK-ähnlichen T-Zellen und NK-Zellen sowie der unseparierten Population dienten in meinen Experimenten die K562-Transfektanten, K562- Cw*0304, -E*0103 und -G*0101, ebenso wie die Daudi-Variante, Daudi-β_{2m} (A14, A66.1, B58, Cw6.1, Beschreibung unter Material, Seite 33). Bei dieser Zelle

wurde die durch einen homozygoten β_2m -Defekt hervorgerufene HLA-Klasse-I-Defizienz durch Transfektion mit β_2m -kodierender cDNA aufgehoben. Um zu zeigen, dass die Inhibition der Lyse nicht nur durch die unterschiedlichen HLA-Allotypen beeinflusst wurde, sondern dass das HLA-Expressionsniveau für die Regulierung der Zytotoxizität eine Rolle spielte, wurde die schwach HLA-Klasse-I-exprimierende Nierenzellkarzinomlinie RCC26 (A*0201, A*3303, B*4101, B*5101, Cw*1502 und Cw*1701) mit der Variante RCC26-endo γ 1 verglichen, die aufgrund einer retroviralen IFN- γ -Gen Transduktion endogen IFN- γ produziert [Schendel *et al.* 2000]. Diese Variante exprimiert durch die endogene IFN- γ -Stimulation verstärkt HLA-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche und zeigt die *de novo*-Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen.

D. ERGEBNISSE

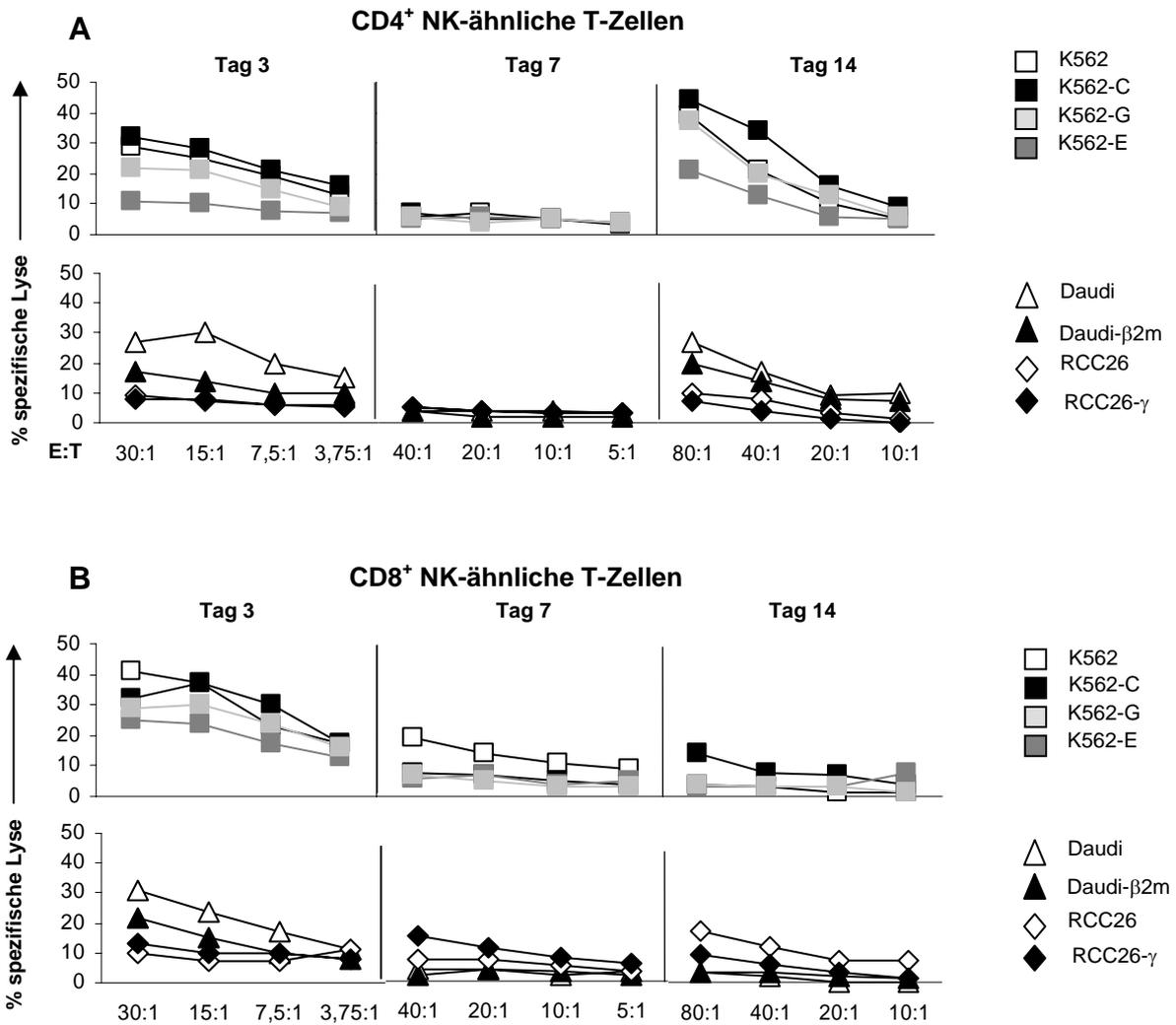


Abb. D1.3: Zytotoxizität und Inhibition der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von Spender JB an Tag drei, sieben und 14. Aufgetragen wurde die Effektor-zu-Zielzellratio (E:T) und der Prozentsatz spezifischer Lyse. Gezeigt sind in A) CD4⁺ und in B) CD8⁺ T-Zellen, kultiviert mit 1000 U/ml IL-2 und Lektin, die zu drei verschiedenen Zeitpunkten auf ihre zytotoxische Aktivität gegen die HLA Klasse I-negativen Zielzellen K562, Daudi, sowie der schwach HLA Klasse I-positiven RCC26 geprüft wurden. Die Inhibition der Zytotoxizität erfolgte über die transfizierten HLA-Moleküle, HLA-Cw*0304, -E-*0103 und -G*0101 auf K562. Eine Abschaltung konnte auch durch die Daudi-β₂m Variante beobachtet werden, die nach β₂m-Transfektion von Daudi die HLA-Moleküle, HLA-A14, -A66.1, -B58 und -Cw6.1 exprimiert. RCC26-endoy₁ exprimiert durch das endogene IFN-γ vermehrt HLA-Klasse-I auf der Oberfläche und reguliert dadurch die Lyse herunter.

CD4⁺ T-Zellen lysierten an Tag drei und 14 die HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen K562 und Daudi jedoch nicht die schwach HLA-Klasse-I-exprimierenden RCC26-Zellen (Abb. D1.3A). Bei CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen war eine gute Lyse von K562 und Daudi an Tag drei zu beobachten, welche zu den Tagen sieben und 14 hin deutlich abnahm. Auch CD8⁺ T-Zellen lysierten RCC26 nur äußerst schwach (10% spezifische Lyse an Tag drei, Abb. D1.3B). Generell blieb auch bei allen anderen Spendern die lytische Aktivität von CD4⁺ T-Zellen unter der von CD8⁺ T-Zellen, die

als CTL als Hauptfunktion lytische Aktivität ausüben. Diese Zytotoxizität von CD4⁺ T-Zellen ist ungewöhnlich, da die Produktion von Zytokinen und nicht Zytotoxizität als Hauptaufgabe von CD4⁺ T-Zellen angesehen wird, weshalb sie auch als T-Helfer-Zellen bezeichnet werden. Die lytische Aktivität beider T-Zellpopulationen dieses Spenders (JB) wurde durch HLA-E, schwach durch HLA-G und nicht durch HLA-C Moleküle inhibiert. CD8⁺ T-Zellen wurden an Tag drei durch HLA-E am stärksten, HLA-G schwächer und kaum durch HLA-C inhibiert. Die CD4⁺ T-Zellen dieses Spenders verloren ihre zytotoxische Aktivität an Tag sieben, erlangten sie an Tag 14 jedoch zurück. Bei den CD8⁺ T-Zellen hingegen nahm sie langsam bis zu Tag 14 ab. Die Lyse der HLA-Klasse-I-negativen Daudi-Zellen durch beide T-Zellpopulationen wurde durch die HLA-Klasse-I-exprimierende Variante Daudi-β₂m inhibiert. Auch an diesem Beispiel einer HLA-Klasse-I-positiven Variante (Daudi-β₂m) einer ursprünglichen HLA-Klasse-I-negativen Zelle (Daudi) ließ sich also bestätigen, dass HLA-Klasse-I-Moleküle diese T-Zell-Aktivität inhibieren können. Allgemein zeigten NK-ähnliche T-Zellen an Tag drei die höchste zytotoxische Aktivität, wohingegen an Tag 14 bereits eine E:T von 80:1 eingesetzt werden musste, um die lytischen Eigenschaften der beiden T-Zellpopulationen messen zu können. Als Vergleich zu diesen T-Zelllinien wurden bei den Zytotoxizitätsversuchen zusätzlich NK-Zellen und die unseparierte Population (eine Mischung aus durchschnittlich 70-95% T-Zellen und 5-30% NK-Zellen) mitgeführt.

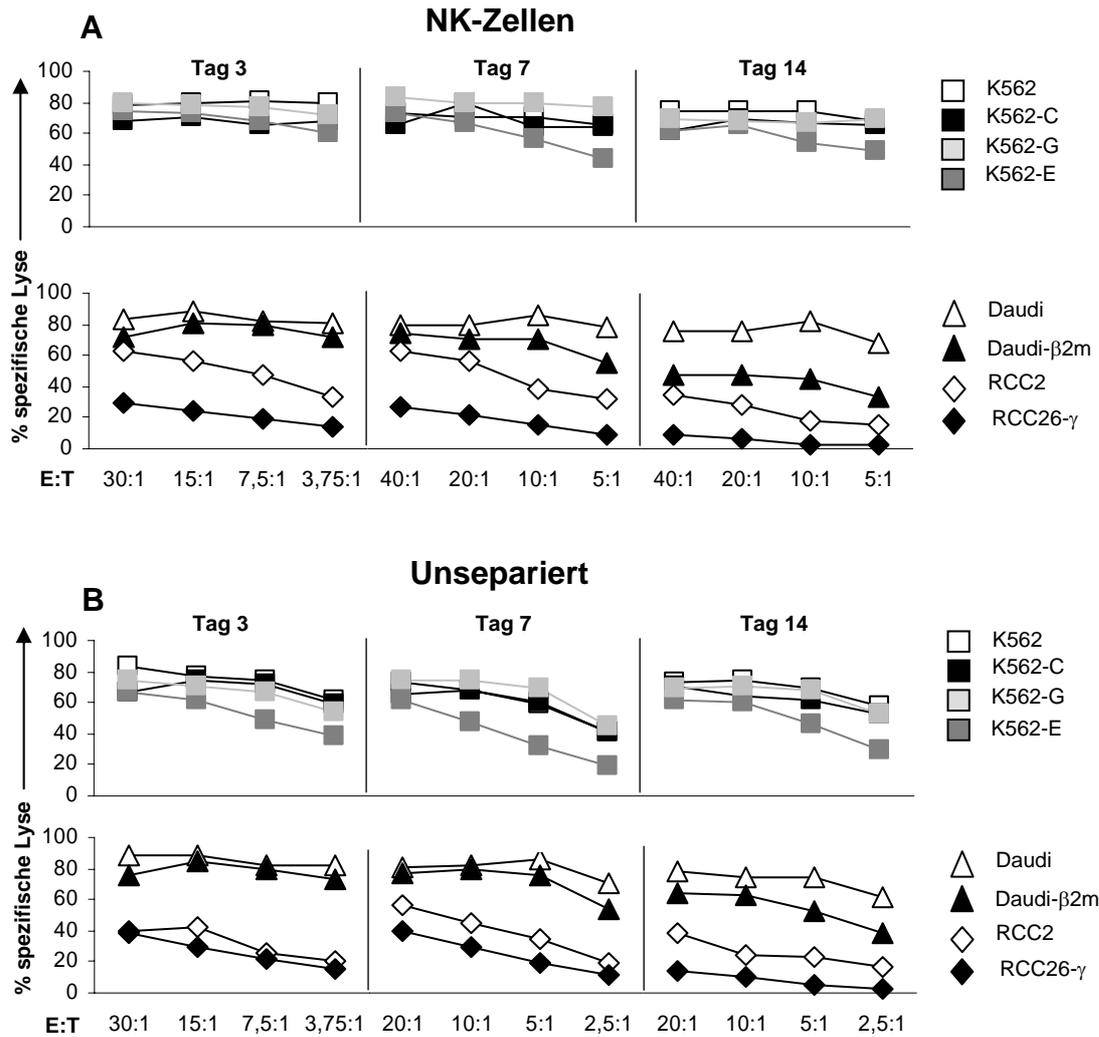


Abb. D1.4 Zytotoxizität der separierten NK-Zellen und der unseparierten Population. Aufgetragen wurde die Effektor-zu-Ziellratio (E:T) und der Prozentsatz spezifischer Lyse. Gezeigt sind in **A)** die NK-Zellen und in **B)** die unseparierte Population des Spenders JB.

Die NK-Zellen und die unseparierte Population zeigten eine viel stärkere Lyse als die IL-2/Lektin stimulierte T-Zellen (Abb. D1.4A, B). Allerdings konnte die lytische Aktivität von K562 bei diesen aktivierten NK-Zellen nicht über HLA-E, -G oder -Cw3 inhibiert werden. Bei den unseparierten Populationen war nur eine schwache Inhibition durch HLA-E zu beobachten. Die auf Daudi- β_2m exprimierten HLA-Klasse-I-Moleküle erwiesen sich besonders an Tag 14 als Inhibitoren der lytischen Aktivität der NK-Zellen sowie der unseparierten Population. RCC26-endo γ 1 inhibierte im Vergleich zu RCC-26 die Lyse der NK-Zellen. Ein schwächerer inhibitorischer Effekt wurde bei der unseparierten Population nachgewiesen. Bei aktivierten NK-Zellen wurde bereits vielfach beobachtet, dass die Stimulation so stark war, dass eine HLA-vermittelte Abschaltung unmöglich war, da sich das Gleichgewicht zu stark in Richtung Aktivierung verschoben hatte.

D. ERGEBNISSE

Zusätzlich zu den oben genannten Zielzellen wurde die HLA-Klasse-I-negative B-Zelllinie L721.221 als Zielzelle getestet und eine Reihe HLA-exprimierender Transfektanten dieser Zelllinie. So wurde auch die hemizygot Variante L721.112, die hemizygot den HLA-Haplotyp A1, B8 und Cw7 exprimiert im Vergleich zu den HLA-Klasse-Ia-positiven Transfektanten L721.221-Cw6, -Cw7, -B27, -B35 und -B37 und der HLA-Klasse-Ib-Transfektante L721.221-G getestet.

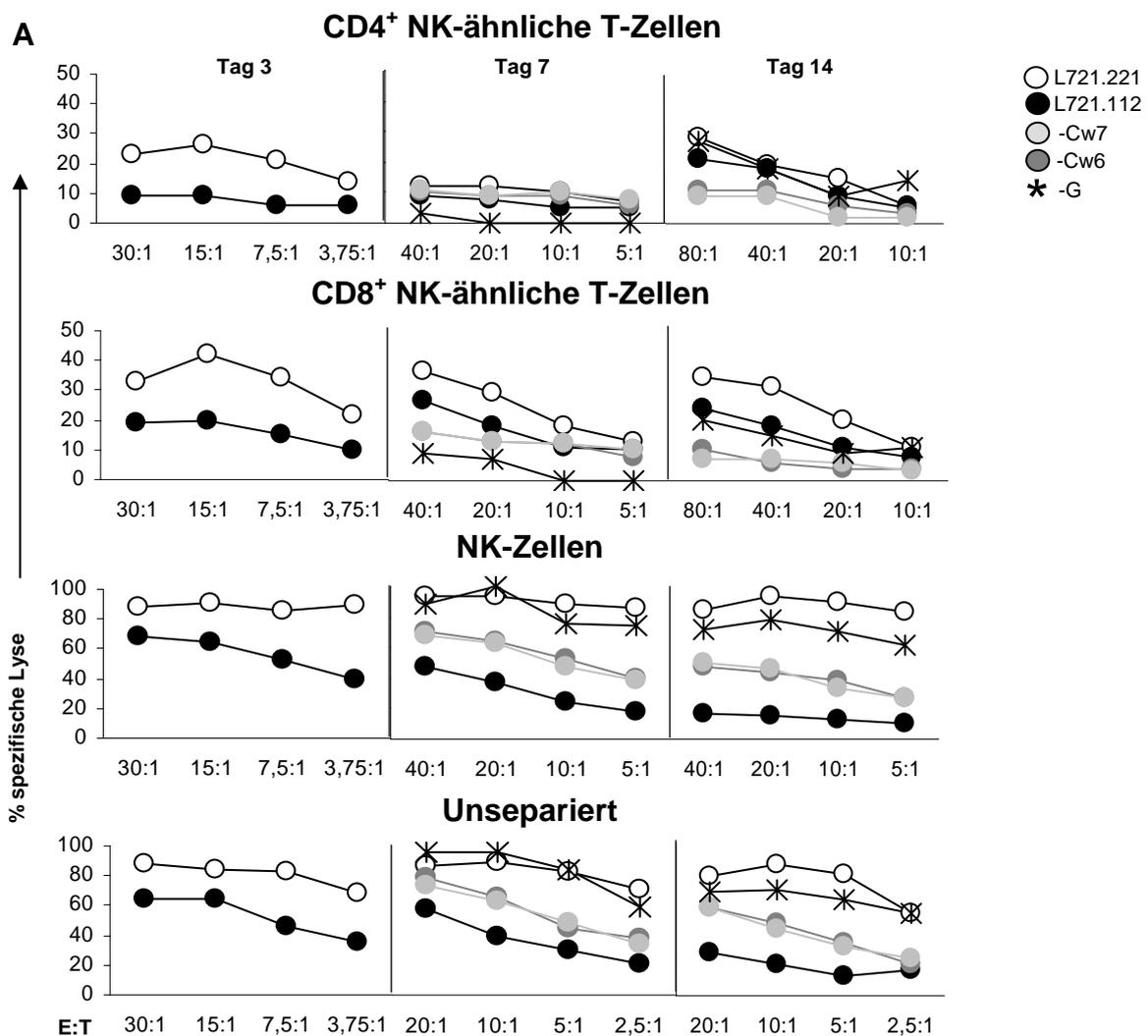


Abb. D1.5: Zytotoxizität der T- und NK-Zellen, sowie der unseparierten Population des Spenders JB. Dargestellt ist in **A)** die Lyse der Zielzelle L721.221 und der hemizygoten Variante L721.112. An Tag sieben wurden zusätzlich die Transfektanten L721.221-Cw6, Cw7 und -G getestet.

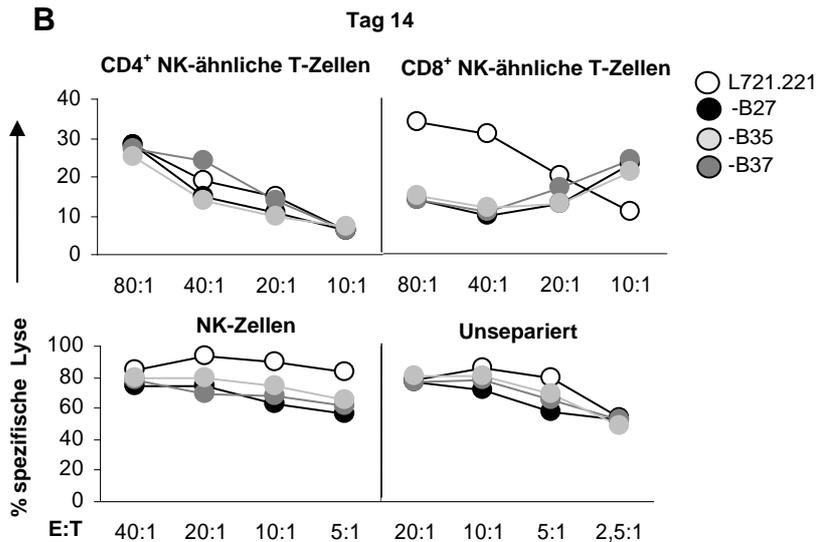


Abb. D1.5: B) Zusätzlich wurden an Tag 14 die zytotoxischen Eigenschaften der vier Zellpopulationen gegen L721.221-B27, -B35 und -37 getestet.

L721.221 diente an allen drei getesteten Zeitpunkten als sehr gute Zielzelle für alle vier Populationen (Abb. D1.5A). Ebenso vermochte die Variante L721.112 die Lyse aller Effektorpopulationen speziell an Tag drei deutlich zu inhibieren. Die beiden HLA-C-Moleküle, Cw6 und Cw7, inhibierten die lytische Aktivität der T- und NK-Zellen sowie die der gemischten Zellpopulation mit ähnlicher Effizienz. Dies deutete darauf hin, dass die starke Inhibition der L721.112-Variante zumindest teilweise dem im A1, B8, Cw7-Haplotyp exprimierten Cw7 Molekül zuzuschreiben ist. HLA-G regulierte die lytische Aktivität bei allen CD4⁺ T-Zellen an Tag sieben und bei CD8⁺ T-Zellen auch an Tag 14 herunter. Die Beobachtung, dass sich die Zytotoxizität von NK-Zellen nicht durch HLA-G inhibieren ließ, scheint in Widerspruch zu publizierten Daten zu stehen, welche eine HLA-G-vermittelte Inhibition für alle NK-Zellen durch KIR2DL4-Rezeptor postulieren [Watzl *et al.* 2000]. Da ohne entsprechende Reagenzien ein KIR2DL4-Expressionsnachweis nicht möglich ist, kann diese Diskrepanz im Augenblick nur spekulativ beantwortet werden. Möglicherweise ist KIR2DL4 auf aktivierten NK-Zellen nicht ausreichend exprimiert oder die HLA-G/2DL4-Interaktion ist zu schwach für eine effektive Inhibition und wird daher von einer starken Aktivierung dominiert.

An Tag 14 waren meist ausreichend Zellen vorhanden, um drei weitere Transfektanten von L721.221 in die funktionellen Analysen mit einzubeziehen (Abb. D1.5B). HLA-B27, -B35 und -B37 bewirkten keine Inhibition der lytischen Aktivität der CD4⁺ T-Zellen, der gemischten Population bzw. der NK-Zellen. Dagegen ist eine deutliche Inhibition der Lyse durch CD8⁺ T-Zellen zu beobachten. Ein indirekter HLA-

E-Effekt durch eine Stabilisierung durch das B35-Signalpeptid konnte mittels durchflußzytometrischer Analysen und eines HLA-E-spezifischen Antikörpers ausgeschlossen werden. Diese CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen wurden aufgrund ihrer Zytotoxizität gegen HLA-Klasse-I-negative Zielzellen und der HLA-Klasse-I-vermittelten Inhibition als NK-ähnliche oder nicht-MHC-restringierte T-Zellen bezeichnet.

Diese Lysemuster zeigten, dass unterschiedliche HLA-Klasse-I-Allotypen die Zytotoxizität der T-Zellen herunterregulieren können, da Daudi-β₂m (HLA-A14, A66.1, B58, Cw6.1) und L721.112 (A1, B8, Cw7) verschiedene HLA-Klasse-I-Allele exprimieren und diese beiden Varianten eine Inhibition der Effektorzellen bewirkten. Spezifität und Niveau der Zytotoxizität der NK-ähnlichen T-Zellen unterschieden sich zwischen den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen eines Spenders sowie zwischen den fünf verschiedenen Spendern und differierten ebenfalls in der individuellen Kinetik (Tab. D1.1-D1.3). Dies resultiert aus dem variierenden funktionellen Status der T-Zellen während der Kultur und/oder der Kultivierung unterschiedlicher Lymphozytensubpopulationen. Die K562-Transfektanten beeinflussten je nach Spender, T-Zellpopulation und Tag sehr unterschiedlich die Zytotoxizität der NK-ähnlichen T-Zellen. Gegen RCC26 wurde bei drei Spendern an einem der drei Versuchstage eine lytische Aktivität durch NK-ähnliche T-Zellen gemessen. Das Fehlen der Zytotoxizität gegen diese Nierentumorzelllinie ist nicht auf eine HLA-Klasse-I-vermittelte Inhibition zurückzuführen, sondern resultiert vielmehr aus der generell schwächeren lytischen Aktivität aller NK-ähnlichen T-Zellen gegen nicht-hämatopoietische Zielzellen, wie RCC-26, im Vergleich zu hämatopoietischen Zielzellen wie K562, Daudi und L721.221. Im Falle der Lyse von RCC26-Zellen konnte für RCC-26 endo-γ1-Zellen aufgrund ihrer erhöhten HLA-Expression immer Resistenz gegen die Lyse gezeigt werden. Dies deutete darauf hin, dass zum einen die Lyse der RCC Tumorlinie zwischen den NK-ähnlichen T-Zellen verschiedener Spender variierte und zum anderen niedrige HLA-Klasse-I-Expression auf RCC-Zelllinien eine Lyse durch NK-ähnliche T-Zellen ermöglichte, während Erhöhung der HLA-Klasse-I-Expression zu Resistenz gegenüber der Lyse führte. Betrachtet man alle fünf Spender, so lässt sich als gemeinsamer Befund folgendes zusammenfassen: Die HLA-Klasse-I-negativen Linien K562, L721.221 und Daudi wurden von den unterschiedlichen T-Zellpopulationen der verschiedenen Spender sehr gut, aber in unterschiedlichem Maße lysiert. HLA-E inhibierte NK-ähnliche T-

D. ERGEBNISSE

Zellen und könnte gemeinsam mit HLA-C als universeller Inhibitor nicht-MHC-restringierter T-Zellen dienen. L721.112 und Daudi- β_2m regulierten bei allen Spendern die Lyse der CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen herunter. Die Transfektanten L721.221-Cw6 und -Cw7 regulierten zumindest an einem der beiden Tage (sieben oder 14) die lytische Aktivität beider T-Zellpopulationen herunter, wohingegen die Transfektanten L721.221-B27, -B35 und -B37 nur bei drei Spendern an Tag 14 die Lyse inhibierten. Generell zeigten NK-ähnliche T-Zellen eine stärkere lytische Aktivität gegenüber hämatopoietischen Tumorzellen als gegenüber epithelialen RCC-Zellen. In den nachfolgenden Tabellen sind die Aktivierungsmuster der T-Zellen der fünf untersuchten Spender zu drei Zeitpunkten zusammengestellt.

Tabelle D1.1 Spender JB und CF

Spender	JB				CF			
	CD4		CD8		CD4		CD8	
E:T	30:1		30:1		40:1		20:1	
Tag 3	Lyse	Inhibition	Lyse	Inhibition	Lyse	Inhibition	Lyse	Inhibition
K562	29	E,G	41	C,E,G			16	E
Daudi	27	- β_2m	31	- β_2m			25	
RCC26			10					
L721.221	23	L721.112	33	L721.112				
E:T	40:1		40:1		40:1		40:1	
Tag 7								
K562			19	C,E,G			11	C, E, G
Daudi								
RCC26					21	-endoy1	16	-endoy1
L721.221	12	L721.112 -G	36	L721.112 -Cw6 -Cw7 -B27	n.t.		n.t.	
E:T	80:1		80:1		80:1		80:1	
Tag 14								
K562	39	E						
Daudi	27	- β_2m						
RCC26	10		17	-endoy1	11			
L721.221	28	L721.112 -Cw6 -Cw7	34	L721.112 -G -Cw6 -Cw7 -B27 -B35 -B37	13	L721.112 -G -Cw6 -Cw7 -B27 -B35 -B37	14	L721.112 -G -Cw6 -Cw7 -B27 -B35 -B37

Tab. D1.1: Zusammenfassung der lytischen Aktivität der CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen und deren Inhibition durch HLA-Klasse-I-Moleküle. Dargestellt sind die NK-ähnlichen T-Zellen der Spender JB und CF, wobei alle Lysewerte der Zielzellen über 10% angegeben wurden. Inhibition über 50% ist in rot dargestellt, Inhibition unter 20% wurde nicht gewertet, n.t. nicht getestet. Die Inhibition der Lyse wurde für jeden Spender, jede T-Zellpopulation und jeden Versuchszeitpunkt relativ zu den Prozent spezifische Lyse der entsprechenden HLA Klasse-I-negativen Zielzelle berechnet.

D. ERGEBNISSE

Tabelle D1.2 Spender WG und RP

Spender	WG			RP				
	CD4		CD8		CD4		CD8	
E:T	20:1		10:1		40:1		40:1	
Tag 3	Lyse	Inhibition	Lyse	Inhibition	Lyse	Inhibition	Lyse	Inhibition
K562	15	E	14		15	C,E	20	C
Daudi							25	-β ₂ m
RCC26								
L721.221			10	L721.112			20	L721.112
E:T	40:1		40:1		40:1		40:1	
Tag 7								
K562			20	C, E, G	23	E, G	17	G
Daudi							13	++
RCC26								
L721.221			24	L721.112 -G -Cw6 -Cw7			18	L721.112 -Cw6 -Cw7
E:T	80:1		80:1		80:1		80:1	
Tag 14								
K562					59	C, E,G	43	C, G
Daudi					46	-β ₂ m	36	-β ₂ m
RCC26					15	-endoy1		
L721.221			36	L721.112 -G -Cw6 -Cw7 -B27 -B35 -B37	24	L721.112 -Cw6 -Cw7		

Tab. D1.2: Zusammenfassung der lytischen Aktivität der CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen und deren Inhibition durch HLA-Klasse-I-Moleküle. Dargestellt sind die NK-ähnlichen T-Zellen der Spender WG und RP, wobei alle Lysewerte der Zielzellen über 10% angegeben wurden. Inhibition über 50% ist in rot dargestellt, Inhibition unter 20% wurde nicht gewertet, n.t. nicht getestet. Die Inhibition der Lyse wurde für jeden Spender, jede T-Zellpopulation und jeden Versuchszeitpunkt relativ zu den % spezifische Lyse der entsprechenden HLA Klasse I-negativen Zielzelle berechnet.

Tabelle D1.3 Spender AM

Spender	AM			
	CD4		CD8	
E:T	30:1		30:1	
Tag 3	Lyse	Inhibition	Lyse	Inhibition
K562	12	C,E,G	45	C,E,G
Daudi			34	-β ₂ m
RCC26				
L721.221	13	L721.112	42	L721.112
E:T	40:1		40:1	
Tag 7				
K562			14	C,G
Daudi	25	-β ₂ m	11	-β ₂ m
RCC26				
L721.221	13	L721.112 -G -Cw6 -Cw7	36	L721.112 -G -Cw6 -Cw7
E:T	80:1		80:1	
Tag 14				
K562				
Daudi				
RCC26				
L721.221				

Tab. D1.3: Zusammenfassung der lytischen Aktivität der CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen und deren Inhibition durch HLA-Klasse-I-Moleküle. Dargestellt sind die NK-ähnlichen T-Zellen der Spender JB und CF, wobei alle Lysewerte der Zielzellen über 10% angegeben wurden. Inhibition über 50% ist in rot dargestellt, Inhibition unter 20% wurde nicht gewertet, n.t. nicht getestet. Die Inhibition der Lyse wurde für jeden Spender, jede T-Zellpopulation und jeden Versuchszeitpunkt relativ zu den % spezifische Lyse der entsprechenden HLA Klasse I-negativen Zielzelle berechnet.

Als Kontrolle für die Zytotoxizitätsversuche bezüglich der HLA-E-vermittelten Inhibition diente die NK-Leukämiezelllinie NKL, die sich durch die Expression des HLA-E-spezifischen inhibitorischen CD94/NKG2A-Komplexes sowie des pan-HLA-spezifischen ILT2-Rezeptors (CD85j) auszeichnet. Diese Zellen gelten als typische Beispiele nicht-MHC-restringierter Killerzellen, da sie generell HLA-unabhängig aktiviert werden, aber durch HLA-E und einige andere HLA-Klasse-I-Moleküle inhibiert werden können. Im Gegensatz zur deutlich CD94/NKG2A exprimierenden, effektiven Killerzelle NKL zeigte die NK-Leukämieinie YT nur geringe Expression der NK-Rezeptoren CD94/NKG2A und besaß nur eine schwache zytotoxische Aktivität.

In Abbildung D1.6 ist ein typisches Zytotoxizitätsmuster dieser beiden malignen NK-Linien dargestellt.

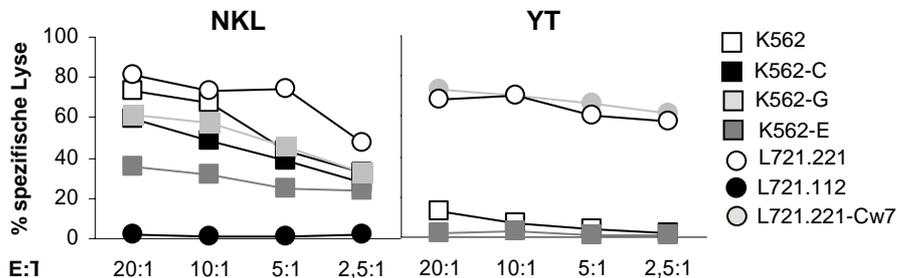


Abb. D1.6: Zytotoxizität von NKL und YT. Gezeigt ist die Lyse der Zielzellen K562 und L721.221 und die Inhibition der Lyse durch K562-E, -C und -G (letzten beiden nur bei NKL), sowie der Variante L721.112 und der Transfektante L721.221-Cw7 (nur YT).

Wie erwartet wurden K562- und L721.221-Zellen von NKL-Zellen deutlich lysiert. Die K562-E Transfektante von K562 war im Gegensatz zu den HLA-C und -G-transfizierten Zellen in der Lage die Lyse abzuschalten. Komplette Resistenz ist bei der A1⁺, B8⁺, Cw7⁺ L721.112-Variante zu beobachten, wobei dieser Effekt auf die ILT-2-vermittelte Inhibition zurückzuführen ist. YT-Zellen hingegen können L721.221-Zellen lysieren, nicht jedoch K562-Zellen, obwohl beide Zelllinien HLA-Klasse-I-negativ sind. Diese Diskrepanz lässt sich nur teilweise durch die geringere Expression verschiedener AR wie NKG2D oder 2B4 auf YT-Zellen erklären. Möglicherweise liegt hier auch ein Defekt in der Signalübertragung und der Expression zytotoxischer Effektormoleküle, wie Perforin, Granzym A und B vor. Da dieser „Defekt“ jedoch bei der Lyse von L721.221-Zellen nicht auftritt, scheint es sich um eine Zielzell-spezifische Eigenschaft zu handeln. Bereits am Beispiel dieser beiden NK-Linien kann ein Eindruck von der Plastizität und Individualität von NK-Zellen gewonnen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass $CD8^+$ und erstaunlicherweise ebenfalls $CD4^+$ NK-ähnliche T-Zellen nach einer TZR-unabhängigen Stimulation (IL-2 und Lektin) in der Lage sind, HLA-Klasse-I-negative Zielzellen zu lysieren. Das Niveau der Lyse unterscheidet sich zwischen verschiedenen Spendern und T-Zellpopulationen und folgt unterschiedlichen Kinetiken. Dies deutet darauf hin, dass NK-ähnliche T-Zellen einen funktionellen Status besitzen, der sich während der zweiwöchigen Kultivierungszeit verändert und/oder unterschiedliche Lymphozytensubpopulationen entstehen. Hämatopoietische Zielzellen können von NK-ähnlichen T-Zellen offensichtlich besser lysiert werden als nicht-hämatopoietische epitheliale Zielzellen. Die Inhibition der NK-ähnlichen T-Zellen kann vor allem über HLA-E und -C, aber auch HLA-A, -B und -G Moleküle erfolgen.

2. Die HLA-Klasse-I-vermittelte Inhibition gereinigter CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ist nicht abhängig von der Expression bekannter inhibitorischer Rezeptoren

Da bei allen NK-ähnlichen T-Zellen eine HLA-C bzw. HLA-E-vermittelte Inhibition der zytotoxischen Aktivität zu beobachten war, lag es nahe, dass diese funktionelle Charakterisierung mit der Expression der bekannten HLA-E bzw. -C-spezifischen Rezeptoren (CD94/NKG2A bzw. KIR2DL1-3) korrelierte. Deshalb wurden alle NK-ähnlichen T-Zellen weiterhin auf die Expression bekannter IR und AR untersucht. Charakteristika dieser Rezeptoren sind in Tabelle I1.1 und I1.2 im Anhang zusammengefasst. In Tabelle D2.1 sind die Rezeptor-Expressionsmuster der NK-ähnlichen T-Zellen eines repräsentativen Spenders an Tag drei, sieben und 14 dargestellt. Die Zusammenfassungen der restlichen Spender finden sich im Anhang Tabelle I1.3-I1.6.

D. ERGEBNISSE

Tabelle D2.1 Phänotypische Charakterisierung des Spenders JB

Tag	CD4			CD8			NK			Uns.		
	3	7	14	3	7	14	3	7	14	3	7	14
Antikörper												
CD3	100	99	100	100	99	100	3	8	40	65	64	61
TZR $\alpha\beta$	100	100	96	100	100	99	7	7	42	64	55	50
CD4	98	99	95	0	5	0	0	3	0	39	29	9
CD56/CD3							1	2	16	5	7	7
CD56/CD3 ⁻	0	0	1	0	0	0	59	77	53	14	28	33
KIR2DL1	1	1	0	0	0	0	1	21	25	0	1	1
2DL2,3/CD3/2B4/CD56	1	1	0	1	0	0	24	21	6	4	2	3
2DL2,3/CD3/2B4/CD56 ⁻									2	2	4	5
KIR3DL1	0	1	0	0	0	0	23	8	7	6	5	3
CD94/NKG2A	2	1	1	5	1	3	50	84	60	24	36	30
CD94/NKG2A ⁻	0	2	0	4	3	0	3	8	22	4	6	4
ILT-2	+	7	3	6	10	3	4	1	13	8	8	3
LAIR-1/CD3	2	7	94	+	+	99	+	+	99	+	33	55
LAIR-1/CD3 ⁻											+	+
CD161/CD3	2	1	2	1	1	0	81	4	44	11	13	1
CD161/CD3 ⁻								+		11	12	1
CD25	100	95	14	90	100	4	20	11	3	17	21	14
CD69	100	10	33	98	+	96	80	100	+	64	81	78
CD25/CD69	99	20	6	88	98	3	19	10	2	15	18	11
CD122*	0	2	2	2	0	1	1	+	+	2	+	0
CD45RO	92	100	99	+	100	100	2	10	60	43	65	88
NKG2D^o	14	15	15	96	100	99	90	95	98	56	87	90
DNAM-1	83	71	90	90	96	99	82	72	62	73	94	90
MOPC21	9	0	14	18	0	15	26	0	8	9	0	13

Tab. D2.1: Übersicht über die Rezeptorexpression des Spenders JB. Dargestellt ist das Expressionsmuster der CD4⁺ (CD4) und CD8⁺ (CD8) NK-ähnlichen T-Zellen, sowie der NK-Zellen und der unseparierten Population (Uns.) an Tag drei, sieben und 14. Einer von fünf repräsentativen Spendern ist dargestellt. In der linken Spalte sind die getesteten Antikörper aufgeführt. Die jeweilige Expression ist in Prozent positiver Zellen angegeben. Die Sauberkeit nach Aufreinigung der T-Zellen lag bei allen Spendern zwischen 98% und 100%. + bedeutet eine schwach positive Verschiebung (siehe Abbildung D2.1 A und B), n.t. nicht getestet. * Die Expression der IL-2R β -Kette (CD122) war bei allen Zellen so gering, das eine klare Subpopulation nicht abgrenzbar war. ^o Zum Zeitpunkt der Analysen lagen NKG2D- und DNAM-1-spezifische mAk nur unmarkiert vor, weshalb die Isotypkontrolle MOPC21 mit dargestellt ist.

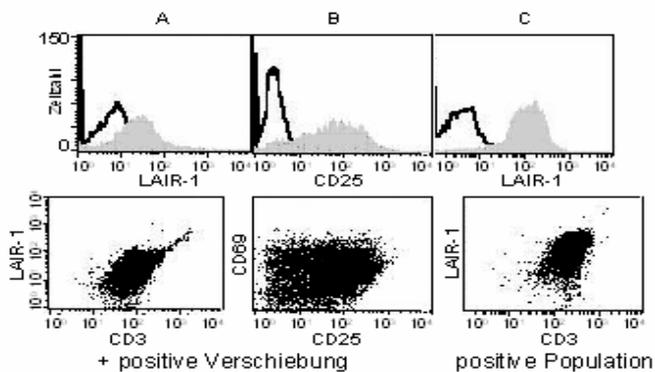


Abb. D2.1: Auswertung der Durchflusszytometrie-Daten aus Tab. D2.1. Dargestellt sind in **A)** CD8⁺ T Zellen an Tag drei, **B)** CD4⁺ T Zellen an Tag sieben und **C)** CD4⁺ T Zellen an Tag 14 von Spender AM. Als Beispiel für eine positive Verschiebung (+ in Tab. D2.1) wird die Expression von LAIR-1 und CD25 (A bzw. B) aufgezeigt. Eine eindeutig positive Population ist für die Expression von LAIR-1 in C dargestellt. In der oberen Reihe sind die Daten zum besseren Vergleich als Histogramme, in der unteren Reihe als Punktelcke aufgezeigt.

Interessanterweise wurden auf NK-ähnlichen T-Zellen (Tab. D2.1) weder KIR2D- noch KIR3D-Rezeptoren exprimiert, obwohl die lytische Aktivität der CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen durch HLA-Cw3, einem KIR2DL2,3-Liganden inhibiert wurde (z. B. bei Spender RP an Tag drei, Tab. D1.2). ILT2 (CD85j) und LAIR-1, die bekanntermaßen auch auf einigen T- und NK-Zellen exprimiert sein können, waren an Tag drei nur schwach nachweisbar und verschwanden entweder danach wieder (ILT2) oder wurden über die Kultivierungsperiode hinweg stärker exprimiert (LAIR-1). Die LAIR-1-Liganden sind zwar nicht bekannt aber HLA-Klasse-I-Moleküle kommen auf keinen Fall in Frage, womit LAIR-1 aufgrund der HLA-vermittelten Inhibition als IR für NK-ähnliche T-Zellen ausscheidet [Trowsdale *et al.* 2001]. Wie erwartet wurde die Expression des AR 2B4 (CD244) nach 14 Tagen auf aufgereinigten CD8⁺, nicht aber CD4⁺ NK-ähnlichen T-Zellen induziert, wohingegen nur eine geringe Anzahl an T-Zellen schon zu früheren Zeitpunkten 2B4 exprimierte. Dies deutet darauf hin, dass 2B4 nicht auf naiven T-Zellen vorkommt, sondern durch verschiedene Stimulationsformen induziert werden muss. Die AR NKG2D und DNAM-1 wurden indirekt gefärbt. Die Expressionswerte mussten gegen die negative Kontrolle MOPC21 abgeglichen werden, da bei dieser indirekten Färbung sonst die Gefahr einer falsch-positiven Färbung besteht. NKG2D wurde von 71-76% der CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen während der gesamten 14 Tage exprimiert, übereinstimmend mit der konstitutiven Expression von NKG2D auf nahezu allen humanen CD8⁺ T- und NK-Zellen [Bauer *et al.* 1999]. Der kostimulierende Rezeptor DNAM-1 wurde auf CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen detektiert, wie dies bereits für klassische T-Zellen beschrieben wurde [Shibuya *et al.* 1996]. CD56 wurde nicht auf CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen gefunden, obwohl CD56 von Subpopulationen aktivierter T-Zellen exprimiert werden kann [Pittet *et al.* 2000]. Alle NK-ähnlichen T-Zellen exprimierten einen CD45RO-positiven Gedächtnis-Phänotyp und unterschieden sich nicht in Bezug auf Aktivierungsmarker wie CD25 und CD69 (Tab. D2.1) von spezifischen T-Zellen, die über den TZR aktiviert wurden. Im Allgemeinen führte die TZR-unabhängige Stimulation der T-Zellen nicht zu Induktion und Expression von inhibitorischen NK-Rezeptoren wie KIR2D und KIR3D. Der ILT2⁺CD56⁻ und LAIR⁺CD56⁻ Phänotyp könnte ein Marker für frühe NK-ähnliche T-Zellen sein, da dieser Phänotyp an Tag drei für alle fünf Spender charakteristisch war. Klassische T-Zellen mit Ausnahme einiger Subpopulationen, exprimieren weder

ILT2 noch LAIR-1, aber diese IR sind eventuell in das Altern von Lymphozytenpopulationen involviert [Snyder *et al.* 2002].

CD161 (NKR1A) ist ein potenzieller AR auf NK-Zellen, dessen Liganden im humanen System nicht bekannt sind. Dieser Rezeptor wird auf T-Zellen auch nach Zytokin/Lektinstimulation nicht exprimiert.

Während 2B4 und NKG2D *per se* nicht von separierten und isoliert kultivierten CD4⁺ NK-ähnlichen T-Zellen exprimiert wurden, konnten beide Rezeptoren detektiert werden, wenn die CD4⁺ NK-ähnlichen T-Zellen für 24 Stunden (bei Spender RP) bzw. 48 Stunden (bei Spender JB) mit autologen NK-Zellen inkubiert wurden (Abb. D2.2). Dies deutete darauf hin, dass direkte Zell-Zell-Interaktionen oder die Sekretion spezifischer Stimuli durch NK-Zellen für diese Induktion verantwortlich waren.

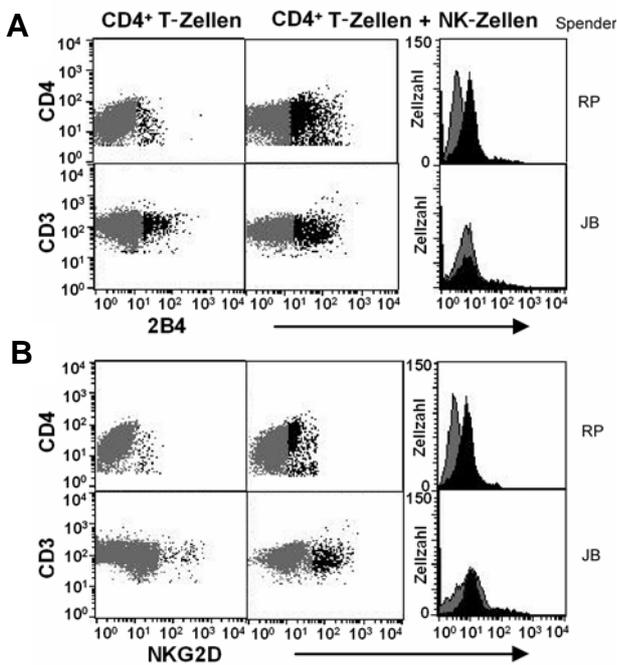


Abb. D2.2: Induktion der Expression von 2B4 und NKG2D auf CD4⁺ NK-ähnlichen T-Zellen. Gezeigt sind die T-Zellen der Spender RP und JB. Die Punktwolken zeigen CD4⁺ NK-ähnliche T-Zellen allein an Tag vier (JB) bzw. 14 (RP) und nach Kokultivierung mit autologen NK-Zellen für 24 (JB) und 48 (RP) Stunden, bei einer Ratio von 2:1 (10⁵ T-Zellen, 5 x 10⁴ NK-Zellen). In **A**) ist die positive Verschiebung der Expression von 2B4 bei CD4⁺ NK-ähnlichen T-Zellen gezeigt. In der oberen Reihe wurde bei Spender RP 2B4 gegen CD4, in der unteren Reihe bei Spender JB 2B4 gegen CD3 aufgetragen. In **B**) ist die positive Verschiebung der Expression von NKG2D bei CD4⁺ NK-ähnlichen T-Zellen gezeigt. In der oberen Reihe wurde bei Spender RP NKG2D gegen CD4, in der unteren Reihe wurde bei Spender JB NKG2D gegen CD3 aufgetragen. Die Histogramme zeigen Überlappungen der eingegrenzten CD4⁺ NK-ähnlichen T-Zellen ohne (grau) und mit (schwarz) NK-Zell-Kontakt.

Diese Daten geben einen ersten Hinweis darauf, dass eine Stimulation über Zytokine allein nicht ausreichend war, um potenziell kostimulatorische Rezeptoren wie 2B4 und NKG2D *de novo* zu induzieren. Für eine deutliche Expression dieser beiden Moleküle scheint daher eine direkte Zell-Zell-Interaktion notwendig zu sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass trotz der nachgewiesenen zytotoxischen Aktivität CD4⁺ NK-ähnlicher T-Zellen gegen HLA-Klasse-I-negative Zielzellen keine bekannten AR außer DNAM-1, der auch von klassischen T-Zellen exprimiert wird, detektiert werden konnten. Nur durch Kokultivierung mit autologen NK-Zellen konnte eine 2B4- und NKG2D-Expression induziert werden. CD8⁺ NK-ähnliche T-Zellen exprimierten, ebenso wie klassische CTL, die AR 2B4 nach Induktion und konstitutiv NKG2D. Es konnte keine Expression von KIR2DL1-3 auf NK-ähnlichen T-Zellen detektiert werden, obwohl dies nach Spezifität der Inhibition durch einen der Liganden, HLA-Cw3, erwartet worden war. Es wurden auch keine weiteren bekannten IR auf den NK-ähnlichen T-Zellen gefunden.

3. NKG2D, 2B4 und DNAM-1 induzieren in NK-ähnlichen T-Zellen weder Zytotoxizität noch Zytokinsekretion

Die Detektion der AR NKG2D, 2B4 und DNAM-1 auf CD4⁺ bzw. CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen deutete darauf hin, dass diese Rezeptoren möglicherweise in die Aktivierung der Zytotoxizität involviert waren. Daher habe ich analysiert, ob diese AR Zytotoxizität induzieren können. Hierfür wurden redirigierte Lyse-Experimente durchgeführt, in welchen diese Rezeptoren über AR-spezifische Antikörper stimuliert werden, die an die Fc-Rezeptor-positive murine Mastozytomzelllinie P815 gebunden sind (Abb. D3.1).

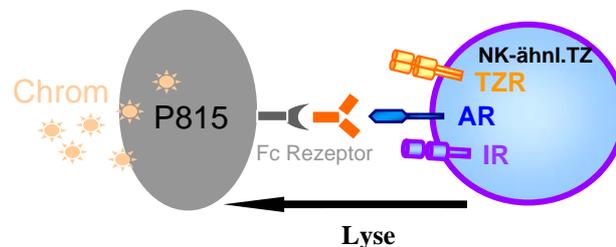


Abb. D3.1: Schematische Darstellung der redirigierten Lyse. In blau ist die NK-ähnliche T-Zelle dargestellt, die über den AR stimuliert wird. Dieser wird durch einen spezifischen Antikörper erkannt, der an den Fc-Rezeptor der P815-Zellen gebunden ist, wodurch eine aktivierende Ligandenbindung induziert wird.

CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnliche T-Zellen, unseparierte PBMC desselben Spenders und NKL als NK-Zell-Kontrolle wurden auf die Induktion der Zytotoxizität über die AR 2B4, NKG2D, DNAM-1 und CD161 getestet (Abb. D3.2). Der pan-T- und NK-Zell-Marker CD2 wurde als nicht-aktivierende Kontrolle mitgeführt, um nicht-spezifische Antikörper-induzierte Effekte auszuschließen. Der CD3-spezifische Antikörper wurde verwendet, um die Funktionalität des TZR zu überprüfen.

D. ERGEBNISSE

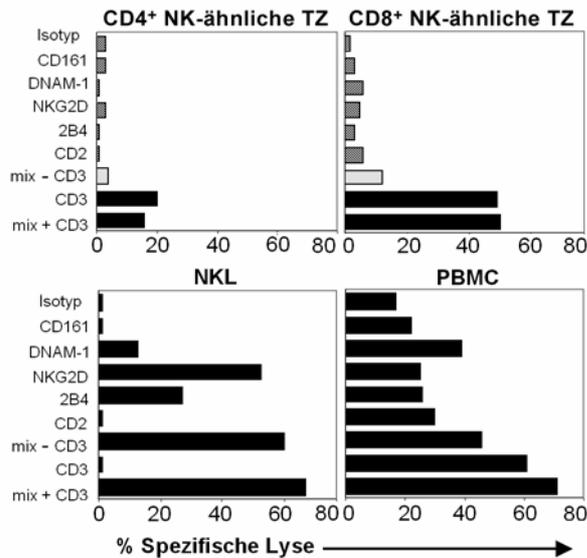


Abb. D3.2: Stimulation über AR. Dargestellt sind CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnliche T-Zellen, NKL und PBMC, die über Antikörper (100 ng/ml) gegen bekannte AR stimuliert wurden. Die E:T betrug 40:1 (CD4⁺) oder 30:1 (CD8⁺). Keine Zytotoxizität wurde beobachtet für die T-Zellen (dunkelgraue Balken). Ein leichter Anstieg der Zytotoxizität wurde für eine Mischung aus AR, ohne den CD3-spezifischen Antikörper (mix - CD3, hellgrauer Balken) beobachtet. Zytotoxizität wurde bei den T-Zellen nur nach der Stimulation über CD3 beobachtet (mix + CD3 und CD3, schwarze Balken). NKL diente als positive Kontrolle für die Aktivierung von NK-Zellen durch DNAM-1, NKG2D und 2B4 (E:T 20:1). Die unseparierten PBMC dienten als positive Kontrolle für NK-haltige Populationen (28% NK-Zellen, 72% T-Zellen, E:T 30:1). Die T-Zellen und PBMC stammten von Spender RP an Tag 15.

Weder in CD4⁺ noch in CD8⁺ T-Zellen konnte ein zytotoxisches Signal durch die spezifischen AR 2B4, NKG2D, DNAM-1 und die Negativkontrolle CD2 und die NK-Kontrolle CD161 induziert werden. Ein leichter, aber nicht signifikanter Anstieg der spezifischen Lyse verglichen zur Isotypkontrolle, konnte bei den CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen beobachtet werden, wenn alle AR miteinander kombiniert wurden. Im Gegensatz dazu stimulierte der CD3-spezifische Antikörper sowohl die CD4⁺ als auch die CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen über den TZR/CD3 Komplex. Die Kombination der AR mit dem CD3-spezifischen Antikörper resultierte nicht in einer erhöhten Zytotoxizität. Dies deutete darauf hin, dass die AR in diesem System auch keine kostimulierenden Signale vermittelten. Dagegen zeigten NKL und PBMC wie erwartet eine starke Stimulation über 2B4, NKG2D, DNAM-1, nicht bzw. schwach über CD161 und CD2. Im Gegensatz zu NK-ähnlichen T-Zellen war bei NKL-Linie sogar ein kooperativer Effekt zwischen den Rezeptoren 2B4 und NKG2D sichtbar. Aus Abbildung D3.3 wird deutlich, wie sich dieser additive Effekt auf die Effektivität der Lyse von NKL gegen die Zielzellen auswirkte.

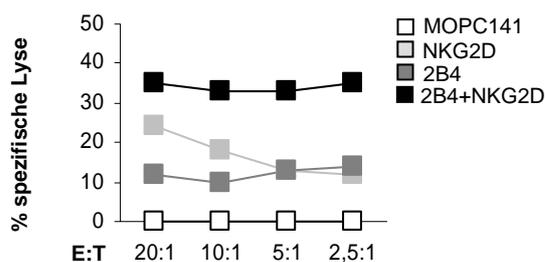


Abb. D3.3: Chromfreisetzungstest der NKL gegen P815, stimuliert mit verschiedenen AR. Stimulation der NKL über die Isotypkontrolle MOPC141, den AR 2B4 allein, NKG2D allein und die beiden AR kombiniert. mAk-Konzentration betrug jeweils 100 ng/ml.

Da sich der TZR der NK-ähnlichen T-Zellen als einziger funktioneller Rezeptor herauskristallisierte, testete ich in einem Blockierungsexperiment, ob der TZR in die Erkennung von Zielzellen involviert war, das heißt, ob sich die zytotoxische Aktivität der NK-ähnlichen T-Zellen durch Blockieren der CD3 ϵ -Kette des TZR-Komplexes, beeinflussen ließ (Abb. D3.4). Als TZR-Kontrolle wurde zunächst ein klassischer zytotoxischer T-Zellklon (JB4) eingesetzt, dessen HLA-A2-restringierte Erkennung einzig durch den TZR/CD3-Komplex vermittelt wird. Dazu wurden verschiedene CD3-spezifische mAk bezüglich ihrer Eignung als blockierende mAk getestet. Aus Abbildung D3.4 geht hervor, dass der mAk MT301 die Lyse der A2⁺-LCL besser blockierte als die beiden anderen CD3 ϵ -spezifischen mAk OKT3 und BMA031. Deshalb wurde dieser mAk für die Blockierungsversuche mit CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen ausgewählt.

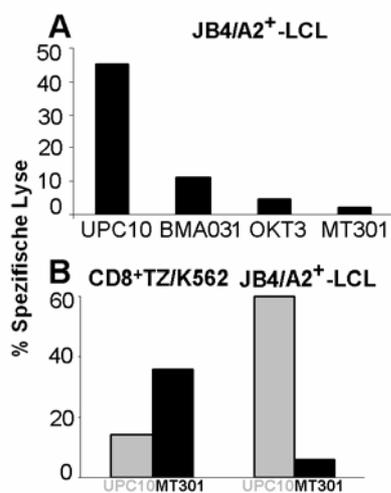


Abb. D3.4: Blockierung der Lyse über CD3-spezifische Antikörper. In **A**) wurden neben dem Isotyp UPC10 drei verschiedene CD3 ϵ -spezifische Antikörper (BMA031, OKT3 und MT301 10 μ g/ml) für die Blockade der Lyse des HLA-A2-spezifischen T-Zellklons JB4 gegen eine HLA-A2 positive Zielzelle (LCL) in einer E:T von 10:1 verwendet. In **B**) wurden CD8⁺ NK-ähnliche T-Zellen (CD8⁺TZ) und der T-Zellklon JB4 parallel in einem Experiment getestet. Mit der Isotypkontrolle UPC10 (graue Balken) zeigten die NK-ähnlichen T-Zellen eine Lyse der Zielzelle K562 von 15% (E:T 30:1), JB4 gegen die LCL eine Lyse von 60% (E:T 20:1). Bei Gabe des CD3 ϵ -spezifischen Antikörpers MT301 zeigten die NK-ähnlichen T-Zellen eine Lyse von 36%, JB4 von 6% (schwarze Balken). Die CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen stammten von Spender JB an Tag zehn.

Die Zytotoxizität der NK-ähnlichen T-Zellen wurde wie erwartet nicht über die Vorinkubation mit dem CD3 ϵ -spezifischen Antikörper MT301 (Abb. D3.4B) inhibiert. Stattdessen bewirkte die Bindung des mAk eine Stimulation des TZR/CD3-Komplexes (in Abbildung D3.4 als Erhöhung der K562-Lyse sichtbar). Dies deutete darauf hin, dass der TZR der NK-ähnlichen T-Zellen durchaus funktionsfähig ist, in der nicht-MHC-restringierten Zytotoxizität gegen HLA-Klasse-I-negative Zielzelle jedoch keine Rolle spielt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass über die auf CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen exprimierte AR 2B4, NKG2D und DNAM-1 keine Zytotoxizität induziert werden konnte. Offensichtlich ist allein der TZR/CD3-Komplex funktionell in der Lage, aktivierende Signale zu übermitteln. Durch Blockierung der CD3 ϵ -Kette über einen CD3 ϵ -spezifischen mAk konnte gezeigt werden, dass die lytischen Eigenschaften der CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen unbeeinflusst blieben. Somit konnte nicht geklärt werden, welche AR für die Stimulation von NK-ähnlichen T-Zellen verantwortlich waren.

4. Die Oberflächenexpression der IR und AR korreliert nicht immer mit der Expression auf mRNA-Ebene

Um die Frage der Rezeptorexpression abzurunden, habe ich zusätzlich einige Untersuchungen an verschiedenen Rezeptoren auf mRNA-Basis durchgeführt. Diese sollten initial dazu dienen die AR KIR2/3DL von den IR KIR2/3DS Rezeptoren zu unterscheiden, da die Antikörper (Anhang, Tab. I1.3-I1.6) keine Unterscheidung zwischen der langen inhibitorischen L- und der kurzen aktivierenden S-Form der KIR-Gene ermöglichen. So bindet der p58.1-mAk sowohl an KIR2DL1- als auch an KIR2DS1-Rezeptoren. Die mRNA-Analysen sollten also Aufschluss über die polyklonale Zusammensetzung der KIR/C-Typ-Lektin- und NCR-exprimierenden Zellen geben. Zunächst wurden dafür mRNA-Rezeptorrepertoires für unseparierte IL-2/Lektin-stimulierte PBMC durchgeführt (Abb. D4.1.1). Als Ergänzung wurden die NK-Leukämielinien NKL und YT sowie die beiden T-Zellleukämielinien Jurkat und Molt4 auf ihr KIR/C-Typ-Lektin/NCR-Expressionsmuster hin analysiert (Abb. D4.1.2, D4.1.3).

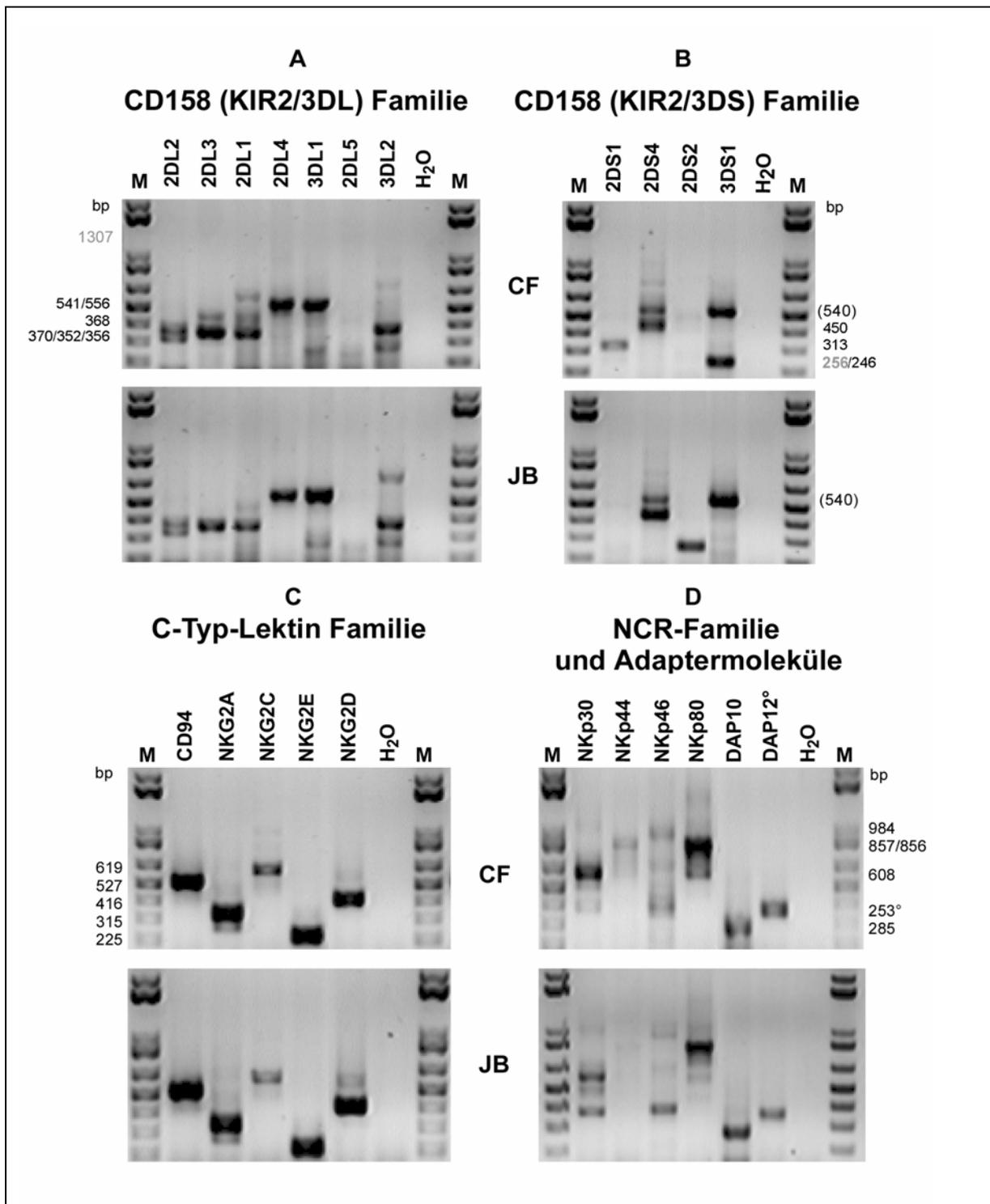


Abb. D4.1.1: mRNA-Expression der vier verschiedenen Rezeptor-Familien in PBMC. Gezeigt sind die unseparierten PBMC zweier verschiedener Spender (CF und JB) nach IL-2/Lektin Stimulation. Die Reihenfolge der KIR2/3DS und KIR2/3DL PCR-Produkte erfolgte gemäß ihrer chromosomalen Lokalisation [Andre *et al.* 2001]. Die Klammer bezeichnet eine unbekannte Bande von 3DS1. M=Marker

Die unseparierten PBMC enthielten bis zu 20% NK-Zellen (siehe Anhang, Tab. I1.3-I1.6) und zeigten ein typisches mRNA-Expressionsmuster verschiedener Rezeptoren durch polyklonale Zellen. Die Muster zwischen den Spendern unterschieden sich

aufgrund der unterschiedlichen chromosomalen Zusammensetzung der KIR-Gene auf Chromosom 19q13.4, wofür ein ausgedehntes System von ca. 18 bekannten Haplotypen verantwortlich ist [Uhrberg *et al.* 1997, Valiante *et al.* 1997]. Die hier verwendeten Primer ließen keine Unterscheidung der Allele eines KIR-Gens zu [Uhrberg *et al.* 1997], die amplifizierten Bereiche dienten jedoch der Differenzierung der einzelnen Gene.

Bei beiden Spendern waren spezifische Amplifikate für die KIR2/3DS- und KIR2/3DL-Familie vorhanden (Abb. D4.1.1A, B). Dies sollte als Hinweis auf die Anwesenheit KIR2/3DS- und KIR2/3DL-exprimierender NK-Zellen innerhalb der PBMC-Population gewertet werden. Die auf Chromosom 12p13.1 kodierten C-Typ-Lektin-Rezeptoren CD94, NKG2A, -C und -E (Abb. 4.1.1C) waren auf mRNA-Ebene ebenfalls in den gemischten Populationen beider Spender nachweisbar. Daraus ließ sich ableiten, dass die enthaltenen NK-Zellen sowohl inhibitorische CD94/NKG2A- als auch aktivierende CD94/NKG2C/E-Heterodimere exprimieren konnten. Der AR NKG2D, der mehr dem Namen als der tatsächlichen Funktion nach mit den anderen NKG2-Mitgliedern verwandt ist, konnte als mRNA erwartungsgemäß nachgewiesen werden, da sowohl NK-Zellen als auch CD8⁺ T-Zellen diesen Rezeptor exprimieren.

Die als NCR-Familie zusammengefassten Rezeptoren NKp30, NKp44 und NKp46 (Abb. D4.1.1D) gelten als einzige spezifische Marker für NK-Zellen, da bisher bei keinem anderen hämatopoietischen Zelltyp eine Expression dieser Moleküle gezeigt werden konnte. Amplifikate dieser Rezeptoren waren demnach auf die in den gemischten Populationen enthaltenen NK-Zellen zurückzuführen. NKp80 dagegen ist auf NK- und einigen CD8⁺ T-Zellen exprimiert. Da für keinen Rezeptor der NCR-Familie bislang Liganden identifiziert werden konnten, kann ihre Beteiligung an der NK-Aktivität nur indirekt über Blockierungsexperimente untersucht werden. Blockierende mAk standen für eine Untersuchung jedoch nicht zur Verfügung.

Die Adaptermoleküle DAP10 und DAP12 sind für die Signalübermittlung der AR verantwortlich und sowohl strukturell als auch funktionell mit dem TZR-Adaptermolekül CD3 ζ verwandt. Ein Nachweis auf mRNA-Ebene deutete deshalb darauf hin, dass zumindest die Verknüpfung der AR durch diese Adapter mit der Signaltransduktionsmaschinerie gewährleistet ist. Da für DAP10 und DAP12 kommerziell keine mAk erwerblich sind, musste die Analyse dieser Adaptermoleküle auf die mRNA-Expressionsdaten beschränkt bleiben.

In Abbildung D4.1.2 und D4.1.3 dienten zum einen gemischte PBMC Populationen (verschiedener Spender, PBL) als positive Kontrolle und zum anderen wurden die Zelllinien NKL, YT, Jurkat und Molt4 verwendet, um eine Korrelation der mRNA-Daten mit der Rezeptor-Expression und Funktionalität der Zellen zu überprüfen.

Wie zu erwarten waren in PBL Amplifikate für alle Rezeptoren bis auf 2DL5, NKG2C und NKp44 nachweisbar, die von den enthaltenen NK-Populationen nicht exprimiert wurden. Eine Subpopulation der PBL (NK-Zellen) war bezüglich des mRNA-Expressionsmuster positiv für CD94 und NKG2A, welches mit der Oberflächenexpression korrelierte (Abb. D4.2). Für NKL-Zellen zeigte sich die mRNA-Expression von CD94 und NKG2A (IR-Komplex) als auch von NKG2C und NKG2E (AR-Komplex). Die Expression der CD94/NKG2A-mRNA stimmte mit der Oberflächenexpression (FACS-Daten) überein (Abb. D4.2). Funktionell korrelierte das Vorhandensein von CD94/NKG2A mit der Abschaltung der NKL durch HLA-E. Im Gegensatz dazu ließ sich NKG2C als Protein nicht auf der Zelloberfläche nachweisen (Daten nicht gezeigt). Es kann also davon ausgegangen werden, dass NKG2C-mRNA nicht in Protein translatiert wurde. Damit wurde erstmals eine Diskrepanz zwischen mRNA und Protein-Expression für NK-Rezeptoren beobachtet, die sich für weitere Zellen und Rezeptoren bestätigen sollte. Für NKG2E existiert kein spezifischer mAk, so dass die Proteinexpression nicht untersucht werden kann.

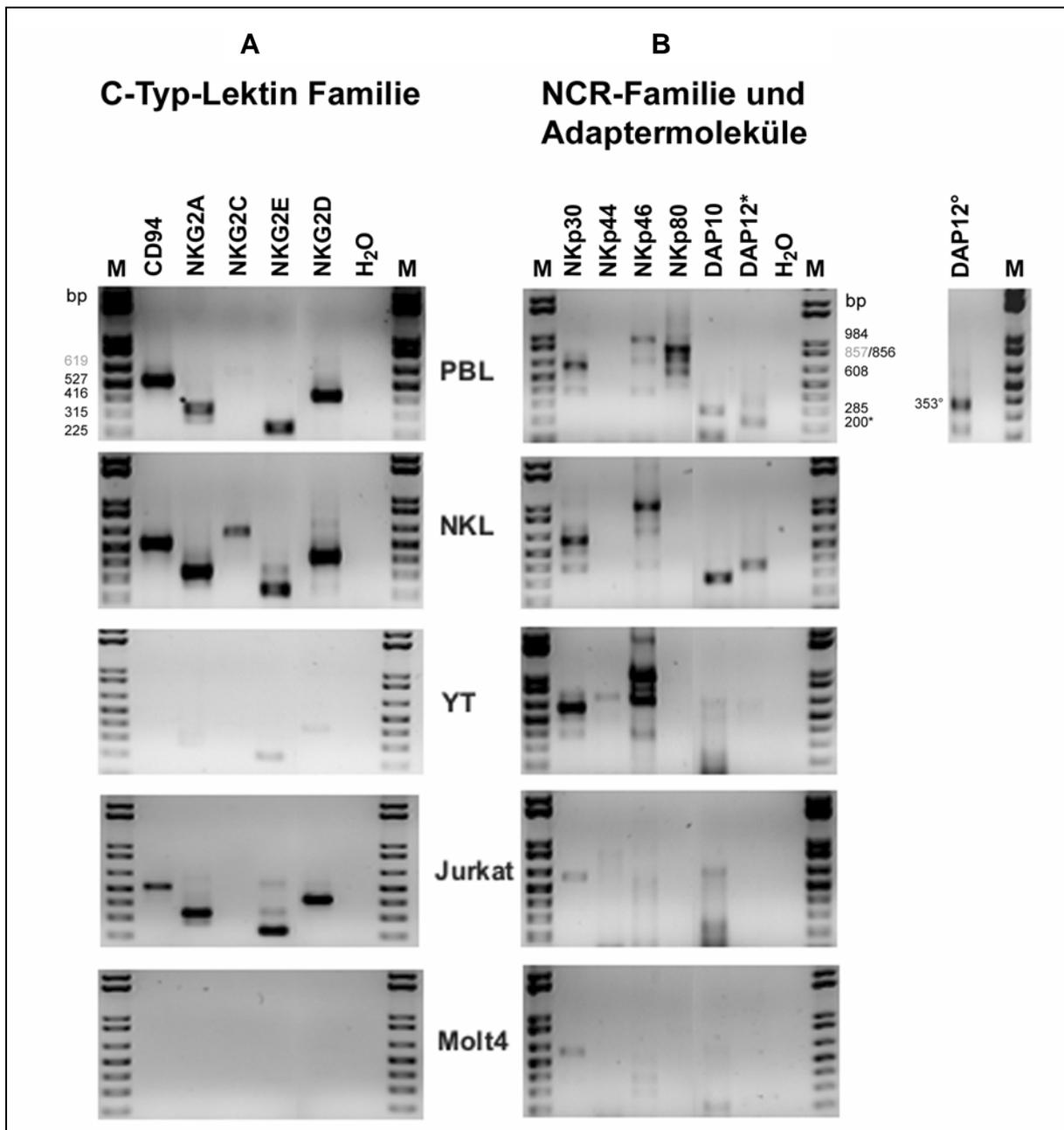


Abb. D4.1.2: mRNA-Expression der C-Typ-Lektin-Rezeptoren A) und der NKp-Familie sowie der Adaptermoleküle DAP10 und DAP12 B). Dargestellt ist die mRNA-Expression von PBL, NKL, YT, Jurkat und Molt4. bp bezeichnet die Basenpaargröße der Fragmente, M den Marker (1 kb Fragmentleiter). In grau sind die Größen der in PBL nicht exprimierten Fragmente angegeben. * und ° zeigen die Expression zwei verschiedener DAP12 Fragmente bei zwei verschiedenen PBL.

Während die NK-Linie YT nur sehr schwach NKG2E- und D-Expression auf mRNA-Ebene zeigte, waren in Jurkat-T-Zellen diese Rezeptoren bis auf NKG2C auf mRNA-Niveau deutlich detektierbar. Eine Überprüfung dieses Ergebnisses für Jurkat-Zellen mittels Durchflusszytometrie ergab jedoch, dass von diesen Zellen weder CD94/NKG2A (Abb. D4.2) noch NKG2D (Daten nicht gezeigt) auf der Oberfläche exprimiert wurden. Eine intrazelluläre Proteinexpression von CD94 und NKG2A konnte aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden, da die verfügbaren mAk

nicht Western-Analysen-tauglich waren. Der AR NKG2D war auf mRNA-Ebene auf NKL- und YT-Zellen (sehr schwach) nachweisbar, nicht jedoch auf den T-Zellen Molt4.

Bezüglich der NCR-Familie zeigte sich bei NKp30, NKp46 und NKp80 in PBL, NKL und YT das Auftreten mehrerer Banden, die durch Sequenzierung näher charakterisiert wurden (Abb. D4.3). mRNA für NKp30 und NKp46 war in PBL und in den beiden NK-Linien wie erwartet deutlich nachweisbar. NKp44-spezifische Amplifikate waren weder in PBL noch in der NK-Linie NKL detektierbar. Da dieser NCR erst nach Aktivierung von NK-Zellen exprimiert wird, ist das Fehlen eines NKp44-spezifischen Amplifikats in PBL mit dem nicht-aktivierten Status peripherer NK-Zellen erklärbar. NKp80-spezifische Amplifikate dagegen waren nur in PBL-cDNA vorhanden (Abb. D4.1.2). Dies stimmt mit dem publizierten Expressionsmuster von NKp80 auf ruhenden NK- und einigen T-Zellen überein. Für NKp80 war kein mAk erhältlich, womit das Auftreten der NKp80-spezifischen mRNA bei den PBL nicht mit einer Expression des Proteins korreliert werden konnte.

Während für die NK-Linien NKL und YT eine NCR-Expression erwartet wurde, blieb bei Jurkat- und Molt4-T-Zellen die Expression mit Ausnahme eines schwachen NKp30-Amplifikats, aus. Möglicherweise erfolgte aufgrund der malignen Transformation der Jurkat- und der Molt4-Zellen eine Dysregulation der Expression dieses Rezeptors, die sich bezeichnenderweise nur auf die mRNA, nicht aber auf die Proteinebene erstreckte. Eine NKp30-Proteinexpression auf der Oberfläche von Jurkat- bzw. Molt4-Zellen war entsprechend nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Die Adaptermoleküle DAP10 und DAP12 sind nur in PBL und NKL exprimiert, nicht jedoch in YT-, Jurkat- und Molt4-Zellen. Ohne diese Adaptermoleküle und damit ohne Verknüpfung zur Signaltransduktionskaskade ist auch eine geringere zytotoxische Aktivität bei NKG2D/DAP10-abhängigen Konstellationen (z.B. K562 als Zielzelle) zu erwarten. Dieser Unterschied zwischen NKL und YT in der Lyse von K562 wurde bereits in Abbildung D1.6 dargestellt. In verschiedenen PBL-Analysen wurden auch für DAP12 verkürzte Amplifikate nachgewiesen, die durch Sequenzierung im Folgenden genauer charakterisiert wurden (Abb. D4.3).

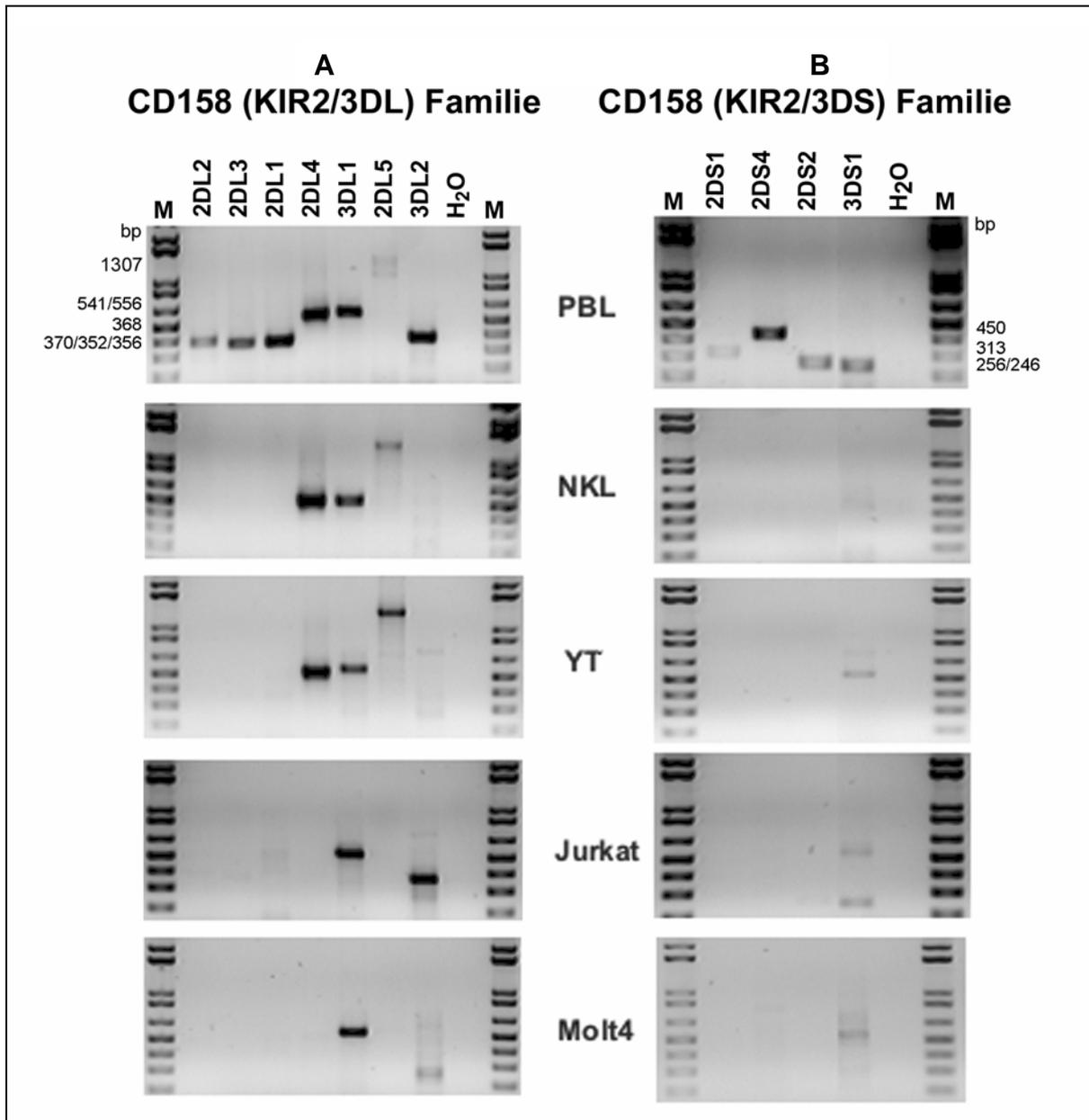


Abb. D4.1.3: mRNA-Expression der KIR2/3DL A) und KIR2/3DS B) Familie. Dargestellt ist die Expression von PBL, NKL, YT, Jurkat und Molt4. bp bezeichnet die Basenpaargröße der Fragmente, M den Marker (1 kb Fragmentleiter).

Bezüglich der KIR-mRNA-Analysen zeigte sich eine Diskrepanz zu der Proteinoberflächenexpression, speziell am Beispiel des KIR3DL1-Rezeptors. Dieser Rezeptor wurde, zusammen mit dem verwandten KIR3DL2-Molekül, als mRNA-Amplifikat in NKL, YT, Jurkat und Molt4 nachgewiesen (Abb. D4.1.3), das Protein war an der Oberfläche allerdings nicht detektierbar (Abb. D4.2). Durch Sequenzierung der Amplifikate wurde die Identität des KIR3DL1-Amplifikates bestätigt. Weitere Sequenzanalysen ergaben, dass es sich dabei um das Allel KIR3DL1*004 handelte, dessen Aminosäureaustausch an Position 82 dafür verantwortlich ist, dass das Protein im Trans-Golgi-Kompartiment arretiert ist und nicht an die Oberfläche gelangen kann [Parham 2003]. KIR2DL/S2 und KIR2DL/S1 konnten ausschließlich

D. ERGEBNISSE

bei PBL auf mRNA-Ebene detektiert werden. Dabei handelte es sich offensichtlich um positive NK-Subpopulationen, wie bereits durch Oberflächenanalysen gezeigt werden konnte (Abb. D4.2). Dagegen konnte KIR2DS4 bei PBL auf mRNA-Ebene detektiert werden, wurde aber entweder nicht in Protein umgeschrieben oder gelangte nicht auf die Oberfläche, da sich in der Durchflusszytometrie keine KIR2DS4-positive Population identifizieren ließ. Jüngste Ergebnisse aus dem Labor von M. Uhrberg (Universität Düsseldorf) haben gezeigt, dass eine Deletionsmutante des KIR2DS4 in ca. Zweidrittel der KIR2DS4-positiven Haplotypen erklären könnte, dass das 2DS4-Protein selten als Protein nachweisbar ist (persönliche Kommunikation mit M. Uhrberg).

Bei der größeren, ca. 500 bp langen Bande bei KIR3DS1 im Falle der PBMC von Spender CF (Abb. D4.1.1B, in Klammern) YT, Jurkat und Molt4 handelte es sich vermutlich um kontaminierende genomische DNS, die ein Intron enthält. Die schwache Bande für 3DS1 bei YT, Jurkat und Molt4 (Abb. D4.1.3B) ließ sich durch mAk-Bindung nicht überprüfen, da der KIR3DL1-Ak p70 nicht mit dem KIR-3DS1 Rezeptor kreuzreagiert (persönliche Kommunikation mit E. Vivier).

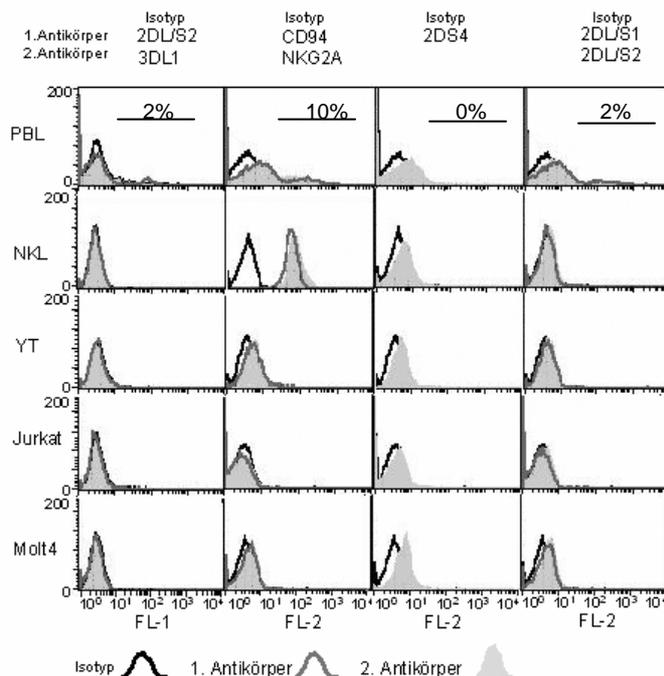


Abb. D4.2 Oberflächenexpression verschiedener Rezeptoren auf PBL, NKL, YT, Jurkat und Molt4. Als Isotypkontrolle wurde CD19, ein strikt B-Zell-spezifischer Marker verwendet. Jede Spalte zeigt eine Färbung mit der negativen Kontrolle und ein oder zwei Antikörper gegen die Rezeptoren. Da die beiden CD158-spezifischen Antikörper KIR2DL nicht von KIR2DS unterscheiden können, wurden diese Färbungen mit KIR2DL/S1 und KIR2DL/S2 gekennzeichnet. In der ersten Reihe sind die Prozentsätze der gefärbten Zellen angegeben.

Zusammenfassend lassen sich aus den mRNA-Daten nicht immer eindeutige Rückschlüsse auf die Oberflächenexpression der hier untersuchten Rezeptoren ziehen. Aufgrund dieser Ergebnisse habe ich davon abgesehen zusätzlich zu diesen NK- und T-Zelllinien separierte CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnliche T-Zellen bezüglich ihrer mRNA-Expressionsmuster zu überprüfen, da mRNA-Daten alleine keine Aussagen über die Funktionalität einer Effektorzelle erlauben. Bei weiteren Versuchen habe ich mich auf FACS-Daten und Funktionsanalysen gestützt. Die ausgedehnten mRNA-Analysen führten jedoch zu einem interessanten Ergebnis in Bezug auf Spleißvarianten der Rezeptor-spezifischen Produkte. Die nähere Untersuchung der verkürzten Amplifikate einiger Rezeptoren mittels Sequenzierung ergab, dass es sich ausschließlich um Deletionsvarianten handelte (Abb. D4.3), die als Spleißvarianten bzw. Abbauprodukte der kompletten mRNA in der Zelle vorkommen. In Abbildung D4.3 sind die Deletionsvarianten von NKp46, NKp30 und NKp80 sowie DAP12 zusammengestellt. Beiden Typ-I-Rezeptoren, NKp46 und NKp30 war gemeinsam, dass die Deletionen innerhalb der Signalsequenz (SS) beginnen und sich bis zum Ende der ersten Domäne erstreckten. Deshalb wäre für ein derart verkürztes Protein der Verlust der Ligandenbindung (und möglicherweise der mAk-Bindung) zu erwarten. Im Falle des Typ-II-Transmembranproteins NKp80 erstreckte sich die Deletion in der mRNA von der Mitte der C-Typ-Lektin-Domäne bis etwa zur Mitte der Transmembranregion (TM), weshalb die Membranlokalisierung des entsprechend verkürzten Proteins bezweifelt werden musste. Bei allen drei Rezeptoren war es jedoch leider nicht möglich die verkürzten Proteine mittels Western-Analyse nachzuweisen, da die dazu nötigen mAk nicht zur Verfügung standen.

Die Deletion in der mRNA des DAP12-Adaptermoleküls betraf sowohl die kurze extrazelluläre Sequenz als auch die TM-Region und einen Teil des zytoplasmatischen Anteils. Dieses verkürzte Protein sollte demnach löslich sein und könnte als solches in die Regulation des Signalweges der DAP12-abhängigen Rezeptoren involviert sein.

Die größte Anzahl und Variation an mRNA-Deletionsprodukten (Abb. D5.1) wurde für den AR 2B4 nachgewiesen, weshalb dieser Rezeptor im Detail untersucht wurde.

D. ERGEBNISSE

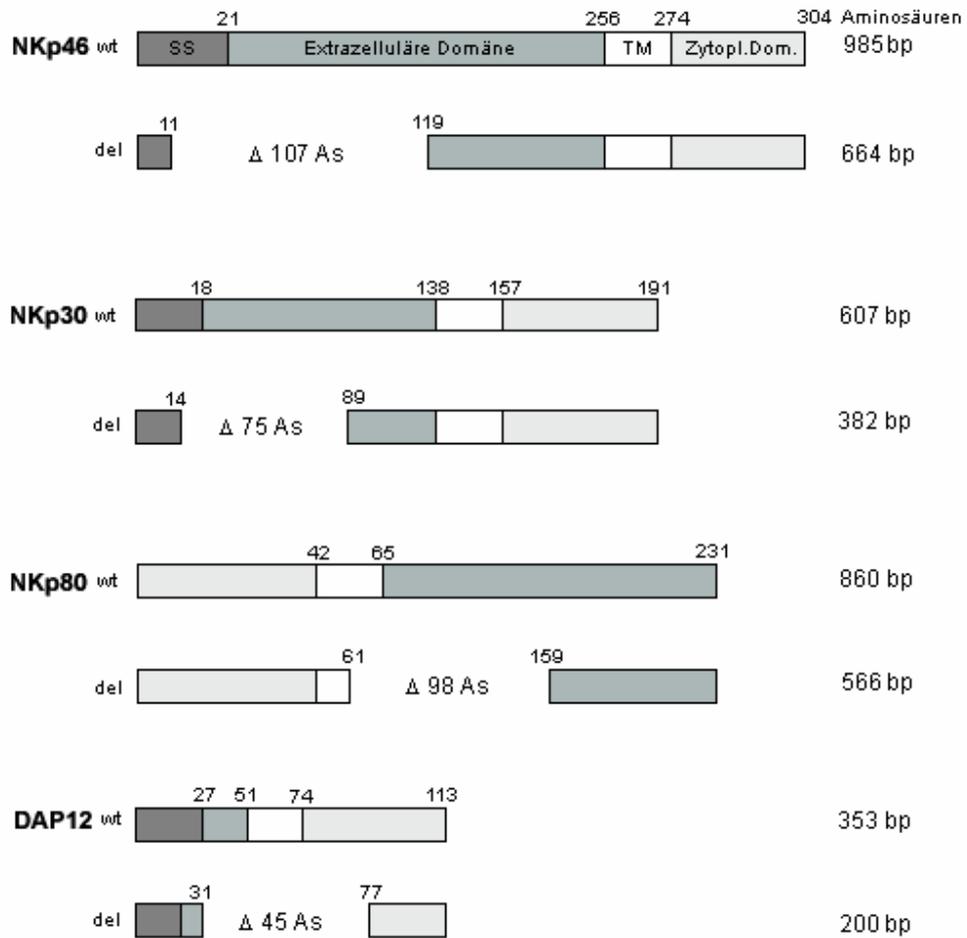


Abb. D4.3: Varianten der Rezeptoren NKp46, NKp30, NKp80 und des Adaptermoleküls DAP12. Signalsequenz (SS), extrazelluläre Domäne, Transmembranregion (TM) und zytoplasmatische Domäne (Zytopl. Dom.) des Wildtyp (wt)-Rezeptors und der Mutante mit der Deletion (del) sind schematisch dargestellt. Die Zahlen über den Domänen bezeichnen Aminosäuren, in der rechten Spalte ist die Größe des jeweiligen cDNA-Fragments in Basenpaaren angegeben. Δ steht für die Größe der Deletion in Aminosäuren (As).

Gezeigt wurde in diesem Kapitel, dass PBL auf mRNA-Ebene eine Reihe von Rezeptoren aus den vier Familien KIR2/3DS, KIR2/3DL, C-Typ-Lektin und NCR exprimierten. Auch die Adaptermoleküle DAP10 und DAP12 sind auf mRNA-Ebene nachweisbar. Die mRNA-Expression dieser Adaptermoleküle und Rezeptoren ist auf die in PBL mit ca. 10% vertretenen NK-Zellen zurückzuführen. Die Oberflächenanalysen korrelierten allerdings nicht immer mit den mRNA-Expressionsmustern. Die NK-Linien NKL und YT sowie die T-Zelllinien Jurkat und Molt4 exprimierten auf mRNA-Ebene KIR3DL1. Anhand von Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass keine Umschreibung der KIR3DL1-mRNA in Protein erfolgte bzw. dieses nicht an die Oberfläche gelangen konnte. mRNA-Daten allein reichen daher nicht aus, um Aussagen über die Oberflächenexpression von Rezeptoren bzw. ihrer Funktionalität zu treffen.

5. Tetramer-Herstellung des AR 2B4

Da CD8⁺ NK-ähnliche T-Zellen nach Aktivierung den AR 2B4 exprimierten, suchten wir diesen Rezeptor aus, um ein lösliches Tetramer (Multimer) herzustellen. Multimere zeigen höhere Affinität zu ihren Liganden und die Tetramer/Ligand-Interaktion wird dadurch stabiler. In unserem Labor sollte dazu eine Klonierungsstrategie mit anschließender Proteingewinnung analog zur HLA-Klasse-I-Tetramertechnologie etabliert werden.

Bei der Tetramer-Synthese wird das Gen des gewünschten Proteins mit einer Biotinylierungsseite versehen und in ein Plasmid kloniert. Anschließend wird das Gen in Bakterien zur Proteinexpression gebracht. Aus diesen Bakterien wird das Protein aufgereinigt und muss anschließend zurückgefaltet werden, da es in denaturierter Form vorliegt. Gelingt dies, wird das Protein biotinyliert und an ein Streptavidin-Molekül gebunden, das vier Bindungsstellen für Biotin besitzt und somit vier Proteine binden kann, wodurch das Tetramer entsteht. Streptavidin selbst ist an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der die Detektion des gebundenen Tetramers ermöglicht. Diese multimerisierten Rezeptoren bieten die Möglichkeit, ihre natürlichen Liganden zu suchen bzw. das Bindungsmuster eines Rezeptors an verschiedene Zellpopulationen mit der individuellen Expression eines oder mehrerer Liganden zu vergleichen. Als lösliche Rezeptoren können Effektorfunktionen durch Tetramere

auch blockiert werden. Das ausschließlich in hämatopoietischen Zellen exprimierte CD48-Molekül ist bereits als 2B4-Ligand identifiziert worden. Um nun zu analysieren, ob nicht-hämatopoietische Zellen (z.B. Nierenzellkarzinomzellen) einen 2B4-Liganden exprimieren, sollte das 2B4-Tetramer als löslicher Rezeptor eingesetzt werden. Bei der Amplifikation der vollständigen Sequenz entdeckte ich zwei Spleißvarianten von 2B4, die ich sequenzieren ließ (Abb. D5.1).

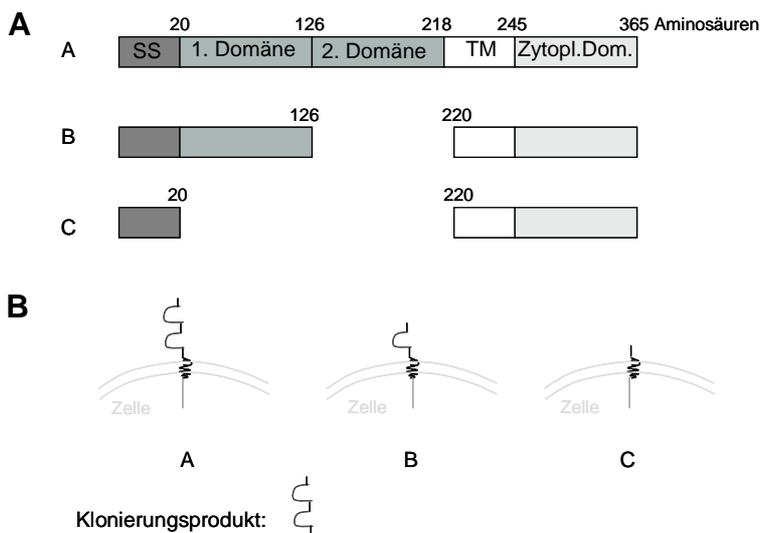


Abb. D5.1 Spleißvarianten von 2B4.

A) zeigt die Wildtyp-Form A und die beiden Spleißvarianten B und C. In **B)** sind die Domänen von 2B4 veranschaulicht und das Klonierungsprodukt dargestellt. Die Primer für die Klonierung sind im Methodenteil (Punkt 1.6) beschrieben.

Im Gegensatz zu den zuvor dargestellten Deletionsvarianten der NCR- und DAP12-Amplifikate korrelierten die 2B4-Amplifikate exakt mit der Domänenstruktur. In der Variante B erstreckte sich die Deletion exakt über die zweite Ig-Domäne von 2B4 bis zum Beginn der TM-Region. In der Variante C war zusätzlich auch die erste Ig-Domäne deletiert, die Signalsequenz (SS) blieb jedoch intakt. Die exakte Definition dieser beiden Spleißvarianten ermöglichte durch den Vergleich mit den bekannten Domänen des murinen 2B4, die extrazellulären Domänen des humanen 2B4 zu bestimmen. Die beiden extrazellulären Domänen dienten anschließend der Herstellung des löslichen Tetramers. Aus den schematisch dargestellten Domänen-Varianten wurden die Primerpositionen für die Klonierung der gesamten extrazellulären Domänen eins und zwei ohne SS und ohne TM-Region bestimmt.

Für die Klonierung von 2B4 wurden zunächst zwei RT-PCR-Amplifikate aus dem Bereich zwischen SS und TM auf ein Agarosegel aufgetragen und daraus eluiert (Abb. D5.2A). Die Primer wurden so ausgewählt, dass sie jeweils eine Restriktionsschnittstelle für Nde I und BamH I enthielten und die zwei extrazellulären

Domänen amplifizierten (Produktlänge 611 bp). An die PCR-Produkte wurden für die TA-Klonierung im so genannten TAQ-Schritt A-Reste angehängt. Der zusätzliche Schritt der TA-Klonierung stellte sich als notwendig heraus, um die Klonierungseffizienz zu erhöhen. Das gesamte Produkt wurde anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen und erneut eluiert (Abb. D5.2B). Über Nacht wurde dieses Produkt in den TA-Vektor ligiert und anschließend in kompetente Bakterien transformiert. Nach dem Ausplattieren der Bakterien auf Ampicillin und X-Gal beschichtete Platten, konnten am nächsten Tag Kolonien nach der Blau/Weiß-Selektion ausgewählt werden. Sechs weiße Kolonien wurden ausgewählt und das Plasmid (TA-Vektor) mit der Insertion (2B4) in einer Minipräparation isoliert. In einem Kurzverdau, als einem nur dreistündigen und nicht über-Nacht-Verdau des Plasmids, wurde kontrolliert, ob die Insertion vorhanden war (Abb. D5.2C). War dies der Fall, wurde die gesamte Minipräparation über Nacht mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Nach dem Verdau wurde die gesamte Probe auf ein Gel aufgetragen (Abb. D5.2D) und die Insertion (611 bp) eluiert. Anschließend erfolgte die Ligation der Insertion in den pET23a Vektor (Insert:ion:Vektor 3:1) und eine erneute Transformation in kompetente Bakterien, die auf Ampicillin/X-Gal Platten ausplattiert wurden.

Klonierung von 2B4

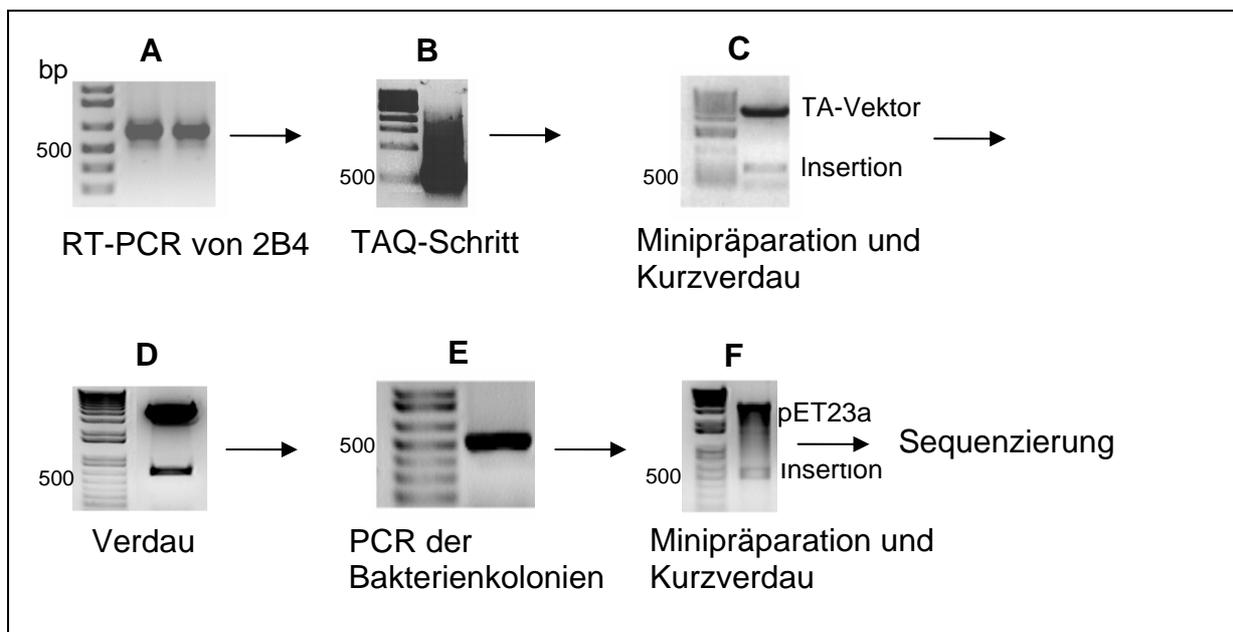


Abb. D5.2 Klonierungsschritte von 2B4. In A bis F werden die einzelnen Schritte dokumentiert.

Der pET23a Vektor wurde von D. Busch dahingehend modifiziert, dass er im 3' Bereich der BamH I-Schnittstelle eine Biotinylierungsseite besitzt, die bei der Transkription der Insertion an das Protein gehängt wird. Der Vektor wurde vor der Ligation ebenfalls mit Nde I und BamH I verdaut, auf ein Gel aufgetragen und eluiert. Nach Ligation und Transformation wurden wieder sechs Kolonien nach der Blau/Weiß-Selektion ausgewählt und in einer PCR auf die Korrektheit der Insert-Sequenz hin getestet (Abb. D5.2E). Wurde der Vektor mit der Insertion erfolgreich kloniert, konnte eine Minipräparation zur Vektor-Isolierung und ein analytischer Kurzverdau durchgeführt werden. Der Kurzverdau und ein Teil der unverdauten Minipräparation wurden dann auf ein Gel aufgetragen. In Abbildung D5.2F ist der Kurzverdau zu sehen. Bei dem Kurzverdau ist der unverdaute Vektor als Schmier und deutlich die Bande für 2B4 zu erkennen. Eine entsprechende Menge der Minipräparation wurde daher zum Sequenzieren geschickt, um die Fehlerfreiheit der Sequenz von 2B4 zu bestätigen.

Das Schneiden des pET23a Vektors und die Elution des geschnittenen Vektors aus dem Gel vor der Ligation mit der Insertion, stellte sich ebenfalls als Voraussetzung für eine erfolgreiche Klonierung heraus, da in den Vorversuchen immer die bereits vorhandene Insertion aus dem Vektor dominierte (von D. Busch als Ausgangsmaterial zur Verfügung gestellt).

Nach der erfolgreichen Klonierung von 2B4 wurde nun versucht das Protein in Bakterien zu exprimieren. Für die Proteinexpression wurden Bakterien mit der Minipräparation des Vektors (pET23a) und der Insertion (2B4) transformiert. Am nächsten Tag konnten von den Ampicillinhaltigen Agar-Platten Kolonien gewählt werden, die nur wachsen konnten, wenn sie den Vektor mit dem Ampizillinresistenzgen enthielten. Sechs Kolonien wurden zunächst in einer „Mini“-Expression (sechs Milliliter LB-Medium) ausgetestet. Für etwa drei Stunden wurden die Bakterien nun kultiviert und regelmäßig bezüglich der OD_{600} gemessen. Im Spektrometer kann bei einer optischen Dichte von 600 nm (OD_{600}), die relative Dichte der Bakterien bestimmt werden. Lag diese zwischen 0,3 und 0,4 wurde ein Milliliter der Kultur eingefroren. Bei einer OD_{600} von 0,7 bis 0,8 wurde eine so genannte Null-Wert-Probe entnommen, bevor die Bakterien mit IPTG zur Proteinexpression induziert wurden. Nach drei Stunden wurde dann der „Drei-Stunden-Wert“ entnommen. Die Null- und die Drei-Stunden-Probe wurden pelletiert und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen (Abb. D5.3A). Bei dem Null-Wert sollte keine Protein-

Bande, bei dem Drei-Stunden-Wert dagegen eine deutliche 2B4-Protein-Bande erkennbar sein (mit rotem Pfeil markiert, Abb. D5.3A).

Protein-Gewinnung

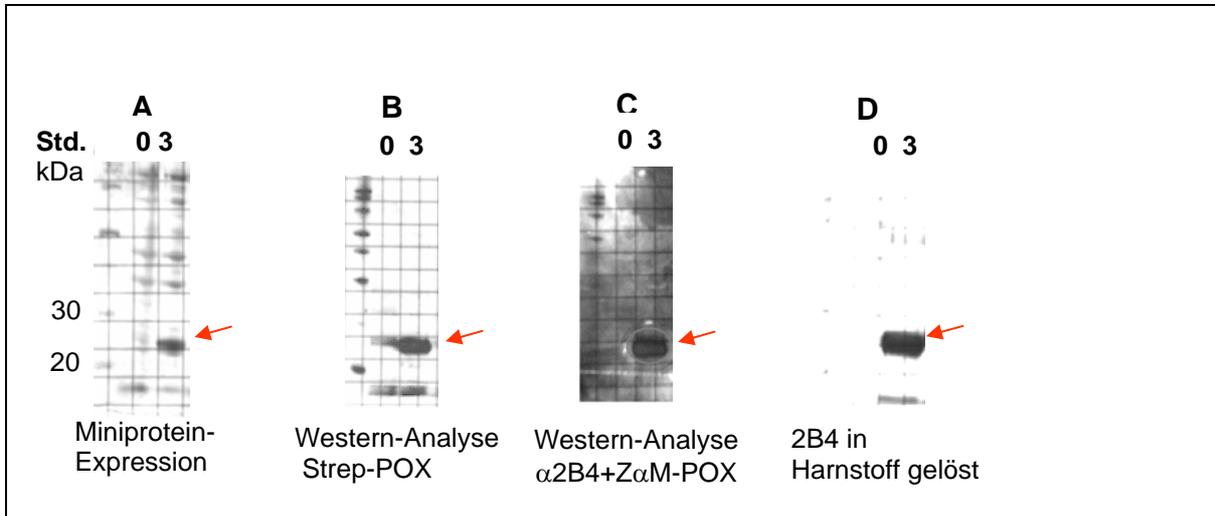
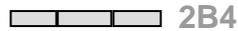


Abb. D5.3: Proteinexpression von 2B4. In A-D werden die verschiedenen Versuche zur Proteinexpression von 2B4 dargestellt. 20 und 30 bezeichnet die Größe des Protein-Fragmentlängen-Markers, Std. 0 und 3 zeigen den Null- und den Drei-Stunden-Wert an.

Um zu testen, ob es sich bei dem Protein tatsächlich um biotinyliertes 2B4 handelte, wurde eine Western-Analyse zum einen mit Streptavidin-POX (Abb. D5.3B) und zum anderen mit einem sekundären Ziege α Maus-POX Antikörper (Abb. D5.3C), der den primären 2B4-spezifischen Antikörper (C1.7) detektierte, durchgeführt. Über eine Chemolumineszenz-Reaktion konnte die Bindung der POX-markierten mAk an Biotin bzw. das Protein sichtbar gemacht werden (Abb. D5.4).

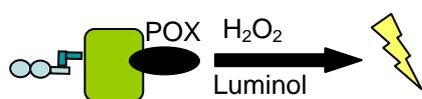


Abb. D5.4: Chemolumineszenz-Reaktion. In blau ist 2B4 dargestellt, das über Biotin an Streptavidin-Peroxidase (grün) gekoppelt ist. Die Peroxidase (POX) oxidiert nach Zugabe der chemischen Reagenzien das Luminol, das seinerseits Licht emittiert.

Als negative Kontrolle für die 2B4+Z α M-POX-Western-Analyse diente ein zweites aufgereinigtes Protein (ULBP-2), das bei diesem Versuch nicht gefärbt wurde. Dies zeigte, dass es sich bei dem exprimierten Protein tatsächlich um 2B4 handelte. Die Western-Analyse über die Streptavidin-Peroxidase war nur möglich, weil Bakterien ihre synthetisierten Proteine in geringem Maße selbst biotinylieren.

Nachdem nun die Identität von löslichem 2B4 bestätigt wurde, führte ich eine präparative Proteinexpression in sechs Litern Bakterienkultur durch. Hierfür wurde

die in der Miniproteinexpression eingefrorene Bakterienkultur verwendet mit welcher der präparative Ansatz angeimpft wurde. Von diesem Ansatz wurde wie unter Methoden 2.1.2 beschrieben das Protein aufgereinigt und in Harnstoff gelöst (Abb. D5.3D). Da so exprimierte Proteine generell denaturiert vorliegen, sollte 2B4 in die bioaktive Form rückgefaltet werden. In mehreren Versuchen wurden verschiedene Bedingungen für die Rückfaltung ausgetestet, jedoch konnte die starke Autoaggregation des Proteins bei diesem Vorgang nicht verhindert werden. Nach einer Anreicherung des gefalteten 2B4 über ein Ultrafiltrationssystem, sollte es über eine FPLC aufgereinigt werden. Hierbei werden einzelne Protein-Fractionen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Protein-Faltung und -Anreicherung

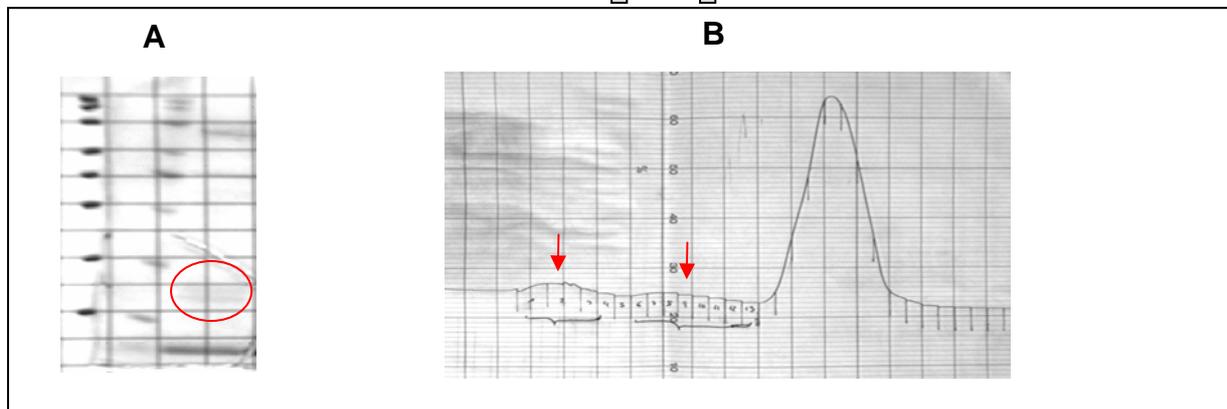
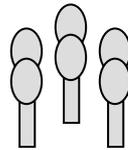


Abb. D5.5: Aufreinigung und Anreicherung von 2B4. In **A**) wird das aufgereinigte Protein, in **B**) die Daten der FPLC dargestellt. Die roten Markierungen zeigen auf dem Gel die schwache 2B4-Bande, in der FPLC die möglicherweise 2B4-enthaltenden Fraktionen.

Trotz der starken Aggregatbildung und des großen Verlusts an Protein, wurde mit Hilfe einer FPLC im Labor von D. Busch versucht, das Protein (schwache Bande in Abb. D5.5A) anzureichern. Ein Gel-Lauf zeigte bereits, dass nach der Anreicherung über die Ultrafiltration kaum noch 2B4 vorhanden war (Abb. D5.5A). Bei einem FPLC-Lauf entstehen verschiedene Fraktionen, in denen Proteine zu definierten Zeitpunkten nach ihrem definierten Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dabei ist es möglich, mehrere Fraktionen zu sammeln, so dass im Nachhinein eine Vereinigung der für das Protein in Frage kommenden Fraktionen möglich ist, um die Ausbeute zu steigern. In Abbildung D5.5B wird eine Auswertung eines solchen Laufes mit 2B4 gezeigt. Von links nach rechts nimmt das Molekulargewicht ab, d.h., es sollte sich ein deutlicher Ausschlag bei der ungefähren Größe von 2B4 ergeben. Der große Ausschlag beinhaltet die Gesamtmenge unspezifischer Protein-

Komponenten der Vorversuche. Da sich bei 2B4 zwei undeutliche Erhöhungen (Abb. D5.5A Pfeile) ergaben, wurden diese Fraktionen gesammelt, auf ein geringes Volumen konzentriert und eine Biotinylierung versucht. Um zu testen, ob das biotinylierte Protein tatsächlich aufgereinigt und angereichert wurde und die Biotinylierung funktionierte, sollte vor der Tetramerisierung eine Biotinylierung mit anschließendem Streptavidin-Bindungstest durchgeführt werden. Bei der Biotinylierung werden große Mengen Biotin an das Protein angehängt. Bindet das biotinylierte Protein an Streptavidin, verschiebt sich die Bande auf dem Gel im Vergleich zu der von ungebundenem Protein nach oben. Dieser Bindungstest ist in Abbildung D5.6 dargestellt. Auf Spur eins wurde nur Streptavidin, auf Spur zwei nur 2B4 und PBS als Kontrolle aufgetragen. Auf Spur drei ist die Kombination aus 2B4 und Streptavidin aufgetragen, die nach Bindung der beiden Komponenten ein größeres Molekulargewicht aufweisen sollte. Die Klammer zeigt den Bereich des Streptavidins (SA) an, das unter den denaturierenden Bedingungen des Gels teilweise zerfällt und einen Schmier bildet. Es war jedoch keine spezifische Bande für 2B4 und kein Unterschied zwischen der Spur mit und ohne Streptavidin erkennbar (Abb. D5. 6).

Biotinylierung und Tetramerisierung

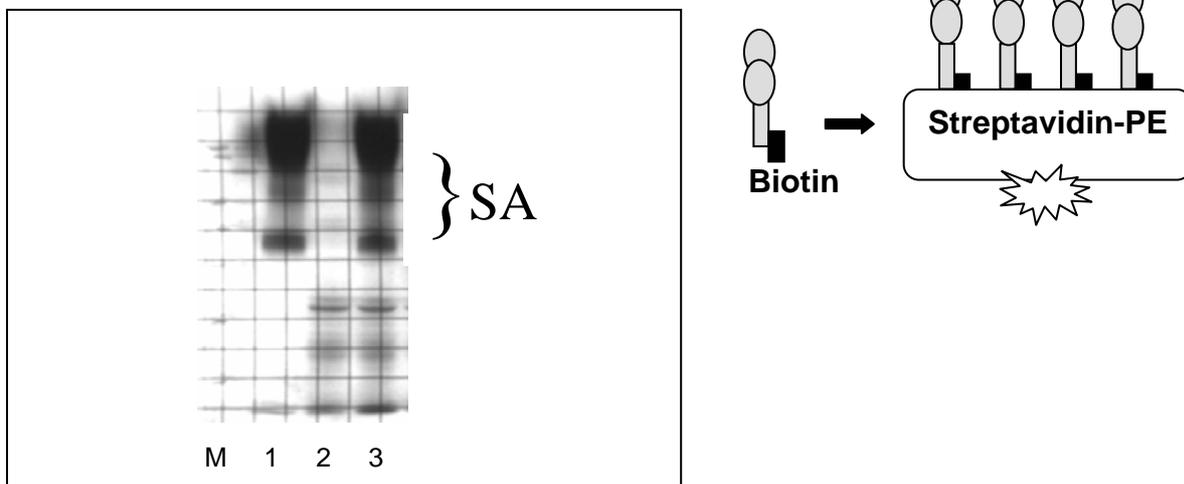


Abb. D5.6: Streptavidin-Bindungstest. Gezeigt wird der Protein-Fragment-Marker (M) und drei verschiedene Spuren: 1 nur Streptavidin, 2 2B4/PBS, 3 2B4/Streptavidin.

Obwohl dieser Versuch der Rückfaltung nicht sehr Erfolg-versprechend aussah, wurden mit diesem Material Bindungsstudien an 2B4-Liganden-exprimierenden (CD48⁺) Zellen per Durchflusszytometrie durchgeführt. Leider zeigte sich auch in diesen Experimenten, dass die Proteinrückfaltung unter verschiedenen Bedingungen

nicht zur Herstellung funktioneller Multimere führte. Nach mehreren erfolglosen Versuchen stellte sich durch persönliche Kommunikation mit international renommierten Kollegen aus dem Bereich der NK-Zell-Forschung heraus, dass die meisten NK-Rezeptoren zu extremer Aggregation und schlechter Rückfaltung neigen. Aus diesem Grund haben auch die anderen NK-Zell-Labors die Produktion multimerer NK-Rezeptoren eingestellt; publiziert sind lediglich Multimere von KIR2D/3DL1-3 und NKG2D [Krmptotic *et al.* 2002, Saulquin *et al.* 2003]. Nach etlichen Versuchen die Faltung zu verbessern und die Aggregation zu verringern, die womöglich für den großen Proteinverlust verantwortlich war, wurden die Versuche eingestellt. Da außerdem durch ein isoliertes 2B4-Signal keine Aktivierung CD8⁺ NK-ähnlicher T-Zellen induziert werden konnte, erwies sich ein Einsatz von 2B4-Multimeren als nicht zwingend notwendig für die Charakterisierung dieser NK-ähnlichen T-Zellen (Kapitel 3.).

Die Herstellung von Tetrameren eines ausgewählten Rezeptors gestaltete sich als nicht durchführbar. Zwar konnte der AR 2B4 kloniert und in Bakterien exprimiert werden, die Rückfaltung des denaturiert vorliegenden Proteins gelang jedoch nicht. Durch einen großen Verlust an Protein bei der Rückfaltung, war es nicht möglich die endgültige Tetramerisierung des Proteins durchzuführen, die auch die Biotinylierung und die Bindung von 2B4 an ein Fluoreszenz-gekoppeltes Streptavidin beinhaltet hätte.

6. NK-ähnliche Aktivität der T-Zellen kann durch IL-2 oder IL-15 in Abwesenheit anderer Rezeptor-abhängiger Signale induziert werden

Um auszuschließen, dass die Aktivierung NK-ähnlicher T-Zellen durch IL-2 in Anwesenheit von Lektin hauptsächlich durch nicht-spezifische und nicht-physiologische Signale über eine Kreuzvernetzung mehrerer Oberflächen-Rezeptoren induziert wurde, testete ich den Effekt verschiedener IL-2-Konzentrationen mit und ohne Lektin bei unseparierten PBMC aus (Abb. D6.1). Lektin wurde nur einmalig für die ersten 24 Stunden zugegeben.

Durch die verschiedenen Stimulationsansätze der PBMC stellte ich fest, dass sich das Niveau an Zytotoxizität gegen die HLA-Klasse-I-negative Zielzellen K562, Daudi und L721.221 nicht signifikant zwischen 50 U/ml IL-2 und 1000 U/ml IL-2 und mit oder ohne Lektin unterschied. Interessanterweise war der NK-Zellgehalt in Lektin-haltigem Medium unabhängig von der IL-2-Konzentration signifikant reduziert. Dies deutete darauf hin, dass T-Zellproliferation durch diesen unspezifischen Stimulus angeregt, NK-Zellproliferation dagegen gehemmt wurde. Die Beobachtung ähnlicher zytotoxischer Aktivität in Populationen mit stark unterschiedlichen NK-Zellzahlen deutete darauf hin, dass sowohl NK- als auch NK-ähnliche T-Zellen an der nicht-MHC-restringierten Aktivität beteiligt waren. IFN- α und IFN- γ wurden ebenfalls als Stimulatoren für NK-ähnliche Aktivität getestet. Bei IFN- α lag die Zytotoxizität der PBMC nur wenig über dem Ansatz ohne Zytokine. IFN- γ ließ die Zellen so schlecht proliferieren, dass nur mit zusätzlicher Lektin-gabe stimulierte PBMC getestet werden konnten. Diese Population zeigte eine etwas erhöhte Zytotoxizität verglichen mit dem Ansatz ohne Zytokin. Beide Zytokine schienen also nicht für eine Stimulation der PBMC zu NK-ähnlicher Zytotoxizität geeignet zu sein. Die gleichen Stimulationsansätze wurden ebenfalls mit separierten T-Zellen durchgeführt (Abb. D6.2).

D. ERGEBNISSE

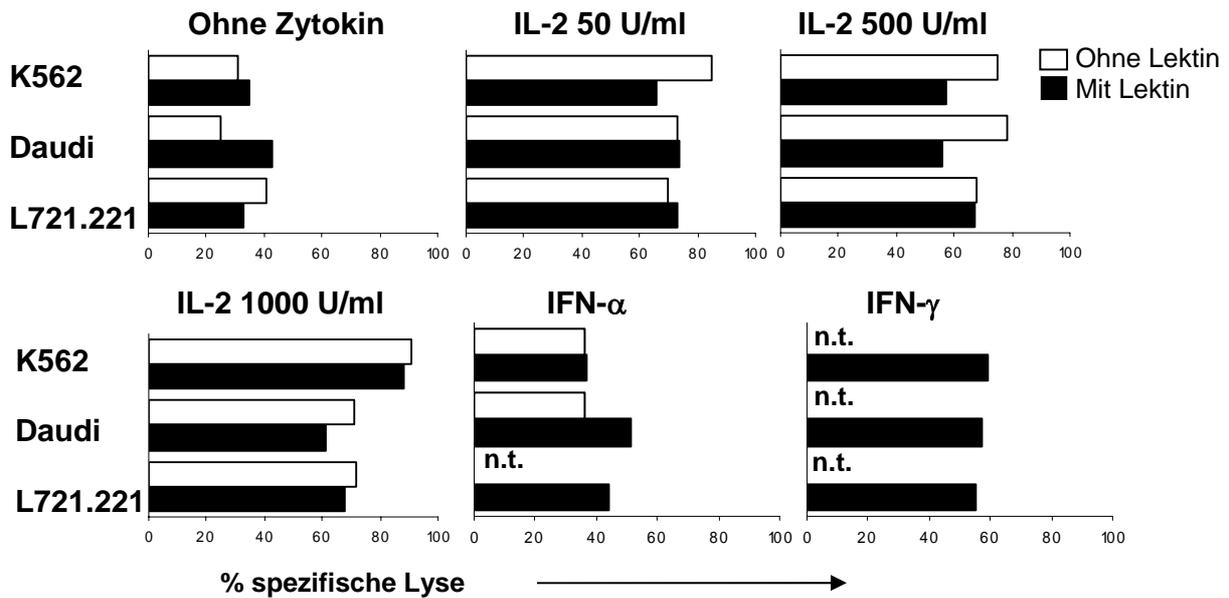


Abb. D6.1: Stimulationsansätze mit unseparierten PBMC des Spenders JB. Dargestellt sind die verschiedenen Ansätze, in denen PBMC sieben Tage kultiviert wurden: 50, 500 und 1000 U/ml IL-2 sowie 500 U/ml IFN- α oder IFN- γ in Abwesenheit (weiße Balken) oder Anwesenheit (schwarze Balken) von Lektin. PBMC ohne Lektin % NK-Zellen; mit Lektin % NK-Zellen: Ohne Zytokin 15%; 8%, IL-2 50 U/ml 42%; 10%, IL-2 500 U/ml 35%; 6%, IL-2 1000 U/ml 30%; 5%, IFN- α 20%; 18% IFN- γ 16%. n.t. nicht getestet

Die NK-ähnlichen T-Zellen zeigten trotz Kultivierung mit IL-2 alleine gute Zytotoxizität gegen die beiden Zielzellen K562 und L721.221 (Abb. D6.2). Stimulation der Zellen mit 50 U/ml IL-2 reichte jedoch nicht aus, um eine gute spezifische Lyse verglichen mit 1000 U/ml IL-2 zu erreichen. IFN- α und IFN- γ stellten sich als schlechte Stimulatoren der T-Zellen heraus, da sich mit diesen Zytokinen keine Steigerung der zytotoxischen Aktivität erzielen ließ. In diesem Punkt unterschieden sich CD4⁺ nicht von CD8⁺ T-Zellen.

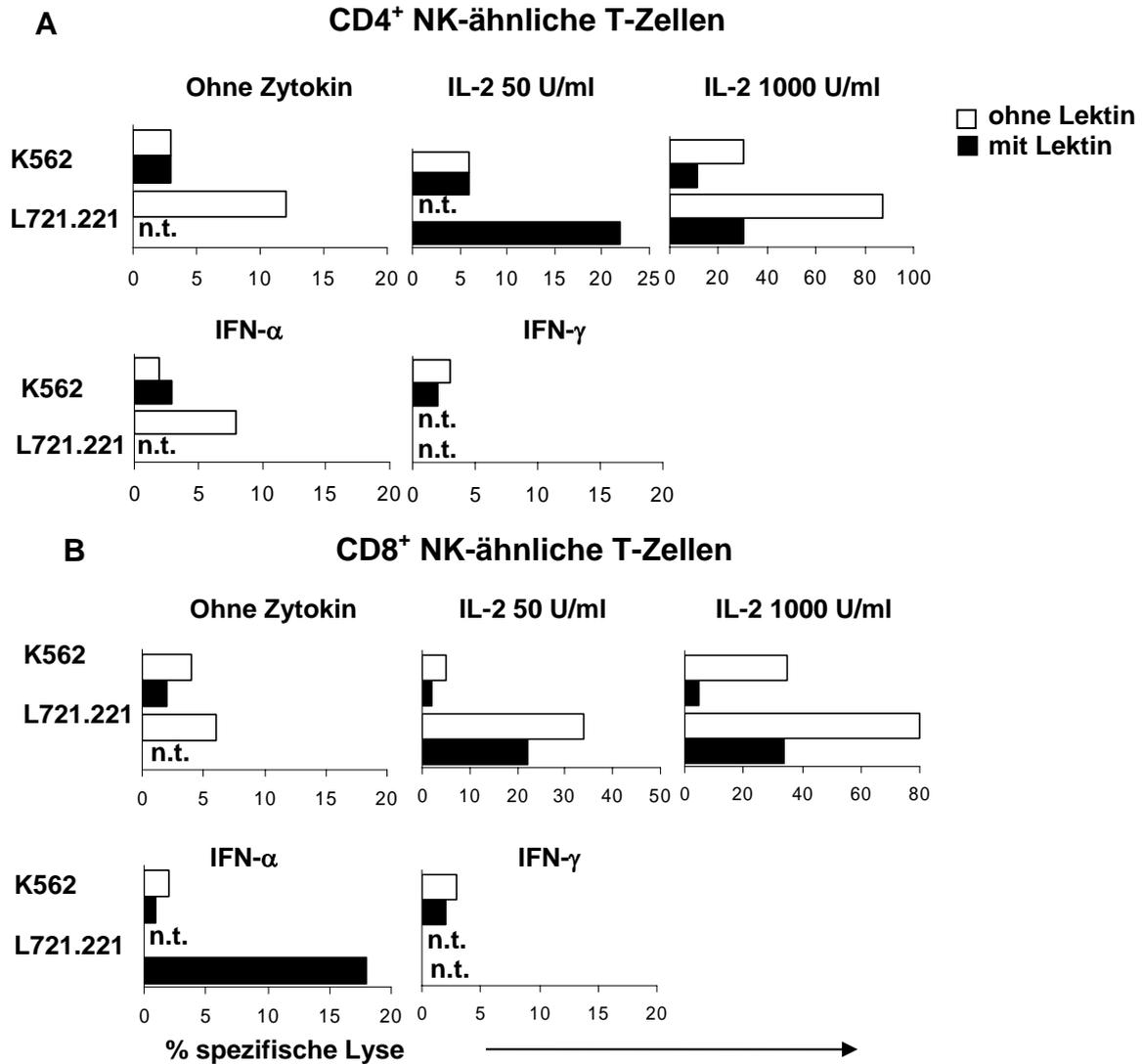


Abb. D6.2: Stimulationsansätze mit A) separierten CD4⁺ T-Zellen und B) mit CD8⁺ T-Zellen. Dargestellt sind verschiedene Ansätze mit 50, 500 und 1000 U/ml IL-2, sowie 500 U/ml IFN- α oder IFN- γ , in Abwesenheit (weiße Balken) oder Anwesenheit (schwarze Balken) von Lektin. Die E:T für K562 war 15:1, die für L721.221 30:1. Die T-Zellen stammten von Spender JB an Tag acht. n.t.=nicht getestet (mangelnde Zellmengen).

In weiteren Versuchen wurden T-Zellen ohne Lektin und mit unterschiedlichen Mengen an IL-2 stimuliert. Hierbei stellte sich heraus, dass NK-ähnliche Aktivität durchaus auch ohne Lektin und mit geringerer IL-2 Konzentration induziert werden konnte (Abb. D6.3). In weiteren Experimenten wurden daher nur noch 500 U/ml IL-2 ohne Lektin zur Stimulation der T-Zellen verwendet. In diesen Konzentrations- und Zytokinexperimenten fiel erstmals auf, dass bei verschiedenen Stimulationen auch eine unterschiedliche Aktivität gegen HLA-Klasse-I-negative Zielzellen (K562, L721.221 und Daudi) auftrat.

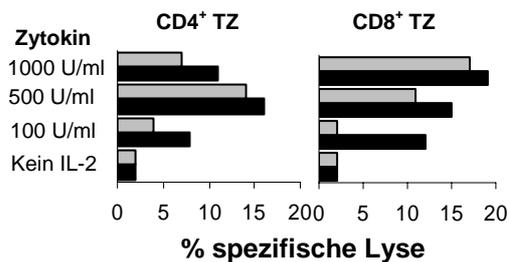


Abb. D6.3: Stimulation NK-ähnlicher T-Zellen ohne Lektin und mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL-2. Die grauen Balken zeigen die Lyse von K562, die schwarzen Balken die Lyse von Daudi. CD4⁺ NK-ähnliche T-Zellen (CD4⁺ TZ) sowie CD8⁺ NK-ähnliche T-Zellen (CD8⁺ TZ) ließen sich auch mit geringeren Mengen an IL-2 stimulieren. Die Zellen des Spenders RP an Tag acht wurden in einer E:T von 30:1 eingesetzt.

Da neben IL-2 auch IL-15 Signale über die gemeinsame γ -Kette [Giri *et al.* 1994, Grabstein *et al.* 1994, Schluns *et al.* 2004] des jeweiligen Rezeptor-Komplexes überträgt, wurde die nicht-MHC-restringierte Zytotoxizität der CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen nach Stimulation mit IL-2 bzw. IL-15 und in An- oder Abwesenheit von Lektin verglichen. CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnliche T-Zellen zeigten signifikant erhöhte Zytotoxizität gegen die drei HLA-Klasse-I-negativen Zielzelllinien mit IL-2 in Abwesenheit von Lektin (Abb. D6.4A). Dieser Effekt war genauso bei IL15-aktivierten T-Zellen zu erkennen, wenn auch weniger deutlich. Die stärkste Zytotoxizität wurde ohne Lektinzugabe gegen Daudi-Zellen beobachtet, wobei die Zytotoxizität deutlich die Werte der Stimulation mit Lektin übertraf. Bei beiden NK-ähnlichen T-Zellpopulationen wurde die spezifische Lyse der Zielzellen durch die Anwesenheit von Lektin sogar verringert. Nur L721.221 wurde bei Anwesenheit von Lektin von den CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen und den CD4⁺ NK-ähnlichen T-Zellen (bei IL-15-Stimulation) deutlich bevorzugt lysiert. CD8⁺ NK-ähnliche T-Zellen zeigten zudem gegen K562 eine schwach erhöhte Lyse, wenn Lektin im Stimulationsansatz vorhanden war.

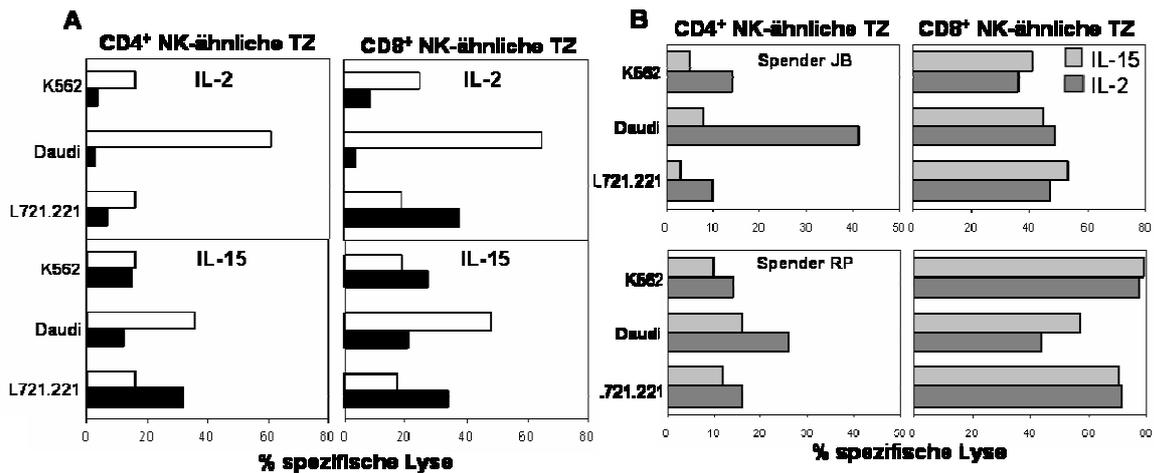


Abb. D6.4: Stimulationsansätze mit CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen mit IL-2 und IL-15. In **A**) sind CD4⁺ oder CD8⁺ NK-ähnliche T-Zellen des Spenders JB dargestellt, die mit IL-2 (500 U/ml) bzw. IL-15 (5 ng/ml) an Tag sechs gegen die Zielzellen K562, Daudi und L721.221 stimuliert wurden. Die weißen Balken zeigen Stimulationen ohne, die schwarzen Balken mit Lektin. In **B**) sind die CD4⁺ bzw. die CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen der Spender JB und RP dargestellt, die in Abwesenheit von Lektin aber mit IL-2 (dunkelgraue Balken) oder IL-15 (hellgraue Balken) acht Tage stimuliert wurden. Die E:T betrug 20:1. Die T-Zellpopulationen enthielten 0-2% NK-Zellen für Spender JB und 0-6% NK-Zellen für Spender RP.

In Abbildung D6.4B wurde die NK-ähnliche Aktivität der T-Zellen zweier Spender nach einer Stimulation mit IL-2 oder IL-15 in Abwesenheit von Lektin miteinander verglichen. IL-2 stellte sich bei beiden Spendern im Falle von CD4⁺ NK-ähnlichen T-Zellen als besserer Stimulator heraus. Bei CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen wurde die spezifische Lyse der drei Zielzellen durch IL-2 und IL-15 in gleichem Maße erhöht. Da bei Spender RP null für IL-2 und sechs % für IL-15 an NK Zellen in der CD8⁺ T-Zellpopulation detektiert wurden, müssen die Werte unter dem Vorbehalt der Mitwirkung von NK-Zellen betrachtet werden. Auf das je nach Zytokin sehr unterschiedliche Wachstumsverhalten der T-Zellen habe ich bereits hingewiesen. Deshalb wurde der Effekt der IL-2- bzw. IL-15-Stimulation mit und ohne Lektin bezüglich der Proliferation quantifiziert. Die höchsten Proliferationsraten wurden bei beiden Populationen NK-ähnlicher T-Zellen bei Stimulation mit IL-2 und Lektin erreicht (Abb. D6.5). IL-2 alleine, IL-15 alleine und Lektin induzierten ähnliche, aber signifikant verringerte Proliferationsraten. Demnach beeinflussten zwei Aspekte die Generierung von NK-ähnlichen T-Zellen. Hohe Zytotoxizität gegen HLA-Klasse-I-negative Zielzellen wurde erreicht, wenn die Effektor-T-Zellen ohne Lektin und mit einer niedrigen Dosis IL-2 oder IL-15 kultiviert wurden. Diese Zunahme an Zytotoxizität wurde von einer Abnahme der Proliferation begleitet. Daher wurden die meisten meiner Experimente mit Lektin und hoher IL-2-Dosis durchgeführt, um genügend Zellen für die vielfältigen Untersuchungen zu erhalten.

D. ERGEBNISSE

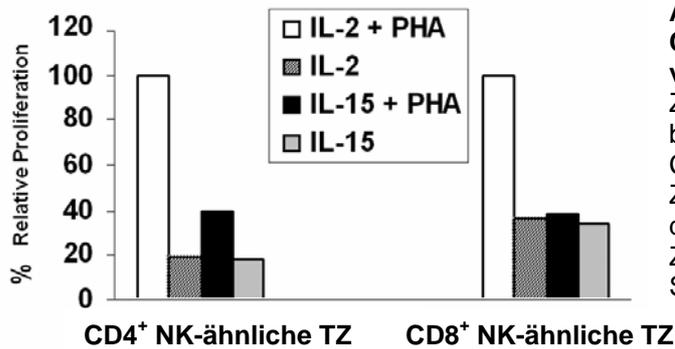


Abb. D6.5: Relative Proliferation CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnlicher T-Zellen (TZ) unter verschiedenen Kulturbedingungen. Die Zellzahlen wurden nach sechs Tagen Kultur berechnet, ausgehend von $4,5 \times 10^5$ bei den CD4⁺ T-Zellen und $4,7 \times 10^6$ bei den CD8⁺ T-Zellen. $15,4 \times 10^6$ war bei den CD4⁺ T-Zellen der 100% Referenz-Wert, bei den CD8⁺ T-Zellen waren es $13,4 \times 10^6$ bei einer Stimulation mit Lektin und IL-2 1000 U/ml.

Nicht-MHC-restringierte Aktivität kann in T-Zellen nicht nur über eine hohe IL-2-Dosis (1000 U/ml) und Lektin generiert werden. Es stellte sich heraus, dass auch geringere IL-2-Konzentrationen, wie z.B. 500 U/ml, für die Induktion ausreichen. IL-15, dessen Rezeptorkomplex die β -Kette (CD122) und die γ -Kette (CD132) mit dem IL-2-Rezeptorkomplex gemeinsam hat, war ebenfalls in der Lage Zytotoxizität der NK-ähnlichen T-Zellen gegen HLA-Klasse-I-negative Zielzellen zu induzieren. Eine wichtige Beobachtung war, dass Abwesenheit von Lektin in den Stimulationsansätzen die zytotoxischen Eigenschaften der NK-ähnlichen T-Zellen stark erhöhte. Einziger Nachteil der erhöhten Effektorfunktionen war die verringerte Proliferationsfähigkeit der so stimulierten Zellen.

7. CD8⁺ aber nicht CD4⁺ NK-ähnliche T-Zellen exprimieren intrazellulär Perforin

Ein bedeutender Effektor-Mechanismus der zellvermittelten Zytotoxizität ist die Perforinsekretion nach einer Rezeptor-vermittelten Degranulation. Da die Höhe der spezifischen Lyse je nach Gabe von Lektin variierte untersuchte ich, ob es eine Korrelation zwischen der Lektinstimulation und dem intrazellulären Perforin-Gehalt der Zellen gab (Abb. D7.1). Perforin wird in der Zelle zusammen mit anderen Effektormolekülen wie Granzym A und B gespeichert, welche nach Rezeptor-vermittelten Signalen, z. B. durch den TZR, degranulieren und diese Moleküle direkt in Kontakt zur Membran der Zielzelle bringen. Dort induziert Perforin zusammen mit anderen Effektormolekülen den so genannten programmierten Zelltod (Apoptose), der *in vitro* durch die Freisetzung von Chrom nachgewiesen werden kann.

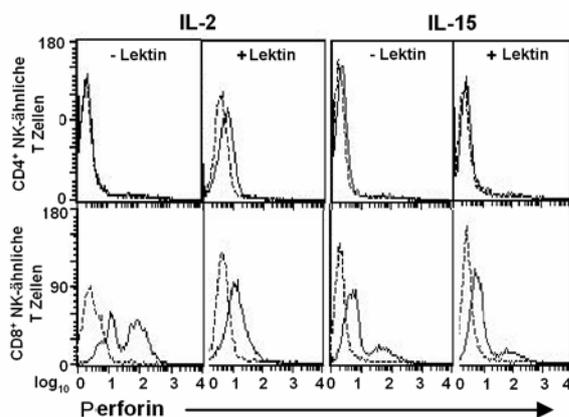


Abb. D7.1: Perforin-Expression CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnlicher T-Zellen. Die Perforin-Expression wurde durch intrazelluläre Färbung anhand FITC-konjugierter α -Perforin Antikörper durchgeführt. CD4⁺ (obere Reihe) und CD8⁺ (untere Reihe) NK-ähnliche T-Zellen wurden sechs Tage kultiviert und mit IL-2 oder IL-15, in An- oder Abwesenheit von Lektin stimuliert. Individuelle Isotypkontrollen sind durch gestrichelte Linien dargestellt, Perforin durch durchgezogene.

CD4⁺ NK-ähnliche T-Zellen besaßen unabhängig von ihrem Stimulationsmodus kein intrazelluläres Perforin. Dies wies darauf hin, dass deren Zytotoxizität auf anderen Faktoren, wie der Expression des Liganden für den CD95-Apoptoserezeptor, beruhte. Tatsächlich wurde CD95L-spezifische mRNA durch RT-PCR bei CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen detektiert (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu exprimierten CD8⁺ NK-ähnliche T-Zellen deutlich Perforin nach Inkubation mit IL-2 oder IL-15 ohne Lektin. In Anwesenheit von Lektin jedoch, zeigten IL-2-stimulierte CD8⁺ NK-ähnliche T-Zellen eine verringerte Perforinexpression. Kein signifikanter Unterschied konnte zwischen der Stimulation mit IL-15 mit oder ohne Lektin

beobachtet werden. Diese Resultate korrelierten mit der beobachteten verringerten Zytotoxizität von CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen gegen K562 und Daudi nach Kultivierung der T-Zellen mit IL-2 und Lektin. Das umgekehrte Verhältnis zwischen Proliferation und Zytotoxizität könnte darauf hinweisen, dass bei nicht-MHC-restringierten T-Zellen ein empfindliches Gleichgewicht zwischen Proliferation und Effektorfunktion beibehalten wird, welches von der Art der Rezeptor-vermittelten Signale abhängig ist.

CD8⁺ NK-ähnliche T-Zellen exprimierten im Gegensatz zu CD4⁺ NK-ähnlichen T-Zellen das Effektormolekül Perforin. Bei Stimulation mit IL-2 ohne Lektin korrelierte eine erhöhte Perforinexpression, im Vergleich zur Lektinstimulation, mit der erhöhten Zytotoxizität gegen HLA-Klasse-I-negative Zielzellen.

8. NK-ähnliche T-Zellen sezernieren ein breites Spektrum an Zytokinen

Klassische Lymphozyten, wie MHC-restringierte T-Zellen und NK-Zellen, zeigen zusätzlich zu ihrer zytotoxischen Aktivität die Sekretion eines breiten Spektrums an Zytokinen und Chemokinen. Daher fungieren sie als bedeutende Regulatoren einer Immunantwort und können diese in unterschiedliche Richtungen dirigieren. Ein Beispiel dafür ist die TH1/TH2-Balance, die bei der Bekämpfung bestimmter Pathogene bzw. bei autoreaktiven Prozessen eine große Rolle spielt. Das durch IFN- γ dominierte TH1-Zytokinmuster ist vor allem für die Ausbildung einer effektiven Immunreaktion gegen Viren nötig. Dagegen ist das TH2-Leitzytokin IL-4 zusammen mit IL-10 und IL-13 von großer Bedeutung für die Ausbildung von IgE-vermittelten Autoimmunerkrankungen und Allergien. Somit sollte untersucht werden ob NK-ähnliche T-Zellen sich einem dieser Muster zuordnen lassen oder aufgrund ihrer Polyklonalität eine gemischte Zytokinsekretion ohne TH1/TH2-Schwerpunkt aufweisen.

Da Zytotoxizität der NK-ähnlichen T-Zellen nicht durch die untersuchte AR induziert wurde, überprüfte ich zunächst die Möglichkeit überprüft, ob stattdessen eine Zytokin- und Chemokinsekretion über diese Rezeptoren induziert werden konnte, welche gegebenenfalls in die TH1/TH2-Muster eingeordnet werden könnte. Die Multiplex-Protein-Array-Technologie, die als einzige die gleichzeitige Detektion mehrerer Zytokine/Chemokine aus einem Überstand ermöglicht, wurde hierfür verwendet. NK-ähnliche T- und NK-Zellen wurden mit AR-spezifischen Antikörpern, gekoppelt an P815-Zellen, inkubiert und eine Reihe an Zytokinen/Chemokinen nach 24 Stunden im Überstand gemessen. Analog zu der Induktion der Zytotoxizität konnte die Stimulation über verschiedene AR (2B4, NKG2D, DNAM-1 und CD161) weder in CD4⁺ noch in CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen eine Zytokin/Chemokinsekretion auslösen (Abb. D8.1). Nur CD3-spezifische Antikörper stimulierten CD4⁺ NK-ähnliche T-Zellen zur Sekretion substantieller Mengen (≥ 100 pg/ml) an TNF- α , GM-CSF, IL-5, IL-13 und dem Chemokin MIP-1 β . Damit ist diesen CD4⁺ NK-ähnlichen T-Zellen des Spenders JB ein TH2-ähnliches Zytokinmuster zuzuordnen, obwohl das Leitzytokin IL-4 nicht produziert wurde. Die CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen sezernierten nur MIP-1 β

nach Stimulation mit dem CD3-spezifischen Antikörper. NK-Zellen zeigten erhöhte Sekretion von MIP-1 β , TNF- α und IL-13 über verschiedene AR. Dies zeigte, dass diese Rezeptoren auf NK-Zellen funktionell waren.

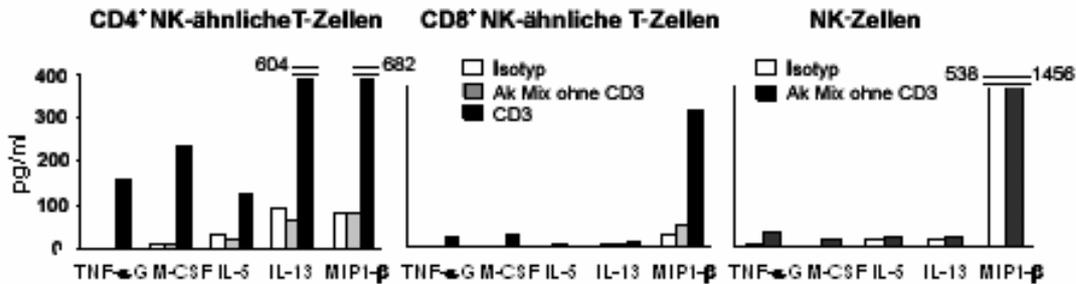


Abb. D8.1: Stimulation CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnlicher T-Zellen über CD3 oder verschiedene AR. Zytokinsekretion wurde gemessen nach Zugabe einer Mischung von Antikörpern gegen verschiedene AR (2B4, NKG2D, DNAM-1 und CD161) ohne α -CD3 (grau), nur mit dem mAk gegen CD3 (schwarz) und einer Isotypkontrolle (weiß). Effektorzellen (10^5 Zellen/Loch) wurden mit den Antikörpern (100 ng/ml Antikörper verdünnt nach Methoden 5.3) gekoppelt an P815 (10^5 Zellen/Loch) in Duplikaten angesetzt und für 24 Stunden inkubiert. Die Zellen stammten von Spender RP an Tag sechs.

Auch wenn Zytokin/Chemokinsekretion nicht direkt über bekannte AR induziert werden konnte, wurde die allgemeine Fähigkeit von NK-ähnlichen T-Zellen in der initialen Stimulationsphase getestet, in Abwesenheit bestimmter Signale Zytokine/Chemokine zu produzieren. Dabei wurde untersucht, ob IL-2-Stimulation für die Zytokinsekretion nötig war. Hierfür wurden NK-ähnliche T- und NK-Zellen zwei Tage mit IL-2 kultiviert, anschließend eine definierte Zellzahl entnommen und in An- und Abwesenheit von IL-2 für 24 Stunden kultiviert, bevor die Überstände für die Messung abgenommen wurden. Im Falle der Abwesenheit von IL-2 im Medium sollte kein exogenes IL-2 mehr messbar sein, da die Zellen vor der Zugabe des entsprechenden Mediums und der 24-Stunden-Inkubation gewaschen wurden. Das Sekretionsmuster der Spender JB und RP ist in Tabelle D8.1 zusammengefasst, im Anhang finden sich in Tabelle I1.7, I1.8 und I1.9 die Zytokinmuster der anderen drei Spender.

D. ERGEBNISSE

Tab. D8.1: Zytokin/Chemokinsekretion CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnlicher T- und NK-Zellen nach Stimulation mit 1000 U/ml IL-2 und Lektin.

Zytokin	Spender JB						Spender RP					
	Tag 3			Tag 9			Tag 3			Tag 9		
	CD4	CD8	NK	CD4	CD8	NK	CD4	CD8	NK	CD4	CD8	NK
IL-2 ^c	824 ^a	2472	313	50	75	11794 ^d	649	1146	234	182	114	11
IL-4	22 ± 4 ^b	6 ± 1	1 ± 1	3 ± 1	1 ± 1	10 ± 10	14 ± 5	13 ± 3	6 ± 3	2 ± 1	1 ± 1	7 ± 6
IL-5	661 (344) ^b	635 (284)	161 (111)	107 (55)	18 ± 2	83 (871) ^d	519 (164)	519 (282)	435 (176)	29 ± 17	10 ± 4	205 (41)
IL-6	12 ± 5	6 ± 3	4 ± 2	2 ± 2	1 ± 1	2 ± 1	216 (125)	178 ± 20	57 ± 12	5 ± 3	2 ± 2	9 ± 5
IL-8	15 ± 8	1 ± 0	5 ± 1	63 ± 8	1 ± 0	3 ± 2	159 (58)	190 ± 1	46 (15)	7 ± 2	2 ± 1	3 ± 1
IL-10	309 (112)	11 ± 1	1 ± 0	7 ± 4	<1	3 ± 3	397 (242)	184 ± 11	12 ± 6	4 ± 2	0	1
IL-13	2147 (1024)	1269 (475)	214 (119)	495 (152)	35 ± 12	73 (1524) ^d	1925 (567)	2990 (1369)	1308 (573)	169 (25)	20 (0)	601 (77)
IFN-γ	132 (78)	170 (130)	161 (89)	45 (0)	41 (0)	0 (69)	145 (67)	1437 (670)	1903 (896)	45 (0)	41 (0)	57 (0)
TNF-α	112 ± 0	77 ± 2	33 ± 10	5 ± 2	3 ± 2	5 ± 4	85 ± 13	166 ± 17	145 (64)	3 ± 3	3 ± 3	5 ± 4
GM-CSF	46 ± 12	48 ± 22	15 ± 10	24 (1)	9 ± 6	0 (32)	137 (36)	812 (292)	234 (111)	7 ± 7	20	28 (1)
MIP-1β	>4000 ^e	>4000 ^e	>4000 ^e	618 (466)	343 ± 20	512 (1295) ^d	>4000 ^e	>4000 ^e	>4000 ^e	135 (44)	66 (16)	915 (240)

□ 50 – 300 pg/ml □ 301 – 1000 pg/ml ■ 1001 - 4000 pg/ml

^a Die Zytokin/Chemokinsekretion wurde über eine Multiplex-Protein-Array-Technologie analysiert. 50.000 Zellen an Tag zwei und acht wurden für 24 Stunden mit oder ohne IL-2 inkubiert (entspricht Tag drei und neun). Konzentrationen von 11 Zytokinen/Chemokinen wurden gleichzeitig gemessen. Die verschiedenen Grau-Skalierungen richten sich nach unterschiedlichen Konzentrationen der Zytokine in Anwesenheit von IL-2 im Medium.

^b Lag bei Konzentrationen über 50 pg/ml die Standardabweichung (SD) der Messungen mit bzw. ohne IL-2 unter 20%, wurde dieser Wert ± SD angegeben; + bzw. - IL-2 Werte mit einer SD von > 20% werden getrennt angegeben. Die obere Reihe repräsentiert dabei die Werte in Anwesenheit von IL-2, die in Klammern darunter aufgelisteten Daten repräsentieren die Werte in Abwesenheit von exogenem IL-2 während der 24-stündigen Inkubation.

^c Für die IL-2-Werte repräsentieren alle Daten die IL-2 Sekretion der verschiedenen Subpopulationen in Abwesenheit von endogenem IL-2.

^d NK-Zellen von Spender JB an Tag neun waren kontaminiert durch 8% CD3⁺ T-Zellen, was eventuell zu der Sekretion von IL-2, IL-5, IL-13 and MIP-1β beiträgt. Daher wurden für diese Population die IL-2-Werte für die Grau-Skalierung verwendet.

^e In diesen Proben war die MIP-1β Sekretion höher als 4000 pg/ml und überschritt damit den linearen Abschnitt der Standardkurve für MIP-1β.

Im Allgemeinen sezernierten alle drei Populationen mehr Zytokine/Chemokine an Tag drei als an Tag neun. Weder CD4⁺ noch CD8⁺ NK-ähnliche T-Zellen neigten in diesen Ansätzen zu einem TH1- oder TH2-spezifischen Zytokinmuster. Dies erklärt sich möglicherweise aus der Tatsache, dass mit polyklonalen Populationen nicht-spezifisch aktivierter T-Zellen gearbeitet wurde. Der Unterschied zu den in Abbildung D8.1 gezeigten Daten lag in der Art des experimentellen Ansatzes. Für die Rezeptorvermittelte Stimulation (Abb. D8.1) wurden die T-Zellen an Tag sechs gewaschen und in Anwesenheit der Stimulatorzelle P815 mit den verschiedenen mAk kultiviert. Diese Bedingungen machen die Zytokinproduktion von einem direkten Zell-Zell-Kontakt abhängig. Dagegen wurden die Messungen für Tabelle D8.1 ohne Stimulatorzellen quasi als Momentaufnahme der Tage drei und neun durchgeführt, so dass die hier autonome Zytokinproduktion ohne externen Stimulus getestet werden konnte. Zudem wurden die NK-ähnlichen T-Zellen für die Rezeptorvermittelte Stimulation ohne Lektin und mit 500 U/ml IL-2 kultiviert, in Tabelle D8.1 handelte es sich dagegen um Zellen, die mit Lektin und einer höheren Dosis IL-2 aktiviert wurden.

IL-2, IL-5, IFN- γ , TNF- α und GM-CSF wurden bei beiden T-Zellpopulationen aller vier Spender detektiert (siehe Anhang für Spender CF und WG). IL-4 wurde bei keiner Population der NK-ähnlichen T- und NK-Zellen der vier Spender detektiert. Von den drei Zellpopulationen des Spenders RP wurde an Tag drei IL-6 produziert, IL-8 und IL-10 wurden dagegen von den CD4⁺ NK-ähnlichen T-Zellen aller vier Spender sezerniert. Das CC-Chemokin MIP-1 β scheint in großen Mengen von T- und NK-Zellen nach verschiedenen Stimulationen sezerniert zu werden. Dieses an den aktivierungsinduzierten CCR5-Rezeptor bindende Chemokin ist für die Migration von Lymphozyten entlang eines MIP-1 β Gradienten in Entzündungsrichtung wichtig. Man kann also vermuten, dass die starke MIP-1 β -Produktion der NK-ähnlichen T-Zellen eine Rolle bei der Amplifikation und Richtung einer Immunantwort spielen könnte. Wie erwartet, wurden bei keinem Spender MCP-1 noch G-CSF, IL-7, IL-12, IL-17 oder IL-1 β von NK-ähnlichen T- und NK-Zellen sezerniert, da diese Zytokine generell nicht von Lymphozyten produziert werden. Zwar war die Zytokin/Chemokinsekretion im Allgemeinen ohne IL-2 Stimulation etwas niedriger, doch scheint eine initiale Induktion über die gemeinsame γ -Kette des IL-2/IL-15-Rezeptors alleine auszureichen, um eine anhaltende Zytokin/Chemokinherstellung zu gewährleisten.

D. ERGEBNISSE

Im Gegensatz zu der Induktion der Zytokin/Chemokinsekretion über bekannte AR habe ich untersucht, ob Zielzellen, die Zytotoxizität in NK-ähnlichen T-Zellen anregen konnten, auch die Produktion von Zytokinen bzw. Chemokinen einleiten können (Abb. D8.2). K562-Zellen stimulierten nur die Sekretion von MIP-1 β und inhibierten die Sekretion von IFN- γ , IL-6 und IL-13. Daudi-Zellen dagegen stimulierten die Zytokinproduktion von IFN- γ , TNF- α , IL-6 und IL-13 in beiden T-Zellpopulationen und erhöhten signifikant die IL-5 Sekretion der CD4 $^+$, aber nicht der CD8 $^+$ NK-ähnlichen T-Zellen. Die Zytokin/Chemokinsekretion wurde in Anwesenheit von IL-2 bzw. IL-15 während der Kokultivierung der Effektorzellen mit den Zielzellen nach 24 Stunden gemessen. Daher konnte die endogene IL-2-Sekretion in diesem Ansatz nicht gemessen werden. IL-15 stimulierte mit Ausnahme von MIP-1 β , die Zytokin/Chemokinsekretion in geringerem Maße als IL-2. Zielzell-unabhängige Zytokin/Chemokinsynthese durch separierte CD4 $^+$ und CD8 $^+$ NK-ähnliche T-Zellen wurde zum Vergleich mitgeführt (Abb. D8.2, weiße Balken). Dieses Ergebnis ist ein gutes Beispiel für die Plastizität der Aktivierung dieser Effektorzellen, da die beiden HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen Daudi und K562 unterschiedliche Zytokinmuster in CD4 $^+$ und CD8 $^+$ NK-ähnlichen T-Zellen induzierten.

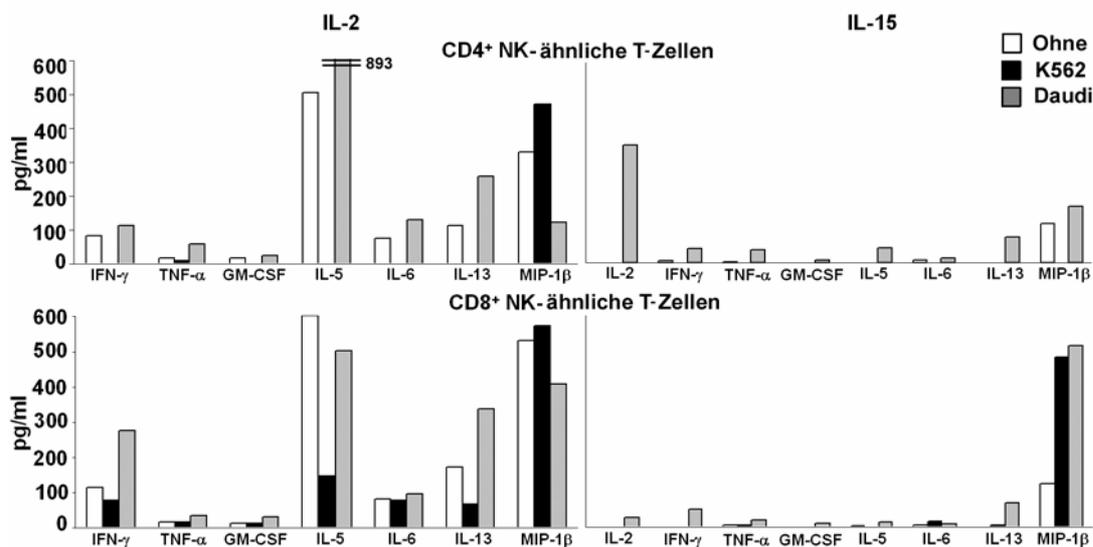


Abb. D8.2: Zytokin/Chemokinsekretion nach Inkubation der NK-ähnlichen T-Zellen mit den Zielzellen K562 und Daudi. Separierte CD4 $^+$ und CD8 $^+$ NK-ähnliche T-Zellen (Spender JB) wurden (nach drei Tagen Kultivierung mit IL-2 oder IL-15) mit K562 oder Daudi in Anwesenheit von IL-2 bzw. IL-15 im Medium (500 U/ml bzw. 5ng/ml) für 24 Stunden kultiviert. Die Effektor-zu-Zielzellratio betrug 1:1 mit 50.000 T-Zellen und 50.000 Zielzellen pro Loch. Der Ansatz erfolgte in Duplikaten. Die Überstände wurden vereint und für die Zytokin/Chemokinmessung verwendet.

Bezeichnenderweise zeigten NK-ähnliche T-Zellen ohne Inkubation mit Zielzellen eine geringere Produktion an Zytokinen/Chemokinen als die unter der Tabelle D8.1 beschriebenen Populationen. Dies könnte daran liegen, dass die T-Zellpopulationen aus der obigen Tabelle zusätzlich mit Lektin stimuliert wurden, die T-Zellen aus Abbildung D8.2 dagegen nur mit IL-2 bzw. IL-15. Diese Experimente zeigten, dass Zytotoxizität und Zytokinproduktion durch eine definierte Stimulation (z.B. K562) nicht unbedingt korrelieren müssen, da die zytotoxischen Eigenschaften der NK-ähnlichen T-Zellen ohne Lektin höher waren als in Anwesenheit von Lektin, wohingegen die Zytokinproduktion ohne Lektin geringer war als in Anwesenheit dieser zusätzlichen unspezifischen T-Zell-Aktivierung.

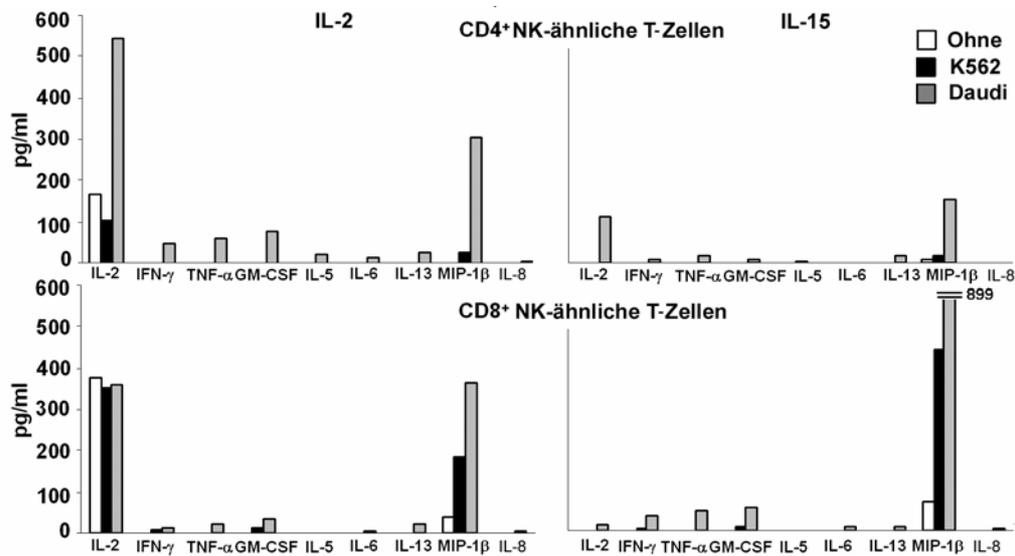


Abb. D8.3: Zytokin/Chemokinsekretion der NK-ähnlichen T-Zellen. In der linken Spalte sind NK-ähnliche T-Zellen des Spenders RP gezeigt, die mit IL-2 induziert wurden, ohne Zugabe von IL-2 während der Kokultivierung mit den Zielzellen K562 und Daudi. In der rechten Spalte wurde die Zytokin/Chemokinsekretion der NK-ähnlichen T-Zellen nach Stimulation mit IL-15 gemessen, wobei IL-15 während der Kokultivierung mit den Zielzellen nicht zugegeben wurde. Die Sekretion ist ohne Kokultivierung mit Zielzellen (weiß), mit K562 (schwarz) und mit Daudi (grau) dargestellt.

Um auch die Sekretion von IL-2 testen zu können, wurde ein Versuch mit Spender RP durchgeführt, bei welchem die separierten CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen während der Kokultivierung mit den Zielzellen nicht mit IL-2 bzw. IL-15 stimuliert wurden. Daudi-Zellen erwiesen sich wieder als potente Stimulatoren der Zytokin/Chemokinherstellung für IL-2-stimulierte T-Zellen. IL-15-stimulierte T-Zellen zeigten (mit Ausnahme von MIP1-β bei den CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen) auch hier niedrigere Werte als IL-2-stimulierte T-Zellen. Weiter ist in Abbildung D8.3 zu sehen, dass die Zytokin/Chemokinsekretion ohne Zugabe von Lektin generell stark reduziert war.

Ohne Zielzellkontakt wurde IL-2 vor allem bei der IL-15-Stimulation nur in sehr geringen Mengen von NK-ähnlichen T-Zellen sezerniert. Ohne zusätzliche Aktivierung anderer Rezeptoren (mittels Lektinbindung) beschränkte sich die Palette der durch Zielzellen wie Daudi- oder K562-induzierten Zytokine auf MIP1- β bzw. in einigen Fällen auch auf IL-5. Dies lässt den Schluss zu, dass für die Produktion einer breiten Palette an Zytokinen und Chemokinen neben den Signalen der IL-2/IL-15-Rezeptoren weitere Signale durch andere Rezeptoren, z. B. durch den TZR/CD3-Komplex, nötig sind. Dies steht im Gegensatz zur Induktion der Zytotoxizität, die in NK-ähnlichen T-Zellen durch Zytokine allein erfolgen konnte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass NK-ähnliche T-Zellen nach Stimulation mit Lektin und IL-2 eine breite Palette an Zytokinen/Chemokinen sezernierten. Stimulationen über den IL-2-IL/15-Rezeptor-Komplex alleine reichten dafür nicht aus. Zielzellen, die bei NK-ähnlichen T-Zellen zytotoxische Aktivität induzieren konnten, waren auch in der Lage, diese Effektorzellen zur Zytokinsekretion zu stimulieren. Für eine derartige Aktivierung auf Zytokinniveau waren dagegen Signale über die auf den CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen exprimierten AR (2B4, NKG2D und DNAM-1) nicht ausreichend.

E. DISKUSSION

Der funktionelle Vergleich humaner NK-Zellen mit zytokinstimulierten T-Zellen in der vorliegenden Arbeit hat ergeben, dass neben NK-Zellen auch andere Effektorzellen zu NK-ähnlicher Zytotoxizität induziert werden können. Bereits in früheren Studien wurden so genannte LAK-Zellen aus PBMC generiert, die nicht-MHC-restringierte Aktivität zeigten [Rosenberg 1986]. LAK-Zellen wurden lange Zeit mit NK-Zellen gleichgesetzt, da davon ausgegangen wurde, dass T-Zellen auf eine reine Zytokinstimulation nicht reagieren. Ein wichtiges Merkmal für die Charakterisierung humaner LAK-Aktivität ist die Lyse HLA-Klasse-I-negativer Zielzellen. In früheren Arbeiten aus unserer Gruppe wurde allerdings gezeigt, dass der Anteil an NK-Zellen in diesen Populationen nicht mehr als 20% betrug und der T-Zellanteil die LAK-Populationen dominierte [Falk *et al.* 2002b]. Die größte Population innerhalb der LAK-Zellen bilden also CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, deren nicht-MHC-restringierte zytotoxische und phänotypische Eigenschaften in dieser Arbeit im Detail betrachtet werden sollten. Bisher wurden NK- und T-Zellen stets in gemischten Populationen mit Zytokinen stimuliert, weshalb besonderes Augenmerk auf die Frage der autonomen T-Zellaktivierung gelegt werden sollte.

Frühere Studien über Antigen-unabhängige T-Zellstimulation durch Zytokine konzentrierten sich vor allem auf die Proliferation und Differenzierung von T-Zell-Subpopulationen [Schluns *et al.* 2003]. In meiner Arbeit wurden nun die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften hochaufgereinigter CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen definiert, die durch TZR-unabhängige Zytokinstimulation eine NK-ähnliche Aktivität erlangten. Hierfür wurden aus den PBMC gesunder Spender T-Zellen isoliert, expandiert und bezüglich ihrer Zytotoxizität, Zytokinproduktion sowie bezüglich der Regulation durch HLA-Klasse-I-Moleküle charakterisiert.

1. Nicht-MHC-restringierte Aktivität NK-ähnlicher T-Zellen und Inhibition durch HLA-Klasse-Ia und -Ib Moleküle

Um die zytotoxischen Eigenschaften von CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen zu überprüfen, wurden die hoch-aufgereinigten T-Zellen von fünf Spendern mit einer hohen Dosis IL-2 (1000 U/ml) für zwei Wochen kultiviert. Zusätzlich wurde über die ersten 24 Stunden der Kultivierung Lektin zugegeben, was zu einer Oberflächenvernetzung verschiedener Rezeptoren auf T-Zellen führt und dadurch die zytotoxischen Eigenschaften erhöht. An drei verschiedenen Zeitpunkten (Tag drei, sieben und 14) wurden unterschiedliche funktionelle Untersuchungen durchgeführt. Hierbei wurden neben separierten T-Zellen auch separierte NK-Zellen und eine unseparierte Population (PBMC) mitgeführt. Eine Reihe HLA-Klasse-I-negativer Zielzellen sollte zeigen, ob die so aktivierten T-Zellen in der Lage sind, unabhängig von ihrem TZR, nicht-MHC-restringierte Zytotoxizität auszuüben. In Zusammenarbeit mit dem Labor von Frau Prof. Weiß standen einige HLA-Klasse-I-positive Transfektanten bzw. Varianten von Klasse-I-negativen Zielzellen zur Verfügung, um den Effekt bestimmter HLA-Klasse-I-Moleküle auf die NK- und T-Zellaktivität zu analysieren. Diese Varianten exprimierten ein bestimmtes HLA-Klasse-I-Molekül oder einen bekannten HLA-Haplotyp auf der Oberfläche und dienten daher der genauen Charakterisierung der MHC-vermittelten Abschaltung der NK-ähnlichen Aktivität bei NK- und T-Zellen.

Eine wichtige Voraussetzung für die T-Zellcharakterisierung war die Reinheit der T-Zellsubpopulationen, die stets 98-99% betrug. Die isolierten CD4⁺ bzw. CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen zeigten eine spezifische Lyse der HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen K562, Daudi und L721.221, wobei die zytotoxische Aktivität der CD4⁺ T-Zellen meist unter derjenigen der CD8⁺ T-Zellen blieb. Ein gemeinsames Merkmal aller fünf Spender war, dass die Zytotoxizität der CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen innerhalb der ersten drei Tage *in vitro* am höchsten lag und im Verlauf der zweiwöchigen Kultivierung trotz der kontinuierlichen Gabe von IL-2 deutlich abnahm. Diese Kinetik scheint auf das Fehlen eines TZR-Signals zurückzuführen zu sein, da ein gegensätzlicher Verlauf mit zunehmender Zytotoxizität ab Tag sechs bis Tag 21 bereits für CIK Zellen gezeigt wurde. Bei dieser Variante werden PBMC mit einer

Mischung aus IFN- γ , CD3 und IL-2 aktiviert [Verneris *et al.* 2004]. Möglicherweise resultieren TZR-vermittelte Signale zusammen mit Zytokinen, also in einem anderen Aktivierungsstatus verglichen mit NK-ähnlichen T-Zellen, die nur über ein Zytokin (IL-2 oder IL-15) stimuliert wurden.

Auch, wenn sich die zytotoxischen Aktivitäten der NK-ähnlichen T-Zellen zwischen den verschiedenen Spendern und auch zu den drei Zeitpunkten unterschieden, so inhibierten doch kontinuierlich HLA-C und/oder -E Moleküle die Zytotoxizität aller Effektorpopulationen. Die Inhibition der Lyse war jedoch nicht nur auf spezifische HLA-Moleküle begrenzt, da sie durch HLA-Klasse-I-positive Zellvarianten mit unterschiedlichen Allotypen wie Daudi- β_2m (HLA-A14, -A66.1, -B58, -Cw6.1) und L721.112 (HLA-A1, -B8, -Cw7) erzielt werden konnte. Die individuelle Stärke der Inhibition durch HLA-C und -E variierte ebenfalls zwischen den Spendern und auch zwischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Im Prinzip scheinen sowohl HLA-Klasse-Ia als auch HLA-Klasse-Ib-Moleküle das Potenzial zu besitzen die NK-ähnliche Aktivität zu inhibieren. Auf der einen Seite resultierten die Unterschiede in der Stärke der Inhibition möglicherweise aus der Tatsache, dass während der Kultivierung verschiedene T-Zell-Klone expandiert wurden. Auf der anderen Seite, könnte sich auch der funktionelle Status während der zwei Wochen verändern. Das Muster der HLA-C-, -E- und gelegentlich auch -G-vermittelten Abschaltung bei NK-ähnlichen T-Zellen deutet darauf hin, dass sich dieses Muster unabhängig vom genetischen Hintergrund der MHC- und KIR-Genloci entwickelte. Speziell für HLA-C-Moleküle konnte ich zeigen, dass HLA-Cw3 und -Cw7, die beide der HLA-C-Gruppe 2 angehören, ebenso die Zytotoxizität der gereinigten CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen inhibierten wie HLA-Cw6, das der HLA-C-Gruppe 1 zuzuordnen ist. Die Beobachtung, dass diese drei HLA-C Moleküle inhibierend auf fast alle NK-ähnlichen T-Zellpopulationen wirkten, deutet darauf hin, dass die Aufspaltung der HLA-C Gruppen in Gruppe 1 (Cw2, Cw4, Cw5, Cw6) und Gruppe 2 (Cw1, Cw3, Cw7, Cw12) für die Regulation dieser zytokinstimulierten T-Zellen nicht relevant ist. Zusätzlich zu den spezifischen HLA -Cw3, -E und -G Molekülen als K562-Transfektanten und den HLA-Cw6 und -Cw7-Molekülen als L721.221-Transfektanten wurden weitere Transfektanten getestet, welche HLA-G, -B27, -B35 und -B37 in L721.221-Zellen exprimierten. Wie schon bei der K562-G-Transfektante beobachtet, zeigte die L721.221-G-Transfektante negativ regulierende Eigenschaften auf die Zytotoxizität einiger NK-ähnlicher T-Zellpopulationen mehrerer Spender. Auch die drei HLA-B-

Moleküle B27, B35 und B37, erwiesen sich in einigen Fällen als Inhibitoren der T-Zellaktivität. Jede NK-ähnliche T-Zellpopulation der fünf Spender war durch mindestens ein HLA-Klasse-I-Allelprodukt inhibierbar, wenngleich sich die jeweiligen Spezifitäten unterschieden. Eine Abschaltung läuft also spezifisch ab und ist von der Verteilung der Subpopulation und/oder vom funktionellen Stadium der NK-ähnlichen T-Zellen abhängig.

Im Gegensatz zu den hämatopoietischen Zielzellen K562, Daudi und L721.221 wurde eine epitheliale Tumorzelllinie, RCC-26, durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zwar lysiert, allerdings nur von jeweils einer der beiden T-Zellpopulationen von drei der fünf Spender und dazu nur mit geringer Effizienz. Die Steigerung der HLA-Klasse-I-Expression nach IFN- γ -Gen-Transfer in RCC-26 (RCC-26-endoy1) führte zur Inhibition der Zytotoxizität bei CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen. Übereinstimmend mit vorangegangenen Studien richtet sich die nicht-MHC-restringierte Zytotoxizität der NK-ähnlichen T-Zellen gegen Tumorzellen hämatologischen sowie nicht-hämatologischen Ursprungs. Das individuelle HLA-Klasse-I-Niveau auf einer Zielzelloberfläche stellte einen wichtigen Parameter für die Regulierung der NK-Zellen und NK-ähnlichen T-Zellen dar [Nossner *et al.* 1996, Algarra *et al.* 2004]. Trotz ihrer generell höheren HLA-Klasse-I-Expression wurden hämatopoietische Zielzellen von NK-ähnlichen T-Zellen aller Spender effizienter lysiert, was bedeuten könnte, dass diese Zellen bestimmte AR-Liganden exprimieren, die epithelialen Zellen fehlen oder dort nur schwach exprimiert sind. Auch aus der NK-Zellregulation ist dieses Phänomen bekannt. So stellte man in klinischen Studien der haploidentischen Knochenmarktransplantationen fest, dass in Konstellationen von Spender-NK-Zellen ohne passenden Liganden im Empfänger Leukämiezellen im Patienten eliminiert werden, Endothel- und Epithelzellen jedoch verschont bleiben [Velardi *et al.* 2002, Davies *et al.* 2002, Farag *et al.* 2002]. Es findet also keine erhöhte *graft-versus-host* Reaktion (Reaktionen des Transplantats gegen den Empfänger) statt, was auf Unterschiede in der Erkennung von hämatopoietischen bzw. epithelialen Zellen durch NK-Zellen hinweist [Velardi *et al.* 2002]. Die breite Variation der Lyse der verschiedenen Zielzellen durch die beiden T-Zellpopulationen bei den verschiedenen Spendern könnte auch darauf hinweisen, dass die vorhergegangenen Infektionen der Spender eine Rolle spielen. Intrazelluläre Pathogene, die die HLA-Klasse-I-Expression allelspezifisch reduzieren, könnten zur Selektion bestimmter KIR-exprimierender Effektorzellen führen, die im

Gedächtnis-Zustand in der Peripherie überleben. Entsprechende Stimulationen, wie IL-2, könnten diese Zellen reaktivieren. Gab es keine Generierung solcher T-Zellpopulationen in der Vorgeschichte des Spenders könnte dies erklären, warum bei manchen Spendern nur eine niedrige NK-ähnliche Aktivität der T-Zellen gegen HLA-Klasse-I-negative Zielzellen induziert werden konnte. Die große Ähnlichkeit zwischen NK- und NK-ähnlichen T-Zellen in Aktivierung und Regulation wirft die Frage auf, ob diese Zellen möglicherweise miteinander verwandt sind. Gemeinsame CD34⁺ Vorläuferzellen (hämatopoietische Stammzellen) für NK- und T-Zellen wurden bereits beschrieben [Rodewald *et al.* 1992, Lanier *et al.* 1992, Sanchez *et al.* 1993, Sanchez *et al.* 1994], doch es gibt noch keine direkte Verbindung zwischen der Entwicklung zu NK- oder T-Zelle und der Expression inhibitorischer Rezeptoren.

2. Expressionsmuster und Funktionalität bekannter inhibitorischer und aktivierender Rezeptoren auf NK-ähnlichen T-Zellen

Für die phänotypische Charakterisierung der T-, NK- und unseparierten Zellen der fünf Spender an Tag drei, sieben und 14 wurden parallel zu den zytotoxischen Versuchen auch durchflußzytometrische Analysen verschiedener Rezeptoren vorgenommen. CD3-, CD4- und $\alpha\beta$ ⁺TZR-Antikörper dienten in erster Linie der Überprüfung der Sauberkeit der T- und NK-Zellpopulationen und der Komposition der unseparierten Populationen. Aktivierungsmarker wie die IL-2-Rezeptor- α -Kette CD25, CD69 und CD45RO werden nur nach Induktion exprimiert und zeigen den funktionellen Status der Zellen an. NK-ähnliche T-Zellen wiesen vor allem an Tag drei und sieben bei allen Spendern diese Marker auf und können vor allem wegen der CD45RO-Expression als Gedächtnis-Zellen bezeichnet werden. Wie erwartet, setzten sich die NK-Populationen aus einem Gemisch unterschiedlicher KIR-exprimierender Zellen zusammen. Für einige NK-Zellen wurde die gleichzeitige Expression von mehr als einem inhibierenden Rezeptortyp bereits beschrieben [Moretta *et al.* 2002], wodurch deren Zytotoxizität durch die jeweiligen HLA-Allele unabhängig voneinander inhibiert werden kann. Auch die NK-Populationen der fünf Spender beinhalteten NK-Zellen mit mehreren IR. Im Gegensatz dazu wurde keiner

der bekannten inhibitorischen Rezeptoren CD94/NKG2A, KIR2DL1, KIR2DL2,3 oder KIR3DL1 von NK-ähnlichen T-Zellen exprimiert. Da jedoch eine funktionelle Abschaltung der Zytotoxizität über HLA-Cw3, -Cw6 und -Cw7 beobachtet wurde, mussten dieser Inhibition andere unbekannte Rezeptoren zu Grunde liegen. Der inhibierende Rezeptor LAIR-1 wurde zeitweise von beiden T-Zellpopulationen exprimiert. Dies wurde bereits für spezifische zytotoxische T-Zellen beschrieben [Meyaard *et al.* 1997, Meyaard 1999]. Eine inhibierende Wirkung konnte nicht nachgewiesen werden, da die Liganden für LAIR-1 bisher nicht bekannt sind. Die aktivierenden Rezeptoren 2B4, DNAM-1 und NKG2D wurden zwar von CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen exprimiert, es konnte aber in der redirigierten Lyse keine Zytotoxizität allein über diese Rezeptoren induziert werden. Ebenso war es nicht möglich über 2B4, NKG2D und DNAM-1 auf CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen eine kostimulatorische Aktivität in Kombination mit CD3-vermittelten Signalen zu induzieren oder zu erhöhen. Daher ist nicht anzunehmen, dass diese Rezeptoren als Korezeptoren des TZR fungieren, wie dies für NKG2D bei MHC-restringierten Zellen beschrieben wurde [Bauer *et al.* 1999, Gilfillan *et al.* 2002].

Interessanterweise konnte die Expression von 2B4 und NKG2D auf CD4⁺ NK-ähnlichen T-Zellen durch Kokultivierung mit autologen NK-Zellen induziert werden. Dies deutet darauf hin, dass direkter Kontakt mit NK-Zellen möglicherweise für unbekannte Signale an T-Zellen sorgt, welche die Expression aktivierender Rezeptoren stimulieren.

Die Tatsache, dass über 2B4, NKG2D und DNAM-1, keine Zytotoxizität bei NK-ähnlichen T-Zellen induziert werden konnte, stimmt mit neuen Forschungsergebnissen überein, nach welchen die NKG2D-vermittelte Zytotoxizität von CD8⁺ CTL stark von initialen TZR-Signalen abhängt [Verneris *et al.* 2004]. Die Kombination von TZR- und Zytokin-Rezeptor-Signalwegen erklärt möglicherweise die beobachteten Unterschiede und impliziert, dass für die Verbindung des Rezeptors zu der nachfolgenden Signalkaskade mehr als ein isoliertes Zytokin-vermitteltes Signal nötig ist.

Interessanterweise konnte ich keine CD56⁺ NK-ähnlichen T-Zellen nachweisen, obwohl dieser Aktivierungsmarker von CD8⁺ CTL-Subpopulationen und T-Zellklonen exprimiert wird. In einigen experimentellen Systemen wird CD56 als Aktivierungsmarker für T-Zellen diskutiert [Pittet *et al.* 2000]. Da die von mir untersuchten NK-ähnlichen T-Zellen eindeutig einen aktivierten Phänotyp aufwiesen,

kann die CD56-Expression in isolierten T-Zellen offensichtlich nicht alleine durch Zytokine induziert werden. Dagegen gab es bei jedem Spender Subpopulationen von NK-ähnlichen T-Zellen, die den IR ILT2 (LIR-1) exprimierten, der sonst nur auf manchen NK-Zellen und T-Zellsubpopulationen detektiert wird [Colonna *et al.* 1997]. Dieser ILT2⁺CD56⁻ Phänotyp könnte zur phänotypischen Charakterisierung NK-ähnlicher T-Zellen dienen. Da ILT2 jedoch nur initial exprimiert wird, die NK-ähnliche Aktivität aber über einen längeren Zeitraum erhalten bleibt, muss von der Existenz weiterer Rezeptoren ausgegangen werden.

Zusätzlich zu isolierten T-Zellen wurden unseparierte PBMC, die mit IL-2/Lektin stimuliert wurden, auf mRNA-Expression der vier großen Rezeptorfamilien (KIRS, KIRL, C-Typ-Lektin-Rezeptoren, Rezeptoren der Natürlichen-Zytotoxizitäts-Familie) getestet. Die PBMC von den zwei Spendern zeigten mRNA-Expression für verschiedene Rezeptoren, die vermutlich auf die NK-Zellpopulation in dem Gemisch zurückzuführen war, da die Expression dieser Rezeptoren auf NK-Zellen bekannt ist. Ein ähnliches Repertoire wurde auch bei PBL (einer Mischung mehrerer Spender) als positive Kontrolle für mRNA-Expression verschiedener Rezeptoren getestet. Die NK-Linien NKL und YT dienten als Beispiel für NK-Zellen und Jurkat und Molt4 als Beispiel für T-Zelllinien. Auffallend war die mRNA-Expression von KIR3DL1 in YT- und NKL-Zellen. Es stellte sich jedoch bei den durchflusszytometrischen Analysen heraus, dass KIR3DL1 in diesen Zellen nicht auf der Oberfläche exprimiert wurde. Dieser KIR gelangt vermutlich aufgrund einer allelspezifischen Mutation nicht an die Zelloberfläche [Gardiner *et al.* 2001, Pando *et al.* 2003]. Aus dem mRNA-Expressionsmuster können also keine Rückschlüsse auf die tatsächliche Rezeptor-Expression gezogen werden. Es ist somit für die Aussagen über phänotypische Eigenschaften der Zellen nicht ausreichend. Für KIR2DL/S1, KIR2DL/S2 und KIR2DS4 waren bei diesen Zelllinien die Oberflächenanalysen und mRNA-Daten negativ. Der CD94/NKG2A-Komplex wurde von NKL-Zellen und der NK-Fraktion als Subpopulation der PBL sowohl auf mRNA-Ebene produziert als auch in der Oberflächenfärbung nachgewiesen.

Im Zuge der mRNA-Analysen konnte ich für die NCR-Rezeptoren sowie für die Adaptermoleküle DAP10 und DAP12 verkürzte Transkripte nachweisen. Es stellte sich heraus, dass vor allem NKL-Zellen verschiedene bisher unveröffentlichte Spleißvarianten der Rezeptoren NKp46, NKp30, NKp80 und dem Adaptermolekül

DAP12 exprimierten. Die funktionelle Bedeutung dieser verkürzten Rezeptoren ist allerdings noch nicht bekannt.

3. Stimulation der NK-ähnlichen T-Zellen durch IL-2 oder IL-15 in niedriger Dosis und in Abwesenheit von Lektin.

Nach dem lange bekannten Protokoll der LAK-Zell-Generierung wurden gemischte PBMC mit einer hohen Dosis an IL-2 (1000 U/ml) und Lektin stimuliert [Rosenberg 1986]. Diese nicht-physiologischen Bedingungen wurden auch in meinen Experimenten genutzt um bei separierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nicht-MHC-restringierte Aktivität zu induzieren. In weiteren Versuchen wurde die IL-2 Konzentration reduziert, andere Zytokine getestet und ohne Lektin gearbeitet, um die Induktion NK-ähnlicher T-Zellen unter physiologischeren Bedingungen auszutesten. Zytokine wie IFN- α und IFN- γ stellten sich als ungeeignete Stimulatoren heraus, da die Zellen unter diesen Bedingungen so schlecht proliferierten, dass die Versuche teilweise nicht vollständig durchgeführt werden konnten. Bei den verschiedenen Stimulationen mit unterschiedlichen IL-2-Konzentrationen stellte sich heraus, dass 500 U/ml IL-2 zur Aktivierung der T-Zellen ausreichend waren. Eine weitere interessante Beobachtung bestand darin, dass die zytotoxischen Eigenschaften der T-Zellen ohne Lektin erhöht wurden. Offensichtlich war ein isoliertes Zytokinrezeptor-Signal nicht nur ausreichend, sondern sogar besser als eine Fülle verschiedener Signale. Ein weiteres Zytokin, das auf seine Fähigkeit NK-ähnliche Aktivität in T-Zellen zu induzieren getestet wurde, war IL-15. Es stellte sich heraus, dass dieses Zytokin zumeist ebenso gut wie IL-2 eine NK-ähnliche Aktivität bei T-Zellen induzieren konnte und die Zellen gut genug proliferieren ließ um die Experimente durchzuführen. Zytokine wie IL-2 und IL-15, die an Rezeptorkomplexe binden, welche die IL-2/IL-15 β -Kette (CD122) und die γ -Kette (CD132) gemeinsam haben, spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Gedächtnis-T-Zellen und der Lymphozyten-Homeostase [Ku *et al.* 2000, Goldrath *et al.* 2002, Schluns *et al.* 2003, Schluns *et al.* 2004] [Liu *et al.* 2002]. Beide Zytokine können die Differenzierung naiver T-Zellen stimulieren und einen Gedächtnis-T-Zell-Phänotyp unabhängig von Antigen-Kontakten induzieren. IL-2 und IL-15 haben aber vermutlich laut Literatur auch gegensätzliche Funktionen [Waldmann *et al.* 2001]. So wird IL-2

für einen effektiven Aktivierungs-induzierten-Zelltod (activation-induced cell death, AICD) benötigt. Dagegen ist IL-15 in die Rettung aus AICD-Prozessen involviert. Frühere Studien, die Kombinationen von Zytokinen verwendeten, zeigten, dass Antigen-unabhängige Stimulation CD69⁺ aktivierte T-Zellen ohne TZR-Beteiligung induzieren konnte [Kanegane *et al.* 1996].

Tatsächlich konnten in den Stimulationsversuchen Signale über die IL-2/IL-15 β - und γ -Kette (CD122/CD132) in den hoch-aufgereinigten CD45RO⁺ Gedächtnis-Phänotyp-T-Zellen nicht-MHC-restringierte Aktivität induzieren, die gegen HLA-Klasse-I-negative Zielzellen gerichtet war. Diese TZR-unabhängige Aktivierung durch Zytokin-Rezeptoren ist also nicht auf IL-2 beschränkt und stellt somit einen neuen funktionellen Status in T-Zellen dar, der zu NK-ähnlicher Zytotoxizität führt. Die zytotoxische Eigenschaft scheint ein Mechanismus in T-Zellen zu sein, der sich unabhängig vom Kontakt mit anderen Zellen des Immunsystems entwickelt.

Allgemein wurde beobachtet, dass die Kombination von Zytokinen mit anderen, Rezeptor-vermittelten Signalen (Lektin), die zytotoxische Aktivität zwar deutlich reduzierte, die Proliferation der Zellen aber stark förderte. Zusätzlich veränderte sich die bevorzugte Lyse bestimmter HLA-Klasse-I-negativer Zielzellen, wie K562, Daudi und L721.221, wenn CD4⁺ oder CD8⁺ NK-ähnliche T-Zellen neben IL-2 oder IL-15 zusätzlich mit Lektin stimuliert wurden. Diese drei Zielzellen variieren im Bezug auf die Expression von Liganden für aktivierende Rezeptoren, wie zum Beispiel CD48, ULBP1-3 und MICA/B sowie die Adhäsionsmoleküle LFA-3 und ICAM-1 stark voneinander (eigene Beobachtungen). Möglicherweise differieren sie auch in der Expression anderer Oberflächenmoleküle, wodurch die variable Sensitivität bezüglich der Lysierbarkeit durch unterschiedlich stimulierte NK-ähnliche T-Zellen, erklärt werden könnte.

4. Perforin-Expression CD8⁺ NK-ähnlicher T-Zellen

Die Zytotoxizität humaner Lymphozyten wird über zwei Hauptmechanismen ausgeübt, die sich bzgl. der Effektormoleküle unterscheiden, aber letztlich in den Kaspase-abhängigen Apoptoseweg münden. Bei der klassischen TZR-abhängigen Zytotoxizität dominiert die von dem Todesrezeptor CD95 (Fas) vermittelte Apoptose [Scaffidi *et al.* 1999]. Als Folge des TZR-Signals wird in CTL die *de novo* Expression des CD95-Liganden (CD95L, FasL) auf mRNA-Ebene induziert, woraufhin durch die Bindung des CD95L an CD95 (Fas) auf der Zielzelle die Kaspasekaskade ausgelöst und der apoptotische Vorgang eingeleitet wird. Bei NK-Zellen dagegen scheint die CD95-vermittelte Apoptose eine untergeordnete Rolle zu spielen, da diese Killerzellen mit Perforin und Granzym A und B beladene Vesikel im Zytoplasma besitzen [Catalfamo *et al.* 2003]. Durch die Bindung an eine Zielzelle werden diese Vesikel in Richtung Kontaktstelle polarisiert und es erfolgt eine Rezeptor-vermittelte Degranulation der Vesikel. Perforin ermöglicht die Endozytose der Effektormoleküle in die Zielzelle, in der unter anderem die DNS degradiert wird [Kagi *et al.* 1994, Catalfamo *et al.* 2003]. Perforin wird als zentrale Komponente der NK-Zytotoxizität betrachtet. Deshalb habe ich bei NK-ähnlichen T-Zellen die Perforinexpression durch intrazelluläre Färbungen sowie die CD95L-Expression auf mRNA-Ebene untersucht. Während eine CD95L Expression in beiden NK-ähnlichen T-Zellpopulationen induziert werden konnte, schien dieser Mechanismus für die NK-ähnliche Zytotoxizität nicht essentiell zu sein, da CD95-negative Zielzellen ebenso effizient lysiert wurden, wie ihre CD95-positiven Varianten (Daten wurden nicht dargestellt). Die Stimulation über IL-2 oder IL-15 in Abwesenheit von TZR-abhängigen Signalen war ausreichend, um die intrazelluläre Perforin-Expression in CD8⁺ aber nicht CD4⁺ NK-ähnlichen T-Zellen zu erhöhen. Die Perforin-Konzentrationen der CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen nach Stimulation mit IL-2 in Abwesenheit von Lektin korrelierten mit der Stärke an Zytotoxizität. Es kann also davon ausgegangen werden, dass isolierte Signale über die gemeinsame β - und γ -Kette des IL-2/IL-15-Rezeptor-Komplexes in der Lage waren, Perforin-vermittelte NK-ähnliche Aktivität in peripheren T-Zellen zu induzieren.

5. Zytokinsekretion der NK-ähnlichen T-Zellen

Zusätzlich zu ihrer Zytotoxizität zeigt sich, dass NK-ähnliche T-Zellen ein breites Spektrum an Zytokinen, wie zum Beispiel IL-2, -5, -13, IFN- γ und TNF- α sowie das Chemokin MIP-1 β sezernieren können. In Korrelation zur Zytotoxizität sezernierten die NK-ähnlichen T-Zellen in Anwesenheit von IL-2 und Lektin während der ersten Tage in Kultur die größte Menge an Zytokinen. Wie schon bei den Zytotoxizitätsversuchen beobachtet, konnte die Zytokinsekretion nicht allein über die aktivierenden Rezeptoren, wie zum Beispiel NKG2D und 2B4, induziert werden. So scheinen neben Signalen über den IL-2/IL-15-Rezeptorkomplex weitere Signale über andere Rezeptoren, wie den TZR, nötig zu sein. Im Gegensatz dazu reichte die Zytokinstimulation der NK-ähnlichen T-Zellen alleine aus, um Zytotoxizität zu induzieren. Da diese Studien immer mit polyklonalen T-Zell-Populationen durchgeführt wurden, konnte die Zytokinproduktion nicht eindeutig dem TH1- oder TH2-spezifischen Muster zugeordnet werden. Trotzdem kann festgestellt werden, dass sich das Zytokinspektrum der NK-ähnlichen T-Zellen von dem der MHC-restringierten CTL nach TZR-Stimulation substantiell unterscheidet. Klassische CTL sezernierten nämlich zusätzlich hohe Mengen an IL-4, -10 und GM-CSF (Ergebnisse nicht gezeigt). Dieser interessante Befund der Diskrepanz zwischen Zytokinproduktion und zytotoxischer Aktivität könnte darauf zurückzuführen sein, dass für die Sezernierung von Zytokinen eine transkriptionelle Regulation an den jeweiligen Zytokinpromotern erfolgen muss. Für die Promotoraktivierung eines Zytokins müssen eine Reihe von Transkriptionsfaktoren induziert bzw. aktiviert werden, wofür in der Regel eine Kombination mehrerer Signaltransduktionswege erforderlich ist [Arendt *et al.* 2002]. Dagegen muss für die Aktivierung der Effektormoleküle (z.B. Granzym A und B, Perforin) lediglich ein transkriptionsabhängiges Signal an die in der Zelle bereits vorliegenden Vesikel vermittelt werden, welches zur Degranulation und Freisetzung der Proteine führt [Catalfamo *et al.* 2003]. Dafür scheint das IL-2/IL-15-Rezeptor-vermittelte Signal offensichtlich auszureichen.

Somit könnten NK-ähnliche T-Zellen neben ihrer Zytotoxizität auch eine potentielle Rolle bei der Immunregulation spielen.

6. NK-ähnliche T-Zellen und ihre Bedeutung für die Tumortherapie

Viele Studien zur Aktivierung von Lymphozyten wurden mit dem Ziel unternommen, potente Effektorzellen gegen Tumoren für therapeutische Anwendungen zu generieren. So wurden beispielsweise CIK Zellen durch eine Mischung aus exogenem IL-2, -7, oder -12 [Zoll *et al.* 1998, Zoll *et al.* 2000], oder einer Kombination von IL-2, IFN- γ und CD3-spezifischen Antikörpern [Schmidt-Wolf *et al.* 1997, Verneris *et al.* 2002] hergestellt. Nach der TZR-abhängigen, aber Antigen-unabhängigen Stimulation, zeigten diese Zellen eine zytotoxische Aktivität gegen Tumoren *in vitro* und in einem SCID-Maus-Lymphom-Model [Schmidt-Wolf *et al.* 1991]. Zudem zeigten extensive klinische Studien mit IL-2-aktivierten LAK-Zellen, die sich hauptsächlich aus T-Zellen zusammensetzten, gelegentlich hohe, aber variable und vor allem unvorhersehbare klinische Antworten [Ghosh *et al.* 1989, Atkins *et al.* 1999, Fisher *et al.* 2000]. Ein klinischer Gewinn durch den adoptiven Transfer von LAK-Zellen für Krebs-Patienten wurde durch die mangelnde Regression der Tumore und die hohe Zytotoxizität von IL-2 limitiert, das den Patienten systemisch zur Erhaltung der LAK-Aktivität gegeben werden musste. Diese Zytotoxizität und das mangelnde Verständnis der Mechanismen, mit Hilfe derer LAK-Zellen das Wachstum mancher Tumoren inhibieren konnten, führte zu einem Wechsel der therapeutischen Strategien und zu einem vermehrten Einsatz Antigen-spezifischer CTL in der adoptiven Immuntherapie. Eine Konsequenz dieser CTL-basierten Therapien war das selektive Auswachsen von Tumorzellen mit niedriger oder veränderter HLA-Klasse-I-Expression, die dadurch nicht länger durch spezifische MHC-restringierte T-Zellen lysiert werden konnten [Ikeda *et al.* 1997, Coulie *et al.* 1999, Seliger *et al.* 2002]. Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, dass nicht-MHC-restringierte Aktivität NK-ähnlicher T-Zellen ein Werkzeug für zukünftige Therapie-Ansätze darstellen könnte, um Tumorzellen zu bekämpfen, die der Immunüberwachung durch CTL über die Herabregulation der HLA-Klasse-I-Expression entkommen. Solche Tumorzellen, möglicherweise auch besonders Leukämiezellen, sollten durch NK-ähnliche T-Zellen lysiert werden können. Eine komplementäre Immuntherapie, die NK-ähnliche T-Zellen und CTL konzentriert einsetzt, könnte die Selektion von Tumor-Varianten verhindern, die der Immunüberwachung durch den einen oder den anderen Zell-Typ entkommen.

F. Zusammenfassung

Unser Immunsystem setzt sich aus einer Vielzahl von Effektorzellen zusammen, von welchen jede ihre eigene Rolle bei der Infektions- und Tumorabwehr spielt. Zwei wichtige Komponenten des Immunsystems sind die angeborene und die erworbene (adaptive) Immunität. Angeborene Immunität wird als solche bezeichnet, weil so genannte „unspezifische“ Effektorzellen, die in jedem Individuum bereits bei Geburt vorhanden sind, *ad hoc* auf einen Angriff auf das Immunsystem reagieren. Die erworbene Immunität zeichnet sich dagegen durch eine verzögerte Reaktion aus, weil hierfür zunächst spezialisierte Immunzellen aktiviert werden müssen, die spezifisch Virus-infizierte oder entartete Zellen erkennen und gegebenenfalls eliminieren.

Die humanen Leukozyten-Antigen (HLA)-Moleküle spielen für die Effektorzellen beider Systeme eine entscheidende Rolle. Für die Effektorzellen der adaptiven Immunität, die spezifischen T-Lymphozyten, präsentieren sie Antigene in Form von HLA/Peptidkomplexen, die anzeigen, ob eine Zelle Virus-infiziert oder entartet ist. Die Erkennung dieser HLA-Klasse-I/Peptid-Komplexe durch den T-Zellrezeptor (TZR) führt zur Aktivierung spezifischer, zytotoxischer $\alpha\beta^+$ T-Zellen (CTL). Im Gegensatz dazu werden Natürliche Killer (NK)-Zellen, die zum angeborenen Immunsystem gezählt werden, Antigen-unabhängig durch HLA-Klasse-I-Moleküle inhibiert. Zeigen also beispielsweise Tumorzellen eine verminderte HLA-Klasse-I-Oberflächenexpression, können sie der Erkennung und Eliminierung durch CTL entkommen, während NK-Zellen genau gegensätzlich reagieren: Da sie nicht länger durch HLA-Klasse-I-Moleküle inhibiert werden, ist der Weg für ihre Aktivierung und damit Eliminierung der Tumorzellen frei. NK-Zellen werden dabei über eine präzise Balance zwischen aktivierenden Signalen und inhibierenden Signalen reguliert, die durch aktivierende (AR) und inhibitorische (IR) Rezeptoren vermittelt werden.

In meiner Arbeit konnte ich im Detail nachweisen, dass $\alpha\beta^+$ T-Zellen nach einer TZR- und Antigen-unabhängigen Stimulation allein über Immunmediatoren (Zytokine) NK-ähnliche Eigenschaften zeigen. Diese zytokinstimulierten T-Zellen habe ich bezüglich ihrer Funktionalität und ihrer phänotypischen Eigenschaften charakterisiert. Hierbei wurde erstmals für gereinigte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen eine derartige NK-ähnliche Aktivität nachgewiesen. Folgende Erkenntnisse ergaben sich aus meinen Untersuchungen mit fünf gesunden Spendern, deren periphere T-Zellen mit

verschiedenen Zytokinen stimuliert und zu drei verschiedenen Zeitpunkten bezüglich Funktion, Phänotyp und Zytokinproduktion analysiert wurden.

- 1) Die nicht-MHC-restringierte NK-ähnliche Aktivität bei T-Zellen wurde als Zytotoxizität gegen HLA-Klasse-I-negative Zielzellen definiert. Sie ließ sich ausschließlich auf CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnliche T-Zellen zurückführen, da es sich um 98-100% reine T-Zellpopulationen mit einem Gedächtnis-T-Zellphänotyp handelte. Die nicht-MHC-restringierte Zytotoxizität wurde durch Interleukin (IL)-2 allein sowie in Anwesenheit von Lektin induziert, wobei die lytische Aktivität bereits drei Tage nach Stimulation auftrat. Die großen Variationen in der Stärke und Kinetik der NK-ähnlichen T-Zell-Zytotoxizität verschiedener Spender resultieren aus der Tatsache, dass es sich hierbei um einen speziellen funktionellen Status und/oder die Zusammensetzung der T-Zellpopulationen handelt.
- 2) Die nicht-MHC-restringierte Aktivität der NK-ähnlichen T-Zellen wurde durch die Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen auf der Zielzelle inhibiert. Neben den individuellen Effekten verschiedener HLA-A- und -B-Moleküle erwiesen sich HLA-C- und HLA-E-Moleküle als universelle Inhibitoren für CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnliche T-Zellen aller Spender und scheinen daher eine Sonderstellung in der Regulation dieser Zellen einzunehmen.
- 3) Trotz der spezifisch HLA-Klasse-I-vermittelten Inhibition, konnte weder auf CD4⁺ noch auf CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen einer der bekannten inhibitorischen Rezeptoren (IR) nachgewiesen werden. Offensichtlich werden CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnliche T-Zellen von bisher noch unbekanntem IR reguliert. Dagegen wurden die aktivierenden Rezeptoren (AR) 2B4, DNAM-1 und NKG2D auf CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen detektiert. Überraschenderweise konnte über diese AR keine NK-ähnliche Aktivität induziert werden. Der TZR/CD3-Komplex war als einziger Rezeptor auf den CD4⁺ und CD8⁺ NK-ähnlichen T-Zellen funktionell, spielte jedoch in der nicht-MHC-restringierten Aktivität der T-Zellen gegen HLA-Klasse-I-negative Zielzellen keine Rolle.
- 4) Da Lektin die T-Zellen über die Vernetzung mehrerer Rezeptoren unspezifisch stimuliert, wurde die Wirkung von IL-2 und IL-15, deren Rezeptoren die β - und die γ -Kette gemeinsam haben, isoliert untersucht. Während hohe Dosen IL-2 allein besser als IL-15 in der Lage waren eine NK-ähnliche Aktivität zu

induzieren, war Lektin ausschließlich für die Zellproliferation essentiell und erwies sich für die Zytotoxizität der NK-ähnlichen T-Zellen sogar als hinderlich.

- 5) Perforin erwies sich als einer der Effektormechanismen CD8⁺ NK-ähnlicher T-Zellen, dessen Expression mit der zytotoxischen Aktivität korrelierte. CD4⁺ NK-ähnliche T-Zellen exprimieren dagegen kein Perforin, weshalb die Induktion des Liganden für den Apoptoserezeptor CD95 (CD95L/FAS-L) möglicherweise für deren lytische Aktivität verantwortlich ist.
- 6) Neben den zytotoxischen Eigenschaften wiesen NK-ähnliche T-Zellen die Fähigkeit auf, ein breites Repertoire an Zytokinen zu sezernieren. Die Zytokinsekretion konnte zwar nicht über die AR 2B4, DNAM-1 oder NKG2D induziert werden, der direkte Kontakt mit HLA-Klasse-I-negativen Zielzellen resultierte jedoch in einer quantitativen Steigerung und Veränderung des Zytokinmusters.

Mit diesen Parametern (Induktion und Inhibition der Zytotoxizität, Phänotyp, Proliferation und Zytokinsekretion) wurden nicht-MHC-restringierte T-Zellen ausgiebig charakterisiert. Darüber hinaus konnte ich in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Grenzen zwischen angeborener und erworbener Immunität nicht statisch sind. So können T-Zellen NK-ähnliche Eigenschaften übernehmen, wenn sie unabhängig von ihrem TZR mit Zytokinen stimuliert werden. Diese Ergebnisse sind vor allem im Zusammenhang mit dem Zytokinanstieg nach Knochenmarktransplantationen und für das Verständnis der Tumorabwehr von Bedeutung.

G. REFERENZEN

Alcami,A and Koszinowski,UH. (2000)

Viral mechanisms of immune evasion.

Immunol. Today 21(9):447-455.

Algarra,I, Garcia-Lora,A, Cabrera,T, Ruiz-Cabello,F, and Garrido,F. (2004)

The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape.

Cancer Immunol. Immunother.

Andre,P, Biassoni,R, Colonna,M, Cosman,D, Lanier,LL, Long,EO, Lopez-Botet,M, Moretta,A, Moretta,L, Parham,P, Trowsdale,J, Vivier,E, Wagtmann,N, and Wilson,MJ. (2001)

New nomenclature for MHC receptors.

Nat. Immunol. 2(8):661-

Arendt,CW, Albrecht,B, Soos,TJ, and Littman,DR. (2002)

Protein kinase C-theta:: signaling from the center of the T-cell synapse.

Curr. Opin. Immunol. 14(3):323-330.

Atkins,MB, Lotze,MT, Dutcher,JP, Fisher,RI, Weiss,G, Margolin,K, Abrams,J, Sznol,M, Parkinson,D, Hawkins,M, Paradise,C, Kunkel,L, and Rosenberg,SA. (1999)

High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993.

J. Clin. Oncol. 17(7):2105-2116.

Augugliaro,R, Parolini,S, Castriconi,R, Marcenaro,E, Cantoni,C, Nanni,M, Moretta,L, Moretta,A, and Bottino,C. (2003)

Selective cross-talk among natural cytotoxicity receptors in human natural killer cells.

Eur. J. Immunol. 33(5):1235-1241.

Bauer,S, Groh,V, Wu,J, Steinle,A, Phillips,JH, Lanier,LL, and Spies,T. (1999)

Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA.

Science 285(5428):727-729.

Biassoni,R, Falco,M, Cambiaggi,A, Costa,P, Verdiani,S, Pende,D, Conte,R, di Donato,C, Parham,P, and Moretta,L. (1995)

Amino acid substitutions can influence the natural killer (NK)-mediated recognition of HLA-C molecules. Role of serine-77 and lysine-80 in the target cell protection from lysis mediated by "group 2" or "group 1" NK clones.

J. Exp. Med. 182(2):605-609.

Billadeau,DD, Upshaw,JL, Schoon,RA, Dick,CJ, and Leibson,PJ. (2003)
NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway.
Nat. Immunol. 4(6):557-564.

Blery,M, Olcese,L, and Vivier,E. (2000)
Early signaling via inhibitory and activating NK receptors.
Hum. Immunol. 61(1):51-64.

Boles,KS, Stepp,SE, Bennett,M, Kumar,V, and Mathew,PA. (2001)
2B4 (CD244) and CS1: novel members of the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily molecules expressed on natural killer cells and other leukocytes.
Immunol. Rev. 181:234-249.

Braud,VM, Allan,DS, O'Callaghan,CA, Soderstrom,K, D'Andrea,A, Ogg,GS, Lazetic,S, Young,NT, Bell,JI, Phillips,JH, Lanier,LL, and McMichael,AJ. (1998)
HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C.
Nature 391(6669):795-799.

Carosella,ED, Moreau,P, Aractingi,S, and Rouas-Freiss,N. (2001)
HLA-G: a shield against inflammatory aggression.
Trends Immunol. 22(10):553-555.

Catalfamo,M and Henkart,PA. (2003)
Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway.
Curr. Opin. Immunol. 15(5):522-527.

Ceman,S, Rudersdorf,R, Long,EO, and Demars,R. (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):754-761.

Cerwenka,A and Lanier,LL. (2003)
NKG2D ligands: unconventional MHC class I-like molecules exploited by viruses and cancer.
Tissue Antigens 61(5):335-343.

Cicccone,E, Pende,D, Viale,O, Than,A, Di,DC, Orengo,AM, Biassoni,R, Verdiani,S, Amoroso,A, Moretta,A, and . (1992)
Involvement of HLA class I alleles in natural killer (NK) cell-specific functions: expression of HLA-Cw3 confers selective protection from lysis by alloreactive NK clones displaying a defined specificity (specificity 2).
J. Exp. Med. 176(4):963-971.

Colonna,M, Moretta,A, Vely,F, and Vivier,E. (2000)

A high-resolution view of NK-cell receptors: structure and function.
Immunol. Today 21(9):428-431.

Colonna,M, Navarro,F, Bellon,T, Llano,M, Garcia,P, Samaridis,J, Angman,L, Cella,M, and Lopez-Botet,M. (1997)

A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells.
J. Exp. Med. 186(11):1809-1818.

Colucci,F, Caligiuri,MA, and Di Santo,JP. (2003)

What does it take to make a natural killer?
Nat. Rev. Immunol. 3(5):413-425.

Coulie,PG, Ikeda,H, Baurain,JF, and Chiari,R. (1999)

Antitumor immunity at work in a melanoma patient.
Adv. Cancer Res. 76:213-242.

Davies,SM, Ruggieri,L, DeFor,T, Wagner,JE, Weisdorf,DJ, Miller,JS, Velardi,A, and Blazar,BR. (2002)

Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor.
Blood 100(10):3825-3827.

Dunlop,MB, Doherty,PC, Zinkernagel,RM, and Blanden,RV. (1977)

Cytotoxic T cell response to lymphocytic choriomeningitis virus. Properties of precursors of effector T cells, primary effector T cells and memory T cells in vitro and in vivo.
Immunology 33(3):361-368.

Falk,CS, Mach,M, Schendel,DJ, Weiss,EH, Hilgert,I, and Hahn,G. (2002a)

NK cell activity during human cytomegalovirus infection is dominated by US2-11-mediated HLA class I down-regulation.
J. Immunol. 169(6):3257-3266.

Falk,CS, Noessner,E, Weiss,EH, and Schendel,DJ. (2002b)

Retaliation against tumor cells showing aberrant HLA expression using lymphokine activated killer-derived T cells.
Cancer Res. 62(2):480-487.

Falk,CS, Nossner,E, Frankenberger,B, and Schendel,DJ. (2000)

Non-MHC-restricted CD4+ T lymphocytes are regulated by HLA-Cw7-mediated inhibition.
Hum. Immunol. 61(12):1219-1232.

Falk,CS and Schendel,DJ. (2002c)

Allogeneic MHC class I ligands and their role in positive and negative regulation of human cytotoxic effector cells.

Hum. Immunol. 63(1):8-19.

Falk,CS, Steinle,A, and Schendel,DJ. (1995)

Expression of HLA-C molecules confers target cell resistance to some non-major histocompatibility complex-restricted T cells in a manner analogous to allospecific natural killer cells.

J. Exp. Med. 182(4):1005-1018.

Fanger,NA, Cosman,D, Peterson,L, Braddy,SC, Maliszewski,CR, and Borges,L. (1998)

The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor-mediated signaling in monocytes.

Eur. J. Immunol. 28(11):3423-3434.

Farag,SS, Fehniger,TA, Ruggeri,L, Velardi,A, and Caligiuri,MA. (2002)

Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect.

Blood 100(6):1935-1947.

Ferrini,S, Cambiaggi,A, Meazza,R, Sforzini,S, Marciano,S, Mingari,MC, and Moretta,L. (1994)

T cell clones expressing the natural killer cell-related p58 receptor molecule display heterogeneity in phenotypic properties and p58 function.

Eur. J. Immunol. 24(10):2294-2298.

Fisher,RI, Rosenberg,SA, and Fyfe,G. (2000)

Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma.

Cancer J. Sci. Am. 6 Suppl 1S55-S57.

Gardiner,CM, Guethlein,LA, Shilling,HG, Pando,M, Carr,WH, Rajalingam,R, Vilches,C, and Parham,P. (2001)

Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism.

J. Immunol. 166(5):2992-3001.

Gati,A, Da Rocha,S, Guerra,N, Escudier,B, Moretta,A, Chouaib,S, Angevin,E, and Caignard,A. (2004)

Analysis of the natural killer mediated immune response in metastatic renal cell carcinoma patients.

Int. J. Cancer 109(3):393-401.

Germain,RN. (1986)

Immunology. The ins and outs of antigen processing and presentation.
Nature 322(6081):687-689.

Ghosh,AK, Dazzi,H, Thatcher,N, and Moore,M. (1989)

Lack of correlation between peripheral blood lymphokine-activated killer (LAK) cell function and clinical response in patients with advanced malignant melanoma receiving recombinant interleukin 2.
Int. J. Cancer 43(3):410-414.

Gilfillan,S, Ho,EL, Cella,M, Yokoyama,WM, and Colonna,M. (2002)

NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation.
Nat. Immunol. 3(12):1150-1155.

Giri,JG, Ahdieh,M, Eisenman,J, Shanebeck,K, Grabstein,K, Kumaki,S, Namen,A, Park,LS, Cosman,D, and Anderson,D. (1994)

Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15.
EMBO J. 13(12):2822-2830.

Godfrey,DI, MacDonald,HR, Kronenberg,M, Smyth,MJ, and Van,KL. (2004)

NKT cells: what's in a name?
Nat. Rev. Immunol. 4(3):231-237.

Goldrath,AW, Sivakumar,PV, Glaccum,M, Kennedy,MK, Bevan,MJ, Benoist,C, Mathis,D, and Butz,EA. (2002)

Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells.
J. Exp. Med. 195(12):1515-1522.

Grabstein,KH, Eisenman,J, Shanebeck,K, Rauch,C, Srinivasan,S, Fung,V, Beers,C, Richardson,J, Schoenborn,MA, Ahdieh,M, and . (1994)

Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor.
Science 264(5161):965-968.

Grimm,EA, Mazumder,A, Zhang,HZ, and Rosenberg,SA. (1982)

Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes.
J. Exp. Med. 155(6):1823-1841.

Guerra,N, Michel,F, Gati,A, Gaudin,C, Mishal,Z, Escudier,B, Acuto,O, Chouaib,S, and Caignard,A. (2002)

Engagement of the inhibitory receptor CD158a interrupts TCR signaling, preventing dynamic membrane reorganization in CTL/tumor cell interaction.
Blood 100(8):2874-2881.

Gumperz,JE, Barber,LD, Valiante,NM, Percival,L, Phillips,JH, Lanier,LL, and Parham,P. (1997)

Conserved and variable residues within the Bw4 motif of HLA-B make separable contributions to recognition by the NKB1 killer cell-inhibitory receptor.
J. Immunol. 158(11):5237-5241.

Hayday,A and Tigelaar,R. (2003)

Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells.
Nat. Rev. Immunol. 3(3):233-242.

Hofmeister,V and Weiss,EH. (2003)

HLA-G modulates immune responses by diverse receptor interactions.
Semin. Cancer Biol. 13(5):317-323.

Houlihan,JM, Biro,PA, Harper,HM, Jenkinson,HJ, and Holmes,CH. (1995)

The human amnion is a site of MHC class Ib expression: evidence for the expression of HLA-E and HLA-G.
J. Immunol. 154(11):5665-5674.

Ikeda,H, Lethe,B, Lehmann,F, van,BN, Baurain,JF, de,SC, Chambost,H, Vitale,M, Moretta,A, Boon,T, and Coulie,PG. (1997)

Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor.
Immunity. 6(2):199-208.

Janeway,CA, Jr. and Travers,P. (2004)

Immunobiology V. V

Kagi,D, Ledermann,B, Burki,K, Seiler,P, Odermatt,B, Olsen,KJ, Podack,ER, Zinkernagel,RM, and Hengartner,H. (1994)

Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice.
Nature 369(6475):31-37.

Kanegane,H and Tosato,G. (1996)

Activation of naive and memory T cells by interleukin-15.
Blood 88(1):230-235.

Karlhofer,FM, Ribaldo,RK, and Yokoyama,WM. (1992)

MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells.
Nature 358(6381):66-70.

Krmpotic,A, Busch,DH, Bubic,I, Gebhardt,F, Hengel,H, Hasan,M, Scalzo,AA, Koszinowski,UH, and Jonjic,S. (2002)

MCMV glycoprotein gp40 confers virus resistance to CD8+ T cells and NK cells in vivo.
Nat. Immunol. 3(6):529-535.

Ku,CC, Murakami,M, Sakamoto,A, Kappler,J, and Marrack,P. (2000)

Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines.
Science 288(5466):675-678.

Lanier,LL. (2003)

Natural killer cell receptor signaling.
Curr. Opin. Immunol. 15(3):308-314.

Lanier,LL. (1998)

NK cell receptors.
Annu. Rev. Immunol. 16:359-393.

Lanier,LL, Spits,H, and Phillips,JH. (1992)

The developmental relationship between NK cells and T cells.
Immunol. Today 13(10):392-395.

Lazetic,S, Chang,C, Houchins,JP, Lanier,LL, and Phillips,JH. (1996)

Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits.
J. Immunol. 157(11):4741-4745.

Le,BP and Blaschitz,A. (1999)

The functionality of HLA-G is emerging.
Immunol. Rev. 167:233-244.

Linn,YC and Hui,KM. (2003)

Cytokine-induced killer cells: NK-like T cells with cytotoxic specificity against leukemia.
Leuk. Lymphoma 44(9):1457-1462.

Liu,K, Catalfamo,M, Li,Y, Henkart,PA, and Weng,NP. (2002)

IL-15 mimics T cell receptor crosslinking in the induction of cellular proliferation, gene expression, and cytotoxicity in CD8+ memory T cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 99(9):6192-6197.

Ljunggren,HG and Karre,K. (1990)

In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition.
Immunol. Today 11(7):237-244.

Long,EO. (1999)

Regulation of immune responses through inhibitory receptors.
Annu. Rev. Immunol. 17:875-904.

Lopez-Botet,M, Llano,M, Navarro,F, and Bellon,T. (2000)

NK cell recognition of non-classical HLA class I molecules.
Semin. Immunol. 12(2):109-119.

Lopez-Botet,M, Navarro,F, and Llano,M. (1999)

How do NK cells sense the expression of HLA-G class Ib molecules?
Semin. Cancer Biol. 9(1):19-26.

Meyaard,L. (1999)

LAIR-1, a widely distributed human ITIM-bearing receptor on hematopoietic cells.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 244:151-157.

Meyaard,L, Adema,GJ, Chang,C, Woollatt,E, Sutherland,GR, Lanier,LL, and Phillips,JH. (1997)

LAIR-1, a novel inhibitory receptor expressed on human mononuclear leukocytes.
Immunity. 7(2):283-290.

Mingari,MC, Moretta,A, and Moretta,L. (1998a)

Regulation of KIR expression in human T cells: a safety mechanism that may impair protective T-cell responses.
Immunol. Today 19(4):153-157.

Mingari,MC, Ponte,M, Bertone,S, Schiavetti,F, Vitale,C, Bellomo,R, Moretta,A, and Moretta,L. (1998b)

HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin 15-induced expression of CD94/NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD8+ T cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 95(3):1172-1177.

Mingari,MC, Ponte,M, Vitale,C, Bellomo,R, and Moretta,L. (2000)

Expression of HLA class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: a regulated mechanism that controls T-cell activation and function.
Hum. Immunol. 61(1):44-50.

Mingari,MC, Ponte,M, Vitale,C, Schiavetti,F, Bertone,S, and Moretta,L. (1997b)
Inhibitory receptors for HLA class I molecules on cytolytic T lymphocytes. Functional relevance and implications for anti-tumor immune responses.
Int. J. Clin. Lab Res. 27(2):87-94.

Mingari,MC, Ponte,M, Vitale,C, Schiavetti,F, Bertone,S, and Moretta,L. (1997a)
Expression of HLA class I-specific inhibitory receptors by chronically activated cytolytic T lymphocytes: useful or harmful to the host?
Melanoma Res. 7 Suppl 2S89-S93.

Mingari,MC, Schiavetti,F, Ponte,M, Vitale,C, Maggi,E, Romagnani,S, Demarest,J, Pantaleo,G, Fauci,AS, and Moretta,L. (1996)
Human CD8+ T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 93(22):12433-12438.

Mingari,MC, Vitale,C, Cambiaggi,A, Schiavetti,F, Melioli,G, Ferrini,S, and Poggi,A. (1995)
Cytolytic T lymphocytes displaying natural killer (NK)-like activity: expression of NK-related functional receptors for HLA class I molecules (p58 and CD94) and inhibitory effect on the TCR-mediated target cell lysis or lymphokine production.
Int. Immunol. 7(4):697-703.

Moretta,A. (2002)
Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues.
Nat. Rev. Immunol. 2(12):957-964.

Moretta,A, Biassoni,R, Bottino,C, Mingari,MC, and Moretta,L. (2000a)
Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity.
Immunol. Today 21(5):228-234.

Moretta,A, Bottino,C, Mingari,MC, Biassoni,R, and Moretta,L. (2002)
What is a natural killer cell?
Nat. Immunol. 3(1):6-8.

Moretta,A, Bottino,C, Vitale,M, Pende,D, Biassoni,R, Mingari,MC, and Moretta,L. (1996a)
Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells.
Annu. Rev. Immunol. 14:619-648.

Moretta,A, Bottino,C, Vitale,M, Pende,D, Cantoni,C, Mingari,MC, Biassoni,R, and Moretta,L. (2001)
Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity.
Annu. Rev. Immunol. 19:197-223.

Moretta,L, Biassoni,R, Bottino,C, Mingari,MC, and Moretta,A. (2000b)
Human NK-cell receptors.
Immunol. Today 21(9):420-422.

Moretta,L, Mingari,MC, Pende,D, Bottino,C, Biassoni,R, and Moretta,A. (1996b)
The molecular basis of natural killer (NK) cell recognition and function.
J. Clin. Immunol. 16(5):243-253.

Morris,MA and Ley,K. (2004)
Trafficking of natural killer cells.
Curr. Mol. Med. 4(4):431-438.

Nakajima,H, Samaridis,J, Angman,L, and Colonna,M. (1999)
Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor gamma-chain.
J. Immunol. 162(1):5-8.

Natali,PG, Nicotra,MR, Bigotti,A, Venturo,I, Marcenaro,L, Giacomini,P, and Russo,C. (1989)
Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 86(17):6719-6723.

Natarajan,K, Dimasi,N, Wang,J, Mariuzza,RA, and Margulies,DH. (2002)
Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination.
Annu. Rev. Immunol. 20:853-885.

Navarro,F, Llano,M, Bellon,T, Colonna,M, Geraghty,DE, and Lopez-Botet,M. (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):277-283.

Nossner,E, Falk,CS, Jantzer,P, Reinhardt,C, Steinle,A, and Schendel,DJ. (1996)
The HLA likes and dislikes of allospecific and non-MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes.
Immunol. Rev. 154:105-135.

Pando,MJ, Gardiner,CM, Gleimer,M, McQueen,KL, and Parham,P. (2003)
The protein made from a common allele of KIR3DL1 (3DL1*004) is poorly expressed at cell surfaces due to substitution at positions 86 in Ig domain 0 and 182 in Ig domain 1.
J. Immunol. 171(12):6640-6649.

Pantel,K, Schlimok,G, Kutter,D, Schaller,G, Genz,T, Wiebecke,B, Backmann,R, Funke,I, and Riethmuller,G. (1991)

Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells.

Cancer Res. 51(17):4712-4715.

Parham,P. (2003)

Immunogenetics of killer-cell immunoglobulin-like receptors.

Tissue Antigens 62(3):194-200.

Parham,P and Ohta,T. (1996)

Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules.

Science 272(5258):67-74.

Pende,D, Accame,L, Pareti,L, Mazzocchi,A, Moretta,A, Parmiani,G, and Moretta,L. (1998)

The susceptibility to natural killer cell-mediated lysis of HLA class I-positive melanomas reflects the expression of insufficient amounts of different HLA class I alleles.

Eur. J. Immunol. 28(8):2384-2394.

Pittet,MJ, Speiser,DE, Valmori,D, Cerottini,JC, and Romero,P. (2000)

Cutting edge: cytolytic effector function in human circulating CD8+ T cells closely correlates with CD56 surface expression.

J. Immunol. 164(3):1148-1152.

Rammensee,HG. (1995)

Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules.

Curr. Opin. Immunol. 7(1):85-96.

Raulet,DH. (2003)

Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands.

Nat. Rev. Immunol. 3(10):781-790.

Ravetch,JV and Lanier,LL. (2000)

Immune inhibitory receptors.

Science 290(5489):84-89.

Rodewald,HR, Moingeon,P, Lucich,JL, Dosiou,C, Lopez,P, and Reinherz,EL. (1992)

A population of early fetal thymocytes expressing Fc gamma RII/III contains precursors of T lymphocytes and natural killer cells.

Cell 69(1):139-150.

Romero,X, Benitez,D, March,S, Vilella,R, Miralpeix,M, and Engel,P. (2004)
Differential expression of SAP and EAT-2-binding leukocyte cell-surface molecules CD84, CD150 (SLAM), CD229 (Ly9) and CD244 (2B4).
Tissue Antigens 64(2):132-144.

Rosenberg,SA. (1986)
Adoptive immunotherapy of cancer using lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin-2.
Important Adv. Oncol. 55-91.

Ryan,JC, Naper,C, Hayashi,S, and Daws,MR. (2001)
Physiologic functions of activating natural killer (NK) complex-encoded receptors on NK cells.
Immunol. Rev. 181:126-137.

Sallusto,F, Geginat,J, and Lanzavecchia,A. (2004)
Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance.
Annu. Rev. Immunol. 22:745-763.

Sanchez,MJ, Muench,MO, Roncarolo,MG, Lanier,LL, and Phillips,JH. (1994)
Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus.
J. Exp. Med. 180(2):569-576.

Sanchez,MJ, Spits,H, Lanier,LL, and Phillips,JH. (1993)
Human natural killer cell committed thymocytes and their relation to the T cell lineage.
J. Exp. Med. 178(6):1857-1866.

Saulquin,X, Gastinel,LN, and Vivier,E. (2003)
Crystal structure of the human natural killer cell activating receptor KIR2DS2 (CD158j).
J. Exp. Med. 197(7):933-938.

Scaffidi,C, Kirchhoff,S, Krammer,PH, and Peter,ME. (1999)
Apoptosis signaling in lymphocytes.
Curr. Opin. Immunol. 11(3):277-285.

Schendel,DJ, Falk,CS, Nossner,E, Maget,B, Kressenstein,S, Urlinger,S, Tampe,R, and Gansbacher,B. (2000)
Gene transfer of human interferon gamma complementary DNA into a renal cell carcinoma line enhances MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition but suppresses non-MHC-restricted effector cell activity.
Gene Ther. 7(11):950-959.

Schluns,KS and Lefrancois,L. (2003)

Cytokine control of memory T-cell development and survival.
Nat. Rev. Immunol. 3(4):269-279.

Schluns,KS, Nowak,EC, Cabrera-Hernandez,A, Puddington,L, Lefrancois,L, and Aguila,HL. (2004)

Distinct cell types control lymphoid subset development by means of IL-15 and IL-15 receptor {alpha} expression.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A

Schmidt-Wolf,GD, Negrin,RS, and Schmidt-Wolf,IG. (1997)

Activated T cells and cytokine-induced CD3+CD56+ killer cells.
Ann. Hematol. 74(2):51-56.

Schmidt-Wolf,IG, Lefterova,P, Mehta,BA, Fernandez,LP, Huhn,D, Blume,KG, Weissman,IL, and Negrin,RS. (1993)

Phenotypic characterization and identification of effector cells involved in tumor cell recognition of cytokine-induced killer cells.
Exp. Hematol. 21(13):1673-1679.

Schmidt-Wolf,IG, Negrin,RS, Kiem,HP, Blume,KG, and Weissman,IL. (1991)

Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity.
J. Exp. Med. 174(1):139-149.

Seliger,B, Cabrera,T, Garrido,F, and Ferrone,S. (2002)

HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells.
Semin. Cancer Biol. 12(1):3-13.

Shibuya,A, Campbell,D, Hannum,C, Yssel,H, Franz-Bacon,K, McClanahan,T, Kitamura,T, Nicholl,J, Sutherland,GR, Lanier,LL, and Phillips,JH. (1996)

DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes.
Immunity. 4(6):573-581.

Shiroishi,M, Tsumoto,K, Amano,K, Shirakihara,Y, Colonna,M, Braud,VM, Allan,DS, Makadzange,A, Rowland-Jones,S, Willcox,B, Jones,EY, van der Merwe,PA, Kumagai,I, and Maenaka,K. (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):8856-8861.

Snyder,MR, Muegge,LO, Offord,C, O'Fallon,WM, Bajzer,Z, Weyand,CM, and Goronzy,JJ. (2002)

Formation of the killer Ig-like receptor repertoire on CD4+CD28null T cells.
J. Immunol. 168(8):3839-3846.

Trowsdale,J, Barten,R, Haude,A, Stewart,CA, Beck,S, and Wilson,MJ. (2001)

The genomic context of natural killer receptor extended gene families.
Immunol. Rev. 18120-38.

Uhrberg,M, Valiante,NM, Shum,BP, Shilling,HG, Lienert-Weidenbach,K, Corliss,B, Tyan,D, Lanier,LL, and Parham,P. (1997)

Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes.
Immunity. 7(6):753-763.

Ulbrecht,M, Maier,S, Hofmeister,V, Falk,CS, Brooks,AG, McMaster,MT, and Weiss,EH. (2004)

Truncated HLA-G isoforms are retained in the endoplasmic reticulum and insufficiently provide HLA-E ligands.
Hum. Immunol. 65(3):200-208.

Valiante,NM, Uhrberg,M, Shilling,HG, Lienert-Weidenbach,K, Arnett,KL, D'Andrea,A, Phillips,JH, Lanier,LL, and Parham,P. (1997)

Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors.
Immunity. 7(6):739-751.

Veillette,A. (2004)

SLAM Family Receptors Regulate Immunity with and without SAP-related Adaptors.
J. Exp. Med. 199(9):1175-1178.

Veillette,A and Latour,S. (2003)

The SLAM family of immune-cell receptors.
Curr. Opin. Immunol. 15(3):277-285.

Velardi,A, Ruggeri,L, Alessandro, Moretta, and Moretta,L. (2002)

NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation.
Trends Immunol. 23(9):438-444.

Verneris,MR, Baker,J, Edinger,M, and Negrin,RS. (2002)

Studies of ex vivo activated and expanded CD8+ NK-T cells in humans and mice.
J. Clin. Immunol. 22(3):131-136.

Verneris,MR, Karami,M, Baker,J, Jayaswal,A, and Negrin,RS. (2004)

Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8+ T cells.
Blood 103(8):3065-3072.

- Vitale,M, Bottino,C, Sivori,S, Sanseverino,L, Castriconi,R, Marcenaro,E, Augugliaro,R, Moretta,L, and Moretta,A.** (1998)
NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis.
J. Exp. Med. 187(12):2065-2072.
- Vivier,E and Anfossi,N.** (2004)
Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future.
Nat. Rev. Immunol. 4(3):190-198.
- Vivier,E, Tomasello,E, and Paul,P.** (2002)
Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition?
Curr. Opin. Immunol. 14(3):306-311.
- Waldmann,TA, Dubois,S, and Tagaya,Y.** (2001)
Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy.
Immunity. 14(2):105-110.
- Watzl,C, Peterson,M, and Long,EO.** (2000)
Homogenous expression of killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) on polyclonal natural killer cells detected by a monoclonal antibody to KIR2D.
Tissue Antigens 56(3):240-247.
- Wiendl,H, Behrens,L, Maier,S, Johnson,MA, Weiss,EH, and Hohlfeld,R.** (2000)
Muscle fibers in inflammatory myopathies and cultured myoblasts express the nonclassical major histocompatibility antigen HLA-G.
Ann. Neurol. 48(4):679-684.
- Wiendl,H, Mitsdoerffer,M, Hofmeister,V, Wischhusen,J, Bornemann,A, Meyermann,R, Weiss,EH, Melms,A, and Weller,M.** (2002)
A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape.
J. Immunol. 168(9):4772-4780.
- Wiendl,H, Mitsdoerffer,M, Hofmeister,V, Wischhusen,J, Weiss,EH, Dichgans,J, Lochmuller,H, Hohlfeld,R, Melms,A, and Weller,M.** (2003)
The non-classical MHC molecule HLA-G protects human muscle cells from immune-mediated lysis: implications for myoblast transplantation and gene therapy.
Brain 126(Pt 1):176-185.

Winter,CC, Gumperz,JE, Parham,P, Long,EO, and Wagtmann,N. (1998)
Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition.
J. Immunol. 161(2):571-577.

Yelavarthi,KK, Fishback,JL, and Hunt,JS. (1991)
Analysis of HLA-G mRNA in human placental and extraplacental membrane cells by in situ hybridization.
J. Immunol. 146(8):2847-2854.

Young,NT, Canavez,F, Uhrberg,M, Shum,BP, and Parham,P. (2001)
Conserved organization of the ILT/LIR gene family within the polymorphic human leukocyte receptor complex.
Immunogenetics 53(4):270-278.

Zoll,B, Lefterova,P, Csipai,M, Finke,S, Trojaneck,B, Ebert,O, Micka,B, Roigk,K, Fehlinger,M, Schmidt-Wolf,GD, Huhn,D, and Schmidt-Wolf,IG. (1998)
Generation of cytokine-induced killer cells using exogenous interleukin-2, -7 or -12.
Cancer Immunol. Immunother. 47(4):221-226.

Zoll,B, Lefterova,P, Ebert,O, Huhn,D, Von Ruecker,A, and Schmidt-Wolf,IG. (2000)
Modulation of cell surface markers on NK-like T lymphocytes by using IL-2, IL-7 or IL-12 in vitro stimulation.
Cytokine 12(9):1385-1390.

Zompi,S, Hamerman,JA, Ogasawara,K, Schweighoffer,E, Tybulewicz,VL, Di Santo,JP, Lanier,LL, and Colucci,F. (2003)
NKG2D triggers cytotoxicity in mouse NK cells lacking DAP12 or Syk family kinases.
Nat. Immunol. 4(6):565-572.

H. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dolores Schendel an deren Institut ich diese Arbeit anfertigen durfte. Trotz ihres vollen Terminkalenders hatte sie immer gerne Zeit für Fragen und Diskussionen, das sehr zu der Qualität dieser drei Jahre und meiner Doktorarbeit beigetragen hat.

Bei Frau Prof. Weiß und Herrn Prof. Cremer möchte ich mich für die spontane und unkomplizierte Betreuung der Arbeit von Seiten der Universität bedanken, die sicher nicht selbstverständlich ist. Zusätzlich bedanke ich mich bei Frau Prof. Weiß für die zur Verfügung gestellten K562-Transfektanten.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Betreuerin Christine Falk bedanken. Ich hatte das Glück ihre erste Doktorandin zu sein und wurde dementsprechend verwöhnt. Ich denke ihr unglaubliches, unermüdliches Engagement für meine Arbeit und meine Person waren außergewöhnlich und dies ist nicht oft in der „Wissenschaftlerwelt“ zu finden. Nicht viele Doktoranden können behaupten sich während der Promotion nie wirklich Sorgen gemacht haben zu müssen, da Chris die Fähigkeit hat überall etwas positives „Herauszukitzeln“ und mit so großer Leidenschaft in der Wissenschaft steht, dass man selbst in frustrierenden Phasen einfach mitgerissen werden muss. Eine weitere Bereicherung für meine Ausbildung war die hervorragende Einweisung in die Geheimnisse der Zellkultur und sonstige Laborarbeiten durch Barbara Mosetter, bei der ich mich für ihre Engelsgeduld auch nach der hundertsten gleichen Nachfrage und ihre Hilfsbereitschaft in jeder Situation (auch mal beim Auto abschleppen) bedanken möchte. Mit Chris und Babs hatte ich die drei Jahre mehr als nur gute Kolleginnen.

Zu meiner Gruppe gehören seit kurzem Julia Schleypen, Dominik ter Meer und seit noch kürzerem Florian Weigand. Bei Julia und Dominik möchte ich mich für ihre Korrekturarbeiten und ihrer Unterstützung in der „heißen“ Phase des Zusammenschreibens bedanken. Besonders Julia, die ich nun schon über Studienzeiten, Diplomarbeit und Doktorarbeit an meiner Seite habe, ist für mich als Kollegin und vor allem als Freundin unersetzlich geworden. Unermüdlich stand sie mir nicht nur bei Computer-Problemen zur Seite. Wenn sich unsere Wege beruflich trennen, wird mir etwas fehlen, vor allem dass nicht alle mich Malu nennen (Danke Julia!).

Eine Reihe weiterer Kolleginnen und Freundinnen machten die drei Jahre zu einer so besonderen Zeit.

Zum einen meine Mädels aus dem Labor für Tumormmunologie, Birte Sievers und Birgit Stadlbauer, lange Zeit waren sie meine Mittagessensgefährten. Zum anderen meine Mädels aus dem Institut für molekulare Immunologie Sibylle Ruhland, Silke Raffegerst, Julia Schleypen, Sybille Regn und Nicole Baur ohne die meine Zeit hier nicht dieselbe gewesen wäre. Für die große Hilfsbereitschaft, nicht nur in allen FACS-Fragen, möchte ich mich besonders bei Josef Mysliwietz bedanken und für die Unterstützung in sämtlichen Fragen bei Sylvia Donhauser. Bei Julika Jasny, Elfriede Nößner, Christiane Geiger, Caroline Lüking, Konrad Kronenberger und Ralph Mocikat bedanke ich mich für ihre Anregungen und Hilfestellungen.

H. DANKSAGUNG

Außerhalb der Arbeit möchte ich mich bei Debbie bedanken, die sich nichts Besseres vorstellen konnte als am Strand von St. Barbara meine Arbeit zu korrigieren. Natürlich waren alle meine Freunde, besonders Heidi, zu jeder Zeit bereit mich vom Arbeitsstress abzulenken und zu unterstützen.

Einen extra Absatz bekommt mein Freund Peter, dem diese drei Jahre als die längsten unserer neun gemeinsamen Jahre vorgekommen sein könnten. Ich danke ihm für das Auffangen und vor allem das Aufmuntern, so dass schlechte Laune meist bereits im Keim erstickt wurde, und die dann doch wieder klein erscheinenden Probleme von mir belächelt werden konnten. Ohne seine Mutter wäre ich übrigens zu besonders stressigen Zeiten sicherlich verhungert, weshalb ich auch Anna Danke sagen möchte.

Zu guter Letzt möchte ich mich natürlich bei meiner Familie bedanken. Ohne die finanzielle und geistige Unterstützung meiner Eltern über den gesamten Ausbildungszeitraum hinweg und natürlich weit darüber hinaus, wären weder Studium noch Promotion so unkompliziert verlaufen. Widmen möchte ich diese Arbeit meiner Mutter, meinem Vater und meiner Schwester, weil es auf der ganzen Welt keine anderen Menschen gibt, die so stolz auf mich sind.

I. ANHANG

Tabelle I1.1: Übersicht über die inhibitorischen Rezeptoren

Bezeichnung	Familie	Genlocus	Extrazelluläre Domänen	Signal-Motif	Liganden	Expression
CD158a (KIR2DL1; p58.1)	Ig-SF	LRC ; Chr.19q13.4	2 Ig	2 x ITIM	Cw2,4,5,6	NK, T
CD158b (KIR2DL2,3p58.2)	Ig-SF	LRC	2 Ig	2 x ITIM	Cw1,3,7,8,12	NK, T
CD158e1 (KIR3DL1; p70)	Ig-SF	LRC	3 Ig	2 x ITIM	Bw4	NK, T
CD158k (KIR3DL2; p140)*	Ig-SF	LRC	3 Ig	2 x ITIM	A3, A11	NK, T
CD158d (KIR2DL4)*	Ig-SF	LRC	2 Ig	2 x ITIM	HLA-G ?	NK, T
CD158f (KIR2DL5)*	Ig-SF	LRC	2 Ig	2 x ITIM	?	NK, T
CD85j (ILT2 ; LIR-1)	ILT	LRC	4 Ig	2 x ITIM	A, B, G ?	NK, T, B-Zellen
LAIR-1	Ig-SF	LRC	3 Ig	2x ITIM	?	NK, T
CD94/NKG2A	LR	NKC; Chr.12p13.1		2 x ITIM NKG2A	HLA-E + Signalpeptid	NK, T

* keine monoklonalen Antikörper vorhanden

Ig-SF Immunglobulin-Superfamilie

LR C-Typ-Lektin-Rezeptor

ILT Ig-ähnliche Transkripte

NK NK-Zellen

T T-Zellen

LRC *Leukocyte Receptor Complex*

NKC *Natural Killer cell Complex*

ITIM *Immunoreceptor Tyrosin based Inhibition Motif*

I. ANHANG

Tabelle I1.2: Übersicht über die aktivierenden Rezeptoren

Bezeichnung	Familie	Genlocus	Extrazelluläre Domäne	Signal-Motif	Liganden	Expression
CD158h (2DS1; p50.1)	Ig-SF	LRC	2 Ig	DAP12	Cw2,4,5,6	NK; T
CD158j (2DS2; p50.2)	Ig-SF	LRC	2 Ig	DAP12	Cw1,3,7,8,1 2	NK; T
CD158e2 (3DS1)	Ig-SF	LRC	3 Ig	DAP12	Bw4	NK; T
CD158i (2DS4; p50.3)	Ig-SF	LRC	2 Ig	?	?	NK; T
CD94/NKG2C	LR	NKC		DAP12	HLA-E + Signalpeptid	NK; T
NKG2D	LR	NKC		DAP10	MICA/B, ULBP1-3	NK; T
CD161 (NKRP-1A)	LR	NKC		CD3 ζ	?	NK; T
2B4	CD2	Chr. 1p13	2 Ig	SAP	CD48	NK; T
NKp30	NCR	MHC Chr.6	1 Ig	CD3 ζ	?	NK
NKp44	NCR	MHC Chr.6	1 Ig	DAP12	?	NK
NKp46	NCR	LRC	2 Ig	CD3 ζ	?	NK
NKp80 (KLFR1)*	NCR	NKC	C-Typ-Lektin		?	NK; T

* keine monoklonalen Antikörper vorhanden

NCR *Natural Cytotoxicity Receptor*

I. ANHANG

Tabelle I1.3: Phänotypische Charakterisierung des Spenders RP

Tag	CD4			CD8			NK			Uns.		
	3	7	14	3	7	14	3	7	14	3	7	14
Antikörper												
CD3	100	100	100	100	100	100	3	27	39	68	69	74
TCR $\alpha\beta$	100	100	97	100	100	99	2	92	30	100	77	90
CD4	100	99	99	3	1	0	1	18	0	35	18	6
CD56/CD3	0	0	0	0	1	26		3	9	7	15	28
CD56/CD3 ⁻	0	0	0	0	0	0	+	56	56	12	19	26
KIR2DL1	0	0	0	1	0	0	21	7	3	5	3	3
2DL2,3/CD3/2B4/CD56	0	0	0	3	1	1	28	15	8	0	1	5
2DL2,3/CD3/2B4/CD56 ⁻								3	4	1	5	8
KIR3DL1	0	0	0	1	0	0	7	4	1	1	1	1
KIR2DS4	2	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
2B4/CD3								73	61	25	26	25
2B4/CD3 ⁻	8	3	5	+	13	45	96	25	37	24	70	68
CD161/CD3	10	3	5	24	3	4	0	7	17	21	32	32
CD161/CD3 ⁻							92	62	55	17	6	12
CD25	93	+	7	86	85	2	5	7	1	+	24	5
CD69	85	16	21	92	36	72	91	76	82	62	+	63
CD25/CD69	73	11	4	83	25	2	4	3	1	19	20	2
CD122	4	0	1	3	1	1	2	0	+	2	0	0
CD45RO	100	100	99	100	99	100	3	40	65	60	100	97
CD94/NKG2A	2	1	0	8	2	1	40	48	55	17	39	37
CD94/NKG2A ⁻	0	0	0	6	1	0	55	16	11	6	17	12
ILT-2	4	4	1	5	2	1	2	7	2	7	3	10
LAIR-1/CD3	+	90	95	+	96	100	99	23	40	+	70	72
LAIR-1/CD3 ⁻								74	60		30	24
NKG2D ^o	10	4	5	96	96	98	89	98	87	13	73	95
DNAM-1	87	92	75	88	90	90	86	72	62	13	62	78
MOPC21	8	0	2	20	1	3	7	0	1	6	0	3

Tab. I1.3: Zusammenfassung der Rezeptorexpression des Spenders RP. CD4⁺ (CD4) und CD8⁺ (CD8) NK-ähnlichen T-Zellen, NK-Zellen und unseparierte Population (Uns.). Die jeweilige Expression ist in % positiver Zellen angegeben. + bedeutet eine schwach positive Verschiebung n.t. nicht getestet. ° Zum Zeitpunkt der Analysen lagen NKG2D- und DNAM-1-spezifische mAk nur unmarkiert vor, weshalb die Isotypkontrolle MOPC21 mit dargestellt ist.

I. ANHANG

Tabelle I1.4: Phänotypische Charakterisierung des Spenders CF

Tag	CD4			CD8			NK			Uns.		
	3	7	14	3	7	14	3	7	14	3	7	14
Antikörper												
CD3	100	100	100	98	100	100	3	2	1	76	60	76
TCR $\alpha\beta$	99	n.t.	100	100	n.t.	99	5	n.t.	0	73	n.t.	19
CD4	99	93	100	3	0	32	5	0	0	57	10	15
CD56/CD3										4	15	26
CD56/CD3 ⁻	0	0	0	0	0	0	86	95	98	12	14	21
KIR2DL1	0	0	0	n.t.	0	0	n.t.	14	7	0	6	13
2DL2,3/CD3/2B4/CD56	0	0	0	2	0	1	18	16	11	1	5	12
2DL2,3/CD3/2B4/CD56 ⁻										1	6	17
KIR3DL1	0	0	0	n.t.	0	0	n.t.	3	2	0	2	1
KIR2DS4	0	0	0	n.t.	1	0	n.t.	2	0	0	2	1
2B4/CD3										15	36	22
2B4/CD3 ⁻	5	5	0	32	+	90	98	100	100	16	56	74
CD161/CD3	13	0	1	5	1	1	74	90	98	13	25	47
CD161/CD3 ⁻										11	18	16
CD25	4	99	+	8	100	54	38	3	0	10	57	31
CD69	4	50	31	34	+	+	97	100	98	44	100	85
CD25/CD69	1	49	31	7	29	48	39	3	0	8	54	25
CD122	4	1	0	1	2	1	1	100	100	10	1	1
CD45RO	61	100	100	58	100	100	3	36	60	51	97	100
CD94/NKG2A	0	3	0	2	2	2	81	95	91	15	45	50
CD94/NKG2A ⁻	3	1	1	0	1	1	4	0	1	3	0	1
ILT-2	2	7	1	2	8	7	2	16	0	2	4	0
LAIR-1/CD3	0	0	0	0	1	+	+	100	0	0	+	+
LAIR-1/CD3 ⁻												
NKG2D ^o	17	1	4	96	85	97	93	98	71	60	69	92
DNAM-1	76	44	31	55	72	99	95	51	67	41	73	98
MOPC21	16	1	8	40	1	14	29	1	8	21	1	4

Tab. I1.4: Zusammenfassung der Rezeptorexpression des Spenders CF. CD4⁺ (CD4) und CD8⁺ (CD8) NK-ähnlichen T-Zellen, NK-Zellen und unseparierte Population (Uns.). Die jeweilige Expression ist in % positiver Zellen angegeben. + bedeutet eine schwach positive Verschiebung n.t. nicht getestet. ° Zum Zeitpunkt der Analysen lagen NKG2D- und DNAM-1-spezifische mAk nur unmarkiert vor, weshalb die Isotypkontrolle MOPC21 mit dargestellt ist.

I. ANHANG

Tabelle I1. 5: Phänotypische Charakterisierung des Spenders WG

Tag	CD4			CD8			NK			Uns.		
	3	7	14	3	7	14	3	7	14	3	7	14
Antikörper												
CD3	100	100	74	99	100	100	23	8	4	88	73	80
TCR $\alpha\beta$	100	100	99	99	100	99	11	90	33	1	68	96
CD4	100	100	100	1	5	9	21	3	2	48	26	7
CD56/CD3								1	3	5	15	21
CD56/CD3-		0	0	0	0	0	29	96	93	13	15	18
KIR2DL1	0	10	0	n.t.	2	2	2	3	2	2	0	0
2DL2,3/CD3/2B4/CD56	0	0	0	n.t.	0	0	39	n.t.	6	5	3	3
2DL2,3/CD3/2B4/CD56 ⁻												
KIR3DL1	0	0	0	n.t.	0	0	17	10	0	1	1	3
										2	2	7
KIR2DS4	1	0	0	n.t.	1	1	29	n.t.	2	4	6	4
2B4/CD3								98	97	8	20	20
2B4/CD3 ⁻	10	0	10	7	8	+	100	1	2	35	53	79
CD161/CD3	4	0	2	n.t.	0	1	+	n.t.	92+	10	10	9
CD161/CD3 ⁻										2	7	11
CD25	n.t.	+	+	n.t.	+	8	22	n.t.	1	n.t.	64	7
CD69	+	14	2	+	43	70	57	n.t.	92	47	33	+
CD25/CD69	n.t.	11	1	n.t.	43	7	12	n.t.	0	n.t.	12	0
CD122	n.t.	3	2	n.t.	3	5	2	n.t.	+	n.t.	3	4
CD45RO	100	100	100	100	100	100	7	n.t.	14	67	94	100
CD94/NKG2A	n.t.	0	1	n.t.	1	0	+	94	93	5	17	10
CD94/NKG2A ⁻			0		2	2		5	5	85	1	6
ILT-2	n.t.	4	4	n.t.	3	2	22	n.t.	7	n.t.	10	5
LAIR-1/CD3	0	+	+	0	+	100	0	n.t.	+	1	+	+
LAIR-1/CD3 ⁻										0	65	
NKG2D [°]	9	5	9	60	98	99	26	99	93	48	78	93
DNAM-1	76	85	92	87	n.t.	97	43	97	79	72	96	80
MOPC21	10	5	13	24	4	16	11	8	9	16	10	19

Tab. I1.5: Zusammenfassung der Rezeptorexpression des Spenders WG. CD4⁺ (CD4) und CD8⁺ (CD8) NK-ähnlichen T-Zellen, NK-Zellen und unseparierte Population (Uns.). Die jeweilige Expression ist in % positiver Zellen angegeben. + bedeutet eine schwach positive Verschiebung n.t. nicht getestet. ° Zum Zeitpunkt der Analysen lagen NKG2D- und DNAM-1-spezifische mAk nur unmarkiert vor, weshalb die Isotypkontrolle MOPC21 mit dargestellt ist.

I. ANHANG

Tabelle I1. 6: Phänotypische Charakterisierung des Spenders AM

Tag	CD4			CD8			NK			Uns.		
	3	7	14	3	7	14	3	7	14	3	7	14
Antikörper												
CD3	99	99	100	99	99	100	4	14	37	85	90	98
CD4	99	99	97	0	0	0	n.t.	0	17	37	17	0
TCR $\alpha\beta$	100	99	n.t.	100	96	n.t.	0	17	n.t.	85	90	0
CD56/CD3	0	0	0	0	0	0	8	7	60	41	21	40
CD56/CD3 ⁻	0	0	0	0	0	+	86	88	60	47	8	3
KIR2DL1	1	1	0	2	0	0	n.t.	0	17	2	6	17
2DL2,3/CD3/2B4/CD56	1	1	2	2	1	5	34	11	27	6	19	45
2DL2,3/CD3/2B4/CD56 ⁻								41	33	9	23	2
KIR3DL1	0	0	1	1	0	2	24	10	n.t.	n.t.	5	15
KIR2DS4	3	1	4	16	0	7	n.t.	9	1	3	2	5
2B4/CD3							100	99	58	54	10	3
2B4/CD3 ⁻	18	7	17	0	0	100		1	37	42	84	95
CD161/CD3	3	1	16	10	1	12			9	11	14	15
CD161/CD3 ⁻							62		32	14	2	2
CD25	+	+	+	83	58	6	n.t.	7	10	14	37	9
CD69	94	+	53	84	88	98	85	96	75	52	60	56
CD25/CD69	88	45	30	79	48	6	n.t.	16	10	14	21	7
CD122	+	0	7	+	0	n.t.	0	0	3	3	2	3
CD45RO	90	90	99	80	89	n.t.	n.t.	53	85	49	92	100
CD94/NKG2A	4	1	3	12	2	4	62	90	47	36	20	5
CD94/NKG2A ⁻	0	0	4		0	6	32		51	20	6	13
ILT-2	+	5	15	+	13	+	n.t.	9	60	+	+	+
LAIR-1/CD3	+	88	97	+	96	3	2	13	36	53	90	97
LAIR-1/CD3 ⁻							94	85	46	21	10	3
NKG2D ^o	5	5	19	85	95	99	68	92	99	45	89	93
DNAM-1	86	94	99	63	95	97	n.t.	99	92	60	97	98
MOPC21	2	3	26	1	2	19	2	7	12	2	6	22

Tab. I1.6: Zusammenfassung der Rezeptorexpression des Spenders AM. CD4⁺ (CD4) und CD8⁺ (CD8) NK-ähnlichen T-Zellen, NK-Zellen und unseparierte Population (Uns.). Die jeweilige Expression ist in % positiver Zellen angegeben. + bedeutet eine schwach positive Verschiebung n.t. nicht getestet. ° Zum Zeitpunkt der Analysen lagen NKG2D- und DNAM-1-spezifische mAk nur unmarkiert vor, weshalb die Isotypkontrolle MOPC21 mit dargestellt ist.

I. ANHANG

Tabelle I1.7: Zytokinmuster des Spenders RP

Tag 3			Tag 9			Tag 14			Zytokin
CD4	CD8	NK	CD4	CD8	NK	CD4	CD8	NK	
649	1146	234	182	114	11	155	141	33	IL-2
18	15	9	4	2	13	67	3	16	IL-4
519	519	435	46	14	205	750	93	173	IL-5
216	198	69	7	3	14	12	5	4	IL-6
160	191	46	9	2	4	346	54	14	IL-8
397	174	17	6	<1	2	339	5	5	IL-10
1926	2990	1308	169	20	601	3015	306	367	IL-13
145	1437	1903	45	42	57	173	67	34	IFN- γ
98	182	145	6	5	9	23	9	9	TNF- α
137	812	234	14	20	28	111	28	28	GM-CSF
>4000	>4000	>4000	135	66	975	2011	305	813	MIP-1 β

Tab. I1.7, 1.8 und 1.9: Angegeben wurden die Zytokinmeßwerte mit Zugabe von IL-2 in das Medium, während der Inkubation über 24 Stunden vor der Abnahme der Überstände. < oder > wurde eingesetzt für Grenzwerte, ab denen die Messung außerhalb des linearen Bereichs lag.

■ 50-149 ■ 150-999 ■ 1000-4000 pg/ml

Tabelle I1.8: Zytokinmuster des Spenders CF

Tag 3			Tag 8			Tag 14			Zytokin
CD4	CD8	NK	CD4	CD8	NK	CD4	CD8	NK	
1616	2440	183	4678	4665	2822	809	707	346	IL-2
<8	<8	8	13	<8	40	14	<8	<8	IL-4
<6	9	44	111	120	<6	240	<6	<6	IL-5
<8	12	28	21	<8	179	<8	<8	<8	IL-6
<8	22	18	48	<8	<8	160	<8	<8	IL-8
<16	<16	21	20	<16	<16	61	<16	<16	IL-10
<12	30	92	504	359	128	720	24	14	IL-13
<16	36	312	144	180	156	21	<16	<16	IFN- γ
<32	59	1344	181	79	744	<32	<32	<32	TNF- α
65	100	257	266	270	825	115	70	<32	GM-CSF
61	1055	>1500	>1500	>1500	>1500	317	39	383	MIP-1 β

I. ANHANG

Tabelle I1.9: Zytokinmuster des Spenders WG

Tag 3			Tag 8			Tag 14			Zytokin
CD4	CD8	NK	CD4	CD8	NK	CD4	CD8	NK	
1965	2261	1038	1413	2415	73	522	538	32	IL-2
43	34	<8	23	8	40	<8	<8	<8	IL-4
847	6188	<6	437	837	93	31	94	<6	IL-5
15	11	<8	41	9	165	<8	<8	<8	IL-6
<8	<8	<8	189	18	<8	29	<8	<8	IL-8
481	63	<16	62	<16	<16	<16	<16	<16	IL-10
1417	3883	<12	1985	797	206	133	143	<12	IL-13
81	158	121	76	48	141	<16	<16	<16	IFN- γ
182	386	448	62	36	631	<32	<32	<32	TNF- α
129	205	100	190	203	746	44	70	49	GM-CSF
>1500	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500	46	26	523	MIP-1 β

Lebenslauf

Name	Marion Andrea von Geldern
Geburtsdatum	09.03.1976
Geburtsort	Providencia, Santiago de Chile
Email	mariongeldern@web.de

Ausbildung	
Grundschule	Kerschensteinerschule, Germering 1982-1986
Gymnasium	Carl-Spitzweg-Gymnasium, Germering Leistungskurse Französisch und Biologie Abiturnote: 2,2 1986-1995
Sprachen	Englisch fließend, Spanisch fließend, Französisch Grundkenntnisse
Studium	Ludwig-Maximilians-Universität Hauptfach Humangenetik Nebenfächer Genetik, Mikrobiologie, Immunologie Diplomarbeit: Zwei- und dreidimensionale Analyse von zentromerinstabilen Zellen eines Patienten mit dem ICF- Syndrom (Immundefizienz, Zentromerinstabilität, Faziale Anomalien) anhand der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung Diplomnote: 1,7 1995-2000
Auslandsaufenthalt	National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA Im Labor von Thomas Ried: Molekulare zytogenetische Untersuchungen eines Maus Modells für Kolorektalen Krebs. Januar 2001 bis September 2001

<p>Promotion</p>	<p>GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH</p> <p>Institut für Molekulare Immunologie, Prof. Dr. Schendel</p> <p>Thema: Induktion der nicht-MHC-restringierten T-Zell-Aktivität durch T-Zell-Rezeptor-unabhängige Zytokinstimulation und negative Regulation durch HLA-Klasse-I-Moleküle</p>
<p>Posterpräsentationen</p>	<p>Klinische Forschergruppen-Konferenz Wildbadkreuth, 2002</p> <p>FEBS <i>Summer School on Cancer, Immunology and Immunotherapy</i>, Ionian Village, Griechenland, 2003</p> <p>Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Berlin, 2003</p> <p>FOCIS <i>12th International Congress of Immunology</i>, Montreal, Kanada</p>
<p>Publikationen</p>	<p>Day KC, McCabe MT, Zhao X, Wang Y, Davis JN, Phillips J, Von Geldern M, Ried T, KuKuruga MA, Cunha GR, Hayward SW, Day ML.</p> <p><i>Rescue of embryonic epithelium reveals that the homozygous deletion of the retinoblastoma gene confers growth factor independence and immortality but does not influence epithelial differentiation or tissue morphogenesis.</i></p> <p>J Biol Chem. 2002 Nov 15;277(46):44475-84.</p> <p>Schleypen JS, Von Geldern M, Weiss EH, Kotzias N, Rohrmann K, Schendel DJ, Falk CS, Pohla H.</p> <p><i>Renal cell carcinoma-infiltrating natural killer cells express differential repertoires of activating and inhibitory receptors and are inhibited by specific HLA class I allotypes.</i></p> <p>Int J Cancer. 2003 Oct 10;106(6):905-12</p> <p>Eingereicht: von Geldern M, Weiss EH., Schendel DJ. und Falk CS.</p> <p><i>Non-MHC-restricted T cell activity is induced by TCR-independent cytokine stimulation and negatively regulated by HLA class I.</i></p>