

# **Charakterisierung von Subpopulationen Natürlicher Killerzellen des Menschen**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

**Doktorin der Naturwissenschaften**

**Dr. rer. nat.**

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Katy Wendt

geboren am 17.02.1979 in Crivitz

2006

Referent: PD Dr. hum. biol. Roland Jacobs

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Walter Müller

Tag der Promotion: 08. März 2006



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	III
Abkürzungsverzeichnis .....	V
Zusammenfassung .....	1
Abstract .....	2
1 Einleitung .....	3
1.1 Natürliche Killer Zellen .....	3
1.2 Oberflächenmoleküle auf NK-Zellen .....	3
1.2.1 NK-Zellspezifische Oberflächenrezeptoren .....	3
1.2.2 CD56 (NCAM, neural cell adhesion molecule) .....	7
1.2.3 Aktivierungsmarker auf NK-Zellen .....	7
1.3 Funktionen der NK-Zellen .....	8
1.3.1 Zytotoxizität .....	8
1.3.2 Zytokinproduktion .....	9
1.4 NK-Zellsubpopulationen .....	9
1.4.1 Entwicklung .....	11
1.5 Interleukin-21 (IL-21) und sein Rezeptor .....	12
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	12
2 Material und Methoden .....	14
2.1 Material .....	14
2.1.1 Antikörper .....	14
2.1.2 Magnetische Depletion .....	15
2.1.3 Zytokinbestimmung .....	16
2.1.4 Zytokine .....	16
2.1.5 Chemikalien .....	16
2.1.6 Primer .....	17
2.1.7 Medien .....	19
2.1.8 Expressionsanalysen .....	19
2.1.9 PCR .....	19
2.1.10 Geräte .....	20
2.1.11 Verbrauchsmaterialien .....	20
2.1.12 Software .....	21
2.2 Methoden .....	22
2.2.1 Isolation von PBMC aus humanem Vollblut .....	22

2.2.2	Zellzählung .....	22
2.2.3	Phänotypisierung.....	23
2.2.4	Nachweis intrazellulärer Zytokine.....	23
2.2.5	Sortierung von NK-Zellsubpopulationen .....	24
2.2.6	Stimulation hochreiner NK-Zellsubpopulationen .....	26
2.2.7	Affymetrix Genearrays.....	27
2.2.8	Zytokin-Array V (human) von Raybiotech .....	27
2.2.9	Cytometric Bead Array .....	29
2.2.10	Proliferationstest.....	31
2.2.11	Zytotoxizitätstest.....	32
2.2.12	Konjugatbildungsanalyse .....	33
2.2.13	Detektion phosphorylierter Proteine im FACS .....	34
2.2.14	Isolation eukaryotischer RNA.....	35
2.2.15	Prüfen der RNA-Qualität im Agilent-Bioanalyzer .....	35
2.2.16	Two Step RT-qPCR.....	37
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Expressionsanalysen auf RNA- und Proteinebene.....	41
3.1.1	Sortierung von NK-Zellsubpopulationen .....	41
3.1.2	Affymetrix Genechips .....	43
3.1.3	Oberflächenmoleküle .....	45
3.1.4	Zytolytische Moleküle .....	54
3.1.5	Zytokine/Chemokine und ihre Rezeptoren.....	55
3.2	Stimulation von NK-Zellsubpopulationen über physiologische Rezeptoren .....	63
3.2.1	KIR2DL4.....	64
3.2.2	IL-21 Rezeptor (IL-21R) .....	65
3.3	Zusätzliche Daten zur Genexpression.....	74
3.3.1	G Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPRs).....	74
3.3.2	Kinasen .....	74
3.3.3	Phosphatasen .....	76
3.3.4	Transferasen .....	77
3.3.5	RNA-Prozessierung.....	78
4	Diskussion .....	79
	Literaturverzeichnis.....	92
	Danksagung.....	107
	Erklärung zur Dissertation.....	108

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb.1 Phänotypischen und funktionelle Eigenschaften von NK-Zellsubpopulationen ....	11
Abb.2 Geräteinstellung für CBA.....	31
Abb.3 Konjugatbildungsassay.....	34
Abb.4 Reanalyse nach magnetischer Depletion und Separation im FACStar <sup>Plus</sup> .....	42
Abb.5 Korrelation der Genearraydaten eines Individuums und eines Spender-Pools ....	43
Abb.6 Anzahl der exprimierten Transkripte in ruhenden und aktivierten NK-Zellsubpopulationen.....	44
Abb.7 Analyse der CD56-Expression mittels RT-qPCR .....	46
Abb.8 Expression von KIRs in ruhenden und aktivierten CD56 <sup>dim</sup> und CD56 <sup>bright</sup> NK-Zellen .....	47
Abb.9 Validierung der KIR-Genexpression mittels RT-qPCR.....	47
Abb.10 Expression lektin-ähnlicher Rezeptoren.....	49
Abb.11 NCRs auf der Oberfläche von NK-Zellsubpopulationen.....	50
Abb.12 Adhäsionsmoleküle .....	51
Abb.13 Genexpression weiterer Oberflächenrezeptoren.....	52
Abb.14 Oberflächenexpression von CD2, CD69, CD81 und CD99R .....	53
Abb.15 Zytolytische Moleküle .....	55
Abb.16 Zytokin- und Chemokinrezeptoren .....	56
Abb.17 Zytokin-Array von RayBiotech.....	59
Abb.18 Repräsentatives Ergebniss der Zytokin-Arrays.....	60
Abb.19 Produktion von IL-8 und IL-1 $\beta$ in NK-Zellsubpopulationen.....	62
Abb.20 Kinetiken zur Genexpression von IFN $\gamma$ und TNF $\alpha$ .....	63
Abb.21 Proliferation nach Aktivierung über KIR2DL4.....	64
Abb.22 Expression des IL-21 Rezeptors .....	65
Abb.23 Regulation von Aktivierungsmarkern nach IL-2/IL-21 Behandlung.....	66
Abb.24 Proliferationsverhalten nach Stimulation mit IL-2 und/oder IL-21 .....	67
Abb.25 Zytotoxizität und Konjugatbildung in Gegenwart von IL-2/IL-21.....	69
Abb.26 Kontrollen für die STAT Expression .....	70
Abb.27 Phosphorylierung von STAT1.....	71
Abb.28 Phosphorylierung von STAT3.....	72
Abb.29 Phosphorylierung von STAT5.....	73
Abb.30 G Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	74
Abb.31 Kinasen.....	76
Abb.32 Phosphatasen.....	77

Abb.33 Transferasen .....	78
Abb.34 Moleküle, die bei der RNA-Prozessierung beteiligt sind .....	78
Abb.35 Schematische Zusammenfassung der Daten dieser Arbeit .....	91
Tab.1 Expression von Zytokin- und Chemokinliganden .....	58
Tab.2 Expression von IL-8 und IL-1 $\beta$ mRNA .....	61
Tab.3 Expression von Granzym K nach Stimulation mit IL-2/IL-21 .....	67

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
A. dest	Aqua destilata (destilliertes Wasser)
Abb.	Abbildung
ACYP	acylphosphatase
ADARB	adenosine deaminase, RNA-specific
ADCC	antibody-dependent cellular-cytotoxicity (antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität)
AK	Antikörper
ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BLC	B lymphocyte chemoattractant
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C4S-2	chondroitin 4-O-sulfotransferase 2
Ca	Kalzium
ca.	circa
CCR	chemokine (C-C motif) receptor
CD	cluster of differentiation
CHST	carbohydrate (chondroitin 6) sulfotransferase
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CTLA	cytotoxic T lymphocyte-associated protein
CXCR	chemokine (C-X-C motif) receptor
CX3CR	chemokine (C-X3-C motif) receptor
DAPK	death-associated protein kinase
DC	dendritische Zellen
DDOST	dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DUSP	dual specificity phosphatase

EBI2	Epstein-Barr virus induced gene 2 (lymphocyte-specific G protein-coupled receptor)
EDG	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
EGTA	Ethylene glycol-bis[ $\beta$ -aminoethyl ether]-N, N, N',N'-tetraacetic Acid
ENA-78	epithelial neutrophil activating peptide 78
ENPP	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase
ERK	extracellular signal-regulated kinase (extrazelluläre signal-regulierte Kinase)
FACS	fluorescence-activated cell sorter (Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer)
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FGF	fibroblast growth factor
FL	Fluoreszenz
Flt3	Fms-related tyrosine kinase
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward light scatter (Vorwärtsstreulicht)
FUT	fucosyltransferase
g	Gramm
GCP	granulocyte chemotactic protein
GCSF	granulocyte colony-stimulating factor
GDNF	glial cell line-derived growth factor
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor (Granulozyten/Makrophagen koloniestimulierender Faktor)
GPR	G Protein-coupled receptor
GPRK	G protein-coupled receptor kinase
GRO	growth regulated protein
Gy	Gray (1 rad = 0,01 Gy)
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HGF	hepatocyte growth factor
HPRT	hypoxanthine phosphoribosyltransferase
ICAM	intercellular adhesion molecule
iDC	unreife dendritische Zelle
IFN	Interferon

Ig	Immunglobulin
IGF	insulin-like growth factor
IGFBP	insulin-like growth factor binding protein
IL	Interleukin
ILT	immunoglobulin-like transcript
Iono	Ionomycin
IP-10	$\gamma$ -Interferon inducible protein 10
ITAM	immunoreceptor-based tyrosine inhibition motif
ITK	IL2-inducible T-cell kinase
JAK	Janus-Kinase
JNK	c-Jun aminoterminal Kinase
kDa	Kilo-Dalton
KIR	killer cell Ig-like receptor
KLR	killer cell lectin-like receptor
l	Liter
LCK	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LIF	leukocyte inhibitory factor
LIGHT	s. TNFSF14
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	magnetic activated cell sorter (magnetisch aktivierter Zellsortierer)
MCP	monocyte chemoattractant protein
MCSF	macrophage colony stimulating factor
MDC	macrophage derived chemokine
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitäts- komplex)
MIG	monokine-induced by interferon $\gamma$
min	Minuten
MIP	macrophage inflammatory protein
MKNK	MAP kinase-interacting serine/threonine kinase
MKPX	mitogen-activated protein kinase phosphatase x
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
NaCl	Natriumchlorid
NAP	neutrophil activating protein
NT	neurotrophin

NTC	no template control
NCAM	neural cell adhesion molecule (Nervenzell-Adhäsionsmolekül)
NCR	natural cytotoxicity receptor
neg	negativ
ng	Nanogramm
NK	natural killer (Natürliche Killer)
PARC	pulmonary and activation-regulated chemokine
PBL	peripheral blood lymphocytes (periphere Blutlymphozyten)
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (periphere mononukleäre Blutzellen)
PBS	Phosphate buffered saline (Posphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PDXK	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase
PE	Phycoerythrin
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
pg	Picogramm
PHA	Phytohämagglutinin
PKC	protein kinase C
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
pos	positiv
PP	pyrophosphatase
PPP2R5C	protein phosphatase 2, regulatory subunit B
PRKCB	protein kinase C, beta
PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
R	Region
R10	10%-iges FCS-Medium
RANKL	receptor activator of NF $\kappa$ B ligand
RANTES	regulated upon activation normal T cell express sequence
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	reverse Transkription-quantitative PCR
SAT	spermidine/spermine N1-acetyltransferase
SCF	stem cell factor
SDF	stromal cell derived factor
SDFR	stromal cell derived factor receptor
SDS	Sodium dodecyl sulfate

SEM	standarderror of the mean (Standardabweichung des Mittelwertes)
SFRS	splicing factor, arginine/serine-rich
SIAT4C	sialyltransferase 4C (beta-galactoside alpha-2,3-sialytransferase)
SSC	Sideward light scatter (Seitwärtsstreulicht)
STAT	signal transducer and activator of transcription
Tab	Tabelle
TARC	thymus and activation regulated chemokine
TCR	T cell receptor
TGF	transforming growth factor
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
TIE	tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFRSF	TNF ligand
TNFSF	TNF ligand superfamily member
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TOPK	T-LAK cell-originated protein kinase
U/ml	Units pro Milliliter
VEGF	vascular endothelial growth factor
ZS	Zellsuspension
$\alpha$	alpha
$\beta$	beta
$\gamma$	gamma
$\varepsilon$	epsilon
$\zeta$	zeta

## Zusammenfassung

Natürliche Killerzellen sind wichtige Effektoren der angeborenen Immunität, da sie die Fähigkeit besitzen, Tumorzellen oder virus-infizierte Zellen ohne vorherige Sensibilisierung töten zu können. Aufgrund der Produktion einer Reihe von Zytokinen und Chemokinen wie  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$  und GM-CSF nehmen sie auch Einfluss auf die adaptive Immunantwort sowie die Hämatopoese. Phänotypisch lassen sich NK-Zellen durch die Expression von CD56 bei Abwesenheit von CD3 von den T-Zellen unterscheiden. Die Dichte des CD56-Moleküls ermöglicht die Diskriminierung zweier Subpopulationen:  $\text{CD56}^{\text{dim}}$  und  $\text{CD56}^{\text{bright}}$  NK-Zellen, wobei erstere „klassische“ NK-Zellen mit hoher Zytotoxizität darstellen und letztere geringe zytotoxische Eigenschaften besitzen, aber potente Zytokinproduzenten sind.

Zur weiteren Charakterisierung dieser beiden NK-Zellsubpopulationen wurden  $\text{CD56}^{\text{dim}}$  und  $\text{CD56}^{\text{bright}}$  mittels FACS gestützter Sortierung in hochreine Fraktionen aufgetrennt und ihre RNA mit Genearrays von Affymetrix analysiert. Sowohl ruhende als auch aktivierte  $\text{CD56}^{\text{dim}}$  und  $\text{CD56}^{\text{bright}}$  NK-Zellen unterschieden sich signifikant in einer Reihe von Transkripten. Es konnten eigene und bereits publizierte Proteindaten z.B. bezüglich der KIRs, KLRs, CD16 und zytolytischen Moleküle bestätigt sowie im Kontext mit NK-Zellen bislang unbekannte Rezeptoren (CD99R, CD103) identifiziert werden. Die Expression von CCR7, CXCR3 und CD62L prädestiniert die  $\text{CD56}^{\text{bright}}$  NK-Zellen in Lymphknoten zu wandern, während beide Subpopulationen mit Rezeptoren ausgestattet sind, die ihre Migration in entzündliche Gewebe ermöglichen. Die Überstände aufgereinigter und anschließend aktivierter  $\text{CD56}^{\text{dim}}$  und  $\text{CD56}^{\text{bright}}$  NK-Zellen wurden mit Zytokin-Arrays analysiert, die die Sekretion von 79 Zytokinen/Chemokinen detektieren konnten. Zum einen konnte die Produktion von  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{MIP1}\alpha$  etc. bestätigt werden, zum anderen wurden Chemokine gefunden, deren Sekretion durch NK-Zellen zuvor nicht bekannt war.  $\text{TGF-}\beta 2$ ,  $\text{TGF-}\beta 3$  und CCL18 wurden vornehmlich von  $\text{CD56}^{\text{bright}}$  NK-Zellen ausgeschieden, die dadurch immunregulatorische Funktionen übernehmen könnten.  $\text{CD56}^{\text{dim}}$  NK-Zellen produzierten v. a. Mediatoren, die auch direkte antimikrobielle Aufgaben übernehmen können wie  $\text{MIP1}\alpha$ ,  $\text{MIP-1}\beta$ , RANTES oder CXCL8.

Trotz vergleichbarer Dichte des IL-21R auf  $\text{CD56}^{\text{dim}}$  und  $\text{CD56}^{\text{bright}}$  NK-Zellen wurden nach Stimulation mit IL-21 und/oder IL-2 Aktivierungsmarker, aber auch Effektorfunktionen der beiden Subpopulationen unterschiedlich reguliert.

Damit konnten in dieser Arbeit neue Aspekte hinsichtlich  $\text{CD56}^{\text{dim}}$  und  $\text{CD56}^{\text{bright}}$  NK-Zellen demonstriert werden, die unterstreichen, dass es sich bei ihnen um funktionell unterschiedliche Subpopulationen handelt.

**Schlagnworte:** NK-Zellsubpopulationen, Mensch, Zytokine

## Abstract

Natural killer cells represent important effectors of the innate immune system. They are able to lyse virus-infected and tumor cells without prior sensitization. Despite their cytotoxic functions they produce various cytokines and chemokines including IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  and GM-CSF thus regulating the adaptive immune response and hematopoiesis. NK cells phenotypically differ from T cells by the expression of CD56 in absence of CD3. Due to the expression density of CD56 two NK cell subsets can be distinguished: CD56<sup>dim</sup> representing “classical” NK cells with high cytotoxic potential and CD56<sup>bright</sup> which are more potent in producing cytokines and chemokines.

To further characterize these NK cell subsets gene array experiments using sorted resting and activated CD56<sup>dim</sup> and CD56<sup>bright</sup> were performed revealing distinct expression pattern in both subsets. Data as assessed before on the protein level were confirmed like expression of KIR, KLRs, CD16, and cytolytic molecules. In addition receptors not described on NK cells so far e.g. CD99R or CD103 were identified. The surface expression of CCR7, CXCR3, and CD62L by CD56<sup>bright</sup> NK cells enables this subset to migrate into lymph nodes. In contrast, molecules needed for migration into inflamed tissues were detected on both NK cell subsets to a similar degree.

For functional analyses, the supernatants of activated CD56<sup>dim</sup> and CD56<sup>bright</sup> were investigated using a cytokine array covering 79 cytokines and chemokines. In this approach the production of IFN $\gamma$  or MIP1 $\alpha$  was confirmed and proteins prior not known to be secreted by NK cells were found. Immunoregulatory mediators TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 and CCL18 were predominantly produced by CD56<sup>bright</sup> NK cells whereas CD56<sup>dim</sup> mainly secreted MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES and IL-8 which can exert direct antimicrobial effects. Gene array and FACS analyses revealed comparable expression of IL-21R on both NK cell subsets. But incubation with IL-21 and/or IL-2 differently affected phenotype and function of CD56<sup>dim</sup> and CD56<sup>bright</sup>, respectively.

This study demonstrates novel characteristic features of CD56<sup>dim</sup> and CD56<sup>bright</sup> NK cells further confirming that they represent functionally distinct NK cell subsets.

**Keywords:** NK cell subsets, human, cytokines

# 1 Einleitung

## 1.1 Natürliche Killer Zellen

Die Natürlichen Killer (NK-) Zellen verdanken ihren Namen der Fähigkeit virusinfizierte- oder maligne transformierte Zellen ohne vorherige Sensibilisierung und nicht MHC-restringiert abzutöten [1,2]. Damit sind sie wichtige Effektoren der angeborenen Immunität, bei der im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem kein „immunologisches Gedächtnis“ induziert wird. Die NK-Zellen diverser Säuger-Spezies unterscheiden sich trotz funktioneller Gemeinsamkeiten beispielsweise bezüglich ihrer Rezeptorrepertoires. Daher bezieht sich die folgende Charakterisierung auf NK-Zellen des Menschen. Morphologisch werden die NK-Zellen als große granuläre Lymphozyten (large granular lymphocytes, LGL) beschrieben, die sich phänotypisch durch die Abwesenheit von CD3 bei gleichzeitiger Expression von CD56 (NCAM) von den B- und vor allem den T-Zellen unterscheiden lassen [3]. Fast alle NK-Zellen exprimieren den Fc $\gamma$ -Rezeptor III (CD16), über den die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (antibody-dependent cellular-cytotoxicity, ADCC) vermittelt wird. Humanes CD16 interagiert mit Homo- und Heterodimeren von Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$  und CD3 $\zeta$ . Desweiteren sind Marker aus der T-Zellreihe wie CD2 und teilweise CD8 (in geringer Dichte) sowie CD11a, CD11b und CD18 auf NK-Zellen zu finden [4-6].

Im Blut gesunder Individuen stellen die NK-Zellen ca. 10-15% der Lymphozytenpopulation dar. Unter bestimmten Bedingungen z.B. als Reaktion auf ein Stressereignis oder in der Frühphase der Rekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation kann ihr Anteil temporär allerdings dramatisch ansteigen [7,8].

## 1.2 Oberflächenmoleküle auf NK-Zellen

### 1.2.1 NK-Zellspezifische Oberflächenrezeptoren

Neben den erwähnten Oberflächenrezeptoren exprimieren NK-Zellen weitere Moleküle die für die Regulation ihrer Funktionen notwendig sind.

#### 1.2.1.1 Immunglobulinähnliche Rezeptoren (KIRs und ILTs)

Die Funktion der NK-Zellen wird über das Gleichgewicht von Signalen aktivierender und inhibierender Rezeptoren gesteuert. Eine wichtige Rolle spielen dabei killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs), die MHC-I-Moleküle (HLA-A, -B, -C, -G) [9-11] und killer cell lectin-like receptors (KLR wie CD94/NKG2A), die nicht-klassisches MHC-I (z.B.

HLA-E) erkennen [12,13]. Jede NK-Zelle besitzt ein individuelles Expressionsmuster, bei dem meist 3-6 der KIRs auf der Oberfläche zu finden sind, die die entsprechenden HLA-Allele erkennen. Die Nomenklatur der KIRs richtet sich nach ihrer Proteinstruktur. Es können 4 Untergruppen definiert werden und zwar zwei nach der Anzahl der extrazellulären Domänen (2D oder 3D) und zwei anhand der Charakteristik des zytoplasmatischen Anteils (L=long, S=short). Mittlerweile werden die KIRs, bedingt durch ihre Lage auf dem Chromosom, in die CD-Nomenklatur eingefügt (CD158a, CD158b, etc.) wodurch nicht mehr auf Funktion oder Struktur geschlossen werden kann.

Rezeptoren mit einem langen zytoplasmatischen Anteil wie z.B. KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1 enthalten 1-2 sogenannte ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs), deren Phosphorylierung in der Assoziation mit SHP (src-homology domain-bearing tyrosine phosphatase) endet und damit spezifisch die Proteine der Aktivierungskaskade inhibiert. Die aktivierenden KIRs wie KIR2DS1, KIR2DS2 oder KIR3DS1 besitzen einen kurzen zytoplasmatischen Anteil und können allein keine Signale in die Zelle leiten. Sie sind über positiv geladene Aminosäuren (Arginin oder Lysin) in ihrer transmembranären Domäne mit dem Adaptermolekül KARAP/DAP12 assoziiert, das ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activating motif) trägt [14]. Nach Vernetzung kommt es zur Phosphorylierung von DAP12, zur Rekrutierung von ZAP70/Syk Kinase und letztendlich zur Induktion einer zellaktivierenden Signalkaskade [15].

Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass die aktivierenden Isoformen durch Mutation von 5-7 Nukleotiden aus einem gemeinsamen Vorfahren, einem inhibierenden Rezeptor, hervorgegangen sind, wobei sich die Struktur hinsichtlich der Transmembranregion und des zytoplasmatischen Anteils änderte. Weitere aktivierende Formen sind dann durch Rekombination und Duplikation entstanden. Die aktivierenden Isoformen sind evolutionär eher kurzlebig: sie entstehen periodisch, gehen verloren und werden wieder entdeckt, als dass sie durch strenge Selektion bewahrt werden. Die geringere Verbreitung der aktivierenden KIRs in der menschlichen Bevölkerung stützt diese Theorie [16].

Die KIRs binden spezifisch an ihre Liganden, bei denen es sich hauptsächlich um klassische MHC-I Moleküle handelt. Bei einigen Isoformen (z.B. KIR2DL1/DS1 und KIR2DL2/DS2) besitzen beide die gleiche Spezifität, wobei die Affinität des inhibierenden Rezeptors höher ist als die des aktivierenden [17]. Es werden also gesunde Zellen, die MHC-I exprimieren, vor der spontanen Lyse durch NK-Zellen geschützt, da ein dominierendes inhibierendes Signal in die NK-Zelle vermittelt wird. Durch Virusinfektion oder maligne Transformation kommt es häufig zum Verlust oder einer Verminderung von MHC-I auf der betroffenen Zelle, wodurch die T-Zellantwort geschwächt werden kann, aber die NK-Zellen nicht mehr ausreichend Inhibition erfahren und dann aktiviert sind

(„missing-self hypothesis“) [18]. Zusätzlich kann es auf bestimmten Zielzellen zu einer gesteigerten Expression der Liganden (z.B. MICA) aktivierender Rezeptoren (z.B. NKG2D) kommen, deren Signale zur Lyse der Targetzelle durch die NK-Zelle führen (1.2.1.2).

KIR2DL4 (CD158d, p49) das innerhalb der KIR-Familie eine Ausnahme darstellt, wird von allen NK-Zellklonen exprimiert [19,20]. Er besitzt zwei extrazelluläre Domänen mit der unüblichen D0-D2 Konfiguration, d.h. die bei anderen Rezeptoren dieser Familie dazwischen liegende D1-Domäne fehlt bei KIR2DL4 [21]. Der lange zytoplasmatische Anteil trägt ein ITIM, das ein charakteristisches Merkmal der inhibitorischen KIRs ist. Zusätzlich befindet sich eine positiv geladene Aminosäure (Arginin) in der Transmembranregion. Im Gegensatz zu anderen aktivierenden Rezeptoren der KIR-Familie, die mit DAP12 assoziieren, interagiert KIR2DL4 selektiv mit  $Fc\epsilon R1\gamma$  [22]. Damit erhält KIR2DL4 auch das Potential, aktivierende Signale in die Zelle zu senden, wenn er an den bislang einzigen bekannten Liganden HLA-G bindet [23]. HLA-G wird auf Trophoblasten, die in die Decidua wandern, aktivierten Monozyten, Thymusepithelzellen und bestimmten Tumorzellen exprimiert. In Abhängigkeit von der Transmembranregion wird über den KIR2DL4 in ruhenden NK-Zellen zwar die Produktion von  $IFN\gamma$ , jedoch nicht die Zytotoxizität gesteigert [24,25]. Im Gegensatz zur Aktivierung der  $IFN\gamma$ -Produktion über CD16 wird downstream nicht der ERK-Signalweg, sondern der p38 MAP-Kinase Signalweg in Gang gesetzt. Anders verhält es sich in NK-Zellen, die bereits mit IL-2 voraktiviert sind, bei denen neben der  $IFN\gamma$ -Produktion auch die Zytotoxizität gesteigert wird [24]. Das ITIM des KIR2DL4 ist ebenfalls funktionell aktiv. Durch Binden von SHP-2 vermittelt es die Inhibition der natürlichen Zytotoxizität dieser Zellen [26,27]. Die Bindungsfähigkeit bleibt auch nach Mutation des Tyrosins in abgeschwächter Form erhalten [27]. Auf welche Art und Weise die signalgebenden Elemente von KIR2DL4 reguliert werden, ist jedoch noch nicht bekannt. Die Expression und Funktion des Rezeptors wird durch den Genotyp bestimmt. Durch Deletion eines Adenins entstehen verschiedene Spleißvarianten, von denen eine mRNA ein Protein mit verkürztem zytoplasmatischen Anteil und die andere keine Transmembranregion kodiert, die für die Expression wichtig ist. Individuen, die homozygot für das 9A Allel sind, exprimieren KIR2DL4 nur schwach oder meist gar nicht [28-30].

Mit den KIRs genetisch und strukturell verwandt sind die ILTs (immunoglobulin-like transkript) oder auch LIRs (leukocyte inhibitory receptor) [31,32]. Sie interagieren mit HLA-I und können die Immunantwort über Inhibition oder Aktivierung der Zytotoxizität regulieren [33,34]. Die Art der Antwort hängt auch hier von der Struktur der zytoplasmatischen Domäne ab, die entweder lang ist und ein ITIM trägt oder kurz und

der Rezeptor dann mit einem ITAM-tragendem Molekül assoziiert. Es sind noch nicht viele Liganden der ILTs beschrieben, aber der inhibierende Rezeptor ILT2 erkennt beispielsweise HLA-I und CMV-UL18 [35,36].

### 1.2.1.2 Lektinähnliche Rezeptoren (killer cell lectin-like receptors, KLRs)

Zu der Familie der KLRs gehören die Heterodimere aus CD94/NKG2 Molekülen. Welche Funktion sie ausführen, hängt von dem interagierenden NKG2-Molekül ab. So tragen NKG2A und NKG2B intrazelluläre ITIMs und vermitteln daher inhibierende Signale, während NKG2C, NKG2E und NKG2H mit DAP12 assoziieren und die Zelle zu aktivieren vermögen [37].

NKG2D stellt eine Ausnahme innerhalb der NKG2-Familie dar. Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern dieser Familie bildet es kein Heterodimer mit CD94, sondern interagiert als Homodimer mit DAP10. Von dieser Assoziation hängen sowohl die Expression als auch die Signalgebung von NKG2D ab [38]. Im Gegensatz zu DAP12 trägt DAP10 kein ITAM in seinem zytoplasmatischen Anteil, sondern eine SH2-Bindungsstelle für die regulatorische p85 Untereinheit der Phosphatidylinositol (PI)3-Kinase sowie das Signalmolekül Grb2 [39]. Zu den Liganden von NKG2D gehören die eng verwandten durch Stress induzierten Moleküle MIC (MHC class I chain-related) A und B, die im MHC Komplex kodiert sind. Sie sind u.a. auf epithelialen Tumoren wie Brust-, Darm- und Nierenkrebs und von HCMV-infizierten (humanes Cytomegalievirus) Zellen nachweisbar [40]. Weitere Liganden sind die GPI-verankerten UL16-bindenden Proteine (ULBP), die von virusinfizierten Zellen exprimiert werden. Die Interaktion von ULBP mit NKG2D induziert Zytokin- und Chemokinproduktion ( $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{MIP-1}\beta$ ) von NK-Zellen und steigert deren Zytotoxizität [41,42].

Beide oben genannten Rezeptortypen (KIRs und KLRs) sind nicht ausschließlich auf NK-Zellen zu finden, sondern werden auch von einigen T-Zellen exprimiert und übernehmen dort ebenfalls regulatorische Funktionen.

### 1.2.1.3 NCRs und weitere aktivierende Rezeptoren auf NK-Zellen

Zu den aktivierenden Rezeptoren auf NK-Zellen gehören die natural cytotoxicity receptors (NCRs) NKp30 (CD337), NKp44 (CD334), NKp46 (CD335) [43] sowie NTB-A [44] und CS1 [45]. Die NKps sind ebenso wie KIRs Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie aber ihre Expression ist ausschließlich auf NK-Zellen beschränkt. Sie assoziieren mit verschiedenen Adaptermolekülen: NKp30 und NKp46 mit  $\text{CD3}\zeta$  Heterodimeren, NKp46 zusätzlich mit  $\text{CD3}\zeta$ - $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\gamma$  Heterodimeren sowie NKp44 mit DAP12 Homodimeren [43]. Die Liganden der NCRs sind noch weitgehend unbekannt.

Allerdings binden NKp44 und NKp46 in vitro an Hämagglutinin von Influenza und Sendai Virus [46,47]. Außerdem ist das pp65 des HCMV kürzlich als Ligand für NKp30 beschrieben worden [48].

Weitere aktivierende Rezeptoren sind NKp80 aus der KLR-Familie und 2B4 (CD244), das ebenfalls Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie ist. Beide übernehmen eher die Funktion von Korezeptoren bzw. modulierenden („triggernden“) Rezeptoren. Nach Aktivierung mit einem zweiten aktivierenden Rezeptor sind sie in der Lage die Zytotoxizität der NK-Zellen zu steigern [43,49,50].

### **1.2.2 CD56 (NCAM, neural cell adhesion molecule)**

CD56 (NCAM) ist ein membranständiges Glykoprotein, das der Immunglobulin-Superfamilie angehört. Von diesem Molekül werden unterschiedliche Isoformen auf Nerven- und Muskelzellen, eine aber auch auf NK- und T-Zellen exprimiert. Auf Lymphozyten ist die 140kDa-Isoform zu finden [51]. Während es die homophile (CD56 bindet an CD56) Adhäsion zwischen Nerven- und Muskelzellen vermittelt, ist seine genaue Funktion auf NK-Zellen noch weitgehend unbekannt. Es gibt keinen Nachweis eines effektiveren Bindens an CD56<sup>+</sup> Zielzellen und eine Kreuzvernetzung des Rezeptors mittels monoklonaler Antikörper hat keinerlei Einfluss auf den Aktivierungszustand der Zellen [51].

### **1.2.3 Aktivierungsmarker auf NK-Zellen**

#### **1.2.3.1 CD25 (IL-2 Rezeptor $\gamma$ -Kette)**

CD25 ist ein membrangebundenes Glykoprotein, das als  $\alpha$ -Kette Teil des IL-2 Rezeptorkomplexes ist. Während ruhende NK-Zellen die  $\beta$ - (CD122) und  $\gamma$ -Kette (CD132) des IL-2-Rezeptors exprimieren, erscheint CD25 erst nach Aktivierung auf der Zelloberfläche. Zusammen bilden diese drei Ketten den hochaffinen IL-2-Rezeptor. Stimulation mit IL-2 steigert die Zytotoxizität und die Proliferation von NK-Zellen [4]. Damit ist CD25 ein Marker für den Aktivierungszustand der Zellen.

#### **1.2.3.2 CD69 (Early Activation Antigen)**

CD69 ist ein Antigen, das sehr schnell nach Aktivierung auf Lymphozyten exprimiert wird. Es handelt sich um ein disulfidgebundenes Homodimer aus der Familie der C-Typ Lektin-Superfamilie. Kreuzvernetzung von CD69 induziert NK-Zellproliferation und steigert deren zytolytische Aktivität [52].

## 1.3 Funktionen der NK-Zellen

### 1.3.1 Zytotoxizität

Die zytolytische Aktivität der NK-Zellen wird durch die Balance aktivierender und inhibierender Rezeptoren reguliert. Solange die inhibitorischen Signale überwiegen, bleibt die Zelle inaktiv. Werden aber verstärkt aktivierende Rezeptoren stimuliert, startet das zytolytische Programm. Die beiden Hauptmechanismen, die von NK-Zellen zur Eliminierung von Zielzellen genutzt werden, sind ADCC und natürliche Zytotoxizität. Bei der ADCC werden mit Antikörpern opsonierte Zellen über CD16 gebunden, wodurch ihre Aktivierung erfolgt. Dabei spielt die  $\zeta$ -Kette für die Signalgebung eine essentielle Rolle, ist jedoch für den Start der natürlichen Zytotoxizität entbehrlich [53]. Außerdem können NK-Zellen über eine Reihe von Rezeptoren zur Apoptose ihrer Zielzellen führen.

Prinzipiell nutzen beide die gleichen Mechanismen, um die Lyse der Zielzellen einzuleiten. Ein entscheidender Schritt zur erfolgreichen Lyse ist die Bindung der Effektor- an ihre Zielzelle (Konjugatbildung). Sie wird bei NK-Zellen vor allem über LFA-1 (CD11a/CD18) vermittelt, das ICAM1, ICAM2 und ICAM3 auf den Zielzellen bindet [6]. Weiterhin können Moleküle wie CD2, CD44, CD58 und CD69 in unterschiedlichem Umfang zur Zellbindung beitragen [4,52,54]. Durch die Rezeptor/Ligand Interaktion bildet sich eine räumlich begrenzte Kontaktstelle, die sog. immunologische Synapse [55]. In diesem Bereich kommt es, offensichtlich durch LFA-1 vermittelt, zur Polarisierung der lytischen Granula, mit anschließender gezielter Degranulation, die die Zerstörung der Zielzelle zur Folge hat [56]. Perforin und Granzyme sind die bekanntesten Inhaltsstoffe dieser Granula, die von NK-Zellen konstitutiv exprimiert und gespeichert werden, in T-Zellen dagegen zunächst induziert werden müssen [57]. Perforin kann in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen von seinem monomeren in einen amphiphilen, polymeren Zustand übergehen. Die Polymere formen Löcher in der Membran der Zielzelle, wodurch die Integrität der Zelle nicht mehr aufrechterhalten werden kann und das Eindringen der Granzyme ermöglicht wird [58]. Granzyme sind Serinproteinasen, die durch Binden an Einzelstrang-DNA (Granzym A) oder Schneiden der Kaspase (Granzym B) zur Apoptose der Zellen führen [59,60]. In geringerem Maße wird Granzym K exprimiert, das als trypsin-ähnliches Granzym eng mit Granzym A verwandt ist [59,60] und dessen Funktionen in Knock-out (KO)-Mäusen übernehmen kann [61].

Im Anschluss an die Lyse des Targets können die NK-Zellen weitere Zellen attackieren. Welche Mechanismen die NK-Zellen vor der eigenen Lyse schützen, ist noch nicht ausreichend geklärt. Zum einen begrenzt die Bildung der immunologischen Synapse die Ausschüttung der Granula und verhindert dadurch die selbstvermittelte Lyse, zum

anderen wird Perforin durch Cathepsin B geschnitten und Proteinaseinhibitoren (Serpine) bieten der Effektorzelle Schutz vor Granzym B [62,63].

NK-Zellen besitzen noch eine Reihe alternativer Wege, die Lyse von Zielzellen zu induzieren. Nach Aktivierung exprimieren NK-Zellen Fas-Ligand (CD95L), das bei CD95<sup>+</sup> Zielzellen eine Kaskade endogener proteolytischer Enzyme startet, die zum apoptotischen Tod der Zielzellen führt [64]. Außerdem tragen NK-Zellen auf der Oberfläche TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), das über TRAIL-Rezeptoren auf den Targetzellen ebenfalls deren apoptotischen Tod verursacht [65].

### 1.3.2 Zytokinproduktion

Zusätzlich zu ihren zytotoxischen Funktionen sind NK-Zellen in der Lage, eine Vielzahl immunologischer Mediatoren zu bilden. Nach Aktivierung können Zytokine wie Interferon (IFN) $\gamma$ , Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) $\alpha$ , „granulocyte/macrophage-colony stimulating factor“ (GM-CSF) oder Interleukin (IL-)10, aber auch Chemokine wie „macrophage inflammatory protein“ (MIP1) $\alpha$ , MIP1 $\beta$  und IL-8 produzieren [1,66-70]. NK-Zellen sind also in der Lage sowohl Immunantworten, als auch die Hämatopoese zu regulieren und spielen auf diese Weise auch eine wichtige Rolle bei der adaptiven Immunität.

## 1.4 NK-Zellsubpopulationen

Zunächst wurden die NK-Zellen meist als eine homogene Gruppe eingeschätzt. Diese Sicht hat sich geändert und man geht jetzt davon aus, dass sich das NK-Zellkompartiment aus funktionellen Untergruppen zusammensetzt. Die unterschiedliche Expression des CD56-Moleküls erlaubt die phänotypische Unterscheidung von zwei Subpopulationen. NK-Zellen mit niedriger CD56-Expression werden als CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen und die mit hoher als CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen bezeichnet. Im peripheren Blut machen die CD56<sup>dim</sup> ca. 90% aller NK-Zellen aus. Dieses Verhältnis kehrt sich in den Lymphknoten und Tonsillen um, wo der Großteil NK-Zellen den CD56<sup>bright</sup> Phänotyp aufweist [71,72].

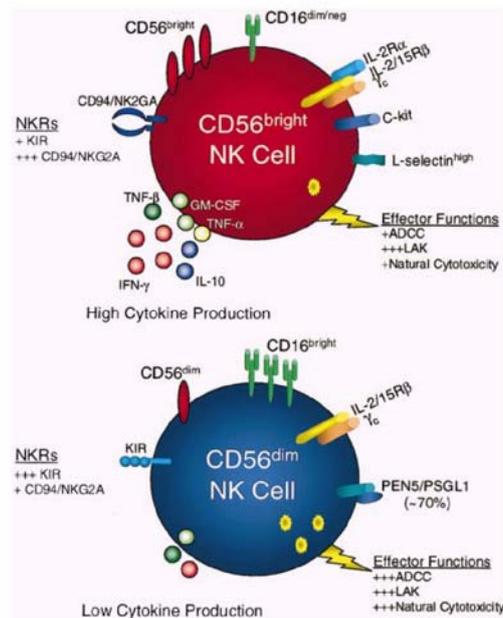
Beide Subpopulationen unterscheiden sich in der Expression weiterer Moleküle. Während CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen CD16 in hoher Dichte auf der Oberfläche tragen, wird es von CD56<sup>bright</sup> nur in geringer Dichte oder gar nicht exprimiert. KIRs wie CD158a, CD158b und NKB1 sind fast ausschließlich auf der Oberfläche von CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen zu finden. KLRs wie CD94/NKG2 und CD161 sind zwar auf beiden Subpopulationen nachweisbar, ersteres ist aber in höherer Dichte auf den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimiert [73]. Außerdem tragen CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen Moleküle auf der Oberfläche, die für die

Migration in die Lymphknoten benötigt werden, wie z.B. CD62L (L-Selektin) und CCR7 [74,75].

Weiterhin zeigen die beiden NK-Zellsubpopulationen aber auch funktionelle Unterschiede, wobei die Expression von CD56 als Surrogatmarker zur Identifizierung der entsprechenden Vertreter dient. CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen repräsentieren „klassische“ NK-Zellen, die ein hohes zytolytisches Potential aufweisen. Im Gegensatz dazu zeichnen sich die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen durch ihre Fähigkeit, große Zytokin- und Chemokinmengen zu produzieren sowie eine stark verminderte Zytotoxizität aus [7,76]. Die unterschiedliche zytotoxische Kapazität ist unter anderem dadurch begründet, dass die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen mehr lytische Granula enthalten und effektiver Konjugate mit den Targetzellen (z.B. K562) bilden [76].

Derzeit bestehen noch unterschiedliche Vorstellungen bezüglich der NK-Zellsubpopulationen, ob beispielsweise die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen Vorläufer der terminal ausgereiften CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen sind oder ob es sich um eigenständige Subpopulationen handelt [72,76-78]. Daher sind weitere Untersuchungen von Phänotyp und Funktion der CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen nötig, um eindeutige Schlüsse zur Einteilung der NK-Zellen und deren Genese ziehen zu können.

In der Decidua findet man eine weitere NK-Zellsubpopulation. Diese unterscheidet sich deutlich von den NK-Zellen im peripheren Blut. Deciduale NK-Zellen sind CD56<sup>bright</sup>, CD16<sup>neg</sup>, exprimieren KIRs und besitzen zahlreiche Granula [79]. Diese Population wurde in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt.



**Abb.1 Phänotypische und funktionelle Eigenschaften von NK-Zellsubpopulationen**

Aus [74] übernommene Abbildung zeigt einen Überblick der phänotypischen und funktionellen Unterschiede von CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen.

### 1.4.1 Entwicklung

NK-Zellen besitzen mit den T-Zellen gemeinsame Progenitoren, die  $Fc\gamma RIII^+CD90^+CD117^+$  sind [80]. Die Reifung der NK-Zellen ist jedoch vom Knochenmark abhängig und erfolgt nicht wie bei den T-Zellen im Thymus. Ein wichtiger Stimulus für die NK-Zellen ist IL-15, das von Stromazellen gebildet wird [81]. In vitro lassen sich NK-Zellen aus  $CD34^+Lin^-$  hämatopoietischen Stammzellen generieren. In Gegenwart von IL-15, Flt3L (fms-like tyrosine kinase 3 ligand), SCF (stem cell factor) und IL-21 entwickeln sich vorrangig CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen, die CD16 und KIRs exprimieren. In Abwesenheit von IL-21 lassen sich hauptsächlich CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen herstellen, die weder CD16 noch KIRs auf der Oberfläche tragen [82]. Freud et al konnten nun zeigen, dass diese Subpopulation aus  $CD34^{dim}CD45RA^+$  Stammzellen hervorgehen, die eine hohe Dichte von  $\alpha_4\beta_7$  auf der Oberfläche tragen [83]. Diese Zellen liegen ebenso wie die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in den T-Zellbereichen der Lymphknoten und differenzieren in Gegenwart von IL-15 und IL-2 oder aktivierten T-Zellen zu CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen aus.

## 1.5 Interleukin-21 (IL-21) und sein Rezeptor

Interleukin (IL)-21 wurde im Jahr 2000 von zwei unabhängigen Gruppen (Parrish-Novak et al und Ozaki et al) beschrieben [84,85]. Es ist ein Typ I Zytokin, das sehr homolog zu IL-2, IL-4 und IL-15 ist. Bislang konnten nur aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen als Produzenten dieses Zytokins festgestellt werden [86]. Die Wirkung von IL-21 ist pleiotrop, d.h. eine Reihe unterschiedlicher Zellen können durch Gabe dieses Zytokins reguliert werden. U.a. verhindert IL-21 den Switch von IgG zu IgE und ist damit relevant für die Pathophysiologie von Autoimmunerkrankungen, wie allergisches Asthma [87]. Weiterhin kann IL-21 die anti-Tumor Aktivität von NK-Zellen in vivo und in vitro steigern [88]. In Kombination mit anderen Zytokinen wie IL-15 und IL-18 kann IL-21 die Produktion von IFN $\gamma$  und IL-10 anregen [89,90]. Die Aktivierung und Reifung Dendritischer Zellen (DCs) wird in Gegenwart von IL-21 inhibiert [91]. Die Rolle von IL-21 bei der Entwicklung von NK-Zellen ist in 1.4.1 beschrieben.

Der IL-21 Rezeptor (IL-21R) wird auf peripheren T-Zellen, surface-(s)IgM<sup>+</sup> B-Zellen, und auch NK-Zellen exprimiert [92,93]. Er ist homolog zur  $\beta$ -Untereinheit des IL-2 Rezeptors und assoziiert ebenso wie die Rezeptoren von IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 und IL-15 mit der Gamma-Kette (common  $\gamma$ -chain, CD132), die der Signaltransduktion dient. Der extrazelluläre Teil des IL-21R enthält ein Zytokinrezeptor-Modul (CRM) mit konserviertem WSXWS (Tryptophan-Serin-X-Tryptophan-Serin) -Motiv und gepaarten Zysteinresten. Anschließend folgt eine Transmembrandomäne und intrazellulär eine konservierte Box 1 und Box 2, an die Januskinasen (JAKs), wie JAK1 und JAK3, binden können [94]. Am Ende der Signaltransduktionskaskade kommt es zur Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 [95]. Damit stellt IL-21R eine Ausnahme innerhalb der common- $\gamma$ -chain Rezeptorfamilie dar, da diese hauptsächlich zur Aktivierung von STAT5 führen.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der angeborenen und adaptiven Immunität. Phänotypisch lassen sich zwei funktionell unterschiedliche NK-Zellsubpopulationen identifizieren. CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen besitzen ein hohes zytolytisches Potential, während die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen eher regulatorische Funktionen übernehmen, indem sie große Mengen an Zytokinen und Chemokinen sezernieren. Außerdem ist diese Subpopulation in der Lage in sekundäre Lymphorgane zu wandern.

Zur weiteren genetischen und funktionellen Charakterisierung sollten diese beiden Subpopulationen mittels FACS (fluorescence activated cell sorter) separiert und auf ihre Funktion analysiert werden. Um einen weitreichenden Überblick über die Genexpression

zu bekommen, wurden Genearray-Analysen (Affymetrix) von ruhenden und aktivierten NK-Zellen bei der GBF in Braunschweig durchgeführt. Diese Ergebnisse wurden anschließend mit Hilfe der RT-qPCR (reverse Transkription quantitative PCR) und im FACS (Proteinebene) verifiziert. Aufgrund dieser Analysen sollten signalgebende Rezeptoren gefunden werden, die CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen etwa gleich stark exprimieren und sich daher für eine Stimulation anböten. Außerdem könnten die Daten dieser Untersuchungen Hinweise zur Charakterisierung analoger Subpopulationen in der Maus liefern, da diese das CD56-Molekül nicht exprimieren und es daher nicht zur Identifizierung herangezogen werden kann.

Die Produktion von Zytokinen durch NK-Zellen ist eine wesentliche Voraussetzung für die Ausführung von regulatorischen Aufgaben dieser Lymphozyten. Daher erfolgte die Charakterisierung von Chemokin- und Zytokinmustern der einzelnen Subpopulationen. Wegen der unterschiedlichen Funktionen, die CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen ausführen, ist anzunehmen, dass sie verschiedene Signalwege bevorzugen. Für die entsprechenden Untersuchungen bezüglich der Signaltransduktion sollte der Western Blot genutzt sowie die Detektion phosphorylierter Moleküle im FACS etabliert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Antikörper

Antikörper	Klon (Isotyp)	Firma
CCR5 PE	3A9 (IgG2a)	Pharmingen, Heidelberg
CD2 FITC	RPA-2.10 (IgG1)	Pharmingen, Heidelberg
CD3 APC	UCHT1 (IgG1)	Pharmingen, Heidelberg
CD3 FITC	UCHT1 (IgG1)	Pharmingen, Heidelberg
CD3 PerCP	SK7 (IgG1)	Becton Dickinson, Heidelberg
CD4 FITC	13B8.2 (IgG1)	IOTest <sup>®</sup> , Immunotech, Marseille, Frankreich
CD8 PE	DK25 (IgG1)	DAKO, Hamburg
CD11a FITC	25.3 (IgG1)	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD16 FITC	DJ130c (IgG1)	DAKO, Hamburg
CD18 FITC	7E4 (IgG1)	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD20 FITC	2H7 (IgG2b)	Pharmingen, Heidelberg
CD25 FITC	ACT-1 (IgG1)	DAKO, Hamburg
CD27 FITC	M-T271 (IgG1)	Pharmingen, Heidelberg
CD56 APC	B159 (IgG1)	Pharmingen, Heidelberg
CD56 FITC	NCAM1.2 (IgG1)	Becton Dickinson, Heidelberg
CD56 PE	My31 (IgG1)	Becton Dickinson, Heidelberg
CD59 FITC	p282(H19) (IgG2a)	Pharmingen, Heidelberg
CD69 PE	L78 (IgG1)	Pharmingen, Heidelberg
CD81 FITC	JS-81 (IgG1)	Pharmingen, Heidelberg
CD94 PE	HP-3D9 (IgG1)	DAKO, Hamburg
CD99R	MEM-131 (IgM)	Immunotools, Friesoythe
CD132 PE	AG184 (IgG1)	Pharmingen, Heidelberg
CD158a PE	EB6 (IgG1)	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD158b PE	GL183 (IgG1)	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD161 FITC	DX12 (IgG1)	Pharmingen, Heidelberg
CXCR4 PE	12G5 (IgG2a)	Pharmingen, Heidelberg
GAM FITC	polyklonal	Dianova, Hamburg
Granzym A PE	CB9 (IgG1)	Pharmingen, Heidelberg
Granzym K FITC	24C3 (IgG1)	Immunotools, Friesoythe

HLA-DR FITC	CR3/43 (IgG1)	DAKO, Hamburg
IFN $\gamma$ ALEXA	B27 (IgG1)	Caltag, Hamburg
IL-8 PE	#6217 (IgG1)	R&D Systems, Wiesbaden
IL-21R PE	#152512 (IgG1)	R&D Systems, Wiesbaden
ILT2 PE	HP-F1 (IgG1)	IOtest <sup>®</sup> , Immunotech, Marseille, Frankreich
KIR2DL4	#33 (IgG1)	E.O. Long und S. Rajagopalan
NKB1 FITC	DX9 (IgG1)	Pharmingen, Heidelberg
NKG2D	1D11 (IgG1)	Pharmingen, Heidelberg
NKp30 PE	Z25 (IgG1)	IOtest <sup>®</sup> , Immunotech, Marseille, Frankreich
NKp44 PE	Z231 (IgG1)	IOtest <sup>®</sup> , Immunotech, Marseille, Frankreich
NKp46 PE	BAB281 (IgG1)	IOtest <sup>®</sup> , Immunotech, Marseille, Frankreich
p50.3 PE	FES172 (IgG2a)	IOtest <sup>®</sup> , Immunotech, Marseille, Frankreich
p70 PE	Z27.3.7 (IgG1)	IOtest <sup>®</sup> , Immunotech, Marseille, Frankreich
Perforin FITC	$\delta$ G9 (IgG2b)	Pharmingen, Heidelberg
pSTAT1 ALEXA647 4a (IgG2a)		BD Pharmingen, Heidelberg
pSTAT3 ALEXA647 4/P-Stat3 (IgG2a)		BD Pharmingen, Heidelberg
pSTAT5 ALEXA647 47 (IgG1)		BD Pharmingen, Heidelberg
TNF $\alpha$ FITC	MAb11 (IgG1)	Pharmingen, Heidelberg
Intraglobulin F	Ig (human)	Biotest Pharma GmbH, Dreieich
anti-erythrozytär	105-2H (IgG1)	Hybridom von S. Izui

Um unspezifische Bindungen ausschließen zu können, wurden Antikörper des gleichen Isotyps, die mit Farbstoffen markiert waren, aber kein Epitop auf den zu untersuchenden Zellen besaßen, verwendet (Isotypkontrolle).

### 2.1.2 Magnetische Depletion

Dynabeads <sup>®</sup> M-450 (4x10 <sup>8</sup> /ml)	Dynal, Hamburg
CD15	Pharmingen, Heidelberg
CD3 (1 mg/ml)	Abt. Klin. Immunologie, MHH
CD14 (0,1 $\mu$ g/ml)	Immunotools, Friesoythe
CD19 (0,1 $\mu$ g/ml)	Immunotools, Friesoythe

### 2.1.3 Zytokinbestimmung

Cytokine Array V	Raybiotech, Norcross, USA
Cytometric Bead Array	Becton Dickinson, Heidelberg
Human Inflammation Kit	Becton Dickinson, Heidelberg
Human TH1/TH2 Cytokine Kit II	Becton Dickinson, Heidelberg

### 2.1.4 Zytokine

IL-21	R&D Systems, Wiesbaden
IL-2	Eurocetus, Amsterdam, Niederlande

### 2.1.5 Chemikalien

$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Agarose	Serva, Heidelberg
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, München
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ficoll <sup>®</sup>	Biochrom KG, Berlin
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Linz, Österreich
Glycin	Merck, Darmstadt
Heparin-Natrium (Liquemin <sup>®</sup> )	Roche, Grenzach-Whylen
Ionomycin	Sigma-Aldrich, München
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
Mausnormalserum	DAKO, Hamburg
Methanol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat (Na-pyruvat)	Gibco, Eggenstein
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS	Gibco, Eggenstein
Penicillin-Streptomycin	Biochrom, Berlin
PHA (Phytohämagglutinin)	Murex Biotech Ltd., Dartford, Kent, UK
PMA (Phorbol-Myrestat-Acetat)	Sigma-Aldrich, München
Rinderserum-Albumin (BSA)	Behring, Marburg
RPMI 1640	Biochrom, Berlin
Saponin	Riedel-de-Haën AG, Seelze

SDS	Bio-Rad, Hercules, USA
Sheath-Lösung (Isoton®-II)	Beckman-Coulter, Krefeld
Trypanblau	Merck, Darmstadt
<sup>3</sup> H-Thymidin	Amersham Biosciences, Braunschweig
<sup>51</sup> Cr	Amersham Biosciences, Braunschweig

### 2.1.6 Primer

Die Primer für die real-time RT-PCR (RT-qPCR) wurden von Biotex (Berlin) bezogen. Die Sequenzen sind in 5'→3' Richtung angegeben (vw=vorwärts, rw=rückwärts). Die Primer und Sonden zur Detektion der KIRs wurden von Dr. Tanja Momot zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.6.1 RT-qPCR mit SYBR-Green

##### *Actin*

vw: 5'-AGTACTCCGTGTGGATCGGC

rw: 5'-GCTGATCCACATCTGGTGGA

##### *IFN<sub>γ</sub>*

vw: 5'-TTCGGTAACTGACTTGAATGT

rw: 5'-ACCTCGAAACAGCATCTGA

##### *TNF<sub>α</sub>*

vw: 5'-ATCTTCTCGAACCCCGAGTGA

rw: 5'-CGGTTTCAGCCACTGGAGCT

##### *CD56*

vw: 5'-GGAGGGGAACCAGGTGAACA

rw: 5'-TGGTCGATGGATGGTGAAGAG

##### *NKG2D*

vw: 5'-CACGTCATTGTGGCCATTGT

rw: 5'-AAGCACAGGCCAGCAAATCTCT

#### 2.1.6.2 RT-qPCRq PCR mit Sonde

##### *Actin*

vw: 5'-AGTACTCCGTGTGGATCGGC

rw: 5'-GCTGATCCACATCTGGTGGA

Sonde:6-FAM-TCCATCCTGGCCTCGCTGTCCA-TAMRA

*KIR2DL1*

vw: 5'-CGTGGGCGTGCCTGTC

rw: 5'-AAGAACCCAACACACGCCAT

Sonde: 6-FAM-CAGCACCATGTCGCTCTTGTTTCGTCA-TAMRA

*KIR2DS1*

vw: 5'-TGAACGTAGGCTCCCTGCA

rw: 5'-CGGAAAGAGCCGAAGCATC

Sonde: 6-FAM-CCAACCTTCCTCTGGGCCCTGCCACCCATGG-TAMRA

*KIR2DL2*

vw: 5'-AGAGGCCCAAGACACCCC

rw: 5'-CAAGGCCTGACTGTGGTGC

Sonde: 6-FAM-AGATATCATCGTGTACGCGGAACCTTCCAAATGCT-TAMRA

*KIR2DS2*

vw: 5'-TGGTCAGATGTCAGGTTTGAGC

rw: 5'-TGGCCTTGGAGACCCCAT

Sonde: 6-FAM-AGGGGAAGTATAAGGACACTTTGCACCTCATTGGAGAGC-TAMRA

*KIR2DL3*

vw: 5'-AACAGTGAACAGGGAGGACTCTG

rw: 5'-AAGGGCGAGTGATTTTTCTCTG

Sonde: 6-FAM-CTCAGGAGGTGACATATGCACAGTTGAATCA-TAMRA

*KIR3DL1*

vw: 5'-TCCAAGGCCAATTTCTCCAT

rw: 5'-GTGAGTAACAGAACCGTAGCATCTG

Sonde: 6-FAM-TCCCATGATGCTTGCCCTTGCAG-TAMRA

*KIR3DS1*

vw: 5'-CTAAGGACCCCTCACGCCTC

rw: 5'-TCACTGGGAGCTGACAACTGA

Sonde: 6-FAM-TTTCTCCATCGGTTCCATGATGCGTGCC-TAMRA

*KIR2DL4*

vw: 5'-TCCCAGAGCTCCTTTGACAT

rw: 5'-AGAAACAGGCAGTGGGTCAC

Sonde: 6-FAM-CCATGGATCTCCCTACGAGTGGTT-TAMRA

### 2.1.7 Medien

Dynal-Puffer	0,1% BSA in PBS (ohne Mg <sup>2+</sup> und Ca <sup>2+</sup> )
Einfriermedium:	20% DMSO in FCS
Formalin-Puffer:	4% Paraformaldehyd in PBS
10%iges FCS-Medium (R10):	10% FCS 1% Penicillin-Streptomycin (100 U/ml, 100 µg/ml) 1% L-Glutamin (2 mM) 1% Na-Pyruvat (1mM) in RPMI 1640
PBS-BSA-Puffer:	0,1% BSA in PBS
PBS-FCS-Puffer:	2% FCS in PBS
Saponin-Puffer:	0,1% Saponin 10 mM HEPES in PBS

### 2.1.8 Expressionsanalysen

Genearray U133A	Affymetrix, High Wycombe, Großbritannien
Genearray U133B	Affymetrix, High Wycombe, Großbritannien

### 2.1.9 PCR

Pico LabChip Kit	Agilent Technologies, Palo Alto, USA
Universal Master Mix	PE Biosystems, Foster City, USA
RNase free DNase Set	Qiagen, Hilden
RT PCR Grade Water	Ambion, Huntingdon, GB
iQ SYBR Green Supermix	BioRad, Hercules, USA
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden
Sensiscript RT Kit	Qiagen, Hilden
RNase Zap Wipes	Ambion, Huntingdon, GB

Ethanol für d. Molekularbiologie	Merck, Darmstadt
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden
Qiashredder Säule	Qiagen, Hilden

### 2.1.10 Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Palo Alto, USA
Brutschrank (CO <sub>2</sub> -Auto-Zero)	Heraeus, Osterode
Chip Priming Station	Agilent Technologies, Palo Alto, USA
Durchflusszytometer (FACSCalibur)	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellsortiergerät (FACStar <sup>plus</sup> )	Becton Dickinson, Heidelberg
Entwickler	Protech Medizintechnik GmbH&Co KG, Osterfeld
Filmkassette	Kodak, Rochester, USA
iCycler	BioRad, Hercules, USA
Mikrofuge ETM	Beckman, München
Mikrofuge22R	Hettich, Tuttlingen
Model 200/2.0 Power Supply	Bio-Rad, Hercules, USA
MS1 Minishaker	IKA Works Inc, Wilmington, USA
MS2 Minishaker	KA Works Inc, Wilmington, USA
Pipette research 1000	Eppendorf, Hamburg
Pipette research 200	Eppendorf, Hamburg
Pipette research 100	Eppendorf, Hamburg
Pipette research 10	Eppendorf, Hamburg
Pipette research 2,5	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank (Lamina Air Flow <sup>®</sup> )	Heraeus, Osterode
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Vortex Mixer Adapter für IKA Vortexer	Agilent Technologies, Palo Alto, USA
Zentrifuge (J-6B)	Beckman, München
Zentrifuge (Omnifuge 2.0RS)	Heraeus, Osterode

### 2.1.11 Verbrauchsmaterialien

15 ml, 50 ml Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
50 ml, 250 ml Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
96-Well-Rundbodenplatten	Greiner, Frickenhausen

96-Well-Spitzbodenplatten	ICN Biomedicals, Aurora, USA
24-Well-Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen
Klebefolien für 96-Well-Platten	Nunc, Wiesbaden
PS (Polystyrol)-Röhrchen (0,6ml)	Greiner, Frickenhausen
Sterilfilter (EasyflowTM)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Filme	Kodak, Rochester, USA
Safe Lock Tube 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
PCR Tube 0,2 ml	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 200 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 100 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 10 µl	Eppendorf, Hamburg
Filterspitzen Biosphere 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Filterspitzen Biosphere 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Filterspitzen Biosphere 100 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Filterspitzen Biosphere 10 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Optical Tape	BioRad, Hercules, USA
Multiply SafeCup	Sarstedt, Nümbrecht
SafeSkin Purple Nitrile	KimberlyClark, Roswell, USA
SafeSkin Satin Plus	KimberlyClark, Roswell, USA

### **2.1.12 Software**

CBA Software 1.3	Becton Dickinson, Heidelberg
GraphPad Prism 4.03	GraphPad Software, San Diego, USA
Scion Image Beta 4.0.2	Scioncorp, Frederick, USA
Summit v3.1	DakoCytomation, Hamburg

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolation von PBMC aus humanem Vollblut

Durch Gradientenzentrifugation mit der Zuckerlösung Ficoll<sup>®</sup>, die eine Dichte von 1,077 besitzt, lässt sich Blut in seine Bestandteile auftrennen. Dabei stellt sich eine charakteristische Schichtung der Blutbestandteile ein. Das Plasma mit den Thrombozyten befindet sich obenauf, gefolgt vom Ficoll<sup>®</sup>. Zwischen diesen beiden liegen die PBMC (peripheral blood mononuclear cells) in der sog. Interphase. Im unteren Bereich sind die roten Blutkörperchen, auf denen sich in einer dünnen Schicht die Granulozyten ansammeln.

Humanes heparinisieretes Vollblut (10 oder 20 ml) von gesunden Spendern wurde in 50 ml Röhrchen 1:2 mit PBS verdünnt und anschließend mit 10 ml Ficoll<sup>®</sup> unterschichtet. Danach erfolgte eine Zentrifugation (1000 g für 20 min), bei der die Interphase gebildet wurde. Der Überstand (Plasma) wurde abgesaugt und die Schicht mit den PBMC in ein neues Röhrchen überführt. Dieses wurde mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und erneut bei 1000 g (10 min) zentrifugiert, um noch vorhandenes Ficoll<sup>®</sup> zu entfernen. Der Überstand wurde wiederum verworfen, die Zellen noch einmal mit 10 ml PBS gewaschen, um Thrombozyten zu entfernen (10 min, 300 g), und letztendlich in 2 ml PBS oder R10 aufgenommen.

### 2.2.2 Zellzählung

Zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Experimente wird die Zellzahl nach jeder Isolation bestimmt und anschließend eine festgelegte Zellkonzentration eingestellt. Diese kann mit Essigsäure, zur Lyse kontaminierender Erythrozyten, oder mit Trypanblau, zur Bestimmung der Lebendzellzahl, durchgeführt werden.

Es wurden 20 µl der Zellsuspension in 380 µl 3%-iger Essigsäure verdünnt (1:20). Diese Suspension wurde in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Zur Bestimmung der Vitalität wurde parallel eine Zellprobe mit Trypanblau 1:2 oder 1:3 verdünnt. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen in zwei diagonal gegenüberliegenden Eckquadraten gezählt und anschließend die Zahl der isolierten Zellen mit folgender Gleichung bestimmt:

$\frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{Anzahl der gezählten Großquadrate}} \times \text{Verdünnung} \times 10^4 = \text{Zellen pro ml}$
---

### **2.2.3 Phänotypisierung**

Die Phänotypisierung dient der Identifizierung und Analyse der Verteilung der Zellpopulationen, die durch Ficoll<sup>®</sup> Gradientenzentrifugation gewonnen werden.

In einer 96-Well-Rundbodenplatte wurden  $3 \times 10^5$  Zellen pro Well eingesetzt. Pro Spender wurde neben dem Untersuchungsansatz jeweils eine Isotypkontrolle angefertigt. Beide Proben wurden mit 10  $\mu$ l humanem IgG versehen, um unspezifische Anlagerung der Antikörper an die Fc-Rezeptoren zu diskriminieren. Die Kontrolle wurde mit 10  $\mu$ l Maus IgG der entsprechenden Isotypen versehen, die mit den verwendeten Farbstoffen (FITC, PE, APC, PerCp etc.) markiert waren. Zur Identifizierung der NK-Zellen wurden jeweils gleichzeitig Antikörper gegen CD56 und CD3 genutzt. Die Expression weiterer Moleküle wurde mittels 3- oder 4-Farbfluoreszenzen bestimmt.

### **2.2.4 Nachweis intrazellulärer Zytokine**

Nach entsprechender Stimulation bilden Lymphozyten verschiedene Zytokine, die normalerweise sezerniert werden. Für den intrazellulären Nachweis dieser Mediatoren kann ihr Ausschleusen aus der Zelle unterbunden werden. Dazu werden die Zellen eine Stunde nach Beginn der Stimulation z.B. mit Brefeldin A behandelt. Dieser fungale Metabolit greift in die intrazellulären Transportprozesse der Zelle ein und verhindert so die Sekretion der gebildeten Zytokine, die deshalb innerhalb der Zellen akkumuliert werden. Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern sowie nach Fixierung und Aufschluss der Zellen durch ein Detergenz wie Saponin können die Zytokine nun intrazellulär nachgewiesen werden.

Eine Stunde nach Beginn der Stimulation wurde jedem Ansatz 2  $\mu$ g/ml (Endkonzentration) Brefeldin A zugesetzt. Nach einer Inkubation von insgesamt 4 h oder über Nacht (22 h) wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend in PBS/BSA aufgenommen. Für den Nachweis wurden ca.  $3 \times 10^5$  Zellen pro Well eingesetzt. Vor der Fixierung wurden die Oberflächenmarker CD56 und CD3 gefärbt, da sich CD56 gegenüber der Paraformaldehydbehandlung empfindlich erwies. Nach 15 min Inkubation bei 4°C wurden die Zellen zweimal mit PBS/BSA gewaschen und anschließend mit 4%-igem Paraformaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln fixiert. Nach dieser Vorbehandlung wurde 50  $\mu$ l Saponin-Puffer zugegeben, um die Zellmembran für die zytokinspezifischen Antikörper durchlässig zu machen. Die Inkubation erfolgte 15 min bei 4°C. Abschließend wurde nochmals gewaschen.

## 2.2.5 Sortierung von NK-Zellsubpopulationen

### 2.2.5.1 Isolation von PBMC aus Freseniusfiltern

Im peripheren Blut gesunder Menschen ist die Zahl der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen sehr gering (ca. 1% der Lymphozyten). Um ausreichend Zellmaterial für die Untersuchungen zu erhalten, können große Mengen PBMC aus Fresenius-Filtern gewonnen werden. Diese Filter werden zur Abtrennung der weißen Blutzellen bei der Herstellung von Erythrozytenkonzentraten für die Transfusion verwendet und enthalten die Leukozytenzahl, die man aus ca. 450 ml Vollblut isolieren kann. Die Suspension enthält Granulozyten, die in kürzester Zeit absterben können, wodurch DNA freigesetzt würde. Diese bindet über Histone an die Zelloberfläche anderer Zellen und kann zu starken Verklumpungen in der Suspension führen. Durch Gabe von DNase, die die DNA spaltet, kann die Vernetzung der Zellen verhindert werden.

Zu Beginn erfolgte das Spülen der Filter in entgegengesetzter Richtung des früheren Blutstroms mit PBS und anschließend die Isolation der PBMC mittels Ficoll<sup>®</sup> aus dieser Leukozytensuspension (2.2.1). Dabei wurde das Pellet nach jeder Zentrifugation in 100 µl DNase (RNase frei) gelöst. Anschließend wurde eine Phänotypisierung (CD20, CD56, CD3) aller Proben sowie eine Zellzählung (2.2.3; 2.2.2) vorgenommen. Proben mit ausreichender Zellzahl und gut differenzierbarer Population der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen wurden ausgewählt und weiter bearbeitet.

### 2.2.5.2 Depletion von CD3<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup> und CD15<sup>+</sup> Zellen

Zur Beschleunigung des Sortiervorgangs bietet sich eine Anreicherung der NK-Zellen mittels Dynabeads<sup>®</sup>M-450 an. Dabei handelt es sich um superparamagnetische Partikel, die mit Polystyrol beschichtet sind. An die Polystyrolbeschichtung sind humane Antikörper gekoppelt, die den Fc-Teil muriner Antikörper erkennen. Für die Depletion werden diese Beads mit entsprechenden Maus-Antikörpern (z.B. CD3) vorinkubiert, gewaschen und anschließend auf die Zellsuspension gegeben. Nach der Inkubationszeit wird die Probe in einen Magneten gestellt, wodurch die markierten Zellen an die Röhrchenwand gezogen werden. Die angereicherten Zellen befinden sich im Überstand, der abgenommen wird.

Je 10 µg der anti-CD3, -CD19, -CD14 oder -CD15 Antikörper wurden für 15 min bei RT mild schüttelnd mit 1 ml Dynabeads<sup>®</sup>M-450 (4x10<sup>8</sup>) inkubiert und anschließend zweimal gewaschen, indem die Suspension in ein Magnetfeld gestellt und der Überstand abgesaugt wurde. Die Beads wurden in 1 ml PBS/FCS resuspendiert und bei 4°C gelagert. Anhand der FACS-Analysen wurde die ungefähre Zahl der Targetzellen (T- und B-Zellen sowie Monozyten) ermittelt und die vorbereiteten Beads (s.o.) in einer

Konzentration von 3 Beads/Targetzelle eingesetzt. Nur wenn nach Ficoll<sup>®</sup> noch Granulozyten vorhanden waren, wurden diese mit den CD15-markierten Beads depletiert. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT (mild schüttelnd) wurde das Röhrchen mit der Zellsuspension in einen Magneten gestellt. Alle Zellen, die mit den Dynabeads<sup>®</sup> beschichtet waren, wurden an die Wand des Röhrchens gezogen. Der Überstand mit den angereicherten NK-Zellen wurde abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt.

Um den Erfolg der Depletion zu kontrollieren, wurde eine Phänotypisierung (2.2.3) mit Antikörpern gegen CD3, CD56 und CD20 durchgeführt.

### 2.2.5.3 Sortierung

Nach Markierung der Zielzellen können diese im Zellsortiergerät (FACStar<sup>Plus</sup>) voneinander getrennt werden. Hierbei werden die gefärbten Zellen über ein Schlauchsystem aus dem Röhrchen angesaugt und in eine Küvette transportiert. In dieser Küvette erfolgt eine hydrodynamische Fokussierung, d.h. die Zellen werden einzeln hintereinander aufgereiht. Durch Oszillation wird der Strahl in einzelne Tröpfchen aufgespalten, wobei sich dann idealerweise in jedem Tröpfchen eine Zelle befindet. Auf diese Weise verlassen die Zellen die Küvette, wobei sie von einem Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm angestrahlt werden. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, forward scatter) wird direkt detektiert und ist ein Maß für die Größe der Zellen. Das Seitwärtsstreulicht (SSC, sideward scatter) ist ein Maß für die Granularität der Zelle. Es wird um 90° abgelenkt und später durch einen Halbspiegel aufgeteilt, so dass SSC und die Fluoreszenzen gemessen werden und auf diese Weise die Farbstoffe FITC und PE detektiert werden können. Die aufgefangenen Signale werden auf einem Bildschirm angezeigt. Dort werden spezielle Sortierkriterien festgelegt, d.h. Gates eingefügt. Mit dem verwendeten Gerät lassen sich zwei Zelltypen (z.B. CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup>) gleichzeitig von den übrigen trennen. Nach dem Verlassen der Küvette werden die Tropfen mit den zu sortierenden Zellen entsprechend der eingestellten Sortierkriterien mit einer elektrischen Ladung versehen, z.B. werden CD56<sup>dim</sup> Zellen positiv, die CD56<sup>bright</sup> Zellen negativ geladen. Damit jede Zelle die richtige Ladung bekommt, muss bestimmt werden, zu welchem Zeitpunkt die jeweilige Zelle das Ladegerät passiert (time delay) und das Gerät entsprechend justiert wird. Die geladenen Tropfen gelangen anschließend in ein elektrisches Feld und werden aufgrund ihrer Ladung nach rechts oder links abgelenkt und in Röhrchen aufgefangen. Ungeladene Zellen werden nicht abgelenkt und deshalb verworfen.

Nach Vor-Depletion der unerwünschten Zellen mit magnetischen Beads (2.2.5.2) wurde die Zahl der angereicherten NK-Zellen bestimmt. Anschließend erfolgte eine Färbung mit

Antikörpern gegen CD3 (FITC) und CD56 (PE). Die Färbung mit Antikörpern gegen CD3 diente der Einstellung der Sortgates im Sortiergerät und damit dem Ausschluss der T-Zellen. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wurden die Zellen zweimal mit PBS/BSA gewaschen und zum Schluss in 3 ml R10 aufgenommen. Anschließend erfolgte die Sortierung der beiden Subpopulationen im FACStar<sup>Plus</sup> von Becton Dickinson. Die Reinheit der sortierten Zellen wurde abschließend im FACScalibur kontrolliert.

## 2.2.6 Stimulation hochreiner NK-Zellsubpopulationen

### 2.2.6.1 Stimulation mit PMA/Ionomycin für Zytokin- und Genearray

Nach der Separation von CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen wurde eine Konzentration von  $1 \times 10^6$ /ml in R10 eingestellt. Von dieser Suspension wurde in den einzelnen Experimenten jeweils 200  $\mu$ l/Well eingesetzt und mit PMA/Ionomycin (50 ng/ml; 500 ng/ml) 48 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> stimuliert. Nach Zentrifugation wurden jeweils Überstand und Zellen separat geerntet.

### 2.2.6.2 Stimulation mit PMA/Ionomycin für den Cytometric Bead Array

Sortierte CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen wurden auf  $1 \times 10^6$ /ml eingestellt und mit 50 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin für 24 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Überstände gelagert und bei -20°C eingefroren bis mehrere Spender gleichzeitig analysiert werden konnten.

### 2.2.6.3 Stimulation über KIR2DL4

Zur Stimulation der sortierten NK-Zellsubpopulationen wurden MaxiSorb-Platten (Nunc) mit dem Antikörper gegen KIR2DL4 (2  $\mu$ g/ml) beschichtet. Der KIR2DL4-spezifische Antikörper ( $\alpha$ KIR2DL4-AK) wurde freundlicherweise von E. O. Long und S. Rajagopalan zur Verfügung gestellt. Als Negativkontrolle dienten Wells, die nur mit PBS gefüllt waren. Um unspezifische Reaktionen ausschließen zu können, wurde ein Antikörper (2  $\mu$ g/ml 105-2H) des gleichen Isotyps verwandt, der aber kein Epitop auf humanen Zellen erkannte. Außerdem wurde eine Kostimulation mit 500 U/ml IL-2 durchgeführt. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37°C wurden die Wells dreimal gewaschen, indem sie mit PBS gefüllt und dieses wieder abgesaugt wurde. Anschließend wurden 100  $\mu$ l Zellsuspension ( $2 \times 10^5$ /ml) in jedes Well pipettiert.

#### 2.2.6.4 Aktivierung mit IL-21 und/oder IL-2

Sowohl PBMC, als auch sortierte NK-Zellen wurden mit 50 U/ml IL-2 und/oder 20 ng/ml IL-21 behandelt. Die IL-2-Konzentration war für NK-Zellen suboptimal und sollte nur als Kostimulus fungieren.

#### 2.2.7 Affymetrix Genearrays

Eine elegante Methode zur Expressionsanalyse stellen Genearrays dar. Im Gegensatz zu den herkömmlichen Northern oder Southern Blot-Analysen, bieten diese die Möglichkeit eine Vielzahl an Genen in einem Experiment zu untersuchen. Auf den Arrays U133A und U133B von Affymetrix sind beispielsweise 39000 Transkripte, die 30000 Gene repräsentieren. Dabei werden die Sequenzen mittels chemischer Prozesse und Photolithographie auf einen Glasträger gebracht. Bei Affymetrix werden zur Detektion 25-mere verwendet, die allerdings die Gefahr von Fehlhybridisierungen erhöhen. Um diese ausschließen zu können, werden sog. perfect match und mismatch Paare angefertigt, die sich nur durch ein Nukleotid in der Mitte der Sequenz unterscheiden. Zusätzlich werden mehrere Oligonukleotide pro Zielsequenz eingesetzt. Dadurch wird auch die zuverlässige Unterscheidung sehr ähnlicher Moleküle wie der KIRs gewährleistet. Nach Herstellung der Arrays kann die Hybridisierung mit den Proben stattfinden. Die RNA wird aus den jeweiligen Proben isoliert, in cDNA umgeschrieben und dabei mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden markiert. Danach erfolgt die Hybridisierung mit dem Array und abschließend werden die Signale jedes Punktes auf dem Array mit Hilfe eines Readers bestimmt.

Aufgereinigte NK-Zellsubpopulationen wurden direkt oder nach Stimulation mit PMA/Ionomycin in RLT-Puffer bei -70°C eingefroren. Es wurden Expressionsanalysen der RNA eines Individuums sowie der eines Pools von 10 verschiedenen Spendern mit den Arrays U133A und U133B von der GBF in Braunschweig durchgeführt. Die RNA stimulierter Zellen von sieben Spendern wurde mit dem Array U133A ebenfalls in Braunschweig analysiert. Bei den Untersuchungen der Pools wurden äquimolare RNA-Mengen aller Spender eingesetzt. Zur Auswertung der Daten wurden Excel-Tabellen aller Werte durch die GBF zur Verfügung gestellt.

#### 2.2.8 Zytokin-Array V (human) von Raybiotech

Die Zytokin-Arrays von Raybiotech bieten eine gute Möglichkeit, um die Produktion einer Vielzahl verschiedener Mediatoren durch sortierte NK-Zellsubpopulationen in einem Experiment zu untersuchen. Die Membranen der Arrays sind mit punktförmigen Feldern

spezifischer Antikörper sowie sechs Positiv- und drei Negativkontrollen beschichtet. Diese Membranen werden mit Überstand oder Serum von Patienten inkubiert. Anschließend wird ein Cocktail mit den entsprechenden Antikörpern auf die Membran gegeben. Diese sind mit Biotin markiert und können daher an Streptavidin/HRP binden, das in einem dritten Inkubationsschritt auf die Membran gegeben wird. Die Proteine können so mittels Chemilumineszenz auf einem Film sichtbar gemacht werden.

Hier wurde der Zytokin-Array V (für humane Zellen) verwendet, der gleichzeitig 79 Zytokine bzw. Chemokine identifizieren kann. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde der Überstand von CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (unstimuliert, stimuliert (2.2.6.1)) geerntet und bei -20°C weggefroren bis Überstände von 10 verschiedenen Spendern vorhanden waren. Diese wurden zu einem Pool von 1 ml (100 µl/Spender) vereinigt.

Zuerst wurde die Membran 30 min bei RT in 1x Blockpuffer (im Kit enthalten) geschwenkt, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde 1 ml Überstand des Pools aus 10 verschiedenen Spendern auf die Membran gegeben und 3 h auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Die Membran wurde dreimal mit 2 ml Waschpuffer I und zweimal mit 2 ml Waschpuffer II für je 5 min gewaschen. Die biotinylierten Primärantikörper wurden in 1x Blockpuffer (1:250) verdünnt und jede Membran mit 750 µl dieser Lösung bei 4°C über Nacht inkubiert. Es wurde erneut gewaschen (s.o.) und dann das HRP-konjugierte Streptavidin (1:1000 verdünnt) darauf gegeben. Nach 1 h wurde die Membran gewaschen (s.o.) und sofort mit der Detektion fortgefahren. Dazu wurden Detektionspuffer C und D (je 500 µl) gemischt. Mit dieser Lösung wurde die Membran 7 min bei RT und im Dunkeln behandelt. Anschließend wurde die Membran kurz getrocknet, in Frischhaltefolie eingeschlagen und auf den Film gelegt, der 10 min belichtet wurde. Nach der Entwicklung des Films wurden die Spots ausgewertet. Um die Produktion von Zytokinen und Chemokinen der beiden Subpopulationen miteinander vergleichen zu können, wurden die Punkte (ein Punkt=ein Zytokin/Chemokin) mit Hilfe des Programms ScionImage in Histogramme umgewandelt. Diese berücksichtigten sowohl die Leuchtintensität (Höhe des Peaks), als auch die Größe (Breite des Graphen) jedes Punktes. Die Zytokine und Chemokine konnten so in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Dafür wurde die Fläche der Graphen in Pixel bestimmt.

### 2.2.9 Cytometric Bead Array

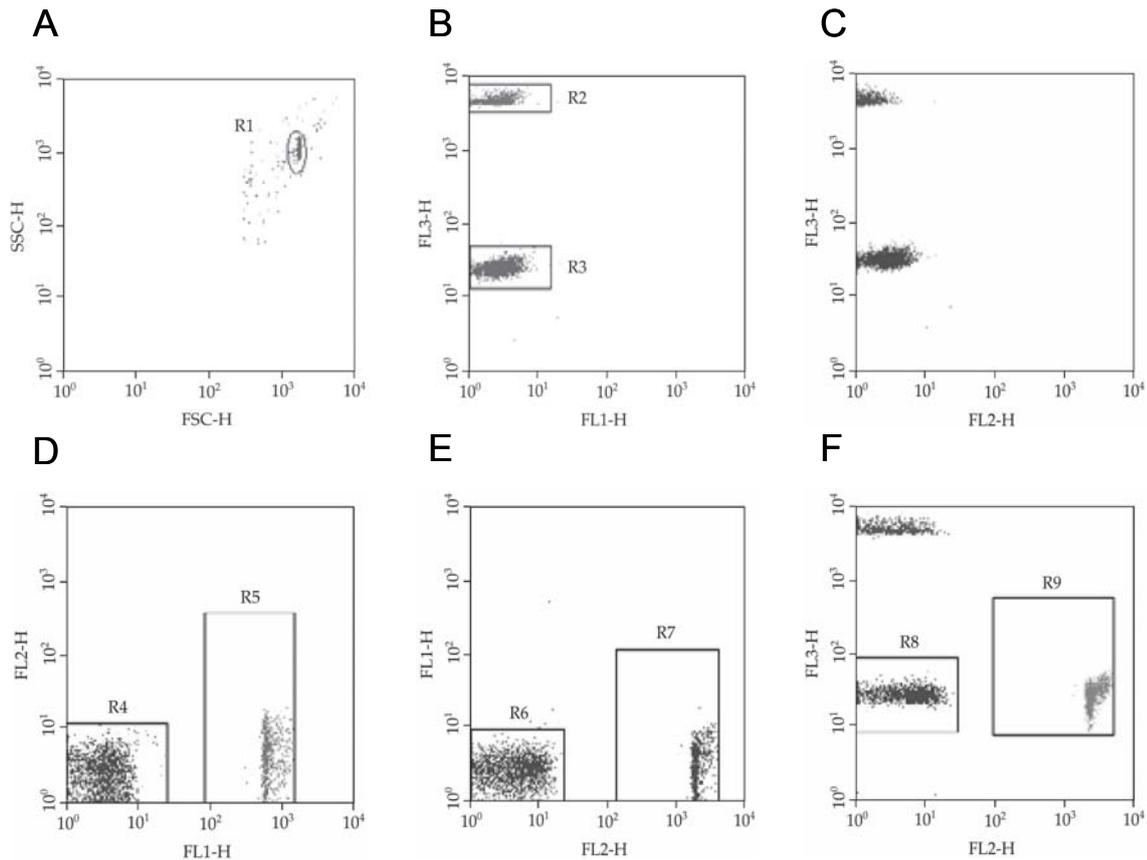
Der Cytometric Bead Array (CBA) erlaubt die Analyse von bis zu 10 Zytokinen im Überstand sortierter NK-Zellsubpopulationen mittels Durchflusszytometrie. Der CBA von Becton Dickinson enthält sechs Bead-Populationen mit unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten. Jede dieser Populationen ist mit spezifischen Antikörpern beschichtet, die jeweils ein bestimmtes Zytokin erkennen, z.B. IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-4. Im FACS lassen sich die Bead-Populationen in der Fluoreszenz 3 (FL3) voneinander differenzieren. Die Fluoreszenzintensität in FL2 wird von der Zytokinkonzentration bestimmt: je höher die Konzentration des spezifischen Zytokins im Überstand ist, desto mehr sekundärer Antikörper (PE Detection Reagent) wird gebunden und lässt das Signal der FL2 steigen. Die entsprechende Bead-Population wandert im Dot Blot (FL3 gegen FL2) nach rechts. Anhand einer Standardkurve kann die Zytokinkonzentration des Überstandes bestimmt werden.

Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde der Überstand von CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (unstimuliert, stimuliert (2.2.6.2)) geerntet und bei -20°C weggefroren bis Überstände von verschiedenen Spendern vorhanden waren.

Der lyophilisierte Standard wurde zunächst in 200  $\mu$ l 10-fach Puffer rekonstituiert und 15 min bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe des Standards in Assay Diluent angelegt (Top Standard, 1:2, 1:4, ... 1:256). Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, der nur Assay Diluent enthielt. Für die Analysen wurden pro Probe bzw. Verdünnungsschritt 10  $\mu$ l jeder einzelnen Bead-Population kalkuliert und die entsprechende Menge in ein Röhrchen pipettiert (z.B. 5 Proben, 9 Standards und 1 Negativkontrolle = 15 Ansätze, d.h. also 150  $\mu$ l pro Bead-Population), so dass ein Gemisch entstand, das alle Bead-Populationen enthielt. Davon wurden 50  $\mu$ l in jedes Röhrchen gegeben und 50  $\mu$ l PE Detection Reagent sowie 50  $\mu$ l Probe bzw. Standard wurden dazu pipettiert. Die Ansätze wurden 3 h bei RT, im Dunkeln inkubiert. Während dieser Zeit konnten die Parameter des Gerätes eingestellt werden. Nach der Inkubation wurden die Proben einmal mit Waschpuffer gewaschen und das Pellet in 300  $\mu$ l Waschpuffer aufgenommen. Anschließend erfolgte die Messung im FACS mit folgender Reihenfolge: Negativkontrolle, Standardreihe (geringste bis höchste Konzentration) und schließlich die Proben. Die generierten Daten wurden mit der CBA Software von Becton Dickinson ausgewertet.

### 2.2.9.1 Geräteeinstellungen

Nach den Grundeinstellungen des FACSCalibur mit der FACScmp Software, erfolgten die Einstellungen für den CBA. In 3 Röhrchen (A; B, C) wurden 50 µl Cytometer Setup Beads pipettiert. In Röhrchen B wurde 50 µl FITC Positivkontrolle und in Röhrchen C 50 µl PE Positivkontrolle hinzugegeben. Diese Ansätze wurden 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde in Röhrchen A 450 µl Waschpuffer und in Röhrchen B und C je 400 µl Waschpuffer pipettiert. Das Gerät wurde in den Aquisitionsmodus versetzt, ein Fenster mit den Achsen FSC (x-Achse) und SSC (y-Achse) erstellt und die Skalierung auf log eingestellt. Der Parameter SSC PMT Voltage wurde von der Grundeinstellung ausgehend um 100 verringert und der Threshold des FSC auf 650 gesetzt. Im Setupmodus wurde Röhrchen A gemessen. Das Fenster R1 (Region 1) wurde so verschoben, dass es die kleine Bead-Population einschloss (Abb.2A). Anschließend wurde der Parameter FL3 PMT (photomultiplier tube) so eingestellt, dass der Median der FL3 der oberen Population 5000 betrug. Während R2 die obere Population erfasste, wurde R3 so verschoben, dass es die untere Population einschloss (Abb.2B). FL1 PMT wurde entsprechend so eingestellt, dass der Median von FL1 ungefähr 2,0-2,5 betrug. Im nächsten Schritt wurde FL2 PMT so angepasst, dass der Wert für den Median von FL2 bei ungefähr 2,0-2,5 lag (Abb.2C). Danach wurde Röhrchen B gemessen, um die Kompensation FL2-%FL1 einzustellen. Das Fenster R5 wurde so positioniert, dass die rechte Population darin lag. Im Kontrollfenster „Compensation“ wurde die Einstellung FL2-%FL1 so verändert, dass der Median von R5 ungefähr den gleichen Wert hatte, wie der der Population innerhalb von R4 (Abb.2D). Nun wurden mit Hilfe von Röhrchen C die Einstellungen FL1-%FL2 und FL3-%FL2 justiert. R7 wurde so verschoben, dass die FL2<sup>bright</sup> Population davon eingeschlossen wurde. Durch Verändern von FL1-%FL2 wurde der Median von R7 dem von R6 angeglichen (Abb.2E). Zum Schluss wurde R9 über die FL2<sup>bright</sup> Population gelegt und durch Verstellen von FL3-%FL2 wurde der Median dieses Fensters auf den Wert des Medians von R8 gebracht (Abb.2F). Wenn notwendig konnte der Wert für FL2-%FL3 auf 0,1 gesetzt werden. Nach dieser Prozedur war das Gerät optimal für den CBA eingestellt. Die Einstellungen wurden gespeichert und ausgedruckt.



**Abb.2 Geräteinstellung für CBA**

Die Bead-Population wurde im FSC/SSC Plot sichtbar und durch die Region 1 (R1) eingegrenzt (A). Der Median der Fluoreszenzintensität von FL1, FL2 und FL3 wurde durch Regulation des PMT eingestellt (B, C). Abschließend wurden FL1, FL2 und FL3 gegeneinander kompensiert, um überlappende Spektralbereiche auszuschließen (D, E, F).

### 2.2.10 Proliferationstest

Ein einfaches Verfahren zur Analyse der Zellproliferation bietet die Markierung mit radioaktivem <sup>3</sup>H-Thymidin. Nach 48 Stunden Stimulation wird den Zellen <sup>3</sup>H-Thymidin zugeführt. In weiteren 24 h wird dieses Nukleotid von proliferierenden Zellen in die DNA eingebaut, nicht jedoch von ruhenden. Die Radioaktivität kann anschließend im  $\beta$ -Counter bestimmt werden.

Für den Proliferationstest wurden pro Stimulus je nach verfügbarer Zellmenge zwei oder drei Parallelansätze angefertigt, von denen später das arithmetische Mittel errechnet wurde. Nach 48 h Stimulation wurden die Zellen mit 0,4  $\mu$ Ci <sup>3</sup>H-Thymidin markiert und für weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Absaugen mit destilliertem Wasser geerntet. In dem hypotonischen Medium kam es zur Lyse der Zellen und zur Freisetzung der DNA. Die DNA-Ketten mit dem eingebauten <sup>3</sup>H-Thymidin wurden auf einem Filter aufgefangen, während Zelltrümmer und lösliches <sup>3</sup>H-Thymidin diesen

passierten. Der Filter wurde nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit in eine dafür vorgesehene Folie eingeschweißt, wonach die Radioaktivität im  $\beta$ -Counter gemessen wurde.

### 2.2.11 Zytotoxizitätstest

NK-Zellen sind in der Lage, körperfremde oder alterierte körpereigene (maligne oder virusinfizierte) Zellen abzutöten. Diese Aktivität gegenüber einer empfänglichen Zelllinie wird im Zytotoxizitätstest untersucht. Ein Standardtarget stellt die erythromyeloide Zelllinie K562 dar, die kein MHC-I exprimiert und somit keine inhibierenden Signale über KIRs in die NK-Zellen vermittelt. Im Gegensatz dazu sind T-Zellen wegen des fehlenden MHC-I nicht fähig diese Zelllinie zu töten, so dass auch mit PBMC eine spezifische Lyse durch die NK-Zellen ermittelt werden kann. Die Targetzellen werden für den Test mit  $^{51}\text{Cr}$  markiert. Während der 4 h Inkubation haben die Effektorzellen die Möglichkeit zur Lyse der Targets, die dabei das  $^{51}\text{Cr}$  freisetzen. Im Überstand befindliches  $^{51}\text{Cr}$  kann im  $\gamma$ -Counter bestimmt werden und stellt ein Maß für die Zytotoxizität der Effektorzellen dar.

Die Targetzelllinien wurden am Vortag gefüttert, so dass sie sich zum Testzeitpunkt in der Log-Phase befanden. Am Testtag wurden die Zellen 5 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden 1 h bei 37°C mit 100  $\mu\text{Ci}$   $^{51}\text{Cr}$  markiert. Anschließend wurden sie mit 3 ml R5 (5%-iges FCS-Medium) gewaschen und das Zellpellet in 1 ml R5 resuspendiert. Für die Zellzählung (2.2.2) wurden die Targets 1:2 mit Trypanblau verdünnt und für den Test auf  $1 \times 10^5/\text{ml}$  eingestellt.

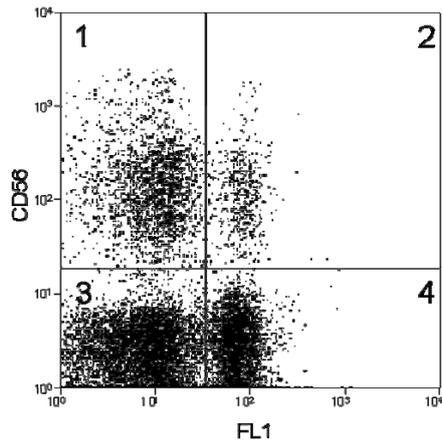
Von den Effektoren wurden verschiedene Verdünnungen hergestellt (z.B.  $3 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $1,5 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $0,75 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $0,375 \times 10^6/\text{ml}$ ). Davon wurden je 100  $\mu\text{l}$  in die Wells einer unsterilen 96-Well Spitzbodenplatte für Dreifachbestimmungen pipettiert. Als minimale Freisetzung (Min) wurden drei Wells mit 100  $\mu\text{l}$  R10 bzw. als maximale Freisetzung (Max) drei Wells mit 100  $\mu\text{l}$  1%-igem Triton X (entspricht 100% Lyse) pipettiert. Durch Zugabe von 5000 Targets pro Well ergaben sich damit Effektor zu Target Verhältnisse (E:T Ratio) von 60:1, 30:1, 15:1 und 7,5:1. Die E:T Ratio wurde bei der Verwendung aufgereinigter NK-Zellen variiert, z.B. 10:1 und 5:1. Waren alle Zellen pipettiert, wurde die Platte 3 min bei 200 g zentrifugiert und dann für 4 h im Brutschrank inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Platte 5 min bei 300 g zentrifugiert. 25  $\mu\text{l}$  des Überstandes wurden in die flexiblen Platten pipettiert und 150  $\mu\text{l}$  Szintillationsflüssigkeit dazu gegeben. Die Platten wurden mit der entsprechenden Folie verschlossen und für 15 min gerüttelt. Anschließend wurden die Proben im  $\gamma$ -Counter gemessen.

Die spezifische Lyse wurde mit folgender Gleichung bestimmt:

$$\frac{\text{Experimentelle Freisetzung} - \text{Min. Freisetzung}}{\text{Max. Freisetzung} - \text{Min. Freisetzung}} \times 100 = \text{spezifische Lyse (\%)}$$

### 2.2.12 Konjugatbildungsanalyse

Die Bildung von Konjugaten ist eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Lyse der Zielzellen durch die Effektorzellen. Aufgrund der Eigenfluoreszenz der Zelllinie K562, die das Standardtarget für NK-Zellen darstellt, ist die Messung dieser Konjugate im FACS möglich. Werden die NK-Zellen mit CD56 APC und die T-Zellen mit CD3 PE gefärbt, sind nach der gemeinsamen Inkubation der PBMC und K562 im FACS vier Populationen erkennbar. Ungebundene NK-Zellen ( $\text{CD56}^+$ ) bzw. K562 ( $\text{FL1}^+$ ) befinden sich im ersten bzw. vierten Quadranten.  $\text{CD56}^+\text{FL1}^+$  stellen die Konjugate dar, die im zweiten Quadranten liegen. Im dritten Quadranten sind alle übrigen Zellen ( $\text{CD56}^-\text{FL1}^-$ ) (Abb.3). PBMC wurden mittels Ficoll isoliert, auf  $3 \times 10^6/\text{ml}$  eingestellt und anschließend  $100 \mu\text{l}$  dieser Zellsuspension für 24 h mit IL-2 und/oder IL-21 in einer Spitzbodenplatte stimuliert. Außerdem wurde die Zelllinie K562 mit frischem R10 gefüttert, damit sie sich zum Testzeitpunkt in der optimalen Wachstumsphase befand. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden die PBMC mit CD56 APC und CD3 PE gefärbt. Nach 20 Minuten wurden die Zellen zweimal gewaschen und wiederum in  $100 \mu\text{l}$  R10 resuspendiert. Die K562 wurden gezählt und auf  $1 \times 10^6/\text{ml}$  eingestellt. Von dieser Suspension wurden  $50 \mu\text{l}$  auf die Effektorzellen pipettiert, d.h.  $5 \times 10^4$  Zellen. Damit ergab sich eine E:T Ratio von 6:1. Um die Anlagerung der NK-Zellen an die Targetzellen zu unterstützen, wurden die Zellen 3 Minuten bei 200 g an zentrifugiert. Danach erfolgte die 15 minütige Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$ . Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert und zwar mit  $100 \mu\text{l}$  Pipettenspitzen, die an der Spitze um ca. 1 cm gekürzt waren. Dadurch sollten die Scherkräfte vermindert werden, die evtl. zur Trennung der Konjugate führen könnten. Die Proben wurden im FACS analysiert. Mit Hilfe der CD3-Färbung konnten die T-Zellen ausgeschlossen werden. Für die Analyse wurde auf  $\text{CD56}^{\text{dim}}$  und  $\text{CD56}^{\text{bright}}$  NK-Zellen gegatet.



**Abb.3 Konjugatbildungsassay**

Nach entsprechender Inkubationszeit von PBMC mit K562 wurden Konjugate zwischen den NK- und den Targetzellen gebildet. Die Analyse CD3<sup>+</sup> Zellen zeigte vier große Populationen im Dot Plot FL1/FL4. Im ersten bzw. vierten Quadranten lagen ungebundene NK- bzw. Targetzellen, im zweiten fanden sich die Konjugate und im dritten alle übrigen Zellen.

### 2.2.13 Detektion phosphorylierter Proteine im FACS

Zur Untersuchung von Signaltransduktionswegen sind Western Blot Analysen üblich. Diese Methode benötigt jedoch große Zellmengen, die vor allem bei den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen nur durch mehrfache Sortierungen und poolen verschiedener Spender erzielt werden könnten. Der Nachweis signaltransduzierender Moleküle im FACS bietet eine ausgezeichnete Alternative, da PBMC genutzt und damit aufwendige Sortierungen umgangen werden können. Ebenso wie beim Western Blot werden die Zellen mit den entsprechenden Stimuli etwa 1 h behandelt. Anschließend erfolgt die sofortige Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd. Die geringere Paraformaldehydkonzentration (2%) ermöglicht die nachträgliche Analyse des CD56-Moleküls. Anschließend werden die Zellen mit Saponin, 70%-igem oder 90%-igem Methanol aufgeschlossen. Die Art des Detergenz richtet sich nach den zu untersuchenden Signalmolekülen, so lassen sich laut Hersteller z.B. die STAT-Proteine nur mit 90% Methanol ausreichend aufspalten, damit der Antikörper sein Epitop erkennt. Letztendlich können die Zellen mit Antikörpern zur Detektion der Signal- und Oberflächenmoleküle gefärbt und ihre Expression im FACS analysiert werden.

Frisch isolierte PBMC wurden auf  $3 \times 10^6$ /ml eingestellt und 500 µl/Ansatz eine Stunde im Brutschrank (37°C) stehen gelassen, bevor sie mit den entsprechenden Stimuli für eine Stunde inkubiert wurden. Danach erfolgte die sofortige Fixierung, indem ein gleiches Volumen (500 µl) 4%-iges Paraformaldehyd auf die Zellsuspension gegeben wurde. Die Proben wurden 10 min bei 37°C inkubiert, gefolgt von einer 5-minütigen Zentrifugation bei 300 g. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet mit Hilfe des Rüttlers gelöst. Anschließend wurde 1 ml 90%-iges Methanol (eiskalt) pipettiert und die Röhrchen 30 min auf Eis stehen gelassen. Nach zwei Waschschrritten mit PBS/2% FCS wurde das Pellet in 100 µl dieses Puffers resuspendiert. Zur Analyse wurden je 20 µl IgG und der spezifischen Antikörper (gegen CD56, CD3 und pSTAT1, pSTAT3 oder pSTAT5)

hinzugegeben. Nach der Inkubation (30 min, RT) wurden die Zellen noch einmal gewaschen und das Pellet in 500 µl PBS/2% FCS aufgenommen, bevor die Messung im FACS erfolgte. Als Kontrollen dienten PBMC, die mit 10 ng/ml IFN $\gamma$  (pSTAT1) 5 ng/ml IL-6 (pSTAT3) oder 1000 U/ml IL-2 (pSTAT5) behandelt wurden.

### **2.2.14 Isolation eukaryotischer RNA**

Nach der Sortierung von NK-Zellen in zwei hochreine Populationen wurde sofort oder nach Stimulation mit PMA/Ionomycin die Gesamt-RNA mit dem RNeasy Micro Kit von Qiagen aufgereinigt. Die Kontroll-RNA wurde aus PBMC (ebenfalls aus Filtern isoliert) mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen isoliert. Die folgenden Abläufe wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei beiden Kits in gleicher Weise durchgeführt.

Zur Lyse wurden die Zellen in RLT Puffer aufgenommen (350 µl bis  $5 \times 10^6$  Zellen bzw. 600 µl bei Zellzahlen bis  $1 \times 10^7$ ). Diese Suspension wurde in eine Qiashredder™ Säule pipettiert und 2 min bei 13200 g zentrifugiert. Dabei wurden die Zellkompartimente nochmals aufgetrennt und Zelltrümmer beseitigt. Die aufgefangene Lösung (im folgenden Überstand genannt) wurde mit dem gleichen Volumen 70%-igen Ethanol vermischt, in die Qiagen Micro/Mini Säule pipettiert und anschließend 30 sec bei 9000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Säule mit 350 µl RW1 Puffer gewaschen (30 sec bei 9000 g). Anschließend erfolgte der DNase Verdau. 10 µl der RNase freien DNase wurde mit 70 µl RDD Puffer gemischt und diese 80 µl auf die Membran der Säule pipettiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT wurde die Säule noch einmal mit 350 µl RW1 Puffer gewaschen. Danach wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß gestellt und mit 500 µl RPE Puffer gewaschen (30 sec, 9000 g). Der zweite Waschschrift erfolgte bei der Mini Säule ebenfalls mit RPE und bei der Micro Säule mit 80%-igem Ethanol (2 min, 13200 g). Die Säule wurde noch einmal in ein neues Reaktionsgefäß gestellt und 1 min bei 13200 g zentrifugiert. Die Eluierung erfolgte mit Wasser (PCR Grade; 14 µl bei der Micro Säule bzw. 30-50 µl bei der Mini Säule) in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß. Die aufgereinigte RNA wurde bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren.

### **2.2.15 Prüfen der RNA-Qualität im Agilent-Bioanalyzer**

Um die Qualität der isolierten RNA zu kontrollieren und einen Überblick über die isolierte Menge zu erhalten, wurde der Agilent 2100 Bioanalyzer verwendet.

Zur Analyse der RNA stehen verschiedene Chips zur Verfügung. Für geringe RNA-Mengen (bis 2 ng) wird der PicoChip verwendet. Bei größeren Mengen ist die Nutzung des weniger sensitiven NanoChips sinnvoll. Alle Chips bestehen aus zwei miteinander

verbundenen Glasschichten, von denen die eine Mikrokapillaren besitzt und die andere 16 Löcher. Die Glas-Chips sind von einem Plastikmantel umgeben, der 16 Wells zur Verfügung stellt. Drei von diesen Wells werden mit einem Gel-Farbstoff-Mix gefüllt. Das Gel wird in die Kapillaren gepresst, die an die Wells angeschlossen sind. Die anderen Wells werden mit Puffer (Marker) beladen bzw. im Falle des PicoChip eines mit der sog. Conditioning Solution. Diese ist notwendig um zwischen Farbstoff, RNA und Wand des Separationskanals einen Ausgleich zu schaffen. Bei dem NanoChip erfolgt dies durch den Standard (Leiter), kann aber aufgrund der geringen RNA-Mengen beim PicoChip nur mit einer zusätzlichen Conditioning Solution gewährleistet werden. Eines der Wells wird mit dem Standard beladen. Befindet sich der fertig präparierte Chip im Gerät, gelangt in jedes Well eine kleine Elektrode, die in der Lage ist, über elektrokinetische Kräfte die Probe durch die Kapillare wandern zu lassen, die dann in die Separationskapillare ragt. Dort wird die Probe elektrophoretisch aufgetrennt. Der Inhalt wird über ein Fluoreszenzsignal ermittelt und in einem Gelbild sowie als Elektropherogramm (peaks) dargestellt.

### 2.2.15.1 Gelpräparation für die Analyse im Agilent-Bioanalyser

Für die Auftrennung der Proben wurde ein spezielles Gel in den Chip pipettiert. Dieses musste zunächst filtriert werden. Dazu wurden 550 µl der Gel-Matrix in einen Filter pipettiert und anschließend 10 min bei 1500 g zentrifugiert. Das filtrierte Gel wurde in Aliquots à 65 µl aufgeteilt und konnte so maximal vier Wochen bei 4°C gelagert werden. Für die Analyse wurde 65 µl Gel-Matrix mit 1 µl Farbstoff gemischt, gerüttelt und 10 min bei 13000 g zentrifugiert. 60 µl des Überstandes wurden abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### 2.2.15.2 Beladen des PicoChips

Ein neuer Chip wurde in die Priming Station gelegt. Zu Beginn wurde 9 µl Gel-Farbstoff-Gemisch in das Well mit der Bezeichnung „G“ pipettiert. Anschließend wurde die Priming Station geschlossen und mittels Druck das Gel in die Kapillare gepresst (30 sec). Danach wurden die anderen beiden „G“-gekennzeichneten Wells ebenfalls mit 9 µl Gel-Farbstoff-Gemisch befüllt und 9 µl Conditioning Solution in das entsprechende Well („CS“) gegeben. In alle anderen Wells inklusive Leiter wurden 5 µl des Markers (Puffer) pipettiert. Jeweils 1 µl RNA-Probe bzw. Leiter wurde den entsprechenden Wells hinzugefügt. Der Chip wurde dann 1 min kräftig auf einem speziell dafür angefertigten Schüttler resuspendiert, bevor die Analyse im Agilent-Bioanalyser durchgeführt wurde.

## 2.2.16 Two Step RT-qPCR

### 2.2.16.1 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird mRNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Bei den reversen Transkriptasen Sensiscript und Omniscript handelt es sich um rekombinante heterodimere Proteine, die in *E. coli* exprimiert werden. Nach der spezifischen Bindung des Oligo-dT16 Primer an die Poly-Adenosin-Sequenz jeder mRNA kann die reverse Transkriptase diesen verlängern und die RNA-Sequenz in die komplementäre DNA-Sequenz umwandeln. Die entstandenen cDNA-Moleküle enthalten nun die Informationen wie stark welche Gene der betreffenden Zellen aktiv sind.

Je 20 µl Ansatz wurde folgendes pipettiert:

2,0 µl	10xRT Puffer
2,0 µl	dNTP Mix (0,5 mM je dNTP)
1,0 µl	oligo dT16
0,5 µl	RNase Inhibitor (20 U/µl)
1,0 µl	Sensiscript Reverse Transkriptase
13,5 µl	RNA

Das folgende Programm wurde verwendet:

60 min	37°C
hold	4°C

Die cDNA wurde bei -80°C eingefroren.

### 2.2.16.2 Sonden-PCR (nach TaqMan™)

Zur quantitativen RT-qPCR nach TaqMan™ benötigt man neben den spezifischen Primern der herkömmlichen PCR eine ebenfalls spezifische, fluorogene Sonde, die zwischen den beiden Primern lokalisiert ist und eine besonders hohe Spezifität der PCR bedingt. Die Sonde ist an ihrem 5'-Ende mit einem kovalent gebundenen fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat, FAM) markiert. Das 3'-Ende trägt einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat, TAMRA), der über ein Linker-Arm modifiziertes Nukleotid (LAN) gebunden ist. Außerdem wird es über einen Phosphatrest

blockiert und kann daher nicht verlängert werden. Bei einer Wellenlänge von 488 nm wird die Sonde zur Fluoreszenz angeregt. Durch einen Fluoreszenzenergie-Transfer (FRET) wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher unterdrückt und kein Signal detektiert. Die spezifische Sonde und die Primer hybridisieren während der PCR an das Template. Im Verlauf der Extensionsphase verlängert die Taq-Polymerase die Primer und synthetisiert einen komplementären DNA-Strang. Dabei trifft sie auf die Sonde, die sie durch ihre 5'-3' Exonukleaseaktivität abbaut. Auf diese Weise wird die Nähe von Reporter und Quencher und damit auch FRET aufgehoben. Am Ende der Extension erfolgt die Detektion mit einer Wellenlänge von 488 nm. Mit der Akkumulation von PCR-Produkt steigt somit die Fluoreszenz des Reporters in der Probe an. Da nicht oder nur schlecht gebundene Sonden nicht geschnitten werden, ist das ansteigende Signal sequenzspezifisch und kann anschließend ausgewertet werden.

Der Ansatz für ein Gesamtvolumen von 25 µl umfasste:

12,5 µl	Universal Mix
1,0 µl	Primer vorwärts (10 µM)
1,0 µl	Primer rückwärts (10 µM)
1,0 µl	Sonde (5 µM)
2,5 µl	cDNA
7,0 µl	H <sub>2</sub> O

und das folgende Programm wurde verwendet:

2 min	50°C	} 50x
10 min	95°C	
15 sec	95°C	
1 min	60°C	

### 2.2.16.3 RT-qPCR mit SYBR Green

SYBR Green, ein interkalierender Farbstoff, lagert sich im Verlauf der Amplifikation in den DNA-Doppelstrang ein. Dadurch wird die Fluoreszenz messbar erhöht und nimmt proportional mit der Menge doppelsträngiger DNA im Verlauf der Reaktion weiter zu. Am Ende erfolgt eine Schmelzkurvenanalyse, um eventuelle unspezifische Nebenprodukte sichtbar zu machen. Dabei wird die Temperatur des Reaktionsansatzes in 30 sec

Schritten um jeweils 0,5°C erhöht. Ist der Schmelzpunkt des Produktes erreicht, nimmt die Fluoreszenz stark ab bis sie nicht mehr detektierbar ist. Sind alle Produkte geschmolzen, ist die Reaktion beendet.

Der Ansatz für ein Gesamtvolumen von 25 µl umfasste:

12,5 µl	SYBR Green Supermix
0,625 µl	Primer vorwärts (10 µM)
0,625 µl	Primer rückwärts (10 µM)
2,0 µl	cDNA
9,25 µl	H <sub>2</sub> O

und das folgende Programm wurde verwendet:

3 min	90°C	
10 sec	95°C	} 40x
45 sec	60°C	
1 min	95°C	
1 min	60°C	
10 sec	60°C (+0,5°C)	80x

#### 2.2.16.4 Auswertungen

Zur Auswertung der RT-qPCR kann eine absolute oder relative Quantifizierung vorgenommen werden. Für die absolute Quantifizierung muss eine Standardreihe mit bekannten RNA-Mengen oder Kopienzahlen erstellt werden. Bei der relativen Quantifizierung wird die Menge der Zielsequenz auf das Signal einer anderen Sequenz bezogen. Zur Berechnung können die Standardkurvenmethode und die delta ( $\Delta$ ) ct-Methode genutzt werden. Letztere benötigt zwar keine Standardreihe, kann aber nur angewandt werden, wenn die PCR-Effizienzen der experimentellen Proben und der Referenz nahezu identisch sind.

##### A) Standardkurvenmethode

Hierbei werden zunächst die Werte der experimentellen Proben durch die Werte der Referenz dividiert (Normalisierung). Anschließend wird der Wert einer experimentellen Probe (z.B. der höhere oder die unbehandelte Probe) als Kalibrator definiert. Jeder normalisierte Wert wird durch den des Kalibrators dividiert und so der relative Wert jeder Probe ermittelt.

## B) $\Delta$ ct-Methode

Zunächst erfolgt die Normalisierung gegen die Referenz, wobei der  $\Delta$ ct-Wert erhalten wird ( $(\text{mittlerer ct-WertProbe}) - (\text{ct-WertReferenz}) = \Delta\text{ct}$ ). Anschließend wird eine Probe als Kalibrator festgelegt. Dieser  $\Delta$ ct-Wert wird von dem der Proben subtrahiert ( $\Delta\text{ctProbe} - \Delta\text{ct Kalibrator} = \Delta\Delta\text{ct}$ ). Die relative Menge der Zielsequenz (normalisiert mit der Referenz) zum Kalibrator beträgt dann  $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ .

Für alle PCRs diente Actin als endogene Referenz, um Unterschiede in der Gesamtmenge der RNA auszugleichen (normalisieren). Außerdem wurde für jedes zu untersuchende Transkript eine Standardreihe mit der cDNA ruhender oder aktivierter (für die Untersuchung der Zytokin-RNA) PBL angefertigt, mit deren Hilfe die relative Quantifizierung durchgeführt werden konnte. In den meisten Fällen wurde die Standardkurvenmethode zur Auswertung genutzt.

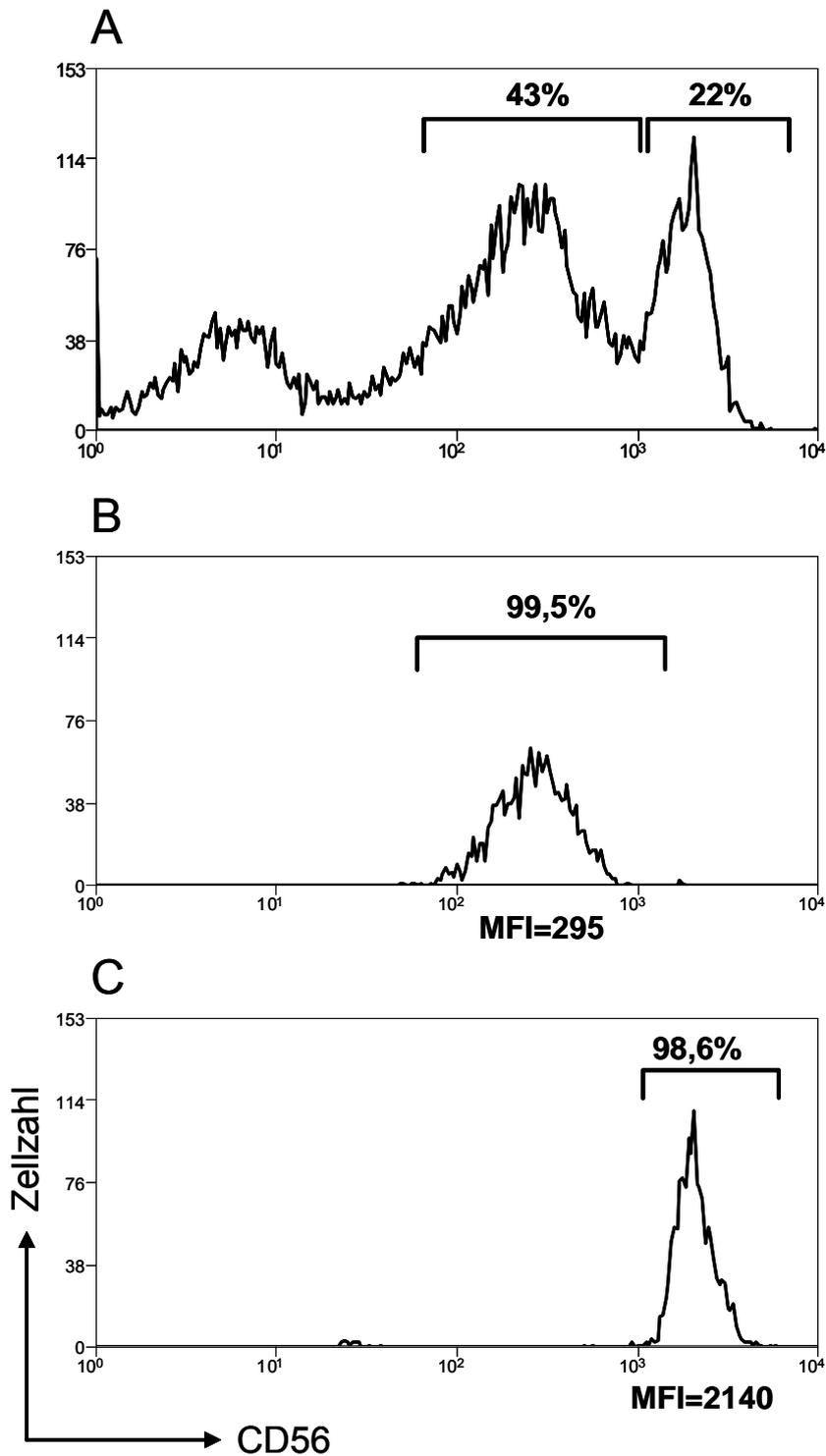
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Expressionsanalysen auf RNA- und Proteinebene

#### 3.1.1 Sortierung von NK-Zellsubpopulationen

Für die Expressionsanalysen der CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen war deren Separation notwendig. Um möglichst viel Ausgangsmaterial zu erhalten, wurden Leukozytenfilter genutzt. Aus den einzelnen Filtern wurden durch Dichtegradientenzentrifugation zwischen 200 und 700 Millionen PBMC gewonnen, die ca. 0,5-1% CD56<sup>bright</sup> und 8-15% CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen enthielten (nicht gezeigt). Anhand der Expression von CD25, CD69 und HLA-DR wurde gezeigt, dass weder die NK- noch die T-Zellen aus den Filtern einen höheren Aktivierungsstatus aufwiesen als Zellen, die standardmäßig aus dem heparinisierten Blut von Normal Spendern gewonnen wurden (nicht gezeigt).

Zur Beschleunigung der FACS-Separation wurde eine Depletion der T-Zellen (CD3<sup>+</sup>), B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) und Monozyten durchgeführt. In einigen Proben waren trotz Gradientenzentrifugation noch Granulozyten vorhanden, die mittels CD15-Beads entfernt wurden. Die angereicherten NK-Zellen enthielten 43% CD56<sup>dim</sup> und 22% CD56<sup>bright</sup> (Abb.4A). Die NK-Zellsubpopulationen wurden im FACStar<sup>Plus</sup> voneinander getrennt. Die anschließende Reanalyse erbrachte eine Reinheit der CD56<sup>dim</sup> (Abb.4B) und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (Abb.4C) von 96%-99%. Proben, die eine Kontamination mit der jeweils anderen Subpopulation oder anderen Lymphozyten enthielten, wurden verworfen.

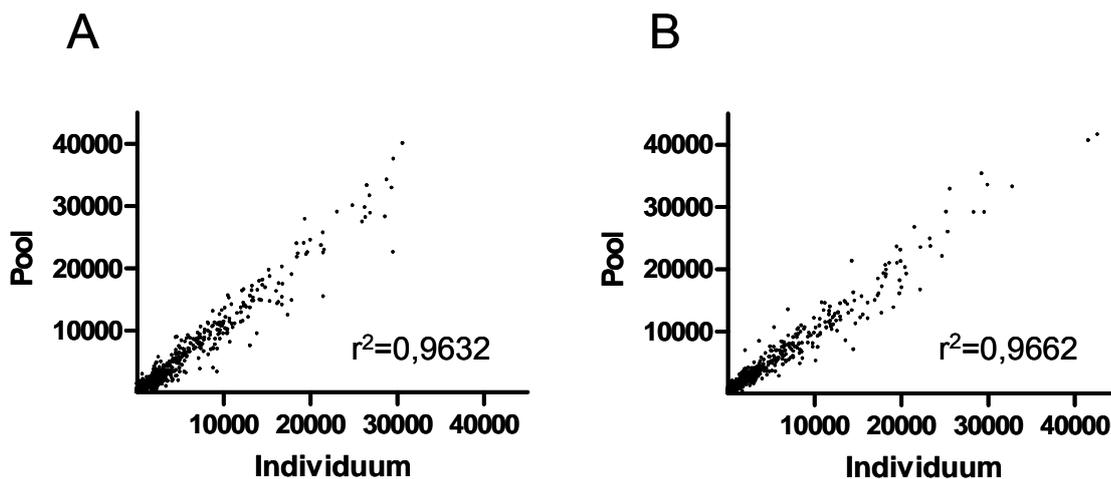


**Abb.4** Reanalyse nach magnetischer Depletion und Separation im FACStar<sup>Plus</sup>

Eine repräsentative FACS-Analyse nach magnetischer Depletion der T- und B-Zellen, Monozyten und Granulozyten zeigt eine deutliche Anreicherung der NK-Zellen. Die Angaben beziehen sich auf den Anteil der jeweiligen Population innerhalb der NK-Zellen (A). Nach Separation der NK-Zellsubpopulationen im FACS erhält man hochreine CD56<sup>dim</sup> (B) und CD56<sup>bright</sup> (C) NK-Zellen.

### 3.1.2 Affymetrix Genechips

Zur Untersuchung der Expressionsmuster von CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen wurden die Arrays U133A und U133B von Affymetrix verwendet. Beide Arrays umfassten zusammen 39000 Transkripte, die 30000 Gene repräsentieren. Die Analyse ruhender NK-Zellsubpopulationen wurde mit der RNA eines Individuums sowie eines Pools von 10 verschiedenen Spendern durchgeführt. In diesem Pool wurden äquimolare Mengen der RNA eines jeden Spenders eingesetzt. Um individuelle Eigenschaften des Einzelspenders oder Eigenheiten des Pools auszuschließen, wurden die Werte beider Analysen in einem Dot Blot gegeneinander dargestellt und analysiert. Die hohe Korrelation beider Experimente von CD56<sup>dim</sup> ( $r^2=0.9632$ ) (Abb.5A) und CD56<sup>bright</sup> ( $r^2=0.9662$ ) NK-Zellen (Abb.5B), führte zu der Entscheidung in weiteren Versuchen gepoolte RNA zu verwenden. Dies ermöglichte, vor allem von den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen ausreichend Analysematerial zu gewinnen, um messbare Signale zu erhalten.

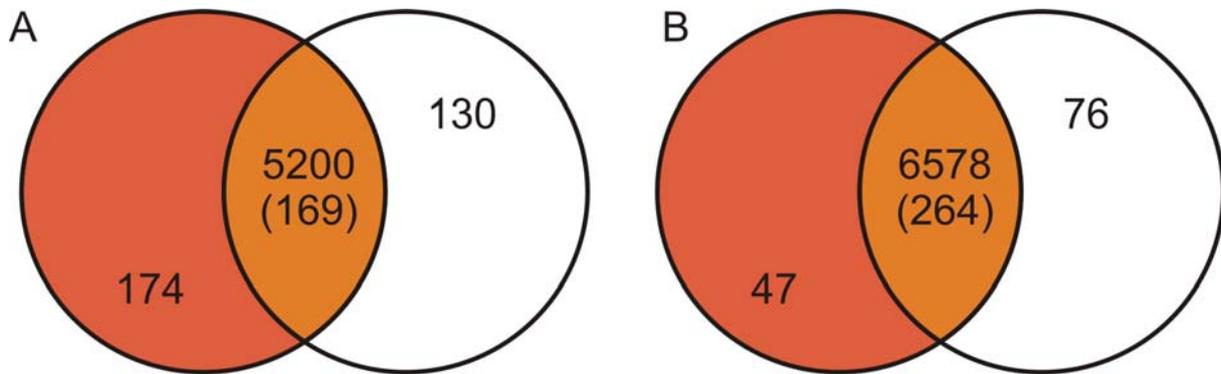


**Abb.5 Korrelation der Genearraydaten eines Individuums und eines Spender-Pools**

Es wurden Genearrays mit der cDNA eines Individuums und eines Pools von 10 verschiedenen Spendern analysiert. Die Signale der entsprechenden Sonden-Sets wurden für CD56<sup>dim</sup> (A) und CD56<sup>bright</sup> (B) NK-Zellen gegeneinander dargestellt. Die Korrelation ( $r^2$ ) wurde mit GraphPad Prism-Software berechnet.

Um die Reinheit der sortierten Subpopulationen zu prüfen, wurden Transkripte analysiert, die spezifisch für andere Leukozyten sind. T-Zellspezifische Moleküle wie CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\gamma$ , CD4 und CD8 $\beta$ 1 waren nicht in den Proben nachweisbar. CD3 $\zeta$ , das z.B. mit CD16 assoziiert und CD8 $\alpha$ , das auf einer geringen Zahl von NK-Zellen exprimiert wird, konnten auch auf RNA-Ebene detektiert werden. Transkripte für CD14 bzw. CD19, die spezifisch für Monozyten bzw. B-Zellen sind, wurden ebenfalls nicht in den Proben gefunden (nicht gezeigt).

In ruhenden CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen waren 5200 Transkripte detektierbar, von denen 169 in der einen oder der anderen Subpopulation signifikant höher exprimiert waren. Insgesamt unterschieden sie sich signifikant in 473 Transkripten. Es wurden innerhalb der Gesamtheit der NK-Zellen 174 Gene ausschließlich von den CD56<sup>dim</sup> und 130 nur von den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimiert (Abb.6A).



**Abb.6 Anzahl der exprimierten Transkripte in ruhenden und aktivierten NK-Zellsubpopulationen**

Bei ruhenden NK-Zellen (A) wurden 39000 Transkripte, bei aktivierten (B) 20000 Transkripte untersucht. Die Anzahl der Transkripte, die ausschließlich in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen präsent waren, sind im dunklen Kreis und jene, die nur in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen zu finden waren, im hellen Kreis dargestellt. Die Schnittfläche kennzeichnet Transkripte, die in beiden Subpopulationen vorhanden sind. Innerhalb dieser Gruppe sind Transkripte signifikant unterschiedlich in CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimiert (Zahl in Klammern). Transkripte, die nicht in den NK-Zellsubpopulationen detektiert wurden, sind nicht dargestellt.

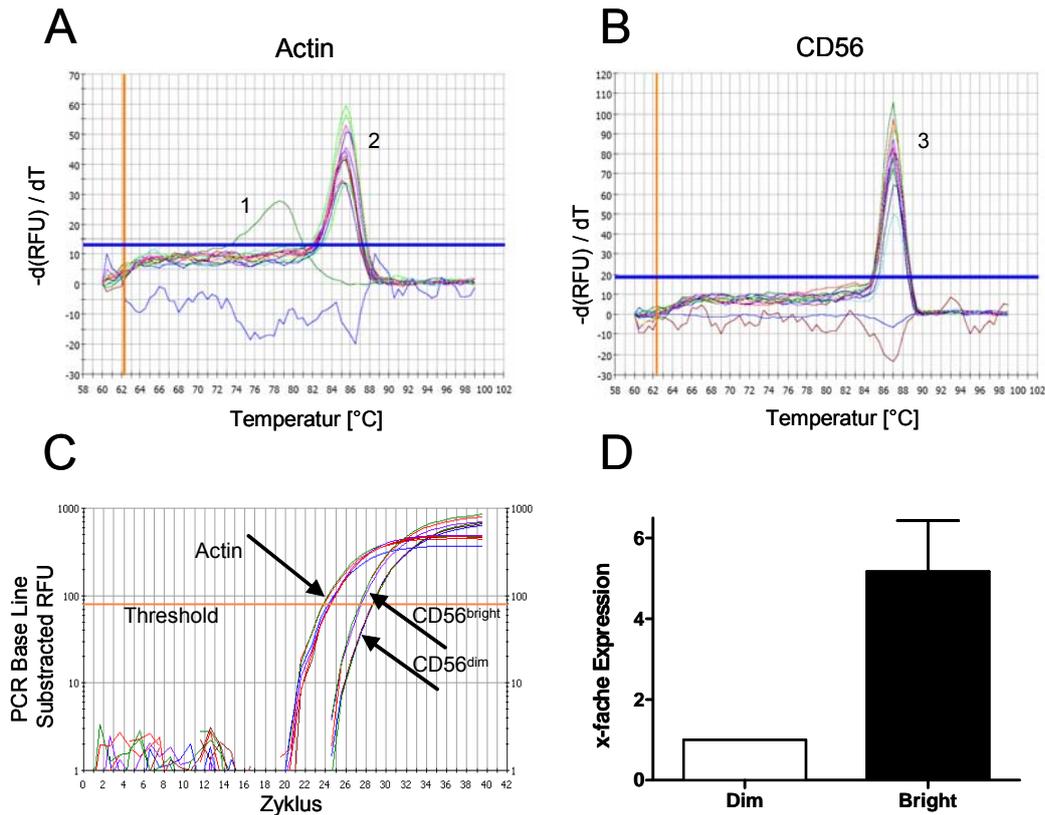
Für die Untersuchung von aktivierten NK-Zellsubpopulationen wurden PMA und Ionomycin als Stimulus gewählt. Dabei handelt es sich zwar um eine nicht-physiologische Aktivierung, bei der aber keine Oberflächenrezeptoren involviert sind und somit alle Zellen gleichermaßen aktiviert werden. PMA induziert die Protein Kinase C (PKC) und Ionomycin ist ein Calciumionophor, das die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> in der Zelle bewirkt. Die Stimulation von NK-Zellsubpopulationen über andere Rezeptoren wie CD16 und CD2 wurde nicht in Betracht gezogen, da diese in verschiedenem Maße von den Subpopulationen exprimiert werden und somit auch zu unterschiedlichen Reaktionen führen würden.

Die sortierten CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen wurden somit für 48 Stunden mit PMA/Ionomycin stimuliert. Ein RNA-Pool von sieben verschiedenen Spendern (äquimolare Mengen) wurde mit dem Array U133A untersucht. Hier fanden sich 6578 Transkripte, die beide Subpopulationen exprimierten. Von den 387 Transkripten mit signifikant unterschiedlicher Expression waren 264 in beiden Subpopulationen vorhanden, 47 allein in den CD56<sup>dim</sup> und 76 nur in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (bezogen auf die Gesamtheit der NK-Zellen) (Abb.6B).

### 3.1.3 Oberflächenmoleküle

#### 3.1.3.1 CD56 (NCAM)

Das Adhäsionsmolekül CD56 (NCAM) ist entscheidend, um NK-Zellen von den T-Zellen sowie die beiden NK-Zellsubpopulationen voneinander abzugrenzen. Daher wurde die Expression dieses Moleküls auch auf mRNA Ebene untersucht. Die Genearrays zeigten eine höhere Expression des NCAM in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen. Diese Ergebnisse wurden zusätzlich in der RT-qPCR verifiziert, die mit dem interkalierenden Farbstoff SYBR-Green und mit  $\beta$ -Actin als Referenz durchgeführt wurde. Bei der Schmelzkurvenanalyse trat das Actinprodukt bei 85,5°C und das CD56-Produkt bei 87°C auf (Abb.7A, B). Die PCR-Effizienzen unterschieden sich nur geringfügig und lagen für Actin bei 87,8% und für CD56 bei 91,8% (nicht gezeigt). Die logarithmische Darstellung der PCR offenbarte, dass die Proben der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen etwa 1,3 Zyklen vor den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen den Threshold überschritten (Abb.7C). Dies wies auf eine höhere CD56-Expression durch die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen hin. Eine konkrete Aussage konnte erst nach Normalisierung der Werte mit Hilfe der Referenz (Actin) getroffen werden. Aufgrund der ähnlichen PCR-Effizienzen konnten in diesem Beispiel die Standardkurven- oder die  $\Delta$ ct-Methode zur Auswertung angewandt werden. Mit Hilfe der Standardkurvenmethode wurde eine 3,2-fach und mit der  $\Delta$ ct-Methode eine 3,7-fach höhere Expression von CD56 in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen errechnet. Vier unabhängige Versuche ergaben durchschnittlich eine 5,1-fach höhere Expression von CD56 in den CD56<sup>bright</sup> als in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen (Abb.7D). Auf Proteinebene ergab die FACS-Analyse eine 5-10 fach höhere Expression auf CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen und bestätigt damit die Genearray und RT-qPCR Daten.



**Abb.7 Analyse der CD56-Expression mittels RT-qPCR**

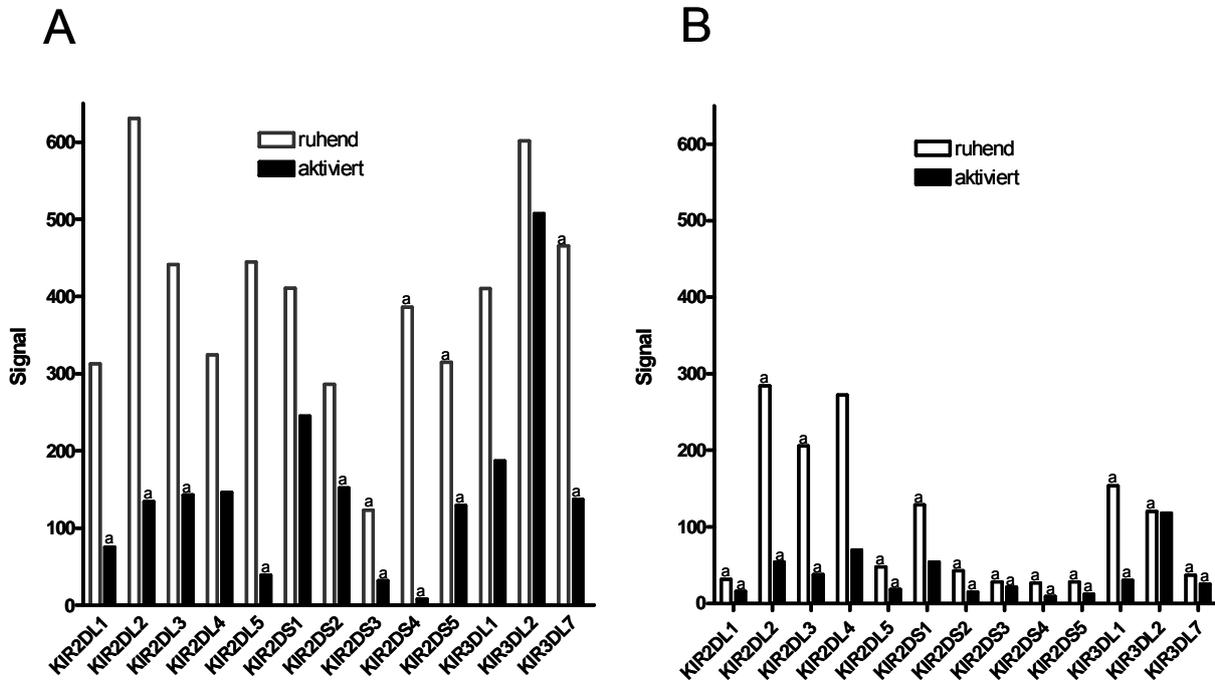
Die Schmelzkurven zeigen einen spezifischen Peak (2) und ein Primerdimer (1) für die Actin-PCR (A) sowie ein spezifisches Produkt (3) bei der CD56-PCR (B). In der logarithmischen Darstellung sind die Graphen einer repräsentativen PCR zu sehen (C). Während der exponentiellen Phase entsteht eine Gerade, durch die der Threshold gelegt wird, d.h. der Zeitpunkt bestimmt wird, bei dem die Proben das Hintergrundsignal übertreffen. Vier unabhängige Versuche zeigen eine höhere Expression des CD56-Moleküls bei den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (D).

### 3.1.3.2 Killer Cell Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIRs)

Die stark homologen Rezeptoren der KIR-Familie wurden mittels Genearray und RT-qPCR analysiert. Die Arrays zeigten, dass sowohl die aktivierenden, als auch die inhibierenden Rezeptoren fast ausschließlich (z.B. KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DS1) von ruhenden CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen exprimiert wurden. Eine Ausnahme stellte KIR2DL4 dar, dessen Transkript in signifikant größerer Menge in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen nachweisbar war. Für die Analyse der Expression eines Moleküls wurde bei dieser und allen weiteren ein repräsentatives Sonden-Set gewählt, dessen Signale bei CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> bzw. ruhenden und aktivierten NK-Zellen verglichen wurden.

Nach Aktivierung mit PMA/Ionomycin wurde in beiden Zellsubpopulationen die KIR mRNA herunterreguliert und nur noch wenige Transkripte (KIR2DS1, KIR2DL4, KIR3DL1, und KIR2DL3) zeigten Signale, die den Hintergrundlevel überschritten. Basierend auf dem Affymetrix-Algorithmus wurden die übrigen als abwesend (absent (a))

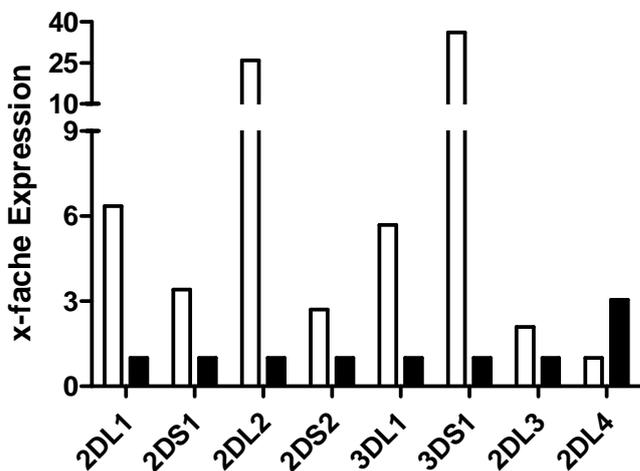
gewertet. Die Expression der detektierten Transkripte verblieb in den CD56<sup>dim</sup> höher als in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (Abb.8). FACS-Analysen derartig aktivierter PBMC offenbarten keinerlei Änderungen in der Expression dieser Rezeptoren auf der Zelloberfläche.



**Abb.8 Expression von KIRs in ruhenden und aktivierten CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen**

Für die Untersuchung der Genexpression von ruhenden (□) und aktivierten (■) NK-Zellen und der Unterschiede zwischen CD56<sup>dim</sup> (A) und CD56<sup>bright</sup> (B) wurde hier und in allen weiteren Experimenten jeweils das entsprechende Sonden-Set ausgewählt, dessen Signale verglichen wurden. Außerdem sind die Balken der Transkripte, die als abwesend bewertet wurden, mit einem „a“ für absent markiert.

Auch mittels der RT-qPCR konnten alle KIRs hauptsächlich in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen detektiert werden. Die inhibierenden Formen KIR2DL2 und KIR2DL1 wurden etwa 25-fach bzw. 6-fach höher von dieser Subpopulation exprimiert. Im Gegensatz dazu wurde ca. dreimal mehr KIR2DL4-Transkript in den CD56<sup>bright</sup> detektiert (Abb.9).



**Abb.9 Validierung der KIR-Genexpression mittels RT-qPCR**

In unabhängigen Versuchen wurden die Ergebnisse der Genearrays mittels RT-qPCR validiert. Die x-fache Expression wurde nach der Standardkurvenmethode berechnet. Die Mittelwerte zur Expression verschiedener KIRs in CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen (□) und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (■) ist gezeigt.

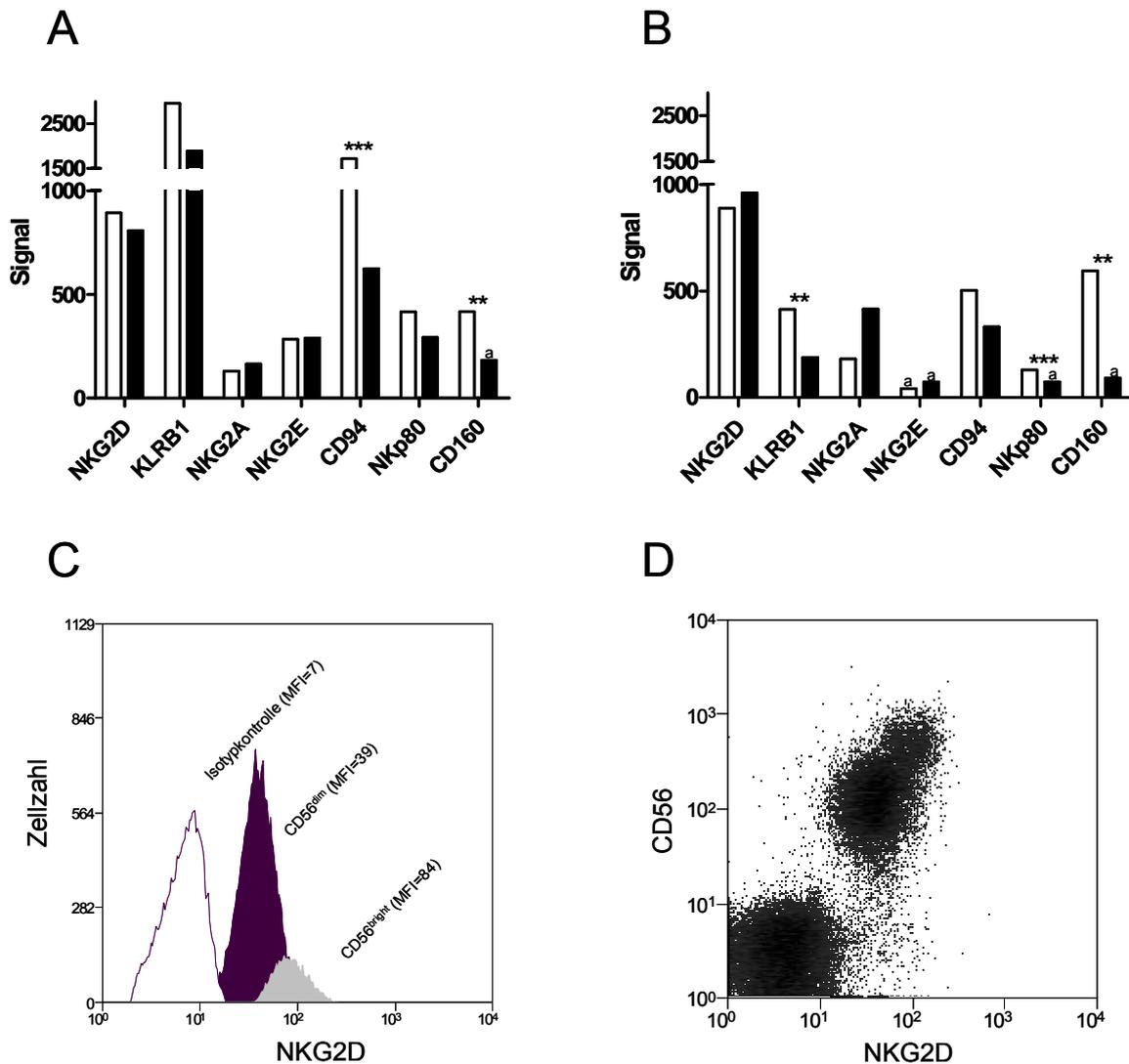
Die Spezifität für jedes einzelne KIR-Molekül konnte erst mit einer Sonde erreicht werden, die es ermöglichte auch die sich jeweils nur im intrazellulären Anteil des Moleküls unterscheidenden inhibierenden und aktivierenden Iso-Formen voneinander zu unterscheiden, ohne gleichzeitig zwei Rezeptoren zu detektieren. Die Spezifität der PCRs wurde in Agarosegelen überprüft (nicht gezeigt).

#### 3.1.3.3 Lektin-ähnliche Rezeptoren (killer cell lectin-like receptors, KLRs)

Eine andere Gruppe NK-Zellspezifischer Rezeptoren, die KLRs, wurden ebenfalls mit den Genearrays untersucht. NKG2D, NKG2A und KLRB1 (CD161) wurden von beiden NK-Zellsubpopulationen etwa gleich stark exprimiert. CD94, welches u. a. mit NKG2A und NKG2C assoziiert, zeigte in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen signifikant schwächere Signale als in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen ( $p < 0,001$ ). CD160 (BY55) wurde ausschließlich in dieser Subpopulation exprimiert ( $p < 0,01$ ) (Abb.10A).

Nach Aktivierung wurden diese Rezeptoren stark herunterreguliert. Die Signale für KLRB1 fielen von 2000 auf 180 in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen und von knapp 3000 auf 400 in den CD56<sup>dim</sup>, die nun eine signifikant höhere KLRB1-Expression besaßen ( $p < 0,01$ ). Bezüglich CD160 konnte keinerlei Änderung der Expressionslevel in den Subpopulationen festgestellt werden. CD94, ebenso wie NKG2D und NKG2A, wurden nun von beiden NK-Zellsubpopulationen gleich exprimiert. NKG2E wurde soweit reduziert, dass die spezifische mRNA dieses Moleküls nicht mehr detektierbar war und deshalb nur noch Hintergrundsignal gemessen wurde (Abb.10B).

Die FACS-Analyse von NKG2D zeigte, dass alle NK-Zellen diesen Rezeptor auf der Oberfläche trugen, wobei eine höhere mittlere Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity, MFI) bei den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen vorlag (Abb.10C, D).



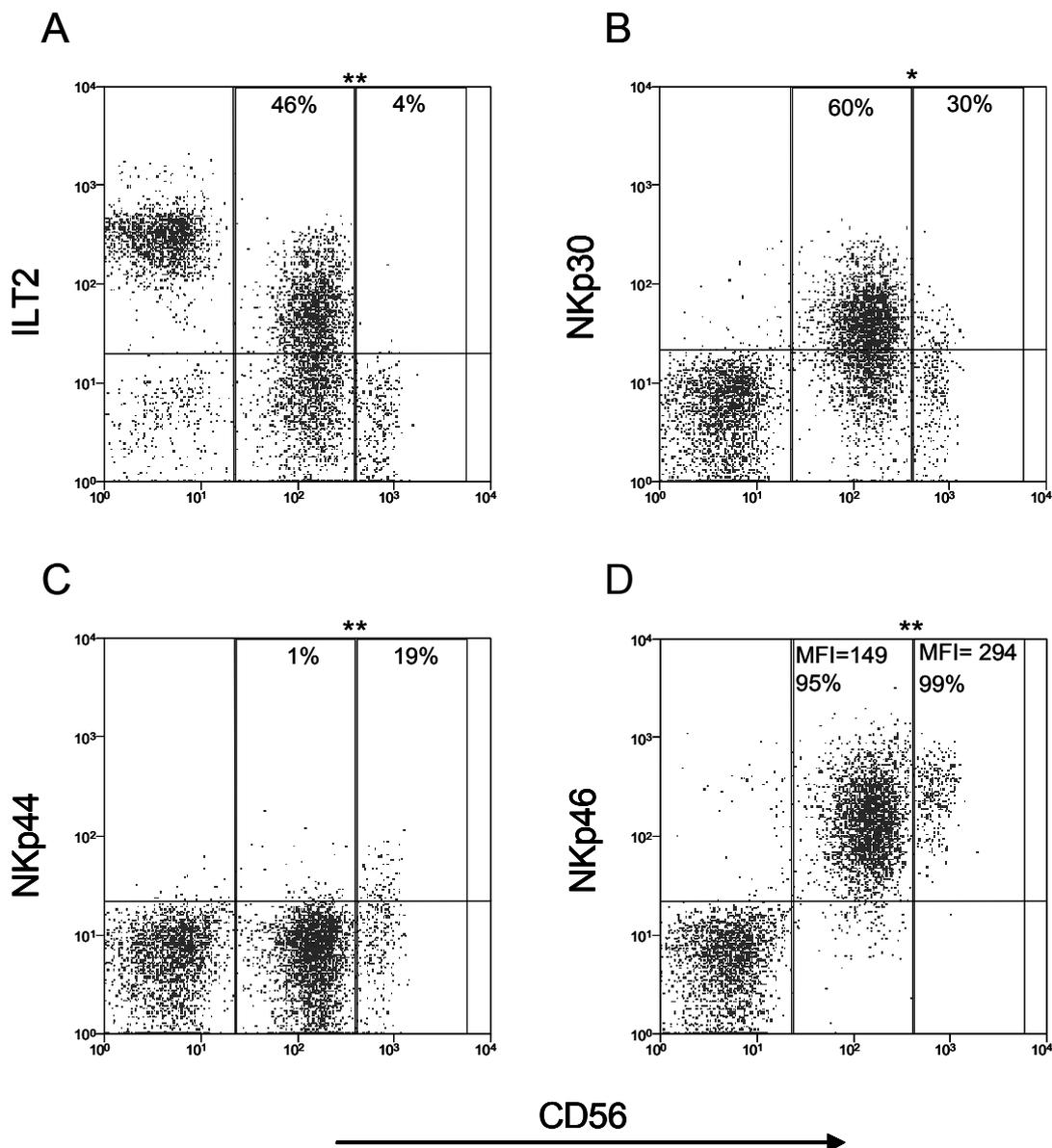
**Abb.10 Expression lektin-ähnlicher Rezeptoren**

Die Signalstärken KLR-spezifischer Sonden nach Hybridisierung mit cDNA ruhender (A) und aktivierter (B) CD56<sup>dim</sup> (□) und CD56<sup>bright</sup> (■) NK-Zellen ist dargestellt. Die Signifikanzen wurden nach dem Affymetrix-Algorithmus berechnet (\*\* = B =  $p < 0,01$ , \*\*\* = A =  $p < 0,001$ ; a=absent). Das Histogramm (C) und der Dot Blot (D) zeigen ein repräsentatives Beispiel der NKG2D-Expression auf CD3<sup>+</sup> Lymphozyten. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) auf CD56<sup>dim</sup>, CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen und der entsprechenden Isotypkontrolle sind im Histogramm angegeben.

### 3.1.3.4 Natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren (NCRs)

Bezüglich der Expression der NCRs traten Diskrepanzen zwischen den Genearrays und den FACS-Analysen auf. In den Genearray-Analysen war nur NKp80 detektierbar. Dieser wurde in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen nach Aktivierung komplett herunterreguliert (Abb.10A, B). Die Transkripte der anderen NCRs konnten weder in ruhenden noch aktivierten sortierten NK-Zellen nachgewiesen werden, waren aber teilweise auf der Oberfläche dieser Zellen vorhanden (Abb.11).

Das Immunglobulin-ähnliche Transkript (ILT)2 wurde ausschließlich von den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen exprimiert, für das 46% dieser Subpopulation positiv waren ( $p < 0,01$ ) (Abb.11A). NKp30 wurde ebenfalls überwiegend von den CD56<sup>dim</sup> auf der Oberfläche getragen (60%), aber auch von einem geringen Teil der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (30%) ( $p < 0,05$ ) (Abb.11B). NKp44 wurde nur auf 19% der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen detektiert ( $p < 0,01$ ), während NKp46 auf allen ruhenden NK-Zellen exprimiert wurde (Abb.11C, D). Hier unterschieden sich die beiden NK-Zellsubpopulationen jedoch in der MFI, die signifikant höher bei den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen war ( $p < 0,01$ ).



**Abb.11 NCRs auf der Oberfläche von NK-Zellsubpopulationen**

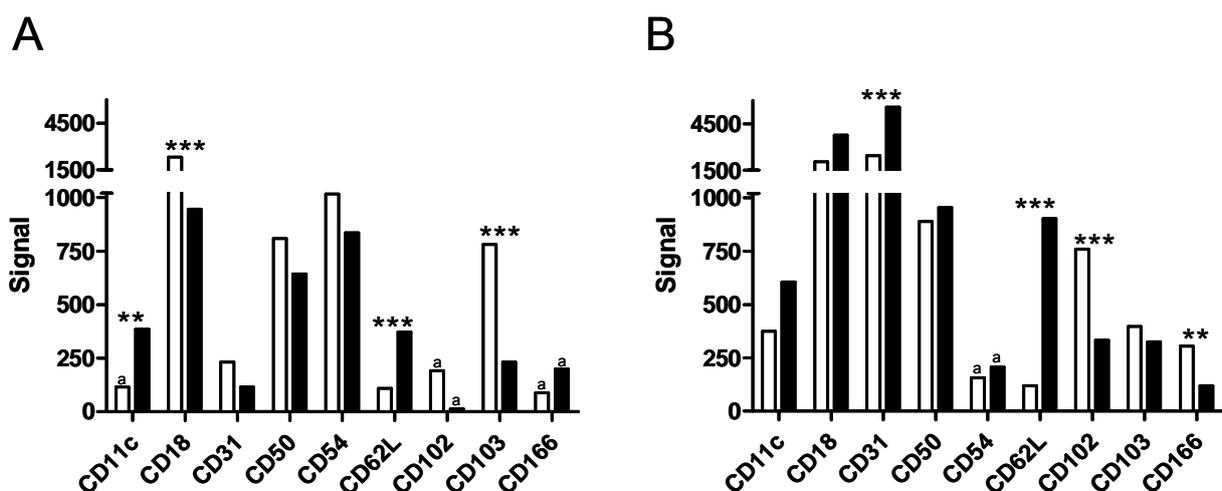
In FACS-Analysen ruhender CD3<sup>+</sup> Lymphozyten wurde die Oberflächenexpression von NCRs untersucht. Die prozentualen Angaben sind Mittelwerte sechs unabhängiger Versuche und beziehen sich auf die receptorexprimierenden Zellen innerhalb der CD56<sup>dim</sup> oder CD56<sup>bright</sup> Subpopulation. Diese waren für ILT2 (A), NKp30 (B) und NKp44 (C) signifikant. NKp46 (D) war bezüglich der MFI signifikant höher auf den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimiert. (\*\*= $p < 0,01$ , \*= $p < 0,05$ )

## 3.1.3.5 Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmoleküle werden von einer Vielzahl von Zellen exprimiert. Sie sind entscheidend beim direkten Zellkontakt zwischen Target- und Effektorzellen oder den Epithelzellen und Lymphozyten bei deren Wanderung durch die Gewebe.

Die Expression von CD62L (L-Selektin) auf NK-Zellen wurde bereits beschrieben [96]. Die Genexpressionsanalysen bestätigten diese Proteindaten und zeigten eine signifikant höhere Expression in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen. Andere Adhäsionsmoleküle wie CD31 (PECAM1), CD54 (ICAM1) und CD50 (ICAM3) wurden von beiden Subpopulationen etwa gleich stark exprimiert. Während für CD11c signifikant höhere Signale in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen nachweisbar waren, wurden CD18 und CD103 ( $\alpha$ E Integrin) stärker von den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen exprimiert. Die Signale der Sonden-Sets für CD102 (ICAM2) und CD166 (ALCAM) waren geringer als die Hintergrundsignale und wurden deshalb nach Affymetrix Algorithmus als abwesend (absent) bewertet (Abb.12A).

Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin wurde CD62L ausschließlich von den CD56<sup>bright</sup> heraufreguliert, wodurch der signifikante Unterschied zu den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen erhalten blieb (Abb.12B). Während die Signale für CD31 in beiden NK-Zellsubpopulationen etwa gleich stark anstiegen, verringerten sie sich für CD54 bis unterhalb des Hintergrundlevels. CD102 und CD166 wurden zwar von beiden Subpopulationen heraufreguliert, erreichten aber signifikant höhere Signale in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen. CD11c wurde in den CD56<sup>dim</sup> sowie CD18 und CD103 in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen heraufreguliert, so dass für diese Moleküle gleich hohe Signale detektiert wurden. Die Expression von CD50 änderte sich kaum.



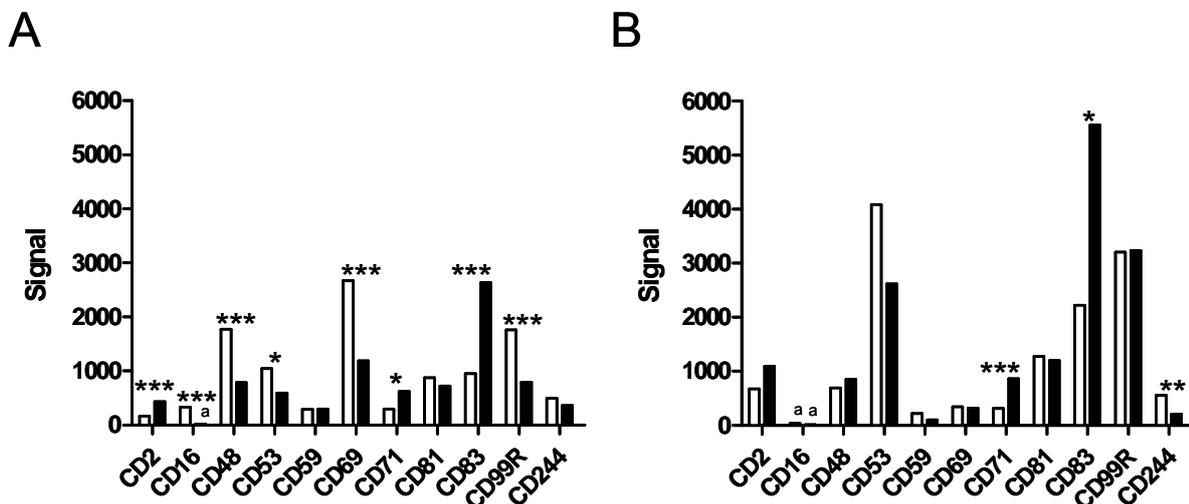
**Abb.12 Adhäsionsmoleküle**

Die Signalstärken von Sonden-Sets verschiedener Adhäsionsmoleküle ruhender (A) und aktivierter (B) CD56<sup>dim</sup> (□) und CD56<sup>bright</sup> (■) NK-Zellen sind dargestellt. (nach Affymetrix Algorithmus: \*\*\*=p<0,001, \*\*=p<0,01; a=absent).

## 3.1.3.6 Weitere Rezeptoren

Auch die Transkripte weiterer Oberflächenmoleküle wurden in den NK-Zellsubpopulationen nachgewiesen. Die Analysen ruhender NK-Zellen zeigten, dass CD16, CD48, CD69 und CD99R signifikant höher in den CD56<sup>dim</sup> sowie CD2 und CD83 stärker in den CD56<sup>bright</sup> exprimiert waren ( $p < 0,001$ ). CD59, CD71, CD81 und CD244 waren in beiden Subpopulationen etwa gleich vertreten (Abb.13A).

Nach 48-stündiger Inkubation mit PMA/Ionomycin wurden einige Änderungen in den Expressionsmustern dieser Moleküle erkennbar (Abb.13B). Die Expression von CD2 und CD53 war auf beiden Subpopulationen erhöht, während CD16 und CD69 eher vermindert exprimiert waren. CD48 wurde nur von den CD56<sup>dim</sup> herunterreguliert, blieb in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen jedoch unverändert. Diese zeigten eine stärkere, aber verglichen mit den CD56<sup>dim</sup> nicht signifikante Erhöhung von CD83. CD71 wurde ebenfalls von den CD56<sup>bright</sup> heraufreguliert, so dass ein signifikanter Unterschied zu den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen entstand ( $p < 0,001$ ). Im Gegensatz dazu wurde die CD244-Expression nur von dieser Subpopulation gesteigert und war nun signifikant höher als in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen ( $p < 0,01$ ). CD99R wurde in beiden NK-Zellsubpopulationen heraufreguliert, aber in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen so stark, dass kein Unterschied mehr zu den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen zu erkennen war. Die Expression von CD59 und CD81 wurde nicht durch die Stimulation beeinflusst (Abb.13B).



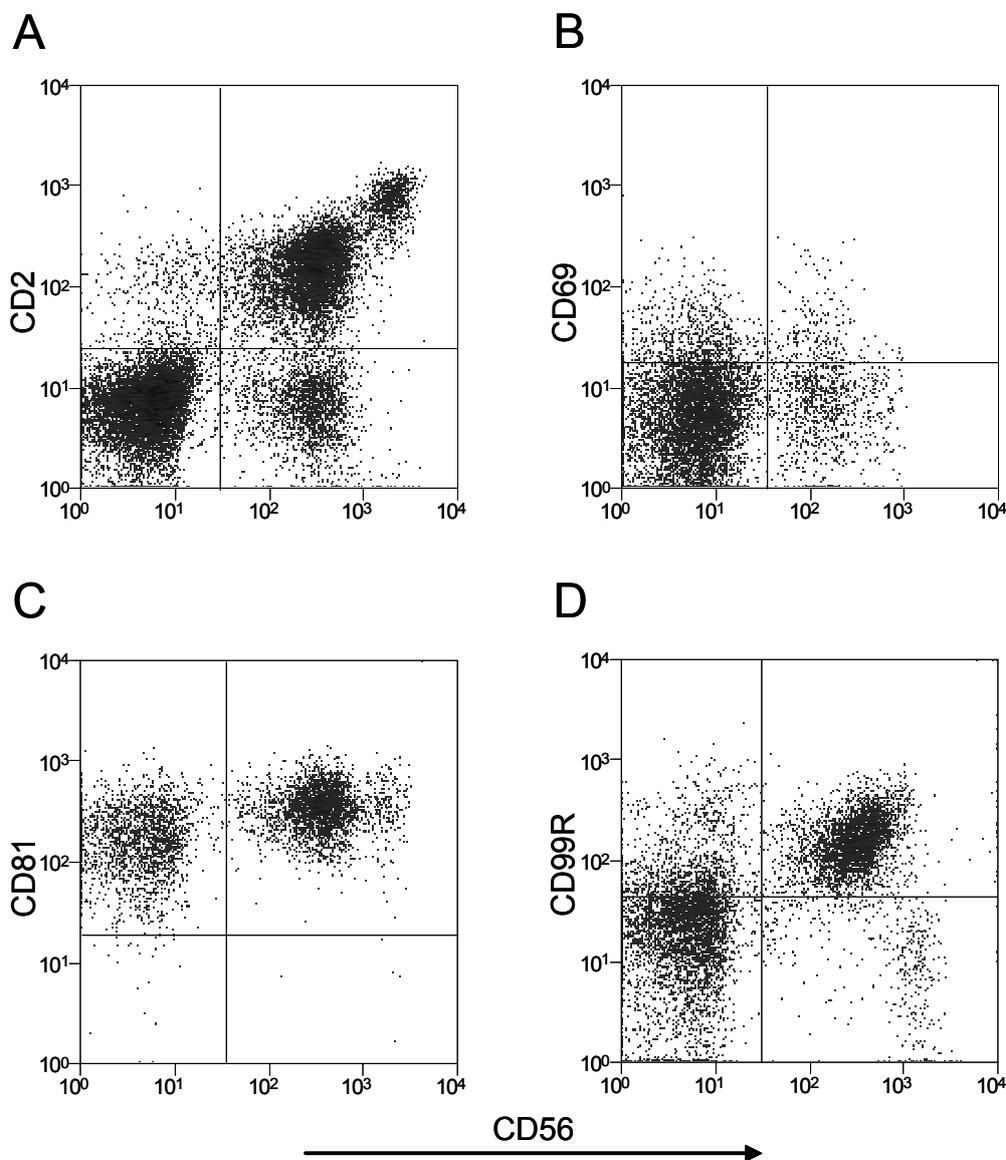
**Abb.13 Genexpression weiterer Oberflächenrezeptoren**

Die Transkripte weiterer Rezeptoren konnten in CD56<sup>dim</sup> (□) und CD56<sup>bright</sup> (■) NK-Zellen detektiert werden. Die Expression variierte entsprechend dem Aktivierungszustand der Zellen (A, ruhend; B, aktiviert) (nach Affymetrix Algorithmus: \*\*\*= $p < 0,001$ , \*\*= $p < 0,01$ , \*= $p < 0,1$ ; a=absent).

Einige dieser Moleküle wurden parallel auch auf Proteinebene untersucht. Es stellte sich heraus, dass die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen das CD2-Molekül in höherer Dichte auf ihrer Oberfläche trugen (Abb.14A). CD69 war nur auf wenigen ruhenden NK-Zellen

vorhanden, aber es waren prozentual mehr  $CD56^{dim}$  NK-Zellen  $CD69^+$ , als unter den  $CD56^{bright}$  NK-Zellen (Abb.14B). Dies wies daraufhin, dass die  $CD56^{dim}$  NK-Zellen schon leicht aktiviert im peripheren Blut waren.  $CD99R$  konnte nur auf ruhenden  $CD56^{dim}$  NK-Zellen nachgewiesen werden, während  $CD81$  von allen NK-Zellen exprimiert wurde, ohne dass Unterschiede zwischen  $CD56^{dim}$  und  $CD56^{bright}$  NK-Zellen auftraten (Abb.14C, D). Bezüglich dieser Moleküle stimmten somit die Ergebnisse der Arraydaten ruhender NK-Zellsubpopulationen mit denen der FACS-Analysen überein.

Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin wurde der Aktivierungsmarker  $CD69$  auf der Zelloberfläche von  $CD56^{dim}$  und  $CD56^{bright}$  NK-Zellen heraufreguliert (nicht gezeigt). Dies steht im Gegensatz zu den Genexpressionsanalysen (Abb.13).



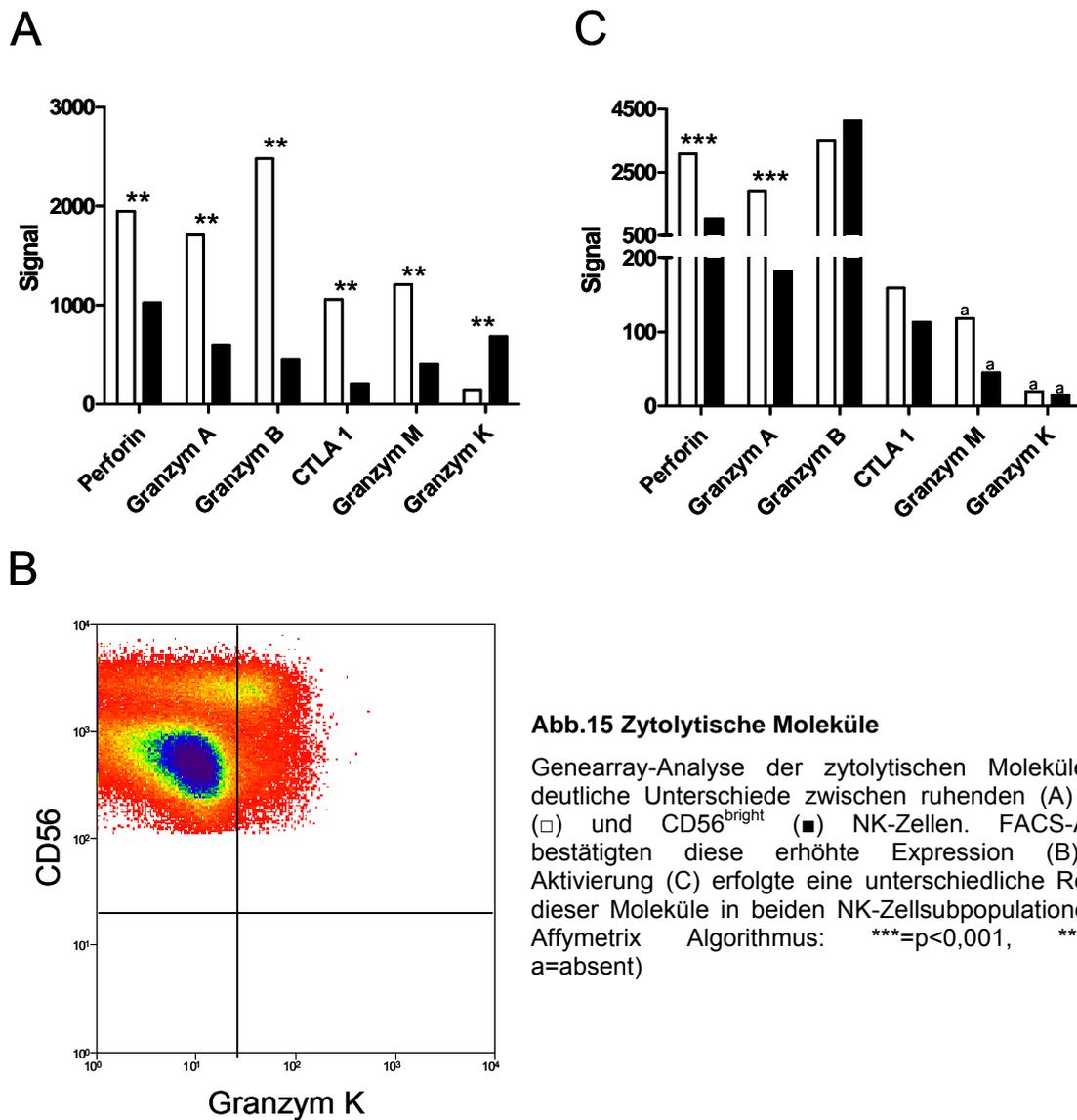
**Abb.14 Oberflächenexpression von CD2, CD69, CD81 und CD99R**

Für die Verifizierung der Genarraydaten wurden vier Rezeptoren gewählt, deren Oberflächenexpression auf  $CD3^+$  Lymphozyten in FACS-Analysen untersucht wurde.

### 3.1.4 Zytolytische Moleküle

Mit Hilfe der zytolytischen Substanzen sind NK-Zellen, aber auch T-Zellen in der Lage ihre Zielzellen effizient abzutöten. Die bekanntesten dieser Moleküle Perforin und Granzym A wurden bereits in FACS-Analysen in NK-Zellsubpopulationen detektiert, wobei eine größere Zahl der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen diese Moleküle exprimierten [76]. Ergänzend zu diesen Daten zeigten die Genearrays eine gesteigerte Expression von Granzym A, Granzym M, Granzym B, Perforin und CTLA1 in der eher zytotoxischen CD56<sup>dim</sup> Population. Im Gegensatz dazu wurde Granzym K signifikant höher von den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimiert (Abb.15A). Das Protein war auch intrazellulär im FACS nachweisbar und entsprechend der RNA-Daten wurde Granzym K in 37% der CD56<sup>bright</sup>, aber nur in 9% der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen detektiert (Abb.15B).

Nach Aktivierung der Zellen wurden Perforin und Granzym A in beiden Subpopulationen leicht heraufreguliert, die Signifikanz der unterschiedlichen Expression blieb jedoch zu Gunsten der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen erhalten. Im Gegensatz dazu wurde die Granzym B-Expression fast ausschließlich von den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen gesteigert und erreichte die gleichen Signale wie in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen. CTLA1 und Granzym M wurden in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen stark und in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen leicht vermindert. Für Granzym K konnten nur noch Hintergrundsignale nachgewiesen werden (Abb.15C).



**Abb.15 Zytolytische Moleküle**

Genearray-Analyse der zytolytischen Moleküle zeigte deutliche Unterschiede zwischen ruhenden (A) CD56<sup>dim</sup> (□) und CD56<sup>bright</sup> (■) NK-Zellen. FACS-Analysen bestätigten diese erhöhte Expression (B). Nach Aktivierung (C) erfolgte eine unterschiedliche Regulation dieser Moleküle in beiden NK-Zellsubpopulationen (nach Affymetrix Algorithmus: \*\*\*=p<0,001, \*\*=p<0,01; a=absent)

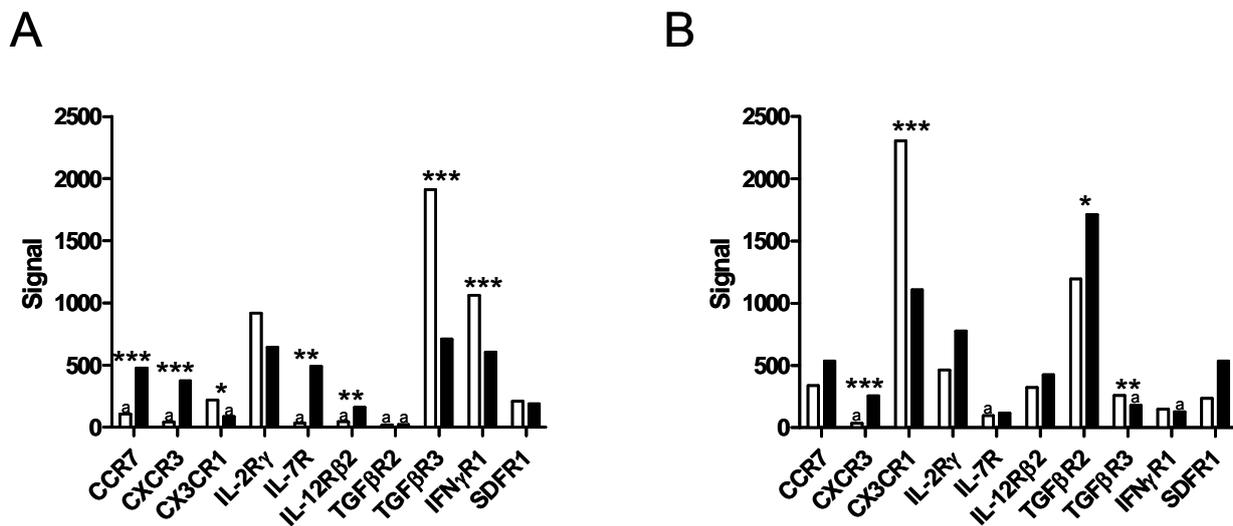
### 3.1.5 Zytokine/Chemokine und ihre Rezeptoren

#### 3.1.5.1 Zytokin- und Chemokinrezeptoren

Die Aktivitäten verschiedener Zellpopulationen werden von löslichen Mediatoren wie Hormonen, Zytokinen oder Chemokinen vermittelt.

Mit Hilfe der Genearrays konnte eine Vielzahl von Chemokin-/Zytokinrezeptoren und deren Liganden untersucht werden. Ruhende CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen offenbarten eine signifikant höhere Expression von CCR7, CXCR3 (p<0,001), IL-7R und IL-12Rβ2 (p<0,01). Im Gegensatz dazu exprimierten CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen TGFβR3 und IFNγR1 signifikant höher als die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (p<0,001). CX3CR1, IL-2Rγ, TGFβR2 und SDFR1 wurden von beiden NK-Zellsubpopulationen gleichermaßen exprimiert (Abb.16A).

Nach Aktivierung mit PMA/Ionomycin wurde CCR7 von den CD56<sup>dim</sup> heraufreguliert, so dass der signifikante Unterschied zu den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen ausgeglichen wurde. Die Expression von CXCR3, IL-2R $\gamma$  und SDFR1 blieb von diesem Stimulus unbeeinflusst. Im Gegensatz dazu wurde CX3CR1 in beiden Subpopulationen stark induziert, aber die Signale in den CD56<sup>dim</sup> stiegen bis auf einen Wert von 2250, während die der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen nur 1000 erreichten ( $p < 0,001$ ). Der IL-7R wurde in den CD56<sup>bright</sup> reduziert und IL-12R $\beta$ 2 sowie IFN $\gamma$ R1 in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen induziert, so dass bei diesen Rezeptoren jeweils gleiche Expressionslevel in den Subpopulationen detektierbar waren. Der TGF $\beta$ R2 wurde in allen NK-Zellen heraufreguliert, erreichte aber in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen eine etwas höhere Expression. Anders verhielt es sich bei TGF $\beta$ R3, der in beiden Subpopulationen verringert exprimiert wurde, wobei der signifikante Unterschied zwischen CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen jedoch erhalten blieb (Abb.16B).



**Abb.16 Zytokin- und Chemokinrezeptoren**

Sowohl ruhende (A) als auch aktivierte (B) CD56<sup>dim</sup> (□) und CD56<sup>bright</sup> (■) NK-Zellen zeigten unterschiedliche Expressionsmuster von Zytokin- und Chemokinrezeptoren (nach Affymetrix Algorithmus: \*\*\*= $p < 0,001$ , \*\*= $p < 0,01$ , \*= $p < 0,1$ ; a=absent).

#### 3.1.5.2 Liganden für Zytokin- und Chemokinrezeptoren

Aus der Gruppe der CC-Chemokine wurde die mRNA von CCL3 (MIP1 $\alpha$ ) und CCL5 (RANTES) in beiden ruhenden NK-Zellsubpopulationen exprimiert, allerdings signifikant höher in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen. CCL4 (MIP1 $\beta$ ) wurde ausschließlich in Proben dieser Subpopulation detektiert. Im Gegensatz dazu fanden sich XCL1 (Lymphotaktin) und CXCL6 (GCP2) nur in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, während diese RNA nicht in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen nachweisbar war. Weiterhin wurden TNFSF3 (Lymphotoxin B), VEGF und TNFSF10 (TRAIL) in ruhenden NK-Zellsubpopulationen detektiert, wobei die ersten beiden stärker in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimiert wurden ( $p < 0,01$ ) (Tab.1).

Nach Aktivierung mit PMA/Ionomycin wurden auch andere Chemokine induziert. XCL1 wurde von den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen heraufreguliert, ein signifikanter Unterschied zu den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen blieb jedoch erhalten. CCL1 (I-309), CCL2 (MCP1), CXCL9 (MIG), TNFSF4 (OX-40 Ligand) und TNFSF14 (LIGHT) wurden in beiden Subpopulationen induziert. Dabei wurden stärkere Signale für CCL1 und TNFSF4 in den CD56<sup>bright</sup> und für CCL2 in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen nachgewiesen, während CXCL9 und TNFSF14 in beiden Subpopulationen ähnlich exprimiert waren. CCL7 (MCP3), CCL8 (MCP2), CXCL2 (GRO $\beta$ ) wurden allein von den CD56<sup>dim</sup> heraufreguliert. Anders verhielt es sich im Falle von CSF2 (GM-CSF) und TNFSF11 (RANKL), die nur in den aktivierten CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen detektierbar waren. TNFSF3 wurde durch die Aktivierung in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen induziert, so dass es beide Subpopulationen etwa gleich stark exprimierten. TRAIL wurde bevorzugt von den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen gebildet. VEGF war in aktivierten NK-Zellsubpopulationen nicht mehr nachzuweisen und auch CXCL6 war vor allem in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen durch diesen Stimulus herunterreguliert (Tab.1). Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass sowohl ruhende als auch aktivierte CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen sehr unterschiedliche Expressionsmuster von Zytokinen, Chemokinen und deren Rezeptoren zeigten.

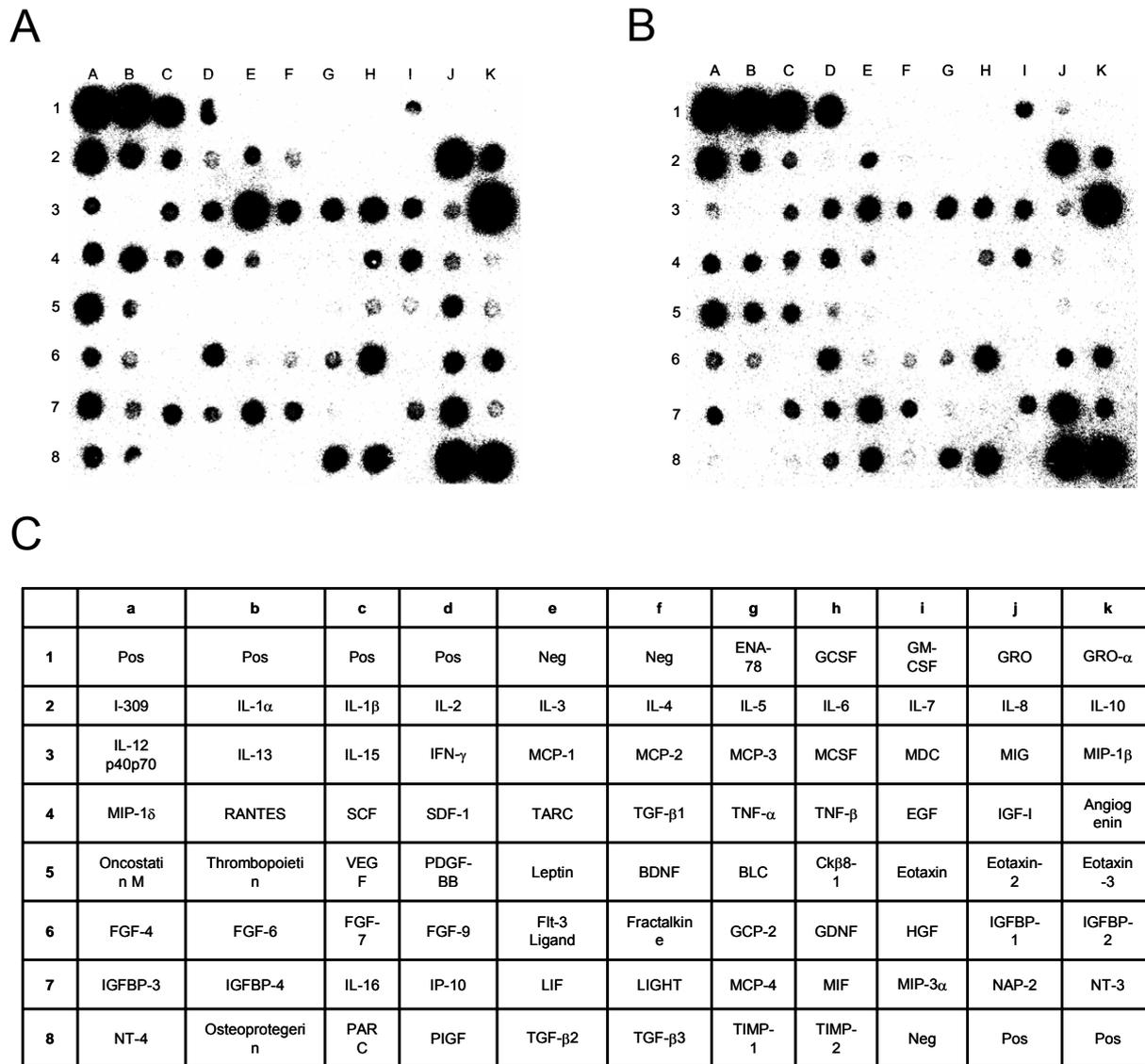
		XCL1 (Lymphotactin)	CCL1 (I-309)	CCL2 (MCP1)	CCL3 (MIP1 $\alpha$ )	CCL4 (MIP1 $\beta$ )	CCL5 (RANTES)	CCL7 (MCP3)	CCL8 (MCP2)	CXCL1 (GRO $\alpha$ )	CXCL2 (GRO $\beta$ )
ruhend	Dim	A	A	A	P***	P***	P***	A	A	A	A
	Bright	P***	A	A	P	A	P	A	A	P	A
aktiviert	Dim	P	P	P***	P***	P***	P***	P**	P*	P	P**
	Bright	P**	P***	P	P	P	P	A	A	A	A
		CXCL6 (GCP2)	CXCL9 (MIG)	CXCL10 (IP-10)	CSF2 (GM-CSF)	TNFSF3 (Lymphotoxin B)	TNFSF4 (OX-40 Ligand)	TNFSF10 (TRAIL)	TNFSF11 (RANKL)	TNFSF14 (LIGHT)	VEGF
ruhend	Dim	A	A	P	A	A	A	P	A	A	A
	Bright	P***	A	A	A	P**	A	P	A	A	P**
aktiviert	Dim	P	P	P*	A	P	P	P	A	P	A
	Bright	M	P	A	P***	P	P***	P**	P**	P	A

Tab.1 Expression von Zytokin- und Chemokinliganden

Die beiden NK-Zellsubpopulationen exprimierten sowohl im ruhenden als auch aktivierten Zustand eine Vielzahl an Zytokinen und Chemokinen unterschiedlich (nach Affymetrix Algorithmus: A=absent, P=present, \*\*\*= $p < 0,001$ , \*\*= $p < 0,01$ , \*= $p < 0,1$ ).

Neben den Ergebnissen der Genearrays wurde auch die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen untersucht. Hierzu wurde ein Zytokin-Array verwendet, der die Möglichkeit bot, bis zu 79 Zytokine und Chemokine gleichzeitig zu untersuchen.

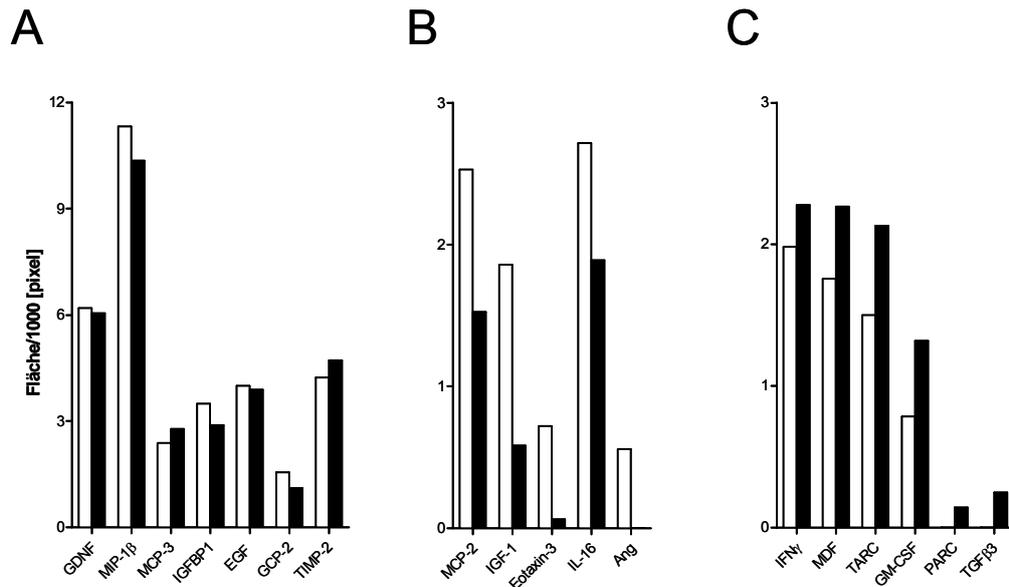
Der Überstand der Zellen von 10 verschiedenen Spendern wurde vereinigt und als Pool untersucht, um ausreichende Signale zu erreichen. Die RNA dieser Zellen wurde ebenfalls gesammelt und für den zweiten Genearray verwendet (3.1.2). Dieser Versuch wurde mit einem Ansatz aus Überständen von 5 Spendern wiederholt. Dieser zeigte im Wesentlichen die gleichen Ergebnisse wie der erste Zytokin-Array. In Abb.17A, B sind die Membranen der ersten Analyse gezeigt. Zur Orientierung kann die Übersicht der untersuchten Parameter und deren Position auf der Membran genutzt werden (Abb.17C). Alle Positivkontrollen zeigten deutliche Signale (1A-D, 8J-K) und alle Negativkontrollen (1E-F, 8I) erwiesen sich auch als solche. Insgesamt waren im Überstand der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen 55 und in dem der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen 51 der 79 Zytokine/Chemokine vorhanden.



**Abb.17 Zytokin-Array von RayBiotech**

Nach 48-stündiger Aktivierung mit PMA/Ionomycin waren unterschiedliche Muster auf den Membranen von CD56<sup>dim</sup> (A) und CD56<sup>bright</sup> (B) NK-Zellen zu erkennen. Die Position der einzelnen Mediatoren sowie der Positiv- und Negativkontrollen können der Tabelle (C) entnommen werden. Gezeigt sind die Membranen eines von zwei durchgeführten Experimenten.

Beide Analysen zeigten, dass GDNF, MIP1 $\beta$ , MCP3, IGFBP1, EGF, GCP2 und TIMP2 von beiden Subpopulationen zu etwa gleichen Mengen sezerniert wurden (Abb.18A). MCP-2, IGF-1, Eotaxin-3, IL-16 und Angiogenin waren ausschließlich oder überwiegend in den Überständen der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen zu finden (Abb.18B). Im Gegensatz dazu wurden IFN $\gamma$ , MDF, TARC, GM-CSF, PARC und TGF $\beta$ 3 vorwiegend von den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen produziert (Abb.18C).



**Abb.18 Repräsentatives Ergebnis der Zytokin-Arrays**

Die Zytokin-Arrays wurden mit Hilfe der Software ScionImage analysiert. Jeder Dot wurde als Histogramm dargestellt, dessen Fläche (in Pixel) berechnet wurde. An Hand dieser wurden die Zytokine/Chemokine in Gruppen eingeteilt: A) gleiche Produktion durch beide NK-Zellsubpopulationen, B) vorwiegend im Überstand der CD56<sup>dim</sup> und C) überwiegend im Überstand der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen detektiert.

### 3.1.5.3 IL-1β und IL-8 (CXCL8)

Von diesen 79 Zytokinen/Chemokinen wurden zunächst IL-1β und IL-8 weitergehend untersucht. Der Zytokin-Array zeigte, dass beide Mediatoren in größeren Mengen von den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen produziert wurden (Abb.19A). Daraufhin wurden die Ergebnisse des Genearrays bezüglich der Expression von IL-1β und IL-8 analysiert. Die Signale für IL-8 waren in allen drei Analysen (Individuum, Pool ruhend, Pool aktiviert) in den CD56<sup>dim</sup> höher, als in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen. Beim Vergleich der ruhenden mit den aktivierten Zellen trat eine deutliche Steigerung der Signale in beiden Subpopulationen auf (Tab.2A). Bezüglich der Expression von IL-1β war im ruhenden Zustand kein Unterschied zwischen CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> erkennbar. Nach Aktivierung wurde dieses Molekül stark in den CD56<sup>dim</sup> induziert, jedoch nicht in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (Tab.2B).

## A

## IL-8

Experiment	Stimulation	Signal Dim	Signal Bright	Signifikanz
I	-	3009	425	***
II	-	2415	419	***
III	+	6081	1092	***

## B

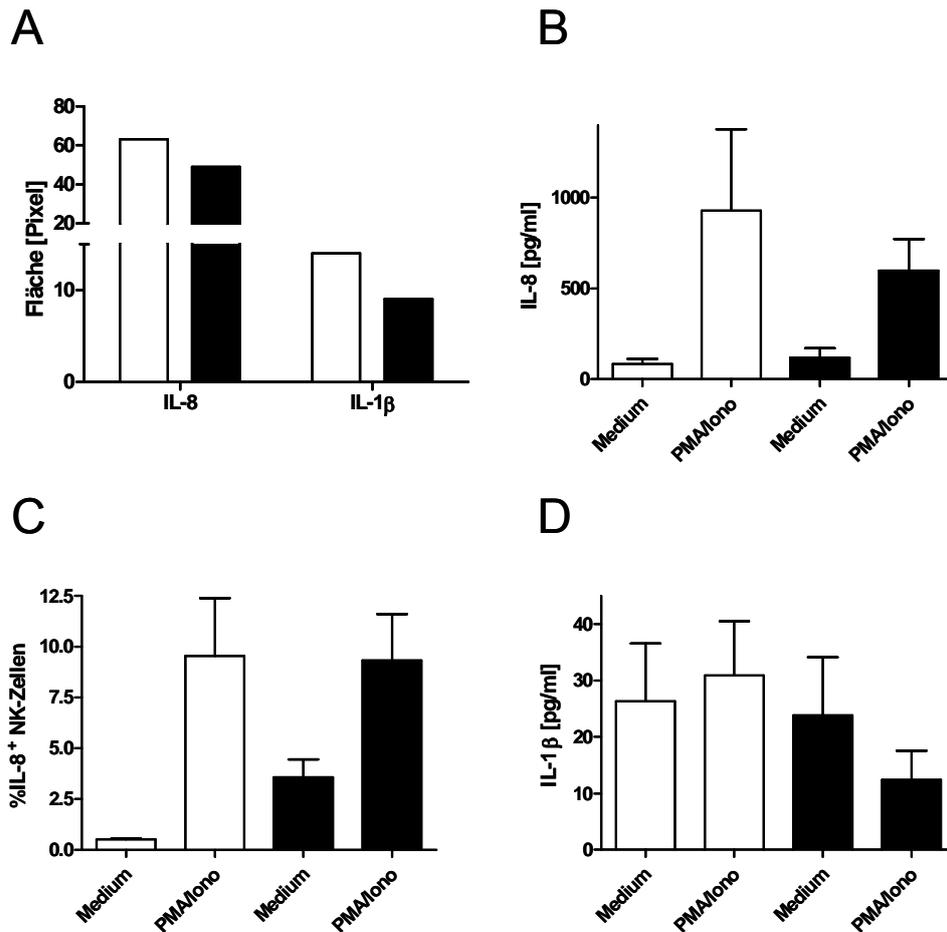
IL-1 $\beta$ 

Experiment	Stimulation	Signal Dim	Signal Bright	Signifikanz
I	-	216	361	
II	-	415	300	
III	+	1602	277	***

**Tab.2 Expression von IL-8 und IL-1 $\beta$  mRNA**

Die Expression der Transkripte von IL-8 (A) und IL-1 $\beta$  (B) in ruhenden NK-Zellen eines Individuums (I) und eines Pools von 10 Spendern (II) sowie aktivierten NK-Zellen eines zweiten Pools von sieben Spendern (III) wurde mittels Genearrays untersucht (nach Affymetrix Algorithmus: \*\*\*= $p < 0,001$ ).

Die Produktion dieser beiden Moleküle wurde außerdem im sog. Cytometric Bead Array untersucht. Das IL-8 wurde von ruhenden NK-Zellsubpopulationen kaum in den Überstand abgegeben. Nach Aktivierung mit PMA/Ionomycin für 48 h zeigte sich eine Steigerung der IL-8 Sekretion, die bei den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen stärker ausfiel. Es fanden sich ca. 900 pg/ml IL-8 im Überstand dieser Subpopulation und 500 pg/ml im Überstand der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (Abb.19B). Zusätzlich konnte IL-8 auch mittels intrazellulärer Färbung in NK-Zellen nachgewiesen werden. Diese zeigte, dass etwa 10% der CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen positiv für dieses Chemokin waren (Abb.19C). Parallel zum Genearray wurde das IL-1 $\beta$  schon im Überstand der ruhenden NK-Zellen gefunden. Nach Stimulation war diese Menge in den CD56<sup>dim</sup> leicht gesteigert, in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen eher vermindert (Abb.19D).



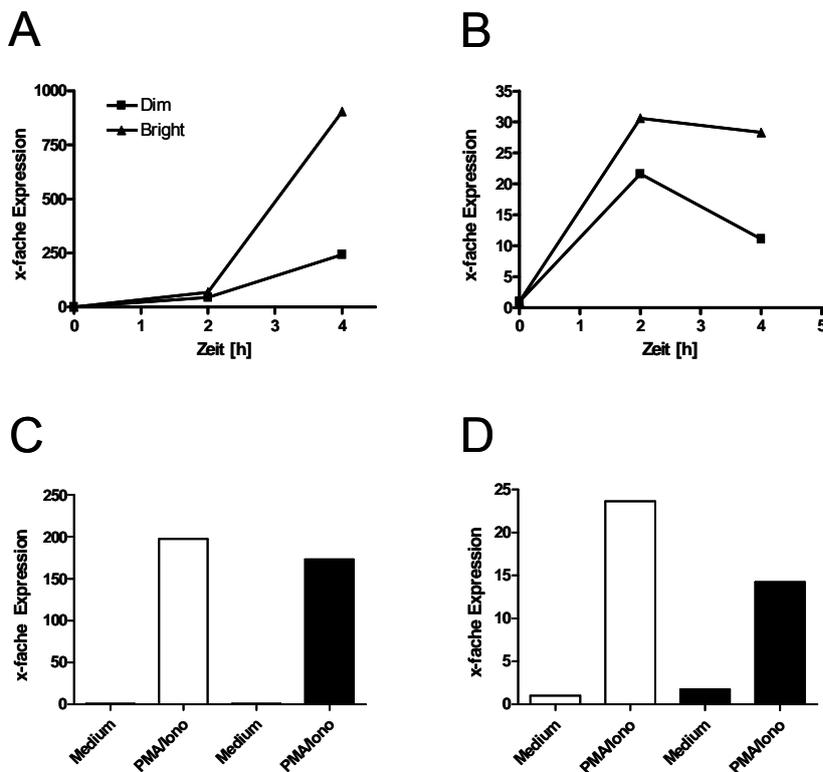
**Abb.19 Produktion von IL-8 und IL-1β in NK-Zellsubpopulationen**

Die Überstände von NK-Zellsubpopulationen wurden mittels Zytokin-Array (A) und Cytometric Bead Array (n=4) (B, D) bezüglich der Sekretion von IL-8 und IL-1β nach Stimulation mit PMA/Ionomycin untersucht. Dabei wurden für den Zytokin-Array Überstände von 10 Spendern gepoolt, die Analyse im CBA jedoch mit Individuen durchgeführt. Zusätzlich wurde IL-8 intrazellulär in CD56<sup>dim</sup> (□) und CD56<sup>bright</sup> (■) NK-Zellen nachgewiesen (n=3). In B-D sind die Mittelwerte +/- SEM dargestellt.

#### 3.1.5.4 IFN $\gamma$ und TNF $\alpha$

Nach 24 h Stimulation mit PMA/Ionomycin wurden IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  mittels intrazellulärer Färbungen nachgewiesen. In beiden Subpopulationen war die Zahl der IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen etwa gleich groß (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe von RT-qPCR verifiziert. Mehrere Kinetiken von 0h, 2h und 4h wurden mit aufgereinigten NK-Zellsubpopulationen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass IFN $\gamma$  RNA erst in der Zeit zwischen 2h und 4h vor allem in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen stark anstieg. Die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen erreichten erst nach 24 h gleiche IFN $\gamma$  RNA Level wie die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (Abb.20A). Die TNF $\alpha$  RNA wurde von den CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen bereits in den ersten beiden Stunden induziert. Nach diesem Zeitpunkt begann die RNA-Menge wieder abzunehmen (Abb.20B). Obwohl der Abfall anfangs stärker in den CD56<sup>dim</sup> war,

zeigten diese nach 24-stündiger Inkubation eine etwas höhere Expression beider Zytokine als die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (Abb.20C, D).



**Abb.20 Kinetiken zur Genexpression von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$**

Aufgereinigte NK-Zellsubpopulationen wurden mit PMA/Ionomycin stimuliert. Nach 2 bzw. 4 h wurden die Zellen geerntet, ihre RNA isoliert und anschließend die Kinetik der Expression von IFN $\gamma$  (A) und TNF $\alpha$  (B) mittels RT-qPCR analysiert. Die gleiche Prozedur wurde genutzt, um die mRNA Level von IFN $\gamma$  (C) und TNF $\alpha$  (D) nach 24-stündiger Aktivierung von CD56<sup>dim</sup> (□) und CD56<sup>bright</sup> (■) NK-Zellen zu untersuchen. Die x-fache Expression bezogen auf den Startwert (0 h) (A, B) oder die Mediumkontrolle (C, D) wurde über die Standardkurvenmethode berechnet.

### 3.2 Stimulation von NK-Zellsubpopulationen über physiologische Rezeptoren

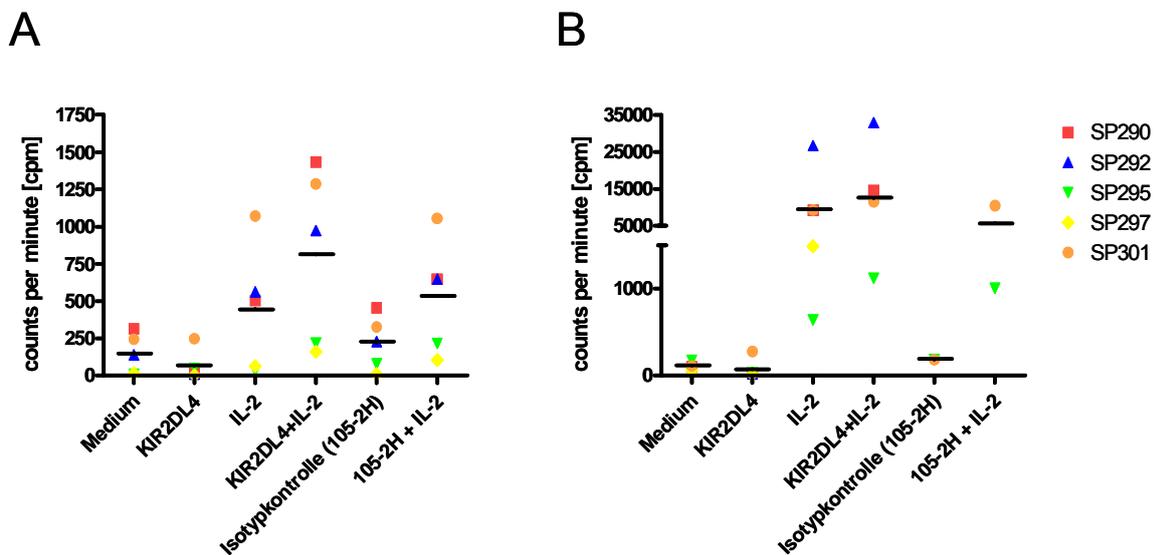
In den vorherigen Analysen wurde für die Aktivierung der NK-Zellen PMA/Ionomycin gewählt, wodurch jede Zelle gleichermaßen stimuliert wird. Rezeptoren, die bekanntermaßen NK-Zellen aktivieren, wie z.B. CD16, CD2, konnten nicht genutzt werden, da diese unterschiedlich exprimiert werden und damit zu erwarten ist, dass CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen unterschiedlich darauf reagieren. Daher wurde nach Rezeptoren gesucht, die auf beiden Subpopulationen etwa gleich exprimiert waren, um diese für physiologische Stimulationen zu verwenden.

### 3.2.1 KIR2DL4

KIR2DL4 gehört zur Familie der Killer Cell Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren. Aufgrund seiner Struktur unterscheidet er sich jedoch deutlich von den anderen bekannten KIRs.

Sowohl Genearray als auch RT-qPCR zeigten, dass dieser Rezeptor auf CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimiert wurde, allerdings mit etwas höheren Signalen in der letzteren Population (3.1.3.2).

Hochreine NK-Zellsubpopulationen wurden in 96-Well-Platten inkubiert, die mit einem Antikörper gegen KIR2DL4 ( $\alpha$ KIR2DL4-AK) und einem Kontrollantikörper beschichtet waren. Nach 72 h wurde die Proliferation der Zellen gemessen. Einige Spender (SP292, SP301) zeigten nach Kostimulation mit IL-2 und  $\alpha$ KIR2DL4-AK eine deutliche Erhöhung der Proliferation gegenüber den Medium und IL-2-Werten. Bei anderen Spendern (SP297) war keine Reaktion auf die Stimuli zu verzeichnen. Im Vergleich der beiden NK-Zellsubpopulationen konnte eine stärkere Proliferation der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen beobachtet werden. Die Proliferation nach Inkubation mit der Isotypkontrolle 105-2H zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Mediumkontrolle. Ebenso verhielt es sich bei der Koinkubation der Isotypkontrolle mit IL-2. Hier wurde eine ähnliche Proliferation festgestellt, wie nach Aktivierung mit IL-2 allein. Daher ließen sich unspezifische Effekte, die durch Fc-Rezeptoren vermittelt werden könnten, ausschließen (Abb.21).



**Abb.21 Proliferation nach Aktivierung über KIR2DL4**

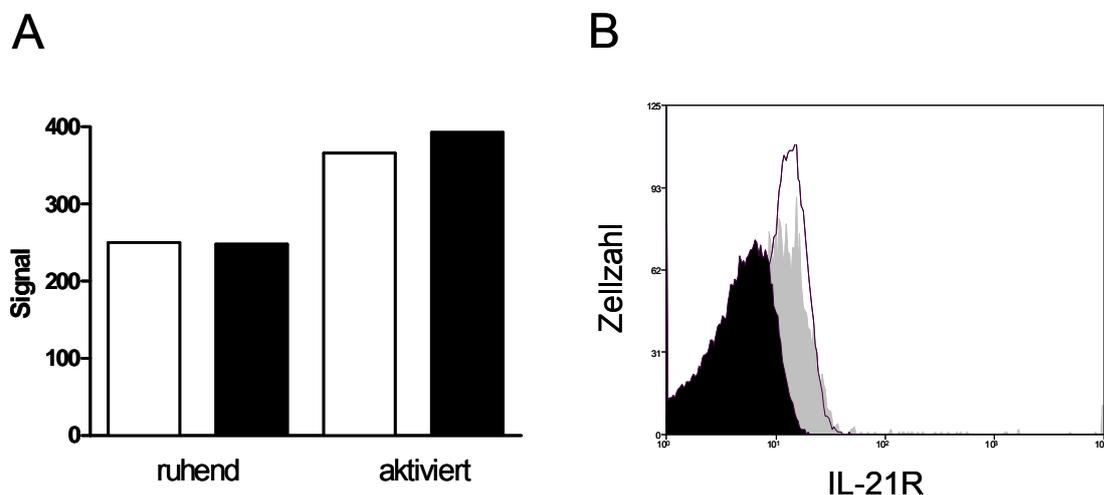
Mit der <sup>3</sup>H-Thymidin-Analyse wurde die Proliferation von aufgereinigten CD56<sup>dim</sup> (A) und CD56<sup>bright</sup> (B) NK-Zellen nach Stimulation über KIR2DL4 bestimmt. Die Ergebnisse von 5 untersuchten Spendern (s. Symbole) sind gezeigt. Die waagerechten Striche demonstrieren den berechneten Mittelwert dieser Untersuchungen. Aufgrund der deutlich höheren Proliferation der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen wurde eine andere Achsenskalierung gewählt.

### 3.2.2 IL-21 Rezeptor (IL-21R)

Der IL-21R gehört gemeinsam mit IL-2R, IL-15R und anderen, zur der common  $\gamma$ -chain Rezeptorfamilie, die diese Kette für die Signaltransduktion verwenden. IL-21R wird von B-, T- und NK-Zellen exprimiert.

Die Genarrayanalysen zeigten, dass IL-21R von CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimiert wurde. Nach Aktivierung mit PMA/Ionomycin stiegen in beiden Subpopulationen die RNA-Level leicht an, ohne dass ein Unterschied in der Expression zwischen den beiden Subpopulationen entstand (Abb.22A). Auf der Zelloberfläche beider NK-Zellsubpopulationen war IL-21R vorhanden, wenn auch in sehr geringer Dichte (Abb.22B).

Mit dieser Kenntnis wurden verschiedene Analysen durchgeführt. Als Kostimulus diente IL-2, das in suboptimalen Konzentrationen eingesetzt wurde.



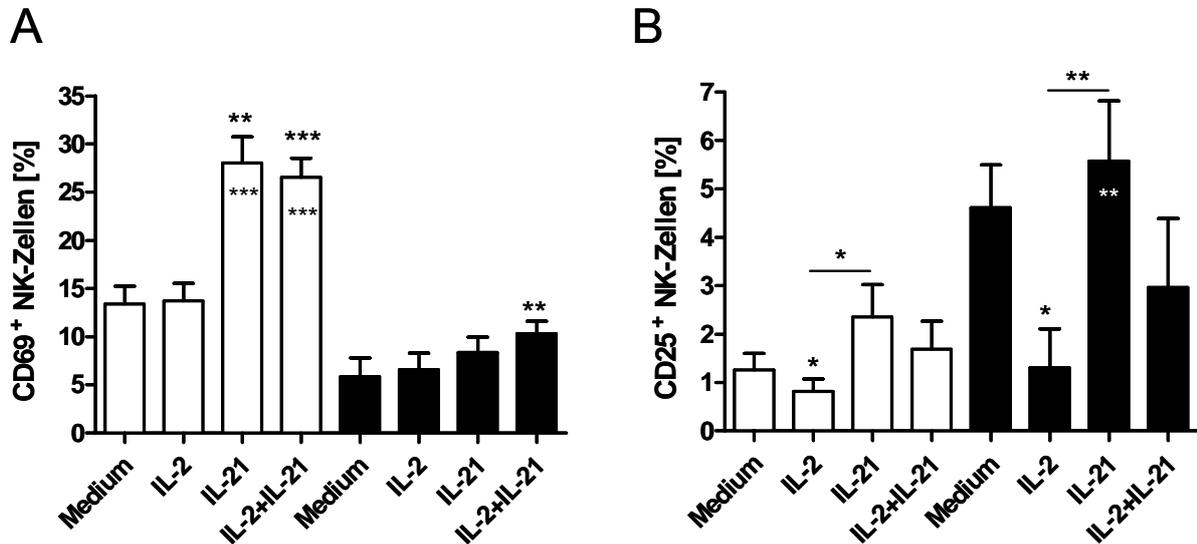
**Abb.22 Expression des IL-21 Rezeptors**

Das Sonden-Set 219971<sub>at</sub> zeigt repräsentativ die Expression von IL-21R in ruhenden und aktivierten CD56<sup>dim</sup> (□) und CD56<sup>bright</sup> (■) NK-Zellen (A). Eine leichte Verschiebung der Histogramme von CD56<sup>dim</sup> (offen) und CD56<sup>bright</sup> (grau) gegenüber der Isotypkontrolle (schwarz) deuten auf eine schwache Expression von IL-21R auf den NK-Zellsubpopulationen hin.

#### 3.2.2.1 Aktivierungsmarker

Nach 24-stündiger Stimulation mit IL-2 und/oder IL-21 wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 auf NK-Zellsubpopulationen untersucht. Wurden die PBMC mit IL-21 behandelt, ergab sich im Vergleich zur Mediumkontrolle ein Anstieg der CD56<sup>dim</sup> CD69<sup>+</sup> NK-Zellen um 10% ( $p < 0,01$ ). Diese Zahl konnte durch Zugabe von IL-2, das allein keinen Effekt vermittelte, nicht weiter gesteigert werden. Die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen zeigten nur eine geringe Regulation von CD69 nach Aktivierung mit der Kombination beider Zytokine. Verglichen mit den CD56<sup>dim</sup> waren signifikant weniger CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen CD69<sup>+</sup>, wenn sie mit IL-21 oder der Zytokinkombination stimuliert

waren (Abb.23A). Im Gegensatz dazu wurde CD25 von beiden Subpopulationen herunterreguliert, wenn IL-2, und leicht heraufreguliert, wenn nur IL-21 in der Kultur anwesend war. Bei der Koinkubation mit beiden Mediatoren konnte durch das IL-21 der herunterregulierende Effekt des IL-2 aufgehoben werden (Abb.23B).



**Abb.23 Regulation von Aktivierungsmarkern nach IL-2/IL-21 Behandlung**

In 7 unabhängigen Versuchen wurde die Regulation der Aktivierungsmarker CD69 (A) und CD25 (B) durch die Stimulation von PBMC mit IL-2 und/oder IL-21 analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil rezeptorpositiver Zellen innerhalb der CD56<sup>dim</sup> (□) und CD56<sup>bright</sup> (■) NK-Zellen. Die Signifikanz wurde mit students t-test berechnet. Die Sterne innerhalb der Balken zeigen die Signifikanz bezogen auf den gleichen Stimulus bei der jeweils anderen Subpopulation. Sterne oberhalb der Balken kennzeichnen, wenn nicht anders markiert, die Signifikanz bezogen auf die Mediumkontrolle (\*\*\*=p<0,001, \*\*=p<0,01, \*=p<0,05).

### 3.2.2.2 Einfluss auf weitere Oberflächenmarker und zytolytische Moleküle

Es wurden weitere, v. a. NK-zellspezifische, Oberflächenmarker nach Stimulation mit den beiden Zytokinen analysiert. Dabei zeigten sich keinerlei Änderungen in der Expression von NKp30, NKp44, NKp46, KIRs (CD158a, CD158b), IL-21R, CD94, CD2, CD16, CD56. Auch die Expression von Adhäsionsmolekülen wie CD18, CD11a und CD58 blieb durch die beiden Zytokine unberührt (Daten nicht gezeigt). Während die zytolytischen Moleküle Perforin und Granzym A nicht durch die Behandlung beeinflusst wurden, konnte eine Expressionssteigerung von Granzym K gezeigt werden. Insbesondere bei den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen war eine Erhöhung Granzym K<sup>+</sup> Zellen nach Stimulation mit IL-2 oder IL-21 nachweisbar. Waren beide Zytokine anwesend, konnte ein additiver Effekt festgestellt werden (Tab.3).

	CD56 <sup>dim</sup>	CD56 <sup>bright</sup>
Medium	12.0%	31.3%
IL-2	14.0%	44.2% ↑
IL-21	10.9%	40.5% ↑
IL-2+IL-21	16.5% ↑	58.4% ↑↑

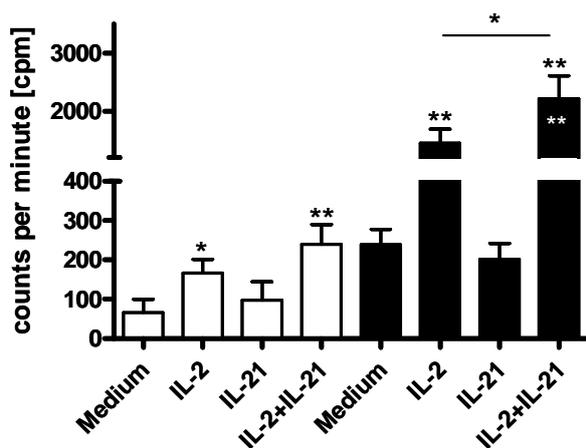
**Tab.3 Expression von Granzym K nach Stimulation mit IL-2/IL-21**

Nach Stimulation mit IL-2 und/oder IL-21 wurde die Granzym K Expression in den CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen unterschiedlich reguliert. Die Pfeile kennzeichnen einen Anstieg der Granzym K<sup>+</sup> Zellen innerhalb jeder Subpopulation. Die Mittelwerte von 4 Experimenten sind gezeigt.

### 3.2.2.3 Proliferation

Im Anschluss an die Untersuchungen der Oberflächenmoleküle wurden funktionelle Analysen mit aufgereinigten NK-Zellsubpopulationen durchgeführt.

Bei den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen war eine geringe Proliferation nach Stimulation mit IL-2 messbar. Diese konnte durch die zusätzlich Gabe von IL-21 nur in geringem Maße weiter gesteigert werden. Die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen wiesen eine höhere Spontanproliferation auf, die durch IL-2 und die Koinkubation beider Mediatoren signifikant gesteigert werden konnte ( $p < 0,01$ ). Dabei war ebenfalls ein synergistischer Effekt von IL-2 und IL-21 zu erkennen. War IL-21 allein in der Kultur vorhanden, konnte keine Proliferation bei sortierten NK-Zellen induziert werden (Abb.24).



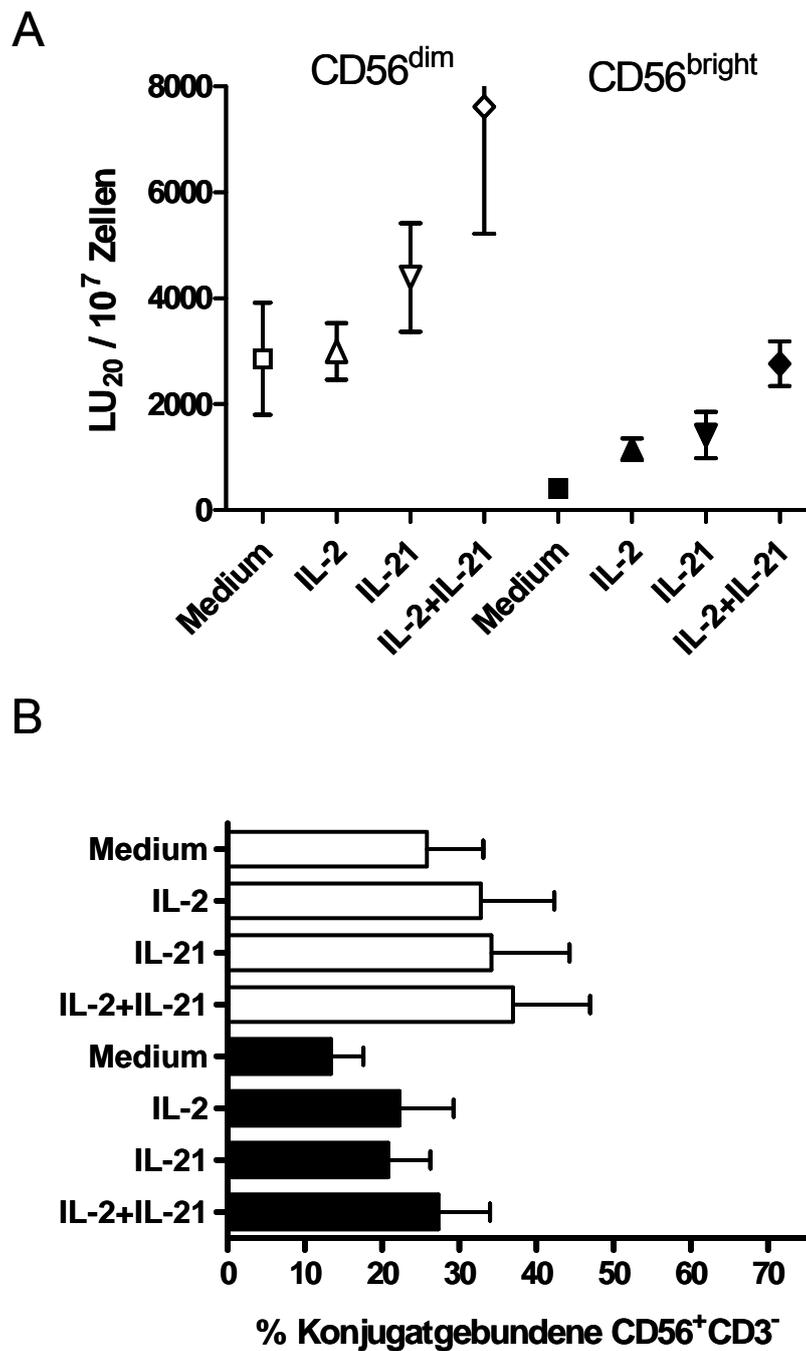
**Abb.24 Proliferationsverhalten nach Stimulation mit IL-2 und/oder IL-21**

Sortierte CD56<sup>dim</sup> (□) und CD56<sup>bright</sup> (■) NK-Zellen wurden mit IL-2 und/oder IL-21 stimuliert und anschließend ein <sup>3</sup>H-Thymidinassay durchgeführt. Es sind die Mittelwerte von 7 Analysen (+/- SEM) gezeigt. Die Signifikanz wurde mit students t-test bestimmt. Sterne oberhalb kennzeichnen, wenn nicht anders markiert, den Anstieg bezogen auf die Mediumkontrolle. Innerhalb der Balken bezieht sich die Signifikanz auf die gleiche Stimulation der jeweils anderen Subpopulation (\*\*= $p < 0,01$ , \*= $p < 0,05$ ).

#### 3.2.2.4 Zytotoxizität und Konjugatbildung

Auch die Zytotoxizität sortierter NK-Zellen gegenüber der Zelllinie K562 wurde nach Stimulation mit IL-2 und/oder IL-21 untersucht. Wie bereits bekannt, zeigten die CD56<sup>dim</sup> eine höhere spontane Lyse als die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen. Diese wurde durch die Behandlung mit der suboptimalen Dosis IL-2 kaum beeinflusst, war jedoch in Gegenwart von IL-21 leicht erhöht. Die Kombination beider Zytokine führte zu einer Verdoppelung der lytischen Units dieser NK-Zellsubpopulation. Bei den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen konnte zwar bereits durch IL-2 ein leichter Anstieg der Zytotoxizität verzeichnet werden, aber IL-21 erwies sich hier ebenfalls als besserer Stimulus. Auch bei dieser NK-Zellsubpopulation wurde eine Verdoppelung der lytischen Units gemessen (Abb.25A).

Auf der Suche nach den Ursachen dieser erhöhten Zytolyse wurden unter anderem sog. Konjugatbildungsanalysen angefertigt. Dabei wird die Bindefähigkeit der NK-Zellen an K562, was eine Voraussetzung für eine effektive Lyse ist, im FACS gemessen. Tatsächlich konnte eine Steigerung der Anzahl konjugatgebundener CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen nachgewiesen werden, insbesondere wenn die PBMC mit beiden Zytokinen gleichzeitig inkubiert wurden (Abb.25B).



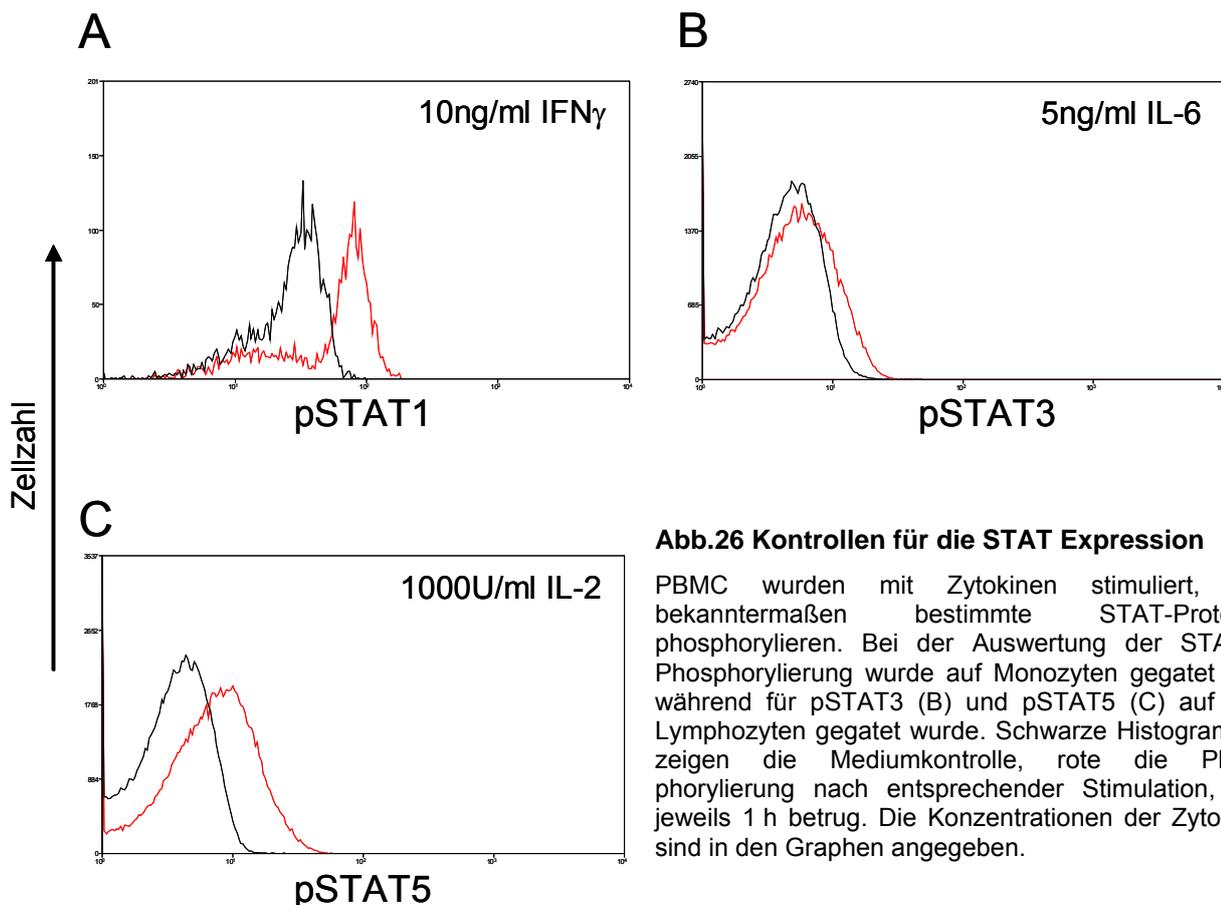
**Abb.25 Zytotoxizität und Konjugatbildung in Gegenwart von IL-2/IL-21**

Zur Bestimmung der Zytotoxizität von sortierten NK-Zellsubpopulationen wurden <sup>51</sup>Cr Assays (n=4) durchgeführt. Die lytischen Units zum Töten von 20% der Targetzellen bezogen auf 10<sup>7</sup> Effektoren wurde aus den Werten der drei E:T-Ratios bestimmt (A). Die Bildung der Konjugate ist eine wichtige Voraussetzung für die Lyse der Targets. In FACS-Analysen (n=6) mit PBMC wurde der Einfluss von IL-2 und/oder IL-21 auf die Bildung dieser Konjugate bestimmt. Es wurde auf die jeweilige Subpopulation gated und der prozentuale Anteil an gebundenen CD56<sup>dim</sup> (□) und CD56<sup>bright</sup> (■) NK-Zellen dargestellt.

## 3.2.2.5 Signaltransduktion

Aufgrund der geringen Zellzahl der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen im peripheren Blut gesunder Individuen, war eine vergleichende Analyse der Signaltransduktion mittels Western Blot unmöglich. Deshalb wurde die Analyse verschiedener Signalmoleküle mittels Antikörper im Durchflusszytometer durchgeführt. Auf diese Weise konnten phosphoryliertes (p)STAT1, pSTAT3 und pSTAT5 nach Stimulation von PBMC mit IL-2 und/oder IL-21 untersucht werden.

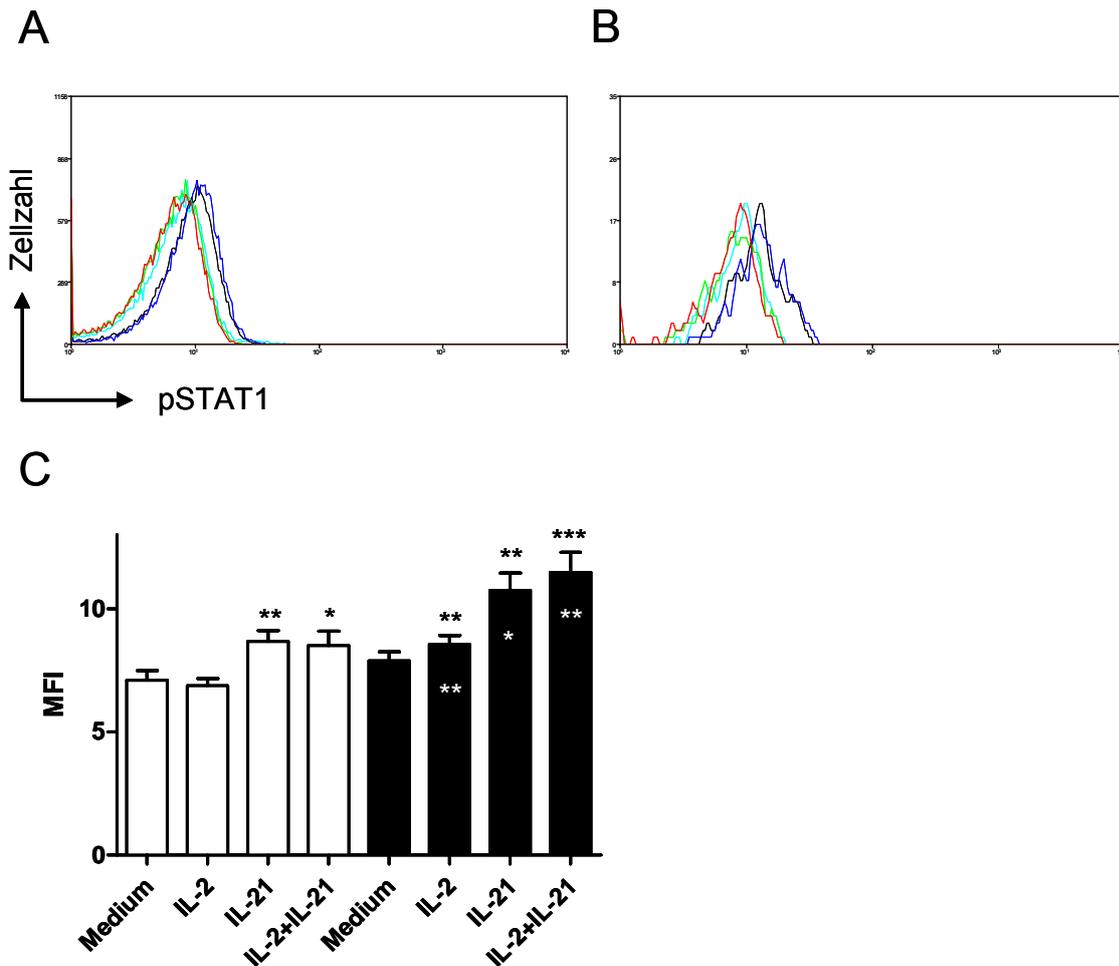
Zunächst wurde nach geeigneten Kontrollen gesucht, die in jedem Fall zur Phosphorylierung eines der Moleküle führte. Es wurden IFN $\gamma$  (für STAT1), IL-6 (für STAT3) und hohe Dosen IL-2 (für STAT5) ausgewählt [97]. Die PBMC wurden 1 h mit dem jeweiligen Stimulus behandelt und anschließend mit entsprechenden Antikörpern gefärbt. Es zeigte sich, dass IFN $\gamma$  insbesondere bei Monozyten eine Verschiebung des Peaks für pSTAT1 verursachte, welche durch die Phosphorylierung dieses Moleküls hervorgerufen wurde. Auch hohe IL-2 Konzentrationen führten zu einer deutlichen Verlagerung des Histogramms für pSTAT5. IL-6 zeigte zwar nur eine schwache Phosphorylierung von STAT3, wurde aber trotzdem als Kontrolle genutzt (Abb.26).



**Abb.26 Kontrollen für die STAT Expression**

PBMC wurden mit Zytokinen stimuliert, die bekanntermaßen bestimmte STAT-Proteine phosphorylieren. Bei der Auswertung der STAT1-Phosphorylierung wurde auf Monozyten gated (A), während für pSTAT3 (B) und pSTAT5 (C) auf alle Lymphozyten gated wurde. Schwarze Histogramme zeigen die Mediumkontrolle, rote die Phosphorylierung nach entsprechender Stimulation, die jeweils 1 h betrug. Die Konzentrationen der Zytokine sind in den Graphen angegeben.

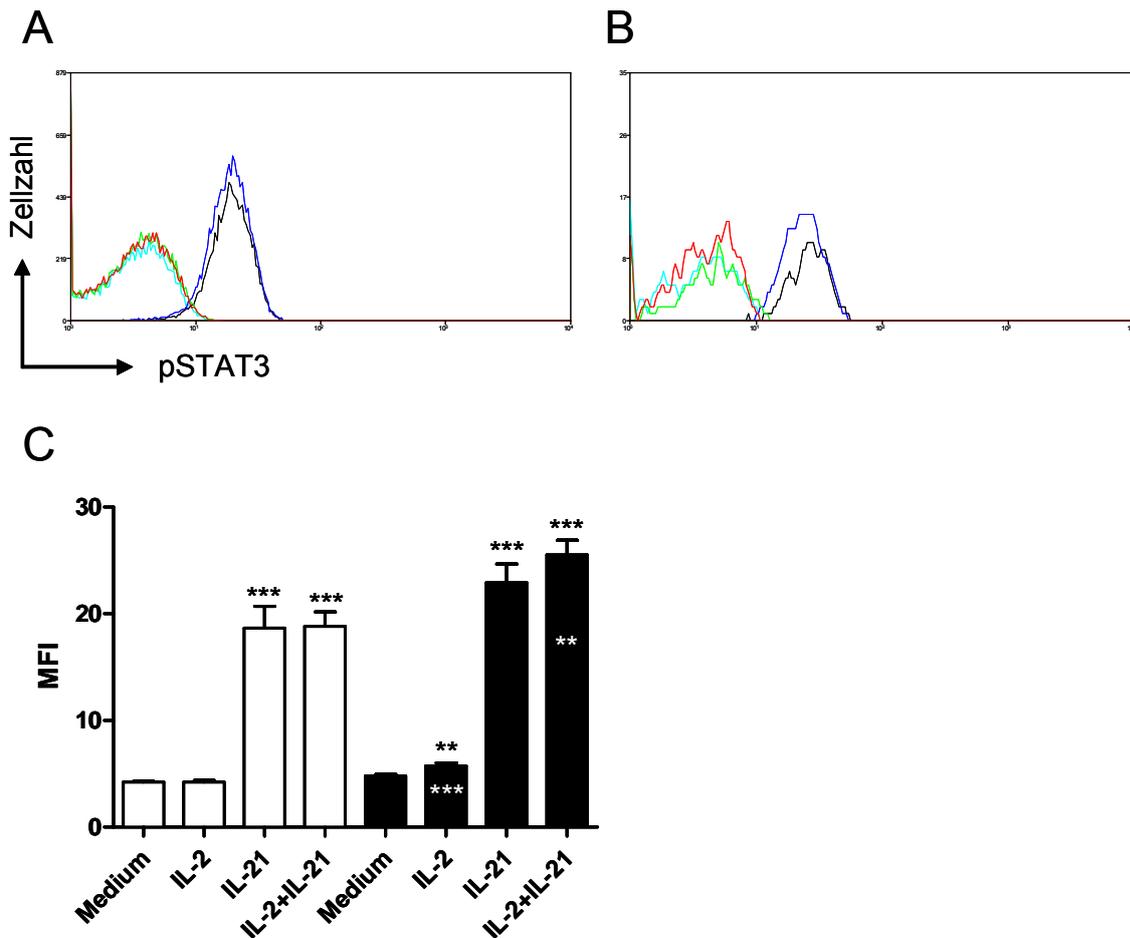
Bei Betrachtung der NK-Zellsubpopulationen wurde eine leichte Phosphorylierung von STAT1 nach Stimulation mit 50 U/ml IL-2 festgestellt, die bei den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen im Vergleich zum Medium sogar signifikant war ( $p < 0,01$ ). Etwas stärker wurde dieses Molekül in Gegenwart von IL-21 phosphoryliert ( $p < 0,01$ ), was durch gleichzeitige Inkubation mit IL-2 bei den CD56<sup>bright</sup> ( $p < 0,001$ ) weiter gesteigert werden konnte, bei den CD56<sup>dim</sup> ( $p < 0,05$ ) jedoch nicht. Vergleicht man die Reaktion der beiden Subpopulationen miteinander, so war die Phosphorylierung von STAT1 bei den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in Anwesenheit von IL-2 und beider Mediatoren signifikant höher ( $p < 0,01$ ) (Abb.27).



**Abb.27 Phosphorylierung von STAT1**

Nach Stimulation mit IL-2 und/oder IL-21 wurde die Phosphorylierung von STAT1 im FACS analysiert. Ein repräsentatives Beispiel, gated auf CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> (A) und CD3<sup>+</sup>D56<sup>bright</sup> (B) NK-Zellen ist gezeigt (Medium (rot), IL-2 (grün), IL-21 (blau), IL-2+IL-21 (schwarz) IFN $\gamma$  (türkis)). Die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=8) sind gezeigt. Sterne oberhalb der Balken (C) von CD56<sup>dim</sup> (□) und CD56<sup>bright</sup> (■) NK-Zellen markieren die Signifikanz bezogen auf die Mediumkontrolle, Sterne innerhalb der Balken beziehen sich auf die Signifikanz zur jeweils anderen Subpopulation (\*\*\*=p<0,001; \*\*=p<0,01; \*=p<0,05).

Die Phosphorylierung von STAT3 wurde besonders durch IL-21 und der Koinkubation beider Zytokine induziert. Die Steigerung der Phosphorylierung war bei beiden NK-Zellsubpopulationen mit  $p < 0,001$  signifikant. Nur bei der  $CD56^{\text{bright}}$  Subpopulation konnte eine schwache Phosphorylierung von STAT3 durch IL-2 beobachtet werden ( $p < 0,01$ ). Verglichen mit den  $CD56^{\text{dim}}$  NK-Zellen war auch hier die Reaktion der  $CD56^{\text{bright}}$  NK-Zellen auf die eingesetzten Stimuli signifikant stärker (IL-2  $p < 0,01$ , beide Zytokine  $p < 0,05$ ) (Abb.28).

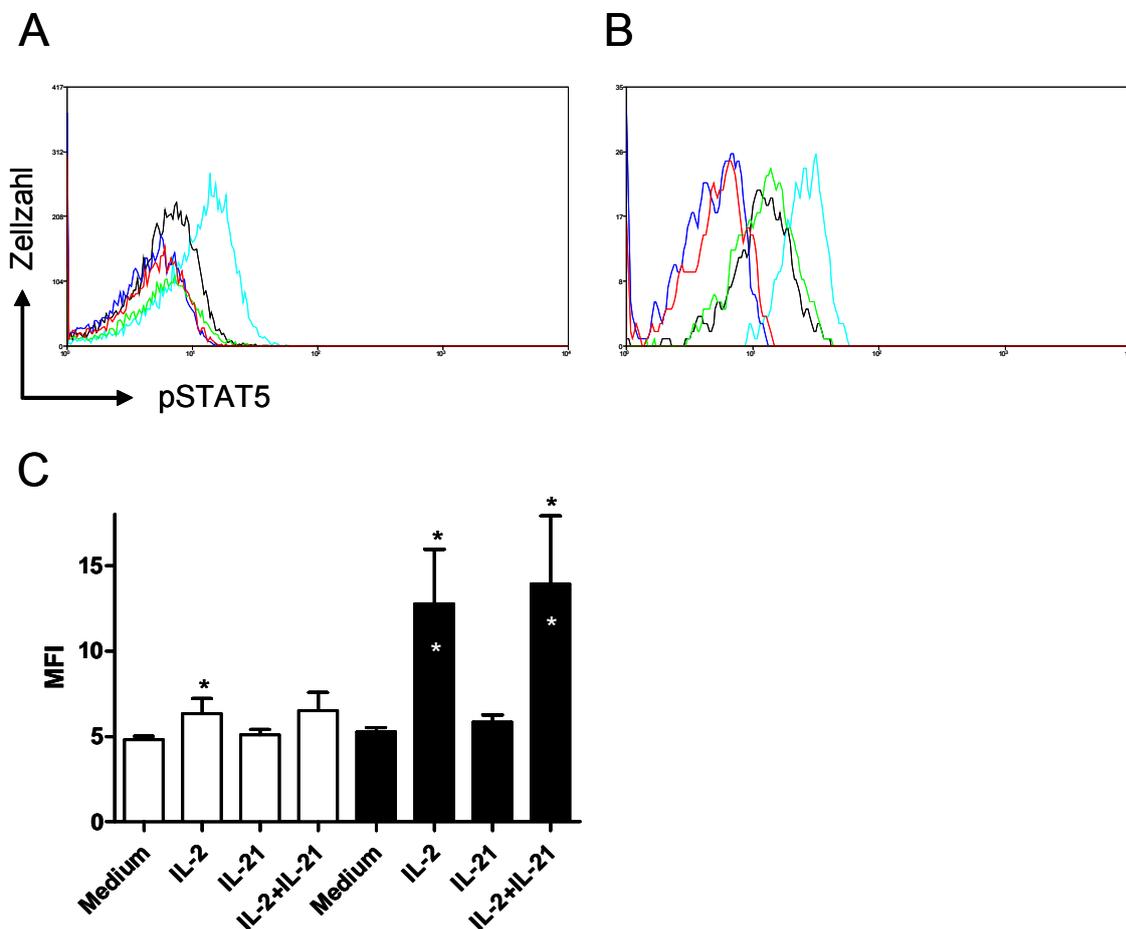


**Abb.28 Phosphorylierung von STAT3**

Die Phosphorylierung von STAT3 wurde durch die Inkubation mit IL-21 induziert. Repräsentative Histogramme von  $CD56^{\text{dim}}$  (A) und  $CD56^{\text{bright}}$  (B) NK-Zellen zeigen die Phosphorylierung von STAT3 in Gegenwart von Medium (rot), IL-2 (grün), IL-21 (blau), IL-2+IL-21 (schwarz) und IL-6 (türkis). Die Mittelwerte +/- SEM der 6 Experimente sind in (C) gezeigt. Signifikanzen bezogen auf die Mediumkontrolle befinden sich oberhalb der Balken, die Vergleiche zur jeweils anderen Subpopulation innerhalb der Balken ( $CD56^{\text{dim}}$  (□),  $CD56^{\text{bright}}$  (■); \*\*\*= $p < 0,001$ , \*\*= $p < 0,01$ , \*= $p < 0,05$ ).

STAT5 wurde fast ausschließlich von den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen nach Stimulation mit IL-2 oder beiden Mediatoren phosphoryliert ( $p < 0,05$ ). Bei den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen wurde in Gegenwart von IL-2 ( $p < 0,01$ ) eine geringe Verlagerung des pSTAT5-Peaks detektiert (Abb.29). Die Phosphorylierung von STAT5 nach Stimulation mit IL-2 allein oder der Zytokinkombination war bei den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen stärker als bei den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen ( $p < 0,05$ )

Zusammenfassend ergibt sich damit, dass die Stimulation von NK-Zellen mit IL-21 insbesondere STAT3 phosphoryliert, das damit aktiviert wurde. Die beiden anderen STATs spielten nur eine untergeordnete Rolle. Das IL-2 verursachte hauptsächlich eine Phosphorylierung von STAT5. Im Vergleich der beiden Subpopulationen wurden höhere Signale bei den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen gemessen.



### Abb.29 Phosphorylierung von STAT5

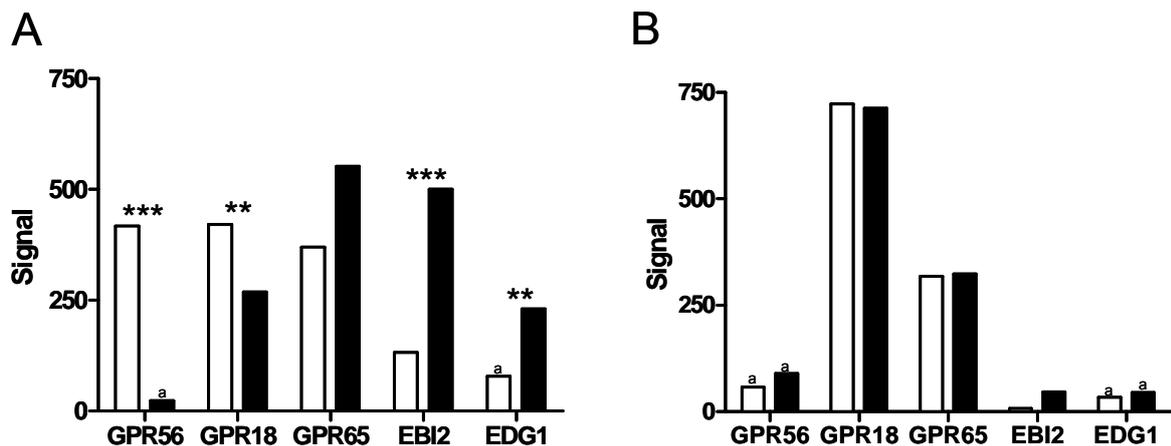
Nach 1-stündiger Inkubation von PBMC mit Medium (rot), IL-2 (grün), IL-21 (blau), IL-2+IL-21 (schwarz) und 1000 U/ml IL-2 (türkis) wurde der Phosphorylierungszustand von STAT5 überprüft. Die Histogramme der Analysen von CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> (A) und CD3<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup> (B) zeigen ein repräsentatives von 8 Experimenten. Die Mittelwerte +/- SEM sind in (C) dargestellt. Die Signifikanzen wurden mit students t-test bestimmt (der Stern oberhalb der Balken markiert den signifikanten Unterschied zur Mediumkontrolle, der Stern innerhalb kennzeichnet die Signifikanz zur jeweils anderen Subpopulation;  $* = p < 0,05$ ).

### 3.3 Zusätzliche Daten zur Genexpression

#### 3.3.1 G Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPRs)

Eine wichtige Rolle zur Regulation der Signalwege spielen Kinasen, Phosphatasen und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPRs). Diese wurden mit Hilfe der Genearrays analysiert.

Hier zeigte sich ein auffallend unterschiedliches Muster in beiden ruhenden NK-Zellsubpopulationen, und zwar waren GPR56 und GPR18 signifikant höher in CD56<sup>dim</sup>, aber EBI2 und EDG1 signifikant höher in CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimiert (Abb.30A). Nach Aktivierung der Zellen mit PMA/Ionomycin zeigte sich eine drastische Reduktion der GPR56 mRNA in den CD56<sup>dim</sup> und von EBI2 sowie EDG1 in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, so dass diese Rezeptoren von beiden Subpopulationen auf niedrigem Niveau exprimiert wurden. GPR18 wurde sowohl in den CD56<sup>dim</sup>, als auch in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen heraufreguliert und erreichte gleiche Level in beiden Subpopulationen (Abb.30B).



**Abb.30 G Protein-gekoppelte Rezeptoren**

Die Expression von G Protein-gekoppelten Rezeptoren variierte je nach Aktivierungszustand der Zellen (ruhend (A); aktiviert (B)). Signifikante Unterschiede zwischen CD56<sup>dim</sup> (□), CD56<sup>bright</sup> (■) traten überwiegend bei frisch isolierten Zellen auf (nach Affymetrix Algorithmus: \*\*\*= $p < 0,001$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; a=absent).

#### 3.3.2 Kinasen

Ebenfalls wichtig für die Regulation der Signalkaskade sind Kinasen und Phosphatasen. Diese Enzyme hängen Phosphatgruppen an Proteine oder entfernen sie von diesen und tragen somit zur Aktivierung bzw. Inhibition der Proteinfunktion bei. Die Genearrays erbrachten unterschiedliche Expression verschiedener Kinasen in CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen. In ruhenden NK-Zellen wurde MKNK2 (MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 2) signifikant höher in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimiert

( $p < 0,001$ ). Die Transkripte von PRKCB1 (Protein kinase C beta 1), LCK, TOPK und GPRK5 (G-protein coupled receptor kinase) waren ausschließlich in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen vorhanden ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ), während PDXK und MKPX (mitogen-activated protein kinase phosphatase x) in beiden Subpopulationen exprimiert war, jedoch ca. 2,5-fach höher in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen ( $p < 0,01$ ). Für ITK (IL-2 inducible T cell kinase) und DAPK (death-associated protein kinase) wurden in ruhenden NK-Zellsubpopulationen nur geringe bzw. keine Unterschiede festgestellt. TIE war in ruhenden NK-Zellen nicht detektierbar (Abb.31A).

Nach Aktivierung der NK-Zellen konnten deutliche Regulationen der Expressionsmuster dieser Enzyme gemessen werden. Die PRKCB1 und ITK wurden in beiden Subpopulationen induziert, jedoch deutlich stärker in der CD56<sup>bright</sup> als in der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen ( $p < 0,001$ ). DAPK wurde von den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen komplett herunterreguliert, so dass aktivierte CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen diese Kinase signifikant höher exprimierten. Auch MKNK wurde von den beiden Subpopulationen gegensätzlich reguliert. In den CD56<sup>bright</sup> nahmen die Signale ebenfalls ab und in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen stiegen sie an. TOPK hingegen wurde in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen induziert, während es in aktivierten CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen nicht mehr detektiert werden konnte. Der Expressionslevel von MKPX wurde in beiden untersuchten Subpopulationen gesteigert, wobei die CD56<sup>dim</sup> eine stärkere Regulation zeigten als die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen. PDXK wurde von den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen so stark reduziert, dass der signifikante Unterschied zu den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, der zwischen ruhenden NK-Zellsubpopulationen bestand, bei aktivierten Zellen nicht mehr existierte. LCK wurde nach Aktivierung in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen so reguliert, dass auch in diesem Fall keine signifikante Differenz zwischen den beiden Subpopulationen nachweisbar war (Abb.31B).

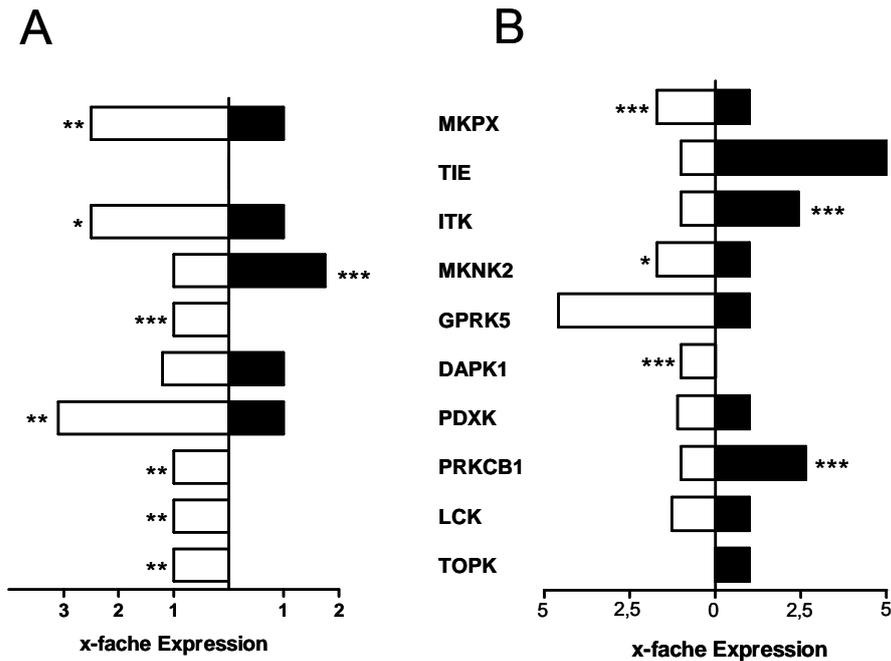


Abb.31 Kinasen

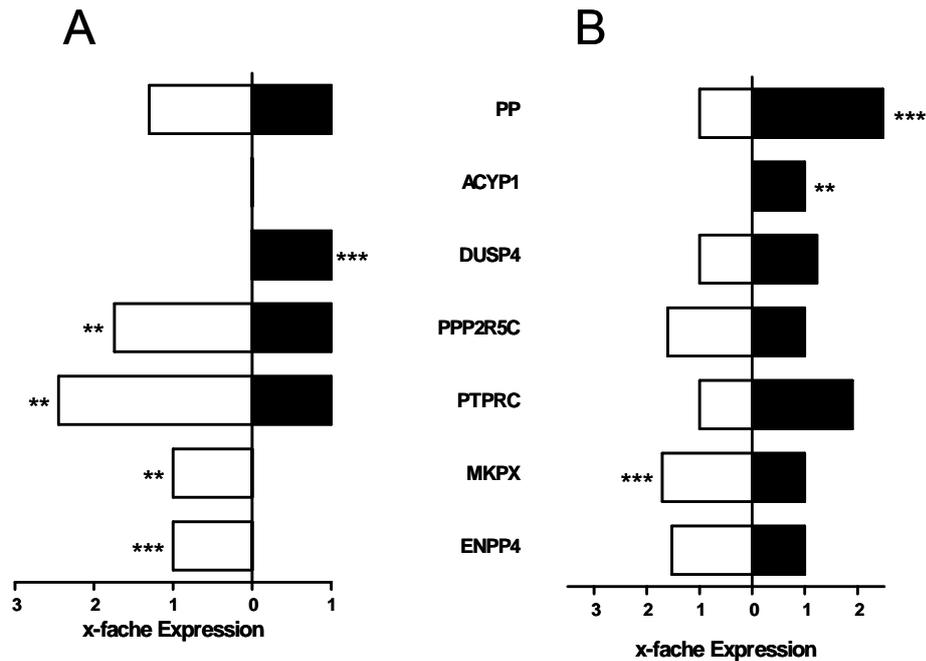
Die x-fache Expression von Kinasen in ruhenden (A) und aktivierten (B) CD56<sup>dim</sup> (□), CD56<sup>bright</sup> (■) NK-Zellen ist dargestellt. Durch Division mit dem jeweils geringeren Signal wurde die x-fache Expression berechnet. Transkripte, die nur in einer der beiden Subpopulationen detektiert werden konnten, wurden auf den Wert „1“ gesetzt. Signifikanzen wurden nach dem Affymetrixalgorithmus berechnet (\*\*\*=p<0,001, \*\*=p<0,01, \*=p<0,1).

### 3.3.3 Phosphatasen

Die Phosphatasen zeigten wie die oben genannten Enzyme unterschiedliche Expressionsmuster in den beiden NK-Zellsubpopulationen.

PP wurde in gleichem Maße von den beiden NK-Zellsubpopulationen exprimiert, während ACYP1 nicht in ruhenden NK-Zellen nachweisbar war. PPP2R5C und PTPRC wurden ca. 2-fach höher in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen gemessen (p<0,01). DUSP4 war ausschließlich in den CD56<sup>bright</sup> sowie MKPX und ENPP4 nur in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen vorhanden (Abb.32A).

Nach Stimulation der sortierten NK-Zellen wurde DUSP4 von beiden Subpopulationen heraufreguliert, jedoch etwas stärker in den CD56<sup>dim</sup>, so dass der Unterschied zwischen CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen ausgeglichen wurde. PP, ACYP1 und ENPP4 wurden nur von der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen heraufreguliert. Dabei entstand ein signifikanter Unterschied bezüglich der Expression von PP und ACYP1 (p<0,001, p<0,01) bzw. ging im Falle von ENPP4 verloren. Die Phosphatasen PPP2R5C und PTPRC wurden überwiegend von den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen herunterreguliert, woraus etwa gleiche Expressionslevel in den untersuchten Subpopulationen resultierten (Abb.32B).



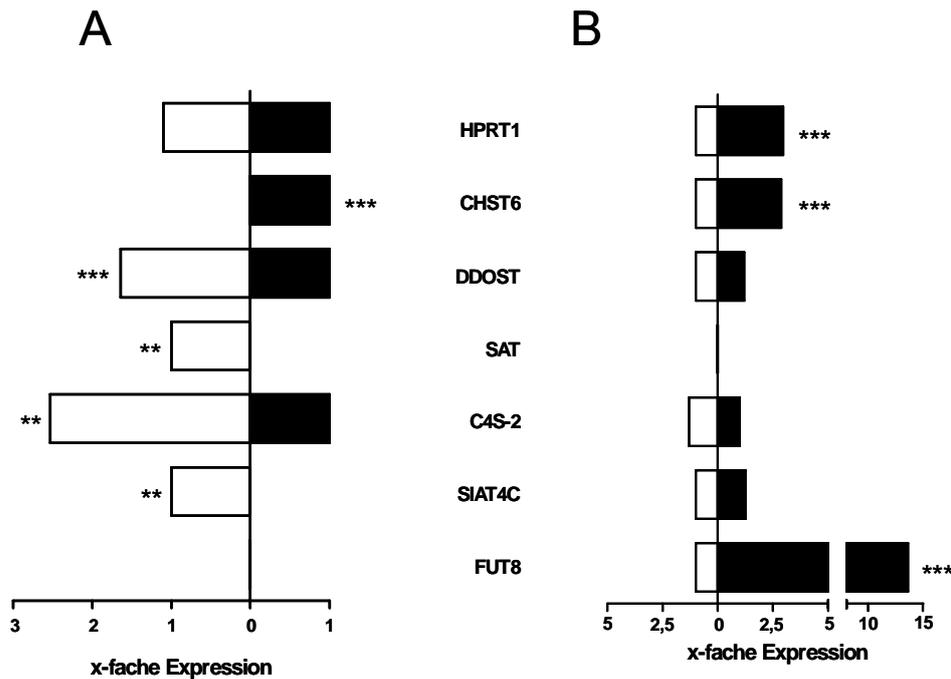
**Abb.32 Phosphatasen**

Transkripte, die für Phosphatasen kodieren, wurden in ruhenden (A) und aktivierten (B) NK-Zellsubpopulationen unterschiedlich reguliert. Die Expression wurde als x-fach Wert bezogen auf die jeweils andere Subpopulation (CD56<sup>dim</sup> (□), CD56<sup>bright</sup> (■)) dargestellt (nach Affymetrix Algorithmus: \*\*\*=p<0,001; \*\*=p<0,01).

### 3.3.4 Transferasen

In ruhenden NK-Zellen wurde CHST6 allein in den CD56<sup>bright</sup>, SAT und SIAT4C nur in der CD56<sup>dim</sup> Population nachgewiesen. HPRT1 konnte in beiden Zellgruppen gleichermaßen detektiert werden, während DDOST und C4S-2 signifikant höhere Level in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen aufwiesen (Abb.33A). FUT8 wurde von keiner der beiden Subpopulationen exprimiert.

Durch die Aktivierung mit PMA/Ionomycin änderten sich diese Expressionsmuster. HPRT1 und FUT8 wurden extrem in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen induziert und erreichten signifikant höhere Signale als die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen. CHST6 wurde zwar von den CD56<sup>dim</sup> exprimiert, der Level der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen wurde aber nicht erreicht. DDOST, C4S-2 und SAT wurden von den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen herunterreguliert, so dass sich bei ersteren die Signale in beiden Subpopulationen angleichen, SAT hingegen nicht mehr messbar war. SIAT4C wurde nur in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen beeinflusst. Hier ging der signifikante Unterschied zu den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen ebenfalls verloren (Abb.33B).

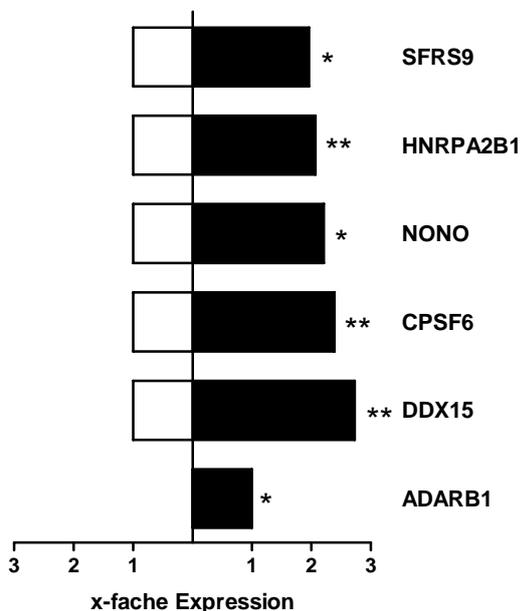


**Abb.33 Transferasen**

Die x-fache Expression von Tansferasen in ruhenden und aktivierten CD56<sup>dim</sup> (□) und CD56<sup>bright</sup> (■) NK-Zellen ist gezeigt (nach Affymetrix Algorithmus: \*\*\*=p<0,001; \*\*=p<0,01).

### 3.3.5 RNA-Prozessierung

Nach der Transkription wird die entstandene mRNA weiter modifiziert. Dies kann durch alternatives Splicing oder Polyadenylierung geschehen. Die Analyse von Proteinen, die in die RNA-Prozessierung involviert sind, zeigte deutliche Unterschiede zwischen CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, insbesondere nach Aktivierung mit PMA/Ionomycin. Es fällt auf, dass die Adenindeaminase ADARB1, der Splicingfaktor SFRS9 und andere Proteine überwiegend in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimiert wurden (Abb.34).



**Abb.34 Moleküle, die bei der RNA-Prozessierung beteiligt sind**

In aktivierten CD56<sup>dim</sup> (□) und CD56<sup>bright</sup> (■) NK-Zellen wurden Transkripte, die für RNA-prozessierende Moleküle kodieren untersucht. Gezeigt ist die x-fache Expression (nach Affymetrix Algorithmus: \*\*=p<0,01; \*=p<0,1).

## 4 Diskussion

Die NK-Zellen des Menschen werden als  $CD3^+CD56^+$  Lymphozyten definiert. Aufgrund der Expressionsdichte des CD56-Moleküls, dessen genaue Funktion allerdings auf diesen Lymphozyten noch weitgehend unbekannt ist, lassen sich zwei Subpopulationen diskriminieren:  $CD56^{dim}$  und  $CD56^{bright}$ , die sich phänotypisch aber vor allem auch funktionell voneinander unterscheiden [98,99]. Die „klassischen“ NK-Zellen vermitteln beträchtliche Zytotoxizität gegenüber sensitiven Targetzellen und werden von den  $CD56^{dim}$  NK-Zellen repräsentiert, die zudem in der Regel CD16 und KIRs koexprimieren. Im Gegensatz dazu sind  $CD56^{bright}$  NK-Zellen  $CD16^{dim/neg}$   $KIR^{neg}$  mit geringerem zytolytischen Potential, besitzen aber die Fähigkeit, eine Vielzahl an Zytokinen und Chemokinen zu sezernieren [7,76].

Zur weiteren Charakterisierung dieser Zellen wurden Genearrays mit der RNA ruhender und aktivierter hochreiner  $CD56^{dim}$  und  $CD56^{bright}$  NK-Zellen durchgeführt. Um mögliche Besonderheiten eines einzelnen Spenders oder die eines Pools ausschließen zu können, wurde die RNA eines Individuums und eines Spender-Pools (n=10) analysiert und gegenübergestellt. Die Ergebnisse zeigten eine hohe Korrelation zueinander, so dass für weitere Versuche auf einen RNA-Pool mehrerer Spender zurückgegriffen werden konnte.

Die Glaubwürdigkeit der Array-Analysen wurde durch bereits bekannte Daten bezüglich der Expression der KIRs, CD2, CD16, CD48, KLRs und zytolytischer Moleküle auf Proteinebene bzw. durch ähnliche Ergebnisse weiterer Gruppen, wobei diese allerdings andere Arrays mit geringerem Umfang an untersuchten Transkripten genutzt haben, gestützt [76,79,100].

Die Untersuchung von 39000 Transkripten (Arrays U133A+B von Affymetrix) zeigte, dass beide Subpopulationen im ruhenden Zustand 473 Transkripte unterschiedlich stark exprimierten, wobei bezogen auf NK-Zellen 174 ausschließlich in den  $CD56^{dim}$  und 130 nur in  $CD56^{bright}$  detektierbar waren. Für die Aktivierung aufgereinigter NK-Zellsubpopulationen wurde PMA/Ionomycin verwendet. Es wirkt zwar unspezifisch auf die Zellen, aber CD16 oder CD2, die potente Rezeptoren für die Aktivierung von NK-Zellen darstellen, werden von den Subpopulationen unterschiedlich exprimiert und lassen keine vergleichenden Analysen zu. Auch die Stimulation über IL-2 bot sich nicht an, da die  $CD56^{bright}$  NK-Zellen den hochaffinen Rezeptor tragen und im Gegensatz zu den  $CD56^{dim}$  NK-Zellen schon auf geringe Konzentrationen dieses Zytokins ansprechen würden. Die Analysen aktivierter  $CD56^{dim}$  und  $CD56^{bright}$  NK-Zellen wurden mit dem

Genearray U133A von Affymetrix, der mit 22000 Transkripten die relevanten Gene für diese Untersuchung enthält, genutzt. Demnach wurden 371 Transkripte signifikant höher in der einen oder der anderen Subpopulation exprimiert, wobei 74 ausschließlich in CD56<sup>dim</sup> und 76 in CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen nachweisbar waren.

Durch die Genearrays und mittels RT-qPCR konnten die Proteindaten bezüglich der höheren Expression des CD56-Moleküls auf den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen auf RNA-Ebene bestätigt werden. Die unterschiedliche Dichte dieses Moleküls auf der Oberfläche der beiden NK-Zellsubpopulationen wird daher wahrscheinlich durch transkriptionelle Prozesse reguliert.

Die Transkripte der KIRs wurden fast ausschließlich in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen nachgewiesen und somit die vorher erhobenen Proteindaten bestätigt und ergänzt, denn nicht für jedes KIR-Molekül stehen derzeit Antikörper zur Verfügung. Außerdem ist anzumerken, dass bestimmte KIRs auf der Zelloberfläche zwar detektierbar sind, aber aufgrund der starken Homologien der extrazellulären Domäne aktivierender und inhibierender Isoformen mit Hilfe von Antikörpern nicht voneinander unterschieden werden können. Erst eine Sonden-PCR machte es möglich, sie getrennt nachzuweisen und eine Aussage über die unterschiedliche Verteilung auf CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen zu treffen.

Im Gegensatz zu anderen KIRs wird KIR2DL4 von allen NK-Zellen exprimiert. Die Genearray- und PCR-Daten zeigten sogar eine höhere Expression dieses Moleküls in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen. Dieser Rezeptor weist eine funktionelle Besonderheit auf, denn er besitzt sowohl die Eigenschaften aktivierender (geladene Aminosäure in der Transmembranregion) als auch inhibierender (ITIM) Rezeptoren [26]. Es wurde gezeigt, dass KIR2DL4 tatsächlich auch beide Funktionen übernehmen kann, nämlich beispielsweise bei der Induktion der IFN $\gamma$ -Produktion oder der Inhibition der natürlichen Zytotoxizität [24,26]. Ob und in welchem Umfang CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen unterschiedlichen Gebrauch von diesem Rezeptor machen, ist bislang nicht bekannt.

Die Aktivierung mit PMA/Ionomycin führte zu einer starken Verminderung der KIR-spezifischen RNA in beiden NK-Zellsubpopulationen, wobei die Proteinexpression dabei nicht direkt beeinflusst wurde.

Im Gegensatz zu den meisten KIRs konnten die KLRs auf der Oberfläche beider NK-Zellsubpopulationen nachgewiesen werden, was die hier durchgeführten Genearrays und die RT-qPCR wiederum bestätigten [73]. Die Expression der KLRs bei

gleichzeitigem Fehlen von KIRs auf den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen lässt vermuten, dass diese NK-Zellsubpopulation vorrangig über inhibierende und aktivierende Formen der KLRs reguliert wird.

Die NCR NKp30 und NKp46 wurden zwar auf der Oberfläche von CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen nachgewiesen, ihre Transkripte konnten jedoch in mehreren Arrays nicht detektiert werden. Wahrscheinlich handelt es sich bei ihnen um sehr langlebige Proteine, die zum Zeitpunkt der Untersuchung keiner transkriptionellen Regulierung unterlagen. Im Einklang mit anderen Gruppen, konnte gezeigt werden, dass NKp44 nur auf wenigen ruhenden CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen des peripheren Blutes vorhanden ist [72]. NKp30 wurde fast ausschließlich auf den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen exprimiert, während NKp46 auf allen NK-Zellen detektiert werden konnte. Bei diesem Molekül war die Dichte jedoch signifikant höher auf den CD56<sup>bright</sup> verglichen mit den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen.

Da auch nach Aktivierung mit PMA/Ionomycin keine Änderung in der Expression der NKps auftrat, ist anzunehmen, dass der Phorboläther nicht der geeignete Stimulus für die Regulation dieser Rezeptoren ist. Bekanntermaßen wird NKp44 nach Inkubation mit IL-2 auf allen NK-Zellen heraufreguliert, was die generelle Regulierbarkeit des Moleküls belegt [101].

Für ihre Wanderung durch die Gewebe bzw. die Bildung von Konjugaten als Voraussetzung für die Lyse von Targetzellen spielen Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle. In Übereinstimmung mit anderen Gruppen und eigenen Proteindaten wurde eine signifikant höhere mRNA-Expression von CD62L (L-Selektin) in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen detektiert, die durch Aktivierung mit PMA/Ionomycin weiter gesteigert werden konnte [96]. CD62L ist ein wichtiges Molekül für das sog. Homing von Lymphozyten, d.h. deren Migration in die Lymphknoten. Die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen machen in den Lymphknoten den größten Anteil der NK-Zellen aus und dabei stellt sich die Frage, welchen Ursprungs diese Lymphozyten sind. Zwei Möglichkeiten sind denkbar: entweder wandern spezialisierte CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen aus dem Knochenmark in die Lymphknoten oder unreife Vorläufer erreichen dieses lymphatische Gewebe und differenzieren dort zu CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen aus. Die erste Theorie wird dadurch gestützt, dass CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen generell im peripheren Blut nachweisbar sind und ihr Anteil dort nach Stammzelltransplantation beträchtlich ansteigt [7,102]. Da die Wanderung von Lymphozyten aus dem Blut in die Lymphknoten über verschiedene Adhäsionsmoleküle wie CD62L, CXCR3 und CCR7 vermittelt wird, die von CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimiert werden, ist diese NK-Zellsubpopulation gut für die potentielle Migration in die Lymphknoten ausgestattet. Desweiteren konnte bereits im Mausmodell in Abhängigkeit

von CXCR3 die Wanderung von NK-Zellen in die Lymphknoten induziert werden [103]. Somit ist es möglich, dass spezialisierte CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in die Lymphknoten migrieren, ähnlich wie es bei T-Zellen beschrieben ist [104]. Andererseits konnten Caligiuri et al Vorläuferzellen in den Lymphknoten identifizieren, die in Gegenwart von IL-15, IL-2 oder aktivierten T-Zellen zu CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen differenzieren, wodurch die These zur Migration unreifer Vorläufer in die Lymphknoten bekräftigt wurde [83]. Welchen der Mechanismen die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen dafür nutzen oder ob möglicherweise beide Wege parallel beschritten werden, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

Damit NK-Zellen ihre Funktionen effektiv ausführen können, ist auch die Wanderung in entzündliche Gewebe von entscheidender Bedeutung. Verschiedene Rezeptoren, die dazu beitragen, konnten auf CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen detektiert werden.

CD31 (PECAM-1) vermittelt die homophile, aber auch heterophile Adhäsion von Zellen, wobei die Liganden für letztere zur Zeit noch kontrovers diskutiert werden. Auf diese Weise können z.B. Leukozyten an Endothelzellen binden. Die Genearrays und auch FACS-Analysen zeigten, dass CD31 von beiden Subpopulationen gleich stark exprimiert wurde. Nach Aktivierung kam es zu einem Anstieg der entsprechenden mRNA. Werden NK-Zellen über CD31 aktiviert, kommt es zu einem Anstieg von  $\beta$ 2-Intergrinen auf der Oberfläche, wodurch die Adhäsionsfähigkeit dieser Zellen erhöht wird. Außerdem konnte die Diapedese von ruhenden CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen durch Endothelzellen mittels blockierender Antikörper gegen CD31 inhibiert werden [105]. Ein weiteres Molekül, das die Wanderung von Lymphozyten in entzündliche Gewebe ermöglicht, ist CD103 ( $\alpha^E\beta^7$ -Integrin). Im Zusammenhang mit NK-Zellen wurde dieses Molekül bislang noch nicht beschrieben [106]. In dieser Arbeit konnte das CD103-Transkript signifikant höher in ruhenden CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen und etwa gleich stark in aktivierten NK-Zellsubpopulationen nachgewiesen werden. CD103 vermittelt die Lokalisierung und/oder die Verankerung in Epithelzellen über E-Cadherin. Es wird überwiegend auf intestinalen intraepithelialen Lymphozyten exprimiert. Beide NK-Zellsubpopulationen sind also prinzipiell in der Lage in entzündliche Gewebe einzuwandern.

CD166 (ALCAM), dessen Expression auf NK-Zellen kaum beschrieben ist, konnte im Genearray auf aktivierten CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen detektiert werden. Erstere wiesen dabei signifikant höhere Signale auf. CD166, das eine homophile Bindung vermittelt, wird u.a. auch auf einigen Tumorzellen exprimiert. Daher könnte es eine Rolle für die Bindung entsprechender Targets durch die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen und in der Folge zu einer effektiveren Lyse dieser Zielzellen führen.

Nach Stimulation regulieren Lymphozyten eine Reihe von Aktivierungsmarkern wie beispielsweise CD69 hoch. In diesen Untersuchungen wurde für CD69 eine starke Verminderung der mRNA nach Aktivierung mit PMA/Ionomycin detektiert, während das Protein auf allen NK-Zellen nachweisbar war. Dieser scheinbare Widerspruch könnte darin begründet sein, dass die CD69 mRNA AU-reiche Sequenzen besitzt, die einen raschen Abbau vermitteln können und daher zur Instabilität des Moleküls führen [107].

CD99 (MIC2, CD99 restricted (R)) wurde in ruhenden CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen signifikant höher exprimiert. Auch auf der Oberfläche dieser Zellen konnte eine höhere Dichte dieses Moleküls festgestellt werden. CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen regulierten CD99 erst nach Aktivierung mit PMA/Ionomycin hoch. Im Zusammenhang mit NK-Zellen war bisher nur die Expression von CD99 auf CD16<sup>+</sup> Zellen untersucht worden [108]. Da fast ausschließlich die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen CD16 exprimieren, wurden diese Daten damit auf mRNA-Ebene bestätigt. Welche Funktion CD99 auf der Oberfläche von NK-Zellen übernimmt, ist bisher nicht bekannt. Es ist an einer Reihe von zellulären Prozessen beteiligt wie homotypische Aggregation, Apoptose, Adhäsion, Proteintransport, Differenzierung zu T<sub>Helfer</sub> (T<sub>H</sub>)1-Zellen und Migration von Monozyten [109-112].

Innerhalb des NK-Zellkompartiments sind hauptsächlich CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen für die Ausführung der zytotoxischen Funktionen verantwortlich. Dies reflektiert u.a. die hohe Expression der zytolytischen Granula und ihre Fähigkeit, besonders effektiv an die Zielzellen zu binden. Die Genearrays unterstreichen diese bekannten Daten und erweitern sie zudem durch den Befund einer signifikant höheren Expression von Granzym M, Granzym B, Perforin und CTLA1 in dieser NK-Zellsubpopulation. Eine Ausnahme stellt hier Granzym K dar, das sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in stärkerem Maße in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen nachweisbar war. Das könnte zur moderaten Zytotoxizität dieser Subpopulation beitragen, denn im Modell konnte gezeigt werden, dass Granzym K in Granzym A<sup>-/-</sup> Mäusen die Funktion des fehlenden Proteins übernimmt [61]. Bei der Tötung von unreifen DCs durch die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in den Lymphknoten könnte Granzym K eine entscheidende Rolle spielen [113]. Nach Aktivierung wurde die Granzym K Expression zwar reduziert, aber Granzym B in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen heraufreguliert. Dies könnte das erhöhte zytotoxische Potential voraktivierter CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen erklären, das bereits beschrieben wurde [7]. Zusätzlich zu Granzym K wurden auch CTLA-1 und Granzym M in beiden Subpopulationen herunterreguliert. Dieses Phänomen bedarf weiterer Untersuchungen, könnte aber einen regulatorischen Mechanismus der natürlichen Zytotoxizität darstellen.

Neben ihren zytotoxischen Funktionen sind NK-Zellen auch in der Lage, eine Vielzahl an Zytokinen und Chemokinen zu produzieren. Chemokine lassen sich nicht nur strukturell (CC, CXC, C), sondern auch grob funktionell einteilen: CXCL1-8 werden bei akuten Entzündungsprozessen induziert und locken vorrangig Neutrophile an; CXCL9-12 sind eher konstitutiv vorrätig und wirken auf Lymphozyten sowie Zellen außerhalb des hämatopoetischen Systems; CCL1-28 haben Einfluss auf die lymphoiden und myeloiden Kompartimente während Entzündung und Homöostase [114].

Mit Hilfe der Genearrays und eines Zytokinarrays konnte ein Überblick an Zytokinen und Chemokinen gewonnen werden, deren mRNA nach Aktivierung oder zum Teil auch konstitutiv in CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen vorhanden war bzw. von diesen sezerniert wurden. Die gezeigten Daten des Gene- und Zytokin-Arrays stammen von dem gleichen Spenderpool, korrelieren sehr gut miteinander und bestätigen sich damit gegenseitig. Außerdem konnten die Ergebnisse des ersten Zytokin-Arrays in einem zweiten reproduziert werden. Aufgrund der langen Inkubationszeit von 48 h ist nicht auszuschließen, dass die Sekretion einiger Mediatoren durch sekundäre Effekte hervorgerufen oder andere von der jeweiligen Subpopulation verbraucht wurden. Es traten beispielsweise bei MCP-2 und MCP-3 Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen des Zytokin-Arrays und denen des Genearrays auf. Diese Proteine waren zwar im Überstand nachweisbar, ihre mRNA jedoch nicht. Eine Erklärung liefern u.a. die eben genannten Probleme, aber auch die hohe Instabilität von Zytokin- und Chemokin-mRNA, die durch AU-reiche Regionen bedingt ist.

Generell ist die Produktion von XCL1, CCL1-5, CCL22, GM-CSF und CXCL8 durch NK-Zellen zwar bereits beschrieben, aber durch welche NK-Zellsubpopulation sie sezerniert werden, war teilweise noch unklar [69,70,115,116].

Diese Untersuchungen zeigen, dass beide NK-Zellsubpopulationen CCL3, CCL4 und CCL5 exprimieren, aber sowohl mRNA als auch die Proteine in größeren Mengen in den CD56<sup>dim</sup> bzw. deren Überstand detektierbar waren. Sie binden an CCR5, der ein wichtiger Korezeptor für HIV ist. Durch Sekretion dieser Mediatoren, die kompetitiv an CCR5 binden, kann das Eindringen des Virus in CCR5<sup>+</sup> Zellen inhibiert werden [115]. Zusätzlich besitzt CCL5 ebenso wie IL-8, CXCL9 und CXCL10 direkte antimikrobielle Eigenschaften [117,118]. Die zwei letzteren wurden von beiden NK-Zellsubpopulationen gleich stark exprimiert. Die Chemokine CCL2-5, CCL8, CXCL10 sowie CX3CL1 können die Zytotoxizität von NK-Zellen steigern, indem die Ausschüttung der zytolytischen Granula erhöht wird [119-121]. CX3CL1 wurde zwar nur in geringen Mengen von NK-Zellen sezerniert, aber die Signale der CX3CR1 mRNA waren in ruhenden CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen signifikant höher und stiegen nach Aktivierung dieser Zellen stark an. Durch die Sekretion von CX3CL1 durch Endothelzellen im Verlauf von Entzündungsprozessen,

könnte die Migration dieser Zellen in die Gewebe initiiert und ihre Zytotoxizität gesteigert werden. Die Produktion eben genannter Chemokine und der Expression von CX3CR1 könnte u.a. zum starken zytotoxischen Potential der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen beitragen. Chemokine, die neben ihren regulatorischen Aufgaben auch direkt antimikrobiell wirken, wurden somit in größeren Mengen von den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen sezerniert.

Die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen zeigten eine höhere Expression an TGF $\beta$ 2 und TGF $\beta$ 3 auf RNA- und Proteinebene. TGF $\beta$ s sind regulatorische Moleküle mit pleiotropen Effekten auf Zellproliferation, -differenzierung, -migration und -überleben. Die Funktion wird hauptsächlich über TGF $\beta$ R2 vermittelt, dessen mRNA in aktivierten NK-Zellsubpopulationen etwa gleich stark exprimiert wurde, während TGF $\beta$ R3-Transkripte im Vergleich zu ruhenden NK-Zellen reduziert waren. TGF $\beta$ 1 konnte nicht in NK-Zellen nachgewiesen werden, was entweder darauf zurückzuführen ist, dass PMA/Ionomycin möglicherweise nicht der geeignete Stimulus war, zumal TGF $\beta$ 2 und 3 anders als TGF $\beta$ 1 reguliert werden oder dieses von den Zellen verbraucht wurde. Damit sind CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen prinzipiell in der Lage, über diese Faktoren eine Reihe von zellulären Prozessen zu regulieren.

Weiterhin scheinen die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen Chemokine zu produzieren, die bislang hauptsächlich im Zusammenhang mit DCs beschrieben wurden. Dazu gehören TARC (CCL17), MDC und PARC (CCL18). Ersteres führt zur Rekrutierung von CLA<sup>+</sup> T-Lymphozyten in die Haut. Es bindet gemeinsam mit MDC an CCR4, der vorrangig auf Zellen vom T<sub>H</sub>2 Phänotyp exprimiert wird [122]. CCL18 hat Einfluss auf unreife DCs (iDC) und Lymphozyten. Es lockt naive T-Zellen, aber auch B-Zellen und iDCs in die Lymphknoten. Es kann durch PMA, aber auch IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  induziert werden, d.h. also die Produktion dieses Mediators könnte hier durch die Aktivierung mit PMA/Ionomycin direkt oder über die Produktion von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  indirekt induziert worden sein [123]. Wird CCL18 von CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen sezerniert, können diese Zellen sowohl T-Zellen als auch DCs in die Lymphknoten locken, wodurch Berichte über die Interaktion dieser drei Zellpopulationen unterstrichen werden [113]. Weiterhin konnte RANKL (TNFSF11) vorrangig in CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen nachgewiesen werden. Dieser Ligand vermittelt über RANK (TNFRSF11A) die Interaktion von T-Zellen mit DCs, wodurch erstere aktiviert werden können. Im Zusammenspiel mit IL-4 und TGF $\beta$  kann außerdem das Überleben von RANK<sup>+</sup> T-Zellen erhöht werden [124]. Durch die Expression von RANKL auf CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen könnten diese in die eben genannten Prozesse eingreifen. Bezüglich dieser Interaktionen zeigten die Genearrays auch eine signifikant höhere Expression von TRAIL (TNFSF10) in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, über das iDCs effektiv getötet werden können [125]. CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen exprimieren zwar

dieses Molekül ebenfalls, konnten aber nur in geringem Maße in den Lymphknoten nachgewiesen werden und eine Rekrutierung dorthin scheint ausgeschlossen, da sie nicht ausreichend mit CCR7 und CXCR3 ausgestattet sind, die neben CD62L wichtig für die Migration in die Lymphknoten sind [72]. Eine Interaktion mit den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen in diesem lymphatischen Gewebe ist daher unwahrscheinlich. Die Produktion von CCL17, CCL18, RANKL, TGF $\beta$ 2 und TGF $\beta$ 3 unterstreichen die regulatorischen Eigenschaften der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen.

Ein weiteres Molekül aus der Familie der TNF-Rezeptor/Liganden ist LIGHT (TNFSF14). Es handelt sich um ein Transmembranprotein, das je nach Expression seines Rezeptors verschiedene biologische Funktionen übernimmt. U. a. vermittelt es Apoptose verschiedener Tumorzellen, die den Lymphotoxin- $\beta$  Rezeptor und den HVEM (herpes simplex virus entry mediator) auf der Oberfläche tragen. Wird nur einer dieser beiden exprimiert, wird über LIGHT keine Zytolyse der Targetzelle induziert [126]. LIGHT konnte in aktivierten NK-Zellsubpopulationen detektiert werden. Beide Zellen hätten damit die Möglichkeit, Tumorzellen auf diesem Wege zu eliminieren. Ob und welche Rolle die Produktion dieser Mediatoren bei der Interaktion der NK-Zellen mit anderen Zellen des Immunsystems spielt, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

IL-8 und IL-1 $\beta$  wurden in dieser Arbeit weitergehend untersucht. Diese Mediatoren wurden überwiegend von den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen produziert. Im Gegensatz zu CD31 und CX3CR1, die die Wanderung in entzündliche Gewebe vermitteln können, ist IL-8 in der Lage, diese Migration zu inhibieren und besitzt somit anti-entzündliche Eigenschaften. Möglicherweise spielt die Produktion dieses Chemokins eine Rolle bei der negativen Regulation dieser Prozesse. IL-1 $\beta$  ist in der Lage, die IL-8 Produktion zu induzieren, während seine eigene Sekretion durch IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und bakterielle Endotoxine vermittelt werden kann. Neben seinen regulatorischen Eigenschaften auf die Proliferation von B-Zellen und die Stimulation von T<sub>H</sub>-Zellen kann IL-1 $\beta$  direkt zellzerstörend auf bestimmte Tumorzellen wirken. Ebenso wie CCL3-5 haben IL-8 und IL-1 $\beta$  neben ihren regulatorischen auch direkte antimikrobielle bzw. zytolytische Effekte und werden vorrangig von den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen sezerniert.

Während nach einer Inkubationszeit von 4 h die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen bekanntermaßen größere Mengen an IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  produzieren [76], konnte hier nach 24 h ein Ausgleich der Zytokinlevel in den beiden Subpopulationen gemessen werden. Auf mRNA-Ebene ließ sich mittels Kinetiken ersteres bestätigen, da die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen bei IFN $\gamma$  nach 4 h bzw. beim TNF $\alpha$  nach 2 h deutlich höhere RNA-Level zeigten. Diese konnten die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen nach 24 h ausgleichen. Um also Aussagen zur Produktion von Zytokinen und Chemokinen durch die beiden NK-Zellsubpopulationen

treffen zu können, ist der Analysezeitpunkt von entscheidender Bedeutung. Möglicherweise würden Untersuchungen mittels des Zytokinarrays nach einer kürzeren Zeit andere Muster an Mediatoren aufweisen, als die hier gezeigten, die erst nach 48 h analysiert wurden.

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen der Chemokin-/Zytokinmuster die Sekretion von Mediatoren wie CCL17 und CCL18, die bislang nicht im Zusammenhang mit NK-Zellen bekannt waren. Mediatoren, die auch direkte antimikrobielle oder zytolytische Funktionen übernehmen können (CCL3-5, IL-8, IL-1 $\beta$ ), wurden vorrangig von den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen produziert. Diese erhalten damit auch die Möglichkeit, Immunantworten mit zu steuern. Die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen dagegen, produzieren diese Proteine in geringerem Maße, dafür jedoch größere Mengen an Zytokinen/Chemokinen (TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, CCL17), die deren regulatorisches Potential weiter unterstreichen.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Suche nach Rezeptoren, die einerseits beide NK-Zellsubpopulationen gleich stark exprimieren und andererseits aktivierende Signale in die Zelle leiten, um vergleichende Untersuchungen durchführen zu können. CD16, CD2 und IL-2, die eine Aktivierung von NK-Zellen vermitteln können, boten sich nicht an, da diese Moleküle bzw. der IL-2 Rezeptorkomplex deutlich unterschiedlich auf CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimiert werden.

Zunächst wurde deshalb die Eignung von KIR2DL4 untersucht, der als einziger KIR auf allen NK-Zellsubpopulationen vorhanden ist und daher als ein sehr interessanter Kandidat erschien. Es wurden die Proliferation separierter CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen nach Kreuzvernetzung mittels eines Antikörpers durchgeführt, der freundlicherweise von S. Rajagopalan zur Verfügung gestellt wurde. Da KIR2DL4 durch IL-2 heraufreguliert wird, wurden 500 U/ml dieses Zytokines allein oder als Kostimulus eingesetzt [25]. Einige Spender zeigten eine erhöhte Proliferation in Gegenwart beider Stimuli, während es andere nicht taten. Die Isotypkontrolle zeigte keine Erhöhung der Proliferation im Vergleich zur Mediumkontrolle. Die Kombination aus Isotypkontrolle und IL-2 lieferte das gleiche Resultat wie der Einsatz von IL-2 alleine. Diese Ergebnisse belegen, dass die Aktivierung nicht über Fc-Rezeptoren, sondern spezifisch über KIR2DL4 vermittelt wurde. Die unterschiedliche Reaktion der Spender kann durch die Expression der beschriebenen Spleißvarianten erklärt werden. Aufgrund der geringen Zellmengen von CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen wurde allerdings keine Bestimmung der Allele durchgeführt. Ob die Spender mit der geringen bzw. fehlenden Proliferation das A9 Allel tragen, das einen Rezeptor ohne Transmembranregion kodiert, der daher nicht auf der Oberfläche exprimiert werden kann, ist nicht sicher zu sagen [28]. Wegen der individuell

unterschiedlichen Ergebnisse wurde auf weitere Untersuchungen zur Stimulation mit KIR2DL4 verzichtet und auf den IL-21R zurückgegriffen.

IL-21R wurde in den Genearrays gleich stark in ruhenden und aktivierten CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen nachgewiesen. Auch auf der Oberfläche dieser Zellen konnte der Rezeptor als Protein in geringer, aber vergleichbarer Dichte detektiert werden und stellte damit ein geeignetes Untersuchungsobjekt dar. Zunächst wurden PBMC mit 20 ng/ml IL-21 und 50 U/ml IL-2 allein oder in Kombination für 24 h inkubiert. Die Dosis IL-2 sollte ausschließlich als Kostimulus dienen und kann in dieser Konzentration allein keine Aktivierung der Zellen induzieren. Die IL-21 Konzentration wurde zum einen anhand verschiedener Publikationen und nach einer Untersuchung zur Dosisabhängigkeit gewählt. Diese Analysen zeigen, dass die Aktivierungsmarker CD69 und CD25 unterschiedlich von CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen reguliert wurden. Während erstere vorrangig CD69 in Gegenwart von IL-21 oder in Kombination mit IL-2 heraufregulierten, zeigten letztere eher eine erhöhte Expression von CD25, wenn IL-21 allein in die Kultur gegeben wurde. Wurde dem Ansatz IL-2 zugefügt, nahm die Zahl CD25<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen stark ab. Dies ist nicht überraschend, denn CD25 wird nach Stimulation mit IL-2 internalisiert und kann nicht mehr auf der Oberfläche der Zellen nachgewiesen werden [127,128]. Desweiteren wurde die Proliferation und die Zytotoxizität von separierten NK-Zellsubpopulationen nach Stimulation mit diesen Mediatoren gemessen. Während die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen auch bei suboptimaler IL-2 Konzentration proliferierten, was nach Koinkubation mit IL-21 weiter gesteigert werden konnte, wurde in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen insbesondere bei der Zytokinkombination eine erhöhte Zytotoxizität festgestellt. Beide Subpopulationen zeigten einen geringen Anstieg der jeweils anderen Funktion. Das erhöhte zytolytische Potential erklärt sich u.a. durch die leicht ansteigende Konjugatbildung sowie die erhöhte intrazelluläre Expression von Granzym K, die besonders bei den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen nachgewiesen wurde. Granzym K scheint also tatsächlich eine wichtige Rolle bei der Zytotoxizität dieser NK-Zellsubpopulation zu übernehmen. Die verbesserte Konjugatbildung in Gegenwart von IL-2 und/oder IL-21 ist nicht auf eine Erhöhung der Dichte von Adhäsionsmolekülen wie CD11a/CD18 (LFA-1), CD2 oder CD58 und auch nicht durch vermehrte Akkumulation von Granzym A oder Perforin in den Zellen zurückzuführen, da im FACS keine Änderung in der Expression dieser Moleküle festgestellt wurde. Vielmehr ist bekannt, dass z.B. bezüglich CD11a/CD18 nach Aktivierung eine Konformationsänderung vollzogen wird, die eine höhere Affinität an die Liganden bedingt. Außerdem wurde wie bereits oben erwähnt CD69 insbesondere auf den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen heraufreguliert, das ebenfalls die Bindung an Targetzellen vermitteln kann [52].

Da sowohl IL-2 als auch IL-21 von aktivierten T-Zellen produziert werden, könnte dies ein weiterer Mechanismus der Interaktion dieser Lymphozyten mit NK-Zellen darstellen. Der beobachtete synergistische Effekt von IL-2 und IL-21 könnte möglicherweise klinisch interessant für den Einsatz dieser Mediatoren in der Therapie sein. Die starken Nebenwirkungen, die durch hohe IL-2-Konzentrationen ausgelöst werden, könnten durch Kostimulation mit IL-21 und gleichzeitiger Reduktion von IL-2 vermindert werden.

Aufgrund der geringen CD56<sup>bright</sup> NK-Zellzahlen war eine vergleichende Analyse der gesamten Signaltransduktion nach Stimulation mit IL-2 und/oder IL-21 nicht möglich. Daher wurde stellvertretend die Phosphorylierung von STAT1, STAT3 und STAT5 im FACS untersucht. Die Antikörper von BD binden spezifisch an das phosphorylierte Thyrosin des jeweiligen Proteins. Durch Verminderung der Paraformaldehyd-konzentration auf 2% war der Nachweis von CD56 auch nach Fixierung der Zellen möglich. Als Kontrollen dienten Zytokine, von denen bekannt war, dass sie die Phosphorylierung des entsprechenden STAT-Proteins induzieren. IFN $\gamma$  führte zu einer starken Phosphorylierung von STAT1 in Monozyten und zu einem geringen Maß in Lymphozyten. Hohe IL-2 Konzentrationen induzierten die Phosphorylierung von STAT5 und IL-6 vermittelte eine schwache Phosphorylierung von STAT3. IL-21 allein und die Kombination beider Zytokine zeigte eine schwache Phosphorylierung von STAT1. Dieses reguliert unter anderem die natürliche Zytotoxizität, jedoch nicht die ADCC von NK-Zellen und könnte somit zum gesteigerten zytolytischen Potential dieser Zellen beitragen [129]. Im Gegensatz dazu kommt es zu einem deutlichen Anstieg des Phosphorylierungszustands von STAT3, wenn die Zellen mit IL-21 allein oder der Zytokinkombination aktiviert wurden. Nur bei den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen konnte ein geringer synergistischer Effekt von IL-2 und IL-21 beobachtet werden. Da STAT3 beispielsweise die Proliferation von Zellen reguliert, könnte dies die Steigerung der Proliferation in Gegenwart dieser Zytokine erklären. STAT5 wurde in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen auch bei suboptimalen Dosen IL-2 phosphoryliert, was durch Kombination mit IL-21 nicht weiter gesteigert werden konnte. Die starke Reaktion der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen auf suboptimale IL-2 Konzentration ist wahrscheinlich auf die Expression von CD25 zurückzuführen, das zusammen mit CD132 und CD122 den hochaffinen IL-2 Rezeptorkomplex bilden. Die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen, die kaum CD25 exprimierten, zeigten nur eine schwache Phosphorylierung von STAT5, wenn IL-2 und IL-21 in der Kultur waren. Da auch STAT5 die Proliferation regulieren kann, könnte es zusammen mit STAT3 die starke Zellteilung der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen herbeigeführt haben [130,131]. Damit STAT-Proteine in den Nukleus wandern und dort an DNA binden können, ist die Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren notwendig. Die genauen Funktionen dieser

Homo- bzw. Heterodimere sind noch weitgehend unbekannt und bedürfen weiterer Untersuchungen. Es ist also durchaus möglich, dass durch die Aktivierung mit IL-2 und/oder IL-21 bestimmte Homo- oder Heterodimere gebildet werden, die die gemessenen Funktionen regulieren. Es ist außerdem anzunehmen, dass STATs in Abhängigkeit vom Zelltyp unterschiedliche Aufgaben ausführen.

Die große Zahl an Transkripten, die mit Hilfe der Genearrays untersucht wurden, konnten in dieser Arbeit nicht ausreichend ausgewertet werden. Deshalb wurde auf einige relevante eingegangen. Zum einen wurden natürlich die Moleküle berücksichtigt, deren Expression bereits bekannt war und damit frühere Ergebnisse bestätigten. Außerdem wurde ausführlich auf Moleküle eingegangen, die für die weitere Charakterisierung der beiden Subpopulationen dienen und teilweise noch nicht im Zusammenhang mit NK-Zellen beschrieben waren. Die unterschiedliche Expression von signaltransduzierenden und RNA-prozessierenden Proteinen unterstreicht die Theorie, dass es sich bei CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> um funktionell unterschiedliche NK-Zellsubpopulationen handelt.

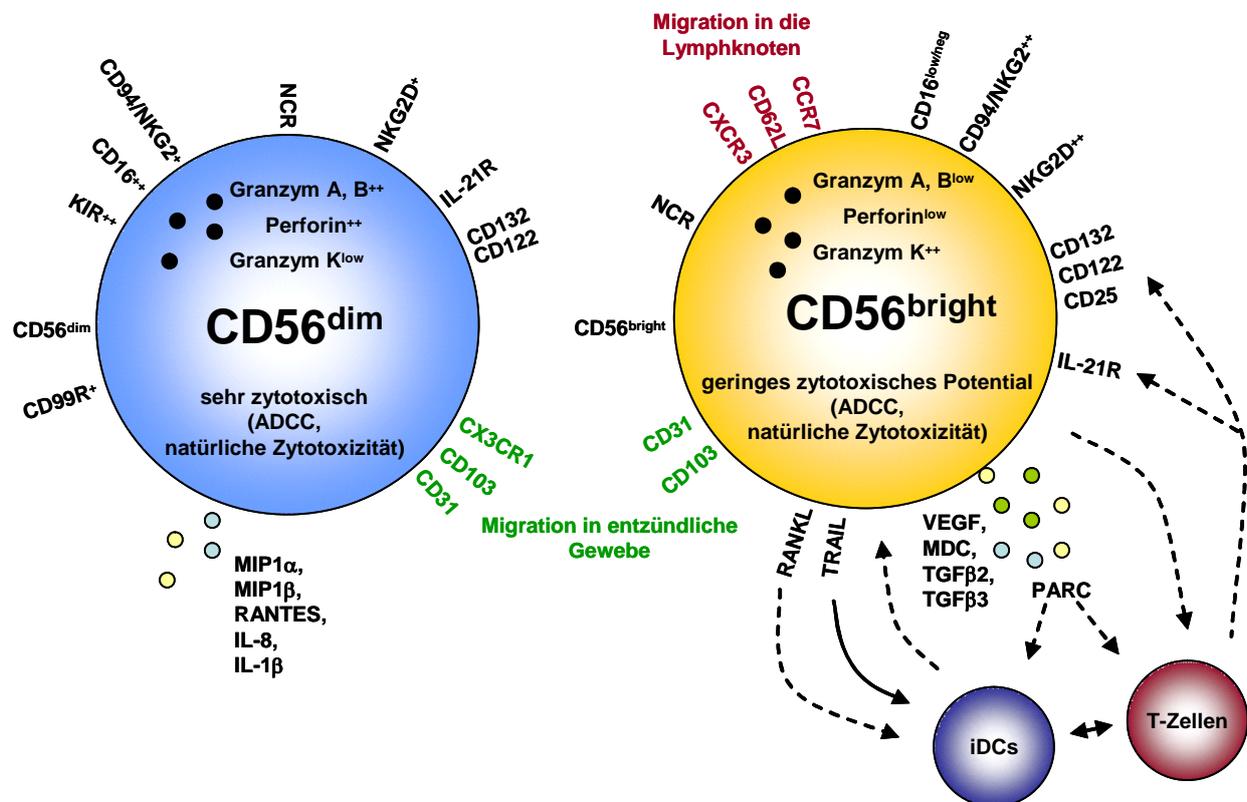
Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Rezeptoren, mit deren Hilfe ähnliche Subpopulationen in der Maus festgestellt werden können. Murine NK-Zellen exprimieren weder CD56 noch ein dazu homologes Protein. Daher ist es bisher schwierig ein adäquates Mausmodell für in vivo Versuche zu etablieren. Mögliche Zielmoleküle könnten dieser Arbeit zu Folge sein: (I) CXCR3, das nur auf CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimiert wird, (II) CX3CR1 und CD99, die im ruhenden Zustand nur auf CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen vorhanden sind und erst nach Aktivierung mit PMA/Ionomycin auch in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen detektiert wurden, (III) CD103, das signifikant höher in ruhenden CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen nachgewiesen wurde. Antikörper gegen diese murinen Strukturen sind teilweise kommerziell erhältlich oder wurden in Laboren anderer Institutionen generiert [132-135].

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen auf Protein- und RNA-Ebene Unterschiede in der Expression von Rezeptoren, Granzymen, Perforin, signaltransduzierenden Molekülen sowie Chemokinen und Zytokinen aufweisen. Dabei konnten frühere Daten (KIRs, Granzyme) bestätigt und neue Rezeptoren (CD99R, CD103) bzw. Mediatoren (VEGF, CCL17, CCL18) im Kontext mit NK-Zellen identifiziert werden. Welche Rolle sie bei den Funktionen der NK-Zellen oder deren Interaktion mit anderen Immunzellen spielen, bedarf jedoch weiterer Analysen. Dafür wäre u.a. die Etablierung eines geeigneten Mausmodells mit entsprechenden NK-

Zellsubpopulationen hilfreich. Diese müssten über andere Rezeptoren als CD56 definiert werden, wobei sich wie oben erwähnt CD99R oder CXCR3 anbieten, da sie entweder nur auf CD56<sup>dim</sup> oder CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimiert sind.

Die Analysen gewähren somit neue Einblicke in die Eigenschaften von humanen NK-Zellsubpopulationen und unterstreichen die These funktioneller Untergruppen innerhalb des NK-Zellkompartiments.

Eine Zusammenfassung der wichtigsten Daten dieser Arbeit zeigt das stark vereinfachte Schema:



**Abb.35 Schematische Zusammenfassung der Daten dieser Arbeit**

Rezeptoren, die auf CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimiert sowie Zytokine und Chemokine, die von ihnen sezerniert werden, sind dargestellt. Gestrichelte Pfeile kennzeichnen mögliche Interaktionen aufgrund der Expression dieser Moleküle und die durchgezogene Linie zeigt eine bereits beschriebene Interaktion zu unreifen DCs. Außerdem sind Rezeptoren und deren potentielle Funktion farblich gekennzeichnet.

## Literaturverzeichnis

1. G. Trinchieri. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989; 47: 187-376.
2. M. Takasugi, M. R. Mickey und P. I. Terasaki. Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells. *Cancer Res* 1973; 33: 2898-2902.
3. J. Ritz, R. E. Schmidt, J. Michon, T. Hercend und S. F. Schlossman. Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv Immunol* 1988; 42: 181-211.
4. R. E. Schmidt, T. Hercend, D. A. Fox, A. Bensussan, G. Bartley, J. F. Daley, S. F. Schlossman, E. L. Reinherz und J. Ritz. The role of interleukin 2 and T11 E rosette antigen in activation and proliferation of human NK clones. *J Immunol* 1985; 135: 672-678.
5. C. V. Desroches, C. Andreoni und D. Rigal. Differential expression of the LFA-1 molecule on the human peripheral blood mononuclear cell subpopulations. *Immunol Lett* 1990; 24: 13-20.
6. R. E. Schmidt, G. Bartley, H. Levine, S. F. Schlossman und J. Ritz. Functional characterization of LFA-1 antigens in the interaction of human NK clones and target cells. *J Immunol* 1985; 135: 1020-1025.
7. R. Jacobs, M. Stoll, G. Stratmann, R. Leo, H. Link und R. E. Schmidt. CD16-CD56+ natural killer cells after bone marrow transplantation. *Blood* 1992; 79: 3239-3244.
8. M. Schedlowski, R. Jacobs, G. Stratmann, S. Richter, A. Hadicke, U. Tewes, T. O. Wagner und R. E. Schmidt. Changes of natural killer cells during acute psychological stress. *J Clin Immunol* 1993; 13: 119-126.
9. M. Colonna, J. Samaridis. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science* 1995; 268: 405-408.
10. V. Litwin, J. Gumperz, P. Parham, J. H. Phillips und L. L. Lanier. NKB1: a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *J Exp Med* 1994; 180: 537-543.
11. R. Biassoni, C. Cantoni, D. Pende, S. Sivori, S. Parolini, M. Vitale, C. Bottino und A. Moretta. Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol Rev* 2001; 181: 203-214.
12. V. M. Braud, D. S. Allan, C. A. O'Callaghan, K. Soderstrom, A. D'Andrea, G. S. Ogg, S. Lazetic, N. T. Young, J. I. Bell, J. H. Phillips, L. L. Lanier und A. J. McMichael.

- HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998; 391: 795-799.
13. N. Lee, M. Llano, M. Carretero, A. Ishitani, F. Navarro, M. Lopez-Botet und D. E. Geraghty. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 5199-5204.
  14. L. L. Lanier, B. C. Corliss, J. Wu, C. Leong und J. H. Phillips. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 1998; 391: 703-707.
  15. P. J. Leibson. Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity* 1997; 6: 655-661.
  16. L. Abi-Rached, P. Parham. Natural selection drives recurrent formation of activating killer cell immunoglobulin-like receptor and Ly49 from inhibitory homologues. *J Exp Med* 2005; 201: 1319-1332.
  17. W. E. Seaman. Natural killer cells and natural killer T cells. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1204-1217.
  18. H. G. Ljunggren, K. Karre. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; 11: 237-244.
  19. C. Cantoni, S. Verdiani, M. Falco, A. Pessino, M. Cilli, R. Conte, D. Pende, M. Ponte, M. S. Mikaelsson, L. Moretta und R. Biassoni. p49, a putative HLA class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily. *Eur J Immunol* 1998; 28: 1980-1990.
  20. N. M. Valiante, M. Uhrberg, H. G. Shilling, K. Lienert-Weidenbach, K. L. Arnett, A. D'Andrea, J. H. Phillips, L. L. Lanier und P. Parham. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 1997; 7: 739-751.
  21. A. Selvakumar, U. Steffens und B. Dupont. NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains. *Tissue Antigens* 1996; 48: 285-294.
  22. A. Kikuchi-Maki, T. L. Catina und K. S. Campbell. Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK cells through association with the Fc receptor gamma protein. *J Immunol* 2005; 174: 3859-3863.
  23. S. Rajagopalan, E. O. Long. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med* 1999; 189: 1093-1100.
  24. S. Rajagopalan, J. Fu und E. O. Long. Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J Immunol* 2001; 167: 1877-1881.

25. A. Kikuchi-Maki, S. Yusa, T. L. Catina und K. S. Campbell. KIR2DL4 is an IL-2-regulated NK cell receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN-gamma production. *J Immunol* 2003; 171: 3415-3425.
26. M. Faure, E. O. Long. KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *J Immunol* 2002; 168: 6208-6214.
27. S. Yusa, T. L. Catina und K. S. Campbell. SHP-1- and phosphotyrosine-independent inhibitory signaling by a killer cell Ig-like receptor cytoplasmic domain in human NK cells. *J Immunol* 2002; 168: 5047-5057.
28. J. P. Goodridge, C. S. Witt, F. T. Christiansen und H. S. Warren. KIR2DL4 (CD158d) genotype influences expression and function in NK cells. *J Immunol* 2003; 171: 1768-1774.
29. C. S. Witt, J. M. Whiteway, H. S. Warren, A. Barden, M. Rogers, A. Martin, L. Beilin und F. T. Christiansen. Alleles of the KIR2DL4 receptor and their lack of association with pre-eclampsia. *Eur J Immunol* 2002; 32: 18-29.
30. C. S. Witt, A. Martin und F. T. Christiansen. Detection of KIR2DL4 alleles by sequencing and SSCP reveals a common allele with a shortened cytoplasmic tail. *Tissue Antigens* 2000; 56: 248-257.
31. M. J. Wilson, M. Torkar, A. Haude, S. Milne, T. Jones, D. Sheer, S. Beck und J. Trowsdale. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 4778-4783.
32. J. Samaridis, M. Colonna. Cloning of novel immunoglobulin superfamily receptors expressed on human myeloid and lymphoid cells: structural evidence for new stimulatory and inhibitory pathways. *Eur J Immunol* 1997; 27: 660-665.
33. N. A. Fanger, L. Borges und D. Cosman. The leukocyte immunoglobulin-like receptors (LIRs): a new family of immune regulators. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 231-236.
34. M. Cella, C. Dohring, J. Samaridis, M. Dessing, M. Brockhaus, A. Lanzavecchia und M. Colonna. A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing. *J Exp Med* 1997; 185: 1743-1751.
35. D. Cosman, N. Fanger, L. Borges, M. Kubin, W. Chin, L. Peterson und M. L. Hsu. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 1997; 7: 273-282.
36. T. L. Chapman, A. P. Heikeman und P. J. Bjorkman. The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity* 1999; 11: 603-613.

37. S. Lazetic, C. Chang, J. P. Houchins, L. L. Lanier und J. H. Phillips. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol* 1996; 157: 4741-4745.
38. J. Wu, Y. Song, A. B. Bakker, S. Bauer, T. Spies, L. L. Lanier und J. H. Phillips. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999; 285: 730-732.
39. C. Chang, J. Dietrich, A. G. Harpur, J. A. Lindquist, A. Haude, Y. W. Loke, A. King, M. Colonna, J. Trowsdale und M. J. Wilson. Cutting edge: KAP10, a novel transmembrane adapter protein genetically linked to DAP12 but with unique signaling properties. *J Immunol* 1999; 163: 4651-4654.
40. S. Bauer, V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J. H. Phillips, L. L. Lanier und T. Spies. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999; 285: 727-729.
41. M. Kubin, L. Cassiano, J. Chalupny, W. Chin, D. Cosman, W. Fanslow, J. Mullberg, A. M. Rousseau, D. Ulrich und R. Armitage. ULBP1, 2, 3: novel MHC class I-related molecules that bind to human cytomegalovirus glycoprotein UL16, activate NK cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1428-1437.
42. D. Cosman, J. Mullberg, C. L. Sutherland, W. Chin, R. Armitage, W. Fanslow, M. Kubin und N. J. Chalupny. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 2001; 14: 123-133.
43. A. Moretta, C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M. C. Mingari, R. Biassoni und L. Moretta. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 197-223.
44. R. M. Flaig, S. Stark und C. Watzl. Cutting edge: NTB-A activates NK cells via homophilic interaction. *J Immunol* 2004; 172: 6524-6527.
45. M. Falco, E. Marcenaro, E. Romeo, F. Bellora, D. Marras, F. Vely, G. Ferracci, L. Moretta, A. Moretta und C. Bottino. Homophilic interaction of NTBA, a member of the CD2 molecular family: induction of cytotoxicity and cytokine release in human NK cells. *Eur J Immunol* 2004; 34: 1663-1672.
46. T. I. Arnon, H. Achdout, N. Lieberman, R. Gazit, T. Gonen-Gross, G. Katz, A. Bar-Ilan, N. Bloushtain, M. Lev, A. Joseph, E. Kedar, A. Porgador und O. Mandelboim. The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46. *Blood* 2004; 103: 664-672.
47. O. Mandelboim, N. Lieberman, M. Lev, L. Paul, T. I. Arnon, Y. Bushkin, D. M. Davis, J. L. Strominger, J. W. Yewdell und A. Porgador. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 2001; 409: 1055-1060.

48. T. I. Arnon, H. Achdout, O. Levi, G. Markel, N. Saleh, G. Katz, R. Gazit, T. Gonen-Gross, J. Hanna, E. Nahari, A. Porgador, A. Honigman, B. Plachter, D. Mevorach, D. G. Wolf und O. Mandelboim. Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol* 2005; 6: 515-523.
49. S. Sivori, S. Parolini, M. Falco, E. Marcenaro, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta und A. Moretta. 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation. *Eur J Immunol* 2000; 30: 787-793.
50. M. Vitale, M. Falco, R. Castriconi, S. Parolini, R. Zambello, G. Semenzato, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta und A. Moretta. Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 233-242.
51. L. L. Lanier, C. Chang, M. Azuma, J. J. Ruitenberg, J. J. Hemperly und J. H. Phillips. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol* 1991; 146: 4421-4426.
52. A. Moretta, A. Poggi, D. Pende, G. Tripodi, A. M. Orengo, N. Pella, R. Augugliaro, C. Bottino, E. Ciccone und L. Moretta. CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta. *J Exp Med* 1991; 174: 1393-1398.
53. E. Vivier, P. Morin, C. O'Brien, B. Druker, S. F. Schlossman und P. Anderson. Tyrosine phosphorylation of the Fc gamma RIII(CD16): zeta complex in human natural killer cells. Induction by antibody-dependent cytotoxicity but not by natural killing. *J Immunol* 1991; 146: 206-210.
54. R. F. Siliciano, J. C. Pratt, R. E. Schmidt, J. Ritz und E. L. Reinherz. Activation of cytolytic T lymphocyte and natural killer cell function through the T11 sheep erythrocyte binding protein. *Nature* 1985; 317: 428-430.
55. J. C. Stinchcombe, G. Bossi, S. Booth und G. M. Griffiths. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 2001; 15: 751-761.
56. Y. T. Bryceson, M. E. March, D. F. Barber, H. G. Ljunggren und E. O. Long. Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J Exp Med* 2005; 202: 1001-1012.
57. J. A. Trapani. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biol* 2001; 2: REVIEWS3014-
58. O. Krahenbuhl, J. Tschopp. Debate: the mechanism of lymphocyte-mediated killing. Perforin-induced pore formation. *Immunol Today* 1991; 12: 399-402.

59. A. Hameed, D. M. Lowrey, M. Lichtenheld und E. R. Podack. Characterization of three serine esterases isolated from human IL-2 activated killer cells. *J Immunol* 1988; 141: 3142-3147.
60. L. Shi, C. M. Kam, J. C. Powers, R. Aebersold und A. H. Greenberg. Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. *J Exp Med* 1992; 176: 1521-1529.
61. S. Shresta, P. Goda, R. Wesselschmidt und T. J. Ley. Residual cytotoxicity and granzyme K expression in granzyme A-deficient cytotoxic lymphocytes. *J Biol Chem* 1997; 272: 20236-20244.
62. K. N. Balaji, N. Schaschke, W. Machleidt, M. Catalfamo und P. A. Henkart. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med* 2002; 196: 493-503.
63. C. E. Hirst, M. S. Buzza, C. H. Bird, H. S. Warren, P. U. Cameron, M. Zhang, P. G. Ashton-Rickardt und P. I. Bird. The intracellular granzyme B inhibitor, proteinase inhibitor 9, is up-regulated during accessory cell maturation and effector cell degranulation, and its overexpression enhances CTL potency. *J Immunol* 2003; 170: 805-815.
64. N. L. Vujanovic, S. Nagashima, R. B. Herberman und T. L. Whiteside. Nonsecretory apoptotic killing by human NK cells. *J Immunol* 1996; 157: 1117-1126.
65. Y. Kashii, R. Giorda, R. B. Herberman, T. L. Whiteside und N. L. Vujanovic. Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J Immunol* 1999; 163: 5358-5366.
66. K. Handa, R. Suzuki, H. Matsui, Y. Shimizu und K. Kumagai. Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin 2 (IL 2). II. IL 2-induced interferon gamma production. *J Immunol* 1983; 130: 988-992.
67. P. T. Mehrotra, R. P. Donnelly, S. Wong, H. Kanegane, A. Geremew, H. S. Mostowski, K. Furuke, J. P. Siegel und E. T. Bloom. Production of IL-10 by human natural killer cells stimulated with IL-2 and/or IL-12. *J Immunol* 1998; 160: 2637-2644.
68. E. M. Bluman, K. J. Bartynski, B. R. Avalos und M. A. Caligiuri. Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 alpha in response to monocyte-derived cytokines. *J Clin Invest* 1996; 97: 2722-2727.
69. T. A. Fehniger, M. H. Shah, M. J. Turner, J. B. VanDeusen, S. P. Whitman, M. A. Cooper, K. Suzuki, M. Wechser, F. Goodsaid und M. A. Caligiuri. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol* 1999; 162: 4511-4520.

70. L. J. Levitt, A. Nagler, F. Lee, J. Abrams, M. Shatsky und D. Thompson. Production of granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor by human natural killer cells. Modulation by the p75 subunit of the interleukin 2 receptor and by the CD2 receptor. *J Clin Invest* 1991; 88: 67-75.
71. T. A. Fehniger, M. A. Cooper, G. J. Nuovo, M. Cella, F. Facchetti, M. Colonna und M. A. Caligiuri. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 2003; 101: 3052-3057.
72. G. Ferlazzo, D. Thomas, S. L. Lin, K. Goodman, B. Morandi, W. A. Muller, A. Moretta und C. Munz. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* 2004; 172: 1455-1462.
73. R. Jacobs, K. Weber, K. Wendt, H. Heiken und R. E. Schmidt. Altered coexpression of lectin-like receptors CD94 and CD161 on NK and T cells in HIV patients. *J Clin Immunol* 2004; 24: 281-286.
74. M. A. Cooper, T. A. Fehniger, S. C. Turner, K. S. Chen, B. A. Ghaheri, T. Ghayur, W. E. Carson und M. A. Caligiuri. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 2001; 97: 3146-3151.
75. M. J. Robertson. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 173-183.
76. R. Jacobs, G. Hintzen, A. Kemper, K. Beul, S. Kempf, G. Behrens, K. W. Sykora und R. E. Schmidt. CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 3121-3127.
77. M. J. Loza, B. Perussia. Differential regulation of NK cell proliferation by type I and type II IFN. *Int Immunol* 2004; 16: 23-32.
78. M. J. Loza, B. Perussia. The IL-12 signature: NK cell terminal CD56+high stage and effector functions. *J Immunol* 2004; 172: 88-96.
79. L. A. Koopman, H. D. Kopcow, B. Rybalov, J. E. Boyson, J. S. Orange, F. Schatz, R. Masch, C. J. Lockwood, A. D. Schachter, P. J. Park und J. L. Strominger. Human Decidual Natural Killer Cells Are a Unique NK Cell Subset with Immunomodulatory Potential. *J Exp Med* 2003; 198: 1201-1212.
80. M. J. Sanchez, M. O. Muench, M. G. Roncarolo, L. L. Lanier und J. H. Phillips. Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus. *J Exp Med* 1994; 180: 569-576.
81. E. Mrozek, P. Anderson und M. A. Caligiuri. Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996; 87: 2632-2640.

82. S. Sivori, C. Cantoni, S. Parolini, E. Marcenaro, R. Conte, L. Moretta und A. Moretta. IL-21 induces both rapid maturation of human CD34+ cell precursors towards NK cells and acquisition of surface killer Ig-like receptors. *Eur J Immunol* 2003; 33: 3439-3447.
83. A. G. Freud, B. Becknell, S. Roychowdhury, H. C. Mao, A. K. Ferketich, G. J. Nuovo, T. L. Hughes, T. B. Marburger, J. Sung, R. A. Baiocchi, M. Guimond und M. A. Caligiuri. A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity* 2005; 22: 295-304.
84. J. Parrish-Novak, S. R. Dillon, A. Nelson, A. Hammond, C. Sprecher, J. A. Gross, J. Johnston, K. Madden, W. Xu, J. West, S. Schrader, S. Burkhead, M. Heipel, C. Brandt, J. L. Kuijper, J. Kramer, D. Conklin, S. R. Presnell, J. Berry, F. Shiota, S. Bort, K. Hambly, S. Mudri, C. Clegg, M. Moore, F. J. Grant, C. Lofton-Day, T. Gilbert, F. Rayond, A. Ching, L. Yao, D. Smith, P. Webster, T. Whitmore, M. Maurer, K. Kaushansky, R. D. Holly und D. Foster. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 2000; 408: 57-63.
85. K. Ozaki, K. Kikly, D. Michalovich, P. R. Young und W. J. Leonard. Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor beta chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 11439-11444.
86. D. S. Mehta, A. L. Wurster und M. J. Grusby. Biology of IL-21 and the IL-21 receptor. *Immunol Rev* 2004; 202: 84-95.
87. W. J. Leonard, R. Spolski. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 688-698.
88. G. Wang, M. Tschoi, R. Spolski, Y. Lou, K. Ozaki, C. Feng, G. Kim, W. J. Leonard und P. Hwu. In vivo antitumor activity of interleukin 21 mediated by natural killer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 9016-9022.
89. T. Habib, A. Nelson und K. Kaushansky. IL-21: a novel IL-2-family lymphokine that modulates B, T, and natural killer cell responses. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 1033-1045.
90. M. Strengell, S. Matikainen, J. Siren, A. Lehtonen, D. Foster, I. Julkunen und T. Sareneva. IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN-gamma production in human NK and T cells. *J Immunol* 2003; 170: 5464-5469.
91. K. Brandt, S. Bulfone-Paus, D. C. Foster und R. Ruckert. Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation. *Blood* 2003; 102: 4090-4098.
92. M. Strengell, I. Julkunen und S. Matikainen. IFN-alpha regulates IL-21 and IL-21R expression in human NK and T cells. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 416-422.
93. J. Parrish-Novak, S. R. Dillon, A. Nelson, A. Hammond, C. Sprecher, J. A. Gross, J. Johnston, K. Madden, W. Xu, J. West, S. Schrader, S. Burkhead, M. Heipel, C.

- Brandt, J. L. Kuijper, J. Kramer, D. Conklin, S. R. Presnell, J. Berry, F. Shiota, S. Bort, K. Hambly, S. Mudri, C. Clegg, M. Moore, F. J. Grant, C. Lofton-Day, T. Gilbert, F. Rayond, A. Ching, L. Yao, D. Smith, P. Webster, T. Whitmore, M. Maurer, K. Kaushansky, R. D. Holly und D. Foster. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 2000; 408: 57-63.
94. J. Parrish-Novak, D. C. Foster, R. D. Holly und C. H. Clegg. Interleukin-21 and the IL-21 receptor: novel effectors of NK and T cell responses. *J Leukoc Biol* 2002; 72: 856-863.
95. M. Strengell, T. Sareneva, D. Foster, I. Julkunen und S. Matikainen. IL-21 up-regulates the expression of genes associated with innate immunity and Th1 response. *J Immunol* 2002; 169: 3600-3605.
96. M. Frey, N. B. Packianathan, T. A. Fehniger, M. E. Ross, W. C. Wang, C. C. Stewart, M. A. Caligiuri und S. S. Evans. Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J Immunol* 1998; 161: 400-408.
97. J. F. Bromberg. Activation of STAT proteins and growth control. *Bioessays* 2001; 23: 161-169.
98. A. Nagler, L. L. Lanier, S. Cwirla und J. H. Phillips. Comparative studies of human FcR3-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 1989; 143: 3183-3191.
99. M. A. Caligiuri, A. Zmuidzinis, T. J. Manley, H. Levine, K. A. Smith und J. Ritz. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med* 1990; 171: 1509-1526.
100. J. Hanna, P. Bechtel, Y. Zhai, F. Youssef, K. McLachlan und O. Mandelboim. Novel insights on human NK cells' immunological modalities revealed by gene expression profiling. *J Immunol* 2004; 173: 6547-6563.
101. M. Vitale, C. Bottino, S. Sivori, L. Sanseverino, R. Castriconi, E. Marcenaro, R. Augugliaro, L. Moretta und A. Moretta. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 1998; 187: 2065-2072.
102. L. R. Gottschalk, R. A. Bray, H. Kaizer und H. M. Gebel. Two populations of CD56 (Leu-19)+/CD16+ cells in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1990; 5: 259-264.
103. A. Martin-Fontecha, L. L. Thomsen, S. Brett, C. Gerard, M. Lipp, A. Lanzavecchia und F. Sallusto. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 2004;

104. F. Sallusto, D. Lenig, R. Forster, M. Lipp und A. Lanzavecchia. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401: 708-712.
105. M. E. Berman, Y. Xie und W. A. Muller. Roles of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in natural killer cell transendothelial migration and beta 2 integrin activation. *J Immunol* 1996; 156: 1515-1524.
106. M. A. Morris, K. Ley. Trafficking of natural killer cells. *Curr Mol Med* 2004; 4: 431-438.
107. A. G. Santis, M. Lopez-Cabrera, F. Sanchez-Madrid und N. Proudfoot. Expression of the early lymphocyte activation antigen CD69, a C-type lectin, is regulated by mRNA degradation associated with AU-rich sequence motifs. *Eur J Immunol* 1995; 25: 2142-2146.
108. M. N. Dworzak, G. Fritsch, P. Buchinger, C. Fleischer, D. Printz, A. Zellner, A. Schollhammer, G. Steiner, P. F. Ambros und H. Gadner. Flow cytometric assessment of human MIC2 expression in bone marrow, thymus, and peripheral blood. *Blood* 1994; 83: 415-425.
109. G. Bernard, J. P. Breitmayer, M. de Matteis, P. Trampont, P. Hofman, A. Senik und A. Bernard. Apoptosis of immature thymocytes mediated by E2/CD99. *J Immunol* 1997; 158: 2543-2550.
110. I. Alberti, G. Bernard, A. K. Rouquette-Jazdanian, C. Pelassy, M. Pourtein, C. Ausseil und A. Bernard. CD99 isoforms expression dictates T cell functional outcomes. *FASEB J* 2002; 16: 1946-1948.
111. G. Bernard, V. Raimondi, I. Alberti, M. Pourtein, J. Widjenes, M. Ticchioni und A. Bernard. CD99 (E2) up-regulates alpha4beta1-dependent T cell adhesion to inflamed vascular endothelium under flow conditions. *Eur J Immunol* 2000; 30: 3061-3065.
112. A. R. Schenkel, Z. Mamdouh, X. Chen, R. M. Liebman und W. A. Muller. CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat Immunol* 2002; 3: 143-150.
113. M. D. Chiesa, M. Vitale, S. Carlomagno, G. Ferlazzo, L. Moretta und A. Moretta. The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1657-1666.
114. M. M. Rosenkilde, T. W. Schwartz. The chemokine system -- a major regulator of angiogenesis in health and disease. *APMIS* 2004; 112: 481-495.
115. A. Oliva, A. L. Kinter, M. Vaccarezza, A. Rubbert, A. Catanzaro, S. Moir, J. Monaco, L. Ehler, S. Mizell, R. Jackson, Y. Li, J. W. Romano und A. S. Fauci. Natural killer cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals are an important

- source of CC-chemokines and suppress HIV-1 entry and replication in vitro. *J Clin Invest* 1998; 102: 223-231.
116. B. Hennemann, Y. K. Tam, T. Tonn und H. G. Klingemann. Expression of SCM-1alpha/lymphotactin and SCM-1beta in natural killer cells is upregulated by IL-2 and IL-12. *DNA Cell Biol* 1999; 18: 565-571.
  117. A. M. Cole, T. Ganz, A. M. Liese, M. D. Burdick, L. Liu und R. M. Strieter. Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J Immunol* 2001; 167: 623-627.
  118. A. Bjorstad, H. Fu, A. Karlsson, C. Dahlgren und J. Bylund. Interleukin-8-derived peptide has antibacterial activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3889-3895.
  119. O. Yoneda, T. Imai, S. Goda, H. Inoue, A. Yamauchi, T. Okazaki, H. Imai, O. Yoshie, E. T. Bloom, N. Domae und H. Umehara. Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells. *J Immunol* 2000; 164: 4055-4062.
  120. D. D. Taub, T. J. Sayers, C. R. Carter und J. R. Ortaldo. Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1995; 155: 3877-3888.
  121. P. Loetscher, M. Seitz, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini und B. Moser. Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca<sup>2+</sup> mobilization, and enzyme release. *J Immunol* 1996; 156: 322-327.
  122. A. Zlotnik, O. Yoshie. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12: 121-127.
  123. E. Schutyser, A. Richmond und J. Van Damme. Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 14-26.
  124. D. M. Anderson, E. Maraskovsky, W. L. Billingsley, W. C. Dougall, M. E. Tometsko, E. R. Roux, M. C. Teepe, R. F. DuBose, D. Cosman und L. Galibert. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997; 390: 175-179.
  125. Y. Hayakawa, V. Screpanti, H. Yagita, A. Grandien, H. G. Ljunggren, M. J. Smyth und B. J. Chambers. NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy. *J Immunol* 2004; 172: 123-129.
  126. Y. Zhai, R. Guo, T. L. Hsu, G. L. Yu, J. Ni, B. S. Kwon, G. W. Jiang, J. Lu, J. Tan, M. Ugustus, K. Carter, L. Rojas, F. Zhu, C. Lincoln, G. Endress, L. Xing, S. Wang, K. O. Oh, R. Gentz, S. Ruben, M. E. Lippman, S. L. Hsieh und D. Yang. LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin beta receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer. *J Clin Invest* 1998; 102: 1142-1151.

127. V. Duprez, M. Ferrer und A. Dautry-Varsat. High-affinity interleukin 2 receptor alpha and beta chains are internalized and remain associated inside the cells after interleukin 2 endocytosis. *J Biol Chem* 1992; 267: 18639-18643.
128. A. Yu, T. R. Malek. The proteasome regulates receptor-mediated endocytosis of interleukin-2. *J Biol Chem* 2001; 276: 381-385.
129. S. Liang, H. Wei, R. Sun und Z. Tian. IFNalpha regulates NK cell cytotoxicity through STAT1 pathway. *Cytokine* 2003; 23: 190-199.
130. Y. Tanabe, T. Nishibori, L. Su, R. M. Arduini, D. P. Baker und M. David. Cutting edge: role of STAT1, STAT3, and STAT5 in IFN-alpha beta responses in T lymphocytes. *J Immunol* 2005; 174: 609-613.
131. J. D. Campbell, G. Cook, S. E. Robertson, A. Fraser, K. S. Boyd, J. A. Gracie und I. M. Franklin. Suppression of IL-2-induced T cell proliferation and phosphorylation of STAT3 and STAT5 by tumor-derived TGF beta is reversed by IL-15. *J Immunol* 2001; 167: 553-561.
132. J. Chen, B. P. Vistica, H. Takase, D. I. Ham, R. N. Fariss, E. F. Wawrousek, C. C. Chan, J. A. DeMartino, J. M. Farber und I. Gery. A unique pattern of up- and down-regulation of chemokine receptor CXCR3 on inflammation-inducing Th1 cells. *Eur J Immunol* 2004; 34: 2885-2894.
133. T. Nanki, Y. Urasaki, T. Imai, M. Nishimura, K. Muramoto, T. Kubota und N. Miyasaka. Inhibition of fractalkine ameliorates murine collagen-induced arthritis. *J Immunol* 2004; 173: 7010-7016.
134. G. Bixel, S. Kloep, S. Butz, B. Petri, B. Engelhardt und D. Vestweber. Mouse CD99 participates in T-cell recruitment into inflamed skin. *Blood* 2004; 104: 3205-3213.
135. A. Ericsson, M. Svensson, A. Arya und W. W. Agace. CCL25/CCR9 promotes the induction and function of CD103 on intestinal intraepithelial lymphocytes. *Eur J Immunol* 2004; 34: 2720-2729.

## Bisherige wissenschaftliche Tätigkeit

### Publikationen

R. Jacobs, K. Weber, K. Wendt, H. Heiken, R.E. Schmidt. Altered coexpression of lectin-like receptors CD94 and CD161 on NK and T cells in HIV patients. *J Clin Immunol* 2004; 24: 281-286.

K. Wendt and E. Wilk, R.E. Schmidt, R. Jacobs. New Genetic and Proteinic Characteristics of CD56<sup>dim</sup> and CD56<sup>bright</sup> Natural Killer Cells. In Bearbeitung

K. Wendt, E. Wilk, S. Buyny, R. E. Schmidt, R. Jacobs. Different effects of IL-21 on Natural Killer subsets. In Bearbeitung

### Abstracts

G. Hintzen, K. Wendt, R. E. Schmidt und R. Jacobs. Cytokine production of human CD56<sup>bright</sup> NK cells is regulated via CD26. *Immunobiology* 2001;

R. Jacobs, K. Weber, K. Wendt, R. E. Schmidt und H. Heiken. Altered coexpression of lectin-like receptors CD94 and CD161 on NK and T cells in HIV patients. *Immunol Lett* 2003; 87: 77-78.

K. Weber, R. Jacobs, K. Wendt, R. E. Schmidt und H. Heiken. Coexpression of lectin-like receptors CD94 and CD161 on NK and T cells in HIV patients. *Eur J Med Res* 2003; 8:

K. Weber, R. Jacobs, K. Wendt, R. E. Schmidt und H. Heiken. Differential KLR expression and functional capacities of NK cells and T cells in HIV-1 infected patients. 1st Spring Workshop of the DGFI 2003, Leipzig 2003;

E. Wilk, K. Wendt, R. E. Schmidt und R. Jacobs. Different Gene and Protein expression in CD56<sup>dim</sup> and CD56<sup>bright</sup> Natural Killer Cells reflecting effector and regulatory functions. *Immunobiology* 2003; 208: 92-92.

M. Rihl, E. Kruithof, D. T. Y. Yu, F. De Keyser, E. M. Veys, C. Barthel, R. Jacobs, K. Wendt, R. E. Schmidt, H. Zeidler, J. G. Kuipers und D. Baeten. Neurotrophins in Spondyloarthritis (SPA) Synovitis: Relation to

Inflammation and Response to Therapy. ACR Meeting 2004

K. Wendt, E. Wilk, R. E. Schmidt und R. Jacobs. Differential expression of cytokines and chemokines by NK cell subsets. Immunobiology 2004; 209: 291-512.

K. Wendt, W. Ansari, R. E. Schmidt und R. Jacobs. HIV Infection and Therapy affects Phenotype and Function of NK Cell Subsets. NK Cell Workshop 2004 2004;

E. Wilk, K. Wendt, R. E. Schmidt und R. Jacobs. Different Gene and Protein Expression in CD56<sup>dim</sup> and CD56<sup>bright</sup> NK Cells. NK Cell Workshop 2004,

E. Wilk, K. Wendt, R. E. Schmidt und R. Jacobs. Phenotypical and Functional Screening of CD56<sup>dim</sup> and CD56<sup>bright</sup> Natural Killer Cells. Immunobiology 2005; 210: 383-383.

K. Wendt, E. Wilk, S. Buyny, S. Bremer, R. E. Schmidt und R. Jacobs. IL-21 differently affects human NK cell subsets. Immunobiology 2005; 210: 382-383.

#### Vorträge und Poster

K. Wendt, E. Wilk, R. Jacobs. Functional Differences of Human Natural Killer Cell Subsets. 26. Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen, Borstel, 14.11.2003 (Vortrag)

Wendt,K.; Ansari,W.; Schmidt,R.E.; Jacobs,R. HIV Infection and Therapy affects Phenotype and Function of NK Cell Subsets. 20<sup>th</sup> International Natural Killer Cell Workshop, Noordwijkerhout, Niederlande, 24.28.04.2004 (Poster)

Wendt K.; Wilk E.; Schmidt R.E.; Jacobs R. Differential expression of cytokines and chemokines by NK cell subsets. Gemeinsame Tagung der Deutschen und Niederländischen Gesellschaft für Immunologie (JAMI), Maastricht, Niederlande, 20.-23.10.2004 (Vortrag)

Wendt K; Wilk E.; Buyny S.; Bremer S.; Schmidt R.E.; Jacobs R. IL-21 differently affects human NK cell subsets. Gemeinsame Tagung der Deutschen und Skandinavischen Gesellschaft für Immunologie, Kiel, Deutschland, 21.-24.09.2005 (Vortrag)

## **Lebenslauf**

Name	Katy Wendt
Geburtsdatum:	17. Februar 1979
Geburtsort:	Crivitz (Mecklenburg-Vorpommern)
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	Ledig

## **Schule**

1985-1989	Polytechnische Oberschule Schwerin
1989-1993	19. Realschule Schwerin
1993-1997	Herdergymnasium Schwerin
20.06.1997	Allgemeine Hochschulreife

## **Studium**

01.10.1997-31.03.2000	Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
01.04.2000-19.04.2002	Fortsetzung des Biologiestudiums an der Universität Hannover
Januar 2003	Abschluss Diplom Biologin

## **Dissertation**

seit 01.04.2003	wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Klinische Immunologie der Medizinischen Hochschule Hannover
01.01.2004-30.09.2005	Stipendium der Graduiertenförderung des Landes Niedersachsen

## **Danksagung**

Ich danke PD Dr. Roland Jacobs für die hervorragende theoretische und praktische Betreuung sowie seine ständige Gesprächsbereitschaft, die wichtig für das Gelingen dieser Arbeit waren.

Prof. Dr. Reinhold E. Schmidt danke ich für die Möglichkeit die Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu können.

Esther möchte ich für die angenehme und effektive Zusammenarbeit und ihre Diskussionsbereitschaft während der letzten Jahre danken.

Sabine, Sonja, Verena, Gamze und Franziska, danke für die gute Stimmung im Labor und die technische Unterstützung während dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern/innen der Abteilung für Transfusionsmedizin der Medizinischen Hochschule für die Zusammenarbeit, insbesondere bei der Bereitstellung der Leukozytenfilter und den unzähligen freiwilligen Blutspendern.

Daniela, Nadine und Melanie danke ich für die Aufmunterung am „Rande“ und die Bereitstellung von Schlafräum in Notfällen.

Großer Dank gilt meinen Eltern, die stets hinter mir stehen und mich unterstützen, wo sie können. Ohne Euch wäre ich nicht so weit gekommen.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Kai, der mir in den vergangenen Jahren stets den Rücken freigehalten, mich aufgebaut und mich immer wieder angespornt hat. Vielen Dank für deine Unterstützung, dein Verständnis und deine Geduld.

## **Erklärung zur Dissertation**

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation „Charakterisierung von Subpopulationen Natürlicher Killerzellen des Menschen“ selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 03.04.2006

Katy Wendt