Dynamik des KIR- und NKR-Repertoires in pädiatrischen Patienten im Verlauf des ersten Jahres nach Stammzelltransplantation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tuebingen

vorgelegt von
Le, Thuy-Mi

2014

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. R. Handgretinger
2. Berichterstatter: Professor Dr. med. H. Salih

Für meine Eltern Thi Thuy Duong und Vi-Dan Le.

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 7

1.1 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation 7

1.2 Natürliche Killerzellen und ihre Bedeutung 9

1.2.1 Erkennung von Zielzellen 11

1.2.2 Rezeptor-Familien der Natürlichen Killerzellen 14

1.3 KIR Haplotypen 16

1.3.1 Gemeinsame Merkmale von Haplotyp A und B 17

1.3.2 Haplotyp A 17

1.3.3 Haplotyp B 17

1.4 Fragestellung 18

2 PROBANDEN UND MATERIAL 20

2.1 Probanden 20

2.2 Primer 24

2.3 Chemikalien und Reagenzien 26

2.4 Geräte 27

2.5 Laborzubehör 27

2.6 Molkularbiologische Kits 28

2.7 Enzyme 28

3 METHODEN 29

3.1 Versuchsaufbau 29

3.2 Dichtegradientenzentrifugation 30

3.3 RNA Isolierung 31

3.4 Desoxynucleotidtriphosphate 34

3.5 cDNA-Synthese 34

3.6 KIR- und NKR-PCRs 35

3.7 Sequenziergerät: Genetic Analyzer 3130XL von Applied Biosystems 39

3.8 Computer Programme 40

4 ERGEBNISSE 41

4.1 Aufbau der Analyse 41

4.2 Deskriptive Statistik 42

4.3 Activating NKR 44

4.3.1 NKp46 44

4.3.2 NKp30 46

4.3.3 NKG2C 48

4.3.4 NKG2E 49

4.3.5 NKG2D 51

4.4 Inhibitory NKRs 54

4.4.1 ILT2 (= CD85j) 54

4.4.2 NKG2A 58

4.5 Nach Stammzelltransplantation neu aufgetretene Marker 63

4.6 KIR-Haplotypen 63

4.6.1 Eingruppierung der KIR-Haplotypen beim Spender und Empfänger 63

4.7 Trends in grafischen Analysen 65

Generelle Verteilung der KIR-/ NKR-Marker 65

4.7.1 65

4.8 Verteilung von KIR-/ NKR-Marker 66

4.8.1 KIR Inhibitory 66

4.8.2 KIR Activating 67

4.8.3 NKR Inhibitory 68

4.8.4 NKR Activating 69

5 DISKUSSION 70

5.1 Methodenkritik 70
5.1.1 Nachweis von Genaktivitäten auf transkriptionaler nicht jedoch Proteinebene 70
5.1.2 CD56 als Referenzprotein 71

5.2 NKp46 71

5.3 NKG2C und CD226 72

5.4 NKG2D und NKG2E 73

5.5 NKp30 75

5.6 ILT2 75

5.7 NKG2A 76

5.8 Nach Stammzelltransplantation neu aufgetretene Marker 77
5.8.1 KIR3DL1 77
5.8.2 KIR2DL4 78

5.9 KIR Haplotypen in der Gruppe der Verstorbenen 79

5.10 KIR Mismatch 79

5.11 Klinische Relevanz und Ausblick 80

6 ZUSAMMENFASSUNG 85

7 LITERATURVERZEICHNIS 87

8 TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS 93

9 DANKSAGUNG 95

10 LEBENSLAUF 96

11 ANHANG 97

1 Einleitung

1.1 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die allogene Stammzelltransplantation hat einen besonderen Stellenwert in der Therapie von hämatologischen, onkologischen und immunologischen Erkrankungen, da sie kurativ Potenzial hat, auch dann, wenn andere Therapie-Optionen bereits versagt haben. Bemerkenswert sind zudem mehrfach beschriebene *Graft-versus-Tumour* Effekte (Copelan, 2006).

Die Indikation zur Stammzelltransplantation ist aufgrund wachsender, neuer Forschungsergebnisse in ständigem Wandel und wird auch für bestimmte, nicht maligne Stoffwechsel-Erkrankungen mit infauster Prognose in experimentellen Studien durchgeführt.

In der Regel ist in der Kinderheilkunde eine Stammzelltransplantation indiziert bei akuten Leukämie Erkrankungen mit ungünstiger Zytogenetik und bzw. oder schlechtem Therapieansprechen nach 2. Polychemotherapie-Block, sowie bei Rezidiv (Creutzig, et al., 2013; Kilian, et al. 2013). Des Weiteren werden aplastische Anämien und schwere kombinierte Immundefekte durch eine allogene Stammzelltransplantation therapiert (Copelan, 2006).

Bei einer allogenen, hämatopoetischen Stammzelltransplantation werden Stammzellen des blutbildenden Systems eines HLA (Humanes Leukozyten Antigen)-kompatiblen Verwandten oder fremden Spenders gewonnen und nach myeloablativer Konditionierung des Empfängers transplantiert. Dabei gibt es drei mögliche Spender-Konstellationen: Ein HLA-identisches Geschwisterkind, ein HLA-kompatibler Fremdspender oder ein partiell HLA-identischer Familienspender (entspricht einem haplo-identischen Spender, in der Regel ein Elternteil). Da es vor allem für ethnische Minderheiten schwierig ist einen geeigneten Fremdspender zu finden, ist es von besonderem Interesse haplo-identische Stammzelltransplantationen möglichst komplikationsarm durchführen zu können.

Die myeloablative Konditionierung des Empfängers soll alle, insbesondere defekte, Stammzellen beseitigen und spätere Abstoßungsreaktionen vermeiden. Dies wird mittels Chemotherapeutika, Kortikosteroiden und bei Bedarf mittels Radiotherapie erreicht.

Trotz kurativer Chancen der Stammzelltransplantation kann sie schwere Komplikationen mit sich bringen.
Eine *Graft-versus-Host-Disease* (GvHD) entsteht, wenn Spender-T-Zellen auf Gewebe des Empfängers reagieren. Durch die Konditionierung des Empfängers werden Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert, die Zytokine einer Entzündungsreaktion ausschütten. Dies verstärkt die Erkennung der Empfänger-Antigene durch reife Spender-T-Zellen. Es folgt die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen, die schließlich eine GvHD im Zielgewebe hervorrufen. Hauptsächlich sind Darm, Haut und Leber betroffen. Patienten, die eine GvHD entwickeln, zeigen eine höhere Rate an malignen Rezidiven. Eine T-Zell-Depletion der Spenderzellen reduziert das Risiko einer GvHD, jedoch ist dies wiederum mit einer höheren Rezidiv-Rate für bestimmte maligne Erkrankungen verbunden (Jenq und van den Brink, 2010). Außerdem führt diese Maßnahme zu einer höheren Rate von Abstoßungsreaktionen (Copelan, 2006). Im Gegensatz dazu verursachen verabreichte Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) des Spenders keine GvHD (Caligiuri, 2007), (Moretta, et al., 2009). Eine überzeugende Anti-Tumor-Wirkung von NK-Zellen zeigt sich in der haploidenten Stammzelltransplantation: Durch einen KIR (*Killer Immunoglobulin-like Receptors*)-Mismatch kommt es zu einem *Graft-versus-Leukemia-Effect*. Dieser ist nach Stammzelltransplantation für eine niedrigere Rezidivrate und höhere Überlebensrate verantwortlich (Ruggeri, et al., 1999; Symons, et al., 2010). Die größte Wahrscheinlichkeit einen Mismatch von KIR zur MHC-Klasse-I zu erzielen, ergibt sich in folgender Konstellation: Eine HLA haploidentisch-mismatched und T-Zell depletierte, hämatopoetische Stammzelltransplantation bei einer malignen Erkrankung, die anfällig für einen *Graft-versus-Leukemia-Effect* ist. Dies ist häufig der Fall bei der Akuten Myeloischen Leukämie, oder wenn aktivierende Signale durch den Rezeptor

NKG2D (Familie der *Natural Killer cell lectin-like receptor subfamily*) oder Natural Cytotoxicity Triggering Receptors verarbeitet werden (Caligiuri, 2007).
Eine *Natural Killer Cell-versus-tumour response* in bestimmten Empfänger-Spender Paaren kann durch die Expression von KIRs vorhergesagt werden, unabhängig von der HLA-Kompatibilität. Eine optimale Paarung von Spender KIRs und Empfänger MHC ist mit einer signifikanten Reduktion eines malignen Rezidivrisikos verbunden. KIR Typing wird zur Bestimmung von haploidentischen Spendern benutzt um die Raten von maligen Rezidiven, Infekt-Komplikationen und GvHD zu reduzieren (Jenq und van den Brink, 2010).

1.2 Natürliche Killerzellen und ihre Bedeutung

Die ersten Zellen der lymphatischen Zellreihe nach Stammzelltransplantation sind $CD56^{bright}$ Natürliche Killerzellen (Poli et al., 2008), (Federmann, et al., 2011), (Leung, 2011).
Wie bereits hervorgehoben haben Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und ihre Rezeptoren wichtige Funktionen bei der Stammzelltransplantation. Sie haben jedoch auch im Immunsystem eine Sonderstellung, auf die näher eingegangen werden soll.
NK-Zellen wurden seit ihrer Identifizierung 1975, aufgrund ihrer Morphologie, der Expression lymphatischer Marker und Herkunft von einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle im Knochenmark, als Zellen der lymphatischen Reihe klassifiziert. Natürliche Killerzellen werden allgemein als Komponenten der angeborenen Immunabwehr betrachtet, weil ihnen antigenspezifische Zelloberflächenrezeptoren fehlen (Vivier, et al., 2011).
NK-Zellen wurden ursprünglich als zytolytische Effektor-Lymphozyten beschrieben, die direkt und ohne spezifische Immunisierung den Tod von Tumorzellen und virusinfizierten Zellen veranlassen können. Doch die „natürliche“ Effektor-Funktion von NK-Zellen wurde revidiert, da sie ein *Priming* durch verschiedene Faktoren, wie z.B. durch dendritische Zellen oder Makrophagen präsentiertes Interleukin (IL) -15, IL-12 oder IL-18 benötigen um ihr vollständiges Effektor-Potential zu erlangen (Lucas, et al., 2007), (Huntington, et al., 2007), (Vivier et al., 2011).

Es ist jedoch der besondere *„Ready-to-go“* Status von NK-Zellen im Gegensatz zu den T-Zellen hervorzuheben: Ihre Immunantwort kann innerhalb von Minuten getriggert werden. Sie benötigen keine Transkription der Effektor-Substanzen, da Interferon (IFN)-γ-Transkripte bereits in den Vorläufer-NK-Zellen vorhanden sind. Auch muss keine Zellproliferation angeregt werden, bevor eine Immunantwort stattfinden kann (Lanier, 2005).
Natürliche Killerzellen produzieren eine Reihe von Zytokinen. IFN-γ wird sowohl unter physiologischen wie pathologischen Umständen produziert. Andere Zytokine, die produziert werden, wirken sowohl proinflammatorisch als auch immunsuppressiv, wie Tumornekrosefaktor α (TNF-α) und IL-10. Weiterhin werden Wachstumsfaktoren produziert: GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor), G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) und IL-3. Außerdem sezernieren NK-Zellen viele Chemokine, unter anderem IL-8. NK-Zell vermittelte Zytotoxizität und Zytokinproduktion beeinflussen dendritische Zellen, Makrophagen sowie Neutrophile und befähigen NK-Zellen mit regulatorischen Funktionen spätere Antigen-spezifische T- und B-Zell-Reaktionen zu bewirken. (Vivier et al., 2011)

NK-Zellen stammen von CD(Cluster of Differentiation)34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen ab. Die typische Zelloberfläche einer NK-Zelle wird phänotypisch wie folgt definiert: In der Duchflusszytometrie ist CD3 nicht vorhanden, das bedeutet, dass T-Zellen nicht präsent sind. Hingegen wird CD56 exprimiert, eine Isoform von 140 kDa bei Adhäsionsmolekülen von Nervenzellen (NCAM). CD56 kommt auch bei einer Minderheit von T-Zellen vor (Caligiuri, 2007). NK-Zellen können in 2 verschiedene Populationen unterteilt werden anhand ihrer Oberflächen-Antigene: $CD56^{bright}$ $CD16^{dim/-}$ als Vorläuferzellen und $CD56^{dim}$ $CD16^{+}$ als differenzierte Zellen. Die $CD56^{bright}$ $CD16^{dim/-}$ NK-Zellen kommen zum Großteil in sekundären lymphatischen Geweben vor, aber auch in der peripheren Blutbahn. $CD56^{dim}$ $CD16^{+}$ hingegen repräsentieren mindestens 90% der NK-Zellen in peripherem Blut.
Die Fraktion der $CD56^{bright}$ Zellen hat eine hohe Dichte der Oberflächen-Expression von CD56. Diese Zellen können innerhalb von Minuten viele

verschiedene Zytokine und Chemokine produzieren, jedoch sind sie nur im geringen Maß fähig Tumorzellen zu vernichten. $CD56^{dim}$ Zellen hingegen sind ausgereifter, stammen von erst genannter Zell-Fraktion ab und finden sich im Knochenmark, Blut und in der Milz. Beachtlich ist, dass, obwohl sie nur wenige Zytokine produzieren, einige davon in der Lage sind, anfällige Tumorzellen spontan zu lysieren. Das typische Zytokin einer NK-Zelle ist IFN-γ. Dieses formt die Immunantwort von Th1-Zellen, aktiviert APCs (Antigen presenting Cells), die wiederum die MHC-Klasse-I Expression hochregulieren, aktiviert Makrophagen-Aktivität und hat antiproliferative Wirkungen auf virale oder maligne transformierte Zellen. (Caligiuri, 2007)

Eine *Follow-up* Studie über 11 Jahre deckte auf, dass eine niedrige lytische NK-Zell Aktivität mit einem erhöhtem Krebsrisiko einher geht (Imai et al., 2000; Vivier et al., 2011).

1.2.1 Erkennung von Zielzellen

Man hat lange angenommen, dass NK-Zellen die Besonderheit haben, jedes Ziel zu vernichten, das kein MHC (Major Histocompatibility Complex)-Klasse I Molekül präsentiert; die sogenannte „*Missing self Hypothesis*“. Mittlerweile weiß man, dass NK-Zellen viele hemmende und aktivierende Rezeptoren haben, die MHC-Klasse-I – Moleküle beeinflussen (Caligiuri, 2007). T- und B-Zellen besitzen einen einzigen Antigen-Rezeptor, der ihre Entwicklung und Aktivierung dominiert. Im Gegensatz dazu verlassen sich NK-Zellen auf eine ausgedehnte Reihe von Rezeptoren, die über Effektor-Funktionen verfügen (Lanier, 2008).

Natürliche Killerzellen besitzen inhibitorische Rezeptoren, die MHC-Klasse-I Moleküle als ihre verwandten Liganden auf praktisch jeder Zelle im Körper erkennen. Dazu gehören die inhibitorischen KIRs (*Killer Immunoglobin-like Receptors*), die an klassische MHC-Klasse-Ia Liganden (HLA-A, B und C) binden. Weitere inhibitorische Rezeptoren sind CD94-NKG2A heterodimere Rezeptoren, die an nicht-klassische MHC-Klasse-Ib Liganden (HLA-E) binden.

Somit besitzt jede NK-Zelle, die eine Zielzelle vernichten kann, neben aktivierenden auch hemmende Rezeptoren, die bei Erkennung von jeglichen

verwandten MHC-Klasse-I Molekülen die Vernichtung von verwandten Zellen verhindert (Caligiuri, 2007).

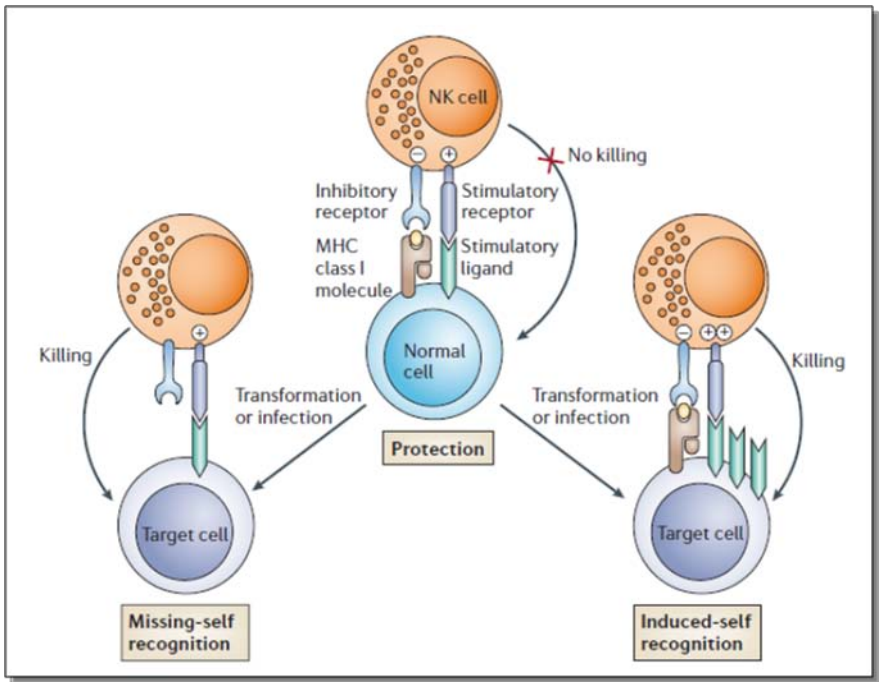


Abbildung 1 Das Gleichgewicht von hemmenden und stimulierenden Signalen, die eine NK-Zelle bekommt, bestimmt das Ergebnis der Interaktion mit den Zielzellen (Raulet & Vance, 2006)

Die **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**Abbildung 1 Das Gleichgewicht von hemmenden und stimulierenden Signalen, die eine NK-Zelle bekommt, bestimmt das Ergebnis der Interaktion mit den Zielzellen (Raulet & Vance, 2006) verdeutlicht das Wirken der NK-Zellen: Gewöhnliche Zellen sind vor der Vernichtung durch NK-Zellen geschützt, wenn Signale von stimulierenden Liganden im Gleichgewicht sind mit hemmenden Signalen, die von MHC-Klasse-I Molekülen ausgehen. Wenn jedoch die Expression von MHC-Klasse-I Molekülen verloren geht, wie es beispielsweise bei Zelltransformationen oder Infektionen der Fall ist, gibt es für die stimulierenden Signale der Zielzelle keine Antagonisten mehr. Daraus folgt eine NK-Zell-Aktivierung und Lyse der Zielzelle (Raulet & Vance, 2006).

Auch besteht die Hypothese der „*induced-self recognition*“: Zelltransformationen oder Infektionen können die Expression von stimulierenden Liganden

hervorrufen, die die konstitutionelle Hemmung durch hemmende Zellrezeptoren überwinden (Bottino, et al., 2005), (Raulet & Vance, 2006). Es ist sehr wahrscheinlich, dass sowohl die „*missing-self*"- als auch die „*induced-self*" *recognition* gleichzeitig wirken, um den NK-Zellen die maximale Fähigkeit zu gewährleisten zwischen gewöhnlichen, transformierten und infizierten Ziel-Zellen zu unterscheiden (Raulet & Vance, 2006).
Man würde nun annehmen, dass ein MHC-Klasse-I Mangel zu NK-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen führt. Doch dies ist nicht der Fall. Auch entsteht keine GvHD (*Graft-versus-Host-Disease*), wenn Patienten bei Stammzelltransplantation NK-Zellen der Spender bekommen. Welche Mechanismen führen zu den Widersprüchen? Es scheint, dass bei MHC-Klasse-I Mangel die Natürlichen Killerzellen in einem nicht aktivierten Stadium bleiben und somit ihre eigentlichen Zielzellen nicht angreifen (Caligiuri, 2007).

Eine sogenannte NK-Zell Alloreaktivität kann bei Stammzelltransplantation hervorgerufen werden: Die Alloreaktivität der Spender-NK-Zellen gegen den Empfänger entsteht durch ein *mismatch* zwischen hemmenden Rezeptoren für MHC-Klasse-I Moleküle auf Spender-NK-Zellen und MHC-Klasse-I Liganden auf Empfängerzellen. Diese Spender-NK-Zellen bemerken die fehlende Expression von eigenen MCH-Klasse-I Molekülen auf den fremden Zielzellen des Empfängers und vermitteln eine Alloreaktion. (Ruggeri, et al., 2006), (Ruggeri, et al., 2007). Diese Reaktion kann als *Graft-versus-Leukemia* oder *Graft-versus-Tumour* Effekt genutzt werden, wie bereits in Kapitel 1.1 im Falle von *KIR mismatch* beschrieben.

1.2.2 Rezeptor-Familien der Natürlichen Killerzellen

Tabelle 1 Eigenschaften von NK-Rezeptor Familien (Dorak, 2012)

NK Rezeptor Familie	Molekulare Struktur	Genetischer Komplex	Liganden
KIR	Ig-Superfamilie	LRC (19q13.4)	HLA-A, -Bw, -Cw, -G
ILT/LIR	Ig-Superfamilie	LRC	HLA Klasse Ia (-G)
CD94/NKG2 (KLR)	*C-type lectin-like*	NKC (12p12.3 - 13.2)	HLA Klasse Ib (-E)
NKG2D (KLRK1)	*C-type lectin-like*	NKC	MIC und MHC Klasse I-ähnliche
NCR	Ig-Superfamilie	Verschiedene, inkl. MHC (NCR3), LRC	Virale Hämagglutinine und andere

Die meisten der NK-Rezeptoren gehören zur Ig-Superfamilie und sind Typ I integrale Membran-Proteine.

1.2.2.1 Killer Cell Ig-Like Receptors

Die KIRs bilden die größte Gruppe der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie. Sie werden im *Leukocyte Receptor Complex/Cluster* (LRC) auf dem menschlichen Chromosom 19q13.42 codiert. KIR Moleküle mit drei Ig-ähnlichen Domänen (KIR3D) sind beteiligt an der Erkennung von HLA-A und-B Molekülen. Hingegen binden KIRs mit zwei Ig-ähnlichen Domänen (KIR2D) an HLA-C Moleküle (Dorak, 2012).

Inhibitorische KIRs besitzen zwei ITIMs (*immune receptor tyorosine-based inhibitory motifs*), die die Tyrosinphosphatase rekrutieren und aktivieren (Dorak, 2012). Der Tyrosin-Rest wird phosphoryliert, wahrscheinlich durch eine Kinase der Src (Sarcoma)-Familie, woraufhin die Lipidphosphatase SHIP-1 rekrutiert wird. Diese baut Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat zu Phosphatidylinositol-3 ,4-bisphosphat ab. Oder es wird die Tyrosinphosphatase SHP-1 oder SHP-2

rekrutiert. Die inhibitorischen NK-Zellen rekrutieren diese Phosphatasen zu der Schnittstelle zwischen NK-Zellen und der voraussichtlichen Zielzelle. Die Tyrosinphosphatasen unterdrücken die NK-Zell-Antworten, indem sie die Proteinsubstrate dephosphorylieren, die mit den aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren verbunden sind. Da sich dies in der Nähe der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren abspielt, können die Phosphatasen $Ca2^{+}$-Einstrom, Degranulation, Zytokinproduktion und NK-Zell-Proliferation beenden (Lanier, 2008).

Aktivierende KIRs besitzen ITAMs (*Immune - receptor tyrosine-based activation motifs)* tragende Rezeptorkomplexe, die durch die Sequenz in der cytoplasmatischen Domäne definiert werden. Das Signalmolekül DAP12 und der IgE-Rezeptor FcεRI-γ besitzen einen einzigen ITAM; der T-Zell Rezeptor CD3-ζ besitzt drei ITAMs pro Kette. Wenn die Rezeptoren DAP12, FcεRI-γ, oder CD3-ζ beansprucht werden, kommt es zur Phosphorylisierung der ITAM-Tyrosine, vermutlich durch Kinasen der Src-Familie. Nach der Phosphorylierung binden ITAM-tragende Untereinheiten die Tyrosin-Kinase Syk (*Spleen tyrosine kinase*) und ZAP 70 (*Zeta-chain-associated protein kinase 70*). Die Hauptfunktionen der NK-Zellen, nämlich Zytokinsekretion und Zytotoxizität, werden durch NK-Zell-Rezeptoren, die ITAMs beinhalten, verschiedenartig reguliert (Lanier, 2008), (Vivier et al., 2011).

1.2.2.2 Ig-like Transcripts/ Leukocyte Ig-like Receptors

ILTs/LIRs sind inhibitorische Rezeptoren, die HLA-Klasse-I als Liganden benutzen. ILTs werden auf Monozyten, dendritischen Zellen, einigen NK-Zellen und B-Zellen exprimiert (Dorak, 2012).

1.2.2.3 NKG2

Die Familie der *Natural Killer cell lectin-like receptor subfamily* bilden den NK Komplex (NKC) auf Chromosom 12p12.3-p13.2.

NKG2A ist ein inhibitorischer Rezeptor. Liganden bildet nicht HLA-E selbst, sondern dessen Komplex, das aus HLA-Klasse I-Vorläufer-Sequenzen abstammt.

Hingegen ist NKG2D ein aktivierender Rezeptor mit NK-Zell vermittelter Zytotoxizität gegen Tumoren und Viren. NKG2D besitzt vielfältige Liganden: MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A), MICB (MHC class I polypeptide-related sequence B) und ULBPs (*UL16 binding proteins*) (Dorak, 2012).

Im Gegensatz zu ITAM beinhaltenden Rezeptoren, benötigt der NKG2D-DAP 10 –Rezeptor-Komplex keine Kinasen der Syk Familie oder LAT (linker for activation of T cells) (Lanier, 2008), (Billadeau, et al., 2003).

1.2.2.4 Natural Cytotoxicity Triggering Receptors

NCRs haben die Fähigkeit eine NK-Zell vermittelte Lyse ohne vorherige Aktivierung einzuleiten. Sie sind unabhängig von MHC-Molekülen. Es handelt sich um die Rezeptoren NKp44, NKp46 und NKp30, die zur Ig-Superfamilie gehören.

NCR-Gene (NCR1, 2 und 3) werden in der frühen Phase der NK-Zell Entwicklung exprimiert, noch vor den KIR-Genen. Sie regulieren möglicherweise die NK-Zell-Differenzierung. Der einzig bekannte Ligand für NKp44 und NKp46 ist virales Hämagglutinin.

NKp30 ist der aktivierende Rezeptor bei der Interaktion zwischen dendritischen Zellen (DCs) und NK-Zellen. Diese Interaktion tritt bei der Entwicklung von dendritischen Zellen auf, um selektiv unreife DCs zu vernichten bevor sie in sekundäre, lymphatische Organe wandern. (Dorak, 2012)

1.3 KIR Haplotypen

Die genomische Vielfalt der KIR Region wird auf mehreren Ebenen erreicht. Zum einen unterscheiden sich KIR-Gene individuell, zum anderen kann ein bestimmter Haplotyp aus mindestens 8 und bis zu 14 KIR-Genen und Pseudogenen bestehen. Einen wesentlichen Beitrag zur KIR-Vielfalt leistet der Allel-Polymorphismus, der durch Punktmutationen und homologe Rekombination entsteht, und für jeden KIR-Loci identifiziert wurde. Durch frühe Bevölkerungsstudien zu KIR-Genen haben sich die KIR Haplotypen A und B herauskristallisiert (Hsu, et al., 2002).

Auch ist es nach Ansicht des „*KIR Nomenclature Committees*“ nützlich die KIR Haplotypen in die Gruppen A und B einzuteilen, da diese potenzielle biologische und medizinische Bedeutung haben. Weiterhin sollen konsistente und logische Kriterien entwickelt werden, um KIR Haplotypen zu unterscheiden. (The European Bioinformatics Institute of the European Molecular Biology Laboratory, 2014)

1.3.1 Gemeinsame Merkmale von Haplotyp A und B

Beide Haplotypen weisen sogenannte „*Framework Genes*“ auf. Insgesamt sind dies vier Gene: Am Centromer-Ende KIR3DL3, am Telomer-Ende KIR3DL2, sowie KIR3DP1 und KIR2DL4 in der Mitte. Bis auf einige Ausnahmen, sind diese KIRs in jedem Individuum zu finden (The European Bioinformatics Institute of the European Molecular Biology Laboratory, 2011), (Rajalingam, 2002).

1.3.2 Haplotyp A

In der Regel sind alle vier „*Framework Genes*“ beim Haplotyp A vorhanden: KIR3DL3, KIR3DL2, KIR3DP1 und KIR2DL4. Zusätzlich findet sich auch KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR2DS4 sowie KIR2DP1(The European Bioinformatics Institute of the European Molecular Biology Laboratory, 2011), (Rajalingam, 2002).

1.3.3 Haplotyp B

Der B Haplotyp zeigt mehrere unterschiedliche Kombinationen von KIR Genen. Dabei kommt von folgenden Genen eines oder mehrere vor: KIR2DL2, KIR2DL5, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5 und KIR3DS1. Hinzu kommen einer bis fünf der „*Activating KIR*“ wie z.B. KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5 und KIR3DS1. Bemerkenswert ist, dass Haplotyp B auch „*Inhibitory KIR genes*“ vorweisen kann, wie z.B. KIR2DL2 und KIR2DL5, die beim Haplotyp A nicht vorkommen (The European Bioinformatics Institute of the European Molecular Biology Laboratory, 2011), (Rajalingam, 2002).

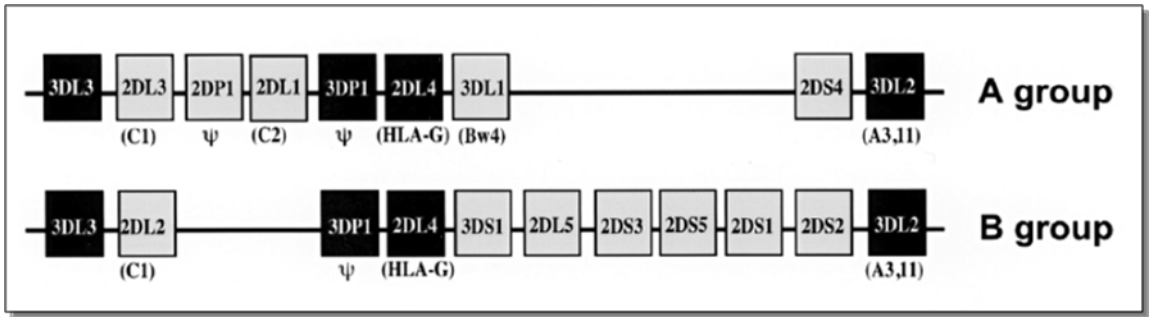


Abbildung 2 Genomische Organisation der zwei KIR Haplotypen (Rajalingam, 2002)

1.4 Fragestellung

Ziel der Arbeit war es auf Transkript-Ebene die Genaktivität der verschiedenen NK-Zell Rezeptoren nach Stammzelltransplantation bei pädiatrischen Patienten nachzuweisen. In der vorliegenden Studie erhielten alle Patienten CD3-/CD-19 depletierte Stammzellen, das bedeutet, dass T- und B-Zellen aus dem Graft depletiert wurden, NK-Zellen des Spenders jedoch mit transplantiert wurden.

NK-Zellen haben bei Stammzelltransplantation beachtliches, therapeutisches Potential: Sie verursachen keine GvHD. Sie ermöglichen bei einem KIR Mismatch einen *Graft-versus-Leukemia* Effekt. Doch sind viele und genaue Regulierungsmechanismen noch ungeklärt.

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von NK-Zellen nach Stammzelltransplantation untersucht. Hierfür wurde analysiert welche Rezeptoren nach der Transplantation wann exprimiert werden, und ob sie bei Komplikationen wie GvHD, Infekten oder Rezidiven moduliert werden. Daraus kann abgeleitet werden, ob sich bestimmte NK-Zell Marker als diagnostische oder prognostischer Marker eignen, insbesondere vor dem Hintergrund dass NK-Zellen die erste lymphatische Zellpopulation nach Stammzelltransplantation sind.

Dafür wurden in KIR- und NKR-Typing aufgeführte KIR- und NKR-Transkripte mittels spezifischer Primer nachgewiesen. Das KIR- und NKR-Typing wurde bei Spendern und pädiatrischen Patienten im Laufe eines Jahres nach Stammzelltransplantation durchgeführt.

Tabelle 2 KIR- und NKR-Typing

KIR- und NKR-Typing

Aktivierende *Killer Immunoglobulin-like Receptors* (KIRs)	KIR2DL4
	KIR2DS1
	KIR2DS2
	KIR2DS3
	KIR2DS4
	KIR2DS5
Inhibierende *Killer Immunoglobulin-like Receptors* (KIRs)	
	KIR2DL1
	KIR2DL2
	KIR2DL3
	KIR2DL5
	KIR3DL1
	KIR3DL2
	KIR3DL3
	KIR3DS1
Aktivierende *Natural Killer Cell Receptors* (NKRs)	
	CD226
	NKG2C
	NKG2D
	NKG2E
Inhibierender *Natural Killer Cell Receptor* (NKR)	NKG2A
***Natural Cytotoxicity Triggering Receptors* (NCRs), aktivierend**	
	NKp30
	NKp46
Ig-like transcript, inhibierend	ILT2 = CD85j

2 Probanden und Material

2.1 Probanden

Probanden waren 27 Patienten und ihre Stammzell-Spender der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen. Bei den untersuchten Patienten wurde innerhalb des Zeitraums von 2007 bis 2009 eine allogene, haploidente Stammzell-Transplantation durchgeführt. Neben der Einwilligung der Patienten und Spender in die Therapie waren diese auch mit molekulargenetischen Untersuchungen zu wissenschaftlichen Zwecken einverstanden.

Das zur Analyse verwendete Material waren Restproben aus Routine-Blutentnahmen von Patienten sowie Restproben von Leukapherisat der Spender.

Die Auswahl der Patienten verlief dabei nach dem Zufallsprinzip, insbesondere ohne vorherige Kenntnis über Diagnose oder Prognose des einzelnen Patienten.

In folgender Tabelle **3** Übersicht der Patienten und jeweiligen Spender, aufgeführt sind die Patienten in anonymisierter Form mit ihrer zugehörigen Krankheitsdiagnose; sowie der dazugehörige Spender mit der Unterscheidung, ob es sich um einen verwandten oder um einen Fremdspender handelt. Ebenfalls aufgeführt sind die HLA-Typisierungen von Patient und Spender.

Tabelle 3 Übersicht der Patienten und jeweiligen Spender

Patient	Diagnose	Spender	Spender-HLA	Empfänger-HLA
1	**cALL**	**HLA-identer Fremdspender**	A*0101/A*0201; B*3503/B*5101; Cw*0401/Cw*1402; DRB1*1104x/DRB1*1101x; DQB1*0301	A*0101/A*0201; B*3502/B*5101; Cw*0401/Cw*1402; DRB1*1104x/DRB1*1101x; DQB1*0301/DQB1*0301
2	**Ewing Sarkom**	**Haploidentisch (Mutter)**	A*0301/A*2902; B*0702/B*4403; Cw*0702/Cw*1601; DRB1*1601/DRB1*0701; DQB1*0502/DQB1*0202	A*0201/A*2902; B*3906x/B*4403; Cw*0702/Cw*1601; DRB1*0404/DRB1*0701; DQB1*0302/DQB1*0202
3	**ALL mit Philadelphia-Chromosom**	**Haploidentisch (Mutter)**	A*68x/A*31x; B*15x/B*38x; Cw*03x/Cw*12x; DRB1*1401/DRB1*0701; DQB1*0301/DQB1*0303x	**Keine Angaben**
4	**cALL**	**Haploidentisch (Vater)**	A*02x/A*11x; B*13x/B*15x; Cw*04x/Cw*03x; DRB1*10x/DRB1*15x; DQB1*0501/DQB1*0601x	A*1101/A*1101; B*1301/B*15x; Cw*0801/Cw*0303; DRB1*1202x/DRB1*1501; DQB1*0301/DQB1*0601x
5	**AML (M2)**	**HLA-identer Fremdspender**	A*0301/A*2402; B*3502/B*5601; Cw*0401/Cw*0102; DRB1*0401/DRB1*1101x; DQB1*0302/DQB1*0301	A*0301/A*2402; B*3501/B*5601; Cw*0401/Cw*0102; DRB1*0401/DRB1*1101x; DQB1*0302/DQB1*0301
6	**AML (M1)**	**Haploidentisch (Mutter)**	A*0101/A*6802; B*5001/B*1503; Cw*0602/Cw*02x; DRB1*0701/DRB1*1001; DQB1*0202/DQB1*0501	A*0101; B*5001/B*5201x; Cw*0602/Cw*1202x; DRB1*0701/DRB1*1401; DQB1*0202/DQB1*0503x
7	**ALL**	**Haploidentisch (Mutter)**	**A*02x/A*11x; B*18x/B*40x; Cw*07x/Cw*15x; DRB1*0701/ DRB1*1404; DQB1*0303x/ DQB1*0503x**	**A*0201/A*3303; B*1808/ B*5801; Cw*0701/ Cw*0302; DRB1*0802x/ DRB1*1404; DQB1*0402/ DQB1*0503x**
8	**Immundefekt** (T-/ B- und NK-SCID)	**Haploidentisch (Mutter)**	A*0101/A*0201; B*5501/B*5101; Cw*0303/Cw*1502; DRB1*1301/DRB1*0401; DQB1*0302/DQB1*0603	A*0201/A*1101; B*1402/B*5101; Cw*0802/Cw*1502; DRB1*0401/DRB1*1301; DQB1*0603/DQB1*06x
9	**AML (M4)**	**Haploidentisch (Mutter)**	A*0101/A*0201; B*5701/B*2705x;	A*0101/A*0201; B*5701/B*4002;

			Cw*0602/Cw*0102; DRB1*0701/DRB1*1101x; DQB1*0303x/DQB1*0301	Cw*0602/Cw*0202x; DRB1*0701/DRB1*1301; DQB1*0303x/DQB1*0603
10	**Z.n. B-NHL; Sek. MDS**	**Haploidentisch (Mutter)**	A*0201; B*4001x/B*5701; Cw*0304/Cw*0602; DRB1*0404/DRB1*0701; DQB1*0302/DQB1*0303x	A*0101/A*0201; B*5701; Cw*0602; DRB1*0303; DQB1*x
11	**SCID**	**Haploidentisch (Bruder)**	A*32x/A*33x; B*13x/B*27x; Cw*0202x/Cw*06x; DRB1*0101/DRB1*0402; DQB1*0302/DQB1*0501	A*3201/A*3303; B*1302/B*2702; Cw*0602/Cw*0202x; DRB1*0101/DRB1*0402; DQB1*0501/DQB1*0302
12	**cALL**	**Haploidentisch (Mutter)**	A*01x/A*03x; B*07x/B*08x; Cw*03x/Cw*1501; DRB1*02x/DRB1*06x	A*0101/A*0201; B*0801/B*1801; Cw*0701; DRB1*0301x/DRB1*1104x; DQB1*0201/DQB1*0301
13	**Aplastische Anämie**	**HLA-identer Fremdspender**	A*0101/A*0201; B*0702/B*0710; Cw*0702/Cw*0702; DRB1*0301/DRB1*1501, DQB1*0602/DQB1*0201	A*0101/A*0201, B*0702/B*0710; Cw*0702/Cw*0702; DRB1*1501/DRB1*0301; DQB1*0602 /DQB1*0201
14	**Chron. Granulomatose**	**HLA-identer Fremspender**	**Keine Angaben**	**Keine Angaben**
15	**AML (M5)**	**Haploidentisch (Vater)**	A*2402/A*0101; B*0702/B*5701; Cw*0702/Cw*0602; DRB1*1501/DRB1*0701; DQB1*0602/DQB1*0303x	A*0101/A*2402; B*4101/B*5701; Cw*0602/Cw*0701; DRB1*0701/DRB1*1305; DQB1*0303x/DQB1*0301
16	**Biphänotyp. Leukämie**	**HLA-identer Fremdspender**	**A*0101/A*0201; B*3701/B*5001; Cw*0602/Cw*--; DRB1* 0301; /DRB1*1103; DQB1*0201/DQB1* 0301**	A*0101/A*0201; B*3701 /B*5001; Cw*0602/Cw*--; DRB1*0301 /DRB1*1103; DQB1*0201/DQB1*0301
17	**cALL**	**Haploidentisch (Mutter)**	A*01x/A*02x; B*07x/B*27x; Cw*02x/Cw*07; DRB1*0101x/DRB1*1501x DQB1*0501/DQB1*0602	A*0101/A*; B*0702/B*0801; C*0701/ C*0702; DRB1*0301x/DRB1*1501x; DRB3*0101x; DRB5*0101x; DQB1*0201/DQB1*0602
18	**Neuroblastom (Stadium IV)**	**Haploidentisch (Mutter)**	A*0101/A*--; B*0801/B*1302; Cw*0602/Cw*0701; DRB1*0301/DRB1*0701,	A*0101/A*0301, B*1302/B*4402; Cw*0501/Cw*0602; DRB1*0701/DRB1*1301;

			DQB1*0201/DQB1*0202	DQB1*0202 /DQB1*0603
19	**B-ALL**	**Haploidentisch (Mutter)**	A*01/A*02; B*57/B*35; Cw*06/Cw*04; DRB1*1501/DRB1*11; DQB1*0602/DQB1*0301	A*0101/A*0301; B*5701/B*0702; Cw*0602/Cw*0702; DRB1*1501/DRB1*0401; DQB1*0602/DQB1*0302
20	**cALL**	**Haploidentisch (Bruder)**	A*03x/A*23x; B*35x/B*49x; Cw*04x/Cw*07x; DRB1*0101/DRB1*1301; DQB1*0504/DQB1*0603	A*0301/A*2301; B*3501/B*4901; Cw*0401/Cw*0701; DRB1*0101/DRB1*1301; DQB1*0504/DQB1*0603
21	**Alpha-Mannosidose**	**HLA-identer Fremdspender**	A*0201/A*0201; B*1501/B*14x; Cw*0304/Cw*0304; DRB1*0401/DRB1*0401; DQB1*0302/DQB1*0302	A*0201/A*0201; B*1501/B*1501; Cw*0304/Cw*0304; DRB1*0401/DRB1*0401; DQB1*0302/DQB1*0302
22	**Z.n. T-NHL (Stadium IV); AML (M0)**	**Haploidentisch (Mutter)**	A*2402/ A*0205; B*3508/ B*5001; Cw*0401/Cw*0602; DRB1 *0403/DRB1*1104x; DQB1 *0301/DQB1*0302	A*0201/A*2402; B*1801/ B*3508; Cw*0701/Cw*0401; DRB1*0403/DRB1*0403; DQB1*0302/DQB1*0302
23	**Neuroblastom (Stadium IV)**	**Haploidentisch (Mutter)**	A*0201; B*1801/B*4001x; Cw*0701/Cw*0304; DRB1*1104x/DRB1*1501; DQB1*0301/DQB1*0602	A*0101/A*0201; B*0801/B*4001x; Cw*0701/Cw*0304; DRB1*0301x/DRB1*1501; DQB1*0201/DQB1*0602
24	**cALL**	**HLA-identisch (Bruder)**	A*2402/A*2501; B*1501/B*1801; Cw*0303/Cw*1203; DRB1*1301/DRB1*1501; DQB1*0603/DQB1*0602	A*2402/A*2501; B*1501/B*1801; Cw*0303/Cw*1203; DRB1*1301/DRB1*1501; DQB1*0603/DQB1*0602
25	**AML; Sek. MDS**	**HLA-identer Fremdspender**	A*0301/A*2402; B*0702/B*5101; Cw*0702/Cw*1502; DRB1*1101x/DRB1*1501; DQB1*0602/DQB1*0301	A*0301/A*2402; B*0702/B*5101; Cw*0702/Cw*1502; DRB1*1101x/DRB1*1501; DQB1*0301/DQB1*0602
26	**Interferon Gamma Rezeptor Defekt Typ 2**	**Haploidentisch (Onkel)**	A*0201/A*2601; B*0801/B*3501; Cw*0702/Cw*0401; DRB1*1601; DQB1*0502	A*2601/A*3201; B*0801/B*5101; Cw*0702/Cw*1602; DRB1*1601/DRB1*1101x; DQB1*0502/DQB1*0302
27	**ALCL** (Großzelliges anaplastisches Lymphom)	**HLA-identisch (Bruder)**	A*0101/A*0301; B*1402/B*5701; Cw*0802/Cw*0602; DRB1*0102/DRB1*0701; DQB1*0303x/DQB1*0501	A*0101/A*0301; B*1402/B*5701; Cw*0802/Cw*0602; DRB1*0102/DRB1*0701; DQB1*0303x/DQB1*0501

2.2 Primer

Die verwendeten Primer enthalten spezifische Sequenzen für Rezeptoren von Natürlichen Killerzellen.
Die Rezeptoren der NK-Zellen können anhand ihrer molekularen Struktur und Wirkung auf NK-Zellen in folgende Gruppen aufgeteilt werden (genauer wurde in der Einleitung darauf eingegangen): *Killer Immunoglobulin-like Receptors* (KIRs), die sich in Gruppen von aktivierenden (KIR2DL4, KIR2DS1-5), und inhibierenden (KIR2DL1-3, 5, KIR3DL1-3, KIR3DS1) Rezeptoren unterteilen lässt.
Natural Killer Cell Receptors (NKRs) haben ebenfalls aktivierende (CD226, NKG2C, D, E) und inhibierende Rezeptoren (NKG2A). Weitere Untergruppen sind *Natural Cytotoxicity Triggering Receptors* (NCRs), die aktivierende Funktion haben (NKp30, 44, 46). ILT2 = CD85j fällt unter den Ig-like transcripts (ILTs, entspricht Leukocyte Ig-like Receptors = LILRs) und wirkt inhibierend.

Die Sequenzen der Primer KIR2DL1-5, KIR2DS1-5, KIR3DL1 und 2, KIR3DS1, sowie CD56 wurden aus Arbeiten von Chen, et al., 2009 entnommen.
Die Sequenzen der Primer NKG2A, C, D, E; NKp30, 46; und CD 85j (ILT2) wurden von PD Dr. rer. nat. Karin Schilbach und Dr. med. Matthias Pfeiffer designed. Alle Primer wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg hergestellt, mit Ausnahme von NKG2A, 2-DFW-FAM, 2DL4-3DFW-FAM und CD56-FAM, die durch Applied Biosystems UK, Warrington Cheshire synthetisiert wurden.

Tabelle 4 KIR- und NKR- Primer

Primer Fluoreszenz	Sequenz	Amplifikat (bp)
KIR 2 DL 1 (reward) 2D (forward) FAM	5`- AGGGTCACTGGGAGCTGACAC-3` 5`- ATGGCGTGTGTTGGGTTCTTC-3`	330
KIR 2 DL 2 (reward) 2D (forward) FAM	5`- GGACCGATGGAGAAGTTGGCT-3` 5`- ATGGCGTGTGTTGGGTTCTTC-3`	245
KIR 2 DL 3 (reward) 2D (forward) FAM	5`-CTCTGTGCAGAAGGAAGTGCTG-3` 5`- ATGGCGTGTGTTGGGTTCTTC-3`	166
KIR 2 DL 4 (reward) 2DL4-3D (forward) FAM	5`-ATAGATGGTAGATGTCAAAGGAGCTCT-3` 5`-GTGGTCGGCACCCAGCAA-3`	152
KIR 2 DL 5 (reward) 2DL4-3D (forward) FAM	5`-AGCCTAGGTTCATGGGCCCT-3` 5`-GTGGTCGGCACCCAGCAA-3`	183
KIR 2 DS 1 (reward) 2D (forward) FAM	5`-GTCCCTGCCAGGTCTTGCT-3` 5`- ATGGCGTGTGTTGGGTTCTTC-3`	269
KIR 2 DS 2 (reward) 2D (forward) FAM	5`-CAATGAGGTGCAAAGTGTCCTTAT-3` 5`- ATGGCGTGTGTTGGGTTCTTC-3`	199
KIR 2 DS 3 (reward) 2D (forward) FAM	5`-AGAGGGTCACTGGGAGCTGAA-3` 5`- ATGGCGTGTGTTGGGTTCTTC-3`	323
KIR 2 DS 4 (reward) 2D (forward) FAM	5`-CTCTCCAATGAGGTGCAAAGTGTT-3` 5`- ATGGCGTGTGTTGGGTTCTTC-3`	204
KIR 2 DS 5 (reward) 2D (forward) FAM	5`-CAATGAGGCGCAAAGTGTG-3` 5`- ATGGCGTGTGTTGGGTTCTTC-3`	199
KIR 3 DL 1 (reward) 2DL4-3D (forward) FAM	5`-GTAGGTCCCTGCAAGGGCAA-3` 5`-GTGGTCGGCACCCAGCAA-3`	265
KIR 3 DL 2 (reward) 2DL4-3D (forward) FAM	5`-CCTGCAAGGACAGGCATCAA-3` 5`-GTGGTCGGCACCCAGCAA-3`	258
KIR 3 DL 3 (reward) 2DL4-3D (forward) FAM	5`-GAATAGTTGACCTGGGAACCCG-3` 5`-GTGGTCGGCACCCAGCAA-3`	228
KIR 3 DS 1 (reward) 2DL4-3D (forward) FAM	5`-AAGGGCACGCATCATGGA-3` 5`-GTGGTCGGCACCCAGCAA-3`	253
CD 56 (reward) CD 56 (forward) FAM	5`-TTCGCTGCTGATGTTCCG-3` 5`-AGGTGGATAAGAACGACGAGG-3`	227
CD 226 (reward) NED CD 226 (forward)	5`-GGGTAAGTGTAAAGAGAGCAGG-3` 5`-CGAGAACATGTCTCTAGAATGTGT-3`	252
CD 85j/ ILT2(reward) NED	5`-CAGCTCCCATGCATTCCAGACTCC-3`	368

CD 85j/ ILT2 (forward)	5`-GGACACTCGGAGCCCACACG-3`	
NKG 2 A (reward) NED **NKG 2 A (forward)**	5`-CACCAATCCATGAGGATGGTG-3` 5`-CTCCAGAGAAGCTCATTGTTGG-3`	329
NKG 2 C (reward) **NKG 2 C (forward) NED**	5`-CTGATGCACTGCAAACGCAAAT-3` 5`-GGAAATATTCCAAGTAGAATTAAAT-3`	620
NKG 2 D (reward) NED **NKG 2 D (forward)**	5`-TAAAGCTCGAGGCATAGAGTGC-3` 5`-GATTCCTCTCTGCGGTAGAC -3`	79
NKG 2 E (reward) NED **NKG 2 E (forward)**	5`-CACACTGGTCTGATATAAGTCCACG-3` 5`-GCCTGTGCTTCAAAGAACTCTTCT-3`	231
NKp 30 (reward) NED **NKp 30 (forward)**	5`-AATGGCCAGTCTCCCTTGG-3` 5`-GCATTTGATGCTCGAGGTCCC -3`	125
NKp 46 (reward) NED **NKp 46 (forward)**	5`-GCTTTTCCTTTGGAACCATGAA-3` 5`-GTCGGGCTGTGTCTGAGTCA -3`	145

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Biocoll (Ficoll)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Desoxynucleosidtriphosphate	GeneAmp® dNTPs, Applied Biosystems, California, USA
EDTA	Universitätsapotheke Tübingen, Deutschland
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lysing-Buffer	Universitätsapotheke Tübingen, Deutschland
1x PBS (w/o Ca^{2+}/Mg^{2+})	GIBCO, Eggenstein, Deutschland
DEPC-behandeltes Wasser	Invitrogen, Groningen, Niederlande
HPLC-Wasser	Sigma Aldrich St. Louis, USA
DNA-Längenstandard	GeneScan™ -500 ROX™ STANDARD, Applied Biosystems®, California, USA
Formamid	Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems®, California, USA

2.4 Geräte

Pipetten	Gilson P2, P10, P20, P100, P200 Gilson, Villers-le Bel, Frankreich
Pipitierhilfe	Accu-Jet® Braun, Melsungen, Deutschland
RNA-Messgerät	Gene Quant II, Pharmacia Biotech, RNA/DNA Calculator, Model 8U-2105-98, New Jersey, USA; Drucker: Seiko Instruments Inc. SII DPU-414-Thermal Printer 30B
Sequenziergerät	3130xL Genetic Analyzer, Applied Biosystems®, California, USA
Vortexgerät	REAX top Heidolph, Nürnberg, Deutschland
Zentrifugen	Mikro 22 R, Rotixa 50 RS, Rotanta 46 RSC Hettich, Tuttlingen, Deutschland Vakuumzentrifuge Vacuum Concentrator, Bachhofer

2.5 Laborzubehör

Verschiedene Glaswaren (Bechergläser, Messzylinder)	Schott Duran®, Mainz, Deutschland
Kyro-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße	Thermo-Strips™ PEQLAB, Erlangen Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
(verschiedene Größen)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland Biozym, Oldendorf, Deutschland
Stabpipetten	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5ml, 2,0ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Reaktionsgefäße 15ml, 50ml	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Spritzen (Verschiedene Größen)	Braun, Melsungen, Deutschland
Well-Platten	MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems®, California, USA
Well-Platten Abdeckung	MicroAmp® 96-Well Full Plate Cover Applied Biosystems®, California, USA

2.6 Molkularbiologische Kits

Kit zur Isolierung von RNA	RNeasy Mini Kit (50) QIAGEN, Hilden, Germany
Kit für cDNA-Umschrieb	Super-Script III First-Strand Invitrogen, Groningen, Niederlande

2.7 Enzyme

Taq-Polymerase (inkl. PCR10xbuffer, 50mM $MgCl_2$)	*Taq* DNA Polymerase Invitrogen, Groningen, Niederlande
Gold Taq (inkl. PCR 10xbuffer, 25mM $MgCl_2$)	AmpliTaq® Gold DNA Polymerase, Applied Biosystems, California, USA

3 Methoden

3.1 Versuchsaufbau

In der vorliegenden Arbeit wurden bei 27 Patienten nach haploidenter Stammzelltransplantation Genaktivitäten von KIRs und NKRs (insgesamt 23) auf Transkriptionsebene nachgewiesen.
Es wurden Proben jeweils an Tag 30, 60, 100, 200 und 365 nach Stammzelltransplantation analysiert. Ebenso analysierten wir dieselben Genaktivitäten vor der Transplantation beim zugehörigen Spender der Patienten.
Zunächst wurden von den Patienten Periphere Mononukleäre Blutzellen (PBMNCs) gewonnen, unter denen sich die Natürlichen Killerzellen befinden, die die gesuchten KIRs und NKRs exprimieren. Die Mononukleären Blutzellen wurden bei den Spendern aus Leukapherisat gewonnen, bei den Patienten aus Routine-Blut-Untersuchungen zu oben stehenden Tagen nach Stammzelltransplantation.
Aus den PBMNCs wurde RNA isoliert, um die KIR- und NKR-Transkripte zu gewinnen. Die RNA wurde zu cDNA umgeschrieben, damit PCRs (Polymerase Chain Reactions) durchgeführt werden können. Durch eine PCR werden ausgewählte DNA-Abschnitte vervielfältigt, um diese durch weitere, unten aufgeführte Methoden nachzuweisen.

Das für NK-Zellen charakteristische Adhäsionsmolekül CD56 wurde als *lineage*-Marker amplifiziert. Mit dem parallelen Nachweis der CD56-Genexpression sollte überprüft werden, ob im untersuchten Material genügend NK-Zellen vorhanden waren und auch tatsächlich die KIR- und NKR-Marker von NK-Zellen nachgewiesen wurden.
Es wurde die Expression der jeweiligen Marker zur Expression von CD56 normalisiert. Somit lassen sich die Expressionen der verschiedenen Marker untereinander vergleichen.

Das Sequenziergerät Genetic Analyzer 3130XL von Applied Biosystems übernahm die Kapillargelelektrophorese, die Analyse der Fragmentlängen und die Detektion der Fluoreszenz-markierten DNA.

3.2 Dichtegradientenzentrifugation

Um periphere mononukleäre Blutzellen (PBMNCs) aus Vollblut oder Leukapherisat zu gewinnen, wurde die Dichtegradientenzentrifugation angewandt.
Als Separationsmedium wurde Ficoll-Hypaque genutzt, ein synthetisches Polysaccharid. Die Dichte von Ficoll-Hypaque mit 1,077g/ml ist größer als die Dichte von Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten und gleichzeitig geringer als die von Erythrozyten und Granulozyten. Durch die Zentrifugalkraft sammeln sich die Zellen geringerer Dichte über der Ficoll-Schicht an und die Zellen größerer Dichte bilden ein Sediment unter der Ficoll-Schicht.

1. Für die Dichtegradientenzentrifugation wurde Vollblut im Verhältnis 1:2 mit PBS-Puffer verdünnt; Leukapherisat wurde im Verhältnis 1:4 verdünnt, aufgrund der größeren Zellzahl. Das Gemisch wurde langsam auf das Ficoll aufgeschichtet. Das Verhältnis von verdünntem Blut bzw. Leukapherisat zu Ficoll lag bei 2/3 zu 1/3.
2. Dieser Gradient wurde bei 800xg für 15 min ohne Bremse zentrifugiert. Dadurch wurden die Zellen höherer Dichte als die des Ficolls von den Zellen niedrigerer Dichte separiert: Über der Ficoll-Schicht bildete sich eine Schicht von PBMNCs, die mit einer Pipette abgenommen wurde.
3. Die gewonnenen Zellen wurden mit PBS-Puffer erst bei 500xg für 12 min, dann bei 400xg für 6 min gewaschen, jeweils wieder mit Bremse.
4. Anschließend wurde das Zellpellet in Lysing-Buffer resuspendiert und 10 min im Dunkeln inkubiert. So wurden verbleibende Erythrozyten lysiert.
5. Das Zellgemisch wurde bei 400xg für 6 min abzentrifugiert.
6. Schließlich wurde wie unter 3. ausgeführt mit PBS-Puffer gewaschen.

3.3 RNA Isolierung

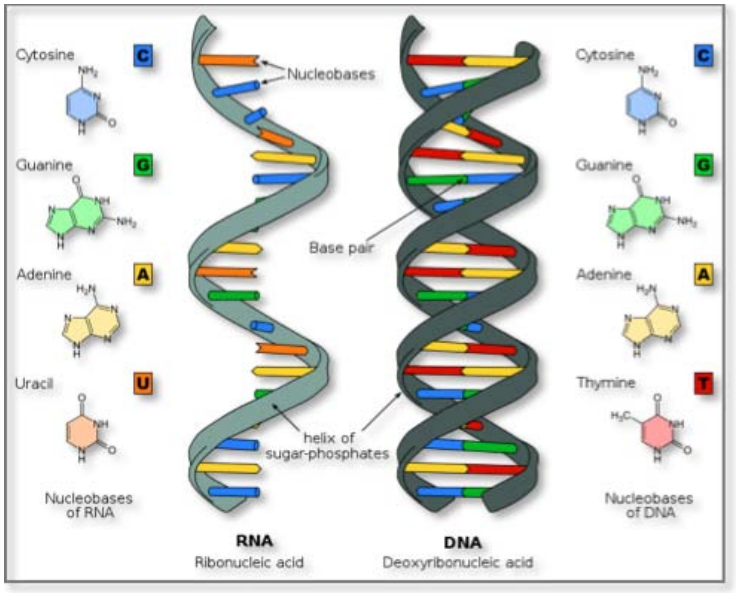


Abbildung 3 Aufbau von RNA und DNA (Thomas Jefferson University, 2012)

Nukleinsäuren kommen in jedem Lebewesen vor. Die Desoxyribonukleinsäure, DNA (desoxyribonucleic acid), codiert genetische Informationen. Eine DNA besteht aus aneinander geknüpften Desoxynukleotiden: Diese sind aufgebaut aus einem Basenanteil (Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin), einem Zuckeranteil (Desoxyribose) und einem Phosphatrest. Zwei Desoxynukleotide werden durch eine Phosphat-Zucker-Bindung verbunden. Zudem besitzt die DNA einen komplementären Strang, der durch Basenpaarungen, die Wasserstoffbrücken bilden, mit dem Gegenstrang verbunden ist. Basenpaare bilden Adenin mit Thymin und Cytosin mit Guanin. (Siehe **Abbildung** 3 Aufbau von RNA und DNA (Thomas Jefferson University, 2012)

Die Ribonukleinsäure, RNA (ribonuecleic acid), enthält die Sequenzinformation zur Proteinsynthese. Die RNA setzt sich zusammen aus mehreren aneinander gereihten Nukleotiden. Diese sind ähnlich aufgebaut wie bei der DNA: Ein Basenanteil (Adenin, Cytosin, Guanin oder Uracil statt Thymin), ein Zuckeranteil (Ribose), und ein Phosphatrest. Auch hier werden die Nukleotide wie bei der DNA durch Phosphat-Zucker-Bindungen verbunden. Im Gegensatz zur DNA ist die RNA meist einsträngig.

Aus einem DNA-Strang kann mit Hilfe von RNA-Polymerasen ein RNA-Molekül synthetisiert werden, eine sogenannte Transkription. Das heißt, ein bestimmter DNA-Abschnitt, der ein Gen codiert, wird in RNA umgeschrieben. Die RNA enthält Informationen, die am Ribosom, zur Protein-Synthese benötigt wird. (Siehe **Abbildung** 4 Transkription und Translation (Sinner, 2007))

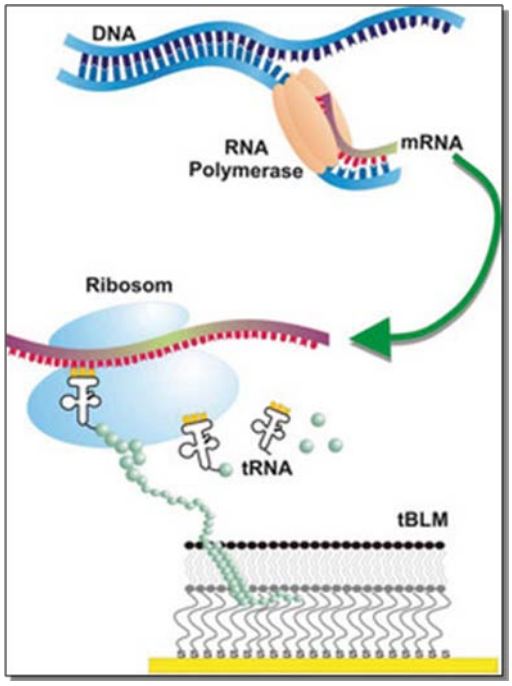


Abbildung 4 Transkription und Translation (Sinner, 2007)

Zur Isolierung von RNA wurde das RNeasy® Mini Kit von *QIAGEN*, Hilden, Deutschland verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren.

1. Pro RNA-Isolierung wurden zwischen $1x10^5$ und $5x10^6$ PBMNCs eingesetzt.
2. Zell-Lyse: RLT-Puffer war für die Denaturierung von Proteinen zusätzlich mit ß-Mercaptoethanol versetzt: 10µl je 1ml RLT-Puffer, entsprechend einer ein-prozentigen ß-Mercaptoethanol-Lösung.
   Bis zu $5x10^6$ Zellen wurden in 350 µl ß-RLT-Puffer aufgenommen; bei mehr als $5x10^6$ Zellen bis $1x10^7$ Zellen wurden diese in 600 µl ß-RLT-Puffer aufgenommen.

3. Homogenisierung und DNA-Scherung: Das Zell-Lysat durchlief mindestens 10 Mal eine 1ml-Spritze mit einer Kanüle von 0,9 mm Diameter.
4. Protein-Entfernung: 70% Ethanol wurde in gleichem Volumenanteil, also 350 oder 600 µl, hinzugegeben und die Flüssigkeiten wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut durchmischt.
   Davon wurden 700 µl auf eine RNeasy Säule von Qiagen mit einem 2 ml Sammelgefäß gegeben und 15 sec bei 14000 rpm abzentrifugiert. Der Säulendurchlauf wurde verworfen, wie auch in den folgenden Schritten 6 - 8.
5. Bei entsprechend vielem Ausgangsmaterial wurde Schritt 4 wiederholt.
6. Dann wurde 700 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und 15 sec bei 14000 rpm abzentrifugiert.
7. Es folgte 500µl RPE Puffer für 1 min bei 14000 rpm. Dies wurde mit einer verlängerten Zeit von 2 min wiederholt.
8. Nun wurde das Sammelgefäß mit Durchlauf verworfen und die Säule mit einem neuem 2 ml Gefäß für 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert.
9. Eluation: Die Säule wurde auf ein frisches 1,5 ml Sammelgefäß überführt und die RNA mit 30 – 50µl RNAse-freiem Wasser eluiert, bei 14000 rpm für 1 min.

Die RNA-Konzentration wurde mittels Gene Quant II von Pharmacia Biotech photometrisch bestimmt.

Nukleinsäuren können mittels UV-Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm quantifiziert werden. Es ist etabliert, dass eine RNA-Lösung mit einer optischen Dichte von 1,0 eine Konzentration von 40 µg/ml enthält, bezogen auf ein Messgefäß mit einer Weglänge von 10 mm. Nukleinsäuren werden bei 260 nm maximal absorbiert, Proteine hingegen werden bei 280 nm maximal absorbiert. Um also die Reinheit einer RNA-Lösung, beziehungsweise die Verunreinigung mit Proteinen zu ermitteln, wird das Verhältnis von A_{260}/A_{280} gemessen. Ein Verhältnis $A_{260}/A_{280} \geq 1{,}8$ spricht für eine gute RNA-Reinheit. Ist das Verhältnis <

1,8 enthält die gemessene Lösung Proteine oder andere Verunreinigungen, oder zu wenig RNA-Material.

3.4 Desoxynucleotidtriphosphate

Die vier Desoxynucleotide ATP, GTP, CTP, TTP wurden in DEPC-Wasser gelöst und lagen damit als 10mM Lösung vor. Die dNTPs wurden in 50µl Alipquots bei -20° C gelagert bis sie verbraucht wurden.

3.5 cDNA-Synthese

Aus RNA kann eine complementary DNA, die sogenannte cDNA synthetisiert werden. Erst diese kann als Template für eine PCR dienen.
Es werden also zur RNA komplementäre DNA-Stränge vervielfältigt, um nachfolgend durch PCR und Kapillargelelektrophorese Genexpressionen nachzuweisen.
Zur Synthese von cDNA aus RNA wurde das „SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix“ Kit von invitrogen™ verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren.
Für die reverse Transkription wurden 0,1 µg bis 2,0 µg RNA pro Ansatz verwendet.

Tabelle 5 cDNA-Mastermix 1

Komponente	Volumen in µl
RNA: 0,1 – 2,0µg	6,0
Primer: 50µM Oligo-dTs	1,0
Annealing Buffer	1,0

Der Mastermix I besteht aus RNA, Oligo-dTs und Pufferlösung. Die Primer in Form von Oligo-dTs hybridisieren beim Abkühlen und mittels Annealing Buffer an die RNA-Stränge und ermöglichen die nachfolgende cDNA-Synthese.
Durch die Verwendung von Oligo-dTs, die jeweils aus 16 – 20 Thymidinen bestehen, kommt es zur spezifischen Bindung an die Poly-A^+-Enden der *messenger*-RNAs. Diese codieren genetische Informationen.

Der cDNA-Mastermix I wird zur Denaturierung von Sekundärstrukturen der RNA in einem Thermo-Cycler bei 65°C für 5 min erhitzt, und anschließend sofort auf Eis gestellt (mindestens 1 min), um eine Rückbildung der RNA-Sekundärstrukturen zu verhindern.

Tabelle 6 cDNA-Mastermix 2

Komponente	Volumen in µl
2x First-Strand Reaction Mix	10,0
SuperScript™III/RNaseOUT™ Enzyme Mix	2,0

Der cDNA-Mastermix 2 besteht aus Pufferlösung, RNase-Inhibitoren und der Reversen Transkriptase. Das Enzym Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Dieses Enzym synthetisiert mit Hilfe von Primern und dNTPs von einem RNA-Einzelstrang einen DNA-Strang und schließlich auch den DNA-Gegenstrang.
Der cDNA-Mastermix 2 wurde dem cDNA-Mastermix 1 hinzugefügt. Die Umsetzung von RNA in cDNA erfolgte im Thermo-Cycler durch Erhitzen auf 50°C und einer Inkubation von 50 min. In dieser Umgebung findet die Reverse Transkriptase ihr Arbeitsoptimum zur cDNA-Synthese.
Abschließend wurde auf 85°C für 5 min erhitzt, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren.

3.6 KIR- und NKR-PCRs

Die PCR dient in der vorliegenden Arbeit zur Vervielfältigung von cDNA-Abschnitten, die von umgeschriebenen RNA-Transkripten stammen.
Bei einer PCR werden zyklisch 3 Phasen in einem Thermo-Cycler durchlaufen, wie Abbildung 5 Prinzip der PCR (Pray, 2008) zeigt:
1. Denaturierung: Die Template-DNA wird erhitzt, worauf sich die beiden DNA-Stränge trennen.
2. Annealing: Durch Temperatur-Senkung im Thermo-Cycler können die Primer an die DNA-Stränge hybridisieren. Primer sind spezifische Oligonukleotide, die

den Start- und Endpunkt für die zu amplifizierenden DNA-Abschnitte bestimmen.

3. Elongation: Bei einer optimalen Arbeitstemperatur von 70 – 74°C für die Taq-Polymerase kann der komplementäre DNA-Strang synthetisiert werden. Das Enzym Taq-Polymerase ist eine thermostabile DNA-Polymerase. Neben den vorhandenen Primern wird eine Pufferlösung benötigt, die ein optimales Milieu für die taq-Polymerase bereitstellt.

Bei den hier durchgeführten PCRs wurden 35 solcher Zyklen durchlaufen.

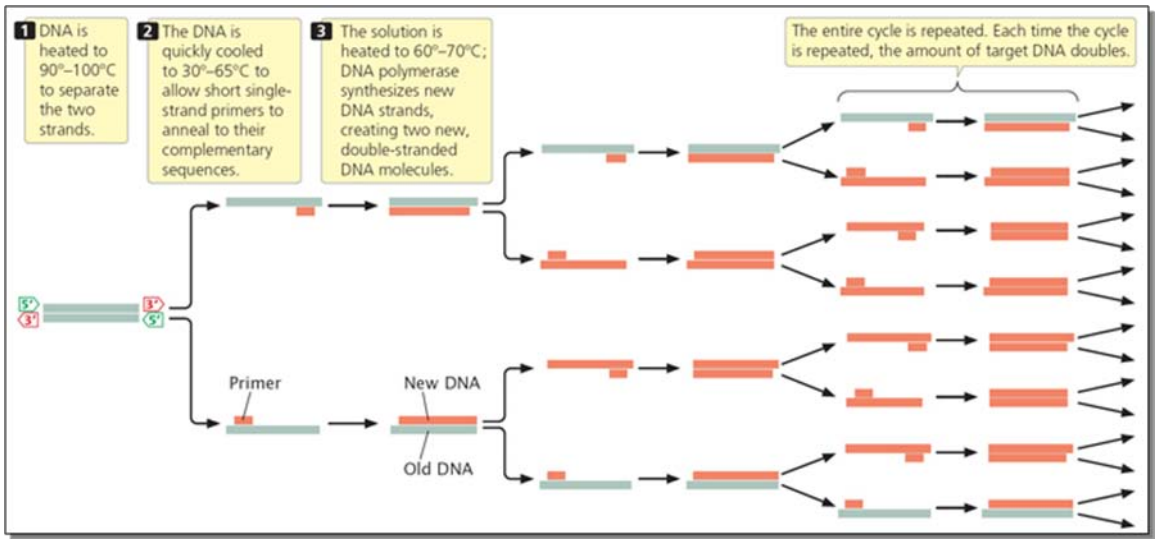


Abbildung 5 Prinzip der PCR (Pray, 2008)

Es wurde eine Multiplex-PCR durchgeführt, das heißt, dass mehrere Amplifikationen in einem Reaktions-Ansatz liefen. Dadurch wurden die cDNA-Nachweise bei der Vielzahl von Patienten und Nachuntersuchungen sowie der Vielzahl der Primer effizienter gestaltet als bei einer einfachen PCR.

Für die Multiplex-PCR wurden in einen Reaktionsansatz 3 – 5 unterschiedliche Primerpaare gegeben, die sich in ihrer Fragmentlänge oder in ihrer Fluoreszens-Markierung unterscheiden.

Die Reaktionsansätze wurden für eine feste Kombination von 3 – 5 KIR-/ NKR-Primerpaare konzipiert, um den gesamten Ansatz nachfolgend auch im Sequenziergerät zur Kapillargelelektrophorese zu nutzen.

Die Mehrzahl der KIR-/ NKR-Transkripte wurden mit der „AmpliTaq® Gold DNA Polymerase“ von Applied Biosystems vervielfältigt, um unspezifische Primer-Bindungen zu reduzieren.

Dies traf zu für: KIR2DL1-4, KIR3DL1/2, KIR2DS1-5, KIR3DL2/3, KIR2DL5, KIR3DS1, CD226, NKp30/44/46, NKG2D/E.

CD56 lief als Referenz mit.

Tabelle 7 Mastermix AmpliTaq® Gold DNA Polymerase je Primerpaar

Komponente	Volumen in µl
H_2O	16,375
Gold Buffer 10x	2,50
25mM $MgCl_2$	3,0
dNTPs 10mM	1,0
cDNA	1,0
Gold Taq	0,125
Primer (forward + reverse) 20pmol/µl = 20µM	1,0
insgesamt	25,00

AmpliTaq® Gold PCR-Programm im Thermo-Cycler						
	Initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Finale Elongation	
Temperatur	95°C	95°C	58°C	72°C	72°C	4°C
Dauer	360 Sek.	15 Sek	45 Sek.	30 Sek.	300 Sek.	∞
		35 Zyklen				

Folgende drei NKR-Marker ließen sich besser mit der *Taq* DNA Polymerase von Invitrogen amplifizieren: CD85j/ ILT2, sowie NKG2A und NKG2C.

CD56 lief ebenfalls als Referenz mit.

Tabelle 8 Mastermix Taq DNA Polymerase je Primerpaar

Komponente	Volumen in µl
H2O	17,9
10xPuffer mit 50mM MgCl2	3,5
dNTPs s.o.	2,0
cDNA	0,3
Taq DNA Polymerase	0,3
Primer (forward + reward) 20pmol/µl = 20µM	1,0
insgesamt	25,00

Taq DNA Polymerase PCR-Programm im Thermo-Cycler						
	Initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Finale Elongation	
Tem-peratur	94°C	94°C	58°C	72°C	72°C	4°C
Dauer	240 Sek.	30 Sek	45 Sek.	30 Sek.	420 Sek.	∞
		35 Zyklen				

Tabelle 9 Tabelle KIR-/ NKR-Primer Kombinationen für Kapillargelelektrophorese über Sequenziergerät

Kombinationen	Primer				
1	KIR2DL4	KIR2DS4	KIR3DL2	NKG2D	
2	KIR2DL3	KIR3DL1		NKp30	CD226
3	KIR2DL5	KIR3DL3	KIR2DS1	NKp46	NKG2E
4	KIR2DS2	KIR2DL2	KIR2DS3	CD56	
5	KIR2DS5	KIR3DS1	KIR2DL1		
6	CD56		NKG2C	NKG2A	ILT2

FAM markiert
NED markiert

Kombinationen 1 – 5 wurden mit der AmpliTaq® Gold DNA Polymerase von Applied Biosystems durchgeführt, Kombination 6 mit der Taq DNA Polymerase von Invitrogen.

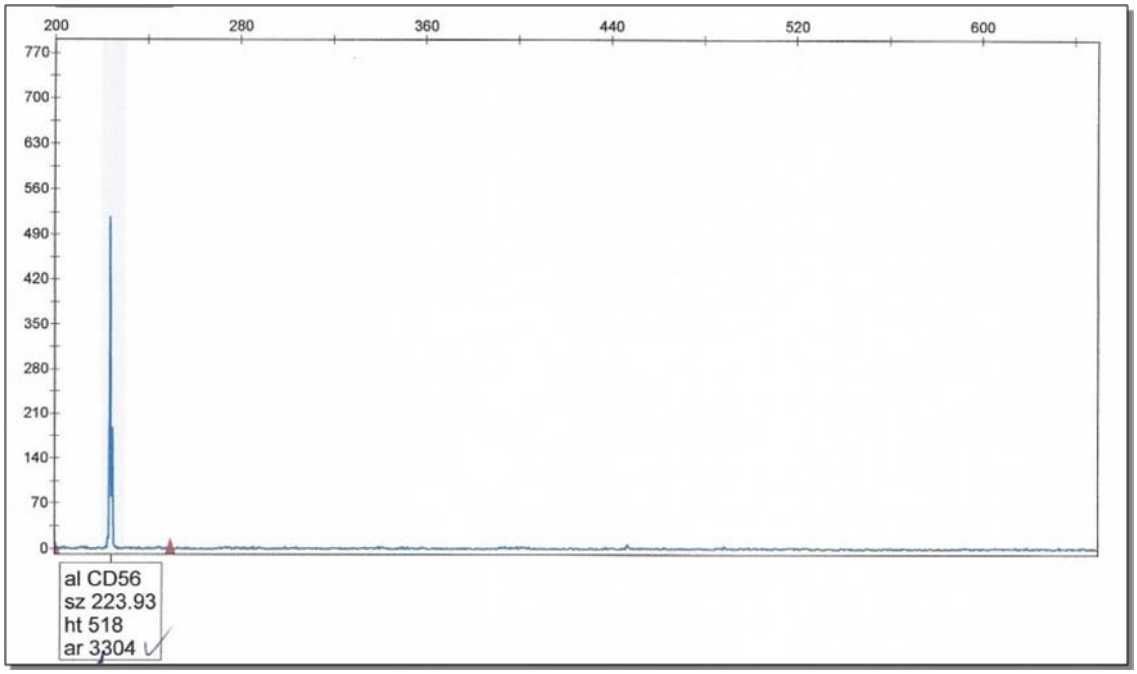
3.7 Sequenziergerät: Genetic Analyzer 3130XL von Applied Biosystems

3-5 FAM bzw. NED konjugierte KIR-/ NKR-Primer wurden in jeweils einer PCR eingesetzt. Die Primer unterschieden sich entweder in ihrer Markierung oder in der Länge des durch sie amplifizierten Produktes.

Der Genetic Analyzer (3130XL von Applied Biosystems) detektierte bei der Kapillargel-Elektrophorese mit Hilfe eines Lasers die Fluoreszens-markierte DNA mit ihrer spezifischen Färbung und ihrer spezifischen Fragmentlänge.

Die Messung wurde graphisch als ein Elektropherogramm ausgegeben: Auf der y-Achse wird die Fragmentlänge [bp] abgebildet und auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität, die als Fläche [ar] unter dem Spitzen-Ausschlag von dem Programm berechnet wird. Dies wurde für jedes KIR-/ NKR-Amplifikat durchgeführt und es entstand ein KIR-/ NKR-Typing.

Abbildung 6 Elektropherogramm für CD56 (Le, 2010)



Für die automatische Erkennung der Elektropherogramme wurden die Proben wie folgt aufbereitet; dabei befanden sich die Ansätze zur Schonung auf Eis.
Von den Kombinationen 1 – 6 mit den KIR-/ NKR-PCRs wurden jeweils 5,0 µl entnommen und mit 45,0 µl HPLC-H_2O verdünnt. Von dieser Mischung wurde wiederum 1,0 µl entnommen und mit 13,5 µl Formamid versetzt; darin enthalten waren zudem 0,5 µl vom DNA-Längenstandard. Die PCR-Längenstandard-Mischung wurde in ein Well der 96-Well-Platte pipettiert. Die Proben wurden bei 90°C über 2 min denaturiert und einige Minuten kühl gestellt bis sie im Sequenziergerät analysiert wurden.

3.8 Computer Programme

Die Erkennung der Fragmentlängen über den Genetic Analyzer 3130XL von Applied Biosystems wurde mittels des Software-Programms „Applied Biosystems Gene Mapper 4.0“ ausgewertet.
Für selbst erstellte Graphiken wurde GraphPad Prism 4, sowie Microsoft Excel 2007 benutzt.

4 Ergebnisse

4.1 Aufbau der Analyse

In der vorliegenden Studie wurden nach allogener Stammzelltransplantation KIR-/NKR-Transkripte jeweils an Tag 30, 60, 100, 200 und 365 bestimmt. Ebenso analysierten wir dieselben Transkripte vor der Transplantation beim zugehörigen Spender der Patienten.
Die Expression der KIR-/ NKR-Marker wurde mit Hilfe des Genetic Analyzers wie folgt angegeben: Fläche unter dem Ausschlag für Transkript x/ Fläche unter dem Ausschlag für CD56; nachfolgend als Marker-Quotient beschrieben.
Die Expression der jeweiligen Marker wurde also zur Expression von CD56, einem NK-Zell spezifischem Molekül als *lineage*-Marker, normalisiert. Somit lassen sich die verschiedenen Marker, die zu mehreren unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen wurden, untereinander vergleichen. Auch wird dadurch eine Quantifizierung der Expressionen möglich.

Von großem Interesse ist dabei, ob nach Stammzelltransplantation die Marker durch bestimmte Ereignisse wie GvHD, Infekt, Rezidiv oder therapeutischen Maßnahmen moduliert werden.
So sollte folgendes in der Analyse untersucht werden:

- Welche Marker werden nach Stammzelltransplantation hoch oder herunter reguliert und steht dies im Zusammenhang mit Ereignissen wie z.B. Infekt oder GvHD?
- Gibt es abweichende Regulationen der Marker bei oben genannten Ereignissen beim KIR Haplotypen A im Vergleich zum Haplotypen B?
- Gibt es abweichende Regulationen der Marker bei oben genannten Ereignissen bei verstorbenen Patienten im Vergleich zu Patienten, die überlebt haben?
- Welche Marker werden nach Transplantation neu exprimiert?

Bei der statistischen Datenanalyse zeigte sich eine sehr große Streubreite innerhalb jedes einzelnen, gemessenen Markers zu den verschiedenen Zeitpunkten während der Ereignisse. Auch weisen die Marker sehr individuelle, Patienten bezogene Profile auf. Die Patientenzahl betrug insgesamt 27.
Die Daten der Marker-Expressionen stammen nicht aus einer Normalverteilung. Zum Test der Normalverteilung wurde der Bera-Jarque Wert herangezogen. Durch diesen Test kann mathematisch schlussgefolgert werden, dass es sich bei den vorliegenden Daten um keine Normalverteilung handelt (siehe Anhang).
Aus oben genannten Gründen können gängige statistische Testverfahren, vor allem solche, die eine Normalverteilung der Daten voraussetzen, nicht angewendet werden. Deshalb wird die Analyse durch deskriptive, also beschreibende Statistik geführt und Trends in grafischen Analysen aufgezeigt.

4.2 Deskriptive Statistik

Es wird die relative Veränderung eines Markers von einem Zeitpunkt zum nächsten betrachtet. Die Marker wurden zu festgelegten Zeitpunkten nach Stammzelltransplantation analysiert (Tag 30, 60, 100, 200, 365). Diese wurden in Zusammenhang mit den Ereignissen Infekt, GvHD, Rezidiv und Ereignis-freies-Intervall gesetzt. Die Ereignisse wurden unabhängig davon betrachtet, ob sie bei ein- und denselben Patienten oder bei verschiedenen Patienten auftraten. Es wurde die Richtung der Veränderungen der Marker betrachtet: Absteigende prozentuale Werte in Bezug auf den jeweils zeitlich vorangegangenen Wert wurden als Herunter-Regulation, entsprechend einer niedrigeren Expression von Markern aufgefasst; und aufsteigende prozentuale Werte als Hoch-Regulation, entsprechend einer höheren Expression von Markern interpretiert. Zusätzlich wurde überprüft, ob es in den Untergruppen der Patienten bezüglich Erkrankung (Leukämie/ Solider Tumor/ andere seltene Erkrankungen), KIR-Haplotyp und Überlebende versus Verstorbene Unterschiede in der Regulation der Marker gab.
Bei der Analyse der Daten zeigte sich, dass die Regulation der *Natural Killer Cell-Receptors* (NKRs) durch oben genannte Ereignisse moduliert wurden. Es

wurden diese, im Folgenden aufgeführte NKRs, in die statistische Analyse aufgenommen:

Activating NKRs:

- NKG2C
- NKG2D
- NKG2E
- NKp30
- NKp46
- CD226 (= DNAM-1).

Inhibitory NKRs:

- NKG2A,
- ILT2 (= CD85j).

Ein- bzw. Ausschlusskriterien der Expressions-Analyse:

- Messwerte zu einem Zeitpunkt, für den es keine klinische Angaben über den Patienten gab, wurden nicht berücksichtigt, da die Messwerte zu keinen Ereignissen in Zusammenhang gebracht werden konnten.
- Treten zwei Ereignisse gleichzeitig auf, wurde wie folgt verfahren:
    - Rezidiv wurde als stärkerer Einfluss gewertet und das weitere Ereignis vernachlässigt.
    - Bei GvHD oder Infekt wurde das Ereignis ausgewählt, das stärker auftrat (z.B. frühe Haut-GvHD hat mehr Einfluss als Fieber).
- Treten Infekt und Therapie gleichzeitig auf, wurde nur der Infekt gewertet, da eine Therapie in der Regel aufgrund des Infektes anschließend durchgeführt wurde.
- Als statistisch Aussage kräftig wurden Ereignisse gewertet, zu denen mindestens 15 gemessene Werte vorlagen.

Grafische Darstellung der Expressions-Analyse:

- Im Säulen-Diagramm wird für jedes Ereignis (GvHD, Infekt, *„No Event“*, Rezidiv und Therapie) die Anzahl der gemessenen Marker-Werte als Säule dargestellt.

- Hoch-Regulationen werden in einer roten Säule angezeigt und Herunter-Regulationen in einer blauen Säule. Pfeile verdeutlichen auffällige Regulationen.

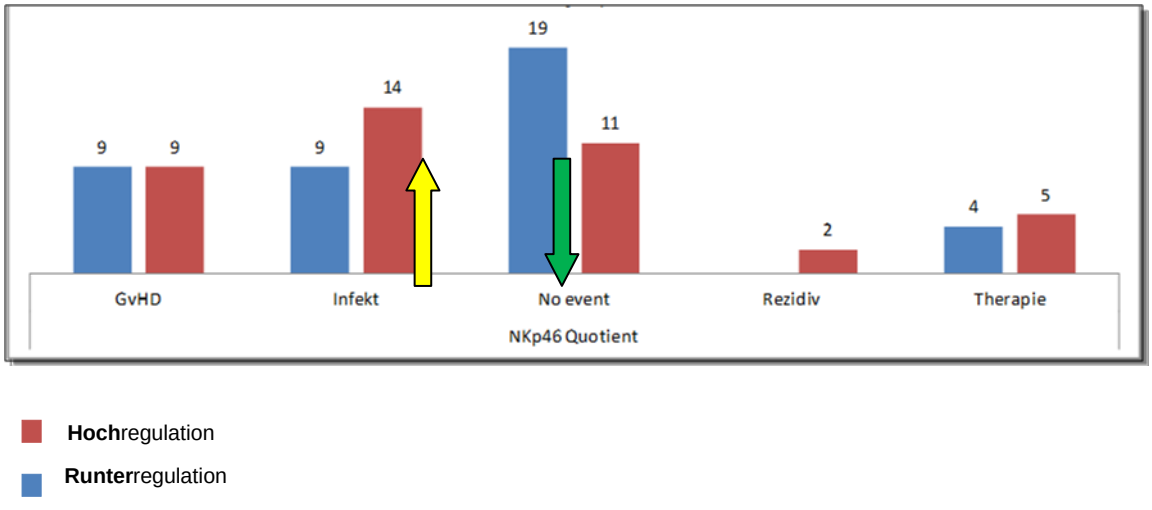
Zur Analyse der Untergruppen wurde jedes Ereignis nochmals in die untersuchten Untergruppen aufgeteilt: Für jede Gruppe wurde eine rote Säule der Hoch-Regulation und eine blaue Säule der Herunter-Regulation dargestellt.

4.3 Activating NKR

4.3.1 NKp46

Die stärkste, Ereignis assoziierte-Regulation zeigte die Expression von NKp46: Bei Infekt zeigten 61% der NKp46-Marker eine Hochregulation. Ohne Ereignis („*No event*“) war NKp46 zu 63% niedriger exprimiert.
Bei GvHD waren Hoch- und Herunter-Regulation ausgeglichen (50% positiv/ 40% negativ). Für die Ereignisse Therapie und Rezidiv gab es zu wenige Messwerte für eine Auswertung.

Abbildung 7 Allgemeine Regulation von NKp46

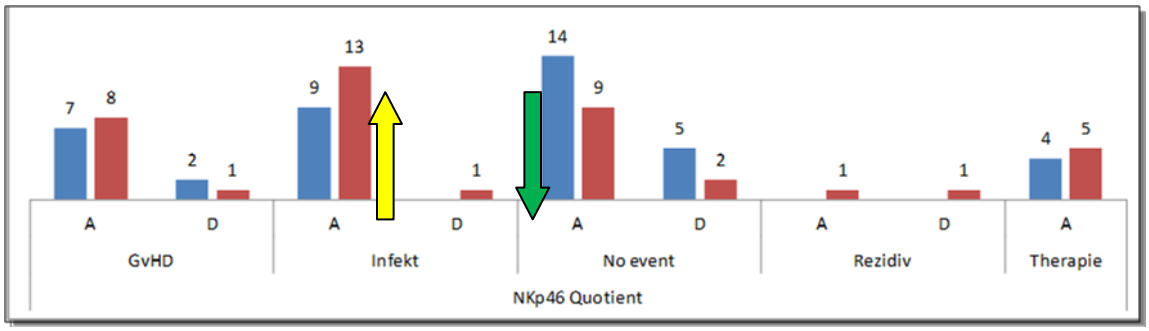


Die Beobachtung der Hochregulation bei Infekt und der Herunter-Regulation wenn kein Ereignis vorliegt, hat sich durch alle Untergruppen hindurch gezogen:

In der Gruppe der Überlebenden wurden bei Infekt in 59% der Fälle NKp46 hoch reguliert. Im Gegensatz dazu wurde NKp46 zu 61% runter reguliert, wenn kein Ereignis auftritt. Bei der Gruppe der Verstorbenen gab es zu wenige Messwerte für eine Auswertung.

Bei Patienten mit KIR-Haplotyp B wurden bei Infekt sogar 82% der Fälle NKp46 hochreguliert, ohne Ereignis jedoch 78% herunter reguliert. Bei KIR-Haplotyp A gab es zu den jeweiligen Ereignissen zu wenige Messwerte für eine Auswertung.

Abbildung 8 NKp46 Regulation bei Überlebenden (*Alive*) versus Verstorbene (*Deceased*)

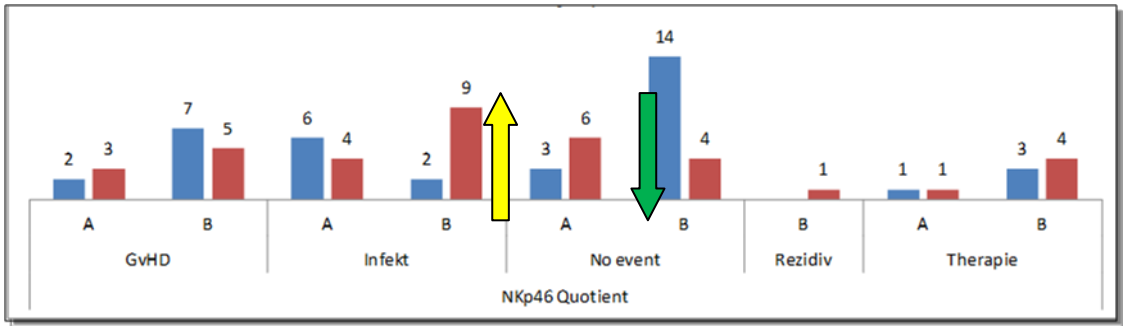


Hochregulation

Runterregulation

A = Alive
D = Deceased

Abbildung 9 NKp46 Regulation bei KIR-Haplotyp A versus KIR-Haplotyp B



Hochregulation

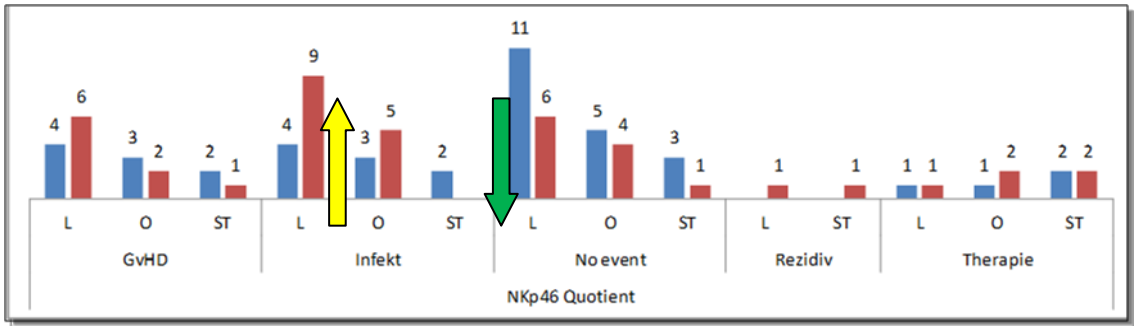
Runterregulation

A = KIR-Haplotyp A
B = KIR-Haplotyp B

Auch bei den Patienten mit einer Leukämie-Erkrankung wurden bei Infekt 75% der Fälle NKp46 hochreguliert, ohne Ereignis jedoch 65% der Fälle herunter reguliert.

Für die anderen Erkrankungen (Solider Tumor und andere seltene Erkrankungen wie Immundefekte) gab es zu den jeweiligen Ereignissen zu wenige Messwerte für eine Auswertung.

Abbildung 10 NKp46 Regulation bei verschiedenen Erkrankungen



Hochregulation

Runterregulation

L = *Leukemia*
O = *Others* (Andere seltene Erkrankungen)
ST = *Solid Tumors*

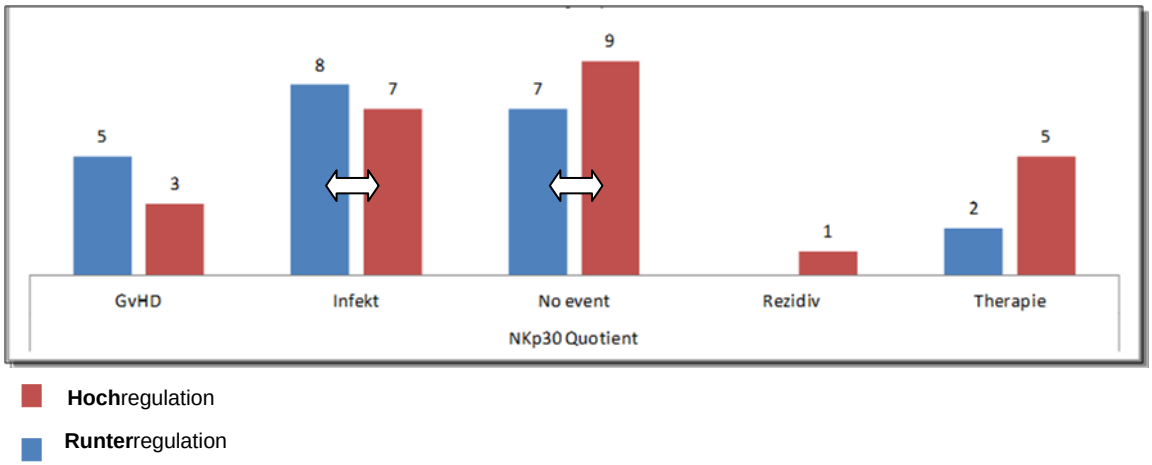
4.3.2 NKp30

Eine Regulation von NKp30 war bei Infekt (47% positiv/ 53% negativ) und „*No Event*“ (44% positiv/ 56% negativ) relativ ausgeglichen. Dies spricht für eine Ereignis-unabhängige Hochregulation.

Für die Ereignisse GvHD, Rezidiv und Therapie gab es zu wenige Messwerte für eine Auswertung.

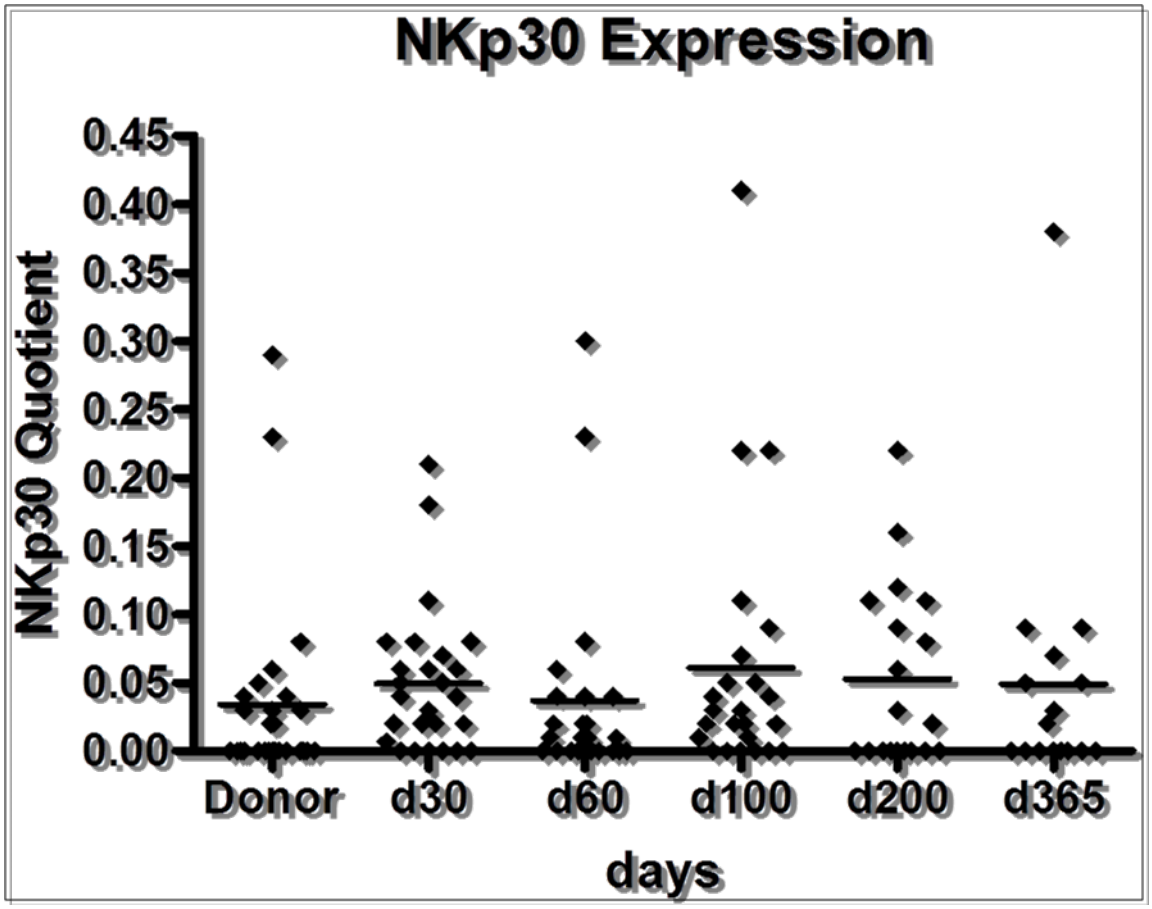
Bei der Gruppe der Überlebenden/ Verstorbenen, bei KIR-Haplotyp A/ B und bei den verschiedenen Erkrankungen gab es zu den jeweiligen Ereignissen zu wenige Messwerte für eine Auswertung. (Grafiken im Anhang)

Abbildung 11 Allgemeine Regulation von NKp30



In der Abbildung 12 Allgemeine NKp30 Expression im zeitlichen Verlauf wird jedoch deutlich, dass NKp30 nach Stammzelltransplantation im zeitlichen Verlauf hoch reguliert wird: Die durchschnittlichen Werte zur Expression von NKp30 sind an den Tagen 30, 100, 200 und 365 bei den Patienten höher als der Durchschnittswert der Spender an Tag 0 (Mittelwert der Spender für NKp30/CD56: 0,03; Mittelwerte der Patienten für NKp30/CD56 über alle Zeitpunkte verteilt: 0,05).

Abbildung 12 Allgemeine NKp30 Expression im zeitlichen Verlauf



4.3.3 NKG2C

Eine Hochregulation der Expression von NKG2C zeigte sich bei „*No Event*“ (59% positiv).

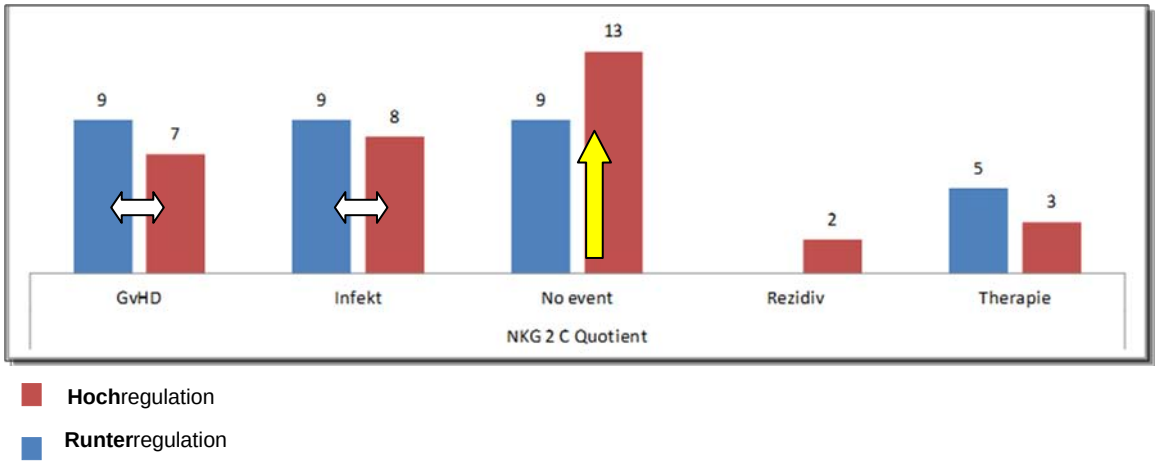
Bei den Ereignissen GvHD (44% positiv/ 56% negativ) und Infekt (47% positiv/ 53% negativ) war die Regulation eher ausgeglichen. Das bedeutet im Vergleich zu „*No Event*“, wo eine Hochregulation stattfand, wurde NKG2C bei GvHD und Infekt herunter reguliert.

Für die Ereignisse Therapie und Rezidiv gab es zu wenige Messwerte für eine Auswertung.

Eine Hochregulation von NKG2C-Markern bei „*No Event*“ zeigte sich auch in allen Untergruppen für die Überlebenden, Patienten mit KIR-Haplotyp B und

Leukämie-Erkrankte. Bei der Gruppe der Verstorbenen und bei KIR-Haplotyp A gab es zu den jeweiligen Ereignissen zu wenige Messwerte für eine Auswertung. (Grafiken im Anhang)

Abbildung 13 Allgemeine Regulation von NKG2C



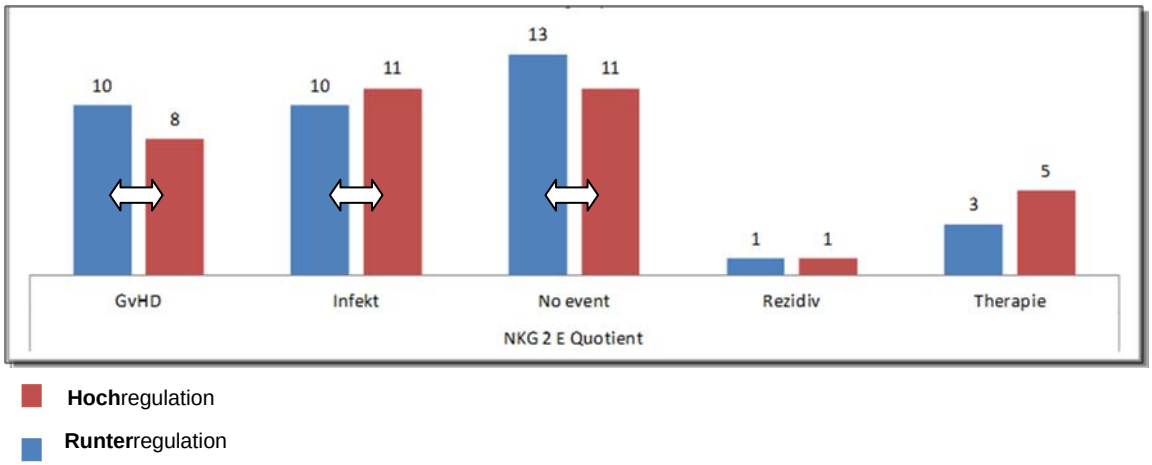
4.3.4 NKG2E

Eine Regulation von NKG2E war bei GvHD (44% positiv/ 56% negativ), Infekt (52% positiv/ 48% negativ) und „*No Event*“ (46% positiv/ 54% negativ) relativ ausgeglichen. Dies spricht für eine Ereignis-unabhängige Regulation.

Für die Ereignisse Therapie und Rezidiv gab es zu wenige Messwerte für eine Auswertung.

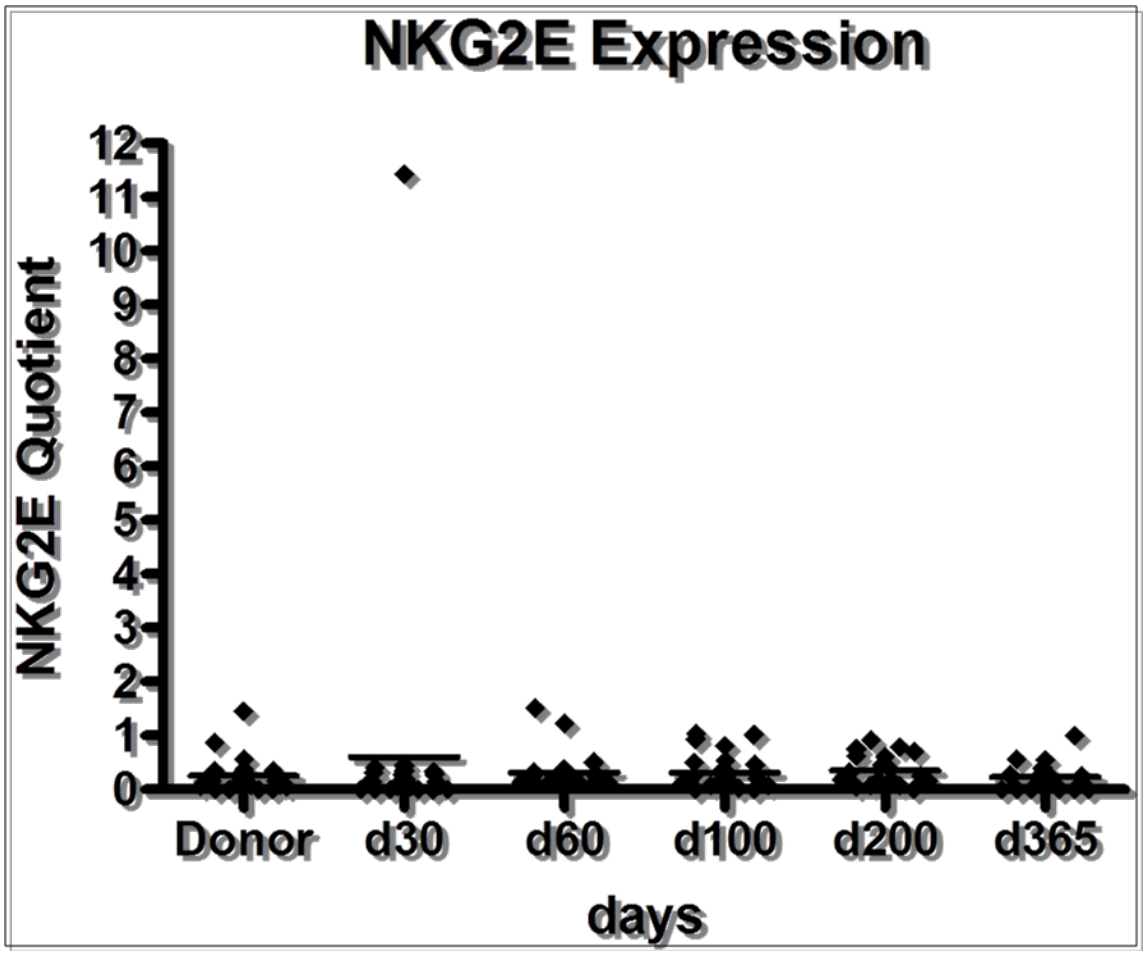
Eine Ereignis-unabhängige Regulation von NKG2E-Markern zeigte sich auch in allen Untergruppen für die Überlebenden, Patienten mit KIR-Haplotyp B und Leukämie-Erkrankte. Bei der Gruppe der Verstorbenen und bei KIR-Haplotyp A gab es zu den jeweiligen Ereignissen zu wenige Messwerte für eine Auswertung. (Grafiken im Anhang)

Abbildung 14 Allgemeine Regulation von NKG2E



In Abbildung 15 Allgemeine NKG2E Expression zeigt sich für NKG2E eine relativ geringe Schwankungsbreite (für den Quotienten NKG2E/CD56: einziger Ausreißer mit 11,41 herausgenommen: Mittelwert der Patienten über alle Zeiträume 0,3. Minimum (> 0) von 0,01 und Maximum von 1,52), was für eine strenge Regulation spricht.

Abbildung 15 Allgemeine NKG2E Expression



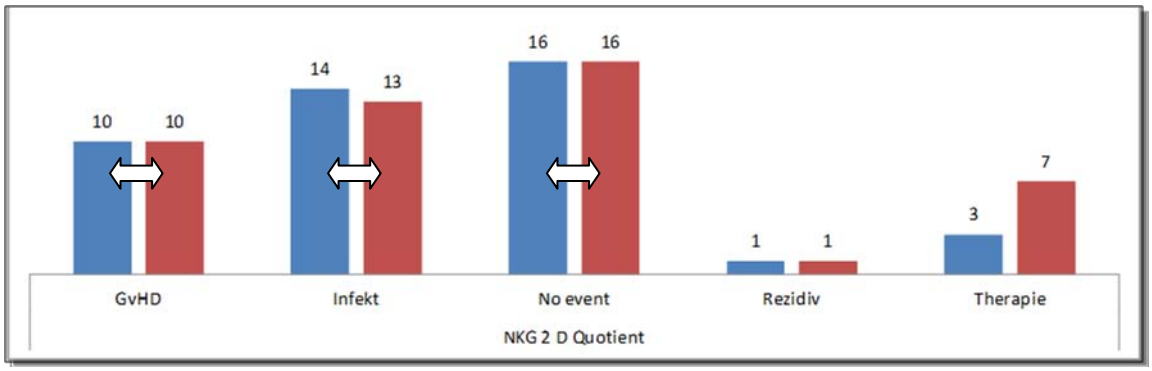
4.3.5 NKG2D

Die Regulation der Expression von NKG2D war bei GvHD (50%/ 50%), Infekt (47% positiv/ 52% negativ) und „*No Event*“ (50%/ 50%) ausgeglichen. Dies spricht für eine Ereignis-unabhängige Regulation von NKG2D. Doch zeigten sich sehr hohe Werte für die Expression des NKG2D-Quotienten in der Abbildung 17 Allgemeine NKG2D Expression (Maximum: 89,65; Minimum > 0: 0,03; Mittelwert der Patienten: 2,91). Das heißt NKG2D wurde sehr stark reguliert.

Für die Ereignisse Therapie und Rezidiv gab es zu wenige Messwerte für eine Auswertung.

Eine Ereignis-unabhängige Regulation von NKG2D-Markern zeigte sich auch in allen Untergruppen für die Überlebenden, Patienten mit KIR-Haplotyp B und Leukämie-Erkrankte. Bei der Gruppe der Verstorbenen und bei KIR-Haplotyp A gab es zu den jeweiligen Ereignissen zu wenige Messwerte für eine Auswertung. (Grafiken im Anhang)

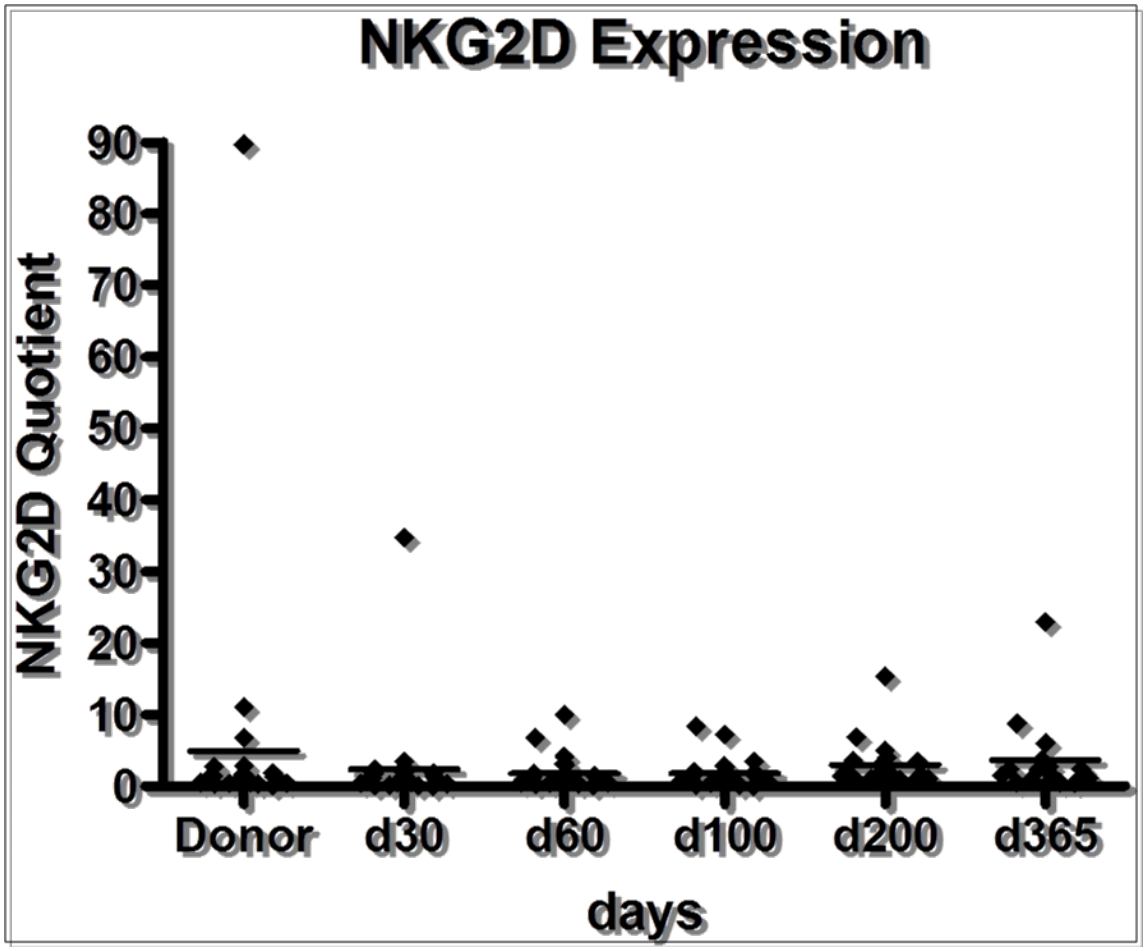
Abbildung 16 Allgemeine Regulation von NKG2D



Hochregulation

Runterregulation

Abbildung 17 Allgemeine NKG2D Expression



CD226 (=DNAM-1)

Eine Hochregulation der Expression von CD226 zeigte sich bei „*No Event*“ (58% positiv).

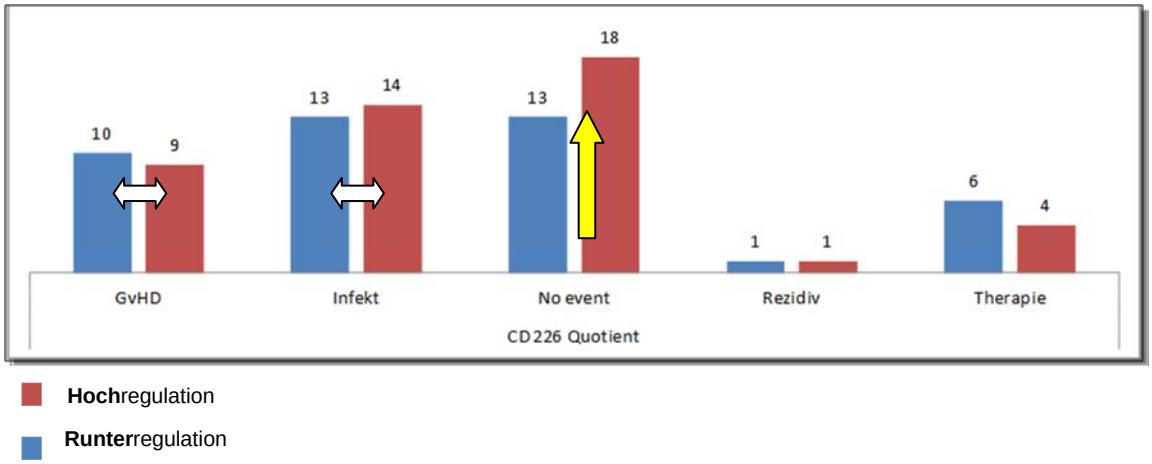
Bei den Ereignissen GvHD (50%/ 50%) und Infekt (54% positiv/ 46% negativ) war die Regulation eher ausgeglichen. Das bedeutet im Vergleich zu „*No Event*“, wo eine Hochregulation stattfand, wurde CD226 bei GvHD und Infekt herunter reguliert.

Für die Ereignisse Rezidiv und Therapie gab es zu wenige Messwerte für eine Auswertung.

Eine Hochregulation von CD226-Markern bei „*No Event*“ zeigte sich auch in allen Untergruppen für die Überlebenden, Patienten mit KIR-Haplotyp B und

Leukämie-Erkrankte. Bei der Gruppe der Verstorbenen und bei KIR-Haplotyp A gab es zu den jeweiligen Ereignissen zu wenige Messwerte für eine Auswertung. (Grafiken im Anhang)

Abbildung 18 Allgemeine Regulation von CD226



Hochregulation

Runterregulation

4.4 Inhibitory NKRs

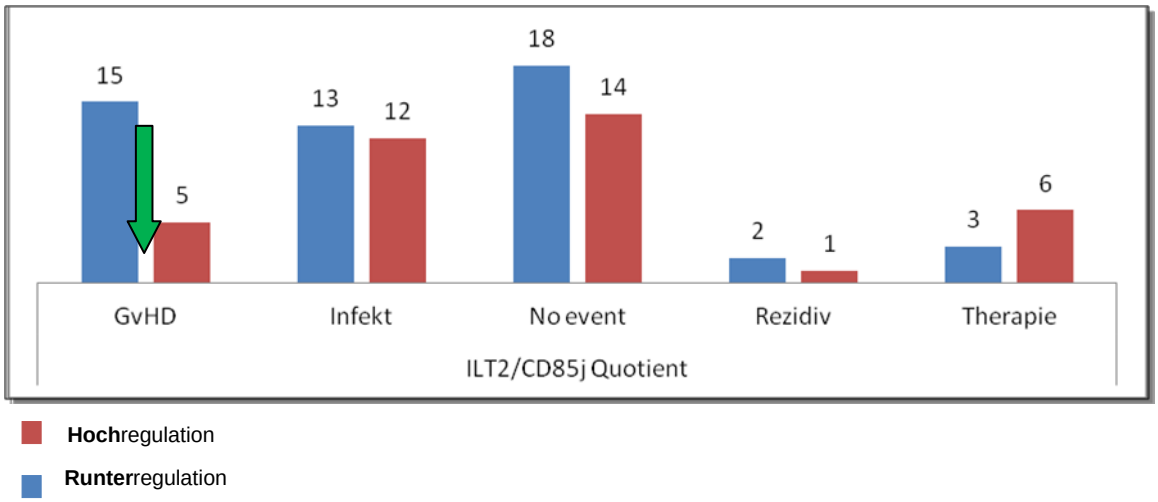
4.4.1 ILT2 (= CD85j)

Eine eindrückliche, Ereignis-assozierte Regulation zeigte der Inhibitory NKR ILT2: Bei GvHD wurden 75% der Fälle herunter reguliert. Dieser Mechanismus zeigte sich ebenfalls in allen Untergruppen.

Bei den Ereignissen Infekt (58% positiv/ 52% negativ) und „*No Event*“ (44%positiv/ 56% negativ) war die Regulation eher ausgeglichen.

Für die Ereignisse Therapie und Rezidiv gab es zu wenige Messwerte für eine Auswertung.

Abbildung 19 Allgemeine Regulation von ILT2/CD85j



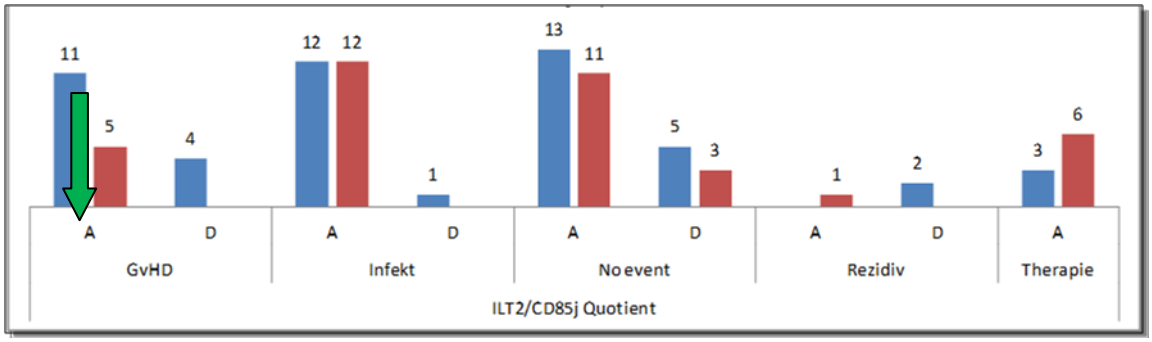
Die Beobachtung der Herunter-Regulierung von ILT2-Markern bei GvHD hat sich durch alle Untergruppen hindurch gezogen:

In der Gruppe der Überlebenden wurden bei GvHD 75% der Fälle herunter reguliert. Bei der Gruppe der Verstorbenen gab es zu wenige Messwerte für eine Auswertung.

Bei Patienten mit KIR-Haplotyp B wurden bei GvHD 71% der Fälle herunter reguliert. Bei KIR-Haplotyp A gab es zu den jeweiligen Ereignissen zu wenige Messwerte für eine Auswertung.

Auch bei den Patienten mit einer Leukämie-Erkrankung wurden bei GvHD 75% der Fälle herunter reguliert. Für die anderen Erkrankungen (Solider Tumor und andere seltene Erkrankungen wie Immundefekte) gab es zu den jeweiligen Ereignissen zu wenige Messwerte für eine Auswertung.

Abbildung 20 ILT2/CD85j Regulation bei Überlebenden (*Alive*) versus Verstorbene (*Deceased*)

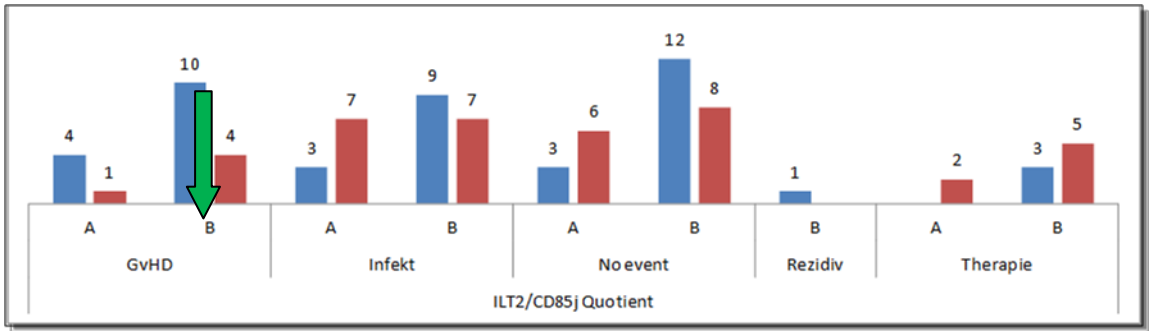


Hochregulation

Runterregulation

A = Alive
D = Deceased

Abbildung 21 ILT2/CD85j Regulation bei KIR-Haplotyp A versus KIR-Haplotyp B

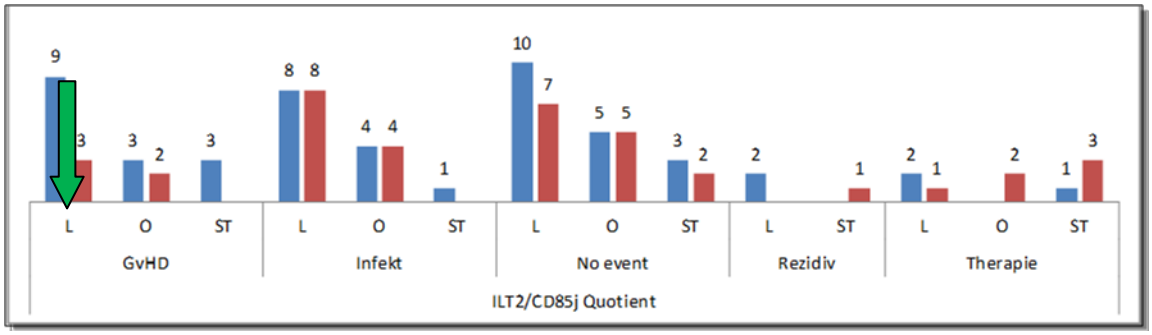


Hochregulation

Runterregulation

A = KIR-Haplotyp A
B = KIR-Haplotyp B

Abbildung 22 ILT2/CD85j Regulation bei verschiedenen Erkrankungen



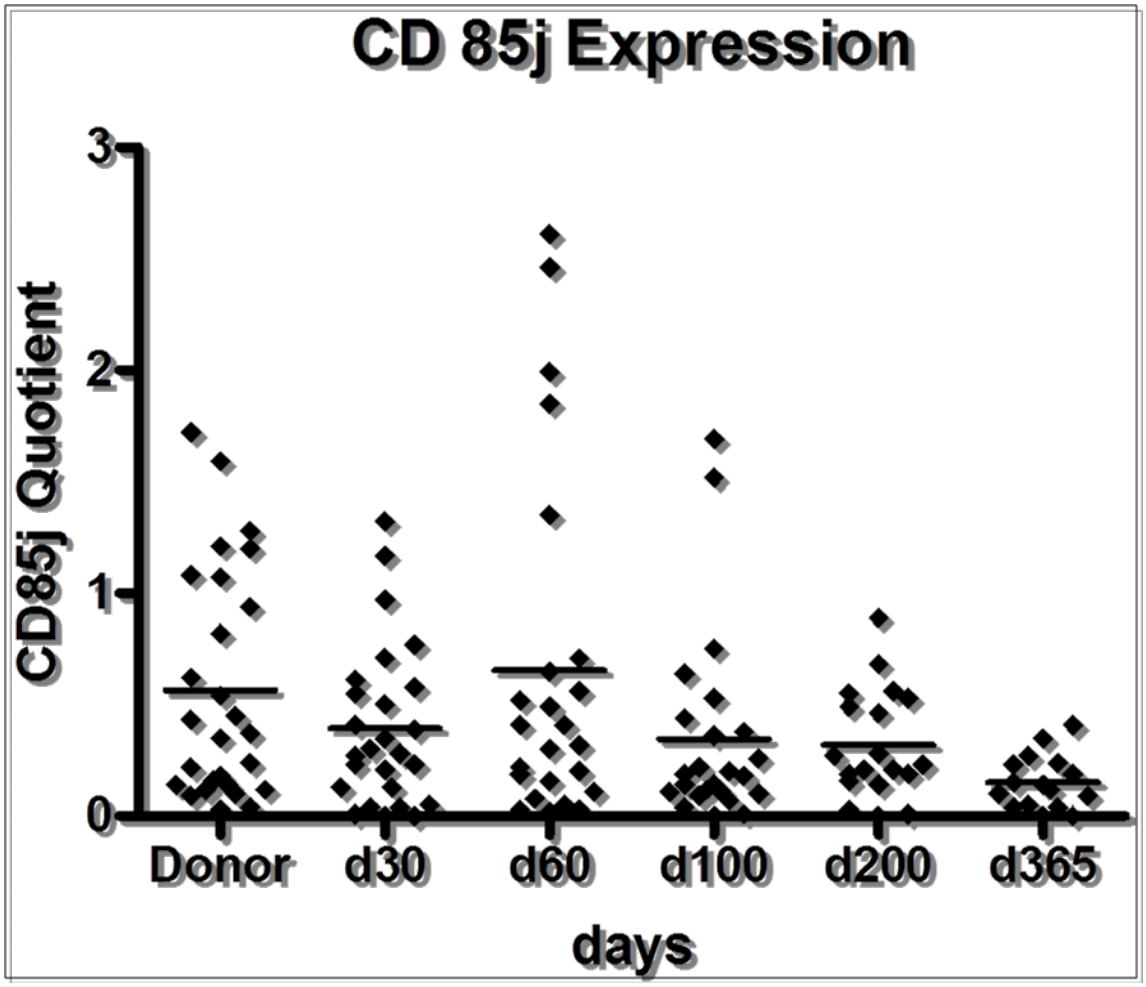
Hochregulation

Runterregulation

L = *Leukemia*
O = *Others* (Andere seltene Erkrankungen)
ST = *Solid Tumors*

In der Abbildung 22 ILT2/CD85j Regulation bei verschiedenen Erkrankungen wird deutlich, dass ILT2 insgesamt hohe Durchschnittswerte aufwies. Der Quotient ILT2/CD56 für den Spender betrug im Mittel 0,58. ILT2/CD56 für Patienten über alle Zeiträume betrug durchschnittlich 0,41. Zudem zeigte ILT2 eine breite Streuung mit einem Minimum >0 von 0,03 und einem Maximum von 1,72.

Abbildung 23 Allgemeine ILT2 = CD85j Expression

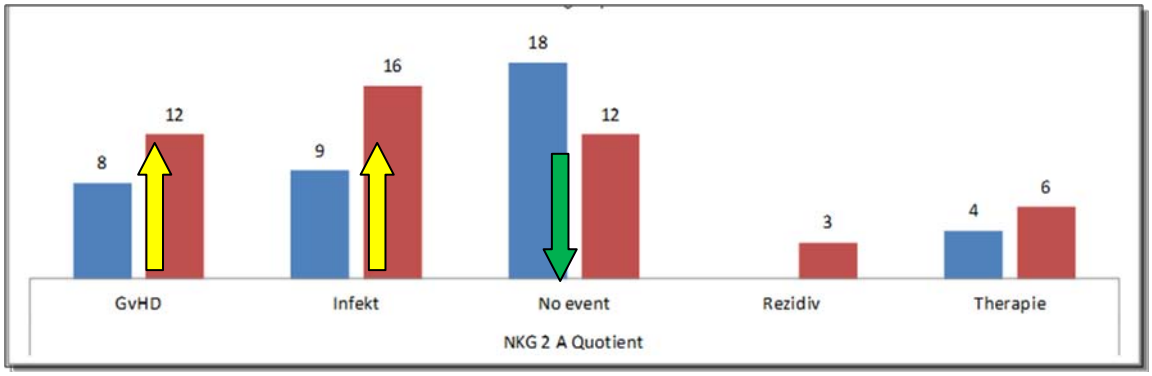


4.4.2 NKG2A

Eine weitere auf den ersten Blick Ereignis-assoziiert erscheinende Hochregulation zeigte die Expression von NKG2A: Bei Infekt wurden in 60% der Fälle und bei GvHD ebenso in 64% der Fälle die NKG2A-Marker hoch reguliert. Ohne Ereignis hingegen („*No event*“), wurde die Expression von NKG2A in 60% der Fälle herunter reguliert.

Für die Ereignisse Therapie und Rezidiv gab es zu wenige Messwerte für eine Auswertung.

Abbildung 24 Allgemeine Regulation von NKG2A



Hochregulation

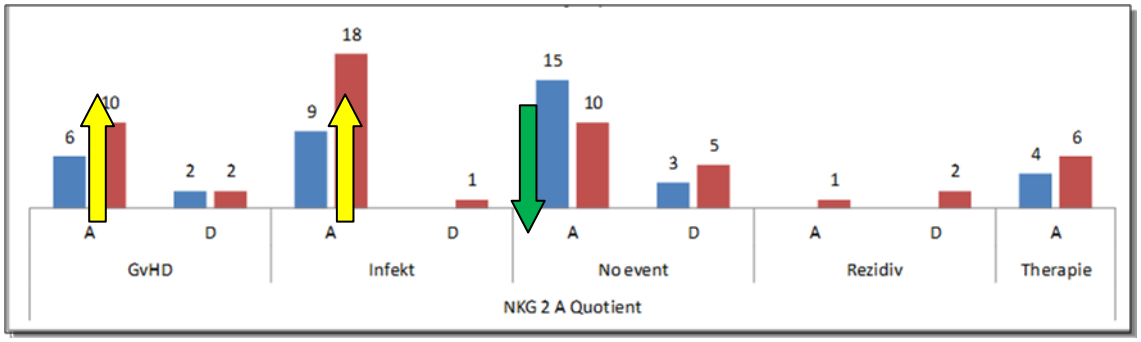
Runterregulation

Die Beobachtung der Hochregulation bei den Ereignissen GvHD und Infekt und der Herunter-Regulation bei *„No Event“* hat sich durch alle Untergruppen hindurch gezogen:

In der Gruppe der Überlebenden wurden bei GvHD 63% und bei Infekt 63% der NKG2A-Marker hoch reguliert. Bei *„No Event“* wurden 65% der NKG2A-Marker herunter reguliert. Bei der Gruppe der Verstorbenen gab es zu wenige Messwerte für eine Auswertung.

Bei Patienten mit KIR-Haplotyp B wurden bei GvHD 57% der NKG2A-Marker hochreguliert und bei Infekt 57%. Bei *„No Event“* wurden 61% der NKG2A-Marker herunter reguliert. Bei KIR-Haplotyp A gab es zu den jeweiligen Ereignissen zu wenige Messwerte für eine Auswertung (<15 Fälle insgesamt).

Abbildung 25 NKG2A Regulation bei Überlebenden (*Alive*) versus Verstorbene (*Deceased*)

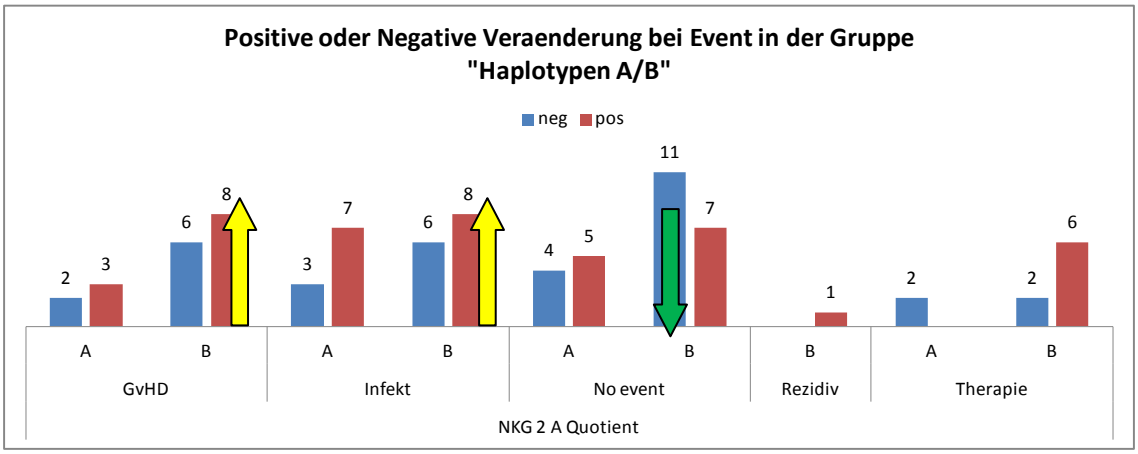


Hochregulation

Runterregulation

A = Alive
D = Deceased

Abbildung 26 NKG2A Regulation bei KIR-Haplotyp A versus KIR-Haplotyp B



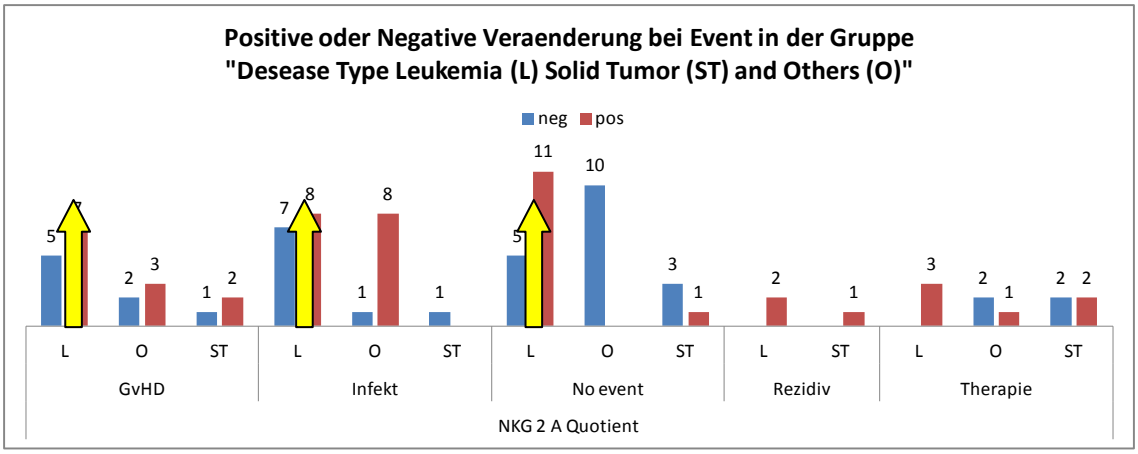
Hochregulation

Runterregulation

A = KIR-Haplotyp A
B = KIR-Haplotyp B

Bei den Leukämie-Erkrankten wurden bei GvHD 58% und bei Infekt 53% der NKG2A-Marker hoch reguliert. Im Gegensatz zu den anderen Untergruppen fand bei den Leukämie-Erkrankten auch bei *„No Event“* eine Hochregulation bei 69% der Fälle statt. Diese Regulierung spricht für eine Ereignis unabhängige Expression.

Abbildung 27 NKG2A Regulation bei verschiedenen Erkrankungen



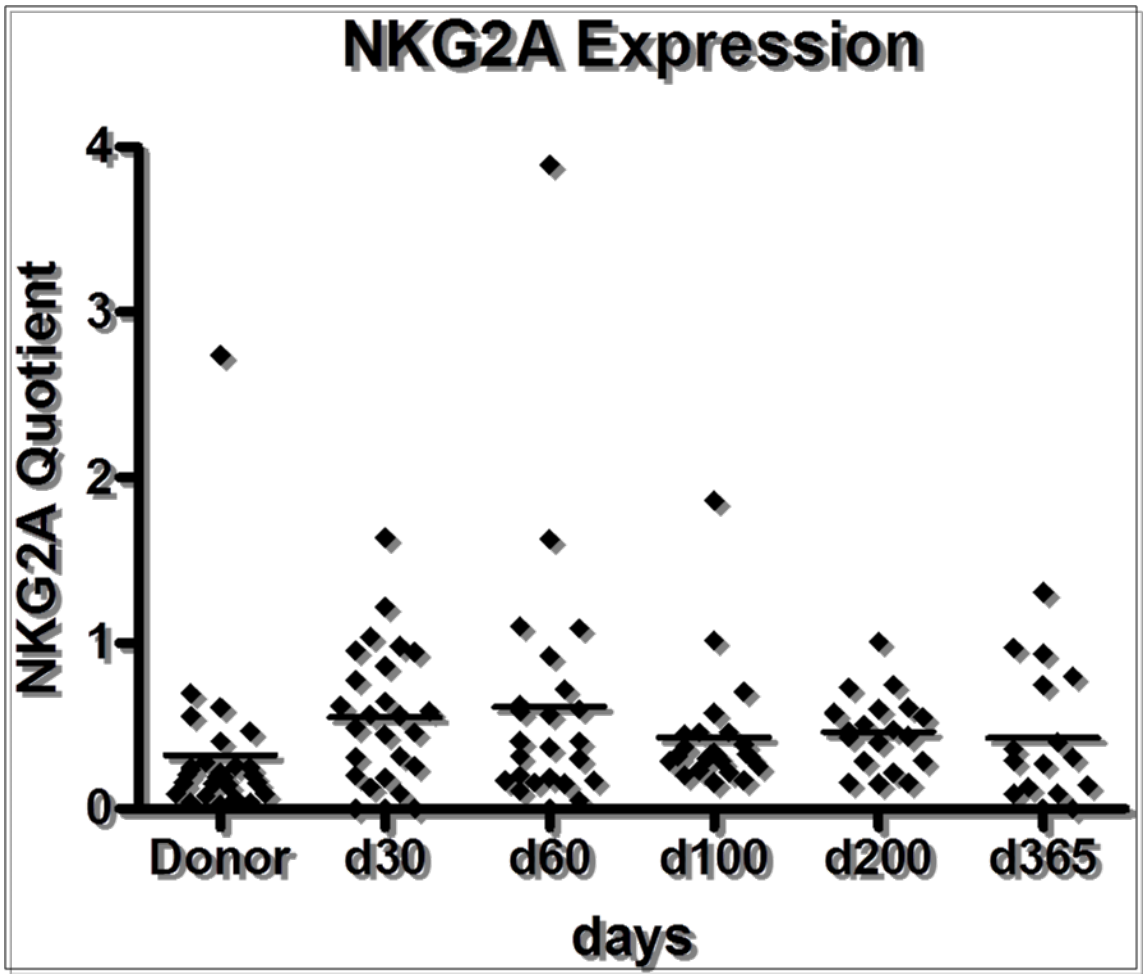
Hochregulation

Runterregulation

L = *Leukemia*
O = *Others* (Andere seltene Erkrankungen)
ST = *Solid Tumors*

In der Abbildung 28 Allgemeine NKG2A Expression wird deutlich, dass NKG2A nach Stammzelltransplantation im zeitlichen Verlauf hoch reguliert wurde: Die durchschnittlichen Werte zur Expression von NKG2A sind an allen Tagen (30, 60, 100, 200, 365) nach Stammzelltransplantation bei den Patienten höher als der Durchschnittswert der Spender an Tag 0. Mittelwert der Spender für NKG2A/CD56: 0,34; Mittelwerte der Patienten für NKG2A/CD56 über alle Zeitpunkte verteilt: 0,51. Auch diese Beobachtung spricht für eine Ereignis unabhängige Expression von NKG2A.

Abbildung 28 Allgemeine NKG2A Expression



4.5 Nach Stammzelltransplantation neu aufgetretene Marker

Bei der Analyse der Daten wurde auch untersucht, welche KIR- und NKR-Marker nach Stammzelltransplantation neu aufgetreten waren. Das heißt, es wurde untersucht welche Marker beim Spender nicht vorhanden waren, jedoch nach Stammzelltransplantation beim Empfänger exprimiert wurden. Es wurde gesehen, dass fast alle Marker exprimiert werden können, auch wenn sie beim Spender nicht vorhanden waren.
Bei den nach Transplantation neu aufgetretenen Markern gibt es drei, die besonders häufig exprimiert wurden:

- NKp30 wurde bei 48% der Patienten aktiviert.
- KIR3DL1 trat bei 41% der Patienten neu auf.
- KIR2DL4 trat bei 37% der Patienten neu auf.

Es wurde ebenfalls überprüft, ob die Neuexpressionen mit klinischen Ereignissen wie Infekt, GvHD, Rezidiv oder Therapie einhergehen. Für keine der drei Marker konnte ein deutlicher klinischer Zusammenhang mit den Neuexpressionen gesehen werden.
KIR3DL1 zeigte eine ähnliche Regulierung: Bei Infekt wurde der Marker zu 32% der Fälle neu exprimiert und bei keinem Ereignis zu 35% neu exprimiert. Die maximale Expression erreichte KIR3DL1 an Tag 30 nach Stammzelltransplantation (Mittelwert für KIR3DL1/CD56 an Tag 30: 0,03; an Tag 0 beim Spender: 0,003).
KIR2DL4 zeigte die höchste Neuexpression mit 36% der Fälle, wenn kein Ereignis auftrat. Bei Infekt und GvHD wurde KIR2DL4 zu jeweils 21% der Fälle neu exprimiert.

4.6 KIR-Haplotypen

4.6.1 Eingruppierung der KIR-Haplotypen beim Spender und Empfänger

Entsprechend der Beschreibung in der Einleitung (Kapitel 1.3) wurden anhand der KIR Marker die Probanden in Haplotyp A oder B eingeteilt. Dabei gab es ein

Patient-Spender Paar, das sich nicht eindeutig einordnen ließen: Bei Spender 23 wurden keine KIRs detektiert und Empfänger 23 exprimierte sowohl den für Haplotyp B typischen KIR2DL2; als auch KIR2DL1, KIR2DL3 und KIR2DS4, die für Haplotyp A charakteristisch sind.

In 3 Fällen wurden nach der Stammzell-Transplantation im Empfänger KIR-Marker detektiert, die sich von denen des Spenders unterschieden. Das heißt die Empfänger wiesen z.T. auch nur über einen bestimmten Zeitraum, andere Haplotypen auf als die der jeweiligen Spender. In 2 von 3 Fällen, in denen sich die Haplotypen unterschieden, war beim Empfänger zum entsprechenden Zeitraum ein gemischter Chimärismus nachgewiesen. Das heißt, dass der Empfänger autologe Hämatopoese zeigte, die den zum Spender unterschiedlichen Haplotypen erklärt.

Tabelle 10 KIR-Haplotypen der Patienten und ihrer Spender

	Spender	Empfänger	Kommentar
1	B	B	Empfänger verstorben
2	B	B	Empfänger verstorben
3	B	B	Empfänger verstorben
4	A	A	
5	B	B	
6	A	A	
7	B	B	
8	A	B an d30, danach A	Zusätzlich Leber-Transplantat vom Spender; Bis Tag 60 gemischter Chimärismus
9	B	B	
10	B	B	
11	B	B	
12	B	B	
13	A	B an d30 und 60, danach A	Bis Tag 96 wurde ein gemischter Chimärismus nachgewiesen.
14	B	B	
15	A	A	Empfänger verstorben
16	B	B	
17	A	A	Empfänger verstorben

18	B	B	
19	B	B	Empfänger verstorben
20	A	A	
21	B	B	
22	A	B	Keine klinische Erklärung für unterschiedliche Haplotypen
23	-	-	Keine eindeutige Einordnung möglich (siehe Kap.4.6.1)
24	B	B	
25	B	B	
26	A	A	
27	B	B	

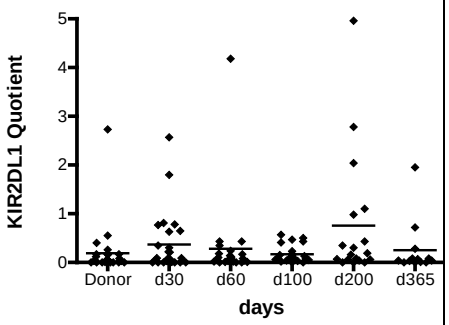
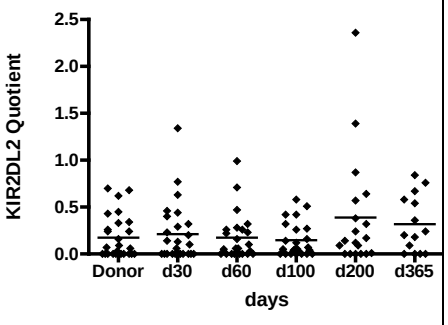
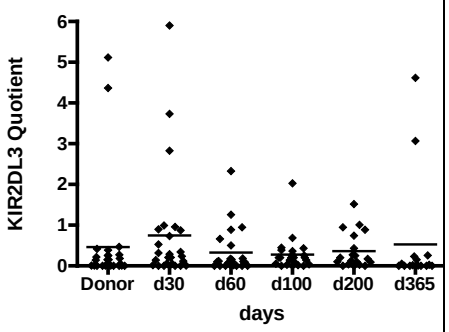
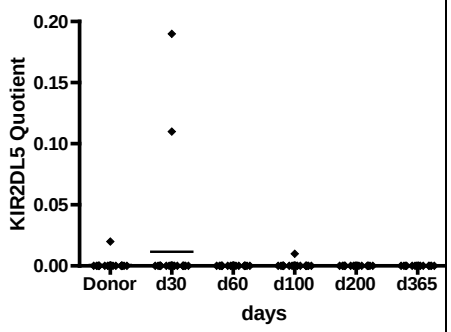
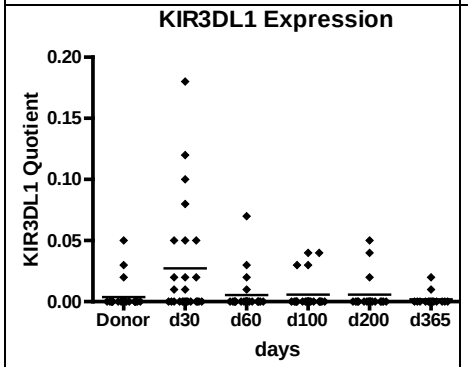
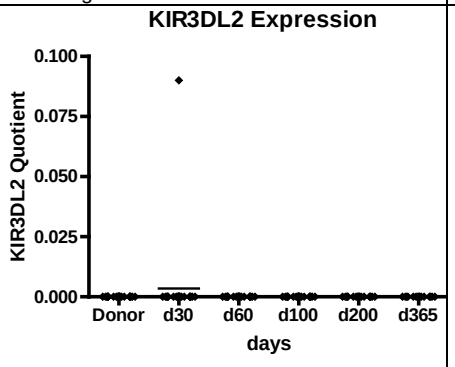
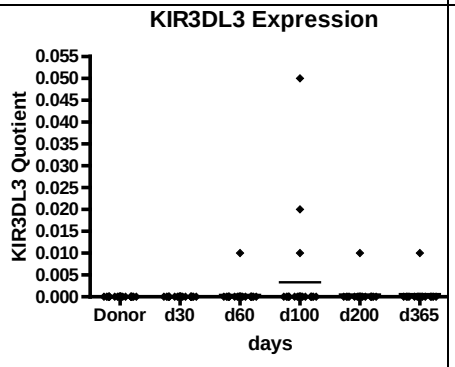
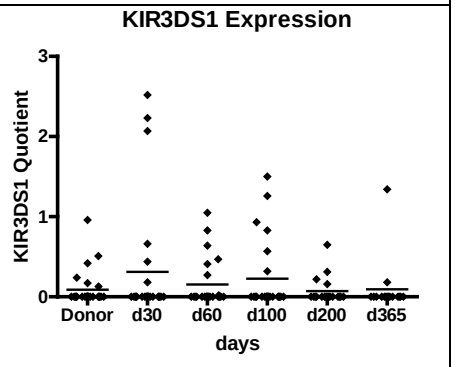
4.7 Trends in grafischen Analysen

4.7.1 Generelle Verteilung der KIR-/ NKR-Marker

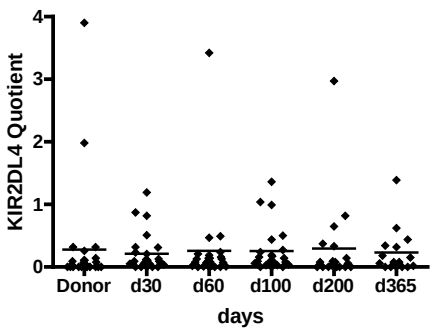
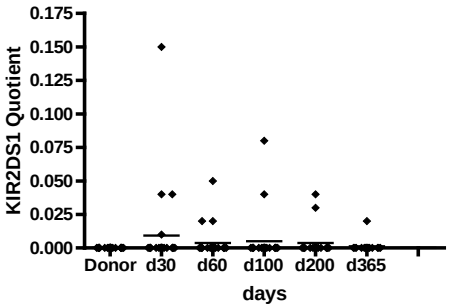
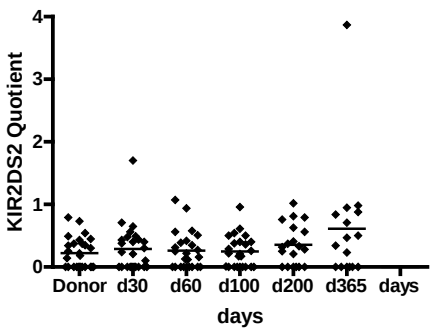
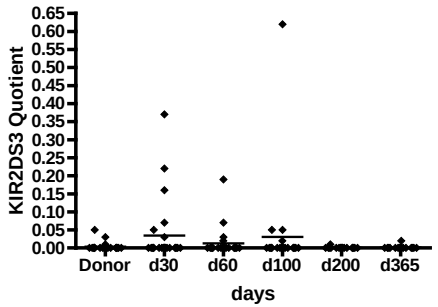
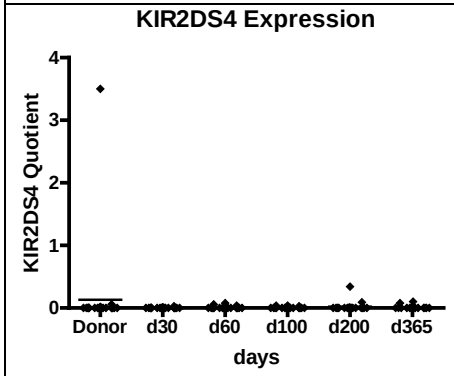
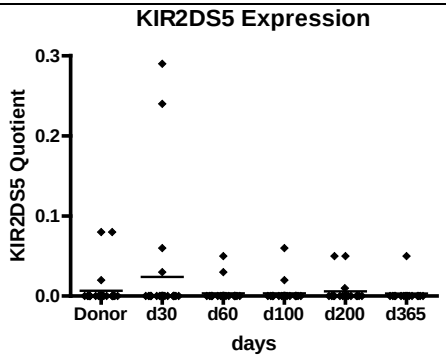
Für jeden KIR- und NKR-Marker wurden Box Plots erstellt (siehe Anhang). Der jeweilige Marker-Quotient wurde auf eine Zeitachse aufgetragen.
Interessant war die Frage, ob es Gründe für überdurchschnittlich hohe Werte gab: Betrachtet man alle Werte (für jeden Marker an den jeweiligen Tagen), die mindestens das Zweifache über dem Median liegen, ergibt sich folgende Verteilung:
29% sind mit einem klinischen Ereignis wie Infekt, GvHD oder therapeutischem Eingriff verbunden; 16,5% weisen ein KIR Mismatch auf und 13% gehören zur Gruppe der Verstorbenen. Allerdings können 26% der Ausreißer keiner Besonderheit zugeordnet werden.
Patient 9 und 18 zeigen häufig überdurchschnittliche Werte. Bei beiden besteht ein KIR-Mismatch zum Donor. Patient 18 bekam zusätzlich regelmäßige Applikationen mit Anti-GD2-AK hu14.18.

4.8 Verteilung von KIR-/ NKR-Marker

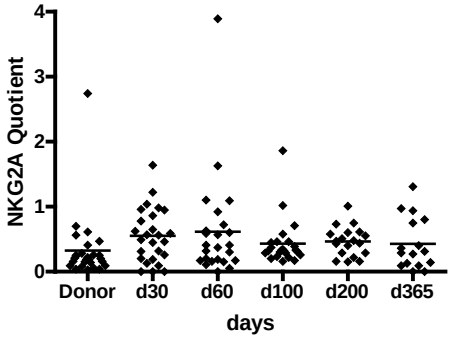
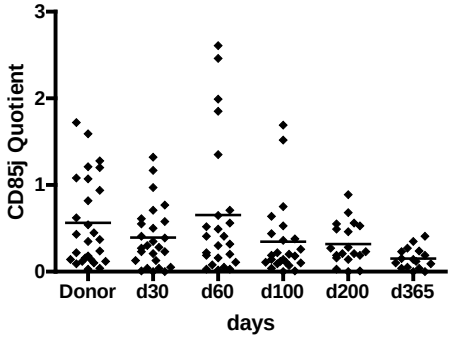
4.8.1 KIR Inhibitory

			
KIR2DL1 hat sein Durchschnittsmaximum an d200, allerdings mit großer Streuungsbreite. An d365 hat es wieder das Niveau wie beim Donor.	KIR2DL2 zeigt vom Donor bis zu d100 sehr ähnliche Durchschnittswerte. An d200 Maximum des Mittelwertes, allerdings breite Streuung.	KIR2DL3 hat einige Ausreißer, zeigt aber im Mittel konstante Duchschnittswerte.	KIR2DL5 bleibt bis auf wenige Ausreißer negativ.
			
KIR3DL1 zeigt an d30 seinen höchsten Mittelwert.	KIR3DL2 hat bis auf einen Wert nur negative Ergebnisse.	KIR3DL3 weist nur ein paar wenige positive Werte auf.	KIR3DS1 zeigt an d30, d200 und d365 ähnliche Durchschnittswerte. Jedoch streuen die Werte weit auseinander.

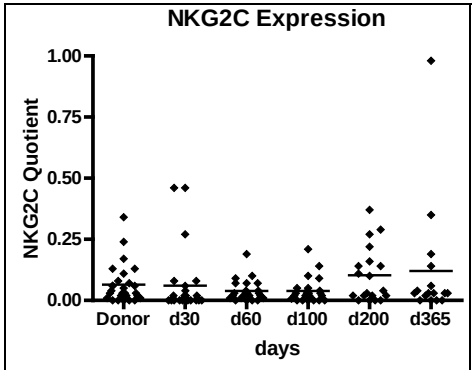
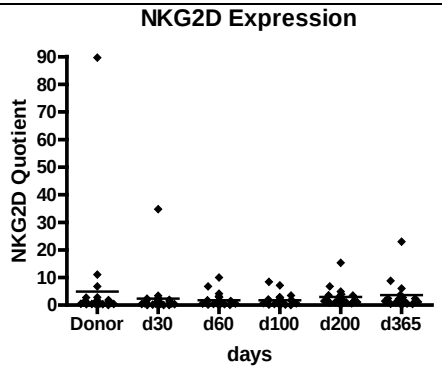
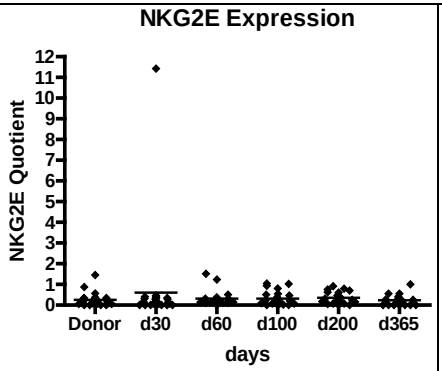
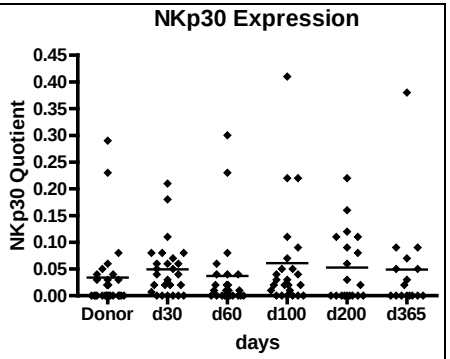
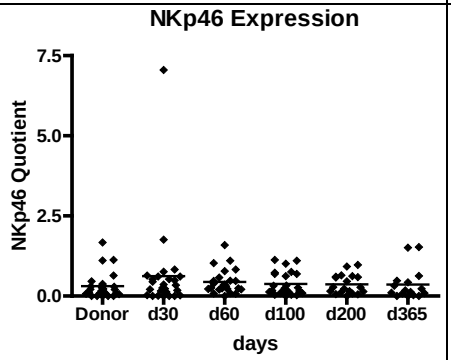
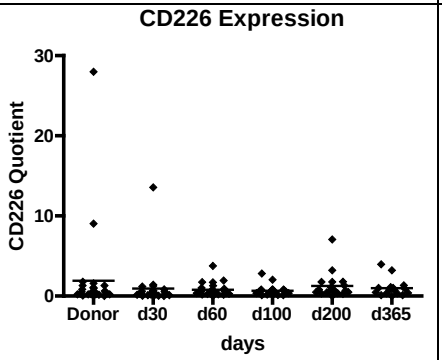
4.8.2 KIR Activating

			
KIR2DL4 weist konstante Durchschnittswerte mit jedoch breiter Streuung auf.	KIR2DS1 hat niedrige Durchschnittswerte, trotz einiger Ausreißer.	KIR2DS2 zeigt Durchschnittswerte auf konstantem Niveau, bietet an d365 den maximalen Durchschnittswert.	KIR2DS3 zeigt insgesamt eher niedrige Durchschnittswerte. Das Niveau an d200 und d365 gleicht dem des Donors.
			
KIR2DS4 zeigt wenig positive Werte, ist überwiegend negativ.	KIR2DS5 weist insgesamt niedrige Werte auf.		

4.8.3 NKR Inhibitory

			
NKG2A wird im Verlauf nach Stammzelltransplantation vermehrt exprimiert	ILT2/CD85j zeigt stabile hohe Durchschnittswerte mit jedoch breiter Streuung.	NKR Inhibitory weisen insgesamt stabile, hohe Durchschnittswerte auf mit einem Maximum an d60.	

4.8.4 NKR Activating

			
NKG2C zeigt vom Donor bis zu d100 sehr ähnliche Durchschnittswerte, danach ansteigende Werte.	NKG2D bietet konstante, sehr hohe Durchschnittswerte mit wenigen Ausreißern nach oben.	NKG2E bietet ebenfalls konstante Durchschnittswerte mit einem Ausreißer.	NKp30 zeigt eher niedrige Durchschnittswerte mit großer Streuungsbreite. Im Verlauf ansteigende Werte.
			
	NKp46 zeigt insgesamt Durchschnittswerte auf selben Niveau.	CD226 zeigt insgesamt sehr ähnliche, hohe Durchschnittswerte mit ein paar Ausreißern.	

5 Diskussion

5.1 Methodenkritik

In der vorliegenden Arbeit wurden die Genaktivitäten der Marker-Moleküle KIR (aktivierende und inhibierende *Killer cell Immunoglobulin-like Receptors*) und NKRs (*Natural Killer Cell Receptors*) für Natürliche Killerzellen (NK-) Zellen untersucht, bei Spendern vor Stammzellspende und bei den Patienten nach Stammzelltransplantation zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Werte wurden auf den Expressionswerten von CD56, den sognannten „*lineage*“ Marker der NK Zellen normalisiert.

5.1.1 Nachweis von Genaktivitäten auf transkriptionaler nicht jedoch Proteinebene

RNA wurde aus den Proben isoliert, um KIRs, NKRs (in Kapitel 1.4 aufgeführt) und CD56 auf Transkript-Ebene nachzuweisen. Die mRNA wurde zu cDNA umgeschrieben und schließlich wurden nach PCR mit spezifischen, Floureszensmarkierten Primern, die relevanten Transkripte nachgewiesen. Die Expression von Genen kann auf unterschiedlichen Ebenen reguliert werden, nämlich während der Transkription, der Translation und posttranslational, sowie durch komplexe Regelsysteme, die mehrere Expressionsebenen betreffen können. Hier wurde semiquantitativ, und qualitativ der Nachweis spezifischer Genaktivitäten geführt, ohne die translationale und posttranslationale Regulation zu berücksichtigen. Dennoch bleibt die Detektion von Transkripten bei der Vielzahl von Markern zu vielen verschiedenen Untersuchungszeitpunkten eine reproduzierbare und sensitive Methode um ungefähre Anhaltspunkte über Genexpressionen von Interesse zu bekommen, wenn diese auch nur relativ zur tatsächlichen Proteinmenge exprimiert werden.
Da die Expression der jeweiligen Marker-Transkripte mit der Expression des Proteins jedoch direkt, bzw. indirekt korreliert kann sie als relatives Maß einer Genaktivität dienen.

5.1.2 CD56 als Referenzprotein

CD56 wird als *Lineage*-Marker für NK-Zellen definiert (Caligiuri, 2007). CD56 kommt auch auf einer Minderheit von T-Zellen vor (Caligiuri, 2007), jedoch sind in der frühen Phase nach Stammzelltransplantation von CD3/CD19-depletierten Zellen keine oder nur wenige T-Zellen vorhanden (Federmann, et al., 2011). Deshalb und weil CD56 zellspezifisch für NK-Zellen ist, ist es legitim CD56 als Referenz zu verwenden. Die Expression aller untersuchten Marker wurde auf die Expression von CD56 normalisiert. Somit lassen sich die Expressionen der verschiedenen Marker untereinander vergleichen und es kann eine relative Stärke der Expressionen gesehen werden.

5.2 NKp46

Bei der vorliegenden Untersuchung zeigte NKp46 die stärkste Ereignis-assoziierte Regulation: Bei Infekt wurde bei 61% der Fälle NKp46 vermehrt transkribiert. Ohne Ereignis („*No event*“) fiel NKp46 in 63% der untersuchten Proben unter den Wert des vorangegangenen Untersuchungszeitpunktes.

NKp46 ist ein aktivierender Rezeptor der *Natural Cytotoxicity Triggering Receptors* und der spezifischste NK-Zell Marker unter den Säugetieren (Walzer, et al., 2007), (Koch, et al., 2013). Zudem ist er unter den NCRs der einzige, der ein Ortholog in Mäusen und anderen Species aufweist. Diese evolutionäre Erhaltung hat zu der Aussage geführt, dass NKp46 der primäre *Natural Cytotoxicity Triggering Receptor* sei, der an der Erkennung von Pathogenen und Tumorzellen beteiligt sei (Koch, et al., 2013). NKp46 vermittelt tatsächlich effiziente antivirale Zytotoxizität (Dorak, 2012), und ist auch für die Lyse von Myelom-Zellen zwingend erforderlich (El-Sherbiny, et al., 2007). Insgesamt hat NKp46 eine Schlüsselrolle in der Erkennung und Elimination von Viren, Bakterien und Tumoren (Koch, et al., 2013).

Die vorliegende Beobachtung, dass NKp46 bei Infektionen vermehrt, bei der Abwesenheit von klinischen Ereignissen weniger exprimiert wird, ist mit der aktuellen, oben beschriebenen Literatur vereinbar.

Aufgrund seines Expressionsprofils könnte NKp46 nach Stammzelltransplantation als Marker eine Infektion bestätigen. Im

Umkehrschluss kann jedoch nach Stammzelltransplantation bei negativem PCR-Ergebnis eine Infektion nicht ausgeschlossen werden, da die negative Regulation nicht zwingend erfolgt.

5.3 NKG2C und CD226

NKG2C ist ein aktivierender Rezeptor der *Natural Killer cell lectin-like receptor subfamily.* In der vorliegenden Studie zeigte sich eine vermehrte Expression von NKG2C bei „*No Event*“ (59% positiv). Im Vergleich dazu wurde NKG2C bei GvHD und Infekt herunter reguliert, was ein unerwartetes Ergebnis darstellt. In der Arbeit von Della Chiesa, et al., 2013 wurde gezeigt, dass nach Stammzelltransplantation im Falle einer CMV-Infektion vermehrt NKG2C-positive NK-Zellen gebildet wurden, die langlebig sind und Leukämie-Patienten vor Infektionen und Rezidiven schützen könnte. In der hier vorliegenden Studie könnte es sich bei der Hochregulation von NKG2C im, klinisch gesehen gesunden Zustand der Patienten, um NK-Zellen handeln, die im Vorfeld Pathogen- oder Rezidivreaktiv waren, was jedoch ohne klinisches Korrelat eher unwahrscheinlich ist. NKG2C könnte hier nach Stammzelltransplantation einfach als Marker für aktivierte, funktionsfähige NK Zellen angesehen werden, die gesunde Patienten aufweisen.

CD226, auch DNAM-1 genannt, gehört zu den aktivierenden *Natural Killer Cell Receptors*, die zur IgG-Superfamilie gehören.
CD226 zeigte in dieser Untersuchung ein ähnliches Expressionmuster wie NKG2C, nämlich vermehrte Expression bei „*No Event*“. In 58% der Messungen wurde ein ansteigender Wert gegenüber dem vormals vorliegenden Messwert erfasst. Im Gegensatz dazu induzierte GvHD und Infekt die Absenkung der Expression von CD226.
Für CD226 sind zwei Liganden beschrieben: Nectin-2 (CD112) und PVR (Poliovirus Rezeptor = CD115) (El-Sherbiny, et al., 2007). Die Liganden werden von gesunden Zellen exprimiert, jedoch dienen sie im Kontext maligner, dysregulierter Zellen als Targetmolekül für die NK-Zell vermittelte Lyse.

Die Klinik korreliert mit diesen Befunden. So wurde gezeigt, dass Patienten mit aktiver Myelom-Erkrankung CD226 geringer exprimierten als Patienten, die sich nach Behandlung in kompletter Remission befanden. Auch die gesunden Spender der Myelom-Patienten hatte eine vermehrte CD226 Expression (El-Sherbiny, et al., 2007).

Die Spezifität von CD226 für PVR oder Nectin-2 wird dadurch erkennbar, dass NK-Zell vermittelte Lyse nur bei Myelom-Zellen geschieht, die diese Liganden auch exprimieren (El-Sherbiny, et al., 2007), (Cerboni, et al., 2014). In der Arbeit von Verhoeven, et al., 2008 zeigte sich Ähnliches für das Ewing Sarkom (Verhoeven, et al., 2008). Nach der aktuellen, oben beschriebenen Literatur hat CD226 somit eine wichtige Rolle bei der Tumorzell-Lyse.

Bei onkologischen Patienten unserer Studie zeigte sich interessanter Weise, dass auch hier klinisch gesunde Zustände mit vermehrter CD226 Expression assoziiert waren. Wie NKG2C könnte auch CD226 nach Stammzelltransplantation als Marker für ein aktives, funktionelles NK Zellkompartment sprechen, das den gesunden Zustand des Patienten mit bedingt.

5.4 NKG2D und NKG2E

NKG2D gilt als der aktivierende Rezeptor der *Natural Killer cell lectin-like receptor subfamily,* er war in dieser Studie absolut und relativ am stärksten von allen NK Zellmarkermolekülen sowie unabhängig von klinischen Ereignissen exprimiert (Maximum des Quotienten NG2D/CD56 mit 89,65; Mittelwert der Patienten 2,32).

NKG2D ist ein *C-type lectin-like* Rezeptor, der auf der Oberfläche von allen menschlichen NK-Zellen exprimiert wird. Er erkennt mindestens 6 Liganden, wovon jeder eine MHC-Klasse I – Homologie besitzt: MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A), MICB (MHC class I polypeptide-related sequence B) und ULBPs (Dorak, 2012). *UL16 binding Proteins* 1 – 6 sind Oberflächen-Proteine, die auf transformierten oder gestressten Zellen vorkommen, als Liganden für NKG2D (Wang & Sun, 2014). Bemerkenswert ist, dass NKG2D–Liganden nicht in normalem Gewebe exprimiert werden. Vielmehr

wird ihre Expression durch zellulären Stress wie bei viraler Infektion oder maligner Transformation hervorgerufen (Caligiuri, 2007), (Champsaur & Lanier, 2010), (Vivier, et al., 2011).

Wenn gesunde Gewebezellen MCH-Klasse I-Moleküle exprimieren, die mindestens einen inhibitorischen NK-Rezeptor ansprechen, werden keine Liganden für NKG2D exprimiert und es erlischt die Killerfunktion der NK-Zelle. Interessant ist, dass Tumorzellen gezielt NKG2D antagonisieren, um die zytolytische Wirkung von NK-Zellen außer Gefecht zu setzen (Caligiuri, 2007). Ein Mechanismus dazu ist zum Beispiel das Ausschütten von löslichen NKG2D-Liganden, die als Agonist für den aktivierenden NKG2D-Rezeptor auf NK-Zellen dienen. Ein Phänomen, das beim Menschen mit schlechter Prognose einher geht und beim Myelom oder Prostata Karzinom zu beobachten ist (Terme, et al., 2008). Im Menschen wurde beobachtet, dass viele Tumore NKG2D-Liganden hochregulieren, im Rahmen des onkologischen Prozesses. Auch schütten Zellen, die Chemotherapeutika ausgesetzt waren, vermehrt NKG2D-Liganden aus (Cerboni, et al., 2014).

In der vorliegenden Studie wurde insgesamt eine hohe Expression von NKG2D gesehen, die Ereignis unabhängig war. Das untersuchte Klientel hatte zu 81% onkologische Erkrankungen (übrige: Immundefekte), 78% der Patienten überlebten. Diese Beobachtung ist mit den aktuellen, oben beschriebenen Arbeiten von Caligiuri, 2007; Champsaur & Lanier, 2010; Cerboni, et al., 2014; Wang & Yang, 2014 vereinbar, da NKG2D aufgrund Beteiligung bei zytolytischer Aktivität von NK Zellen bei Tumorgeschehen und Virusinfektionen vermehrt exprimiert wird. Eine niedrige Expression geht mit einer schlechteren Prognose bei Tumorerkrankungen einher (Terme, et al., 2008).

NKG2E ist ein aktivierender Rezeptor der *Natural Killer cell lectin-like receptor subfamily.*

Bei der Auswertung zeigte sich eine Ereignis-unabhängige Regulation der Expression von NKG2E mit nur geringen Schwankungen. Insgesamt wurde NKG2D in der relativen Expressionsstärke 8-fach stärker als NKG2E exprimiert

(Mittelwert der Patienten für den Quotienten NKG2D/CD56: 2,32. Mittelwert der Patienten für den Quotienten NKG2E/CD56: 0,35).
Bezüglich NKG2E im Zusammenhang mit Stammzelltransplantation gibt es aktuell nur wenig Literatur. In der Arbeit von Cooley, et al., 2007 wurde beobachtet, dass NKG2E im Gegensatz zu NKG2A nach Stammzelltransplantation nicht vermehrt exprimiert wurde. Dies spricht für eine beständige Expression von NKG2E nach Stammzelltransplantation.

5.5 NKp30

NKp30 gehört zu den NCRs (*Natural Cytotoxicity Receptors*). Sein Ligand B7-H6 kommt nicht auf gesunden Zellen vor, sondern wird von bestimmten Tumorzellen (Vivier, et al., 2011), (Brandt, et al., 2009) und virusinfizierten Zellen exprimiert (Koch, et al., 2013).
NKp30 könnte einen neuen Mechanismus darstellen, Tumorzellen unschädlich zu machen: Nämlich durch die Vernichtung von Tumorzellen, durch Tumor-Liganden, die durch NK-Zell spezifische, triggernde Rezeptoren, wie NKp30, erkannt werden (Pende, et al., 1999).
Bei der Auswertung wurde beobachtet, dass NKp30 unabhängig von klinischen Ereignissen exprimiert wurde. Nach Stammzelltransplantation stieg die Expression von NKp30 im Verlauf stetig an (Mittelwert der Spender für NKp30/CD56: 0,03; Mittelwerte der Patienten für NKp30/CD56 über alle Zeitpunkte verteilt: 0,07). Diese Beobachtung gewinnt im Hinblick auf die Rolle von NKp30 bei Tumorzell-Lyse, sowie lytischem crosstalk mit unreifen dendritischen Zellen besondere Relevanz.

5.6 ILT2

ILT2 gehört zu den *Ig-like Transcripts/ Leukocyte Ig-like Receptors*, die inhibierend auf die NK-Zelle wirken. ILT2 ist ein bedeutender inhibitorischer Rezeptor auf NK-Zellen mit dem nicht klassischen HLA-G Liganden. Er zeigte eine deutliche, Ereignis-assoziierte Regulation der Expression: bei GvHD wurde ILT2 in 75% der Fälle herunter reguliert.

ILTs erkennen eine ganze Bandbreite von klassischen und nicht-klassichen MHC Klasse I-Molekülen. Allerdings werden ihre präzisen Bindungs-eigenschaften kontrovers diskutiert. Durch die Bindungsfähigkeit an klassische MHC Klasse I-Moleküle konkurriert ILT2 auch mit CD8+ Zellen. Jedoch geschieht die Bindung an nicht klassische HLA-G mit einer 3 bis 4-fach höheren Affinität. Die ILT2-HLA-G Bindung hat zum einen eine besondere Bedeutung, da HLA-G Moleküle einzig auf Trophoblasten der Plazenta, Epithelzellen des Thymus und bestimmten Tumorzellen, einschließlich Gliomzellen exprimiert werden (Shiroishia, et al., 2003). Im Trophoblast dient die Inhibition dem Toleranzerhalt gegenüber dem Trophoblasten als „fremder" Struktur und geht mit einer reduzierten IFN-γ Produktion einher. Unabhängig davon kann ILT2 eine intial hochregulierte IFN-γ Produktion wieder herunter regulieren (Morel & Bellòn, 2008).

Im Zuge einer GvHD werden durch Aktivierung von Spender-T-Zellen vermehrt IFN-γ und IL-2 ausgeschüttet, die zu zellulär vermittelter Schädigung des Empfänger-Gewebes führen kann (Wang & Yang, 2014). Dass Stammzellempfängern bei GvHD ILT2 geringer exprimierten, lässt offen ob die GvHD, als Folge dieser „verminderten Expression" auftritt, oder ob die GvHD als unabhängiger Prozess gesehen werden muss, der aufgrund fehlender Liganden von ILT2 tragenden NK Zellen nicht reguliert werden kann. Daher ist es wesentlich wahrscheinlicher, daß das Absinken der Expression von ILT2 das „Überwachsen" anderer, die GvHD modulierende Klone, mit anderem KIR-besatz wiederspiegelt.

5.7 NKG2A

NKG2A als Verterter der inhibitorischen Rezeptoren, die der Familie der *Natural Killer cell lectin-like receptor subfamily* angehören, zeigte in dieser Studie eine vermeintlich Ereignis-assoziierte Regulation: Bei Infekt in 60% und bei GvHD in 64% der Fälle wurde NKG2A-Marker hoch reguliert. Diese Beobachtung stimmt mit Daten von Caligiuri überein, der zeigte, dass die inhibitorische Wirkung von NKG2A bei Virusinfektionen oder maligner Transformationen counter reguliert werden kann (Caligiuri, 2007).

Ohne Ereignis hingegen („*No event*“), wurde die Expression von NKG2A in 60% der Bestimmungen unter den zuvor gemessenen Wert abgesenkt. Dies entspricht der eigentlichen inhibierenden Funktion von NKG2A.

Interessanterweise wurde nach Stammzelltransplantation NKG2A nicht nur bei Infekt und GvHD vermehrt exprimiert, sondern ebenso bei Leukämie-Patienten ohne erkennbares klinisches Ereignis.
In der Arbeit von Cooley, et al., 2007 wurde gezeigt, dass nach allogener Stammzelltransplantation die Expression von NKG2A signifikant angestiegen war: 92% der Empfänger exprimierten NKG2A, wohingegen die Spender nur zu 54% NKG2A exprimierten. Die vorliegende Arbeit zeigte ähnliche Mechanismen: Die durchschnittlichen Werte zur Expression von NKG2A sind an allen Tagen (30, 60, 100, 200, 365) nach Stammzelltransplantation bei den Patienten höher als der Durchschnittswert der Spender (Mittelwert der Spender für NKG2A/CD56: 0,34; Mittelwerte der Patienten für NKG2A/CD56 über alle Zeitpunkte verteilt: 0,51). Bei den vorliegenden Daten konnte bei jedem Spender NKG2A-Transkripte nachgewiesen werden. Nach Stammzelltransplantation war im Verlauf die NKG2A-Expression stetig angestiegen.
Ein Anstieg von NKG2A bei Infektionen und GvHD kann daher nicht prädiktiv gewertet werden, da Leukämie-Patienten auch ohne klinische Ereignisse NKG2A hochregulieren und generell nach Stammzelltransplantation vermehrt NKG2A exprimiert wird.

5.8 Nach Stammzelltransplantation neu aufgetretene Marker

5.8.1 KIR3DL1

KIR3DL1 gehört zu den inhibierenden *Killer Immunoglobulin-like Receptors*.
Bei der Auswertung fiel auf, dass KIR3DL1 interessanterweise bei 41% der Patienten neu exprimiert wurde.
KIR3DL1 ist eigentlich typisch für den KIR Haplotypen A (Parham, et al., 2011). Jedoch gibt es eine Reihe von KIR Haplotypen B, die ebenfalls KIR3DL1

exprimieren (The European Bioinformatics Institute of the European Molecular Biology Laboratory, 2011). Bei den vorliegenden Daten können 100% der Neuexpressionen dieses Rezeptors aufgeteilt werden in 80% Haplotyp B und 20% Haplotyp A. Diese Verteilung ist dem Übergewicht von Haplotyp B mit 68% der untersuchten Probanden verschuldet.

KIR3DL1 ist ein sehr variabler Rezeptor auf NK-Zellen. Dass heißt er wird individuell exprimiert und hat eine begrenzte Lebensdauer. Die Transkription wird durch IL-15 aktiviert, das eine NK-Zell Reifung hervorruft (Parham, et al., 2011). IL-15 wird vorwiegend von myeoloischen Zellen exprimiert und ist ein Oberflächen-assoziiertes Zytokin (Votavova, et al., 2014). Es aktiviert NK-Zellen und hat den Vorteil, dass es die Expansion von regulatorischen T-Zellen vermeidet (Knorr, et al., 2014).

Die Beobachtung der vielen Neuexpressionen ist also vereinbar mit der aktuellen oben beschriebenen Literatur, die KIR3DL1 als sehr variablen Rezeptor beschreibt. Bei der Auswertung wurde kein Zusammenhang der Expression von KIR3DL1 mit klinischen Ereignissen gesehen.

5.8.2 KIR2DL4

KIR2DL4 gehört zu den aktivierenden *Killer Immunoglobulin-like Receptors,* und gehört zu den *Framework* Genen, die sowohl bei KIR Haplotyp A als auch B auftreten können (Rajalingam, 2002).

37% der Patienten exprimierten KIR2DL4 neu. Dabei war kein Zusammenhang der Expression mit einem klinischen Ereignis erkennbar. Bei den Proben der Spender wurden damit weniger KIR2DL4-Transkripte als im Patienten nachgewiesen. Es ist anzunehmen, dass die Spender gesund waren, und keine Aktivierung bestimmter NK-Zellpopulationen vorlag, und somit keine Expression von KIR2DL4 stattgefunden hatte.

Dies ist vereinbar mit der aktuellen Literatur. Der Rezeptor kann nicht an der Oberfläche von primär ruhenden NK-Zellen aus peripherem Blut detektiert werden. Der Ligand HLA-G, der vermehrt bei infizierten Zellen, Stress und Tumorerkrankungen exprimiert wird, bindet an KIR2DL4 (Rajagopalan & Long, 2012). Bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation wird KIR2DL4 im Vergleich zu anderen KIRs vermehrt exprimiert. Virsuinfektionen und Rezidiv

sollten jedoch als Ursache für eine vermehrte Expression ausgeschlossen werden können. Hier greift als Erklärung wohl eher die Tatsache dass NK-Zellen in ihrer Reifung KIR2DL4-Transkripte benötigen, bevor sie jegliche andere KIR-Gene exprimieren (Cooley, et al., 2007).

5.9 KIR Haplotypen in der Gruppe der Verstorbenen

In der vorliegenden Studie sind 6 Patienten verstorben. Davon wiesen 67% (4 von 6) den Haplotyp B auf, und 33% (2 von 6) den Haplotyp A auf. Es wird in mehreren Studien (Cooley, et al., 2009), (Cooley, et al., 2010), (Symons, et al., 2010), (Kröger, et al., 2011) beschrieben, dass der KIR Haplotyp B eine niedrigere Rezidiv-Rate und eine höhere Überlebensrate hervorbringt.
Da das hier untersuchte Patientenklientel eine Verteilung von 68% (17 von 25 eindeutig zu bestimmenden Haplotypen) Haplotyp B sowie 32% (8 von 25) Haplotyp A aufweist, spiegelte die Verteilung der Haplotypen in der Gruppe der Verstorbenen exakt die Verteilung in der Gesamtgruppe wieder. Eine Aussage über besseres Überleben bezüglich der Haplotypen kann nicht getroffen werden. Um ein statistisch aussagekräftiges Ergebnis zu bekommen, muss die Zahl der untersuchten Patienten höher sein.

5.10 KIR Mismatch

Wie bereits in Kapitel 1.2.1 beschrieben, kann eine Alloreaktion von Spender NK-Zellen gegenüber Empfänger Zellen durch ein *mismatch* von KIR Liganden entstehen (Ruggeri, et al., 2006) und im besten Fall einen *Graft versus Leukemia* bzw. *Tumor* Effekt auslösen.
Bei den vorliegenden Probanden zeigten 13 Personen ein *KIR Match* bei haploidenter Stammzelltransplantation und 5 Personen ein *KIR Mismatch*. In 3 Mismatch Fällen war die Richtung Host versus Graft und in den 2 anderen Fällen die Richtung Graft versus Host. (Die KIR Liganden nach Haplotypisierung und ihre Graft versus Host- bzw. Host versus Graft-Reaktionen wurden über http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/ligand.html berechnet.)
Bei den 2 Graft versus Host-Fällen handelte es sich um Patient 9 und 18. Patient 9 hatte eine AML und hatte ein Jahr nach Stammzelltransplantation kein Rezidiv. Patient 18 hatte ein Neuroblastom, Stadium 4, d.h. eine sehr

fortgeschrittene maligne Erkrankung mit Fernmetastasen, die nach Stammzelltransplantation zusätzlich mit Anti-GD2-AK hu14.18 therapiert wurde. Darunter traten keine weiteren Metastasen auf und beide Patienten gehören zur Gruppe der Überlebenden. Dies spricht für einen *Graft versus Leukemia/Tumour* Effekt.

Auffällig ist, dass in der Gruppe der Verstorbenen kein *KIR Mismatch* vorhanden ist, sondern alle Patienten mit einem *KIR Mismatch* in der Gruppe der Überlebenden zu finden sind. Unsere Beobachtungen unterstützten Studien von Ruggeri et al. und Symons et al. nämlich, dass durch ein *KIR Mismatch* ein Graft-versus-Leukemia Effekt entstehen kann, resultierend in niedrigerer Rezidiv-Rate und einer höheren Überlebensrate sowie weniger Komplikationen (Ruggeri, et al., 1999), (Symons, et al., 2010).

Um ein statistisch aussagekräftiges Ergebnis zu bekommen, muss die Zahl der untersuchten Patienten höher sein.

5.11 Klinische Relevanz und Ausblick

Die bereits hervorgehobene, besondere Bedeutung von NK-Zellen nach Stammzelltransplantation liegt in ihrer Eigenschaft, keine GvHD zu verursachen und darüber hinaus *Graft-versus-Leukemia/Tumor* Effekte hervor rufen zu können.

In der vorliegenden Arbeit waren interessante Regulationen im Hinblick auf *Natural Killer Cell*-Rezeptoren zu beobachten.

Die aktivierenden NKRs wurden sowohl in Zusammenhang mit klinischen Ereignissen der Patienten reguliert, als auch unabhängig davon.

Unabhängig von klinischen Ereignissen beim Patienten wurde nach Stammzelltransplantation NKp30 exprimiert.

Die NKp30 Transkripte stiegen im Mittel im zeitlichen Verlauf an. Der Mittelwert des Quotienten NKp30/CD56 für die Patienten über alle Zeiträume bleibt mit 0,07 eher niedrig. Die Streuung ist relativ gering (0 bzw. 0,01 bis 0,41) und spricht für eine strenge Regulation.

Ebenfalls unabhängig von klinischen Ereignissen wurden NKG2D Transkripte nachgewiesen. Der NKG2D/CD56-Quotient fiel durch hohe Werte (Mittelwert der Patienten über alle Zeiträume 2,32) und eine enorm breite Streuung auf (0 bzw. 0,03 bis 34,79). NKG2D wurde in der relativen Expressionsstärke 8-fach stärker als NKG2E exprimiert.
Auch NKG2E wurde Ereignis unabhängig exprimiert. Im Gegensatz zu NKG2D wies NKG2E eine relativ geringe Streuungsbreite auf, was für eine strenge Regulierung spricht (NKG2E/CD56-Ouotienten: einziger Ausreißer und mit 11,41 herausgenommen: Mittelwert der Patienten über alle Zeiträume 0,3. Minimum (> 0) von 0,01 und Maximum von 1,52).

NKp46 wurde am stärksten Ereignis-assoziiert reguliert. Bei Infekt wurde bei 61% der Fälle NKp46 hochreguliert und ohne Ereignis („*No event*“) fiel NKp46 in 63% der Fälle unter den Wert des vorangegangenen Untersuchungszeitpunktes. NKp46 wurde relativ stark exprimiert und moduliert mit einem durchschnittlichen NKp46/CD56 Quotienten von 0,47 für alle Patienten. Sein Maximum betrug 7,05 und sein Minimum (> 0) 0,01.
Ebenfalls Ereignis assoziiert wurden NKG2C und CD226 in ihrer Expression reguliert. NKG2C wurde bei „*No Event*“ zu 59% hoch reguliert. Im Vergleich dazu wurde NKG2C bei GvHD und Infekt herunter reguliert. Der Mittelwert des NKG2C/CD56 Quotienten für alle Patienten betrug 0,09 mit einem Maximum von 0,96 und Minimum (> 0) von 0,01. Im Vergleich zu NKp46 wurde dieser in der relativen Expressionsstärke im Mittel 7-fach höher exprimiert als NKG2C.
CD226 zeigte eine ähnliche Regulierung wie NKG2C, nämlich vermehrte Expression bei „*No Event*“ in 58% der Fälle und eine Herunter-Regulation bei GvHD und Infekt. Dabei fiel im Vergleich zu NKG2C die relative Expression von CD226 mit einem CD226/CD56 Quotienten von 0,95 für alle Patienten im Mittel 11-fach stärker als NKG2C aus. Der CD226-Quotient erreichte ein Maximum von 13,55 und ein Minimum (> 0) von 0,01.

Auch die inhibierenden NKRs zeigten letzten Endes sowohl eine mit klinischen Ereignissen der Patienten-assoziierte als auch unabhängige Regulation ihrer Expression.
NKG2A wurde Ereignis unabhängig reguliert. Nach Stammzelltransplantation war die NKG2A-Expression im Verlauf stetig angestiegen. Der Mittelwert der Patienten für NKG2A/CD56 über alle Zeitpunkte verteilt betrug mit 0,51 das 1,5-fache der mittleren Expressionsstärke der Spender mit 0,34. NKG2A/CD56 hatte bei den Patienten ein Maximum von 3,89 und ein Minimum (> 0) von 0,05.
ILT2 hingegen zeigte eine eindrückliche Ereignis-assoziierte Regulation der Expression mit einer verminderten Transkription bei GvHD in 75% der Fälle.
Die relative Expressionsstärke von ILT2/CD56 war sowohl bei den Spendern mit einem Mittelwert von 0,58 als auch bei allen Patienten mit einem Mittelwert von 0,41 relativ hoch. Das Maximum des ILT2 Quotienten betrug 1,72 und das Minimum (> 0) 0,03.

Folgende NK-Zell Marker können für Diagnostik und Therapie nach Stammzelltransplantation große Relevanz gewinnen:

NKp46 wurde bei Infektionen deutlich hoch reguliert und bei klinisch unauffälligem Zustand herunter reguliert. Er könnte daher Infektionen bestätigen jedoch sein Fehlen eine Infektion nicht ausschließen.
Diese Befunde sind mit der aktuellen Literatur vereinbar, da NKp46 eine Schlüsselrolle in der Erkennung und Elimination von Viren, Bakterien und Tumoren inne hat (Koch, et al., 2013). NKp46 vermittelt effiziente antivirale Zytotoxizität (Dorak, 2012), und ist auch für die Lyse von Myelom-Zellen zwingend erforderlich (El-Sherbiny, et al., 2007).

Bei guter klinischer Verfassung der Patienten zeigte sich eine Hochregulation der Expression von CD226 und NKG2C. Diese beiden Rezeptoren könnten nach Stammzelltransplantation als Marker für aktivierte, funktionsfähige NK-Zellen sprechen, die den gesunden Zustand des Patienten mit bedingen.

Durch Rezeptor - Liganden Interaktion zwischen CD226 und PVR bzw. Nectin-2 wird die NK-Zelle aktiviert. Im Kontext mit weiteren aktivierenden Signalen wird so die Wahrscheinlichkeit zytolytischer Aktivität gegenüber der Zielzelle erhöht. Man kann davon ausgehen, dass Tumore, die die Liganden PVR und Nectin-2 exprimieren daher möglicherweise eine stärkere NK-Zell vermittelte Lyse erfahren als diejenigen Tumore, die diese Liganden nicht tragen.

ILT2 zeigte eine deutlich verminderte Expression bei GvHD, was sonst kein anderer Marker zeigte. ILT2 könnte als diagnostischer Marker für eine GvHD herangezogen werden.

In aktuellen Studien wurden Infusionen von NK-Zellen bereits therapeutisch genutzt.
In der Arbeit von Choi, et al., 2014 bekamen Patienten, die eine haploidentische Stammzelltransplantation aufgrund von malignen hämatologischen Erkrankungen hinter sich hatten, NK-Zell Infusionen. Die NK-Zellen wurden von den jeweiligen Spendern gewonnen, indem ihre letzte Portion des Leukapherisates CD3-depletiert wurde und die Zellkulturen mit humanem IL-15 und IL-21 stimuliert wurden. Diese NK-Zellen wurden den Patienten in der 2. und 3. Woche nach Stammzelltransplantation infudiert. Als Ergebnis zeigte sich eine signifikante Reduzierung einer Progression der Leukämie.
Hu, et al. verabreichte 2012 Mäusen nach einer Knochenmarktransplantation ohne Myeloablation Spender NK-Zellen und behandelte die Mäuse zusätzlich mit IL-15. Dabei wurde eine synergistische Wirkung von NK-Zell Infusionen und IL-15 Therapie sichtbar: Das Engraftment und die Reifung von Spenderzellgruppen wurde gefördert. Zudem wurde die Alloreaktivität des Spenders im nicht-myeoloablativen Mausmodell nach Knochenmarktransplantation gesenkt.
Nach oben genannter, aktueller Literatur ist es sinnvoll zu überprüfen, wie eine Therapie mit NK-Zellen nach Stammzelltransplantation gestaltet werden kann.

Zieht man die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit heran, bieten sich folgende Überlegungen an:

ILT2 zeigte eine deutliche Herunter-Regulation bei GvHD. Eine mögliche Erklärung wäre, dass bei einer GvHD vermehrt MHC-Klasse I und II Moleküle exprimiert werden, die eine Hochregulation von inhibitorischen Liganden zur Folge haben. Als Gegenregulation werden bestimmte inhibitorische Liganden, die unter anderem spezifisch von ILT2 erkannt werden, auch der inhibitorische Rezeptor ILT2, weniger exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass NK-Zellen bei einer GvHD durch Herunter-Regulation von ILT2 möglicherweise aktiviert werden.

Beim immunologischen Vorgang einer GvHD, wäre es wünschenswert, wenn NK-Zellen ihre inhibitorischen Liganden nicht verlieren und der inhibierende NK-Zell Rezeptor ILT2 nicht vermindert exprimiert würde. Denn durch eine vermehrte Expression von Liganden für NK-Zellen, kommt es zu einer erhöhten Aktivität von NK-Zellen, die einer GvHD entgegenwirken können.

Es wäre interessant zu klären, ob in vitro expandierte NK-Zellen, die durch längeres Verbleiben in einem stabilen Zytokin-Milieu ihren inhibierenden Liganden ILT2 exprimieren. Falls dies der Fall sein sollte, wäre es wichtig zu klären, ob sie ILT2 auch dann noch exprimieren, wenn sie in ein komplett verändertes Zytokin-Milieu kommen. Das heißt zu klären, ob NK-Zellen durch Expansion in vitro phänotypisch und eventuell auch funktionell fixiert werden können oder nicht.

Da bisher nur wenig Literatur über die NK-Zell Aktivität bei GvHD existiert und überwiegend die Funktion von NK-T-Zellen bei GvHD beschrieben wurde (Wang, et al., 2014), (Alpdogan, et al., 2012), ist es sinnvoll weitere Untersuchungen zur Aktivität von Natürlichen Killerzellen bei GvHD durchzuführen.

6 Zusammenfassung

Die allogene Stammzelltransplantation hat einen besonderen Stellenwert in der Therapie von hämatologisch-onkologischen Erkrankungen, da sie kuratives Potenzial bietet, auch wenn andere Therapien bereits versagt haben. Eine gefürchtete Komplikation ist die GvHD, die entsteht wenn Spender-T-Zellen auf Gewebe des Empfängers reagieren. NK-Zellen des Spenders hingegen verursachen keine GvHD. Vielmehr kann eine Alloreaktivität der Spender NK-Zellen gegen den Empfänger, z.B. bei einem *KIR-Mismatch*, als *Graft-versus-Leukemia/-Tumour* Effekt genutzt werden. In diesem Zusammenhang weisen NK-Zellen eine beachtliche Anti-Tumor-Wirkung auf. Sie besitzen viele hemmende und aktivierende Rezeptoren, die MHC-Klasse I – Moleküle beeinflussen. Dabei wirken sowohl die „*missing-self*"- als auch die „*induced-self" recognition.*

Ziel der Arbeit war es auf Transkript-Ebene die Genaktivität der im folgenden beschriebenen NK-Zell Rezeptoren nach Transplantation nachzuweisen: Aktivierende KIRs (KIR2DL4, KIR2DS1-5) und inhibierenden KIRs (KIR2DL1-3, 5, KIR3DL1-3, KIR3DS1); aktivierende NKRs (CD226, NKG2C, D, E) und inhibierender NKR (NKG2A); außerdem aktivierende NCRs (NKp30, 46) und der inhibierende ILT2 = CD85j. Es wurde analysiert welche Rezeptoren wann exprimiert wurden, und ob sie bei Komplikationen wie GvHD oder Infekt moduliert wurden. Probanden waren 27 Patienten und ihre Stammzell-Spender (Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Zeitraum: 2007 bis 2009). Es wurden Proben vom Spender und von Patienten jeweils an Tag 30/60/100/200/365 nach Stammzelltransplantation mittels PCR mit spezifisch Fluoreszens-markierten Primern analysiert. Die Fluoreszenzintensität jedes einzelnen Markers wurde über einen *Genetic Analyzer* als Fläche angegeben, die wir zur Fläche des NK-Zell spezifischen Oberflächenmoleküls CD56 der jeweiligen Probe normalisierten. Die spezifischen Quotienten Marker x/CD56 wurden zur Datenanalyse herangezogen.

Hier waren interessante Regulationen bezüglich der Expression von *Natural Killer Cell*-Rezeptoren zu beobachten: Unabhängig von klinischen Ereignissen

beim Patienten wurden nach Stammzelltransplantation folgende Marker exprimiert: NKp30 stieg im zeitlichen Verlauf an, mit relativ geringer Streuung (NKp30/CD56: 0 - 0,41) und somit strenger Regulation. NKG2D fiel durch hohe Werte (Ø NKG2D/CD56 von Patienten: 2,32) und eine enorm breite Streuung auf (NKG2D/CD56 0 - 34,79). NKG2D wurde in der relativen Expressionsstärke 8-fach stärker als NKG2E exprimiert. NKG2E zeigte eine strenge Regulierung mit relativ geringer Streuung (Ø NKG2E/CD56 von Patienten 0,3; 0 - 1,52). Die NKG2A-Expression war im Verlauf stetig angestiegen (Ø NKG2A/CD56 von Patienten mit 0,51 betrug das 1,5-fache der Ø Spender mit 0,34).

Ereignis-assoziiert reguliert wurden folgende Rezeptoren: NKp46 wurde bei Infekt zu 61% der Fälle hochreguliert und ohne Ereignis („*No event*“) in 63% der Fälle herunter reguliert. NKG2C wurde bei „*No Event*“ zu 59% hoch reguliert und im Vergleich dazu bei GvHD und Infekt herunter reguliert. CD226 zeigte ebenfalls eine vermehrte Expression bei „*No Event*“ in 58% der Fälle und eine Herunter-Regulation bei GvHD und Infekt. ILT2 hatte eine verminderte Transkription bei GvHD in 75% der Fälle. Somit können für Diagnostik und Therapie nach Stammzelltransplantation folgende Marker große Relevanz gewinnen: NKp46 könnte bei Anstieg Infektionen bestätigen, jedoch sein Fehlen eine Infektion nicht ausschließen. Bei guter klinischer Verfassung der Patienten zeigte sich eine Hochregulation der Expression von CD226 und NKG2C. Diese beiden Rezeptoren könnten nach Stammzelltransplantation als Marker für aktivierte, funktionsfähige NK-Zellen sprechen, die den gesunden Zustand des Patienten mit bedingen. Auch zeigen Tumore mit den spezifischen Liganden PVR und Nectin- 2 für CD226 eine erhöhte Tumorlyse durch vermehrte NK-Zellaktivität. ILT2 zeigte als einziger Marker bei GvHD eine deutlich verminderte Expression. Dies sollte Anlass geben für weitere Untersuchungen zur Aktivität von NK-Zellen bei GvHD.

Durch diese Arbeit wurden also nach Stammzelltransplantation einige NK-Zell Rezeptoren nachgewiesen, die als Indikatoren für Infekt, GvHD und gesunden klinischen Zustand der Patienten dienen können. Die hier aufgezeigten Zusammenhänge gilt es nun in einer größeren Patientenzahl zu überprüfen.

7 Literaturverzeichnis

1 Alpdogan, O. & Brink van den, M., 2012. Immune Tolerance and Transplantation. *Seminars in Oncology*, Band 39, p. 629–642.

2 Barrow, A. D. & Trowsdale, J., 2008. The extended human leukocyte receptor complex: diverse ways of modulating immune responses. *Immunological Reviews* , p. Vol. 224: 98–123.

3 Billadeau, D. D. et al., 2003. NKG2D-DAP10 triggers human NK cell–mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nature Immunology*, Band 4, pp. 557-564.

4 Bottino, C., Castriconi, R., Moretta, L. & Moretta, A., 2005. Cellular ligands of activating NK receptors. *Trends in Immunology*, Band 26, pp. 221-226.

5 Brandt, C. et al., 2009. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor in humans. Band 206, pp. 1495-1503.

6 Caligiuri, M. A., 2007. Human natural killer cells. *Blood*, Band 112, pp. 461-469.

7 Cerboni, C. et al., 2014. The DNA damage response: a common pathway in the regulation of NKG2D and DNAM-1 ligand expression in normal, infected and cancer cells. *Frontiers in Immunology*, Band 4, pp. 1-7.

8 Champsaur, M. & Lanier, L. L., 2010. Effect of NKG2D ligand expression on host immune response. *Immunology Review*, Band 235, pp. 267-285.

9 Chen, X. et al., 2009. A novel approach for quantification of KIR expression in healthy donors and pediatric recipients of hematopoietic SCTs. *Bone Marrow Transplant*, Band 43, p. 525–532.

10 Choi, I. et al., 2014. Donor-Derived Natural Killer Cells Infused after Human Leukocyte Antigen–Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation: A Dose-Escalation Study. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*.

11 Cooley, S. et al., 2009. Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*, pp. 726-732.

12 Cooley, S. et al., 2010. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*, Band 116, pp. 2411-2419.

13 Cooley, S. et al., 2007. A subpopulation of human peripheral blood NK cells that lacks inhibitory receptors for self-MHC is developmentally immature. *Blood*, Band 110, pp. 578-586.

14 Copelan, A. E., 2006. Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *The New England Journal of Medicine*, Band 354, pp. 1813-1826.

15 Creutzig, U., Dworzak, M. & Reinhardt, D., 2013. *Akute myeloische Leukämie im Kindesalter.* s.l., AWMF online.

16 Della Chiesa, M. et al., 2013. Impact of HCMV infection on NK cell development and function after HSCT. *Frontiers in Immunology*, Band 4, pp. 1-7.

17 Dorak, M. T., 2012. *Natural Killer Cell Receptors.* [Online] Available at: http://www.dorak.info/mhc/nkcell.html [Zugriff am 2013].

18 El-Sherbiny, M. Y. et al., 2007. The Requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the Natural Killer Cell-mediated killling of Myeloma Cells. *Cancer Research*, Band 67, pp. 8444-8449.

19 Federmann, B. et al., 2011. Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic cell transplantation: impact of reduced intensity conditioning and CD3/CD19 depleted grafts. *Leukemia*, Band 25, pp. 121-129.

20 Hartog, d. G. et al., 2013. Ontogeny of the avian intestinal immunoglobulin repertoire:Modification in CDR3 length and conserved VH-pseudogene usage. *Molecular Immunology*, Band 56, pp. 811-818.

21 Hsu, C. K., Chida, S., Geraghty, E. D. & Dupont, B., 2002. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order,

haplotypes and allelic polymorphism. *Immunological Reviews*, Band 190, pp. 40-52.

22 Hu, B. et al., 2012. Donor NK Cells and IL-15 promoted Engraftment in nonmyeloablative allogeneic bone marrow transplant. *The Journal of Immunology*, Band 189, pp. 1661-1670.

23 Huntington, D. N., Vosshenrich, J. A. C. & Di Santo, P. J., 2007. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nature Reviews | Immunology*, Band 7, pp. 703-714.

24 Imai, K. et al., 2000. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet*, Band 356, p. 1795–99.

25 Jenq, R. R. & Brink, v. d. M. R. M., 2010. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer*, Band 10, pp. 213-220.

26 Jenq, R. R. & van den Brink, M. R., 2010. Allogeneic haematopoetic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer*, Band 10, pp. 213-220.

27 Kilian, S. & members, E. W. a. I.-B. B. a. D. C., 2013. *Common guidelines for diagnostic approaches to leukemias.* s.l., European Network for Cancer research in children and adolescents.

28 Knorr, A. D., Bachanova, V., Verneris, R. M. & Miller, S. J., 2014. Clinical utility of natural killer cells in cancer therapy and transplantation. *Seminars in Immunology*, Band 26, pp. 161-172.

29 Koch, J., Steinle, A., Watzl, C. & Madelboim, O., 2013. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Cell Press*, Band 34, pp. 182-191.

30 Kröger, N. et al., 2011. Donor KIR haplotype B improves progression-free and overall survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Leukemia*, p. 1657–1661.

31 Lanier, L. L., 2005. NK Cell Recognition. *Annual Review Immunology*, Band 23, pp. 225-274.

32 Lanier, L. L., 2008. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nature Immunlogy*, Band 9.

33 Le, T.-M., 2010. *KIR-/NKR-Spectratype.* Tübingen: s.n.

34 Leung, W., 2011. Use of NK cell activity in cure by transplant. *British Journal of Haematology*, Band 155, pp. 14-29.

35 Lucas, M. et al., 2007. Natural Killer Cell-Mediated Control of Infections Requires Production of Interleukin 15 by Type I IFN-Triggered Dendritic cells. *Immunity*, Band 26, p. 503–517.

36 Marsh, S. G. et al., 2003. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Immunogenetics*, p. 220–226.

37 Morel, E. & Bellòn, T., 2008. HLA Class I Molecules regulate IFN-y production induced in NK cells by target cells, viral products, or immature Dendritic Cells through the Inhibitory Receptor ILT2/CD85j. *The Journal of Immunology*, Band 181, pp. 2368-2381.

38 Moretta, L. et al., 2009. Natural killer alloeffector responses in haploidentical hemopoietic stem cell transplantation to treat high-risk leukemias. *Tissue Antigens*, Band 75, p. 103–109.

39 Parham, P., Norman, J. P., Abi-Rached, L. & Guethlein, A. L., 2011. Variable NK cell Receptors exemplified by Human KIR3DL1/DS1. *Journal of Immunology*, Band 187, pp. 11-19.

40 Pende, D. et al., 1999. Identification and Molecular Characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *Journal of experimental medicine*, Band 190, p. 1505–1516.

41 Poli, A. et al., 2008. CD56bright natural killer (NK) cells: an important cell subset. *Immunology*, Band 10.1111/j., pp. 1365-2567.

42 Pray, A. L., 2008. *Scitable by Nature Education.* [Online] Available at: http://www.nature.com/scitable/topicpage/the-biotechnology-revolution-pcr-and-the-use-553

43 Rajagopalan, S. & Long, O. E., 2012. KIR2DL4 (CD158d): an activation receptor for HLA-G. *Frontiers in Immunology*, Band 3, pp. 1-6.

44 Rajalingam, R., 2002. Diversity of NK Cell Receptors and their HLA Class I Ligands. *Scientific Communicatiions*, pp. 68 - 72.

45 Raulet, H. D. & Vance, E. R., 2006. Self-tolerance of natural killer cells. *Nature*, Band 6, pp. 520-531.

46 Ruggeri, L., Aversa, F., Martelli, F. M. & Velardi, A., 2006. Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self. *Immunological Reviews*, Band 214, pp. 202-218.

47 Ruggeri, L. et al., 1999. Role of Natural Killer Cell Alloreactivity in HLA-Mismatched Hematopoietic Stem Cell Transplatation. *Blood*, pp. 333-339.

48 Ruggeri, L. et al., 2002. Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants. *Sciene*, Band 295, pp. 2097-2100.

49 Ruggeri, L. et al., 2007. Natural killer cell alloreactivity in allogeneic hematopoietic transplantation. *Current Opinion in Oncology*, Band 19, pp. 142-147.

50 Shiroishia, M. et al., 2003. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *PNAS*, Band 100, pp. 8856-8861.

51 Sinner, E.-K., 2007. *Max-Planck-Institut für Polymerforschung.* [Online] Available at: http://www.mpip-mainz.mpg.de/7847/research_report_460702?c=16785

52 Symons, H. J. et al., 2010. Improved survival with inhibitory Killer Immunoglobulin Receptor (KIR) gene mismatches and KIR haplotype B donors after nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, p. 533–542.

53 Terme, M. et al., 2008. Natural Killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nature Immunology*, Band 9, pp. 468-494.

54 The European Bioinformatics Institute of the European Molecular Biology Laboratory, 2011. *EMBL-EBI.* [Online]

Available at: http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/haplotypes.html [Zugriff am 2011].

55 Thomas Jefferson University, P., 2012. *Computational Medicine.* [Online] Available at: https://cm.jefferson.edu/learn/dna_and_rna.html

56 Verhoeven, H. J. D. et al., 2008. NK cells recognize and lyse Ewing sarcoma cells through NKG 2D and DNAM-1 receptor dependent pathways. *Molecular Immunology*, Band 45, pp. 3917-3925.

57 Vivier, E. et al., 2011. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science*, Band 331, pp. 44-49.

58 Votavova, P., Tomala, J. & Kovar, M., 2014. Increasing the biological activity of IL-2 and IL-15 through complexing with anti-IL-2 mAbs and IL-15Ralpha-Fc chimera. *Immunology Letters*, Band 159, pp. 1-10.

59 Walzer, T. et al., 2007. Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. *PNAS*, Band 104, p. 3384 –3389.

60 Wang, H. & Yang, Y.-G., 2014. The complex and central role of interferon-y in graft-versus-host disease and graft-versus-tumor activity. *Immunological Reviews*, Band 258, pp. 30-44.

61 Wang, R. & Sun, D. P., 2014. Natural Killer Cell-Mediated Shedding of ULBP2. *PLOS ONE*, Band 9, pp. 1-12.

8 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Das Gleichgewicht von hemmenden und stimulierenden Signalen, die eine NK-Zelle bekommt, bestimmt das Ergebnis der Interaktion mit den Zielzellen (Raulet & Vance, 2006) 12
Abbildung 2 Genomische Organisation der zwei KIR Haplotypen (Rajalingam, 2002) 18
Abbildung 3 Aufbau von RNA und DNA (Thomas Jefferson University, 2012) 31
Abbildung 4 Transkription und Translation (Sinner, 2007) 32
Abbildung 5 Prinzip der PCR (Pray, 2008) 36
Abbildung 6 Elektropherogramm für CD56 (Le, 2010) 40
Abbildung 7 Allgemeine Regulation von NKp46 44
Abbildung 8 NKp46 Regulation bei Überlebenden (*Alive*) versus Verstorbene (*Deceased*) 45
Abbildung 9 NKp46 Regulation bei KIR-Haplotyp A versus KIR-Haplotyp B 45
Abbildung 10 NKp46 Regulation bei verschiedenen Erkrankungen 46
Abbildung 11 Allgemeine Regulation von NKp30 47
Abbildung 12 Allgemeine NKp30 Expression im zeitlichen Verlauf 48
Abbildung 13 Allgemeine Regulation von NKG2C 49
Abbildung 14 Allgemeine Regulation von NKG2E 50
Abbildung 15 Allgemeine NKG2E Expression 51
Abbildung 16 Allgemeine Regulation von NKG2D 52
Abbildung 17 Allgemeine NKG2D Expression 53
Abbildung 20 ILT2/CD85j Regulation bei Überlebenden (*Alive*) versus Verstorbene (*Deceased*) 56
Abbildung 21 ILT2/CD85j Regulation bei KIR-Haplotyp A versus KIR-Haplotyp B 56
Abbildung 22 ILT2/CD85j Regulation bei verschiedenen Erkrankungen 57
Abbildung 23 Allgemeine ILT2 = CD85j Expression 58
Abbildung 24 Allgemeine Regulation von NKG2A 59

Abbildung 25 NKG2A Regulation bei Überlebenden (*Alive*) versus Verstorbene (*Deceased*) 60
Abbildung 26 NKG2A Regulation bei KIR-Haplotyp A versus KIR-Haplotyp B. 60
Abbildung 27 NKG2A Regulation bei verschiedenen Erkrankungen 61
Abbildung 28 Allgemeine NKG2A Expression 62

Tabelle 1 Eigenschaften von NK-Rezeptor Familien (Dorak, 2012) 14
Tabelle 2 KIR- und NKR-Typing 19
Tabelle 3 Übersicht der Patienten und jeweiligen Spender 21
Tabelle 4 KIR- und NKR- Primer 25
Tabelle 6 cDNA-Mastermix 2 35
Tabelle 7 Mastermix AmpliTaq® Gold DNA Polymerase je Primerpaar 37
Tabelle 8 Mastermix Taq DNA Polymerase je Primerpaar 38
Tabelle 9 Tabelle KIR-/ NKR-Primer Kombinationen für Kapillargelelektrophorese über Sequenziergerät 39
Tabelle 10 KIR-Haplotypen der Patienten und ihrer Spender 64

9 Danksagung

Herrn Professor Dr. med. R. Handgretinger danke ich herzlichst für die Unterstützung der Dissertation.
Bei PD rer. nat. Karin Schilbach-Stückle bedanke ich mich für die geduldige und ausdauernde Unterstützung auch über die Distanz hinweg, ihre anregenden Diskussionen und ihren beispielhaften Enthusiasmus als Forscherin.
Weiterhin danke ich Dr. med. Matthias Pfeiffer für die freundliche und lehrreiche Begleitung der Dissertation.
Dankend wende ich mich an das Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie Tübingen, insbesondere Dipl.-Stat. Aline Naumann und Professor Dr. M. Eichner für die statistische Beratung.

Mein Dank gilt auch den hilfsbereitesten und herzlichsten Mitarbeitern, die man sich als Doktorandin wünschen kann: Claudia Zürn, Irene Metzdorf und Stefanie Katz vom Chimärismus-Labor; der guten Seele der Arbeitsgruppe Schilbach: Hendrik Ziegler; der onkologischen Tagesstation, dem KMT-Labor und der KMT-Station.
Für den nicht zu ersetzenden, freundschaftlichen Beistand danke ich Adrienne Rupp, Lisa Hartmann und Bart Moonen.
Mein ganz besonderer Dank gilt Carlo Weimer für die uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Thuy-Mi Le
Geburtsdaten	05.01.1984 in Krefeld
Staatsangehörigkeit	deutsch

02/2011 bis heute	**Ärztin an der Klinik für Neugeborene, Kinder und Jugendliche; Klinikum Nürnberg Süd**

Studium

10/2003 – 11/2010 08/03/2006 19/10/2010 11/2010	**Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen** Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Approbation als Ärztin
02/2009 – 01/2010	Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Tübingen: • Innere Medizin: Notaufnahme, Intensivstation • Allgemein- und Kinderchirurgie • Pädiatrie: Allgemeinpädiatrie, Neonatologie, Hämatologie/Onkologie

Universitäre Tätigkeit

10/2005 – 02/2007	Wissenschaftliche Hilfskraft am Anatomischen Institut der Universität Tübingen für anatomische Zeichnungen

Schulbildung

08/1994 – 07/2003	Quenstedt-Gymnasium Mössingen, Abitur
09/1990 – 07/1994	Amberger Grundschule, Nürnberg

11 Anhang

11.1 Test auf Normalverteilung der Daten

11.1.1 Die Datenmenge

Die Größe der untersuchten Patienten beträgt N=26 mit maximal 5 Zeitpunkten, zu denen Werte erhoben wurden (d30, d60, d100, d200, d365). Um eine statistische Regressionsanalye durchführen zu können, müssen die zugrundeliegenden Daten normalverteilt sein. Hierzu werden wir 2 Marker im Detail auf ihre Verteilung untersuchen.
Die Untersuchung der Normalverteilung wird mit dem Bera-Jarque Test überprüft.

11.1.2 Der Test

Der Bera-Jarque Test ist ein statistischer Test, der anhand der Schiefe (S) und der Kurtosis (K) in den Daten prüft, ob eine Normalverteilung vorliegt. Es handelt sich daher um einen speziellen Anpassungstest.
H0: Die Daten sind normalverteilt.
HA: Die Daten sind nicht normalverteilt.
Sind die Daten normalverteilt so ist S (Schiefe) gleich 0 und K (Kurtosis) ebenfalls gleich 0. Die Bera-Jarque Statistik ist dann ebenfalls 0.

11.1.3 Testablauf und Berechnung

Hierzu werden folgende Schritte ausgeführt:

1. Die prozentualen Veränderungen von Periode zu Periode für Marker (z.B. d30 auf d60) werden erfasst und die prozentuale Veränderung wird berechnet (z.B. Quotient des Markers x ist 0,3 in d30 und 0,4 in d60: 0,4/0,3-1= +33%; d.h. der Marker hat sich von d30 auf d60 um 33% erhöht.)

2. Deskriptive Statistikwerte werden ermittelt um Kurtosis-Wert (K) und Schiefe-Wert (S) zu erhalten. Diese beiden Werte sind zur Berechnung des Bera-Jarque Werts erforderlich.

3. Bera-Jarque Wert Formel: BJ= (N/6)*(S^2+(K^2/4))
S=Schiefe-Wert;
K=Kurtosis-Wert;
N=Anzahl der eingegangenen Werte

4. Berechnung:

a. Die Nullhypothese besagt, dass die Daten normalverteilt sind.

b. Für NKG2D im Zusammenhang mit dem Ereignis GvHD ergibt sich, dass der Bera Jarque Wert bei 190 liegt und hiermit größer als der kritische Wert ist. Hiermit wird die Nullhypothese zurückgewiesen. Die Daten sind nicht normalverteilt.

c. Für NKG2E im Zusammenhang mit dem Ereignis GvHD ergibt sich, dass der Bera Jarque Wert bei 48,3 liegt und hiermit ebenfalls größer als der kritische Wert ist. Hiermit wird die Nullhypothese ebenfalls zurückgewiesen. Die Daten sind nicht normalverteilt.

NKG2D Normalverteilungstest

Ereignis	NKG2D Veränderung zur Vorperiode in %
GvHD	23,74
GvHD	6,04
GvHD	5,30
GvHD	4,29
GvHD	3,74
GvHD	2,02
GvHD	1,49
GvHD	0,89
GvHD	0,78
GvHD	0,55
GvHD	-0,17
GvHD	-0,17
GvHD	-0,27
GvHD	-0,29
GvHD	-0,31
GvHD	-0,43
GvHD	-0,85
GvHD	-0,92
GvHD	-0,97
GvHD	-0,97

Deskriptive Statistik NKG2D und Ereignis GvHD

Mean	2,174131009
Standard Error	1,233263255
Median	0,193007249
Mode	#N/A
Standard Deviation	5,515320943
Sample Variance	30,4187651
Kurtosis	13,424541
Skewness	3,456237423
Range	24,71372422
Minimum	-0,97286656
Maximum	23,74085766
Sum	43,48262018
Count	20

Confidence Level(95,0%)	2,581249652
	Critical
Bera Jarque	Value
190,0	5,99

NKG2E Normalverteilungstest

Ereignis	NKG 2E Veränderung zur Vorperiode in %
GvHD	39,21
GvHD	31,75
GvHD	4,52
GvHD	4,39
GvHD	3,69
GvHD	2,87
GvHD	1,46
GvHD	0,58
GvHD	-0,03
GvHD	-0,10
GvHD	-0,14
GvHD	-0,19
GvHD	-0,33
GvHD	-0,60
GvHD	-0,63
GvHD	-0,99
GvHD	-1,00
GvHD	-1,00

Deskriptive Statistik NKG 2D und Event GvHD

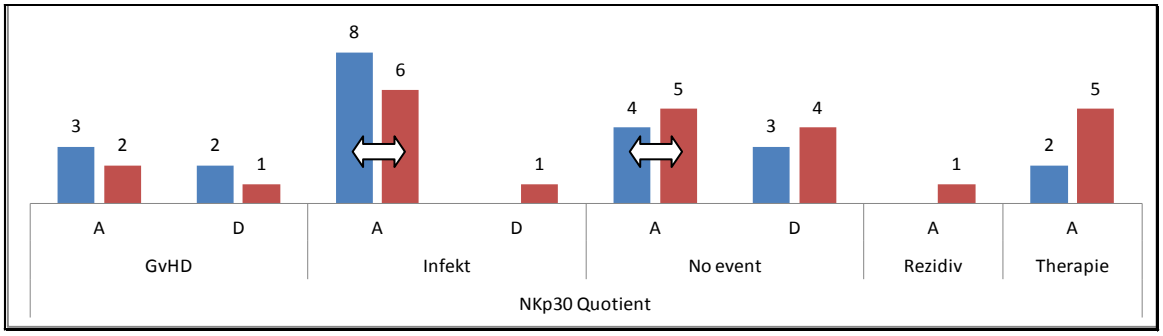
Mean	4,636566665
Standard Error	2,697518564
	-
Median	0,068065422
Mode	-1
Standard Deviation	11,44460201
Sample Variance	130,9789152
Kurtosis	6,046928573
Skewness	2,639030691
Range	40,20959742
Minimum	-1
Maximum	39,20959742
Sum	83,45819997
Count	18
Confidence Level(95,0%)	5,691266636
Bera Jarque	Critical Value
48,3	5,99

11.1.4 Ergebnis

Die zugrunde liegenden Daten sind nicht normalverteilt. Aus diesem Grund werden deskriptive Statistikwerkzeuge angewendet.

11.2 Regulation von KIR-/ NKR-Markern in Zusammenhang mit Ereignissen

NKp30 Regulation bei Überlebenden (*Alive*) versus Verstorbene (*Deceased*)

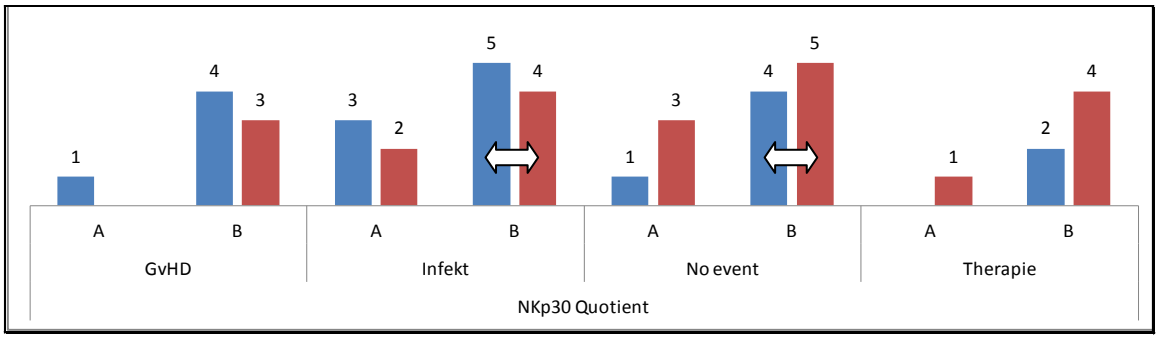


Hochregulation

Runterregulation

A = Alive
D = Deceased

NKp30 Regulation bei KIR-Haplotyp A versus KIR-Haplotyp B

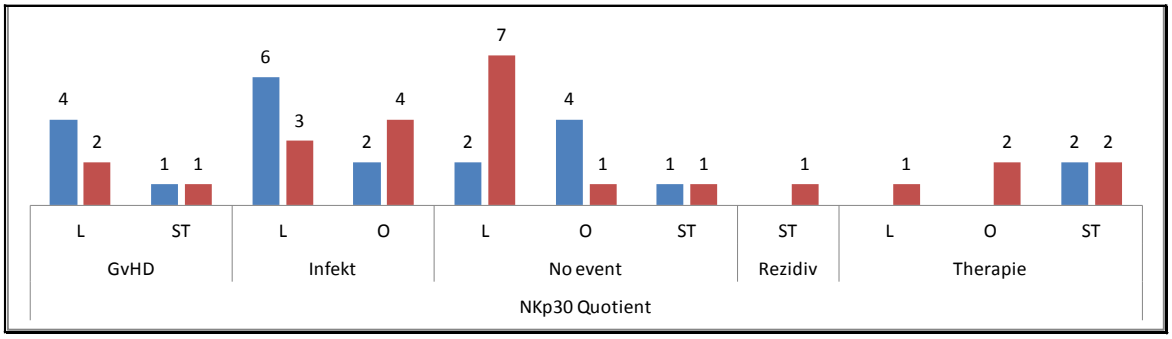


Hochregulation

Runterregulation

A = KIR-Haplotyp A
B = KIR-Haplotyp B

NKp30 Regulation bei verschiedenen Erkrankungen

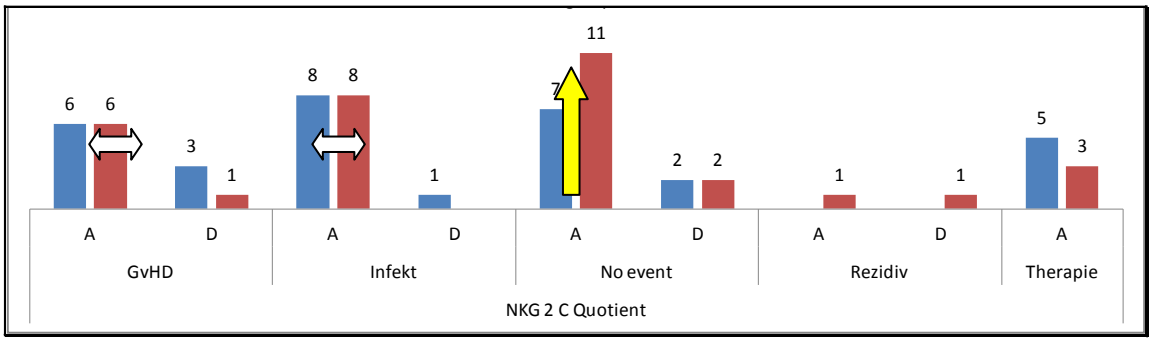


Hochregulation

Runterregulation

L = *Leukemia*
O = *Others* (Andere seltene Erkrankungen)
ST = *Solid Tumors*

NKG2C Regulation bei Überlebenden (*Alive*) versus Verstorbene (*Deceased*)

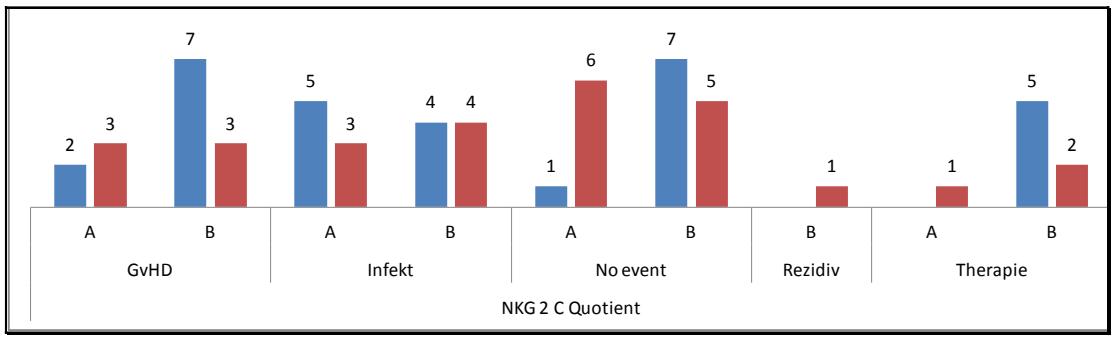


Hochregulation

Runterregulation

A = Alive
D = Deceased

NKG2C Regulation bei KIR Haplotyp A versus KIR-Haplotyp B

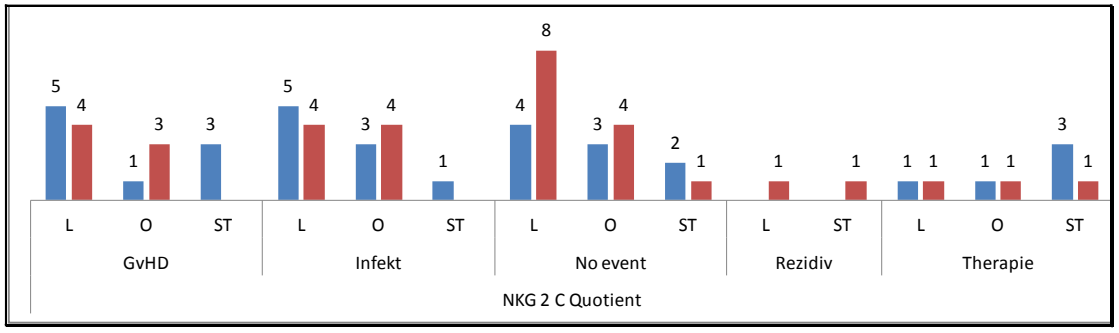


Hochregulation

Runterregulation

A = KIR-Haplotyp A
B = KIR-Haplotyp B

NKG2C Regulation bei verschiedenen Erkrankungen

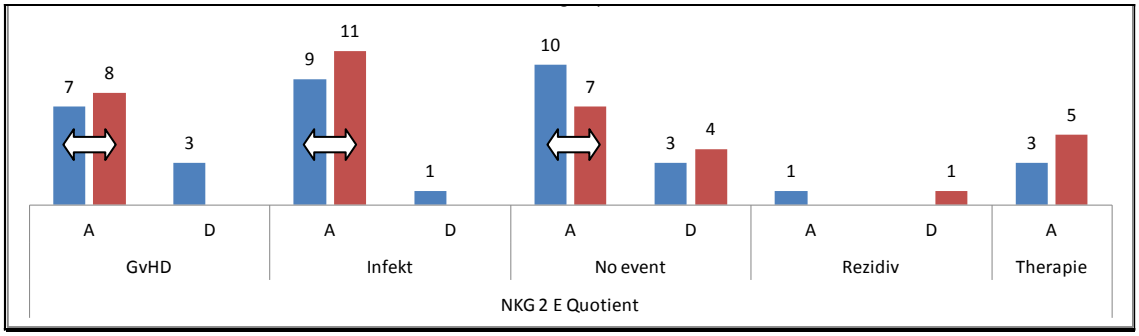


Hochregulation

Runterregulation

L = *Leukemia*
O = *Others* (Andere seltene Erkrankungen)
ST = *Solid Tumors*

NKG2E Regulation bei Überlebenden (*Alive*) versus Verstorbene (*Deceased*)

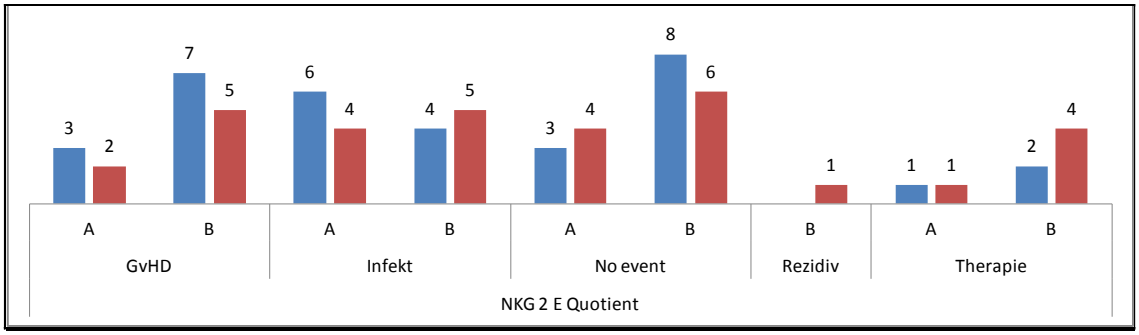


Hochregulation

Runterregulation

A = Alive
D = Deceased

NKG2E Regulation bei KIR-Haplotyp A versus KIR-Haplotyp B

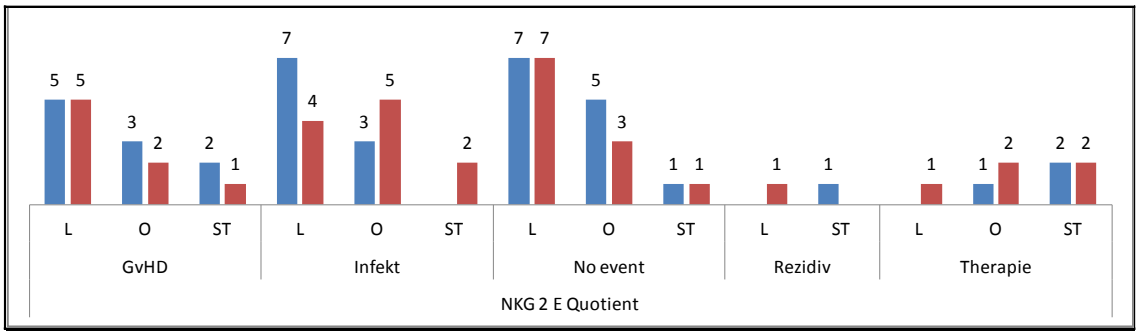


Hochregulation

Runterregulation

A = KIR-Haplotyp A
B = KIR-Haplotyp B

NKG2E Regulation bei verschiedenen Erkrankungen

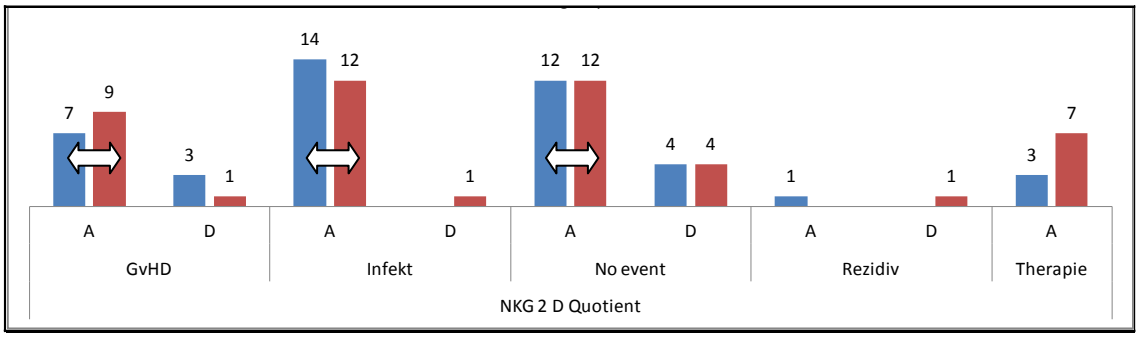


Hochregulation

Runterregulation

L = *Leukemia*
O = *Others* (Andere seltene Erkrankungen)
ST = *Solid Tumors*

NKG2D Regulation bei Überlebenden (*Alive*) versus Verstorbene (*Deceased*)

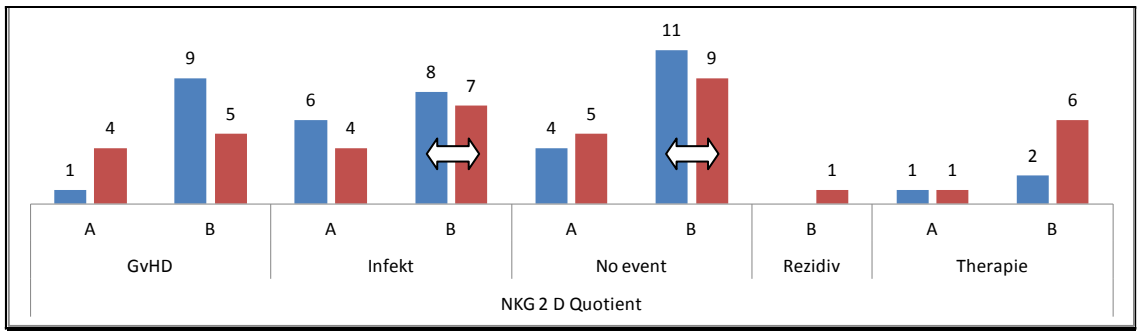


Hochregulation

Runterregulation

A = Alive
D = Deceased

NKG2D Regulation bei KIR-Haplotyp A versus KIR-Haplotyp B

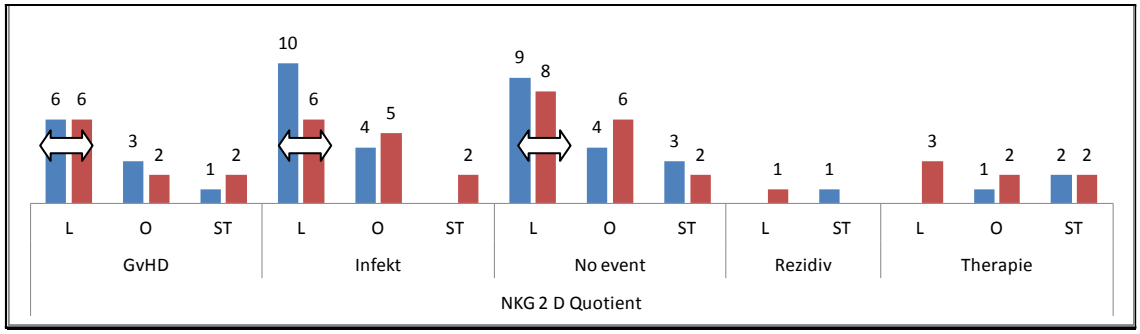


Hochregulation

Runterregulation

A = KIR-Haplotyp A
B = KIR-Haplotyp B

NKG2D Regulation bei verschiedenen Erkrankungen

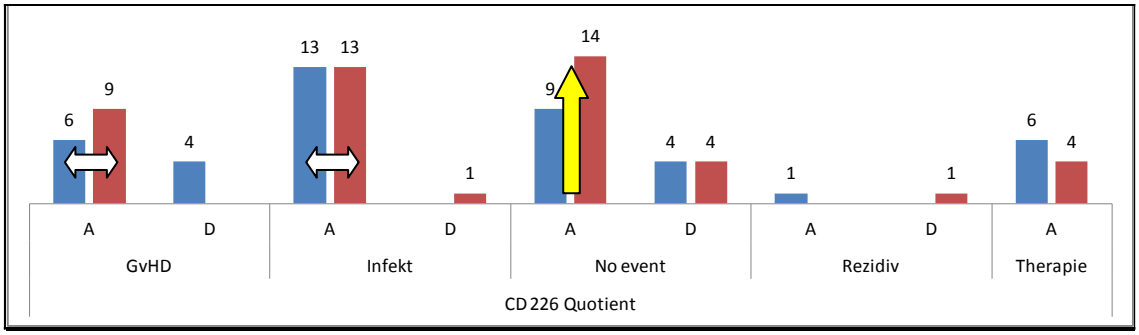


Hochregulation

Runterregulation

L = *Leukemia*
O = *Others* (Andere seltene Erkrankungen)
ST = *Solid Tumors*

CD226 Regulation bei Überlebenden (*Alive*) versus Verstorbene (*Deceased*)

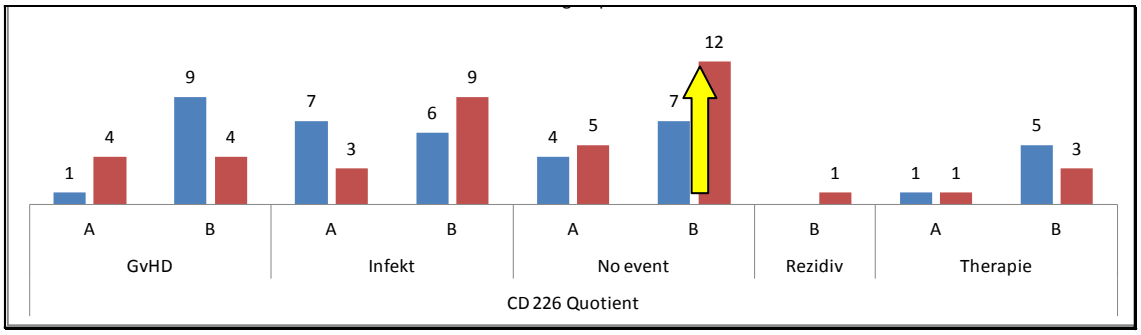


Hochregulation

Runterregulation

A = Alive
D = Deceased

CD226 Regulation bei KIR-Haplotyp A versus KIR-Haplotyp B

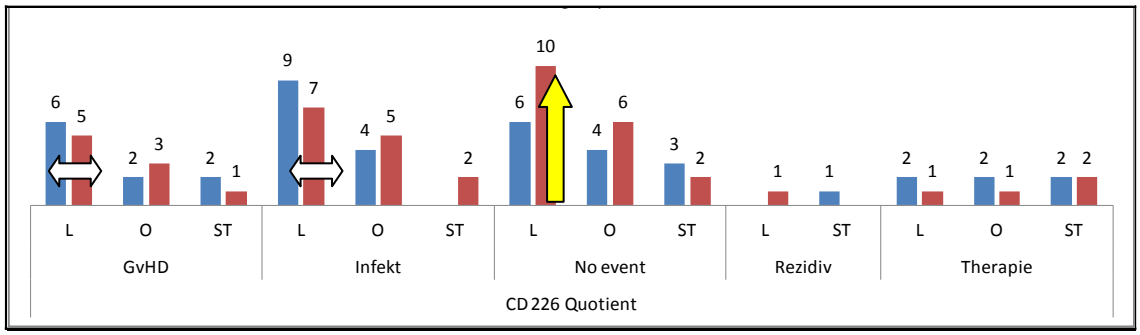


Hochregulation

Runterregulation

A = KIR-Haplotyp A
B = KIR-Haplotyp B

CD226 Regulation bei verschiedenen Erkrankungen



Hochregulation

Runterregulation

L = *Leukemia*
O = *Others* (Andere seltene Erkrankungen)
ST = *Solid Tumors*