

**Aus der Universitätsklinik für Kinderheilkunde
und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer**

**Untersuchungen zur Funktion von
CD158b⁺ Natürlichen Killerzellen:
Isolierung, Zytotoxizität und Zytokinproduktion**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Stefanie Christiane Röhm
aus Sindelfingen**

2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Handgretinger

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Fierlbeck

DIESE ARBEIT IST MEINER MUTTER UND
MEINER SCHWESTER ANDREA GEWIDMET.

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|--|----------|
| 1 | EINLEITUNG | 3 |
| 1.1 | DAS IMMUNSYSTEM – EINE EINFÜHRUNG | 3 |
| 1.2 | DAS HLA-SYSTEM..... | 3 |
| 1.2.1 | <i>HLA-Klasse-I-Antigene</i> | 3 |
| 1.2.2 | <i>HLA-Klasse-II-Antigene</i> | 3 |
| 1.2.3 | <i>HLA-Restriktion</i> | 3 |
| 1.2.4 | <i>Relevanz des HLA-Systems im klinischen Alltag</i> | 3 |
| 1.3 | CD-OBERFLÄCHENANTIGENE..... | 3 |
| 1.4 | NATÜRLICHE KILLERZELLEN..... | 3 |
| 1.4.1 | <i>NK-Zellrezeptoren</i> | 3 |
| 1.4.2 | <i>Mechanismen der Zytolyse durch NK-Zellen</i> | 3 |
| 1.5 | ZYTOKINE UND IHRE ROLLE IM IMMUNSYSTEM | 3 |
| 1.5.1 | <i>NK-Zellen und Zytokine</i> | 3 |
| 1.6 | UMRISS DER ARBEIT | 3 |
| 2 | METHODEN | 3 |
| 2.1 | ISOLIERUNG VON PERIPHEREN MONONUKLEÄREN ZELLEN..... | 3 |
| 2.1.1 | <i>Immunomagnetische Zellanreicherung</i> | 3 |
| 2.1.2 | <i>Isolierung von CD56⁺/CD3⁻-NK-Zellen und CD56⁺/CD3⁺-T-Zellen</i> . 3 | |
| 2.1.3 | <i>Isolierung von CD158b⁺/CD3⁻/CD158a⁻-NK-Zellen</i> | 3 |
| 2.2 | IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG MIT DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE | 3 |
| 2.2.1 | <i>Durchführung der FACS-Direkt-Färbung</i> | 3 |
| 2.2.2 | <i>Durchführung der FACS-Indirekt-Färbung</i> | 3 |
| 2.3 | ZYTOTOXIZITÄTSTEST..... | 3 |
| 2.3.1 | <i>Vorbereitung der Targetzellen</i> | 3 |
| 2.3.2 | <i>Vorbereitung der Effektorzellen</i> | 3 |
| 2.3.3 | <i>Durchführung des Zytotoxizitätstest</i> | 3 |
| 2.4 | INTRAZELLULÄRE ZYTOKINBESTIMMUNG..... | 3 |
| 2.4.1 | <i>Durchführung</i> | 3 |

| | | |
|----------|---|----------|
| 2.4.2 | <i>Messung und Auswertung</i> | 3 |
| 2.5 | LYMPHOZYTENMISCHKULTUR | 3 |
| 2.5.1 | <i>Durchführung</i> | 3 |
| 2.5.2 | <i>Bestimmung der intrazellulären Zytokinproduktion nach MLC</i> | 3 |
| 2.5.3 | <i>Bestimmung von Interferon-γ im Überstand der MLC</i> | 3 |
| 3 | MATERIAL | 3 |
| 3.1 | ALLGEMEINE GERÄTE UND LABORARTIKEL | 3 |
| 3.2 | ALLGEMEINE REAGENZIEN | 3 |
| 3.3 | HARD- UND SOFTWARE | 3 |
| 3.4 | MIKROSKOPIE | 3 |
| 3.5 | STAMMLÖSUNGEN | 3 |
| 3.6 | SPEZIELLE MATERIALIEN FÜR DIE ISOLIERUNG VON MONONUKLEÄREN ZELLEN ... | 3 |
| 3.7 | SPEZIELLE MATERIALIEN FÜR DIE IMMUNOMAGNETISCHE ZELLANREICHERUNG ... | 3 |
| 3.8 | SPEZIELLE MATERIALIEN FÜR DIE IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG | 3 |
| 3.9 | SPEZIELLE MATERIALIEN FÜR DIE ZYTOTOXIZITÄTSBESTIMMUNG | 3 |
| 3.10 | SPEZIELLE MATERIALIEN FÜR DIE INTRAZELLULÄRE ZYTOKINBESTIMMUNG | 3 |
| 3.10.1 | <i>Herstellung der Stimulatoren</i> | 3 |
| 3.10.2 | <i>Herstellung des Fixators</i> | 3 |
| 3.10.3 | <i>Herstellung des Waschpuffers</i> | 3 |
| 3.10.4 | <i>Herstellung des Permeabilisators</i> | 3 |
| 3.11 | SPEZIELLE MATERIALIEN FÜR DIE MLC | 3 |
| 3.12 | SPEZIELLE MATERIALIEN ZUR IFN- γ -BESTIMMUNG IM ÜBERSTAND DER MLC | 3 |
| 4 | ERGEBNISSE | 3 |
| 4.1 | ISOLIERUNG VON CD158B ⁺ /CD3 ⁻ /CD158A ⁻ -NK-ZELLEN | 3 |
| 4.1.1 | <i>Prinzip</i> | 3 |
| 4.1.2 | <i>Ergebnisse</i> | 3 |
| 4.1.2.1 | PBMNC-Isolierung | 3 |
| 4.1.2.2 | CD3/CD158a-Depletion | 3 |
| 4.1.2.3 | CD158b-Anreicherung (CD158b ⁺ /CD3 ⁻ /CD158a ⁻ -NK-Zellen) | 3 |
| 4.2 | ISOLIERUNG VON CD56 ⁺ /CD3 ⁻ -NK-ZELLEN UND CD56 ⁺ /CD3 ⁺ -T-ZELLEN | 3 |

| | | |
|----------|--|----------|
| 4.2.1 | <i>Prinzip</i> | 3 |
| 4.2.2 | <i>Ergebnisse</i> | 3 |
| 4.2.2.1 | PBMNC-Isolierung | 3 |
| 4.2.2.2 | CD56 ⁺ -Isolierung..... | 3 |
| 4.2.2.3 | Auftrennung in die CD56 ⁺ /CD3 ⁺ - und CD56 ⁺ /CD3 ⁻ -Zellfraktionen | 3 |
| 4.3 | ZYTOTOXIZITÄT DER ANGEREICHERTEN ZELLPOPULATIONEN..... | 3 |
| 4.3.1 | <i>Versuchsaufbau</i> | 3 |
| 4.3.2 | <i>Zytotoxische Aktivität gegen HLA-Cw6-transfizierte Zellen</i> | 3 |
| 4.3.3 | <i>Zytotoxische Aktivität gegen HLA-Cw7-transfizierte Zellen</i> | 3 |
| 4.3.4 | <i>Zytotoxische Aktivität gegen K562</i> | 3 |
| 4.3.5 | <i>Zytotoxische Aktivität gegen LCL 721.221</i> | 3 |
| 4.4 | NACHWEIS VON INTRAZELLULÄRE ZYTOKINPRODUKTION..... | 3 |
| 4.4.1 | <i>Intrazelluläre Zytokinproduktion nach chemischer Stimulation</i> | 3 |
| 4.4.1.1 | Interleukin-2..... | 3 |
| 4.4.1.2 | Interferon- γ | 3 |
| 4.4.1.3 | Tumor-Nekrose-Faktor- α | 3 |
| 4.4.1.4 | Interleukin-5, Interleukin-10 und Interleukin-12..... | 3 |
| 4.4.2 | <i>Intrazelluläre Zytokinproduktion nach Antigenstimulation</i> | 3 |
| 4.4.2.1 | Verlauf der Zellzahlen | 3 |
| 4.4.2.2 | Verlauf der Antigenexpression der MLC..... | 3 |
| 4.4.2.3 | Nachweis von intrazellulärer Zytokinproduktion | 3 |
| 4.4.2.4 | Interferon- γ -Konzentration im Überstand der MLC..... | 3 |
| 5 | DISKUSSION | 3 |
| 5.1 | ALLGEMEINE METHODENKRITIK | 3 |
| 5.1.1 | <i>Immunomagnetische Zellanreicherung</i> | 3 |
| 5.1.2 | <i>Durchflusszytometrie</i> | 3 |
| 5.1.3 | <i>Zytotoxizitätstest</i> | 3 |
| 5.1.4 | <i>Nachweis von intrazellulärer Zytokinproduktion</i> | 3 |
| 5.1.5 | <i>MLC und Nachweis von intrazellulärer Zytokinproduktion</i> | 3 |
| 5.1.6 | <i>Bestimmung von Interferon-γ im Überstand der MLC</i> | 3 |
| 5.2 | ISOLIERUNG VON CD158B ⁺ /CD3 ⁻ /CD158A ⁻ -NK-ZELLEN | 3 |
| 5.2.1 | <i>Spezielle Methodenkritik</i> | 3 |
| 5.2.2 | <i>Beurteilung der Ergebnisse</i> | 3 |

| | | |
|----------|--|----------|
| 5.3 | ISOLIERUNG VON CD56 ⁺ /CD3 ⁻ -NK-ZELLEN UND CD56 ⁺ /CD3 ⁺ -T-ZELLEN..... | 3 |
| 5.3.1 | <i>Beurteilung der Ergebnisse</i> | 3 |
| 5.4 | ZYTOTOXIZITÄT DER ANGEREICHERTEN ZELLPOPULATIONEN..... | 3 |
| 5.4.1 | <i>Spezielle Methodenkritik</i> | 3 |
| 5.4.2 | <i>Beurteilung der Ergebnisse</i> | 3 |
| 5.5 | NACHWEIS VON INTRAZELLULÄRER ZYTOKINPRODUKTION..... | 3 |
| 5.5.1 | <i>Intrazelluläre Zytokinproduktion nach chemischer Stimulation</i> | 3 |
| 5.5.1.1 | Interleukin-2..... | 3 |
| 5.5.1.2 | Interferon- γ | 3 |
| 5.5.1.3 | Tumor-Nekrose-Faktor- α | 3 |
| 5.5.1.4 | Interleukin-5..... | 3 |
| 5.5.1.5 | Interleukin-10..... | 3 |
| 5.5.1.6 | Interleukin-12..... | 3 |
| 5.5.2 | <i>Intrazelluläre Zytokinproduktion nach Antigenstimulation</i> | 3 |
| 5.5.2.1 | Verlauf der Zellzahlen | 3 |
| 5.5.2.2 | Verlauf der Antigenexpression..... | 3 |
| 5.5.2.3 | Intrazelluläre Zytokinproduktion | 3 |
| 5.5.2.4 | Interferon- γ -Konzentration im Überstand..... | 3 |
| 5.5.3 | <i>Beurteilung der Ergebnisse</i> | 3 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG | 3 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS | 3 |
| 8 | ANHANG | 3 |
| 8.1 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 3 |
| 8.2 | TABELLENVERZEICHNIS | 3 |
| 8.3 | ABKÜRZUNGEN | 3 |

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem – eine Einführung

Jeder Organismus wird von Beginn seiner Existenz an mit einer Vielzahl an Mikroorganismen und anderen fremden Substanzen konfrontiert, die potentiell schädliche Wirkung haben und damit die Intaktheit seiner Individualität gefährden können. Aus diesem Grund hat die Natur ein komplexes System an Abwehrmechanismen entwickelt – das Immunsystem. Die Voraussetzung für einen wirksamen Schutz des Individuums vor schädlichen Einflüssen ist die Differenzierung zwischen körpereigenen und körperfremden Zellen, Zellbestandteilen und Substanzen.

Das Immunsystem ist aufgebaut aus zwei verschiedenen, miteinander kooperierenden und in der Funktion eng miteinander verbundenen Anteilen: einer unspezifischen, natürlichen Immunität und einer spezifischen, erworbenen Immunität. Die unspezifische Immunität setzt sich zusammen aus anatomischen Anteilen (physikalisch-chemische Barriere von Haut und Schleimhäuten), physiologischen Anteilen (Körpertemperatur, niedriger Magen-pH, Lysozym, Komplementsystem, Akutphasen-Proteine), dem Phagozytosesystem der Makrophagen, den Natürlichen Killerzellen und zahlreichen Zytokinen. Der spezifische Teil des Immunsystems besteht aus einem humoralen Anteil, den B-Lymphozyten und den von ihnen nach Differenzierung zu Plasmazellen produzierten Antikörpern, und aus einem zellulären Anteil, den T-Lymphozyten. Die zellulären Bestandteile des Immunsystems sind in der Lage, Zytokine als Botenstoffe, Stimulations- und Signalvermittler zu sezernieren.

Der spezifische Anteil des Immunsystems unterscheidet sich vom unspezifischen zum einen durch die Notwendigkeit der HLA-gekoppelten Antigenpräsentation, wofür komplexe Rezeptorsysteme benötigt werden. Das Antigen wird hierbei nach Phagozytose und intrazellulärer Prozessierung durch eine antigen-präsentierende Zelle (APZ) auf der Zelloberfläche der APZ in Kombination mit einem HLA-Molekül exprimiert und von T-Lymphozyten erkannt. Bei entsprechender Größe bzw. in Verbindung mit einem Hapten kann die Antigenerkennung auch direkt durch B-Lymphozyten erfolgen. Die Reaktionswege der spezifischen Immunantwort haben hierdurch eine längere Reaktionszeit als die des unspezifischen Immunsystems.

Andererseits besitzt das spezifische Immunsystem die Fähigkeit Gedächtniszellen zu bilden, diese führen bei einer erneuten Infektion mit demselben Antigen zu einer schnelleren und effizienteren Eliminierung desselben. Durch den Antigenkontakt und unter Einfluss von Zytokinen werden B- und T-Lymphozyten zu Proliferation und Differenzierung aktiviert. Schließlich kommt es durch Interaktion von Lymphozyten, Makrophagen, Komplementsystem und Zytokinen zur Elimination des eingedrungenen Fremdstoffes.

Wie jeder Teil des Organismus so kann auch das Immunsystem in seiner Funktion gestört sein. Es gibt viele Beispiele von fehlgesteuerter oder fehlender Immunabwehr: bei Autoimmunerkrankungen ist die Unterscheidung von Selbst und Fremd gestört, es kommt zu einer Immunreaktion gegen den eigenen Körper. Immundefizienzerkrankungen können ausgelöst werden durch genetische Veränderungen oder chemische, physikalische oder biologische Noxen. Allergien und Asthma resultieren aus einer überschüssigen Immunantwort, während Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen und die Graft-versus-host-Reaktion unerwünschte Folgen einer intakten Immunfunktion sind [1, 25, 28].

1.2 Das HLA-System

Das HLA (Humane-Leukozyten-Antigene)-System, synonym MHC (Major-Histocompatibility-Complex), ist ein komplexes System aus körpereigenen Antigenen, welche von nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden. Die Gene des HLA-Systems werden auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 kodiert und autosomal kodominant vererbt. Die HLA-Genorte zeichnen sich durch einen ausgeprägten Polymorphismus aus, wodurch eine große Anzahl an verschiedenen HLA-Phänotypen möglich ist. Man unterscheidet zwischen HLA-Klasse-I-Antigenen und HLA-Klasse-II-Antigenen, die im folgenden näher beschrieben werden. Sie gehören strukturell zur Immunglobulin-Superfamilie. Weiterhin konnte auf Chromosom 6 eine HLA-Klasse-III-Region identifiziert werden, die u.a. für Faktoren des Komplementsystems, Hitzeschockproteine und Zytokine (TNF- α und - β) kodiert [1, 25, 28].

1.2.1 HLA-Klasse-I-Antigene

Die HLA-Klasse-I-Region auf dem Chromosom 6 setzt sich zusammen aus den drei Genorten HLA-A, HLA-B und HLA-C, die wiederum eine unterschiedliche Anzahl von Allelen besitzen. Weiterhin werden in dieser Region auch die Gene für die Klasse-I-ähnlichen Polypeptide HLA-E, -F und -G kodiert, deren genaue Bedeutung und Funktion allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte.

HLA-Klasse-I-Antigene sind auf fast allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten nachweisbar. Korneaendothel, exokrine Zellen der Parotis und des Pankreas, ZNS-Neurone und Trophoblasten bilden Ausnahmen. Besonders ausgeprägt ist die Expression auf lymphoiden Zellen, Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. HLA-Klasse-I-Moleküle präsentieren endogen synthetisierte Antigene. Es handelt sich um zelleigene oder virale Peptide, die von Transportmolekülen (TAP = Transportproteine assoziiert mit Antigen-Prozessierung) ins endoplasmatische Retikulum transportiert und dort an HLA-Klasse-I-Moleküle gebunden werden. Im Anschluss daran werden die HLA-Peptid-Komplexe auf der Zelloberfläche exprimiert und können dort von $CD8^+$ -T-Zellen erkannt werden. Dies führt zur Differenzierung der $CD8^+$ -Zellen zu zytotoxischen T-Zellen (CTL) und konsekutiver Lyse der antigenpräsentierenden Zelle [1, 25, 28].

1.2.2 HLA-Klasse-II-Antigene

In der HLA-Klasse-II-Region des Chromosoms 6 liegen die Gene für HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DM und HLA-DO. Diese Genorte setzen sich wiederum zusammen aus einer unterschiedlichen Anzahl weiterer, strukturell differierender Allele. HLA-DM und HLA-DO unterscheiden sich von den klassischen HLA-Klasse-II-Antigenen durch ihre Eigenschaft, auch ohne gebundenes Peptid stabil zu sein.

HLA-Klasse-II-Antigene werden von B-Zellen, Thymusepithelzellen, Makrophagen, dendritischen Zellen und aktivierten T-Zellen exprimiert. Sie präsentieren exogene Antigene, die zuvor über Rezeptoren oder Endozytose in die Zelle aufgenommen wurden. In endosomalen Vesikeln werden die Proteine durch Proteasen zu 10 - 20 Aminosäuren großen Peptiden verdaut. Die Endosomen verschmelzen mit Vesikeln aus

dem endoplasmatischen Retikulum, die HLA-Klasse-II-Moleküle enthalten. Nach Abspaltung der invarianten γ -Kette entstehen HLA-Peptid-Komplexe, die wiederum an der Zelloberfläche exprimiert werden. HLA-Klasse-II-Antigene stimulieren und aktivieren $CD4^+$ -T-Helferzellen. Dies führt zu Zytokinsekretion durch diese und Interaktion mit B-Zellen und anderen Effektorzellen des Immunsystems [1, 25, 28].

1.2.3 HLA-Restriktion

Die Antigenerkennung durch T-Lymphozyten kann nur erfolgen, wenn das Antigen dem T-Zell-Rezeptor (CD3) in Form eines HLA-Antigen-Komplexes durch eine APZ präsentiert wird. Dieser Mechanismus wird zusätzlich dadurch verfeinert, dass T-Zellen nur nach Kontakt mit fremdem HLA oder fremdem HLA-gebundenem Peptid aktiviert werden. Hierbei müssen die Antigene in Form von Oligopeptiden in der Peptidbindungsgrube von HLA-Molekülen gebunden sein. Die ausgeprägte Vielfalt an HLA-Allelen gewährleistet, dass durch die vielen möglichen Konformationen der Peptidbindungsgrube ein großes Spektrum an Antigenen präsentiert werden kann. Der in dieser Peptidbindungsgrube gebildete HLA-Peptid-Komplex wird vom T-Zell-Rezeptor erkannt, es bildet sich ein trimolekularer Komplex, der durch Hilfsmoleküle, z.B. CD4- oder CD8-Rezeptoren, stabilisiert werden kann. Da es nur durch HLA-gekoppelte Antigenpräsentation und Kostimulation durch die APZ zu einer Aktivierung der T-Zelle kommt, bedingt dies eine sehr spezifische Immunantwort, die jedoch mehrere Tage bis zu einer effizienten Abwehrreaktion benötigt [1, 25, 28].

1.2.4 Relevanz des HLA-Systems im klinischen Alltag

Das HLA-System spielt eine große Rolle in der Transplantationsimmunologie. Bei der Auswahl eines geeigneten Spenders z. B. für eine Knochenmarktransplantation (KMT) sind besonders die Übereinstimmung der HLA-Merkmale A, B, DR und DQ bedeutend für den Erfolg der KMT. Da jeder Spender jeweils ein von der Mutter und ein vom Vater vererbtes Allel besitzt, müssen insgesamt 8 Merkmale idealerweise übereinstimmen.

Des Weiteren beobachtet man eine Assoziation verschiedener Erkrankungen mit bestimmten HLA-Allelen, z. B. haben Menschen mit dem Allel HLA-DR4 ein um den Faktor 10 erhöhtes relatives Risiko, an rheumatoider Arthritis zu erkranken. Bei gleichzeitigem Vorhandensein von HLA-DR4 und HLA-DR3 steigt die Wahrscheinlichkeit, an insulin-abhängigem Diabetes mellitus zu erkranken um den Faktor 20 [25].

1.3 CD-Oberflächenantigene

Die Phänotypisierung von Leukozytensubpopulationen und deren Reifungsgrad erfolgt anhand der Expression von bestimmten Molekülen auf der Zelloberfläche. Um diese Moleküle nachzuweisen, bedient man sich monoklonaler Antikörper, die spezifisch das entsprechende Antigen binden. Die Summe der für ein bestimmtes Oberflächenmolekül typischen Antikörper bezeichnet man als „Cluster of differentiation (CD)“ [25].

1.4 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) machen im Peripherblut etwa 5-15% der lymphozytischen mononukleären Zellen aus. Weiterhin lassen sich NK-Zellen in der Milz, der Leber, der Darmmukosa, dem Thymus und im Knochenmark nachweisen. Ein Teil der NK-Zellen gehört aufgrund ihrer Zellgröße und der intrazellulären azurophilen Granula (primäre Lysosomen, die Perforin und Granzyme enthalten) zu der sehr heterogenen Population der Large Granular Leukocytes (LGL), der auch andere lymphoide Zellen angehören. [25]

Experimentelle Untersuchungen weisen darauf hin, dass NK-Zellen sich sehr wahrscheinlich im Knochenmark aus $CD4^-/CD8^-$ Vorläuferzellen der T-Zell-Reihe differenzieren. Sie lassen sich aus $CD34^+$ -Stammzellen anzüchten [58]. Innerhalb der NK-Zellpopulation finden sich verschiedene Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen. Es konnte noch nicht vollständig geklärt werden, ob es sich bei dieser Heterogenität um unterschiedliche Subpopulationen oder Aktivierungsstufen der NK-Zellen handelt. Die meisten NK-Zellen exprimieren jedoch die folgenden Oberflächenmoleküle:

CD2: ein Adhäsionsmolekül, die 75-kDa β -Untereinheit des IL-2-Rezeptors.

CD16 (FC γ RIIIA): ein Rezeptor für die Fc-Region von Immunglobulinen.

CD56: ein Adhäsionsmolekül, das als typischer Marker für humane NK-Zellen gilt.

CD69: ein Aktivierungs-Molekül, das von aktivierten Leukozyten exprimiert wird.

Weiterhin findet man auf NK-Zell-Subpopulationen die Antigene CD8, CD25, CD38, CD71 und HLA-DR. Außer CD56 können diese Antigene auch auf T-Zelloberflächen nachgewiesen werden, NK-Zellen werden daher im allgemeinen als CD56⁺/CD3⁻ charakterisiert [25].

Die zentrale Aufgabe von NK-Zellen ist die frühe Abwehr von Viren, intrazellulären Bakterien und Parasiten. Ihre Aktivität wird hierbei stimuliert von den Zytokinen IFN- α , IFN- β und IL-12, die von infizierten Zellen sezerniert werden. Die anti-virale NK-Zell-Aktivität erreicht ihren Höhepunkt etwa am 3. Tag post infectionem und stellt damit die erste Front zellulärer Abwehrmechanismen. Erst ab dem 7. Tag treten zytotoxische T-Zellen (CTL) in Aktion. Eine weitere wichtige Funktion von NK-Zellen ist die Fähigkeit Tumorzellen spontan zu lysieren. Durch die Produktion von verschiedenen Zytokinen (u.a. IFN- γ und TNF- α) spielen NK-Zellen außerdem eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort [25].

Bei der Erforschung der NK-Zellfunktion wurde beobachtet, dass als fremd erkannte Zellen, seien sie nun infiziert oder maligne entartet, von NK-Zellen ohne die Mitwirkung der anderen Komponenten des Immunsystems lysiert werden können. Man erklärt sich diese Fähigkeit damit, dass eine Target-Erkennung allein in Abhängigkeit von der Expression von HLA-Klasse-I-Antigenen erfolgt. Exprimiert eine Zelle keine oder als fremd erkannte HLA-Klasse-I-Antigene so kommt es konsekutiv zur Zytolyse durch NK-Zellen. Dieses Phänomen wurde erstmals 1995 von Kärre als 'Missing-self-Hypothese' ('express yourself or die') beschrieben und in späteren Studien bestätigt [25, 29]. NK-Zellen unterscheiden sich damit von CTL in mehreren Punkten: Sie exprimieren nicht den antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptor und bilden keine Gedächtniszellen aus. Das Erkennen von Zielzellen unterliegt nicht der klassischen HLA-Restriktion durch HLA-gekoppelte Antigenpräsentation und APZ-Kostimulation und erfolgt dadurch schneller als die CTL-Aktivierung. Trotzdem ist die NK-Zellfunktion eng an die HLA-Expression gebunden, da diese eine spontane Zytolyse körpereigener Zellen durch natürliche Killerzellen verhindern kann.

1.4.1 NK-Zellrezeptoren

Da sich NK-Zellen in einem daueraktivierten Zustand befinden, ist es die Aufgabe der NK-Zellrezeptoren, die zytotoxische Aktivität zu regulieren. Man unterscheidet hierbei aktivierende (KAR) und inhibierende (KIR) Rezeptoren. In der Interaktion zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen wird letzteren die wichtigere Position zugeordnet im Sinne einer Vetofunktion über aktivierende Signale [3, 25]. NK-Zellen können aber auch durch lösliche Komponenten des Immunsystems wie IFN- α , IFN- β , TNF- α , IL-12 und IL-15 direkt aktiviert werden. Außer KAR und KIR besitzen NK-Zellen weitere Rezeptoren, die ihre Funktion beeinflussen, hierzu zählen Adhäsionsmoleküle (z.B. LFA-1, ICAM-1) und Zytokin-Rezeptoren (z.B. IL-2R, IL-12R). Die NK-Zellfunktion der Targetzellyse scheint letztendlich das Resultat aus positiven Signalen von KAR und kostimulatorischen Rezeptoren und Molekülen auf der einen Seite und inhibierenden Interferenzen der KIR auf der anderen Seite zu sein [3, 11, 25, 31, 35, 59].

Die folgenden inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren konnten bisher identifiziert und durch experimentelle Untersuchungen an NK-Zell-Klonen weiter charakterisiert werden [17, 31, 55, 59]:

Inhibierende Rezeptoren, KIR (killer inhibitory receptor)

- *Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie, Typ I Transmembran-Proteine*

p58 (58kD): Rezeptoren der 58kD-Gewichtsklasse erkennen HLA-C. Es konnten zwei Subtypen differenziert werden [16, 45]:

p58.1 (NKAT1/CD158a): Spezifisch für HLA-Cw-2, -4, -5, -6, -15.
Wird erkannt durch den mAk Anti-EB6.

p58.2 (NKAT2/CD158b): Spezifisch für HLA-Cw-1, -3, -7, -8.
Wird erkannt durch den mAk Anti-GL183.

p70 (70kD) (NKAT3): Rezeptoren der 70kD-Gewichtsklasse sind spezifisch für verschiedene HLA-B- und HLA-A-Antigene [16, 45, 55].

p140 (140kD) (NKAT4): Rezeptoren der 140kD-Gewichtsklasse sind spezifisch für HLA-A-3 und -11 [16, 45, 55, 59].

KIR2DL4: Dieser Rezeptor wird auf allen NK-Zellen exprimiert und ist spezifisch für HLA-G, das bisher nur mit fetalen Trophoblastzellen assoziiert wird [52, 55].

- Rezeptoren der C-Typ-Lektin-Superfamilie, Typ II Transmembran-Proteine

CD94/NKG2: Es handelt sich um ein Heterodimer, das aus zwei Glykoproteinen aufgebaut ist. Dabei ist jeweils ein CD94-Molekül mit einer von vier Untereinheiten des NKG2-Moleküls (NKG2A, NKG2B, NKG2C oder NKG2E) über Disulfidbrücken verbunden. Dieser Rezeptorkomplex kann inhibierend oder aktivierend in die NK-Zellfunktion eingreifen, je nachdem ob CD94 mit NKG2A oder -B (inhibierend) oder NKG2C oder -E (aktivierend) gebunden ist [12, 13, 14, 31, 32, 59]. Der CD94/NKG2-Komplex interagiert mit auf der Zielzelle exprimiertem HLA-E. HLA-E ist ein HLA-Klasse-I-Antigen, das nur dann auf der Zelloberfläche exprimiert wird, wenn es an ein Peptid gebunden vorliegt, welches von HLA-A, -B oder -C stammt [25]. Die HLA-E-Expression ist also ein Indikator für die HLA-Klasse-I-Biosyntheserate einer Zelle. Über die HLA-E-vermittelte NK-Zellinhibition oder -aktivierung hat damit die Expressionsrate von HLA-Klasse-I-Antigenen auf der Zelloberfläche einen direkten Einfluss auf die Überlebenschance der Zielzelle [12, 13, 14, 32, 33, 34, 37]. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass durch eine CD94/NKG2-A-Rezeptor-Bindung die CD16-getriggerte NK-Zellaktivierung antagonisiert werden kann [48].

Ly49A-I: Es handelt sich um eine Gruppe von NK-Rezeptoren, die bisher nur bei Nagern nachgewiesen werden konnten und mit HLA-Klasse-I-Antigenen interagieren. Die meisten dieser Rezeptoren besitzen eine intrazelluläre ITIM-Sequenz und haben damit inhibierende Funktion, Ly49D und Ly49H sind aktivierende Rezeptoren [3, 31, 64]. Es wurde postuliert, dass der CD94/NKG2-Rezeptor das humane Korrelat zum murinen Rezeptorkomplex Ly49 darstellt [16].

Aktivierende Rezeptoren, KAR (killer activatory receptor)

- *Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie, Typ I Transmembran-Proteine*

p50 (50kD): Diese Rezeptoren der 50kD-Gewichtsklasse besitzen strukturelle Ähnlichkeit mit den p58-KIR und erkennen HLA-C. Es konnten drei Subtypen differenziert werden, wobei für p50.3 noch keine spezifische HLA-Interaktion nachgewiesen werden konnte [45]:

p50.1 (NKAT5) erkennt HLA-Cw-2, -4, -5, -6, -15

p50.2 (NKAT6) erkennt HLA-Cw-1, -3, -7, -8

p50.3 (Anti-PAX169, Anti-PAX180, Anti-PAX250)

- *Rezeptoren der C-Typ-Lektin-Superfamilie, Typ II Transmembran-Proteine*

NKR-P1: Ein 60kD schweres Dimer mit Disulfidbrückenbindung [16].

NK-TR: Ein 150kD schweres Protein.

CD94: Dieser Rezeptor wurde bereits ausführlich beschrieben.

- *Andere Rezeptoren, denen NK-Zell-aktivierende Eigenschaften zugeschrieben werden:*

CD2: Ein Adhäsionsmolekül (LFA-2) mit kostimulatorischer Funktion.

CD16: Die Fc γ RIII-Untereinheit des Fc-Rezeptors ist an der Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) beteiligt.

Außerdem scheinen die Rezeptoren CD7, CD27, CD28, CD44, CD69 und verschiedene β 2-Integrine an einer NK-Zell-Aktivierung beteiligt zu sein [11, 25, 31, 35, 59, 62].

Die p50- und p58-Rezeptoren repräsentieren zwei Typen von NK-Zellrezeptoren, bei denen ähnliche extrazelluläre Strukturen mit unterschiedlichen Transmembran- und Zytoplasmamolekülen assoziiert sind und dadurch gegensätzliche Funktionen erhalten. Inhibierende Rezeptoren wie z.B. p58 haben einen langen intrazellulären Anteil, der sogenannte "Immune Receptor Tyrosine-Based Inhibitory Motifs" (ITIM) enthält. Im Anschluss an eine Bindung von p58 an ein korrelierendes HLA-Klasse-I-Protein kommt es via ITIM zu einer Aktivierung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen (SHP-1 und SHP-2) und konsekutiv zu einer Inhibition der NK-Zellzytotoxizität [3, 16, 31, 55]. Aktivierende Rezeptoren wie z.B. p50 haben einen kurzen intrazellulären Anteil und besitzen keine ITIMs, haben dafür jedoch eine positiv geladene Aminosäure (meistens Lysin) im Transmembransegment. Diese Aminosäure ermöglicht die Bindung an DAP12, ein Membranmolekül mit einem negativ geladenen Anteil, das wiederum mit

einem "Immune Receptor Tyrosine-Based Activatory Motif" (ITAM) verbunden ist und zur NK-Zellaktivierung führt [3, 31].

1.4.2 Mechanismen der Zytolyse durch NK-Zellen

Jeder Aktivierung einer NK-Zelle zu Zytolyse, Zytokinsekretion, Proliferation oder Differenzierung geht eine Interaktion zwischen einem NK-Zellrezeptor und einem spezifischen Liganden voraus, der eine intrazelluläre Signalkaskade folgt. Verschiedene Mechanismen sind bekannt, die letztendlich zur Lyse der Zielzelle führen:

ADCC (Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity) & Exozytotische Lyse

Durch ADCC können zytotoxische Zellen, die selbst nicht die Möglichkeit spezifischer Antigenerkennung besitzen, zur Lyse der Zielzelle aktiviert werden. Bei NK-Zellen bindet die Fc γ RIII-Untereinheit (CD16) des Fc-Rezeptors an die Fc-Untereinheit von Antikörpern, die wiederum an Oberflächenantigene der Zielzelle gebunden sind. Durch diese Bindung wird eine intrazelluläre Signalkaskade bei der NK-Zelle in Gang gesetzt. Am Ende dieser Signalkette steht die exozytotische Freisetzung zytolytischer Enzyme, die im Zytoplasma in großen Granula vorliegen. Von diesen Enzymen bewirkt die Gruppe der Perforine zunächst die Bildung von zahlreichen Poren in der Membran der Zielzelle. Durch diese Poren gelangen ebenfalls freigesetzte Granzymproteasen in die Zelle, die hier Caspasen aktivieren, welche wiederum die Fragmentation der DNA induzieren und so letztendlich zu Apoptose (programmierter Zelltod) führen [11, 25].

Fas-/FasL-Mechanismus

Apoptose kann auch über die Bindung zwischen dem Fas-Antigen (CD95) der Zielzelle und dem Fas-Liganden (FasL) der Effektorzelle eingeleitet werden. Auch hier wird durch die Interaktion zwischen Fas-Rezeptor und Fas-Ligand eine intrazelluläre Signalkaskade induziert, die durch aktivierte Caspasen zu DNA-Fragmentation und Zellkernpyknose und somit programmiertem Zelltod führt [11, 25].

1.5 Zytokine und ihre Rolle im Immunsystem

Zytokine sind meist kleine Proteine (MG 8 – 40 kDa), die von vielen verschiedenartigen Zelltypen produziert werden, oft abhängig von entsprechenden Aktivierungszuständen der Zelle. Umgekehrt können die meisten Zellen ein breites Spektrum an Zytokinen produzieren. Diese Botenstoffe werden nur bei Bedarf synthetisiert und sezerniert und können sowohl autokrin als auch parakrin oder endokrin als Mediatoren der Kommunikation zwischen Zellen dienen. Ihre Wirkung beinhaltet die Beeinflussung von Überleben, Wachstum, Differenzierung und Funktion zahlreicher Blut- und Gewebszellen und wird über eine Bindung an spezifische Rezeptoren vermittelt. Die Expression der Zytokinrezeptoren wird durch spezifische Mechanismen reguliert, verschiedene Signale (u.a. Zytokine) vermitteln eine Erhöhung oder Verminderung der Rezeptorexpression. Der Zytokin-Rezeptorbindung folgt die Aktivierung der intrazellulären Signaltransduktion. Einige Zytokine benutzen einen gemeinsamen Rezeptor, der Ligand-Rezeptor-Bindung folgen jedoch unterschiedliche Wechselwirkungen mit weiteren Rezeptorproteinen. Andere Zytokine vermitteln ihre Wirkung über denselben Transduktionsweg. Dies bewirkt eine ausgeprägte Redundanz der Aktivitäten einiger Zytokine, deren Sinn noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte. Durch die Rezeptorbindung kommt es über verschiedene Signaltransduktionswege zur Genregulierung auf Transkriptionsebene. Durch diese Genregulierung werden biologische Aktivitäten vermittelt, die z.B. in der Immunabwehr eine wichtige Rolle bei der Differenzierung, Aktivierung und Koordination von Effektorzellen des Immunsystems spielen. Durch die Induktion der Synthese anderer Zytokine entsteht ein komplexes Netzwerk.

Bisher sind über 50 Zytokine bekannt, eine Klassifikation erfolgt nach ihrer Hauptaktivität, wobei alle Zytokine vielfältige Funktionen erfüllen können, ihre Wirkung ist meist pleiotrop. Man unterscheidet die Gruppe der primär antiviral aktiven Interferone (IFN $-\alpha$, $-\beta$, $-\gamma$). Die Interleukine (IL-1 α , $-\beta$, 2-18), Tumornekrosefaktor α und β und Lymphotoxin sind wichtig bei inflammatorischen Prozessen. Zu den T-Zell-, B-Zell- und hämatopoetischen Wachstumsfaktoren gehören zahlreiche Interleukine und die Koloniestimulierenden Faktoren (CSF) für die entsprechende Zielzellreihe (z.B. G-CSF, M-CSF, EPO, TPO) [22, 25, 46].

1.5.1 NK-Zellen und Zytokine

Über das Spektrum der Zytokinproduktion durch NK-Zellen und die Beeinflussbarkeit dieser Zellreihe durch verschiedene Zytokine ist bereits einiges bekannt. IL-2, -12, IFN- α , - β und - γ und TNF- α und - β steigern die Aktivität von NK-Zellen, IL-1, IL-4 [23] und PDGF (Platelet-derived growth factor) verringern sie [22]. IL-15 und TGF- β steigern die Expression von CD94 auf NK-Zellen und können damit inhibierenden oder aktivierenden Einfluss haben [5, 41, 42, 50]. Bekannt ist außerdem, dass NK-Zellen IFN- γ , TNF- α , IL-3, GM-CSF und G-CSF produzieren [61]. Durch die Produktion von IFN- γ und TNF- α scheinen NK-Zellen schon in frühen Infektionsstadien einen wichtigen Einfluss zu nehmen auf den Erfolg der Immunantwort [43]. IL-2 und IL-12 induzieren die Sekretion von IFN- γ durch NK-Zellen [4, 6, 47]. IL-7 und IL-15 nehmen Einfluss auf NK-Zellreifung, -proliferation, -zytotoxizität und -IFN- γ -Produktion [18, 19]. IL-18 hat in Kombination mit IL-2 oder IL-12 einen verstärkenden Effekt auf die IFN- γ -Produktion [2, 15]. IFN- γ (neben IL-12) wiederum nimmt entscheidenden Einfluss auf die Bildung von Th1-Zellen bei bakteriellen, viralen und parasitären Infektionen. Damit bilden IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 und IL-18 wichtige Bindeglieder zwischen unspezifischem und spezifischem Immunsystem [27, 60]. Ross und Caligiuri konnten 1997 zeigen, dass die Stimulation der IFN- γ -Produktion durch obengenannte Zytokine im weiteren Verlauf zur Apoptose der betroffenen NK-Zelle führt. Diese Zytokin-induzierte Apoptose scheint mit der Produktion von TNF- α durch die NK-Zelle assoziiert zu sein. Damit scheint also ein Regulationsmechanismus der NK-Zellfunktion durch Zytokine vorhanden zu sein [56]. Das Hypophysenhormon Prolaktin, das auch von Zellen des Immunsystems gebildet wird, nimmt ebenfalls Einfluss auf die Interferon- γ -Produktion von NK-Zellen: es kann sowohl alleine die Produktion dieses Zytokins erhöhen als auch in Gegenwart von IL-2 und IL-12. Hierbei erreicht das alleinige Vorhandensein von Prolaktin nicht die Effizienz der beiden letztgenannten Zytokine. Die Gegenwart physiologischer Konzentrationen von Prolaktin scheint jedoch die IL-2-induzierte IFN- γ -Produktion zu verstärken [39]. Durch IL-2 stimuliert differenzieren sich NK-Zellen außerdem zu Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK-Zellen), die eine besonders hohe zytotoxische Aktivität aufweisen [38]. Des Weiteren konnten D'Andrea et al 1996 zeigen, dass die Produktion von TNF- α und IFN- γ durch

KIR⁺-T-Zellen im autologen System gesteigert ist in Gegenwart von anti-KIR-mAk bzw. anti-HLA-Klasse-I-mAk. Dies lässt darauf schließen, dass die KIR einen wichtigen Einfluss auf die Zytokinproduktion von Lymphozyten haben [20].

1.6 Umriss der Arbeit

Die experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit orientieren sich an zwei Schwerpunkten: Zunächst soll eine Methode entwickelt werden zur Anreicherung der KIR-p58.1-NK-Zellsubpopulation. Die Datengrundlage der aufgeführten Theorien der HLA-C-regulierten NK-Zellfunktion rekrutiert sich bisher vor allem aus Studien an geklonten NK-Zellen. Nun soll an nativen Zellen überprüft werden, ob die Inhibition von p58.1⁺-NK-Zellen durch HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7, und -Cw8 reproduzierbar ist. Die Anreicherung dieser spezifischen NK-Zellsubpopulation erfolgt mit Hilfe immunomagnetischer Arbeitstechniken, die Phänotypisierung mittels Durchflusszytometrie. Durch Zytotoxizitätsversuche gegen die Zelllinie K562 wird die Vitalität und gegen HLA-Cw6- und Cw7-transfizierte Zellen die postulierte Regulation der erhaltenen Zellen untersucht. Durch Messung von intrazellulär vorhandenen Zytokinen bei NK-Zellen im Vergleich zu T-Zellen sollen Einblicke in weitere Regulationsmechanismen der NK-Zellfunktion erhalten werden. Diese Messungen werden wiederholt an Zellen, die zuvor durch eine MLC (Mixed Lymphocyte Culture) stimuliert werden. Hiermit soll zum einen durch die Verlaufsbeobachtung von CD56-, CD3-, CD158a- (p58.1-KIR) und CD158b- (p58.2-KIR) Antigenen untersucht werden, ob es im Rahmen der MLC zu einer Veränderung in der Rezeptorexpression kommt. Zum anderen soll geprüft werden, ob sich die Zytokinproduktion durch Konfrontation mit fremdem Antigen verändert.

2 Methoden

2.1 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen

Aus Buffy Coats (bereitgestellt von der Blutbank) oder peripherem Vollblut freiwilliger Spender werden durch Dichtegradientenzentrifugation periphere mononukleäre Zellen (PBMNC) nach der von Böyum beschriebenen Methode isoliert [9, 10]:

Zu 25 ml Blut werden 25 ml Stammlösung 1 (PBS/EDTA) zugegeben und 2-3 mal mit der Pipette aufgezogen und vermischt. In 50 ml Röhrchen werden 15 ml des Trennmediums Lymphoprep vorgelegt, jeweils 25 ml Blut-Stammlösung-1-Mischung werden vorsichtig darauf aufgetragen, so dass zwei Phasen entstehen. Anschließend erfolgt die Dichtegradientenzentrifugation bei 800 g, 20 min, + 25°C, ohne Bremse. Es entstehen drei Phasen: die unterste Phase besteht aus Erythrozyten und Lymphoprep, darauf befinden sich die mononukleären Zellen, es folgt Serum. Die mittlere Phase mit den mononukleären Zellen wird vorsichtig abgenommen und dreimal gewaschen mit Stammlösung 1, Zentrifugation bei 400 g, 15 min, 25°C, Bremse 7. Anschließend erfolgt die manuelle Bestimmung der Zellzahl am Lichtmikroskop mit Neubauer-Zählkammern.

2.1.1 Immunomagnetische Zellanreicherung

Zur Anreicherung einer bestimmten Zellpopulation mit bekannter Antigenstruktur werden die Zellen mit an Eisenionen (Microbeads) konjugierten, spezifischen Antikörpern markiert, die an die entsprechenden Epitope binden. Die markierten Zellen werden anschließend auf eine mit paramagnetischer Eisenmatrix gefüllte Trennsäule aufgetragen, die sich in einem Hochleistungs-Permanentmagneten befindet (MACS = Magnetic Activated Cell Sorter). Positiv markierte Zellen werden in der Trennsäule zurückgehalten, die Negativfraktion erscheint als Durchlauf. Die Positivfraktion kann nach Entfernen der Trennsäule aus dem Magneten eluiert werden. Die Microbeads können durch ein Release-Reagenz von den gebundenen Antikörpern wieder entfernt werden [51].

2.1.2 Isolierung von CD56⁺/CD3⁻-NK-Zellen und CD56⁺/CD3⁺-T-Zellen

Die Methode des "Magnetic Activated Cell Sorting" (MACS) soll anhand der Anreicherung von CD56⁺/CD3⁻-NK-Zellen und CD56⁺/CD3⁺-T-Zellen beschrieben werden. Zur Differenzierung der Zytotoxizität von NK- und T-Zellen gegenüber HLA-Cw6- und HLA-Cw7- transfizierten Zellen wurden diese beiden Zellpopulationen angereichert. Es wird mit dem System der Firma Miltenyi gearbeitet. Alle Waschvorgänge werden bei 400 g und + 4°C für 8 min durchgeführt. Alle Materialien und Reagenzien werden auf Eis aufbewahrt. Folgende Vorgehensweise wurde gewählt:

Isolierung von mononukleären Zellen wie unter 2.1 beschrieben.

Der letzte Waschschrift wird mit Stammlösung 2 (PBS entgast + BSA + EDTA) durchgeführt. Anschließend Zellzahlbestimmung.

Anreicherung von CD56⁺-Zellen:

Zur Reduktion unspezifischer Bindungen werden dem Zellpellet 20 µl Polyglobulin (humanes IgG) pro 10⁷ Zellen zugegeben, anschließend 5-minütige Inkubation auf Eis. Nun folgt die Zugabe von 20 µl Multisort Anti-CD56-Microbeads pro 10⁷ Zellen. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 15 min wird das Zellpellet mit entgaster Stammlösung 2 resuspendiert und anschließend über einen 40 µm Nylon-Filter gegeben. Die von Zellklumpen gereinigte Suspension wird nochmals gewaschen und schließlich in 5 ml entgaste Stammlösung 2 aufgenommen.

Während der Inkubationszeiten wird die Trennsäule vorbereitet: Es wird eine Separation Column Typ VS⁺ im Magnetsystem installiert und mit 7 ml entgaster Stammlösung 2 gespült. Es folgt das tropfenweise Auftragen der Zellsuspension auf die Säule. Danach wird die Säule mit 12 ml entgaster Stammlösung 2 gespült. Durch getrenntes Auffangen der Spülflüssigkeit erhält man die nicht gebundene Negativfraktion. Nach Entnahme der Trennsäule aus dem Magneten und Aufsetzen auf ein 15 ml Röhrchen kann man die Positivfraktion mit 6 ml entgaster Stammlösung 2 eluieren durch schnelles Durchdrücken des mit dem zur Säule gehörigen Stempels.

| | |
|------------------------------|---------------------------|
| Positivfraktion = Eluat: | CD56 ⁺ -Zellen |
| Negativfraktion = Durchlauf: | CD56 ⁻ -Zellen |

Anreicherung von CD3⁺- und CD3⁻-Zellen:

Es wird die bei der CD56⁺-Anreicherung gewonnene Positivfraktion weiterverwendet. Die Zellsuspension wird bei 400 g und + 4°C 8 Minuten lang zentrifugiert, es folgt ein Waschschriff mit Stammlösung 2. Es wird ein Ansatz mit 20 µl Multisort Anti-CD3-Microbeads pro 10⁷ Zellen hergestellt und auf Eis 15 min lang inkubiert. Danach folgen wiederum die Resuspension in entgaster Stammlösung 2, das Abfiltrieren über einen 40 µm Nylon-Filter, ein weiterer Waschschriff und erneute Resuspension in 5 ml entgaster Stammlösung. Nach Vorbereiten der MACS-Säule wird die Zellsuspension aufgetragen. Die MACS-Anreicherung wird nach der soeben beschriebenen Methode vollendet. Man erhält folgende Zellfraktionen:

| | |
|------------------------------|--|
| Positivfraktion = Eluat: | CD56 ⁺ /CD3 ⁺ -T-Zellen |
| Negativfraktion = Durchlauf: | CD56 ⁺ /CD3 ⁻ -NK-Zellen |

2.1.3 Isolierung von CD158b⁺/CD3⁻/CD158a⁻-NK-Zellen

Zur spezifischen Anreicherung von CD158b⁺-NK-Zellen, die weder CD3- noch CD158a-Rezeptoren tragen, wurde die im folgenden beschriebene Methode entwickelt und evaluiert. Die Anreicherung dieser KIR-Subpopulation ist in dieser Art bisher noch nicht beschrieben worden. Nach folgendem Schema wurde vorgegangen:

Isolierung von mononukleären Zellen wie unter 2.1 beschrieben.**Depletion von CD3⁺- und CD158a⁺-Zellen:**

Die Zellen werden gezählt und die PBMNC-Zellzahl mit Stammlösung 2 auf eine Konzentration von 500 Mio / ml eingestellt. Zur Verringerung unspezifischer Bindungen werden 50 µl Polyglobulin / ml Zellsuspension zugegeben (10 µl pro 10⁸ Zellen) und für 5 min bei + 4°C inkubiert. Im nächsten Schritt werden 150 µl Anti-OKT3 (unmarkiert) / ml (10 µl pro 3,3 x 10⁶ Zellen) und 200 µl Anti-CD158a (unmarkiert) / ml (10 µl pro 2,5 x 10⁶ Zellen) zugegeben, es folgen eine 20-minütige Inkubation bei + 4°C und 2 Waschschriffe mit Stammlösung 2. Um diese markierten Zellen aus dem Zellgemisch entfernen zu können, werden 10 µl Goat-Anti-Mouse-

Microbeads pro 10^7 Zellen dazu pipettiert und inkubiert für 20 min bei + 4°C. Zum Schluss werden die Zellen noch einmal gewaschen mit Stammlösung 2 und anschließend in 2 ml davon aufgenommen. Mit Hilfe des oben beschriebenen Magnetsystems werden die Zellen nun aufgetrennt. Man erhält:

Positivfraktion = Eluat: CD3⁺/CD158a⁺-Zellen
Negativfraktion = Durchlauf: CD3⁻/CD158a⁻-Zellen

Anreicherung von CD158b⁺-Zellen:

Der soeben erhaltene Durchlauf der MACS-Depletion wird weiter verarbeitet. Nach der Bestimmung der Zellzahl erfolgt eine Zentrifugation bei 400 g für 8 min, anschließend sorgfältiges Abnehmen des Überstands. Das Zellpellet wird mit 10 µl Anti-CD158b (unmarkiert) pro 10^5 Zellen versetzt und für 25 min bei + 4°C inkubiert. Es folgen 2 Waschschrte mit jeweils 2 ml Stammlösung 2. Als nächster Schritt werden 10 µl Rat-Anti-Mouse-Microbeads pro 10^5 Zellen zugegeben und für 15 min bei + 4°C inkubiert. Diese Microbead-gekoppelten Antikörper binden an den Anti-CD158b-Antikörper. Der Ansatz wird einmal gewaschen und dann in 500 µl Stammlösung 2 aufgenommen. Aufgrund der geringeren Zellzahl wird für die magnetische Anreicherung eine Separation Column Typ MS⁺ im MiniMACS-System verwendet. Die Säule wird mit 1 ml Stammlösung 2 gespült und die Zellsuspension aufgetragen. Dann wird nochmals mit 2 ml Stammlösung 2 gespült und schließlich, nach Entfernung der Säule aus dem Magneten, wird mit 1 ml Stammlösung 3, die zuvor 30 min bei + 56°C inaktiviert wurde, eluiert. Man erhält:

Positivfraktion = Eluat: CD158b⁺/CD3⁻/CD158a⁻-NK-Zellen
Negativfraktion = Durchlauf: CD158b⁻/CD3⁻/CD158a⁻-NK-Zellen

Um die Ergebnisse der Zellanreicherungen evaluieren zu können wird nach jedem Anreicherungsschritt die Zellzahl bestimmt und eine Immunphänotypisierung der erhaltenen Subpopulation mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Kontrollfärbungen zeigen, ob unspezifische Bindungen aufgetreten sind.

2.2 Immunphänotypisierung mit der Durchflusszytometrie

Es handelt sich um eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension anhand von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften, mit Hilfe derer Zellgröße, Granularität und immunologischer Phänotyp bestimmt werden können (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorter). Die Zellsuspension wird durch eine Kapillare mit Überdruck in den Messbereich gesogen, wobei es durch Beschleunigung des Zellflusses zur einzelnen Hintereinanderreihung der Zellen kommt. Im Messbereich kommt es durch Wechselwirkung der Zelle mit dem einfallenden Laserstrahl (Argonlaser, Wellenlänge 488 nm) zur Lichtstreuung. Diesen Vorgang bezeichnet man als hydrodynamische Fokussierung. Anhand der Veränderung der Richtung des Lichtstrahls, die von Photodetektoren wahrgenommen wird, können Zellgröße, Struktur der Zellmembran und intrazelluläre Bestandteile identifiziert werden. Dabei gibt es zwei Parameter: Vorwärtsstreulicht (forward light scatter = FSC) entlang des einfallenden Lichtstrahls als Maß für die Zellgröße, und Seitwärtsstreulicht (side scatter = SSC) im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl als Maß für die intrazelluläre Granularität [21].

Durch Markierung der Zellen mit monoklonalen Antikörpern, die mit einem von vier Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind, kann eine immunologische Phänotypisierung der Zellen erfolgen. Dabei absorbieren die Farbstoffe Lichtenergie des Messlasers. Durch diese Energie werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben und emittieren beim Rücksprung auf das Ausgangsniveau ein Photon. Die Fluoreszenzenergie des Photons ist geringer als die Absorptionsenergie, das abgestrahlte Licht ist langwelliger als das anregende Licht. Die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur Anzahl der Bindungsstellen einer Zelle, die mit Farbstoff-gekoppelten Antikörpern besetzt sind [30, 57].

Als Fluoreszenzfarbstoffe werden verwendet:

- Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Emissionsmaximum bei 520 nm
- Phycoerythrin (PE), Emissionsmaximum bei 560 nm
- Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP), Emissionsmaximum bei 680 nm
- Allophycocyanin (APC), Emissionsmaximum bei 660 nm

Durch Messung von Lichtstreuung und Fluoreszenz und Umwandlung der Signale in elektrische Impulse können die Daten an einem angeschlossenen Computer mit Hilfe eines

speziellen Mess- und Bearbeitungsprogramms ausgewertet werden. Die Ergebnisse werden in Form eines Koordinatensystems (Dot Plot) dargestellt, jede untersuchte Zelle entspricht hier einem Punkt. Durch das Setzen von Gates können einzelne Zellsubpopulationen abgegrenzt und genauer analysiert werden. Um Fehlinterpretationen zu verhindern, wird bei jeder Immunphänotypisierung eine Zellprobe mit einer Kontroll-Antikörpermischung gefärbt, die über unspezifische Bindungen informiert und für eine genaue Messeinstellung verwendet wird. Es werden zwei Systeme für die Durchflusszytometrie benutzt:

1. Messeinheit: FACSscan von Becton-Dickinson, besitzt 3 Fluoreszenzkanäle.
PC von Hewlett-Packard.
Auswertungsprogramm PC Lysys II.
2. Messeinheit: FACSCalibur von Becton Dickinson, besitzt 4 Fluoreszenzkanäle.
Computer von Apple (Macintosh).
Auswertungsprogramm CellQuest.

2.2.1 Durchführung der FACS-Direkt-Färbung

In spezielle FACS-Röhrchen werden 100 µl Zellsuspension (Konzentration 50 - 150 x 10³ Zellen / 100 µl) vorgelegt. Anschließend werden jeweils 10 µl eines Fluoreszenz-Farbstoff-konjugierten Antikörpers zugegeben. Sollen unterschiedliche Farbstoffe verwendet werden, können mehrere Direktfärbungen auch im selben Ansatz durchgeführt werden. Nach Vortexen der Zellsuspension Inkubation auf Eis für 30 min unter Lichtausschluss. Nur bei Verwendung von heparinisiertem Vollblut folgt die Zugabe von 2 ml FACS-Lyse-Puffer und eine zweite Inkubation für 10 min unter denselben Bedingungen. Anschließend folgen zwei Waschschrte mit PBS zur Entfernung von ungebundenem Antikörper. Zentrifugation jeweils bei 400 g und + 4°C für 8 min. Wichtig ist eine sorgfältige Resuspension des Zellsedimentes jeweils im Anschluß an die Zentrifugation. Die Proben können nun gemessen werden.

2.2.2 Durchführung der FACS-Indirekt-Färbung

Nach Anreicherung der $CD158b^+/CD3^-/CD158a^-$ -NK-Zellen waren diese bereits mit unmarkiertem Anti-CD158b beladen. An diesen Anti-CD158b waren wiederum Microbeads gebunden. Da davon ausgegangen werden kann, dass durch die Anreicherung nicht alle CD158b-Antigene durch Anti-CD158b besetzt werden, wird mit folgender FACS-Indirekt-Färbung gearbeitet: zusätzliche Markierung der Zellen (100 μ l Zellsuspension) mit 20 μ l unmarkiertem CD158b-monoklonalen Antikörper, dadurch Absättigung noch freier Antigenbindungsstellen auf der Zelloberfläche. Inkubation und Waschen. Zugabe von 5 μ l Goat-Anti-Mouse-Antikörper, FITC-konjugiert, pro 100 μ l Zellsuspension. Es handelt sich hierbei um einen Anti-Globulin-Antikörper, der an Anti-CD158b bindet. Nochmals Inkubation und Waschen. Zugabe von 50 μ l Mausserum, Inkubation und Waschen. Das Mausserum dient der Verhinderung unspezifischer Bindungen bei der nun folgenden PE-Färbung. Diese wird wie oben beschrieben durchgeführt.

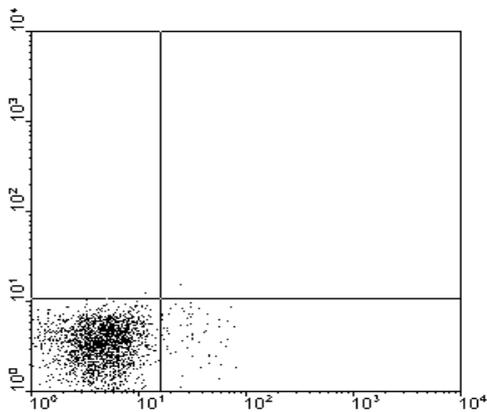


Abbildung 1:
Unspezifische Bindung mit GAM-FITC.

2.3 Zytotoxizitätstest

Es handelt sich um eine Methode zur Bestimmung der Zytotoxizität von Effektorzellen. Die Durchführung entspricht weitgehend der von Blomberg et al 1986 vorgestellten Weise. Hierbei werden die Zielzellen (Targetzellen) mit lipophilem BATDA-Liganden

inkubiert, der die Fähigkeit zur Passage der Zellmembran besitzt. In der Zelle wird der Ligand zur hydrophilen Form (TDA) hydrolysiert und verliert dadurch seine Membrangängigkeit. Bei der durch Effektorzellen verursachten Targetzellzerstörung wird TDA freigesetzt und bildet mit der zugegebenen Europium-Lösung (Eu-Solution) einen stark fluoreszierenden stabilen Chelatkomplex (EuTDA). Die photometrisch gemessene Fluoreszenz ist direkt proportional zur Lyserate.

Zur Beurteilung der Zytotoxizität der Effektorzellen wird die Spezifische Lyse berechnet. Aus Drei- und Vierfachbestimmungen der Messwerte werden zunächst jeweils Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Außerdem müssen die Parameter Spontanlyse, Maximallyse und Background ermittelt werden. Die Spontanlyse entspricht der spontanen Freisetzung von TDA und ist somit ein Maß für den Zustand der Targetzellen. Ihr Wert sollte nicht über 30% liegen. Die Maximallyse ist der Wert, der durch Lyse aller Targetzellen maximal erreicht werden kann. Beim Background handelt es sich um die Fluoreszenz-Aktivität von im zellfreien Überstand eventuell vorhandenen Liganden.

$$\text{Spontanlyse in \%} = \frac{(\text{Spontanlyse} - \text{Background}) \times 100}{(\text{Maximallyse} - \text{Background})}$$

$$\text{Spezifische Lyse in \%} = \frac{(\text{Meßwert} - \text{Spontanlyse}) \times 100}{(\text{Maximallyse} - \text{Spontanlyse})}$$

2.3.1 Vorbereitung der Targetzellen

Als Targetzellen werden transformierte lymphoide Zellen (K562), HLA-freie (LCL-721.221) und HLA-transfizierte Zellen (HLA-Cw6, HLA-Cw7) verwendet. Die Zelllinie K562 ist ein Standard-Target zur Bestimmung der NK-Zell-Zytotoxizität, die anderen Zelllinien dienen den Untersuchungen zur HLA-C-beeinflußten NK-Zell-Aktivität.

Zellkultur

Die Targetzelllinien wachsen in einer Suspensionskultur bei + 37°C in wasserdampfgesättigter 5%iger CO²-Atmosphäre im Brutschrank. Zur Langzeitkultivierung muss das Kulturmedium für K562 10% Fetales Kälberserum (FCS) enthalten

(Stammlösung 3). Dem Medium für die HLA-freien und HLA-C-transfizierten Zellen muss außerdem Hygromycin B zugesetzt werden (Stammlösung 4). Die Bedingungen zum Zellwachstum werden verbessert indem die Zellkonzentration relativ klein gehalten wird. Daher werden die Zellen jeden zweiten Tag in einer Konzentration von ca. $5 - 10 \times 10^4$ Zellen / ml neu ausgesät. Einen Tag vor dem Zytotoxizitätstest werden sie nochmals verdünnt. Dieser Proliferationsreiz wirkt günstig auf den Zustand der Zellen, wodurch die Spontanlyse positiv beeinflusst wird.

BATDA-Markierung der Targetzellen für den Zytotoxizitätstest

Zur schonenden Behandlung der Zellen erfolgen alle Zentrifugationsschritte für 5 min bei 200 g und Bremse 3. Die Zellsuspensionen werden zentrifugiert und die Überstände dekantiert, danach wird die Konzentration mit Stammlösung 5 auf jeweils 10^6 Zellen / ml eingestellt. Pro Target werden 2 ml Zellsuspension (= 2×10^6 Zellen) mit 5 μ l BATDA-Ligand resuspendiert und für 30 min im Brutschrank (+ 37°C, 5% CO₂) inkubiert. Um den BATDA-Liganden aus dem Überstand zu entfernen werden die Targets anschließend fünf mal mit Stammlösung 5 gewaschen. Nach jedem Waschschrift werden die Zellen in ein neues 15 ml Röhrchen überführt, um eine Verunreinigung durch nicht aufgenommenen Liganden zu minimieren. Die Zellen müssen sehr vorsichtig gehandhabt werden, um eine vorzeitige Freisetzung des Liganden zu vermeiden. Im Anschluß an den letzten Waschschrift wird die Zellzahl bestimmt und die Konzentration mit Stammlösung 5 auf 5×10^4 Zellen / ml eingestellt. Dies entspricht einer Konzentration von 5000 Targets / Well bei der Durchführung des Zytotoxizitäts-Testes mit 100 μ l Targetsuspension / Well. Zusätzlich wird von jeder Targetpopulation eine Probe entnommen und separat zentrifugiert. Der Überstand hiervon wird zur Background-Bestimmung verwendet.

2.3.2 Vorbereitung der Effektorzellen

Bei den Effektorzellen handelt es sich um die in den Zellanreicherungen gewonnenen Populationen an CD158b⁺/CD3⁻/CD158a⁻-Zellen, CD158b⁻/CD3⁻/CD158a⁻-Zellen, CD56⁺/CD3⁺-Zellen, CD56⁺/CD3⁻-Zellen und unaufgereinigte PBMNC. Die Zellzahl wird bestimmt, die Konzentration wird mit Stammlösung 5 auf 2×10^6 / ml eingestellt. Die Zentrifugation erfolgt hierbei mit 400 g für 8 Minuten. Anschließend wird eine

Verdünnungsreihe hergestellt, die sich in ihrer Ausgangskonzentration auf die Targetzellkonzentration bezieht, die bei 5×10^4 Zellen / ml liegt. Je nach vorhandener Effektorenanzahl kann die Verdünnungsreihe mit einem E/T-Verhältnis von 80:1, 40:1 oder 20:1 beginnen, was einer Effektorenkonzentration von 4×10^6 / ml, 2×10^6 / ml oder 1×10^6 / ml entspricht.

2.3.3 Durchführung des Zytotoxizitätstest

Es wird eine Mikrotiterplatte mit 96 Rundboden-Kavitäten (= Wells) verwendet.

In der ersten Reihe werden drei Vierfach-Bestimmungen durchgeführt:

1. Background: in die ersten vier Wells werden jeweils 100 μ l Medium und 100 μ l Target-Überstand pipettiert.
2. Spontanlyse: in die folgenden vier Wells werden jeweils 100 μ l Medium und 100 μ l Targetzellsuspension gegeben.
3. Maximallyse: die letzten vier Wells enthalten zusätzlich zu 100 μ l Medium und 100 μ l Targetzellsuspension jeweils 15 μ l Triton.

In den folgenden Reihen werden Dreifach-Bestimmungen durchgeführt. Für jedes E/T-Verhältnis werden jeweils 3 x 100 μ l einer Effektorzellverdünnung mit 3 x 100 μ l Targetzellsuspension angesetzt. Wenn das Assay fertig pipettiert ist, wird die Platte für 2 min bei 100 g mit Bremse 4 an zentrifugiert, anschließend kommt sie zur Inkubation für 2 h in den Brutschrank. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Platte bei obiger Einstellung wiederum an zentrifugiert. Jeweils 20 μ l des Überstandes eines Wells werden in eine neue 96-Lochplatte mit Flachboden pipettiert. Mit der Multipette werden 200 μ l Europium-Lösung jedem Well zugegeben. Nach weiteren 15 Minuten auf dem Schüttler kann das Ergebnis am Fluorometer gemessen und anschließend ausgewertet werden.

2.4 Intrazelluläre Zytokinbestimmung

Zur Bestimmung der Zytokinproduktion von definierten Zellsubpopulationen werden intrazelluläre Zytokinfärbungen in Kombination mit phänotypisierenden Oberflächenfärbungen durchgeführt. Hierzu werden nach Anreicherung von PBMNC

diese zur Zytokinproduktion stimuliert mit PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat), Ionomycin und Monensin. PMA und Ionomycin führen über einen erhöhten Kalziumeinstrom (Ionomycin) oder direkt (PMA) zu einer polyklonalen Aktivierung der Zelle, während Monensin als Protein-Transport-Inhibitor die Zytokinsekretion der Zelle verringert und damit die intrazelluläre Zytokinkonzentration erhöht. Im Anschluß an die Stimulation wird eine Oberflächenfärbung mit fluoreszierenden Antikörpern, die mit den Farbstoffen FITC, PE und PerCP gekoppelt sind, durchgeführt. Es folgt die Fixierung der Oberflächenfärbung und Zellstruktur mit Formaldehyd und Permeabilisierung der Zellmembran mit Saponin-Lösung. Durch die Permeabilisierung der Zellmembran werden Poren geschaffen für den Eintritt der Anti-Zytokin-Antikörper. Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen wird nun eine Inkubation mit humanem IgG₁ angeschlossen. Schließlich werden intrazellulär vorliegende Zytokine mit APC-konjugierten spezifischen Antikörpern angefärbt. Die Immunphänotypisierung der Zellen und Messung ihrer Zytokinproduktion erfolgt mittels Durchflusszytometrie.

2.4.1 Durchführung

Isolierung von mononukleären Zellen wie unter 2.1 beschrieben.

Einstellen der Zellkonzentration auf 10^6 Zellen / ml mit Stammlösung 3.

Stimulation der Zellen

In eine 24-Lochplatte werden 1×10^6 PBMNC = 1 ml Zellsuspension pro Loch vorgelegt. Dann werden 10 ng / ml Zellsuspension PMA, 200 ng / ml Zellsuspension Ionomycin und 3 μ M / ml Zellsuspension Monensin zugegeben und jeweils gut resuspendiert. Es folgt eine Inkubationszeit von 12 h bei + 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank.

Oberflächenfärbung

Aus jedem Ansatz der 24-Lochplatte werden 200 μ l der Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen werden zweimal gewaschen mit jeweils 2 ml kaltem 2%igen FCS-PBS, die Zentrifugationsschritte erfolgen bei 400 g für 5 min bei + 4°C. Der Waschpuffer wird anschließend mit Pasteurpipette und Vakuumpumpe sorgfältig entfernt. Die Oberflächenfärbung wird nun mit jeweils 2 μ l des gewünschten

Antikörpers durchgeführt, es folgen eine Inkubation für 30 min auf Eis und zwei Waschschritte unter denselben Bedingungen wie zuvor, der Waschpuffer wird wieder genau abgenommen.

Fixierung

Zur Fixierung der Zellstruktur inklusive Oberflächenfärbung wird jedem Ansatz jeweils 1 ml kalter 2 %iger para-Formaldehyd-Lösung zugegeben und dann für 45 min auf Eis inkubiert. Es folgen zwei Waschschritte.

Intrazellulärfärbung

Für die Intrazellulärfärbung wird zunächst HumanIgG₁ (vorgegebene Konzentration = 5 mg / ml) mit 0,3%iger Saponin-Lösung um den Faktor 20 verdünnt. Zu jedem Ansatz werden 20 µl HumanIgG₁ pipettiert und anschließend 15 min auf Eis und unter Lichtausschluss inkubiert. Dann wird mit 80 µl des gewünschten spezifischen APC-Antikörpers, der zuvor von der Ausgangskonzentration 0,1 mg / ml mit 0,3%iger Saponin-Lösung um den Faktor 400 verdünnt wurde, gefärbt. Es folgen eine Inkubationszeit von 45 min auf Eis und unter Lichtausschluss und 2 Waschschritte mit 0,1%iger Saponin-Lösung, Zentrifugation bei 400 g und + 4°C für 5 min. Der Waschpuffer muss wieder genau abgenommen werden.

2.4.2 Messung und Auswertung

Bei der durchflusszytometrischen Bestimmung der intrazellulären Zytokinproduktion wird nach folgendem Schema vorgegangen: An unstimulierten Zellen werden zunächst Kontrollmessungen mit dem FACS-Kontroll-Antikörper $\gamma 1/\gamma 2$ durchgeführt, um die Kanäle FL1 (FITC) und FL2 (PE) einzustellen. Anschließend folgen Einzelmessungen für die Kanäle FL3 (PerCP) und FL4 (APC). Anhand von Doppel- und Dreifachfärbungen werden die Kanaleinstellungen nochmals abgeglichen, bevor mit den Messungen am vierfach gefärbten Probenmaterial begonnen wird. Die Vierfachfärbungen erfolgen mit Anti-CD158a-FITC, Anti-CD158b-PE, Anti-CD3-PerCP und jeweils einem Zytokinfärbenden APC-Farbstoff (Anti-IL-2-APC, Anti-IL-5-APC, Anti-IL-10-APC, Anti-IL-12-APC, Anti-IFN γ -APC und Anti-TNF α -APC). Diese Messungen werden am stimulierten Zellmaterial wiederholt.

Bei der Auswertung wird zunächst das phänotypische Muster der Proben bestimmt, indem eine quantitative Untersuchung auf CD3⁺- und CD3⁻-Zellen durchgeführt wird. Diese werden wiederum nach dem Merkmal CD158a⁺ und CD158b⁺ aufgetrennt. Zum Schluss erfolgt die Zuordnung der Zytokin-Messwerte zu den hierdurch ermittelten Zellpopulationen.

Beispiel einer Färbung zum Nachweis der intrazellulären Produktion von Interferon- γ :

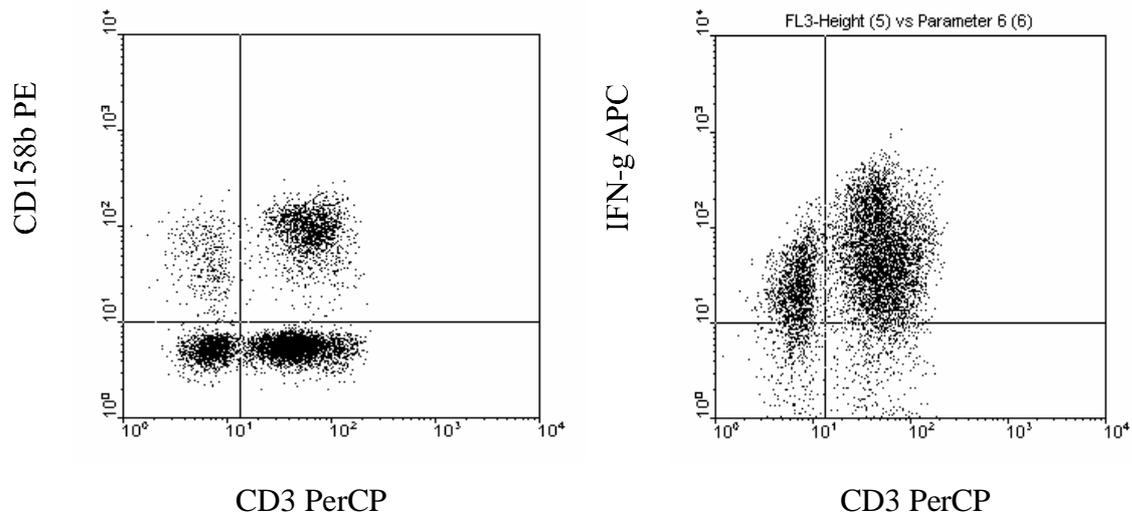


Abbildung 2:

Nachweis von intrazellulärer Produktion von IFN- γ mit phänotypischer Zuordnung.

2.5 Lymphozytenmischkultur

Das Testprinzip beruht auf der Beobachtung, dass antigenreaktive Lymphozyten bei allogener, Antigenpräsentation zur Proliferation stimuliert werden (MLC = Mixed lymphocyte culture). Abhängig von den Differenzen zwischen den HLA-Antigenen und der Reaktionsfreudigkeit der Effektoren kann dies auch in einer Lyse der antigenpräsentierenden Zellen (Stimulatoren) resultieren. Werden Lymphozyten zweier unterschiedlicher Spender miteinander vermischt und sind alle Zellen in funktionsfähigem Zustand, so handelt es sich um eine Zweiweg-MLC. Hierbei stimulieren sich die Populationen gegenseitig, beide können Änderungen in Wachstumsverhalten, Differenzierung und Zytotoxizität zeigen. Wurde eine der beiden

Zellreihen jedoch zuvor bestrahlt, so verliert sie hierdurch ihre Reaktivität und Teilungsfähigkeit bei Erhaltung der Oberflächenstruktur, sie kann also nach wie vor als Stimulus dienen. Hier spricht man von einer Einweg-MLC. [Friemel]

2.5.1 Durchführung

Von zwei verschiedenen Spendern werden PBMNC angereichert und mit Stammlösung 3 auf eine Konzentration von 1×10^6 / ml eingestellt. Es wird die Methode der Einweg-MLC angewendet, die Herstellung der Stimulatoren erfolgt durch Bestrahlung jeweils einer von zwei Lymphozytenpopulationen mit 30 Gy am Telecobalt-Gerät. In eine 24-Lochplatte werden jeweils 1 ml der Stimulator-Population und Effektor-Population pro Loch pipettiert. Es entstehen somit vier Versuchsansätze, jede Lymphozytenpopulation dient in verschiedenen Ansätzen als Effektor oder als Stimulator. Die MLC wird im Brutschrank (+ 37°C, 5% CO₂) aufbewahrt. Am Tag des Ansatzes und an verschiedenen darauffolgenden Tagen werden Proben entnommen, bei denen die Zellzahl bestimmt und eine FACS-Immunphänotypisierung durchgeführt wird.

2.5.2 Bestimmung der intrazellulären Zytokinproduktion nach MLC

Zusätzlich zur Immunphänotypisierung werden die MLC-Ansätze darauf untersucht, ob Interferon- γ , Tumor-Nekrose-Faktor- α oder Interleukin-2 von den aktivierten Lymphozyten produziert werden. Dies geschieht durch eine wie unter 2.5 beschriebene intrazelluläre FACS-Färbung und durch die folgend beschriebene Bestimmung von Interferon- γ im Überstand der MLC.

2.5.3 Bestimmung von Interferon- γ im Überstand der MLC

An verschiedenen fortgeschrittenen Inkubationstagen werden Proben der MLC entnommen und bei 450 g für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, bei - 70°C eingefroren und bei vollständiger Vorlage aller Proben auf Interferon- γ angefärbt. Es wurde der QTF1015 human IFN γ Immunoassay Kit der Firma WAK-Chemie Medical GmbH verwendet. Es handelt sich hierbei um ein Verfahren zur

quantitativen Bestimmung von humanem IFN- γ in Flüssigkeiten auf der Grundlage einer durchflusszytometrischen Immunfluoreszenz-Messung.

Durchführung

Man beginnt mit der Vorbereitung der Standardmessreihe und der zu bestimmenden Proben. Die IFN- γ -Standards besitzen folgende Konzentrationen: 20000 pg / ml, 5000 pg / ml, 1000 pg / ml, 200 pg / ml, 50 pg / ml, 10 pg / ml, 2 pg / ml, 0 pg / ml. Zur Herstellung der Standardmessreihe werden jeweils 500 μ l eines IFN- γ -Standards in FACS-Röhrchen pipettiert. Dasselbe geschieht mit 500 μ l jeder Probe an MLC-Überstand. Die IFN- γ -Capture-Beads werden durch Vortexen resuspendiert, dann werden jedem Ansatz 10 μ l IFN- γ -Capture-Beads zugegeben. Es folgen eine Inkubation für 60 min auf dem Rüttler und zwei Waschschrte mit jeweils 2 ml 1X IFA-Puffer, Zentrifugation bei 500 g für 5 min. Der Waschpuffer wird sorgfältig abgenommen. In jedem FACS-Röhrchen werden nun 10 μ l Anti-IFN- γ -Antikörper pipettiert, wieder wird für 30 min auf dem Rüttler inkubiert, anschließend einmal gewaschen und zentrifugiert wie zuvor. Das Zellpellet wird in 200 μ l PBS resuspendiert und kann nun durchflusszytometrisch gemessen werden.

Auswertung

Die Messwerte der Standardmessreihe ergeben bei doppelt logarithmischer Darstellung gegen die IFN- γ -Konzentration eine Standardkurve, anhand derer die IFN- γ -Konzentration der Proben an MLC-Überstand bestimmt werden kann.

3 Material

3.1 Allgemeine Geräte und Laborartikel

| | |
|--|-------------------|
| Sterile Werkbank Mobilien W 90 | Waldner |
| Sterile Werkbank | Heraeus |
| Zentrifugen Rotina 48R und Rotixa RP | Hettich |
| Vortexer VF 2 | Janke & Kunkel |
| Dreh-Schüttler | Heidolph |
| Waage | Sartorius |
| Heizbad | Köttermann |
| Cellcounter H3 | Bayer |
| Cellcounter Advia 120 | Bayer |
| Brutschrank | Heraeus |
| Zellkulturflaschen 50 ml, 250 ml | Greiner |
| Pipettiergerät Pipettboy Plus | Tecnomara |
| Pipettiergerät Fireboy | Tecnomara |
| Pipettiergerät Multipette plus | Eppendorf |
| Pipetten | Gilson |
| Pipettenspitzen | Sarstedt, Greiner |
| Röhrchenständer | Nalgene |
| Sterile Polyesterol-Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml | Greiner |
| Butterfly-21 | Abbott |
| Kanülen | Braun |
| Einmalspritzen (5 ml, 10 ml, 50 ml) | Braun |
| Desinfektionsspray | Braun |
| Handschuhe | Safeskin |
| Eppendorf-Röhrchen | Eppendorf |
| Mikrolance 3 | Becton Dickinson |

3.2 Allgemeine Reagenzien

| | |
|--|-------------------|
| PBS-Spezial (Phosphat Buffered Saline) | Life Technologies |
| EDTA (250 mmol, pH 8,0) | Univ. Apotheke |
| Bovine serum albumine (BSA) 7,5% | Life Technologies |
| Hepes-Puffer | Gibco |
| RPMI 1640-Medium | Biochrom |
| Fetales Kälberserum (FCS) | Seromed |
| L-Glutamin | Seromed |
| Penicillin / Streptomycin | Seromed |
| Hygromycin | Sigma |
| Aqua destillata | Fresenius |
| Heparin | Sigma |

3.3 Hard- und Software

| | |
|-------------------------------|------------------|
| PC & Drucker Laser Jet 4 Plus | Hewlett-Packard |
| PC Lysis II | Becton Dickinson |
| HP Reader | Hewlett-Packard |
| PC Macintosh | Apple |
| CellQuest | Apple |
| Word 6.0 | Microsoft |
| Excel 5.0 | Microsoft |
| WinMDI | Joseph Trotter |

3.4 Mikroskopie

| | |
|---|--------------|
| Lichtmikroskop (Zellzahlbestimmung) | Olympus |
| Inversionsmikroskop (Zellkulturbeobachtung) | Olympus |
| Neubauer Zählkammer | Brandt |
| Objektträger 76 x 26 mm | Langenbrinck |
| Deckgläser | Knittel |
| Trypanblau (0,4%) | Sigma |

3.5 Stammlösungen

Stammlösung 1: Wasch-Puffer

- 500 ml PBS-Spezial
- + 10,6ml EDTA (250 mM)

Stammlösung 2: MACS-Puffer (entgast)

- PBS-Spezial
- + 10,6 ml EDTA (250 mM)
- + 36,5 ml BSA (7,5%)
- 20 min. in ein Ultraschallbad zur Entgasung

Stammlösung 3: Medium für Zellkultivierung

(K562, MLC und intrazelluläre Zytokinfärbung)

- RPMI 1640
- + 5 ml L-Glutamin (200 mM)
- + 5 ml Penicillin (10000 U/ ml) / Streptomycin (10000 µg/ ml)
- + 12,5 ml Hepes-Puffer (25 mM)
- + 50 ml Fetales Kälberserum (FCS)

Stammlösung 4: Medium für Zellkultivierung

(HLA-CW6, HLA-CW7, LCL 721.221)

- 48 ml Stammlösung 3
- + 2 ml Hygromycin B (100 µg/ ml)

Stammlösung 5: Medium für BATDA-Assay

- RPMI 1640
- + 5 ml L-Glutamin (200 mM)
- + 5 ml Penicillin (10000 U/ ml) / Streptomycin (10000 µg/ ml)
- + 12,5 ml Hepes-Puffer (25 mM)
- + 50 ml Fetales Kälberserum, inaktiviert (30 min. bei 56°C)

3.6 Spezielle Materialien für die Isolierung von mononukleären Zellen

Probenmaterial

| | |
|---------------------|---------------------|
| Buffy Coats | Blutbank Tübingen |
| Peripheres Vollblut | Freiwillige Spender |

Reagenzien

| | |
|---------------|---------|
| Stammlösung 1 | |
| Lymphoprep | Nyegard |

3.7 Spezielle Materialien für die immunomagnetische Zellanreicherung

Geräte und Laborartikel

| | |
|---|-----------------|
| Vario MACS / Mini MACS (Magnete) | Miltenyi Biotec |
| MACS-Separation Columns VS ⁺ (10 ⁸ Zellen) / MS ⁺ (10 ⁷ Zellen) | Miltenyi Biotec |
| Ultraschallbad Sonorex Super RK 106 | Bandelin |
| Nylon-Zellfilter (40 µm) | Falcon |
| Filterpapiere | Shandon |

Reagenzien und Antikörper

| | |
|--|------------------|
| Stammlösung 2 | |
| Stammlösung 3 | |
| Polyglobulin | Alpha |
| CD56-Multisort Kit (Microbeads und Reagenzien) | Miltenyi Biotec |
| CD3-Multisort Kit (Microbeads und Reagenzien) | Miltenyi Biotec |
| Anti-CD3 unmarkiert (IgG1 / OKT3) | Becton-Dickinson |
| Anti-CD158a unmarkiert (IgG1) | Becton-Dickinson |
| Anti-CD158b unmarkiert (IgG1) | Becton-Dickinson |
| Goat-Anti-Mouse-Microbeads | Miltenyi Biotec |
| Rat-Anti-Mouse-Microbeads | Miltenyi Biotec |

3.8 Spezielle Materialien für die Immunphänotypisierung

Geräte und Laborartikel

| | |
|--------------------------------|------------------|
| FACScan-Flowcytometer | Becton-Dickinson |
| FACS Calibur | Becton-Dickinson |
| FACS-Röhrchen 12 x 75 mm spitz | Greiner |

Reagenzien und Antikörper

| | |
|---|---------------------|
| Mausserum | |
| Kontroll Antikörper $\gamma 1/\gamma 2$ Simultest | Becton-Dickinson |
| Anti-CD3-FITC (IgG1) | Becton-Dickinson |
| Anti-CD3-PE (IgG1) | Becton-Dickinson |
| Anti-CD3-PerCP (IgG1) | Becton-Dickinson |
| Anti-CD3-APC (IgG1) | Becton-Dickinson |
| Anti-CD56-FITC (IgG1 / NCAM 16.2) | Becton-Dickinson |
| Anti-CD56-PE (IgG1 / Leu TM 19) | Becton-Dickinson |
| Anti-CD56-PE (IgG1 / NCAM 16.2) | Becton-Dickinson |
| Anti-CD94-PE (IgG1) | Immunotech |
| Anti-CD158a-FITC (IgG1) | Becton-Dickinson |
| Anti-CD158a-PE (IgG1) | Immunotech |
| Anti-CD158b-PE (IgG1) | Immunotech |
| Goat-Anti-Mouse-FITC (IgG1) | Becton-Dickinson |
| Anti-HLA-A,B,C-FITC (w6/32) | Harlan Sera-Lab Lt. |
| Anti-DX9-PE (IgG1) | Becton-Dickinson |

3.9 Spezielle Materialien für die Zytotoxizitätsbestimmung

Geräte und Laborartikel

| | |
|--|------------|
| Zytotox-Fluorometer 1230 Arcus | LKB-Wallac |
| 96-Loch-Mikrotiterplatten (Rund- und Flachboden) | Greiner |
| Multititer-Ranks (12 Maxisorp) | Nunc |

Reagenzien

Stammlösung 5

BATDA-Ligand

Delfia

EU-Solution

Delfia

Triton X-100 (10%)

Sigma

Zellreihen

Standard-NK-Zell-Target K562.

EBV-transformierte B-Lymphoblastoid Zelllinie LCL-721.221.

LCL-721.221 transfiziert mit HLA-Cw6, HLA-Cw7.

3.10 Spezielle Materialien für die intrazelluläre Zytokinbestimmung

Geräte und Laborartikel

Pasteurpipette

Vakuumpumpe

Pfeiffer Vacuum

Reagenzien und Antikörper

Stimulatoren PMA, Ionomycin, Monensin

Pharmingen

DMSO (Dimethylsulfoxid)

Sigma

PFA (Paraformaldehyd)

Sigma

Saponin-Lösung

Pharmingen

Anti-CD158a-FITC

Becton-Dickinson

Anti-CD158b-PE

Immunotech

Anti-CD3-PerCP

Becton-Dickinson

Anti-IL-2-APC

Pharmingen

Anti-IL-5-APC

Pharmingen

Anti-IL-10-APC

Pharmingen

Anti-IL-12-APC

Pharmingen

Anti-IFN γ -APC

Pharmingen

Anti-TNF α -APC

Pharmingen

3.10.1 Herstellung der Stimulatoren

PMA:

In DMSO gelöstes PMA wird bei -77°C aufbewahrt, aliquotiert à $10\ \mu\text{l}$ ($c = 2\ \text{mg} / \text{ml} \cong 20\ \mu\text{g PMA} / \text{Aliquot}$). Bei Bedarf wird ein Aliquot mit PBS auf $2\ \text{ml}$ aufgefüllt ($c = 20\ \mu\text{g} / 2\ \text{ml} \cong 10000\ \text{ng} / \text{ml}$). Davon werden $100\ \mu\text{l}$ abgenommen und auf $1\ \text{ml}$ aufgefüllt ($c = 1000\ \text{ng} / \text{ml}$). Jeweils $10\ \mu\text{l}$ werden entnommen und der Zellsuspension zugegeben, dies ergibt die erforderliche Konzentration von $10\ \text{ng} / \text{ml}$ Zellsuspension.

Ionomycin:

In DMSO gelöstes Ionomycin wird bei -25°C aufbewahrt, aliquotiert à $10\ \mu\text{l}$ ($c = 1\ \text{mg} / \text{ml} \cong 10\ \mu\text{g Ionomycin} / \text{Aliquot}$). Bei Bedarf wird ein Aliquot mit PBS auf $500\ \mu\text{l}$ aufgefüllt ($c = 20\ \mu\text{g} / \text{ml} \cong 20000\ \text{ng} / \text{ml}$). Davon werden jeweils $10\ \mu\text{l}$ entnommen und der Zellsuspension zugegeben, dies ergibt die erforderliche Konzentration von $200\ \text{ng} / \text{ml}$ Zellsuspension.

Monensin:

In PBS gelöstes Monensin wird bei -25°C aufbewahrt, aliquotiert à $10\ \mu\text{l}$ ($c = 150\ \mu\text{M} / \text{Aliquot}$). Bei Bedarf wird ein Aliquot mit PBS auf $500\ \mu\text{l}$ aufgefüllt ($c = 3\ \mu\text{M} / \text{Aliquot}$). Daraus werden jeweils $10\ \mu\text{l}$ entnommen der Zellsuspension zugegeben, dies ergibt die erforderliche Konzentration von $3\ \mu\text{M} / \text{ml}$ Zellsuspension.

3.10.2 Herstellung des Fixators

Zur Herstellung des Fixators para-Formaldehyd (PFA) (2%) wird $1\ \text{g PFA}$ in $50\ \text{ml PBS}$ aufgenommen und bei 60°C im Wasserbad aufgelöst.

3.10.3 Herstellung des Waschpuffers

Zur Herstellung des Waschpuffers FCS-PBS (2%) werden $10\ \text{ml FCS}$ zu $500\ \text{ml PBS}$ gegeben.

3.10.4 Herstellung des Permeabilisators

1 g Saponin (10%-Lösung) wird in 10 ml PBS aufgenommen und bei 37°C im Wasserbad aufgelöst. Daraus werden Lösungen mit Konzentrationen von 0,3% und 0,1% hergestellt.

3.11 Spezielle Materialien für die MLC

Geräte und Laborartikel

Telecobaltgerät Gammacell Elite

MDS Nordion

24-Loch-Platten

Greiner

Reagenzien

Stammlösung 3

3.12 Spezielle Materialien zur IFN- γ -Bestimmung im Überstand der MLC

Reagenzien

QTF 1015 human INF- γ Immunoassay Kit:

WAK-Chemie Medical GmbH

INF- γ -Standards: 20000 pg / ml,
5000 pg / ml
1000 pg / ml
200 pg / ml
50 pg / ml
10 pg / ml
2 pg / ml
0 pg / ml

IFN- γ -Capture-Beads

10X IFA-Puffer

Anti-IFN- γ -Antikörper, PE-konjugiert

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung von CD158b⁺/CD3⁻/CD158a⁻-NK-Zellen

4.1.1 Prinzip

Zur spezifischen Untersuchung der zytotoxischen Aktivität von CD158b⁺-NK-Zellen, die nur diesen KIR-Rezeptor exprimieren, nicht aber CD158a, musste zunächst eine Methode zur Anreicherung dieser KIR-Subpopulation entwickelt werden. Folgende Vorgehensweise wurde gewählt:

- Isolierung von mononukleären Zellen (PBMNC) aus peripherem Vollblut.
- Depletion von CD3⁺- und CD158a⁺-Zellen durch Markierung der PBMNC mit Anti-OKT3 (unmarkiert) und Anti-CD158a (unmarkiert) und Zugabe von Goat-Anti-Mouse-Microbeads.
- Isolierung von CD158b⁺-NK-Zellen durch Markierung der CD3⁻/CD158a⁻-Zellsuspension mit Anti-CD158b (unmarkiert) und Anreicherung mit Rat-Anti-Mouse-Microbeads.

Bei dieser Methode wurde auf eine CD56⁺-Anreicherung verzichtet. Die genaue Durchführung der immunomagnetischen Anreicherung ist ausführlich im Methodenteil beschrieben.

4.1.2 Ergebnisse

Die beschriebene Methode konnte soweit optimiert werden, dass die gewonnene Anzahl an CD158b⁺/CD3⁻/CD158a⁻-Zellen zur Durchführung von Zytotoxizitätsassays verwendet werden konnte.

4.1.2.1 PBMNC-Isolierung

Die Tabelle 1 und Abbildung 3 zeigen die Ergebnisse nach PBMNC-Isolierung. Es wurden insgesamt 17 Buffy Coats eingesetzt. Die ersten drei davon wurden einzeln

angereichert, danach wurden die Versuche mit Pools aus jeweils zwei Buffy Coats durchgeführt. Die Anreicherung wurde daher insgesamt 10 mal durchgeführt. Die errechnete PBMNC-Gesamt-Zellzahl wurde gemittelt aus den 17 Buffy-Coat-Isolaten nach Auswertung des Differential-Blutbildes, d.h. in Bezug auf die Lymphozytenzahl. Die weiteren Werte beziehen sich auf die tatsächlich weiterverwendeten PBMNC-Isolate, d.h. unter Einbeziehung der Pools. Bei den prozentualen Anteilen an CD158a und CD158b wurden Doppelfärbungen mit einbezogen, es handelte sich also nicht um einfach positive KIR-Populationen.

| Gesamt-Zellzahl | Anteil an CD3 ⁺ | Anteil an CD158a ⁺ | Anteil an CD158b ⁺ |
|------------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 720 x 10 ⁶ | 76,8% | 3,0% | 5,0% |
| (570-880 x 10 ⁶) | (71,1-84,7%) | (0,9-8,1%) | (3,1-7,8%) |
| (n=17) | (n=10) | | |

Tabelle 1: Quantitative Auswertung nach PBMNC-Isolierung.

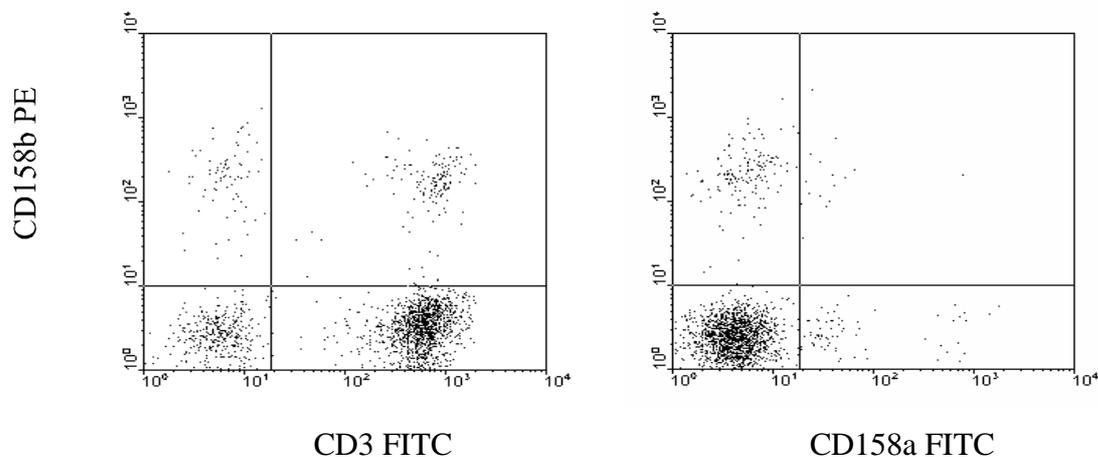


Abbildung 3: Zellpopulation nach PBMNC-Isolierung.

4.1.2.2 CD3/CD158a-Depletion

Die Tabelle 2 und die Abbildung 4 zeigen die Ergebnisse der Auswertung der zehn Versuche nach Depletion der CD3⁺/CD158a⁺-Zellen. Die gemittelte Gesamt-Zellzahl und der Wert für die Ausbeute aus PBMNC beziehen sich auf die Anzahl von 17 ursprünglich vorhandenen Buffy Coats, die für diese Versuche verwendet wurden. Die

weiteren Werte nehmen Bezug auf die durch die Depletion erhaltene CD3⁻/CD158a⁻-Zellpopulation. Wie man aus Tabelle 2 und Abbildung 4 erkennen kann, war die Depletion von CD3⁺- und CD158a⁺-Zellen im allgemeinen sehr erfolgreich, nur geringe Anteile dieser beiden Zellpopulationen verblieben im Eluat. Die eluierte Zellfraktion bestand zu einem Großteil aus CD56⁺-Zellen, die darin enthaltenen CD158b⁺-Zellen waren fast vollständig CD56⁺.

| Zellzahl nach Depletion | Ausbeute aus PBMNC | Anteil an CD3 ⁺ | Anteil an CD158a | Anteil an CD158b ⁺ |
|---|---------------------|----------------------------|--------------------|-------------------------------|
| 44,6 x 10 ⁶ (13,0-116,0 x 10 ⁶) | 5,8% (1,5-14,9%) | 3,0% (0,86-4,9%) | 1,1% (0,0-4,9%) | 9,9% (4,0%-15,6%) |
| (n=17) | (n=10) | | | |

Tabelle 2: Quantitative Auswertung nach CD3/CD158a-Depletion.

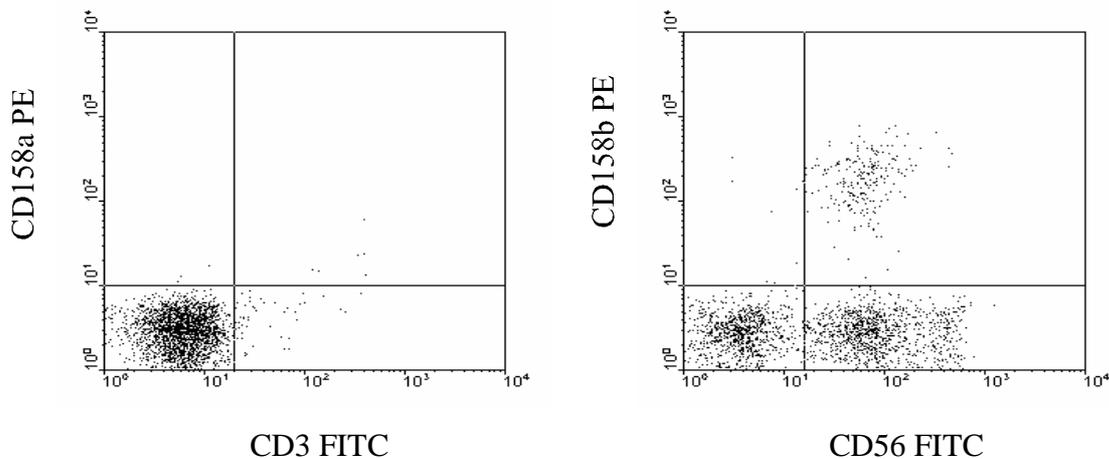


Abbildung 4: Zellpopulation nach CD3/CD158a-Depletion.

4.1.2.3 CD158b-Anreicherung (CD158b⁺/CD3⁻/CD158a⁻-NK-Zellen)

Die Tabelle 3 und die Abbildungen 5 und 6 zeigen die Ergebnisse der CD158b⁺-Anreicherung aus der zuvor erhaltenen CD3⁻/CD158a⁻-Zellfraktion. Die Zellzahl bezieht sich wiederum auf die aus 17 Buffy Coats durchschnittlich eluierte Zellzahl, die weiteren Daten auf die 10 Versuchsansätze, die phänotypisch untersucht wurden.

| Zellzahl nach Anreicherung | Ausbeute aus CD158b ⁺ in PBMNC | Ausbeute aus CD158b ⁺ nach Depletion |
|--|---|---|
| 0,95 x 10 ⁶ (0,2-2,7 x 10 ⁶) | 2,7% (0,4-7,0%) | 28,7% (13,1-47,1%) |

(n=17)

(n=10)

| Anteil an CD3 ⁺ | Anteil an CD158a ⁺ | Anteil an CD56 ⁺ /CD158b ⁺ | Reinheit CD158b ⁺ /CD3 ⁻ /CD158a ⁻ |
|----------------------------|-------------------------------|--|---|
| 2,1% (0,8%-4,0%) | 1,7% (0,0%-7,2%) | 82,2% (65,1%-95,1%) | 85,6% (72,7%-93,5%) |

(n=10)

Tabelle 3: Quantitative Auswertung nach CD158b-Anreicherung.

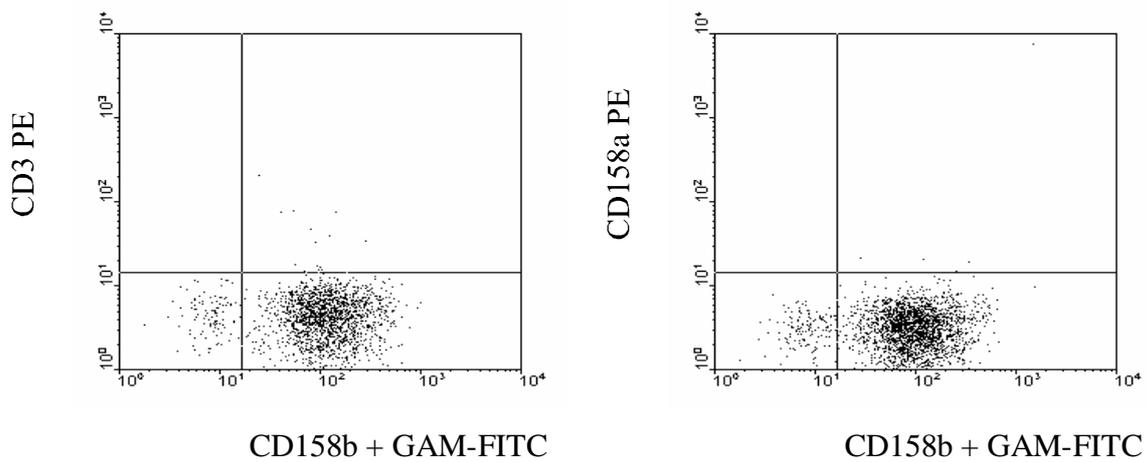


Abbildung 5: Zellpopulation nach CD158b-Anreicherung.

Anteil an CD3⁺- und CD158a⁺- Zellen.

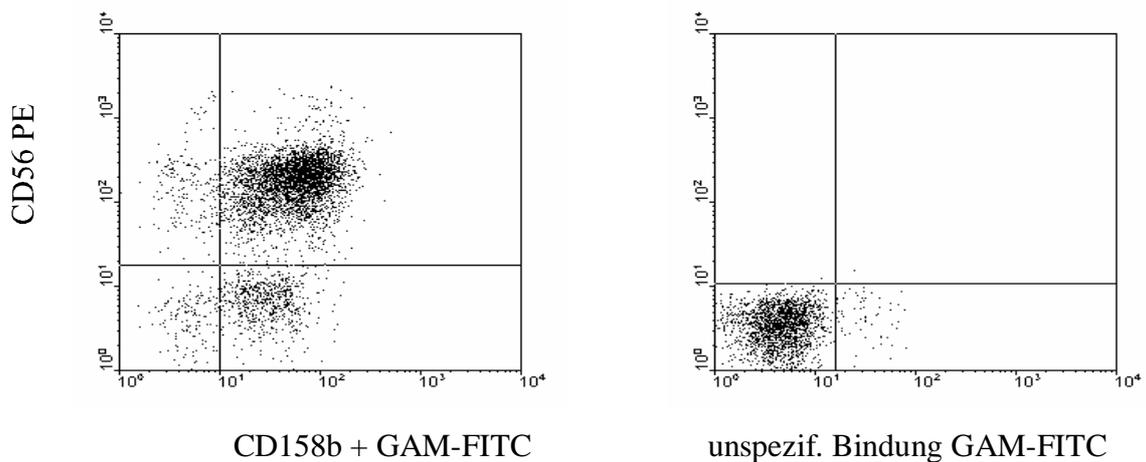


Abbildung 6: Zellpopulation nach CD158b-Anreicherung.

Anteil an CD56⁺-Zellen.

4.2 Isolierung von CD56⁺/CD3⁻-NK-Zellen und CD56⁺/CD3⁺-T-Zellen

4.2.1 Prinzip

Zur spezifischen Untersuchung der zytotoxischen Aktivität von CD56⁺/CD3⁻-NK-Zellen und CD56⁺/CD3⁺-T-Zellen gegen K562, LCL 721.221, HLA-Cw6- und HLA-Cw7-transfizierte Zellen mussten diese beiden Zellfraktionen angereichert werden. Folgende Vorgehensweise wurde gewählt:

- Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Vollblut.
- Durchführung einer MACS-Anreicherung von CD56⁺-Zellen.
- Separation der CD56⁺/CD3⁺- und CD56⁺/CD3⁻-Zellpopulationen, ebenfalls durch magnetische Zellsortierung.

Die genaue Durchführung ist ausführlich im Methodenteil beschrieben.

4.2.2 Ergebnisse

4.2.2.1 PBMNC-Isolierung

Die Tabelle 4 und Abbildung 7 zeigen die Ergebnisse nach PBMNC-Isolierung. Es wurden sechs Versuche durchgeführt.

| Gesamt-Zellzahl | Anteil an CD56 ⁺ -Zellen | Anteil an CD3 ⁺ -Zellen | Anteil an CD56 ⁺ /CD3 ⁺ -Zellen |
|--|-------------------------------------|------------------------------------|---|
| 909 x 10 ⁶ (620-1131 x 10 ⁶) | 30% (21,7-37,6%) | 64% (55,5-69,0%) | 6,2% (4,8-7,7%) |

(n=6)

Tabelle 4: Quantitative Auswertung nach PBMNC-Isolierung.

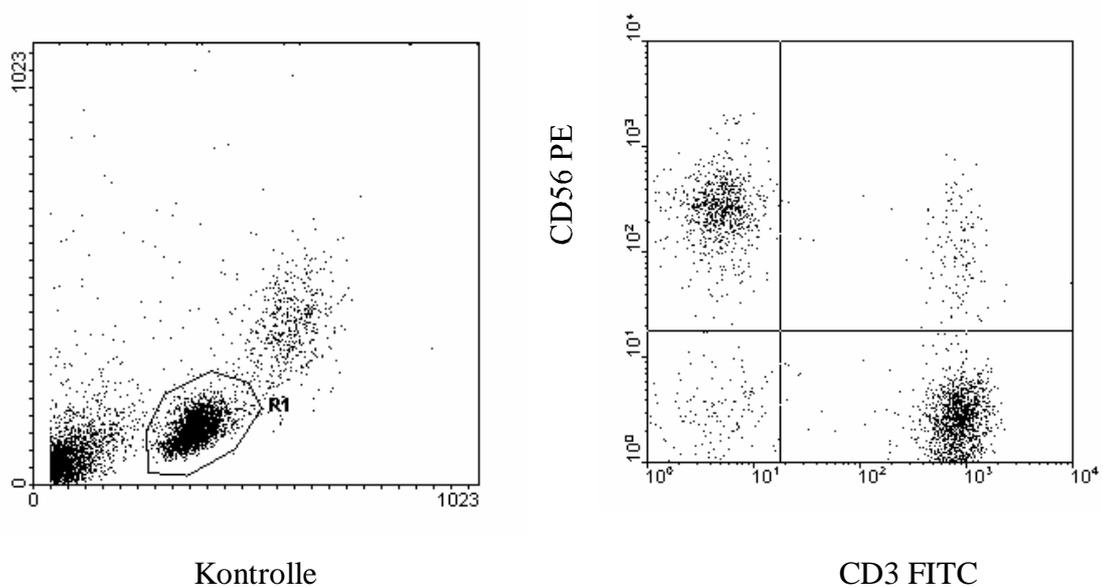


Abbildung 7: Zellpopulation nach PBMNC-Isolierung.

4.2.2.2 CD56⁺-Isolierung

Die Anreicherung der CD56⁺-Zellen funktionierte zuverlässig. Tabelle 5 und Abbildung 8 zeigen die Ergebnisse.

| Gesamt-Zellzahl | Ausbeute aus CD56 ⁺ -PBMNC | Reinheit |
|--------------------------------|---------------------------------------|----------------|
| 50,5 x 10 ⁶ | 29,4% | 99,5% |
| (22,3-95,0 x 10 ⁶) | (19,0%-40,8%) | (97,84-99,98%) |

(n=6)

Table 5: Quantitative Auswertung nach CD56⁺-Anreicherung.

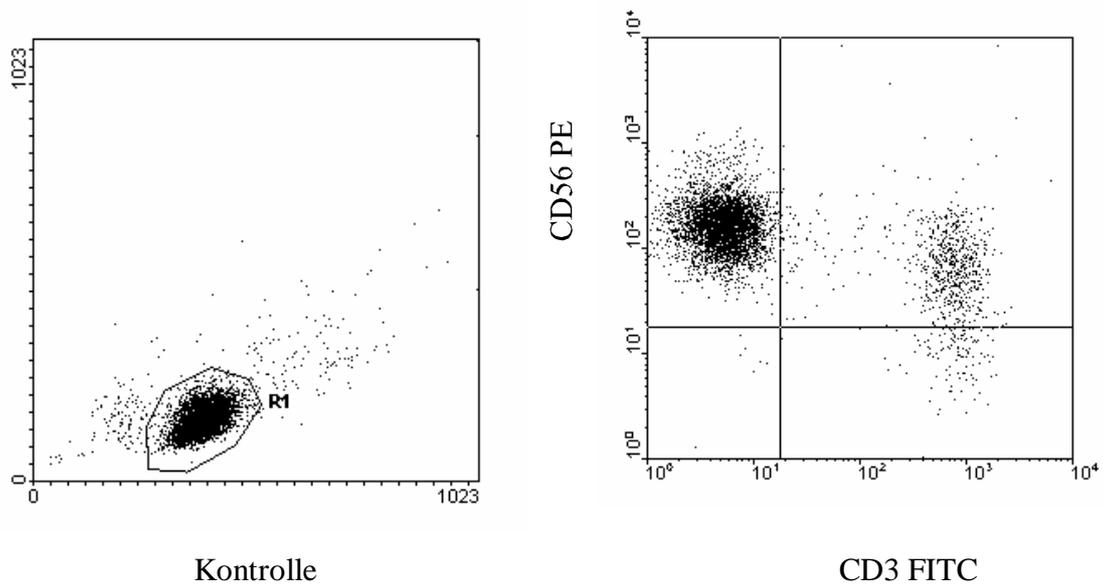


Abbildung 8: Zellpopulation nach 56⁺-Anreicherung.

4.2.2.3 Auftrennung in die CD56⁺/CD3⁺- und CD56⁺/CD3⁻-Zellfraktionen

Die Ergebnisse der Anreicherung von CD56⁺/CD3⁺-T-Zellen und CD56⁺/CD3⁻-NK-Zellen waren zufriedenstellend. Einzig eine CD56⁺/CD3⁺-Anreicherung ergab nur eine Reinheit von 52,3%.

| | Gesamt-Zellzahl | Ausbeute aus CD56 ⁺ , jew. bez. auf CD56 ⁺ /CD3 ⁺ -Anteil bzw. CD56 ⁺ /CD3 ⁻ -Anteil resp. | Reinheit |
|-------------------------------------|---|---|-----------------------|
| CD56 ⁺ /CD3 ⁺ | 10,6 x 10 ⁶ (3,3-20,4 x 10 ⁶) | 44,5% (27,4%-59,4%) | 82,7% (52,3-96,9%) |
| CD56 ⁺ /CD3 ⁻ | 15,6 x 10 ⁶ (4,8-32,0 x 10 ⁶) | 40,2% (29,7%-49,3%) | 95,3% (82,9-99,2%) |

(n=6)

Tabelle 6: Quantitative Auswertung CD56⁺/CD3⁺- und CD56⁺/CD3⁻-Zellpopulationen.

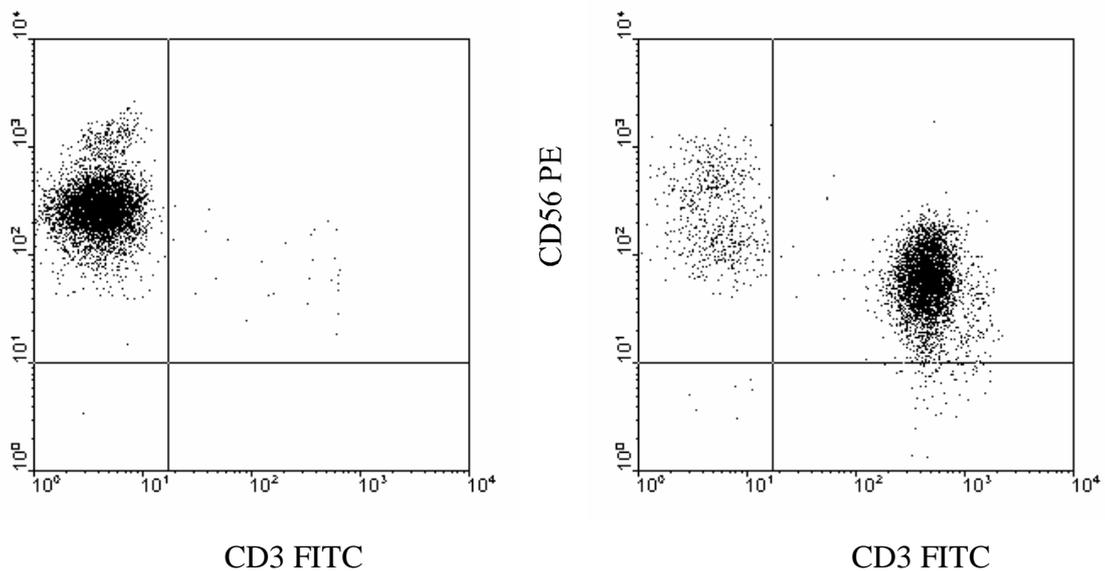


Abbildung 9: Zellpopulationen an CD56⁺/CD3⁻-NK-Zellen und CD56⁺/CD3⁺-T-Zellen.

4.3 Zytotoxizität der angereicherten Zellpopulationen

Die Zytotoxizität der CD158b⁺/CD3⁻/CD158a⁻-NK-Zellen wurde gegenüber folgenden Targets untersucht: K562, LCL 721.221, HLA-Cw6, HLA-Cw7. Ziel der Anreicherung von CD56⁺/CD3⁻-NK-Zellen und CD56⁺/CD3⁺-T-Zellen war es, anhand von Zytotox-Versuchen gegen dieselben Targetzelllinien eine Aussage über die zytotoxische Potenz dieser Zellpopulationen treffen zu können. Dadurch sollte vor allem ein Vergleich zu der Zytotoxizität der CD158b⁺/CD3⁻/CD158a⁻-NK-Zellen ermöglicht werden.

4.3.1 Versuchsaufbau

Die Untersuchungen erfolgten anhand der BATDA-Methode. Aufgrund der niedrigen Zellzahlen bei den CD158b⁺-Anreicherungen wurden die Zytotox-Versuche dieser Zellpopulation mit einem E/T-Verhältnis von 20:1 - 2,5:1 durchgeführt. Die Zytotox-Versuche der CD56⁺/CD3⁻-NK-Zellen und der CD56⁺/CD3⁺-T-Zellen wiederum wurden aufgrund der günstigen Zellzahlen mit E/T-Verhältnissen von 40:1 - 5:1 angesetzt. Daher besteht nun der Sachverhalt, dass für alle vorhandenen Zellpopulationen einzig bei E/T-Verhältnissen von 20:1, 10:1 und 5:1 Daten ubiquitär präsent sind. Diese Werte sind in den Abbildungen schwarz hinterlegt. Die E/T-Verhältnisse, die nur bei einem Teil der Effektoren vorhanden sind, sind grau hinterlegt. Da jede Versuchsreihe einzeln für sich betrachtet eine gleichmäßige Abnahme der Lyseraten zeigt, scheint es gerechtfertigt, die Versuche trotz dieses etwas eingeschränkten Bereiches miteinander zu vergleichen. Die Abbildungen im folgenden enthalten die zusammengefaßten Versuchsergebnisse.

Bei den Effektoren handelt es sich um folgende Populationen:

- NK-Zellen (CD56⁺/CD3⁻)
- KIR⁺-NK-Zellen (CD158b⁺/CD158a⁻/CD56⁺/CD3⁻)
- KIR⁻-NK-Zellen (CD158b⁻/CD158a⁻/CD56⁺/CD3⁻)
- T-Zellen (CD56⁺/CD3⁺)
- PBMNC

4.3.2 Zytotoxische Aktivität gegen HLA-Cw6-transfizierte Zellen

Die zytotoxische Aktivität der Effektoren gegen HLA-Cw6-transfizierte Zellen war durchweg gering. Spontanlyse: 17,8%-34,8%. n = 6.

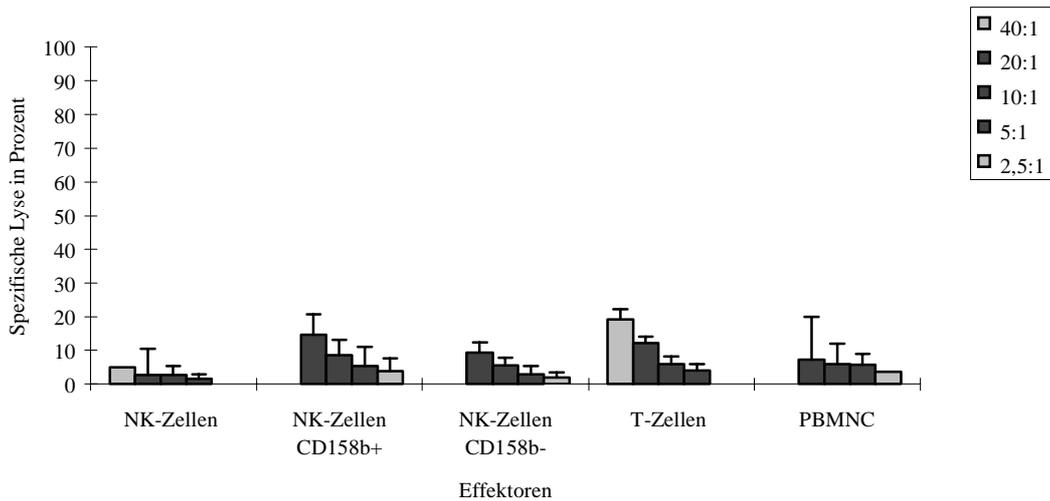


Abbildung 10: Zytotoxische Aktivität gegen HLA-Cw6-transfizierte Zellen.

4.3.3 Zytotoxische Aktivität gegen HLA-Cw7-transfizierte Zellen

CD56⁺-angereicherte NK-Zellen nach CD3-Depletion zeigten die besten Lyseraten gegen HLA-Cw7-transfizierte Zellen, gefolgt von KIR⁻ NK-Zellen.

Spontanlyse: 21,6%-26,7%. n = 6.

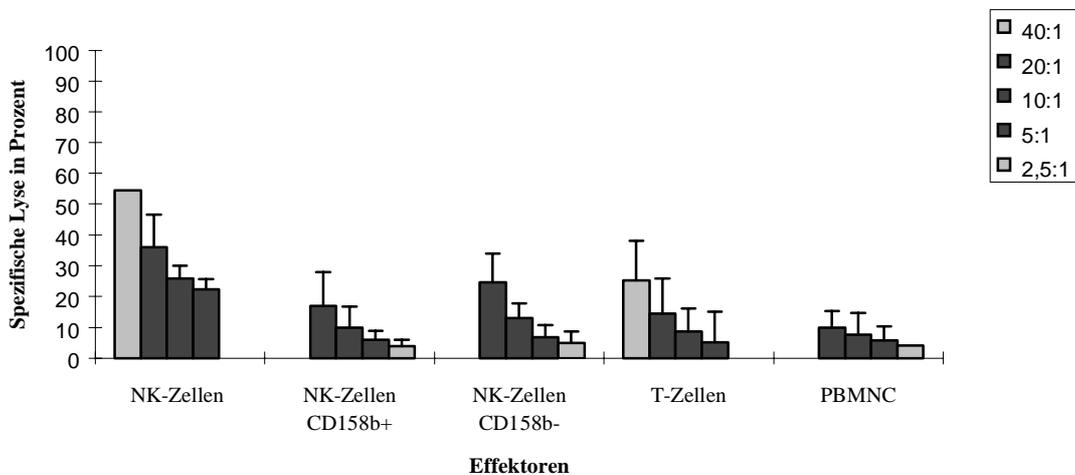


Abbildung 11: Zytotoxische Aktivität gegen HLA-Cw7-transfizierte Zellen.

4.3.4 Zytotoxische Aktivität gegen K562

Auch gegenüber der Zelllinie K562 zeigten CD56⁺-angereicherte NK-Zellen nach CD3-Depletion die besten Ergebnisse, wiederum gefolgt von KIR⁻-NK-Zellen und KIR⁺-NK-Zellen. Spontanlyse: 16,5%-18,9%. n = 6.

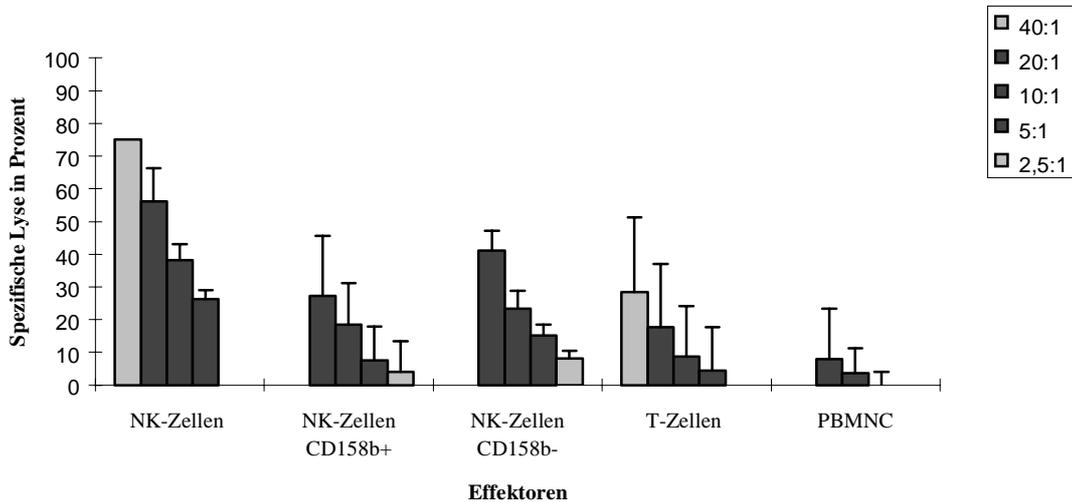


Abbildung 12: Zytotoxische Aktivität gegen K562.

4.3.5 Zytotoxische Aktivität gegen LCL 721.221

Gegen die theoretisch HLA-freie Zelllinie LCL 721.221, die als Standardtarget zur Bestimmung der NK-Zellaktivität verwendet wird, konnte keine lytische Aktivität nachgewiesen werden. Bei der phänotypischen Kontrolle der Targetzellen zeigte sich, dass die Zellen entgegen der Annahme HLA-positiv waren.

Spontanlyse: 19,2%-30,3%. n = 6.

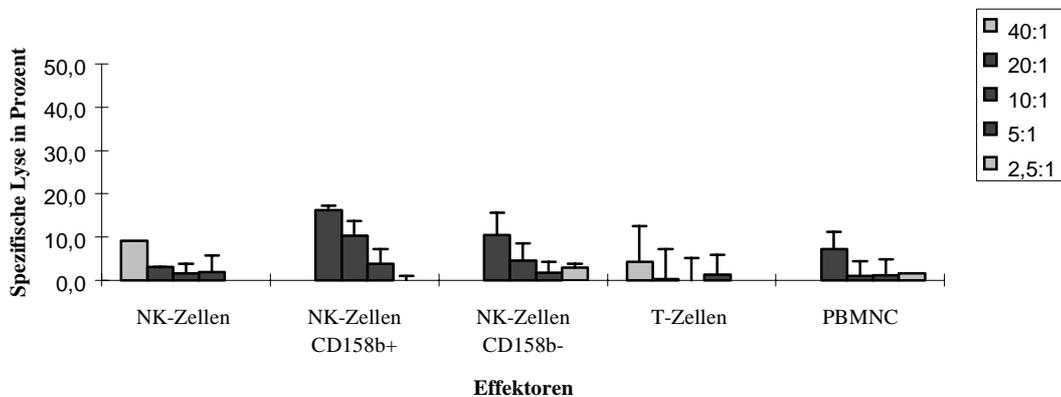


Abbildung 13: Zytotoxische Aktivität gegen LCL 721.221.

4.4 Nachweis von intrazellulärer Zytokinproduktion

4.4.1 Intrazelluläre Zytokinproduktion nach chemischer Stimulation

In fünf Versuchsansätzen wurden $CD56^+$ -angereicherte Lymphozyten phänotypisch untersucht. Anschließend wurde die intrazelluläre Produktion von IL-2, IL-5, IL-10, IL-12, IFN- γ und TNF- α durchflusszytometrisch bestimmt. Die genaue Durchführung der Stimulation und Färbung der Zellen ist ausführlich im Methodenteil beschrieben. Ebenso die Durchführung der anschließenden durchflusszytometrischen Untersuchungen mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen. Die Abbildungen zeigen den prozentualen Anteil der phänotypisch bestimmten Zellpopulationen, die das jeweilige Zytokin produzieren. Da die Ergebnisse teilweise stark differieren, werden die Werte nicht zusammengefaßt sondern einzeln dargestellt. Bei der phänotypischen Untersuchung zeigte sich zunächst, dass der Blutspender von Versuch 4 keinen $CD158a^+$ -KIR exprimiert. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die $CD158a^+$ -Zellen des Blutspenders für Versuch 5 nach Stimulation nicht mehr nachweisbar waren.

4.4.1.1 Interleukin-2

Die Produktion von IL-2 konnte nur in sehr geringem Maße nachgewiesen werden. Einzig bei $CD56^+$ -T-Zellen konnte mit diesem Versuchsansatz eine schwache IL-2-Produktion gezeigt werden. Der Höchstwert lag bei 9,4% der T-Zellen in Versuch 1.

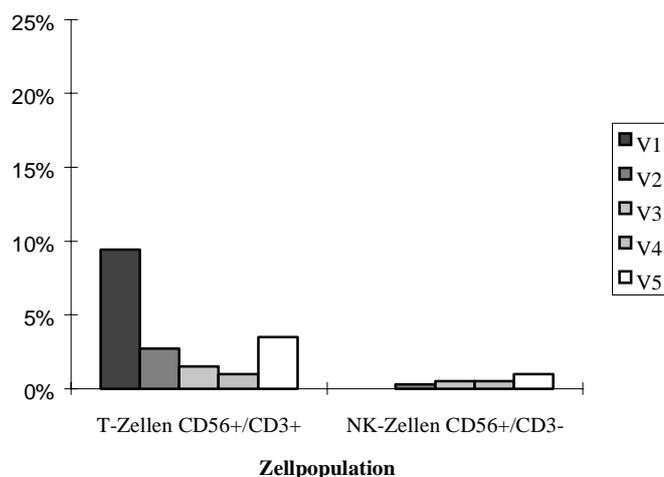


Abbildung 14: Nachweis von intrazellulär produziertem IL-2.

4.4.1.2 Interferon- γ

Alle untersuchten Zellpopulationen produzierten in hohem Maße IFN- γ . Es lassen sich hierbei nur geringfügige Unterschiede zwischen T-Zellen und NK-Zellen feststellen, wobei T-Zellen marginal bessere Ergebnisse zeigten.

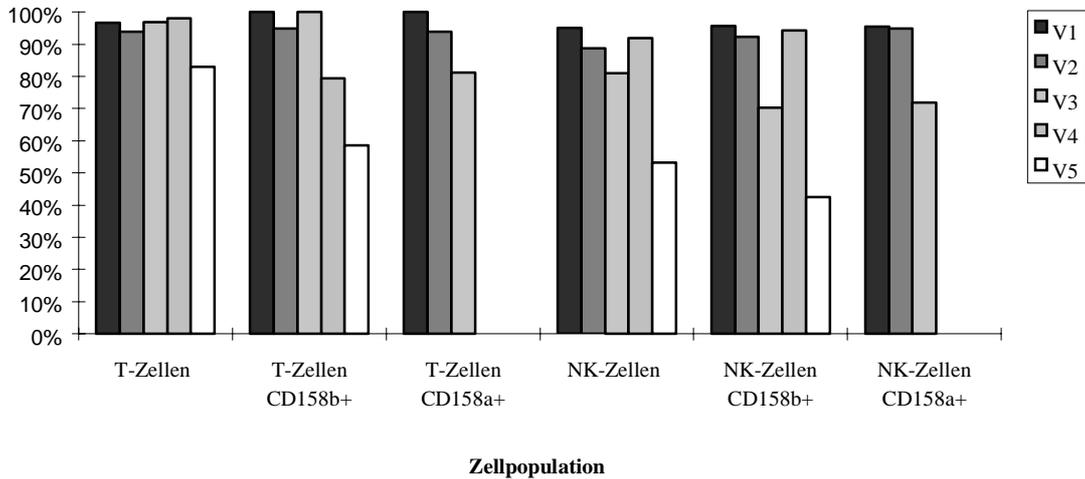


Abbildung 15: Nachweis von intrazellulär produziertem IFN- γ .

4.4.1.3 Tumor-Nekrose-Faktor- α

Die Produktion von TNF- α war bei T-Zellen deutlich höher als bei NK-Zellen.

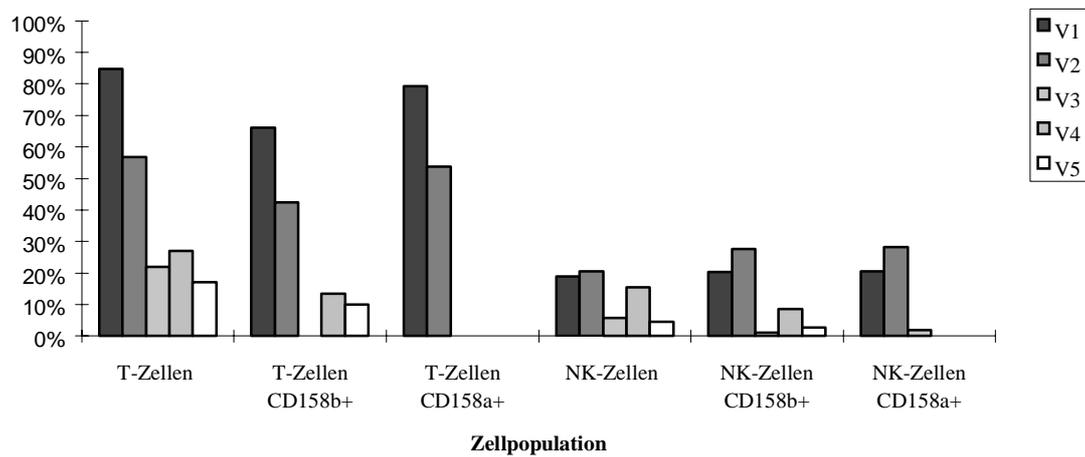


Abbildung 16: Nachweis von intrazellulär produziertem TNF- α .

4.4.1.4 Interleukin-5, Interleukin-10 und Interleukin-12

Eine Produktion dieser Zytokine konnte nicht nachgewiesen werden.

4.4.2 Intrazelluläre Zytokinproduktion nach Antigenstimulation

Im Anschluß an die Bestimmung der intrazellulären Zytokinproduktion nach chemischer Stimulation wurde untersucht, ob die dabei erhaltenen Ergebnisse reproduzierbar sind durch Stimulation der Lymphozyten in einer gemischten Lymphozytenkultur (MLC = Mixed Lymphocyte Culture). Die genaue Durchführung dieser Methode ist im Methodenteil beschrieben. Die Zellen wurden hierzu nicht angereichert, es wurden vielmehr PBMNC von zwei verschiedenen Spendern in zwei Ansätzen inkubiert. In jedem Ansatz war ein Spenderblut zuvor bestrahlt worden. Der Versuchsaufbau sah daher folgendermaßen aus:

Versuch 1: Spender 1 PBMNC vs Spender 2 PBMNC bestrahlt

Versuch 2: Spender 2 PBMNC vs Spender 1 PBMNC bestrahlt

Hierdurch sollte ermöglicht werden, dass zwei verschiedene HLA-Populationen miteinander konfrontiert wurden, jedoch nur einer der beiden Populationen noch die Fähigkeit zur Proliferation, Antigenexpression und Zytokinproduktion erhalten blieb.

Aus der MLC wurden an Tag 0, Tag 6 und Tag 10 Proben entnommen und auf Zellzahl, Phänotyp, intrazelluläre Zytokinproduktion und IFN- γ -Konzentration im Überstand untersucht.

4.4.2.1 Verlauf der Zellzahlen

Bei Versuch 1 kam es zunächst zu einer Zellproliferation, gefolgt von deutlicher Reduktion der Zellzahl. Die Zellzahlen in Versuch 2 blieben konstant.

| | Versuch 1 | Versuch 2 |
|--------|----------------------------|----------------------------|
| Tag 0 | 1,0 x 10 ⁶ / ml | 1,0 x 10 ⁶ / ml |
| Tag 6 | 1,2 x 10 ⁶ / ml | 1,0 x 10 ⁶ / ml |
| Tag 10 | 0,6 x 10 ⁶ / ml | 1,0 x 10 ⁶ / ml |

Tabelle 7: Verlauf der Zellzahlen der MLC.

4.4.2.2 Verlauf der Antigenexpression der MLC

Zunächst konnte beobachtet werden, dass der Anteil an CD3⁺-T-Zellen innerhalb des FACS-Lymphogates weiter anstieg. Ein Anstieg von CD56⁺-Zellen in Versuch 1 war

verbunden mit der Beobachtung, dass auch diese Zellen fast ausschließlich $CD3^+$ und damit T-Zellen waren. Auffällig war weiterhin, dass es zwischen Tag 6 und Tag 10 in Versuch 1 zu einem starken relativen Anstieg an $CD158a^+$ -Zellen kam, die wiederum zum größten Teil $CD3^+$, d.h. T-Zellen, waren. Obwohl sich die Zellzahl zwischen diesen beiden Zeitpunkten halbierte, vervierfachte sich der prozentuale Anteil der $CD158a^+$ -Zellen in dieser Zeit.

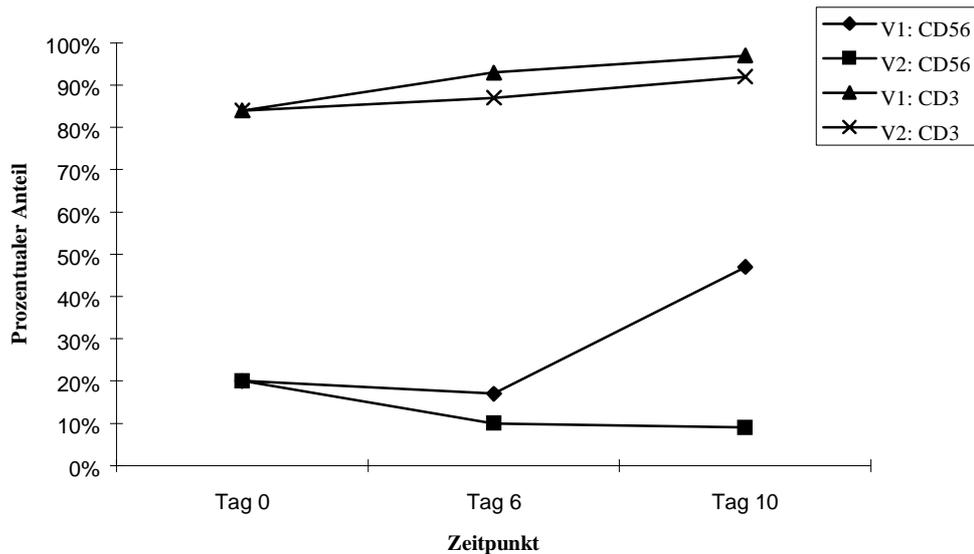


Abbildung 17: Verlauf der Expression von CD56 und CD3 in der MLC.

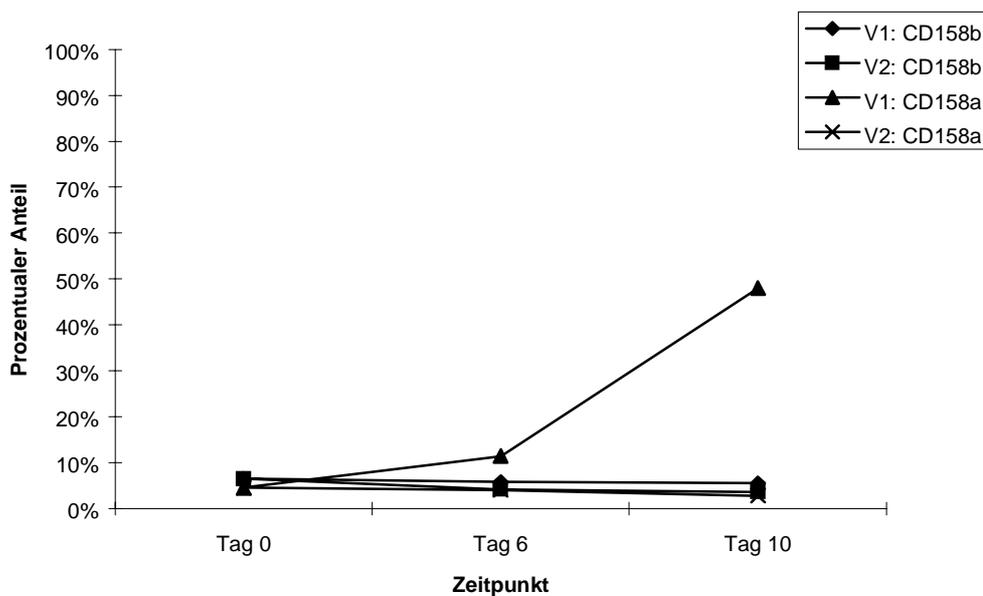


Abbildung 18: Verlauf der Expression von CD158a und CD158b in der MLC.

4.4.2.3 Nachweis von intrazellulärer Zytokinproduktion

Die MLC-Ansätze wurden auf die intrazelluläre Produktion von IL-2, IFN- γ und TNF- α untersucht. Die Ergebnisse fielen sehr schwach aus, es konnte nur eine Produktion von IFN- γ beobachtet werden.

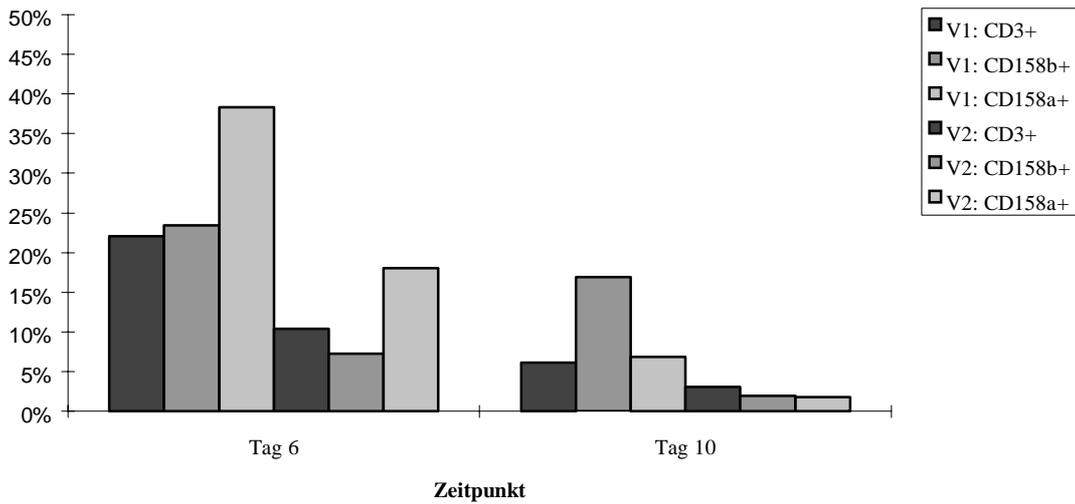


Abbildung 19: Nachweis von intrazellulär produziertem IFN- γ in der MLC.

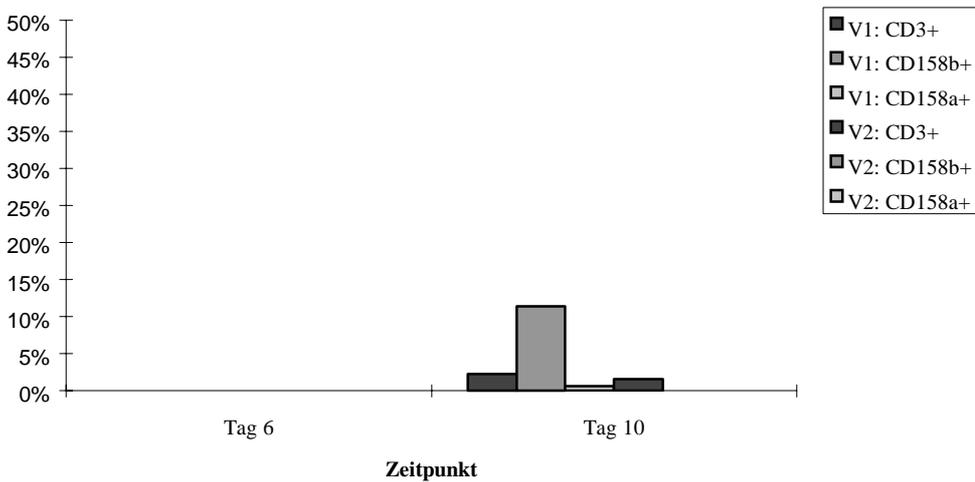


Abbildung 20: Nachweis von intrazellulär produziertem TNF- α in der MLC.

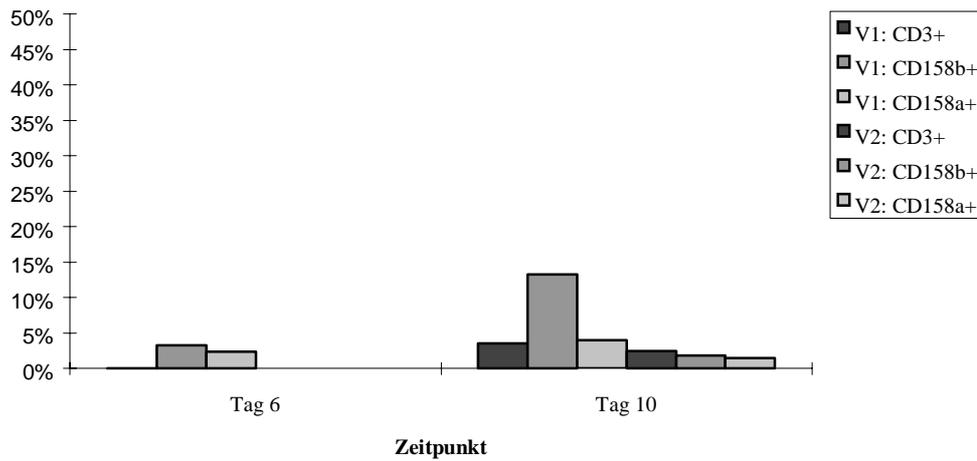


Abbildung 21: Nachweis von intrazellulär produziertem IL-2 in der MLC.

4.4.2.4 Interferon- γ -Konzentration im Überstand der MLC

Die IFN- γ -Konzentration im Überstand entwickelte sich in den beiden Versuchen gegenläufig.

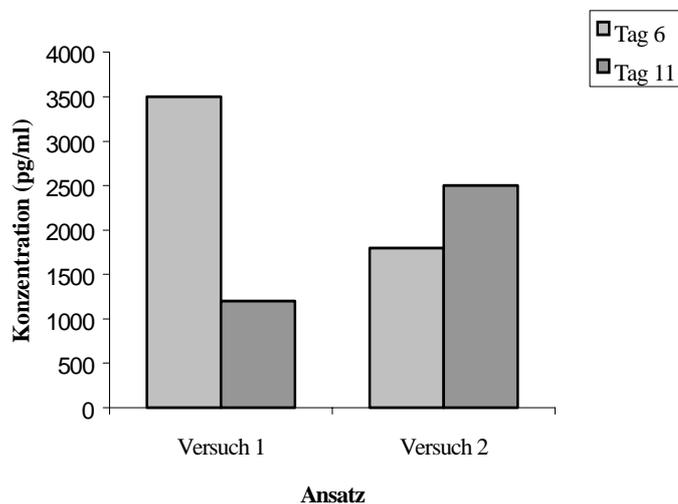


Abbildung 22: Nachweis von IFN- γ im Überstand der MLC.

5 Diskussion

5.1 Allgemeine Methodenkritik

5.1.1 Immunomagnetische Zellanreicherung

Die Anreicherungen erfolgten aus peripherem Vollblut und Buffy Coats freiwilliger gesunder Blutspender. Ein Buffy Coat ist die Schicht aus Leukozyten und Thrombozyten, die sich nach längerem Stehen oder nach Zentrifugation zwischen sedimentierten Erythrozyten und Plasma ausbildet. Die ungerinnbar gemachten Präparate wurden aus der Blutbank der Universitätsklinik Tübingen bezogen. Im allgemeinen wurden Zellen mehrerer Spender dort bereits zu einem Buffy Coat gepoolt. Bei der immunomagnetischen Zelltrennung mit magnetischen Mikrokugeln handelt es sich um eine Standardmethode zur Isolierung von Lymphozytensubpopulationen. Sie ist diesbezüglich hinreichend beschrieben und evaluiert worden [21, 24, 44]. Die Effektivität der Entfernung von markierten Zellen aus einem Zellgemisch liegt bei 99,9%, die Vitalität der Zellen soll durch die Methode nicht beeinträchtigt werden [21].

5.1.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein einfaches und schnelles Verfahren zur immunologischen und morphologischen Phänotypisierung von mononukleären Zellen. Die Expression bestimmter Oberflächenantigene kann durch Markierung der Zellen mit fluoreszierenden Farbstoffen analysiert werden. Es handelt sich um ein einfaches und schnelles Verfahren, das in diagnostischer Routine und wissenschaftlicher Arbeit fest etabliert ist. Die Farbstoffe FITC, PE und PerCP gehören zur Routineausstattung und die Anfärbung der Zellen mit diesen Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte nach standardisierten Protokollen. Neu hinzugenommen wurden die APC-Farbstoffe zur intrazellulären Zytokinbestimmung. Die Färbung mit APC erfolgte nach einem für PE standardisierten Protokoll für die Intrazellulärfärbung. Die Messung mit diesem Farbstoff beanspruchte einen zweiten Laser im Durchflusszytometer, die Einstellungen hierfür wurden experimentell ermittelt.

5.1.3 Zytotoxizitätstest

Der Europium-Freisetzung-Zytotoxizitätstest ist ein von Blomberg et al beschriebenes Verfahren, das die Zerstörung von Targetzellen durch Effektorzellen quantitativ darstellt [7,8]. Dies geschieht durch photometrische Messung der Fluoreszenz von aus lysierten Zellen freigesetztem TDA-Europium-Komplex. Im Gegensatz zum ⁵¹Chromfreisetzungstest handelt es sich um eine nicht-radioaktive Methode und ist dadurch einfacher zu handhaben. Zudem ist sie schneller in der Durchführung. Die Qualität der Messergebnisse des Europium-Freisetzungstests (FST) wird wie beim ⁵¹Cr-FST durch die spontane Freisetzung von TDA bzw. ⁵¹Chrom beeinträchtigt. Diese Spontanlyserate ist zunächst abhängig vom Zustand der Zellen, kann aber auch Targetzell-spezifisch variieren. Sie kann jedoch durch einen schonenden Umgang mit den Zellen bei vielen Zelllinien unter 30% gehalten werden. Dieser Wert konnte bei den durchgeführten Versuchen fast immer deutlich unterschritten werden. Ein weiteres Maß für die Beurteilung eines Zytotoxizitätstests stellt die in Abhängigkeit vom eingesetzten Effektor/Target- Verhältnis absinkende Lyserate dar. Da die Zellzahlen nach Abschluß der CD158b⁺-Zellanreicherungen teilweise sehr niedrig waren, ergaben sich zwei Dinge, die bei der Auswertung beachtet werden mussten: Zum einen war es nicht immer möglich mit der angereicherten Zellpopulation Zytotoxizitätsversuche gegen alle vier Targets durchzuführen. In diesem Fall wurde auf das Target LCL 721.221 verzichtet. Diese Entscheidung erfolgte im Hinblick auf die Tatsache, dass die zytotoxische Aktivität gegen die Tumorzelllinie K562 ausreichend Auskunft über den Zustand der Effektorzellen gibt. Zum anderen wurden die Versuche mit der CD158b⁺-Zellpopulation bei E/T-Verhältnisse von 20:1, 10:1, 5:1 und 2,5:1 durchgeführt, die Versuche mit den anderen Zellpopulationen bei E/T-Verhältnissen von 40:1, 20:1, 10:1 und 5:1. Dadurch sind einzig bei E/T-Verhältnissen 20:1, 10:1 und 5:1 Daten für alle vorhandenen Zellpopulationen präsent. Da jede Versuchsreihe einzeln für sich betrachtet eine gleichmäßige und deutliche Abnahme der Lyseraten zeigt, scheint es gerechtfertigt, die Versuche trotz dieses etwas eingeschränkten Bereiches miteinander zu vergleichen.

5.1.4 Nachweis von intrazellulärer Zytokinproduktion

Zur Bestimmung der intrazellulären Zytokinproduktion wurde ein Standardprotokoll für die Zytokin-PE-Färbung angewandt auf die Zytokin-APC-Färbung. Der entscheidende Punkt bei der Auswertung war, adäquate Messeinstellungen für den zweiten Laser im Durchflusszytometer zu eruieren und diesen mit den Lasereinstellungen für die anderen drei Farbstoffe abzustimmen. Anhand von zahlreichen Probemessungen konnte dies erfolgreich durchgeführt werden.

5.1.5 MLC und Nachweis von intrazellulärer Zytokinproduktion

Die gemischte Lymphozytenkultur ist eine gängige Methode zur Bestimmung der Alloreaktivität von Lymphozyten [21]. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob mit dem Versuchsansatz einer MLC auch ein adäquater Nachweis von intrazellulärer Zytokinproduktion durch NK-Zellen gelingen kann. Die hierzu erhaltenen Ergebnisse korrelieren teilweise nicht sehr stark mit den Werten für die Zytokinfärbungen ohne MLC. Es ist daher zu überlegen, ob dieser Versuchsaufbau ein geeigneter Ansatz für die Bearbeitung der Fragestellung ist.

5.1.6 Bestimmung von Interferon- γ im Überstand der MLC

Die Messungen zur Interferon- γ -Konzentration im Überstand der MLC erfolgten mit einem evaluierten IFN- γ -Immunassay-Kit der Firma WAK Chemie Medical GmbH. Nach Erstellung einer Titrationskurve mit den Messwerten der Standard-Verdünnungsreihe konnten die Ergebnisse der Messung des MLC-Überstands zugeordnet werden.

5.2 Isolierung von CD158b⁺/CD3⁻/CD158a⁻-NK-Zellen

5.2.1 Spezielle Methodenkritik

Es sollte zunächst eine Methode zur Anreicherung der KIR-Subpopulation von CD158b⁺-NK-Zellen aus Peripherblut entwickelt werden. Diese Zellen sollten weder den T-Zell-Rezeptor CD3 noch den KIR-Rezeptor CD158a koexprimieren. Hierdurch sollten Untersuchungen zur isolierten Funktion von CD158b⁺-NK-Zellen unter nativen Bedingungen ermöglicht werden. Unter der Vorgabe, dass die Zellen durch die Anreicherungsmethode in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt würden, sollte es ursprünglich das Ziel der Arbeit sein, die gewonnene KIR-Subpopulation in Zellkultur zur Proliferation zu stimulieren, um sie dann gegebenenfalls im Hinblick auf eine zukünftige therapeutische Anwendung weiter untersuchen zu können. Zur Beurteilung der Zellfunktion nach Anreicherung wurden Zytotoxizitätsversuche durchgeführt. Die Anreicherung basierte auf folgendem Versuchsaufbau:

Isolierung von PBMNC

Die Isolierung von mononukleären Zellen aus Peripherblut (PBMNC) durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation funktionierte zuverlässig.

Depletion von CD3⁺- und CD158a⁺-Zellen

Die Depletion von CD3⁺- und CD158a⁺-Zellen aus der PBMNC-Zellsuspension verlief durchgehend zufriedenstellend. In der verbleibenden Negativfraktion waren im Mittel noch 3,0% CD3⁺-Zellen und 1,1% CD158a⁺-Zellen enthalten.

Anreicherung von CD158b⁺-Zellen

Die Reinheit der eluierten Positivfraktion (CD158b⁺/CD3⁻/CD158a⁻-Zellen) nach Abschluss der Anreicherung lag bei durchschnittlich 85,6%. Der Anteil an CD158b⁺/CD56⁺-Zellen lag bei durchschnittlich 82,2%, d.h. es handelte sich fast ausschließlich um NK-Zellen.

Die Ausbeute an CD158b⁺/CD3⁻/CD158a⁻-Zellen aus der durchflusszytometrisch ermittelten CD158b⁺-Fraktion der PBMNC betrug durchschnittlich 2,7%. Die Ausbeute an CD158b⁺/CD3⁻/CD158a⁻-Zellen aus den CD158b⁺-Zellen nach Depletion von CD3 und CD158a lag im Mittel bei 28,7%.

5.2.2 Beurteilung der Ergebnisse

Die Reinheit der angereicherten CD158b⁺-Zellen war mit 85,6% zufriedenstellend und ausreichend für die Auswertung der Zytotoxversuche, die mit dieser Zellpopulation durchgeführt wurden. Der durchschnittliche Anteil von 82,2% an CD56⁺-Zellen belegt die primäre Präsenz des CD158b⁺-Rezeptors auf NK-Zellen und rechtfertigt den Verzicht auf eine zusätzliche CD56⁺-Anreicherung, die die Zellen zusätzlichem Stress aussetzen würde. Eine Erklärung für die eher niedrige Ausbeute hingegen könnte sein, dass die einzelnen Zellen aus der KIR⁺-Zellpopulation, die angereichert werden sollten, das Oberflächenantigen CD158b in relativ geringem Ausmaß exprimieren und dadurch die entstehenden Antigen-Microbead-Antikörper-Komplexe nicht die tatsächlich vorhandene Zellzahl erfassen. Außerdem wurden Zellen, die sowohl den Rezeptor CD158b als auch CD158a exprimieren, depletiert, so dass auch dies zu einer Verringerung der Zellzahl beigetragen hat. Resultierend aus dieser Vermutung ist es fragwürdig, ob es gelingen könnte, die Eluat-Zellzahl mit dem gewählten Versuchsaufbau weiter zu optimieren. Der limitierende Faktor des Versuchsansatzes bestand daher auch darin, dass die eluierten Zellzahlen nicht ausreichend waren, um zusätzlich zu Zytotoxizitätsversuchen einen Anteil der gewonnenen Zellpopulation zu kultivieren. Die Frage, ob der Versuch eines Zellkulturansatzes gelungen wäre, stellt sich jedoch nicht nur in Bezug auf die Zellzahl. Des Weiteren wäre es hierbei sicher relevant gewesen, ob die angereicherten Zellen, die nach wie vor mit Microbeads beladen waren, sich zur Proliferation hätten stimulieren lassen, oder ob zuvor das enzymatische Abauen der Microbeads erforderlich geworden wäre, was die Zellen einem weiteren Stressfaktor ausgesetzt hätte.

5.3 Isolierung von CD56⁺/CD3⁻-NK-Zellen und CD56⁺/CD3⁺-T-Zellen

Um die zytotoxische Funktion der angereicherten CD158b⁺/CD3⁻/CD158a⁻-Zellpopulation vergleichend beurteilen zu können, wurden CD56⁺/CD3⁻-NK-Zellen und CD56⁺/CD3⁺-T-Zellen angereichert.

5.3.1 Beurteilung der Ergebnisse

CD56⁺-Anreicherung

Die PBMNC-Isolierung und Anreicherung von CD56⁺-Zellen verlief durchgehend zuverlässig. Die Ausbeute an CD56⁺-Zellen aus PBMNC lag im Schnitt bei 29,4%. Der mittlere Wert für die Reinheit der eluierten CD56⁺-Fraktion war 99,5%.

Trennung der CD56⁺/3⁺-T-Zellen von den CD56⁺/3⁻-NK-Zellen

Bei der Auftrennung der CD56⁺-Fraktion in T-Zellen und NK-Zellen konnte eine Ausbeute von 44,5% an T-Zellen und 40,2% an NK-Zellen erzielt werden. Die Werte beziehen sich jeweils auf die zuvor durch FACS-Phänotypisierung ermittelten Anteile an CD56⁺/CD3⁺-T-Zellen bzw. CD56⁺/CD3⁻-NK-Zellen in der CD56⁺-Fraktion der PBMNC. Die mittlere Reinheit der T-Zellen lag bei 82,7%, wobei der Wert allerdings deutlich verschlechtert wird durch eine relativ schlechte Anreicherung von 52,3% bei sechs Versuchsansätzen. Die mittlere Reinheit der NK-Zellpopulation lag bei 95,3%.

5.4 Zytotoxizität der angereicherten Zellpopulationen

5.4.1 Spezielle Methodenkritik

An klonierten NK-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass diese in der Lage sind, Zellen mit veränderter oder fehlender HLA-Klasse-I-Expression zu erkennen und zu lysieren. Dieser Mechanismus wird durch verschiedene Oberflächenrezeptoren der NK-Zelle reguliert. Besonders wichtig hierbei scheinen Killer Inhibitory Receptors (KIR) zu sein, die mit unterschiedlichen HLA-Klasse-I-Antigenen interagieren können. Dadurch bewirken sie die Inhibition der NK-Zelle und verhindern eine lytische Aktivität gegenüber der antigenpräsentierenden Zelle. Es wurde postuliert, dass der Rezeptor p58.1-KIR, der durch Anti-CD158a bzw. Anti-EB6 erkannt wird, mit den Antigenen HLA-Cw-2, -4, -5, -6 und -15 interagiert und der Rezeptor p58.2-KIR, durch Anti-CD158b bzw. Anti-GL183 erkannt, mit HLA-Cw-1, -3, -7 und -8. Anhand der angereicherten CD158b⁺/CD3⁻/CD158a⁻-NK-Zellen sollten diese Erkenntnisse an nativen Zellen reproduziert werden. In dieser Arbeit lag der Schwerpunkt in der

Untersuchung von NK-Zellen, die von den beiden 58kD-KIR ausschließlich den p58.2-Subtyp (CD158b) exprimieren. Dazu war der p58.1-Subtyp (CD158a) zuvor depletiert worden. Die Zytotoxizität der angereicherten CD158b⁺/CD3⁻/CD158a⁻-NK-Zellen wurde anschließend in vergleichenden Untersuchungen mit CD56⁺/CD3⁻-Zellen und CD56⁺/CD3⁺-Zellen beurteilt. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Zytotoxversuche noch einmal zusammengefasst. Alle angegebenen maximalen spezifischen Lyseraten (MSL) beziehen sich auf das E/T-Verhältnis 20:1. Die Werte sind die gemittelten Ergebnisse der jeweiligen Versuchsreihen.

Zytotoxizität gegen K562 und LCL 721.221

Um die Vitalität der einzelnen Zellpopulationen beurteilen zu können, wurde ihre zytotoxische Aktivität gegen die Tumorzelllinie K562, das Standard-Target für NK-Zellen, und gegen die HLA-freie Zelllinie LCL 721.221 untersucht. Die Spontanlyseraten der Versuche mit K562 lagen bei 16,5% - 18,9%, mit LCL 721.221 bei 19,2 - 30,3%.

Die Ergebnisse lassen erkennen, dass NK-Zellen eine höhere Zytotoxizität gegenüber K562 besitzen als T-Zellen. Besonders auffallend ist die hohe Lyserate von K562 durch die Population der CD56⁺/CD3⁻-NK-Zellen mit einer MSL von 56,2%. Danach nimmt die zytotoxische Aktivität der einzelnen Effektorpopulationen in folgender Reihenfolge ab: KIR⁻-NK-Zellen (CD158b⁻/CD158a⁻/3⁻) zeigen eine Lyserate von 41,3%, KIR⁺-NK-Zellen (CD158b⁺/CD158a⁺/3⁻) liegen bei 27,2%, gefolgt von CD56⁺/CD3⁺-T-Zellen mit 17,6% und unaufgereinigten Lymphozyten (PBMNC) mit 7,9%. Die Zelllinie LCL 721.221, die theoretisch keine HLA-Klasse-I-Antigene exprimieren sollte, ist ebenfalls ein klassisches NK-Zelltarget. Tatsächlich konnte aber kaum zytotoxische NK-Aktivität gegen dieses Target nachgewiesen werden. Da durch Färbung mit dem HLA-Klasse-I-bindenden Antikörper w6/32 gezeigt werden konnte, dass der eingesetzte LCL 721.221-Klon entgegen der Erwartungen HLA-Klasse-I-Antigene exprimierte, verwundert dies jedoch nicht.

Zytotoxizität gegen HLA-Cw6-transfizierte Targetzellen

HLA-Cw6-transfizierte Zellen wurden durchgängig in allen Versuchen wenig lysiert. Die Spontanlyseraten von 17,8% - 34,8% lassen darauf schließen, dass die Targetzellen generell in gutem Zustand waren und die Versuchsergebnisse nicht durch schlechte

Rahmenbedingungen verfälscht wurden. Maximale spezifische Lyseraten wurden mit 14,6% von KIR⁺-NK-Zellen (CD158b⁺/CD158a⁻/3⁻) und mit 12,1% von T-Zellen (CD56⁺/CD3⁺) erreicht. Die unaufgetrennten NK-Zellen (CD56⁺/CD3⁻) erwiesen sich gegen HLA-Cw6-Targets als schwächste Effektoren (MSL 2,6%).

Zytotoxizität gegen HLA-Cw7-transfizierte Targetzellen

Bei Spontanlyseraten von 21,6% - 26,7% stellten unaufgetrennte NK-Zellen (CD56⁺/CD3⁻) die Effektorpopulation mit dem höchsten Killingpotential gegenüber HLA-Cw7-Transfektanten dar (MSL 36,1%). Es folgten KIR⁻-NK-Zellen (CD158b⁻/CD158a⁻/3⁻) mit einer MSL von 24,6%, KIR⁺-NK-Zellen (CD158b⁺/CD158a⁻/3⁻) mit 17,1%, T-Zellen (14,5%) und unaufgereinigte Lymphozyten (9,9%).

5.4.2 Beurteilung der Ergebnisse

Die Vitalität aller isolierten Effektorpopulationen konnte anhand von Zytotoxversuchen gegen K562 geprüft und bestätigt werden. Betrachtet man gezielt das zytotoxische Verhalten der in der CD158b-Anreicherung gewonnenen KIR⁺-NK-Zellen (CD158b⁺/CD158a⁻/CD3⁻), so läßt sich folgendes feststellen: Die maximale spezifische Lyserate bei einem E/T-Verhältnis von 20:1 liegt für K562 bei 27,2%, für HLA-Cw6-transfizierte Targets bei 14,6% und für HLA-Cw7-transfizierte Targets bei 17,1%. Es handelt sich insgesamt um relativ niedrige Werte, die eine Interpretation schwierig machen. In Kenntnis der bisherigen Untersuchungsergebnisse von Rezeptorbindungsstudien an klonierten NK-Zellen würde man jedoch erwarten, dass CD158b⁺/CD158a⁻-NK-Zellen HLA-Cw6-Transfektanten lysieren, HLA-Cw7-Transfektanten hingegen nicht oder zumindest weniger als HLA-Cw6-Targets. Auch die KIR⁻-NK-Zellen (CD158b⁻/CD158a⁻/3⁻) zeigen eine höhere zytotoxische Aktivität gegenüber HLA-Cw7 als gegenüber HLA-Cw6, sie waren jedoch in ihrer lytischen Aktivität gegenüber HLA-Cw7 potenter als die KIR⁺-Zellen. Dies könnte wiederum ein Hinweis sein darauf, dass die CD158b⁺-Zellen im Vergleich zu CD158b⁻-Zellen tatsächlich durch die Interaktion mit HLA-Cw7 inhibiert wurden. Auffällig in diesem Zusammenhang ist weiterhin die hohe zytotoxische Aktivität der unaufgetrennten NK-Zellen (CD56⁺/CD3⁻) gegen K562 und HLA-Cw7-Transfektanten bei nahezu fehlender Lyse der HLA-Cw6-Transfektanten. Die hohe zytotoxische Aktivität gegenüber den

ersten beiden Targets könnte an dem daueraktivierten Zustand der NK-Zellen liegen. Dies mag ihnen eine im Vergleich zu T-Zellen schnellere und stärkere Reaktion gegenüber den Targets erlauben, da der gegebene Versuchsansatz den T-Zellen nicht genügend Zeit bietet, ihre volle zytotoxische Aktivität zu entwickeln. Lag dann die fehlende Lyse der HLA-Cw6-Zellen in einem generell mangelhaften Zustand dieser Targets, welcher auch die geringe Lyse durch die KIR⁺-NK-Zellen begründen würde? Da die Versuche über einen längeren Zeitraum hinweg verteilt waren und hierbei unterschiedliche HLA-Cw6-Zellklone verwendet wurden, scheint dies jedoch unwahrscheinlich. Zudem wurden mit den KIR⁺-NK-Zellen immerhin Lyseraten von 14,6% erreicht. Auch die Spontanlyseraten der HLA-Cw6-Transfektanten von 17,8% - 34,8% boten keinen Hinweis für einen schlechten Zustand der Zellen.

Die Ergebnisse bleiben insgesamt uneinheitlich; die an klonierten NK-Zellen postulierten Theorien der HLA-C-Regulation konnten mit diesem Versuchsaufbau nicht bestätigt werden. Eine Inhibition der Effektorzellen durch eine Interaktion zwischen CD94/NKG2 und HLA-E konnte ausgeschlossen werden, die HLA-Cw6- und HLA-Cw7-Targets wurden negativ auf die Expression von HLA-E untersucht. Weiterhin ist zu bedenken, dass der Antikörper G1183, mit dem die Anreicherung durchgeführt wurde, nicht nur an p58.2-KIR bindet, sondern auch an p50.2-KAR. Dieser KAR-Rezeptor aktiviert NK-Zellen zu lytischer Aktivität gegen HLA-Cw-1-, -3-, -7-, oder -8-präsentierende Zellen. Man nimmt jedoch an, dass die Affinität der KAR zu HLA-C geringer ist als die von KIR, so dass die inhibierende Komponente gegenüber der aktivierenden überwiegt im Zusammenspiel von KIR und KAR. Der aktivierende KAR-Einfluss soll daher nur bei geringem Vorhandensein von KIR zum Tragen kommen. Dies würde die Ergebnisse im Hinblick auf HLA-Cw6 und HLA-Cw7 also nur dann erklären, wenn die angereicherten Zellen tatsächlich mehr p50.2 KAR exprimieren sollten als p58.2 KIR. Eine andere Studie, veröffentlicht 1998 von Winter et al, kam auf ähnliche Ergebnisse in Bezug auf HLA-Cw-3 und -4 [62]. Ein weiterer Ansatz zur Erklärung der Ergebnisse mag außerdem in der Anreicherungs-methode begründet sein, da die KIR⁺-NK-Zellen dem Stress eines zusätzlichen Anreicherungsschrittes und der fortbestehenden Microbead-Bindung unterliegen, der bei der KIR⁻-Fraktion nicht gegeben ist. Auch besteht die Möglichkeit, dass die KIR⁺-Zellen durch den gebundenen G1183-Antikörper in irgendeiner Weise beeinflusst werden. Dieser Theorie

widersprechen jedoch Versuche, die zeitgleich in unserem Labor durchgeführt wurden und bei denen fast ausschließlich CD158b⁺-NK-Zellen einer Melanopatientin HLA-Cw7-transfizierte Zellen ebenfalls besser lysierten als HLA-Cw6-Targets, ohne durch eine Bindung von Anti-G1183 oder Microbeads beeinflusst worden zu sein [53]. Man kann sich des weiteren fragen, ob die Expression von KIR generell Einfluss auf die lytische Grundaktivität von NK-Zellen ausübt. So läßt sich die geringere zytotoxische Aktivität der KIR⁺-Zellen im Vergleich zu KIR⁻-Zellen und unaufgetrennten NK-Zellen (CD56⁺/CD3⁻) gegenüber dem HLA-freien Target K562 nicht mit einer KIR-Inhibition erklären.

Als Schlussfolgerung der dargelegten Überlegungen ist es vorzuschlagen, dass die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse ein nochmaliges Bedenken der an klonierten KIR⁺-NK-Zellen postulierten Thesen bewirken sollten. Offensichtlich sind die Mechanismen der Regulation zytotoxischer NK-Funktion komplexer als bisher angenommen. Die Inhibition einer NK-Zelle scheint zu resultieren aus dem Zusammenspiel vielfältiger Faktoren, bei denen KIR- und KAR-Rezeptoren, deren Expressionsmuster, HLA-Klasse-I-Affinität und Rezeptor-Interaktivität, vermutlich eine wichtige aber nicht die einzige Rolle spielen.

5.5 Nachweis von intrazellulärer Zytokinproduktion

5.5.1 Intrazelluläre Zytokinproduktion nach chemischer Stimulation

In einem weiteren Ansatz zur Erforschung der NK-Zell-Funktion wurde an angereicherten CD56⁺-Zellen untersucht, ob bei einzelnen, immunphänotypisch identifizierten CD56-Subpopulationen Unterschiede in der intrazellulären Zytokinproduktion nachgewiesen werden können. Methodisch wurde so vorgegangen, dass mit Hilfe von Vierfarben-Durchflusszytometrie zunächst zwischen KIR⁺- und KIR⁻-NK-Zellen und KIR⁺- und KIR⁻-T-Zellen differenziert wurde (FITC, PE und PerCP). Daraufhin konnten die intrazellulär vorliegenden Zytokine, mit APC gefärbt und der jeweiligen Zellpopulation zugeordnet, gemessen werden. Es wurden Untersuchungen zur Produktion von Interleukin-2, -5, -10 und -12, Interferon- γ und Tumor-Nekrose-Faktor- α durchgeführt.

5.5.1.1 Interleukin-2

Interleukin-2 (IL-2) wird überwiegend von aktivierten CD4⁺-T-Zellen sezerniert. Als Wachstumsfaktor ist dieses Zytokin für die Stimulation von T-Lymphozyten und NK-Zellen bedeutsam. NK-Zellen werden durch IL-2 zur Proliferation und Differenzierung in lymphokinaktivierte Killerzellen (LAK) angeregt. Diese besitzen die Fähigkeit Tumorgewebe zu lysieren ohne gesundes Gewebe anzugreifen. Die IL-2-LAK-Therapie wird daher zur Behandlung maligner Erkrankungen genutzt. Außerdem wird die IFN-Produktion von NK-Zellen durch IL-2 erhöht [22, 25, 46].

Bei den durchgeführten Untersuchungen konnte nur bei der T-Zell-Population eine Produktion dieses Zytokins nachgewiesen werden.

5.5.1.2 Interferon- γ

Interferon- γ (IFN- γ) wird bei immunologischen und entzündlichen Vorgängen gebildet. Es wird von Th1-Zellen und NK-Zellen produziert, wobei die Synthese durch Antigenkontakt stimuliert wird. Auch IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 und IL-18 induzieren die IFN- γ -Bildung durch NK-Zellen. IFN- γ wurde zunächst die Wirkung zugeschrieben, Zellen vor viraler Infektion zu schützen. Diese Wirkung wird vermittelt durch die Hochregulation von u.a. HLA-I- und -II-Molekülen auf der Oberfläche verschiedener Zellreihen. Weiterhin aktiviert IFN- γ Endothelzellen und neutrophile Granulozyten, fördert nicht nur die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen sondern auch die von Monozyten, wirkt als Chemotaxin und induziert eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen. IFN- γ stimuliert B-Zellen zur Proliferation, Differenzierung und Produktion von IgG, es fördert außerdem die Polarisierung von T-Zellen zu Th1-Zellen und zytotoxischen T-Zellen [22, 25, 46].

IFN- γ wurde in allen untersuchten Proben in hohem Maße nachgewiesen, es sind jedoch teilweise starke Differenzen zwischen den einzelnen Versuchen zu erkennen. T-Zellen zeigten dabei generell höhere Werte als NK-Zellen.

5.5.1.3 Tumor-Nekrose-Faktor- α

Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) wird von Makrophagen, NK-Zellen und aktivierten T-Lymphozyten produziert. Die biologische Wirkung von TNF- α ist stark proinflammatorisch. TNF- α hemmt die Proliferation von Tumorzellen und stimuliert

Fibroblasten- und Endothelzellwachstum, es vermehrt die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen. TNF- α stimuliert die Produktion von Prostaglandinen und Zytokinen durch Makrophagen und Granulozyten. Die Expression von HLA-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen wird gesteigert, die Proliferation und zytotoxische Aktivität von CTL verstärkt, bei B-Zellen wirkt TNF- α fördernd auf Wachstum und IgG-Synthese [22, 25, 46]. Bei NK-Zellen scheint TNF- α bei der Induktion des programmierten Zelltodes involviert zu sein. Im Anschluß an eine zytokin-induzierte Stimulation der NK-Zelle zur IFN- γ -Produktion wurden erhöhte TNF- α -Werte beobachtet, gefolgt von Apoptose der NK-Zelle. Hier kann es sich um einen Regulationsmechanismus handeln, der einer überschießenden zytotoxischen NK-Zell-Funktion entgegen wirken soll [56].

Die Produktion von TNF- α war besonders hoch bei den ersten zwei Versuchen, auch hier zeigten T-Zellen deutlich höhere Werte als NK-Zellen.

5.5.1.4 Interleukin-5

Nach bisherigen Kenntnissen wird das Zytokin Interleukin (IL-5) von aktivierten T-Lymphozyten und Mastzellen gebildet. Es hat großen Einfluss auf die Reifung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten und spielt daher eine wichtige Rolle bei parasitären und allergischen Erkrankungen. Diese Wirkung wird verstärkt durch die Induktion eines Klassenwechsels hin zu IgA bei der Synthese von Antikörpern durch B-Lymphozyten. IL-5 stimuliert außerdem die Produktion von Histamin und Leukotrienen durch basophile Granulozyten [22, 25, 46].

Eine Assoziation von IL-5 mit NK-Zellen konnte bisher nicht beobachtet werden. Auch mit den hier durchgeführten Versuchen konnten keine neuen Erkenntnisse zu einer eventuell vorhandenen Produktion von IL-5 durch NK-Zellen gewonnen werden. Eine Produktion durch die CD56⁺-T-Zellen konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

5.5.1.5 Interleukin-10

Interleukin-10 (IL-10) wird vor allem von aktivierten T-Lymphozyten gebildet. Die Wirkung dieses Zytokins ist vorrangig anti-inflammatorisch indem es der Ausweitung einer antigenspezifischen Immunantwort entgegenwirkt. Dies geschieht durch die Reduktion der HLA-Klasse-II-Expression von Antigen-präsentierenden Zellen und die

Suppression der Zytokinproduktion durch Makrophagen, wodurch indirekt ein negativer Einfluss auf die Aktivierung von T-Zellen entsteht. Auf NK-Zellen wirkt IL-10 in Form einer Hemmung der IFN- γ - und TNF- α -Sekretion, es fördert jedoch trotzdem deren zytotoxische Aktivität [22, 25, 46].

In Korrelation mit den bisherigen Kenntnissen konnte keine Produktion von IL-10 durch NK-Zellen nachgewiesen werden. Eine Produktion durch die CD56⁺-T-Zellen konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

5.5.1.6 Interleukin-12

Antigenpräsentierende Zellen wie Makrophagen und B-Zellen besitzen die Fähigkeit zur Interleukin-12- (IL-12) Synthese. Dieses Zytokin wird bei bakteriellen, parasitären und viralen Erkrankungen gebildet. Synergistisch mit IL-2 aber auch unabhängig davon wirkt es auf T- und NK-Zellen als Reiz zu zytotoxischer Aktivierung und Proliferation. IL-12 induziert außerdem die IFN- γ - und TNF- α -Bildung in diesen Zellen. T-Zellen werden zur Polarisierung hin zu Th1-Zellen beeinflusst. NK-Zellen produzieren unter Einfluss von IL-12 auch IL-3, GM-CSF und G-CSF [22, 25, 46].

Mit dem gewählten Versuchsansatz konnte eine Produktion dieses Zytokins durch die untersuchten Zellpopulationen, sowohl CD56⁺-T-Zellen als auch CD56⁺-NK-Zellen, nicht nachgewiesen werden.

5.5.2 Intrazelluläre Zytokinproduktion nach Antigenstimulation

Es konnte also eine intrazelluläre Produktion von IFN- γ und TNF- α bei NK- und T-Zellen und eine IL-2-Produktion bei T-Zellen nachgewiesen werden. Es lag daher nahe, zu überprüfen, ob diese Zytokinproduktion auch in einen Zusammenhang mit der Alloreaktivität dieser Zellreihen gebracht werden konnte. Als Versuchsansatz hierfür wurde die Durchführung einer gemischten Lymphozytenkultur (Mixed lymphocyte culture MLC) gewählt. Es wurden unaufgetrennte Lymphozyten von zwei Spendern miteinander kultiviert. Dabei war in jedem Versuchsansatz jeweils eine Spender-Lymphozyten-Population zuvor mit 30 Gy bestrahlt worden. An den Tagen 0, 6 und 10 wurden Proben entnommen und auf Verlauf der Zellzahl, Phänotyp, intrazelluläre Zytokinproduktion und IFN- γ -Konzentration im Überstand untersucht.

5.5.2.1 Verlauf der Zellzahlen

Bei Versuch 1 kam es zunächst zu einer Zellproliferation, von Tag 0 bis Tag 6 erhöhte sich die Zellzahl von $1,0 \times 10^6$ / ml auf $1,2 \times 10^6$ / ml. Zwischen Tag 6 und Tag 10 reduzierte sich diese jedoch um die Hälfte auf $0,6 \times 10^6$ / ml. Bei Versuch 2 blieb die Zellzahl konstant bei $1,0 \times 10^6$ / ml.

5.5.2.2 Verlauf der Antigenexpression

Da sowohl das Verhalten von NK-Zellen als auch das von T-Zellen, und hier nicht nur CD56⁺-T-Zellen, überprüft werden sollte, wurde die MLC mit unaufgetrennten Lymphozyten angesetzt. Durch FACS-Phänotypisierung war es möglich, zwischen den einzelnen Zelltypen zu unterscheiden. Tatsächlich war der T-Zell-Anteil, beurteilt an der CD3-Expression, von Anfang an sehr hoch (84%) und es kam auch im weiteren Verlauf der MLC vor allem zu einer T-Zell-Proliferation, der prozentuale Anteil lag an Tag 10 bei beiden Versuchsansätzen über 90%.

Die CD56-Expression nahm bei Versuch 1 deutlich zu, doch handelte es sich hierbei um CD56⁺/CD3⁺-T-Zellen. Des weiteren konnte eine Zunahme der CD158a-Expression beobachtet werden, während die Expression von CD158b keine Änderung zeigte.

Die CD56-Expression in Versuch 2 nahm ab. Die prozentuale Expression von CD158a und CD158b blieb konstant auf niedrigem Niveau.

5.5.2.3 Intrazelluläre Zytokinproduktion

Im Rahmen dieses Versuchsaufbaus konnte so gut wie keine IL-2- und TNF- α -Produktion nachgewiesen werden. Die vergleichsweise hohen Messwerte bei diesen Zytokinen bei CD158b⁺-Zellen (13,3% bei IL-2 und 11,4% bei TNF- α) an Tag 10 bei Versuch 1 müssen kritisch betrachtet werden. Zwar konnten diese Werte aus den FACS-Messungen ermittelt werden, doch nahmen diese Bezug auf eine sehr kleine Zellzahl, da der CD158b-KIR, wie im letzten Absatz dargelegt, in der Gesamtexpression eher herunterreguliert wurde. Man sollte dies also vernachlässigen. Wichtiger ist die Beobachtung, dass vor allem an Tag 6 der MLC hohe Werte für IFN- γ nachgewiesen werden konnten: Bei Versuch 1 produzierten 22,1% der KIR⁻-T-Zellen, 23,5% der CD158b⁺-Zellen und 38,3% der CD158a⁺-Zellen dieses Zytokin. Bei Versuch 2 lagen die Werte mit 10,4% (KIR⁻-T-Zellen), 7,3% (CD158b) und 18,1% (CD158a) deutlich

niedriger. Es ist zu beachten, dass fast alle Zellen bei dieser Untersuchung CD3⁺-T-Zellen sind. Auffallend ist also, dass der CD158a-KIR nicht nur in Versuch 1 vermehrt exprimiert wird, sondern dass diese Zellen auch insgesamt eine besonders hohe Produktion von IFN- γ aufweisen.

5.5.2.4 Interferon- γ -Konzentration im Überstand

Die IFN- γ -Konzentration im Überstand der MLC entwickelte sich unterschiedlich in den beiden Versuchen:

Bei Versuch 1 konnte an Tag 6 eine Konzentration von 3500 pg / ml nachgewiesen werden, die an Tag 10 auf 1200 pg / ml sank. Die Werte korrelieren mit der hohen IFN- γ -Produktion an Tag 6 und dem Verlauf der IFN- γ -Produktion.

Bei Versuch 2 stieg der Wert von 1800 pg / ml (Tag 6) auf 2500 pg / ml (Tag 10). Die niedrigeren Werte korrelieren mit der niedrigeren IFN- γ -Produktion in diesem Versuchsansatz, der Verlauf ist jedoch reziprok zum Nachweis von intrazellulärem IFN- γ , das von Tag 6 auf Tag 10 absank.

5.5.3 Beurteilung der Ergebnisse

Bei den durchgeführten Untersuchungen konnte nur bei der T-Zell-Population eine Produktion von IL-2 nachgewiesen werden, dies stimmt mit den bisherigen Kenntnissen zu diesem Zytokin überein [1, 22, 25]. Eine Produktion von IL-5, IL-10 und IL-12 durch NK-Zellen oder T-Zellen konnte nicht nachgewiesen werden, diese ist in der Literatur für NK-Zellen bisher auch nicht beschrieben, bei T-Zellen jedoch bekannt für IL-5 und IL-10 [1, 22, 25, 46]. Wie zu erwarten war [1, 22, 25, 43, 61], wurde IFN- γ in allen untersuchten Proben in hohem Maße nachgewiesen. T-Zellen zeigten dabei höhere Werte als NK-Zellen. Da die fünf Versuche mit dem Blut fünf verschiedener freiwilliger Spender durchgeführt wurden, kann man vermuten, dass die zum Teil heterogenen Ergebnisse in der individuellen physiologischen Verfassung des einzelnen Spenders begründet sein mögen. Dadurch können sich die untersuchten Zellen in unterschiedlich vorstimuliertem Zustand befunden haben. Die Produktion von TNF- α war besonders hoch bei den ersten zwei Versuchen, auch hier zeigten T-Zellen deutlich

höhere Werte als NK-Zellen. Es mag eine ähnliche Ursache zugrunde liegen wie soeben für IFN- γ dargelegt.

Die Entwicklung der Antigenexpression der MLC zeigte eine deutliche Vermehrung des prozentualen Anteils an CD3⁺-T-Zellen. Ein Anstieg von CD56⁺-Zellen in Versuch 1 war verbunden mit der Beobachtung, dass auch diese Zellen fast ausschließlich CD3⁺ und damit T-Zellen waren. Obwohl sich die Zellzahl zwischen Tag 6 und Tag 10 halbierte, vervierfachte sich der prozentuale Anteil der CD158a⁺-Zellen in dieser Zeit. Es kam also zu einem starken relativen Anstieg an CD158a⁺-Zellen, die wiederum zum größten Teil CD3⁺, d.h. T-Zellen, waren. Dies widerspricht den Beobachtungen von Yamada et al, der 1998 die Vermutung äußerte, dass KIR⁺-T-Zellen keinen TCR (CD3) exprimieren würden [63]. Eine Koexpression von TCR und KIR ist bisher tatsächlich vor allem bei γ/δ -T-Zellen beschrieben, die innerhalb der T-Zellpopulation eine Minderheit darstellen. α/β -T-Zellen scheinen dagegen nur selten KIR zu exprimieren [49]. Handgretinger et al konnte 1999 bei einem Fall von isolierter Aplasie der Erythropoese ("Pure red cell aplasia") einen KIR⁺- γ/δ -T-Zellklon nachweisen, der vermutlich für die isolierte Lyse der HLA-armen erythropoetischen Vorläuferzellen verantwortlich war [26].

Mehrere Möglichkeiten der Interpretation stehen zur Verfügung für die Zunahme an CD158a⁺-T-Zellen: man könnte vermuten, dass diese Zellen eine bessere Überlebensfähigkeit im gegebenen Versuchsansatz besaßen oder man kann spekulieren, dass es gar zu einer relativen Zellproliferation dieser Zellreihe kam. Am wahrscheinlichsten ist jedoch, dass es im Rahmen der Antigenkonfrontation, bei Vorhandensein eines korrelierenden Antigens, zu einer vermehrten relativen Expression des KIR CD158a gekommen ist. Dies könnte in der Funktion einer Beeinflussung der zytotoxischen T-Zell-Aktivität begründet sein. Ähnliche Beobachtungen beschrieb Bertone et al, der eine vermehrte Expression des inhibierenden CD94/NKG2A-Rezeptors auf T-Zellen nachweisen konnte nach Stimulation mit TGF- β . [5]. Mingari et al äußerte 1998 die Vermutung, dass die KIR-Expression von reifen NK-Zellen stabil bleibt, hingegen in T-Zellen unter bestimmten Bedingungen, z.B. durch Stimulation mit Zytokinen, verändert werden kann. Sie beobachtete eine erhöhte Expression von CD94/NKG2A auf CD8⁺-T-Zellen unter Stimulation mit IL-10, IL-1 und TGF- β , während IL-4, IL-6, IL-7, IL-12 und IFN- γ keinen Effekt zeigten [40]. Beide

interpretierten dies im Sinne einer Inhibition und damit Regulation der T-Zell-Rezeptor-(TCR)-vermittelten Zytotoxizität über CD94/NKG2A.

Die MLC-Ansätze wurden außerdem auf die intrazelluläre Produktion von IL-2, IFN- γ und TNF- α untersucht. Die Ergebnisse fielen sehr schwach aus, einzig T-Zellen, sowohl KIR⁺ als auch KIR⁻, zeigten eine IFN- γ -Produktion, wobei die Werte besonders hoch lagen bei der zuvor erwähnten CD158a⁺-Zellpopulation. Hier könnte es sich um eine Bestätigung der soeben formulierten Vermutung handeln: Durch eine vermehrte Expression des KIR auf T-Zellen könnte einer überschießenden TCR-vermittelten Zytotoxizität, erkennbar hier an der hohen IFN- γ -Produktion, entgegengewirkt werden. Die Messung der IFN- γ -Konzentrationen im Überstand entwickelte sich in den beiden Versuchen gegenläufig. Warum es in Versuch 2 zu einer Erhöhung der IFN- γ -Konzentration im Überstand kam bei deutlicher Verringerung der intrazellulären IFN- γ -Konzentration bleibt unklar.

6 Zusammenfassung

NK-Zellen sind lymphozytische mononukleäre Zellen, deren zytotoxische Aktivität nicht der klassischen HLA-Restriktion unterliegt. An klonierten NK-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass diese in der Lage sind, Zellen mit veränderter oder fehlender HLA-Klasse-I-Expression zu erkennen und zu lysieren. In der Funktion und Regulation von NK-Zellen und NK-Zellzytotoxizität wird daher der Interaktion zwischen HLA-Klasse-I-Antigenen und den sogenannten KIR (Killer Cell Inhibitory Receptors) und KAR (Killer Cell Activatory Receptors) besondere Bedeutung zugesprochen. Es wurde postuliert, dass der Rezeptor p58.1-KIR, der durch Anti-CD158a bzw. Anti-EB6 erkannt wird, mit den Antigenen HLA-Cw-2, -4, -5, -6 und -15 interagiert und der Rezeptor p58.2-KIR, durch Anti-CD158b bzw. Anti-GL183 erkannt, mit HLA-Cw-1, -3, -7 und -8.

Ziel dieser Arbeit war es, durch Untersuchungen an der KIR-Subpopulation p58.2 (CD158b) weitere Erkenntnisse über die Interaktion zwischen NK-Zellen und HLA-C-Antigenen zu gewinnen und die durch Untersuchungen an klonierten Zellen postulierten Theorien im nativen System zu verifizieren. Die Zytotoxizität der angereicherten CD158b⁺/CD3⁻/CD158a⁻-NK-Zellen wurde hierfür in vergleichenden Untersuchungen mit CD56⁺/CD3⁻-NK-Zellen und CD56⁺/CD3⁺-T-Zellen beurteilt.

Es wurde zunächst eine Methode zur Anreicherung von NK-Zellen entwickelt, die spezifisch den CD158b-KIR (p58.2) exprimieren ohne Koexpression des CD158a-KIR (p58.1). Um Interaktionen des p58.1-KIR bei den anschließenden Experimenten auszuschließen, wurden Zellen, die diesen Rezeptor exprimierten, depletiert. Ebenfalls depletiert wurden CD3⁺-T-Zellen. Die Reinheit der angereicherten CD158b⁺/CD158a⁻/CD3⁻-Zellpopulation war mit 85,6% zufriedenstellend.

Trotz geringer Ausbeute konnten funktionelle Untersuchungen zur Zytotoxizität der isolierten Zellpopulation (CD158b⁺/CD3⁻/CD158a⁻) im Vergleich zu KIR⁻-NK-Zellen (CD158b⁻/CD3⁻/CD158a⁻), unaufgetrennten NK-Zellen (CD56⁺/CD3⁻), T-Zellen (CD56⁺/CD3⁺) und unaufgetrennten Lymphozyten (PBMNC) angeschlossen werden. Dies erfolgte anhand von BATDA-Zytotox-Assays. Zytotoxizitätsversuche gegen die Tumorzelllinie K562, die als klassisches NK-Zelltarget gilt, bewiesen die Vitalität der

angereicherten Zellen. In Zytotoxizitätsversuchen mit HLA-C-transfizierten Targetzellen konnte die an klonierten CD158b⁺-NK-Zellen postulierte Inhibition durch HLA-Cw7 und Aktivierung bzw. fehlende Inhibition durch HLA-Cw6 mit den angereicherten nativen Zellen nicht reproduziert werden.

Um weitere Kenntnisse über regulatorische Fähigkeiten von NK-Zellen zu erhalten wurden CD56⁺-angereicherte Zellen immunphänotypisch differenziert und die identifizierten Subpopulationen an CD158a⁺- bzw. CD158b⁺-NK-Zellen sowie -T-Zellen vergleichend auf die intrazelluläre Produktion von Zytokinen untersucht. Es konnte eine intrazelluläre Produktion von IFN- γ und TNF- α bei NK- und T-Zellen und eine IL-2-Produktion bei T-Zellen nachgewiesen werden.

Die phänotyp-spezifischen Zytokinuntersuchungen wurden wiederholt an PBMNC, die in einer gemischten Lymphozytenkultur stimuliert worden waren. Im Rahmen dieses Versuchsansatzes konnte durch Messungen der intrazellulären Zytokinproduktion und der Zytokinkonzentration im Überstand der MLC nur eine Produktion von IFN- γ nachgewiesen werden. In der phänotypischen Differenzierung ließen sich die KIR⁺-Zellen fast ausschließlich als CD3⁺-T-Zellen identifizieren, es zeigte sich außerdem eine deutliche Zunahme der CD158a⁺-Subpopulation, die zudem die höchste IFN- γ -Produktion aufwies. Dies läßt darauf schließen, dass KIR auch bei T-Zellen eine bedeutende Rolle in der Beeinflussung der Zytotoxizität spielen.

Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse zeigen, daß die Regulation zytotoxischer NK-Zellfunktion komplex ist und in einem Zusammenspiel vielfältiger Faktoren zu interpretieren ist. KIR- und KAR-Rezeptoren und deren Expressionsmuster, HLA-Klasse-I-Affinitäten und Rezeptor-Interaktionen scheinen hierbei eine wichtige aber nicht die einzige Rolle zu spielen. Die entwickelte Methode zur Isolierung einer spezifischen KIR-Subpopulation aus nativen Zellen kann in der weiteren Erforschung der NK-Zellfunktion gut eingesetzt werden.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, (1996):
Immunologie
Verlag Hans Huber, Bern
- (2) Arai N, Akamatsu S, Arai S, Toshimori Y, Hanaya T, Tanimoto T, Ikeda M, Tomura M, Fujiwara H, Kurimoto M, (2000):
Interleukin-18 in combination with IL-2 enhances natural killer cell activity without inducing large amounts of IFN-gamma in vivo.
J Interferon Cytokine Res, 20, 2, 217-224
- (3) Bakker AB, Wu J, Phillips JH, Lanier LL, (2000)
NK cell activation: distinct stimulatory pathways counterbalancing inhibitory signals
Hum Immunol, 61, 18-27
- (4) Bennett IM, Perussia B, (1996)
Effects of IL-12 on human natural killer cell differentiation.
Ann N Y Acad Sci, 795181-795188
- (5) Bertone S, Schiavetti F, Bellomo R, Vitale C, Ponte M, Moretta L, Mingari MC, (1999):
Transforming growth factor-beta-induced expression of CD94/NKG2A inhibitory receptors in human T lymphocytes.
Eur J Immunol, 29, 1, 23-29
- (6) Billiau A, Heremans H, Vermeire K, Matthys P, (1998):
Immunomodulatory properties of interferon-gamma. An update.
Ann N Y Acad Sci, 85622-85632
- (7) Blomberg K, Granberg C, Hemmila I, Lovgren T, (1986):
Europium-labelled target cells in an assay of natural killer cell activity. I. A novel non-radioactive method based on time-resolved fluorescence.
J Immunol Methods, 86, 2, 225-9
- (8) Blomberg K, Granberg C, Hemmila I, Lovgren T, (1986):
Europium-labelled target cells in an assay of natural killer cell activity. II. A novel non-radioactive method based on time-resolved fluorescence. Significance and specificity of the method.
J Immunol Methods, 92, 1, 117-23
- (9) Böyum A, (1968):
Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood.
Scand J Clin Lab Invest, 21, Suppl. 97, 77-89

- (10) Böyum A, (1977):
Separation of lymphocytes, lymphocyte subgroups and monocytes: a review.
Lymphology, 10, 71-76
- (11) Bonnema JD, Leibson PJ, (1996):
Signal transduction during NK cell activation
Chem Immunol, 64, 28-43
- (12) Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, Brooks AG, (1998):
Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA) -E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis.
J Exp Med, 187, 813-818
- (13) Braud VM, Allan DSJ, O`Callaghan CA, Söderström K, D`Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, Lanier LL, McMichael AJ, (1998):
HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C.
Nature, 19, 391, 795-799
- (14) Brooks AG, Borrego F, Posch PE, Patamawenu A, Scorzelli CJ, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, (1999):
Specific recognition of HLA-E, but not classical, HLA Class I Molecules by soluble CD94/NKG2A and NK cells.
J Immunol, 162, 305-313
- (15) Cai G, Kastelein R, Hunter RA, (2000):
Interleukin-18 (IL-18) enhances innate IL-12-mediated resistance to *Toxoplasma gondii*.
Infect Immun, 68, 12, 6932-6938
- (16) Cantoni C, Verdiani S, Falco M, Conte R, Biassoni R, (1996):
Molecular Structures of HLA-Specific Human NK-Cell Receptors.
Chem Immunol, 64, 88-103
- (17) Cambiaggi A, Vivier E, Olcese L, (1997):
Inhibitory and activatory receptors for MHC class I molecules.
Res Immunol, 148, 172-179
- (18) Carson W, Caligiuri MA, (2000):
Interleukin-15 as a potential regulator of the innate immune response.
Braz J Med Biol Res, 31, 1, 1-9
- (19) Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de-Saint-Basile G, De-Coene C, Selz F, Le-Deist F, Fischer A, (1996) :
Role of interleukin-2 (IL-2), IL-7, and IL-15 in natural killer cell differentiation from cord blood hematopoietic progenitor cells and from gamma c transduced severe combined immunodeficiency X1 bone marrow cells.
Blood, 88, 10, 3901-3909

- (20) D'Andrea A, Chang C, Phillips JH, Lanier LL, (1996):
Regulation of T cell lymphokine production by killer cell inhibitory receptor recognition of self HLA class I alleles.
J Exp Med, 184, 2, 789-794
- (21) Friemel H, (1991):
Immunologische Arbeitsmethoden
Gustav Fischer Verlag, Jena
- (22) Fritsch P, (1998):
Dermatologie und Venerologie
Springer Verlag, Berlin
- (23) Gardiner CM, Reen DJ, (1998):
Differential cytokine regulation of natural killer cell-mediated necrotic and apoptotic cytotoxicity.
Immunology, 93, 4, 511-517
- (24) Geiselhart A, Neu S, Buchholz F, Lang P, Niethammer D, Handgretinger R, (1997):
Positive selection of CD56+ lymphocytes by magnetic cell sorting.
Nat Immunity, 15, 227-233
- (25) Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, (2000):
Kuby Immunology
W.H. Freeman and Company, New York
- (26) Handgretinger R, Geiselhart A, Moris A, Grau R, Teuffel O, Bethge W, Kanz L, Fisch P, (1999):
Pure red-cell aplasia associated with clonal expansion of granular lymphocytes expressing killer-cell inhibitory receptors.
N Engl J Med, 340, 278-284
- (27) Hussell T, Openshaw PJ, (1998):
Intracellular INF-gamma expression in natural killer cells precedes lung CD8+ T cell recruitment during respiratory syncytial virus infection.
J Gen Virol, 79, 2593-2601
- (28) Janeway CA, Travers P, (1997):
Immunologie
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- (29) Kärre K, (1995) :
Express yourself or die: peptides, MHC molecules and NK cells.
Science, 267, 978-979

- (30) Knüchel R, (1996):
Durchflusszytometrische Analytik und Zellsortierung.
Pathologe, 15, 85-94
- (31) Lanier LL, (1998):
NK cell receptors.
Annu Rev Immunol, 16, 359-393
- (32) Le Drean E, Vely F, Olcese L, Cambiaggi A, Guia S, Krystal G, Gervois N, Moretta A, Jotereau F, Vivier E, (1998):
Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK Cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases.
Eur J Immunol, 28, 264-276
- (33) Lee N, Goodlett DR, Ishitani A, Marquardt H, Geraghty DE, (1998):
HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences.
J Immunol, 160, 4951-4960
- (34) Lee N, Llano M, Carretero M, Ishitani A, Navarro F, Lopez-Botet M, Geraghty DE (1998):
HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2-A.
Proc Natl Acad Sci USA, 95, 5199
- (35) Long EO, Wagtmann N, (1997)
Natural killer cell receptors.
Curr Opin Immunol, 9, 344
- (36) Lopez-Botet M, Bellon T, (1999):
Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I.
Curr Opin Immunol, 11, 301-307
- (37) Lopez-Botet M, Perez-Villar JJ, Carretero M, Rodriguez A, Melero I, Bellon T, Llano M, Navarro F, (1997):
Structure and function of the CD94 C-type lectin receptor complex involved in recognition of HLA class I molecules.
Immunol Rev, 155, 165
- (38) Lotzová E, (1993)
Definition and function of natural killer cells
Nat Immun Cell Growth Regul, 12, 169-176
- (39) Matera L, Mori M (2000):
Cooperation of pituitary hormone prolactin with interleukin-2 and interleukin-12 on production of interferon-gamma by natural killer and T cells.
Ann N Y Acad Sci, 917505-917513

- (40) Mingari MC, Moretta A, Moretta L, (1998):
Regulation of KIR expression in human T cells: a safety mechanism that may impair protective T-cell responses.
Immunol Today, 19, 4, 153-156
- (41) Mingari MC, Ponte M, Bertone S, Schiavetti F, Vitale C, Bellomo R, Moretta A, Moretta L, (1998):
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.
Proceedings of the National Academy of Science of USA, 95, 1172-1177
- (42) Mingari MC, Vitale C, Cantoni C, Bellomo R, Ponte M, Schiavetti F, Bertone S, Moretta A, Moretta L, (1997):
Interleukin-15-induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors: Selective expression of CD94/NKG2-A as the only HLA class I-specific inhibitory receptor.
Eur J Immunol, 27, 6, 1374-1380
- (43) Mohan K, Moulin P, Stevenson MM, (1997):
Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection.
J Immunol, 159, 10, 4990-4998
- (44) Molday RS, Yen SPS and Rembaum A, (1977):
Application of magnetic microspheres in labelling and separation of cells.
Nature, 268, 467-438.
- (45) Moretta A, Vitale M, Sivori S, Morelli L, Pende D, Bottino C, (1996):
Inhibitory and activatory receptors for HLA class I molecules in human natural killer cells.
Chem Immunol, 64, 77-87
- (46) Niederle N, Bergmann L, Ganser A, (1996):
Zytokine
Gustav Fischer Verlag, Jena
- (47) Ogata K, Tamura H, Yokose N, An E, Dan K, Hamaguchi H, Sakamaki H, Onozawa Y, Clark SC, Nomura T, (1995):
Effects of interleukin-12 on natural killer cell cytotoxicity and the production of interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in patients with myelodysplastic syndromes.
Br J Haematol, 90, 1, 15-21

- (48) Palmieri G, Tullio V, Zingani A, Piccoli M, Frati L, Lopez-Botet M, Santoni A, (1999):
CD94/NKG2-A inhibitory complex blocks CD16-triggered Syk and extracellular regulated kinase activation, leading to cytotoxic function of human NK cells.
J Immunol, 162, 7181-7188
- (49) Phillips JH, Gumperz JE, Parham P, Lanier LL, (1995):
Superantigen-dependent, cell-mediated cytotoxicity inhibited by MHC class I receptors on T lymphocytes.
Science, 268, 403-405
- (50) Ponte M, Bertone S, Vitale C, Tradori-Cappai A, Bellomo R, Castriconi R, Moretta L, Mingari MC, (1998):
Cytokine-induced expression of killer inhibitory receptors in human T lymphocytes.
Eur Cytokine Netw, 9, 69-72
- (51) Radbruch A, (1992):
Flow Cytometry and Cell Sorting
141-152 Springer Laboratory
- (52) Rajagopalan S, Long EO, (1999):
A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells.
J Exp Med, 189, 7, 1093-1100
- (53) Rau C, (2001):
Funktionelle und phänotypische Untersuchung von p58⁺ Natürlichen Killerzellen und T-Lymphoyten
Dissertation der Universitätskinderklinik Tübingen
- (54) Renard V, Cambiaggi A, Vely F, Blery M, Olcese L, Olivero S, Bouchet M, Vivier E, (1997):
Transduction of cytotoxic signals in natural killer cells: a general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes.
Immunol Rev, 155, 205-21
- (55) Reyburn H, Mandelboim O, Valés-Goméz M, Sheu EG, Pazmany L, Davis DM, Strominger JL, (1997):
Human NK cells: their ligands, receptors and functions.
Immunol Rev, 155, 119-125
- (56) Ross ME, Caligiuri MA, (1997):
Cytokine-induced apoptosis of human natural killer cells identifies a novel mechanism to regulate the innate immune response.
Blood, 89, 3, 910-918

- (57) Schmitz G, Rothe G, (1994):
Durchflusszytometrie in der klinischen Diagnostik.
Schattauer, Stuttgart New York
- (58) Takenaka K, Mizuno S, Harada M, Nagafuji K, Miyamoto T, Iwasaki H, Fujisaki T, Kubota A, Ohno Y, Arima F, Shigematsu H, Gondo H, Okamura S, Inaba S, Niho Y, (1996):
Generation of human natural killer cells from peripheral blood CD34+ cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor.
Brit J Immunol, 92, 788-794
- (59) Timonen T, Helander T, (1997):
Natural killer cell-target cell interactions.
Curr Opin Cell Biol, 9, 667
- (60) Torre D, Giola M, Speranza F, Mattelli A, Basilico C, Biondi G, (2001):
Serum levels of Interleukin-18 in patients with uncomplicated Plasmodium falciparum malaria.
Europ Cytokine Network, 12, 2, 361-364
- (61) Trinchieri G, (1989):
Biology of natural killer cells.
Adv. Immunol., 47, 187-376
- (62) Winter CC, Gumperz JE, Parham P, Long EO, Wagtmann N, (1998):
Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition.
J Immunol, 161, 571-577
- (63) Yamada N, Nagatani T, Takiguchi M, (1998):
T cells expressing killer cell inhibitory receptors do not carry TCR for alloantigens.
Hum Immunol, 59, 488-492
- (64) Yokoyama WM, Reichlin A, Margulies DH, Smith HRC, (1996):
MHC class I-dependent and -independent NK cell specificity.
Chem Immunol, 64, 1-18

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-------|
| Abbildung 1: Unspezifische Bindung mit GAM-FITC. | S. 21 |
| Abbildung 2: Nachweis von intrazellulärer Produktion von IFN- γ mit phänotypischer Zuordnung. | S. 27 |
| Abbildung 3: Zellpopulation nach PBMNC-Isolierung. | S. 39 |
| Abbildung 4: Zellpopulation nach CD3/CD158a-Depletion. | S. 40 |
| Abbildung 5: Zellpopulation nach CD158b-Anreicherung. Anteil an CD3 ⁺ - und CD158a ⁺ - Zellen. | S. 41 |
| Abbildung 6: Zellpopulation nach CD158b-Anreicherung. Anteil an CD56 ⁺ -Zellen | S. 42 |
| Abbildung 7: Zellpopulation nach PBMNC-Isolierung. | S. 43 |
| Abbildung 8: Zellpopulation nach CD56 ⁺ -Anreicherung. | S. 44 |
| Abbildung 9: Zellpopulationen CD56 ⁺ /CD3 ⁻ -Zellen & CD56 ⁺ /CD3 ⁺ -Zellen. | S. 45 |
| Abbildung 10: Zytotoxische Aktivität gegen HLA-Cw6-transfizierte Zellen. | S. 47 |
| Abbildung 11: Zytotoxische Aktivität gegen HLA-Cw7-transfizierte Zellen. | S. 47 |
| Abbildung 12: Zytotoxische Aktivität gegen K562. | S. 48 |
| Abbildung 13: Zytotoxische Aktivität gegen LCL 721.221. | S. 48 |
| Abbildung 14: Nachweis von intrazellulär produziertem IL-2. | S. 49 |
| Abbildung 15: Nachweis von intrazellulär produziertem IFN- γ . | S. 50 |
| Abbildung 16: Nachweis von intrazellulär produziertem TNF- α . | S. 50 |
| Abbildung 17: Verlauf der Expression von CD56 und CD3 in der MLC. | S. 52 |
| Abbildung 18: Verlauf der Expression von CD158a und CD158b in der MLC. | S. 52 |
| Abbildung 19: Nachweis von intrazellulär produziertem IFN- γ in der MLC. | S. 53 |
| Abbildung 20: Nachweis von intrazellulär produziertem TNF- α in der MLC. | S. 53 |
| Abbildung 21: Nachweis von intrazellulär produziertem IL-2 in der MLC. | S. 54 |
| Abbildung 22: Nachweis von IFN- γ im Überstand der MLC. | S. 54 |

8.2 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-------|
| Tabelle 1: Quantitative Auswertung nach PBMNC-Isolierung. | S. 39 |
| Tabelle 2: Quantitative Auswertung nach CD3/CD158a-Depletion. | S. 40 |
| Tabelle 3: Quantitative Auswertung nach CD158b-Anreicherung. | S. 41 |
| Tabelle 4: Quantitative Auswertung nach PBMNC-Isolierung. | S. 43 |
| Tabelle 5: Quantitative Auswertung nach CD56 ⁺ -Anreicherung. | S. 44 |
| Tabelle 6: Quantitative Auswertung CD56 ⁺ /CD3 ⁺ - und CD56 ⁺ /CD3 ⁻ - Zellpopulationen. | S. 45 |
| Tabelle 7: Verlauf der Zellzahlen der MLC. | S. 51 |

8.3 Abkürzungen

| | |
|----------------|---|
| ADCC | Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity |
| AK | Antikörper |
| APC | Allophycocyanin |
| APZ | Antigen-präsentierende Zelle |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CTL | Cytotoxic T-Lymphocytes |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EDTA | Ethylene Diamine Tetraacetic Acid |
| E/T-Verhältnis | Effektor / Target-Verhältnis |
| Europium-FST | Europium-Freisetzungstest |
| Eu-Solution | Europium-Solution |
| FACS | Fluorescence Activated Cell Sorter |
| FACScan | Fluorescence Activated Cell Scan |
| FCS | Fetal Calf Serum |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FL1 | Fluoreszenz 1 (Fluoreszenzkanal für FITC) |
| FL2 | Fluoreszenz 2 (Fluoreszenzkanal für PE) |
| FL3 | Fluoreszenz 3 (Fluoreszenzkanal für PerCP) |

| | |
|---------------|--|
| FL4 | Fluoreszenz 4 (Fluoreszenzkanal für APC) |
| FSC | Forward Scatter |
| g | Erdbeschleunigung |
| GM-CSF | Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor |
| HLA | Humane Leukozyten Antigene |
| IFN- γ | Interferon- γ |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| ITAM | Immune Receptor Tyrosine-Based Activatory Motif |
| ITIM | Immune Receptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif |
| KAR | Killer Cell Activatory Receptor |
| KIR | Killer Cell Inhibitory Receptor |
| LAK-Zellen | Lymphokin-aktivierte Killerzellen |
| LGL | Large Granular Lymphocytes |
| MACS | Magnetic Activated Cell Sorter |
| mAK | monoklonaler Antikörper |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| MLC | Mixed Lymphocyte Culture |
| MSL | Maximale Spezifische Lyserate |
| NK-Zelle | Natürliche Killerzelle |
| PBMNC | Peripheral Blood Mononuclear Cells |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PE | Phycoerythrin |
| PerCP | Peridinin Chlorophyll Protein |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PMA | Phorbol 12-Myristat 13-Acetat |
| RAM | Rat-Anti-Mouse |
| SSC | Side Scatter |
| TCR | T-Zell-Rezeptor |
| TGF- β | Transforming-Growth-Factor- β |
| TNF- α | Tumor-Nekrose-Faktor- α |
| U/min | Umdrehungen / Minute |

DANKSAGUNGEN

Herrn Privatdozent Dr. med. R. Handgretinger danke ich für die Überlassung des Themas, die aufmerksame Betreuung und das beständige Interesse, das er dieser Arbeit zukommen ließ.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Andreas Geiselhart für die unermüdliche Geduld und Hilfsbereitschaft und die gutgelaunte Gelassenheit in allen Belangen.

Herrn Professor Dr. D. Niethammer danke ich für die freundliche Überlassung des Arbeitsplatzes.

Bei den Mitarbeitern des hämatologisch-onkologischen Labors und des KMT-Labors bedanke ich mich für die mannigfaltigen Tips und Tricks und ein sehr gutes Arbeitsklima.

Cornelia Rau danke ich für die zuverlässige und kompetente Zusammenarbeit im Rahmen dieser Arbeit und die vielen gemeinsamen Stunden an der Sterilbank.

Tobias Dezulian war mir eine große Hilfe bei der Formatierung dieser Dissertationsschrift und eine Quelle an Motivation und Verständnis. Danke.

Meiner Mutter und meiner Schwester Andrea danke ich schliesslich dafür, dass sie mir mein Studium und diese Promotionsarbeit durch ihre Unterstützung ermöglicht haben.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name Stefanie Christiane Röhm
Geburtstag 10. März 1974
Geburtsort Sindelfingen

Schul Ausbildung

1980 - 1984 Grundschule Kuppingen
1984 - 1993 Andrae Gymnasium Herrenberg

Hochschulausbildung

1993 - 1994 Studium der europäischen Betriebswirtschaft
Middlesex University Business School, London, GB
1995 - 2001 Studium der Humanmedizin
Universität Tübingen
2000 - 2001 Praktisches Jahr
Innere Medizin, Kantonsspital Basel, CH
Dermatologie, Universitäts-Hautklinik Tübingen
Chirurgie, Kantonsspital Luzern, CH
13.11.2001 Ärztliche Prüfung

Beruflicher Werdegang

02/ 2002 - 01/ 2003 Ärztin im Praktikum an der Universitäts-Hautklinik Tübingen
seit 04/ 2003 Ärztin im Praktikum am Diakonissenkrankenhaus Stuttgart
Abteilung Innere Medizin I