Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

Charakterisierung von NK-Zellsubpopulationen mittels verschiedener Oberflächenmarker

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Birgit Pelka

aus

Stuttgart

2012

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Vogel

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Übersicht über die Therapie lymphatischer Leukämien bei Kindern 1
1.2 Allogene Stammzelltransplantation und die Rolle der NK-Zellen 2
1.2.1 Probleme und Risiken einer Stammzelltransplantation 2
1.2.2 Das Potential von NK-Zellen 4
1.3 Struktur und Funktion von NK-Zellen 6
1.3.1 NK-Zell-Rezeptoren 7
1.3.2 Mechanismus des Killings 10
1.4 Fragestellung 11
2 Material und Methoden 11
2.1 Allgemeine Materialien und Stammlösungen 11
2.2 Gewinnung der NK-Zellen 13
2.2.1 Isolierung der NK-Zellen 13
2.2.2 Anreicherung der NK-Zellen 14
2.3 Targetzellen 15
2.3.1 Zellkulturen 15
2.3.2 Blasten 16
2.4 CD107a-Assay 16
2.4.1 Hintergrundinformationen 16
2.4.2 Materialien 17
2.4.3 Durchführung 17
2.5 Durchflusszytometrie 17
2.5.1 Hintergrundinformationen 17
2.5.2 Materialien 18
2.5.3 Durchführung 19
2.6 Quantitative Durchflusszytometrie 20
2.6.1 Hintergrundinformationen 20
2.6.2 Materialien 20
2.6.3 Durchführung 21

3 Ergebnisse 23
3.1 Vergleich der CD107a-Expression bei unterschiedlichen Target-Zellen 23
3.1.1 Versuche mit K562 23
3.1.2 Versuche mit Sk-N-Be 24
3.1.3 Versuche mit Transfektanten 25
3.1.4 Versuche mit Blasten 27
3.1.5 Vergleich 29
3.2 Charakterisierung der NK-Zellen hinsichtlich der Oberflächenmoleküle CD56, CD16 und CD3 31
3.2.1 Versuche mit K562 32
3.2.2 Versuche mit Sk-N-Be 40
3.3 Charakterisierung der NK-Zellen hinsichtlich aktivierender Rezeptoren 48
3.3.1 Untersuchung von CD69 49
3.3.2 Untersuchung von NKp30 50
3.3.3 Untersuchung von NKp44 51
3.3.4 Untersuchung von NKp46 53
3.3.5 Untersuchung von NKG2D 55
3.3.6 Zusammenfassung 56
3.4 Charakterisierung der NK-Zellen hinsichtlich inhibitorischer Rezeptoren für HLA-Moleküle 58
3.4.1 Versuche mit Cw3/Cw4-Transfektanten 60
3.4.2 Versuche mit Blasten 83
3.4.3 Versuche mit Blasten und CD19-Markierung 102
4 Diskussion 83
4.1 Methodenkritik 115
4.1.1 MACS-Anreicherung von NK-Zellen 115
4.1.2 CD107a-Assay und Durchflusszytometrie 115
4.2 Vergleich der CD107a-Expression in der Gesamtpopulation der NK-Zellen bei unterschiedlichen Targetzellen 117
4.3 Charakterisierung der NK-Zellen hinsichtlich der Oberflächenmoleküle

CD56, CD16 und CD3 118
4.4 Charakterisierung der NK-Zellen hinsichtlich der Rezeptoren CD69, NKp30, NKp44, NKp46 und NKG2D 121
4.5 Charakterisierung der NK-Zellen hinsichtlich inhibitorischer Rezeptoren für HLA-Moleküle 125
4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick 130
5 Zusammenfassung 132
6 Anhang: Abbildungen zu 3.4.1 und 3.4.2 136
Zu 3.4.1 Versuche mit Cw3/Cw4-Transfektanten 136
Zu 3.4.2 Versuche mit Blasten 151
7 Abbildungsverzeichnis 167
8 Tabellenverzeichnis 172
9 Literaturverzeichnis 173

1 Einleitung

1.1 Übersicht über die Therapie lymphatischer Leukämien bei Kindern

Die ALL, die akute lymphoblastische Leukämie, ist die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter mit einem Altersgipfel zwischen dem 2. und 5. Lebensjahr. Dank großer Fortschritte in der Krebsforschung liegt die 5-Jahres-Überlebensrate heute bei über 80%, 75% der Patienten sind schon nach einmaliger Behandlung rückfallfrei.

Die wichtigste Säule in der Behandlung der ALL ist eine intensive Chemotherapie. In manchen Fällen stellt jedoch nur eine allogene Stammzelltransplantation einen kurativen Ansatz dar. Wichtig ist außerdem eine besondere präventive Behandlung des ZNS, da die Blasten durch die Blut-Hirn-Schranke vor Zytostatikawirkungen geschützt sind. Hier wird auch eine Bestrahlung des ZNS eingesetzt.

Die Therapie erfolgt nach Plänen der BFM (Berlin – Frankfurt – Münster) – Studiengruppe und gliedert sich in verschiedene Phasen:

1. Induktionstherapie: sie dauert fünf Wochen; zum Einsatz kommen hauptsächlich die Zytostatika Prednison, Vincristin, Daunorubicin und 1-Asparaginase. Ziel ist das Erreichen einer Remission und damit einer normalen Blutbildung im Knochenmark.
2. Konsolidierung: Über einen Zeitraum von zwei bis vier Monaten wird die Vernichtung der restlichen Tumormasse angestrebt und eine präventive Behandlung des ZNS durchgeführt. Dies dient zur Verminderung eines Frührezidivs. Je nach Rückfallrisiko kommt eine intrathekale und systemische Methotrexat-Therapie oder eine Radiatio zum Einsatz.
3. Reinduktion: Ziel ist die weitere Reduktion noch bestehender Tumorzellen; diese Phase dauert vier Wochen.
4. Erhaltungstherapie: Sie kann bis zu zwei Jahre dauern und dient der Aufrechterhaltung der erreichten Tumorverdrängung.

Während der Therapie kommen ständig diagnostische Maßnahmen zum Einsatz, um die Patienten in eine Risikogruppe einordnen zu können und die Therapie individuell anzupassen. Bedeutsam dafür sind Zytomorphologie und Molekulargenetik der Tumorzellen und das Ansprechen auf die Induktionstherapie.

1.2 Allogene Stammzelltransplantation und die Rolle der NK-Zellen

In manchen Fällen ist eine Stammzelltransplantation die einzige kurative Möglichkeit bei pädiatrischen Patienten mit Leukämie. Mit einer Chemotherapie wird dabei das blutbildende System und damit auch die malignen Zellen des Patienten zerstört und durch Stammzellen eines Spenders ersetzt. Dabei kann der Spender eine HLA-identische Person aus der Familie sein (MFD: matched family donor) oder eine nicht verwandte Person mit den gleichen HLA-Merkmalen (MUD: matched unrelated donor). Inzwischen ist es aber auch möglich, eine haploidente Transplantation durchzuführen. Hierbei kann ein Elternteil dem Kind Stammzellen spenden, obwohl die HLA-Merkmale nicht vollständig übereinstimmen. Dies ist ein sehr vielversprechender Ansatz, da so für fast jeden Patient ein Spender gefunden werden kann.

1.2.1 Probleme und Risiken einer Stammzelltransplantation

Die Hauptprobleme bei einer Stammzelltransplantation sind ein mangelndes Anwachsen des Transplantats (engraftment) bzw. eine Abstoßungsreaktion verbleibender Immunzellen des Empfängers, das Risiko einer Graft-versus-Host-Disease (GvHD), also eine immunologische Reaktion des Transplantats gegen die Körperzellen des Empfängers, eine verzögerte Erholung des Immunsystems mit einem erhöhten Risiko von Infektionen und die unvollständige Zerstörung maligner Zellen mit der Folge eines Rezidivs der Erkrankung.

Dank neuer technischer Möglichkeiten können heute für die Transplantation hoch angereicherte Stammzellen verwendet werden. An der Uniklinik Tübingen wurde dies mit dem CliniMACS-System (M. Schumm et al., 1999) und mit dem

SuperMACS-System (P. Lang. M. Schumm, G. Taylor et al., 1999) durchgeführt. Mit dieser Methode konnte indirekt auch eine effektive T-Zell-Depletion erreicht werden. Dabei war die Anreicherung einer hohen Menge an Stammzellen nicht mit einer hohen Menge an T-Zellen korreliert (R. Handgretinger, P. Lang et al., 2001). Dies hat zwei Vorteile: Zum Einen ist es gerade bei einer haploidenten Transplantation wichtig, eine große Menge an Stammzellen zu transplantieren, um ein gutes engraftmet zu sichern (F. Aversa et al., 1998). Zum Anderen ist eine effektive T-Zell-Depletion wichtig, da T-Zellen hauptsächlich für die Entstehung einer GvHD verantwortlich sind. So war es sogar möglich, auch haploidente Stammzelltransplantationen ohne den Einsatz einer zusätzlichen GvHD-Prophylaxe durchzuführen (R. Handgretinger, R. Klingebiel et al., 2001 und R. Handgretinger, P. Lang et al., 2001).

Die mit der Anreicherung der Stammzellen verbundene T-Zell-Depletion verursacht allerdings auch mehrere Probleme. Diese sind vermehrte Abstoßung des Transplantats (N. A. Kernan et al., 1987), eine langsamere Erholung des Immunsystems und damit eine höhere Rate an Infektionen (R. Handgretinger et al., 2008) und bei manchen Erkrankungen eine höhere Rezidivrate (L. H. Sehn et al., 1999).

Da die Abstoßungsreaktion von T-Zellen des Empfängers ausgehen (N. A. Kernen et al., 1987), ist ein vielversprechender Ansatz zur Therapie bzw. Prophylaxe der Einsatz von OKT-3 (einem anti-CD3-Antikörper) – alleine oder in Kombination mit Immunsuppressiva oder Anti-Thymozyten-Globulin (R. Handgretinger, P. Lang et al., 2001).

Ein weiterer wichtiger Faktor bei einer Stammzelltransplantation ist die Immunrekonstitution des Patienten. Um eine möglichst schnelle Erholung des Immunsystems zu bewirken, ist eine hohe Stammzell-Zahl von Vorteil. Dies kann bei einer haploidenten Transplantation, bei der ein Elternteil als Spender fungiert, besser erreicht werden, da der Spender für wiederholte Mobilisierungen zur Verfügung steht (R. Handgretinger, P. Lang et al., 2001). Eine effektive T-Zell-Depletion ist insofern ebenfalls wichtig, als eine GvHD-Reaktion und/oder ihre Therapie und Prophylaxe mit Immunsuppressiva die Immunrekonstitution verzögert (H. Kook et al., 1996).

Die häufigste Todesursache bei Patienten nach einer Stammzelltransplantation ist jedoch ein Rezidiv der Erkrankung. Auch wenn lichtmikroskopisch keine Blasten entdeckt werden können, ist es möglich, dass noch maligne Zellen im Körper sind. Diese können mit empfindlicheren Methoden wie der Durchflusszytometrie oder der PCR-Analyse nachgewiesen werden. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass ein Auftreten dieser minimalen Restkrankheit oder MRD (minimal residual disease) ein wichtiger prognostischer Faktor ist, und zwar sowohl vor (L. Stramkova et al., 2007, P. Bader et al., 2002, E. Coustan-Smith et al., 2000, A. Biondi et al., 2000) als auch nach Stammzelltransplantation (C. J. Knechtli et al., 1998). Das Auftreten einer MRD kann damit auch als Kriterium für eine intensivere Therapie verwendet werden. Diese kann aus einer intensivierten Konditionierung bestehen oder aber immuntherapeutische Strategien einschließen. Dabei können Infusionen von Spender-T-Lymphozyten eingesetzt werden, die aber ein hohes Risiko einer GvHD bieten (R. Handgretinger, P. Lang et al., 2001). Deshalb sind neue Ansätze nötig, wie zum Beispiel der Einsatz von NK-Zellen.

1.2.2 Das Potential von NK-Zellen

Da der Erfolg der Therapie kindlicher Leukämie mittels haploidenter Stammzelltransplantation hauptsächlich von den Komplikationen der GvHD und eines Rezidivs abhängt, hat die Weiterentwicklung von Strategien dagegen einen großen Stellenwert. NK-Zellen besitzen in diesem Zusammenhang viele nützliche Eigenschaften.

NK-Zellen sind die Lymphozytenpopulation, die sich als erste nach einer Stammzelltransplantation regeneriert (J. E. Reittie et al., 1989). Damit spielen sie eine wichtige Rolle bei der Erholung des Immunsystems. Außerdem scheinen sie für ein stabiles engraftment verantwortlich zu sein (M. Bornhäuser et al., 1999). Bedeutsam ist dabei, dass Spender-NK-Zellen auch bei einer haploidenten Transplantation keine GvHD verursachen, da nicht-hämotopoetisches Gewebe keine Liganden besitzt, die NK-Zellen aktivieren (G. Cudkowicz, M. Bennet, 1971). Maligne Zellen dagegen stellen ein potenzielles Ziel für NK-Zellen dar. So konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass die

Gabe von angereicherten NK-Zellen, die zusätzlich mit IL2 (Interleukin 2) stimuliert worden waren, einen starken Graft-versus-Leukemia-Effekt hervorruft, ohne eine GvHD zu verursachen (M. Zeis et al., 1997). Die Alloreaktivität der Spender-NK-Zellen bei einer haploidenten Transplantation beruht auf einem Fehlen von HLA-Liganden im Empfänger für entsprechende inhibitorische KIR-Rezeptoren, für die ein Ligand im Spender vorhanden ist. Diese Konstellation wird als mismatch bezeichnet. Im Jahr 1999 konnte von L. Ruggeri et al. gezeigt werden, dass sich die so vorhergesagte Alloreaktivität nach einer haploidenten Transplantation bestätigte und die NK-Zellen in der Lage waren, ex vivo die Leukämiezellen des Patienten zu töten (L. Ruggeri et al., 1999). Dabei litten die Patienten nicht unter einer GvHD und zeigten auch ein besseres engraftment als die Patienten ohne mismatch. Die weitere experimentelle und klinische Erfahrung bestätigte das antileukämische Potential der NK-Zellen bei einer Transplantation mit KIR-Ligand-mismatch und die Möglichkeit, dadurch die Rezidivrate zu senken, ohne eine GvHD zu verursachen, und das Überleben zu verbessern (L. Ruggeri et al., 2007). Dieses Modell des KIR-Ligand-mismatch ist allerdings vor allem für Patienten mit AML geeignet. Für die Therapie von Kindern mit ALL wurde dagegen das Rezeptor-Ligand-Modell entwickelt, um so auch hier die Alloreaktivität von NK-Zellen vorhersagen zu können (W. Leung et al., 2004). Hierzu müssen auf den Spender-NK-Zellen KIR-Rezeptoren vorhanden sein, für die es keinen HLA-Liganden im Empfänger und damit auf den leukämischen Blasten gibt.

Inzwischen gibt es auch Ansätze, diese NK-Alloreaktivität noch besser zu nutzen, besonders bei Patienten, die zum Zeitpunkt der Transplantation nicht in Remission sind. Um schon bei der Transplantation Spender-NK-Zellen ko-transfundieren zu können, werden die Stammzellen nicht positiv selektiert, sondern es werden mittels CD3/CD19-gekoppelter magnetischer Microbeads T- und B-Zellen aus dem Transplantat entfernt (M. Schumm et al., 2006).

Möglich ist auch eine Aufreinigung und Expansion von Spender-NK-Zellen ex vivo, die dann zur Immuntherapie bei pädiatrischen Patienten mit Leukämie bei minimaler Resterkrankung verwendet werden können (U. Koehl et al., 2005).

Eine Schwierigkeit besteht allerdings darin, große Mengen von NK-Zellen

herzustellen, damit auch mehrfache Infusionen möglich sind. H. Fujisaki et al. entwickelten eine Möglichkeit, NK-Zellen zu expandieren, indem sie mit einer modifizierten K562-Zelllinie inkubiert wurden, die eine membrangebundene Form von Interleukin 15 und dem 41BB Liganden besitzt (H. Fujisaki et al., 2009). Die so expandierten NK-Zellen waren in der Lage, AML-Zellen in vitro besser zu killen als unstimulierte oder IL2-stimulierte NK-Zellen und zeigten auch im Mausmodell einen antileukämischen Effekt. Diese Therapiemöglichkeit wird nun klinisch getestet.

Vielversprechend scheint auch der Einsatz von Zytokinen wie IL12 und IL18 zu sein. In vitro konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen so stimuliert werden können und damit auch eine Alloreaktivität erreicht werden kann, wenn kein mismatch vorliegt (W. Leung et al. 2004).

In jüngster Zeit wurde außerdem ein Antikörper entwickelt, der an KIR-Rezeptoren bindet und ihr inhibitorisches Signal unterbindet (F. Romangé et al., 2009). In vitro und im Mausmodell konnte dadurch ein besseres Killing von autologen AML-Zellen erreicht werden. Diese positiven Ergebnisse ermöglichen nun eine klinische Phase-I-Studie.

1.3 Struktur und Funktion von NK-Zellen

Die Natürlichen Killerzellen sind neben den T- und B-Zellen die dritte eigenständige Gruppe der Lymphozyten, gehören aber zum angeborenen Immunsystem. Sie sind unter normalen Bedingungen hauptsächlich im peripheren Blut, in der Milz und im Knochenmark zu finden. Die Anzahl der NK-Zellen im Blut liegt bei etwa 10-15% der peripher zirkulierenden Lymphozyten, unterliegt aber sowohl starken interindividuellen Schwankungen wie auch einer zirkadianen Rhythmik (P. Bourin et al., 1993). Körperliche Aktivität, Stress- und Entzündungsreaktionen beeinflussen ebenfalls die NK-Zell-Zahl.

Da NK-Zellen viele azurophile Granula im Zytoplasma besitzen, werden sie auch als „large granular lymphocytes“ (LGL) bezeichnet. In der Durchflusszytometrie bestitzen sie den Phänotyp $CD56^{pos}$ $CD3^{neg}$.

Ihre Aufgabe im Immunsystem besteht darin, virusinfizierte Zellen und maligne Zellen zu töten. Außerdem spielen sie eine Rolle in der Immunregulation durch

Zytokinsekretion als Bindeglied zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem.

1.3.1 NK-Zell-Rezeptoren

NK-Zellen besitzen eine Vielzahl inhibitorischer und aktivierender Rezeptoren an ihrer Oberfläche. Ob eine NK-Zelle aktiviert wird oder nicht, hängt davon ab, ob die inhibitorischen oder die aktivierenden Signale die Oberhand gewinnen. Dabei sind NK-Zellen nicht wie T-Zellen MHC-restringiert. Trotzdem besitzen sie Rezeptoren, die MHC-Moleküle erkennen und vorwiegend inhibitorische Signale übermitteln. Diese werden in zwei Familien eingeteilt: die immunoglobulin-like superfamily mit den sogenannten KIR-Rezeptoren (killer cell immunoglobulin-like receptors) und leukocyte immunoglobulin-like receptors (LIR) oder auch immunoglobulin-like transkripts (ILT) und die C-type lectin superfamily, zu der die CD94:NKG2A/C/E-Rezeptoren gehören.

Unterschiedliche KIR-Rezeptoren erkennen verschiedenen Gruppen von HLA-Molekülen: KIR2DL1 oder CD158a bindet an HLA-Moleküle der C2-Gruppe (HLA-Cw2, -Cw4, -Cw5, -Cw6), KIR2DL2 oder CD158b bindet an HLA-Moleküle der C1-Gruppe (HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7, -Cw8, -Cw9), KIR3DL1 oder CD158e bindet an HLA-Bw4-Moleküle und KIR3DL2 bindet an HLA-A3/A11-Liganden (M. W. Lowdell, 2003). Die Liganden für ILT-Rezeptoren, z.B. ILT2 oder CD85j, sind HLA-G-Moleküle, die zu den nichtklassischen HLA-Klasse-I-Molekülen gehören (J. LeMaoult et al., 2005). Ebenfalls zu den nichtklassischen HLA-Klasse-I-Molekülen gehört HLA-E, das Peptide anderer eigener HLA-Klasse-I-Moleküle bindet. HLA-E ist der Ligand für den CD94:NKG2A/C/E-Rezeptoren-Komplex (V. M. Braud et al., 1998). Wichtig dabei ist, dass nicht alle NK-Zellen alle Rezeptoren gleichzeitig exprimieren.

Die Reifung der NK-Zellen beinhaltet das sogenannte „licensing“: Erst durch den Kontakt mit körpereigenen MHC-I-Molekülen, die an Rezeptoren auf der NK-Zelle binden, werden NK-Zellen kompetent (S. Kim et al., 2005). NK-Zellen ohne Rezeptoren für körpereigene HLA-Moleküle besitzen dagegen nur eine geringe funktionelle Aktivität. So wird erreicht, dass NK-Zellen tolerant gegenüber körpereigenen Zellen sind.

Virusinfizierte und maligne Zellen können von NK-Zellen deshalb gekillt werden, weil sie ihre HLA-Expression herunterregulieren. So sind keine Liganden für die KIR-Rezeptoren vorhanden, die inhibitorischen Signale bleiben aus und die NK-Zelle wird aktiv. Dies wird als „missing self“ bezeichnet und wurde 1986 von K. Kärre et al. erstmals postuliert. Bei einer haploidenten Stammzell-transplantation, bei der die NK-Zellen einen KIR exprimieren, für den es keinen HLA-Ligand auf den leukämischen Blasten gibt, führt dies dazu, dass die Spender-NK-Zellen leukämische Blasten lysieren können (siehe oben).
Inzwischen konnten genauere Erkenntnisse über die Funktion der unterschiedlichen KIR-Rezeptoren gewonnen werden. So konnte gezeigt werden, dass die aktivierende Form des KIR-Rezeptors für die HLA-C2-Gruppe, KIR2DS1, eine wichtige Rolle spielen kann. Während $CD158a^{pos}$ NK-Zellen C1/C1-Blasten gut killen konnten, besaßen $CD158b^{pos}$ NK-Zellen nur eine geringe Alloreaktivität gegenüber C2/C2-Blasten – nur NK-Zellen, die den aktivierenden Rezeptor KIR2DS1 exprimierten, lysierten die C2/C2-Blasten (D. Pende et al., 2009). B. Foley et al. konnten zeigen, dass die KIR2DS1-vermittelte Aktivierung stärker ist als die inhibitorischen Signale, die über den NKG2A-Rezeptor vermittelt werden (B. Foley et al., 2008). Dies würde bedeuten, dass Spender, die für HLA-C1 homozygot sind, nicht nur alloreaktive NK-Zellen besitzen, die Blasten aufgrund des missing self erkennen (also C2/C2-Blasten), sondern auch alloreaktive NK-Zellen gegenüber C1/C2-heterozygoten Blasten. Alle dieses Erkenntnisse können für die Suche nach dem am besten geeigneten Spender wertvoll sein.

Abgesehen von den oben beschriebenen Rezeptoren für MHC-I-Moleküle besitzen NK-Zellen noch eine Vielzahl anderer, hauptsächlich aktivierender Rezeptoren. Die Liganden dafür sind in vielen Fällen noch unbekannt, man geht jedoch davon aus, dass sie z.B. von Tumorzellen exprimiert werden. Wenn diese keine Liganden für die inhibitorischen Rezeptoren besitzen, sorgt die Bindung an die aktivierenden Rezeptoren auf der NK-Zelle dafür, dass sie lysiert werden können.
Die drei Rezeptoren NKp30, NKp44 und NKp46 werden zusammengefasst

unter dem Begriff NCR (natural cytotoxicity receptors). Sie sind spezifisch für NK-Zellen. Ihre Expressionsdichte steht in gegenseitigem Zusammenhang und korreliert mit der Höhe der zytolytischen Aktivität der NK-Zelle (S. Sivori et al., 2000). NKp30 wird von allen ruhenden und aktivierten NK-Zellen exprimiert und ist für manche Tumorzellen der wichtigste aktivierende Rezeptor, meist aber zusammen mit den anderen NCRs verantwortlich für die Aktivierung der NK-Zelle (D. Pende et al., 1999). NKp44 wird nur von IL2-stimulierten NK-Zellen exprimiert. Dies mag zum Teil die erhöhte Fähigkeit dieser Zellen zur Lyse von Tumorzellen erklären. Mit Blockierungsversuchen konnte auch für diesen Rezeptor eine wichtige Rolle in der Interaktion mit Tumorzellen aufgezeigt werden, zusammen mit NKp46 (M. Vitale et al., 1998). NKp46 wiederum wird von allen ruhenden und aktivierten NK-Zellen exprimiert. Eine Bindung an diesen Rezeptor erzeugt ein starkes Signal für die zytolytische Aktivität, das jedoch durch eine Bindung an einen inhibitorischen Rezeptor wie NKG2A wieder herunterreguliert wird (S. Sivori et al., 1997).
Ein weiterer aktivierender Rezeptor ist NKG2D. Dieser ist allerdings nicht spezifisch für NK-Zellen, sondern wird auch von T-Zellen und Makrophagen exprimiert. Er spielt eine wichtige Rolle in der NK-vermittelten Immunität gegenüber virusinfizierten und malignen Zellen. Die aktivierenden Signale, die er vermittelt, können die inhibitorischen Signale der MHC-I-Rezeptoren überwiegen und machen ihn so zu einem entscheidenden Weichensteller. Die Liganden für NKG2D sind verschiedene Stress-induzierte Moleküle wie MICA, MICB und die ULBP-Familie (P. Obeidy et al., 2009)
Auch CD69 ist nicht spezifisch für NK-Zellen. Diese exprimieren CD69 nach Aktivierung z.B. durch IL2. Mittels eines Antikörpers gegen CD69 konnte gezeigt werden, dass die Bindung an diesen Rezeptor die zytolytische Aktivität von NK-Zellen triggert (A. Moretta et al., 1991).

Zuletzt soll noch auf das Oberflächenantigen CD16 eingegangen werden, das eine wichtige Rolle spielt. Es ist der niedrig affine IgG-Rezeptor FcγRIII und bindet an die konstante Region bestimmter Antikörper. Über diesen Rezeptor wird die Antikörper-abhängige Zytotoxizität (ADCC, antibody-dependent cell-

mediated cytotoxicity) vermittelt. So besitzen NK-Zellen neben der natürlichen Zytotoxizität, die über oben genannte Rezeptoren gesteuert wird, einen alternativen Mechanismus zur Zell-Erkennung und -Lyse. Zellen, die über den missing self-Mechanismus nicht erkannt worden wären, auf deren Oberfläche aber entsprechende Antikörper gebunden sind, können über den CD16-Rezeptor erkannt werden und die Lyse wird eingeleitet.

1.3.2 Mechanismus des Killings

Ähnlich wie CD8-positive zytotoxische T-Zellen können NK-Zellen über zwei Wege eine Targetzelle lysieren: zum Einen durch Bindung an den Fas-Liganden (Fas-L), zum Anderen durch Exozytose zytotoxischer Granula. Exprimiert eine Zelle das Fas-Molekül (APO-1, CD95), bindet dieses an Fas-L und löst damit in der Targetzelle die Aktivierung von Enzymen aus, die zur Apoptose führen. Der andere Mechanismus wird nach Erkennung einer Targetzelle über einen Ca^{2+}-Einstrom eingeleitet. Es kommt dann zu einer Fusionierung der zytoplasmatischen Granula mit der Zellmembran und zur Freisetzung ihres Inhalts. Dieser besteht aus Proteasen (Granzym) und Perforin, ein Molekül, das dazu führt, dass in der Membran der Zielzelle Poren entstehen. Durch diese Poren kann Granzym in die Zielzelle gelangen und dort die Apoptose induzierten; außerdem kommt es durch einen Ladungs- und Wasserausgleich über diese Poren ebenfalls zur Zerstörung der Zielzelle. In der Membran dieser Granula befindet sich das Molekül CD107a oder h-LAMP1 (lysosome-associated membrane protein). Durch Fusionierung der Granula mit der Zellmembran kommt dieses Molekül an die Oberfläche und kann nun als funktioneller Marker für die zytotoxische Aktivität der NK-Zelle dienen (G. Alter et al., 2004).

Während der Lyse einer Targetzelle setzen NK-Zellen außerdem verschiedene Zytokine frei und nehmen so Einfluss auf die Immunantwort. Zu nennen sind dabei TNF-α, Interferon-γ, verschiedenen Interleukine (IL1, IL3, IL4, IL6) und auch GM-CSF, TGF-β und IFN-α. Über diese Signalstoffe wird die Aktivität von T-Zellen, Monozyten und Granulozyten reguliert und so die Immunantwort optimiert und koordiniert.

1.4 Fragestellung

NK-Zellen sind eine heterogene Zellpopulation und besitzen eine Vielzahl inhibitorischer und aktivierender Rezeptoren. Ziel dieser Arbeit war es, NK-Zell-Populationen zu definieren, die eine besonders gute Fähigkeit zur Targetzell-Lyse besitzen. Dazu wurden NK-Zellen gesunder Spender mit Targetzellen (Zelllinien und Blasten) inkubiert und die aktiven NK-Zellen mittels des Oberflächenmoleküls CD107a identifiziert. Mithilfe durchflusszytometrischer Untersuchungen konnte dann die Expression von weiteren Rezeptoren untersucht und so die aktiven NK-Zellen charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Materialien und Stammlösungen

Sterile Werkband Hera safe (Heräus)

Brutschrank Hera cell (Heräus)

Laborzentrifungen:

- Rotixa 50 RS (Hettich)
- Rotixa RP (Hettich)

Cellcounter Advia 120 (Bayer)

Vortexer VF 2 (Janke & Kunkel)

Pipettiergerät Pipettboy (Tecnomara)

Verstellbare Pipetten (Pipetman) (Gilson)

Lichtmikroskop (Zeiss)

Sterile Plastikpipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml) (Costar)

Pipettenspitzen (Gilson)

Zellkulturflasche 75 cm^2, 250 ml (greiner bio, CELLSTAR®)

Cell Scraper (Corning Incorporated costar®)

Falcon-Röhrchen (PP-Test tubes) 15 und 50 ml (greiner bio, CELLSTAR®)

Eppendorf Tubes (Safe-Lock Tubes) 1,5 ml (Eppendorf)

Handschuhe (Safeskin)

Spritzen, steril, 10 ml, 20 ml, 50 ml (Braun)

Injectomat®-Spritze 50 ml (Fresenius Kabi)

Butterfly 21 (Abbott)
Kanülen Sterican®, 20G, 22G, 24G (Braun)
Neubauer Zählkammer (Brandt)
Deckglas (Menzel)
Trypanblau (0,4%) (Sigma)
Trypsin/EDTA Solution (Biochrom)
G418-BC Sulfate powder substance (verdünnt in PBS 5 mg/ml) (Biochrom)
Analyseröhrchen für die FACS-Analyse 5ml, Rundboden (Becton Dickinson)

Stammlösung A: MACS-Puffer

- 500 ml Phosphat Buffered Saline (PBS) (Gibco)
- 10,6 ml EDTA (250mM) (Universitätsapotheke)
- 10 ml Humanalbumin 20% (DRK Baden-Württemberg)

Stammlösung B: FACS-Puffer (Becton Dickinson)

Stammlösung C: Medium

- 500 ml RPMI 1640 (Biochrom)
- 50 ml Fetal Bovine Serum (FBS) (PAA Laboratories)
- 10 ml Hepes-Buffer 1M (Biochrom)
- 5 ml L-Glutamin (200 mM) (Biochrom)
- 5 ml Penicillin(10000 U)/Streptomycin(10 mg/ml) (Biochrom)

Stammlösung D: Medium (für Zelllinie Sk-N-Be)

- 250 ml Ham´s F-12 (Lonza)
- 250 ml EMEM (Lonza)
- 50 ml Fetal Bovine Serum (FBS) (PAA Laboratories)
- 2,5 ml L-Glutamin (200 mM) (Biochrom)
- 5 ml Penicillin (10000 U) / Streptomycin (10 mg/ml) (Biochrom)
- 2,5 ml NEA (Biochrom)
- 2,5 ml Natriumpyruvat (Biochrom)

2.2 Gewinnung der NK-Zellen

2.2.1 Isolierung der NK-Zellen

2.2.1.1 Hintergrundinformationen

Da periphere mononukleäre Zellen (PMNC) eine geringere Dichte aufweisen als Erythrozyten und Granulozyten, lassen sie sich durch eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Hypaque von den anderen Blutzellen trennen. Dabei sammeln sich PMNC und Thrombozyten auf der Ficollschicht an, während die Erythrozyten und Granulozyten sich am Boden absetzen. Die PMNC wurden aus heparinisiertem Vollblut freiwilliger Spender gewonnen.

2.2.1.2 Materialien

Peripheres Vollblut freiwilliger Spender
Heparin-Natrium-25000 ratiopharm®
Ficoll (Seromed)
Phosphat Buffered Saline (PBS) (Gibco)

2.2.1.3 Durchführung

1. Heparinisiertes Vollblut wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt. 25 ml Ficoll-Hypaque wurden in einem 50 ml Röhrchen vorgelegt, danach wurden vorsichtig 25 ml des verdünnten Vollblutes aufgeschichtet.
2. Die Röhrchen wurden 30 min bei Raumtemperatur mit 400 g, einer Anlaufzeit von 100 s und der Bremseinstellung 0 zentrifugiert.
3. Nachdem die obere Schicht (Plasma und Thrombozyten) mit einer sterilen Pipette entfernt worden war, wurde die Schicht, welche die PMNC enthielt, mit einer weiteren sterilen Pipette abgesaugt und in ein 50 ml-Röhrchen überführt.
4. Dies wurde mit PBS aufgefüllt und 10 min mit 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet resuspendiert und mit MACS-Puffer aufgefüllt. Ein weiteres Mal wurde zentrifugiert (10 min, 300 g).
5. Der Überstand aller Röhrchen wurde abgesaugt, die Zellpellets resuspendiert und alle in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Dieses wurde mit

mindestens 10 ml MACS-Puffer aufgefüllt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 400 bis 500 µl entnommen, der Rest erneut bei 300 g 10 min zentrifugiert.

2.2.2 Anreicherung der NK-Zellen

2.2.2.1 Hintergrundinformationen

Die Anreicherung bestimmter Zellen mittels MACS („Magnetic-activated cell sorting“) basiert auf der Markierung charakteristischer Epitope auf diesen Zellen mit monoklonalen Antikörpern, die mit magnetischen Eisenoxid-Partikeln konjugiert sind. So werden zur Gewinnung von NK-Zellen CD56-Microbeads eingesetzt. Durch das starke Magnetfeld, in dem sich eine Trennsäule mit paramagnetischer Eisenmatrix befindet, werden die markierten Zellen beim Durchlauf durch die Säule aufgehalten, während die unmarkierten Zellen der Zellsuspension die Trennsäule passieren. Die markierten Zellen lassen sich anschließend, nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld, als Positivfraktion eluieren.

2.2.2.2 Materialien

MACS Magnetic Cell Separator (Miltenyi Biotec)
Separationssäule Typ LS^+ (Miltenyi Biotec)
Stammlösung A
CD56-Microbeads (Miltenyi Biotec)
IL2 Proleukin S 1 mg (Chiron GmbH)

2.2.2.3 Durchführung

1. Das Zellpellet aus PMNC wurde in Stammlösung B gelöst und auf eine Dichte von 100 mio Zellen pro ml eingestellt.
2. Es folgte die Zugabe von CD56-Microbeads (200µl/ml Zellsuspension) und eine 30minütige Inkubation bei ca. 4°C auf einem Schüttler.
3. Die Zellen wurden mit MACS-Puffer 10 min mit 300 g zentrifugiert und anschließend in 7 ml Puffer resuspendiert.
4. Währenddessen wurde eine Trennsäule im Magnetfeld befestigt und mit

10 ml MACS-Puffer gespült.

5. Nun ließ man die Zellsuspension vollständig durch die Säule laufen.
6. Um unmarkierte Zellen aus der Säule zu entfernen, wurde sie drei Mal mit 3 ml Puffer gespült.
7. Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die Zellen wurden herausgespült. Dies geschah mit Hilfe eines Stempels, mit dem zwei Mal 7 ml Puffer schnell durch die Säule gedrückt wurden.
8. Das Eluat wurde 10 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen, das Pellet mit Stammlösung C resuspendiert und nochmals zentrifugiert; währenddessen wurde die Zellzahl bestimmt.
9. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in Stammlösung C resuspendiert und auf 1 mio Zellen pro ml eingestellt. Der Hälfte der Zellsuspension wurde IL2 zugegeben in der Konzentration 1000 IE/ml. Die Zellen konnten dann im Brutschrank bis zur ihrer Verwendung ein bis zwei Tage aufbewahrt werden.

2.3 Targetzellen

2.3.1 Zellkulturen

Es wurden folgende Zelllinien verwendet:

- K562 (eine höchst undifferenzierte menschliche Erythroleukämie-Zelllinie, die keine MHC-Klasse I-Moleküle exprimiert und als typische NK-sensitive Targetzelle gilt)
- Sk-N-Be (eine Neuroblastom-Zelllinie)
- die Cw3/Cw4-Transfektanten einer EBV-transformierten Zelllinie, LCL721.221.Cw3 und LCL721.221.Cw4 (diese besitzen ein Gen für Cw3 bzw. Cw4 auf einem Plasmid, das mit einer G418-Resistenz gekoppelt ist)

Die Zelllinien wurden über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, bezogen. Für die Zelllinie K562 sowie für die

Transfektanten wurde als Medium Stammlösung C verwendet, für die Zelllinie Sk-N-Be Stammlösung D. Den Cw3/Cw4-Zellkulturen wurde außerdem G418 zugesetzt, um die Zellen zu vernichten, die kein Cw3 bzw. Cw4 exprimieren. Alle Zellkulturen wurden alle 2-3 Tage umgesetzt, dafür wurde bei den Transfektanten und der Sk-N-Be-Kultur ein Zellschaber oder Trypsin verwendet, um die adhärenten Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen.

2.3.2 Blasten

Es wurden kryokonservierte ALL-Blasten aus dem Knochenmark von pädiatrischen Patienten der Uniklink Tübingen verwendet. Sie wurden nach dem Auftauen rasch mit PBS verdünnt. Nach zweimaligem Waschen (mit PBS, Zentrifugenprogramm 3) wurden sie in Stammlösung C aufgenommen und sofort weiter verwendet.

2.4 CD107a-Assay

2.4.1 Hintergrundinformationen

NK-Zellen enthalten intrazelluläre Vesikel mit Perforin und Granzym. Dieses wird freigesetzt, um Targetzellen zu lysieren. Dabei verschmilzt die Membran der Vesikel mit der Zellmembran. CD107a oder auch LAMP-1 (lysosomal-associated membrane protein-1), das in der Vesikelmembran enthalten ist, wird nun an der Zelloberfläche exprimiert. Die CD107a-Expression korreliert mit der Zytokin-Sekretion und der Lyse von Targetzellen und ist ein sensitiver Marker für die Aktivierung von NK-Zellen (G. Alter et al., 2004; O. Penack et al., 2005). Nach der Inkubation mit Targetzellen, z.B. K562, bei der auch ein fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen CD107a zugegeben wird, kann die CD107a-Expression der aktivierten NK-Zellen mittels FACS-Analyse sichtbar gemacht werden. Dabei können dann gleichzeitig auch andere Oberflächenmoleküle markiert und analysiert werden. So kann die unterschiedliche CD107a-Expression von NK-Subpopulationen bestimmt werden.

2.4.2 Materialien

Mikrotiterplatte, U-Form, 96 Kavitäten (Greiner)

PE- und PE-Cy5 Mouse Anti-Human CD107a (BD Pharmingen)

Monensin sodium salt 90-95%TLC, verdünnt auf 2 mM in 100% Ethanol (Sigma)

2.4.3 Durchführung

1. Die Target- und Effektorzellen wurden auf eine Dichte von 2 mio Zellen pro ml Medium (Stammlösung C) eingestellt.
2. Pro well wurden 15 µl der CD107a-Antikörper vorgelegt.
3. In jedes well wurden je 100 µl der Suspension der Target- und Effektorzellen pipettiert, außerdem für die Kontrollen jeweils 100 µl Target- oder Effektorzellen alleine mit 100 µl Medium.
4. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurde pro well 5 µl Monensin zugefügt, dann wurden die Zellen zwei weitere Stunden inkubiert.
5. Der Inhalt jedes wells wurde in je ein FACS-Analyse-Röhrchen überführt, mit FACS-Puffer aufgefüllt und bei 300 g 10 min zentrifugiert.
6. Nach Abkippen des Überstandes wurde der Inhalt der Röhrchen zu den bereits vorgelegten FACS-Antikörpern hinzugefügt.

2.5 Durchflusszytometrie

2.5.1 Hintergrundinformationen

Mit der Methode der Durchflusszytometrie oder FACS-Analyse können die Zellen einer Suspension auf Einzelzellebene hinsichtlich physikalischer und chemischer Eigenschaften untersucht werden. Dazu wird die Lichtstreuung analysiert und es können Oberflächenmoleküle mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper sichtbar gemacht werden.

Zur Messung wird die Zellsuspension mit Überdruck durch eine Stahlkapillare angesaugt, durch eine Messküvette geleitet und beim Eintritt in die Messkammer stark beschleunigt, so dass die Zellen einzeln aneinandergereiht den Laserstrahl passieren (hydrodynamische Fokussierung). Nun werden die

Streuungseffekte und die Fluoreszenz der verwendeten Antikörper detektiert. Zelleigenschaften, welche die Lichtstreuung beeinflussen, sind die Zellgröße, die Struktur der Zellmembran und intrazelluläre Bestandteile. Dabei ist das Vorwärtsstreulicht (forward light scatter, FSC) ein Maß für die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) ein Maß für die intrazelluläre Granularität. Wenn nun SSC gegen FSC dargestellt wird, ergibt sich eine charakteristische Aufteilung der Blutzellen, in der Lymphozyten von Monozyten und Granulozyten abgegrenzt werden können.

Zur Darstellung von Oberflächenmolekülen und zur immunologischen Phänotypisierung werden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern inkubiert, an die fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt sind. Beim Passieren des Laserstrahls werden die Farbstoffe angeregt und die emittierte Fluoreszenz wird detektiert. Auf einer Zelle können mit einer geeigneten Farbstoffkombination gleichzeitig mehrere Antigene dargestellt werden. Es ist jedoch zu beachten, dass Zellen auch ohne Anfärbung eine gewisse Autofluoreszenz zeigen. Deshalb wird zu Beginn eine Kontrollmessung unmarkierter Zellen durchgeführt und festgelegt, ab welcher Fluoreszenzintensität eine Zelle als positiv gilt.

2.5.2 Materialien

FACSCalibur (Becton Dickinson)
Angeschlossene Hardware (Apple)
Auswertungsprogramm CellQuest (Becton Dickinson)
Monoklonale Antikörper:
Kontrollantikörper FITC, PE, PerCP, APC (Becton Dickinson)
CD3 APC (Becton Dickinson)
CD16 PE (Becton Dickinson)
CD56 FITC, APC (Becton Dickinson)
CD69 FITC (BD Biosciences)
CD85j / ILT2 PE (Beckman Coulter)
CD107a PE, PeCy5 (BD Pharmingen)
CD158a FITC, PE (Miltenyi Biotec)
CD158b FITC, PE (Miltenyi Biotec)

CD158e / NKB1 FITC, PE (BD Pharmingen)
CD159a / NKG2A PE (Beckman Coulter)
NKp30 PE (Beckman Coulter)
NKp44 PE (Beckman Coulter)
NKp46 PE (Beckman Coulter)
NKG2D APC (Miltenyi Biotec)

2.5.3 Durchführung

1. Die Zellsuspension, die untersucht werden sollte, wurde auf die Konzentration 1 mio/ml eingestellt.
2. In der gewünschten Kombination wurden jeweils 5 µl der fluoreszierenden monoklonalen Antikörper in Röhrchen vorgelegt und 100 µl Zellsuspension zugegeben.
3. Die Proben wurden mittels Vortexer geschüttelt und 30 min im Kühlschrank inkubiert.
4. Die Röhrchen wurden mit Stammlösung B aufgefüllt, bei 400 g 10 min bei 10°C zentrifugiert und dekantiert. Die Zellen wurden resuspendiert und konnten im Kühlschrank unter Lichtabschluss einen Tag bis zur Messung aufbewahrt werden.
5. Zu Beginn der Messung am Durchflusszytometer FACSCalibur wurden die Messeinstellungen anhand der Kontrollen angepasst. Dazu wurden die Verstärkerspannungen für FSC und SSC so eingestellt, dass in der Darstellung SSC gegen FSC die charakteristische Zellverteilung zustande kommt. Nun konnte um die Lymphozyten ein Gate gesetzt werden, so dass nur diese Zellen in einem weiteren Diagramm dargestellt wurden.
6. Die Verstärkerspannungen der anderen Messkanäle wurden so eingestellt, dass sich bei den Kontrollfärbungen die Zellen im jeweiligen Kanal zwischen 10^0 und 10^1 der Fluoreszenzskala befinden.
7. Nun wurden die Proben gemessen.
8. Es schloss sich die Auswertung mit Hilfe der Software CellQuest an. Dazu wurde zunächst ein Gate um die Lymphozytenpopulation gesetzt. Diese Zellen wurden nun in weiteren Diagrammen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz

dargestellt, und zwar wurden immer zwei Kanäle gegeneinander aufgetragen. Von der Software wurden die absoluten und relativen Häufigkeiten der Zellen automatisch berechnet. Außerdem konnte ein Quadrant gesetzt werden, der die Zellen in doppelt negativ, einfach positiv und doppelt positiv einteilt, und es konnten weitere Gates gesetzt werden, um die zu untersuchenden Zellen weiter einzugrenzen.

2.6 Quantitative Durchflusszytometrie

2.6.1 Hintergrundinformationen

Mit Hilfe der quantitativen Durchflusszytometrie wird untersucht, wieviel des jeweiligen Antigens pro Zelle exprimiert wird. Dazu dient die Fluoreszenzintensität als Maß für die Anzahl der gebundenen Antikörper. Um eine genaue Aussage treffen zu können, werden Referenzproben gemessen, deren Antigenexpressionsdichte bekannt ist, und die zu untersuchenden Proben dann in Relation dazu gesetzt. Das Qifikit von Dako enthält solche Referenzproben, und zwar Beads mit einer definierten Menge eines Mausantikörper, die mit einem Sekundärantikörper – FITC-markierte Ziege-anti-Maus-Antikörper – markiert sind. Diese heißen Calibration Beads und es gibt davon in einem Kit fünf verschiedene Beads mit unterschiedlicher Antikörperdichte. Außerdem enthält das Kit Set-Up-Beads, das sind unmarkierte Beads und Beads mit einer hohen Zahl an Mausantikörpern. Sie dienen zur Einstellung der Verstärkungen des FACS-Gerätes. Die zu untersuchenden Zellen werden vor der Messung mit einem gegen das entsprechende Antigen gerichteten Mausantikörper inkubiert und anschließend mit dem gleichen Sekundärantikörper markiert, der auch bei den Beads verwendet wurde. Um die HLA-Klasse-I-Expression zu bestimmen, wurde in dieser Arbeit als Primärantikörper ein unmarkierter W6/32-Antikörper der Firma Dako verwendet.

2.6.2 Materialien

FACSCalibur (Becton Dickinson)
Angeschlossene Hardware (Apple)

Auswertungsprogramm CellQuest (Becton Dickinson)
Quifikit (Dako)
HLA-ABC-Antikörper W6/32 unmarkiert (Dako)

2.6.3 Durchführung

1. Die Zellsuspension wurde auf eine Konzentration von 1 Mio Zelllen pro ml eingestellt.
2. 5 µl Kontrollantikörper und 20 µl Anti-HLA-I-Antikörper wurden jeweils in ein Probenröhrchen pipettiert. Je 100 µl der Zellsuspension wurde dazugegeben, die Rörchen wurden auf dem Vortexer geschüttelt und anschließend 30 min im Kühlschrank inkubiert.
3. Nach der Inkubation wurden die Röhrchen mit Stammlösung A aufgefüllt und 5 min bei 300 g zentrifugiert und dekantiert.
4. 50 µl Set-Up-Beads und Calibration-Beads wurden in je ein Röhrchen pipettiert.
5. Alle Röhrchen wurden mit Stammlösung A aufgefüllt und nochmals wie bei 3. gewaschen.
6. In jedes Röhrchen wurden 10 µl des Sekundärantikörpers zugegeben, der vorher 1:100 mit Stammlösung A verdünnt wurde, geschüttelt und 30 min im Kühlschrank inkubiert.
7. Nach Auffüllen mit Stammlösung B wurden die Röhrchen 10 min bei 400 g zentrifugiert, dekantiert und resuspendiert. Sie konnten nun gemessen werden.
8. Zunächst wurde die Verstärkung des FITC-Kanals mit den Set-Up-Beads eingestellt, so dass im Histogramm die unmarkierten Beads sich im Bereich zwischen 10^0 und 10^1 befanden und die hochmarkierten Beads noch gut darstellbar waren.
9. Mit dieser Einstellung wurden jetzt die Calibration-Beads und die Zellen gemessen. Die Verstärkerspannung für den Side Scatter konnte gegebenenfalls angepasst werden.
10. Die Auswertung erfolgte anhand eines Histogramms, in dem die Messergebnisse dargestellt wurden. Zunächst wurden die geometrischen

Mittel der Fluoreszenzintensität der fünf Calibration-Beads-Populationen bestimmt. In einer Excel-Tabelle wurden die Werte den auf der Packungsbeilage angegebenen Werte für die Antigendichte gegenübergestellt. Daraus wurde nun ein Diagramm mit einer Ausgleichsgeraden erstellt und die Formel ermittelt, mit der von der Fluoreszenzintensität auf die Antigendichte geschlossen werden kann.

11. Die Werte für die Antigendichte der Proben konnten nun anhand des geometrischen Mittels ihrer Fluoreszenzintensität aus dem Histogramm rechnerisch ermittelt werden. Vom errechneten Wert musste noch die ermittelte Anzahl der Oberflächenmoleküle der Negativkontrolle abgezogen werden, die durch Eigenfluoreszenz und unspezifisch gebundenen Kontrollantikörper zustande kommt.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich der CD107a-Expression bei unterschiedlichen Target-Zellen

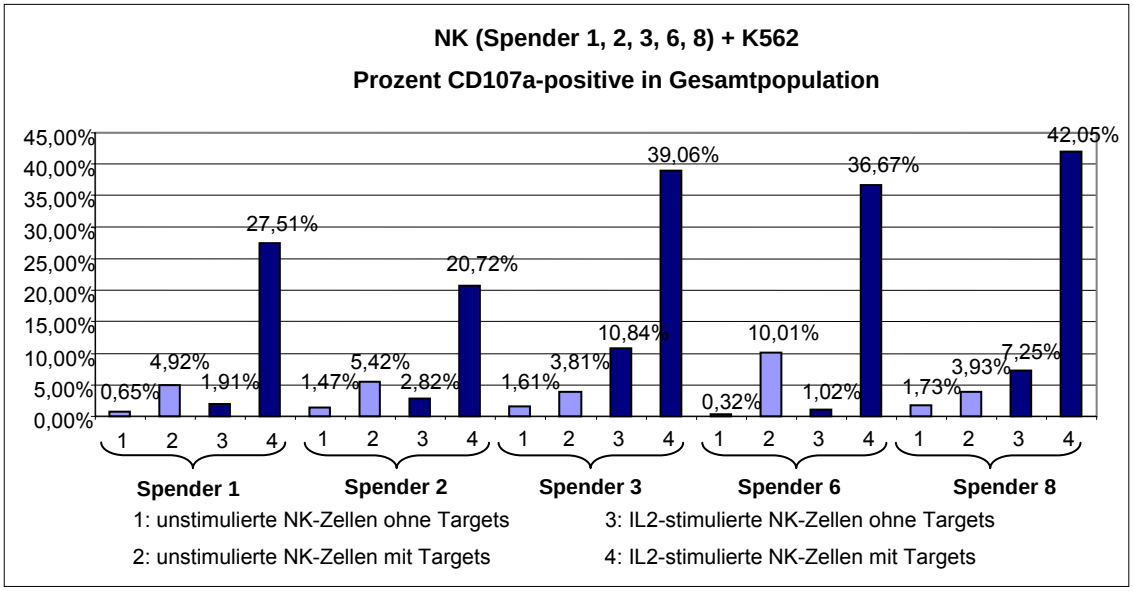
Die CD107a-Expression von NK-Zellen ist ein Maß für ihre Aktivierung zur Lyse von Targetzellen. Die NK-Zellen, von denen die Hälfte zuvor mit IL2 stimuliert wurde, wurden mit Targetzellen inkubiert. Zu dem Ansatz wurde außerdem ein fluoreszenzmarkierter CD107a-Antikörper zugegeben. So konnte nach der Inkubationszeit die CD107a-Expression mittels FACS-Analyse bestimmt werden.

Zunächst soll die CD107a-Expression der NK-Zellen bei unterschiedlichen Targetzellen beschrieben werden. Es wurden die Zelllinien K562 und Sk-N-Be verwendet, außerdem Transfektanten, die Cw3 bzw. Cw4 exprimieren und verschiedene ALL-Blasten. Die Werte stellen Mittelwerte der einzelnen Messungen dar.

3.1.1 Versuche mit K562

Nach der Inkubation mit K562-Zellen zeigte die Gesamtpopulation der NK-Zellen bei allen fünf Versuchen (mit Spender 1, 2, 3, 6 und 8) einen Anstieg der CD107a-Expression. Dabei war der Unterschied der CD107a-Expression zwischen NK-Zellen, die ohne und denen, die mit Targets inkubiert worden waren, bei den zuvor IL2-stimulierten NK-Zellen deutlich höher. Allgemein zeigten die IL2-stimulierten NK-Zellen eine höhere CD107a-Expression im Vergleich zu den unstimulierten Zellen.

Abbildung 1

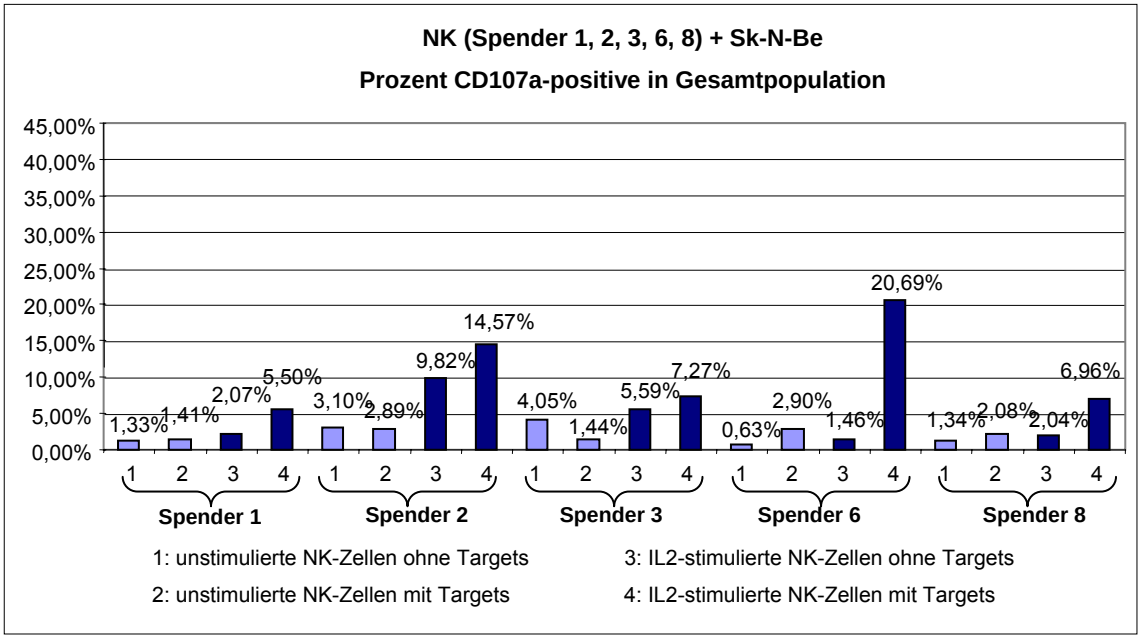


(zu Abb. 1: Die Standardabweichungen für die jeweiligen Mittelwerte im Schaubild betragen: Spender 1: 4,92+/-0,31% und 27,51+/-1,47%; Spender 2: 5,42+/-0,76% und 20,72+/-2,88%; Spender 3: 3,81+/-0,46% und 39,06+/-1,96%; Spender 6: 10,01+/-0,00% und 36,67+/-0,00%; Spender 8: 3,93+/-0,00% und 42,05+/-3,88%)

3.1.2 Versuche mit Sk-N-Be

Bei den Versuchen, bei denen die NK-Zellen der oben genannten Spender mit Sk-N-Be-Targets inkubiert worden waren, zeigte sich ein uneinheitlicheres Bild. Auch hier zeigte sich zwar eine höhere CD107a-Expression der IL2-stimulierten NK-Zellen allgemein und bei den IL2-stimulierten Zellen stieg die CD107a-Expression nach Inkubation mit den Targets stets an, wenngleich auch nicht auf so hohe Werte wie bei den K562-Targets und mit geringerem Unterschied. Eine Sonderstellung nahmen die NK-Zellen von Spender 6 ein, hier stieg die CD107a-Expression sehr stark an. Bei den unstimulierten NK-Zellen jedoch waren die Unterschiede teilweise sehr klein und in zwei von fünf Fällen war die CD107a-Expression der Zellen, die mit Targets inkubiert worden waren, sogar niedriger.

Abbildung 2

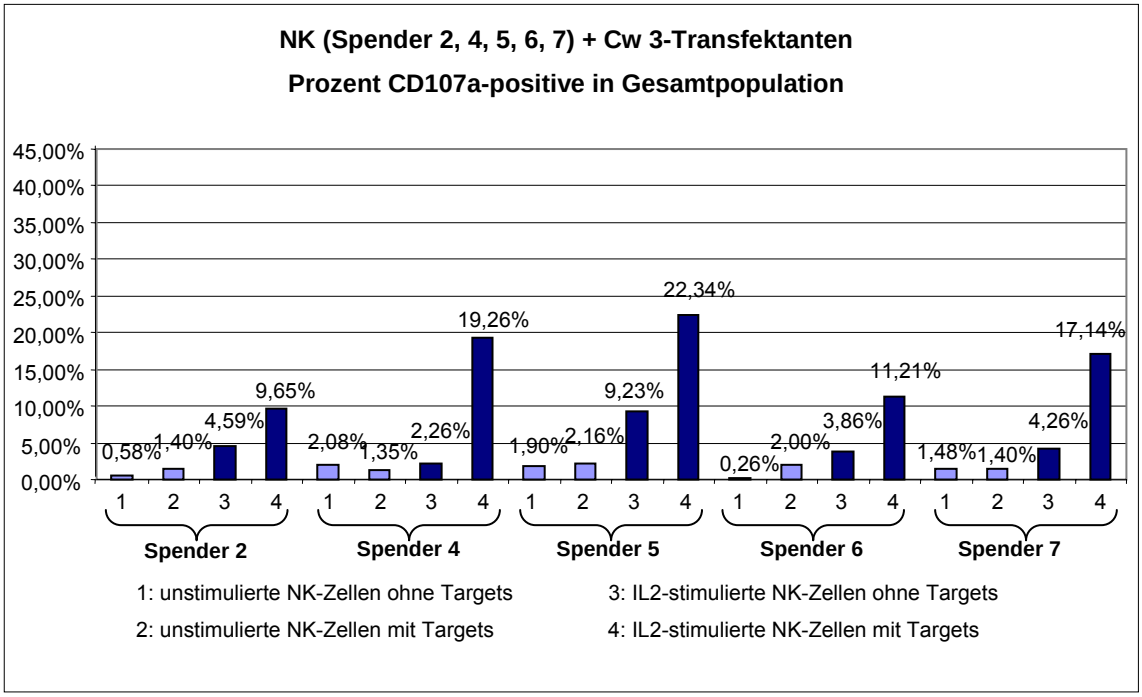


(zu Abb. 2: Die Standardabweichungen für die jeweiligen Mittelwerte im Schaubild betragen: Spender 1: 1,41+/-0,31% und 5,50+/-0,42%; Spender 2: 2,89+/-1,13% und 14,57+/-4,30%; Spender 3: 1,44+/-0,41% und 7,27+/-0,99%; Spender 6: 2,90+/-1,01% und 20,69+/-2,61%; Spender 8: 2,08+/-0,31% und 6,96+/-1,37%)

3.1.3 Versuche mit Transfektanten

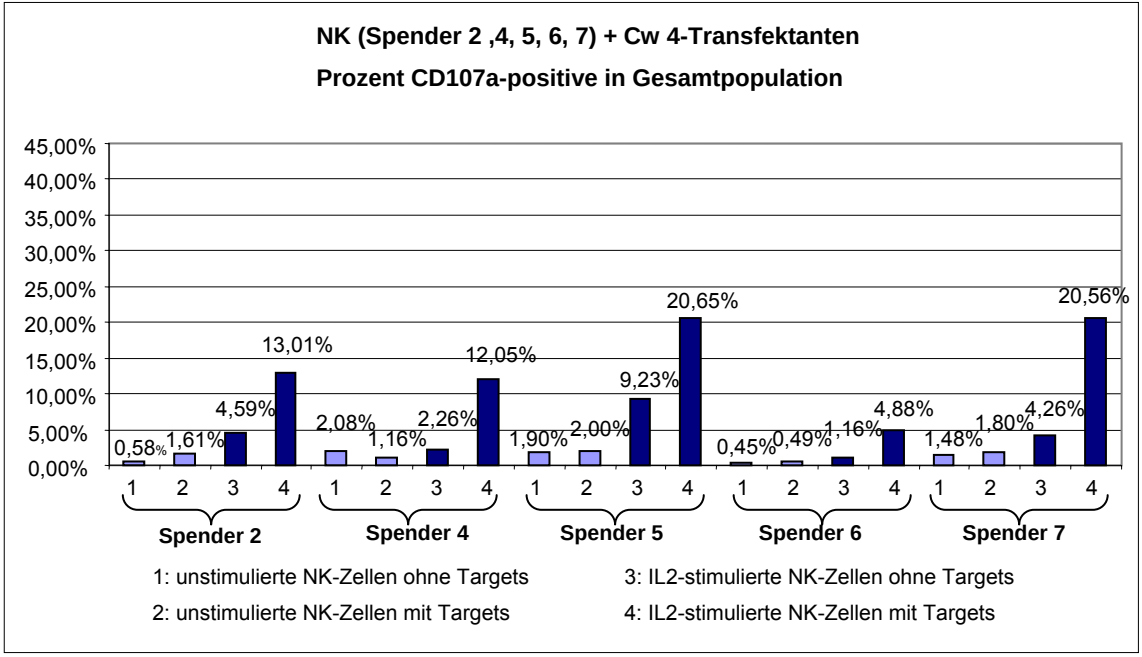
Bei den Versuchen der NK-Zellen von Spender 2, 4, 5, 6 und 7 mit den Transfektanten wiesen die IL2-stimulierten NK-Zellen ebenfalls eine höhere CD107a-Expression im Vergleich zu den unstimulierten Zellen auf. Die IL2-stimulierten NK-Zellen zeigten nach der Inkubation mit Targets auch eine höhere CD107a-Expression. Die Differenz unterlag allerdings größeren Schwankungen. Bei den unstimulierten NK-Zellen waren die Unterschiede zwischen den mit und ohne Targets inkubierten NK-Zellen sehr gering, teilweise war die CD107a-Expression der ohne Targets inkubierten NK-Zellen höher.

Abbildung 3



(zu Abb. 3: Die Standardabweichungen für die jeweiligen Mittelwerte im Schaubild betragen: Spender 2: 1,40+/-0,11% und 9,65+/-2,05%; Spender 4: 1,35+/-0,12% und 19,26+/-3,37%; Spender 5: 2,16+/-0,32% und 22,34+/-2,10%; Spender 6: 2,00+/-0,28% und 11,21+/-0,69%; Spender 7: 1,40+/-0,13% und 17,14+/-0,75%)

Abbildung 4



(zu Abb. 4: Die Standardabweichungen für die jeweiligen Mittelwerte im Schaubild betragen: Spender 2: 1,61+/-0,22% und 13,01+/-0,82%; Spender 4: 1,16+/-0,07% und 12,05+/-1,74%;

Spender 5: 2,00+/-0,08% und 20,65+/-1,34%; Spender 6: 0,49+/-0,06% und 4,88+/-0,08%; Spender 7: 1,80+/-0,09% und 20,56+/-1,32%)

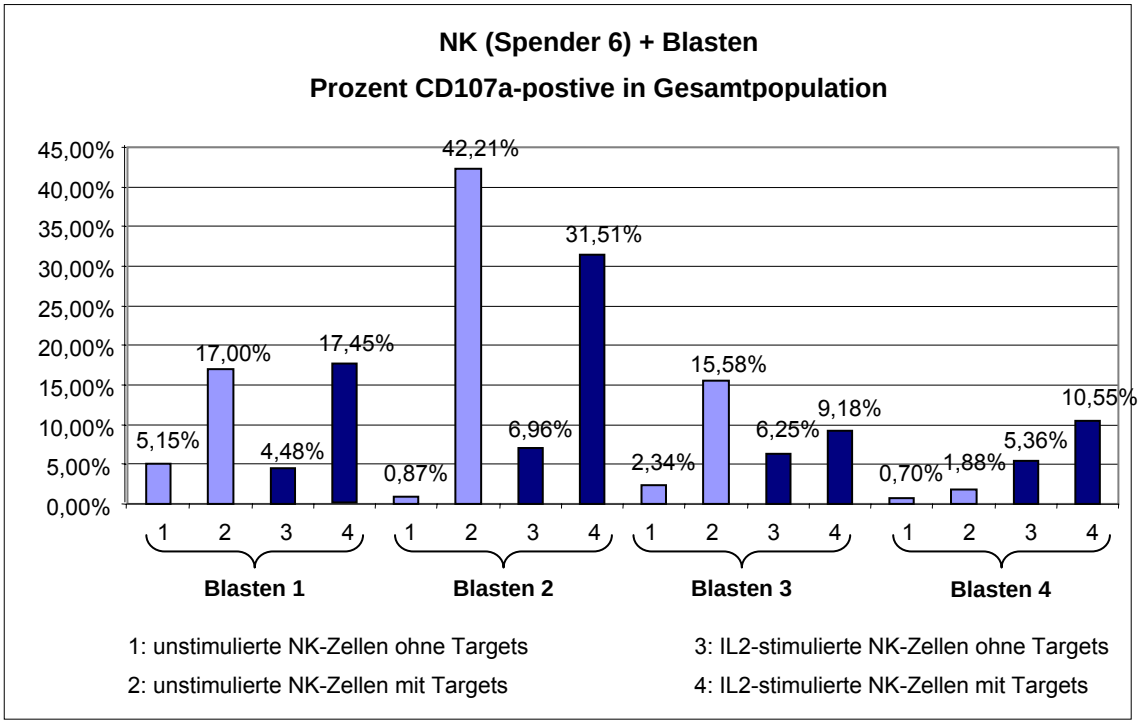
3.1.4 Versuche mit Blasten

Zuletzt wurden noch Versuche mit NK-Zellen der Spender 6 und 8 gegen ALL-Blasten (1 bis 4) durchgeführt.

Bis auf den Versuch mit den NK-Zellen von Spender 6 und den Blasten 1 war die CD107a-Expression der NK-Zellen, die ohne Blasten inkubiert worden waren, nach der IL2-Stimulation deutlich höher.

Bei allen Versuchen, sowohl mit zuvor IL2-stimulierten als auch mit unstimulierten NK-Zellen, war die CD107a-Expression nach der Inkubation mit den Blasten ebenfalls höher als ohne Targetzellen. Die Differenzen und die Zielwerte waren allerdings sehr unterschiedlich. Der Anstieg der CD107a-Expression nach der Inkubation mit den Blasten war außerdem bei den zuvor mit IL2 stimulierten NK-Zellen meist niedriger als bei den unstimulierten NK-Zellen und die Zielwerte lagen in der Hälfte der Fälle unter denen der unstimulierten NK-Zellen.

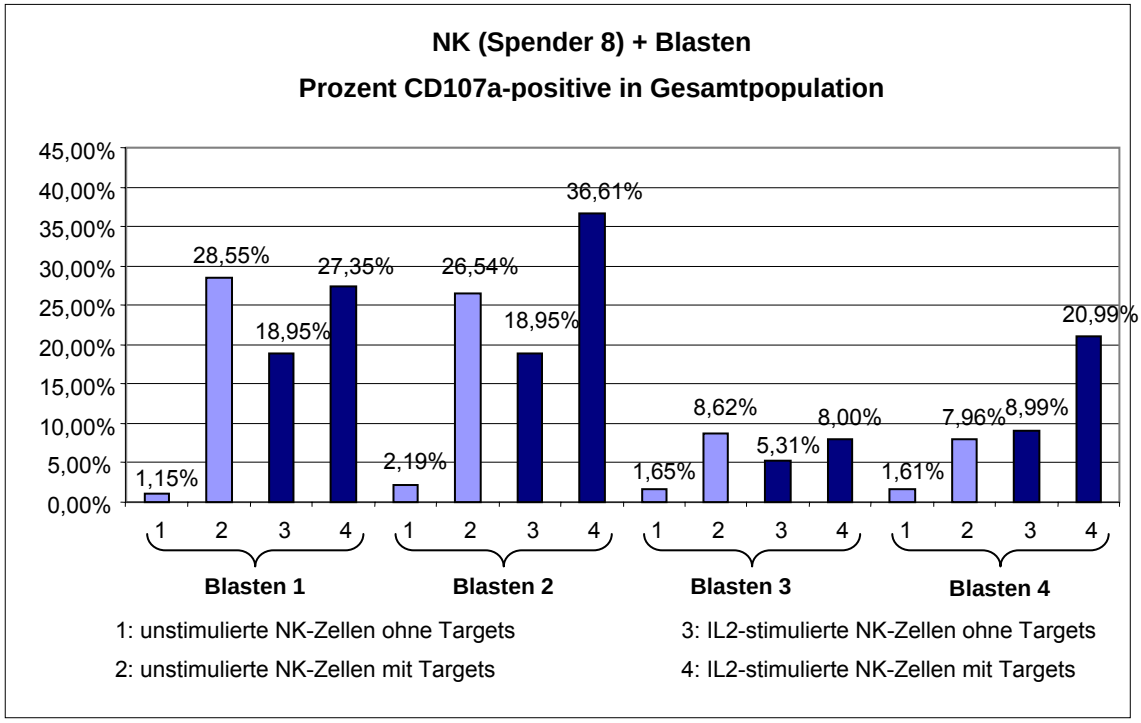
Abbildung 5



(zu Abb. 5: Die Standardabweichungen für die jeweiligen Mittelwerte im Schaubild betragen:

Blasten 1: 17,00+/-1,86% und 17,45+/-0,37%; Blasten 2: 42,21+/-2,92% und 31,51+/-3,11%; Blasten 3: 15,58+/-1,67% und 9,18+/-1,06%; Blasten 4: 1,88+/-0,22% und 10,55+/-1,74%)

Abbildung 6



(zu Abb. 6: Die Standardabweichungen für die jeweiligen Mittelwerte im Schaubild betragen: Blasten 1: 28,55+/-7,98% und 27,35+/-2,34%; Blasten 2: 26,54+/-3,97% und 36,61+/-2,76%; Blasten 3: 8,62+/-1,24% und 8,00+/-0,81%; Blasten 4: 7,96+/-1,12% und 20,99+/-4,40%)

Die höchste CD107a-Expression erreichten die NK-Zellen beider Spender gegen Blasten 2, diese waren die Blasten mit der zweithöchsten HLA-Expression.

Abbildung 7 und 8 zeigen die CD107a-Expression in der Gesamtpopulation der NK-Zellen beim Versuch gegen die Blasten 1 bis 4, geordnet aufsteigend nach der HLA-Expression der Blasten.

Abbildung 7

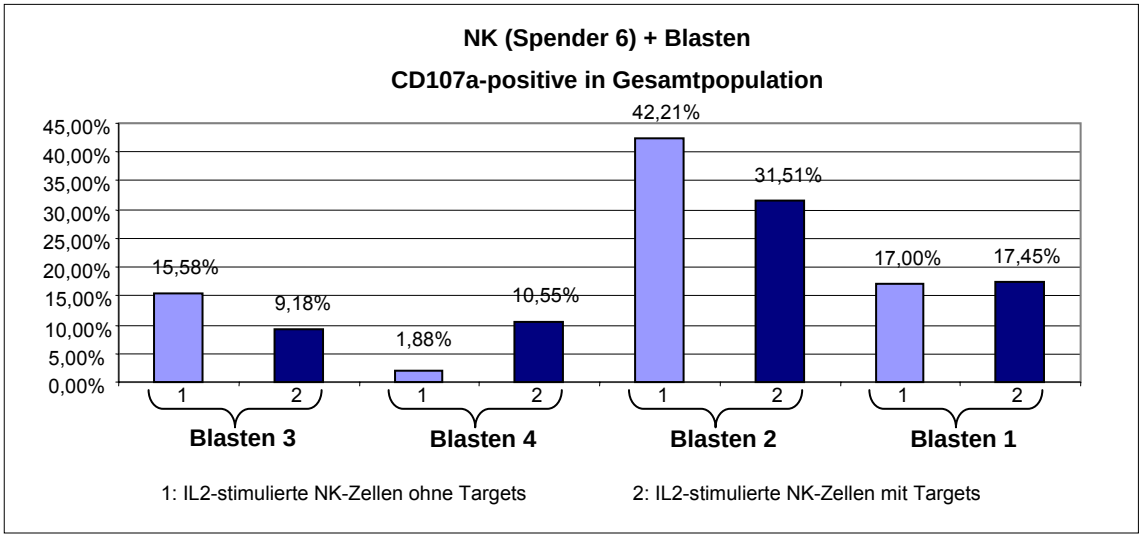
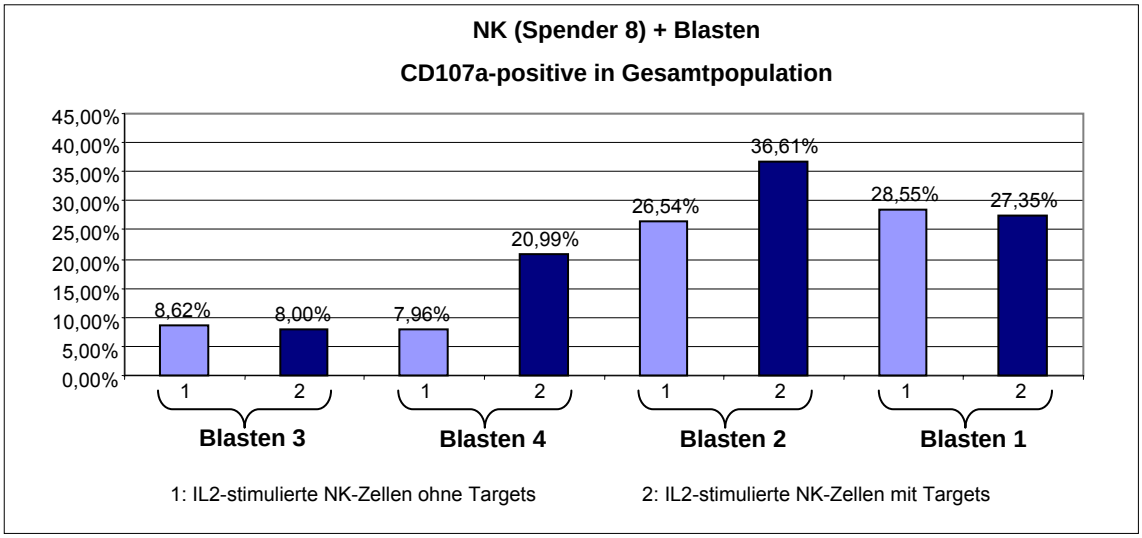


Abbildung 8



3.1.5 Vergleich

Nun sollen die Mittelwerte der CD107a-Expression bei den Versuchen mit den unterschiedlichen Targetzellen verglichen werden.

Mit Abstand die höchste CD107a-Expression erreichten die NK-Zellen nach der Inkubation mit K562-Zellen. Hier war außerdem sowohl bei den unstimulierten als auch bei den IL2-stimulierten NK-Zellen ein deutlicher Anstieg der CD107a-Expression nach Inkubation mit den Targetzellen zu erkennen.

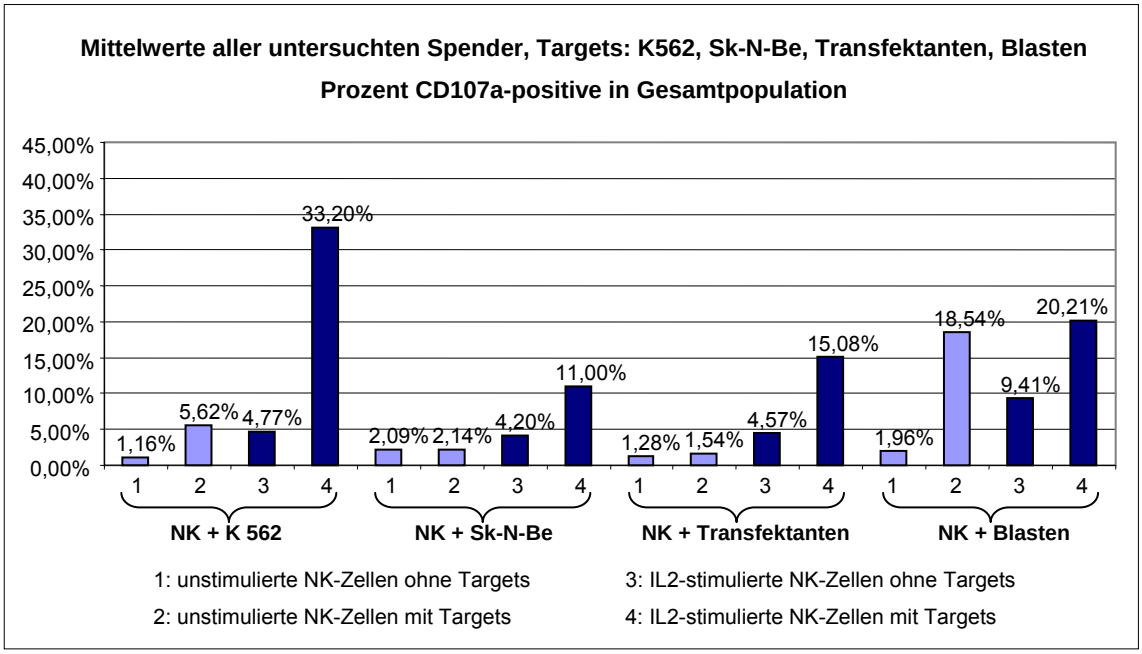
Der zweithöchste Wert für die CD107a-Expression wurde bei den NK-Zellen erreicht, die mit Blasten inkubiert worden waren. Auch hier zeigte sich ein

deutlicher Anstieg nach der Inkubation mit den Targetzellen. Der Unterschied der IL2-stimulierten NK-Zellen gegenüber den unstimulierten war jedoch geringer.

Die CD107a-Expression der NK-Zellen gegen die Transfektanten erreichte den dritthöchsten Wert. Hier zeigten die IL2-stimulierten Zellen deutlich höhere Werte als die unstimulierten Zellen; bei letzteren war außerdem der Unterschied zwischen den mit und ohne Targets inkubierten Zellen sehr gering.

Den niedrigsten Wert wies die CD107a-Expression der mit Sk-N-Be-Targets inkubierten NK-Zellen auf, auch war hier der Unterschied zwischen den mit und ohne Targets inkubierten NK-Zellen (nach IL2-Stimulation) am geringsten.

Abbildung 9



(zu Abb. 9: Die Standardabweichung zu den jeweiligen Mittelwerten im Schaubild betragen:
NK + K562: 1,16+/-0,63%, 5,62+/-2,55%, 4,77+/-4,15%, 33,20+/-8,84%;
NK + Sk-N-Be: 2,09+/-1,43%, 2,14+/-0,74%, 4,20+/-3,54%, 11,00+/-6,46%;
NK + Transf.: 1,28+/-0,73%, 1,54+/-0,49%, 4,57+/-2,72%, 15,08+/-5,75%;
NK + Blasten: 1,96+/-1,42%, 18,54+/-13,22%, 9,41+/-6,04%, 20,21+/-10,82%)

Für alle vier Versuchsreihen gegen die verschiedenen Targets wurden die Werte für die NK-Zellen, die ohne Targets inkubiert worden waren, mit den NK-Zellen, die mit Targets inkubiert worden waren, mittels gepaartem t-Test verglichen, und zwar jeweils für die unstimulierten und die IL2-stimulierten NK-

Zellen. Ein signifikanter Anstieg der CD107a-Expression konnte dabei nachgewiesen werden für die Versuche mit K562, für die IL2-stimulierten NK-Zellen in den Versuchen mit den Transfektanten und für die Versuche mit den Blasten. Folgende Tabelle zeigt die p-Werte der einzelnen Berechnungen:

Tabelle 1

	Vergleich der unstimul. NK-Zellen ohne u. mit Targets	**Vergleich der IL2-stimul. NK-Zellen ohne u. mit Targets**
Versuche mit K562	p=0,0316 (signifikant)	p=0,0009 (signifikant)
Versuche mit Sk-N-Be	p=0,9489 (nicht sign.)	p=0,0978 (nicht sign.)
Versuche mit Transf.	p=0,3305 (nicht sign.)	p<0,0001 (signifikant)
Versuche mit Blasten	p=0,0100 (signifikant)	p=0,0052 (signifikant)

3.2 Charakterisierung der NK-Zellen hinsichtlich der Oberflächenmoleküle CD56, CD16 und CD3

Ziel der Arbeit war es, aktivierte NK-Zellen hinsichtlich ihrer Oberflächenrezeptoren zu charakterisieren. Um die aktivierten NK-Zellen zu markieren, wurden CD107a-Antikörper eingesetzt. Zur Charakterisierung der NK-Zellen wurden sie mit verschiedenen Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Bei der Auswertung der FACS-Analyse konnten nun mithilfe der Antikörper gegen Oberflächenmoleküle verschiedene Populationen definiert werden. Diese Populationen wurden dann hinsichtlich ihrer CD107a-Expression verglichen. Außerdem ließ sich die Verteilung dieser Populationen in den CD107a-positiven NK-Zellen ermitteln. So konnten Erkenntnisse über die Eigenschaften von NK-Zellen mit besonders gutem Killing ermittelt werden.

Zunächst wurden die Oberflächenmoleküle CD56, CD16 und CD3 in Versuchen mit NK-Zellen (unstimuliert und IL2-stimuliert) der Spender 1, 2, 3, 6 und 8 mit K562- bzw. Sk-N-Be-Targets analysiert. Die Antikörper gegen diese Oberflächenmoleküle wurden nach dem CD107a-Assay zugegeben und

konnten dann mittels FACS-Analyse untersucht werden.
Bei der Auswertung der FACS-Daten wurde zunächst im Plot FSC gegen SSC ein Gate auf die Lymphozyten gesetzt und diese dann in einem Plot dargestellt, in dem der Kanal für CD56 auf der x-Achse und der Kanal für CD16 auf der y-Achse aufgetragen waren. Nun konnten Gates auf die Populationen $CD56^{dim}$ $CD16^{neg}$, $CD56^{bright}$ $CD16^{neg}$, $CD56^{dim}$ $CD16^{pos}$ und $CD56^{bright}$ $CD16^{pos}$ gesetzt werden. Die Zellen in diesen Gates wurden wiederum in Plots dargestellt, in denen FSC gegen den Kanal für CD 3 aufgetragen war. So konnten schließlich folgende Populationen differenziert werden:
$CD56^{dim}$ $CD16^{pos}$ $CD3^{neg}$
$CD56^{dim}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$
$CD56^{bright}$ $CD16^{pos}$ $CD3^{neg}$
$CD56^{bright}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$
$CD56^{dim}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{pos}$.
Diese Populationen wurden nun jeweils in Plots dargestellt, in denen FSC gegen den CD107a-Kanal aufgetragen war. So konnte die CD107a-Expression der NK-Zellen dieser Populationen bestimmt werden.
Außerdem wurde die Gesamtheit der NK-Zellen in einem Plot FSC gegen den CD107a-Kanal dargestellt und auf die CD107a-positiven ein Gate gesetzt. Mit diesen Zellen wurde wie zuvor verfahren, um die Verteilung der genannten Populationen in den CD107a-positiven NK-Zellen herauszufinden.

3.2.1 Versuche mit K562

Zunächst zeigte sich bei fast allen Populationen aller Spender, dass die CD107a-Expression der NK-Zellen, die zuvor mit IL2 stimuliert worden waren, höher war als die der unstimulierten Zellen. Die einzige Ausnahme bildeten die $CD56^{dim}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{pos}$ NK-Zellen bei Spender 8. Des Weiteren war zu beobachten, dass bei fast allen Spendern die beiden Populationen $CD56^{dim}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$ und $CD56^{bright}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$ die höchste CD107a-Expression aufwiesen. Einzig bei Spender 2 war die CD107a-Expression der $CD56^{dim}$ $CD16^{pos}$ $CD3^{neg}$ noch höher. Auffällig war außerdem, dass die CD107a-Expression insgesamt bei Spender 6 deutlich niedriger war und dass

hier die $CD56^{dim}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{pos}$ NK-Zellen im Gegensatz zu allen anderen Spendern mit geringem Abstand die dritthöchste CD107a-Expression aufwiesen.

Abbildung 10

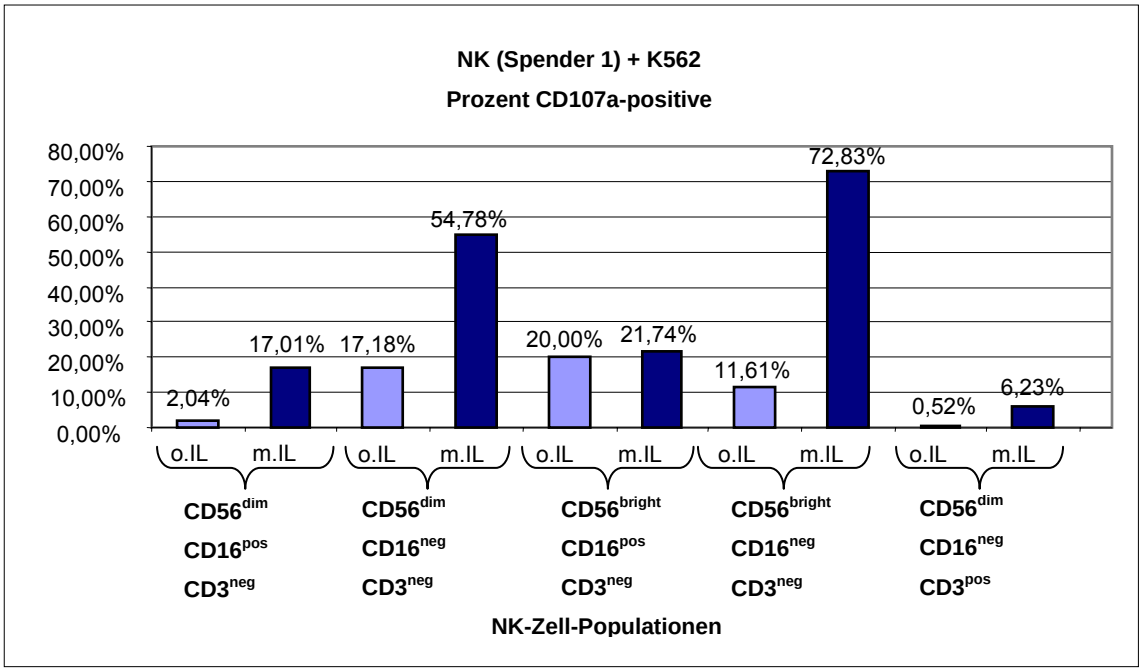


Abbildung 11

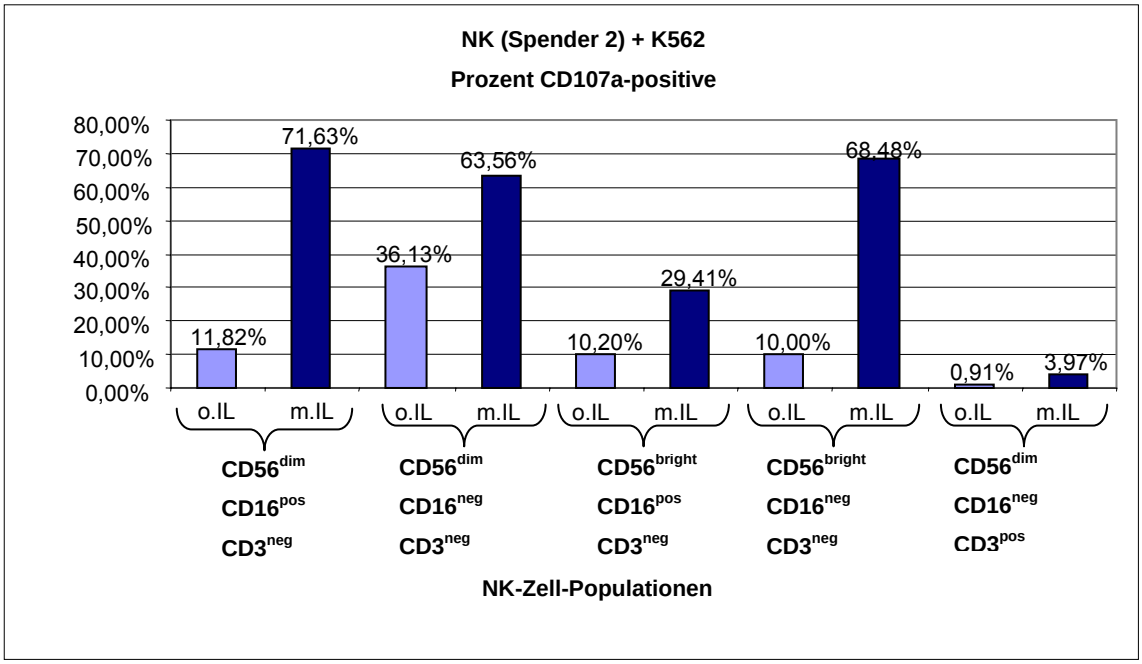


Abbildung 12

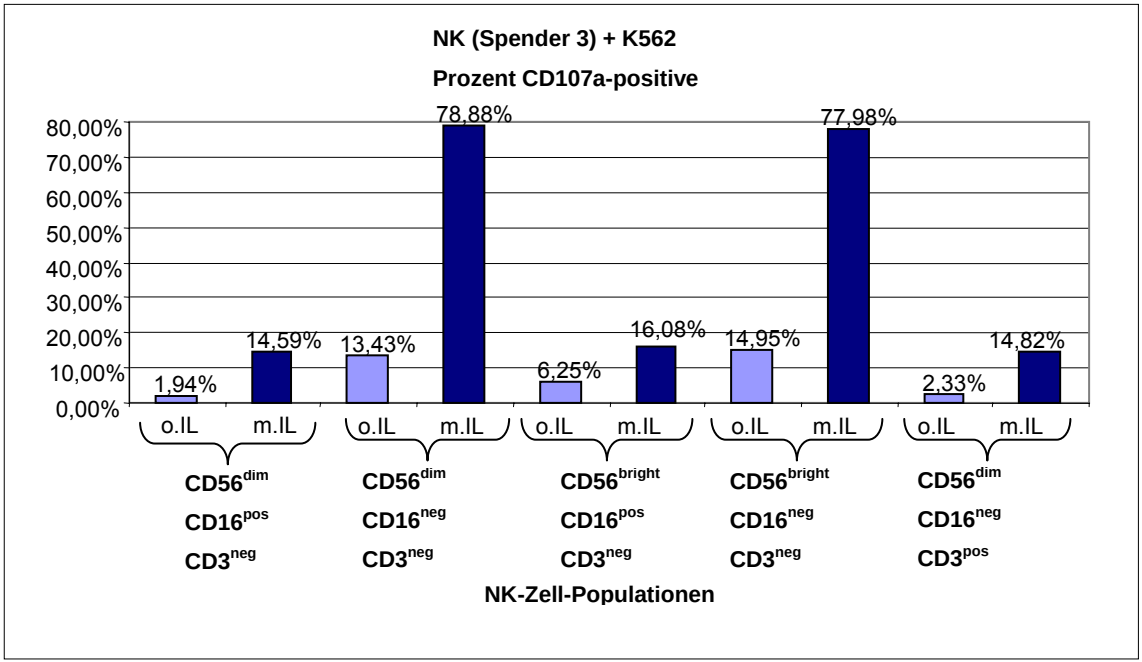


Abbildung 13

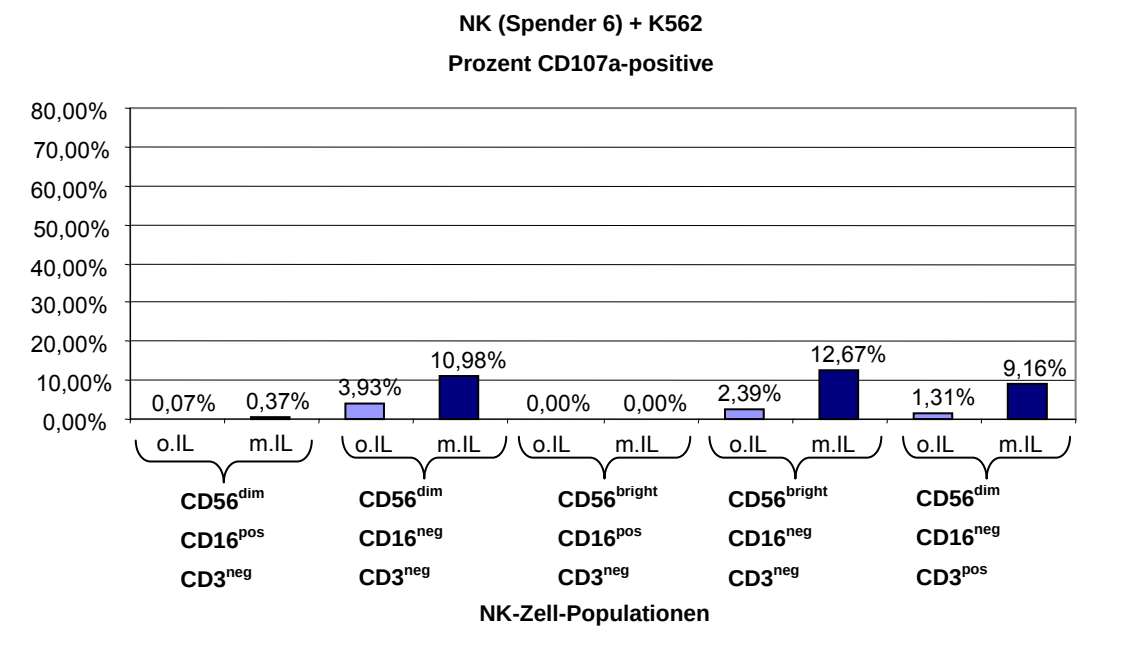
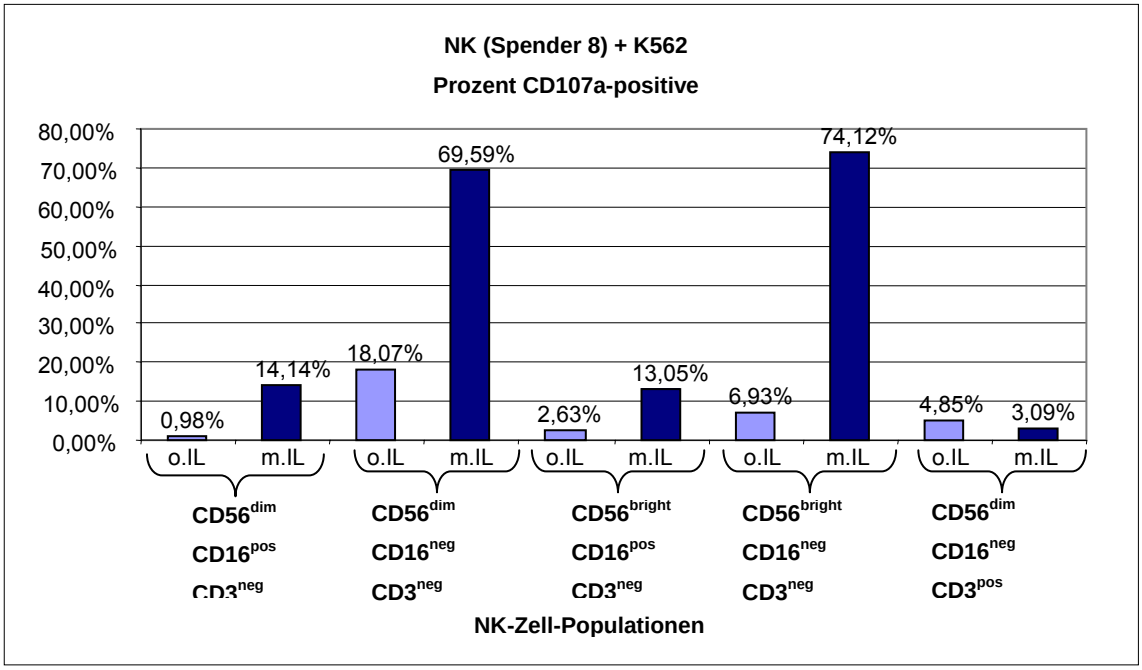


Abbildung 14



Bei der Verteilung der Populationen in den CD107a-positiven erwiesen sich die $CD56^{dim}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$ NK-Zellen als die am meisten vertretene Population bei allen Spendern. Bis auf Spender 6 lag der Anteil bei den IL2-stimulierten NK-Zellen über dem der unstimulierten. Die am zweithäufigsten vertretene Population war bis auf den Versuch mit Spender 6 die $CD56^{dim}$ $CD16^{pos}$ $CD3^{neg}$. Beim Versuch mit Spender 6 nahm die $CD56^{dim}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{pos}$ Population den zweiten Platz in der Verteilung in den CD107a-positiven ein. Zu bemerken ist außerdem, dass bei den stimulierten NK-Zellen von Spender 8 der Anteil der $CD56^{bright}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$ Population etwas über dem der $CD56^{dim}$ $CD16^{pos}$ $CD3^{neg}$ lag.

Abbildung 15

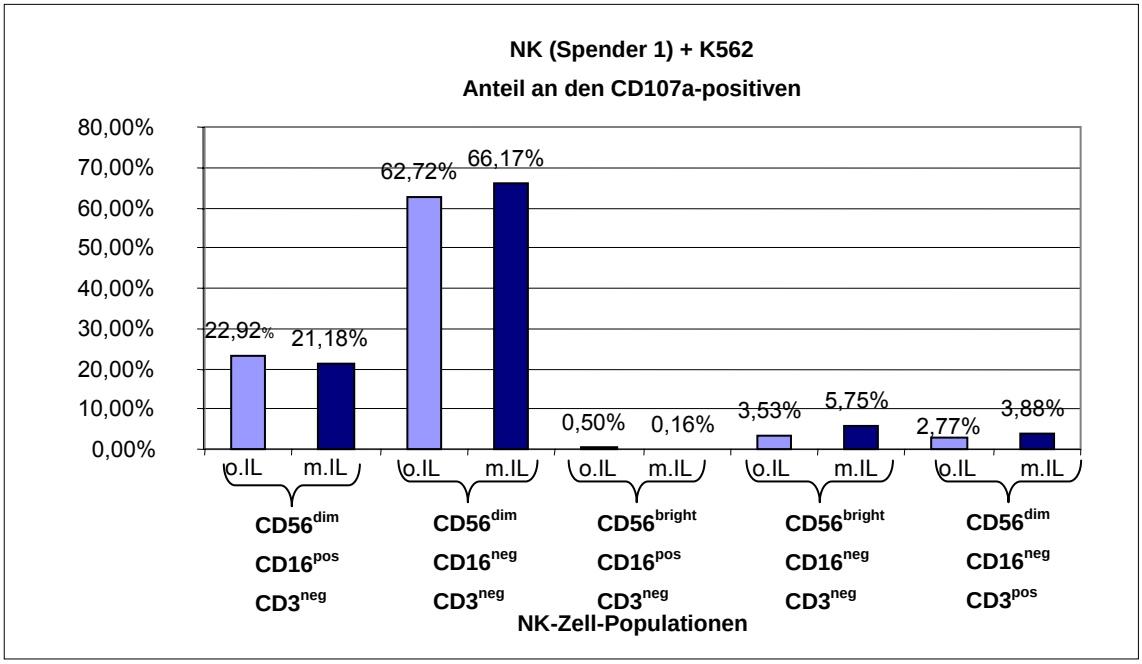


Abbildung 16

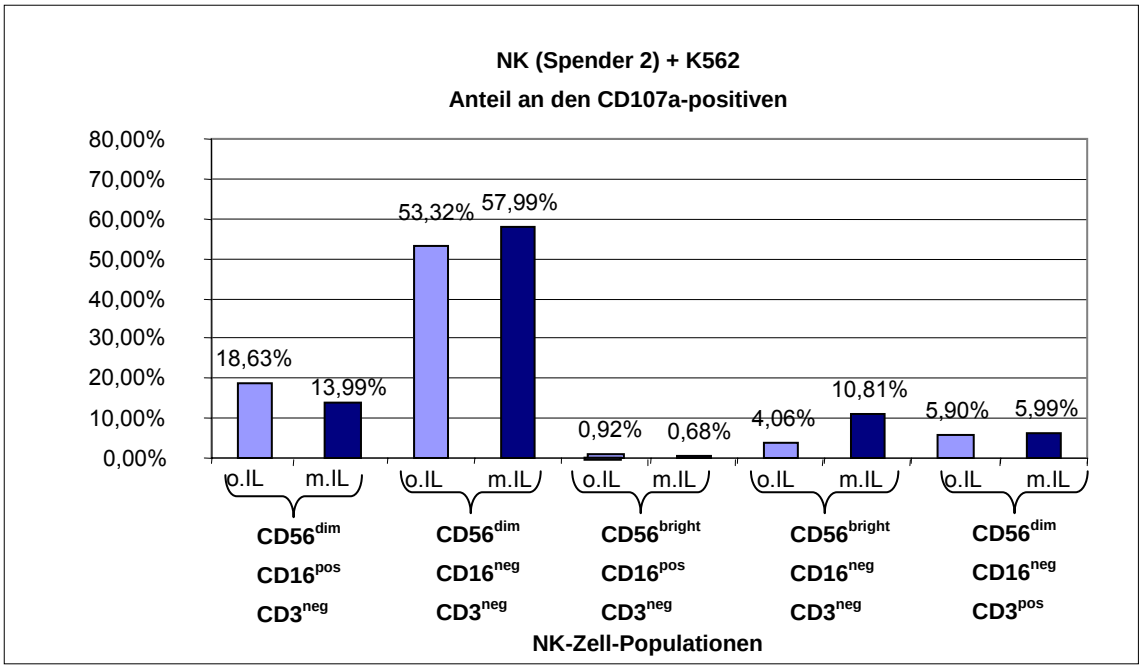


Abbildung 17

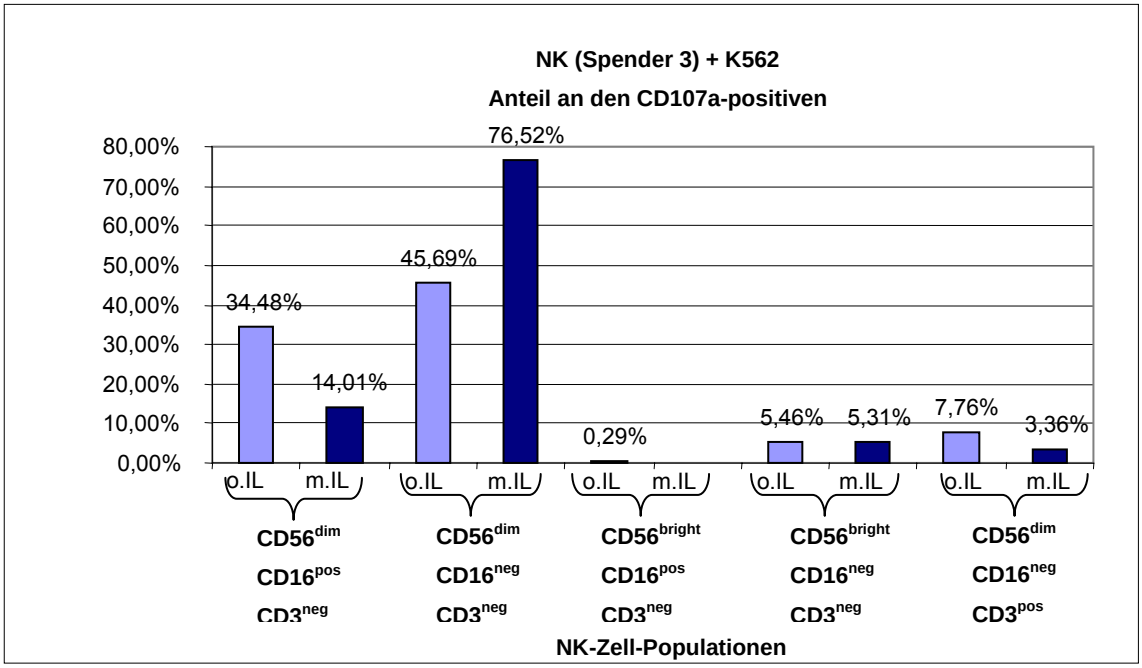


Abbildung 18

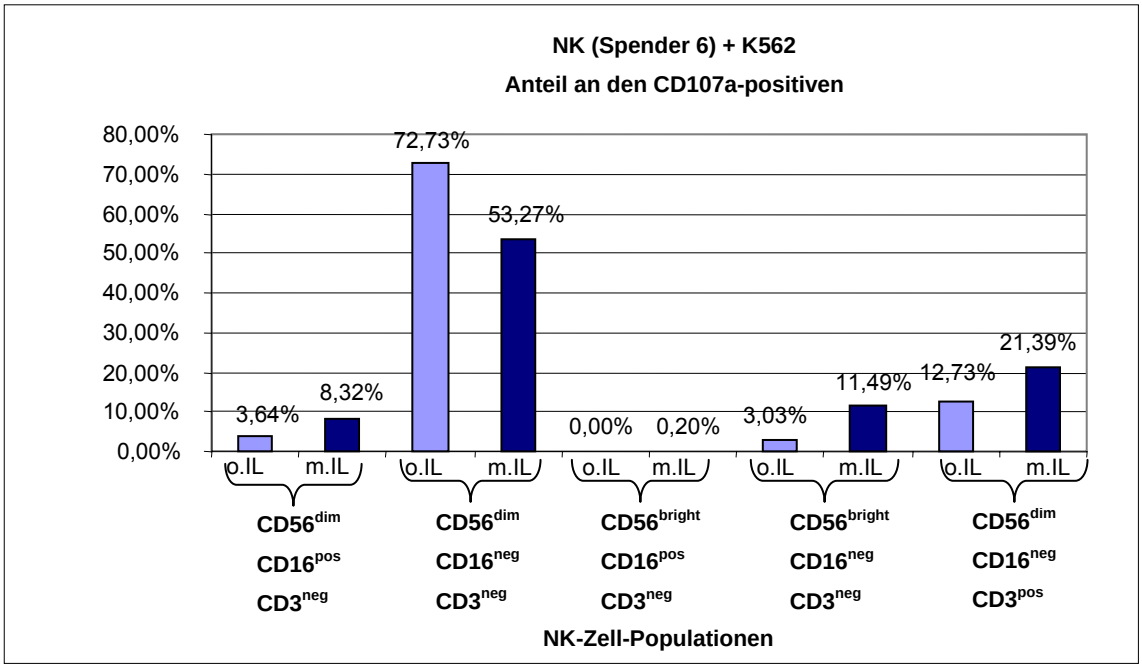
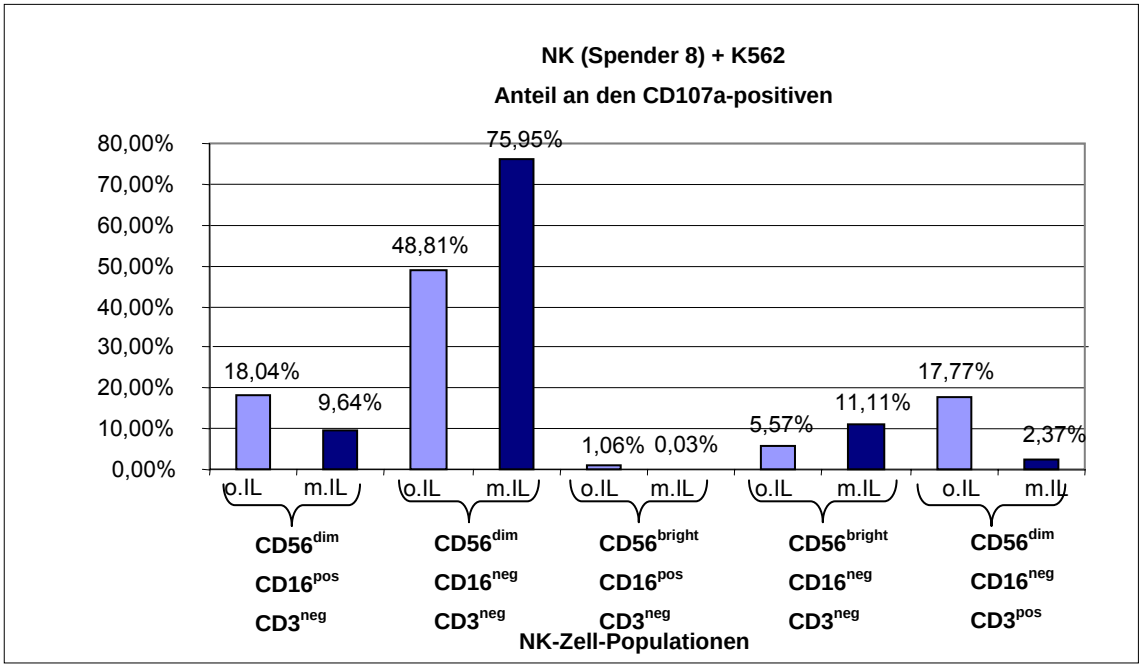
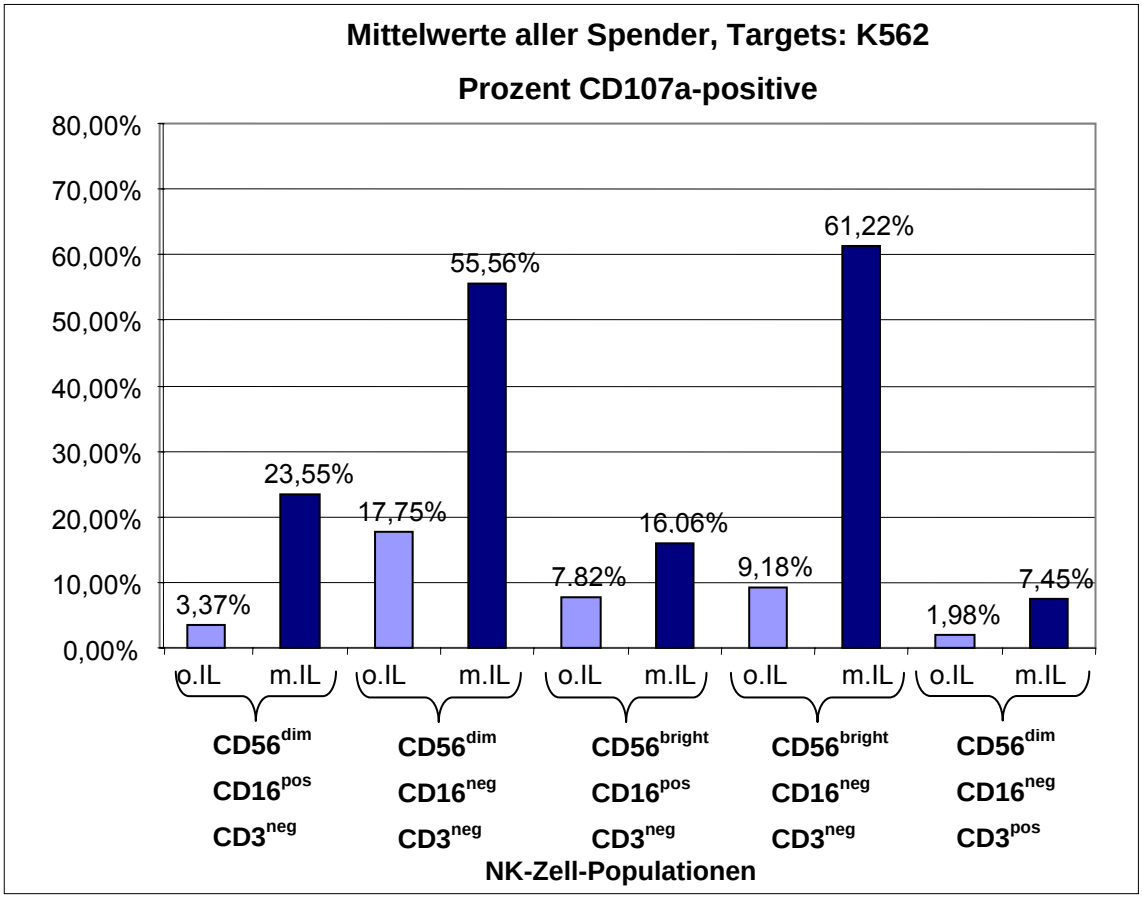


Abbildung 19



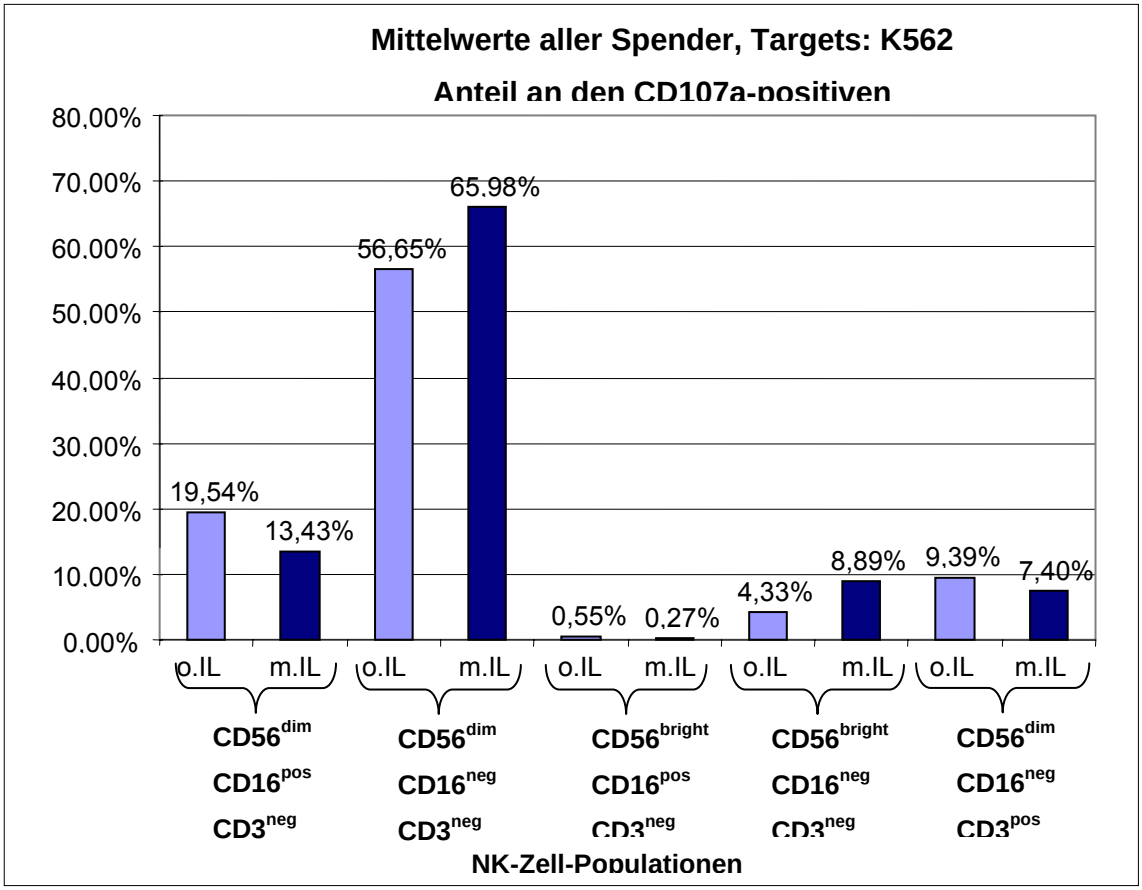
Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass bei den Versuchen mit K562 als Targetzellen die CD56^{dim} CD16^{neg} CD3^{neg} NK-Zellen sowohl eine hohe CD107a-Expression als auch einen großen Anteil in den CD107a-postiven NK-Zellen aufwiesen. Dies bestätigte auch die Betrachtung der Mittelwerte aller Spender.

Abbildung 20



(zu Abb. 20: Die Standardabweichungen zu den jeweiligen Mittelwerten im Schaubild betragen: 3,37+/-4,79%, 23,55+/-27,66%, 17,75+/-11,70%, 55,56+/-26,42%, 7,82+/-7,82%, 16,06+/-10,93%, 9,18+/-4,77%, 61,22+/-27,35%, 1,98+/-1,74%, 7,45+/-4,74%)

Abbildung 21



(zu Abb. 21: Die Standardabweichungen zu den jeweiligen Mittelwerten im Schaubild betragen: 19,54+/-11,07%, 13,43+/-5,03%, 56,65+/-11,05%, 65,98+/-10,44%, 0,55+/-0,44%, 0,27+/-0,28%, 4,33+/-1,14%, 8,89+/-3,08%, 9,39+/-5,92%, 7,40+/-7,93%)

3.2.2 Versuche mit Sk-N-Be

Bei den Versuchen mit Sk-N-Be als Targets erreichten die NK-Zellen insgesamt eine etwas niedrigere CD107a-Expression als mit K562. Die Beobachtung, dass die IL2-stimulierten NK-Zellen mehr CD107a exprimierten als die unstimulierten, traf aber auch hier zu.

Die beiden Populationen $CD56^{dim}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$ und $CD56^{bright}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$ zeigten auch hier die höchsten Werte für die CD107a-Expression. Allerdings lagen diese nur bei den Spendern 2 und 6 deutlich über denen der anderen Populationen. Bei Spender 1 und 3 war der Wert der $CD56^{dim}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$ NK-Zellen deutlich niedriger als bei den $CD56^{bright}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$; außerdem wiesen bei Spender 1 auch die $CD56^{bright}$ $CD16^{pos}$ $CD3^{neg}$ eine

vergleichbar hohe CD107a-Expression auf wie die $CD56^{dim}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$ NK-Zellen. Bei Spender 8 lag der Wert für die CD107a-Expression bei den $CD56^{dim}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$ NK-Zellen etwas über dem der $CD56^{bright}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$, insgesamt aber niedriger als bei allen anderen Spendern.

Abbildung 22

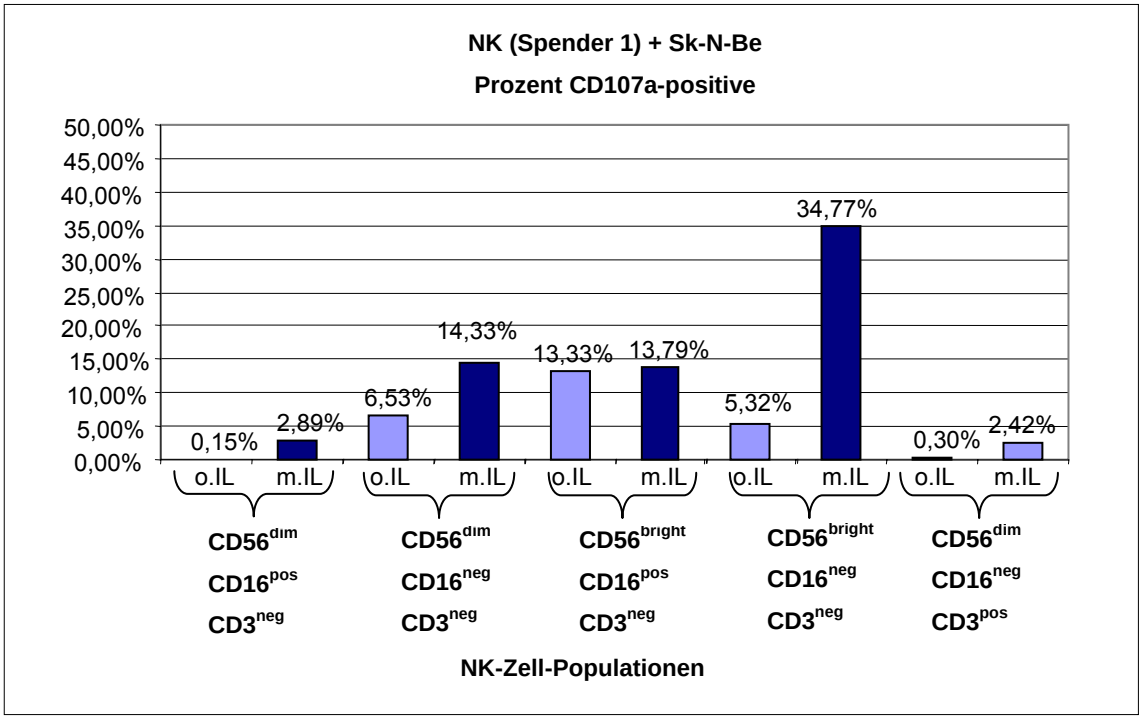


Abbildung 23

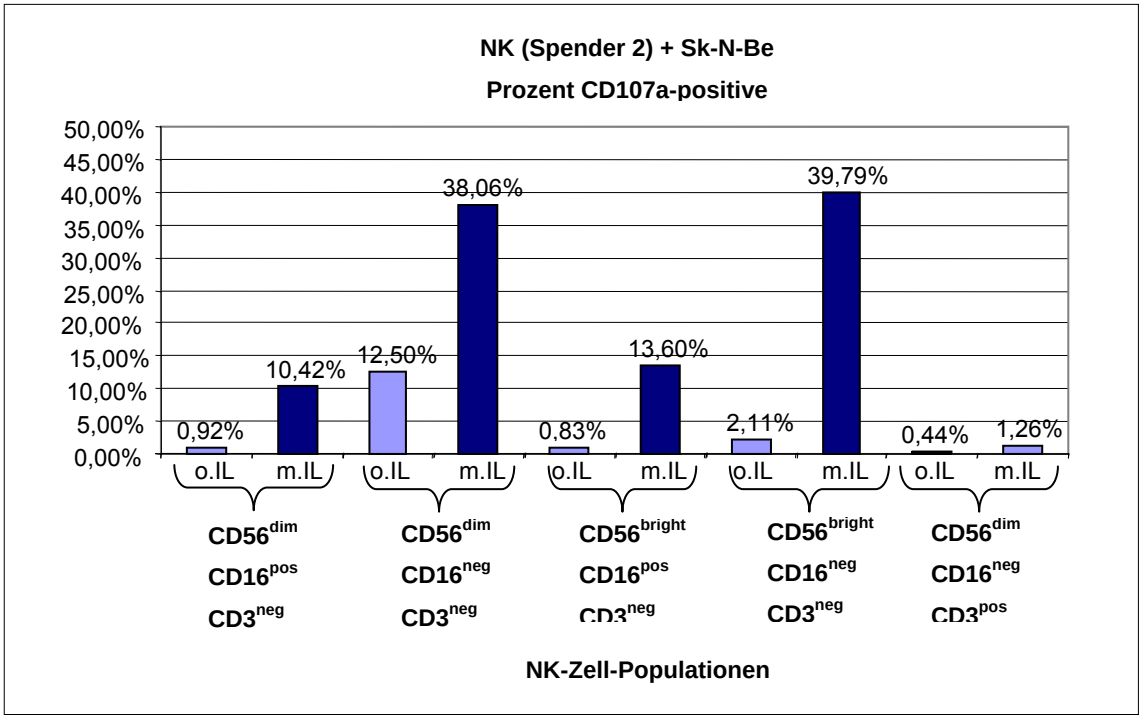


Abbildung 24

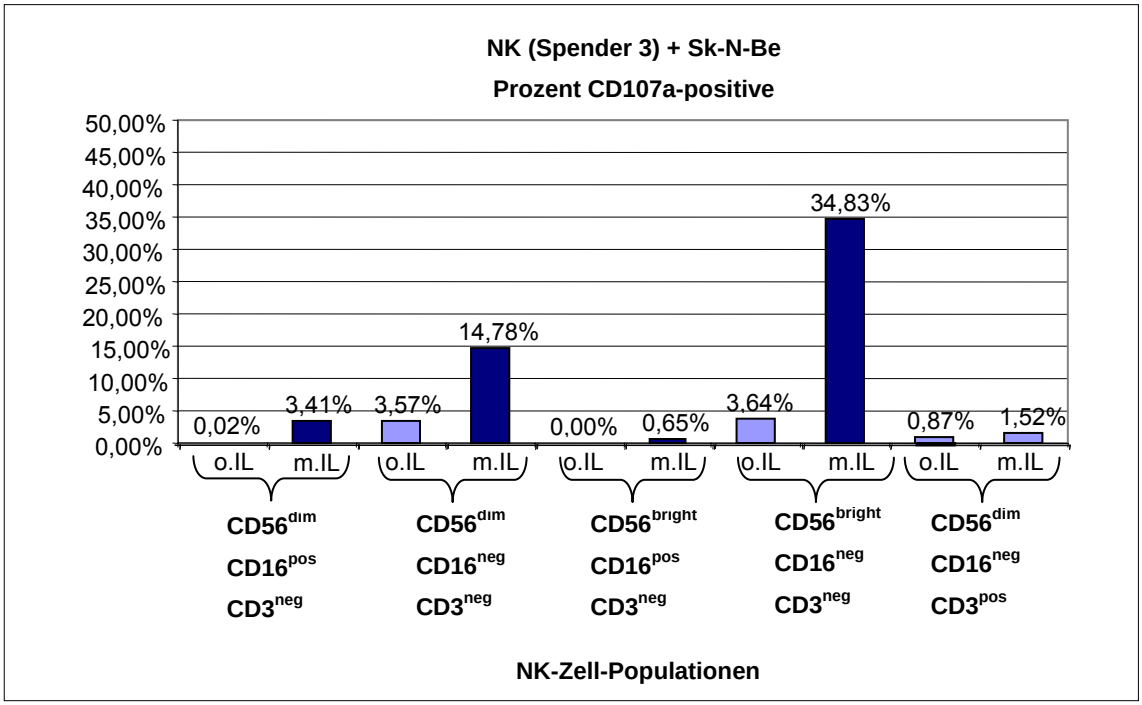


Abbildung 25

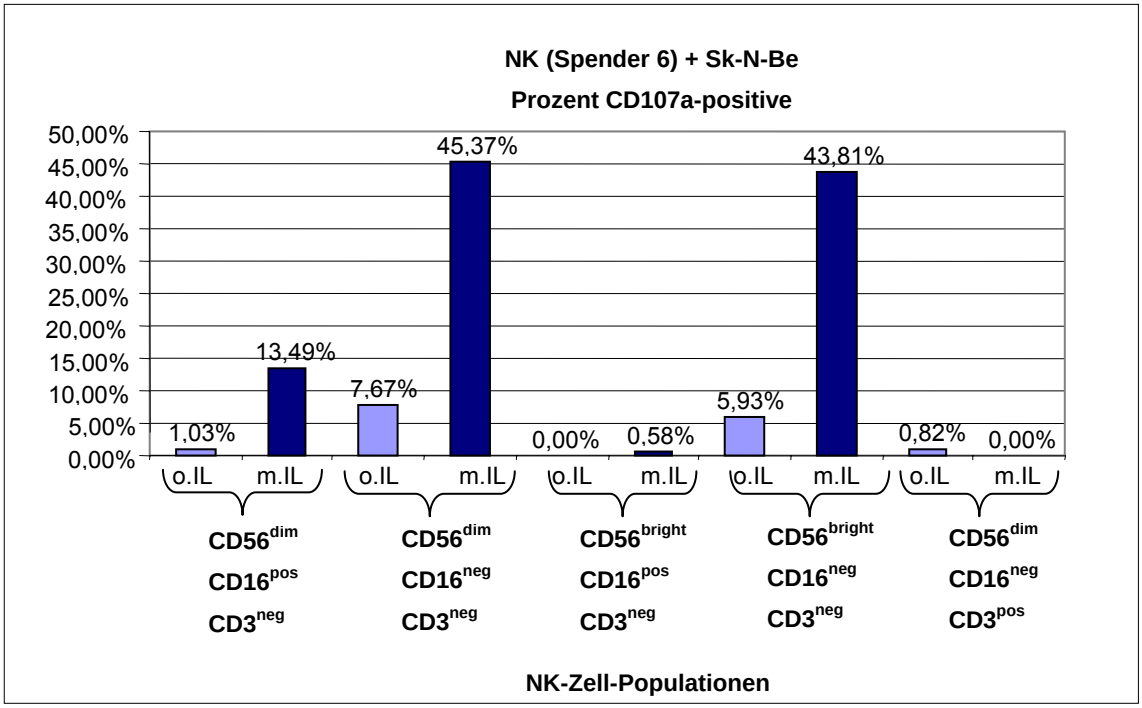
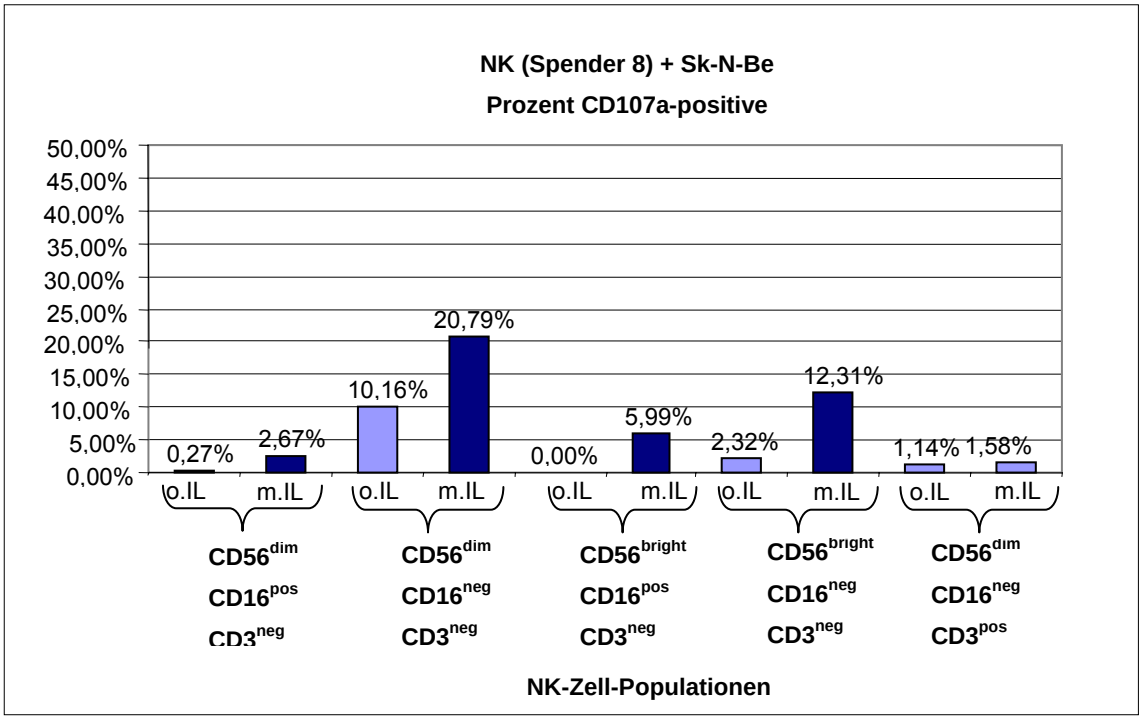


Abbildung 26



In der Verteilung der Populationen in den CD107a-positiven kristallisierte sich nur bei den unstimulierten NK-Zellen die $CD56^{dim}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$ als größte Fraktion heraus – bei Spender 2 und 6 dicht gefolgt von den $CD56^{dim}$ $CD16^{pos}$

$CD3^{neg}$, bei Spender 3 von den $CD56^{bright}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$. Bei den stimulierten NK-Zellen konnte keine einheitliche Verteilung beobachtet werden. Die $CD56^{dim}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$ NK-Zellen gehörten jedoch auch hier zu den am meisten vertretenen Fraktionen. Bei Spender 1 und 8 lag ihr Anteil am höchsten, gefolgt von den $CD56^{dim}$ $CD16^{pos}$ $CD3^{neg}$ und den $CD56^{bright}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$, deren Anteil jeweils deutlich über dem der übrigen Populationen lag. Bei Spender 2 und 3 war der Anteil der beiden Populationen $CD56^{dim}$ $CD16^{pos}$ $CD3^{neg}$ und $CD56^{bright}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$ deutlich höher, außerdem wiesen hier auch die $CD56^{bright}$ $CD16^{pos}$ $CD3^{neg}$ einen nicht zu vernachlässigenden Anteil auf. Bei Spender 6 war der Anteil der $CD56^{dim}$ $CD16^{pos}$ $CD3^{neg}$ am größten, die $CD56^{dim}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$ waren am zweithäufigsten vertreten. Einen deutlich geringeren Anteil wiesen die beiden Populationen $CD56^{bright}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$ und $CD56^{bright}$ $CD16^{pos}$ $CD3^{neg}$ auf.

Abbildung 27

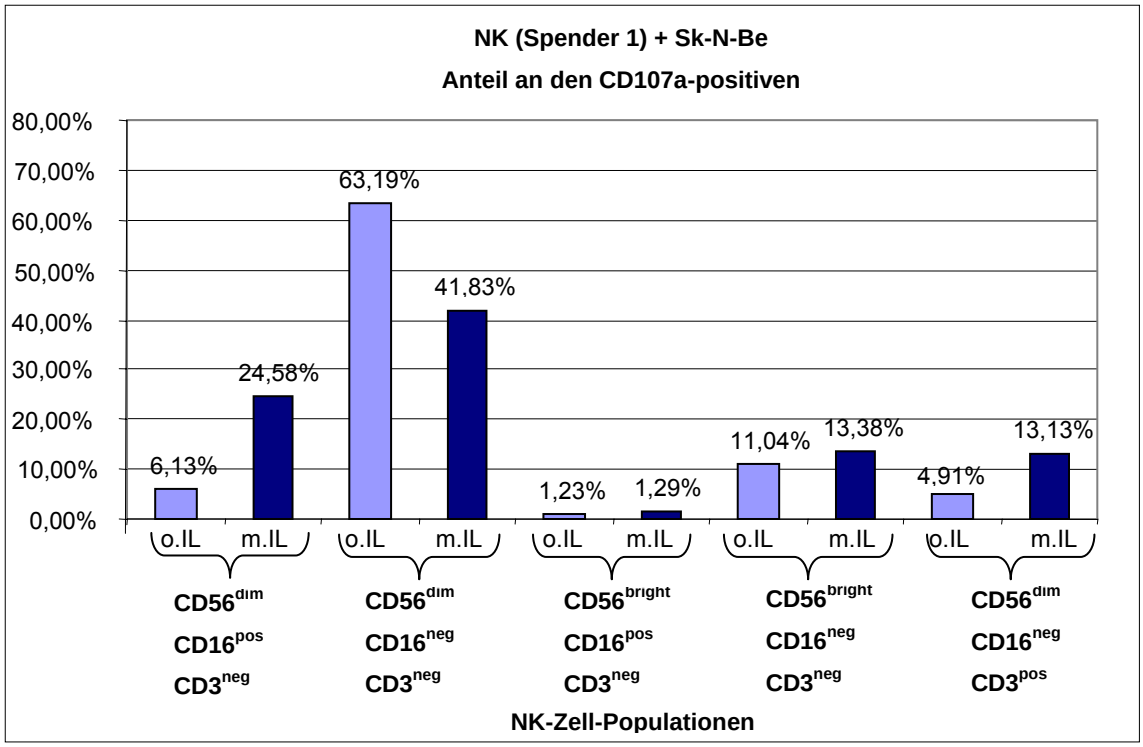


Abbildung 28

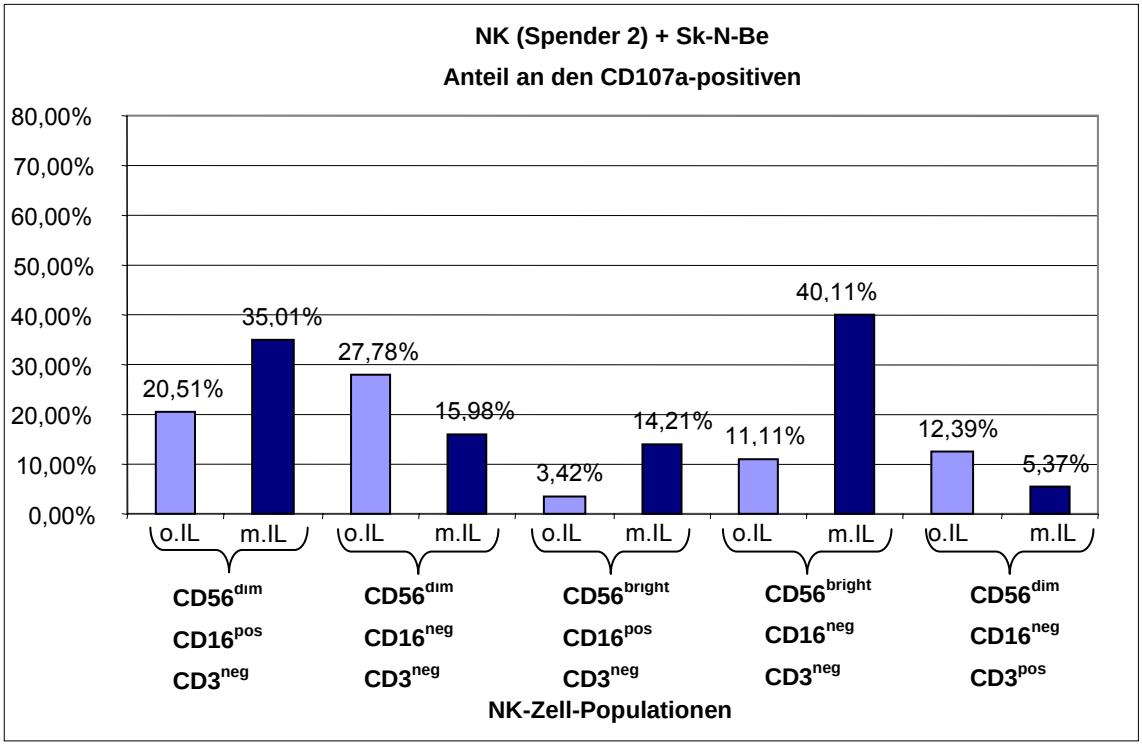


Abbildung 29

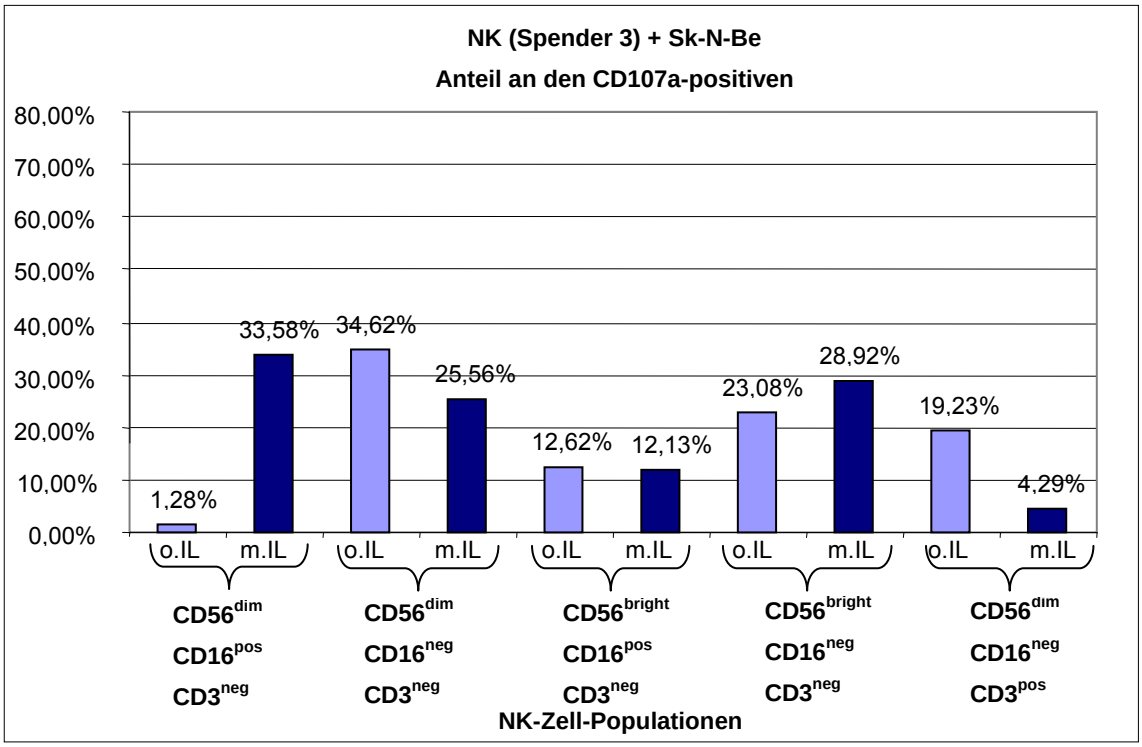


Abbildung 30

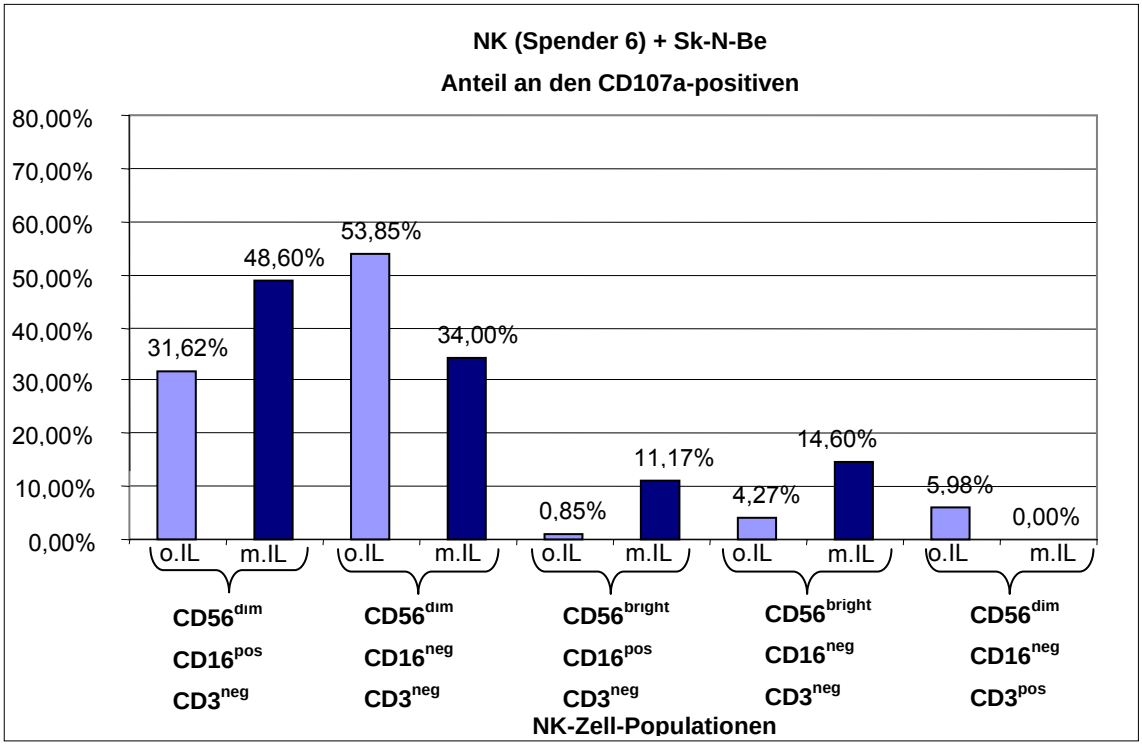
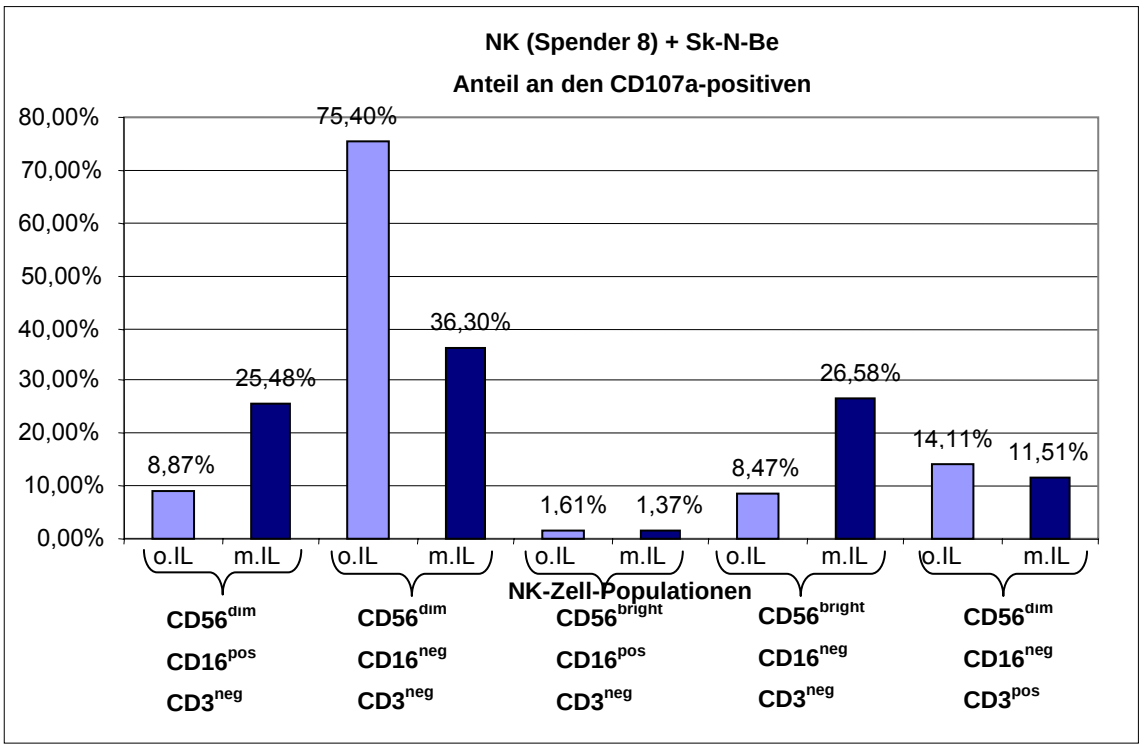
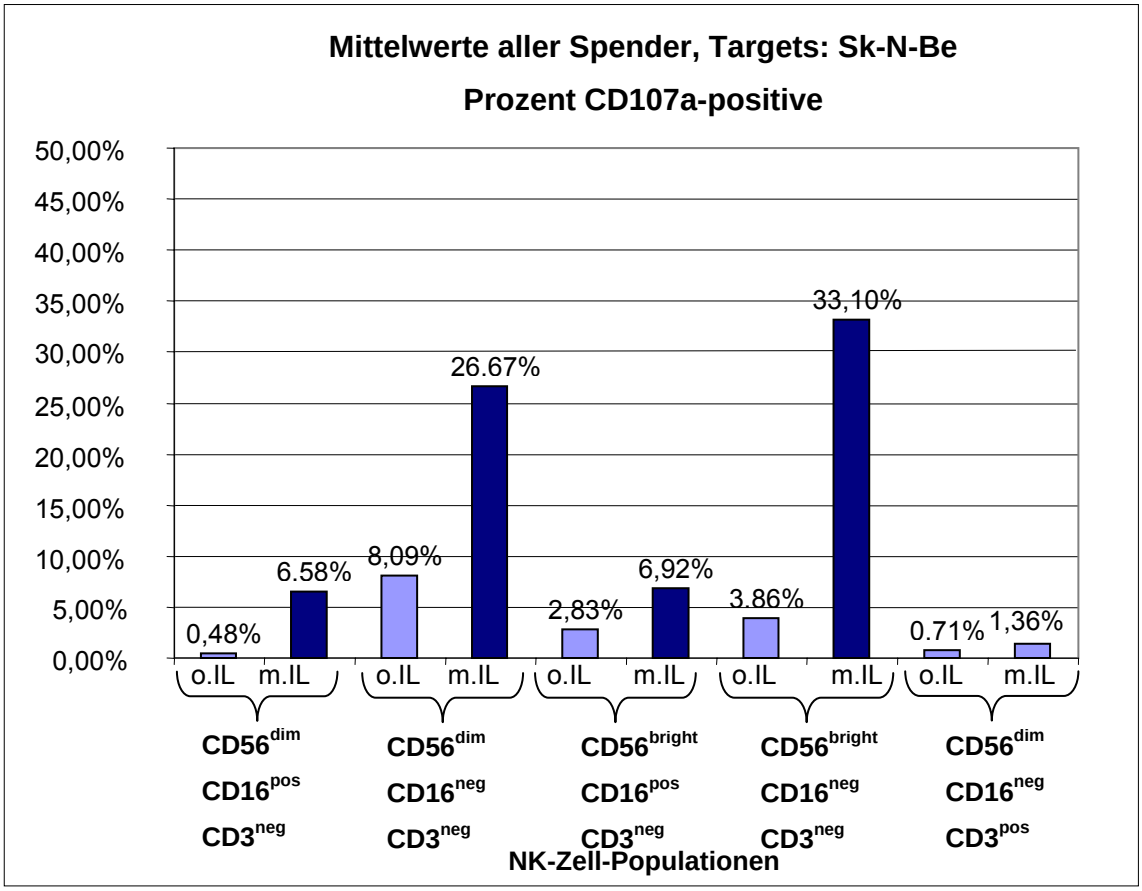


Abbildung 31



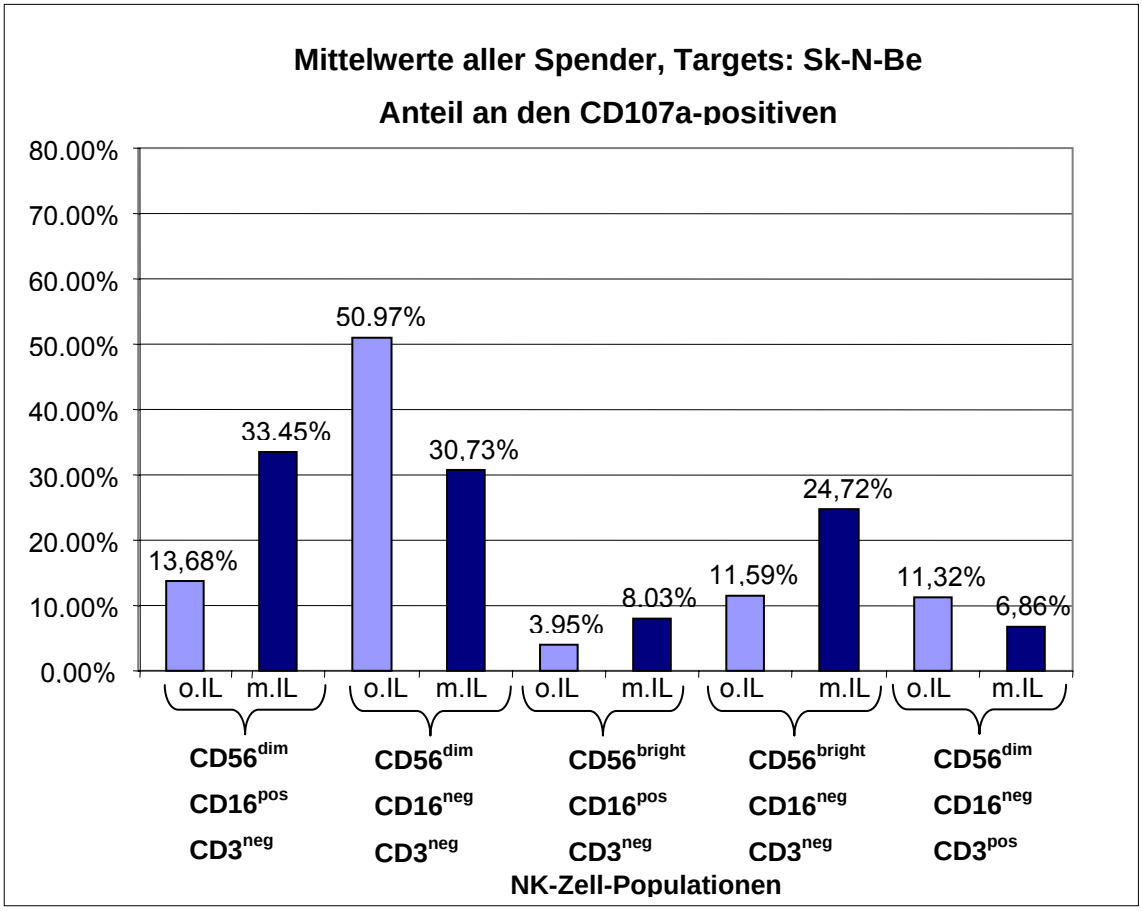
Bei den Versuchen mit Sk-N-Be konnten also nicht so einheitliche Ergebnisse erzielt werden wie bei den Versuchen mit K562. Bei der Betrachtung der Mittelwerte zeigte sich aber auch hier die höchste CD107a-Expression bei den beiden Populationen CD56^{dim} CD16^{neg} CD3^{neg} und CD56^{bright} CD16^{neg} CD3^{neg}. Bei der Verteilung der Populationen in den CD107a-positiven wiesen nur die unstimulierten NK-Zellen das gleiche Verhalten auf wie beim Versuch mit K562. Bei den IL2-stimulierten NK-Zellen waren die Werte für die Anteile der CD56^{dim} CD16^{pos} CD3^{neg} und der CD56^{dim} CD16^{neg} CD3^{neg} NK-Zellen etwa gleich, außerdem war der Wert für die CD56^{bright} CD16^{neg} CD3^{neg} NK-Zellen nur etwas geringer.

Abbildung 32



(zu Abb. 32: Die Standardabweichungen zu den jeweiligen Mittelwerten im Schaubild betragen: 0,48+/-0,46%, 6,58+/-5,04%, 8,09+/-3,42%, 26,67+/-14,21%, 2,83+/-5,88%, 6,92+/-6,56%, 3,86+/-1,72%, 33,10+/-12,22%, 0,71+/-0,34%, 1,36+/-0,87%)

Abbildung 33



(zu Abb. 34: Die Standardabweichungen zu den jeweiligen Mittelwerten betragen: 13,68+/-12,27%, 33,45+/-9,67%, 50,97+/-19,75%, 30,73+/-10,11%, 3,95+/-4,95%, 8,03+/-6,22%, 11,59+/-7,00%, 24,72+/-11,06%, 11,32+/-5,94%, 6,86+/-5,40%)

3.3 Charakterisierung der NK-Zellen hinsichtlich aktivierender Rezeptoren

Zur Untersuchung der NK-Zellen hinsichtlich der aktivierenden Rezeptoren CD69, NKp30, NKp44, NKp46 und NKG2D wurden die Zellen nach dem CD107a-Assay mit FACS-Antikörpern gegen diese Rezeptoren inkubiert und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dies wurde mit NK-Zellen der Spender 1, 2, 3, 6 und 8 und den Zelllinien K562 und Sk-N-Be als Targetzellen durchgeführt. Die Hälfte der NK-Zellen war vor dem Versuch mit IL2 stimuliert worden.

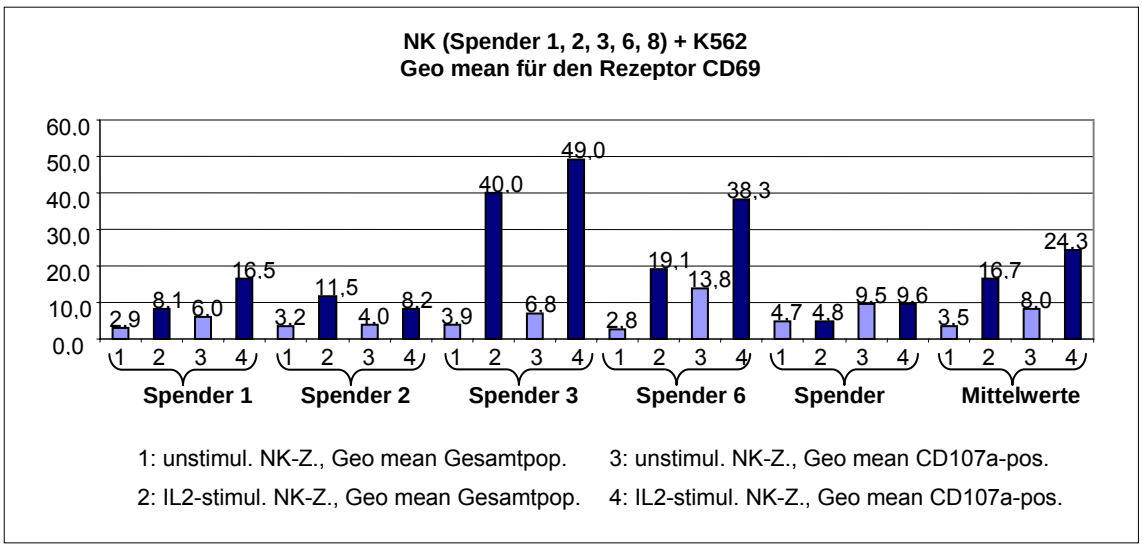
Zur Auswertung wurde zunächst auf die CD56-positive Lymphozytenpopulation ein Gate gesetzt und diese Zellen dann in einem Histogram Plot dargestellt, der

den Kanal des entsprechenden Rezeptors abbildete. Da keine eindeutige Unterteilung in eine für die Rezeptoren positive und negative Fraktion gelang, wurde der Geo mean für die Abschätzung der Expression des jeweiligen Rezeptors herangezogen. Nun wurde die Gesamtpopulation der NK-Zellen in einem Density Plot dargestellt, bei dem auf der y-Achse der Kanal für den CD107a-Antikörper aufgetragen wurde, und ein Gate auf die CD107a-positive Fraktion gesetzt. Diese Population wurde wiederum im Histogram Plot für den Kanal des jeweiligen Rezeptors dargestellt und erneut der Geo mean bestimmt.

3.3.1 Untersuchung von CD69

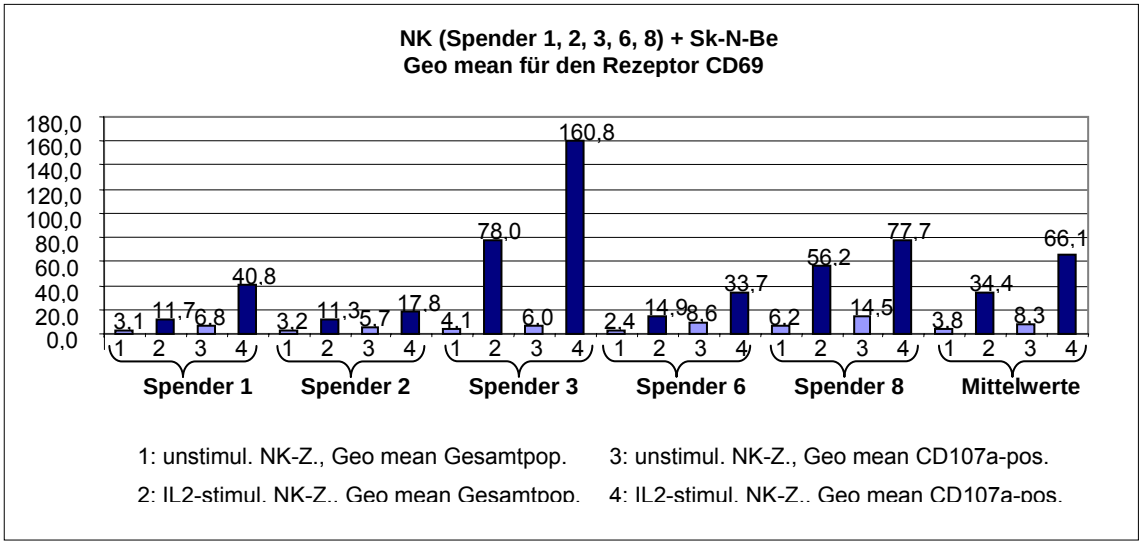
Bis auf die IL2-stimulierten NK-Zellen beim Versuch mit Spender 2 gegen K562 zeigte sich in allen Fällen ein erhöhter Geo mean für CD69 in der CD107a-positiven Population gegenüber der Gesamtpopulation. Die höchsten Werte konnten bei Spender 3 gegen Sk-N-Be erzielt werden gefolgt vom Versuch mit Spender 8 gegen Sk-N-Be und auf dem dritten Platz Spender 3 gegen K562. Außerdem konnte in allen Fällen bei den NK-Zellen, die zuvor mit IL2 stimuliert worden waren, ein höherer Geo mean für CD69 beobachtet werden als bei den unstimulierten NK-Zellen.

Abbildung 34



(zu Abb. 35: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen:
1: 3,5+/-0,7 2: 16,7+/-14,0 3: 8,0+/-3,7 4: 24,3+/-18,3)

Abbildung 35



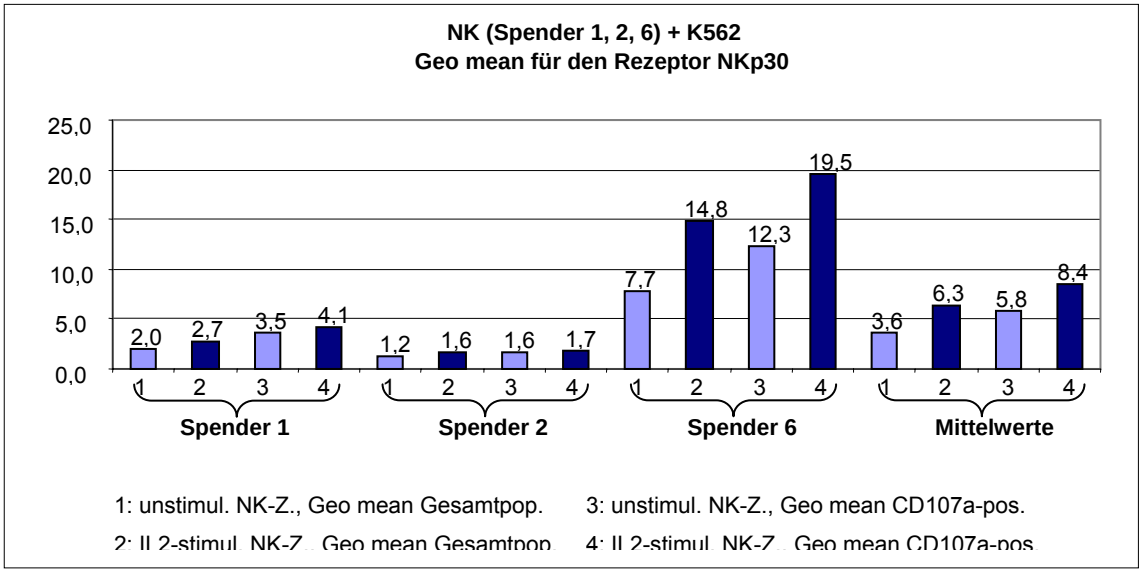
(zu Abb. 36: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen:
1: 3,8+/1,4 2: 34,4+/-30,8 3: 8,3+/-3,6 4: 66,1+/-57,2)

3.3.2 Untersuchung von NKp30

Dieser Rezeptor wurde nur bei den Versuchen mit Spender 1, 2 und 6 (gegen K562) bzw. 3 (gegen Sk-N-Be) mit gefärbt.

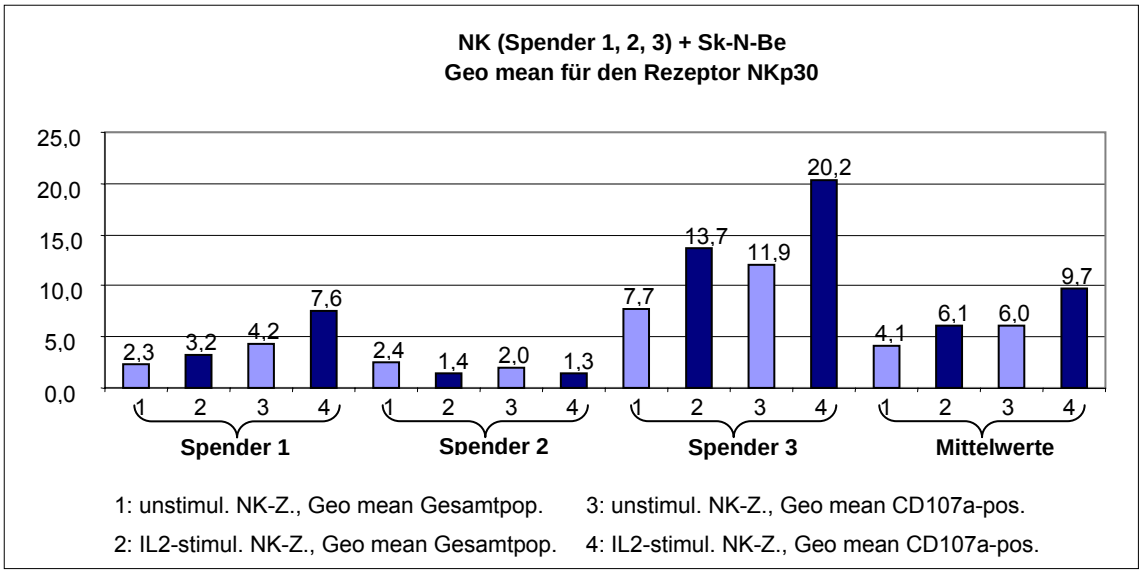
Bis auf den Versuch mit Spender 2 gegen Sk-N-Be konnte in allen Fällen in der CD107a-positiven Population ein höherer Geo mean für NKp30 beobachtet werden. Beim Versuch mit Spender 2 gegen K562 fiel der Anstieg jedoch sehr gering aus. Wie bei CD69 zeigten auch hier die IL2-stimulierten NK-Zellen einen höheren Geo mean, allerdings wiederum mit Ausnahme des oben genannten Versuchs. Die höchsten Werte konnten bei den Versuchen mit Spender 6 gegen K562 und Spender 3 gegen Sk-N-Be erzielt werden.

Abbildung 36



(zu Abb. 37: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen:
1: 3,6+/-3,5 2: 6,3+/-7,3 3: 5,8+/-5,7 4: 8,4+/-9,6)

Abbildung 37



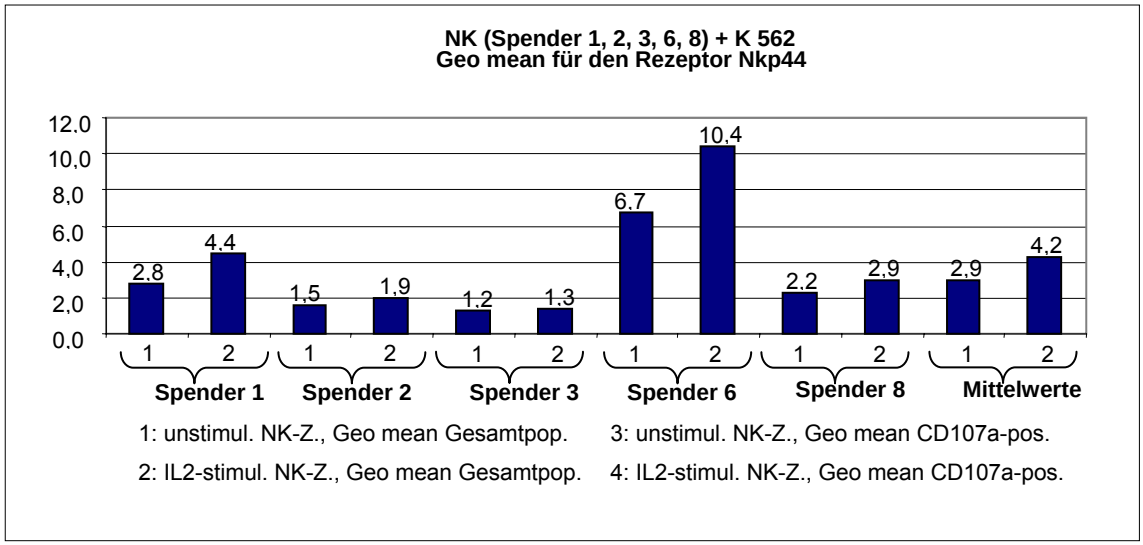
(zu Abb. 38: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen:
1: 4,1+/-3,0 2: 6,1+/-6,6 3: 6,0+/-5,2 4: 9,7+/-9,6)

3.3.3 Untersuchung von NKp44

Um diesen Rezeptor zu untersuchen, wurden nur IL2-stimulierte NK-Zellen herangezogen. Die NK-Zellen von Spender 2 wurden nur gegen K562 getestet. In allen Fällen zeigte sich auch hier in der CD107a-positiven Population ein

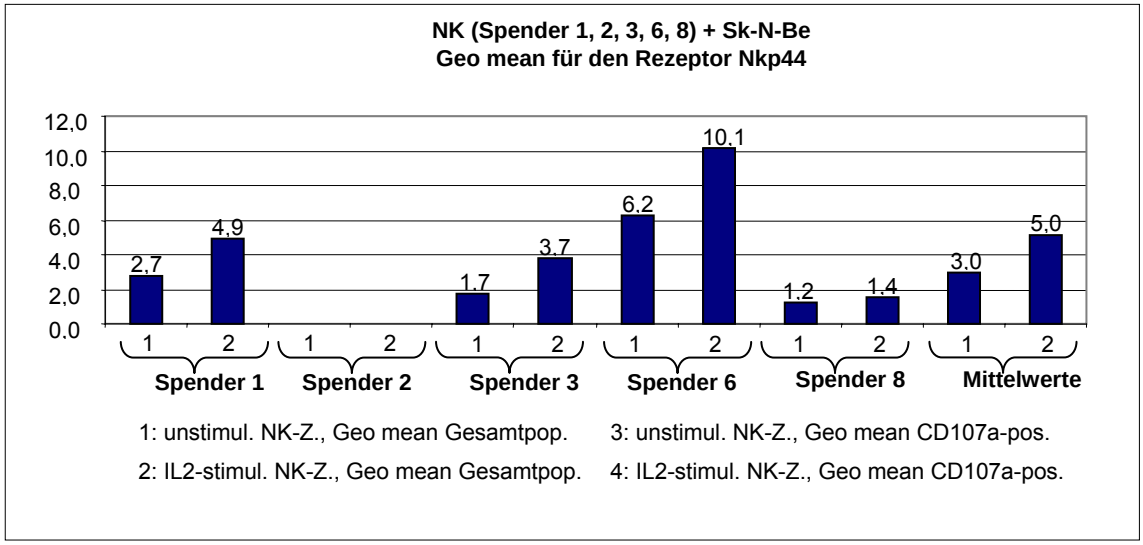
erhöhter Geo mean, jedoch fiel diese Erhöhung in vier von neun Fällen nur gering aus. Die höchsten Werte waren bei den Versuchen mit Spender 6 zu beobachten.

Abbildung 38



(zu Abb. 39: Die Stadardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen:
1: 2,9+/-2,2 2: 4,2+/-3,6)

Abbildung 39



(zu Abb. 40: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen:
1: 3,0+/-2,2 2: 5,0+/-3,6)

3.3.4 Untersuchung von NKp46

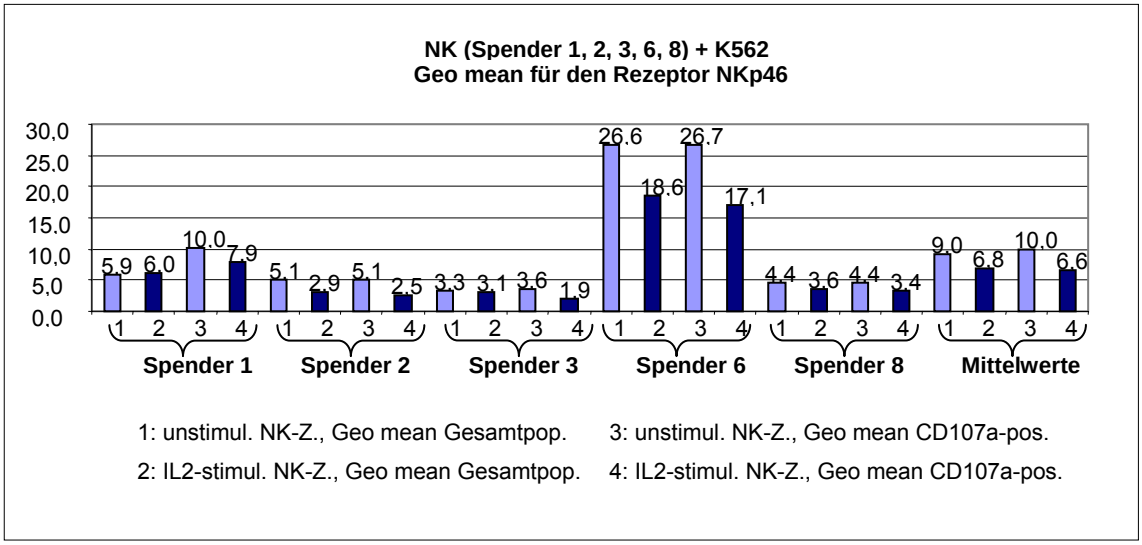
Bei den Versuchen mit K562 konnte nur bei Spender 1 ein deutlich höherer Geo mean in der CD107a-positiven Population festgestellt werden. In den anderen Fällen verhielt der Geo mean sich für die unstimulierten und IL2-stimulierten NK-Zellen gegensätzlich: In den Versuchen mit Spender 2, 3, 6 und 8 war der Geo mean bei den unstimulierten NK-Zellen in der Gesamtpopulation und in der CD107a-positiven Population etwa gleich hoch, während er bei den zuvor mit IL2 stimulierten NK-Zellen in der Gesamtpopulation über dem Wert der CD107a-positiven lag.

Das Verhalten des Geo mean bei den Versuchen mit Sk-N-Be war bei den verschiedenen Spendern unterschiedlich. Bei Spender 1 zeigte sich für stimulierte und unstimulierte NK-Zellen ein erhöhter Wert in der CD107a-positiven Population. Dies galt auch für die unstimulierten NK-Zellen von Spender 2; die IL2-stimulierten NK-Zellen verhielten sich jedoch umgekehrt. Bei Spender 3 war der Geo mean von NKp46 in beiden Fällen in der Gesamtpopulation höher als bei den CD107a-positiven, ebenso wie bei den unstimulierten NK-Zellen von Spender 6. Die IL2-stimulierten NK-Zellen wiederum zeigten hier in der CD107a-positiven Population eine höhere Expression von NKp46 als in der Gesamtpopulation. Im Versuch mit Spender 8 war der Geo mean der stimulierten NK-Zellen auf gleichem Niveau, während er für die unstimulierten NK-Zellen in der CD107a-positiven Population etwas höher lag.

Sowohl bei den Versuchen mit K562 als auch mit Sk-N-Be erzielten die NK-Zellen von Spender 6 die höchsten Geo mean-Werte für NKp46.

Bezüglich des Verhaltens nach IL2-Stimulation zeigte sich hier in fast allen Fällen ein niedrigerer Geo mean bei den stimulierten NK-Zellen. Ausnahmen waren die CD107a-positive Population im Versuch mit Spender 3 und 6 gegen Sk-N-Be.

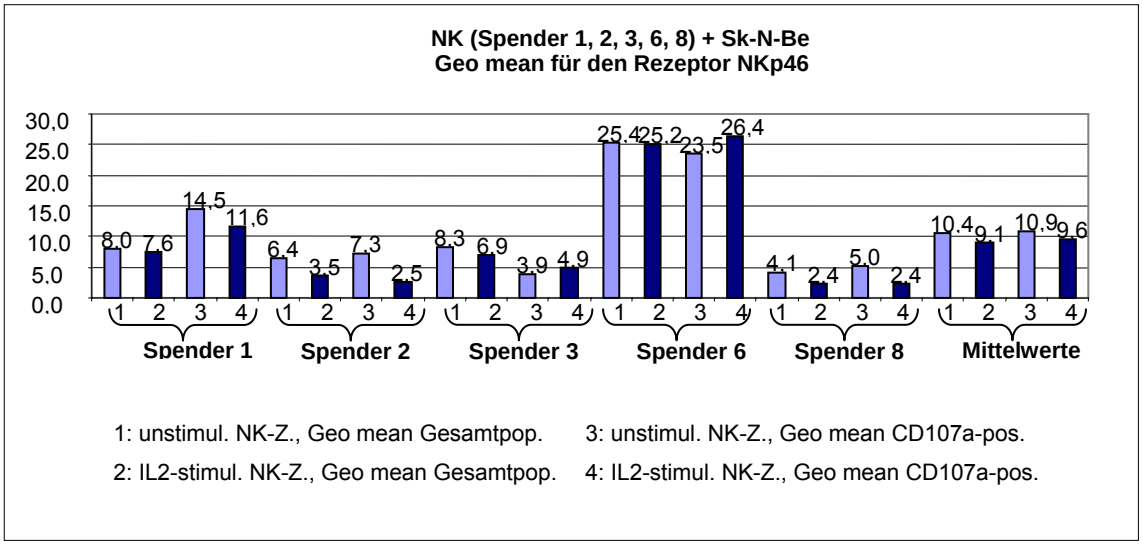
Abbildung 40



(zu Abb. 41: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen:

1: 9,0+/-9,8 2: 6,8+/-6,6 3: 10,0+/-9,6 4: 6,6+/-6,3)

Abbildung 41



(zu Abb. 42: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen:

1: 10,4+/-8,5 2: 9,1+/-9,2 3: 10,9+/-8,2 4: 9,6+/-10,1)

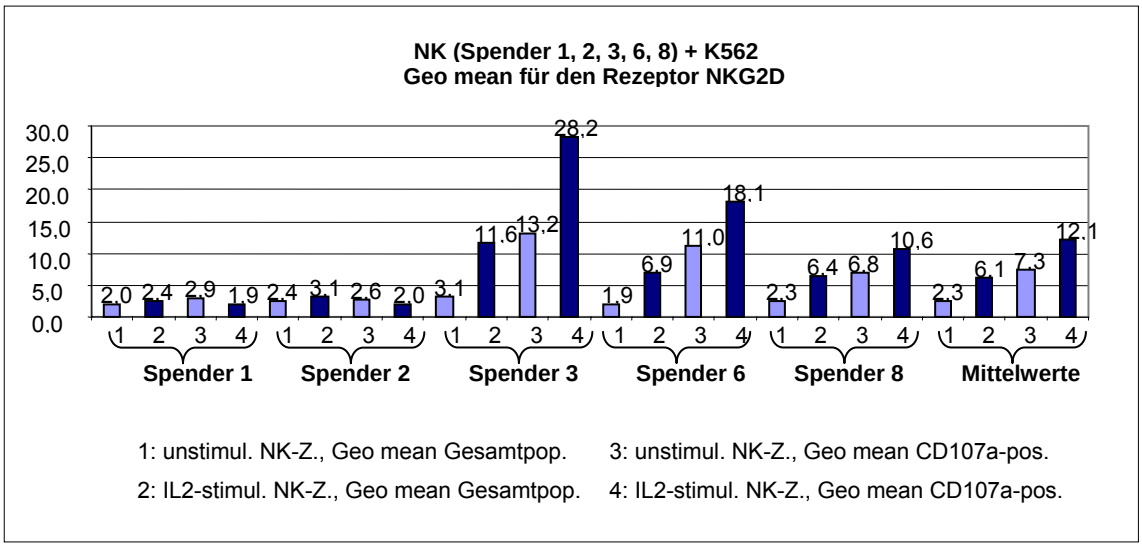
3.3.5 Untersuchung von NKG2D

Bis auf die Versuchen mit Spender 1 gegen K562 und Sk-N-Be und Spender 2 gegen K562 zeigte sich in allen Fällen wie bei den ersten drei untersuchten Rezeptoren, dass der Geo mean in der CD107a-positiven Population einen höheren Wert aufwies als in der Gesamtpopulation. Die genannten Ausnahmen wiesen ein gleich bleibendes Niveau des Geo means auf.

Bis auf die genannten Ausnahmen war auch das unterschiedliche Verhalten der IL2-stimulierten und unstimulierten NK-Zellen wie zuvor beschrieben, nämlich dass die stimulierten NK-Zellen einen höheren Geo mean besaßen. Bei den Ausnahmen war der Unterschied zwischen den zwei Fraktionen nur gering.

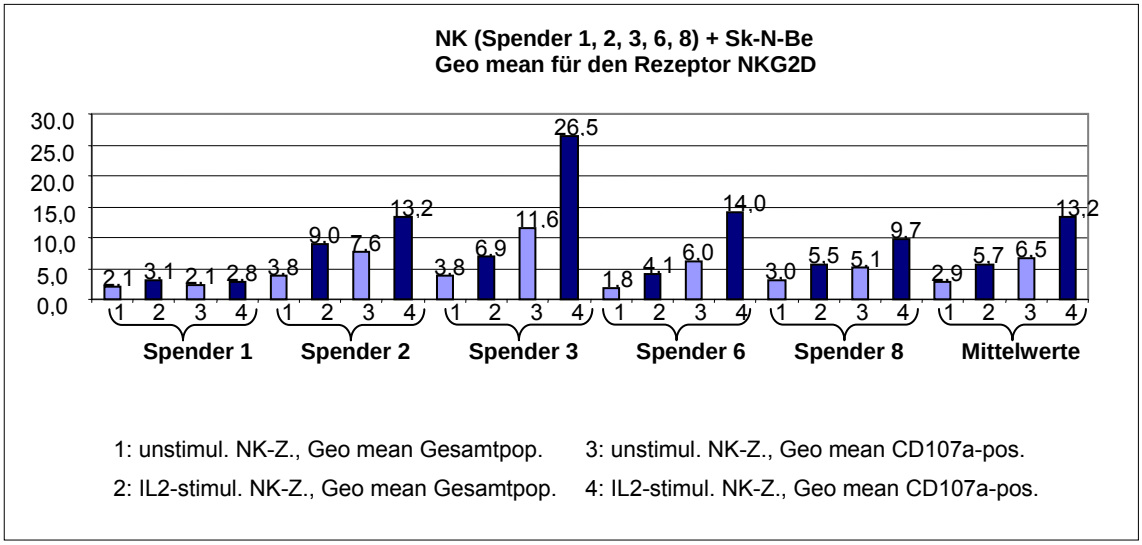
Die höchsten Werte für den Geo mean erreichten die NK-Zellen von Spender 3, sowohl im Versuch mit K562 als auch mit Sk-N-Be.

Abbildung 42



(zu Abb. 43: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen:
1: 2,3+/-0,4 2: 6,1+/-3,6 3: 7,3+/-4,7 4: 12,1+/-11,2)

Abbildung 43



(zu Abb. 44: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen:
1: 2,9+/-0,9 2: 5,7+/-2,3 3: 6,5+/-3,4 4: 13,2+/-8,6)

3.3.6 Zusammenfassung

Die bei der Untersuchung der Rezeptoren CD69, NKp30, NKp44 und NKG2D gemachten Beobachtungen ließen darauf schließen, dass die IL2-stimulierten NK-Zellen generell eine höhere Expression des jeweiligen Rezeptors aufweisen und dass außerdem die Expression des Rezeptors bei den CD107a-positiven NK-Zellen deutlich höher ist als in der Gesamtpopulation. Eine statistische Signifikanz im gepaarten t-Test war hierfür allerdings nur für die unstimulierten NK-Zellen im Versuch gegen Sk-N-Be bei den Rezeptoren CD69 und NKG2D gegeben. Die folgende Tabelle zeigt die p-Werte für die einzelnen Berechungen.

Tabelle 2

	Vergleich des Geo mean der unstimul. NK-Zellen in der Geamtpopulation und in den CD107a-positiven	Vergleich des Geo mean der IL2-stimul. NK-Zellen in der Gesamtpopulation und in den CD107a-positiven
CD69	**Versuche mit K562:** p=0,0601 (nicht signifikant) **Versuche mit Sk-N-Be:** p=0,0198 (signifikant)	**Versuche mit K562**: p=0,1047 (nicht signifikant) **Versuche mit Sk-N-Be:** p=0,0752 (nicht signifikant)
NKp30	**Versuche mit K562:** p=0,2302 (nicht signifikant) **Versuche mit Sk-N-Be:** p=0,2627 (nicht signifikant)	**Versuche mit K562:** p=0,2918 (nicht signifikant) **Versuche mit Sk-N-Be:** p=0,2006 (nicht signifikant)
NKp44		**Versuche mit K562:** p=0,1173 (nicht signifikant) **Versuche mit Sk-N-Be:** p=0,0664 (nicht signifikant)
NKp46	**Versuche mit K562:** p=0,3093 (nicht signifikant) **Versuche mit Sk-N-Be:** p=0,8252 (nicht signifikant)	**Versuche mit K562:** p=0,6640 (nicht signifikant) **Versuche mit Sk-N-Be:** p=0,6672 (nicht signifikant)
NKG2D	**Versuche mit K562:** p=0,0714 (nicht signifikant) **Versuche mit Sk-N-Be:** p=0,1525 (nicht signifikant)	**Versuche mit K562:** p=0,1525 (nicht signifikant) **Versuche mit Sk-N-Be:** p=0,0934 (nicht signifikant)

Außerdem fiel auf, dass für die unterschiedlichen Rezeptoren unterschiedliche Spender die höchsten Werte aufwiesen. So zeigten die NK-Zellen von Spender 3 eine hohe Expression von CD69, NKp30 und NKG2D, die von Spender 6 für alle Rezeptoren außer CD69 und die von Spender 8 vor allem für CD69. Die Expression des Rezeptors war außerdem vom Target abhängig.

Bei der Untersuchung des Rezeptors NKp46 waren die Ergebnisse sehr

uneinheitlich und unterschieden sich vor allem auch bezüglich der Unterschiede zwischen den IL2-stimulierten und unstimulierten NK-Zellen gegenüber den Ergebnissen bei der Untersuchung der anderen Rezeptoren.

3.4 Charakterisierung der NK-Zellen hinsichtlich inhibitorischer Rezeptoren für HLA-Moleküle

In Versuchen mit Cw3/Cw4-Transfektanten sowie mit Blasten wurden die NK-Zellen hinsichtlich ihrer inhibitorischen Rezeptoren für HLA-Moleküle untersucht. Es wurden Antikörper gegen CD158a, CD158b, CD158e, NKG2A und ILT2 verwendet. CD158a oder KIR2DL1 bindet an HLA-Moleküle der Cw4-Gruppe (Cw2,4,5,6), CD158b oder KIR2DL2+3 bindet an HLA-Moleküle der Cw3-Gruppe (Cw1,3,7,8,9) und CD158e oder KIR3DL1 bindet an HLA-Moleküle der Bw4-Gruppe. Die Liganden für NKG2A oder CD94 sind HLA-E-Moleküle. ILT2 oder CD85j hat eine hohe Affinität zu CMV UL18 und eine niedrige Affinität zu HLA-A,B,C,E,F und G-Molekülen.
Nach der Inkubation der NK-Zellen mit den jeweiligen Targetzellen wurden sie folgendermaßen gefärbt:

Tabelle 3

FACS-Röhrchen	**Antikörper**
1 (NK o. IL + Targets) und 2 (NK m. IL + Targets)	CD107a PeCy5 CD158a FITC CD158b,e, ILT2, NKG2A PE, CD56 APC
3 (NK o. IL + Targets) und 4 (NK m. IL + Targets)	CD107a PeCy5 CD158b FITC CD158a,e, ILT2, NKG2A PE, CD56 APC

5 (NK o. IL + Targets) und 6 (NK m. IL + Targets)	CD107a PeCy5 CD158e FITC CD158a,b, ILT2, NKG2A PE, CD56 APC
7 (NK o. IL + Targets) und 8 (NK m. IL + Targets)	CD107a PeCy5 CD158a,b,e FITC NKG2A PE CD56 APC
9 (NK o. IL + Targets) und 10 (NK m. IL + Targets)	CD107a PeCy5 CD158a,b,e FITC ILT2 PE, CD56 APC
11 (NK o. IL + Targets) und 12 (NK m. IL + Targets)	CD107a PeCy5 CD158a,b,e, ILT2, NKG2A PE, CD56 APC

Bei der Auswertung der FACS-Daten wurde zunächst im Density Plot FSC gegen SSC dargestellt und ein Gate auf die lymphatischen Zellen gesetzt. Dann wurde in einem weiteren Densitiy Plot die CD56-Expression dieser Zellen auf der x-Achse dargestellt und ein Gate auf die CD56-positiven Zellen gesetzt. Diese NK-Zellen wurden dann auf zwei Arten weiter ausgewertet:

Zunächst wurden sie in einem weiteren Density Plot dargestellt, in dem der FITC-Kanal auf der x-Achse gegen den PE-Kanal auf der y-Achse aufgetragen war, und in vier Quadranten unterteilt. Bei den Röhrchen 1 bis 6 ergaben sich so folgende Populationen: single-KIR-positive NK-Zellen (rechter unterer Quadrant), für mindestens einen KIR negative und für die anderen KIR-Rezeptoren und NKG2a und ILT2 positive NK-Zellen (linker oberer Quadrant), für alle Rezeptoren positive NK-Zellen (rechter oberer Quadrant) und für alle Rezeptoren negative NK-Zellen (linker unterer Quadrant). Ebenso wurde mit den Röhrchen 7 bis 10 verfahren und hier die jeweiligen einzeln gefärbten KIR-Rezeptoren durch NKG2A oder ILT2 ersetzt. Nun wurden wieder Gates auf diese vier Populationen gesetzt und deren CD107a-Expression ermittelt, indem

sie in einem weiteren Density Plot (PeCy5-Kanal auf der y-Achse gegen FSC auf der x-Achse) dargestellt wurden.
Außerdem wurde die Gesamtheit der NK-Zellen in einem Density Plot dargestellt, in dem der PeCy5-Kanal gegen FSC aufgetragen war und ein Gate auf die CD107a-positiven NK-Zellen gesetzt. Diese wurden nun in einem Plot FITC gegen PE dargestellt und in Quadranten unterteilt. So wurde die Verteilung der oben genannten Populationen in den CD107a-positiven Zellen ermittelt.

3.4.1 Versuche mit Cw3/Cw4-Transfektanten

Die Versuche mit den Cw3- und Cw4-Transfektanten wurden mit den Spendern 2, 4, 5, 6 und 7 durchgeführt.

3.4.1.1 Auswertung der einzelnen Versuche

Zur Veranschaulichung siehe Abbildung 116 bis 155 im Anhang.
Bei den NK-Zellen aller Spender war bei den Versuchen sowohl mit den Cw3- als auch mit den Cw4-Transfektanten bei den NK-Zellen, die zuvor mit IL2 stimuliert worden waren, eine höhere CD107a-Expression zu beobachten als bei den unstimulierten.

Spender 2:
Die Populationen mit der höchsten CD107a-Expresssion und dem höchsten Anteil unter den CD107a-positiven NK-Zellen waren gegen beide Targets die für mindestens einen KIR negativen NK-Zellen, die $NKG2A^{pos}$ KIR^{neg} und die $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} NK-Zellen. Dabei waren die Unterschiede zwischen den $NKG2A^{pos}$ KIR^{neg} und $NKG2A^{neg}$ KIR^{pos} bzw. den $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} und $ILT2^{neg}$ KIR^{pos} NK-Zellen deutlicher, wenn man ihren Anteil an den CD107a-positiven verglich, als wenn man ihre CD107a-Expression betrachtete. Des Weiteren war hier zu beobachten, dass der Anteil der NKG2A-positiven NK-Zellen durch die IL2-Stimulation erhöht wurde, der Anteil der ILT2-positiven NK-Zellen jedoch niedriger war.
Von den single-KIR-positiven NK-Zellen zeigten nur die CD185b-positiven eine

messbare CD107a-Expression. Diese fiel bei den IL2-stimulierten NK-Zellen beim Versuch gegen die Cw4-Transfektanten deutlich höher aus – hier ist kein Ligand für den inhibitorischen Rezeptor vorhanden. Bei den unstimulierten NK-Zellen war der Unterschied sehr gering.

Spender 4:

Was die Populationen mit der höchsten CD107a-Expression angeht, gab es hier Unterschiede zwischen den NK-Zellen mit und ohne IL2-Stimulation. Bei den NK-Zellen ohne IL2 ist die Population mit der höchsten CD107a-Expression die $ILT2^{pos}$ KIR^{neg}, während die Unterschiede zwischen den anderen Populationen nur gering waren. Die IL2-stimulierten NK-Zellen dagegen wiesen mehrere Populationen mit hoher CD107a-Expression auf: es waren dies, wie bei Spender 2, die für mindesten einen KIR negativen NK-Zellen und die $NKG2A^{pos}$ KIR^{neg} sowie $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} Populationen. Die höchsten Anteile unter den CD107a-positiven entfielen ebenfalls auf die gleichen Populationen wie bei Spender 2. Ebenso wie dort war die CD107a-Expression der $NKG2A^{pos}$ KIR^{neg} bei den IL2-stimulierten NK-Zellen höher als bei den unstimulierten, während die $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} NK-Zellen sich entgegengesetzt verhielten.
Hinsichtlich der KIR-Rezeptoren war bei den IL2-stimulierten NK-Zellen allgemein zu beobachten, dass die für mindestens einen KIR negativen NK-Zellen eine höhere CD107a-Expression zeigten als die entsprechenden single-KIR-positiven; die unstimulierten NK-Zellen zeigten hier ein uneinheitliches Verhalten. Die CD158a-positiven, IL2-stimulierten NK-Zellen zeigten gegen beide Targets die höchste CD107a-Expression unter den single-KIR-positiven NK-Zellen. Beim Versuch gegen die Cw3-Transfektanten war die CD107a-Expression bei allen single-KIR-positiven NK-Zellen höher als beim Versuch gegen die Cw4-Targets.

Spender 5:

Die CD107a-Expression bei beiden Targets war hoch bei den für mindestens einen KIR negativen NK-Zellen und mit geringen Unterschieden bei den $NKG2A^{pos}$ KIR^{neg}, $NKG2A^{neg}$ KIR^{pos}, $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} und $ILT2^{neg}$ KIR^{pos} NK-Zellen.

Nur bei den NK-Zellen nach IL2-Stimulation waren die ILT2^{neg} KIR^{pos} deutlich niedriger positiv sind als ILT2^{pos} KIR^{neg}. Die Anteile an den CD107a-positiven verhielten sich ebenso wie bei Spender 2 und 5.
Die single-KIR-positiven NK-Zellen zeigten keine CD107a-Expression bis auf die CD185b-positiven, zuvor IL2-stimulierten NK-Zellen gegen die Cw4-Transfektanten. Auch hier kann keine Inhibition stattfinden.

Spender 6:

Die höchste CD107a-Expression wiesen die ILT2^{pos} KIR^{neg} NK-Zellen auf außer bei den IL2-stimulierten NK-Zellen gegen die Cw3-Transfektanten, hier wiesen sie die zweithöchste CD107a-Expression nach den NKG2A^{pos} KIR^{neg} auf. Beim Versuch gegen die Cw4-Transfektanten wurde NKG2A nicht mit angefärbt. Der höchste Anteil an den CD107a-positiven NK-Zellen entfiel auf die Populationen, die für mindestens einen KIR negativ waren. Die Populationen, bei denen ILT2 bzw. NKG2A angefärbt wurde, wiesen geringere Anteile auf. Hier war der Anteil der ILT2^{pos} KIR^{neg} stets höher als der Anteil der ILT2^{neg} KIR^{pos} NK-Zellen. Beim Versuch gegen die Cw3-Targets wiesen die unstimulierten NK-Zellen einen höheren Anteil der NKG2A^{neg} KIR^{pos} Population als der NKG2A^{pos} KIR^{neg} Population auf, während sich dies bei den IL2-stimulierten NK-Zellen umgekehrt verhielt.
Die für mindestens einen KIR negativen NK-Zellen wiesen eine höhere CD107a-Expression auf als die single-KIR-positiven. Dies galt jedoch nicht für die unstimulierten NK-Zellen, die mit den Cw4-Targets inkubiert worden waren. Sie wiesen ein uneinheitliches Verhalten mit sehr geringen Unterschieden in der CD107a-Expression auf.

Spender 7:

Nur bei den zuvor mit IL2-stimulierten NK-Zellen ließ sich eine Population abgrenzen, deren CD107a-Expression deutlich am höchsten war; dies waren die NKG2A^{pos} KIR^{neg} NK-Zellen. ILT2 war bei diesem Versuch nicht mit angefärbt worden. Bei der Betrachtung der Anteile an den CD107a-positiven NK-Zellen machte diese Population bei den IL2-stimulierten NK-Zellen nach

den NK-Zellen, die für mindestens einen KIR negativ waren, den höchsten Anteil aus. Bei den unstimulierten NK-Zellen wiesen letztere ebenfalls die höchsten Anteile an den CD107a-positiven NK-Zellen auf. Die NKG2A-Populationen machten hier einen deutlich niedrigeren Anteil aus, wobei beim Versuch gegen die Cw3-Targets auf die $NKG2A^{pos}$ KIR^{neg} NK-Zellen ein etwas höherer Anteil entfiel als auf die $NKG2A^{neg}$ KIR^{pos}, dies war beim Versuch gegen die Cw3-Targets umgekehrt.
Unter den single-KIR-positiven NK-Zellen zeigten die CD158e-postiven durchweg die höchste CD107a-Expression und machten auch den höchsten Anteil an den CD107a-positven aus. Beim Versuch gegen die Cw4-Targets wiesen die für mindestens einen KIR negativen NK-Zellen immer eine höhere CD107a-Expression auf als die single-KIR-positiven. Beim Versuch gegen die Cw3-Targets galt dies nur für CD158a bei den unstimulierten NK-Zellen und für CD158a und b bei den NK-Zellen, die mit IL2 stimuliert worden waren.

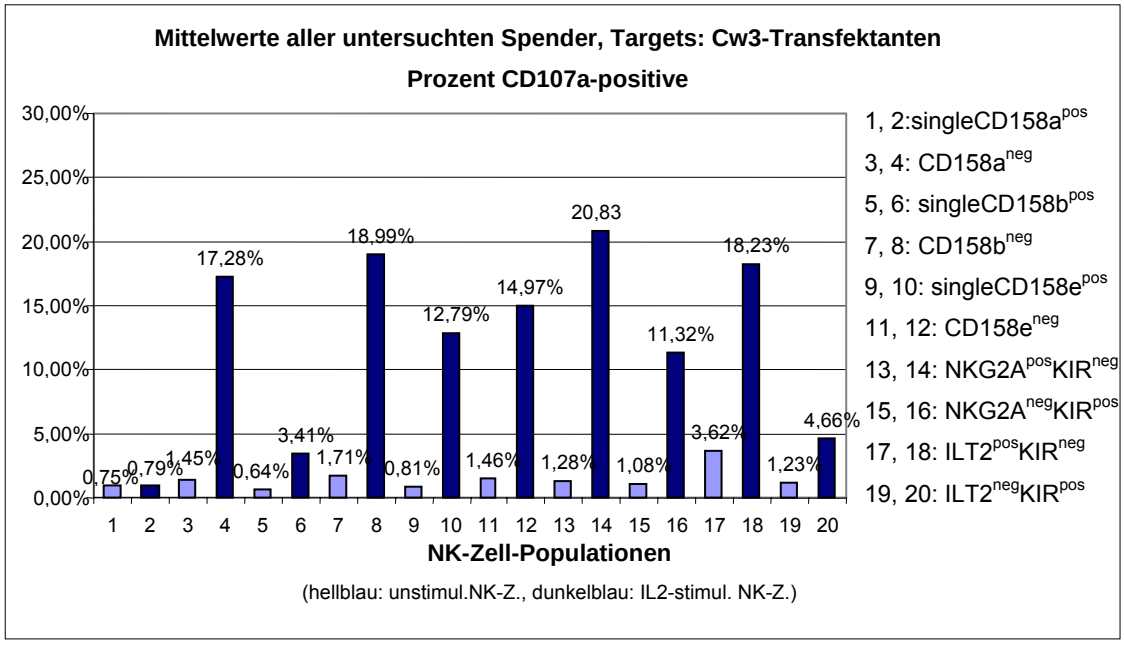
3.4.1.2 Zusammenfassung der Versuche

Zunächst ist zu sagen, dass durch IL2-Stimulation allgemein höhere CD107a-Expression erreicht wurden, allerdings nicht bei allen Populationen in gleichem Maße. Auch die Verteilung der Anteile der CD107a-positiven änderte sich teilweise.

Bei der Betrachtung der Mittelwerte der Versuche aller Spender gegen die gleichen Targetzellen zeigten bei den IL2-stimulierten NK-Zellen die höchste CD107a-Expression die $NKG2A^{pos}$ KIR^{neg} NK-Zellen. Ebenfalls eine hohe CD107a-Expression zeigten die NK-Zellen, die $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} und $NKG2A^{neg}$ KIR^{pos} waren, sowie die für mindestens einen KIR negativen NK-Zellen. Dabei wiesen vor allem die IL2-stimulierten NK-Zellen eine deutlich höhere CD107a-Expression bei der letztgenannten Population auf als bei den single-KIR-positiven NK-Zellen, nur bei CD158e war der Unterschied geringer.
Zur Verteilung der Populationen in den CD107a-positiven NK-Zellen lässt sich sagen, dass die größten Anteile die NK-Zellen bildeten, die für mindestens einen KIR negativ waren. Große Anteile entfielen außerdem auf die $NKG2A^{pos}$

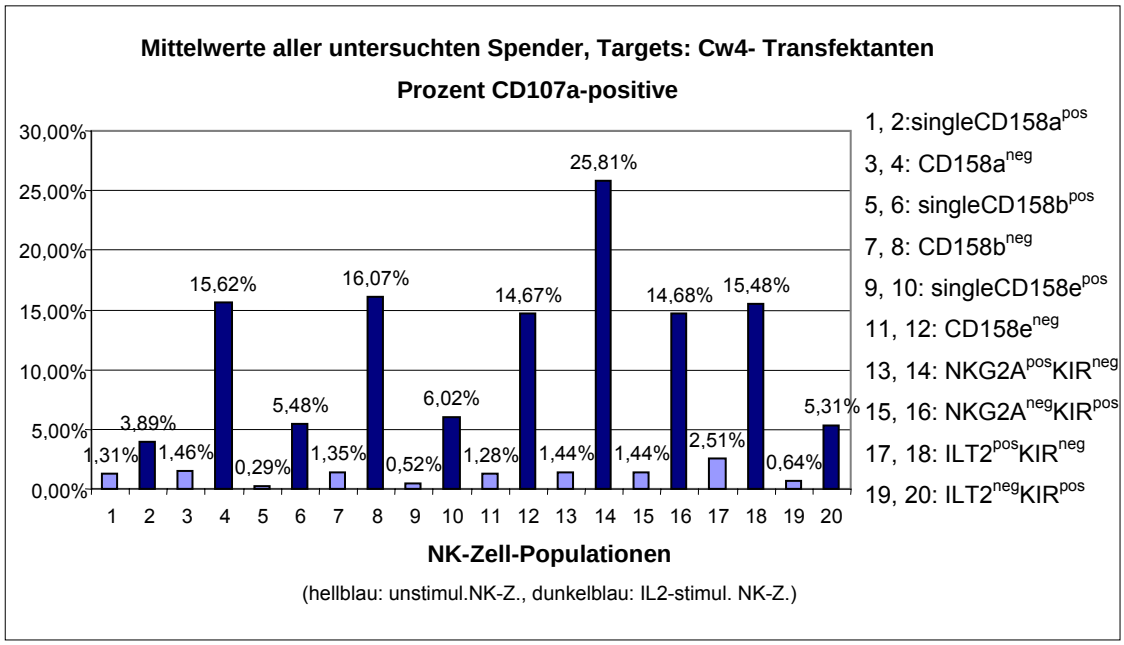
KIR^{neg} und $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} NK-Zellen. Dies galt sowohl für die NK-Zellen ohne als auch mit IL2-Stimulation.

Abbildung 44



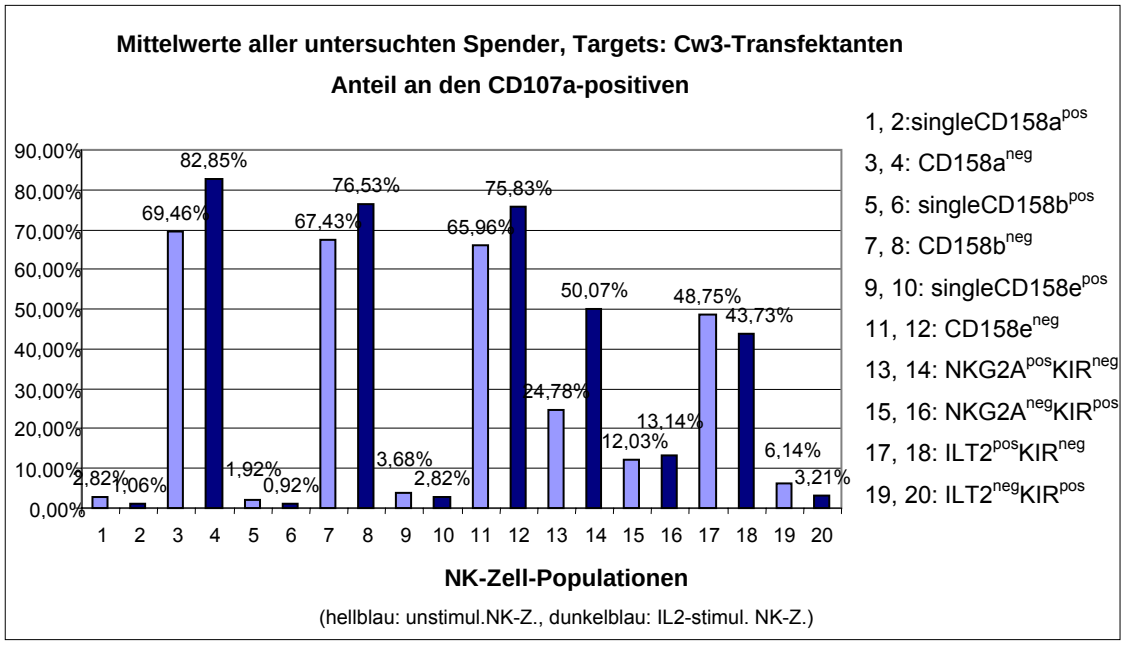
(zu Abb. 44: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 1: 0,75+/-1,32%; 2: 0,79+/-1,76%; 3: 1,45+/-0,21%; 4: 17,28+/-5,35%; 5: 0,64+/-0,77%; 6: 3,41+/-2,73%; 7: 1,71+/-0,25%; 8: 18,99+/-5,96%; 9: 0,81+/-0,82%; 10: 12,79+/-10,43%; 11: 1,46+/-0,41%; 12: 14,97+/-5,26%; 13: 1,28+/-0,52%; 14: 20,83+/-5,69%; 15: 1,08+/-0,48%; 16: 11,32+/-7,25%; 17: 3,62+/-0,91%; 18: 18,23+/-5,65%; 19: 1,23+/-1,03%; 20: 4,66+/-2,33%)

Abbildung 45



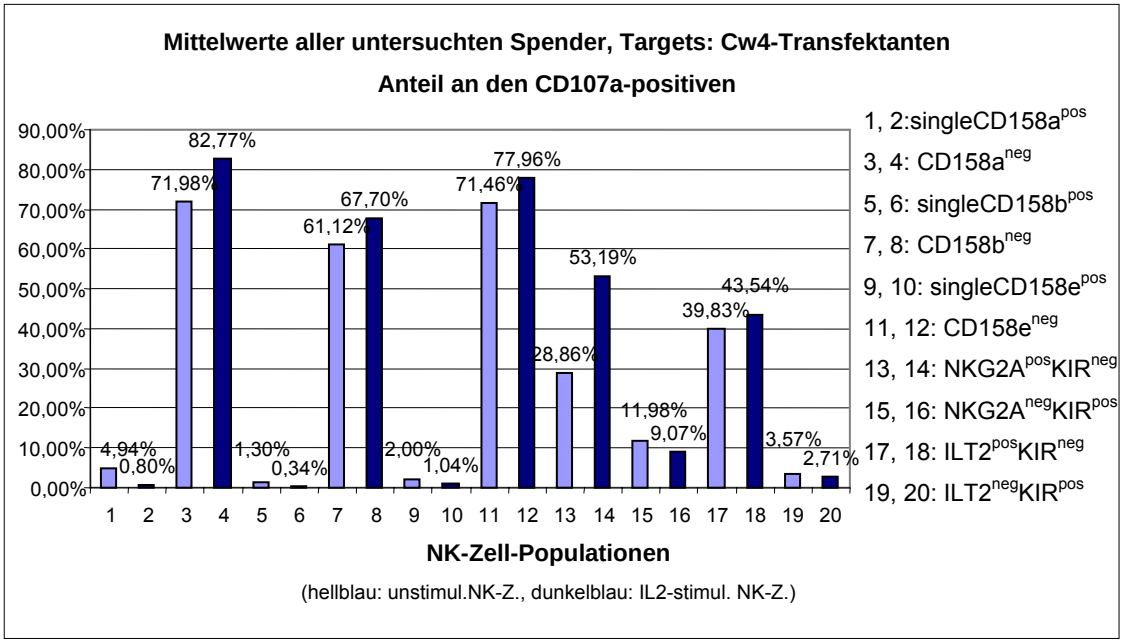
(zu Abb. 45: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen:
1: 1,31+/-1,20%; 2: 3,89+/-3,28%; 3: 1,46+/-0,73%; 4: 15,62+/-6,46%; 5: 0,29+/-0,41%; 6: 5,48+/-5,01%; 7: 1,35+/-0,57%; 8: 16,07+/-6,68%; 9: 0,52+/-0,48%; 10: 6,02+/-7,11%; 11: 1,28+/-0,62%; 12: 14,67+/-7,08%; 13: 1,44+/-0,30%; 14: 25,81+/-3,81%; 15: 1,44+/-0,81%; 16: 14,68+/-8,13%; 17: 2,51+/- 1,39%; 18: 15,48+/-5,93%; 19: 0,64+/-0,74%; 20: 5,31+/-5,08%)

Abbildung 46



(zu Abb. 46: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen:
1: 2,82+/-4,90%; 2: 1,06+/-1,31%; 3: 69,46+/-22,82%; 4: 82,85+/-16,80%; 5: 1,92+/-2,63%; 6: 0,92+/-1,61%; 7: 67,43+/-18,14%; 8: 76,53+/-12,08%; 9: 3,68+/-5,15%; 10: 2,82+/-3,93%; 11: 65,96+/-19,89%; 12: 75,83+/-19,85%; 13: 24,81+/-15,45%; 14: 50,07+/-18,47%; 15: 12,03+/-10,14%; 16: 13,14+/-10,23%; 17: 48,75+/-22,63%; 18: 43,73+/-20,50%; 19: 6,14+/-4,60%; 20: 3,21+/-3,12%)

Abbildung 47



(zu Abb. 47: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 1: 4,94+/-6,53%; 2: 0,80+/-1,08%; 3: 71,98+/-28,15%; 4: 82,77+/-22,55%; 5: 1,30+/-2,14%; 6: 0,34+/-0,31%; 7: 61,12+/-16,91%; 8: 67,70+/-14,21%; 9: 2,00+/-3,44%; 10: 1,04+/-1,98%; 11: 71,46+/-15,93%; 12: 77,96+/-16,46%; 13: 28,86+/-18,52%; 14: 53,19+/-17,86%; 15: 11,98+/-9,76%; 16: 9,07+/-5,81%; 17: 39,83+/-14,14%; 18: 43,54+/-16,51%; 19: 3,57+/-3,14%; 20: 2,71+/-2,74%)

3.4.1.3 Auswertung hinsichtlich KIR-mismatch

Aus allen Messungen mit den NK-Zellen der einzelnen Spender wurde der Mittelwert der CD107a-Expression in der Gesamtpopulation der NK-Zellen des jeweiligen Spenders berechnet. Diese sind in den untenstehenden Schaubildern dargestellt für die NK-Zellen mit und ohne IL2-Stimulation und zwar einmal für alle Konstellationen mit mismatch und einmal für alle Konstellationen ohne mismatch. Die letzten beiden Säulen der Schaubilder zeigen die Mittelwerte aller Werte der jeweiligen Gruppe von Versuchen.

Die HLA-Konstellation der Spender ist in folgender Tabelle aufgezeigt:

Tabelle 4

Spender	Merkmal der Cw3-Gruppe	Merkmal der Cw4-Gruppe
2	positiv	negativ
4	positiv	negativ
5	negativ	positiv
6	positiv	positiv
7	positiv	negativ

Somit ergibt sich für folgende Konstellationen eine potentielle Alloreaktivität nach dem Ligand-Ligand-Modell:

Spender 2, 4 und 7 gegen die Cw4-Transfektanten und Spender 5 gegen die Cw3-Transfektanten.

Abbildung 48

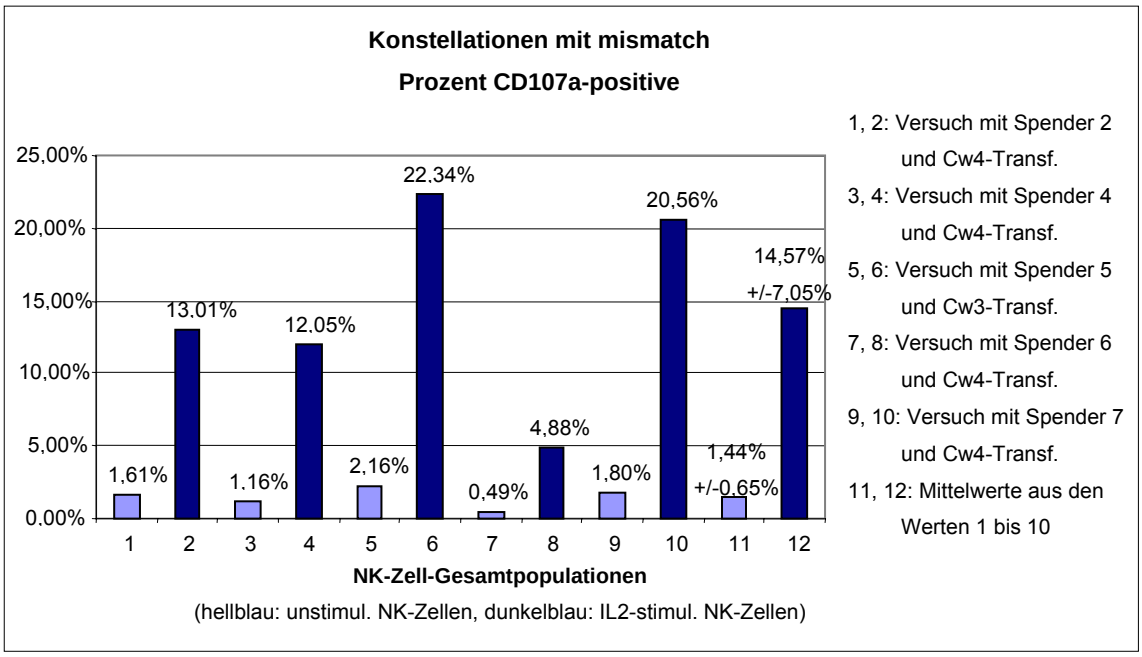
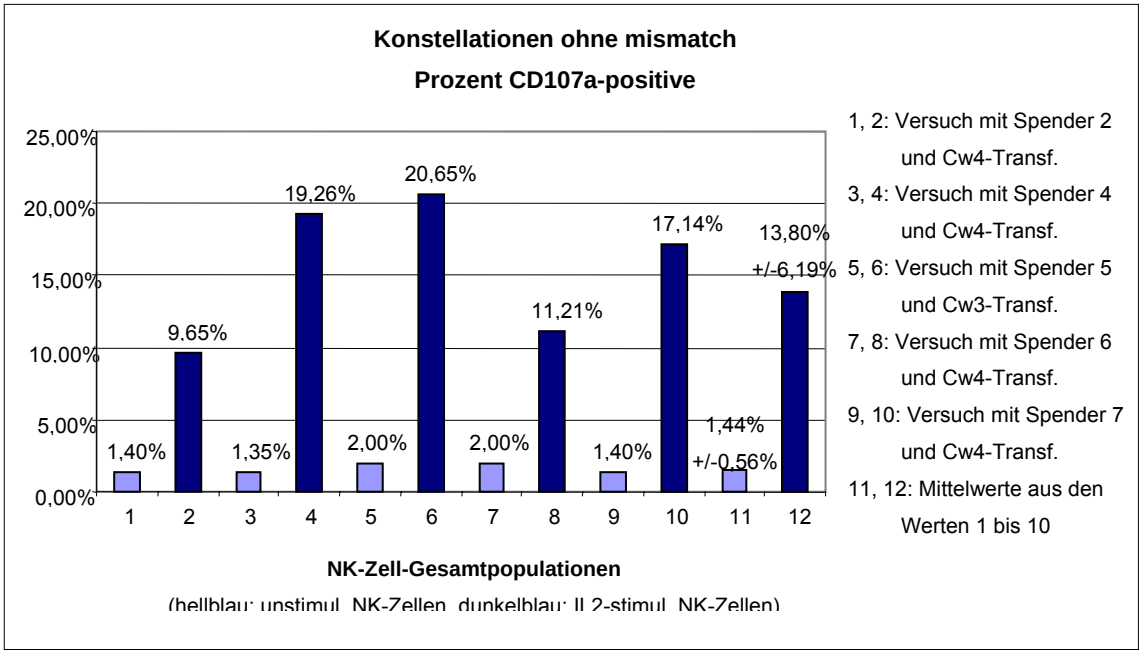


Abbildung 49



Bis auf Spender 4 und Spender 6 war die CD107a-Expression in der Gesamtpopulation bei mismatch höher als ohne mismatch, wobei bei Spender 5 nur ein geringer Unterschied bestand. Der Mittelwert für alle Werte der IL2-stimulierten NK-Zellen bei mismatch war ebenfalls höher als der Mittelwert für alle Werte ohne mismatch.

Die Werte für die unstimulierten NK-Zellen ohne und mit mismatch wurden außerdem mittels gepaartem t-Test verglichen, ebenso wurde für die IL2-stimulierten NK-Zellen verfahren. Hier konnte kein signifikanter Anstieg der CD107a-Expression gezeigt werden (p-Wert für die unstimulierten NK-Zellen: 0,6179, für die IL2-stimulierten NK-Zellen: 0,6913).

3.4.1.4 Auswertung hinsichtlich ILT2 und NKG2A

Die Populationen der NKG2A^{pos} KIR^{neg} und der ILT2^{pos} KIR^{neg} NK-Zellen wiesen in den meisten Fällen eine hohe bzw. die höchste CD107a-Expression auf. Die CD107a-Expression dieser Populationen soll nun noch einmal den Mittelwerten der CD107a-Expression der Gesamtpopulation aus allen Messungen des jeweiligen Versuchs für die NK-Zellen mit und ohne IL2-Stimulation, mit und ohne Targetzellen, gegenübergestellt werden. Hierbei zeigte sich, dass bei den

NK-Zellen nach IL-Stimulation in allen Fällen die CD107a-Expression dieser Populationen höher war als die der Gesamtpopulation, wenn auch teilweise mit geringem Unterschied. Bei den unstimulierten NK-Zellen wiesen nur die ILT2^{pos} KIR^{neg} NK-Zellen konstant dieses Verhalten auf.

Abbildung 50

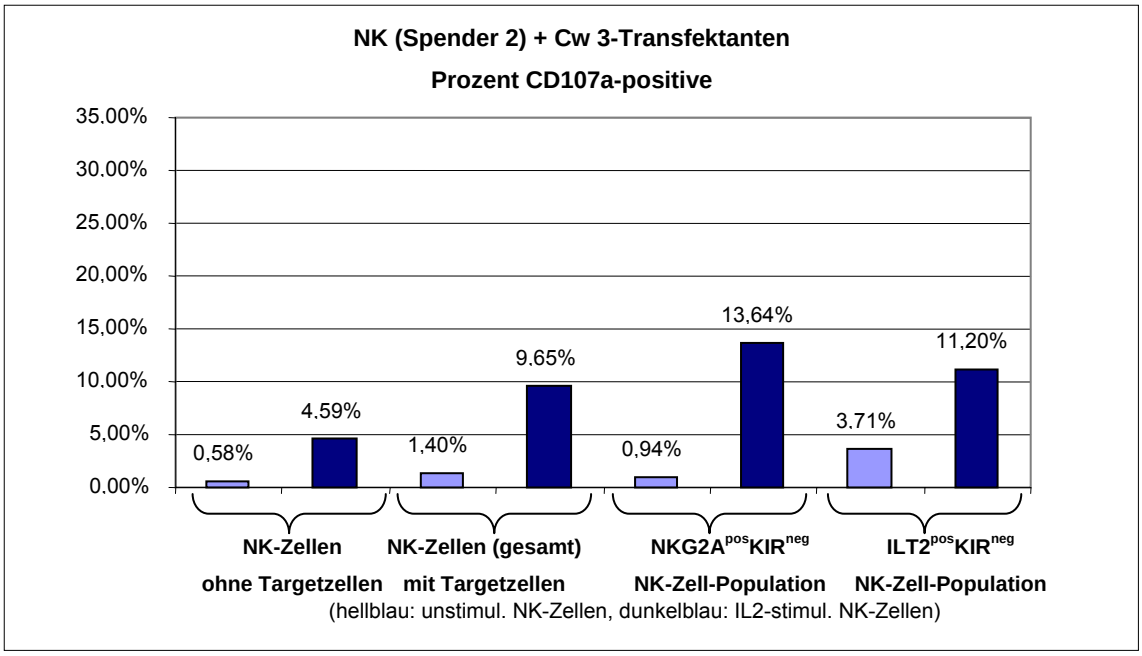


Abbildung 51

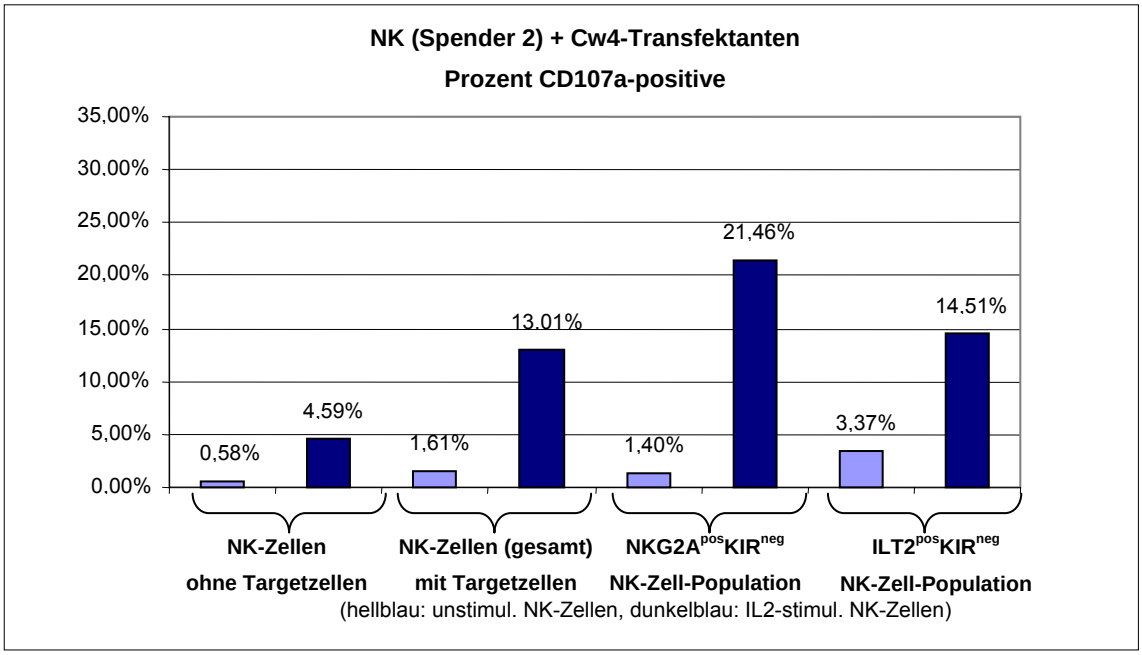


Abbildung 52

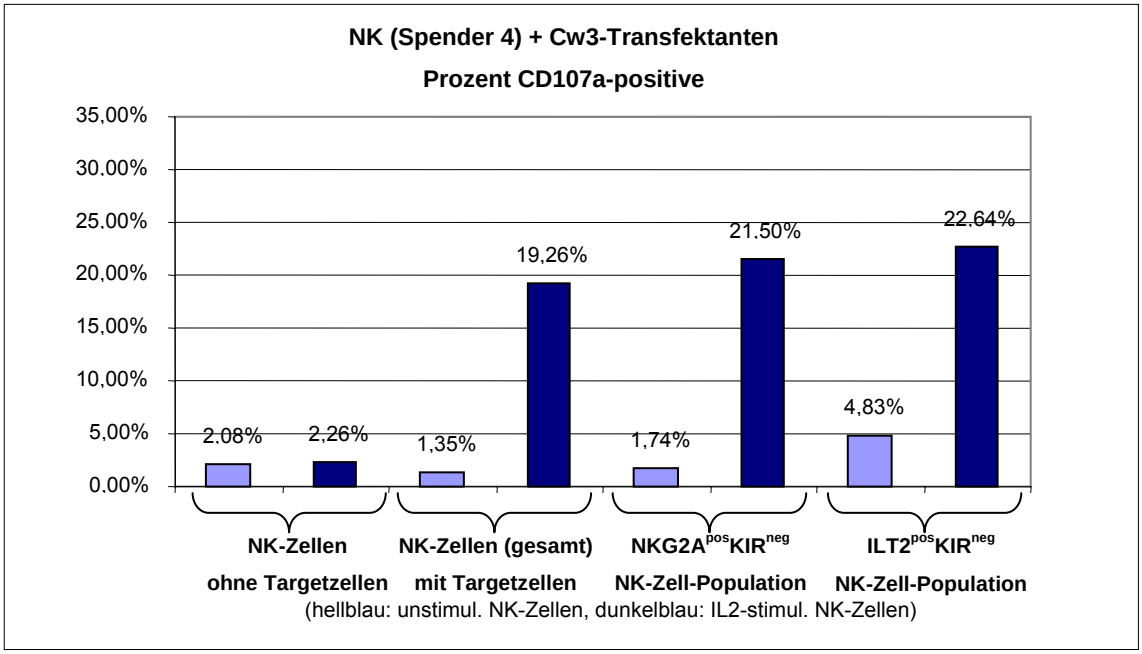


Abbildung 53

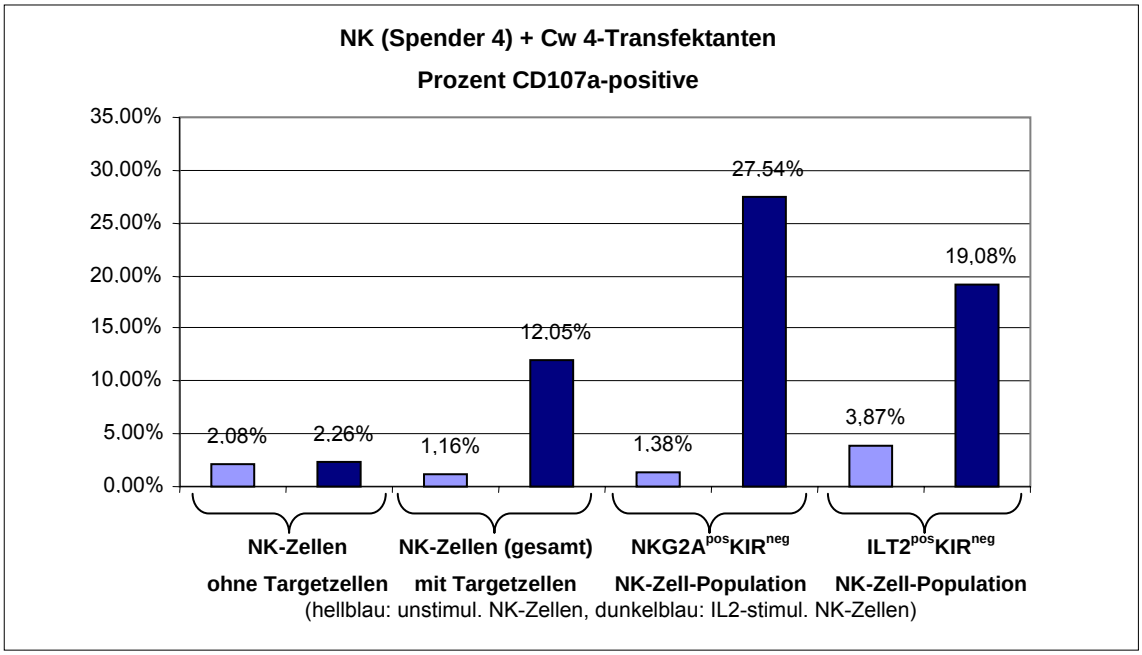


Abbildung 54

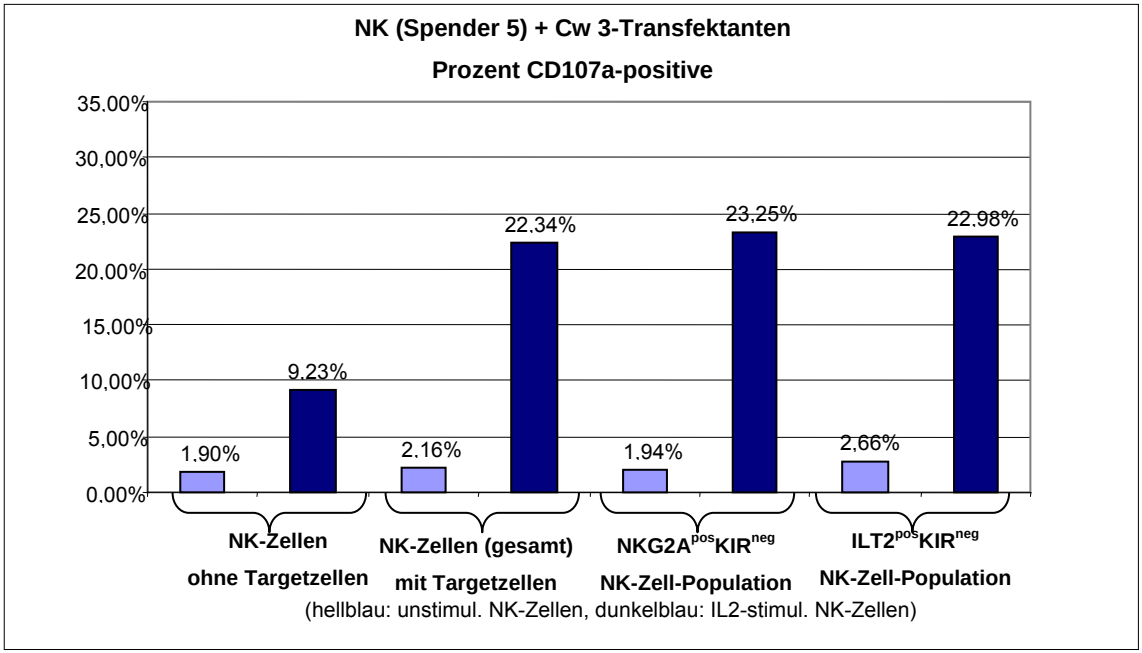


Abbildung 55

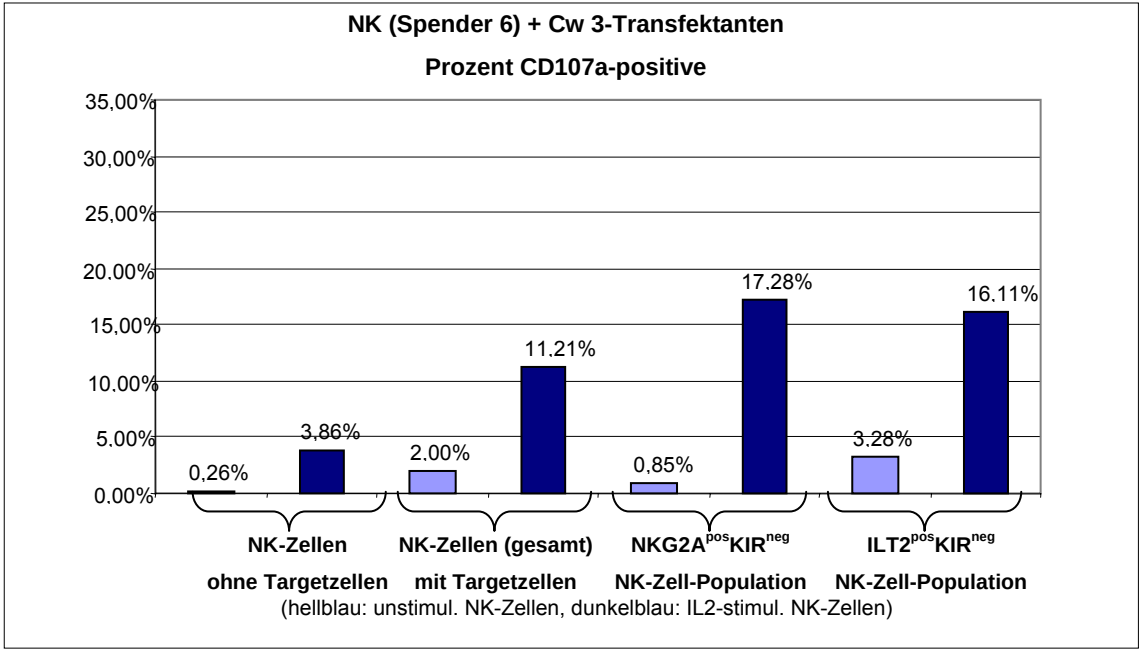


Abbildung 56

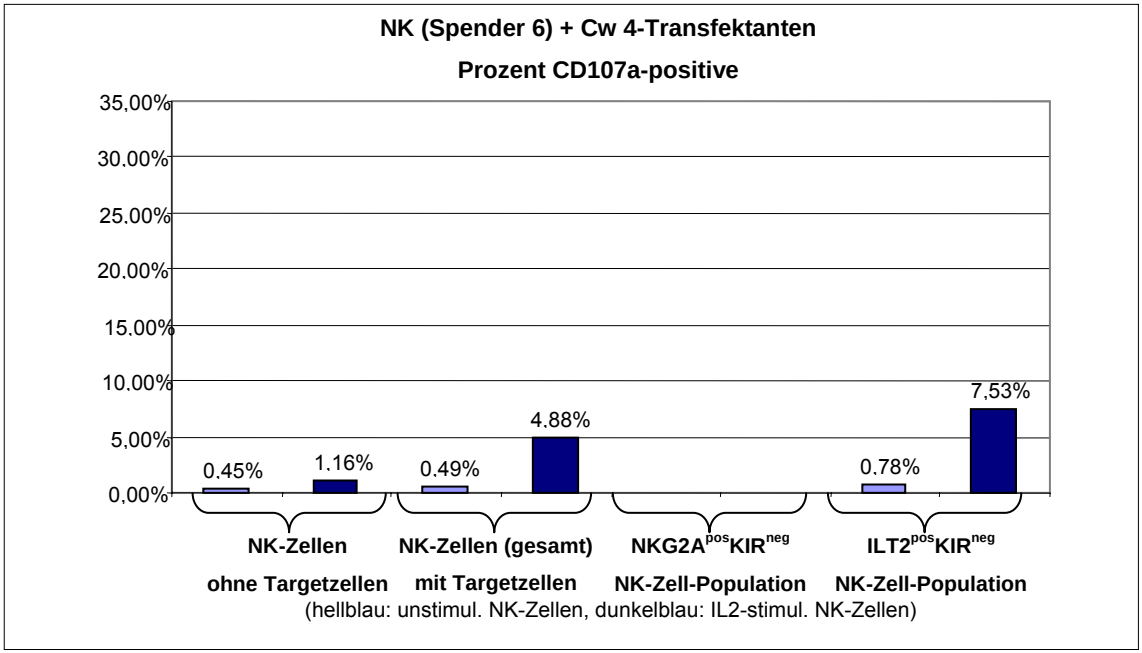


Abbildung 57

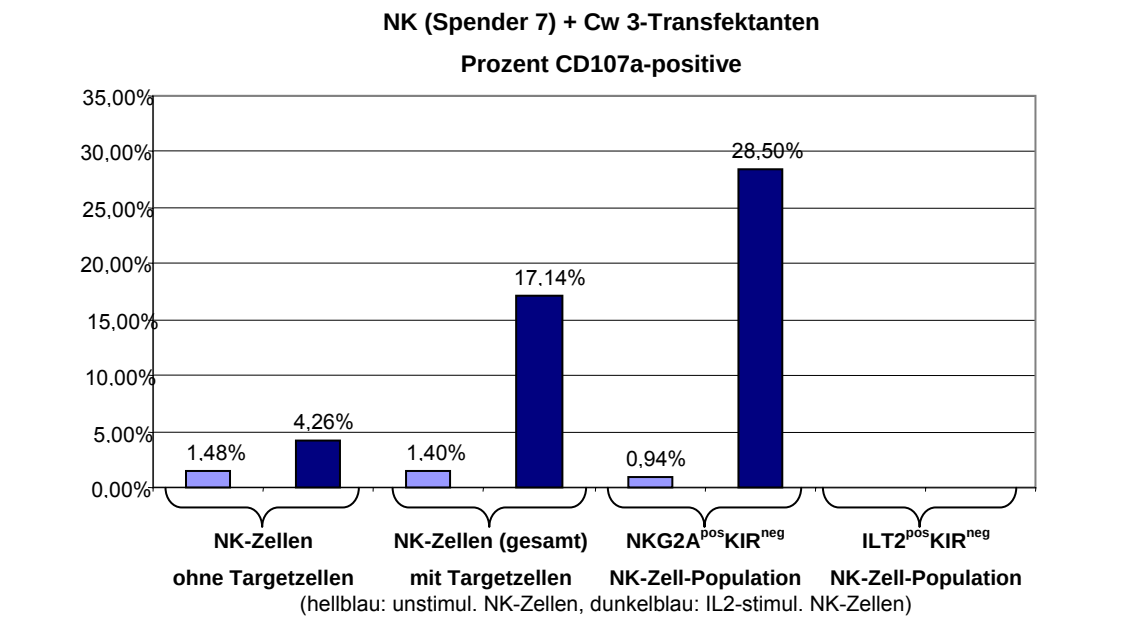
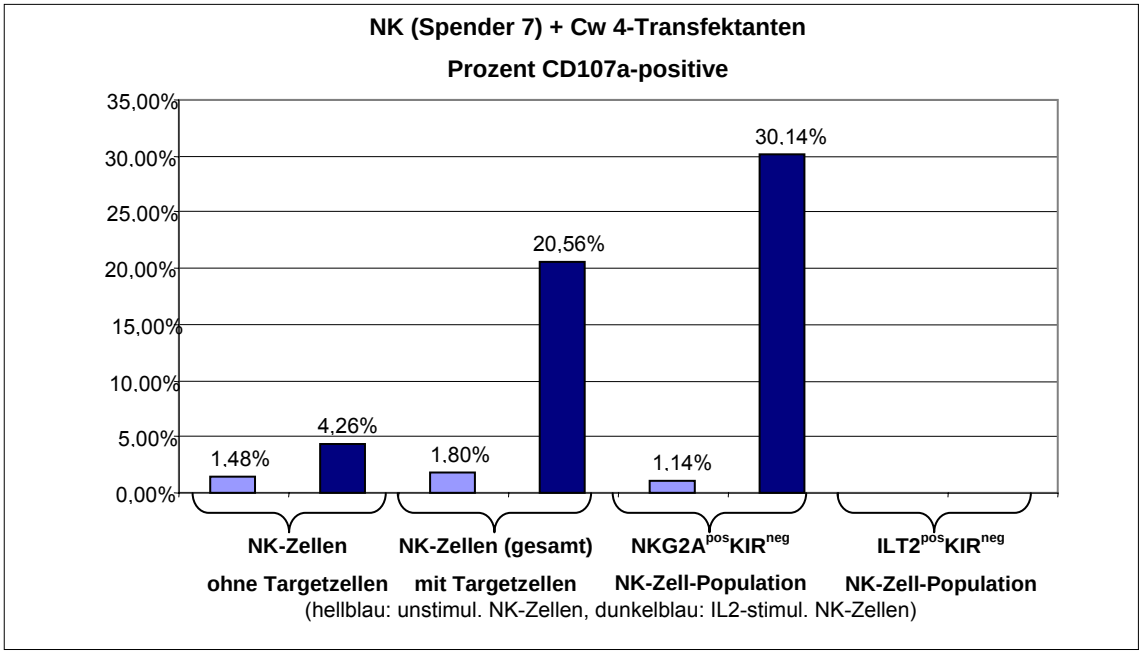


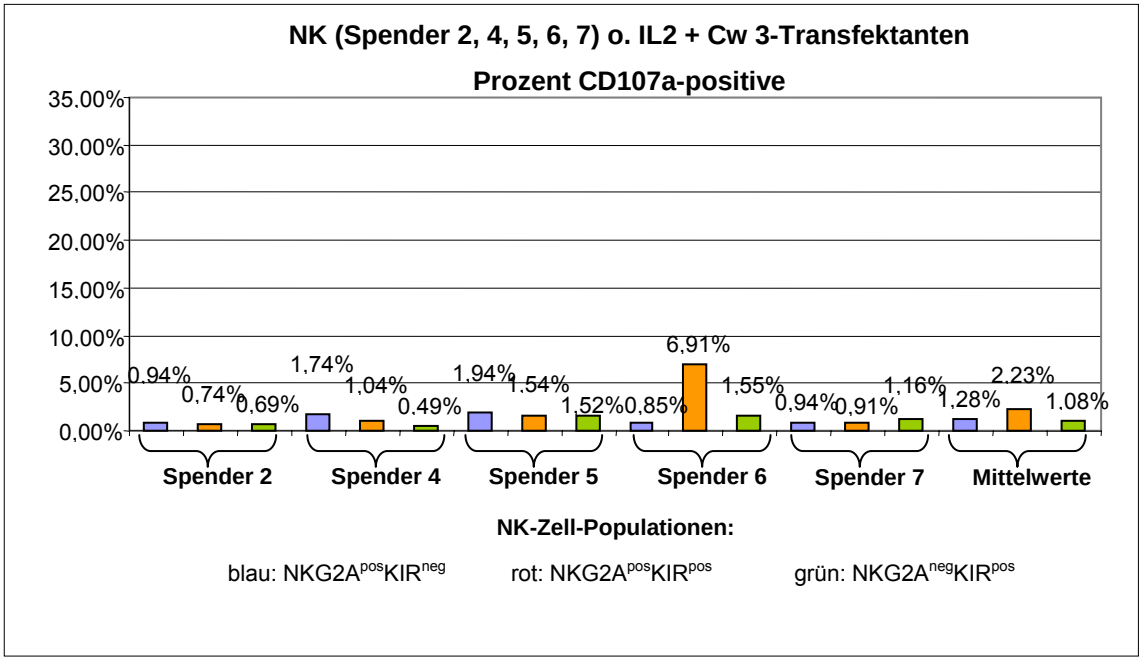
Abbildung 58



Die Werte für die CD107a-Expression der NKG2A^{pos} KIR^{neg} bzw. ILT2^{pos} KIR^{neg} Populationen wurden außerdem mittels gepaartem t-Test mit den Werten für die Gesamtpopulation verglichen (jeweils für die unstimulierten und IL2-stimulierten NK-Zellen). Für die NKG2A^{pos} KIR^{neg} Population konnte nur für die IL2-stimulierten NK-Zellen eine signifikant höhere CD107a-Expression bewiesen werden mit p=0,0026, für die unstimulierten NK-Zellen lag der p-Wert bei 0,0837. Die ILT2^{pos} KIR^{neg} Population wies in beiden Fällen eine signifikant höhere CD107a-Expression auf (unstimulierte NK-Zellen: p=0,0099, IL2-stimulierte NK-Zellen: p=0,0126).

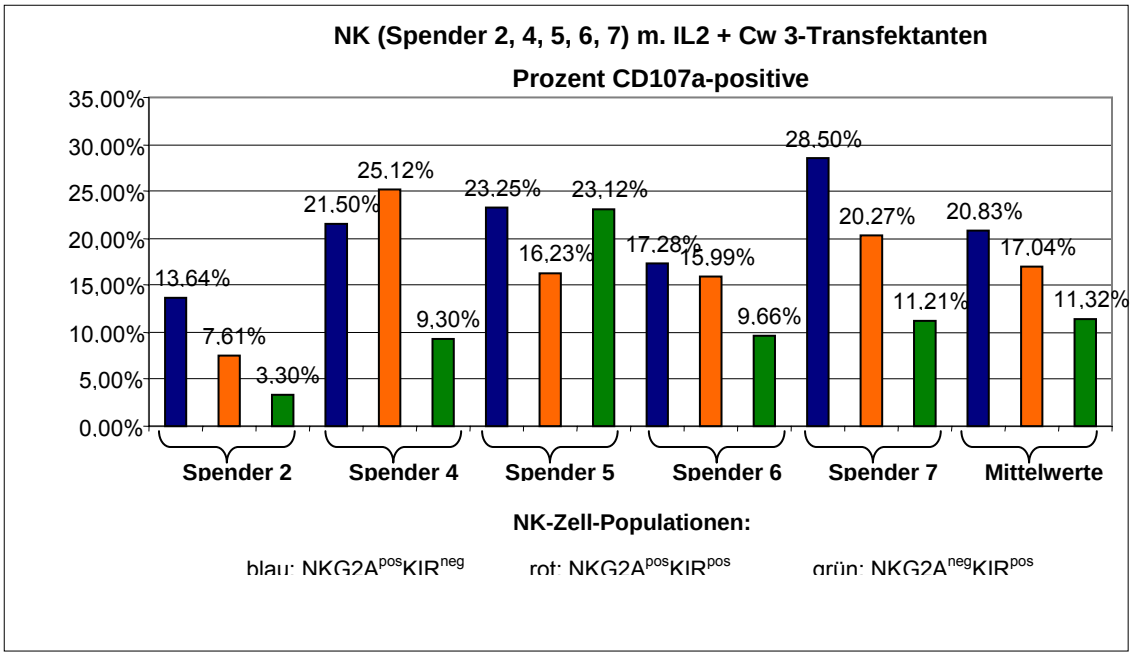
Nun sollen die Populationen der NKG2A^{pos} KIR^{neg}, NKG2A^{pos} KIR^{pos} und NKG2A^{neg} KIR^{pos} NK-Zellen hinsichtlich ihrer CD107a-Expression und ihres Anteils an den CD107a-positiven NK-Zellen verglichen werden.
Bei den unstimulierten NK-Zellen zeigten sich nur geringe Unterschiede in der CD107a-Expression. Die IL2-stimulierten NK-Zellen wiesen bis auf eine Ausnahme alle für die Population der NKG2A^{pos} KIR^{neg} die höchste CD107a-Expression auf. Bei diesen Zellen lag der Mittelwert für die CD107a-Expression der NKG2A^{pos} KIR^{pos} Population bei beiden Targets deutlich über dem der NKG2A^{neg} KIR^{pos} NK-Zellen.

Abbildung 59



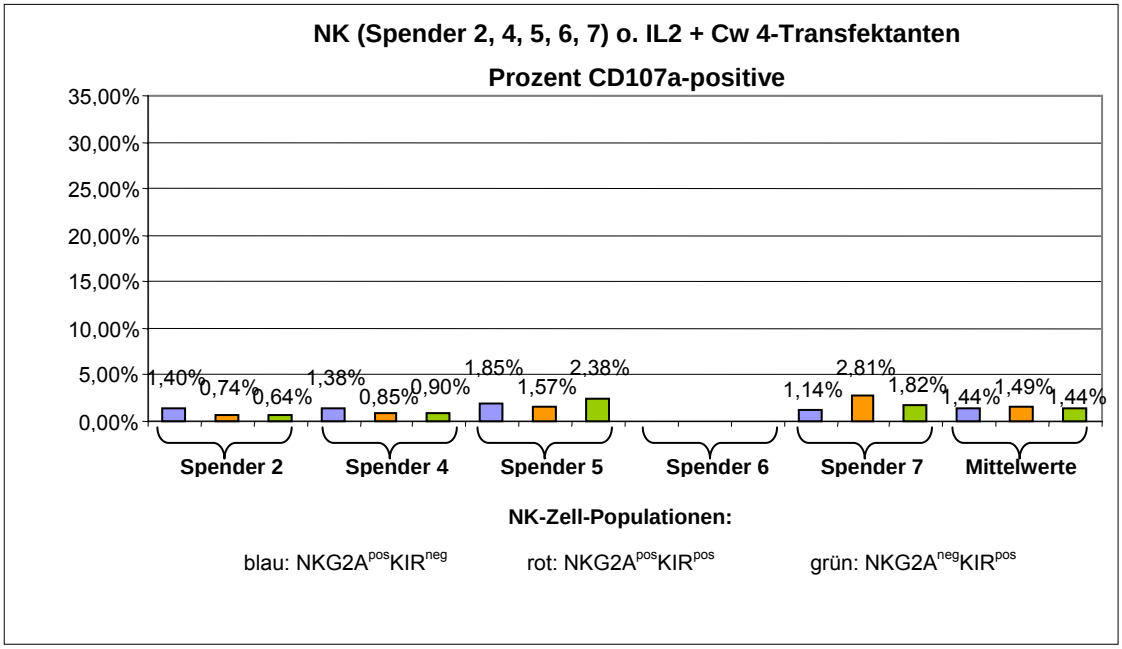
(zu Abb. 59: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 1,28+/-0,52%; 2,23+/-2,63%; 1,08+/-0,48%)

Abbildung 60



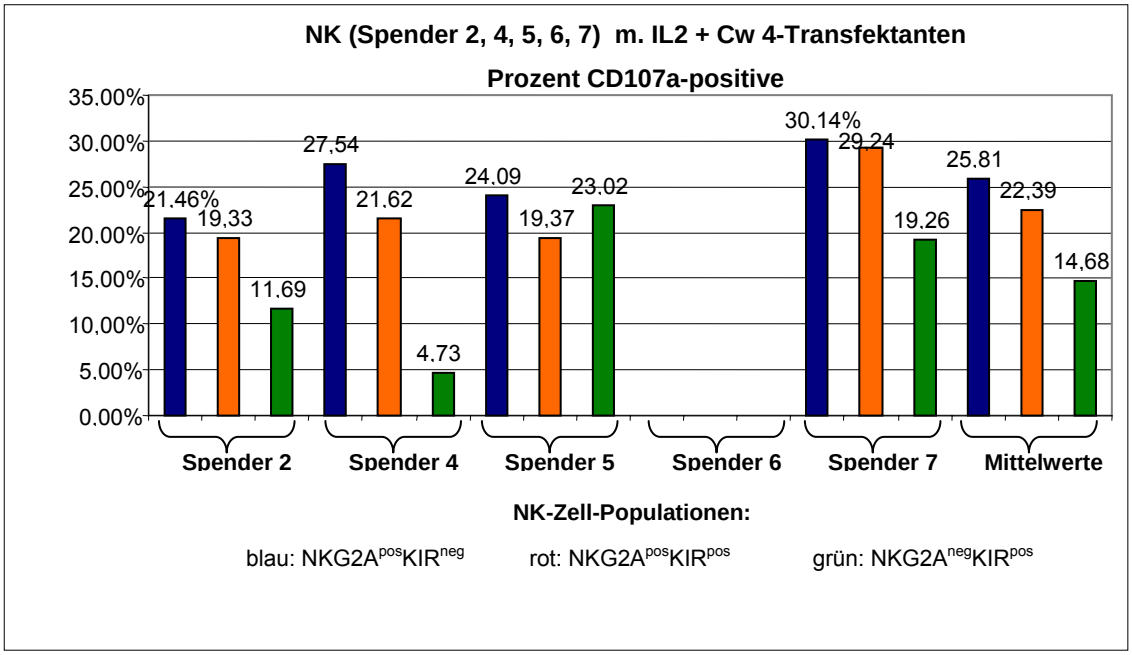
(zu Abb. 60: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 20,83+/-5,69%; 17,04+/-6,45%; 11,32+/-7,25%)

Abbildung 61



(zu Abb. 61: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 1,44+/-0,30%; 1,49+/-0,95%; 1,44+/-0,81%)

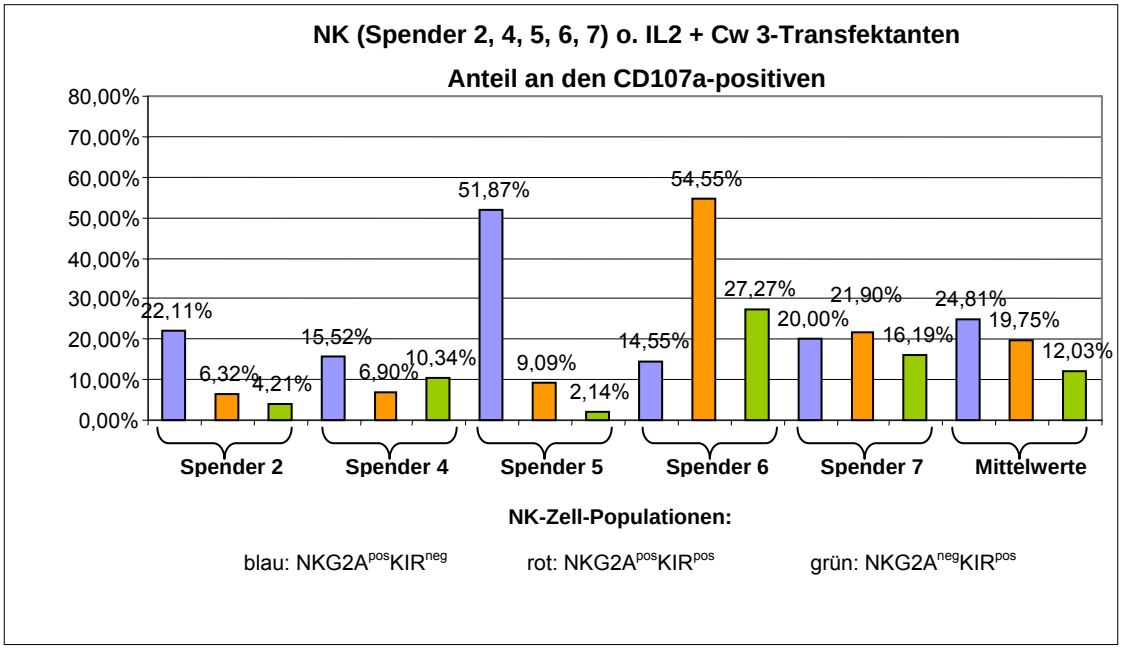
Abbildung 62



(zu Abb. 62: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 25,81+/-3,81%; 22,39+/-4,69%; 14,68+/-8,13%)

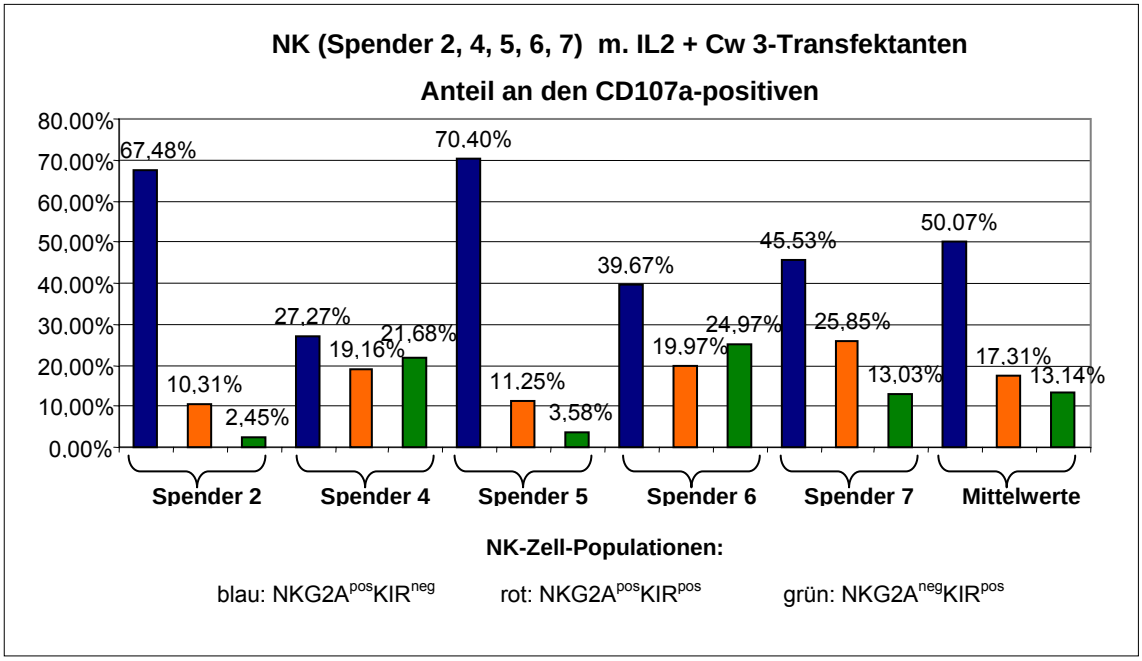
Was die Anteile der Populationen an den CD107a-positiven NK-Zellen betrifft, wiesen die unstimulierten NK-Zellen ein sehr uneinheitliches Verhalten auf. Die Mittelwerte der Anteile der Population der NKG2A^{pos} KIR^{neg} liegen aber bei beiden Targets über denen der NKG2A^{pos} KIR^{pos} NK-Zellen, die wiederum im Mittel einen höheren Anteil ausmachten als die NKG2A^{neg} KIR^{pos} NK-Zellen.
Für die IL2-stimulierten NK-Zellen zeigte sich bis auf einen Fall der deutlich größte Anteil an den CD107a-positiven NK-Zellen bei der Population der NKG2A^{pos} KIR^{neg} NK-Zellen. Bei den Versuchen mit den Cw4-Targets bildete die NKG2A^{pos} KIR^{pos} Population außerdem einen deutlich höheren Anteil als die NKG2A^{neg} KIR^{pos} NK-Zellen. Dies ließ sich bei den Versuchen mit den Cw3-Targets nicht beobachten.

Abbildung 63



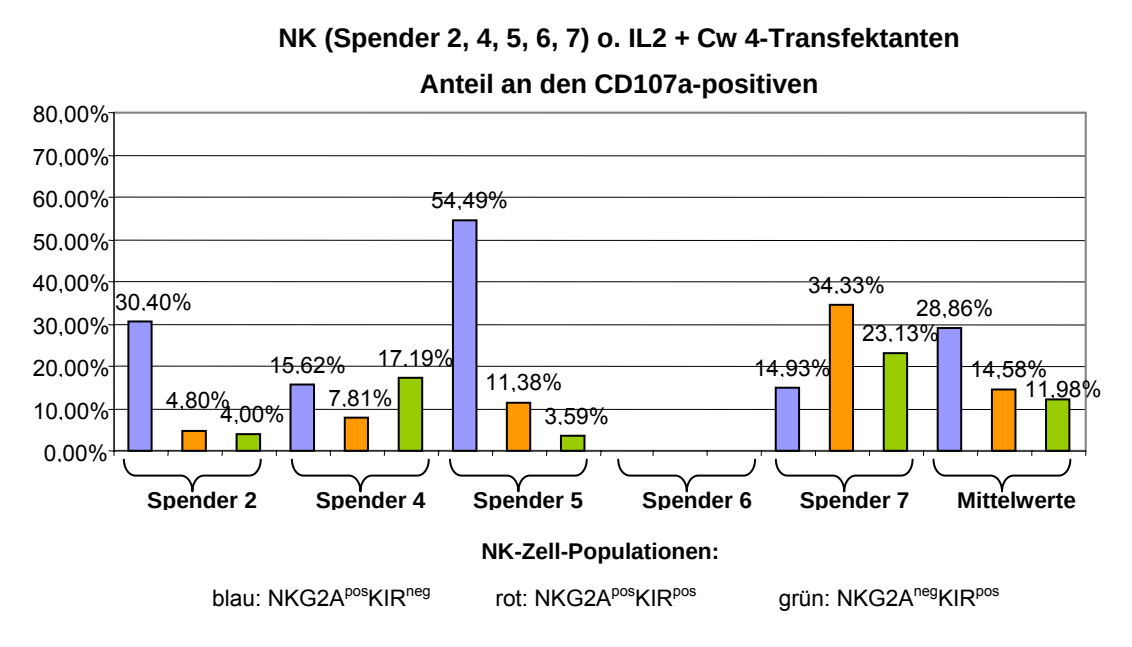
(zu Abb. 63: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 24,81+/-15,45%; 19,75+/-20,46%; 12,03+/-10,14%)

Abbildung 64



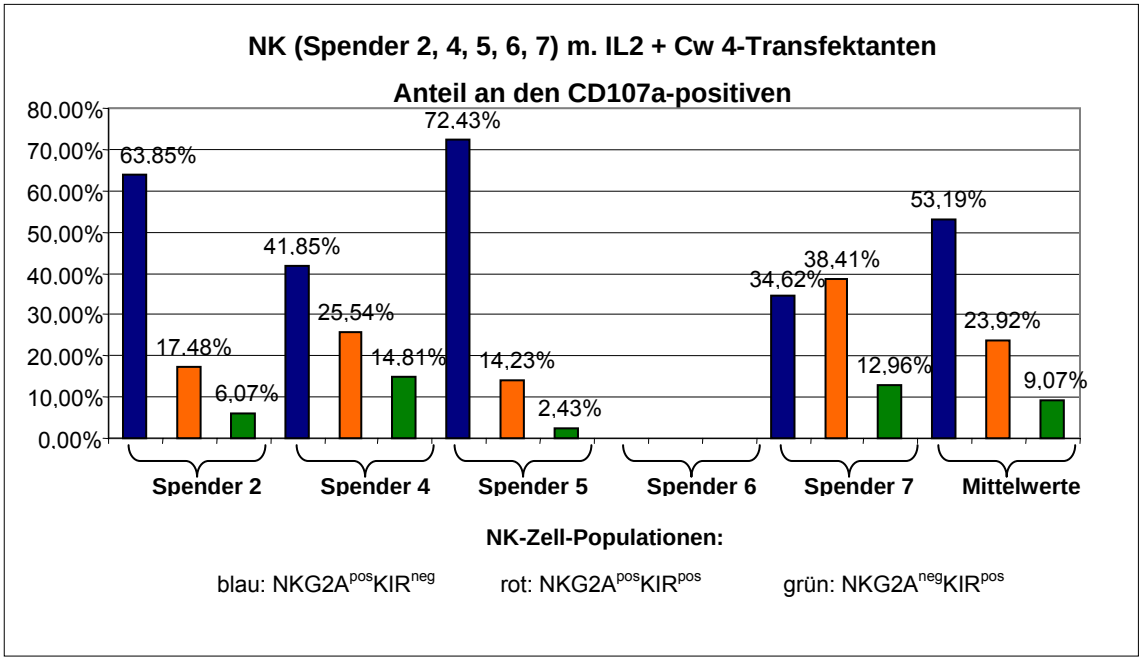
(zu Abb. 64: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 50,07+/-18,47%; 17,31+/-6,50%; 13,14+/-10,23%)

Abbildung 65



(zu Abb. 65: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 28,86+/-18,52%; 14,58+/-13,44%; 11,98+/-9,76%)

Abbildung 66

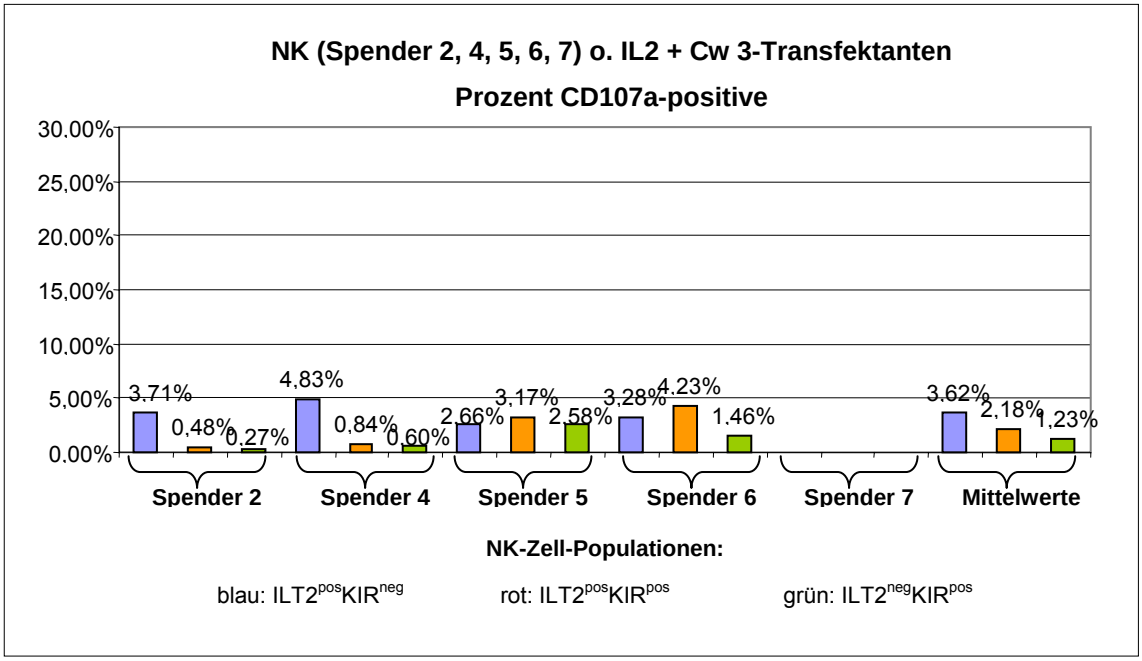


(zu Abb. 66: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 53,19+/-17,86%; 23,92+/-10,77%; 9,07+/-5,81%)

Wie oben wurde nun auch mit den Populationen der ILT2^{pos} KIR^{neg}, ILT2^{pos} KIR^{pos} und ILT2^{neg} KIR^{pos} NK-Zellen verfahren.

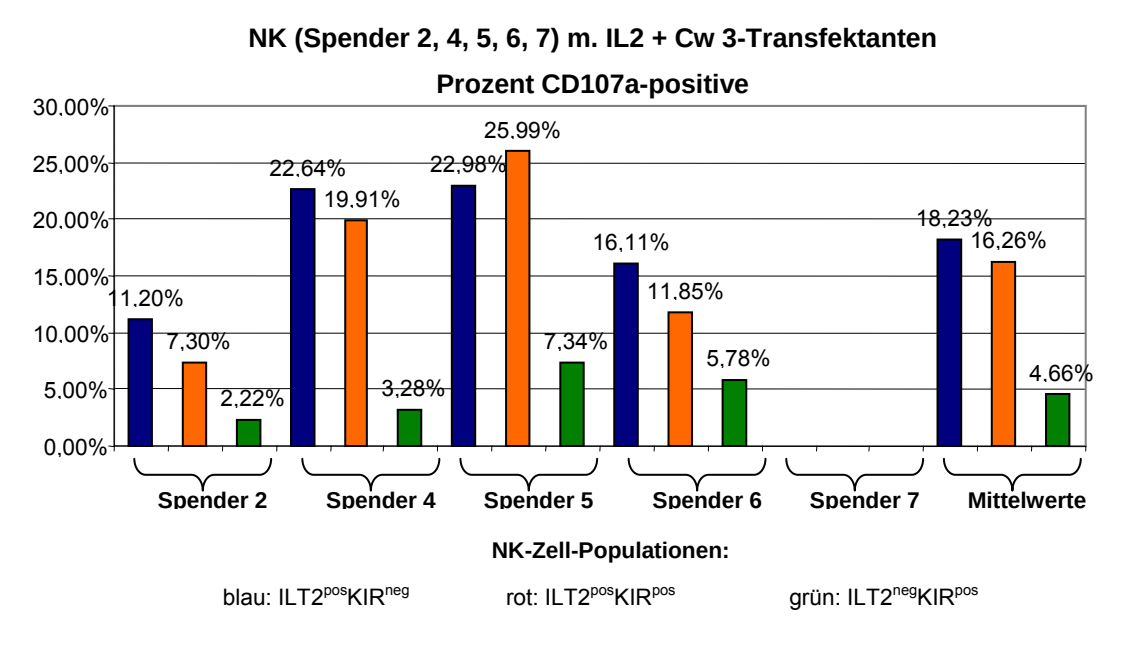
Sowohl bei den NK-Zellen ohne als auch mit IL2-Stimulation war die CD107a-Expression der ILT2^{pos} KIR^{pos} NK-Zellen höher als die der ILT2^{neg} KIR^{pos} NK-Zellen. Der Unterschied zwischen den ILT2^{pos} KIR^{neg} und den ILT2^{pos} KIR^{pos} NK-Zellen war uneinheitlich, bei den Mittelwerten lagen die ILT2^{pos} KIR^{neg} NK-Zellen etwas über den ILT2^{pos} KIR^{pos} NK-Zellen, wobei dies bei den unstimulierten NK-Zellen deutlicher war.

Abbildung 67



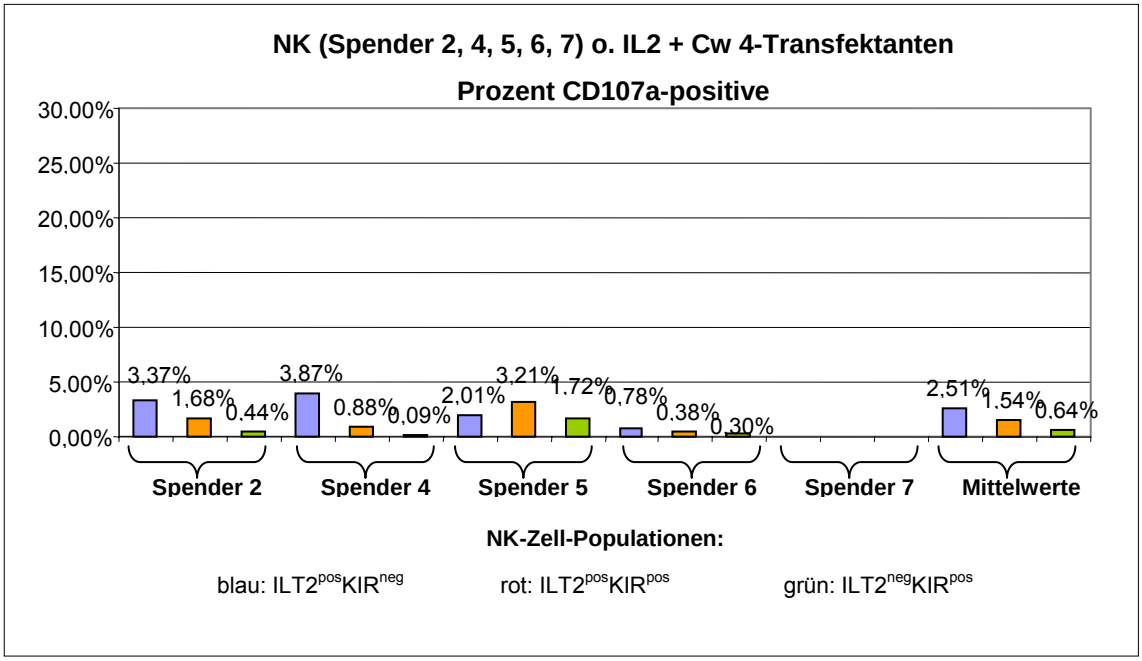
(zu Abb. 67: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 3,62+/-0,91%; 2,18+/-1,81%; 1,23+/-1,03%)

Abbildung 68



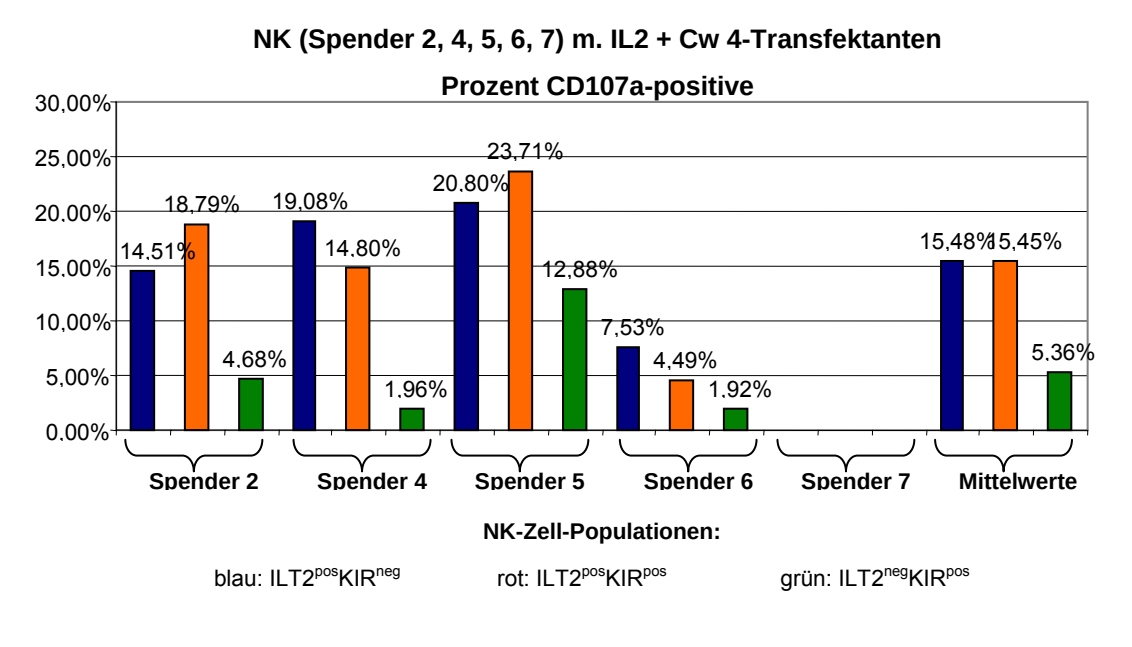
(zu Abb. 68: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 18,23+/-5,65%; 16,26+/-8,32%; 4,66+/-2,33%)

Abbildung 69



(zu Abb. 69: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 2,51+/-1,39%; 1,54+/-1,24%; 0,64+/-0,74%)

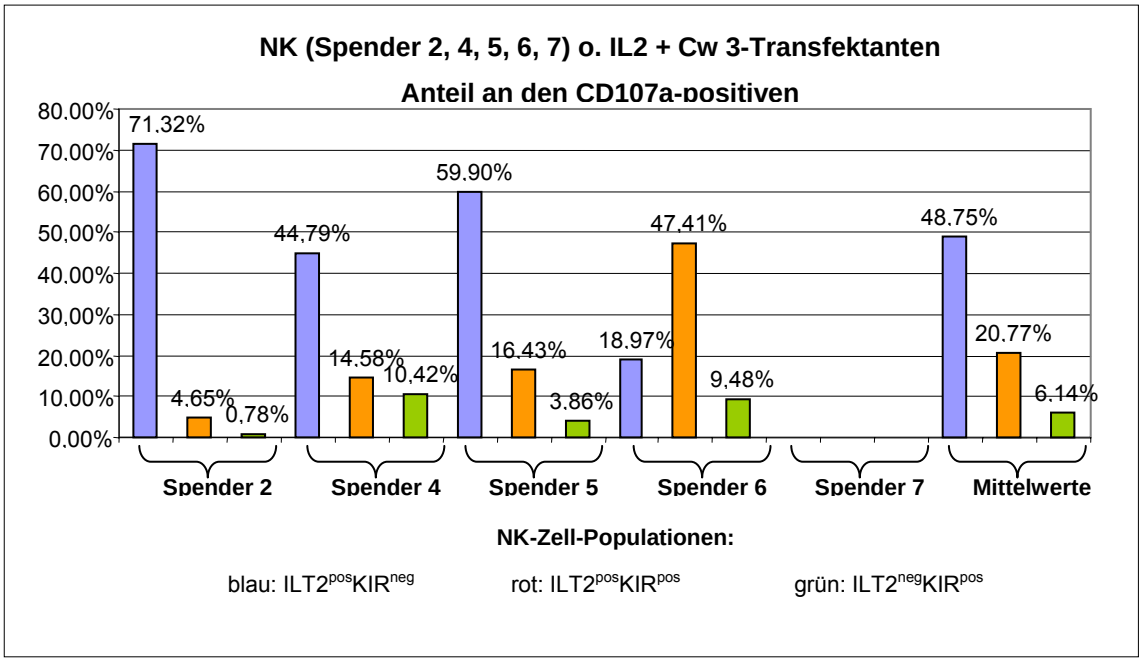
Abbildung 70



(zu Abb. 70: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 15,48+/-5,93%; 15,45+/-8,16%; 5,36+/-5,18%)

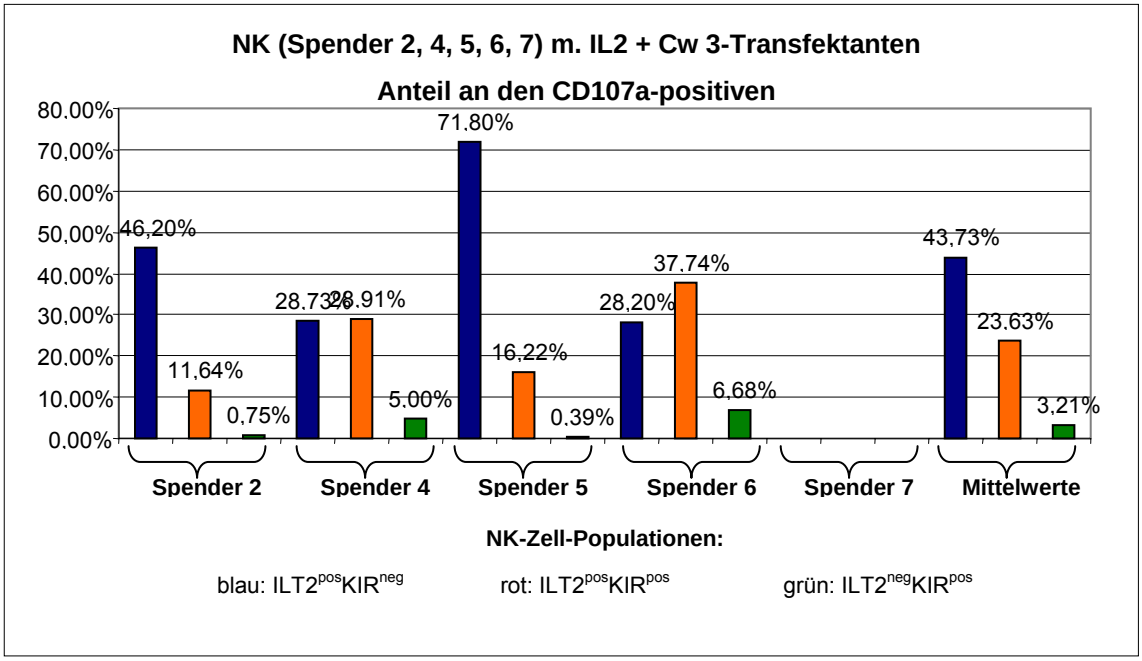
Den größten Anteil an den CD107a-positiven bildeten bei den unstimulierten NK-Zellen bis auf Spender 6 einheitlich die ILT2^{pos} KIR^{neg} Population vor der ILT2^{pos} KIR^{pos} Population, deren Anteil wiederum höher war als der der ILT2^{neg} KIR^{pos} Population. Bei den NK-Zellen nach IL-Stimulation wich auch Spender 4 von diesem Verhalten ab, die Mittelwerte zeigten aber immer noch die eben beschriebene Reihenfolge. Bei Spender 6 und Spender 4 war bei den IL2-stimulierten NK-Zellen der Anteil der ILT2^{pos} KIR^{pos} Population höher als der Anteil der ILT2^{pos} KIR^{neg} NK-Zellen.

Abbildung 71



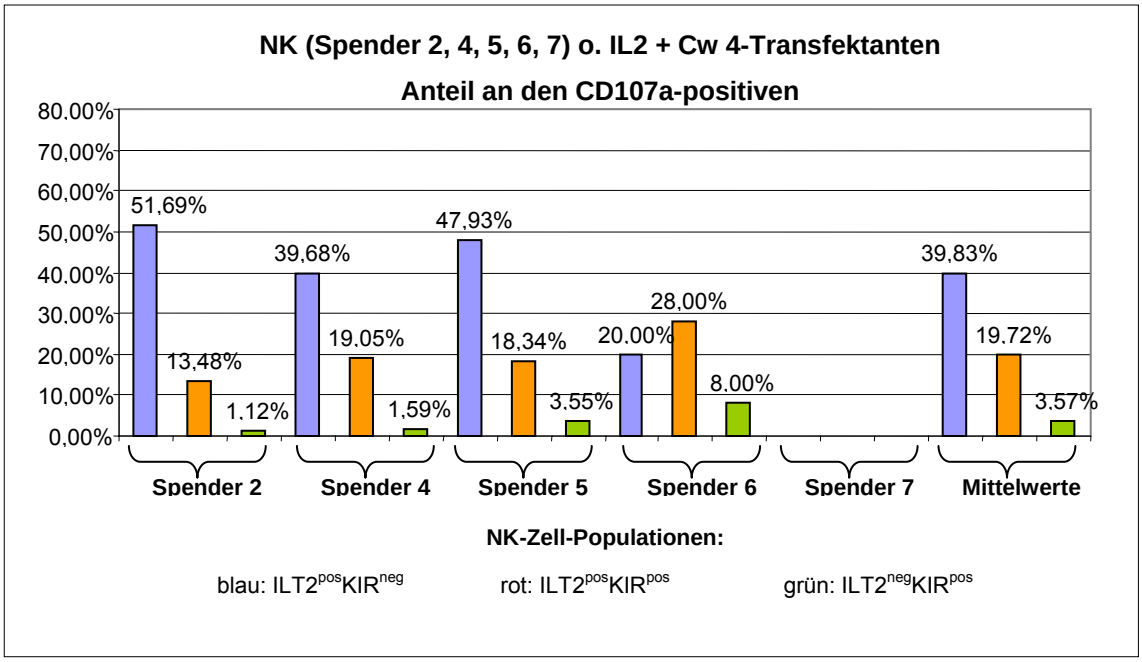
(zu Abb. 71: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 48,75+/-22,63%; 20,77+/-18,50%; 6,14+/-4,60%)

Abbildung 72



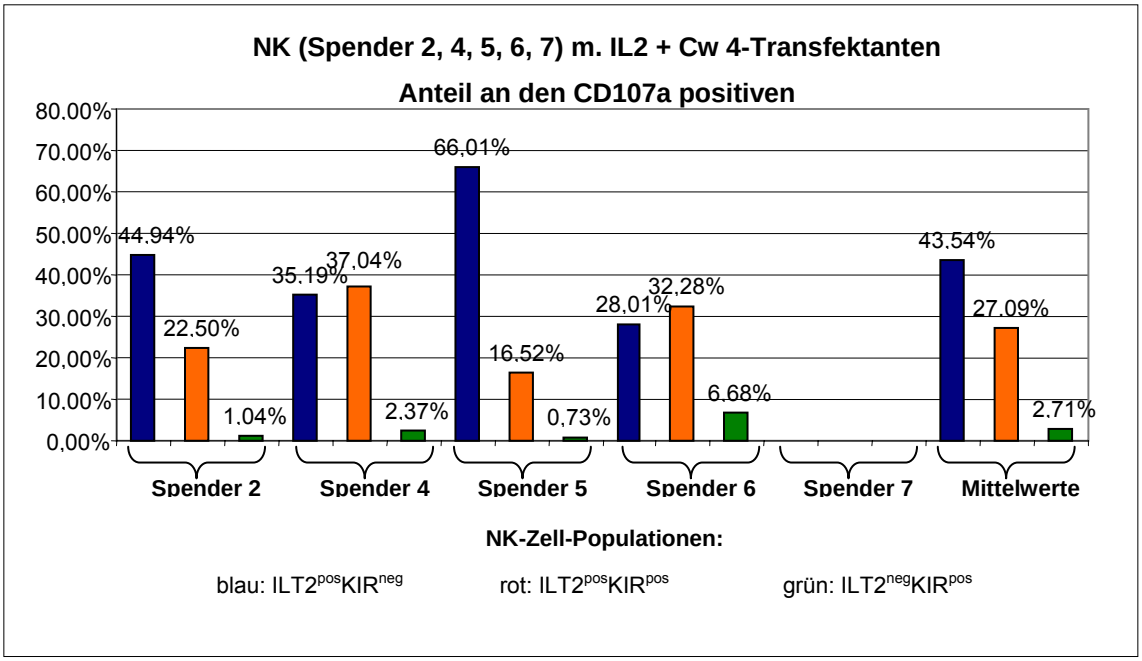
(zu Abb. 72: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 43,73+/-20,50%; 23,63+/-11,91%; 3,21+/-3,12%)

Abbildung 73



(zu Abb. 73: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 39,83+/-14,14%; 19,72+/-6,05%; 3,57+/-3,14%)

Abbildung 74



(zu Abb. 74: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 43,54+/-16,51%; 27,09+/-9,29%; 2,71+/-2,74%)

3.4.2 Versuche mit Blasten

Es wurden Versuch mit den ALL-Blasten 1 bis 4 durchgeführt, und zwar jeweils mit den NK-Zellen von Spender 6 und Spender 8.

Die HLA-Konstellation war folgende:

Tabelle 5

	Merkmal der Cw3-Gruppe	Merkmal der Cw4-Gruppe	Merkmal der Bw4-Gruppe
Spender 6	positiv	positiv	positiv
Spender 8	positiv	positiv	negativ
Blasten 1	positiv	positiv	negativ
Blasten 2	positiv	positiv	positiv
Blasten 3	positiv	negativ	negativ
Blasten 4	positiv	positiv	negativ

Somit war eine mismatch-Konstellation nach dem Ligand-Ligand-Modell gegeben für folgende Paarungen: Spender 6/ Blasten 1 (Bw4), Spender 6/ Blasten 3 (Cw4,Bw4), Spender 6/ Blasten 4 (Bw4), Spender 8/ Blasten 3 (Cw4).

3.4.2.1 Einzelbetrachtung der Versuche

Zur Veranschaulichung siehe Abbildung 156 bis 187 im Anhang.

Spender 6 – Blasten 1:

Sowohl bei den unstimulierten als auch bei den IL2-stimulierten NK-Zellen fand sich hier die höchste CD107a-Expression bei der Population der $ILT2^{pos}$ KIR^{neg}. Die single-KIR-positiven NK-Zellen wiesen durchgehend eine niedrigere CD107a-Expression auf als die für (mindestens) den entsprechenden KIR negativen NK-Zellen. Dies galt auch für CD158e, obwohl die Blasten für das HLA-Merkmal Bw4 negativ sind und so keine Inhibition über den CD158e-Rezeptor stattfinden kann.

Bei der Betrachtung der Verteilung der Populationen in den CD107a-positiven NK-Zellen wurden vorige Beobachtungen noch deutlicher: Die single-KIR-positiven Zellen machten einen sehr geringen Teil aus, während die $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} Population den größten Teil bei den unstimulierten NK-Zellen ausmachte. Bei den IL2-stimulierten NK-Zellen waren die für mindestens einen KIR negativen NK-Zellen am stärksten vertreten, dann folgten die $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} und die $NKG2A^{pos}$ KIR^{neg} NK-Zellen.

Spender 8 – Blasten 1:

Auch hier wies die $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} Population die höchste CD107a-Expression auf und bis auf CD158b bei den IL2-stimulierten NK-Zellen war das Verhalten, was die KIR-Populationen betrifft, ebenfalls wie bei Spender 6.

Auch die Verteilung der Populationen in den CD107a-positiven NK-Zellen entsprach der bei Spender 6 mit der Ausnahme, dass bei den IL2-stimulierten NK-Zellen der Anteil der $NKG2A^{pos}$ KIR^{neg} über dem der $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} NK-Zellen lag.

Spender 6 – Blasten 2:

Hier ließen sich die gleichen Feststellungen treffen wie bei Spender 6 – Blasten 1, nur dass die Werte der Spitzenreiter in der CD107a-Expression beim Versuch mit den Blasten 2 deutlich höher waren.

Die Verteilung der Populationen in den CD107a-positiven NK-Zellen entsprach ebenfalls den Verhältnissen im Versuch Spender 6 – Blasten 1.

Spender 8 – Blasten 2:

Spitzenreiter der CD107a-Expression bei den unstimulierten NK-Zellen war auch hier die Population der $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} NK-Zellen, gefolgt von den $NKG2A^{neg}$ KIR^{pos} und den NK-Zellen, die für mindestens einen KIR negativ waren. Die Werte der IL2-stimulierten NK-Zellen waren zwar insgesamt höher, aber die Unterschiede zwischen den einzelnen Populationen waren klein. Die niedrigste CD107a-Expression wiesen die $NKG2a^{pos}$ KIR^{neg} NK-Zellen auf, die höchste die $NKG2A^{neg}$ KIR^{pos} und die $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} NK-Zellen.

Auch hier war die gleiche Verteilung der Populationen in den CD107a-positiven NK-Zellen zu finden wie bei den Versuchen mit Spender 6 und Blasten 1 und 2, jedoch mit etwas niedrigeren Werten bei den IL2-stimulierten NK-Zellen.

Spender 6 – Blasten 3:

Wie in den meisten Fällen lag auch hier die höchste CD107a-Expression bei der Population der $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} NK-Zellen vor. Auch die single-KIR-positiven NK-Zellen zeigten wie sonst auch eine niedrigere CD107a-Expression als die für mindestens den entsprechenden KIR negativen NK-Zellen, eingeschlossen der KIR-Rezeptor CD158e, für den ein mismatch vorlag.

Die Verteilung der Populationen in den CD107a-positiven entsprach ebenfalls den bisher beschriebenen Versuchen bis auf Spender 8 – Blasten 1.

Spender 8 – Blasten 3:

Die höchsten Werte für die CD107a-Expression wiesen in diesem Versuch die Population der $NKG2A^{neg}$ KIR^{pos} auf, gefolgt von den $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} NK-Zellen. Die single-KIR-positiven, unstimulierten NK-Zellen zeigten keinerlei CD107a-

Expression, bei den NK-Zellen nach IL2-Stimulation waren die Werte der CD107a-Expression dieser Populationen bis auf CD158a niedriger als die der für mindestens den entsprechenden KIR negativen Populationen. Für CD158a lag ein mismatch vor.
Bei der Verteilung der Populationen in den CD107a-Expression war keine Abweichung gegenüber den anderen Versuchen zu beobachten.

Spender 6 – Blasten 4:

Bei den NK-Zellen, die nicht mit IL2 stimuliert worden waren, wies auch hier die Population der $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} den höchsten Wert der CD107a-Expression auf. Auffallend war, dass der Wert der $NKG2A^{neg}$ KIR^{pos} NK-Zellen höher war als der Wert der $NKG2A^{pos}$ KIR^{neg} Zellen. Dies kehrte sich bei den zuvor IL2-stimulierten NK-Zellen um. Hier war außerdem die CD107a-Expression der $NKG2A^{pos}$ KIR^{neg} NK-Zellen höher als die der $ILT2^{pos}$ KIR^{neg}. Teils sogar noch höhere Werte wiesen bei den stimulierten NK-Zellen die NK-Zell-Populationen auf, die für mindestens einen KIR negativ waren; bei den unstimulierten NK-Zellen waren die Werte dieser Populationen zumindest höher als bei den $NKG2A^{pos}$ KIR^{neg} NK-Zellen. Die single-KIR-positiven NK-Zellen zeigten bei den unstimulierten NK-Zellen keine CD107a-Expression, ebenso die CD158b-positiven NK-Zellen nach IL2-Stimulation. Der Wert der CD107a-Expression bei den IL2-stimulierten, CD158e-positiven NK-Zellen lag über dem der CD158a-positiven Nk-Zellen. Für CD158e lag ein mismatch vor.
Die Verteilung der Populationen in den CD107a-positiven NK-Zellen entsprach der vorher beschriebenen.

Spender 8 – Blasten 4:

Bei den unstimulierten NK-Zellen traten die $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} NK-Zellen hinsichtlich ihrer CD107a-Expression deutlich als Spitzenreiter hervor. Außerdem konnte wie meistens beobachtet werden, dass der Wert der für mindestens einen KIR negativen NK-Zellen deutlich höher war als derjenige der single-KIR-positiven NK-Zellen. Sowohl die $NKG2A^{neg}$ KIR^{pos} als auch die $NKG2A^{pos}$ KIR^{neg} NK-Zellen wiesen relativ niedrige Werte auf mit einem etwas höheren für erstere

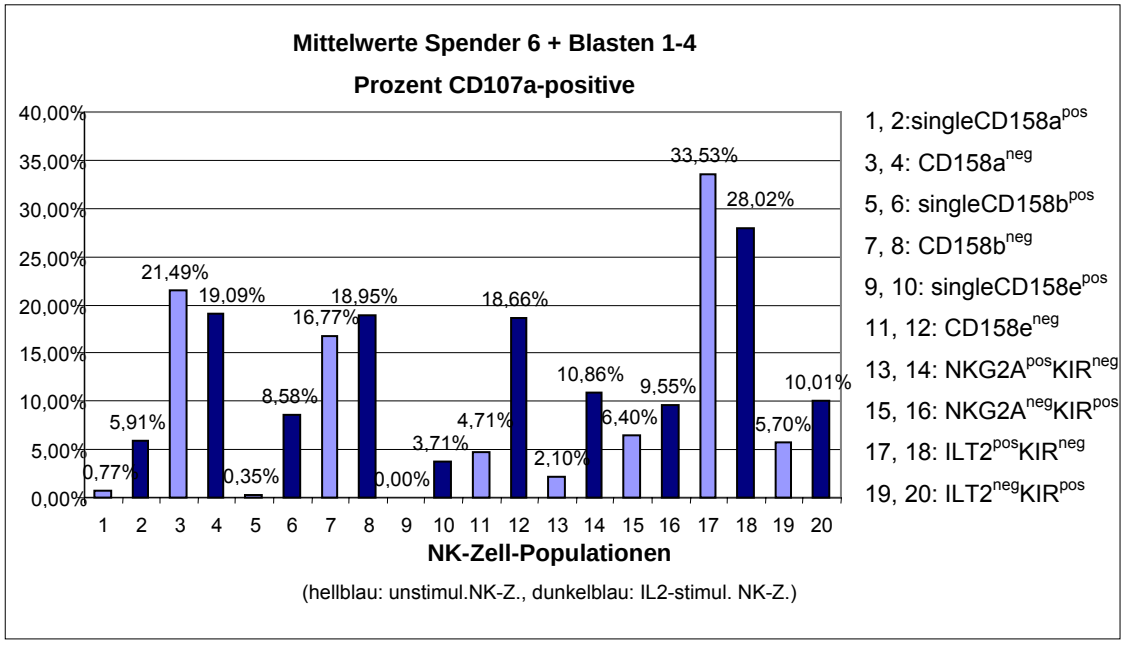
Population. Bei den zuvor IL2-stimulierten NK-Zellen waren die Werte insgesamt höher, die Unterschiede jedoch gering. Spitzenreiter waren hier die $NKG2A^{neg}$ KIR^{pos}, die $NKG2A^{pos}$ KIR^{neg} und die $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} Populationen. Die single-KIR-positiven, vor allem für CD158b, wiesen deutlich höhere Werte bei der CD107a-Expression auf als bei den unstimulierten NK-Zellen. Im Gegensatz zu Spender 6 wies hier die für CD158e single-positive Population den geringsten Wert auf; hier lag kein mismatch vor.
Auch bei diesem Versuch ergab sich keine Veränderung hinsichtlich der Verteilung der Populationen in den CD107a-positiven NK-Zellen.

3.4.2.2 Zusammenschau der Versuche

Nun sollen die Mittelwerte aller Versuche bei beiden Spendern betrachtet werden.
Spitzenreiter der CD107a-Expression waren in beiden Fällen, sowohl für die IL2-stimulierten als auch für die unstimulierten NK-Zellen, die $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} NK-Zellen. Auffällig war, dass die CD107a-Expression der $NKG2A^{pos}$ KIR^{neg} Population durch die IL2-Stimulation deutlich erhöht werden konnte. Es zeigte sich außerdem, dass die CD107a-Expression der single-KIR-positiven meist niedriger war die der für mindestens den entsprechenden KIR negativen NK-Zellen. Bei Spender 8 galt dies jedoch nur für die unstimulierten NK-Zellen, während die Unterschiede zwischen den für die einzelnen KIRs negativen und positiven Populationen bei den IL2-stimulierten NK-Zellen gering waren. Bei den single-KIR-positiven NK-Zellen von Spender 8 ließ sich also durch die IL2-Stimulation die CD107a-Expression deutlich erhöhen.
Zur Verteilung der Populationen in den CD107a-positiven NK-Zellen lässt sich sagen, dass sich bei den NK-Zellen beider Spender in allen Ansätzen zeigte, dass unter den CD107a-positiven NK-Zellen der größte Anteil von NK-Zellen gebildet wurde, die entweder ausschließlich für ILT2 positiv waren oder ausschließlich für einen der drei KIR-Rezeptoren (CD158a/b/e) negativ waren - darunter fielen also jeweils auch die ILT2-positiven Zellen („ILT2-positive Populationen“). Der Anteil dieser Populationen war in der Mehrzahl der Fälle bei den unstimulierten NK-Zellen höher als bei den mit IL2 stimulierten. Dagegen

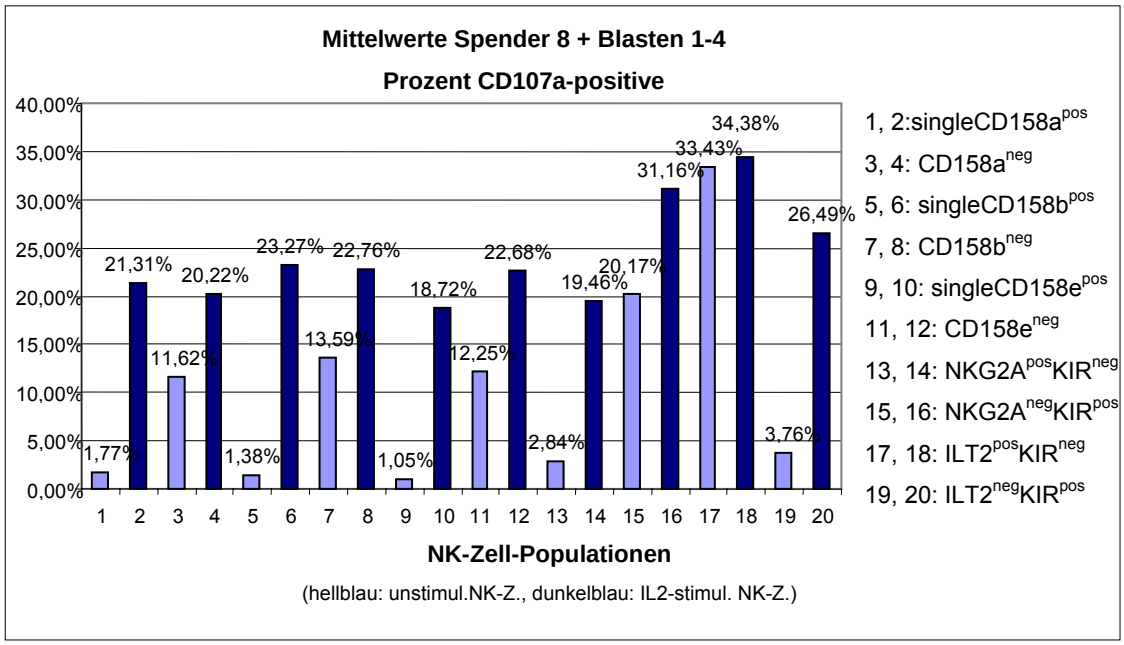
erhöhte sich der Anteil der einfach für NKG2A positiven NK-Zellen, wie auch ihre CD107a-Expression, nach der Stimulation mit IL2.

Abbildung 75



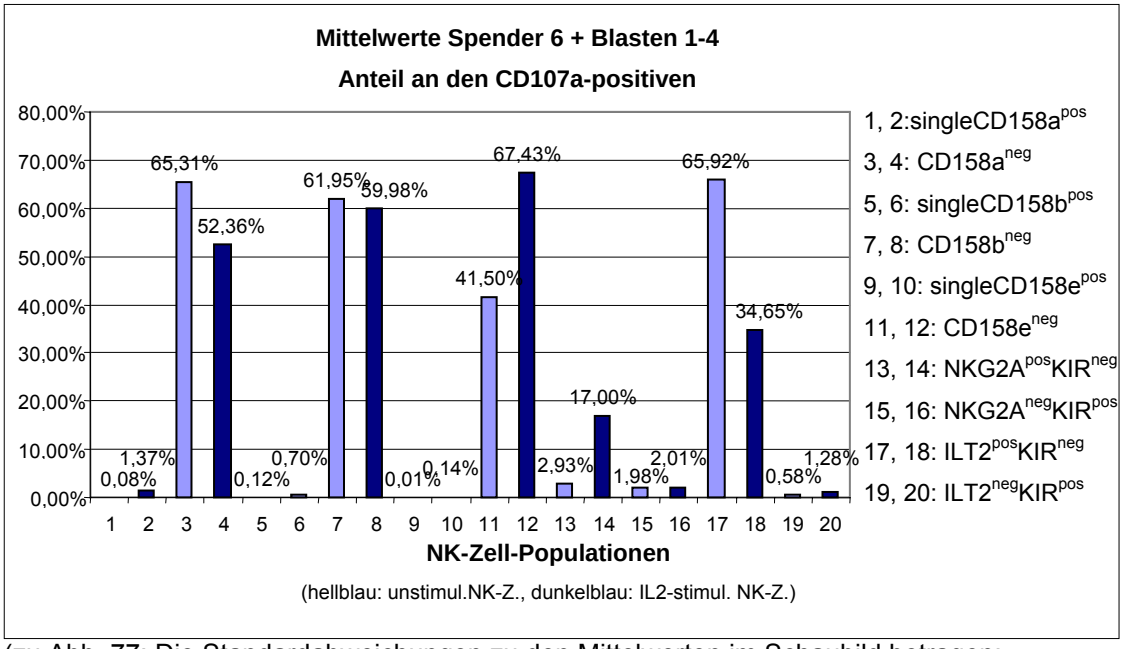
(zu Abb. 75: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen:
1: 0,77+/-1,20%; 2: 5,91+/-4,50%; 3: 21,49+/-28,69%; 4: 19,09+/-19,24%; 5: 0,35+/-0,69%; 6: 8,58+/-10,34%; 7: 16,77+/-23,68%; 8: 18,95+/-16,12%; 9: 0,00+/-0,00%; 10: 3,71+/-1,63%; 11: 4,71+/-4,47%; 12: 18,66+/-13,82%; 13: 2,10+/-1,08%; 14: 10,86+/-4,14%; 15: 6,40+/-6,08%; 16: 9,55+/-4,36%; 17: 33,53+/-29,53%; 18: 28,02+/-24,62%; 19: 5,70+/-7,01%; 20: 10,01+/-4,81%)

Abbildung 76



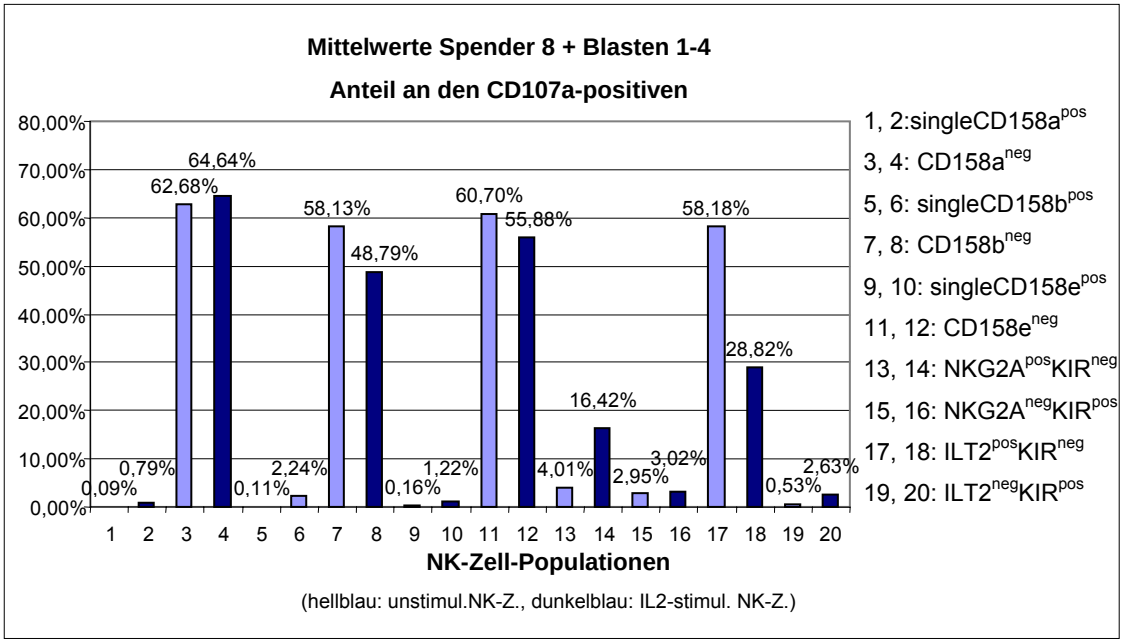
(zu Abb. 76: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen:
1: 1,77+/-2,17%; 2: 21,31+/-16,67%; 3: 11,62+/-11,19%; 4: 20,22+/-12,11%; 5: 1,38+/-1,61%; 6: 23,27+/-15,81%; 7: 13,59+/-10,10%; 8: 22,76+/-13,73%; 9: 1,05+/-2,11%; 10: 18,72+/-16,19%; 11: 12,25+/-10,49%; 12: 22,68+/-11,83%; 13: 2,84+/-1,26%; 14: 19,46+/-9,73%; 15: 20,17+/-17,70%; 16: 31,16+/-17,57%; 17: 33,43+/-17,79%; 18: 34,38+/-16,91%; 19: 3,76+/-2,73%; 20: 26,49+/-18,58%)

Abbildung 77



(zu Abb. 77: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen:
1: 0,08+/-0,12%; 2: 1,37+/-0,52%; 3: 65,31+/-37,27%; 4: 52,36+/-22,89%; 5: 0,12+/-0,17%; 6: 0,70+/-0,69%; 7: 61,95+/-42,37%; 8: 59,98+/-22,00%; 9: 0,01+/-0,02%; 10: 0,14+/-0,14%; 11: 41,50+/-41,02%; 12: 67,43+/-23,04%; 13: 2,93+/-1,86%; 14: 17,00+/-6,50%; 15: 1,98+/-1,28%; 16: 2,01+/-1,16%; 17: 65,92+/-33,53%; 18: 34,65+/-19,19%; 19: 0,58+/-0,71%; 20: 1,28+/-0,88%)

Abbildung 78



(zu Abb. 78: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 1: 0,09+/-0,10%; 2: 0,79+/-0,22%; 3: 62,68+/-37,59%; 4: 64,64+/-14,98%; 5: 0,11+/-0,12%; 6: 2,24+/-1,04%; 7: 58,13+/-37,45%; 8: 48,79+/-13,95%; 9: 0,16+/-0,20%; 10: 1,22+/-0,48%; 11: 60,70+/-36,20%; 12: 55,88+/-13,57%; 13: 4,01+/-3,02%; 14: 16,42+/-5,84%; 15: 2,95+/-1,95%; 16: 3,02+/-0,77%; 17: 58,16+/-30,93%; 18: 28,82+/-13,09%; 19: 0,53+/-0,50%; 20: 2,63+/-1,43%)

3.4.2.3 Auswertung hinsichtlich KIR-mismatch

Aus allen Messungen mit den NK-Zellen der einzelnen Spender wurde der Mittelwert der CD107a-Expression in der Gesamtpopulation der NK-Zellen des jeweiligen Spenders berechnet. Diese sind in den untenstehenden Schaubildern dargestellt für die NK-Zellen mit und ohne IL2-Stimulation und zwar einmal für alle Konstellationen mit mismatch und einmal für alle Konstellationen ohne mismatch. Die letzten beiden Säulen der Schaubilder zeigen die Mittelwerte aller Werte der jeweiligen Gruppe von Versuchen.

Abbildung 79

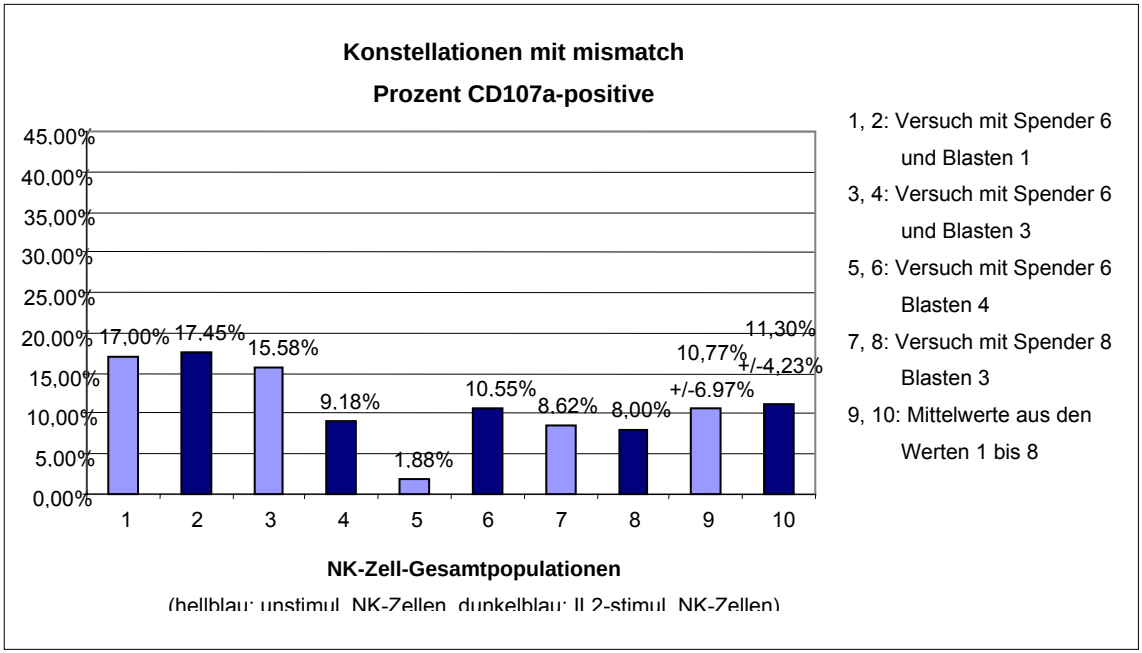
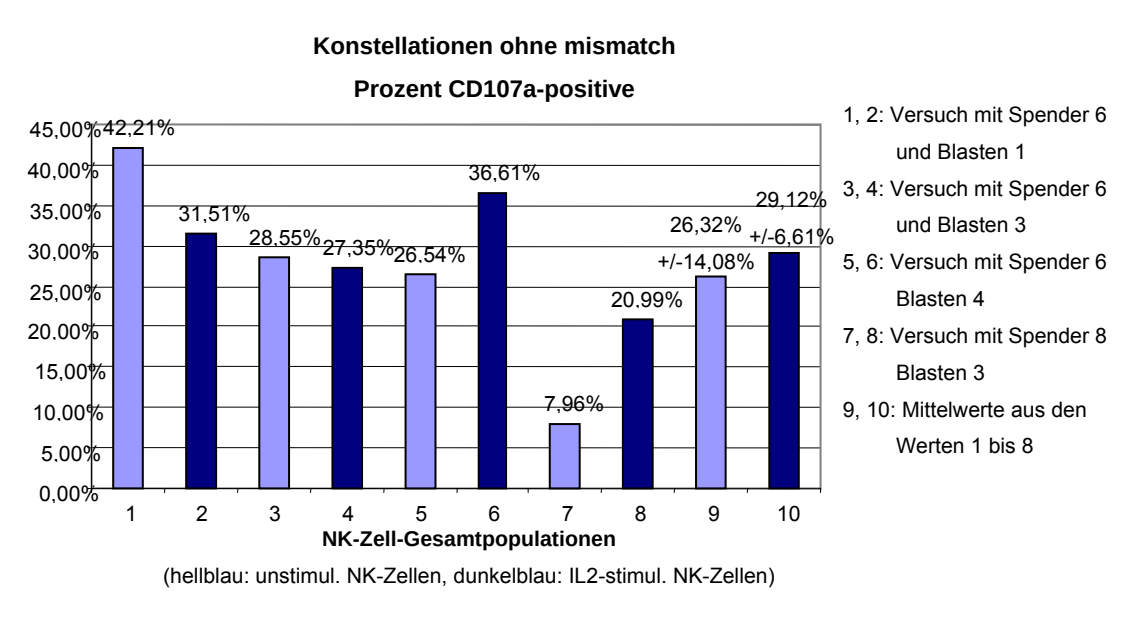


Abbildung 80



Anders als bei den Versuchen mit den Tranfektanten waren hier die Werte für die CD107a-Expression bei den Versuchen mit mismatch-Konstellation nicht höher als bei den Versuchen ohne mismatch-Konstellation.

3.4.2.4 Analyse hinsichtlich ILT2

Die Population der ILT2^{pos} KIR^{neg} NK-Zellen soll im Folgenden näher analysiert werden.

Zunächst soll die CD107a-Expression dieser Population mit der von den NK-Zellen, die ohne Targets inkubiert worden waren, und mit der von der Gesamtpopulation der mit Targets inkubierten NK-Zellen verglichen werden, jeweils für unstimulierte und für IL2-stimulierte NK-Zellen. Dabei zeigte sich zum Einen, dass die CD107a-Expression bei der Gesamtpopulation der mit Targets inkubierten NK-Zellen stets höher war als bei den NK-Zellen, die ohne Targets inkubiert worden waren. Außerdem lag der Wert für die CD107a-Expression bei den ILT2^{pos} KIR^{neg} NK-Zellen immer über dem der Gesamtpopulation. In der Hälfte der Fälle war dabei die CD107a-Expression der IL2-stimulierten NK-Zellen niedriger als die der unstimulierten NK-Zellen. Bei den absoluten Werten der CD107a-Expression gab es insgesamt eine große Bandbreite, abhängig von den Blasten; die höchste CD107a-Expression wurde bei den Versuchen mit Blasten 2 erzielt.

Abbildung 81

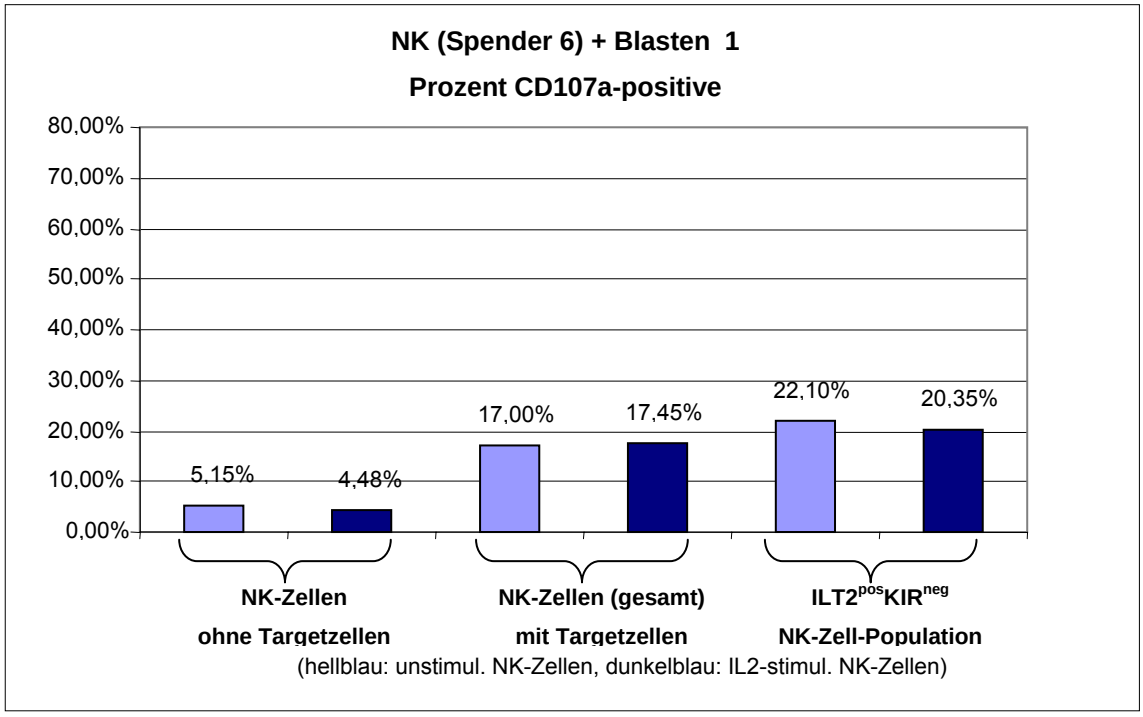


Abbildung 82

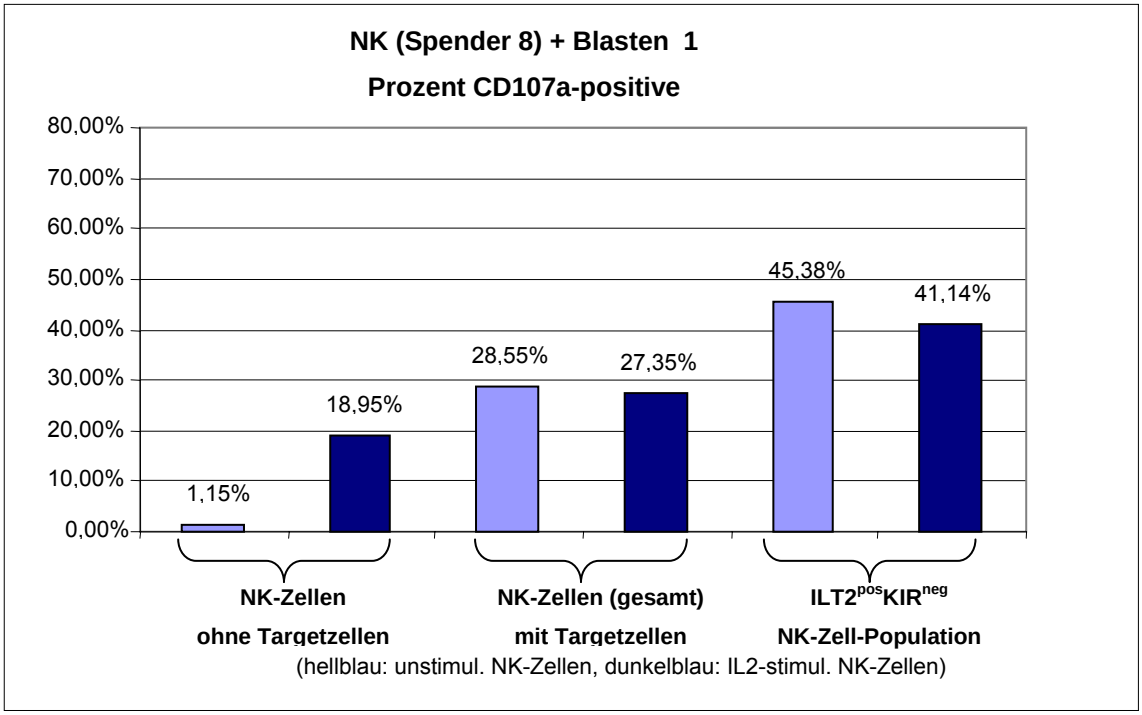


Abbildung 83

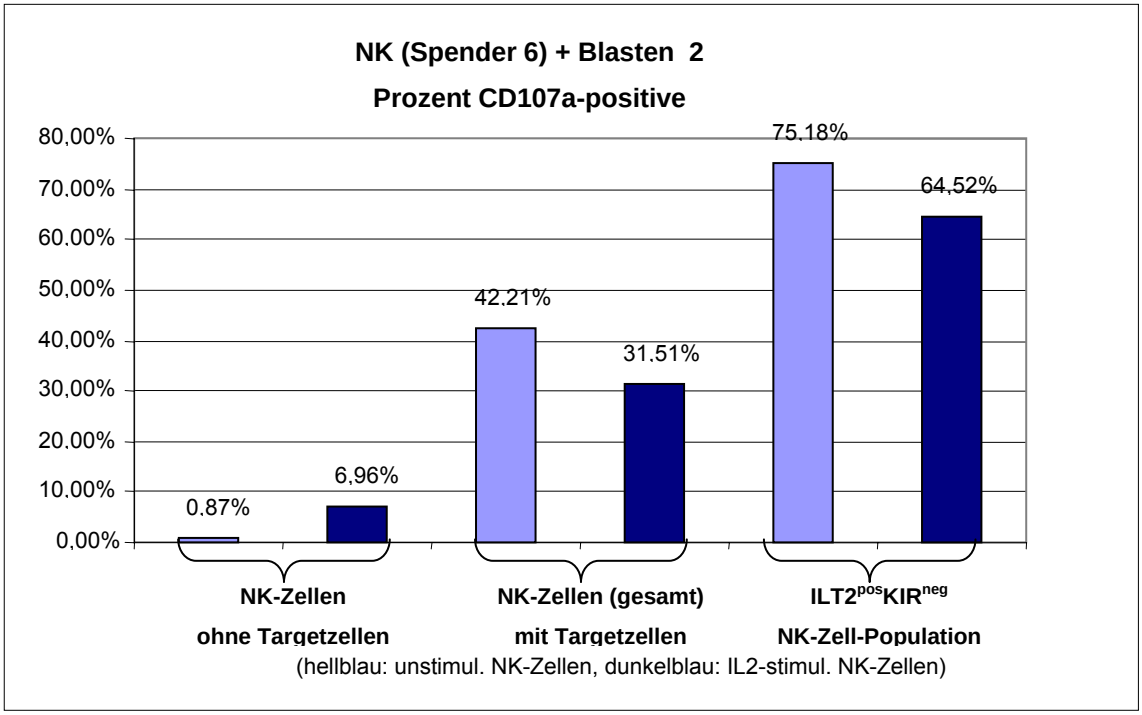


Abbildung 84

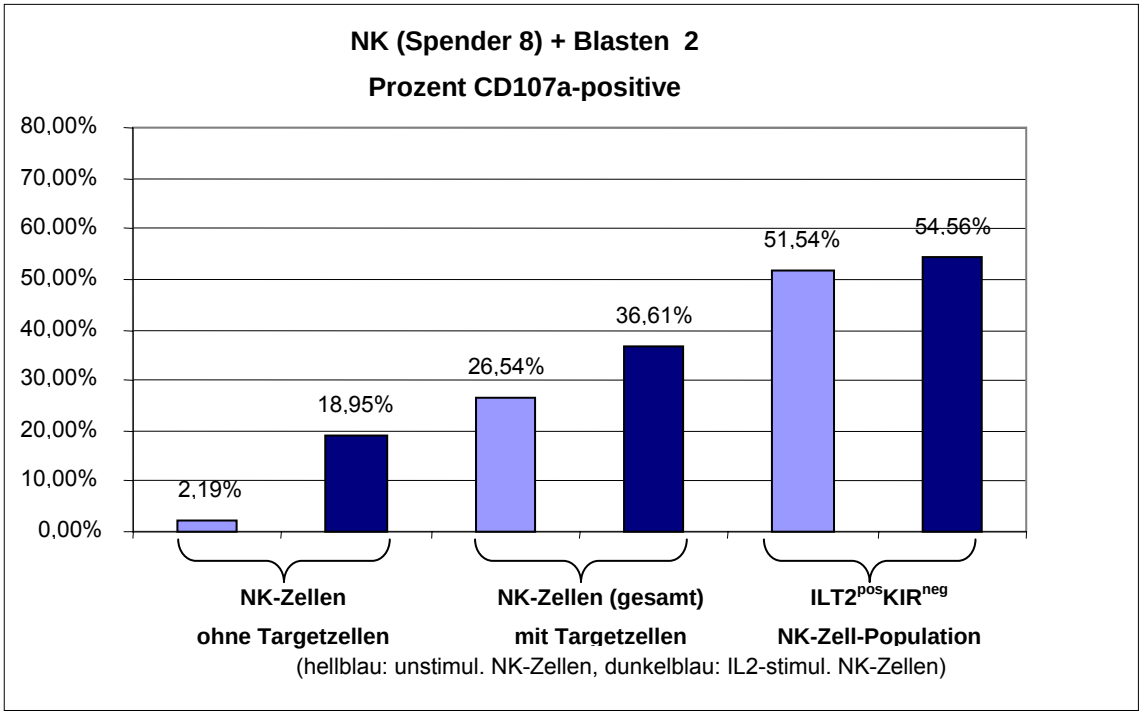


Abbildung 85

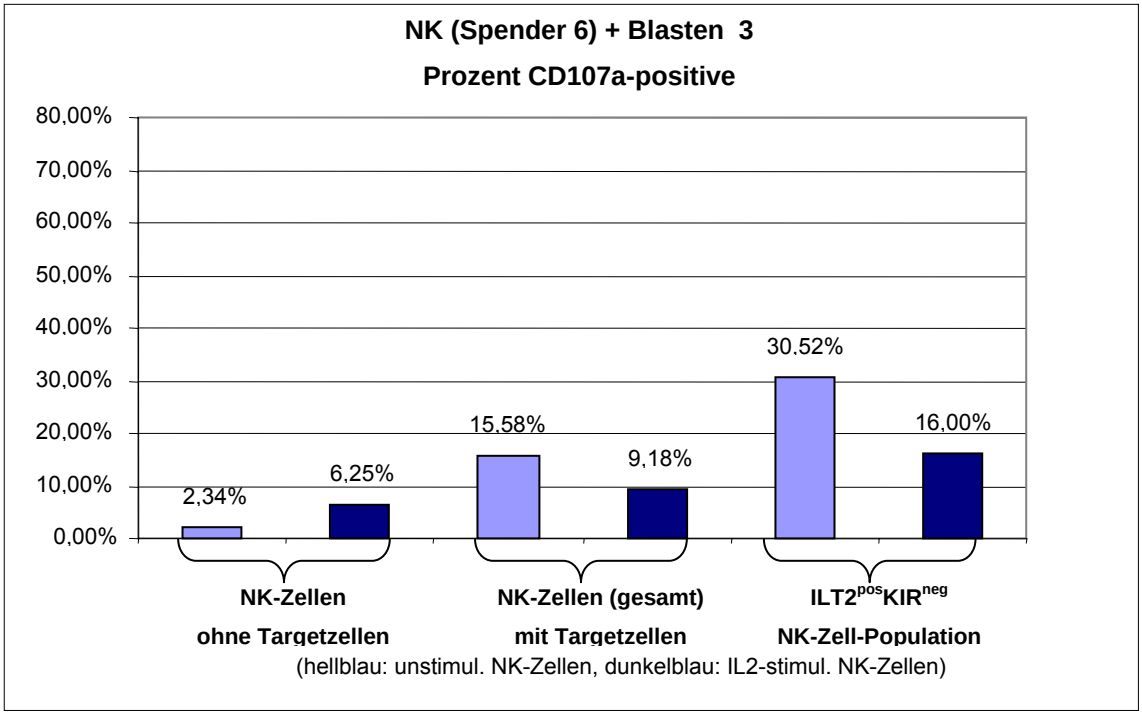


Abbildung 86

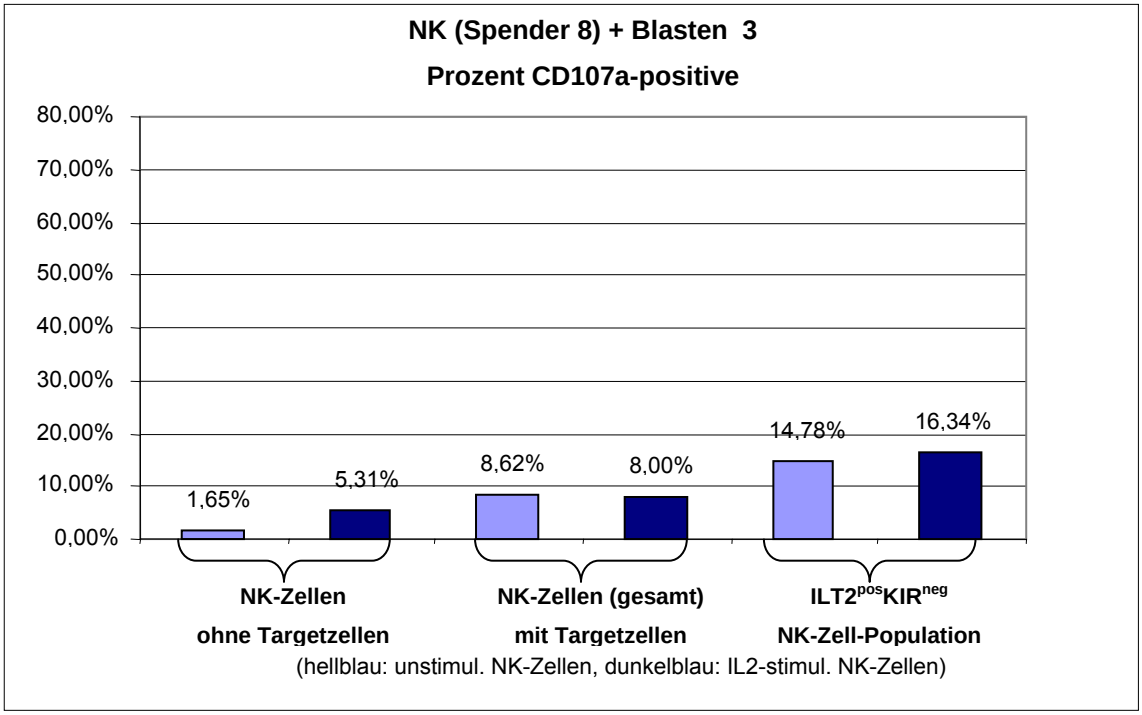


Abbildung 87

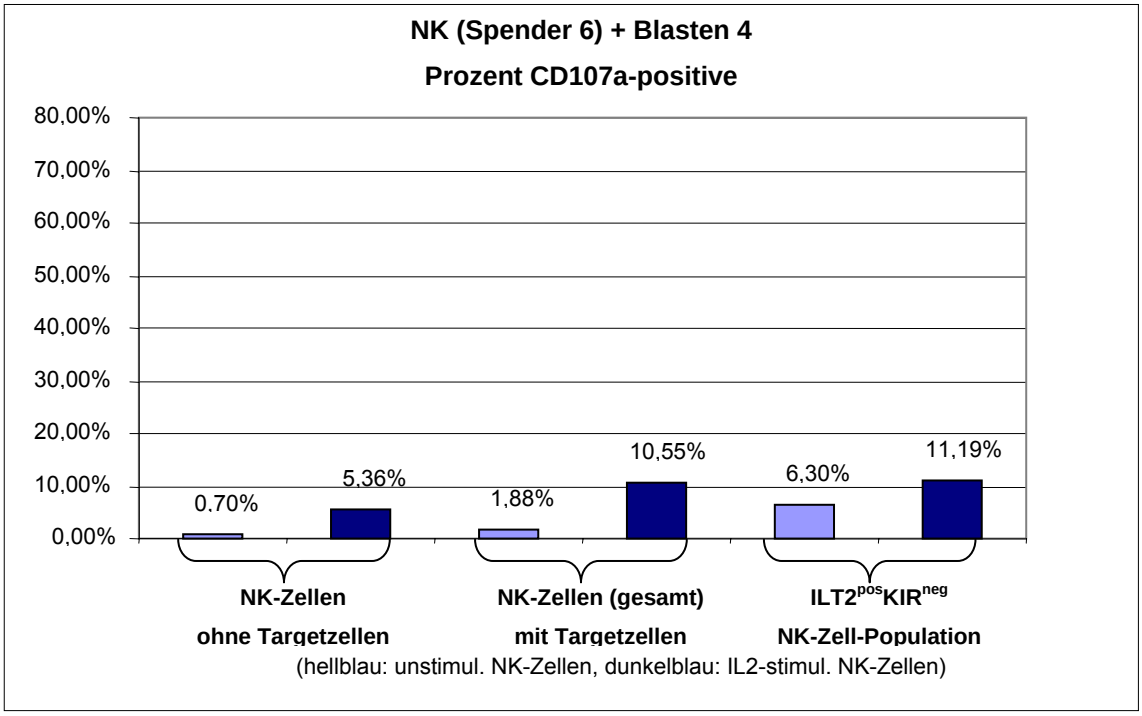
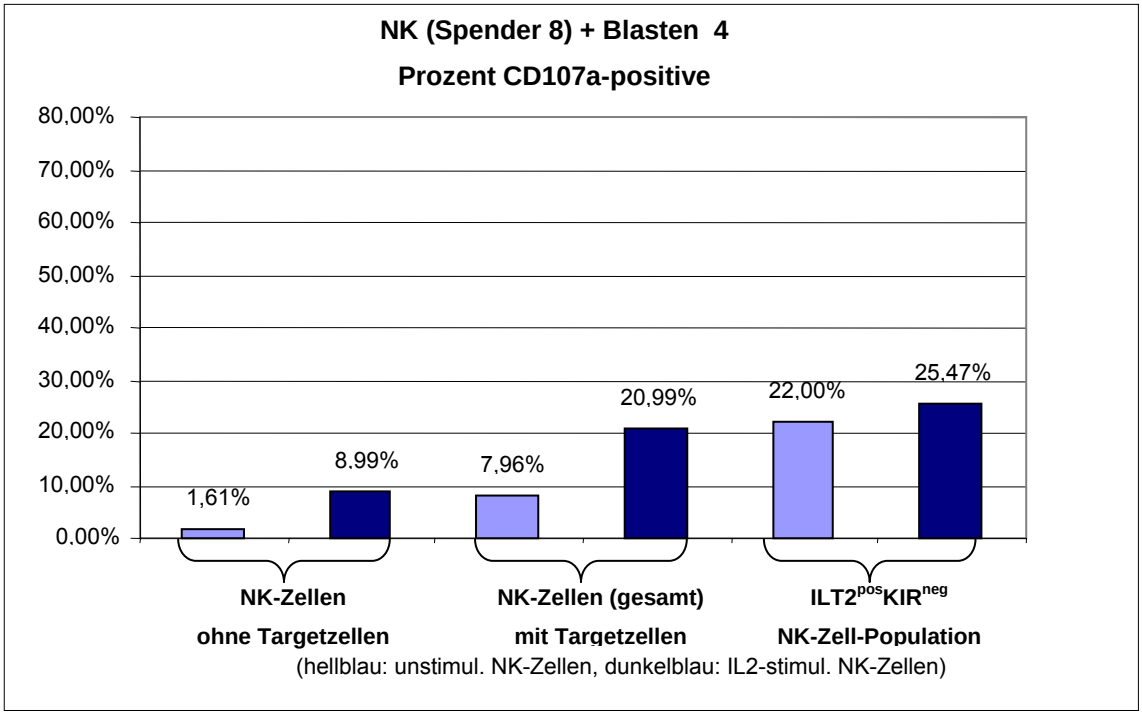


Abbildung 88



Zur statistischen Auswertung dieses Sachverhalts wurde mittels gepaartem t-Test die CD107a-Expression der ILT2^{pos} KIR^{neg} NK-Zell-Population mit derjenigen in der Gesamtpopulation der NK-Zellen verglichen, jeweils für die unstimulierten und die IL2-stimulierten NK-Zellen. In beiden Fällen konnte ein signifikanter Anstieg der CD107a-Expression bewiesen werden; die p-Werte lagen für die unstimulierten NK-Zellen bei 0,0041 und für die IL2-stimulierten NK-Zellen bei 0,0216.

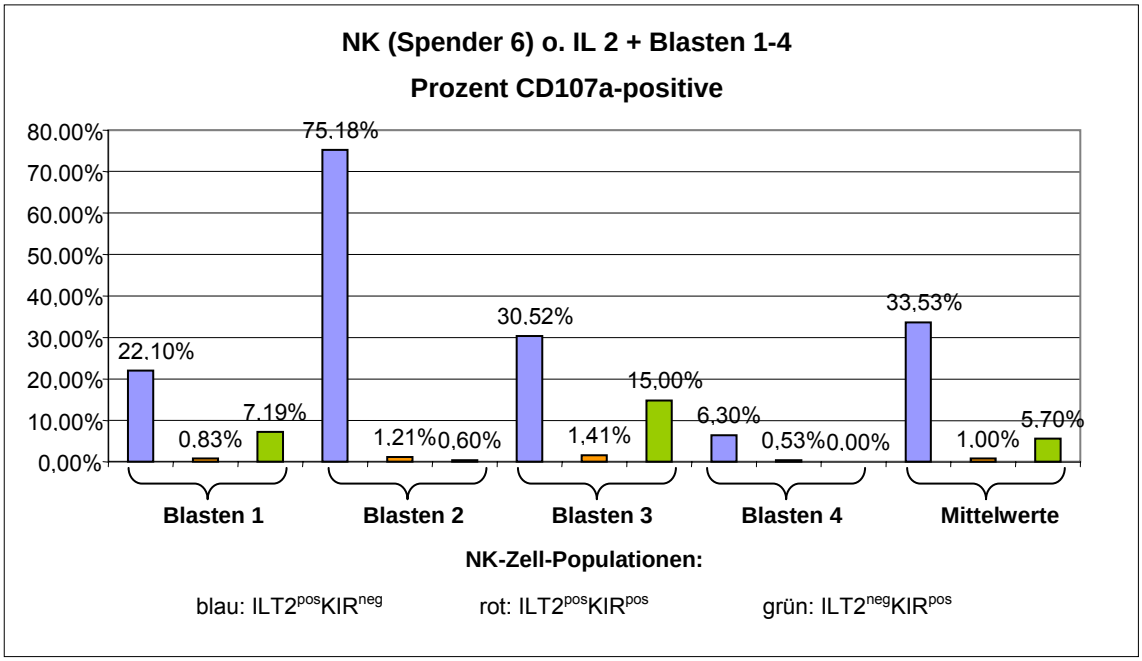
Nun sollen die drei Populationen der ILT2^{pos} KIR^{neg}, der ILT2^{pos} KIR^{pos} und der ILT2^{neg} KIR^{pos} NK-Zellen miteinander verglichen werden.

Für die unstimulierten NK-Zellen zeigten bei beiden Spendern die ILT2^{pos} KIR^{neg} NK-Zellen die höchste CD107a-Expression. Nach IL2-Stimulation erhöhte sich jedoch vor allem die CD107a-Expression der anderen Populationen - diese blieben jedoch bis auf den Versuch Spender 6 – Blasten 4 niedriger als die CD107a-Expression der ILT2^{pos} KIR^{neg} NK-Zellen.

Bei den Versuchen Spender 6 – Blasten 1, 3 und 4, bei denen ein mismatch vorlag, war der Unterschied der CD107a-Expression zwischen ILT2^{pos} KIR^{neg} und ILT2^{pos} KIR^{pos} NK-Zellen für die IL2-stimulierten NK-Zellen kleiner als beim

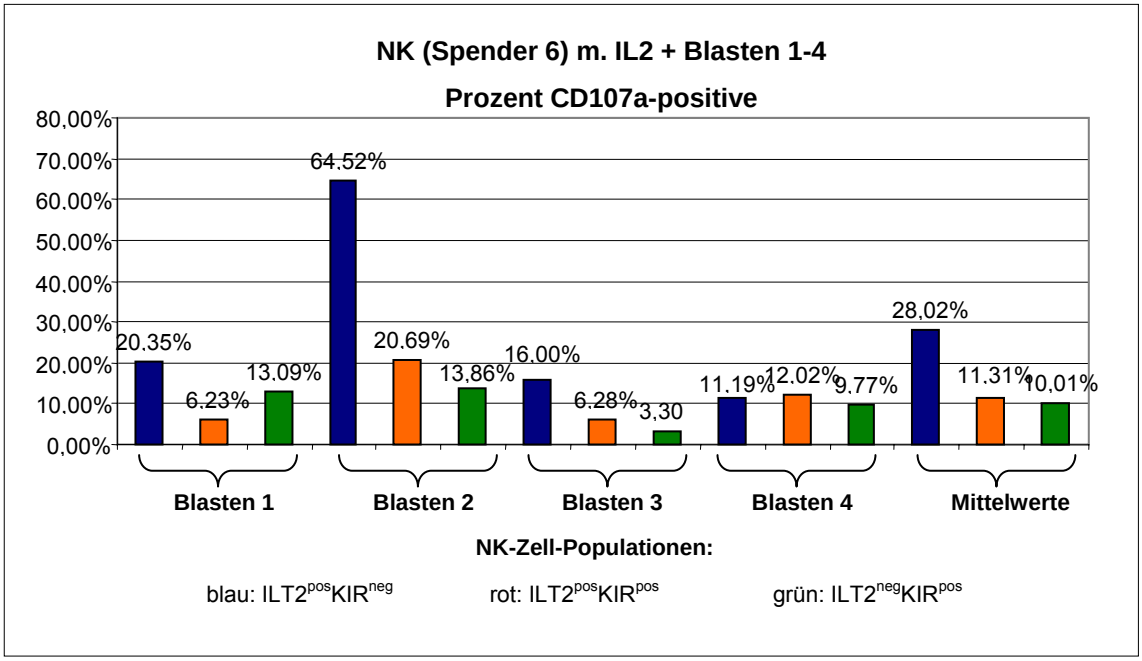
Versuch Spender 6 Blasten 2 ohne mismatch. Dies zeigte sich beim Versuch Spender 8 – Blasten 3, bei dem ebenfalls ein mismatch vorlag, nicht so deutlich. Außerdem war dieser Unterschied auch bei den Versuch Spender 8 – Blasten 2 und 4 ohne mismatch kleiner. Die Unterschiede zwischen den Populationen der ILT2^{pos} KIR^{pos} und der ILT2^{neg} KIR^{pos} Populationen waren gering und uneinheitlich.

Abbildung 89



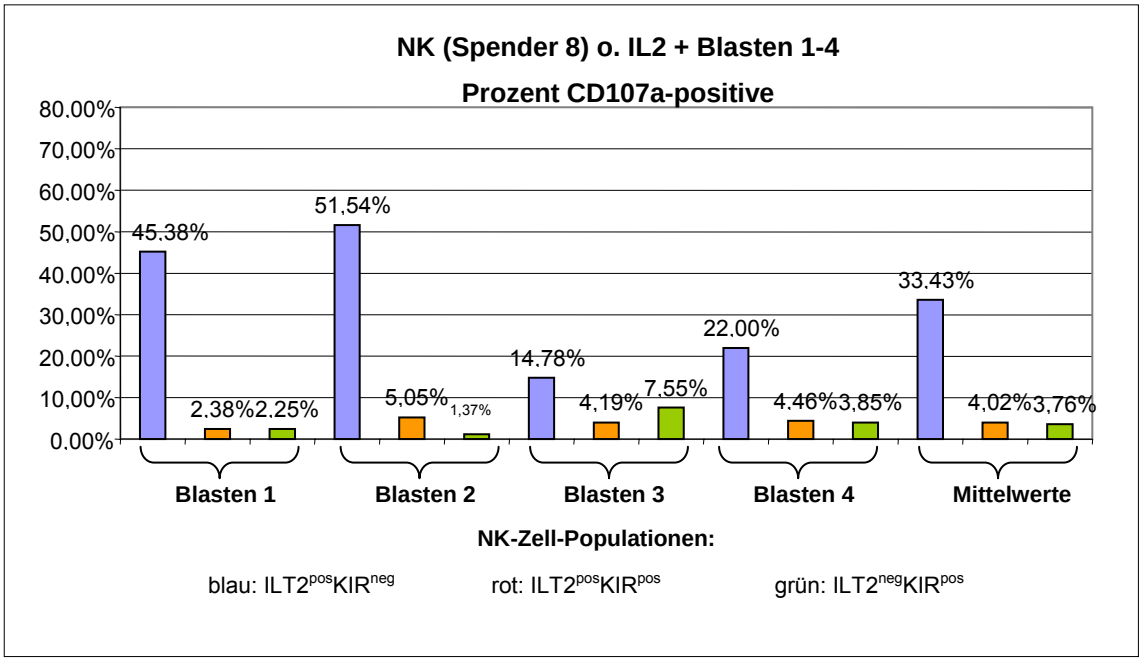
(zu Abb. 89: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 33,53+/-29,53%; 1,00+/-6,39%; 5,70+/-7,01%)

Abbildung 90



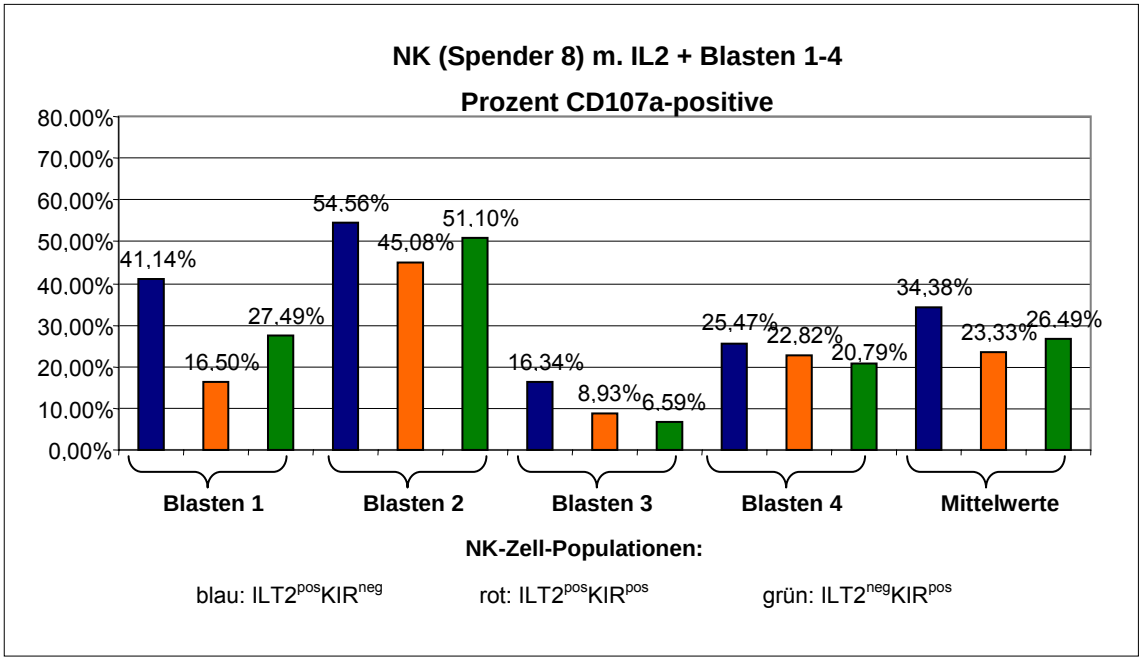
(zu Abb. 90: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 28,02+/-24,62%; 11,31+/-6,82%; 10,01+/-4,81%)

Abbildung 91



(zu Abb. 91: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 33,43+/-17,79%; 4,02+/-1,15%; 3,76+/-2,73%)

Abbildung 92

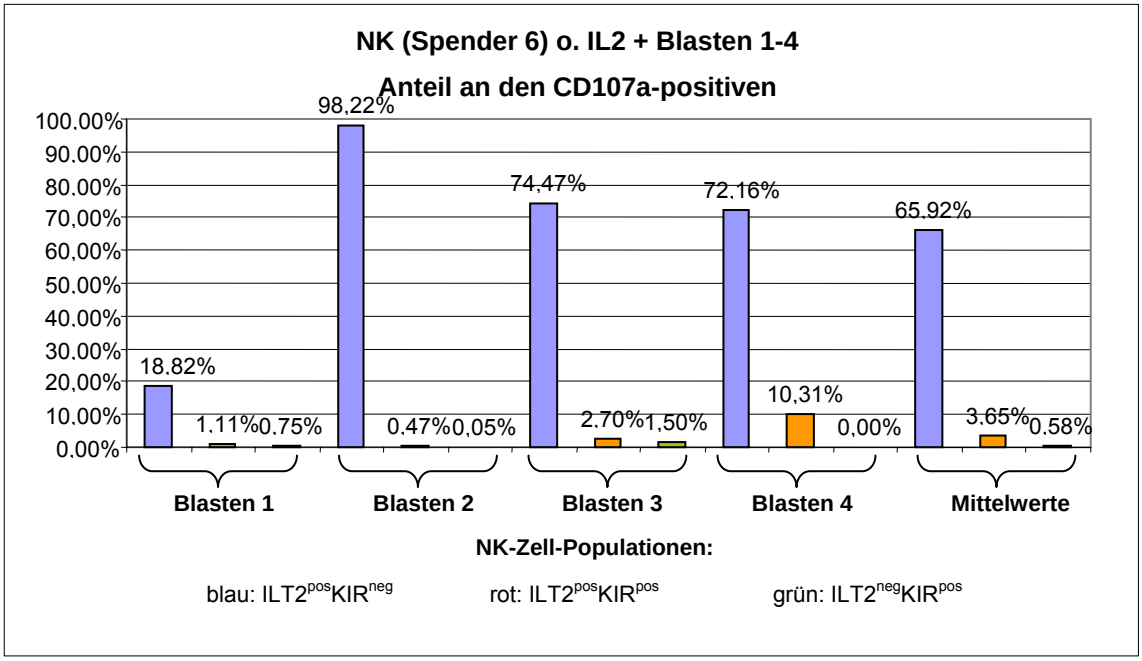


(zu Abb. 92: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 34,38+/-16,91%; 23,33+/-15,57%; 26,49+/-18,58%)

Den größten Anteil an den CD107a-positiven Zellen machten bei den unstimulierten NK-Zellen durchweg die ILT2^{pos} KIR^{neg} Zellen aus, teilweise waren die ILT2^{pos} KIR^{pos} NK-Zellen gering vertreten, die ILT2^{neg} KIR^{pos} NK-Zellen kaum. Bei den NK-Zellen nach IL2-Stimulation war bis auf den Versuch Spender 6 – Blasten 4 ebenfalls der Anteil der ILT2^{pos} KIR^{neg} NK-Zellen am höchsten, jedoch nahmen die Anteile dieser Population ab und die der anderen Populationen dagegen zu. Hierbei lag der Anteil der ILT2^{pos} KIR^{pos} NK-Zellen über dem der ILT2^{neg} KIR^{pos}.

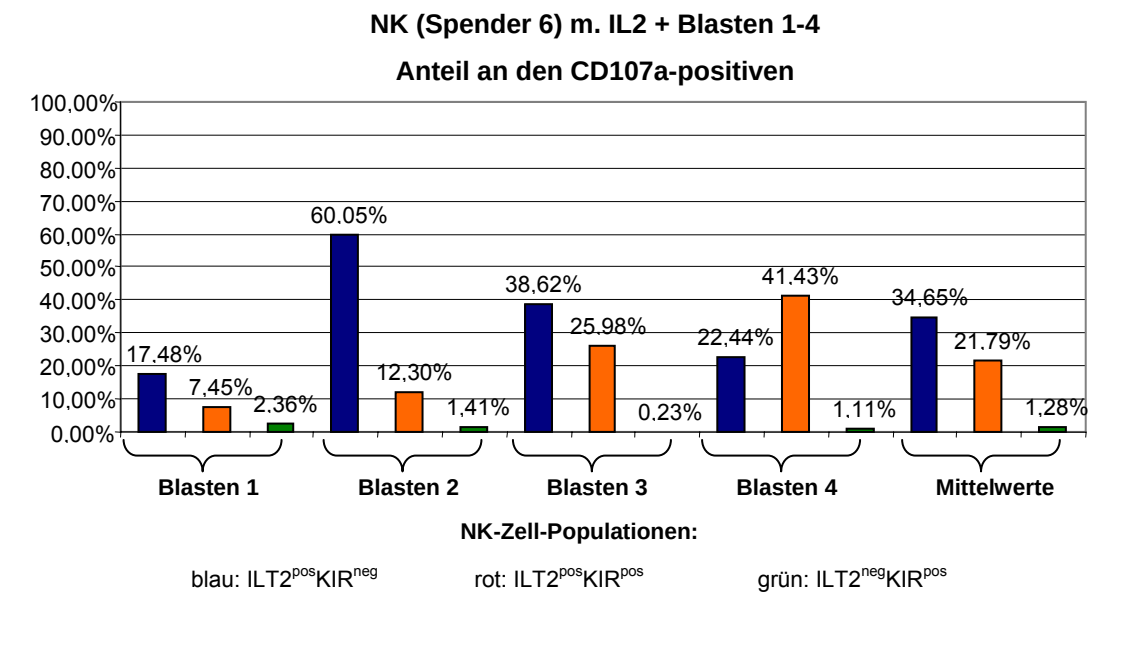
Bei den Versuchen, bei denen ein mismatch mit Spender 6 vorlag, waren die Unterschiede zwischen der ILT2^{pos} KIR^{neg} und der ILT2^{pos} KIR^{pos} Population kleiner als bei den Versuchen ohne mismatch. Bei den Versuchen mit Spender 8 verhielt es sich andersherum.

Abbildung 93



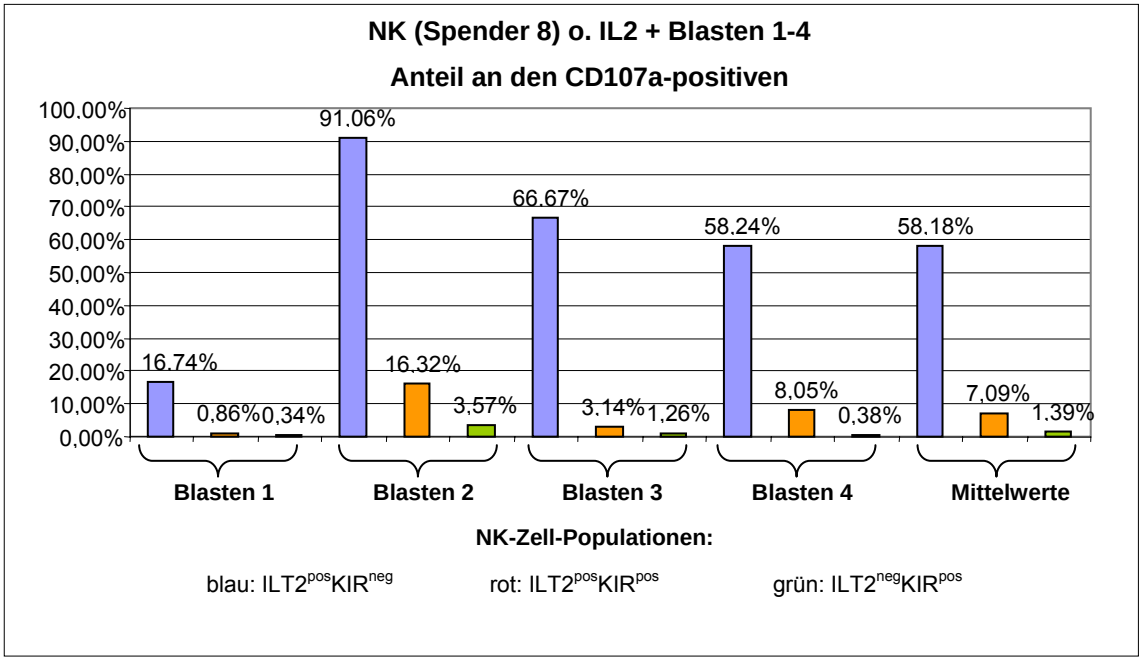
(zu Abb. 93: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 65,92+/-33,53%; 3,65+/-4,54%; 0,58+/-0,71%)

Abbildung 94



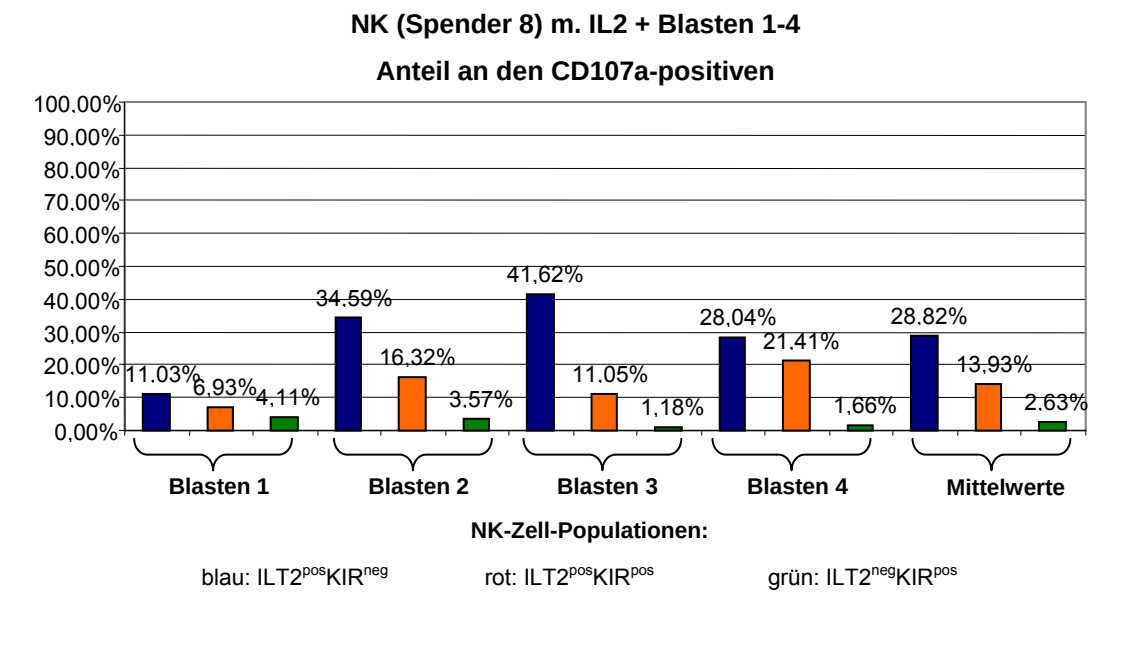
(zu Abb. 94: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 34,65+/-19,19%; 21,79+/-15,26%; 1,28+/-0,88%)

Abbildung 95



(zu Abb. 95: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 58,18+/-30,93%; 7,09+/-6,84%; 1,39+/-1,52%)

Abbildung 96



(zu Abb. 96: Die Standardabweichungen zu den Mittelwerten im Schaubild betragen: 28,82+/-13,09%; 13,93+/-6,30%; 2,63+/-1,43%)

3.4.3 Versuche mit Blasten und CD19-Markierung

Bei den Versuchen mit den Blasten lagen bei der Auswertung der FACS-Daten die CD56-positiven und -negativen Zellen nah beieinander, so dass es teilweise etwas schwierig war, die Blasten und die NK-Zellen sicher voneinander zu trennen. Deshalb wurden drei Kontrollversuche durchgeführt, bei denen nicht, wie zuvor, die NK-Zellen mit einem Antikörper gegen CD56 markiert worden waren, sondern die Blasten mit einem Antikörper gegen CD19. Die Versuche wurden durchgeführt mit NK-Zellen von Spender 6 und Blasten 4 sowie mit NK-Zellen von Spender 8 und Blasten 3 und 4.

3.4.3.1 Einzelbetrachtung der Versuche

Zunächst sollen die Versuche einzeln im Hinblick auf die Ergebnisse bei den vorangegangenen Versuchen mit Blasten beschrieben werden.

Spender 6 – Blasten 4:

Für die unstimulierten NK-Zellen konnte hier die $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} Population als diejenige mit der höchsten CD107a-Expression ausgemacht werden. Bei den zuvor IL2-stimulierten NK-Zellen lag der höchste Wert für die CD107a-Expression bei den $NKG2A^{pos}$ KIR^{neg} NK-Zellen, die $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} zeigten ebenfalls eine hohe CD107a-Expression, die nur wenig unter denen der $NKG2A^{pos}$ KIR^{neg} und der $NKG2A^{neg}$ KIR^{pos} Populationen lag.

Sowohl für die unstimulierten als auch für die IL2-stimulierten NK-Zellen waren die CD107a-Expressions-Werte für die NK-Zellen, die für mindestens einen KIR negativ waren, höher als für die NK-Zellen, die für den entsprechenden KIR einfach positiv waren. Dabei erreichten die single-CD158e-positiven NK-Zellen von den single-KIR-positiven den höchsten Wert für die CD107a-Expression; CD158e war in diesem Falle ein self-KIR, der keinen Liganden auf den Targetzellen erkennen konnte.

Diese Beobachtungen waren so ähnlich auch bei den anderen Versuchen mit Blasten gemacht worden.

Abbildung 97

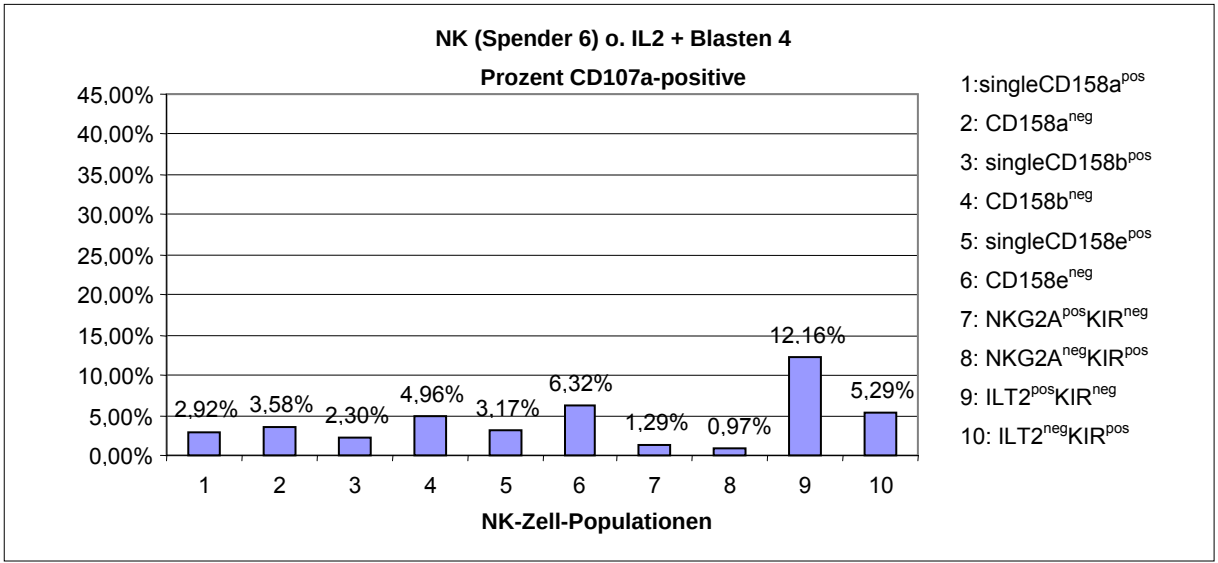
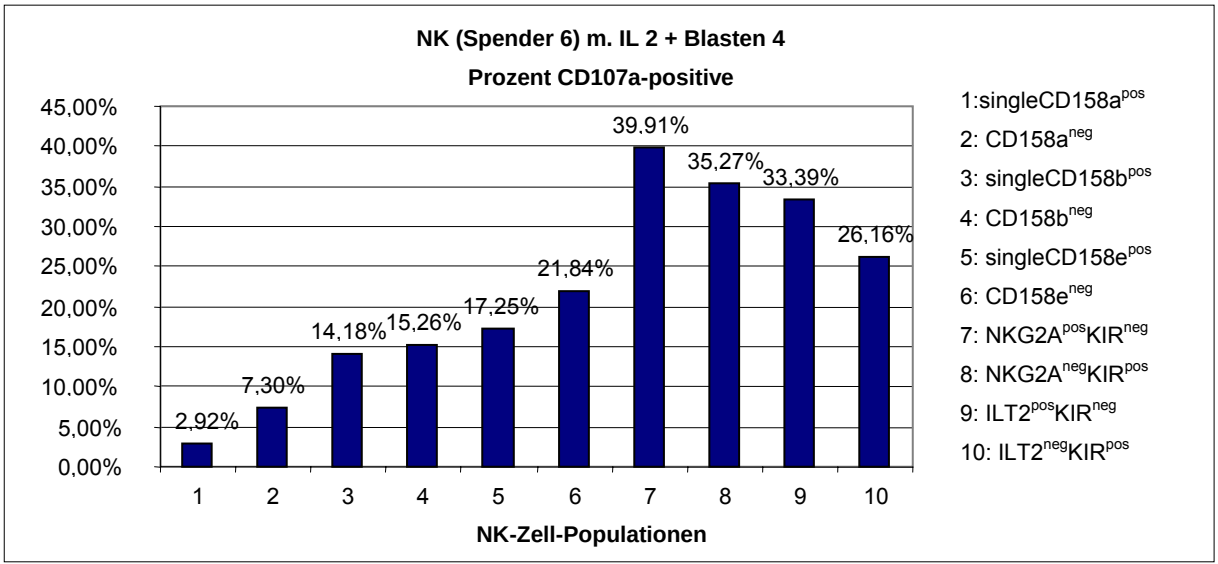


Abbildung 98



In der Verteilung der Populationen in den CD107a-positiven machten den weitaus größten Teil sowohl bei den unstimulierten als auch bei den IL2-stimulierten NK-Zellen die Populationen aus, die für mindestens eine KIR negativ waren. Die Anteile der entsprechenden single-KIR-positiven NK-Zellen dagegen waren sehr gering. Bei den unstimulierten NK-Zellen machten nach den o.g. Populationen mit hohem Anteil die NKG2A^{neg} KIR^{pos} und die ILT2^{pos} KIR^{neg} Populationen die zweit- und drittgrößten Anteile aus. Für die IL2-stimulierten NK-Zellen waren dies die NKG2A^{pos} KIR^{neg} und ILT2^{pos} KIR^{neg}

Populationen.

Ähnliche Ergebnisse erbrachten auch die anderen Versuche mit Blasten, allerdings lagen dort die Anteile der NKG2A^{neg} KIR^{pos} und der ILT2^{neg} KIR^{pos} Populationen meist deutlicher unter denen der NKG2A^{pos} KIR^{neg} bzw. ILT2^{pos} KIR^{neg} Populationen.

Abbildung 99

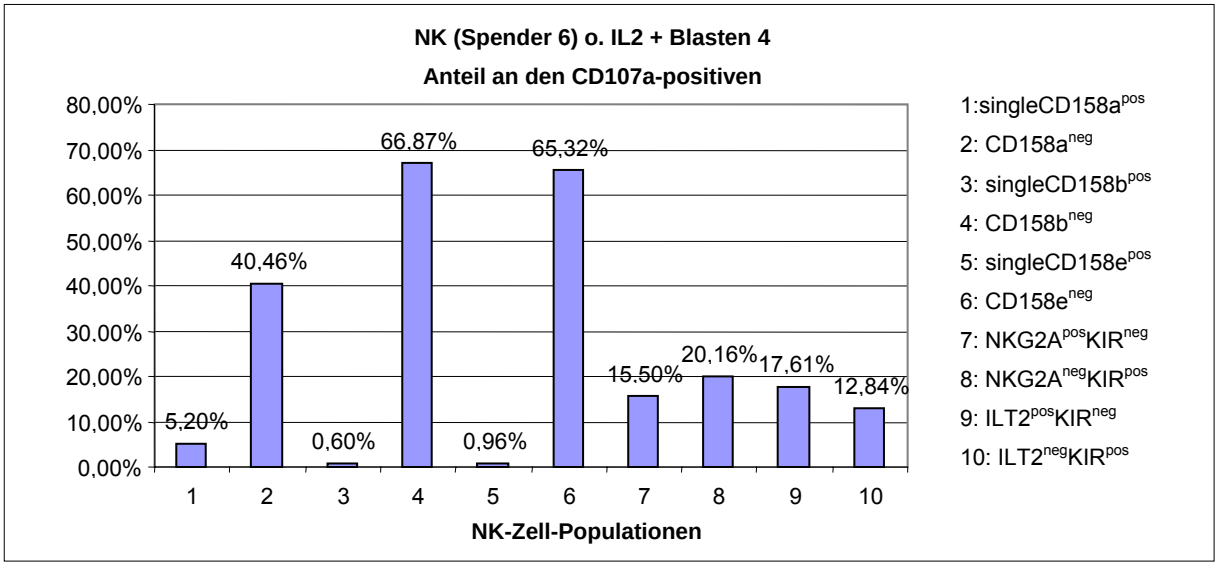
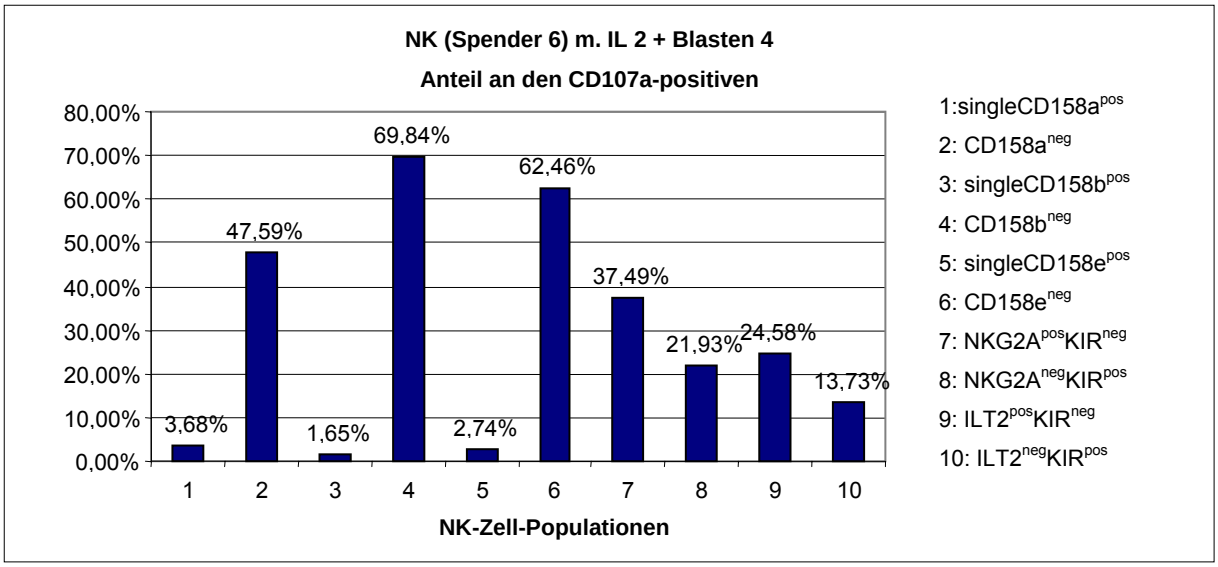


Abbildung 100



Spender 8 – Blasten 3:

Bei diesem Versuch zeigte die ILT2^{pos} KIR^{neg} Population ebenfalls eine hohe CD107a-Expression, allerdings bei den unstimulierten NK-Zellen an zweiter Stelle nach den single-CD158a-positiven NK-Zellen, für die ein mismatch vorlag, und bei den zuvor IL2-stimulierten NK-Zellen erst an vierter Stelle knapp hinter den single-CD158a-positiven, den ILT2^{neg} KIR^{pos} und den für mindestens CD158b negativen NK-Zellen (zu denen ja auch die ILT2^{pos} NK-Zellen zählen).

Unter den single-KIR-positiven NK-Zellen zeigten die single-CD158a-positiven die höchste CD107a-Expression. Dies war auch die einzige single-KIR-positive Population, deren CD107a-Expression die der entsprechenden für mindestens einen KIR negativen NK-Zell-Population überstieg. Auch hier handelte es sich wie im Versuch Spender 6 – Blasten 4 um einen KIR mit „missing self“.

Abbildung 101

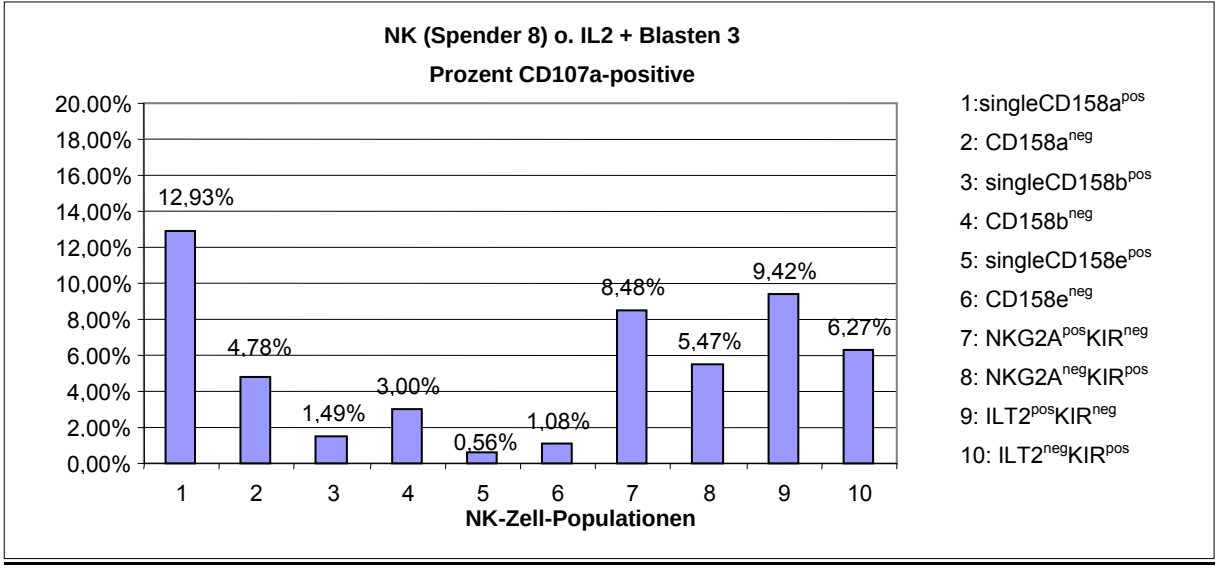
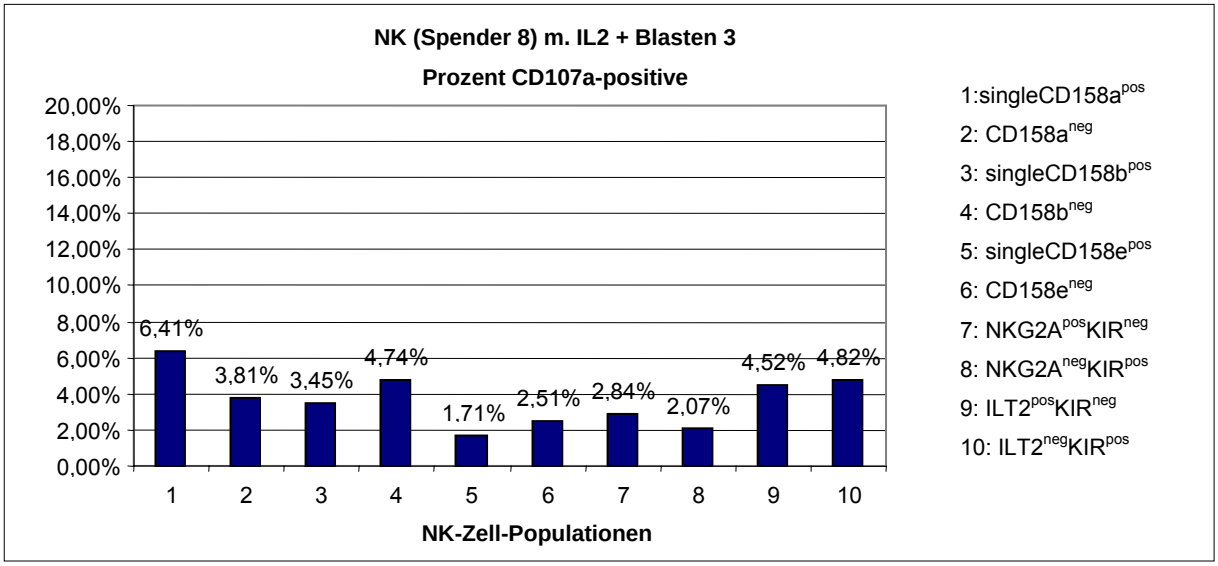


Abbildung 102



Wie auch bei den anderen Versuchen machten die Populationen, die für mindestens einen KIR negativ waren, den größten Teil in der Verteilung in den CD107a-positiven aus. Der Anteil der ILT2^{pos} KIR^{neg} Population lag allerdings unter denen der NKG2A^{pos} KIR^{neg}, der NKG2A^{neg} KIR^{pos} und der ILT2^{neg} KIR^{pos} Populationen. Von diesen drei Populationen machte den größten Anteil die NKG2A^{pos} KIR^{neg} Population aus. Im Unterschied dazu lag der Anteil der ILT2^{pos} KIR^{neg} Population bei den anderen Versuchen meist deutlich über dem der ILT2^{neg} KIR^{pos} NK-Zellen.

Abbildung 103

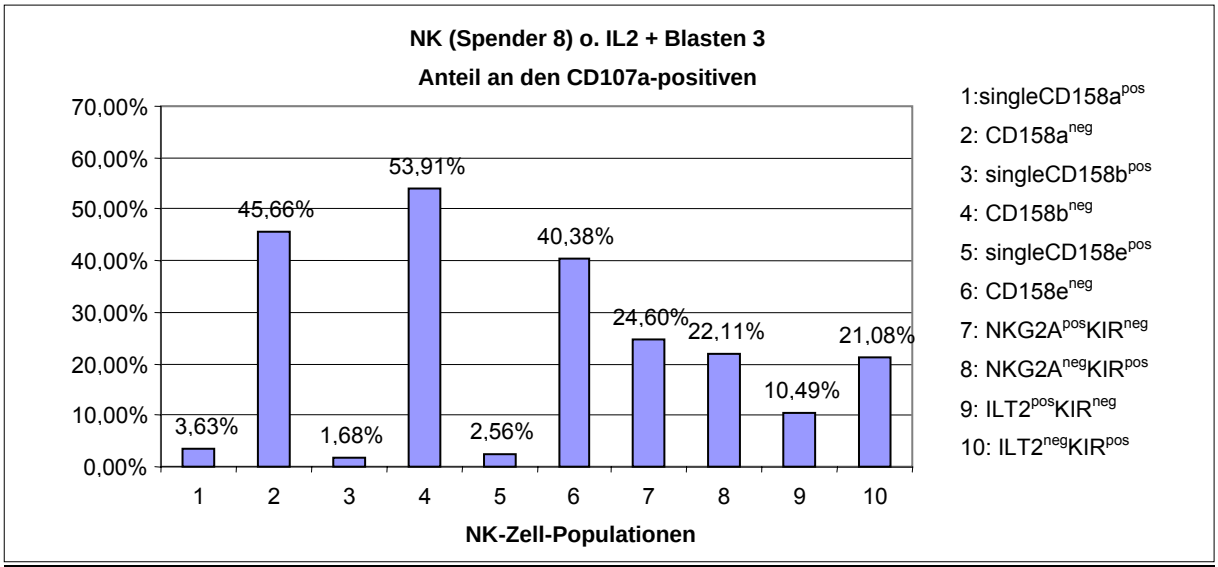
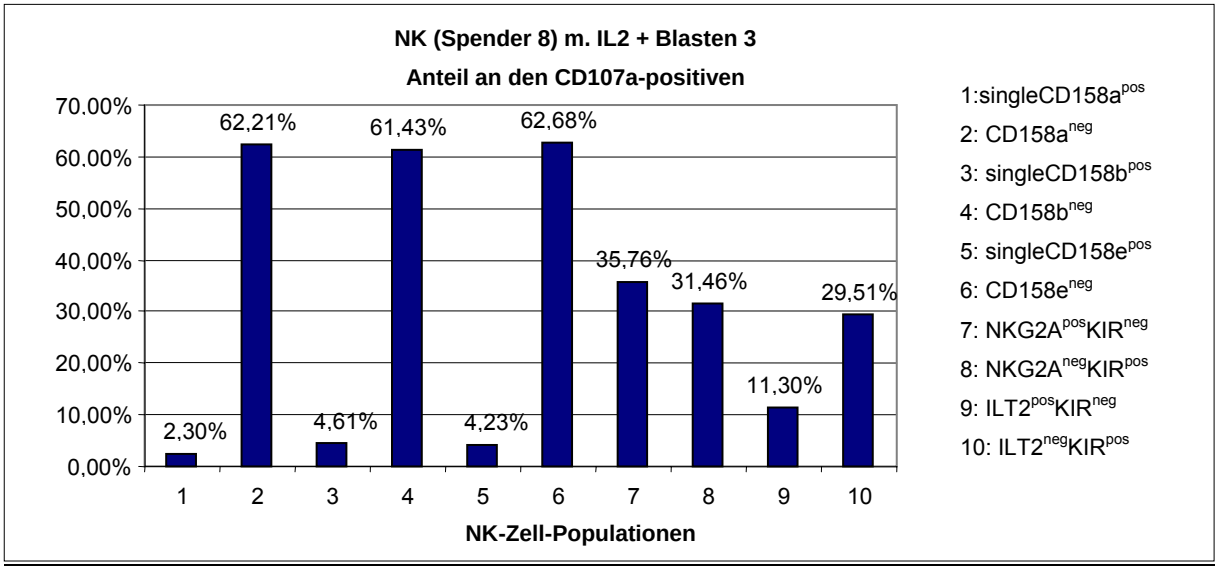


Abbildung 104



Spender 8 – Blasten 4:

Obwohl hier kein mismatch vorlag, war der Wert für die CD107a-Expression bei den unstimulierten NK-Zellen für die single-CD158a-positive Population deutlich höher als bei allen anderen Populationen. Den zweithöchsten Wert erreichte hier die ILT2^{pos} KIR^{neg} Population. Bei den IL2-stimulierten NK-Zellen lag der höchste Wert bei den NKG2A^{pos} KIR^{neg} NK-Zellen, die ILT2^{pos} KIR^{neg} NK-Zellen erreichten hier nur einen mittleren Wert und lagen auch unter dem der ILT2^{neg} KIR^{pos} Population.

Abbildung 105

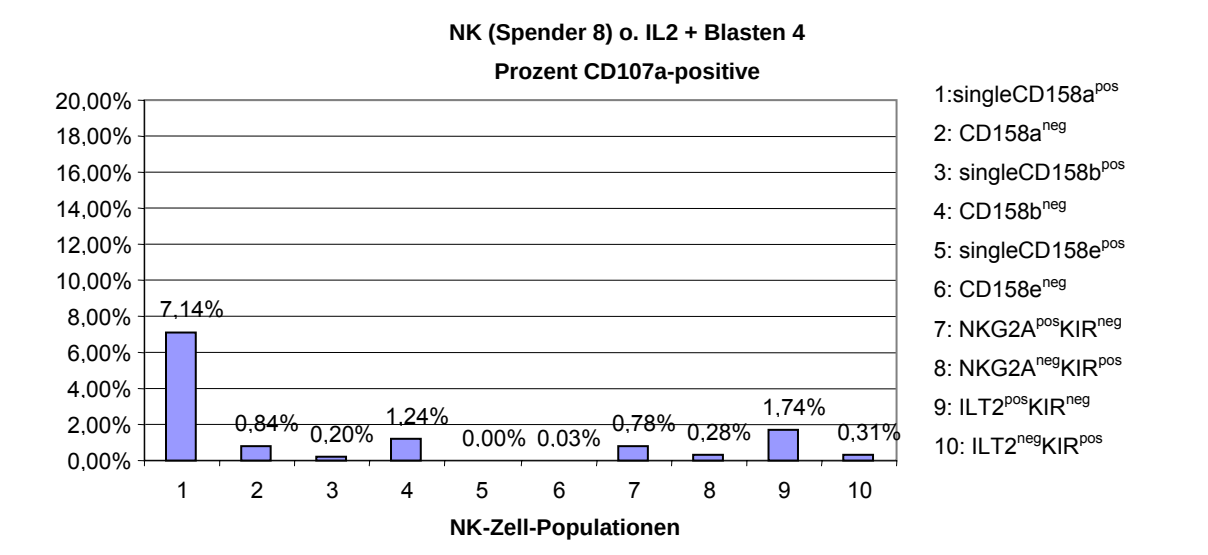
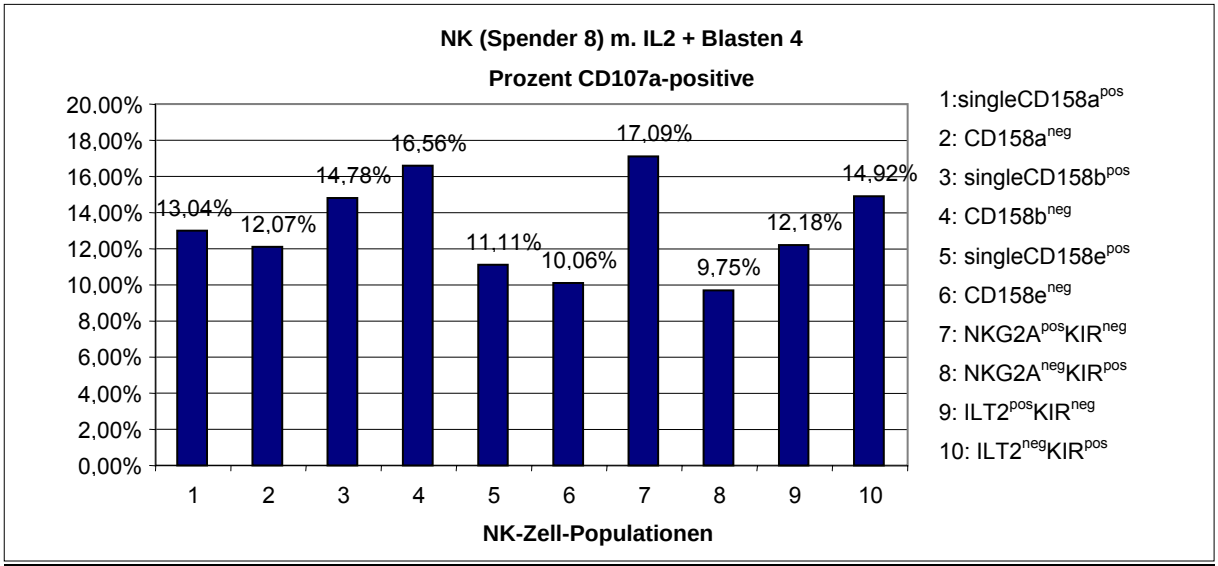


Abbildung 106



Hier zeigte sich für den Versuchsteil mit den unstimulierten NK-Zellen ein ähnliches Ergebnis wie bei den anderen Versuchen: die Populationen, die für mindestens einen KIR negativ waren, machten die größten Anteile unter den CD107a-positiven aus, gefolgt von der NKG2A^{pos} KIR^{neg} und knapp dahinter der ILT2^{pos} KIR^{neg} Population.

Bei den IL2-stimulierten NK-Zellen waren die für einen KIR negativen NK-Zellen ebenfalls am meisten vertreten. Allerdings erhöhten sich hier die Anteile der NKG2A^{neg} KIR^{pos} und der ILT2^{neg} KIR^{pos} Populationen deutlich, so dass die NKG2A^{pos} KIR^{neg} Population nur leicht über der NKG2A^{neg} KIR^{pos} Population lag, während die ILT2^{pos} KIR^{neg} sogar einen geringeren Anteil ausmachte als die ILT2^{neg} KIR^{pos}.

Abbildung 107

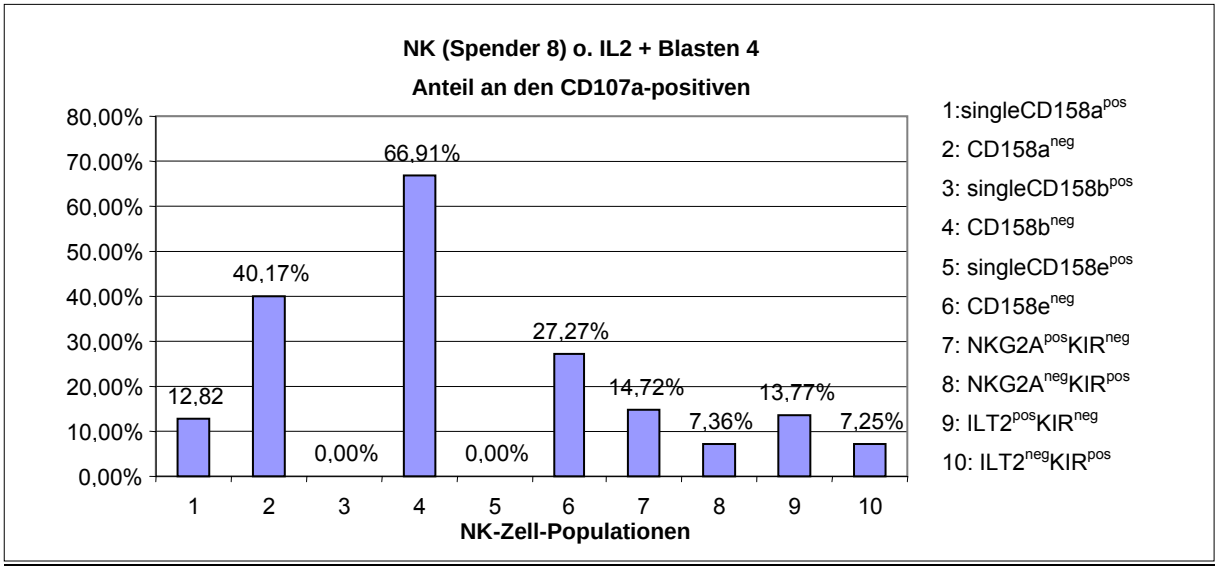
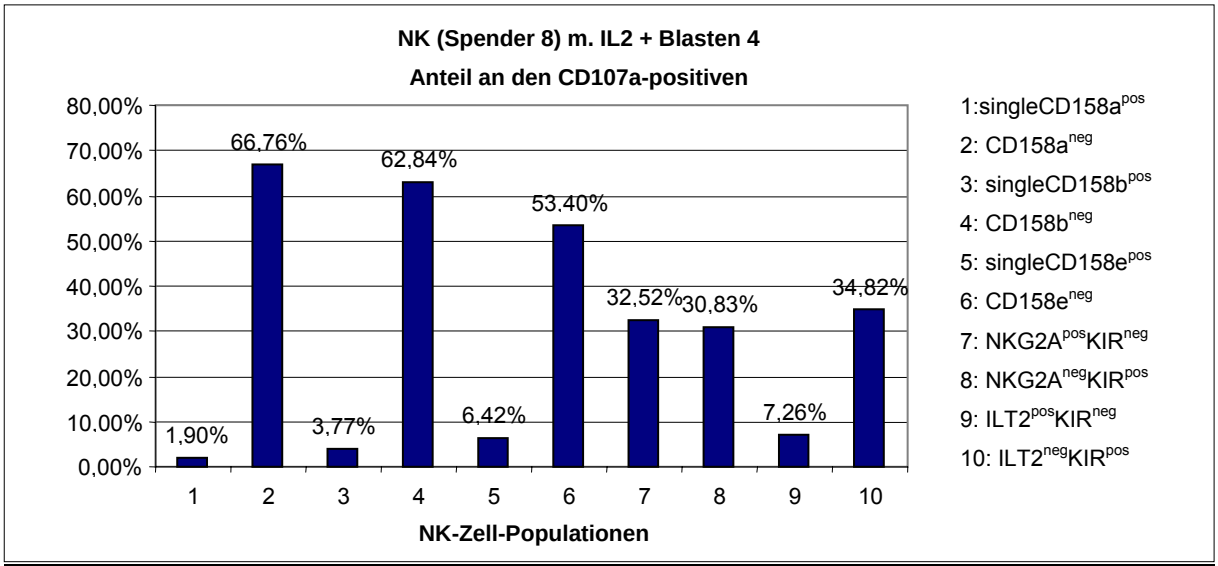


Abbildung 108



3.4.3.2 Analyse hinsichtlich ILT2

Wie bei den anderen Versuchen mit Blasten soll auch hier nun die CD107a-Expression der ILT2^{pos} KIR^{neg} Population mit der CD107a-Expression in der Gesamtpopulation der NK-Zellen, die mit Targets inkubiert worden waren, und mit den NK-Zellen, die ohne Targets inkubiert worden waren, verglichen werden.

Bis auf die IL2-stimulierten NK-Zellen von Spender 8 im Versuch mit Blasten 3 und 4 wiesen in allen Fällen die ILT2^{pos} KIR^{neg} NK-Zellen eine höhere CD107a-Expression auf als in der Gesamtpopulation. In allen Fällen war die CD107a-Expression der ohne Targets inkubierten NK-Zellen am niedrigsten. Diese Ergebnisse ließen sich so auch in den anderen Versuchen beobachten.
Wie auch in den anderen Versuchen, war auch hier nicht in allen Fällen ein Anstieg der CD107a-Expression durch IL2-Stimulation zu beobachten.

Abbildung 109

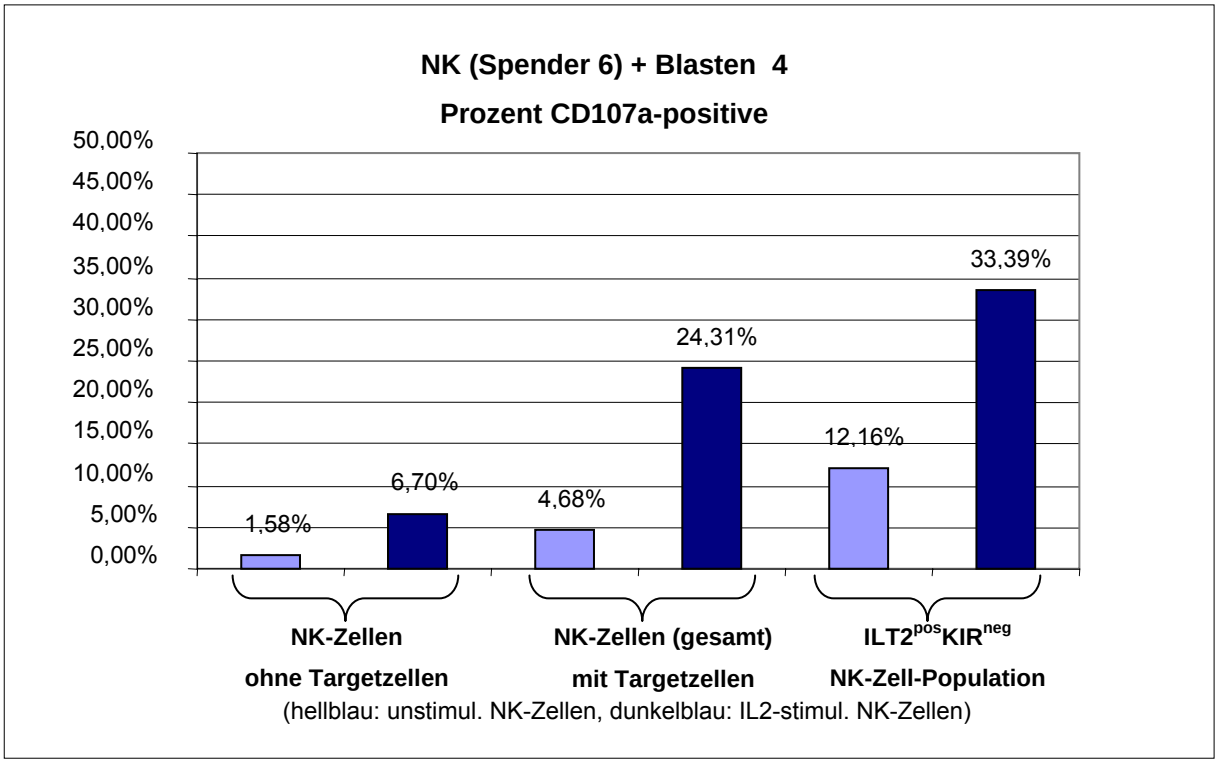


Abbildung 110

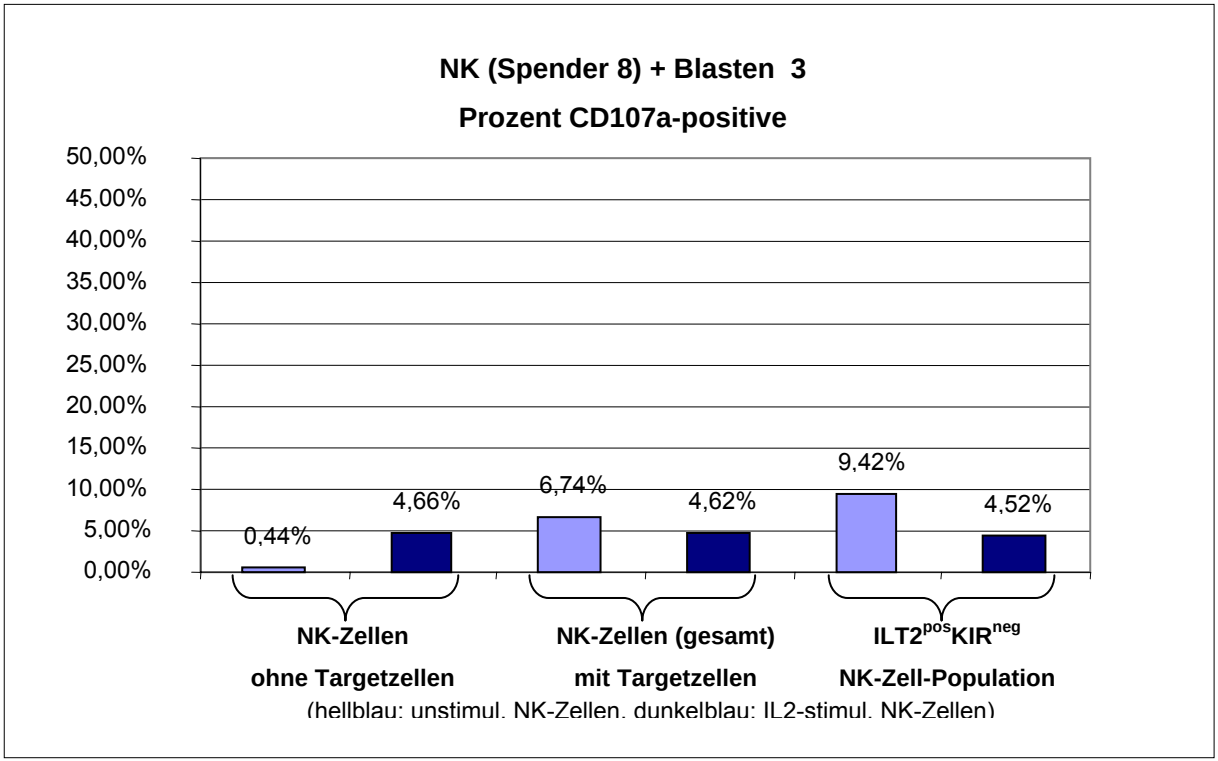
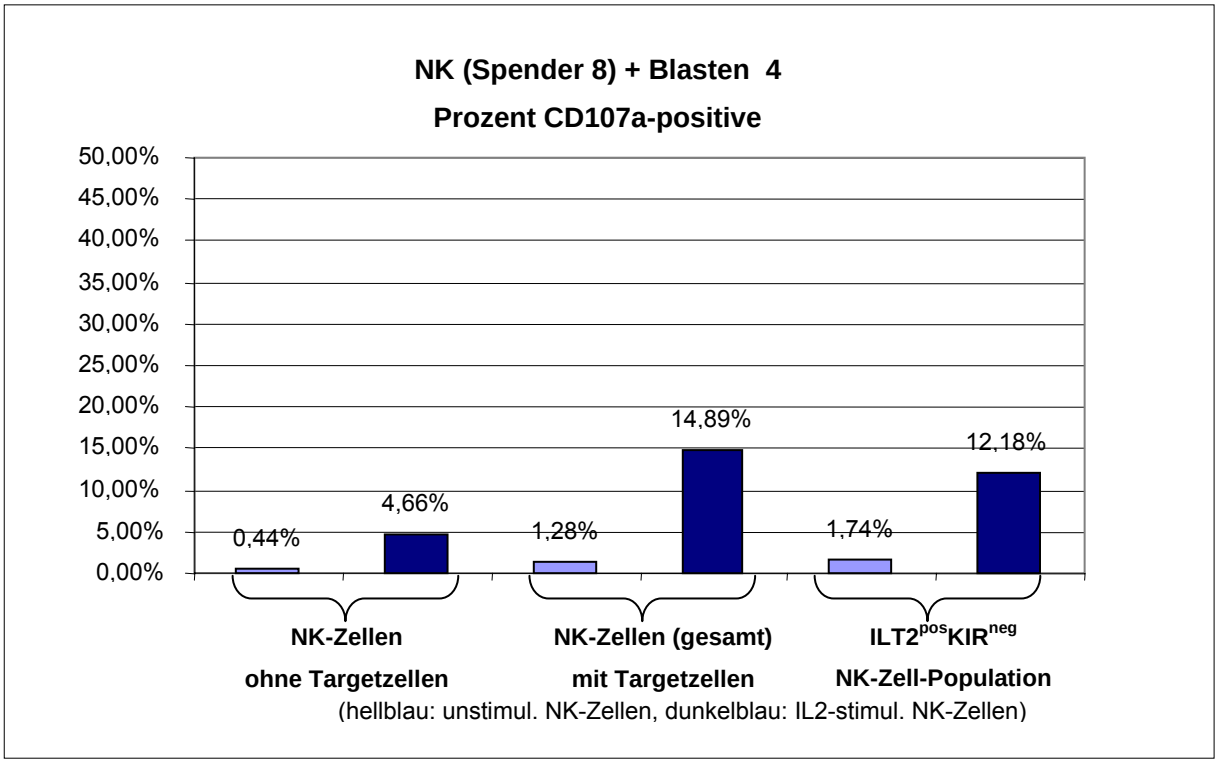


Abbildung 111



Nun sollen die drei Populationen der ILT2^{pos} KIR^{neg}, der ILT2^{pos} KIR^{pos} und der ILT2^{neg} KIR^{pos} NK-Zellen miteinander verglichen werden.

Für die unstimulierten NK-Zellen zeigte sich, wie auch bei den anderen Versuchen, dass die ILT2^{pos} KIR^{neg} Population gegenüber den anderen Populationen die größte CD107a-Expression aufwies. Dies galt bei den IL2-stimulierten NK-Zellen allerdings nur für den Versuch mit Spender 6 und Blasten 4. Bei den beiden anderen Versuchen lag die CD107a-Expresssion der ILT2^{neg} KIR^{pos} NK-Zellen leicht über der der ILT2^{pos} KIR^{neg} Population.

Abbildung 112

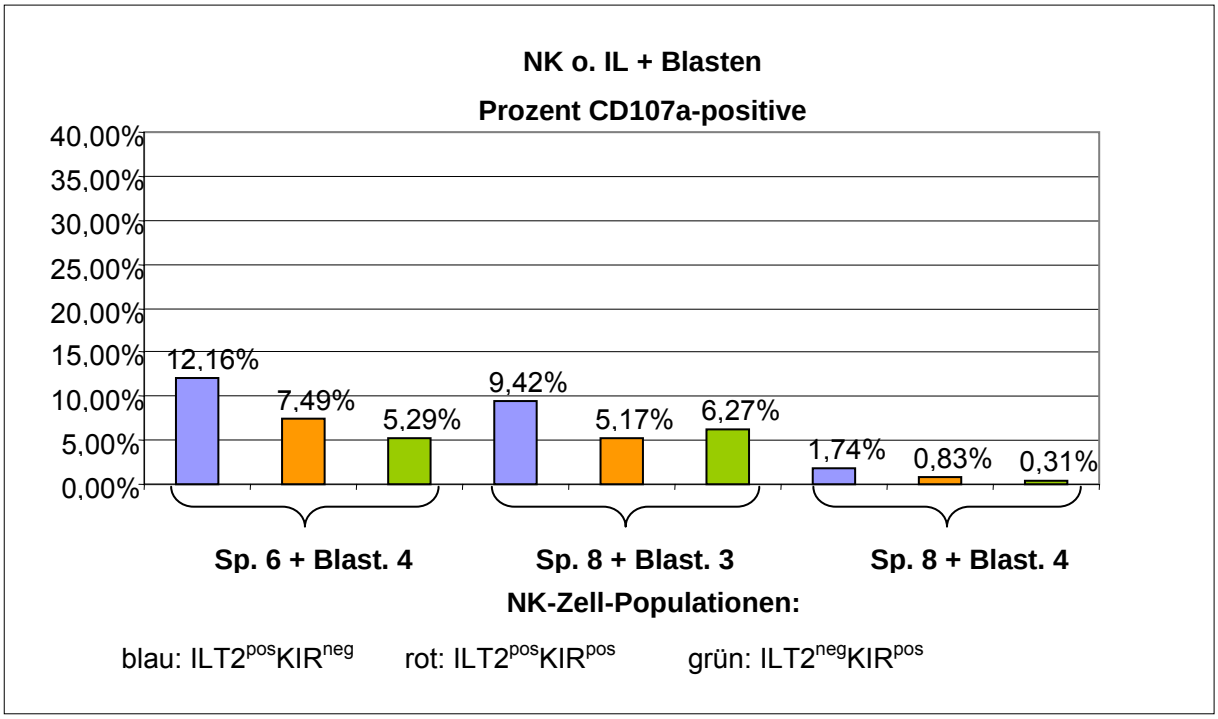
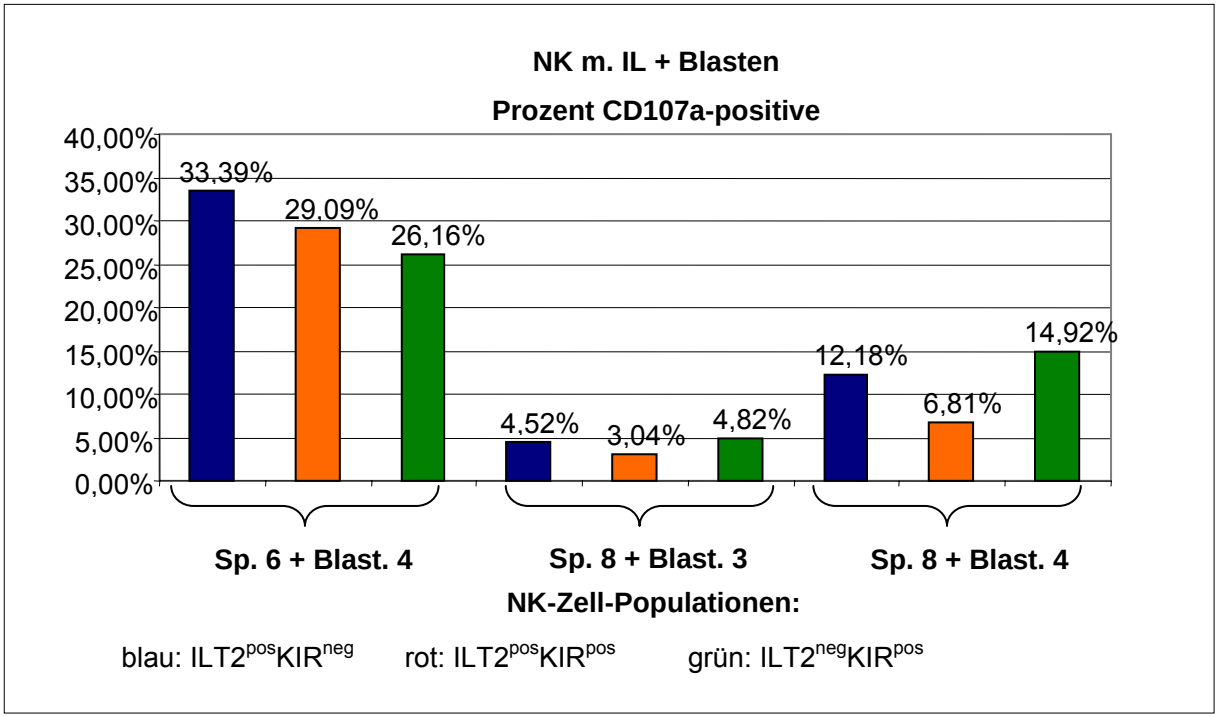


Abbildung 113



Bei den anderen Versuchen mit Blasten lag der Anteil der $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} Population an den CD107a-positiven NK-Zellen fast immer deutlich über dem Anteil der $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} Population, während die $ILT2^{neg}$ KIR^{pos} NK-Zellen nur einen sehr geringen Anteil ausmachten. Dies konnte so hier nicht beobachtet werden. Nur bei den Versuchen mit unstimulierten NK-Zellen von Spender 8 mit Blasten 4 sowie mit IL2-stimulierten NK-Zellen von Spender 6 und Blasten 4 bildete die $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} Population den größten Anteil und hier war auch der Anteil der $ILT2^{pos}$ KIR^{pos} NK-Zellen größer als derjenige der $ILT2^{neg}$ KIR^{pos}.

Beim Versuch mit unstimulierten NK-Zellen von Spender 6 mit Blasten 4 machten die $ILT2^{pos}$ KIR^{pos} NK-Zellen den größten Anteil aus, gefolgt von der $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} Population.

In allen anderen Versuchen bildeten die $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} NK-Zellen den geringsten Teil der CD107a-positiven NK-Zellen, während die $ILT2^{neg}$ KIR^{pos} NK-Zellen am stärksten vertreten waren.

Abbildung 114

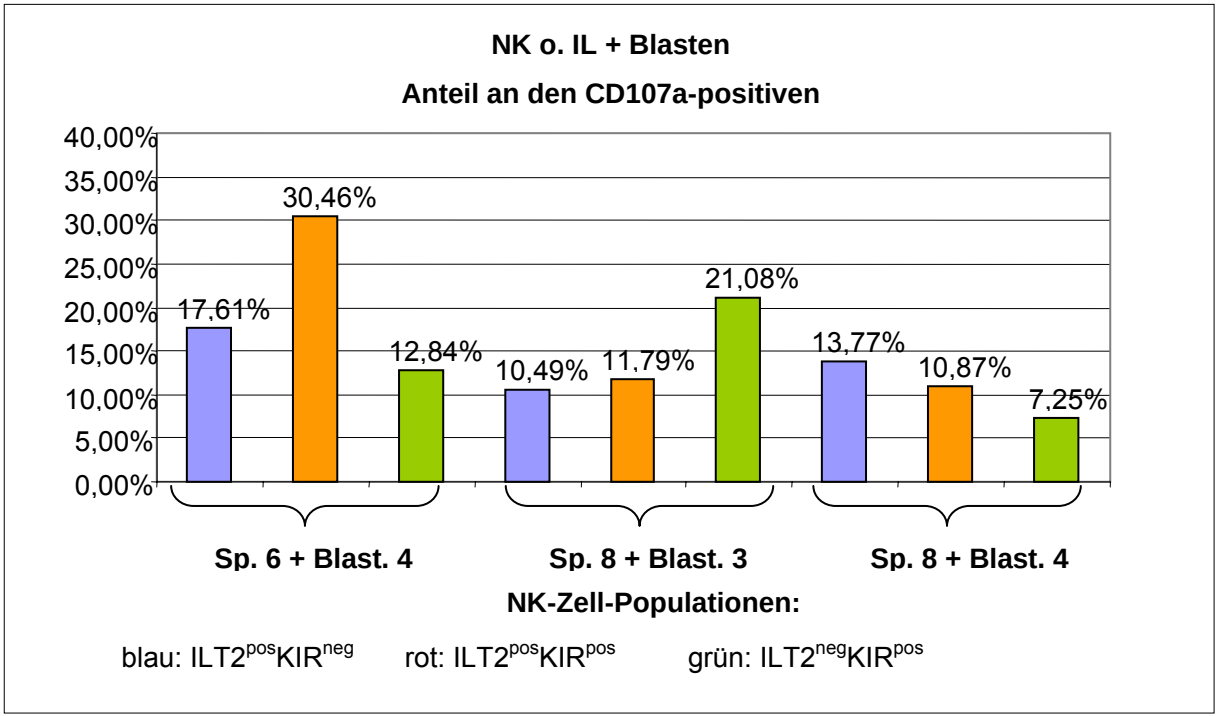
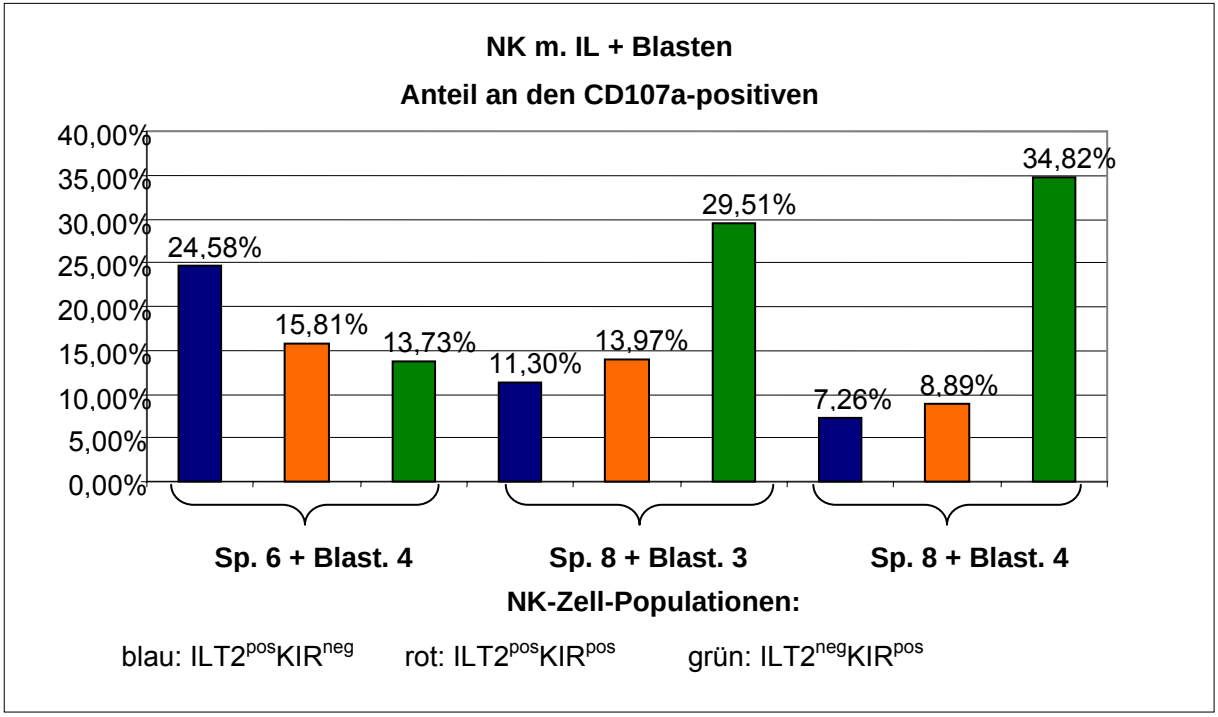


Abbildung 115



4 Diskussion

In der Therapie von Leukämien mit einer Stammzelltransplantation ist es wichtig, Strategien zur Behandlung einer MRD und zur Verhinderung eines Rezidivs zu entwickeln. Der Einsatz von NK-Zellen hat sich dabei in der Vergangenheit, gerade bei einer haploidenten Transplantation, als vielversprechend erwiesen.

Ziel dieser Arbeit war es, diese Zellart näher zu untersuchen und herauszufinden, welche Populationen hauptsächlich für die Vermittlung der Zell-Lyse verantwortlich sind. Dazu wurden die NK-Zellen im CD107a-Assay mit Targetzellen inkubiert und anschließend mittels FACS-Analyse hinsichtlich ihrer Oberflächenmoleküle charakterisiert.

4.1 Methodenkritik

4.1.1 MACS-Anreicherung von NK-Zellen

Die von S. Miltenyi et al. entwickelte Methode zur Anreicherung von Zellen mithilfe von Microbeads, die gegen charakteristische Oberflächenantigene gerichtet sind und mit einem magnetischen Partikel kombiniert sind (S. Miltenyi et al., 1990), ist inzwischen gut etabliert (A. Grützkau et al., 2010). Dabei kann eine Reinheit von bis zu 99% erreicht werden (A. Geiselhart et al., 1996). Die Aktivität der Zellen sowie ihre Proliferation werden dadurch nicht beeinflusst (S. Miltenyi et al., 1990, A. Geiselhart et al., 1996).

4.1.2 CD107a-Assay und Durchflusszytometrie

Ein wichtiger Mechanismus, über den NK-Zellen Targetzellen lysieren könnnen, ist der Perforin-Granzym-Mechanismus, den auch zytotoxische T-Zellen verwenden. Hierbei werden Perforin und Granzym aus Lysosomen freigesetzt. Auf der Membran dieser zytoplasmatischen Granula befindet sich das lysosomen-assoziierte Membranprotein h-LAMP1 oder CD107a, das durch die Verschmelzung der Lysosomen-Membran mit der Zellmembran an der Zellaußenseite sichtbar wird (P. J. Peters et al., 1991, M. R. Betts et al., 2003).

Aufgrund dieser Erkenntis entwickelte die Arbeitsgruppe um G. Alter einen auf FACS basierenden Assay zur Untersuchung der funktionellen Aktivität von NK-Zellen. Sie konnten zeigen, dass die Markierung von CD107a sich eben dafür gut eignet, da die CD107a-Expression mit der Zytokinsekretion und der Lyse von Targetzellen korreliert und außerdem mehr funktionell aktive Zellen erfasst werden als bei der alleinigen Untersuchung auf Zytokinsekretion (G. Alter et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde das Versuchsprotokoll verwendet, das von O. Penack et al. beschrieben wurde (O. Penack et al., 2005). Dort wurde außerdem nach Durchführung des CD107a-Assays die Zytotoxizität der CD107a-positiven und -negativen NK-Zellen getrennt untersucht und so bestätigt, dass die CD107a-positiven NK-Zellen die Targetzell-Lyse vermitteln.
Der CD107a-Assay bietet demnach viele Vorteile (nach O. Penack et al., 2005): Er ist unkompliziert durchzuführen und zeigt zuverlässig die funktionelle Aktvität der NK-Zellen an. Außerdem wird nicht die Menge der lysierten Zellen gemessen wie bei anderen Zytotoxizitäts-Tests, sondern direkt die Effektorzellen auf ihre funktionelle Aktivität untersucht. Dies ermöglicht auch bei der anschließenden Durchflusszytometrie die gezielte Untersuchung der aktiven NK-Zellen auf weitere Oberflächenmoleküle.
Den Erwartungen ensprechend konnte auch in dieser Arbeit ein Anstieg der CD107a-Expression nach der Inkubation von NK-Zellen mit Targets ermittelt werden. Auch durch IL2-Stimulation stieg die CD107a-Expression an, allerdings mit Ausnahme der Versuche, die mit ALL-Blasten als Targets durchgeführt worden waren: hier war oft eine niedrigere CD107a-Expression in der Gesamtpopulation der NK-Zellen nach IL2-Stimulation zu beobachten.
Eine mögliche Erklärung dafür könnte in dem folgenden Problem liegen, das sich bei der Auswertung der FACS-Daten der Blastenversuche ergab. Hier war es schwierig, die CD56-positiven Zellen eindeutig von den CD56-negativen Zellen abzugrenzen, so dass möglicherweise auch einige Blasten in die Analyse der CD107a-Expression mit einbezogen wurden. Deshalb wurden drei Versuche durchgeführt, in denen die Blasten mit einem Antikörper gegen CD19 markiert worden waren, um sie so herausgaten zu können.
Bei den Versuchen, die in 3.3 beschrieben sind, waren bei der Auswertung der

Expression der aktivierenden Rezeptoren keine eindeutig positven bzw. negativen Populationen voneinander abzugrenzen. Es wurde deshalb der Geo mean für die Einschätzung der Expression des jeweiligen Rezeptors herangezogen.

4.2 Vergleich der CD107a-Expression in der Gesamtpopulation der NK-Zellen bei unterschiedlichen Targetzellen

Die untersuchten NK-Zellen erreichten nach Inkubation mit verschiedenen Targetzellen eine unterschiedlich hohe CD107a-Expression. Die höchste CD107a-Expression wurde in den Versuchen mit der Zelllinie K562 gemessen. Diese gilt als gutes NK-Zell-Target, da sie keine MHC-I-Moleküle exprimiert. Die CD107a-Expression lag in dieser Arbeit im Durchschnitt bei 4,77% für unstimulierte NK-Zellen bzw. bei 33,20% für NK-Zellen, die zuvor im IL2 stimuliert worden waren. Von ähnlichen Werten berichten O. Penack et al., und zwar maßen sie eine CD107a-Expression von bis zu 6% in Versuchen mit K562 und NK-Zellen, die nicht mit IL2 stimulierte worden waren (O. Penack et al., 2005). Höhere Werte erzielte die Arbeitsgruppe um G. Alter, hier lag die CD107a-Expression bei 17,4% nach Inkubation mit K562 und ebenfalls ohne IL2-Stimulation (G. Alter et al., 2004).

Die im Durchschnitt zweithöchste CD107a-Expression wurde in dieser Arbeit in den Versuchen mit Blasten gemessen. Anders als frühere Versuche vermuten ließen, wurden hier in den Versuchen mit den Blasten, die die zweithöchste HLA-Expression besaßen, die höchsten Werte für die CD107a-Expression beobachtet, die niedrigsten dagegen in den Versuchen mit den Blasten, die am wenigsten HLA exprimierten. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von M. Pfeiffer, die von einer geringen NK-Susceptibilität von Blasten mit hoher HLA-Expression sprechen, die sich allerdings durch Blockade der HLA-Moleküle überwinden lässt. Blasten mit geringer HLA-Expression dagegen werden gut von NK-Zellen lysiert (M. Pfeiffer, 2004, M. Pfeiffer et al., 2007, T. Feuchtinger et al., 2009).

4.3 Charakterisierung der NK-Zellen hinsichtlich der Oberflächenmoleküle CD56, CD16 und CD3

Die Oberflächenmoleküle CD56 und CD16 wurden schon früh zur Charakterisierung von NK-Zell-Subpopulationen herangezogen, die sowohl hinsichtlich ihres Reifezustandes als auch ihrer Funktionalität Unterschiede aufweisen. Unterschieden wird dabei zunächst zwischen $CD56^{bright}$ und $CD56^{dim}$ NK-Zellen. Während M. Cooper in ihrer Arbeit von 2001 dazu tendiert, diese beiden Populationen als terminal differenziert anzusehen, legen neuere Arbeiten die Vermutung nahe, dass $CD56^{bright}$ NK-Zellen frisch aus Stammzellen differenzierte Zellen sind, die dann zu $CD56^{dim}$ NK-Zellen heranreifen (A. G. Freud et al., 2006, C. Romagnani et al., 2007). Eine weiter Bestätigung dafür lieferten A. Chan et al. (2007), die durch Blockade von CD56 das Entstehen von $CD56^{dim}$ NK-Zellen verhindern konnten und somit diesem Molekül selbst eine Rolle bei der Differenzierung zuschrieben.

Die herausragende Funktion der $CD56^{bright}$ NK-Zellen besteht in der Zytokinproduktion (IFN-γ, TNF-β, IL-10 und -13 und GM-CSF), sie sind deshalb ein wichtiges Bindeglied zwischen der angeborenen und adaptiven Immunität (T. A. Fehninger et al., 2003). Außerdem sind sie verantwortlich für Adhäsion, Migration und Zell-Zell-Kommunikation (K. Wendt et al., 2006). Die $CD56^{dim}$ NK-Zellen dagegen werden als die vorwiegende Zytotoxizität-vermittelnde Population angesehen (M. Cooper et al., 2001, R. Jacobs et al., 2001). Bedeutsam hierfür ist wahrscheinlich auch der phänotypische Unterschied dieser zwei Populationen. Während $CD56^{dim}$-NK-Zellen KIR-Rezeptoren und ILT2 reichlich exprimieren, zeigen $CD56^{bright}$ NK-Zellen kaum bis keine Expression dieser Rezeptoren, dafür besitzen sie allerdings viel NKG2A (R. Jacobs et al., 2001, M. Cooper et al., 2001). Auch das Molekül CD16 wird von beiden Populationen unterschiedlich exprimiert: $CD56^{bright}$ NK-Zellen besitzen (im unstimulierten Zustand) kaum CD16, dagegen sind $CD56^{dim}$ NK-Zellen zu 95% $CD16^{pos}$ und haben somit auch die Fähigkeit zur ADCC (M. Cooper et al., 2001).

CD16 scheint aber nicht nur hinsichtlich der ADCC wichtig zu sein – $CD16^{neg}$

NK-Zellen gelten auch allgemein als unreif, während die Expression von CD16 mit erhöhter Funktionalität einhergeht (H. S. Warren et al., 1991). Im Einklang damit beschrieben A. Nagler et al. 1989 auch die Population der $CD56^{dim}$ $CD16^{pos}$ NK-Zellen als gute zytotoxische Zellen.

In einer neueren Arbeit von der Arbeitsgruppe um O. Penack (2005) dagegen, in der NK-Zellen mittels CD107a-Assay untersucht wurden, zeigten die $CD56^{dim}$ $CD16^{neg}$ NK-Zellen die höchste CD107a-Expression; sie steht damit im Widerspruch zu den Erkenntissen von Warren und Nagler. Die $CD56^{bright}$-NK-Zellen zeigten in dieser Arbeit keinerlei CD107a-Expression.

2007 gelang es dann der Arbeitsgruppe um B. Grzywacz, diese widersprüchlichen Erkenntisse in Einklang zu bringen. Sie konnten zeigen, dass die $CD56^{dim}$ $CD16^{pos}$ NK-Zellen die Expression von CD16 während der Interaktion mit dem Target herunterregulieren. Dieser Prozess ist dabei unabhängig von der Degranulation und auch nicht degranulierende Zellen verlieren CD16. Die hauptsächliche zytotoxische Zellpopulation ist demnach die (ursprünglich) $CD56^{dim}$ $CD16^{pos}$ Zellpopulation.

In der vorliegenden Arbeit gehörten die $CD56^{dim}$ $CD16^{neg}$ NK-Zellen zu den Populationen mit der höchsten CD107a-Expression. Da die Expression von CD56 und CD16 (wie bei O. Penack et al.) erst nach der Inkubation mit den Targetzellen gemessen wurde, bestätigt diese Beobachtung die Erkenntisse von Penack und Grzywacz. Teilweise zeigten in der vorliegenden Arbeit auch die $CD56^{dim}$ $CD16^{pos}$ NK-Zellen eine hohe CD107a-Expression. Möglicherweise verlief in diesen Fällen der Prozess der Herunterregulation von CD16 langsamer und war noch nicht abgeschlossen. Die Tatsache, dass die $CD56^{dim}$ $CD16^{pos}$-NK-Zellen jedoch vor allem durch den zweithöchsten Anteil an den CD107a-positiven NK-Zellen auffielen, bestätigt nochmals die Theorie von der Herunterregulation von CD16: sie waren zum Zeitpunkt der Analyse vermutlich noch am Anfang des lytischen Prozesses (und damit auch noch CD16-positiv), zeigten also auch schon eine CD107a-Expression, allerdings noch keine so hohe wie die NK-Zellen, die im lytischen Prozess schon weiter fortgeschritten und auch schon CD16-negativ waren.

Im Widerspruch zu O. Penack et al. (2005) zeigten in der vorliegenden Arbeit

auch die Population der CD56^{bright} CD16^{neg} NK-Zellen eine hohe CD107a-Expression. Die Ergebnisse von B. Grzywacz et al. dagegen bestätigen diese Beobachtung, denn auch in ihren Experimenten konnte bei dieser Zellpopulation eine CD107a-Expression nachgewiesen werden.

Auch andere Arbeiten konnten zeigen, dass diese Zellpopulation nicht völlig unfähig zur Zytotoxizität ist. Allerdings ist es nötig, dass sie (vor allem durch IL2) stimuliert werden, um aktiv werden zu können. Unter physioglogischen Umständen befinden sich die CD56^{bright} NK-Zellen hauptsächlich in Lymphknoten und Tonsillen; durch IL2 können sie aber mobilisiert werden und erwerben dann einen ähnlichen Phänotyp wie die CD56^{dim} NK-Zellen sowie eine ähnlich gute Fähigkeit zur Zytotoxizität (G. Ferlazzo, D. Thomas et al., 2004). In einer anderen Arbeit wurde eine Kultur von peripheren mononukleären Blutzellen untersucht und mit IL2, IL12 und IL15 stimuliert; dabei expandierten die CD56^{bright} NK-Zellen und zeigten eine gute Zytotoxizität gegen Tumorzellen (E. Takahashi et al., 2007). Der Grund für die gute Aktivierbarkeit der CD56^{bright} NK-Zellen auch durch niedrige Konzentrationen von IL2 liegt darin, dass sie einen hochaffinen heterotrimeren Rezeptorkomplex für IL2 besitzen (A. Nagler et al., 1990).

Konkordant zu diesen Erkenntissen konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Population der CD56^{bright} CD16^{neg} NK-Zellen durch IL2-Stimulation eine gleich hohe oder höhere CD107a-Expression entwickelte im Vergleich zu den CD56^{dim} NK-Zellen.

Was die Verteilung der Populationen in den CD107a-positiven NK-Zellen betrifft, machten die CD56^{dim} CD16^{neg} NK-Zellen in dieser Arbeit (vor allem in den Versuchen mit K562) jedoch den weit höheren Anteil aus. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die CD56^{bright} NK-Zellen nur zu einem geringen Teil im peripheren Blut vorhanden sind (M. Cooper et al., 2001, G. Ferlazzo, D. Thomas et al., 2004).

4.4 Charakterisierung der NK-Zellen hinsichtlich der Rezeptoren CD69, NKp30, NKp44, NKp46 und NKG2D

In der letzten Zeit erlangte die Untersuchung der aktivierenden Rezeptoren von NK-Zellen zunehmend Beachtung. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der NK-Aktivität. Erst kürzlich wurde eine Arbeit veröffentlicht, in der gezeigt werden konnte, dass sich die Expression aller NCRs (Natural Cytotoxicity Receptors, also NKp30, NKp44, NKp46), von CD69 und NKG2D von NK-Zellen gesunder Spender erhöhte, nachdem sie einige Tage mit IL2 inkubiert worden waren. Auch die Zytotoxizität gegenüber K562 und Neuroblastomzellen war stärker und die Zytokinsekretion höher (S. Huenecke et al., 2010). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen dies – zumindest für die Rezeptoren CD69, NKp30, NKp44 und NKG2D. Auch hier erhöhte sich die Expression dieser Rezeptoren nach Inkubation mit IL2 und ihre Expression war bei den für die Zytotoxizität verantwortlichen Zellen (also den CD107a-positiven) erhöht. Für NKp46 dagegen galt dies nur in einem Fall, außerdem zeigten die IL2-stimulierten NK-Zellen fast durchgehend eine niedrigere Expression als die unstimulierten.

Im Folgenden soll kurz auf die Bedeutung der einzelnen Rezeptoren eingegangen werden.

CD69 ist schon lange bekannt und wird außer von NK-Zellen auch von anderen Zellen des Immunsystems exprimiert. Es gilt als früher Aktivitätsmarker (R. Marzio et al., 1999). Schon früh konnte gezeigt werden, dass IL2 die CD69-Expression auf NK-Zellen induziert und gleichzeitig eine erhöhte Zytotoxizität bewirkt (L. L. Lanier et al., 1988); später wurde mittels anti-CD69-Antikörpern die Triggerung der NK-Aktivität durch diesen Rezeptor bewiesen (A. Moretta et al., 1991). Auch in einer neueren Arbeit wurde erneut die Rolle von CD69 hervorgehoben (J. North et al., 2007). Hier wurden NK-Zellen mit der Leukämie-Zelllinie CTV-1 präinkubiert, die Autoren sprechen von „priming“. Dies führte zu einer IL2-unabhängigen Aktivierung der NK-Zellen und zu einer zytotoxischen

Aktivität gegenüber NK-resistenten Zell-Linien, primären Leukämien und soliden Tumoren. Dabei war der hauptsächliche Trigger CD69: seine Expression wurde hochreguliert, der Vergleich $CD69^{pos}$ und $CD69^{neg}$ NK-Zellen zeigte, dass erstere hauptsächlich für die Zell-Lyse verantwortlich waren und schließlich verhinderte auch die Blockade des Liganden die Lyse. Bedeutsam dabei ist, dass gesunde hämatopoetische Zellen nicht angegriffen worden waren, da sie keinen Liganden für den Rezeptor besitzen (J. North et al., 2007). Interessanterweise gibt es allerdings auch eine neuere Untersuchung, die nahe legt, dass gerade die Herunterregulation von CD69 eine erhöhte NK-Aktivität mit sich bringt (E. Esplugues et al., 2005). Hier wurden monoklonale CD69-Antikörper eingesetzt, die eine Internalisierung von CD69 bewirkten. In vitro zeigte sich dadurch eine erhöhte Zytotoxizität der NK-Zellen und auch im Mausmodell führte die Therapie mit CD69-Antikörpern zu einer NK-abhängigen Lyse von Tumorzellen mit gebremstem Tumorwachstum und besserem outcome. Postuliert wurde ein Zusammenhang mit der reduzierten TGF-β-Produktion (E. Esplugues et al., 2005). Es handelt sich hierbei jedoch eher um eine Einzelmeinung, die große Mehrheit der Autoren vertritt die Meinung, dass die CD69-Expression ein Marker für NK-Aktivität ist.

Was die NCRs NKp30, NKp44 und NKp46 angeht, sind die Ergebnisse dagegen einheitlich. Schon im letzten Jahrzehnt konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass sie eine wichtige Rolle in der Aktivierung von NK-Zellen und in der Lyse von Tumor-Targetzellen spielen, da die Blockade mit Antikörpern die NK-Zytotoxizität unterband. Dabei sind je nach Target unterschiedliche Rezeptoren hauptsächlich beteiligt (S. Sivori et al., 1997, M. Vitale et al., 1998, D. Pende et al., 1999). Des Weiteren konnte eine Korrelation der Expressionsdichte der NCRs mit der spontanen Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen festgestellt werden (A. Moretta et al., 2001). Auch dass IL2-aktivierte NK-Zellen eine bessere Zytotoxizität auch gegen vorher resistente Targets zeigen, hängt vermutlich zum Teil mit der Expression von NKp44 zusammen, die durch IL2 induziert wird, da sie so mehr aktivierende Liganden erkennen können (A. Moretta et al., 2001). In neueren Arbeiten wurde auf die klinische Bedeutung dieser Rezeptoren eingegangen. So wurde beobachtet,

dass ein Kontakt von NK-Zellen mit leukämischen Blasten zu einem Verlust oder einer Verminderung der Expression von NKp30 und NKp46 führte, während auch die Expression von NKp44 durch IL2 verhindert wurde (C. Fauriat et al., 2007). In dieser Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass in der Leukämie-Entwicklung NK-Zellen mit einem Phänotyp geringer oder keiner Expression von NCRs entstehen (NCR^{dull}), und zwar nicht begrenzt auf bestimmte AML-Subtypen oder zytogenetische Aberrationen. Diese NK-Zellen zeigten eine schlechte zytolytische Funktion und es bestand auch eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein eines NCR^{dull}-Phänotyps mit einem geringen Überleben bei AML. Entsprechend ist dieser Phänotyp bei Patienten, die eine komplette Remission erreichen, teilweise reversibel (C. Fauriat et al., 2007). Zudem wurde eine geringe Expression von NCR-Liganden auf AML-Blasten nachgewiesen, dies wurde als Strategie der Leukämiezellen gewertet, der Immunantwort zu entgehen (P. Nowbakht et al., 2005).

Auch NKG2D spielt eine große Rolle in der Lyse von Tumorzellen. Bei maligner Transformation oder auch bei Infektion einer Zelle werden Liganden für diesen Rezeptor exprimiert, die dann die Zytotoxizität von NK-Zellen triggern können (S. Bauer et al., 1999, A. P. Makrigiannis et al., 2003, M. Champsaur et al., 2010). Dabei kann unter diesen Stressbedingungen das aktivierende Signal über NKG2D stärker sein als die inhibitorischen Signale anderer Rezeptoren und so die NK-Aktivität bei Infektion und Tumor gesichert werden (S. Bauer et al., 1999, P. Obeidy et al., 2009). Auch im Schutz vor Tumorentstehung scheint NKG2D wichtig zu sein, wie Versuche mit Tumorinduktion an Mäusen nahe legten (M. J. Smyth et al., 2005). Erwähnenswert ist außerdem, dass unterschiedliche Haplotypen des Rezeptors existieren, die zu erhöhter bzw. erniedrigter NK-Aktivität führen und damit das Krebsrisiko erhöhen oder erniedrigen (T. Hayashi et al., 2006). Wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt, können Zytokine die NKG2D-Expression erhöhen. Dies gilt für die Inkubation mit IL2 (V. Decot et al., 2010) – in dieser Arbeit wurde dann auch eine erhöhte Zytotoxizität der NK-Zellen nachgewiesen. Außerdem haben neben IL2 auch IL15 und IL18 den gleichen Effekt, was sich auch therapeutisch nutzen ließe (S. Verheyden et al., 2008). Doch nicht nur die Expression des

Rezeptors selbst ist wichtig, auch das Vorhandensein seiner Liganden wurde in der letzten Zeit untersucht. Salih et al. zeigten 2003, dass NKG2D-Liganden, hauptsächlich MICA, auf Leukämiezellen heterogen exprimiert werden und dass die Expression interindividuell zu variieren scheint, nicht je nach Leukämieart. Dabei werden Zellen mit hoher MICA-Expression trotz MHC-I-Expression von NK-Zellen NKG2D-abhängig lysiert (H. R. Salih et al., 2003). Allerdings kann eine konstitutive Expression von NKG2D-Liganden auch zu einer Art Toleranz führen und die Aktivierung über NKG2D schwächen (M. Champsaur et al., 2010) und lösliche Liganden, die von Tumorzellen sezerniert werden, führen zu einer Herunterregulation von NKG2D und einer verringerten NK-Aktivität (A. P. Makrigiannis et al., 2003). Daraus könnten therapeutische Ansätze entwickelt werden. So wäre es denkbar, bei Patienten, bei denen keine NKG2D-Liganden exprimiert werden, diese medikamentös zu induzieren, z.B. mit Chemotherapie (DNA-Schäden führen zur Ligand-Expression) oder mit TGF-β-Antagonisten. Andersherum wären bei Patienten, die eine konstitutiv hohe Expression von Liganden zeigen, die zu einer Schwächung des Rezeptors führt, Medikamente zur Senkung der Expression nötig. Zuletzt könnten neue Erkenntnisse über die zugrunde liegenden Mechanismen bei löslichen Liganden im Serum neue Möglichkeiten zur Therapie eröffnen (M. Champsaur et al., 2010).

Beim Vergleich der Ergebnisse für die einzelnen Rezeptoren in der vorliegenden Arbeit fiel auf, dass für unterschiedliche Rezeptoren unterschiedliche Spender die höchsten Werte aufwiesen. Außerdem war die Expression der einzelnen Rezeptoren in den CD107a-positiven NK-Zellen je nach Target-Zelle unterschiedlich.

Auf Tumorzellen sind unterschiedliche Liganden für aktivierende Rezeptoren vorhanden und je nach Tumor sind andere Rezeptoren relevant. Es konnte gezeigt werden, dass je nach Target entweder hauptsächlich NKG2D verantwortlich für die Lyse war oder auch die NCRs; teils auch alle Rezeptoren zusammen (D. Pende et al., 2001). In einer neueren Arbeit wurde daraus die Idee entwickelt, einen Spender nach dem passenden NK-Phänotyp für den jeweiligen Tumor zu suchen, also zum Beispiel NK-Zellen mit hoher NKG2D-,

NKp30- und NKp44-Expression bei Melanom. Die NK-Zellen mit hoher Expression dieser Rezeptoren zeigten eine bessere Zytotoxizität und mit Blockadeversuchen konnte nachgewiesen werden, dass dies an eben jenen Rezeptoren lag (G. Markel et al., 2009).

Ein Problem ergibt sich allerdings, wenn Tumorzellen keine oder wenig Liganden für die aktivierenden Rezeptoren exprimieren. So mag eine schlechtere Suszeptibilität von B-ALL-Zellen gegenüber NK-Zellen daran liegen, dass diese Zellen negativ für die NKG2D-Liganden MICA/B sind und auch andere Liganden für aktivierende Rezeptoren weniger exprimieren (S. Verheyden et al., 2008). Auch viele AML-Blasten exprimieren wenig Liganden für NKG2D und NCRs, um so der Immunantwort zu entgehen. P. Nowbakht et al. konnten zeigen, dass eine in vitro-Zugabe von Wachstumsfaktoren, die eine Differenzierung bewirken, und IFN-γ zu einer Hochregulierung der Expression dieser Liganden führte und dadurch auch zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber einer Lyse durch NK-Zellen (P. Nowbakht et al., 2005). Auch in einer anderen Arbeit wird als therapeutischer Ansatz der Einsatz von Wachstumsfaktoren besprochen, die zu einer Hochregulation von NKG2D-Liganden auf Tumorzellen führen, die dadurch besser von NK-Zellen lysiert werden können (A. Rohner et al., 2007).

4.5 Charakterisierung der NK-Zellen hinsichtlich inhibitorischer Rezeptoren für HLA-Moleküle

Unabdingbar für die Funktion von NK-Zellen sind ihre Rezeptoren für HLA-Moleküle, die hauptsächlich inhibitorische Signale übertragen. Diese sind zum Einen die KIR-Rezeptoren, die spezifisch für bestimmte Gruppen von HLA-I-Molekülen sind und die Rezeptoren ILT2 und NKG2A, die eine breitere Spezifität aufweisen. Die typischen alloreaktiven NK-Zellen exprimieren einen oder mehrere KIR-Rezeptoren für HLA-Moleküle, die im Empfänger nicht exprimiert werden, und kein NKG2A, da HLA-E, dessen Ligand, sich auf allen HLA-I-positiven Zellen befindet (L. Moretta et al., 2009).

Dementsprechend zeigten $NKG2A^{pos}$ NK-Zellen in Versuchen mit AML-Blasten

keine gute Zytotoxizität; diese konnte allerdings durch Blockade von NKG2A gesteigert werden (S. Nguyen et al., 2005, D. Pende et al., 2005). Allerdings handelte es sich zumindest in der Arbeit von Nguyen um NK-Zellen nach Stammzelltransplantation, die sich in ihrer Regulation und ihrem zytotoxischen Verhalten von NK-Zellen Gesunder unterscheiden. Andererseits lysierten $NKG2A^{pos}KIR^{neg}$ NK-Klone pädiatrische B-ALL-Blasten, die eine reduzierte HLA-Expression und damit auch wenig HLA-E aufwiesen, gut (T. Feuchtinger et al., 2009). Ähnlich gut waren in dieser Arbeit die single-KIR-positiven NK-Zellen, die einen KIR ohne Ligand auf den Targetzellen exprimierten.

Was die Reifung von NK-Zellen angeht, spielt die NKG2A-Expression ebenfalls eine Rolle. $CD56^{bright}$ NK-Zellen, die als unreif gelten (A. Chan et al., 2007), haben eine hohe NKG2A-Expression, aber wenig KIRs und ILT2 – bei den reiferen $CD56^{dim}$ NK-Zellen verhält es sich umgekehrt (M. Cooper et al., 2001). In ihrem Reifungsprozess durchlaufen NK-Zellen demnach die Stadien von $NKG2A^{neg}$ KIR^{neg} über $NKG2A^{pos}$ KIR^{neg} und $NKG2A^{pos}$ KIR^{pos} bis hin zu $NKG2A^{neg}$ KIR^{pos} NK-Zellen (S. Cooley et al., 2007).

Die Arbeitsgruppe um M. Yawata schrieben der Expression von NKG2A außerdem eine wichtige Rolle in der Regulation des NK-Zell-Repertoires zu (M. Yawata et al., 2008). Sie untersuchten das NK-Repertoire von 58 Spendern und testeten die Zytotoxizität gegenüber HLA-Klasse-I-negativen Targetzellen. Sie fanden eine sehr gute Zytotoxizität bei NK-Zellen, die einfach positiv für einen KIR waren, für den es einen Liganden im Spender gab (self-KIR, S-KIR); allerdings fiel die missing-self-Antwort unterschiedlich aus, je nach HLA- und KIR-Polymorphismus – es gab also „starke“ und „schwache“ HLA-KIR-Paarungen. Die $NKG2A^{pos}$ NK-Zellen zeigten durchgehend eine gute missing-self-Antwort. Schlecht dagegen waren NK-Zellen ohne jeden inhibitorischen Rezeptor (diese sind unreif nach S. Cooley et al., 2006), single-KIR-positive NK-Zellen mit einem KIR ohne Ligand im Spender (non-self-KIR, NS-KIR) und $ILT2^{pos}$ NK-Zellen. Das NK-Repertoire besteht demnach aus Subpopulationen mit unterschiedlichen Levels in der missing-self-Antwort und wird deshalb in der Entwicklung so strukturiert, dass eine balancierte Immunantwort resultiert. Dabei kommt NKG2A eine Pufferfunktion zu, weil es eine konstante missing-

self-Antwort vermittelt, und wird deshalb öfter exprimiert bei Individuen mit mehreren besonders starken oder besonders schwachen HLA-KIR-Kombinationen.

Eine etwas abgewandelte Hierarchie für die Zytotoxizität der NK-Subpopulationen stellten J. Yu et al. (2007) auf: Am besten waren in ihrer Arbeit die NKG2A/ILT2^{pos} S-KIR^{pos} NK-Zellen vor den single-S-KIR-positiven; diese wiederum waren besser als NKG2A^{pos} KIR^{neg} und ILT2^{pos} KIR^{neg}; am schlechtesten waren single-NS-KIR-positiven NK-Zellen. Je mehr S-KIRs exprimiert wurden, desto besser waren die NK-Zellen in ihrer zytotoxischen Funktion. Im Einklang mit diesen Ergebnissen postulierte auch A. T. Björlund et al. (2010), dass NS-KIR-positive NK-Zellen in ihrer Funktion vergleichbar seien mit hyporesponsiven NKG2A^{neg} KIR^{neg} NK-Zellen.

Die herausragende Rolle der S-KIR-positiven NK-Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit so nicht bestätigt werden. Vielmehr zeigte sich in der Gesamtschau der Versuche mit Transfektanten und Blasten, bei denen die inhibitorischen Rezeptoren untersucht worden waren, dass die single-KIR-positiven NK-Zellen im Vergleich wenig CD107a exprimierten und einen kleinen Anteil in den CD107a-positiven NK-Zellen ausmachten – egal, ob es sich um S- oder NS-KIRs handelte. Den größten Anteil an den CD107a-positiven NK-Zellen machten diejenigen Populationen aus, die für mindestens einen KIR negativ waren. Zu ihnen zählten demnach auch NK-Zellen, die NKG2A- oder ILT2-positiv waren. Dies war so auch bei den Versuchen zu beobachten, die mit CD19-Markierung durchgeführt worden waren.

Bei der Untersuchung der Rezeptoren NKG2A und ILT2 zeigten in den Versuchen mit Transfektanten die NKG2A^{pos} KIR^{neg} und die ILT2^{pos} KIR^{neg} sehr gute CD107a-Expressionen und machten einen großen Anteil an den CD107a-positiven aus; bei den Versuchen mit Blasten galt dies in herausragender Weise für die ILT2^{pos} KIR^{neg}. Die CD107a-Expression dieser Populationen war gegenüber derjenigen in der Gesamtpopulation signifikant erhöht, allerdings galt dies für die NKG2A^{pos} KIR^{neg} Population in den Versuchen mit Transfektanten nur für die IL2-stimulierten NK-Zellen. In diesem Zusammenhang ist auch erwähnenswert, dass die CD107a-Expression der

NKG2A^{pos} KIR^{neg} Population durch IL2-Stimulation deutlich erhöht werden konnte. Dies spricht dafür, dass die Stimulation die Hemmung durch HLA-E überwinden konnte.

In den Versuchen mit CD19-Markierung konnte die herausragende Position der ILT2^{pos} KIR^{neg} Population nur zum Teil bestätigt werden. Sie gehörte zwar zu den Populationen mit der höchsten CD107a-Expression, allerdings zeigte teilweise die Population der ILT2^{neg} KIR^{pos} NK-Zellen eine höhere CD107a-Expression.

In der Literatur wurde bisher diesen beiden Populationen der ILT2^{pos} KIR^{neg} und NKG2A^{pos} KIR^{neg} keine so herausragende Rolle wie in der vorliegenden Arbeit zugeschrieben. Allerdings dominieren die NKG2A^{pos} NK-Zellen in der Zeit kurz nach einer HLA-identischen Stammzelltransplantation das funktionelle Repertoire und sind damit wichtig, um ein funktionelles, aber dennoch tolerantes NK-Zell-Repertoire aufrechzuerhalten (A. T. Björklund et al., 2010).

Der Rezeptor ILT2 wurde bei NK-Zellen nicht so intensiv untersucht wie die KIR-Rezeptoren. Durch die starke Bindung von ILT2 an das nichtklassische HLA-Molekül HLA-G (M. Shiroishi et al., 2003) und seine breite Spezifität auch für klassische HLA-I-Moleküle (M. Vitale et al., 1999) wird vor allem seiner inhibitorischen Funktion eine wichtige Rolle zugedacht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Bindung dieses Rezeptors sowohl die Zell-Lyse als auch die IFNγ-Produktion inhibiert (E. Morel et al., 2008). Außerdem führt HLA-G dazu, dass die ILT2-Expression und die Expression anderer inhibitorischer Rezeptoren hochreguliert wird, was möglicherweise zu einer Verstärkung der Hemmung von Effektorzellen und einer Erhöhung der Aktivierungsschwelle führt. Dies würde einen Schutz auch für Zellen ohne HLA-G bedeuten und wäre damit Teil von Mechanismen, der Immunantwort zu entgehen (J. LeMaoult et al., 2005).

Als potenteste alloreaktive NK-Zellen gelten in der Literatur die KIR-positiven NK-Zellen, und zwar vor allem, wenn ein mismatch zwischen Spender und Empfänger besteht. Hierfür gibt es zwei Modelle. Zum Einen ist das Ligand-Ligand-Modell zu nennen, bei dem die HLA-Expression von Spender und Empfänger entscheidend ist. Aufgrund dieses Modells gelang eine gute

Vorhersage bei AML-Patienten, nicht jedoch bei ALL (L. Ruggeri et al., 2002). Das andere Modell, das Rezeptor-Ligand-Modell, definiert ein mismatch dann, wenn ein KIR-Rezeptor im Spender vorhanden ist, für den es keinen Liganden im Empfänger gibt. Hiermit gelang für ALL-Patienten eine gute Vorhersage (W. Leung et al., 2004). Allerdings gibt es auch Studien, bei denen kein positiver Effekt durch ein mismatch beobachtet werden konnte (S. Nguyen et al., 2005). Mögliche Gründe hierfür können Unterschiede im Konditionierungsregime, im Grad der T-Zell-Depletion, in der Immunsuppression (insbesondere der Behandlung mit ATG) und in der Erkrankung der Patienten sein (nach M. Pfeiffer et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit konnte bei den Versuchen mit Transfektanten in drei von fünf Fällen, bei denen ein mismatch vorlag, eine höhere CD107a-Expression in der Gesamtpopulation beobachtet werden, allerdings war der Unterschied nicht signifikant. Bei den Versuchen mit Blasten zeigte sich keine höhere CD107a-Expression bei den Konstellationen mit mismatch. Bei der Betrachtung der einzelnen KIRs konnte ebenfalls keine eindeutige Aussage hinsichtlich missing self bzw. mismatch getroffen werden. Bei den Kombinationen Spender 6 – Blasten 4 und Spender 8 – Blasten 3 zeigten sowohl bei den Versuchen mit CD56-Markierung als auch bei denjenigen mit CD19-Markierung die NK-Zellpopulationen, die single-positiv für einen self-KIR mit missing self waren, eine höhere CD107a-Expression als die anderen single-KIR-positiven Populationen. Für die anderen Kombinationen galt dies jedoch nicht, obwohl auch hier self-KIRs, die ein missing self erkennen konnten, vorhanden waren. Bei den Versuchen mit Transfektanten gab es fünf Kombinationen, in denen eine single-KIR-positive Population, die ein missing self erkannte, eine höhere CD107a-Expression zeigte (darunter drei S-KIR-positive) – allerdings ebenso viele, bei denen keine höhere CD107a-Expression zu verzeichnen war.

4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit wurden NK-Zellen mittels CD107a-Assay untersucht und hinsichtlich ihrer Oberflächenmoleküle charakterisiert. Die NK-Zellpopulationen mit besonders guter Fähigkeit zur Zytotoxizität konnten dabei durch besonders hohe CD107a-Expression und einen besonders hohen Anteil unter den CD107a-positiven identifiziert werden und mittels FACS-Analyse weiterer Oberflächenmoleküle näher charakterisiert werden.

So zeigten NK-Zellen, die $CD56^{dim}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$ und $CD56^{bright}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$ waren, eine hohe CD107a-Expression. Erstere machten, zusammen mit den $CD56^{dim}$ $CD16^{pos}$ $CD3^{neg}$, auch einen hohen Anteil an CD107a-positiven NK-Zellen aus. Die $CD56^{bright}$-NK-Zellen zeigen insbesondere durch IL2-Stimulation eine erhöhte zytotoxische Aktivität.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die aktivierenden Rezeptoren CD69, NKp30, NKp44 und NKG2D wichtig für die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen sein müssen, da ihre Expression in den CD107a-positiven deutlich höher lag als in der Gesamtpopulation und auch durch IL2-Stimulation anstieg. Lediglich für den Rezeptor NKp46 waren die Ergebnisse nicht eindeutig.

Bei der Betrachtung der inhibitorischen Rezeptoren waren herausragende Populationen die $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} und bei den Versuchen mit Transfektanten auch die $NKG2A^{pos}$ KIR^{neg}, was ihre CD107a-Expression und ihren Anteil an den CD107a-positiven anging. Die CD107a-Expression der NKG2A-positiven NK-Zellen konnte durch IL2-Stimulation außerdem deutlich gesteigert werden. Auch die Populationen, die für mindestens einen KIR negativ waren und damit zumindest zum Teil auch positiv für ILT2 und NKG2A, machten durchgehend einen sehr hohen Anteil an den CD107a-positiven aus. Die single-KIR-positiven NK-Zellen zeigten dagegen kaum eine CD107a-Expression und insbesondere die Bedeutung des missing self und dadurch eine erhöhte zytotoxische Aktivität konnte hier so nicht einheitlich bestätigt werden. Allerdings war es bei den Versuchen mit Blasten teilweise nicht einfach, die NK-Zellen in der FACS-Auswertung von den Blasten abzugrenzen. Deshalb wurden Versuche durchgeführt, in denen die Blasten mit anti-CD19-Antikörpern markiert wurden. Diese Versuche konnten die vorigen Ergebnisse nur zum Teil bestätigen. So

zeigten die single-KIR-positiven NK-Zellen eine höhere CD107a-Expression als zuvor und die herausragende Stellung der Population der $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} konnte nur zum Teil bestätigt werden. Zwar gehörte sie zu den Populationen mit der höchsten CD107a-Expression, allerdings zeigte teilweise die Population der $ILT2^{neg}$ KIR^{pos} NK-Zellen eine höhere CD107a-Expression. Wie zuvor waren aber auch hier die Populationen, die für mindestens einen KIR negativ waren und damit auch zum Teil positiv für ILT2 und NKG2A, am meisten in den CD107a-positiven vertreten. Es ist dennoch nötig, in weiteren Versuchen die Rolle der $LT2^{pos}$ KIR^{neg} Population weiter zu klären. Sollte eine größere Versuchsreihe, in der die Blasten mit CD19 markiert werden, die gleichen Ergebnisse erbringen wie der Hauptteil der Versuche in dieser Arbeit, so wäre ein weiterer Schritt, die ILT2-positiven NK-Zellen zu isolieren und weiter zu untersuchen.

Insgesamt kann ein Wissen um die NK-Zell-Populationen mit der besten zytotoxischen Fähigkeit dazu beitragen, Kriterien für Spender festzulegen, bei denen eine besonders gute Chance besteht, dass die NK-Zellen bei einer Stammzelltransplantation einen potenten antileukämischen Effekt vermitteln oder die besonders gut geeignet sind, um NK-Zellen für eine Immuntherapie zu spenden. Außerdem scheint der therapeutische Einsatz von Zytokinen vielversprechend, da dadurch die NK-Aktivität gesteigert werden kann, indem aktivierende Rezeptoren hochreguliert und zuvor weniger aktive Populationen „rekrutiert“ werden können.

5 Zusammenfassung

NK-Zellen sind vor allem im Rahmen von haploidenten Stammzelltransplantationen sehr bedeutsam, da sie einen antileukämischen Effekt vermitteln können, ohne dabei eine GvHD zu verursachen. Die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen wird durch das Zusammenspiel einer Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren reguliert, die inhibitorische und aktivierende Signale übermitteln. Dabei sind NK-Zellen keine homogene Zellpopulation, sondern bestehen aus Subpopulationen mit unterschiedlichem zytotoxischen Potential. Deshalb ist es wichtig, die NK-Zell-Populationen zu charakterisieren, die eine besonders gute Fähigkeit zur Zytotoxizität besitzen. Dafür ist der CD107a-Assay hervorragend geeignet, denn er bietet die Möglichkeit, die NK-Zellen, die degranulieren und zytolytische Enzyme freisetzen, durch ihre CD107a-Expression zu identifizieren und mittels FACS-Analyse näher zu charakterisieren. In dieser Arbeit wurden NK-Zellen gesunder Spender mit verschiedenen Targetzellen (den Zelllinien K562, Sk-N-Be, Cw3- und Cw4-Transfektanten und mit leukämischen Blasten von pädiatrischen Patienten der Uniklinik Tübingen) inkubiert und mittels CD107a-Assay und FACS-Analyse hinsichtlich ihrer Expression von verschiedenen Oberflächenmarkern untersucht.

Allgemein konnte zunächst gezeigt werden, dass die CD107a-Expression der NK-Zellen durch IL2-Stimulation und nach Inkubation mit Targetzellen anstieg.

Bei der näheren Untersuchung kristallisierten sich in Versuchen mit K562 und Sk-N-Be dann die NK-Zellen, die $CD56^{dim}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$ und $CD56^{bright}$ $CD16^{neg}$ $CD3^{neg}$ waren, als Population mit besonders hoher CD107a-Expression heraus; die erstere Population war auch mit einem großen Anteil in den CD107a-positiven NK-Zellen vertreten, zusammen mit den $CD56^{dim}$ $CD16^{pos}$ $CD3^{neg}$ NK-Zellen. Bei den Versuchen mit Sk-N-Be waren die Ergebnisse allerdings nicht so deutlich wie bei den Versuchen mit K562. In der Literatur finden diese Ergebnisse weitgehend Bestätigung – die $CD56^{dim}$ NK-Zellen werden als gute zytotoxische NK-Zellen beschrieben, die ihre CD16-Expression während der Degranulation herunterregulieren. Auch den $CD56^{bright}$ NK-Zellen

wird ein gewissens zytotoxisches Potential zuerkannt, und zwar vor allem nach Stimulation mit IL2, was in der vorliegenden Arbeit ebenfalls bestätigt werden konnte.

Ebenfalls mit den Zelllinien K562 und Sk-N-Be wurden die NK-Zellen hinsichtlich ihrer Expression der aktivierenden Oberflächenmoleküle CD69, NKp30, NKp44, NKp46 und NKG2D untersucht. Bis auf den Rezeptor NKp46 zeigte sich, dass die Expression dieser Moleküle in der CD107a-positiven Fraktion der NK-Zellen höher war als in der Gesamtpopulation. Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Expression der untersuchten Rezeptoren (jedoch wiederum mit Ausnahme von NKp46) durch IL2-Stimulation anstieg. Damit konnte bestätigt werden, dass diese Rezeptoren eine wichtige Rolle in der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen spielen, was auch in der Literatur mehrfach beschrieben und auch durch Blockadeversuche nachgewiesen wurde. Dabei sind sowohl interindividuell verschiedene Rezeptoren dominierend, als auch je nach Targetzelle unterschiedliche Rezeptoren relevant.

Die inhibitorischen Rezeptoren CD158a, CD158b, CD158e, NKG2A und ILT2 wurden in Versuchen mit Cw3- und Cw4-Transfektanten und mit leukämischen Blasten pädiatrischer Patienten untersucht. Wie zuvor waren die NK-Zellen mit einem CD56-Antikörper markiert worden. Bei den Versuchen mit Blasten gestaltete es sich teilweise schwierig, eine eindeutig CD56-positive Population abzugrenzen. Deshalb wurden drei Versuche durchgeführt, in denen die Blasten mit einem CD19-Antikörper markiert und so in der FACS-Analyse ausgeschlossen werden konnten. Die Population der $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} und bei den Versuchen mit Transfektanten auch die der $NKG2A^{pos}$ KIR^{neg} hoben sich durch eine hohe CD107a-Expression und einen großen Anteil an den CD107a-positiven NK-Zellen heraus. Außerdem bewirkte bei den NKG2A-positiven NK-Zellen die IL2-Stimulation eine deutliche Steigerung iherer CD107a-Expression. In den Versuchen mit CD19-Markierung konnte dies allerdings nur zum Teil bestätigt werden. In allen Versuchen bildeten den größten Anteil an den CD107a-positiven die Populationen, die für mindestens einen KIR negativ waren – dazu gehörten also auch die ILT2- bzw. NKG2A-positiven. Die single-

KIR-positiven Populationen dagegen zeigten eine niedrige CD107a-Expression und waren auch kaum in den CD107a-positiven vertreten. In den Versuchen mit CD19-Markierung waren sie hinsichtlich ihrer CD107a-Expression etwas besser, nicht jedoch, was ihren Anteil an den CD107a-positiven NK-Zellen angeht. Dies steht im Widerspruch zu bisherigen Arbeiten, insbesondere auch im Hinblick auf die Theorie des „missing self“, dass nämlich NK-Zellen mit einem KIR-Rezeptor für ein HLA-Molekül, dass auf der Targetzelle nicht exprimiert wird, aber im Spender vorhanden ist, eine besonders gute Zytotoxizität aufweisen. In der vorliegenden Arbeit war nur in einigen Fällen zu beobachten, dass die single-KIR-positiven NK-Zellen, die ein missing self erkannten, besser waren als die anderen single-KIR-positiven Populationen. Auch die herausragende Rolle der $ILT2^{pos}$ KIR^{neg} und $NKG2A^{pos}$ KIR^{neg} Populationen ist so noch nicht beschrieben worden. Allerdings wird NKG2A die Vermittlung einer konstanten, mittelstarken Zytotoxizität zugeschrieben. Bei der näheren Untersuchung dieser Populationen in der vorliegenden Arbeit zeigte sich außerdem, dass sie eine höhere CD107a-Expression aufwiesen als die $ILT2^{pos}$ KIR^{pos} bzw. $NKG2A^{pos}$ KIR^{pos} NK-Zellen. In der Literatur werden dagegen die Populationen, die einen self-KIR und die Rezeptoren ILT2 und NKG2A exprimieren, als gute zytotoxische Effektorzellen beschrieben. Es ist deshalb wünschenswert, diesen Sachverhalt in einer größeren Versuchsreihe mit Blasten, die mit CD19 markiert werden sollten, zu klären. Sollten sich die bisherigen Ergebnisse bestätigen, wäre ein nächster Schritt, die markierten ILT2-positiven NK-Zellen mit FACS-Sortierung zu isolieren und näher zu untersuchen.

Im Hinblick auf die klinische Relevanz können sich die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntisse über die Charakteristik von NK-Zellen mit besonders hohem zytotoxischen Potential bei der Suche nach einem geeigneten Spender für eine Stammzelltransplantation oder eine Immuntherapie mit NK-Zellen als wertvoll erweisen. So ließe sich das NK-Repertoire in Frage kommender Spender untersuchen und so ein Spender ausgewählt werden, der NK-Zellen besitzt, die besonders vielversprechend im Hinblick auf ihr antileukämisches Potential sind.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Stimulation von NK-Zellen durch IL2 eine Steigerung ihres zytotoxischen Potentials bewirkt, und zwar zum Beispiel durch die Hochregulation von aktivierenden Rezeptoren oder auch durch die „Rekrutierung“ von Populationen, die zuvor weniger aktiv waren (genannt seien die $CD56^{bright}$ NK-Zellen und die $NKG2A^{pos}$ NK-Zellen). Dies spricht für einen therapeutischen Einsatz von Zytokinen, um so die NK-Aktivität zu steigern.

6 Anhang: Abbildungen zu 3.4.1 und 3.4.2

Zu 3.4.1 Versuche mit Cw3/Cw4-Transfektanten

Spender 2:

Abbildung 116

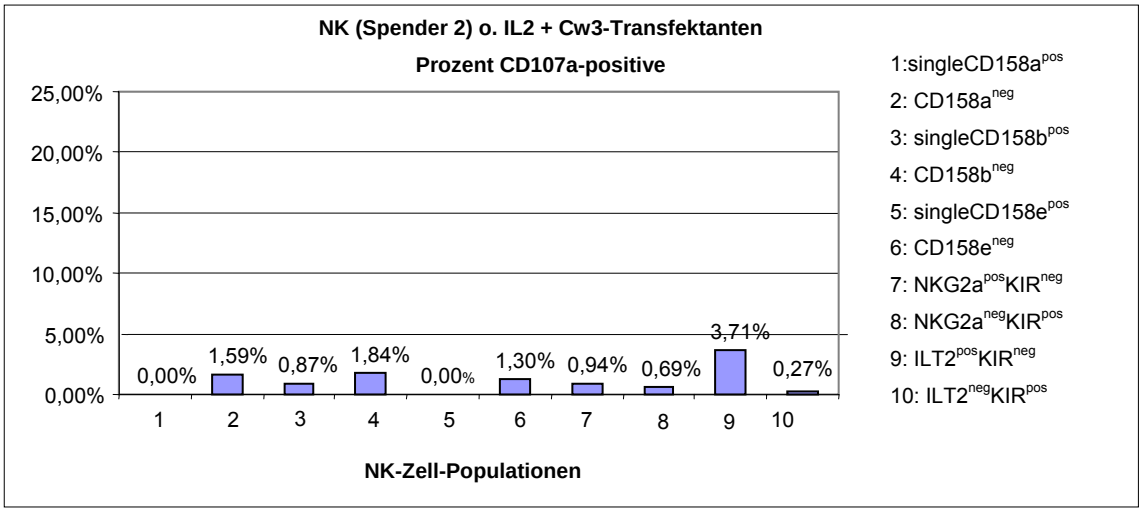


Abbildung 117

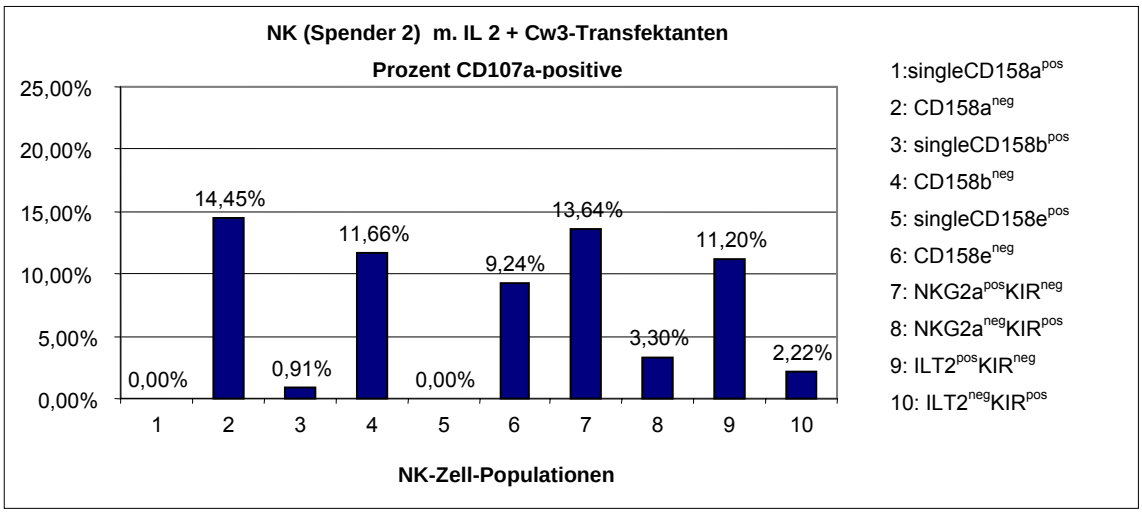


Abbildung 118

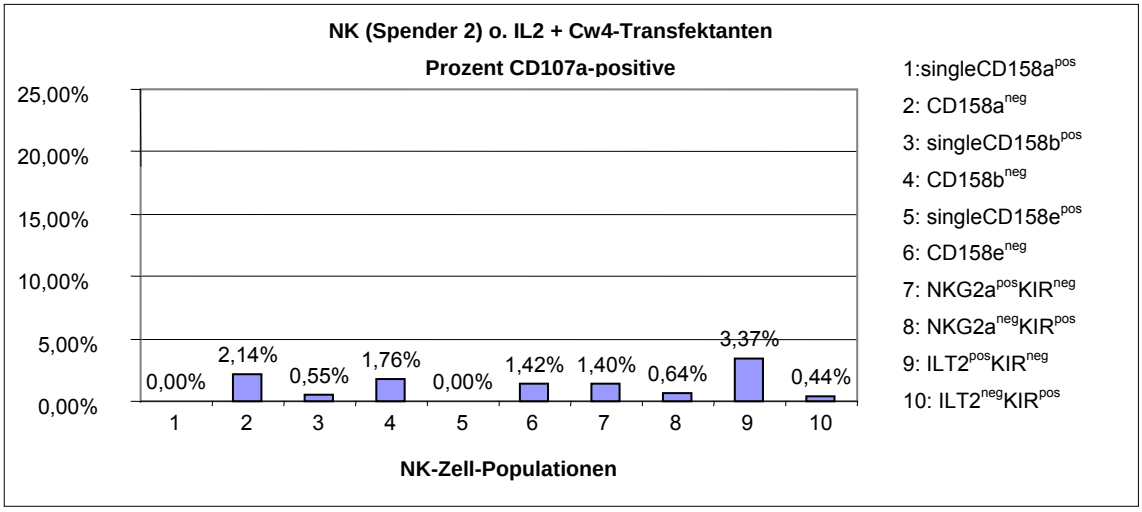


Abbildung 119

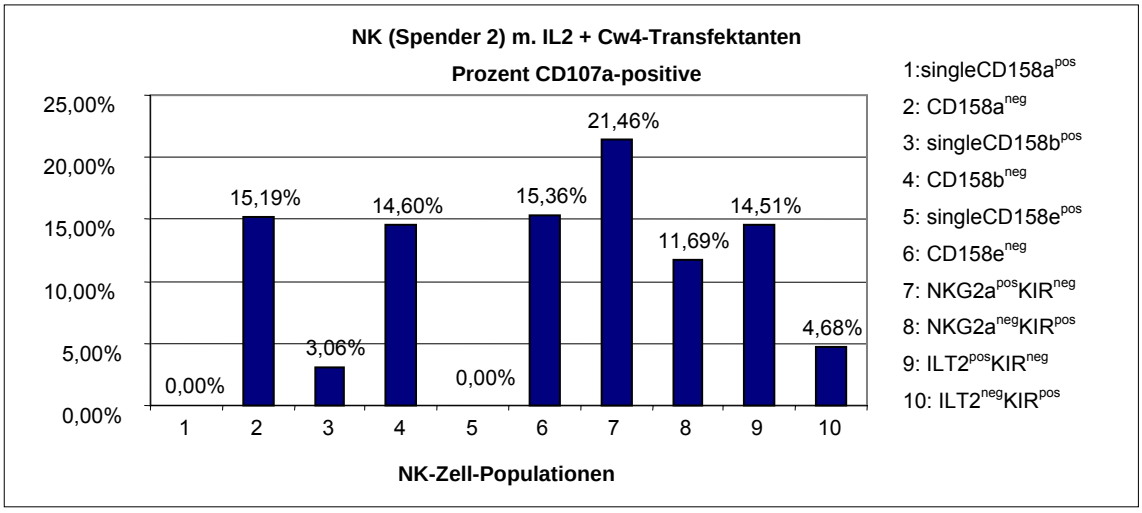


Abbildung 120

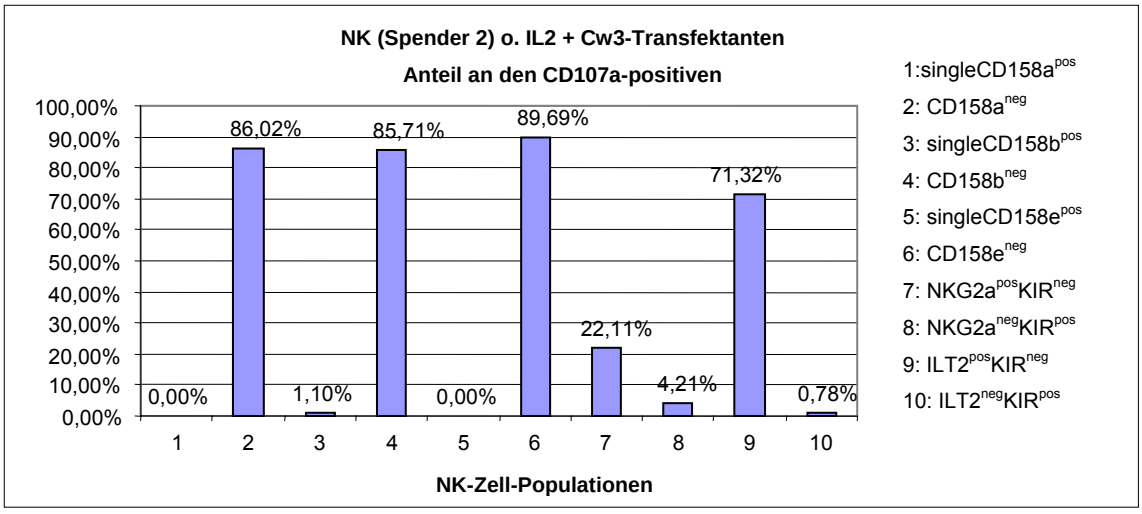


Abbildung 121

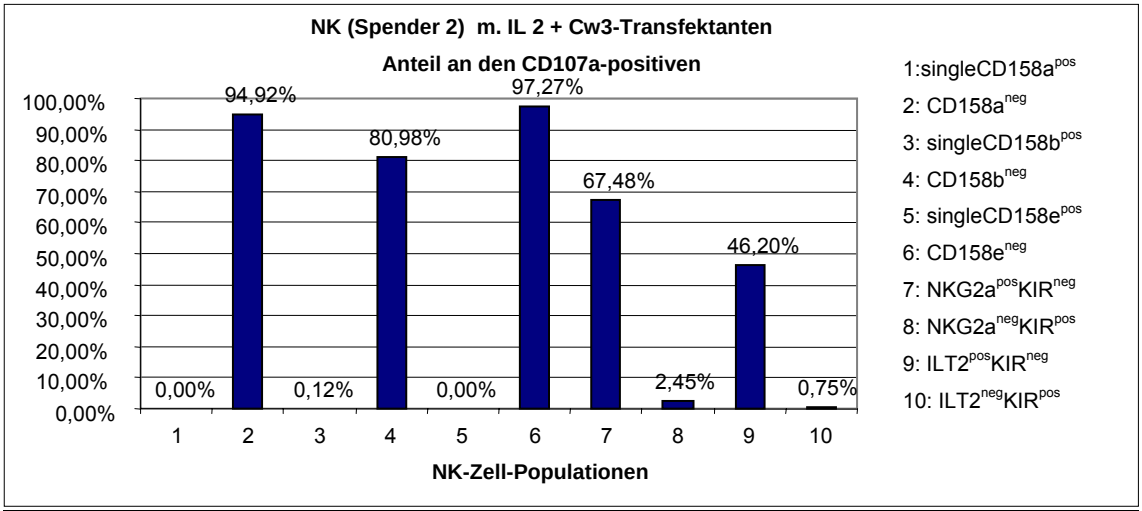


Abbildung 122

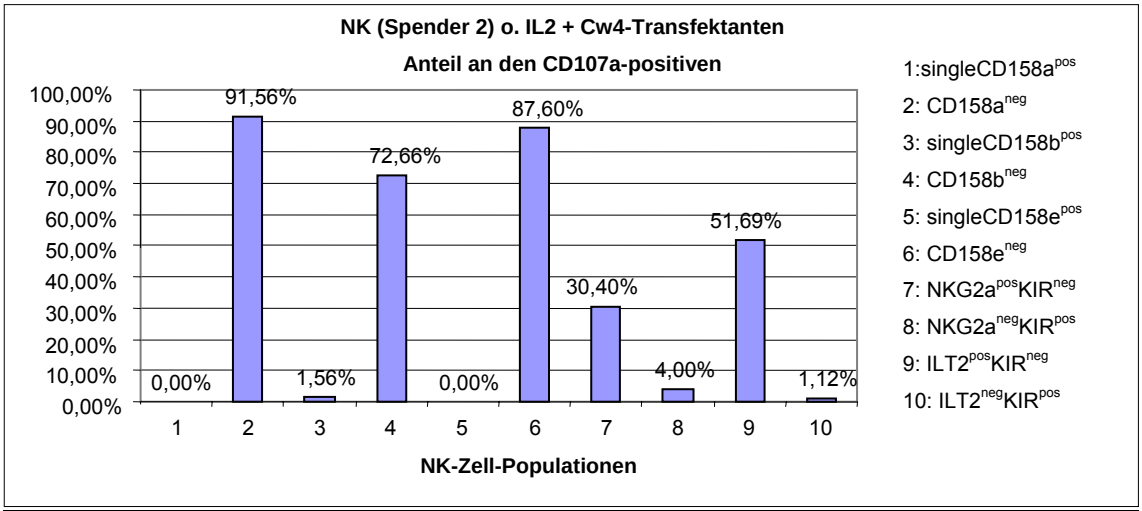
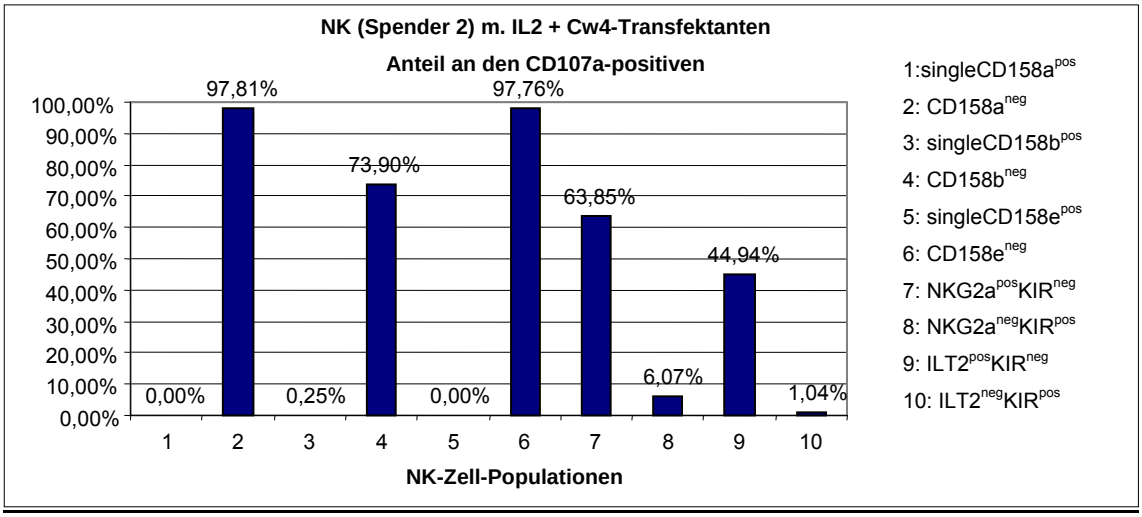


Abbildung 123



Spender 4:

Abbildung 124

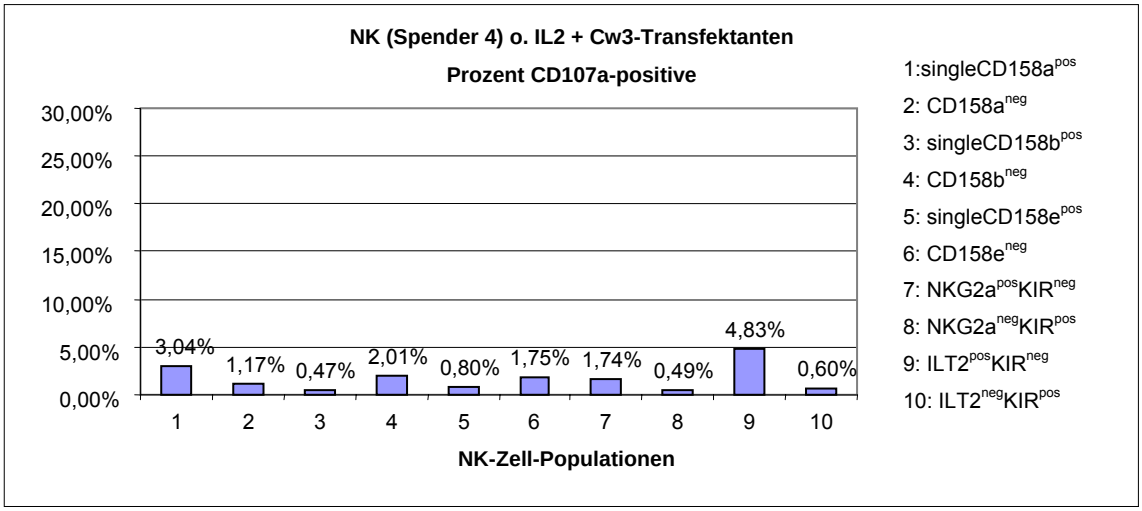


Abbildung 125

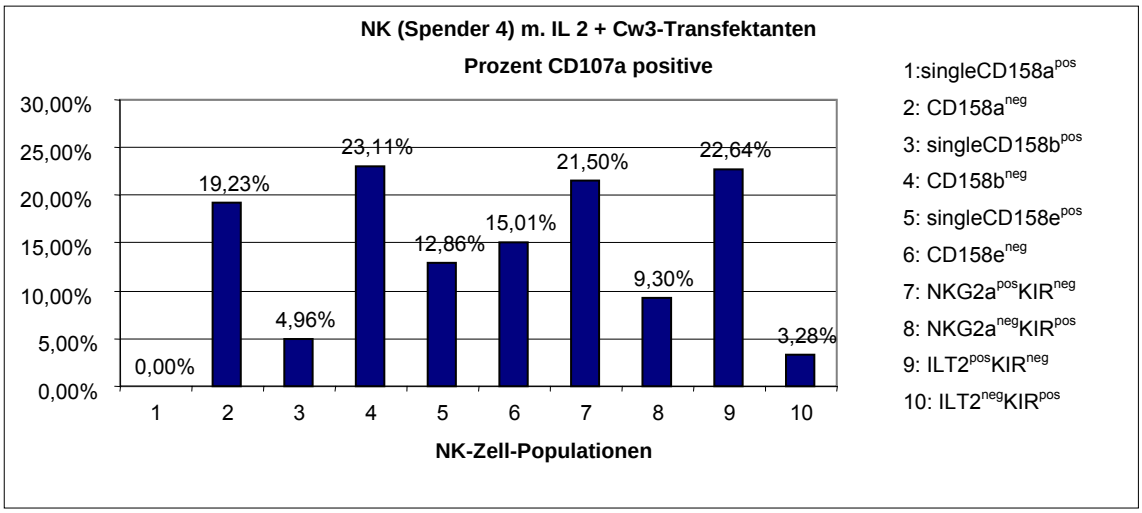


Abbildung 126

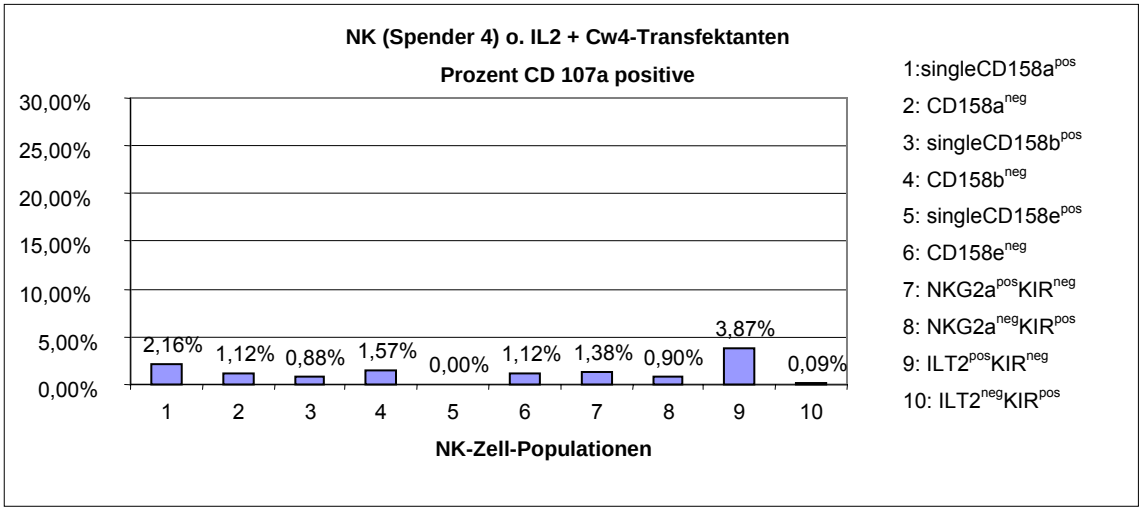


Abbildung 127

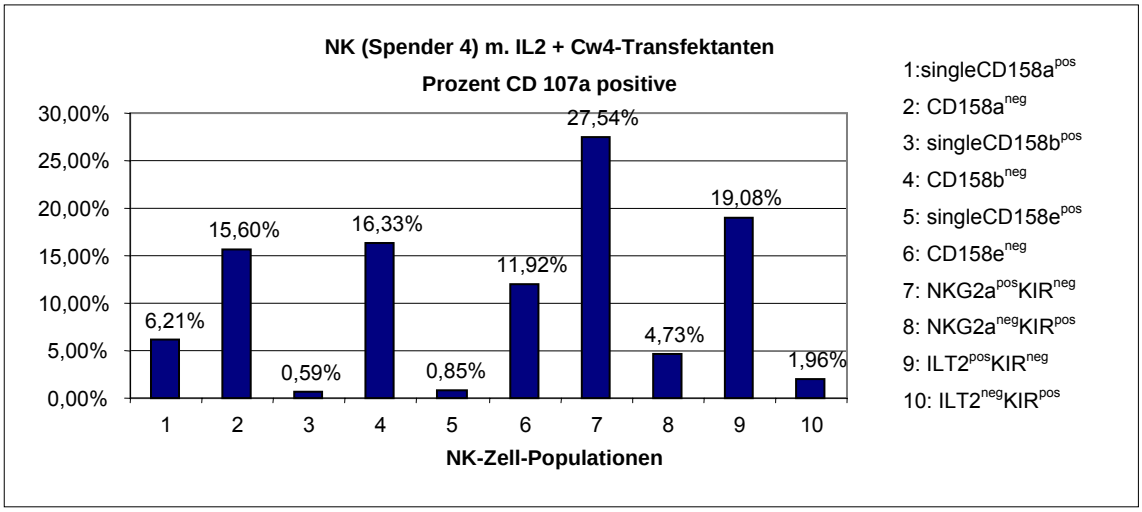


Abbildung 128

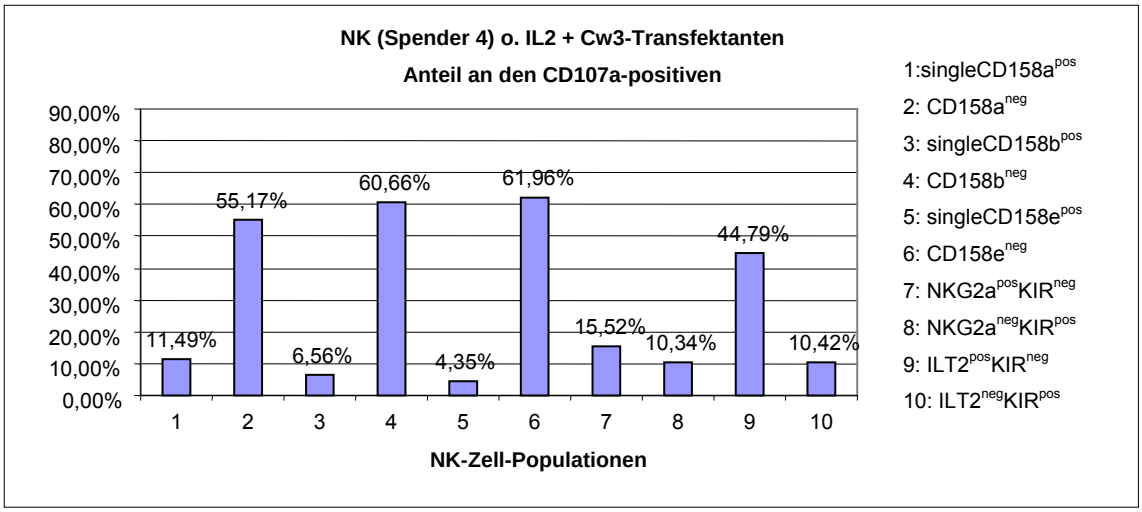


Abbildung 129

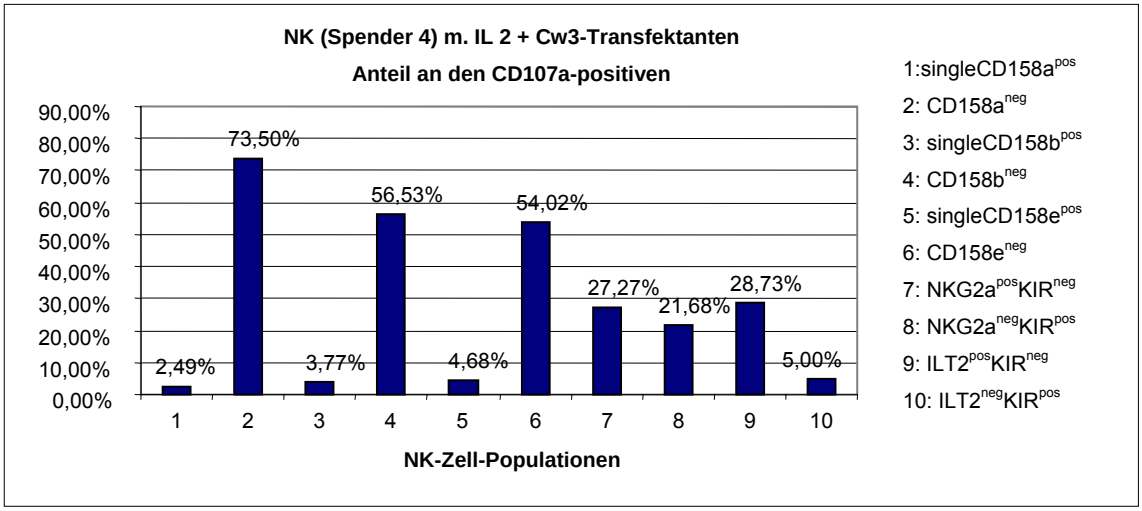


Abbildung 130

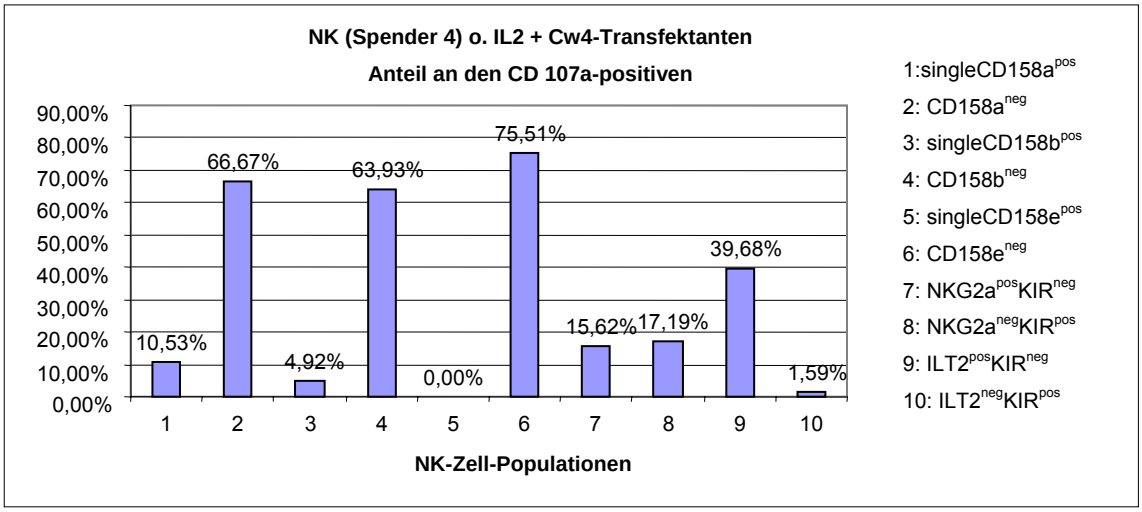
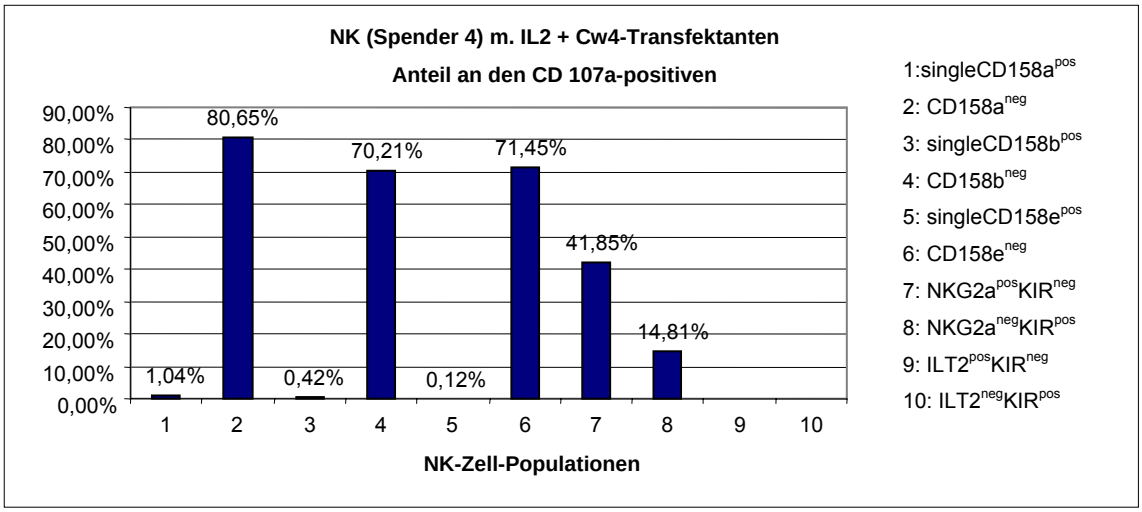


Abbildung 131



Spender 5:

Abbildung 132

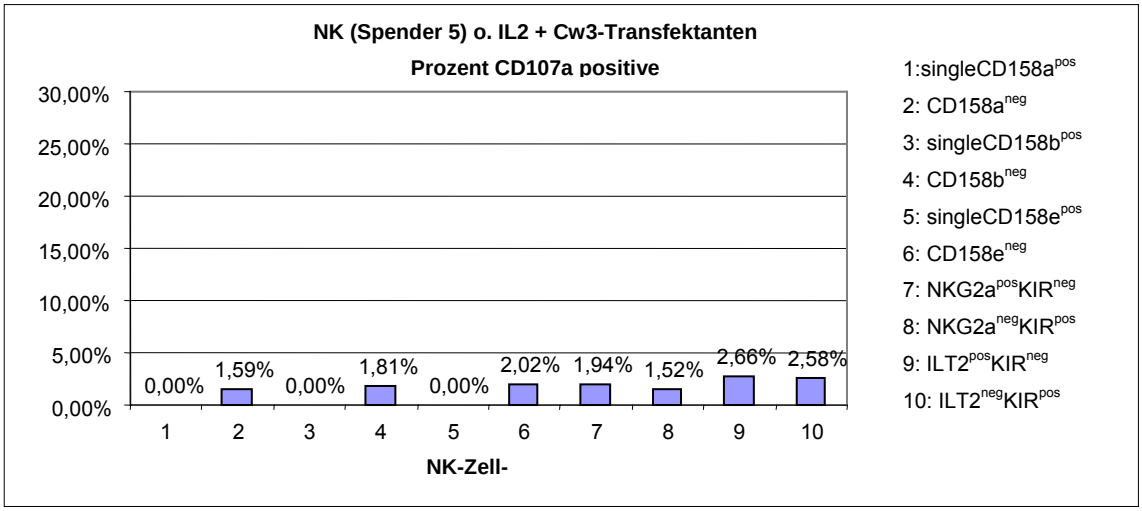


Abbildung 133

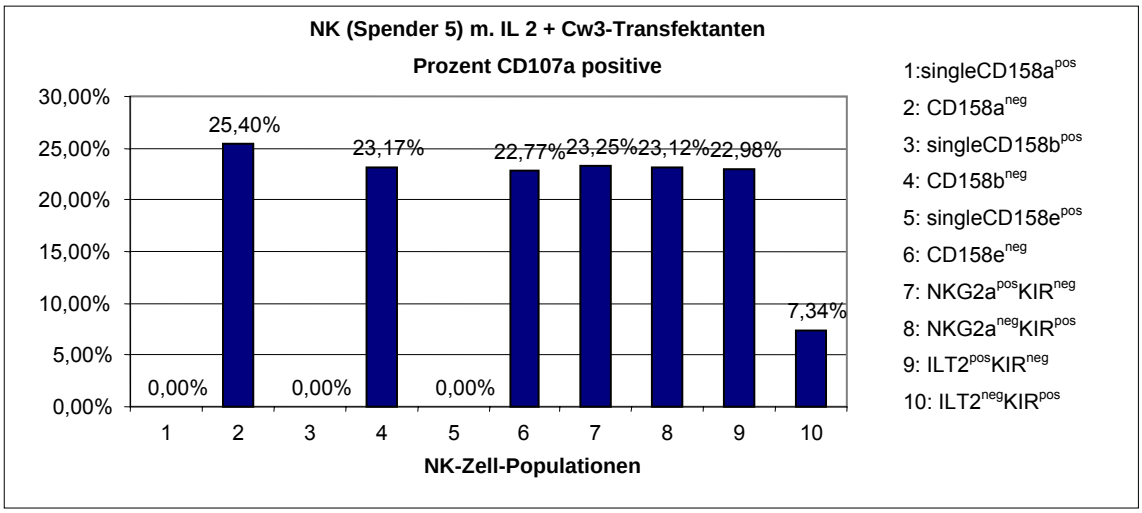


Abbildung 134

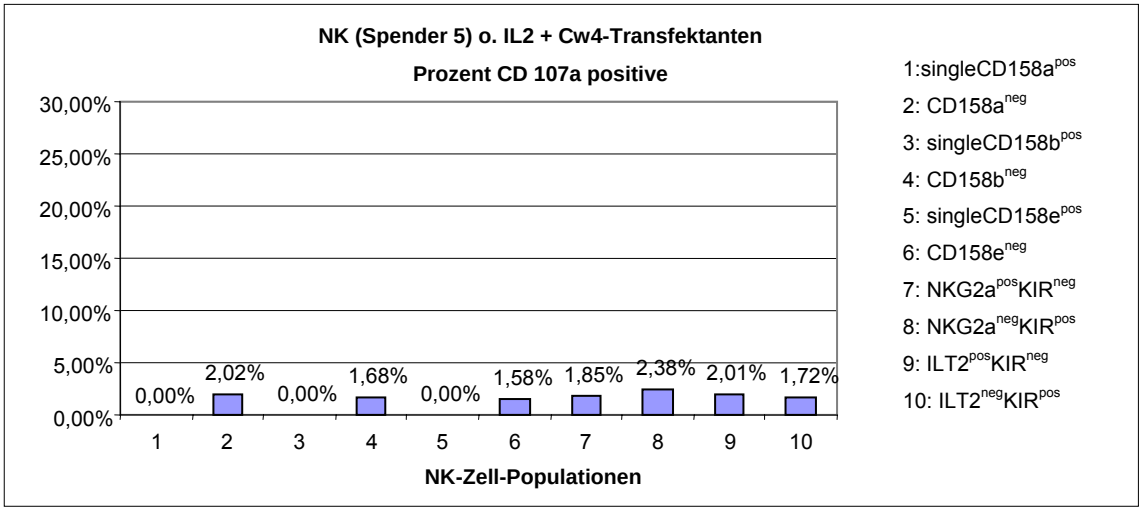


Abbildung 135

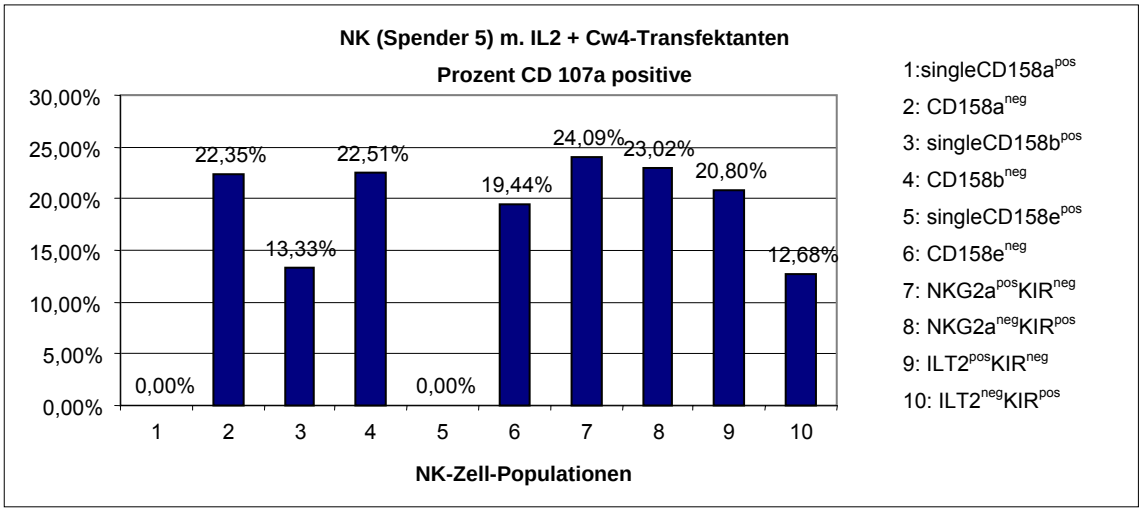


Abbildung 136

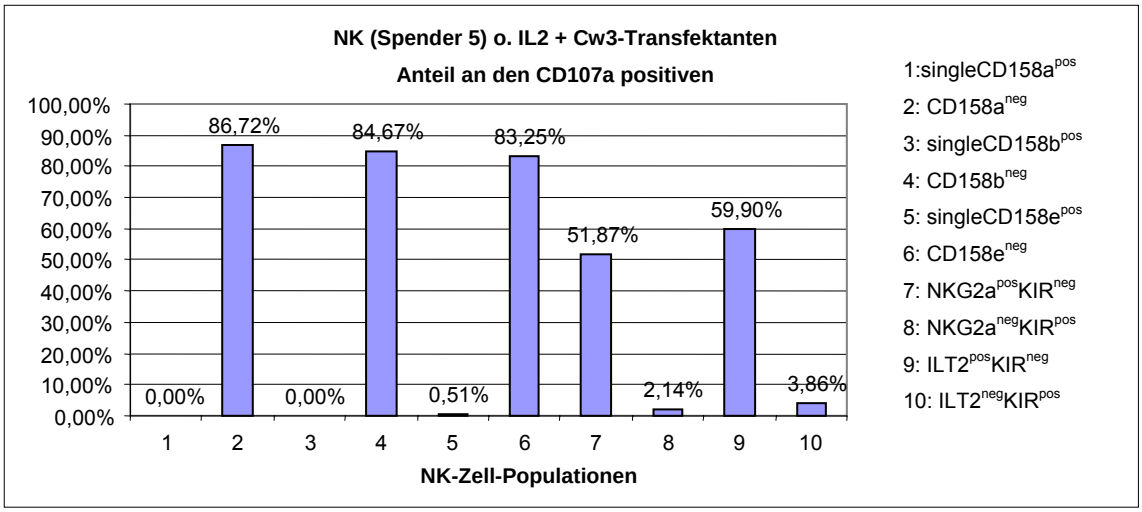


Abbildung 137

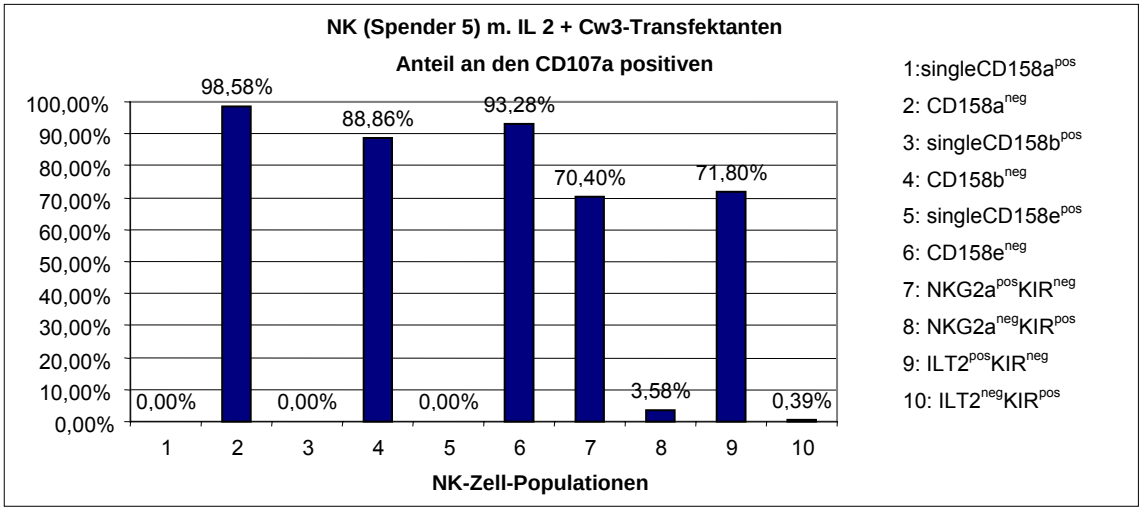


Abbildung 138

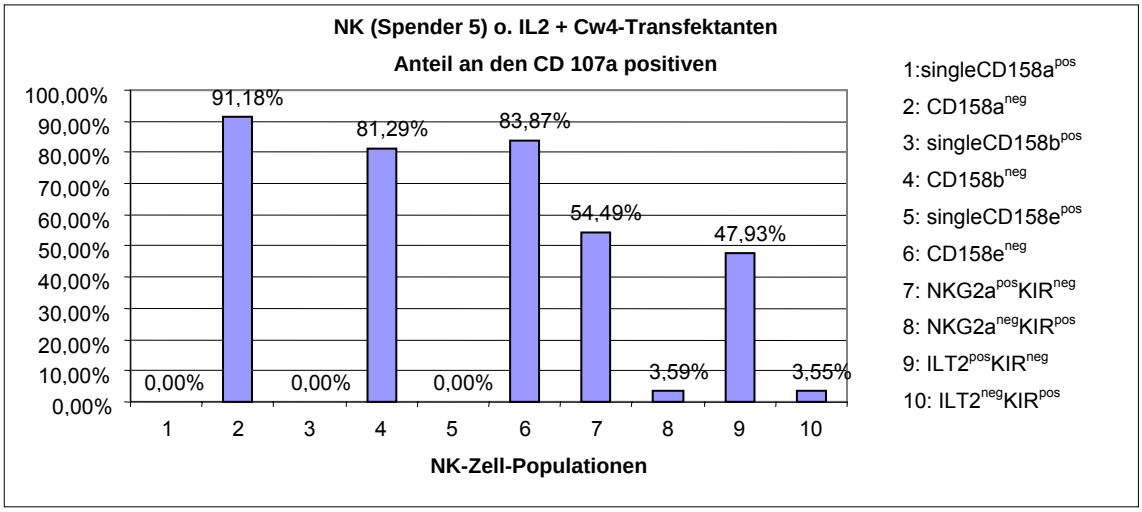
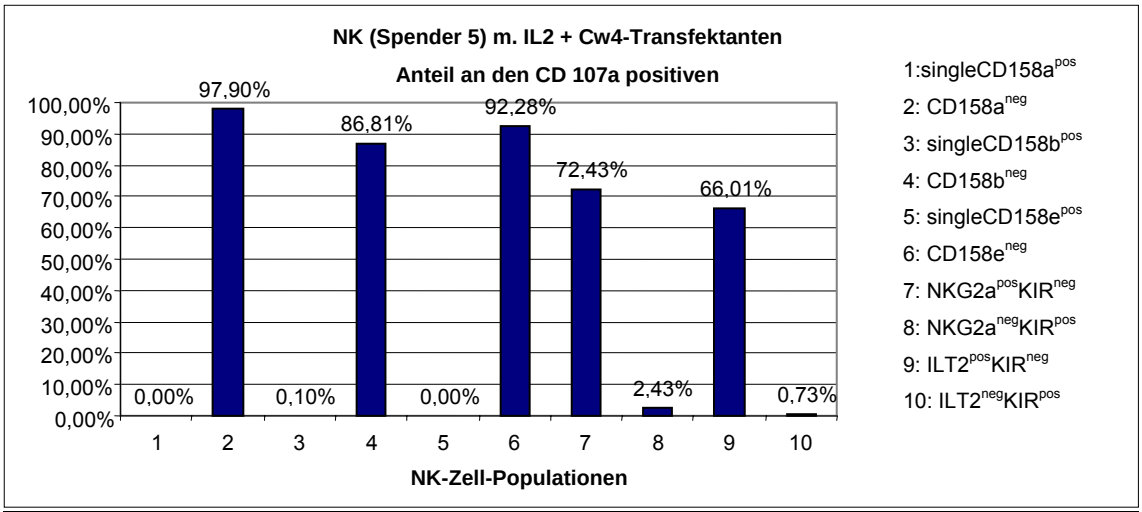


Abbildung 139



Spender 6:

Abbildung 140

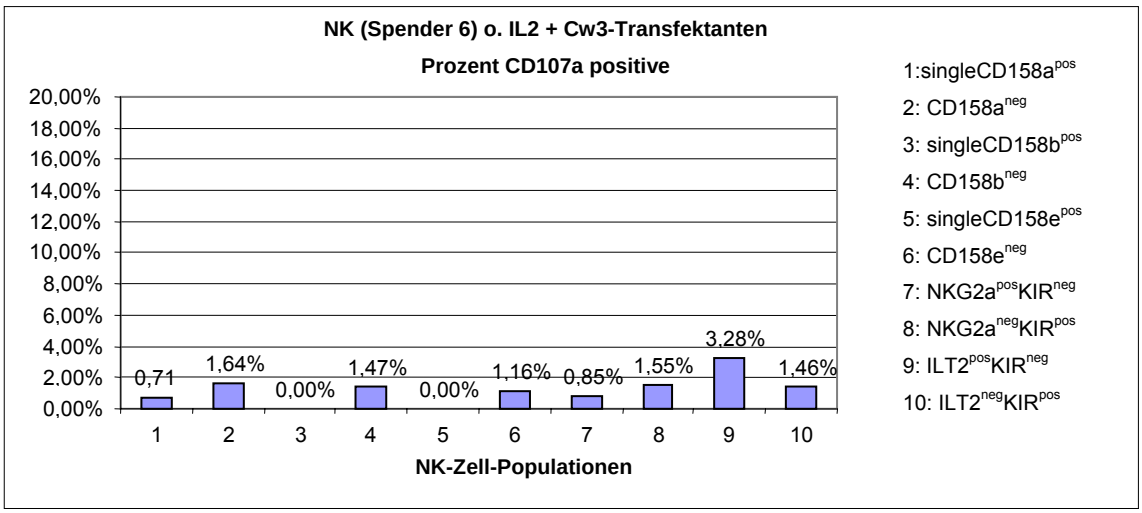


Abbildung 141

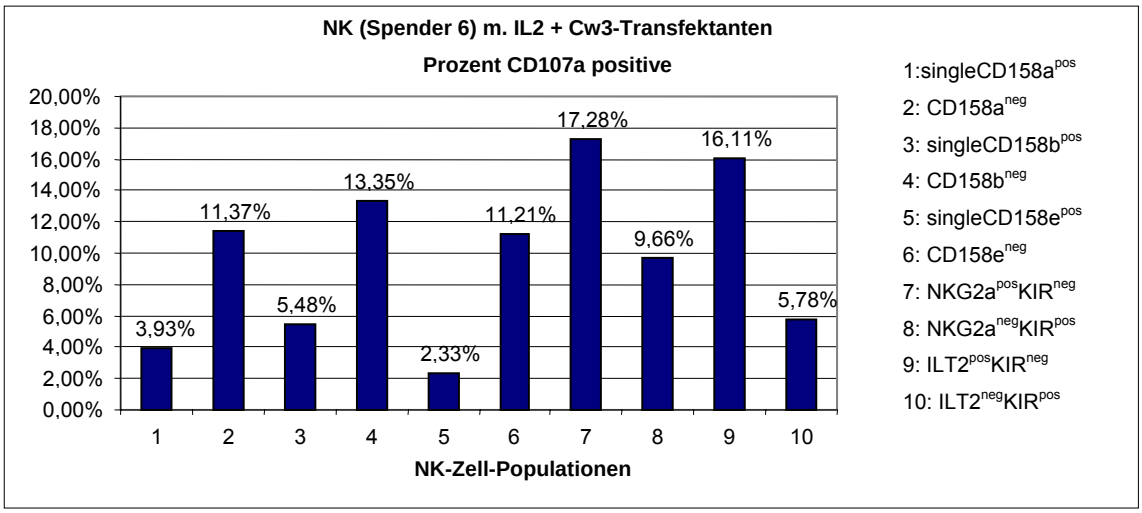


Abbildung 142

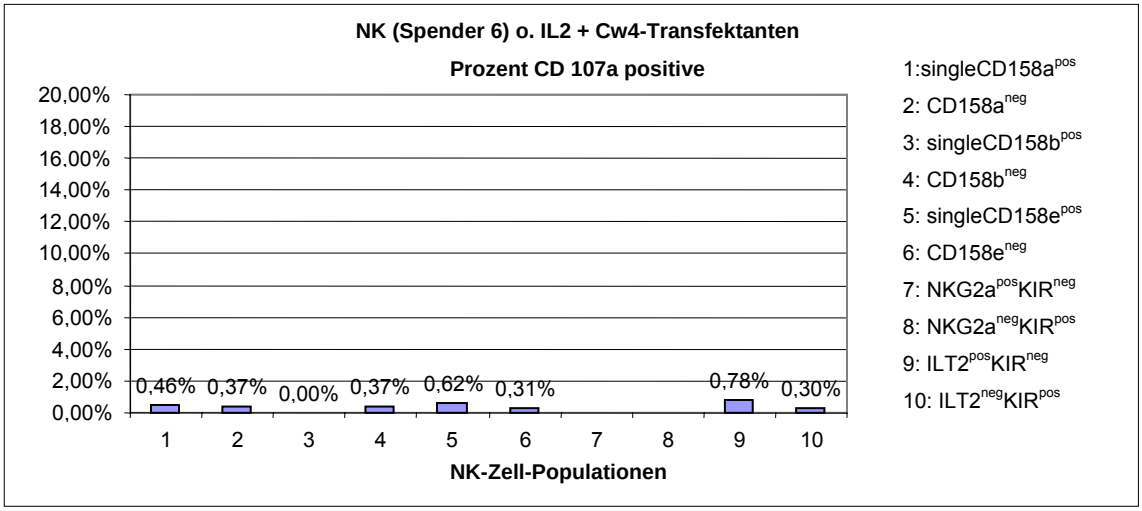


Abbildung 143

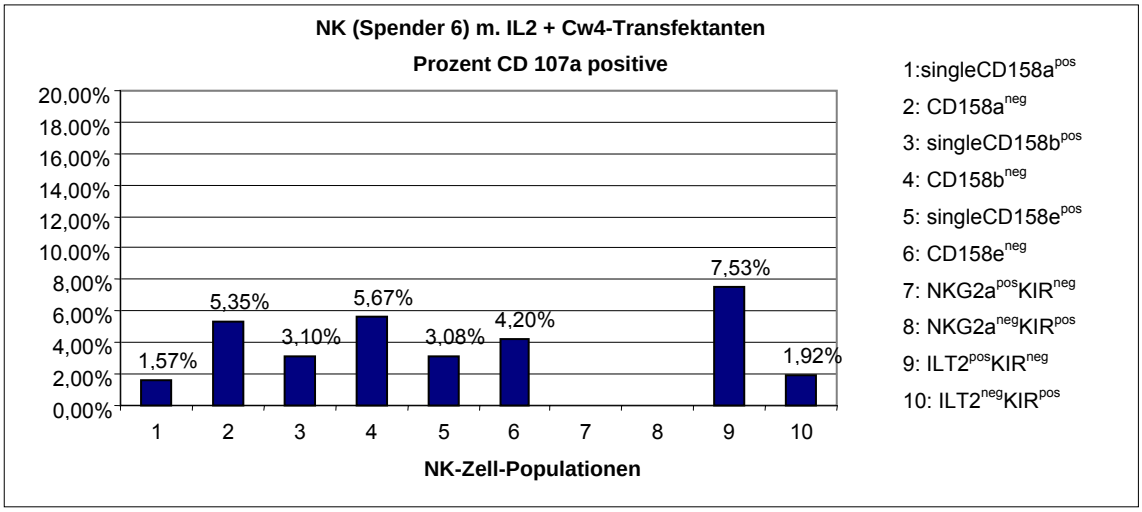


Abbildung 144

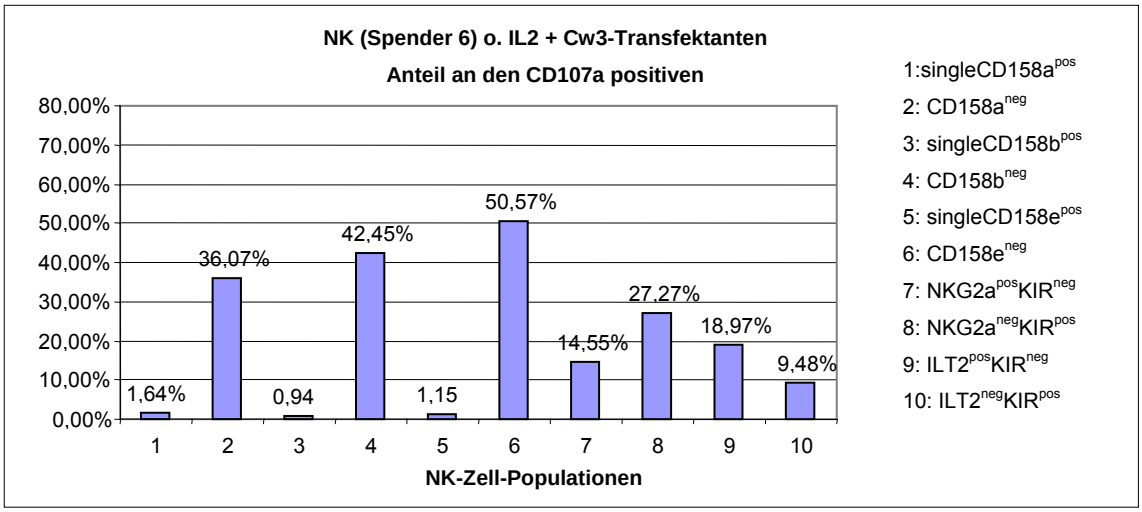


Abbildung 145

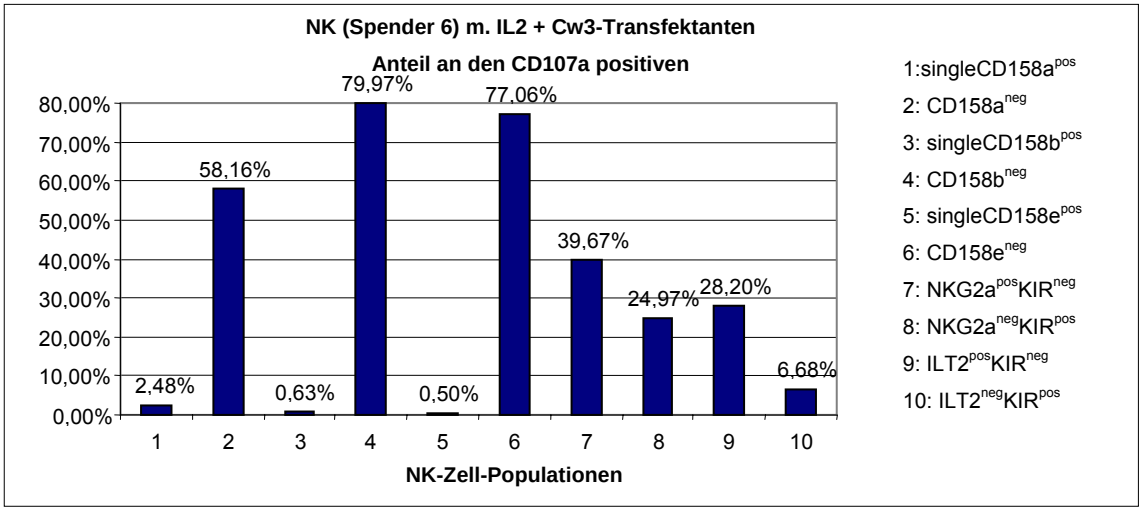


Abbildung 146

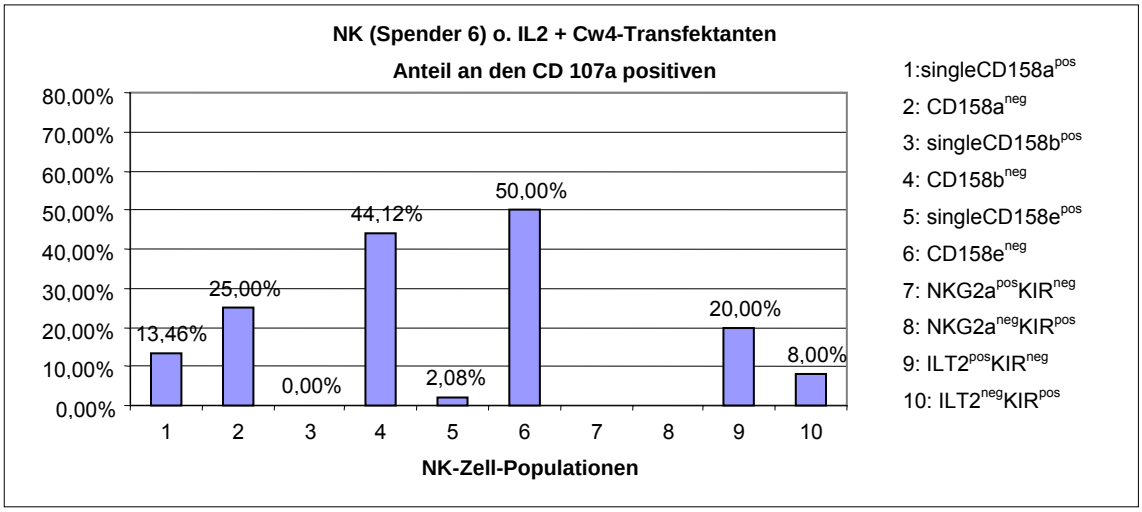
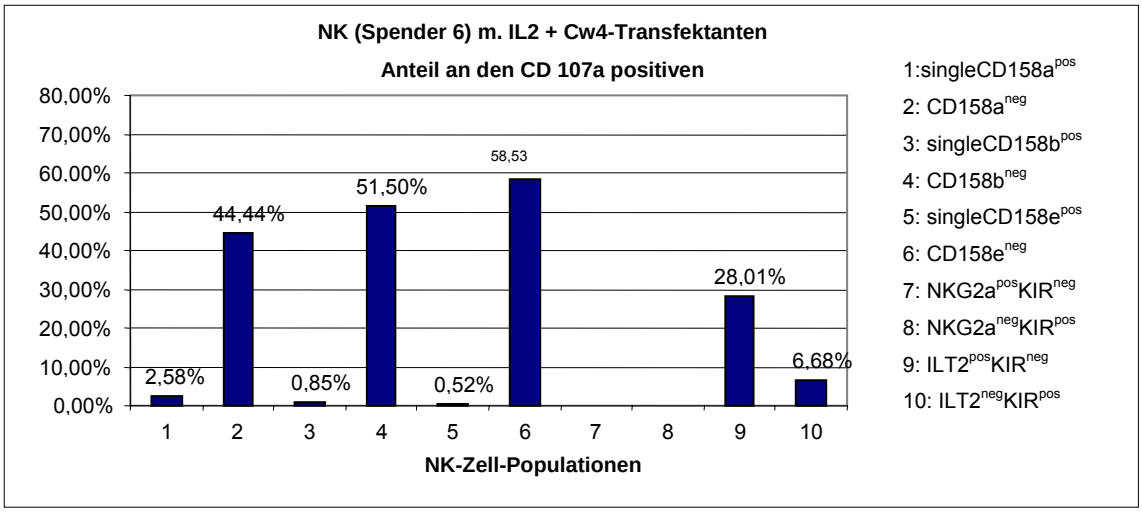


Abbildung 147



Spender 7:

Abbildung 148

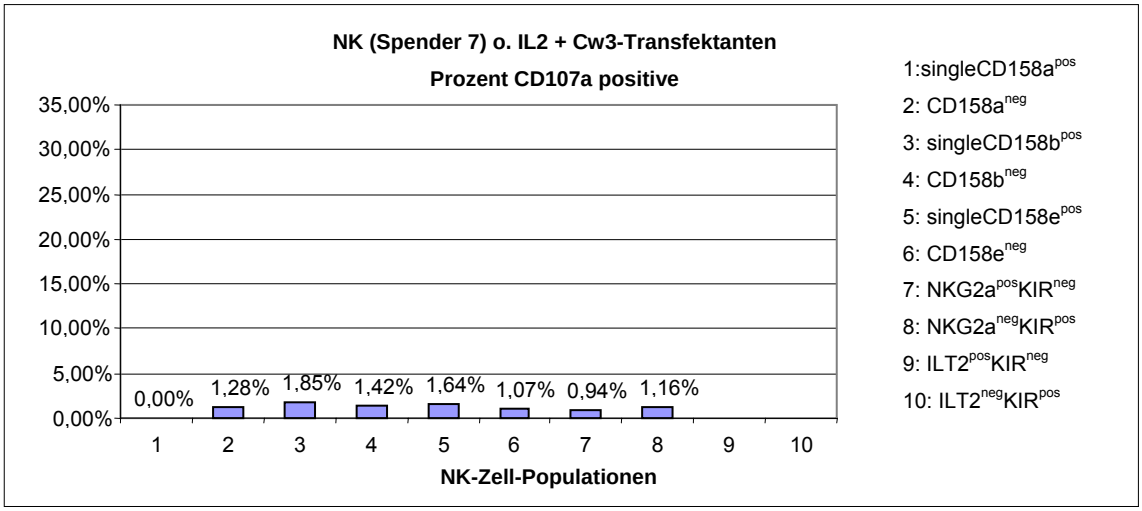


Abbildung 149

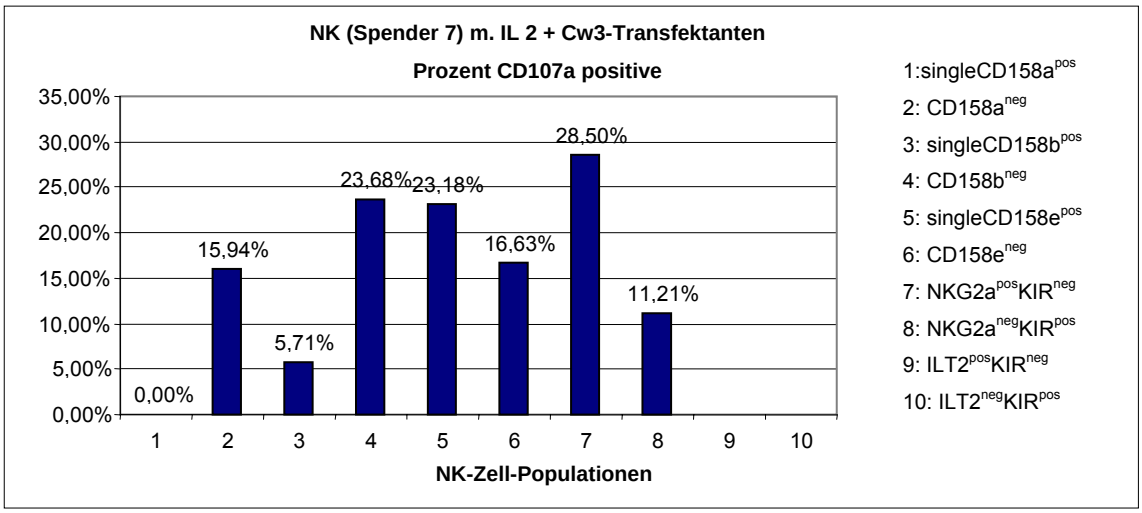


Abbildung 150

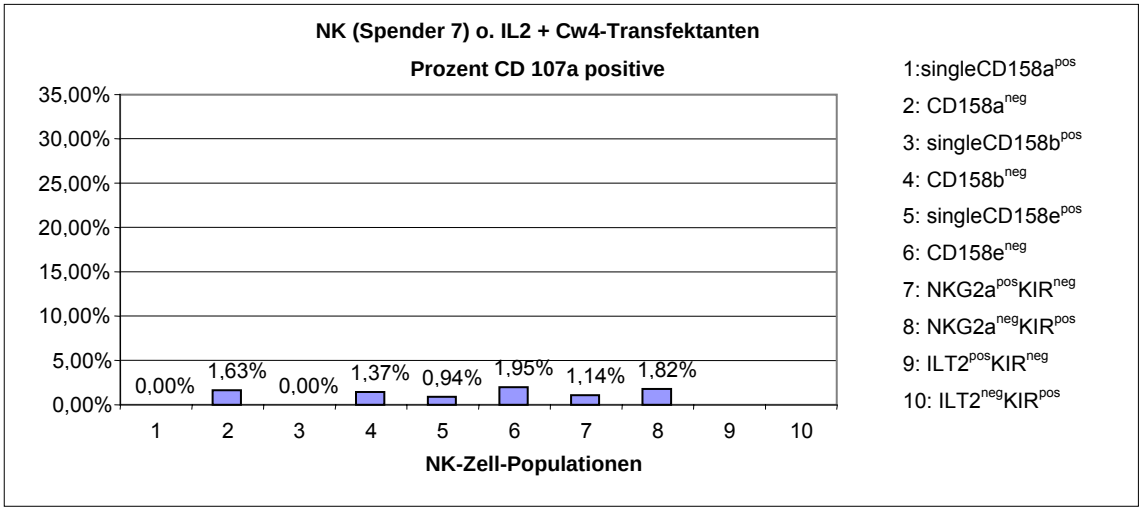


Abbildung 151

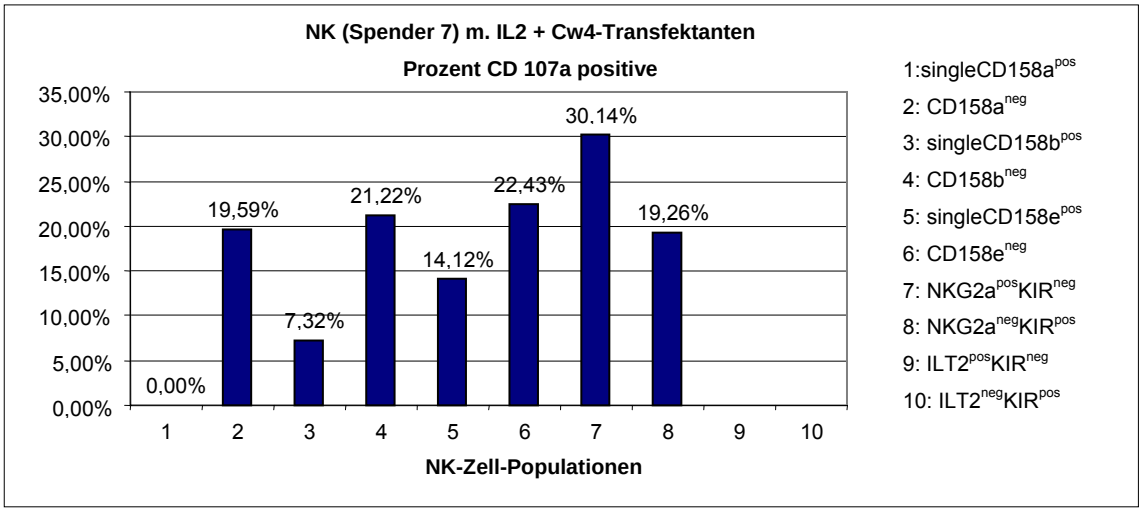


Abbildung 152

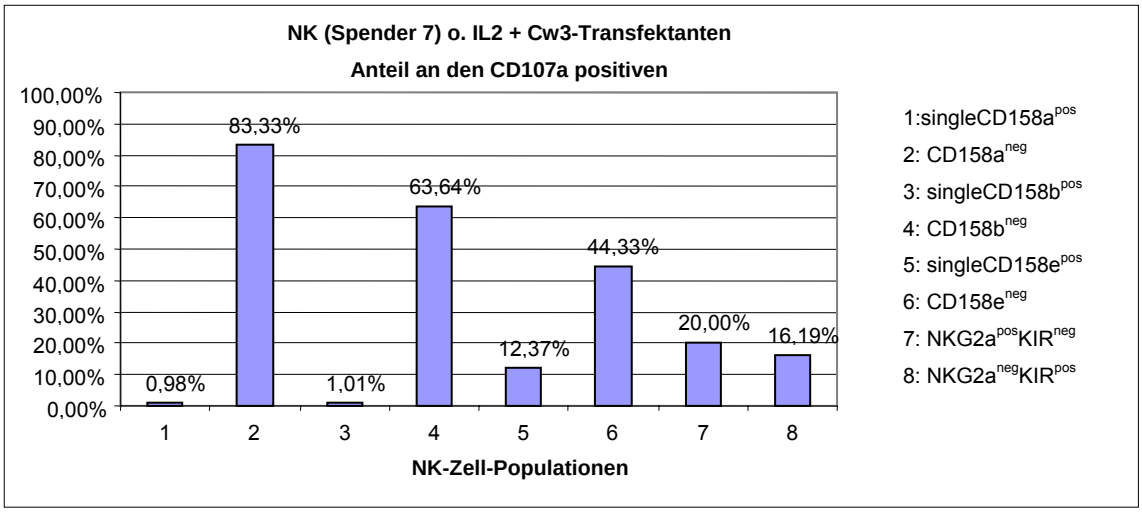


Abbildung 153

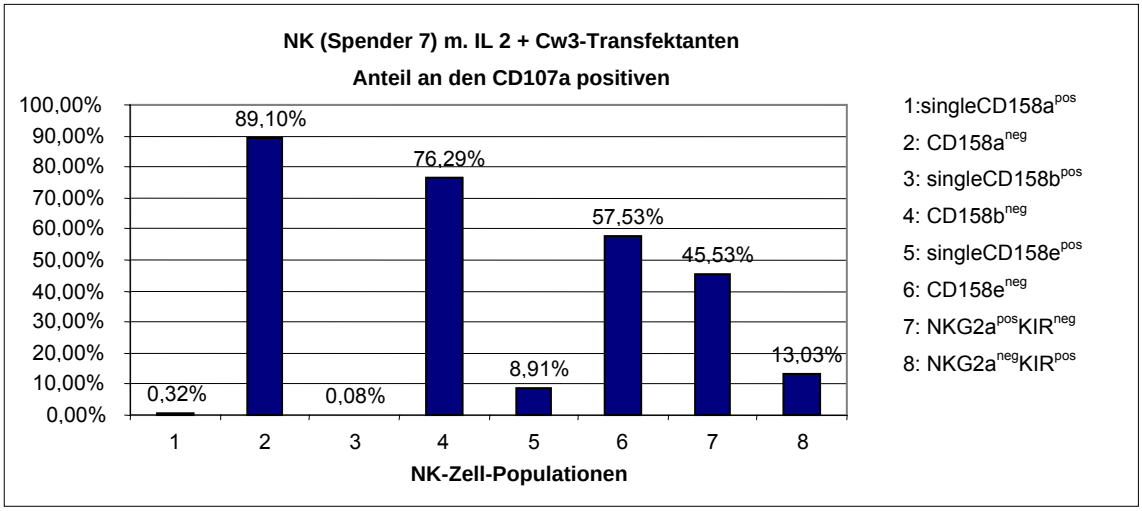


Abbildung 154

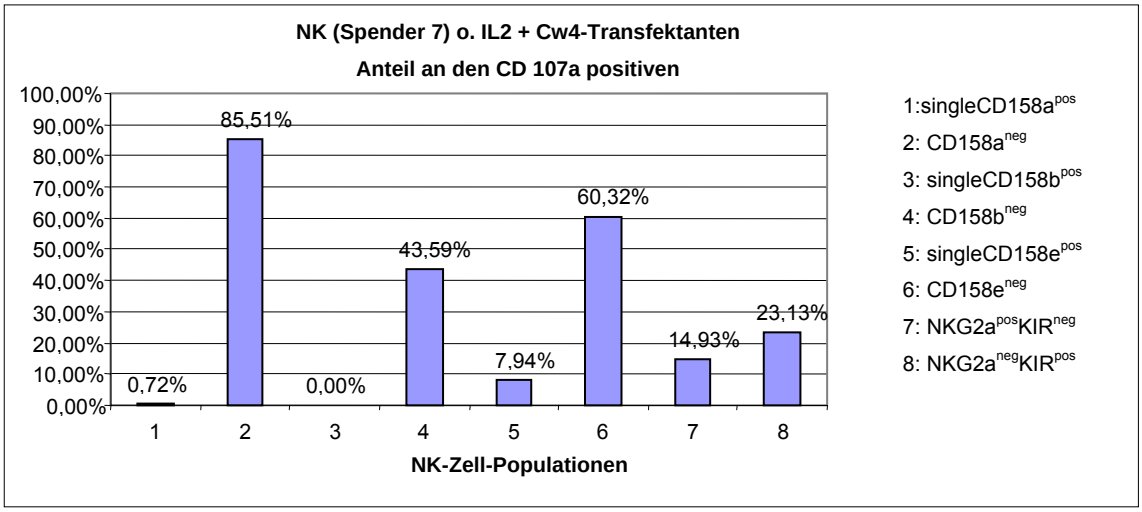
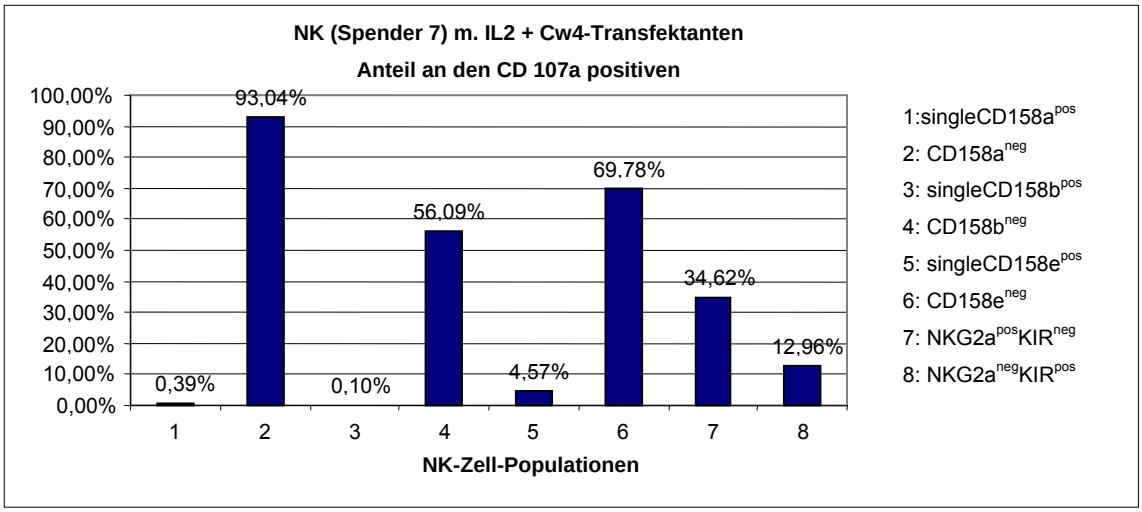


Abbildung 155



Zu 3.4.2 Versuche mit Blasten

Spender 6 – Blasten 1:

Abbildung 156

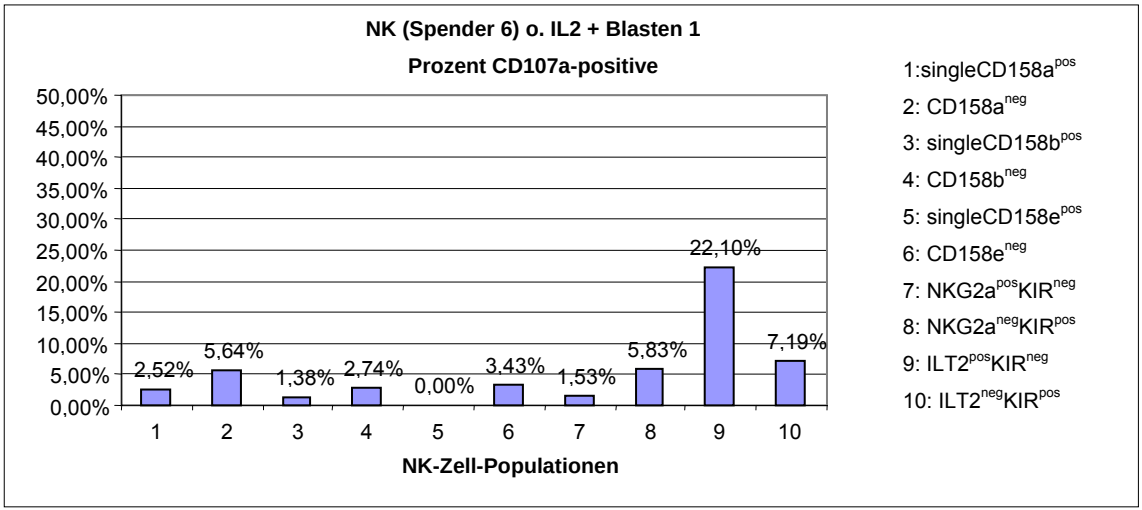


Abbildung 157

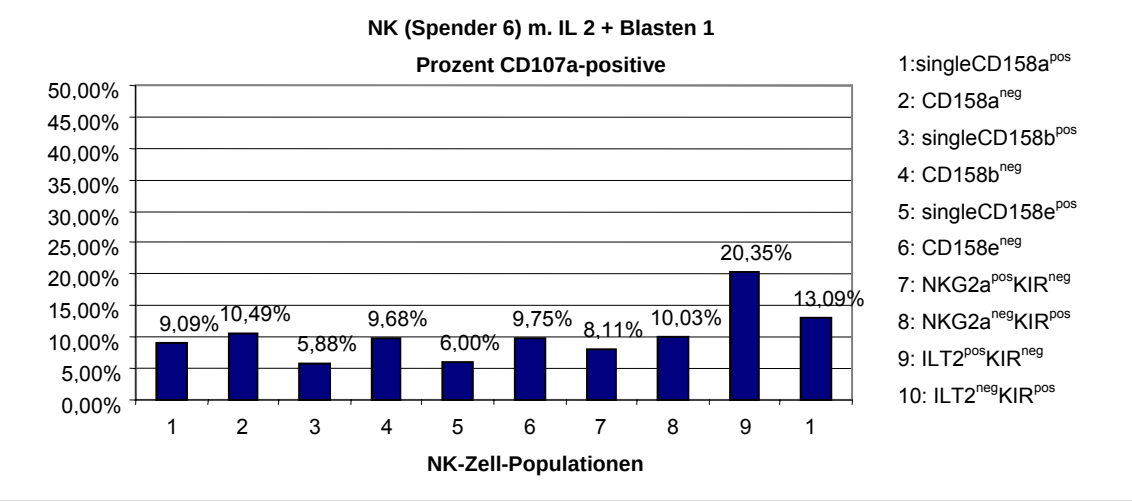


Abbildung 158

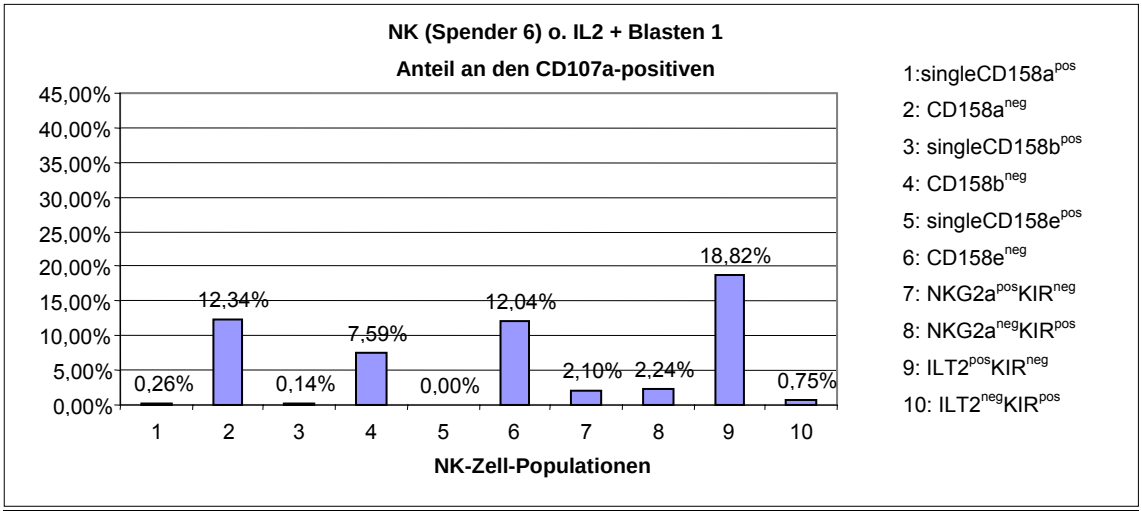
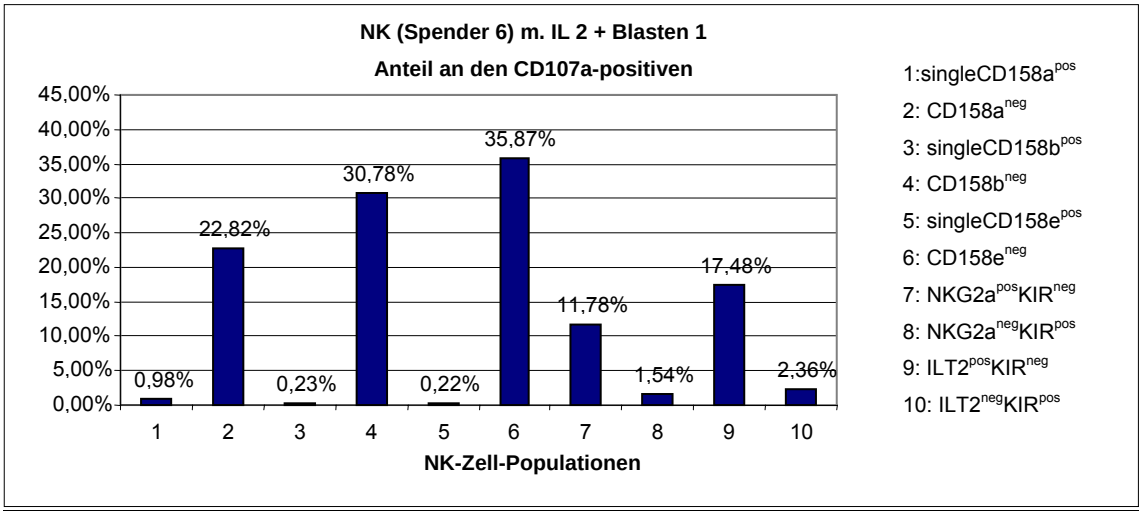


Abbildung 159



Spender 8 – Blasten 1:

Abbildung 160

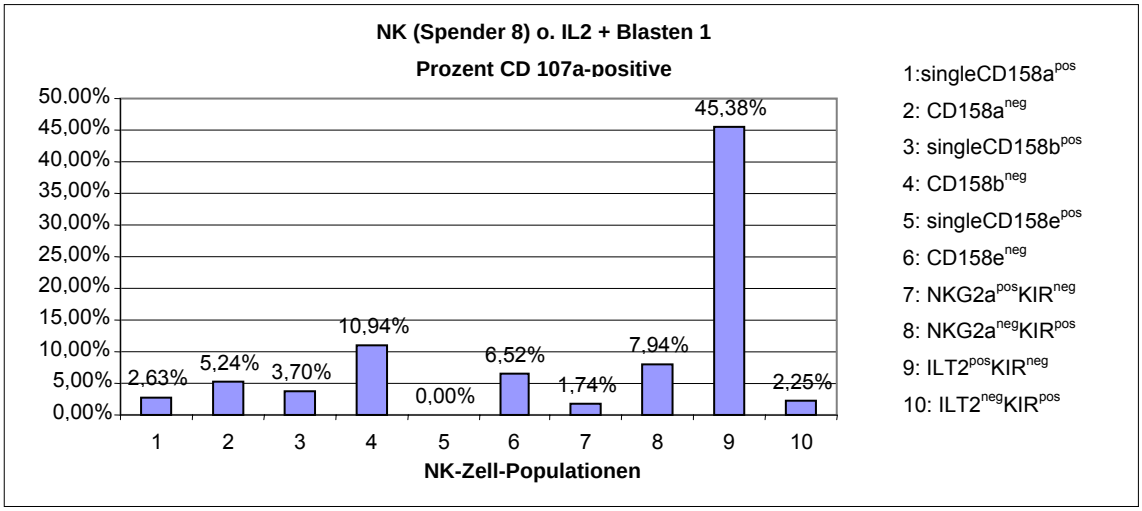


Abbildung 161

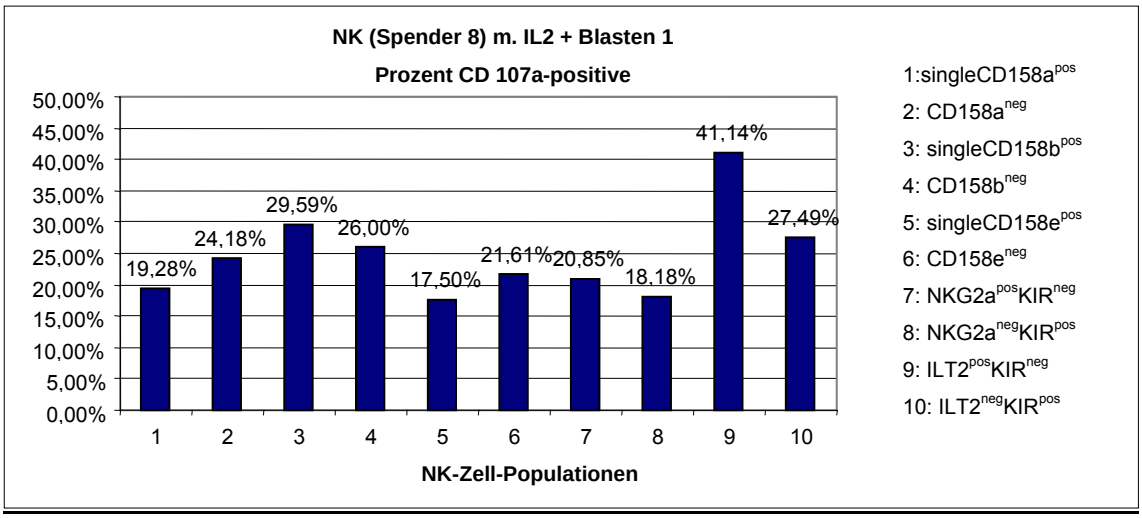


Abbildung 162

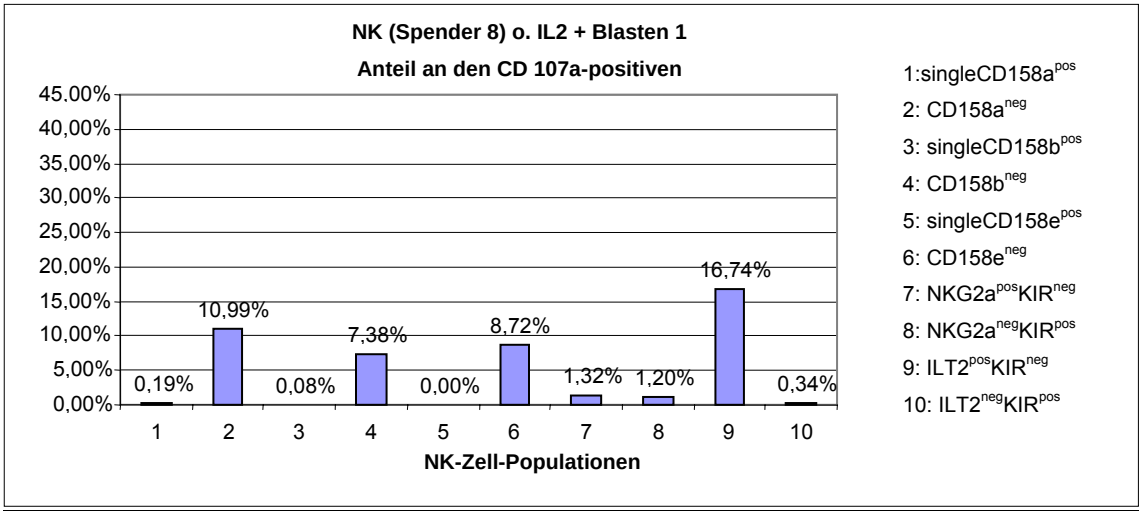
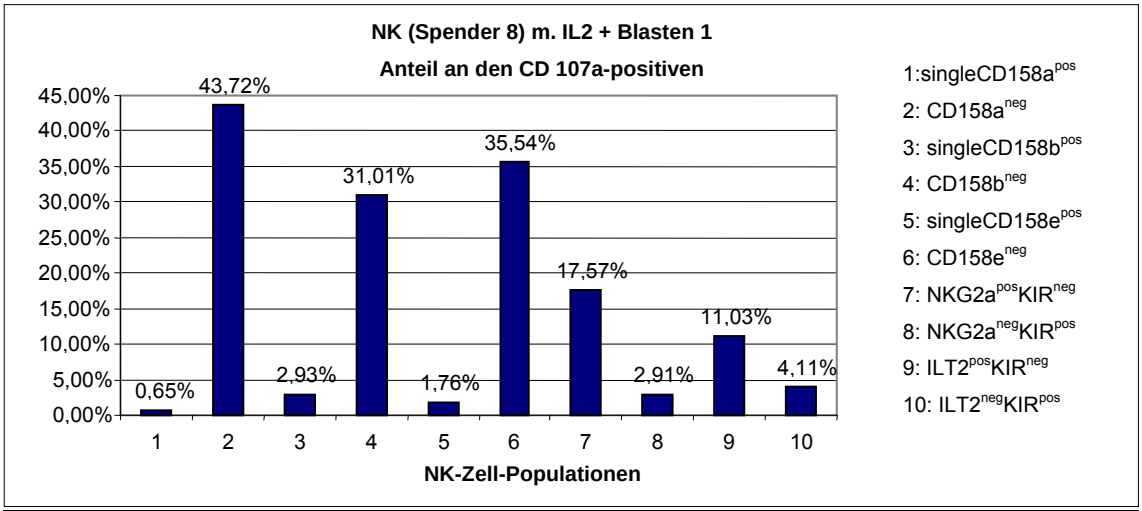


Abbildung 163



Spender 6 – Blasten 2:

Abbildung 164

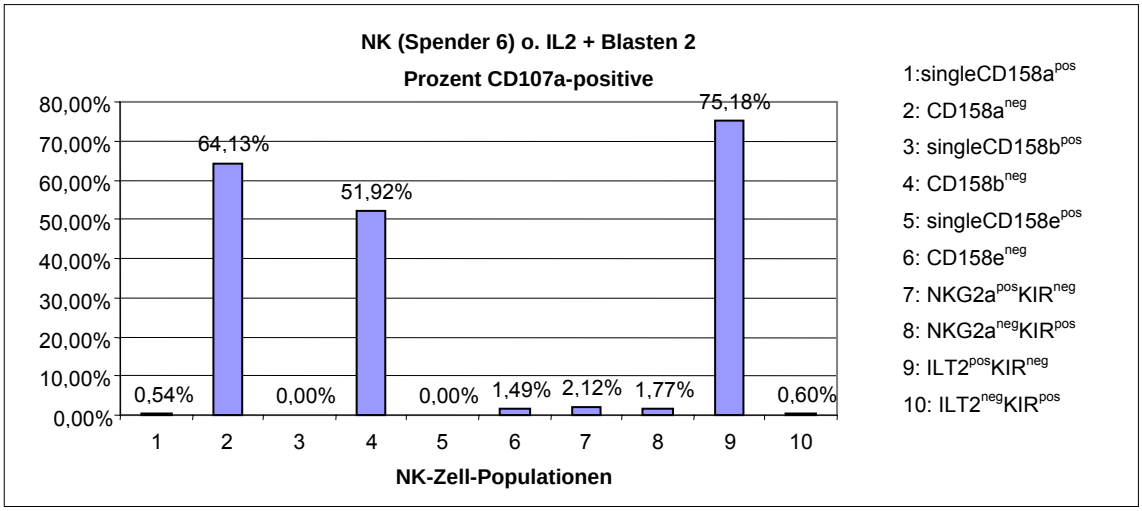


Abbildung 165

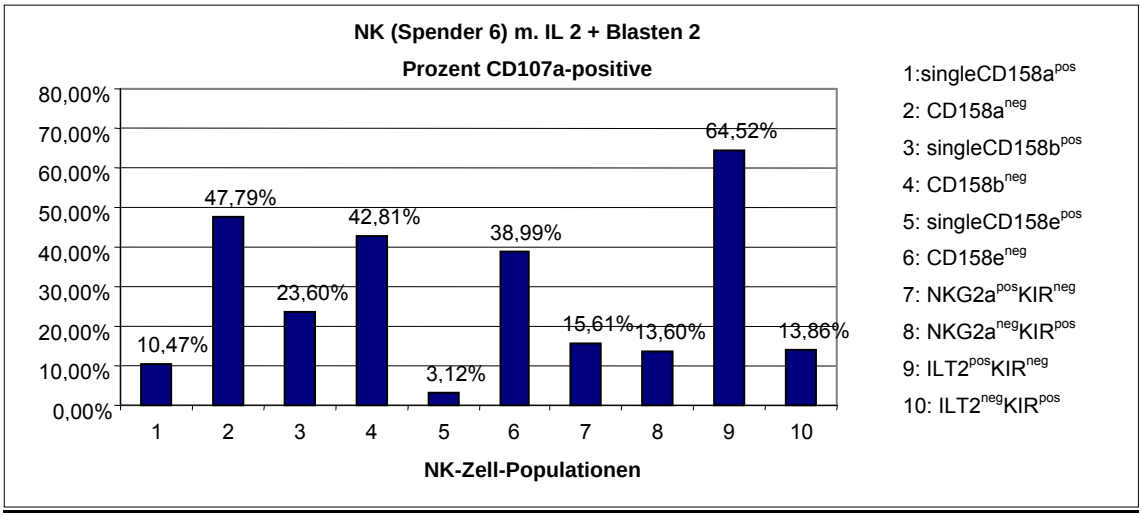


Abbildung 166

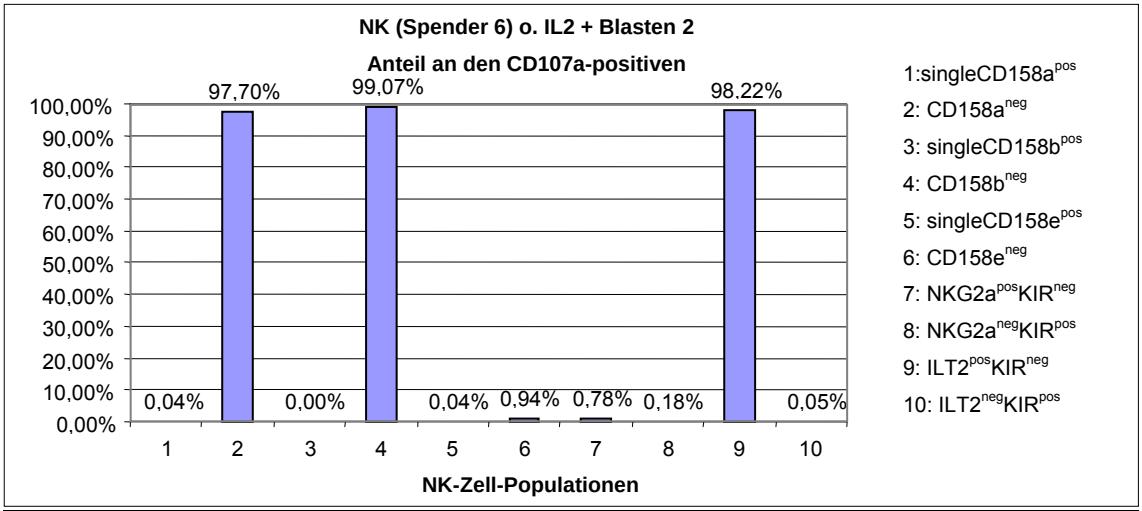
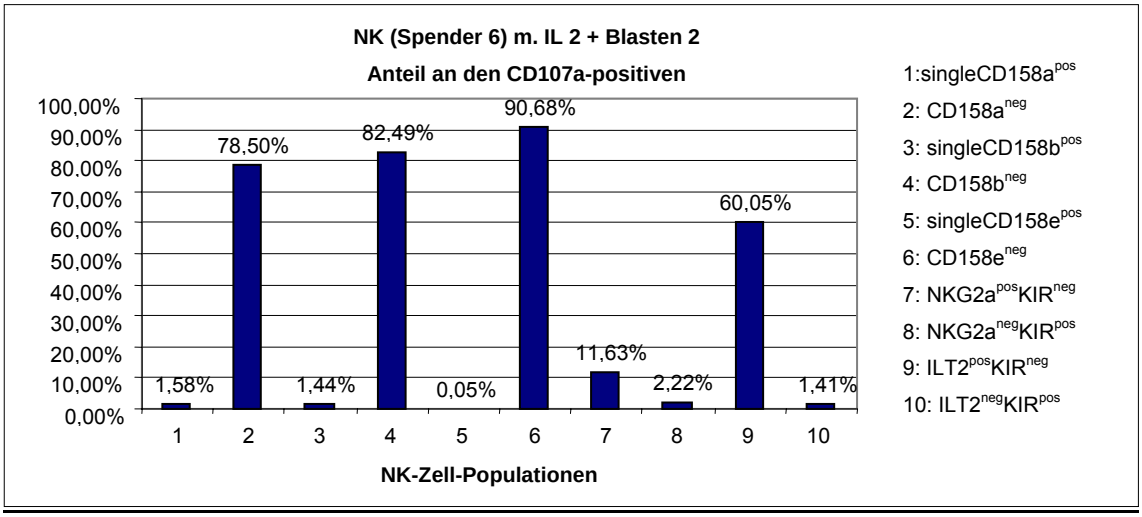


Abbildung 167



Spender 8 – Blasten 2:

Abbildung 168

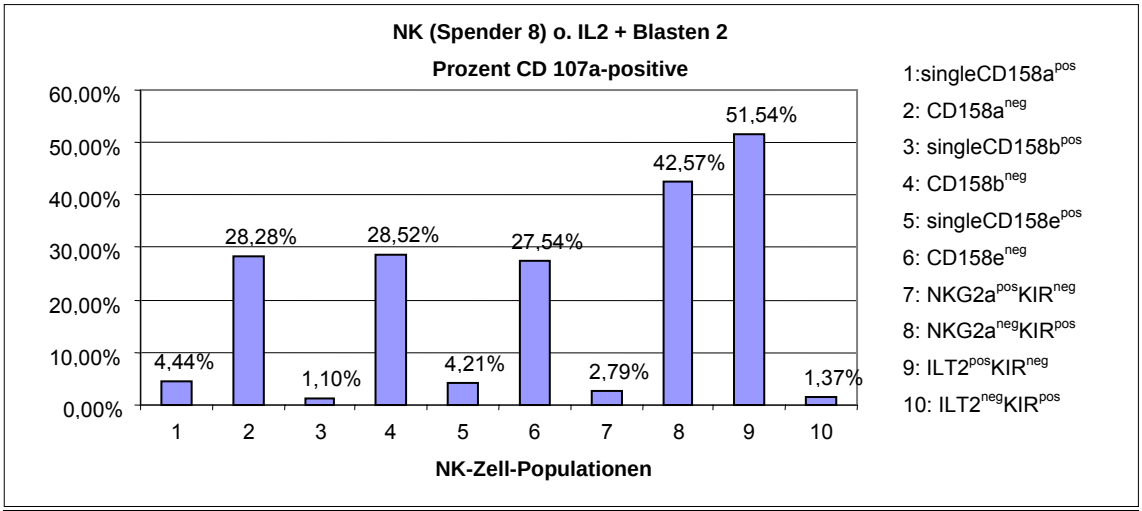


Abbildung 169

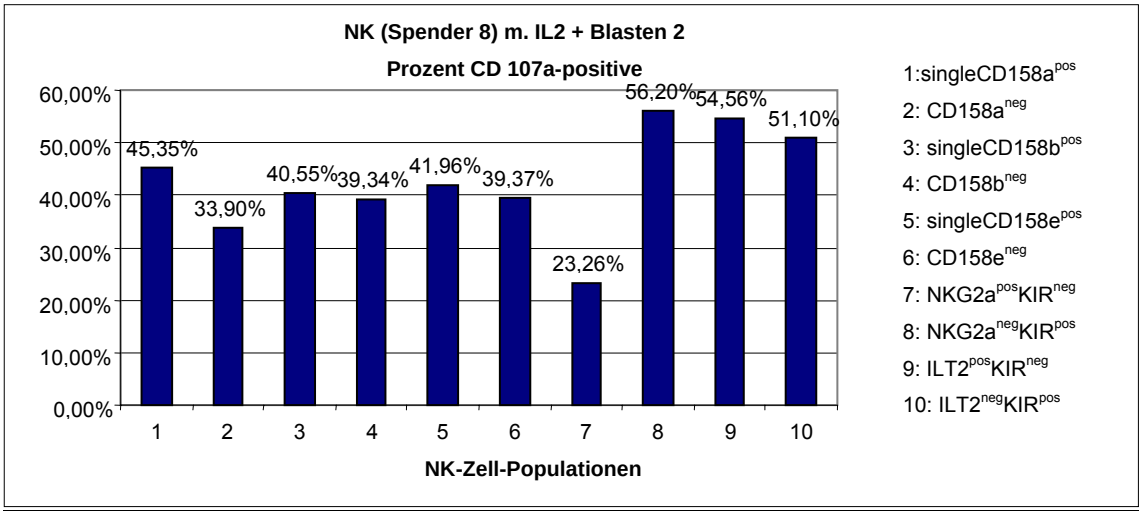


Abbildung 170

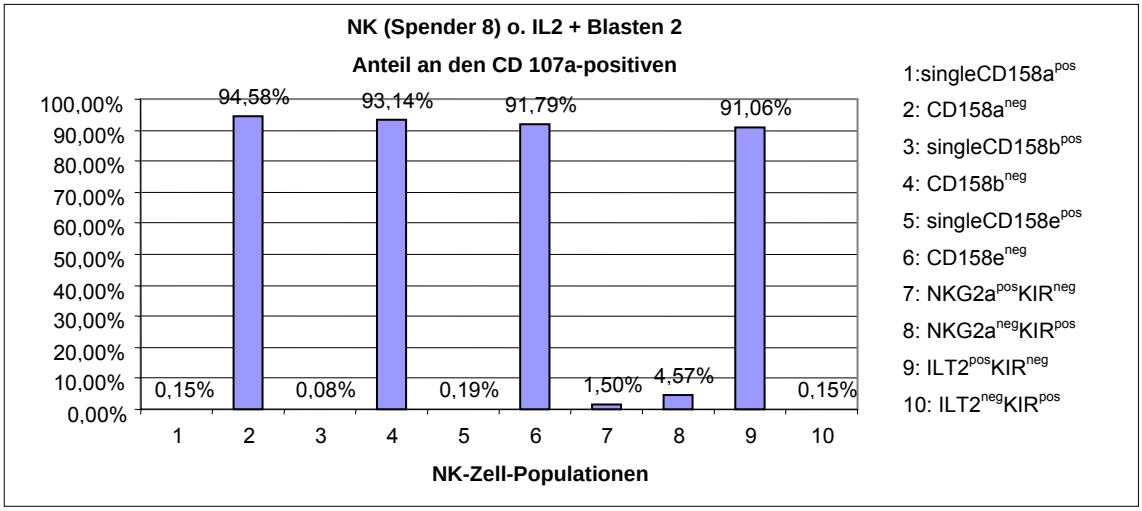
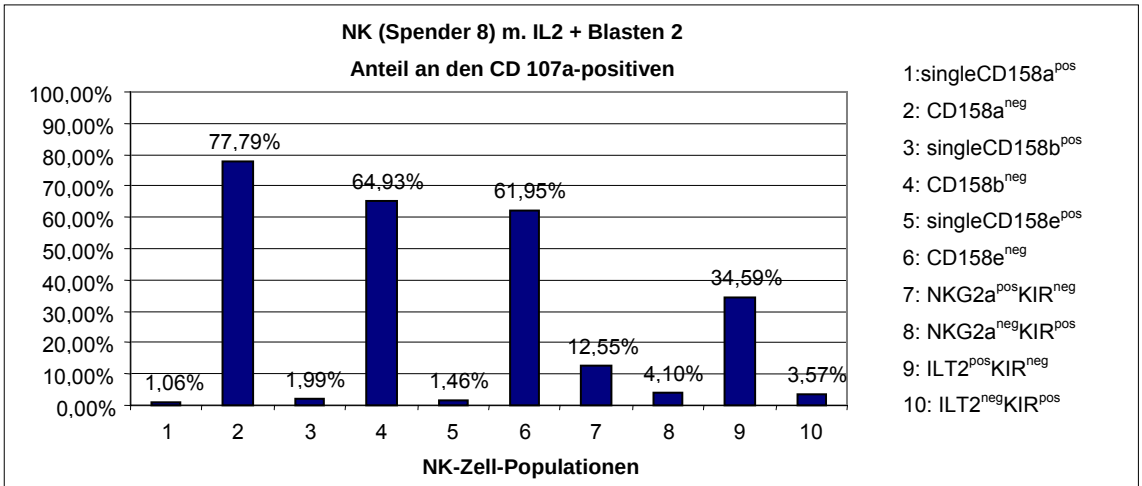


Abbildung 171



Spender 6 – Blasten 3:

Abbildung 172

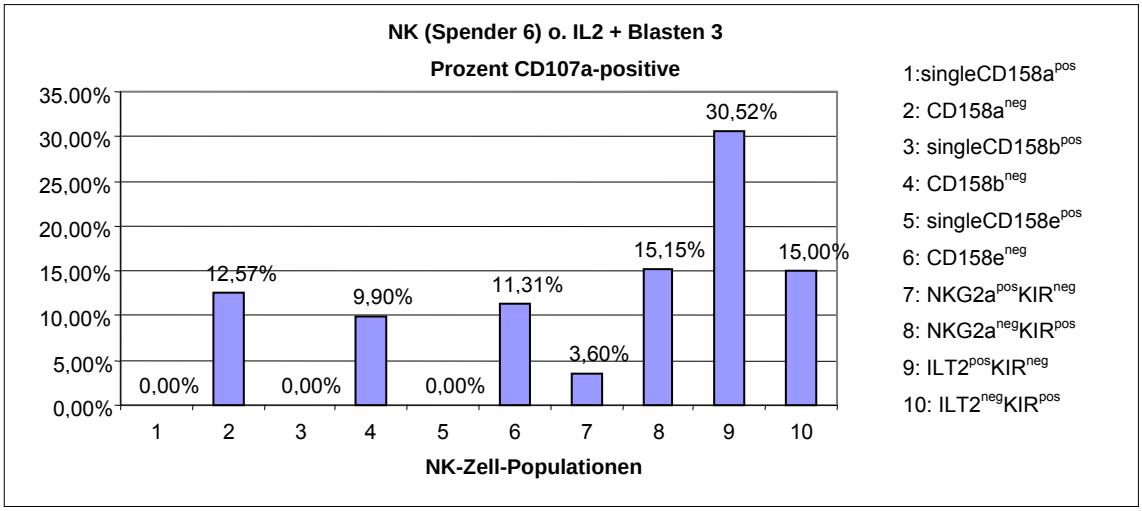


Abbildung 173

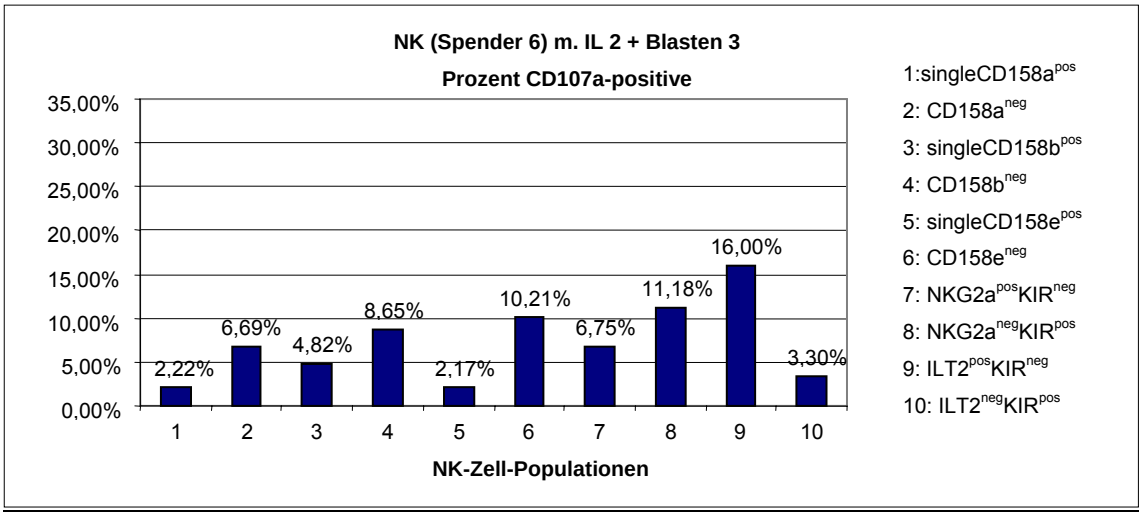


Abbildung 174

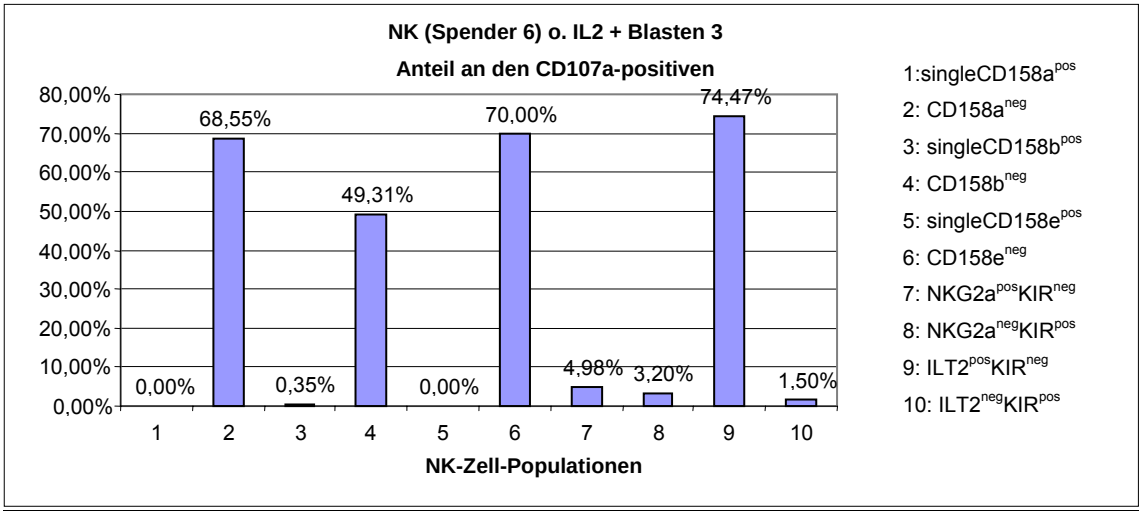
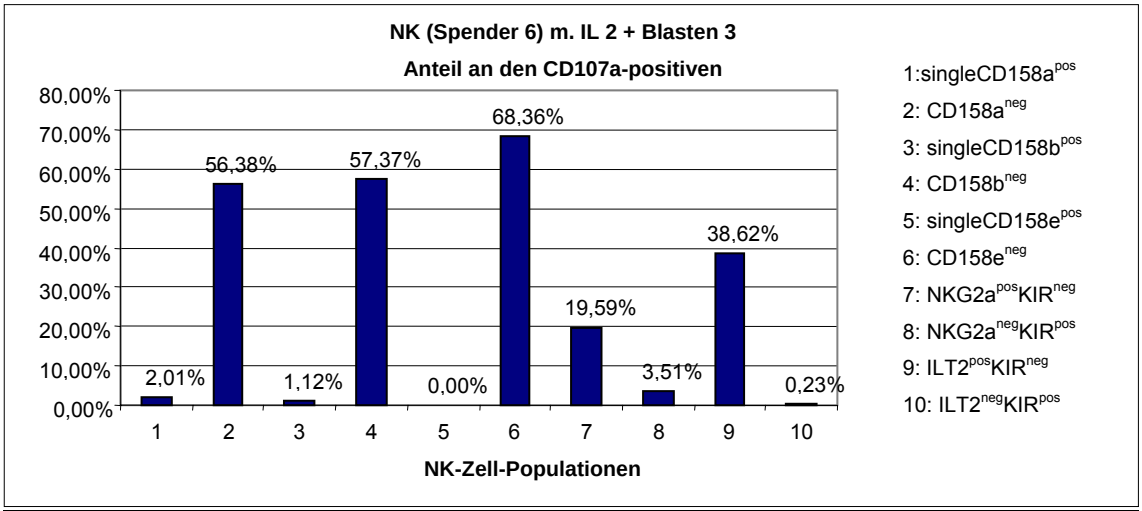


Abbildung 175



Spender 8 – Blasten 3:

Abbildung 176

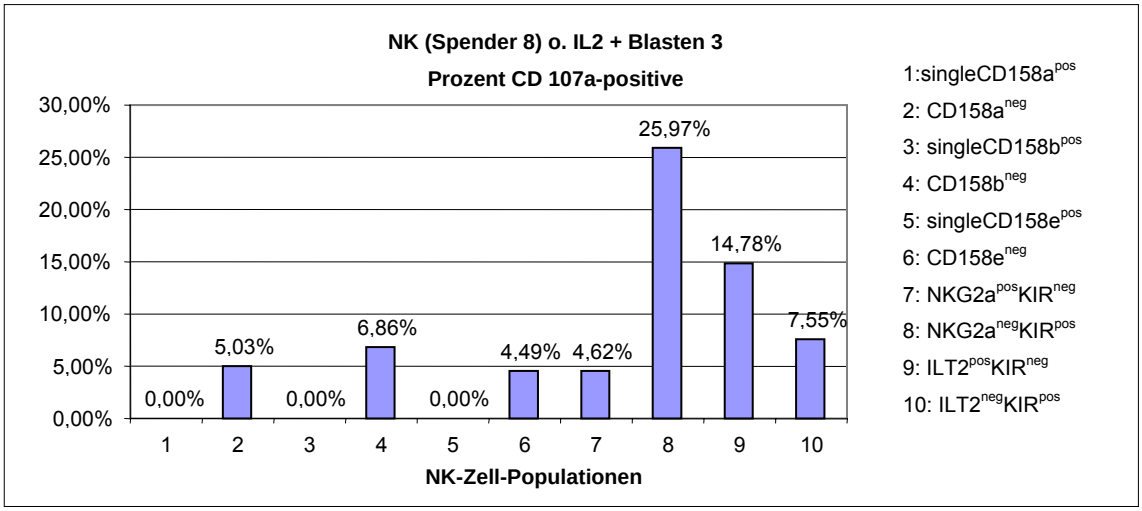


Abbildung 177

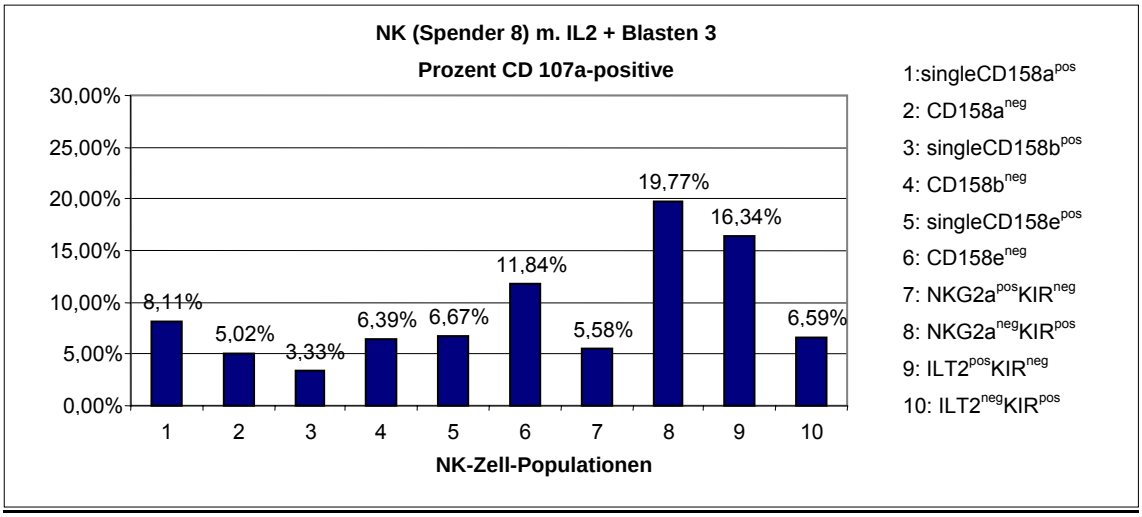


Abbildung 178

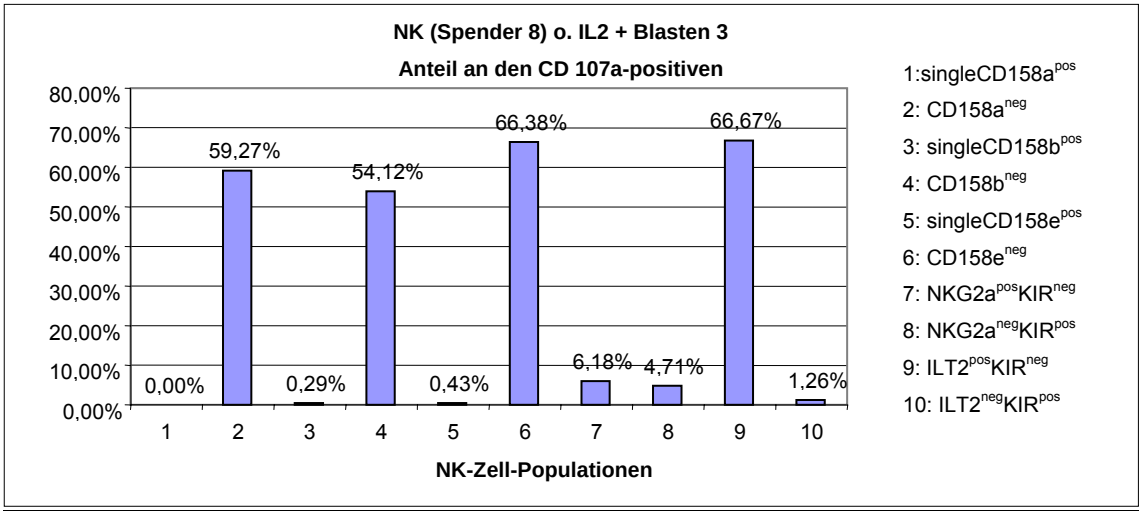
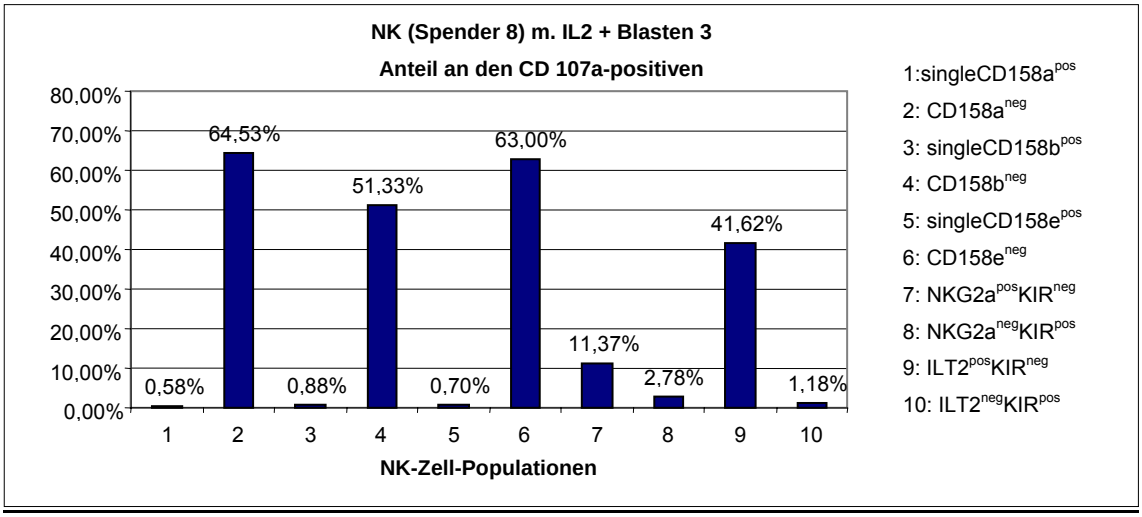


Abbildung 179



Spender 6 – Blasten 4:

Abbildung 180

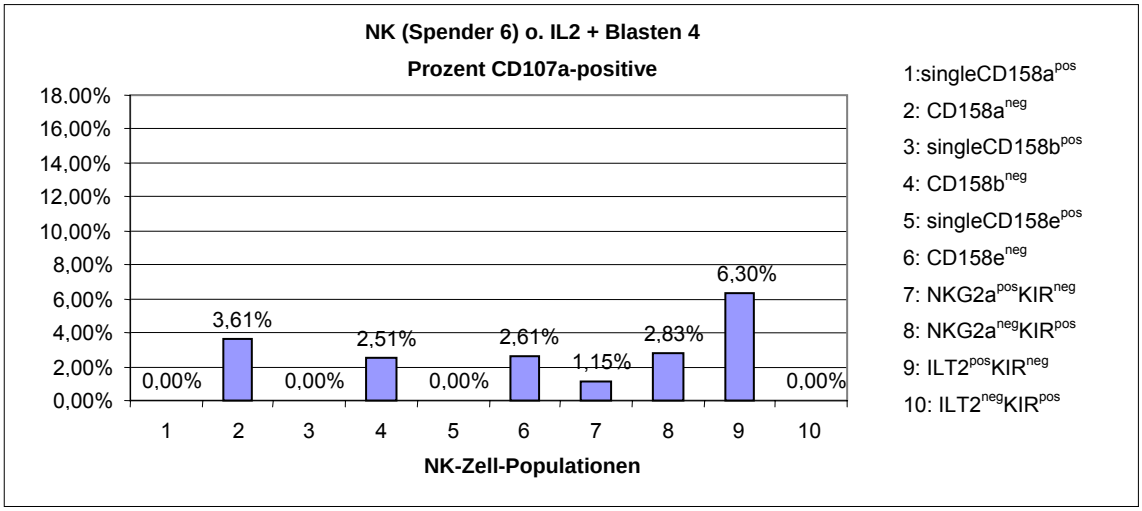


Abbildung 181

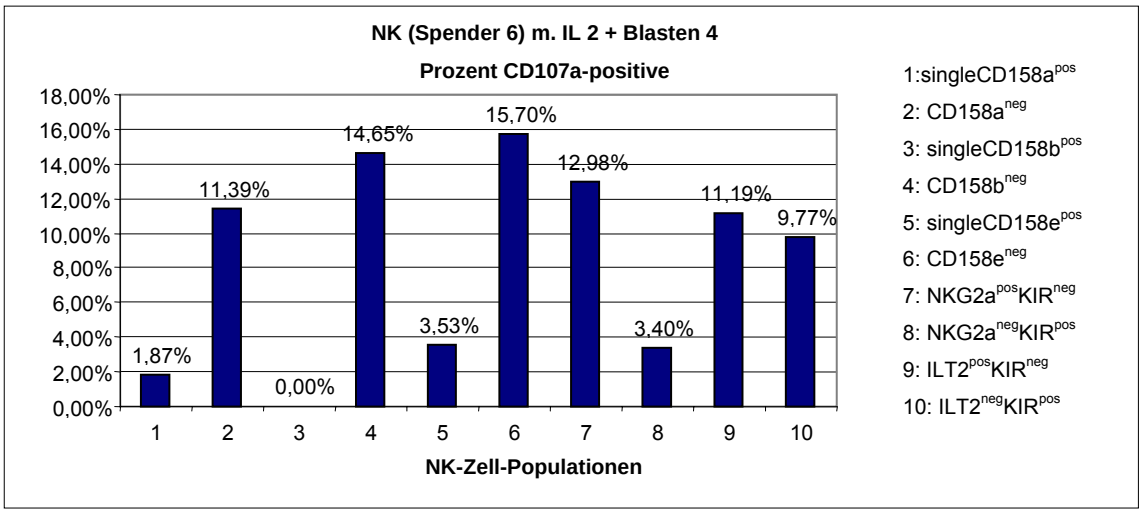


Abbildung 182

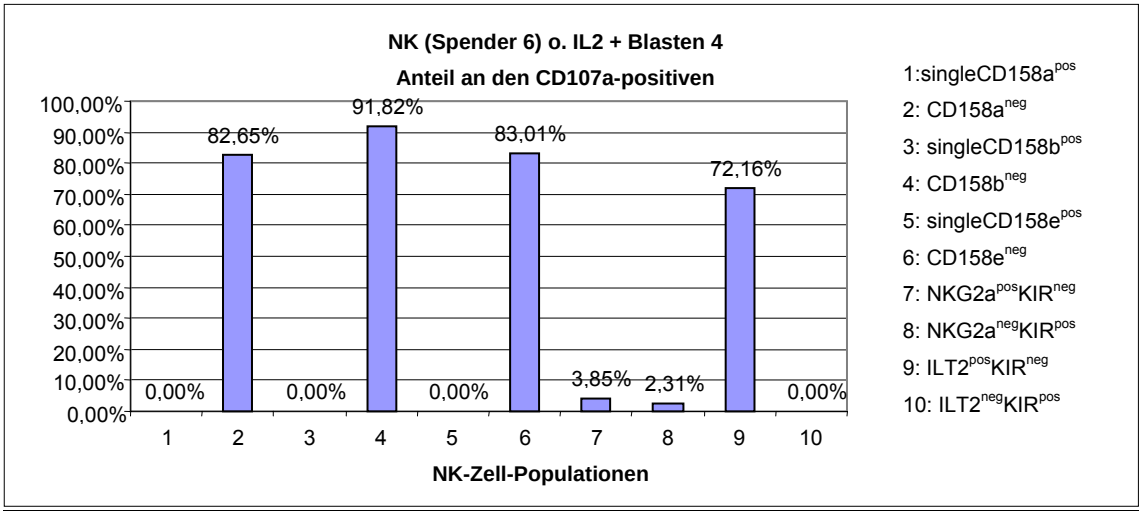
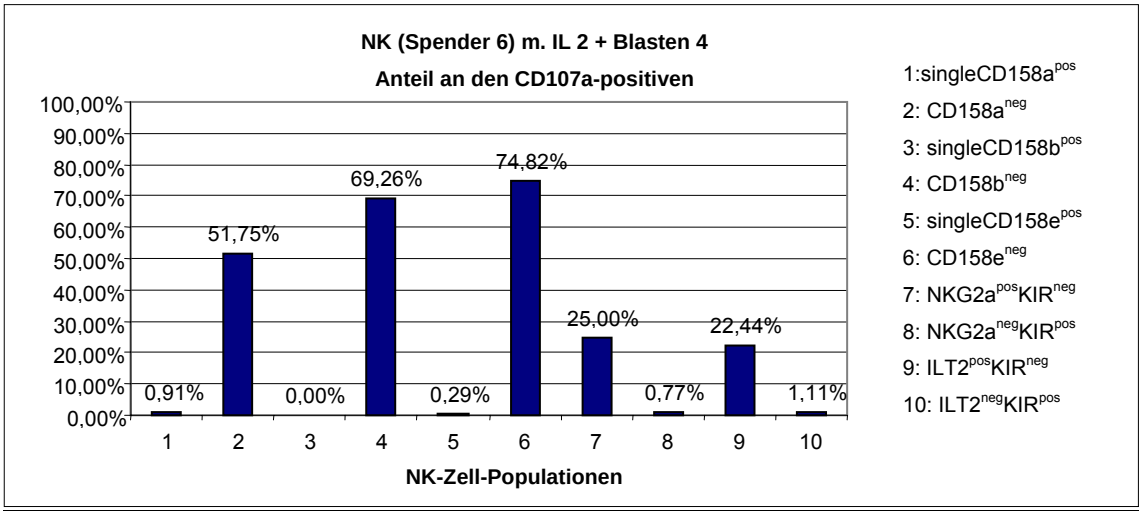


Abbildung 183



Spender 8 – Blasten 4:

Abbildung 184

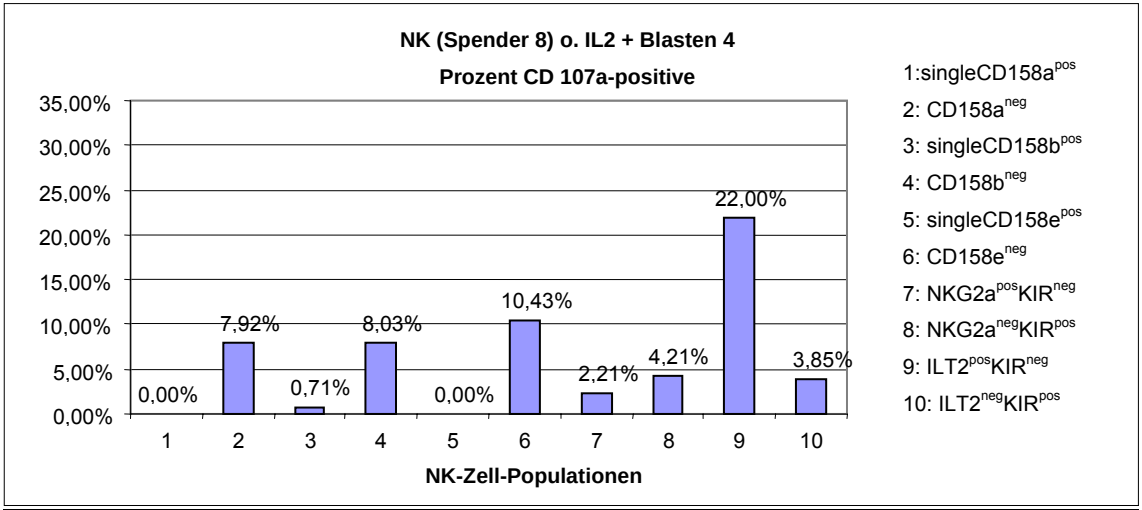


Abbildung 185

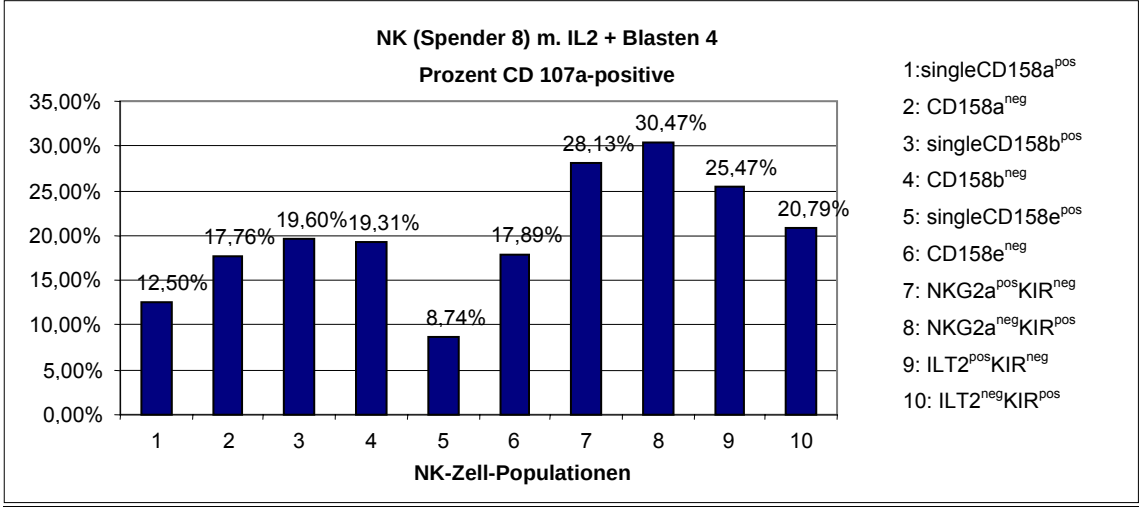


Abbildung 186

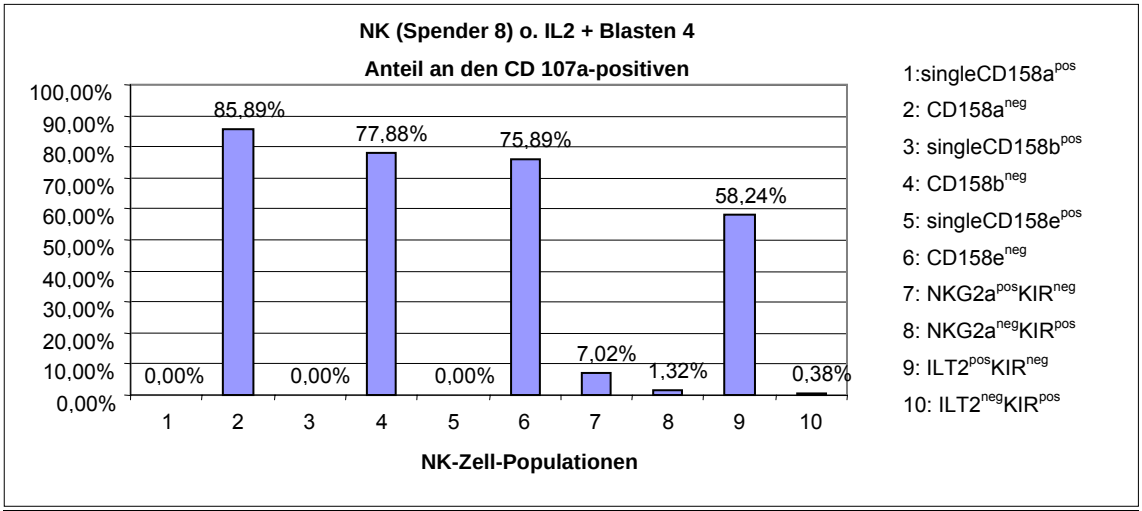
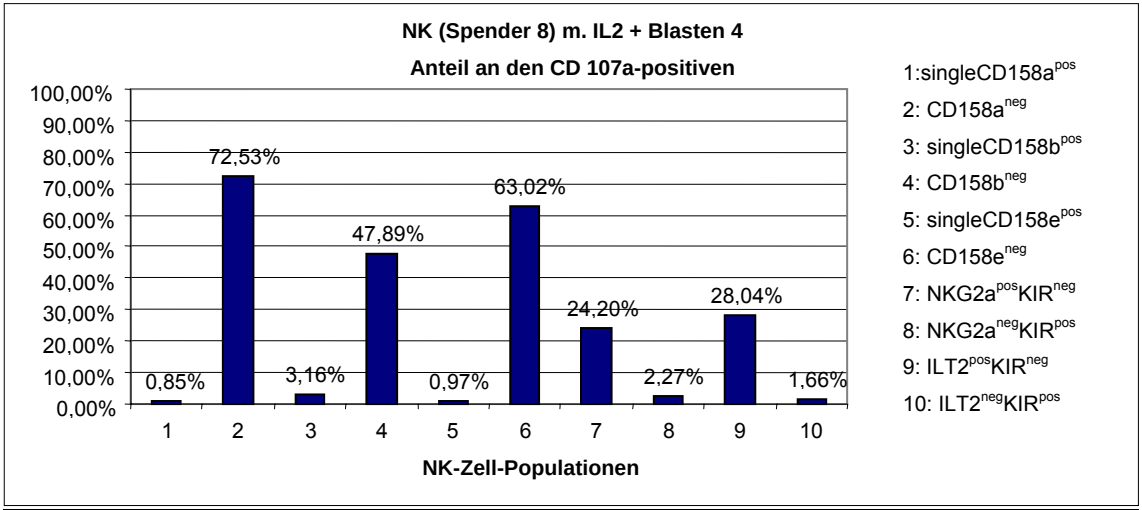


Abbildung 187



7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 24
Abbildung 2 25
Abbildung 3 26
Abbildung 4 26
Abbildung 5 27
Abbildung 6 28
Abbildung 7 29
Abbildung 8 29
Abbildung 9 30
Abbildung 10 33
Abbildung 11 33
Abbildung 12 34
Abbildung 13 34
Abbildung 14 35
Abbildung 15 36
Abbildung 16 36
Abbildung 17 37
Abbildung 18 37
Abbildung 19 38
Abbildung 20 39
Abbildung 21 40
Abbildung 22 41
Abbildung 23 42
Abbildung 24 42
Abbildung 25 43
Abbildung 26 43
Abbildung 27 44
Abbildung 28 45
Abbildung 29 45
Abbildung 30 46

Abbildung 31 46
Abbildung 32 47
Abbildung 33 48
Abbildung 34 49
Abbildung 35 50
Abbildung 36 51
Abbildung 37 51
Abbildung 38 52
Abbildung 39 52
Abbildung 40 54
Abbildung 41 54
Abbildung 42 55
Abbildung 43 56
Abbildung 44 64
Abbildung 45 64
Abbildung 46 65
Abbildung 47 66
Abbildung 48 67
Abbildung 49 68
Abbildung 50 69
Abbildung 51 69
Abbildung 52 70
Abbildung 53 70
Abbildung 54 71
Abbildung 55 71
Abbildung 56 72
Abbildung 57 72
Abbildung 58 73
Abbildung 59 74
Abbildung 60 74
Abbildung 61 75
Abbildung 62 75

Abbildung 63 76
Abbildung 64 77
Abbildung 65 77
Abbildung 66 78
Abbildung 67 79
Abbildung 68 79
Abbildung 69 80
Abbildung 70 80
Abbildung 71 81
Abbildung 72 82
Abbildung 73 82
Abbildung 74 83
Abbildung 75 88
Abbildung 76 88
Abbildung 77 89
Abbildung 78 90
Abbildung 79 91
Abbildung 80 91
Abbildung 81 92
Abbildung 82 93
Abbildung 83 93
Abbildung 84 94
Abbildung 85 94
Abbildung 86 95
Abbildung 87 95
Abbildung 88 96
Abbildung 89 97
Abbildung 90 98
Abbildung 91 98
Abbildung 92 99
Abbildung 93 100
Abbildung 94 100

Abbildung 95 101
Abbildung 96 101
Abbildung 97 103
Abbildung 98 103
Abbildung 99 104
Abbildung 100 104
Abbildung 101 105
Abbildung 102 106
Abbildung 103 106
Abbildung 104 107
Abbildung 105 107
Abbildung 106 108
Abbildung 107 109
Abbildung 108 109
Abbildung 109 110
Abbildung 110 111
Abbildung 111 111
Abbildung 112 112
Abbildung 113 113
Abbildung 114 114
Abbildung 115 114
Abbildung 116 136
Abbildung 117 136
Abbildung 118 137
Abbildung 119 137
Abbildung 120 137
Abbildung 121 138
Abbildung 122 138
Abbildung 123 138
Abbildung 124 139
Abbildung 125 139
Abbildung 126 140

Abbildung 127 140
Abbildung 128 140
Abbildung 129 141
Abbildung 130 141
Abbildung 131 141
Abbildung 132 142
Abbildung 133 142
Abbildung 134 143
Abbildung 135 143
Abbildung 136 143
Abbildung 137 144
Abbildung 138 144
Abbildung 139 144
Abbildung 140 145
Abbildung 141 145
Abbildung 142 146
Abbildung 143 146
Abbildung 144 146
Abbildung 145 147
Abbildung 146 147
Abbildung 147 147
Abbildung 148 148
Abbildung 149 148
Abbildung 150 149
Abbildung 151 149
Abbildung 152 149
Abbildung 153 150
Abbildung 154 150
Abbildung 155 150
Abbildung 156 151
Abbildung 157 151
Abbildung 158 152

Abbildung 159 152
Abbildung 160 153
Abbildung 161 153
Abbildung 162 154
Abbildung 163 154
Abbildung 164 155
Abbildung 165 155
Abbildung 166 156
Abbildung 167 156
Abbildung 168 157
Abbildung 169 157
Abbildung 170 158
Abbildung 171 158
Abbildung 172 159
Abbildung 173 159
Abbildung 174 160
Abbildung 175 160
Abbildung 176 161
Abbildung 177 161
Abbildung 178 162
Abbildung 179 162
Abbildung 180 163
Abbildung 181 163
Abbildung 182 164
Abbildung 183 164
Abbildung 184 165
Abbildung 185 165
Abbildung 186 166
Abbildung 187 166

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 31

Tabelle 2 57
Tabelle 3 58
Tabelle 4 67
Tabelle 5 83

9 Literaturverzeichnis

Alter, G., Malenfant, J. M., Altfeld, M. (2004)
CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity.
J Immunol Methods 294:15-22

Aversa, F., Tabilio, A., Velardi, A., Cunningham, I., Terenzi, A., Falzetti, F., Ruggeri, L., Barbabietola, G., Aristei, C., Latini, P., Reisner, Y., Martelli, F. (1998)
Treatment of high-risk acute leucemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype
N Engl J Med 339:1186-1193)

Bader, P., Hancock, J., Kreyenberg, H., Goulden, N. J., Niethammer, D., Oakhill, A., Steward, C. G., Handgretinger, R., Beck, J. F., Klingebiel, T. (2002)
Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL
Leukemia 16:1668-1672

Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., Spies, T. (1999)
Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA
Science 285:727-729

Betts, M. R., Brenchley, J. M., Price, D. A., De Rosa, S. C., Douek, D. C., Roederer, M., Koup, R. A. (2003)
Sensitive and viable identification of antigen-specific $CD8^+$ T cells by a flow cytometric assay for degranulation
J Immunol Methods 65:

Biondi, A., Valsecchi, M. G., Seriu, T., D'Aniello, E., Willemse, M. J., Fasching, K., Pannunzio, A., Gadner, H., Schrappe, M., Kamps, W. A., Bartram, C. R., van Dongen, J. J., Panzer-Grümayer, E. R. (2000)
Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leucemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group
Leukemia 14(11):1939-1943

Björklund, A., T., Schaffer, M., Fauriat, C., Ringdén, O., Remberger, M., Hammarstedt, C., Barrett, A. J., Ljungman, P., Ljunggren, H.-G., Malmberg, K.-J. (2010)
NK cells expressing inhibitory KIR for non-self-ligands remain tolerant in HLA-matched sibling stem cell transplantation
Blood 115:2686-2694)

Bornhäuser, M., Thiede, C., Brendel, C., Geissler, G., Oelschlägel, U., Neubauer, A., Ehninger, G. (1999)
Stable engraftment after megadose blood stem cell transplantation across the HLA barrier: the case for natural killer cells as graft-facilitating cells
Transplantation 68:87-88

Bourin, P., Mansour, I., Doinel, C., Roue, R., Rouger, P., Levi, F. (1993)
Circadian rhythms of circulating NK cells in healthy and human immunodeficiency virus-infected men
Chronobiol Int 10:298-305

Braud, V. M., Allan, D. S. J., O'Callaghan, C. A., Söderström, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H., Lanier L. L., McMichael, A. J. (1998)
HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C
Nature 391:795-799

Caligiuri, M. A. (2008)
Human natural killer cells
Blood 112:461-469

Champsaur, M., L. L. Lanier (2010)
Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses
Immunol Rev 235:267-285

Chan, A., Hong, D. L., Atzberger, A., Kollnberger, S., Filer, A. D., Buckley, C. D., McMichael, A., Enver, T., Bowness, P. (2007)
$CD56^{bright}$ human NK cells differentiate into $CD56^{dim}$ cells: role of contact with peripheral fibroblasts
J Immunol 179:89-94

Cooley, S., Xiao, F., Pitt, M., Gleason, M., McCullar, V., Bergemann, T. L., McQueen, K. L., Guethlein, L. A., Parham, P., Miller, J. S. (2007)
A subpopulation of human peripheral blood NK cells that lacks inhibitory receptors for self-MHC is developmentally immature
Blood 110:578-586

Cooper, M. A., Fehninger, T. A., Caligiuri, M. A. (2001)
The biology of human natural killer-cell subsets
Trends Immunol 22:633-640

Coustan-Smith, E., Sancho, J., Hancock, M. L., Boyett, J. M., Behm, F. G.,

Raimondi, S. C., Sandlund, J. T., Rivera, G. K., Rubnitz, J. E., Ribeiro, R. C., Pui, C.-H., Campana, D. (2000)
Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia
Blood 96:2691-2696

Cudkowicz, G., Bennett, M. (1971)
Peculiar immunobiology of bone marrow allografts. II. Rejection of parental grafts by resistant F1 hybrid mice
J Exp Med 134:1513-1528

Decot, V., Voillard, L., Latger-Cannard, V., Aissi-Rothé, L., Perrier, P., Stoltz, J. F., Bensoussan, D. (2010)
Natural-killer cell amplification for adoptive leukaemia relapse immunotherapy: comparison of three cytokines, IL-2, IL-15, or IL-7 and impact on NKG2D, KIR2DL1, and KIR2DL2 expression
Exp Hematol 38:351-362

Dulphy, N., Haas, P., Busson, M., Belhadj, S., Peffault de Latour, R., Robin, M., Carmagnat, M., Loiseau, P., Tamouza, R., Scieux, C., Rabian, C., Di Santo, J. P., Charron, D., Janin, A., Socié, G., Toubert, A. (2008)
An unusual $CD56^{bright}CD16^{low}$ NK cell subset dominates the early posttransplant period following HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation
J Immunol 181:2227-2237

Esplugues, E., Vega-Ramos, J., Cartoixà, D., Vazquez, B. N., Salaet, I., Engel, P., Lauzurica, P. (2005)
Induction of tumor NK-cell immunity by anti-CD69 antibody therapy
Blood 105:4399-4406

Fauriat, C., Just-Landi, S., Mallet, F., Arnoulet, C., Sainty, D., Olive, D., Costello, R. T. (2007)

Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction
Blood 109:323-330

Fehninger, T. A., Cooper, M. A., Nuovo, G. J., Cella, M., Facchetti, F., Colonna, M., Caligiuri, M. A. (2003)
$CD56^{bright}$ natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity
Blood 101:3052-3057

Ferlazzo, G., Thomas, D., Lin, S.-L., Goodman, K., Morandi, B., Muller, W. A., Moretta, A., Münz, C. (2004)
The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell ig-like receptors and become cytolytic
J Immunol 172:1455-1462

Feuchtinger, T., Pfeiffer, M., Pfaffle, A., Teltschik, H.-M., Wernet, D., Schumm, M., Lotfi, R., Handgretinger, R., Lang, P. (2009)
Cytolytic activity of NK cell clones against acute childhood precursor-B-cell leukaemia is influenced by HLA class I expression on blasts and the differential KIR phenotype of NK clones
Bone Marrow Transplant 43:875-881

Foley, B., De Santis, D., Lathbury, L., Christiansen, F., Witt, C. (2008)
KIR2DS1-mediated activation overrides NKG2A-mediated inhibition in HLA-C C2-negative individuals
Int Immunol 20:555-563

Fujisaki, H., Kakuda, H., Shimasaki, N., Imai, C., Ma, J., Lockey, T., Eldridge, P., Leung, W. H., Campana, D. (2009)

Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy
Cancer Res 69:4010-4017

Geiselhart, A., Neu, S., Buchholz, F., Lang, P., Niethammer, D., Handgretinger, R. (1996)
Positive selection of CD56+ lymphocytes by magnetic cell sorting
Nat Immun 15:227-233

Grützkau, A., Radbruch, A. (2010)
Small but mighty: how the MACS®-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years
Cytometry 77:643-647

Handgretinger, R., Chen, X., Pfeiffer, M., Schumm, M., Müller, I., Feuchtinger, T., Hale, G., Lang, P. (2008)
Cellular immune reconstitution after haploidentical transplantation in children
Biol Blood Marrow Transplant 14:59-65

Handgretinger, R., Klingebiel, T., Lang, P., Schumm, M., Neu, S., Geiselhart, A., Bader, P., Schlegel, P. G., Greil, J., Stachel, D., Herzog, R. J., Niethammer, D. (2001)
Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34+ progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children
Bone Marrow Transplant 27:777-783

Handgretinger, R., Lang, P., Schumm, M., Pfeiffer, M., Gottschling, S., Demirdelen, B., Bader, P., Kuçi, S., Klingebiel, T., Niethammer D. (2001)
Immunological aspects of haploidentical stem cell transplantation in children
Ann N Y Acad Sci 938:340-357

Hayashi, T., Imai, K., Morishita, Y., Hayashi, I., Kusunoki, Y., Nakachi, K. (2006)
Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance
Cancer Res 66:563-570

Huenecke, S., Zimmermann, S. Y., Kloess, S., Esser, R., Brinkmann, A., Tramsen, L., Koenig, M., Erben, S., Seidl, C., Tonn, T., Eggert, A., Schramm, A., Bader, P., Klingebiel, T., Lehrnbecher, T., Passweg, J. R., Soerensen, J., Schwabe, D., Koehl, U. (2010)
IL-2-driven regulation of NK cell receptors with regard to the distribution of $CD16^+$ and $CD16^-$ subpopulations and in vivo influence after haploidentical NK cell infusion
J Immunother 33:200-210

Jacobs, R., Stoll, M., Stratmann, G., Leo, R., Link, H., Schmidt, R. E. (1992)
CD16- CD56+ natural killer cells after bone marrow transplantation
Blood 79:3239-3244

Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., Sykora, K.-W., Schmidt, R. E. (2001)
$CD56^{bright}$ cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from $CD56^{dim}$ NK cells
Eur J Immunol 31:3121-3126

Kärre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G., Kiessling, R. (1986)
Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy
Nature 319:675-678

Kernan, N. A., Flomenberg, N., Dupont, B., O´Reilly R. J. (1987)
Graft rejection in recipients of T-cell-depleted HLA-nonidentical marrow transplants for leukemia: identification of host-derived antidonor allocytotoxic T

lymphocytes
Transplantation 43:842-847

Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S. M., Lybarger, L., Song, Y.-J., Yang, L., French, A. R., Sunwoo, J. B., Lemieux, S., Hansen, T. H., Yokoyama, W. M. (2005)
Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules
Nature 436:709-713

Knechtli, C. J., Goulden, N. J., Hancock, J. P., Harris, E. L., Garland, R. J., Jones, C. G., Grandage, V. L., Rowbottom, A. W., Green, A. F., Clarke, E., Lankester, A. W., Potter, M. N., Cornish, J. M., Pamphilon, D. H., Steward, C. G., Oakhill, A.
Minimal residual disease status as a predictor of relapse after allogeneic bone marrow transplantation for children with acute lymphoblastic leukaemia
Br J Haematol 102(3):860-871

Koehl, U., Esser, R., Zimmermann, S., Tonn, T., Kotchetkov, R., Bartling, T., Sörensen, J., Grüttner, H.-P., Bader, P., Seifried, E., Martin, H., Lang, P., Passweg, J. R., Klingebiel, T., Schwabe, D. (2005)
Ex vivo expansion of highly purified NK cells for immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation in children
Klin Padiatr 217:345-350

Kook, H., Goldman, F., Padley, D., Giller, R., Rumelhart, S., Holida, M., Lee, N., Peters, C., Comito, M., Huling, D., Trigg, M. (1996)
Reconstruction of the immune system after unrelated or partially matched T-cell-depleted bone marrow transplantation in children: immunophenotypic analysis and factors affecting the speed of recovery
Blood 88:1089-1097

Lanier, L. L., Buck, D. W., Rhodes, L., Ding, A., Evans, E., Barney, C., Phillips, J. H. (1988)
Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen
J Exp Med 167:1572-1585

Lang, P., Schumm, M., Taylor, G., Klingebiel, T., Neu, S., Geiselhart, A., Kuçi, S., Niethammer, D., Handgretinger, R. (1999)
Clinical scale isolation of highly purified peripheral CD34+progenitors for autologous and allogeneic transplantation in children
Bone Marrow Transplant 24(6):583-589

Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Ishitani, A., Navarro, F., López-Botet, M., Geraghty, D. E. (1998)
HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A
Proc Natl Acad Sci USA 95:5199-5204

LeMaoult, J., Zafaranloo, K., Le Danff, C., Carosella, E. D. (2005)
HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells
FASEB J 19(6):662-664

Leung, W., Iyengar, R., Turner, V., Lang, P., Bader, P., Conn, P., Niethammer, D., Handgretinger, R. (2004)
Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells
J Immunol 172:644-650

Löwenberg, B., van Putten, W., Theobald, M., Gmür, J., Verdonck, L., Sonneveld, P., Fey, M., Schouten, H., de Greef, G., Ferrant, A., Kovacsovics, T., Gratwohl, A., Daenen, S., Hujigens, P., Boogaerts, M. (2003)
Effect of priming with granulocyte colony-stimulating factor on the outcome of chemotherapy for acute myeloid leukaemia

N Engl J Med 349:743-752

Lowdell, M. W. (2003)
Natural killer cells in haematopoietic stem cell transplantation
Transfus Med 13:399-404

Makrigiannis, A. P., Anderson, S. K. (2003)
Regulation of natural killer cell function
Cancer Biol Ther 2:610-616

Markel, G., Seidman, R., Besser, M. J., Zabari, N., Ortenberg, R., Shapira, R., Treves, A. J., Loewenthal, R., Orenstein, A., Nagler, A., Schachter, J. (2009)
Natural killer lysis receptor (NKLR)/NKLR-ligand matching as a novel approach for enhancing anti-tumor activity of allogeneic NK cells
PLoS ONE 4:e5597

Marzio, R., Mauel, J., Betz-Corradin, S. (1999)
CD69 and regulation of the immune function
Immunopharmacol Immunotoxicol 21:565-582

Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., Radbruch, A. (1990)
High gradient magnetic cell separation with MACS
Cytometry 11:231-238

Morel, E., Bellón, T. (2008)
HLA class I molecules regulate IFN-γ production induced in NK cells by target cells, viral products, or immature dendritic cells through the inhibitory receptor ILT2/CD85j
J Immunol 181:2368-2381

Moretta, A., Poggi, A., Pende, D., Tripodi, G., Orengo, A. M., Pella, N., Augugliaro, R., Bottino, C., Ciccone, E., Moretta, L. (1991)

CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta.
J Exp Med 174:1393-1398

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

Moretta, L., Moretta, A. (2004)
Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors
EMBO J 23:255-259

Moretta, L., Locatelli, F., Pende, D., Mingari, M. C., Moretta, A. (2009)
Natural killer alloeffector responses in haploidentical hemopoietic stem cell transplantation to treat high-risk leukemias
Tissue Antigens 75:103-109

Nagler, A., Lanier, L. L., Phillips, J. (1990)
Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human $CD16^-$ natural killer cells in vivo
J Exp Med 171:1527-1533

Navarro, F., Llano, M., Bellón, T., Colonna, M., Geraghty, D. E., López-Botet, M. (1999)
The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells
Eur J Immunol 29:277-283

North, J., Bakhsh, I., Marden, C., Pittman, H., Addison, E., Navarrete, C., Anderson, R., Lowdell, M. W. (2007)
Tumor-primed human natural killer cells lyse NK-resistant tumor targets: evidence for a two-stage process in resting NK cell activation
J Immunol 178:85-94

Nowbakht, P., Ionescu, M.-C. S., Rohner, A., Kalberer, C. P., Rossy, E., Mori, L., Cosman, D., De Libero, G., Wodnar-Filipowicz, A. (2005)
Ligands for natural killer cell-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias
Blood 105:3615-3622

Nguyen, S., Dhedin, N., Vernant, J. P., Kuentz, M., Al Jijakli, A., Rouas-Freiss, N., Carosella, E. D., Boudifa, A., Debré, P., Vieillard, V. (2005)
NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect
Blood 105:4135-4142

Obeidy, P., Sharland, A. (2009)
NKG2D and its ligands
Int J Biochem Cell Biol 41:2364-2367

Penack, O., Gentilini, C., Fischer, L., Asemissen, A.M., Scheibenbogen, C., Thiel, E., Uharek L. (2005)
$CD56^{dim}CD16^{neg}$ cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets
Leukemia 19:835-840

Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L.,

Moretta, A. (1999)
Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells
J Exp Med 190:1505-1516

Pende, D., Cantoni, C., Rivera, P., Vitale, M., Castriconi, R., Marcenaro, S., Nanni, M., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, A., Moretta, L. (2001)
Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells. Cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin
Eur J Immunol 31:1076-1086

Pende, D., Spaggiari, G. M., Marcenaro, S., Martini, S., Rivera, P., Capobianco, A., Falco, M., Lanino, E., Pierri, I., Zambello, R., Bacigalupo, A., Mingari, M., C., Moretta, A., Moretta, L. (2005)
Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112)
Blood 105:2066-2073

Pende, D., Marcenaro, S., Falco, M., Martini, S., Bernardo, M. E., Montagna, D., Romeo, E., Cognet, C., Martinetti, M., Maccario, R., Mingari, M. C., Vivier, E., Moretta, L., Locatelli, F., Moretta, A. (2009)
Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity
Blood 113:3119-3129

Peters, P. J., Borst, J., Oorschot, V., Fukuda, M., Krähenbühl, O., Tschopp, J., Slot, J. W. (1991)
Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes

J Exp Med 173:1099-1109

Pfeiffer, M. (2004)
Anreicherung von T-Zell-depletierten NK-Zellen und deren zytotoxische Aktivität gegenüber ALL-Blasten in Abhängigkeit der HLA-Klasse-I-Expression
Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

Pfeiffer, M., Schumm, M., Feuchtinger, T., Dietz, K., Handgretinger, R., Lang, P. (2007)
Intensity of HLA class I expression and KIR-mismatch determine NK-cell mediated lysis of leukaemic blasts from children with acute lymphatic leukaemia
Br J Haematol 138:97-100

Pfeiffer, M. M., Feuchtinger, T., Teltschik, H.-M., Schumm, M., Müller, I., Handgretinger, R., Lang, P. (2010)
Reconstitution of natural killer cell receptors influences natural killer cell activity and relapse rate after haploidentical transplantation of T- and B-cell depleted grafts in children
Haematologica 95:1381-1388

Raffael, A. (1988)
Grundlage der analytischen Durchflußzytometrie
Labor-Medizin 11: 89-97

Reittie, J. E., Gottlieb, D., Heslop, H. E., Leger, O., Drexler, H. G., Hazlehurst, G., Hoffbrand, A. V., Prentice, H. G., Brenner, M. K.
Endogenously generated activated killer cells circulate after autologous and allogeneic marrow transplantation but not after chemotherapy
Blood 73:1351-1358

Rohner, A., Langenkamp, U., Siegler, U., Kalberer, C. P., Wodnar-Filipowicz, A.

(2007)
Differentiation-promoting drugs up-regulate NKG2D ligand expression and enhance the susceptibility of acute myeloid leukemia cells to natural killer cell-mediated lysis
Leuk Res 31:1393-1402

Romagnani, C., Juelke, K., Falco, M., Morandi, B., D'Agostino, A., Costa, R., Ratto, G., Forte, G., Carrega, P., Lui, G., Conte, R., Strowig, T., Moretta, A., Münz, C., Thiel, A., Moretta, L., Ferlazzo, G. (2007)
$CD56^{bright}CD16^{-}$ killer Ig-like receptor^{-} NK cells display longer teleomeres and acquire features of $CD56^{dim}$ NK cells upon activation
J Immunol 178:4947-4955

Romagné, F., André, P., Spee, P., Zahn, S., Anfossi, N., Gauthier, L., Capanni, M., Ruggeri, L., Benson Jr., Don M., Blaser, B. W., Della Chiesa, M., Moretta, A., Vivier, E., Caligiuri, M. A., Velardi, A., Wagtmann, N. (2009)
Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells
Blood 114:2667-2677

Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R. S., Martelli, M. F., Velardi, A. (1999)
Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation
Blood 94:333-339

Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., Martelli, M. F., Velardi, A. (2002)
Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants
Science 295:2097-2100

Ruggeri, L., Mancusi, A., Capanni, M., Urbani, E., Carotti, A., Aloisi, T., Stern, M., Pende, D., Perrruccio, K., Burchielli, E., Topini, F., Bianchi, E., Aversa, F., Martelli, M. F., Velardi, A. (2007)
Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leucemia: challenging its predictive value
Blood 110:433-440

Salih, H. R., Antropius, H., Gieseke, F., Lutz, S. Z., Kanz, L., Rammensee, H.-G., Steinle, A. (2003)
Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia
Blood 102:1389-1396

Schumm, M., Lang, P., Taylor, G., Kuçi, S., Klingebiel, T., Bühring, H. J., Geiselhart, A., Niethammer, D., Handgretinger, R. (1999)
Isolation of highly purified autologous and allogeneic peripheral CD34+ cells using the CliniMACS device
J Hematother 8(2):209-218

Schumm, M., Handgretinger, R., Pfeiffer, M., Feuchtinger, T., Kuçi, S., Faul, C., Vogel, W., Bethge, W., Lang, P. (2006)
Determination of residual T- and B-cell content after immunomagnetic depletion: proposal for flow cytometric analysis and results from 103 separations
Cytotherapy 8:465-472

Sehn, L. H., Alyea, E. P., Weller, E., Canning, C., Lee, S., Ritz, J., Antin, J. H., Soiffer, R. J. (1999)
Comparative outcomes of T-cell-depleted and non-T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: impact of donor lymphocyte infusion

J Clin Oncol 17:561-568

Shiroishi, M., Tsumoto, K., Amano, K., Shirakihara, Y., Colonna, M., Braud, V. M., Allan, D. S. J., Makadzange, A., Rowland-Jones, S., Willcox, B., Jones, E. Y., van der Merwe, P. A., Kumagai, I., Maenaka, K. (2003)
Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G
PNAS 100:8856-8861

Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A. (1997)
p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation
J Exp Med 186:1129-1136

Sivori, S., Parolini, S., Falco, M., Marcenaro, E., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A. (2000)
2B4 functions as a co-receptor in human natural killer cell activation
Eur J Immunol 30:787-793

Smyth, M. J., Swann, J., Creteny, E., Zerafa, N., Yokoyama, W. M., Hayakawa, Y. (2005)
NKG2D function protects the host from tumor initiation
J Exp Med 202:583-588

Stramkova, L., Muzikova, K., Fronkova, E., Krejici, O., Sedlacek, P., Formankova, R., Mejstrikova, E., Stary, J., Trka, J. (2007)
Detectable minimal residual disease before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts extremely poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukaemia
Pediatr Blood Cancer 48:93-100

Takahashi, E., Kuranaga, N., Satoh, K., Habu, Y., Shinomiya, N., Asano, T., Seki, S., Hayakawa, M. (2007)
Induction of $CD16^{+}$ $CD56^{bright}$ nk cells with antitumour cytotoxicity not only from $CD16^{-}$ $CD56^{bright}$ nk cells but also from $CD16^{-}$ $CD56^{dim}$ NK cells
Scand J Immunol 65:126-138

Vago, L., Forno, B., Sormani, M. P., Crocchiolo, R., Zino, E., Di Terlizzi, S., Stanghellini, M. T. L., Mazzi, B., Perna, S., K., Bondanza, A., Middleton, D., Palini, A., Bernardi, M., Bacchetta, R., Peccatori, J., Rossini, S., Roncarolo, M. G., Bordignon, C., Bonini, C., Ciceri, F., Fleischhauer, K. (2008)
Temporal, quantitative, and functional characteristics of single-KIR positive alloreactive natural killer cell recovery account for impaired graft-versus-leukemia activity after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation
Blood 112:3488-3499

Verheyden, S., Demanet, C. (2008)
NK cell receptors and their ligands in leukemia
Leukemia 22:249-257

Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L., Moretta, A. (1998)
NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis
J Exp Med 187:2065-2072

Vitale, M., Castriconi, R., Parolini, S., Pende, D., Hsu M.-L., Moretta, L., Cosman, D., Moretta, A. (1999)
The leukocyte Ig-like receptor (LIR)-1 for the cytomegalovirus UL18 protein displays a broad specificity for different HLA class I alleles: analysis of $LIR\text{-}1^{+}$ NK cell clones
Int Immunol 11:29-35

Waller, E. K., Ship, A. M., Mittelstaedt, S. et al. (1999)
Irradiated donor leukocytes promote engraftment of allogeneic bone marrow in major histocompatibility complex mismatched recipients without causing graft-versus-host disease
Blood 94:3222-3233

Wendt, K. Wilk, E., Buyny, S., Buer, J., Schmidt, R. E., Jacobs, R. (2006)
Gene and protein characteristics reflect functional diversity of $CD56^{dim}$ and $CD56^{bright}$ NK cells
J Leukoc Biol 80:1529-1541

Yawata, M., Yawata, N., Draghi, M., Partheniou, F., Little, A.-M., Parham, P. (2008)
MHC class I specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response
Blood 112:2369-2380

Yu, J., Heller, G., Chewning, J., Kim, S., Yokoyama, W. M., Hsu, K. C. (2007)
Hierarchy of the human natural killer cell response is determinded by class and quantity of inhibitory receptors for self-HLA-B and HLA-C ligands
J Immunol 179:5977-5989

Yu, J., Venstrom, J. M., Liu, X.-R., Pring, J., Hasan, R. S., O'Reilly, R. J., Hsu, K. C. (2009)
Breaking tolerance to self, circulating natural killer cells expressing inhibitory KIR for non-self HLA exhibit effector function after T cell-depleted allogeneic hematopoietic cell transplantation
Blood 113:3875-3884

Zeis, M., Uharek, L., Glass, B., Steinmann, J., Dreger, P., Gassmann, W., Schmitz, N. (1997)

Allogeneic MHC-mismatched activated natural killer cells administered after bone marrow transplantation provide a strong graft-versus-leukaemia effect in mice

Br J Haematol 96:757-761

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Peter Lang für die Überlassung des Themas und die freundliche Betreuung. Ganz besonders danke ich Dr. Matthias Pfeiffer für beständige Unterstützung und hilfreichen Rat, ohne die es diese Arbeit nicht gäbe. Auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des KMT-Labors, besonders Frau Annie Babarin-Dorner, gebührt mein herzlicher Dank für die gute Zusammenarbeit und die Hilfe bei allen Fragen. Für den unverzichtbaren hilfreichen Beistand der Doktorandinnen Ulrike Mura, Christiane Zwicker und Beate Deubzer möchte ich mich ebenfalls ganz herzlich bedanken.

Ebenso danke ich allen freiwilligen Spendern ganz herzlich, die selbst früh morgens am Wochenende bereit waren, Blut zu spenden.

Zuletzt danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern, Jochen Sievers und meiner Schwester. Ihre Unterstützung hat mir das Durchhaltevermögen gegeben, diese Arbeit zu vollenden.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Birgit Pelka
Geburtsdatum:	02. 07. 1983
Geburtsort:	Stuttgart Bad Cannstatt
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulischer Werdegang:

1990 – 1994	Deutsche Schule Seoul
1994 – 2003	Mädchengymnasium St. Agnes, Stuttgart
24. 06. 2003	Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife

Universitärer Werdegang:

2003 – 2010	Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen
05. 04. 2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
30. 04. 2010	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
20. 09. 2010	Approbation als Ärztin

Pflegepraktika:

08/2003 – 10/2003	Klinikum Stuttgart, Katharinenhospital, Abteilung für Gefäßchirurgie
09/2004 – 10/2004	Universitätsklinikum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin Tübingen, Abteilung für Neonatologie

Famulaturen:

08/2006 – 09/2006	Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart, Abteilung für Innere Medizin
08/2007 – 09/2007	Universitätsklinikum für Anästhesiologie und Intensivmedizin Tübingen
03/2008 – 04/2008	Wairarapa Hospital Masterton, Neuseeland, Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe
08/2008 – 09/2008	Praxis für Allgemeinmedizin Dr. B. Erlenbauer, Stuttgart
02/2009	Universitätsklinikum Tübingen, Department für Augenheilkunde

Praktisches Jahr:

02/2009 – 06/2009	Klinikum am Steinenberg Reutlingen, Abteilung für Innere Medizin
06/2009 – 10/2009	Klinikum am Steinenberg Reutlingen, Abteilung für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin
10/2009 – 12/2009	Klinikum am Steinenberg Reutlingen, Abteilung für Chirurgie