

Aus der Klinik für Innere Medizin II
mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie,
Sektion für Stammzell- und Immuntherapie,
(Direktor: Prof. Dr. med. Martin Gramatzki)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**EINFLUSS DER ZYTOKINAKTIVIERUNG AUF DIE EXPRESSION NATÜRLICHER
KILLERZELLREZEPTOREN UND DAS LYSEPOTENTIAL
NATÜRLICHER KILLERZELLEN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
MARC ANDRÉ SCHLEGEL
aus Göttingen

Kiel 2016

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Humpe

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Schrappe

Tag der mündlichen Prüfung: 08.08.2016

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 30.06.2016

gez.: Prof. Dr. Johann Roider
(Vorsitzender des Promotionsausschusses)

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Das Multiple Myelom	1
1.2 Das Immunsystem	3
1.2.1 Natürliche Killerzellen	4
1.2.1.1 Rezeptoren auf NK-Zellen des Menschen	5
1.2.1.2 Subgruppen der NK-Zellen	10
1.2.1.3 Effektormechanismen	11
1.2.1.4 Regulation der NK-Zellaktivität.....	12
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit.....	13
2. MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 Materialien	15
2.2 Methoden	19
2.2.1 Isolation der peripheren mononukleären Blutzellen.....	19
2.2.2 Bestimmung der Zellzahl	19
2.2.3 Magnetische Zellseparation von NK-Zellen	20
2.2.4 Voraktivierung der NK-Zellen	21
2.2.5 Langzeitaktivierung und Expansion von NK-Zellen	21
2.2.6 Zytotoxizitätstests	22
2.2.6.1 ⁵¹ Cr-Freisetzungstest zur natürlichen Zytotoxizität.....	23
2.2.6.2 ⁵¹ Cr-Freisetzungstest zur Autoreaktivität	23
2.2.6.3 Blockierungsversuche	23
2.2.7 Durchflusszytometrie zur Messung der NK-Rezeptorexpression	24
2.2.8 NKR-Liganden- und HLA-Expressionsbestimmung auf Zielzellen.....	25
2.2.9 mRNA-Isolation	25
2.2.10 cDNA-Synthese	26

2.2.11	Bestimmung der KIR-spezifischen mRNA-Expression mittels PCR	27
2.2.12	Agarose-Gelelektrophorese.....	28
2.2.13	Statistische Analyse	29
3.	ERGEBNISSE	30
3.1	Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber der Zelllinie K-562	30
3.2	Charakterisierung der Myelomzellen	34
3.3	Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber der Zelllinie INA-6	35
3.4	Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber der Zelllinie RPMI 8226 ..	37
3.5	Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber der Zelllinie L363.....	40
3.6	Einfluss aktivierender NK-Rezeptoren auf die Lyse von L363	44
3.7	Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber autologen B-Zellen	46
3.8	Durchflusszytometrische Analyse der NK-Zellrezeptoren	46
3.8.1	Der Aktivierungsmarker CD69.....	47
3.8.2	Expression von NKG2A.....	48
3.8.3	Der C-Typ-Lektinrezeptor NKG2D.....	49
3.8.4	NKp30 auf voraktivierten NK-Zellen	50
3.8.5	Veränderung der NKp44-Expression.....	51
3.8.6	Einfluss von IL-2 / IL-15 auf die NKp46-Expression	52
3.8.7	Erhöhung der DNAM-1-Expression durch Voraktivierung	53
3.8.8	Das Adhäsionsmolekül CD96	54
3.8.9	Expression von CD158a/h	55
3.8.10	Veränderung der CD158b1/b2/j-Expression.....	56
3.8.11	Einfluss von IL-2 / IL-15 auf die Expression von CD158e1/e2.....	57
3.8.12	Keine Induktion der CD158i-Expression auf CD158i ⁻ Spendern.....	58
3.9	Molekulargenetische Untersuchung der KIR	59
3.10	Einfluss der NKR-Expression auf die Lyse von Myelomzellen..	61

3.10.1	Zytotoxizität gegenüber RPMI 8226 in Anhängigkeit vom KIR-Typ	61
3.10.2	Zytotoxizität gegenüber L363 in Abhängigkeit vom KIR-Typ	62
3.10.3	Korrelation zwischen spezifischer Lyse und KIR-Expression	63
4.	DISKUSSION	66
4.1	NK-Zellvoraktivierung mittels Interleukin 2 bzw. Interleukin 15 ...	66
4.2	Anstieg der natürlichen Zytotoxizität durch NK-Zellstimulation ...	67
4.3	Natürliche Zytotoxizität gegenüber malignen Plasmazellen	68
4.4	HLA/KIR-Wechselwirkung beeinflusst Lyse der Zielzellen	71
4.5	Keine Änderung des KIR-Phänotyps durch NK-Zellstimulation ..	73
5.	ZUSAMMENFASSUNG	75
6.	LITERATURVERZEICHNIS	76
	DANKSAGUNG	87
	LEBENS LAUF	88
	PUBLIKATIONEN	89

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen	
Abkürzung	Bedeutung
~	ungefähr
⁵¹ Cr	Chrom-51
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
Abb.	Abbildung
ADCC	antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (<i>Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity</i>)
AHPZT	autologe hämatopoetische Progenitorzell- transplantation
AICL	Aktivierungs-induziertes C-Typ-Lektin (<i>Activation-Induced C-type Lectin</i>)
AIM	Aktivierungs-induziertes Molekül (<i>Activation-Induced Molecule</i>)
aNKR	aktivierender NK-Rezeptor
bp	Basenpaar
BR	basale Freisetzung (<i>Basal Release</i>)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CML	Chronische myeloische Leukämie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cpm	Zählungen pro Minute (<i>counts per minute</i>)
d	Tag, lat. <i>dies</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
DNAM-1	DNAX-Begleitmolekül 1 (<i>DNAX Accessory Molecule-1</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dT	Desoxythymidin
E:T-Ratio	Effektor- zu Zielzellverhältnis (<i>Effector Cell to Target Cell Ratio</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FasL	Fas-Ligand
FI	Fluoreszenzintensität
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie- stimulierender Faktor (<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>)
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (<i>Graft versus Host Disease</i>)
GvT	Transplantat gegen Tumor (<i>Graft versus Tumor</i>)
HIV	Humanes Immundefizienzvirus (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HLA	Humanes Leukozytenantigen (<i>Human Leukocyte Antigen</i>)
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ILT	Ig-ähnliches Transkript (<i>Ig-Like Transcript</i>)
iNKR	inhibitorischer NK-Rezeptor
ITAM	aktivierendes Immunrezeptor-Tyrosin-Motiv (<i>Immunreceptor Tyrosine-based Activating Motif</i>)
ITIM	inhibierendes Immunrezeptor-Tyrosin-Motiv (<i>Immunreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif</i>)
kDa	Kilodalton
KIR	Immunglobulin-ähnlicher Killerzellrezeptor (<i>Killer cell Immunoglobulin-like Receptor</i>)
L	Ligand
LRSC	Leukozytendepletionskammer (<i>Leukoreduction System Chamber</i>)
MACS	magnetische Zellseparation (<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>)
mAk	monoklonaler Antikörper
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität (<i>Mean Fluorescence Intensity</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MICA/B	MHC Klasse I Polypeptid-verwandte Kette A/B (<i>MHC Class I-related polypeptide sequence A/B</i>)
MLL5	gemischte Abstammungslinie-Leukämie-5-Protein (<i>Mixed Lineage Leukemia-5 protein</i>)
MM	Multiples Myelom
MR	maximale Freisetzung (<i>Maximal Release</i>)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
n	Anzahl
NCAM	Nervenzellenadhäsionsmolekül (<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>)
NCR	natürlicher Zytotoxizitätsrezeptor (<i>Natural Cytotoxicity Receptor</i>)
NKG2	Natürliche Killergruppe 2 (<i>Natural Killer Group 2</i>)
NKR	NK-Zellrezeptor (<i>NK cell Receptor</i>)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
<i>non-resp.</i>	Nichtansprecher (<i>non-responder</i>)
ns	nicht signifikant
p	p-Wert
PAMP	pathogen-assoziiertes molekulares Muster (<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>)
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PC5	Phycoerythrin-Cyanin 5
PC7	Phycoerythrin-Cyanin 7
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PPR	Mustererkennungsrezeptor (<i>Pattern Recognition Receptor</i>)

Abkürzung	Bedeutung
PVR	Poliomyelitisvirusrezeptor
<i>resp.</i>	Ansprecher (<i>responder</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic Acid</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SEM	Standardfehler (<i>Standard Error of the Mean</i>)
SSP	sequenzspezifischer Primer (<i>Sequence-Specific Primer</i>)
Tab.	Tabelle
TACTILE	durch T-Zellaktivierung erhöhte, späte Expression (<i>T Cell Activation-Increased Late Expression</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	lat. <i>Thermus aquaticus</i>
TCR	T-Zellrezeptor (<i>T-Cell Receptor</i>)
TGF	Umwandlungswachstumsfaktor (<i>Transforming Growth Factor</i>)
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (<i>Toll-Like Receptor</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TRAIL	TNF-verwandter, Apoptose-induzierender Ligand (<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>)
ULBP	UL16 bindendes Protein (<i>UL16-Binding Protein</i>)
vgl.	vergleiche
vs.	gegenüber, lat. <i>versus</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
\bar{x}	Mittelwert
Δ	Differenz

1. EINLEITUNG

1.1 Das Multiple Myelom

Das Multiple Myelom (MM), das auch als diffuses Plasmozytom bezeichnet wird, beruht auf malignen, monoklonal proliferierenden Plasmazellen. Nach der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) wird es den B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen zugerechnet. Die genaue Ätiologie des MM ist bisher unbekannt. Es geht mit verschiedenen chromosomalen Veränderungen einher, die einen Einfluss auf die Prognose der Erkrankung haben (1). Die Inzidenz beträgt 3.000 bzw. 2.700 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland für Männer bzw. Frauen. Neben dem Geschlecht ist die Inzidenz auch von Alter und ethnischer Zugehörigkeit abhängig (2).

Die Zellen des MM befinden sich vornehmlich im Knochenmark, wo sie über Adhäsionsmoleküle an Stromazellen binden. Zudem sezernieren sie verschiedene Zytokine. Beide Mechanismen sind für Wachstum, Überleben, Medikamentenresistenz und Migration der Myelomzellen von Bedeutung (1). Es gibt jedoch auch einige Sonderformen des MM, wie z.B. die Plasmazelleukämie, bei der zirkulierende, entartete Plasmazellen im peripheren Blut gefunden werden (3).

Klinisch tritt die Erkrankung durch Knochenschmerzen, Osteoporose und pathologische Frakturen sowie Infektanfälligkeit, Nierenfunktionseinschränkungen, Anämie und neurologische Symptome in Erscheinung. Verursacht werden die Beschwerden vor allem durch die osteolytischen Knochenveränderungen und die daraus resultierende Hyperkalzämie sowie durch Knochenmarksverdrängung und die Paraproteinssekretion. Diagnostisch fallen eine Plasmazellvermehrung im Knochenmark $> 10\%$, Osteolysen im konventionellen Röntgenbild oder in der Computertomografie und ein M-Gradient in der Serumelektrophorese auf (1).

Eine Einteilung in Stadien erfolgt anhand des *International Staging System* der *Myeloma Working Group* (4). Die Indikation zur therapeutischen Intervention besteht bei symptomatischer oder progredienter Erkrankung. Neben einer Kombinationschemotherapie aus mehreren Therapeutika, wie Thalidomid, Lenalidomid, Bortezomib oder Dexamethason, kommt bei geeigneten Patienten eine Hochdosistherapie

gefolgt von einer Transplantation autologer hämatopoetischer Progenitorzellen (AHPZT) zum Einsatz (1).

Es gibt verschiedene Therapieregime mit unterschiedlichen Chemotherapeutika sowie Zeitpunkten der AHPZT. Der grundlegende Ablauf der etablierten Regime sieht bei diesen Patienten zunächst eine Induktionstherapie vor, um die maligne Plasmazelllast zu senken und das Ansprechen auf die Therapie zu verbessern. An diese schließt sich die AHPZT an, bei der periphere hämatopoetische Progenitorzellen verwendet werden. Um das Ansprechen auf die Therapie zu intensivieren, werden die Patienten im Anschluss an die AHPZT einer Konsolidierungstherapie aus einer Kombination verschiedener Chemotherapeutika unterzogen. Da Rezidive und Progression des MM häufig sind, ist schließlich noch eine Erhaltungstherapie nötig, um Ansprechen und Ergebnis der Therapie zu festigen (5).

Die Therapieregime sowie unterstützende Maßnahmen sind Gegenstand intensiver Forschung, um Ansprechen und Überleben der Patienten zu verbessern. Die Transfusion alloreaktiver natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) stellt hierbei einen erfolgsversprechenden therapeutischen Ansatz dar, um residuelle Tumorzellen zu eliminieren. Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen wird strikt durch aktivierende und inhibierende Signale balanciert. Die inhibierenden Signale werden hierbei durch die Wechselwirkung von Immunglobulin-ähnlichen Killerzellrezeptoren (*Killer cell Immunoglobulin-like Receptors*, KIR) auf Seite der NK-Zellen mit den korrespondierenden humanem Leukozytenantigen (*Human Leukocyte Antigen*, HLA) auf Seite der Tumorzellen wahrgenommen. Aufgrund einer Diskrepanz zwischen dem KIR-Typ der NK-Zellen des Spenders und dem HLA-Typ des Empfängers kommt es so zu einem Transplantat gegen Tumor- (*Graft vs. Tumor*, GvT)-Effekt, der in einem autologen Szenario nicht vorliegt (6).

Die aktivierenden Signale hingegen werden durch die Interaktion der auf NK-Zellen exprimierten natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (*Natural Cytotoxicity Receptors*, NCR) mit den entsprechenden Liganden auf den Zielzellen wahrgenommen. Maligne Zellen wie die des MM weisen eine erhöhte Expression der Liganden für NCR und andere NK-Rezeptoren (NKR) auf der Zelloberfläche auf (7), welche zu einer Aktivierung der NK-Zellen führt. Es konnte gezeigt werden, dass die Transplantation alloreaktiver NK-Zellen dabei keine Transplantat gegen Wirt-Reaktion (*Graft vs. Host*

Disease, GvHD) verursacht (8). Der adoptive Transfer alloreaktiver NK-Zellen könnte demnach einen erfolgsversprechenden Ansatz darstellen, residuelle MM-Zellen nach AHSZT durch den NK-Zell-vermittelten GvT-Effekt zu eliminieren, ohne das erhöhte Mortalitätsrisiko einer allogenen Stammzelltransplantation einzugehen.

Ein Problem in der Immuntherapie des MM bleibt jedoch die Fähigkeit neoplastischer Zellen, der Vernichtung durch das Immunsystem zu entgehen (9). Beim MM betrifft dies insbesondere die vielversprechenden NK-Zellen. So wird beispielsweise die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen durch die Expression des Umwandlungswachstumsfaktors (*Transforming Growth Factor*, TGF) β durch MM-Zellen verringert (10,11). Des Weiteren ist die NKG2D-Expression auf der Zelloberfläche der NK-Zellen von MM-Patienten reduziert (12). NKG2D als aktivierender NK-Zellrezeptor scheint jedoch wichtig für die NK-Zellen vermittelte Lyse autologer MM-Zellen zu sein (7). Außerdem spielt auch die Expression der HLA-Klasse-I-Moleküle der MM-Zellen eine wichtige Rolle im Schutz vor NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität (7). Von großem Interesse ist daher die Entwicklung von Therapieansätzen, welche die zytotoxischen Effektorfunktionen autologer NK-Zellen wiederherstellen bzw. das zytotoxische Potential allogener NK-Zellen erhöhen.

1.2 Das Immunsystem

Während das Immunsystem eine Abwehrreaktion gegen körperfremde Strukturen und krankhaft veränderte körpereigene Zellen hervorruft, werden gesunde körpereigene Zellen nicht attackiert (13). Die klassische Einteilung des Immunsystems gliedert es in einen natürlichen, d.h. angeborenen und in einen adaptiven bzw. erworbenen Teil.

Zum angeborenen Immunsystem werden Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Dendritische Zellen und NK-Zellen gezählt. Nachdem Haut oder Schleimhäute, welche die erste mechanische und chemische Abwehrlinie gegen Krankheitserreger darstellen, überwunden wurden, ist das angeborene Immunsystem für die erste Immunantwort gegen diese Erreger verantwortlich (14). Über Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern Recognition Receptors*, PPRs) auf der Zelloberfläche bzw. im Zytosol sind die Zellen des angeborenen Immunsystems in der Lage Pathogene anhand von pathogen-assoziierten molekularen Mustern (*Pathogen Associated Molecular Pat-*

terns, PAMPs) zu erkennen (15). Zu den PPRs gehören Rezeptoren aus verschiedenen Rezeptorfamilien wie etwa Mannose-, *Scavenger*- oder Toll-ähnliche Rezeptoren (*Toll-Like Receptors*, TLRs). Die Bindung eines PAMP führt über die Transkription spezifischer Gene z.B. zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine oder aber zur Expression co-stimulierender Moleküle. Diese Moleküle stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem dar. Sie rufen die zur Bekämpfung des Erregers nötige Entzündungsreaktion hervor.

Ist die Immunantwort des angeborenen Immunsystems unzureichend, um ein Pathogen erfolgreich zu bekämpfen, setzt die spezifische Immunreaktion des adaptiven Immunsystems ein, zu dessen Zellen die B- und T-Lymphozyten gehören. Nachdem Dendritische Zellen und Makrophagen im peripheren Gewebe Fremdmaterial aufgenommen haben und in das lymphatische Gewebe gewandert sind, präsentieren sie dieses dort den T-Zellen über den Haupthistokompatibilitätskomplex (*Major Histocompatibility Complex*, MHC). Dadurch kommt es zu einer Aktivierung und klonalen Proliferation von B- und T-Lymphozyten. Die Immunantwort des adaptiven Immunsystems ist somit spezifisch. Es bilden sich nachfolgend Gedächtniszellen aus, so dass auf eine zukünftige Darbietung des jeweiligen Antigens schneller reagiert werden kann (14).

1.2.1 Natürliche Killerzellen

NK-Zellen wurden erstmals 1975 beschrieben (16). Es handelt sich um große, granuläre Lymphozyten, die zum angeborenen Immunsystem gehören. Im Gegensatz zu den B- und T-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems findet bei NK-Zellen keine somatische Rekombination der T-Zellrezeptor- oder Immunglobulingene statt (17,18). NK-Zellen machen etwa 10% der mononukleären Zellen des Blutes aus (19). Ihre Lebensdauer liegt bei ungefähr zwei Wochen (20). NK-Zellen werden über die Abwesenheit von CD3, einem unveränderlichen Komplex, der mit dem T-Zellrezeptor (*T-Cell Receptor*, TCR) assoziiert ist, und die Expression von CD56, der Isoform des Nervenzellenadhäsionsmoleküls (*Neural Cell Adhesion Molecule*, NCAM) klassifiziert (21,22).

Zytotoxische NK-Zellen exprimieren den Fc γ -Rezeptor III (CD16), welcher für IgG-Moleküle niedrig affin ist (23). Über diesen Rezeptor wird die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (*Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*, ADCC) vermittelt (24). Darüber hinaus tragen NK-Zellen eine Reihe weiterer Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche, die für die Erfüllung ihrer Funktionen unabdingbar sind. Hierzu gehören Zytokinrezeptoren wie der heterodimere Interleukin-2 (IL-2)-Rezeptor (IL-2R $\beta\gamma$) mit mittlerer Affinität für IL-2 (25) sowie Rezeptoren für einige von Monozyten produzierte Zytokine wie IL-1, IL-10, IL-12, IL-15 und IL-18 (26–30). Darüber hinaus exprimieren NK-Zellen neben Adhäsionsmoleküle auch die für die Vermittlung der natürlichen Zytotoxizität wichtigen Rezeptoren, unter denen insbesondere die KIR und die NCR hervorzuheben sind (siehe Kapitel 1.2.1.1).

Anhand der Expression von CD16 und CD56 können zwei Subpopulationen von NK-Zellen unterschieden werden: die zytotoxischen CD16^{bright}, CD56^{dim} - und die regulatorischen CD16^{dim}, CD56^{bright}-NK-Zellen, welche sich auch in der Expression anderer Oberflächenmoleküle unterscheiden (siehe Kapitel 1.2.1.2).

NK-Zellen stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar. Ihre Hauptaufgabe, d.h. die frühzeitige und schnelle Erkennung und Bekämpfung Virus-infizierter und krankhaft entarteter Zellen, erfüllen sie, ohne dass eine vorherige Sensibilisierung nötig ist (31). Neue Erkenntnisse weisen jedoch darauf hin, dass zur Erlangung ihrer Funktionalität zumindest das vorherige *Priming* durch Dendritische Zellen erfolgen muss (32). Außerdem sezernieren sie immunregulatorische Zytokine wie z.B. Interferon γ (IFN- γ) (33) und interagieren mit Dendritischen Zellen (34). Auf diese Weise modulieren sie sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort. Zur Lyse der Zielzellen bedienen sich NK-Zellen einer Vielzahl effektiver zytotoxischer Effektormechanismen (siehe Kapitel 1.2.1.3), was sie zu einem vielversprechenden Objekt in der Entwicklung von Immuntherapien gegen verschiedene Tumorentitäten macht (24).

1.2.1.1 Rezeptoren auf NK-Zellen des Menschen

Zur Erfüllung ihrer Aufgaben tragen NK-Zellen eine große Bandbreite verschiedener Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, die funktionell in inhibierende und aktivierende NK-

Rezeptoren unterteilt werden können. Tabelle 1 gibt hierzu eine Übersicht über die unterschiedlichen NKR und ihre Liganden, soweit diese bekannt sind. Strukturell lassen sich die NKR größtenteils in zwei Gruppen einteilen. Neben Ig-ähnlichen Rezeptoren, KIR und NCR, die alle der Ig-Superfamilie zugeordnet werden (35–38), exprimieren NK-Zellen auch Rezeptoren der natürlichen Killergruppe 2 (*Natural Killer Group 2*, NKG2), die eine Proteinstruktur aus einer Typ-II-Transmembran- und einer C-Typ-Lektindomäne aufweisen.

Die humanen KIR werden durch eine Gruppe von Genen aus dem Leukozytenrezeptorcluster (*Leukocyte Receptor Cluster*, LRC) kodiert, das sich auf Chromosom 19q13.4 befindet (39). Sie weisen vielfältige Genpolymorphismen auf, die v.a. für KIR3DL1 untersucht sind (40). Der Erwerb des KIR-Repertoires der NK-Zellen wird durch IL-2 und IL-15 beeinflusst (41). Ihre Expression erfolgt klonal, so dass ein Individuum verschiedene NK-Zellklone mit unterschiedlichem KIR-Repertoire besitzt (42). In der gebräuchlichen Nomenklatur wird die Anzahl der Ig-ähnlichen Domänen der KIR mit 2D für zwei und 3D für drei Domänen angegeben. Außerdem wird die Länge des zytoplasmatischen Anteiles mit einem S für kurz (*short*) oder L für lang (*long*) bezeichnet (39).

Die inhibitorischen Isoformen der KIR besitzen ausnahmslos lange intrazelluläre Anteile (L), welche wie die der übrigen inhibitorischen NKRs (iNKRs) mit einem inhibierenden ITIM-Motiv verknüpft sind. Nach Bindung eines entsprechenden KIR-Epitopes hemmen sie die Aktivierung der NK-Zellen (43). Die Liganden für die inhibitorischen KIRs sind weitestgehend bekannt. Sie binden hauptsächlich an die klassischen HLA-Klasse-Ia-Moleküle (HLA-A, -B und -C). Hierbei erkennen KIR2DL2 und KIR2DL3 spezifisch HLA-C-Allele der Gruppe C1. KIR2DL1 hingegen bindet spezifisch die HLA-Moleküle der Gruppe C2 (44). Der Rezeptor KIR3DL1 bindet an HLA-B-Allele mit einem Bw4-Epitop in der α 1-Helix (45), während KIR3DL2 spezifisch HLA-A3- und A11-Allele erkennt (46). KIR2DL4 nimmt eine Sonderstellung unter den inhibitorischen KIR ein. Neben der Fähigkeit, über das ITIM-Motiv inhibierende Signale zu vermitteln, besitzt KIR2DL4 auch die Möglichkeit aktivierend zu wirken, da sich der Rezeptor ebenfalls mit einem ITAM-Motiv (Fc ϵ RI- γ) verknüpfen kann (47). Des Weiteren erkennt KIR2DL4 mit HLA-G einen Liganden der HLA-Klasse-Ib-Moleküle (48). Die Liganden für KIR2DL5 und KIR3DL7 sind bisher noch unbekannt.

1. EINLEITUNG

Tabelle 1: NK-Zellrezeptoren. Übersicht über die verschiedenen aktivierenden (+) und inhibierenden (-) NK-Zell-Rezeptoren. Bei einigen Rezeptoren ist die Qualität des vermittelten Signals noch unbekannt (?).

NK-Zell-Rezeptoren				
Rezeptorklasse	Bezeichnung	Ligand	Signal	Referenz
Immunglobulin-ähnliche Killerzellrezeptoren	KIR2DL1 (CD158a)	HLA-C2	-	(44)
	KIR2DL2 (CD158b1)	HLA-C1	-	(44)
	KIR2DL3 (CD158b2)	HLA-C1	-	(44)
	KIR2DL4 (CD158d)	HLA-G	+/-	(48)
	KIR2DL5 (CD158f)	?	-	(49)
	KIR3DL1 (CD158e1)	HLA-Bw4	-	(45)
	KIR3DL2 (CD158k)	HLA-A3, A11	-	(46)
	KIR3DL7 (CD158z)	?	-	(43)
	KIR2DS1 (CD158h)	HLA-C2	+	(50)
	KIR2DS2 (CD158j)	HLA-Cw3, A11	+	(50,51)
	KIR2DS3	?	+	(52)
	KIR2DS4 (CD158i)	HLA-Cw4	+	(53)
	KIR2DS5 (CD158g)	?	+	(52)
	KIR2DS6 (CD158c)	?	+	(54)
	KIR3DS1 (CD158e2)	HLA-Bw4	+	(55)
NKG2-Rezeptoren	CD94/NKG2A/B	HLA-E	-	(56)
	CD94/NKG2C	HLA-E	+	(56)
	CD94/NKG2E/H	HLA-E	+	(57)
	NKG2D	ULBP1–5, MICA, MICB	+	(58)
	NKG2F	?	+	(59)
natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren	NKp30	B7-H6	+	(60,61)
	NKp44	MLL5	+	(62,63)
	NKp46	?	+	(38)
	NKp80	AICL	+	(64)
andere Rezeptoren	FcγRIII (CD16)	IgG	+	(23)
	AIM (CD69)	?	?	(65)
	TACTILE (CD96)	PVR	- (?)	(66,67)
	DNAM-1 (CD226)	Nectin-2, PVR	+	(68)
	ILT2 (CD85j)	HLA-G	-	(69)

Die aktivierenden KIR haben kurze intrazelluläre Domänen (S), die bei Quervernetzung mit dem Adapterprotein DAP12 einen aktivierenden intrazellulären Signalweg auslösen (70). Die Bindungspartner der extrazellulären Domänen der aktivierenden KIR sind weniger gut bekannt als die der inhibierenden Rezeptoren dieser Familie. KIR2DS1 erkennt, wie sein inhibitorisches Gegenstück KIR2DL1, HLA-C2. KIR2DS2 scheint zum einen HLA-Cw3 mit sehr niedriger Affinität zu erkennen (50), zum anderen konnte eine Bindung von HLA-A11 nachgewiesen werden (51). Während

1. EINLEITUNG

KIR2DS4 an HLA-Cw4 bindet (53) und der Bindungspartner von KIR3DS1 mit HLA-Bw4 ebenfalls bekannt ist (55), sind die Liganden der Rezeptoren KIR2DS3, KIR2DS5 und KIR2DS6 weiterhin nicht identifiziert.

Die KIR unterscheiden sich in der Affinität gegenüber ihren Liganden. Die Interaktion zwischen HLA-C2 und KIR2DL1 ist stärker als zwischen HLA-C1 und KIR2DL2 bzw. KIR2DL3. Zudem weisen aktivierende KIR eine niedrigere Bindungsaffinität auf als ihre inhibierenden Gegenstücke (71,72). Auch KIR2DL2 und KIR2DL3 interagieren unterschiedlich stark mit HLA-Cw3, so dass sich die Affinität zu dem Liganden wie folgt verhält: $KIR2DL2 > KIR2DL3 > KIR2DS2$ (50).

Aus der Gruppe der NKG2-Rezeptoren exprimieren NK-Zellen den inhibitorischen, heterodimeren Rezeptor CD94/NKG2A sowie dessen Spleiß-Variante CD94/NKG2B. Diese Rezeptoren erkennen das nicht-klassische MHC-Molekül HLA-E (56). Die Heterodimere CD94/NKG2C und CD94/NKG2E sowie das durch alternatives Spleißen entstehende CD94/NKG2H binden ebenso an HLA-E. Sie vermitteln jedoch, gekoppelt über das Adapterprotein DAP12, aktivierende Signale (56,73,74).

Weitere Mitglieder der NKG2-Rezeptorfamilie sind NKG2D und NKG2F, die beide nicht an CD94 gekoppelt sind. NKG2D spielt über die Erkennung der Stress-induzierten MHC-Klasse-I-Polypeptid-verwandten Ketten A und B (*MHC Class I-Related Polypeptide Sequence A/B*, MICA/B) und des UL16 bindenden Proteins (*UL16-Binding Protein*, ULBP) eine wichtige Rolle in der Regulation der NK-Zellaktivität, da es die inhibierenden Signale einer MHC-Klasse-I/KIR-Bindung überwinden und zur Aktivierung der NK-Zelle führen kann (58). NKG2F scheint ebenfalls aktivierende Funktion zu haben, wobei der Ligand des Rezeptors noch nicht identifiziert ist (59).

Die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (NCR) zählen zu den aktivierenden NKR (aNKR). Die Nomenklatur richtet sich nach ihrer Molekulargröße. NKp30 (30 kDa groß) sowie NKp44 und NKp46 führen bei Aktivierung zur Zunahme der Zytotoxizität und Zytokinproduktion. Die Expression von NKp44 ist jedoch, anders als bei NKp30 und NKp46, auf aktivierte NK-Zellen beschränkt. NKp44 ist daher ein wichtiger Marker zum Nachweis der Aktivierung humaner NK-Zellen (36).

NKp46 ist einer der Hauptrezeptoren, die bei der Auslösung der natürlichen Zytotoxizität der NK-Zellen eine Rolle spielen. Die Oberflächendichte des NKp46 ist eng verknüpft mit der natürlichen Zytotoxizität gegenüber HLA-Klasse-I-ungeschützten Zellen (75).

NKp30 bindet das Oberflächenmolekül B7-H6, das von humanen Tumorzellen, nicht aber normalen menschlichem Gewebe exprimiert wird (61). NKp44 erkennt das ebenfalls auf Tumorzellen exprimierte gemischte Abstammungslinie-Leukämie-5-Protein (*Mixed Lineage Leukemia-5 protein*, MLL5) (63).

Der Ligand von NKp46 ist bisher noch unbekannt. NKp80, welches strukturelle Ähnlichkeiten zu NKG2-Rezeptoren aufweist, bindet wiederum das aktivierungsinduziertes C-Typ-Lektin (*Activation-Induced C-type Lectin*, AICL) und ermöglicht somit die Erkennung maligner myeloischer Zellen (64,76).

Das aktivierungsinduzierte Molekül (*Activation-Induced Molecule*, AIM, CD69) ist ein früh exprimierter Aktivierungsmarker unbekannter Funktion, den u.a. NK-Zellen auf ihrer Oberfläche tragen (65). Aktivierte NK-Zellen exprimieren außerdem den Marker CD96 (*T Cell Activation-Increased Late Expression*, TACTILE), welcher an der Adhäsion in der Spätphase der Immunantwort mitwirkt (66). Kürzlich publizierte Ergebnisse weisen darauf hin, dass CD96 mit dem DNAX-Begleitmolekül 1 (*DNAX Accessory Molecule-1*, DNAM-1) um den Poliomyelitisvirusrezeptor (PVR) als Ligand konkurriert, so dass die Interaktion zwischen CD96 und PVR die Zytokinfreisetzung und somit die Immunantwort inhibiert (67).

DNAM-1 ist ein weiterer aktivierender Rezeptor und gehört zur Ig-Superfamilie. DNAM-1 erkennt Nektin-2 und den PVR, fungiert als Adhäsionsmolekül und ist des Weiteren in der Regulation der Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber verschiedenen Tumorentitäten hämatopoetischen Ursprungs beteiligt (68,77,78). Ein weiterer Rezeptor der Ig-Superfamilie auf der Oberfläche von NK-Zellen ist das Ig-ähnliche Transkript 2 (ILT2), welches, wie KIR2DL4, HLA-G erkennt und zu den inhibierenden Rezeptoren zählt (69).

1. EINLEITUNG

1.2.1.2 Subgruppen der NK-Zellen

Natürliche Killerzellen sind durch die Expression von CD56 gekennzeichnet. Anhand der differentiellen Expression des Fc γ Rezeptors III (CD16) können zwei Hauptsubpopulationen von NK-Zellen unterschieden werden. 10% der NK-Zellen exprimieren den Fc-Rezeptor Fc γ RIII nicht oder nur in geringer Dichte, während CD56 hoch exprimiert wird. Sie werden als regulatorische CD16^{dim/-} CD56^{bright}-NK-Zellen bezeichnet, da sie die Hauptquelle an von NK-Zellen stammenden immunregulatorischen Zytokinen sind (25,79). 50 – 70% der CD56^{bright}-NK-Zellen sind CD16⁻, 30 – 50% exprimieren CD16 schwach (CD16^{dim}) (80).

Die Mehrzahl der NK-Zellen des Menschen (ca. 90%) weist eine niedrige Expression von CD56 und eine hohe Expression von CD16 auf, so dass diese Zellen als CD16^{bright} CD56^{dim}-NK-Zellen bezeichnet werden. Diese Zellpopulation besteht aus äußerst effizienten zytotoxischen Effektorzellen (81), die entsprechende Zielzellen sowohl über die natürliche zelluläre Zytotoxizität, als auch Antikörper-vermittelt lysieren können.

Zwei weitere Subpopulationen, die jedoch nur eine Minderheit in gesunden Individuen ausmachen, wurden beschrieben: CD16⁻ CD56^{dim} - und CD16^{bright} CD56⁻ NK-Zellen. Die Rolle der CD16⁻ CD56^{dim} Zellen ist unbekannt, wohingegen bei den CD16^{bright} CD56⁻ NK-Zellen zumindest bekannt ist, dass sie bei einer HIV-Infektion stark expandieren, jedoch wenig reaktionsfähig zu sein scheinen (82). Im Folgenden werden deshalb nur die beiden Hauptsubgruppen näher beschrieben.

Das Verhältnis der NK-Zellsubpopulationen wird u.a. durch das Alter beeinflusst. Bei älteren Personen ist die Zahl der CD56^{dim} NK-Zellen beispielsweise erhöht, während es keine signifikante Änderung der Anzahl an CD56^{bright} Zellen gibt (83). Die CD16^{bright} CD56^{dim} Population ist hauptverantwortlich für die Zytotoxizität gegen Zielzellen und ist im Vergleich mit den CD16^{dim/-} CD56^{bright} Zellen zu einem höheren Maß an Antikörper-abhängiger zellulärer Zytotoxizität fähig (84). Zudem weist sie einen deutlich höheren Perforin- und Granzymgehalt auf (85). Obwohl die CD16^{dim/-} CD56^{bright} NK-Zellen die weniger zytotoxische Subpopulation darstellen, leisten sie ebenfalls einen wichtigen Beitrag für die Immunantwort. Sie produzieren im Vergleich zur zytotoxischen NK-Zellpopulation wesentlich größere Mengen an immunregulatorischen Zytokinen, wie etwa Interferon γ (IFN- γ), Tumornekrosefaktor β (TNF- β),

Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), Interleukin 10 (IL-10) und IL-13 (86).

Neben der unterschiedlichen Expression von CD56 und CD16 unterscheidet sich teilweise auch das restliche Rezeptorrepertoire dieser beiden Subpopulationen quantitativ und qualitativ in seiner Expression, was eine Erklärung für die unterschiedlichen Funktionsweisen der NK-Zellsubgruppen sein kann. So exprimieren CD56^{bright} Zellen KIRs nur schwach, den inhibierenden heterodimeren Rezeptor CD94/NKG2A jedoch vergleichsweise hoch, während für CD56^{dim} NK-Zellen das Gegenteil zutrifft (87). Auch die Dichte des aktivierenden Rezeptors NKp46 ist gewöhnlich auf den CD56^{bright} Zellen höher (88).

CD56^{bright} NK-Zellen zeigen zudem als einzige Lymphozyten eine wesentliche Expression des hochaffinen, heterotrimeren Interleukin 2 Rezeptors IL-2 R $\alpha\beta\gamma$, den sie zusätzlich zu dem mit mittlerer Affinität bindenden IL-2 R $\beta\gamma$ tragen, welcher auf allen NK-Zellen zu finden ist (89). Diese unterschiedliche Ausstattung mit IL-2 Rezeptoren zeigt sich in der hohen Proliferationsrate der CD56^{bright} NK-Zellen als Antwort auf niedrige Dosen IL-2. Dem gegenüber zeigen die CD56^{dim} Zellen selbst bei hohen Dosen IL-2 keine Proliferation (90,91). Die unter einer kontinuierlichen Langzeitgabe von IL-2 expandierenden CD56^{bright} NK-Zellen verändern außerdem ihre CD16-Expression dahingehend, dass ein Großteil von ihnen CD16 exprimiert und zu einem hohen Maß an Antikörper-vermittelter zellulärer Zytotoxizität fähig ist (91). Dank dieses Umstandes sind expandierte NK-Zellen vielversprechende Effektorzellen in der Entwicklung neuartiger immuntherapeutischer Strategien.

1.2.1.3 Effektormechanismen

Damit NK-Zellen ihre wichtigen Effektorfunktionen, wie das Mitwirken an Entzündungsreaktionen, Zytokinproduktion oder Zytotoxizität gegenüber Zielzellen, erfüllen können, besitzen sie vielfältige Effektormechanismen. Zielzellen können zum einen über Perforin- und Granzym-vermittelte Zytotoxizität lysiert werden. Das durch aktivierte NK-Zellen aus intrazellulären Granula freigesetzte Perforin bildet Poren in der Zellmembran der Zielzelle, durch welche das ebenfalls aus Granula stammende Granzym B in die Zielzelle eindringen kann. Granzym B führt zur DNA-

Fragmentierung, aktiviert Pro-Caspasen und induziert auf diese Weise die Apoptose der Zielzelle (92,93).

Während die Freisetzung von Perforin und Granzym B eine schnelle und vergleichsweise starke Lysemöglichkeit darstellt, sind NK-Zellen auch zur langsameren und weniger effizienten Induktion der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose von Zielzellen fähig. Dieser Weg der Zytotoxizität setzt die Expression von Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Rezeptoren auf den Zielzellen voraus. NK-Zellen exprimieren Liganden dieser Rezeptoren, wie z.B. den Fas-Liganden (FasL), den TNF-Liganden bzw. den TNF-verwandten, Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL, *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*), die bei Bindung die Apoptose der Zielzelle auslösen (94,95).

Nach Aktivierung sezernieren NK-Zellen außerdem Zytokine wie beispielsweise IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-10 oder IL-13 und können so die Immunantwort auf Virus-infizierte oder maligne entartete Zellen modulieren und das Tumorstadium bremsen (95).

1.2.1.4 Regulation der NK-Zellaktivität

Die Regulation der NK-Zytotoxizität erlaubt zum einen die Aufrechterhaltung der nötigen Selbsttoleranz zur Verhinderung von Autoimmunität, zum anderen gewährleistet sie die ausreichende Funktionalität der NK-Zellen, d.h. die Eliminierung z.B. Virus-infizierter oder maligne entarteter Zellen. Die Zytotoxizität wird über inhibierende und aktivierende Signale reguliert. Zellen, die autologe MHC-Klasse-I-Moleküle ungenügend oder gar nicht exprimieren, aber aktivierende Signale in einem normalen Maß auf ihrer Oberfläche tragen, werden durch NK-Zellen erkannt und lysiert. Verantwortlich dafür ist die Abnahme der Signale, die über inhibierende MHC-Klasse-I-erkennende Rezeptoren vermittelt werden, so dass sich das Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibierender Einflüssen in Richtung Aktivierung verschiebt (96,97). Dies ist etwa der Fall bei entarteten oder Virus-infizierten Zellen, die häufig ihre MHC-Klasse-I-Expression herunterregulieren (98,99), um der Immunantwort von T-Zellen zu entgehen.

NK-Zellen sind aber auch in der Lage, Zellen mit adäquater MHC-Expression zu lysieren, wenn die aktivierenden Signale die inhibierenden übertreffen. Auch hier ver-

lagert sich das Gleichgewicht in Richtung der NK-Zell-Aktivierung. Dabei spielen v.a. aktivierende Rezeptoren eine Rolle, die Nicht-MHC-Klasse-I-Liganden binden, wie z.B. NCRs oder NKG2D. Dies kommt beispielsweise bei einigen Tumor- und gestressten Zellen vor, welche entsprechende Liganden vermehrt auf der Oberfläche präsentieren.

Die Erlangung der Selbsttoleranz von NK-Zellen ist eine erworbene und keine vererbte Eigenschaft, da die zufällig aktivierten KIR-Gene und der HLA-Status eines Individuums, deren Informationen sich auf unterschiedlichen Chromosomen befinden, voneinander unabhängig vererbt werden (97). Dass die Selbsttoleranz nicht immer vollständig ausgeprägt ist bzw. eventuell verloren gehen kann, zeigt die Rolle von NK-Zellen bei der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten (100). Die genauen Vorgänge, die zur Erlangung eines selbsttoleranten, aber funktionsfähigen Rezeptorrepertoires führen, sind schlussendlich nur schlecht verstanden.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

NK-Zellen sind in der Lage maligne Zellen zu erkennen und nachfolgend zu eliminieren. Hierbei kann das zytotoxische Potential der NK-Zellen durch die Aktivierung mit Zytokinen gesteigert werden. Diese „natürliche Zytotoxizität“ der NK-Zellen ist strikt durch die Verrechnung inhibierender und aktivierender Stimuli balanciert. Eine verminderte Inhibierung der NK-Zellen könnte daher, ebenso wie die verstärkte Perzeption aktivierender Signale, zu einer gesteigerten Zytotoxizität führen.

Im Rahmen der Dissertation wurde der Einfluss einer IL-2 bzw. IL-15 vermittelten Voraktivierung auf das zytotoxische Potential der NK-Zellen untersucht. Da sich Zellen des Multiplen Myeloms wenig responsiv gegenüber der NK-Zell-vermittelten natürlichen Zytotoxizität zeigen, wäre eine durch IL-2 oder IL-15 vermittelte Steigerung des zytotoxischen Potentials der NK-Zellen zur Lyse dieser Zielzellen wünschenswert.

Sowohl eine durch die Voraktivierung erhöhte Expression aktivierender NK-Zell-Rezeptoren, aber auch die Reduktion der Expressionshöhe der inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren bzw. eine Änderung des KIR Expressionsmusters könnte ausschlaggebend für eine Steigerung der lytischen Aktivität der NK-Zellen sein. Daher

wurde der Einfluss der Voraktivierung auf die Expressionshöhe dieser Rezeptoren sowie den KIR Phänotyp bestimmt.

Nachdem autologe Zellen durch die Inhibition der NK Zellen vor deren lytischer Aktivität geschützt sind, könnte eine Reduktion der inhibierenden Rezeptoren oder aber eine Veränderung des KIR Phänotyps aufgrund der Voraktivierung ein Risiko für einen späteren Transfer dieser Strategie in die klinische Anwendung darstellen, da autologe Zellen evtl. nicht mehr ausreichend vor der lytischen Aktivität der NK-Zellen geschützt wären. Dieser Aspekt wurde ebenfalls im Rahmen der Arbeit adressiert.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

Soweit nicht anders angegeben wurden die folgenden Materialien verwendet.

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	
Produkt	Hersteller
µMACS™ µ Säule	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
0,2 ml PCR-Reagiergefäß 8er-Kette	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
3,5 ml Einmal-Pasteurpipette	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
4 ml Vi-CELL™ Probengefäß	Beckman Coulter, Brea, USA
5 ml Röhre für Durchflußzytometer	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
6-well, 24-well Gewebekulturplatte mit flachem Boden und Deckel	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-well Mikroplatte mit rundem Boden für 1450 MicroBeta™	PerkinElmer, Waltham, USA
96-well Platte mit v-förmigem Boden und Deckel	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Einmal-Skalpell Nr. 10	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
Gewebekulturflasche 50 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Gewebekulturflasche 650 ml für adhärenente Zellen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
MACS® LS Trennsäule	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS® VortrennungsfILTER 30 µm	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Pipettenspitzen 0,1 - 10 µl, 0,5 - 20 µl, 2 - 200 µl, 50 - 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäß 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reservoir für Multipipette 2,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipette 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhre 10 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 3: Reagenzien

Reagenzien	
Produkt	Hersteller
0,05 % Trypsin-EDTA	Invitrogen, Carlsbad, USA
100 Bp-DNA Leiter Extended 50 µg	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
7-Amino-Actinomycin D (7-AAD)	Beckman Coulter, Brea, USA
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Agarose	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
autoMACS™ Spüllösung	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
CellGro® rh IL-15 10 µg (≥ 8 x 10 ⁶ IU/mg)	CellGenix Technologie Transfer GmbH, Freiburg, Deutschland
CellGro® serumfreies Zellwachstumsmedium für hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen	CellGenix Technologie Transfer GmbH, Freiburg, Deutschland
Chrom-51 185 MBq/ml	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
fötales Kälberserum	Perbio Science, Cramlington, England
MACS bovine Serumalbuminlösung	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Penicillin Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad, USA
phosphatgepufferte Salzlösung	Invitrogen, Carlsbad, USA
rh IL-2 Proleukin® S 18 x 10 ⁶ IE	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, Deutschland
rh IL-6	Invitrogen, Carlsbad, USA
RPMI 1640 + GlutaMAX™-I	Invitrogen, Carlsbad, USA
Szintillationsgemisch Optiphase Supermix	PerkinElmer, Waltham, USA
Triton® X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 4: Zelllinien

Zelllinien	
Zelllinie	Zelltyp
INA-6	humane Plasmazelleukämie-Zelllinie, IL-6 abhängig
K-562	humane CML-Zelllinie
L363	humane Plasmazelleukämie-Zelllinie
RPMI 8226	humane Myelomzelllinie

2. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 5: Geräte

Geräte	
Produkt	Hersteller
Dunkelhaube RH-5	Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland
Navios™ Durchflusszytometer	Beckman Coulter, Brea, USA
Szintillationszähler 1450 MicroBeta Trilux	PerkinElmer, Waltham, USA
thermoMACS™ Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Thermozykler PTC-200	MJ Research Inc., St. Bruno, Kanada
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland
Vi-CELL™ Zellvitalitätsmessgerät	Beckman Coulter, Brea, USA
Vortexmischer PV-1	Grant Instruments, Cambridge, England
Zentrifuge Megafuge 1.0 R, 3 S-R	Heraeus, Hanau, Deutschland

Tabelle 6: Kits

Kits	
Produkt	Hersteller
μMACS™ cDNA-Synthesekit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
μMACS™ mRNA-Isolationskit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Intrazelluläres Färbungskit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
KIR-Typisierungskit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
NK-Zellaktivierungs- und -expansionskit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
NK-Zellen-Isolationskit: human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

Tabelle 7: Zellkulturmedien

Zellkulturmedien		
Medium	Zelllinie	Zusammensetzung
R10-Medium + IL-6	INA-6	RPMI 1640 + GlutaMAX™-I 10 % fötales Kälberserum 1 % Penicillin Streptomycin 2,5 ng/ml IL-6
R10-Medium	K-562, L363, RPMI 8226, NK-Zellen (Kurzzeitaktivierung)	RPMI 1640 + GlutaMAX™-I 10 % fötales Kälberserum 1 % Penicillin Streptomycin
Expansionsmedium	NK-Zellen (Expansion)	CellGro® serumfreies Zellwachstumsmedium für hämatopoetische Stamm- & Progenitorzellen 10 % fötales Kälberserum 500 U/ml IL-2

2. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 8: Pufferlösungen

Pufferlösungen	
Puffer	Zusammensetzung
MACS Separationspuffer (0,5 % BSA)	1,45 l autoMACS™ Spüllösung 75 ml MACS bovine Serumalbuminlösung
TAE-Puffer (1x)	40 mM Tris 1 mM EDTA-Na ₂ -Salz 40 mM Essigsäure

Tabelle 9: monoklonale Antikörper

monoklonale Antikörper		
Antikörper	Reaktivität	Hersteller
CD112-PE	human	Beckman Coulter, Brea, USA
CD155-PE, Klon 300907	human	R&D systems, Minneapolis, USA
CD158a,h-PE	human	Beckman Coulter, Brea, USA
CD158b1/b2,j-PE	human	Beckman Coulter, Brea, USA
CD158e1/e2-PE	human	Beckman Coulter, Brea, USA
CD158i-PE	human	Beckman Coulter, Brea, USA
CD159a-PE	human	Beckman Coulter, Brea, USA
CD16, Klon 3G8	human	Beckman Coulter, Brea, USA
CD16-FITC	human	Beckman Coulter, Brea, USA
CD226(DNAM-1) pure	human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD226(DNAM-1)-PE	human	Beckman Coulter, Brea, USA
CD314(NKG2D) pure	human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD335(NKp46) pure	human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD335(NKp46)-PE	human	Beckman Coulter, Brea, USA
CD336(NKp44) pure	human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD336(NKp44)-PE	human	Beckman Coulter, Brea, USA
CD337(NKp30) pure	human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD337(NKp30)-PE	human	Beckman Coulter, Brea, USA
CD45-Pacific Blue	human	Beckman Coulter, Brea, USA
CD56-PC7	human	Beckman Coulter, Brea, USA
CD69-PE	human	Beckman Coulter, Brea, USA
CD96-PE	human	Beckman Coulter, Brea, USA
HLA ABC-FITC, Klon B9.12.1	human	Beckman Coulter, Brea, USA
IgG1-PE	murin	Beckman Coulter, Brea, USA
IgG2a-FITC	murin	Beckman Coulter, Brea, USA
IgG2a-PE	murin	R&D systems, Minneapolis, USA
MIC A/B-PE, Klon 6D4	human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
NKG2D-PE	human	Beckman Coulter, Brea, USA
ULBP-1-PE, Klon 170818	human	R&D systems, Minneapolis, USA
ULBP-2/-5/-6-PE, Klon 165903	human	R&D systems, Minneapolis, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation der peripheren mononukleären Blutzellen

Die Isolation der peripheren mononukleären Blutzellen (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs) erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Als Separationsmedium wurde Ficoll (Dichte 1,077 g/ml) verwendet. Ausgangsmaterial für die Gewinnung von PBMCs waren Leukozytendepletionskammern (*Leukoreduction System Chambers*, LRSCs), die vom Blutspendezentrum (Institut für Transfusionsmedizin, UK-SH, Kiel) bezogen wurden. LRSCs fallen als Nebenprodukt bei der Thrombozytapherese an, aus ihnen lassen sich doppelt so viele PBMCs isolieren wie aus Buffy Coats und die gewonnenen Zellen haben eine vergleichbare Zusammensetzung wie Leukozytenfiltereluate (101). Nach Eröffnen der LRSCs wurde die erythrozytenhaltige Zellsuspension mit einem Volumenanteil PBS verdünnt. In 50 ml Zentrifugenröhren wurden 7,5 ml verdünnte Blutzellsuspension auf 15 ml Ficoll geschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation zur Auftrennung der zellulären Bestandteile (850 g, 20 min).

Ficoll weist eine höhere Dichte als PBMCs und Thrombozyten und eine geringere als Erythrozyten und Granulozyten auf. Die Zellfraktionen trennen sich nach ihrer Dichte auf, es bildet sich eine PBMC-haltige Interphase zwischen Ficoll und der oberen Phase aus verdünntem Plasma und Thrombozyten (102). Die in der Interphase befindlichen Zellen wurden abpipettiert und in PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen durch mehrmalige Zentrifugation (544 g, 5 min) mit PBS gewaschen. Die so gewonnenen PBMCs wurden zur weiteren Präparation von NK-Zellen verwendet.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

In einem 4 ml Vi-CELL™ Probengefäß wurde 1 ml verdünnte Suspension der jeweils zu bestimmenden Zellen mit dem Zellvitalitätsmessgerät Vi-Cell™ Cell Viability Analyzer hinsichtlich Vitalität und Konzentration analysiert. Die Verdünnung erfolgte entsprechend der erwarteten Konzentration der Zellsuspension mit PBS. Bei zu wenigen Zählereignissen wurde die Messung in einer niedrigeren Verdünnung wiederholt. Aus

2. MATERIAL UND METHODEN

der Konzentration vitaler Zellen und dem Volumen der Zellsuspension wurde anschließend die absolute Zellzahl nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellzahl} = \text{Volumen [ml]} \times \text{Konzentration [Zellen/ml]}$$

2.2.3 Magnetische Zellseparation von NK-Zellen

Die magnetische Zellseparation (*Magnetic Activated Cell Sorting*, MACS) erfolgte unter Anwendung des *NK Cell Isolation Kit: human* von Miltenyi Biotec. Ausgangsmaterial waren die aus LRSC isolierten PBMCs. Zur Negativselektion der NK-Zellen werden hierbei zunächst alle Nicht-NK-Zellen mit biotinylierten Antikörpern markiert. In einem zweiten Schritt binden mit Magnetpartikeln versehene Zweitantikörper (MicroBeads) an den Biotinresten. Die mit MicroBeads beladenen Nicht-NK-Zellen werden beim Durchfluss durch eine Trennsäule, die von einem starken Magnetfeld umgeben wird, zurückgehalten und die unmarkierten NK-Zellen können als Zellsuspension aufgefangen werden. Die Separation der NK-Zellen erfolgte nach dem Protokoll zur Isolation von NK-Zellen von Miltenyi Biotec. Zur magnetischen Separation der NK-Zellen wurden je 500 µl Zellsuspension über eine zuvor mit 3 ml Puffer gespülte MACS[®] LS Trennsäule laufen gelassen. Um Zellklumpen aus der Zellsuspension zu filtern wurden den Trennsäulen MACS[®] VortrennungsfILTER vorgeschaltet. Die unmarkierten NK-Zellen wurden in 10 ml Zentrifugenröhren aufgefangen. Nach Durchfluss der Zellsuspension wurde jede Trennsäule dreimal mit jeweils 3 ml Puffer gespült. Der Durchfluss wurde ebenfalls in den Zentrifugenröhren gesammelt. Die Reinheit der NK-Zellpräparation lag im Mittel bei 99,7 % (SEM = 0,05; n = 31).

2.2.4 Voraktivierung der NK-Zellen

Die immunomagnetisch isolierten NK-Zellen wurden mit R10-Medium auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und die Zellsuspension wurden in 6-well Gewebekulturplatten gegeben. Bei einigen Wells blieb zur Kontrolle die Aktivierung mit Interleukinen aus. Von den übrigen NK-Zellen wurde ein Teil mit 100 U/ml IL-2 und der andere Teil mit 10 ng/ml IL-15 versehen. Anschließend erfolgte eine Inkubation (37°C , 6,0 % CO_2) der Gewebekulturplatten über Nacht im Brutschrank.

2.2.5 Langzeitaktivierung und Expansion von NK-Zellen

Die isolierten NK-Zellen wurden über 21 d mit Mikrokugeln (*MACS[®] Anti-Biotin MACSiBead[™] Particles*, MACSiBeads), die zuvor mit biotinylierten Antikörpern gegen CD335 (NKp46) und CD2 beladen worden sind, expandiert und mit IL-2 (500 U/ml) aktiviert. Die beladenen MACSiBeads simulieren dabei über eine Quervernetzung mit den NK-Zellen potentielle Zielzellen und die hohe Dosis IL-2 sorgt für eine Aktivierung der NK-Zellen. Für die Expansion wurde das NK-Zellaktivierungs- und -expansionskit (*NK Cell Activation / Expansion Kit human*) von Miltenyi Biotec verwendet. Die Beladung der monoklonalen Anti-Biotin-Antikörper mit biotinylierten Antikörpern gegen CD335 (NKp46) und CD2 sowie das Beladen und Waschen der MACSiBeads erfolgte gemäß Herstellerangaben. Für die Expansionsansätze wurden 5×10^5 beladene MACSiBeads pro 10^6 zu expandierende NK-Zellen eingesetzt, welche zuvor mit Expansionsmedium gewaschen und auf eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml eingestellt worden waren, so dass das MACSiBeads-NK-Zellverhältnis 1:2 betrug. Mit den NK-Zellen wurde eine 24-well Gewebekulturplatte mit 1 ml Zellsuspension pro Bohrung bestückt. Ein Teil der Bohrungen wurde nun mit jeweils 50 μl vorbereiteter MACSiBeads versehen und gut durchmischt. Die restlichen Bohrungen wurden als Kontrollansätze ohne MACSiBeads belassen. Die Expansion erfolgte über 21 d im Brutschrank (37°C , 6,0 % CO_2). Die Ansätze wurden regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert, aufgewirbelt und falls nötig mit frischem Expansionsmedium versehen. Unter der Expansion lagerten die NK-Zellen sich zu größeren Zellklumpen zusammen. Wurde eine zu hohe Zelldichte erreicht, wurden die NK-Zellen aufgewirbelt und der Inhalt einer Bohrung auf zwei Bohrungen gesplittet.

2.2.6 Zytotoxizitätstests

Mithilfe eines Chrom-51-(^{51}Cr)-Freisetzungstests (*^{51}Cr -Release-Assays*) wurde die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen untersucht. Hierbei wird ^{51}Cr aus radioaktivmarkierten Zielzellen durch Effektorzell-vermittelte Lyse (*Cell-Mediated Lysis*) freigesetzt und kann anschließend im Zellkulturmedium nachgewiesen werden. Zur Markierung wurden die zuvor auf Vitalität geprüften Zielzellen herunterzentrifugiert (544 g, 5 min) und die Zellpellets danach in 100 μl ^{51}Cr / 10^6 Zellen resuspendiert. Für eine ausreichende Aufnahme des ^{51}Cr wurden die Zielzellen im Brutschrank (37°C, 6,0 % CO_2 , 1 – 1,5 h) inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation wurde überschüssiges ^{51}Cr durch dreimaliges Waschen mit jeweils 10 ml R10-Medium entfernt und die Zielzellen auf eine Konzentration von 10^5 Zellen / ml eingestellt. Pro Ansatz wurden 50 μl Zielzellsuspension (entspricht 5.000 Zellen) verwendet. Mit den chromierten Zellen wurden zuvor vorbereitet 96-Loch-Platten beschickt. Um auf ein Endvolumen von 200 μl / Bohrung zu kommen, wurde die dazu fehlende Menge R10-Medium vorgelegt. Als Effektorzellen wurden anschließend voraktivierte NK-Zellen eingesetzt und im Anschluss die radioaktivmarkierten Zielzellen hinzugefügt. Jeder Ansatz wurde in Triplets pipettiert. Um die basale ^{51}Cr -Freisetzung (*Basal Release*, BR) zu ermitteln, wurde ein Ansatz ohne Effektorzellen belassen. Zur Ermittlung der maximal möglichen ^{51}Cr -Freisetzung (*Maximal Release*, MR) wurden einem Ansatz statt Effektorzellen 50 μl des nichtionischen Tensids Triton® X-100 zugegeben, welches die Zellmembranen der Zielzellen permeabilisiert und so zur Lyse führt. Es folgte eine Inkubation der Ansätze im Brutschrank (37°C, 6,0 % CO_2 , 3 h). Nach beendeter Inkubationszeit wurden die 96-Loch-Platten zentrifugiert (850 g, 5 min). 25 μl der Überstände wurden danach vorsichtig auf 96-Loch-Platten für den Szintillationszähler transferiert, die zuvor mit jeweils 125 μl Flüssigszintillationsgemisch pro Bohrung bestückt worden waren. Zur guten Durchmischung von Überständen und Szintillationsgemisch wurden die 96-Loch-Platten für 20 min auf einer Rüttelplatte belassen und nach Ablauf der Zeit in den Szintillationszähler gestellt. Dieser detektiert die freiwerdende γ -Strahlung als Maß für die Menge lysierter Zielzellen. Die Messung erfolgt in Zählungen pro Minute (*counts per minute*, cpm). Aus den cpm-Werten der Triplets wurden Mittelwerte gebildet, die zur Berechnung der spezifischen Lyse nach folgender Formel genutzt wurden:

$$\text{spezifische Lyse [\%]} = \frac{(\text{experimentelle Lyse [cpm]} - \text{BR [cpm]})}{(\text{MR [cpm]} - \text{BR [cpm]})} \times 100$$

2.2.6.1 ⁵¹Cr-Freisetzungstest zur natürlichen Zytotoxizität

Die Vorbereitung der Zielzellen, die Inkubation der bestückten 96-Loch-Platten und die abschließende Messung der Ansätze erfolgten wie im allgemeinen Teil 2.2.6 zu den Zytotoxizitätstests beschrieben. Als Zielzellen dienten die Zelllinien INA-6, K-562, L363 und RPMI 8226. Die NK-Zellen wurden in einem Effektor-Zielzell-Verhältnis (E:T-Ratio) von 1:1 und 5:1 eingesetzt. Dafür wurden 5 µl bzw. 25 µl der NK-Zellsuspension und 50 µl der vorbereiteten Zielzellen verwendet. Dies entspricht 5.000 bzw. 25.000 NK-Zellen auf 5.000 Zielzellen.

2.2.6.2 ⁵¹Cr-Freisetzungstest zur Autoreaktivität

Die Vorbereitung der Zielzellen, die Inkubation der bestückten 96-Loch-Platten und die abschließende Messung der Ansätze erfolgten wie im allgemeinen Teil 2.2.6 zu den Zytotoxizitätstests beschrieben. Als Zielzellen dienten autologe B-Zellen, die freundlicherweise von Dr. C. Kellner (Sektion für Stammzell- und Immuntherapie, II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) zur Verfügung gestellt wurden. Die NK-Zellen wurden in einer E:T-Ratio von 5:1 eingesetzt. Dafür wurden 25 µl NK-Zellsuspension und 50 µl der vorbereiteten autologen B-Zellen verwendet.

2.2.6.3 Blockierungsversuche

Bei den Blockierungsversuchen werden NK-Zellen mit ungekoppelten, monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Rezeptoren inkubiert, um die entsprechenden Rezeptoren zu blockieren und auf diese Weise die für eine Interaktion nötige Bindung zwischen Rezeptor und Ligand während der Inkubation mit den Myelomzellen zu unterbinden. Auf diese Weise kann über eine eventuell stattfindende Reduktion der

spezifischen Lyse der Einfluss der einzelnen aktivierenden NK-Rezeptoren auf die natürliche Zytotoxizität der NK-Zellen untersucht werden.

Die Vorbereitung der Zielzellen, die Inkubation der bestückten 96-Loch-Platten und die abschließende Messung der Ansätze erfolgten wie im allgemeinen Teil 2.2.6 zu den Zytotoxizitätstests beschrieben. Als Ziel wurde die Zelllinie L363 eingesetzt. Die NK-Zellen wurden vor der Inkubation mit den Zielzellen mit jeweils 10 µl eines der ungekoppelten, monoklonalen Antikörper gegen NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46 oder DNAM-1 versehen. Die NK-Zellen wurden in einer E:T-Ratio von 5:1 eingesetzt. Dafür wurden 25 µl NK-Zellsuspension und 50 µl der vorbereiteten Zielzellen verwendet.

2.2.7 Durchflusszytometrie zur Messung der NK-Rezeptorexpression

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Untersuchung von Zellpopulationen hinsichtlich ihrer exprimierten Oberflächenmarker, intrazellulären Strukturen sowie Zellgröße und Zellzahl. Zunächst werden die zu untersuchenden Zellen mit monoklonalen Antikörpern markiert, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind. Anschließend werden sie im Durchflusszytometer durch eine feine Kapillare gesogen und passieren einzeln einen Laser. Das gestreute Licht wird von Detektoren erfasst und dient zur Berechnung von Größe und Granularität der Zelle. Über Detektion des durch die Fluoreszenzfarbstoffe emittierten Lichtes kann die Expressionsstärke des markierten Oberflächenmarkers oder der intrazellulären Struktur bestimmt werden.

Als zu untersuchende Zellpopulationen wurden voraktivierte NK-Zellen verwendet. Es erfolgten zunächst ein Waschschriff und die anschließende Einstellung auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml mit PBS. Pro Ansatz wurden 65 µl NK-Zellsuspension verwendet, dies entsprach $1,3 \times 10^5$ Zellen. Es wurde den Ansätzen je 10 µl der Antikörper CD16-FITC, CD56-PC7 und CD45-Pacific Blue, sowie 10 µl des Vitalfarbstoffes 7-AAD hinzugefügt. 7-AAD gelangt bei aufgehobener Zellmembranintegrität in die Zelle und interkaliert mit der DNA von somit non-vitalen Zellen. Anschließend wurden zur Ermittlung der unspezifischen Antikörperbindung zu einem der Ansätze 10 µl PE-konjugierte Antikörper gegen murines IgG1 hinzu pipettiert. Statt IgG1-PE wurden die übrigen Ansätze mit 10 µl PE-konjugierten Antikörpern

2. MATERIAL UND METHODEN

spezifisch für humanes NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, DNAM-1, CD69, CD96, CD158a,h, CD158b1/b2, CD158e1/e2, CD158i oder CD159a versehen. Nach der Inkubation (5°C, 20 min, im Dunkeln) wurden jeweils 300 µl PBS hinzugefügt und die Ansätze mit dem Durchflusszytometer Navios™ gemessen und die Ergebnisse mit der Navios™ Cytometry List Mode Data Acquisition & Analysis Software analysiert.

2.2.8 NKR-Liganden- und HLA-Expressionsbestimmung auf Zielzellen

Die Bestimmung der NKG2D- und DNAM-1-Liganden auf den Myelomzelllinien RPMI 8226, INA-6 und L363 sowie die HLA-Bestimmung auf den Zelllinien K-562, RPMI 8226, INA-8 und L363 erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Zunächst wurden die Zielzellen wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben vorbereitet und auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml mit PBS eingestellt. Pro Ansatz wurden 100 µl Zielzellsuspension verwendet. Dies entspricht 2×10^5 Zellen. Den Ansätzen wurden anschließend 10 µl des Vitalfarbstoffes 7-AAD hinzugefügt sowie jeweils einem Ansatz pro Zelllinie 10 µl IgG2a-FITC und zu einem zweiten 10 µl HLA ABC-FITC. Für die NKG2D- und DNAM-1-Ligandenbestimmung wurde zu jeweils einem Ansatz neben 10 µl 7AAD zusätzlich 10 µl MIC A/B-PE, ULBP-1-PE und ULBP-2/-5/-6-PE, zu einem anderen je 10 µl CD112-PE und CD155-PE und zu einem dritten 10 µl IgG2a-PE als Isotypkontrolle hinzugegeben. Nach der Inkubation (5°C, 20 min, im Dunkeln) wurden jeweils 300 µl PBS hinzugefügt und die Proben wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben gemessen.

2.2.9 mRNA-Isolation

Die Isolation der mRNA aus NK-Zellen erfolgte mit dem *µMACS™ mRNA Isolation Kit* von Miltenyi Biotec. Ausgangsmaterial waren voraktivierte und expandierte NK-Zellen in Suspension und bei -20°C tiefgefrorene Zellpellets zuvor voraktivierter oder expandierter NK-Zellen. Es wurden $1-3 \times 10^6$ Zellen für die mRNA-Isolation eingesetzt. Die NK-Zellen in Suspension wurden zunächst mit PBS gewaschen und pelletiert, die gefrorenen Zellpellets direkt zur Isolation verwendet. Nach Hinzufügen von 1 ml eines hochkonzentrierten Salzpuffers mit 0,1 % SDS (*Lysis/Binding Buffer*, Lysis-/Bindungspuffer) erfolgte die Lyse der Zellen durch fünfminütiges Durchwirbeln der Probe mit einem Vortexmischer. Um es von Zelltrümmern zu befreien, wurde das

Lysat auf eine Lysatreinigungssäule (*Lysate Clear Column*) übertragen, die auf einem 2 ml Reagiergefäß platziert war, und anschließend zentrifugiert (13.000 g, 3 min). Zu dem Durchfluss wurden 50 µl Oligo(dT)-konjugierte Magnetpartikel (*Oligo(dT) MicroBeads*) hinzugegeben, die mit dem Poly(A)-Schwanz der mRNA hybridisieren. Nach kurzem Durchmischen der Probe wurde diese über eine zuvor mit 100 µl Lysis-/Bindungspuffer vorgespülte µMACS™ µ Säule laufen gelassen, die im Magnetfeld eines temperierbaren Magnet-Separators platziert war. Die markierte mRNA bindet nun auf der Säule. Die µ Säule wurde im Anschluss zweimal mit 200 µl Lysis-/Bindungspuffer und viermal mit 100 µl eines niedrigkonzentrierten Salzpuffers (*Wash Buffer*, Waschpuffer) gespült. Eine Eluierung der mRNA wurde nicht durchgeführt. Es wurde direkt im Anschluss an die mRNA-Isolation mit der cDNA-Synthese begonnen.

2.2.10 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit dem µMACS™ *One-step cDNA Kit* von Miltenyi Biotec durchgeführt. Die Synthese erfolgte direkt im Anschluss an die mRNA-Isolation und fand direkt auf der verwendeten µMACS™ µ Säule statt. Ausgangsmaterial war die auf der µ Säule gebundene mRNA. Zunächst wurde die µ Säule zweimal mit jeweils 100 µl Äquilibrierungs- und Waschpuffer (*Equilibration/Wash Buffer*) gespült. Anschließend wurden 20 µl resuspendierte Enzymmischung (*lyophilized Enzyme Mix* in 20 µl *Resuspension Buffer*) hinzugefügt, die eine reverse Transkriptase und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) enthält. Um eine Verdunstung während des Syntheseschrittes zu verhindern wurde 1 µl Abdichtungslösung (*Sealing Solution*) auf die Matrix der µ Säule gegeben. Im Anschluss daran erfolgte eine Inkubation (1 h, 42°C), während der die cDNA synthetisiert wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die µ Säule zweimal mit jeweils 100 µl Äquilibrierungs- und Waschpuffer gespült und der Durchfluss verworfen. Es wurden anschließend 20 µl cDNA-Abgabelösung (*cDNA Release Solution*) auf die µ Säule gegeben und ein zweiter Inkubationsschritt durchgeführt (42°C, 10 min). Der Durchfluss und das nach anschließender Elution der cDNA mit 50 µl cDNA-Elutionspuffer (*cDNA Elution Buffer*) entstandene cDNA-Eluat wurden aufgefangen. Die gewonnene cDNA-Lösung wurde entweder direkt im Anschluss an die cDNA-Synthese zur Bestimmung des KIR-

Phänotyps mittels PCR verwendet oder für eine spätere Bestimmung tiefgefroren (-20°C).

2.2.11 Bestimmung der KIR-spezifischen mRNA-Expression mittels PCR

Die Bestimmung der KIR-spezifischen mRNA-Expression der Spender wurde mit dem *KIR Typing Kit* von Miltenyi Biotec vorgenommen. Ausgangsmaterial war die aus mRNA synthetisierte cDNA voraktivierter und expandierter NK-Zellen.

Eine Testplatte des *KIR Typing Kits* zur Bestimmung der mRNA-Expression eines Spenders enthält 19 Ansätze zur Detektion der Expression der verschiedenen KIR-Gene bzw. Pseudogene, eine Kontrolle zur Erfassung einer Kontamination der cDNA-Probe mit genomischer DNA, sowie eine Negativ- und eine Positivkontrolle. Die Ansätze zur Detektion der KIR-Expression bestehen aus einer gefriergetrockneten Enzymmischung, die eine Taq-DNA-Polymerase, für das jeweilige Gen sequenzspezifische Primer (*Sequence-Specific Primers, SSP*), Primer für eine interne Kontrolle (β -Aktin, 400 bp) und DNA Ladungspuffer enthält.

Zunächst wurden zu der gefriergetrockneten Enzymmischung der Negativkontrolle 25 μ l Resuspensionspuffer (*Resuspension Buffer*) gegeben. Anschließend wurden 25 μ l der cDNA-Lösung gründlich mit 575 μ l Resuspensionspuffer vermischt und jeweils 25 μ l cDNA-Puffer-Mischung zu den Ansätzen zur Detektion der KIR-Expression, zur Kontaminationskontrolle und zur Positivkontrolle pipettiert. Alle Ansätze wurden durch Auf- und Abpipettieren gemischt und in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße transferiert. Die Amplifizierung der cDNA mittels PCR in einem Thermozykler erfolgte anschließend nach in Tabelle 10 dargestelltem Profil. Die PCR-Produkte wurden im Anschluss mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese identifiziert.

2. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 10: PCR-Profil. Ablauf der durchgeführten Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung der für die einzelnen KIR-spezifischen komplementären DNA (cDNA).

PCR der amplifizierten KIR-spezifischen cDNA			
Schritt	biochemischer Prozess	Zeit	Temperatur
1. Initialdenaturierung	Denaturierung	60 s	95°C
2. 35 Zyklen	Denaturierung	60 s	94°C
	Annealing	60 s	63°C
	Amplifikation	90 s	72°C
3. Kühlung		unbegrenzt	4°C

2.2.12 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Stränge anhand ihrer Größe aufgetrennt und charakterisiert werden. Die DNA-Stränge werden auf ein Agarosegel aufgetragen, durch welches in einer Elektrophoresekammer Strom fließt. Die negativ geladenen DNA-Bruchstücke wandern dann abhängig von ihrer Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit in Richtung Pluspol, wobei kurze Fragmente schneller als große Bruchstücke wandern. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde genutzt um die Größe der amplifizierten, KIR-spezifischen cDNA voraktivierter NK-Zellen zu bestimmen und so den KIR-Typ des jeweiligen Spenders zu ermitteln.

Zunächst wurde ein 2 %iges Agarosegel hergestellt, indem 2 g Agarose in 100 ml 1-fach TAE-Puffer aufgekocht und das flüssige Gel in eine Form gegossen wurden, die mit einem 40-zinkigem Kamm versehen war. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Kamm entfernt und das Gel in einer Elektrophoresekammer platziert. Zur späteren Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden 12 µl einer DNA-Leiter (Längenstandard) in eine Tasche des Agarosegels gegeben. Weitere Taschen wurden mit jeweils 8,5 µl der verschiedenen PCR-Ansätze beladen. Nach Anschalten der Spannungsquelle wurde das Gel mit 100 V für 45 min laufen gelassen. Nach Beendigung der Laufzeit kam das Gel für weitere 10 min in ein Bad mit 1-fachem TAE-Puffer, dem Ethidiumbromid zugesetzt war. Ethidiumbromid bildet mit Nukleinsäuren Komplexe und kann dann unter UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden. Auf diese Weise können die ihrer Größe nach aufgetrennten DNA-Bruchstücke nachgewiesen werden. Im Anschluss an die Inkubation im Ethidiumbromidbad wurde das Agarosegel unter einer Dunkelhaube mit UV-Licht belichtet und betrachtet. Zur anschließenden KIR-Typisierung wurden Bilder des belichteten Gels angefertigt.

2.2.13 Statistische Analyse

Zur statistischen Berechnung der Ergebnisse wurde das Programm GraphPad Prism 5 für Windows von der Graphpad Software Inc. verwendet. Werte wurden mit verteilungsunabhängigen, nichtparametrischen Tests verglichen. Dabei kam als Test der Oneway-ANOVA für gepaarte bzw. ungepaarte Stichproben und der Bonferroni-Posttest zur Anwendung. Bei Vierfeldertafeln kam der Exakte Test nach Fisher zum Einsatz. Bei einem p-Wert $< 0,05$ wurden Ergebnisse als statistisch signifikant gewertet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber der Zelllinie K-562

Die humane CML-Zelllinie K-562 stellt ein sensibles Ziel für die NK-Zell-vermittelte Lyse dar. Sie weist nur eine reduzierte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf, so dass die Inhibition der NK-Zellen über die KIR-MHC-Interaktion nur zu einem minimalen Anteil vorliegt (vgl. Abb. 1). Zudem exprimiert K-562 Liganden für die aktivierenden NK-Rezeptoren NKG2D und DNAM-1 auf der Zelloberfläche (103,104). K-562 wurde daher als Kontrollzelllinie genutzt, um den Einfluss der Voraktivierung auf das zytotoxische Potential der NK-Zellen unabhängiger Spender zu untersuchen.

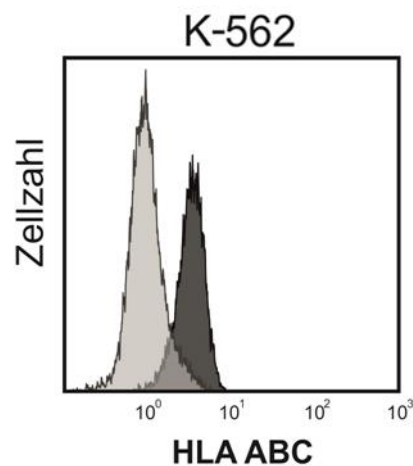


Abbildung 1: HLA-Expression auf der humanen CML-Zelllinie K-562. Fluoreszenzintensität (FI) der Expression des humanen Leukozytenantigens (HLA) für die HLA-Gruppen A, B und C (schwarz) und der Isotypenkontrolle (grau) der chronischen myeloischen Leukämie-(CML)-Zelllinie K-562.

Nur solche Spender, die im nicht-voraktivierten Zustand bei einer E:T-Ratio von 5:1 mindestens 5% spezifische Lyse aufwiesen, wurden auch bei der Auswertung der Zytotoxizitätsexperimente gegenüber den Myelomzelllinien RPMI 8226 und L363 berücksichtigt.

Es wurden NK-Zellen von 43 Spendern gegen K-562 im ⁵¹Cr-Freisetzungstest eingesetzt, um das Ausmaß der natürlichen Zytotoxizität zu bestimmen (vgl. Abb. 2). 14 Spender wiesen bei einer E:T-Ratio von 5:1 im nicht-voraktivierten Zustand eine spezifische Lyse unter 5% auf und wurden als non-responder (Nichtansprecher) definiert. Die 29 Spender, die bei gleicher E:T-Ratio und gleichem Aktivierungszustand

3. ERGEBNISSE

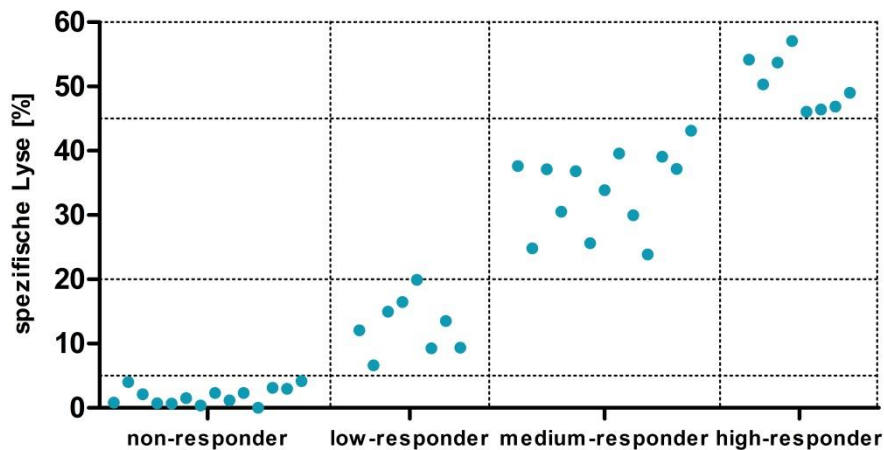


Abbildung 2: Spenderverteilung anhand der spezifischen Lyse von K-562. Einteilung anhand der erreichten, spezifischen Lyse von K-562 bei einer E:T-Ratio von 5:1 im nicht-aktivierten Zustand in *non-responder*, *low-responder*, *medium-responder* und *high-responder*.

eine Lyse von mindestens 5% zeigten, wurden als *responder* (Ansprecher) klassifiziert und anhand der Höhe der erzielten Lyse gegenüber K-562 in drei Gruppen eingeteilt. Diese Einteilung erfolgte modifiziert nach Lotzová, Savary et al. (105). Spender, die eine spezifische Lyse von 5 – 19% aufwiesen, wurden zur Gruppe der *low-responder* (schwache Ansprecher) zusammengefasst (n = 8). Solche, die eine Lyse von 20 – 45% erreichten, wurden als *medium-responder* (mittlere Ansprecher) bezeichnet (n = 13) und Spender mit einer spezifischen Lyse von > 45% gegenüber K-562 wurden schließlich als *high-responder* (hohe Ansprecher) klassifiziert (n = 8). Die im Mittel erreichte Lyse von K-562 durch die *medium-responder* (34%) lag signifikant über der durch *low-responder* erzielten Lyse (13%) und die Lyse durch *high-responder* (50%) war signifikant höher als die der *low-* und *medium-responder* (jeweils $p < 0,001$). Sowohl nach Voraktivierung mit IL-2 als auch IL-15 über Nacht kam es in der responder-Gruppe bei einer E:T-Ratio von 1:1 und 5:1 zu einer im Vergleich mit nicht-stimulierten NK-Zellen signifikant höheren Lyse von K-562 (E:T-Ratio 1:1: IL-2: 16%, IL-15: 18% vs. kein IL: 9%; E:T-Ratio 5:1: IL-2: 44%, IL-15: 51% vs. kein IL: 33%) (vgl. Abb. 3, Tab. 11, 12). Die im Mittel durch Aktivierung mittels IL-15 erzielte Lyse lag bei beiden E:T-Ratios über dem mit IL-2 erreichten Wert, jedoch wurde Signifikanz nur bei einer E:T-Ratio von 5:1 erreicht (E:T-Ratio 1:1: IL-15: 18% vs. IL-2: 16%; E:T-Ratio 5:1: IL-15: 51% vs. IL-2: 44%) (vgl. Abb. 3, Tab. 11, 12).

3. ERGEBNISSE

Tabelle 11: Spezifische Lyse von K-562 durch voraktivierte NK-Zellen. Mittelwert (\bar{x}) und Standardfehler (SEM) der erreichten spezifischen Lyse von K-562 durch die verschiedenen Lysegruppe nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation über Nacht für Effektor-Zielzellverhältnisse (E:T) von 1:1 und 5:1.

Spezifische Lyse von K-562 durch voraktivierte NK-Zellen						
Lysegruppe	Zytokinstatus					
	kein IL		+ IL-2 100 U/ml		+ IL-15 10 ng/ml	
	E:T 1:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 5:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 1:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 5:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 1:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 5:1 \bar{x} (\pm SEM)
<i>responder</i>	9% (\pm 1%)	33% (\pm 3%)	16% (\pm 3%)	44% (\pm 3%)	18% (\pm 3%)	51% (\pm 3%)
<i>low-responder</i>	3% (\pm 1%)	13% (\pm 2%)	5% (\pm 1%)	26% (\pm 2%)	8% (\pm 2%)	33% (\pm 4%)
<i>medium-responder</i>	10% (\pm 2%)	34% (\pm 2%)	18% (\pm 3%)	48% (\pm 3%)	23% (\pm 4%)	56% (\pm 2%)
<i>high-responder</i>	17% (\pm 2%)	50% (\pm 1%)	34% (\pm 2%)	56% (\pm 3%)	27% (\pm 2%)	61% (\pm 2%)
<i>non-responder</i>	1% (\pm 1%)	2% (\pm 0,5%)	1% (\pm 0,5%)	5% (\pm 1%)	2% (\pm 1%)	10% (\pm 3%)

Die Veränderungen der Lysehöhe zeigten sich auch innerhalb der drei *responder*-Gruppen. Nach Kurzzeitaktivierung mit IL-2 war die spezifische Lyse von K-562 bei einer E:T-Ratio von 5:1 in der *low*- und *medium-responder*-Gruppe signifikant höher und innerhalb der *high-responder*-Gruppe nicht signifikant höher als die durch nicht-stimulierte NK-Zellen erzielte Lyse (*low*: IL-2: 26% vs. kein IL: 13%; *medium*: IL-2: 48% vs. kein IL: 34%; *high*: IL-2: 56% vs. kein IL: 50%) (vgl. Abb. 3, Tab. 11, 12). Auch nach IL-15-Stimulation lag die spezifische Lyse bei einer E:T-Ratio von 5:1 bei den drei *responder*-Gruppen signifikant über den Werten der nicht-voraktivierten NK-Zellen (*low*: IL-15: 33% vs. kein IL: 13%; *medium*: IL-15: 56% vs. kein IL: 34%; *high*: IL-15: 61% vs. kein IL: 50%) (vgl. Abb. 3, Tab. 11, 12). Nach IL-15-Stimulation wurden bei allen drei *responder*-Gruppen höhere Lysewerte erzielt als nach Voraktivierung mit IL-2 (*low*: IL-15: 33% vs. IL-2: 26%; *medium*: IL-15: 56% vs. IL-2: 48%; *high*: IL-15: 61% vs. IL-2: 56%). Der Unterschied zwischen IL-2- und IL-15-Stimulierung war jedoch nur für die *medium-responder* signifikant ($p < 0,05$).

Die Lysezunahme nach IL-Stimulierung war in der *low*- und *medium-responder*-Gruppe bei einer E:T-Ratio von 5:1 ausgeprägter als in der *high-responder*-Gruppe (*low*: IL-2: +13%, IL-15: +20%; *medium*: IL-2: +14%, IL-15: +22% vs. *high*: IL-2: +6%, IL-15: +11%) (vgl. Tab. 12). Die Lysewerte der *medium-responder* näherten

3. ERGEBNISSE

sich somit nach Voraktivierung den Werten der high-responder an, so dass sich der Lyseunterschied nach IL-Voraktivierung verringerte.

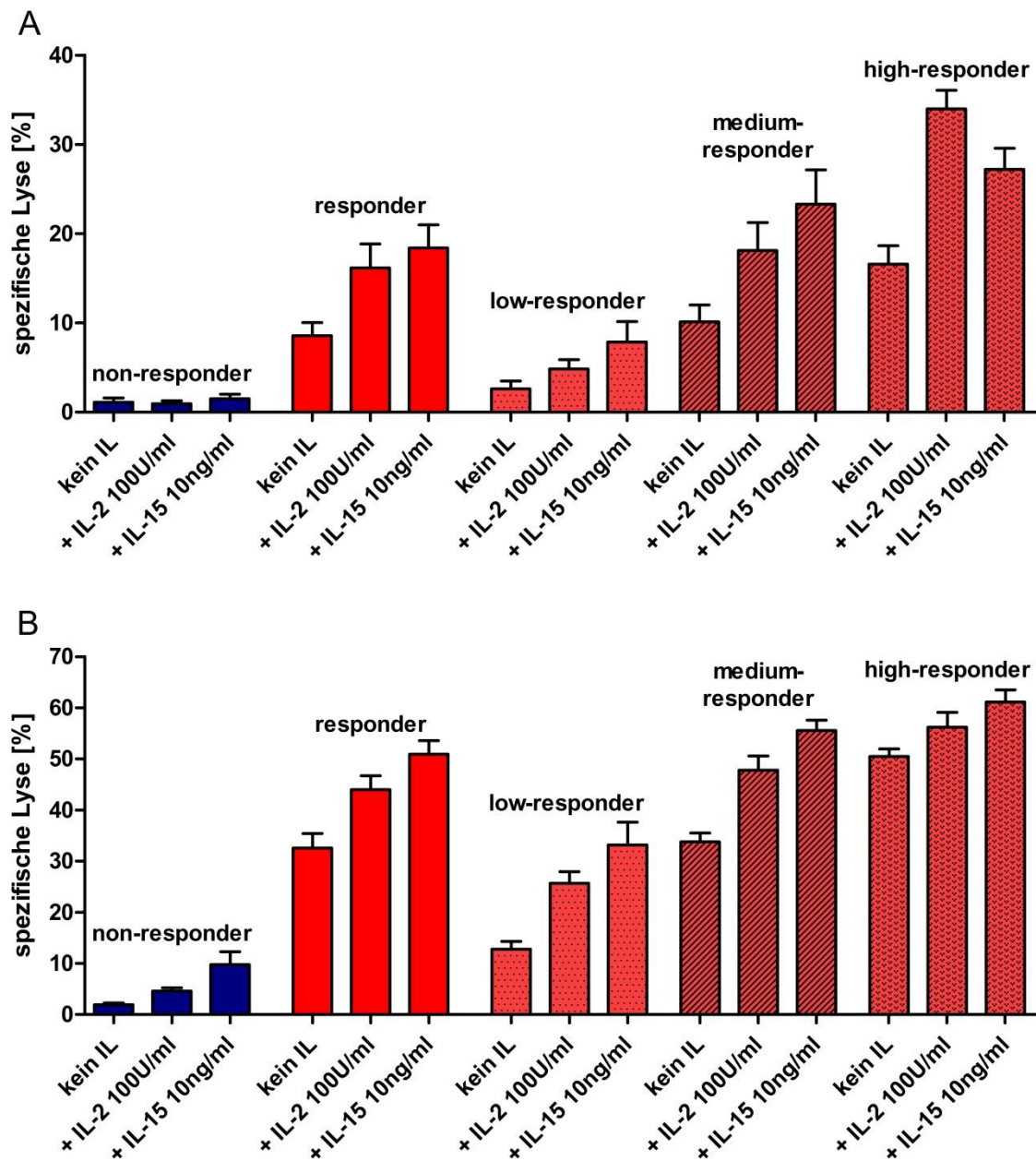


Abbildung 3: Spezifische Lyse von K-562 durch voraktivierte NK-Zellen. Im Mittel erreichte spezifische Lyse von K-562 und Standardfehler durch die verschiedenen Lysegruppe nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation über Nacht (A) für ein Effektor-Zielzellverhältnis (E:T-Ratio) von 1:1 und (B) für ein E:T-Ratio von 5:1.

3. ERGEBNISSE

Tabelle 12: Unterschiede der spezifischen Lyse von K-562 nach IL-Stimulation. Mittelwertunterschiede ($\Delta \bar{x}$) der erreichten spezifischen Lyse in Prozent sowie deren Signifikanzen (p) der responder- und der drei responder-Untergruppen bei unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation über Nacht für Effektor-Zielzellverhältnisse (E:T) von **(A)** 1:1 und **(B)** 5:1 (ns = nicht signifikant).

A spezifische Lyse [%] von K-562 bei einer E:T-Ratio von 1:1								
Zytokinstatus	Lysegruppe							
	responder		low-responder		medium-responder		high-responder	
	$\Delta \bar{x}$	p	$\Delta \bar{x}$	p	$\Delta \bar{x}$	p	$\Delta \bar{x}$	p
kein IL vs. IL-2	+7	<0,001	+2	ns	+8	<0,01	+17	<0,01
kein IL vs. IL-15	+9	<0,001	+5	<0,01	+13	<0,001	+10	ns
IL-2 vs. IL-15	+2	ns	+3	ns	+5	ns	-7	ns

B spezifische Lyse [%] von K-562 bei einer E:T-Ratio von 5:1								
Zytokinstatus	Lysegruppe							
	responder		low-responder		medium-responder		high-responder	
	$\Delta \bar{x}$	p	$\Delta \bar{x}$	p	$\Delta \bar{x}$	p	$\Delta \bar{x}$	p
kein IL vs. IL-2	+11	<0,001	+13	<0,05	+14	<0,001	+6	ns
kein IL vs. IL-15	+18	<0,001	+20	<0,001	+22	<0,001	+11	<0,05
IL-2 vs. IL-15	+7	<0,01	+7	ns	+8	<0,05	+5	ns

3.2 Charakterisierung der Myelomzellen

Alle drei Myelomzelllinien wiesen eine signifikante HLA-Expression der HLA-Gruppen A, B und C auf (vgl. Abb. 4). Die höchste HLA-Expression zeigte L363 (FI 390), gefolgt von INA-6 (FI 275). Am geringsten exprimierte RPMI 8226 HLA auf der Oberfläche (FI 130). Sowohl L363 (DNAM-1-L: 3,37, NKG2D-L: 4,9) als auch RPMI 8226 (DNAM-1-L: 2,77, NKG2D-L: 5,38) wiesen eine deutliche DNAM-1- und NKG2D-Ligandenexpression auf (vgl. Abb. 4, Tab. 13). Auf der Oberfläche von INA-6 konnten die beiden Liganden nur in geringer Dichte nachgewiesen werden (DNAM-1-L: 2,07, NKG2D-L: 3,07) (vgl. Abb. 4, Tab. 13).

Tabelle 13: Expression der DNAM-1- und NKG2D-Liganden auf den Myelomzelllinien L363, RPMI 8226 und INA-6. Mittelwert (\bar{x}) und Standardfehler (SEM) der DNAM-1-Ligandenexpression (CD112 und CD155) und NKG2D-Liganden-Expression (MIC A/B, ULBP-1 und ULBP-2/-5/-6) auf den Myelomzelllinien L363, RPMI 8226 und INA-6 (n = Anzahl).

Expression der DNAM-1- und NKG2D-Liganden auf den Myelomzelllinien (n = 3)				
Zelllinie	DNAM-1-Liganden		NKG2D-Liganden	
	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM
L363	3,37	± 0,43	4,9	± 0,12
RPMI 8226	2,77	± 0,67	5,38	± 0,19
INA-6	2,07	± 0,09	3,07	± 0,07

3. ERGEBNISSE

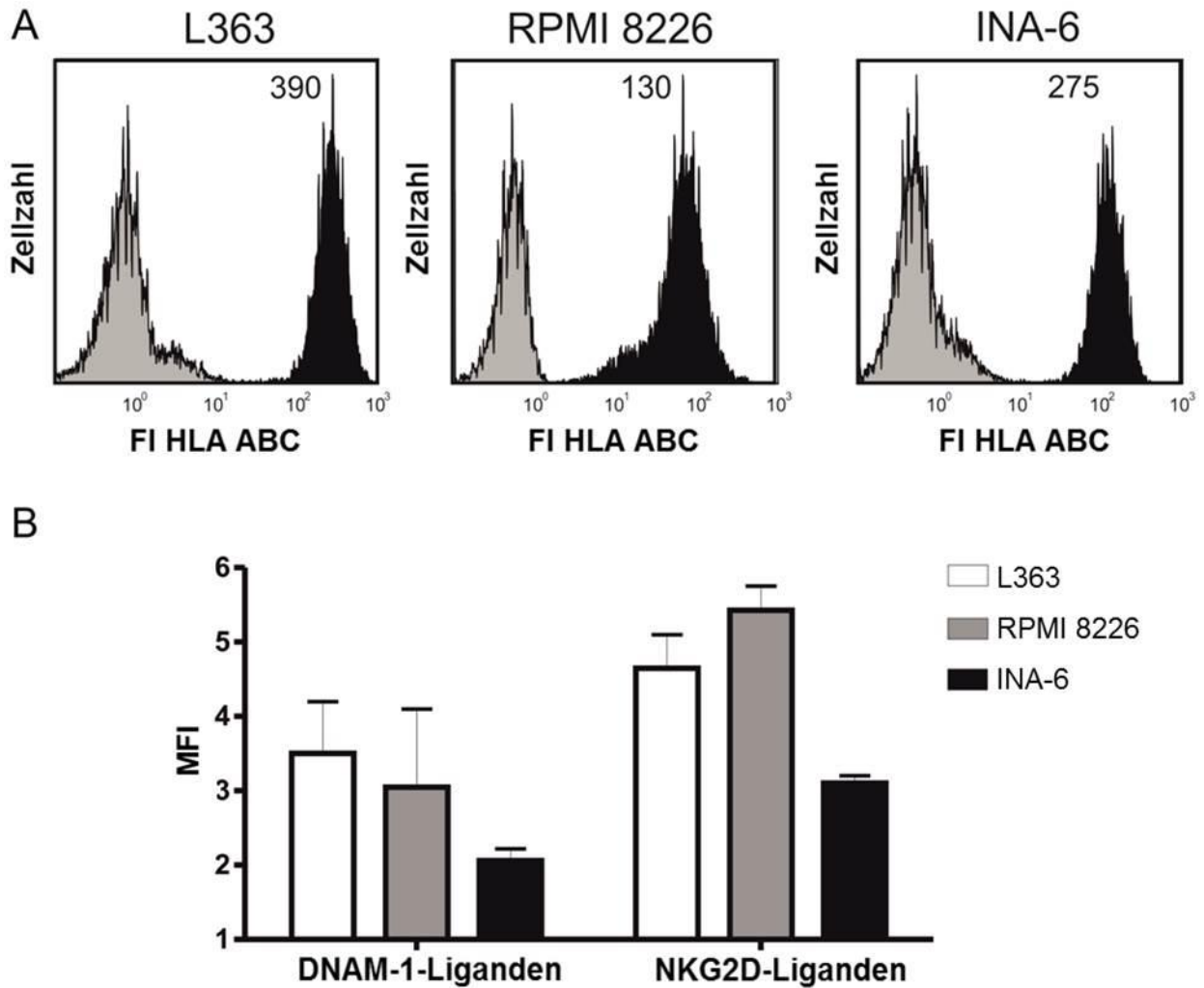


Abbildung 4: HLA-Expression und Expression der NKG2D- und DNAM-1-Liganden auf den Myelomzelllinien. (A) Fluoreszenzintensität (FI) der HLA-Expression für HLA-Gruppen A, B und C (schwarz) und der Isotypenkontrolle (grau) der Myelomzelllinien L363, RPMI 8226 und INA-6. **(B)** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) und Standardfehler der DNAM-1- und NKG2D-Ligandenexpression auf den Myelomzelllinien L363, RPMI 8226 und INA-6.

3.3 Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber der Zelllinie INA-6

Die humane Plasmazelleleukämieinie INA-6 exprimiert auf ihrer Oberfläche das HLA-Antigen Bw4, welches spezifisch durch KIR3DL1 und KIR3DS1 erkannt wird. Bei der Auswertung der ^{51}Cr -Freisetzungstest wurden nur Spender berücksichtigt, die anhand der erzielten spezifischen Lyse der als Kontrollzelllinie eingesetzten Zelllinie K-562 als *responder* klassifiziert wurden.

3. ERGEBNISSE

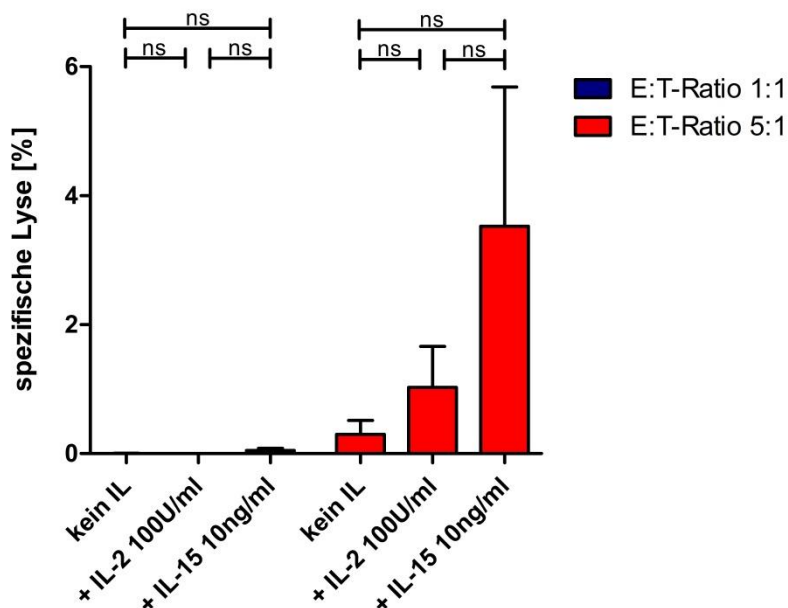


Abbildung 5: Spezifische Lyse von INA-6 durch voraktivierte NK-Zellen. Im Mittel erreichte spezifische Lyse von INA-6 und Standardfehler nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation über Nacht für ein Effektor-Zielzellverhältnis (E:T-Ratio) von 1:1 und 5:1 (n = 7) (ns = nicht signifikant).

Insgesamt fand eine nur sehr geringe Lyse von INA-6 durch NK-Zellen statt (vgl. Abb. 5). Bei einer E:T-Ratio von 1:1 kam es weder durch nicht-voraktivierte NK-Zellen noch nach Stimulation mit IL-2 oder IL-15 zu einer Lyse von INA-6 (vgl. Tab. 14). Bei einer E:T-Ratio von 5:1 zeigte sich im nicht-stimulierten Zustand eine sehr geringe Lyse der Zielzellen (0,3%). Nach IL-2- und IL-15-Voraktivierung zeigte sich eine etwas höhere Lyse (IL-2: 1%, IL-15: 3,5%), wobei der Anstieg durch IL-15-Stimulation größer war (IL-15: +3,2% vs. IL-2: +0,7%) (vgl. Tab. 15). Eine nicht signifikant höhere Lyse von INA-6 bei einer E:T-Ratio von 5:1 als bei einer von 1:1 fand nach IL-15-Voraktivierung statt (E:T-Ratio 5:1: 3,5% vs. E:T-Ratio 1:1: 0,1%).

Tabelle 14: Spezifische Lyse von INA-6 durch voraktivierte NK-Zellen. Mittelwert (\bar{x}) und Standardfehler (SEM) der erreichten spezifischen Lyse von INA-6 nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation über Nacht für Effektor-Zielzellverhältnisse (E:T) von 1:1 und 5:1 (n = 7).

Spezifische Lyse von INA-6 durch voraktivierte NK-Zellen					
Zytokinstatus					
kein IL		+ IL-2 100 U/ml		+ IL-15 10 ng/ml	
E:T 1:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 5:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 1:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 5:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 1:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 5:1 \bar{x} (\pm SEM)
0% (\pm 0%)	0,3% (\pm 0,2%)	0% (\pm 0%)	1% (\pm 0,6%)	0,1% (\pm 0%)	3,5% (\pm 2,2%)

3. ERGEBNISSE

Tabelle 15: Unterschiede der spezifischen Lyse von INA-6 nach IL-Stimulation. Mittelwertunterschiede ($\Delta \bar{x}$) der erreichten spezifischen Lyse in Prozent sowie deren Signifikanzen (p) bei unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation über Nacht für Effektor-Zielzellverhältnisse (E:T-Ratio) von 1:1 und 5:1 (ns = nicht signifikant).

Spezifische Lyse von INA-6				
Zytokinstatus	E:T-Ratio 1:1		E:T-Ratio 5:1	
	$\Delta \bar{x}$	p	$\Delta \bar{x}$	p
kein IL vs. IL-2	$\pm 0\%$	ns	+ 0,7%	ns
kein IL vs. IL-15	+ 0,1%	ns	+ 3,2%	ns
IL-2 vs. IL-15	+ 0,1%	ns	+ 2,5%	ns

3.4 Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber der Zelllinie RPMI 8226

Die humane Myelomzelllinie RPMI 8226 exprimiert auf ihrer Oberfläche das HLA-Antigen Cw2, welches spezifisch durch KIR2DL1 und KIR2DS1 erkannt wird. Bei der Auswertung der ^{51}Cr -Freisetzungstest wurden nur Spender berücksichtigt, welche anhand der erzielten spezifischen Lyse der als Kontrollzelllinie eingesetzten Zelllinie K-562 als *responder* klassifiziert wurden.

Nach Voraktivierung mit IL-2 oder IL-15 lysierten die NK-Zellen RPMI 8226 durchschnittlich stärker als im nicht-voraktivierten Zustand (E:T-Ratio 1:1: IL-2: 2,4%, IL-15: 3,4% vs. kein IL: 0,5%; E:T-Ratio 5:1: IL-2: 10,7%, IL-15: 14,5% vs. kein IL: 3,1%) (vgl. Abb. 6, Tab. 16, 17). Die Steigerung durch IL-15-Stimulierung war höher als nach IL-2-Voraktivierung (E:T-Ratio 1:1: IL-15: +2,9% vs. IL-2: +1,9%; E:T-Ratio 5:1: IL-15: +11,4% vs. IL-2: +7,6%) (vgl. Tab.17). Unabhängig vom Aktivierungsstatus der NK-Zellen waren die erreichten Lysewerte bei einer E:T-Ratio von 5:1 verglichen mit einer E:T-Ratio von 1:1 signifikant höher (kein IL: 5:1: 3,1% vs. 1:1: 0,5%; IL-2: 5:1: 10,7% vs. 1:1: 2,4%; IL-15: 5:1: 14,5% vs. 1:1: 3,4%, jeweils $p < 0,0001$) (vgl. Tab. 16).

3. ERGEBNISSE

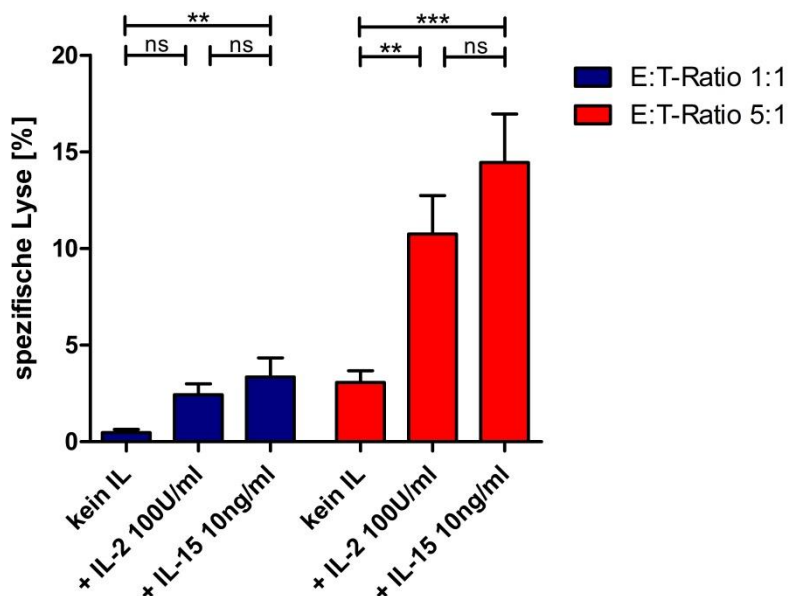


Abbildung 6: Spezifische Lyse von RPMI 8226 durch voraktivierte NK-Zellen. Im Mittel erreichte spezifische Lyse von RPMI 8226 und Standardfehler nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation über Nacht für ein Effektor-Zielzellverhältnis (E:T-Ratio) von 1:1 und 5:1 (** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant).

Tabelle 16: Spezifische Lyse von RPMI 8226 durch voraktivierte NK-Zellen. Mittelwert (\bar{x}) und Standardfehler (SEM) der erreichten spezifischen Lyse von RPMI 8226 nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation über Nacht für Effektor-Zielzellverhältnisse (E:T) von 1:1 ($n = 17$) und 5:1 ($n = 20$).

Spezifische Lyse von RPMI 8226 durch voraktivierte NK-Zellen					
Zytokinstatus					
kein IL		+ IL-2 100 U/ml		+ IL-15 10 ng/ml	
E:T 1:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 5:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 1:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 5:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 1:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 5:1 \bar{x} (\pm SEM)
0,5% (\pm 0,2%)	3,1% (\pm 0,6%)	2,4% (\pm 0,6%)	10,7% (\pm 2%)	3,4% (\pm 1%)	14,5% (\pm 2,5%)

Tabelle 17: Unterschiede der spezifischen Lyse von RPMI 8226 nach IL-Stimulation. Mittelwertunterschiede ($\Delta \bar{x}$) der erreichten spezifischen Lyse in Prozent sowie deren Signifikanzen (p) bei unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation über Nacht für Effektor-Zielzellverhältnisse (E:T-Ratio) von 1:1 und 5:1 (ns = nicht signifikant).

Spezifische Lyse von RPMI 8226				
Zytokinstatus	E:T-Ratio 1:1		E:T-Ratio 5:1	
	$\Delta \bar{x}$	p	$\Delta \bar{x}$	p
kein IL vs. IL-2	+ 1,9%	ns	+ 7,6%	< 0,01
kein IL vs. IL-15	+ 2,9%	< 0,01	+ 11,4%	< 0,001
IL-2 vs. IL-15	+ 1%	ns	+ 3,8%	ns

3. ERGEBNISSE

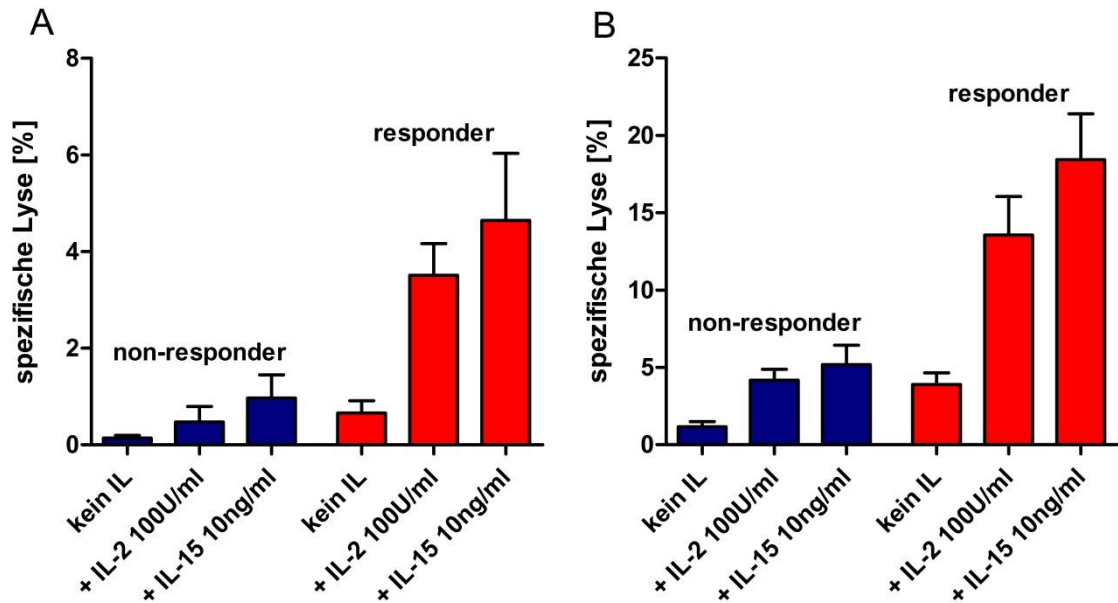


Abbildung 7: Spezifische Lyse von RPMI 8226 durch voraktivierte NK-Zellen. Im Mittel erreichte spezifische Lyse von RPMI 8226 und Standardfehler durch *non-responder* und *responder* nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation über Nacht **(A)** für ein Effektor-Zielzellverhältnis (E:T-Ratio) von 1:1 und **(B)** für ein E:T-Ratio von 5:1

14 von 20 Spendern wiesen bei einer E:T-Ratio von 5:1 nach Kurzzeitaktivierung mit IL-2 oder IL-15 eine spezifische Lyse von mindestens 10% auf und wurden zur *responder*-Gruppe zusammengefasst (vgl. Abb. 7, Tab. 18). Die übrigen sechs Spender wurden als *non-responder* bezeichnet. Die erreichte Lyse der *responder* lag bei einer E:T-Ratio von 1:1 im nicht-voraktivierten Zustand und nach IL-2-Stimulation nicht signifikant über der Lyse der *non-responder* (kein IL: *resp.*: 0,7% vs. *non-resp.*: 0,1%; IL-2: *resp.*: 3,5% vs. *non-resp.*: 0,5%) (vgl. Tab. 18). Nach Kurzzeitaktivierung mit IL-15 war die erreichte spezifische Lyse der *responder* signifikant höher (*resp.*: 4,7% vs. *non-resp.*: 1%, $p < 0,05$). Bei einer E:T-Ratio von 5:1 lagen im nicht-voraktivierten Zustand die erreichten Lysewerte der *responder* über denen der *non-responder* (*resp.*: 3,9% vs. *non-resp.*: 1,2%), was aber nicht signifikant war. Nach Voraktivierung mit IL-2 bzw. IL-15 lag die erzielte Lyse der *responder* signifikant über der erreichten spezifischen Lyse der *non-responder* (IL-2: *resp.*: 13,6% vs. *non-resp.*: 4,2%; IL-15: *resp.*: 18,4% vs. *non-resp.*: 5,2%; IL-2: $p < 0,05$, IL-15: $p < 0,01$). Sowohl bei einer E:T-Ratio von 1:1 als auch 5:1 lag die Lysehöhe der *responder* nach IL-2- oder IL-15 Voraktivierung über den Werten nicht-voraktivierter NK-Zellen (E:T-Ratio 1:1: IL-2: 3,5%, IL-15: 4,7% vs. kein IL: 0,7%; E:T-Ratio 5:1: IL-2: 13,6%, IL-15: 18,4% vs. kein IL: 3,9%) (vgl. Tab. 18). Diese Lyseunterschiede waren bei einem

3. ERGEBNISSE

Verhältnis von 1:1 nur nach IL-15-Stimulierung und bei einer E:T-Ratio von 5:1 nach IL-2- und IL-15-Voraktivierung signifikant (E:T-Ratio 1:1: IL-15: $p < 0,01$; E:T-Ratio 5:1: IL-2: $p < 0,01$, IL-15: $p < 0,001$) (vgl. Tab. 19). Die durch IL-15 erreichten Werte lagen über den mittels IL-2 erreichten (E:T-Ratio 1:1: IL-15: 4,7% vs. IL-2: 3,5%; E:T-Ratio 5:1: IL-15: 18,4% vs. IL-2: 13,6%) (vgl. Tab. 18). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant (vgl. Tab. 19).

Tabelle 18: Spezifische Lyse von RPMI 8226 durch voraktivierte NK-Zellen. Mittelwert (\bar{x}) und Standardfehler (SEM) der erreichten spezifischen Lyse von RPMI 8226 durch *non-responder* und *responder* nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation über Nacht für Effektor-Zielzellverhältnisse (E:T) von 1:1 und 5:1.

Spezifische Lyse von RPMI 8226 durch voraktivierte NK-Zellen						
Lysegruppe	Zytokinstatus					
	kein IL		+ IL-2 100 U/ml		+ IL-15 10 ng/ml	
	E:T 1:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 5:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 1:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 5:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 1:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 5:1 \bar{x} (\pm SEM)
<i>non-responder</i>	0,1% (\pm 0,1%)	1,2% (\pm 0,3%)	0,5% (\pm 0,3%)	4,2% (\pm 0,7%)	1% (\pm 0,5%)	5,2% (\pm 1,3%)
<i>responder</i>	0,7% (\pm 0,3%)	3,9% (\pm 0,8%)	3,5% (\pm 0,7%)	13,6% (\pm 2,5%)	4,7% (\pm 1,4%)	18,4% (\pm 3%)

Tabelle 19: Unterschiede der spezifischen Lyse von RPMI 8226 nach IL-Stimulation. Mittelwertunterschiede ($\Delta \bar{x}$) der erreichten spezifischen Lyse in Prozent sowie deren Signifikanzen (p) der *non-responder*- und der *responder*-Gruppe bei unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation über Nacht für Effektor-Zielzellverhältnisse (E:T-Ratio) von 1:1 und 5:1 (ns = nicht signifikant)

Spezifische Lyse [%] von RPMI 8226								
Zytokinstatus	Lysegruppe							
	E:T-Ratio 1:1				E:T-Ratio 5:1			
	<i>non-responder</i>		<i>responder</i>		<i>non-responder</i>		<i>responder</i>	
	$\Delta \bar{x}$	p	$\Delta \bar{x}$	p	$\Delta \bar{x}$	p	$\Delta \bar{x}$	p
kein IL vs. IL-2	+0,4	ns	+2,8	ns	+3	ns	+9,7	<0,01
kein IL vs. IL-15	+0,9	ns	+4	<0,01	+4	<0,05	+14,5	<0,001
IL-2 vs. IL-15	+0,5	ns	+1,2	ns	+1	ns	+4,8	ns

3.5 Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber der Zelllinie L363

Die humane Plasmazellleukämie-Linie L363 exprimiert auf ihrer Oberfläche die HLA-Antigene Cw3 und Cw7, welche spezifisch durch KIR2DL2, KIR2DL3 und KIR2DS2 erkannt werden. Bei der Auswertung der ^{51}Cr -Freisetzungstest wurden nur Spender berücksichtigt, welche anhand der erzielten spezifischen Lyse der als Kontrollzelllinie eingesetzten Zelllinie K-562 als *responder* eingeteilt wurden.

3. ERGEBNISSE

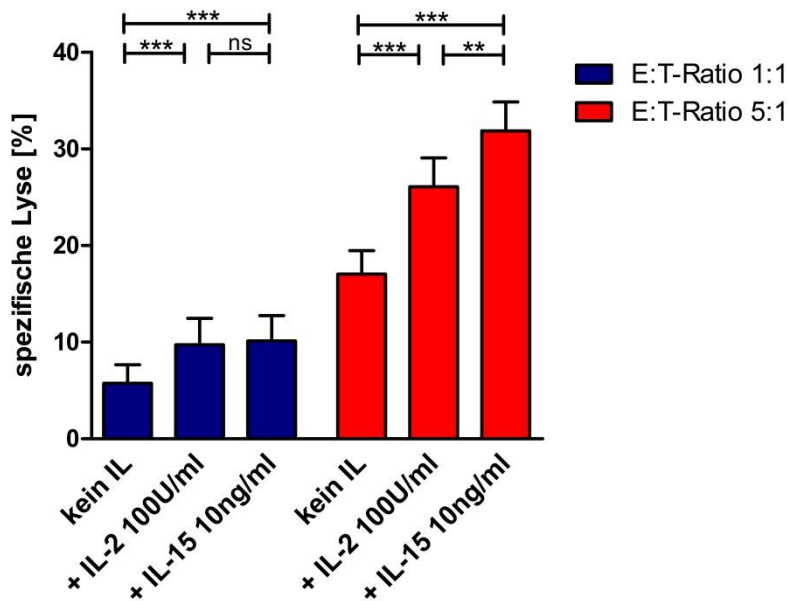


Abbildung 8: Spezifische Lyse von L363 durch voraktivierte NK-Zellen. Im Mittel erreichte spezifische Lyse von L363 und Standardfehler nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation über Nacht für ein Effektor-Zielzellverhältnis (E:T-Ratio) von 1:1 und 5:1 (** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant)

Nach Voraktivierung mit IL-2 oder IL-15 lysierten die NK-Zellen L363 durchschnittlich stärker als im nicht-voraktivierten Zustand (E:T-Ratio 1:1: IL-2: 10%, IL-15: 10% vs. kein IL: 6%; E:T-Ratio 5:1: IL-2: 26%, IL-15: 32% vs. kein IL: 17%) (vgl. Abb. 8, Tab. 20). Die Steigerung durch IL-15-Stimulierung war bei einer E:T-Ratio von 5:1 höher als nach IL-2-Voraktivierung (IL-15: +15% vs. IL-2: +9%) (vgl. Tab. 21). Bei einer E:T-Ratio von 1:1 zeigte sich kein Unterschied der erzielten Lysehöhe zwischen Voraktivierung mit IL-2 und IL-15 (IL-2, IL-15: +4%) (vgl. Tab. 20). Unabhängig vom Aktivierungsstatus der NK-Zellen waren die erreichten Lysewerte bei einer E:T-Ratio von 5:1 verglichen mit einer E:T-Ratio von 1:1 signifikant höher (kein IL: 5:1: 17% vs. 1:1: 6%; IL-2: 5:1: 26% vs. 1:1: 10%; IL-15: 5:1: 32% vs. 1:1: 10%; jeweils $p < 0,0001$).

3. ERGEBNISSE

Tabelle 20: Spezifische Lyse von L363 durch voraktivierte NK-Zellen. Mittelwert (\bar{x}) und Standardfehler (SEM) der erreichten spezifischen Lyse von L363 nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation über Nacht für Effektor-Zielzellverhältnisse (E:T) von 1:1 (n = 21) und 5:1 (n = 28)

Spezifische Lyse von L363 durch voraktivierte NK-Zellen					
Zytokinstatus					
kein IL		+ IL-2 100 U/ml		+ IL-15 10 ng/ml	
E:T 1:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 5:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 1:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 5:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 1:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 5:1 \bar{x} (\pm SEM)
6% (\pm 2%)	17% (\pm 2%)	10% (\pm 3%)	26% (\pm 3%)	10% (\pm 3%)	32% (\pm 3%)

Tabelle 21: Unterschiede der spezifischen Lyse von L363 nach IL-Stimulation. Mittelwertunterschiede ($\Delta \bar{x}$) der erreichten spezifischen Lyse in Prozent sowie deren Signifikanzen (p) bei unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation über Nacht für Effektor-Zielzellverhältnisse (E:T-Ratio) von 1:1 und 5:1 (ns = nicht signifikant)

Spezifische Lyse [%] von L363				
Zytokinstatus	E:T-Ratio 1:1		E:T-Ratio 5:1	
	$\Delta \bar{x}$	p	$\Delta \bar{x}$	p
kein IL vs. IL-2	+ 4%	< 0,001	+ 9%	< 0,001
kein IL vs. IL-15	+ 4%	< 0,001	+ 15%	< 0,001
IL-2 vs. IL-15	\pm 0%	ns	+ 6%	< 0,01

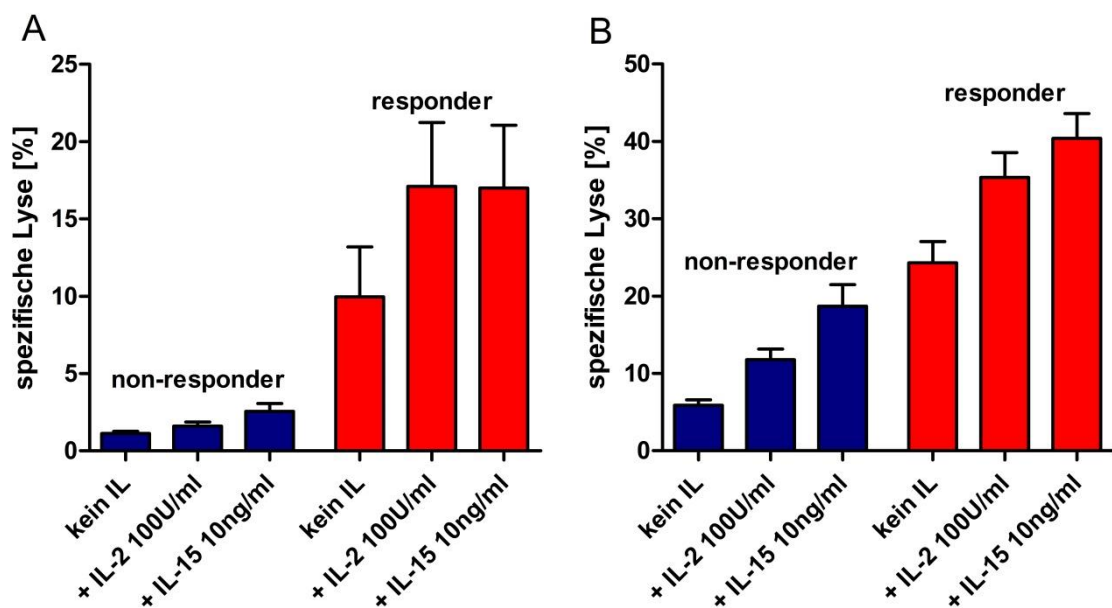


Abbildung 9: Spezifische Lyse von L363 durch voraktivierte NK-Zellen. Im Mittel erreichte spezifische Lyse von L363 und Standardfehler durch *non-responder* und *responder* nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation über Nacht (A) für ein Effektor-Zielzellverhältnis (E:T-Ratio) von 1:1 und (B) für ein E:T-Ratio von 5:1

3. ERGEBNISSE

17 Spender zeigten bei einer E:T-Ratio von 5:1 im nicht-voraktivierten Zustand mindestens eine spezifische Lyse von 10% und wurden als *responder* bezeichnet. Die übrigen 11 Spender wiesen eine spezifische Lyse von L363 von < 10% auf und bildeten die Gruppe der *non-responder* (vgl. Abb. 8, Tab. 22). Bei einer E:T-Ratio von 1:1 lag die erreichte, spezifische Lyse der *responder* im nicht-voraktivierten Zustand nicht-signifikant über der erzielten Lyse der *non-responder* (*resp.*: 10% vs. *non-resp.*: 1%) (vgl. Abb. 9, Tab. 22). Nach Stimulation mit IL-2 oder IL-15 war die Lyse durch die *responder* ebenfalls höher, wobei das geforderte Signifikanzniveau erreicht wurde (*resp.*: IL-2, IL-15: 17% vs. *non-resp.*: IL-2: 2%, IL-15: 3%; IL-2: $p < 0,001$, IL-15: $p < 0,01$). Auch bei einer E:T-Ratio von 5:1 war die durch die *responder* erzielte Lyse von L363 im nicht-voraktivierten Zustand sowie nach Kurzzeitaktivierung mit IL-2 bzw. IL-15 signifikant höher als die durch die *non-responder* erreichten Werte (*resp.*: kein IL: 24%, IL-2: 35%, IL-15: 40% vs. *non-resp.*: kein IL: 6%, IL-2: 12%, IL-15: 19%; jeweils $p < 0,001$). Innerhalb der *responder*-Gruppe zeigte sich bei einer E:T-Ratio von 1:1 durch Stimulation mit IL-2 oder IL-15 signifikant höhere Lysewerte von L363. Die im Mittel erreichten Werte lagen auf gleicher Höhe (IL-2, IL-15: 17% vs. kein IL: 10%) (vgl. Tab. 22, 23). Bei einer E:T-Ratio von 5:1 wurde ebenfalls sowohl nach IL-2- als auch IL-15-Voraktivierung eine signifikant höhere Lyse erzielt als durch nicht-voraktivierte NK-Zellen. Dabei lag die durch IL-15-Stimulierung erreichte Lyse nicht signifikant über den durch IL-2 erzielten Werten (IL-15: 40% vs. IL-2: 35% vs. kein IL: 24%).

Tabelle 22: Spezifische Lyse von L363 durch voraktivierte NK-Zellen. Mittelwert (\bar{x}) und Standardfehler (SEM) der erreichten spezifischen Lyse von L363 durch *non-responder* und *responder* nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation über Nacht für Effektor-Zielzellverhältnisse (E:T) von 1:1 und 5:1.

Spezifische Lyse von L363 durch voraktivierte NK-Zellen						
Lysegruppe	Zytokinstatus					
	kein IL		+ IL-2 100 U/ml		+ IL-15 10 ng/ml	
	E:T 1:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 5:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 1:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 5:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 1:1 \bar{x} (\pm SEM)	E:T 5:1 \bar{x} (\pm SEM)
<i>non-responder</i>	1% (\pm 0%)	6% (\pm 1%)	2% (\pm 0%)	12% (\pm 1%)	3% (\pm 1%)	19% (\pm 3%)
<i>responder</i>	10% (\pm 3%)	24% (\pm 3%)	17% (\pm 4%)	35% (\pm 3%)	17% (\pm 4%)	40% (\pm 3%)

3. ERGEBNISSE

Tabelle 23: Unterschiede der spezifischen Lyse von L363 nach IL-Stimulation. Mittelwertunterschiede ($\Delta \bar{x}$) der erreichten spezifischen Lyse in Prozent sowie deren Signifikanzen (p) der *non-responder*- und der *responder*-Gruppe bei unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation über Nacht für Effektor-Zielzellverhältnisse (E:T-Ratio) von 1:1 und 5:1 (ns = nicht signifikant)

Spezifische Lyse [%] von L363								
Zytokinstatus	Lysegruppe							
	E:T-Ratio 1:1				E:T-Ratio 5:1			
	<i>non-responder</i>		<i>responder</i>		<i>non-responder</i>		<i>responder</i>	
	$\Delta \bar{x}$	p	$\Delta \bar{x}$	p	$\Delta \bar{x}$	p	$\Delta \bar{x}$	p
kein IL vs. IL-2	+1	ns	+7	<0,001	+6	<0,05	+11	<0,001
kein IL vs. IL-15	+2	<0,05	+7	<0,001	+13	<0,001	+16	<0,001
IL-2 vs. IL-15	+1	ns	± 0	ns	+7	<0,05	+5	ns

3.6 Einfluss aktivierender NK-Rezeptoren auf die Lyse von L363

Um den Einfluss der aktivierenden Rezeptoren NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46 und DNAM-1 auf die natürliche Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber der humanen Myelomzelllinie L363 zu testen, wurden Blockierungstests bei insgesamt fünf Spendern durchgeführt.

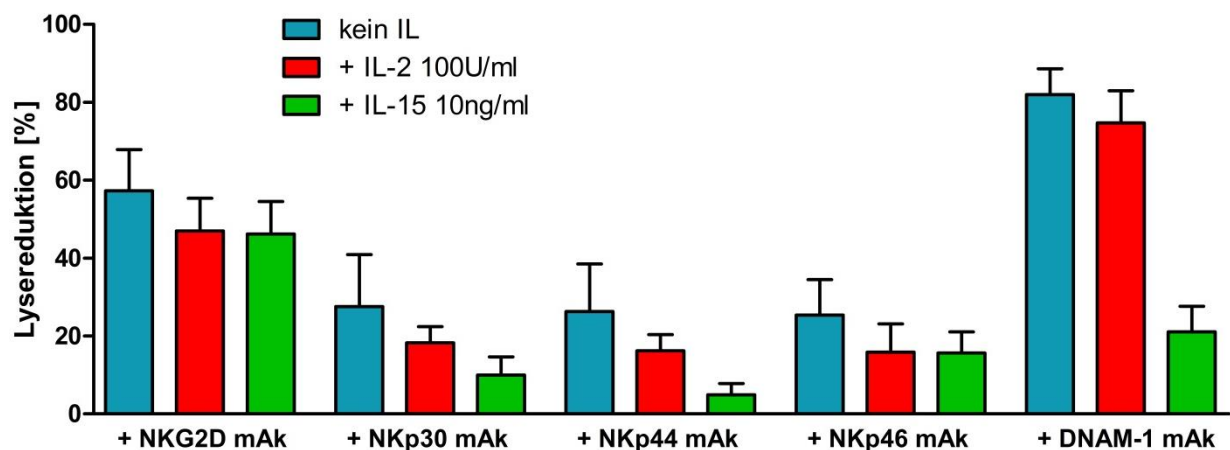


Abbildung 10: Einfluss des Blockens aktivierender NK-Rezeptoren auf die Lyse von L363. Die Lysereduktion in Prozent durch Blocken der NK-Rezeptoren NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46 und DNAM-1 mit monoklonalen Antikörpern (mAk) bei einem Effektor-Zielzellverhältnis von 5:1 für nicht-voraktivierte und mittels Interleukin (IL) über Nacht stimulierte NK-Zellen im Vergleich zur Lyse durch entsprechende ungeblickte NK-Zellen mit gleichem Zytokinstatus (entspricht 0% Lysereduktion).

Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der erzielten Lyse durch das Verwenden von monoklonalen Antikörpern gegen NKG2D (-57%, $p < 0,01$) (vgl. Abb. 10, Tab. 24). Nach Voraktivierung mit IL-2 oder IL-15 nahm die erzielte Lysereduktion ab, die er-

3. ERGEBNISSE

reichte Verminderung war jedoch weiterhin signifikant (IL-2: -47%, $p < 0,01$; IL-15: -46%, $p < 0,001$) (vgl. Abb. 10, Tab. 24). Das Blockieren der NCR NKp30, NKp44 und NKp46 ging nur mit einer geringen, nicht signifikanten Reduktion der Lyse von L363 einher, welche sich nach Stimulation mit IL-2 bzw. IL-15 über Nacht weiter verringerte (NKp30: kein IL: -28%, IL-2: -18%, IL-15: -10%; NKp44: kein IL: -26%, IL-2: -16%, IL-15: -5%; NKp46: kein IL: -25%, IL-2: -16%, IL-15: -16%) (vgl. Abb. 10, Tab. 24). Mit monoklonalen Antikörpern gegen den Rezeptor DNAM-1 wurde im nicht-voraktivierten Zustand und nach IL-2-Voraktivierung die höchste Lysereduktion erzielt (kein IL: -82%, IL-2: -75%; jeweils $p < 0,001$) (vgl. Abb. 10, Tab. 24). Diese nahm bei Voraktivierung mit IL-15 stark ab und fiel auf Werte unterhalb der durch das Blocken von NKG2D erzielten Werte (IL-15: NKG2D: -43% vs. DNAM-1: -21%) (vgl. Abb. 10, Tab. 24), war aber weiterhin signifikant.

Tabelle 24: Reduktion der Lyse von L363 durch das Blocken aktivierender NK-Rezeptoren. Mittelwert (\bar{x}) und Standardfehler (SEM) der Lysereduktion sowie deren Signifikanz in Form von p-Werten (p) durch Verwendung monoklonaler Antikörper (mAk) gegen verschiedene aktivierende NK-Rezeptoren bei einem Effektor-Ziellzellverhältnis (E:T-Ratio) von 5:1 und nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation über Nacht im Vergleich zur durch mAk unbeeinflussten Lyse von L363 bei gleichem Zytokinstatus und gleicher E:T-Ratio (n = Anzahl, ns = nicht signifikant).

Reduktion der Lyse von L363 durch Blocken aktivierender Rezeptoren ($n = 5$)				
mAk gegen:	Zytokinstatus	\bar{x}	SEM	p
NKG2D	kein IL	- 57%	$\pm 11\%$	$< 0,01$
	+ IL-2 100U/ml	- 47%	$\pm 8\%$	$< 0,01$
	+ IL-15 10ng/ml	- 46%	$\pm 8\%$	$< 0,001$
NKp30	kein IL	- 28%	$\pm 13\%$	ns
	+ IL-2 100U/ml	- 18%	$\pm 4\%$	ns
	+ IL-15 10ng/ml	- 10%	$\pm 5\%$	ns
NKp44	kein IL	- 26%	$\pm 12\%$	ns
	+ IL-2 100U/ml	- 16%	$\pm 4\%$	ns
	+ IL-15 10ng/ml	- 5%	$\pm 3\%$	ns
NKp46	kein IL	- 25%	$\pm 9\%$	ns
	+ IL-2 100U/ml	- 16%	$\pm 7\%$	ns
	+ IL-15 10ng/ml	- 16%	$\pm 5\%$	$< 0,05$
DNAM-1	kein IL	- 82%	$\pm 7\%$	$< 0,001$
	+ IL-2 100U/ml	- 75%	$\pm 8\%$	$< 0,001$
	+ IL-15 10ng/ml	- 21%	$\pm 7\%$	$< 0,05$

3. ERGEBNISSE

3.7 Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber autologen B-Zellen

Zur Überprüfung, ob eine Voraktivierung mit IL-2 oder IL-15 zu einer gesteigerten Autoreaktivität gegen körpereigene Zellen führt, wurden im ^{51}Cr -Freisetzungstest exemplarisch bei einem Spender (Spender 42, K-562-*high-responder*) autologe B-Zellen als Zielzellen bei einer E:T-Ratio von 5:1 eingesetzt.

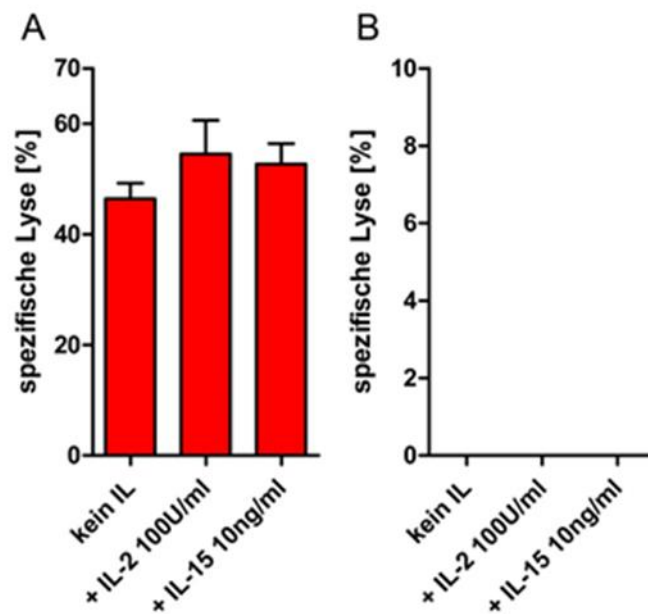


Abbildung 11: Spezifische Lyse von K-562 und autologen B-Zellen durch Spender 42. Erreichte spezifische Lyse von (A) K-562 und (B) autologen B-Zellen mit Standardfehler nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation über Nacht für ein Effektor-Zielzellverhältnis und 5:1

Während K-562 durch den Spender sowohl im nicht-voraktivierten Zustand als auch nach Voraktivierung mit IL-2 oder IL-15 in hohem Maße lysiert wurde (kein IL: 46%, IL-2: 55%, IL-15: 53%), zeigte der Spender keine Lyse autologer B-Zellen (vgl. Abb. 11). Auch nach Stimulation mit IL-2 bzw. IL-15 über Nacht kam es zu keiner Autoreaktivität (kein IL: 0%, IL-2: 0%, IL-15: 0%).

3.8 Durchflusszytometrische Analyse der NK-Zellrezeptoren

Nach IL-Stimulierung wurde eine erhöhte Aktivität gegenüber K-562 und in variierender Ausprägung auch gegenüber den verschiedenen Myelomzelllinien festgestellt. Nicht-HLA-spezifische, aktivierende und inhibitorische NK-Zellrezeptoren und HLA-spezifische KIRs sind an der Regulation der natürlichen NK-Zellaktivität beteiligt. Ei-

3. ERGEBNISSE

ne vermehrte Expression ebendieser kann somit ursächlich für die beobachtete Aktivitätszunahme sein. Im Folgenden werden daher die mittels Durchflusszytometer gemessenen Expressionsmuster der Rezeptoren sowie deren Beeinflussung durch eine Voraktivierung über Nacht mit IL-2 (100 U/ml) oder IL-15 (10 ng/ml) beschrieben.

Als Maß für die Expressionshöhe der Oberflächenmarker diene die mittlere Fluoreszenzintensität (*Mean Fluorescence Intensity*, MFI). Es werden die Mittelwerte und der SEM angegeben.

3.8.1 Der Aktivierungsmarker CD69

Der Aktivierungsmarker CD69 wurde auf ruhenden NK-Zellen nur schwach exprimiert (vgl. Abb. 12, Tab. 25). CD69 zeigte nach Kurzzeitaktivierung den stärksten Expressionsanstieg aller untersuchten Rezeptoren. Nach Voraktivierung mit IL-2 über Nacht kam es im Vergleich mit ruhenden NK-Zellen zu einer signifikant höheren Expression (MFI: IL-2: 5,84 vs. kein IL: 3,41; $p < 0,01$). Wurde die Voraktivierung mit IL-15 vorgenommen, war die Expression signifikant höher als auf den nicht voraktivierten und den mit IL-2 voraktivierten Zellen (MFI: IL-15: 12,48 vs. IL-2: 5,84 vs. kein IL: 3,41; $p < 0,001$) (vgl. Abb. 12, Tab. 25).

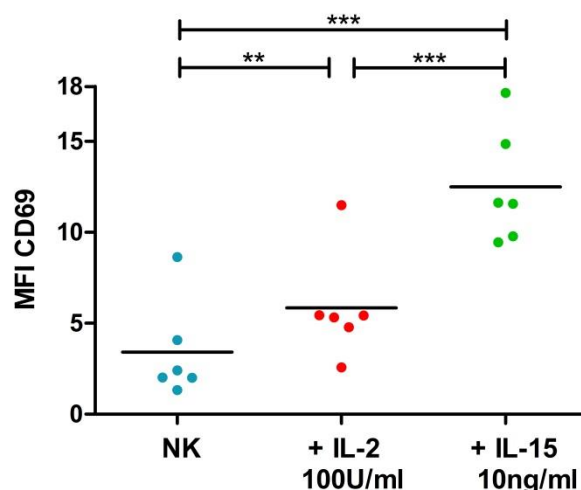


Abbildung 12: Expression von CD69. MFI von CD69 der untersuchten Spender ohne Zytokinstimulierung sowie nach Voraktivierung mit Interleukin-2 (IL-2) (100 U/ml) und Interleukin-15 (IL-15) (10 ng/ml) über Nacht (** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

3. ERGEBNISSE

Tabelle 25: Expression von CD69. Mittelwerte (\bar{x}) und SEM der Expressionshöhe (MFI) von CD69 sowie Expressionsunterschiede nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-stimulation und deren Signifikanzen (p) nach Voraktivierung über Nacht (n = Anzahl)

Voraktivierung (n = 6; $p_{ANOVA} < 0,0001$)	über	Nacht
Zytokinstatus	\bar{x}	SEM
kein IL	3,41	$\pm 1,11$
IL-2 100 U/ml	5,84	$\pm 1,22$
IL-15 10 ng/ml	12,48	$\pm 1,3$
	$\Delta \bar{x}$	p
kein IL vs. IL-2	+ 2,43	< 0,01
kein IL vs. IL-15	+ 9,07	< 0,001
IL-2 vs. IL-15	+ 6,64	< 0,001

3.8.2 Expression von NKG2A

Die Expression des inhibitorischen C-Typ-Lektinrezeptors NKG2A war, verglichen mit der auf ruhenden NK-Zellen beobachteten Expression, sowohl nach Kurzzeitaktivierung mit IL-2 als auch mit IL-15 signifikant höher (MFI: IL-2: 6,31, IL-15: 6,89 vs. kein IL: 5,78; $p < 0,05$ bzw. $p < 0,001$) (vgl. Abb. 13, Tab. 26). Die MFI-Werte lagen hierbei nach Voraktivierung mit IL-15 signifikant höher als nach IL-2-Voraktivierung (MFI: IL-15: 6,89 vs. IL-2: 6,31; $p < 0,05$) (vgl. Abb. 13, Tab. 26).

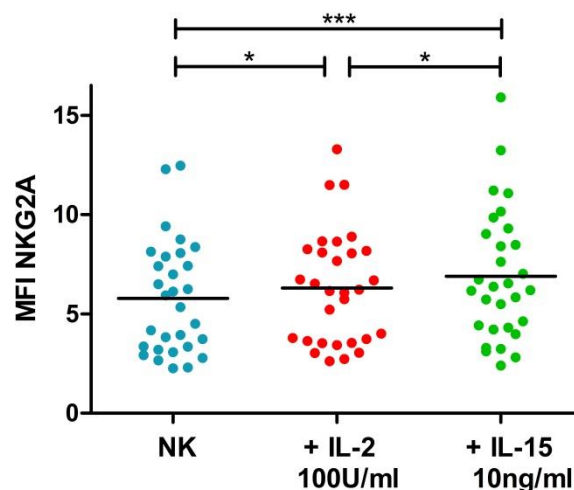


Abbildung 13: Expression von NKG2A. MFI von NKG2A der untersuchten Spender ohne Zytokin-stimulierung sowie nach Voraktivierung mit Interleukin-2 (IL-2) (100 U/ml) und Interleukin-15 (IL-15) (10 ng/ml) über Nacht (***) = $p < 0,001$, * = $p < 0,05$)

3. ERGEBNISSE

Tabelle 26: Expression von NKG2A. Mittelwerte (\bar{x}) und SEM der Expressionshöhe (MFI) von NKG2A sowie Expressionsunterschiede nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-stimulation und deren Signifikanzen (p) nach Voraktivierung über Nacht (n = Anzahl)

Voraktivierung über Nacht (n = 30; $p_{ANOVA} < 0,0001$)		
Zytokinstatus	\bar{x}	SEM
kein IL	5,78	$\pm 0,52$
IL-2 100 U/ml	6,31	$\pm 0,52$
IL-15 10 ng/ml	6,89	$\pm 0,6$
	$\Delta \bar{x}$	p
kein IL vs. IL-2	+ 0,53	< 0,05
kein IL vs. IL-15	+ 1,11	< 0,001
IL-2 vs. IL-15	+ 0,58	< 0,05

3.8.3 Der C-Typ-Lektinrezeptor NKG2D

Der aktivierende C-Typ-Lektinrezeptor NKG2D wurde im Vergleich zu nicht-voraktivierten NK-Zellen nach IL-2-Voraktivierung signifikant höher exprimiert (MFI: IL-2: 4,93 vs. kein IL: 3,51; $p < 0,001$) (vgl. Abb. 14, Tab. 27). Nach Inkubation mit IL-15 über Nacht wurden signifikant höhere MFI-Werte als auf ruhenden oder mit IL-2 voraktivierten NK-Zellen gemessen (MFI: IL-15: 6,55 vs. kein IL: 3,51, IL-2: 4,93; $p < 0,001$) (vgl. Abb. 14, Tab. 27).

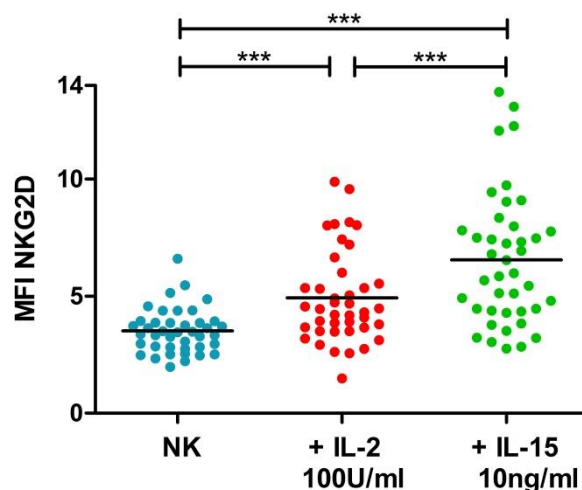


Abbildung 14: Expression von NKG2D. MFI von NKG2D der untersuchten Spender ohne Zytokin-stimulierung sowie nach Voraktivierung mit Interleukin-2 (IL-2) (100 U/ml) und Interleukin-15 (IL-15) (10 ng/ml) über Nacht (***) = $p < 0,001$)

3. ERGEBNISSE

Tabelle 27: Expression von NKG2D. Mittelwerte (\bar{x}) und SEM der Expressionshöhe (MFI) von NKG2D sowie Expressionsunterschiede nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation und deren Signifikanzen (p) nach Voraktivierung über Nacht (n = Anzahl)

Voraktivierung über Nacht (n = 41; $p_{ANOVA} < 0,0001$)		
Zytokinstatus	\bar{x}	SEM
kein IL	3,51	$\pm 0,15$
IL-2 100 U/ml	4,93	$\pm 0,31$
IL-15 10 ng/ml	6,55	$\pm 0,44$
	$\Delta \bar{x}$	p
kein IL vs. IL-2	+ 1,42	< 0,001
kein IL vs. IL-15	+ 3,04	< 0,001
IL-2 vs. IL-15	+ 1,62	< 0,001

3.8.4 NKp30 auf voraktivierten NK-Zellen

Der natürliche Zytotoxizitätsrezeptor NKp30 zeigte nach Kurzzeitaktivierung mit IL-2 und IL-15 eine signifikant höhere Expression als auf ruhenden NK-Zellen (MFI: IL-2: 4,71, IL-15: 5,67 vs. kein IL: 3,91; $p < 0,001$) (vgl. Abb. 15, Tab. 28). Nach IL-15-Voraktivierung exprimierten NK-Zellen NKp30 ebenfalls signifikant höher als nach IL-2-Voraktivierung über Nacht (MFI: IL-15: 5,67 vs. IL-2: 4,71; jeweils $p < 0,001$) (vgl. Abb. 15, Tab. 28).

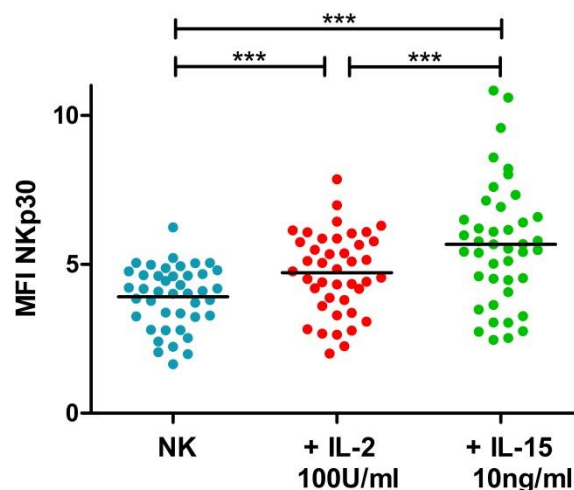


Abbildung 15: Expression von NKp30. MFI von NKp30 der untersuchten Spender ohne Zytokinstimulierung sowie nach Voraktivierung mit Interleukin-2 (IL-2) (100 U/ml) und Interleukin-15 (IL-15) (10 ng/ml) über Nacht (***) = $p < 0,001$)

3. ERGEBNISSE

Tabelle 28: Expression von NKp30. Mittelwerte (\bar{x}) und SEM der Expressionshöhe (MFI) von NKp30 sowie Expressionsunterschiede nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation und deren Signifikanzen (p) nach Voraktivierung über Nacht (n = Anzahl)

Voraktivierung (n = 42; $p_{ANOVA} < 0,0001$)	über	Nacht
Zytokinstatus	\bar{x}	SEM
kein IL	3,91	$\pm 0,16$
IL-2 100 U/ml	4,71	$\pm 0,21$
IL-15 10 ng/ml	5,67	$\pm 0,32$
	$\Delta \bar{x}$	p
kein IL vs. IL-2	+ 0,8	< 0,001
kein IL vs. IL-15	+ 1,76	< 0,001
IL-2 vs. IL-15	+ 0,96	< 0,001

3.8.5 Veränderung der NKp44-Expression

NKp44 wurde auf ruhenden NK-Zellen nur schwach exprimiert (vgl. Abb. 16, Tab. 29). Die Expression von NKp44 war auf mittels IL-2 voraktivierten NK-Zellen nicht-signifikant höher und auf mittels IL-15 stimulierten Zellen signifikant ($p < 0,01$) höher als auf ruhenden NK-Zellen (MFI: IL-2: 2,92, IL-15: 3,49 vs. kein IL: 2,54). NKp44 wurde nach IL-15-Voraktivierung stärker exprimiert als nach IL-2-Stimulation über Nacht (MFI: IL-15: 3,49 vs. IL-2: 2,92) (vgl. Abb. 16, Tab. 29).

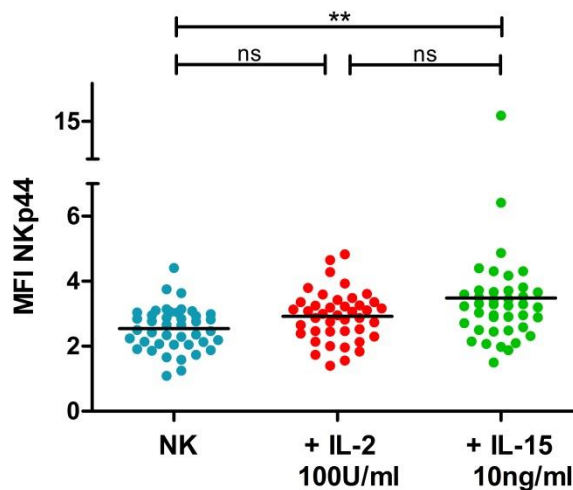


Abbildung 16: Expression von NKp44. MFI von NKp44 der untersuchten Spender ohne Zytokinstimulierung sowie nach Voraktivierung mit Interleukin-2 (IL-2) (100 U/ml) und Interleukin-15 (IL-15) (10 ng/ml) über Nacht (** = $p < 0,01$, ns = nicht signifikant)

3. ERGEBNISSE

Tabelle 29: Expression von NKp44. Mittelwerte (\bar{x}) und SEM der Expressionshöhe (MFI) von NKp44 sowie Expressionsunterschiede nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation und deren Signifikanzen (p) nach Voraktivierung über Nacht (n = Anzahl, ns = nicht signifikant)

Voraktivierung über Nacht (n = 42; $p_{ANOVA} = 0,0019$)		
Zytokinstatus	\bar{x}	SEM
kein IL	2,54	$\pm 0,1$
IL-2 100 U/ml	2,92	$\pm 0,12$
IL-15 10 ng/ml	3,49	$\pm 0,31$
	$\Delta \bar{x}$	p
kein IL vs. IL-2	+ 0,38	ns
kein IL vs. IL-15	+ 0,95	< 0,01
IL-2 vs. IL-15	+ 0,57	ns

3.8.6 Einfluss von IL-2 / IL-15 auf die NKp46-Expression

NKp46 wurde bereits auf ruhenden NK-Zellen in höherem Maße exprimiert (vgl. Abb. 17, Tab. 30). Nach Voraktivierung mit IL-2 über Nacht lag der MFI-Wert gering unter dem ruhender NK-Zellen und war nach IL-15-Stimulierung noch niedriger (MFI: IL-15: 7,63 vs. IL-2: 7,92 vs. kein IL: 8,01) (vgl. Abb. 17, Tab. 30). Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

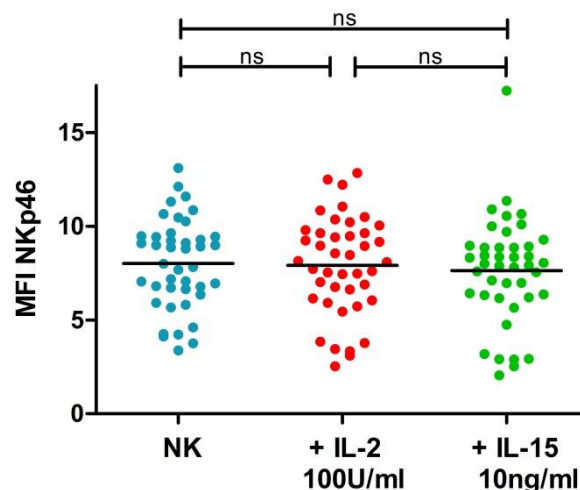


Abbildung 17: Expression von NKp46. MFI von NKp46 der untersuchten Spender ohne Zytokinstimulierung sowie nach Voraktivierung mit Interleukin-2 (IL-2) (100 U/ml) und Interleukin-15 (IL-15) (10 ng/ml) über Nacht (ns = nicht signifikant)

3. ERGEBNISSE

Tabelle 30: Expression von NKp46. Mittelwerte (\bar{x}) und SEM der Expressionshöhe (MFI) von NKp46 sowie Expressionsunterschiede nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation und deren Signifikanzen (p) nach Voraktivierung über Nacht (n = Anzahl, ns = nicht signifikant)

A Voraktivierung über Nacht (n = 42; $p_{ANOVA} = 0,0499$)		
Zytokinstatus	\bar{x}	SEM
kein IL	8,01	$\pm 0,37$
IL-2 100 U/ml	7,92	$\pm 0,4$
IL-15 10 ng/ml	7,63	$\pm 0,44$
	$\Delta \bar{x}$	p
kein IL vs. IL-2	- 0,09	ns
kein IL vs. IL-15	- 0,38	ns
IL-2 vs. IL-15	- 0,29	ns

3.8.7 Erhöhung der DNAM-1-Expression durch Voraktivierung

Das Adhäsionsmolekül DNAM-1 wies von allen untersuchten Rezeptoren auf ruhenden NK-Zellen die höchste Expression auf (vgl. Abb. 18, Tab. 31). Nach Inkubation mit IL-2 über Nacht kam es zu einem geringen, aber signifikanten ($p < 0,001$) Anstieg verglichen mit ruhenden Zellen (MFI: IL-2: 16,06 vs. kein IL: 14,28). Die Kurzzeitaktivierung mit IL-15 führte zu einer signifikant höheren Expression als auf ruhenden NK-Zellen, die auch gegenüber den mit IL-2 aktivierten NK-Zellen signifikant erhöht war (MFI: IL-15: 17,64 vs. kein IL: 14,28, IL-2: 16,06; $p < 0,001$ bzw. $p < 0,01$) (vgl. Abb. 18, Tab. 31).

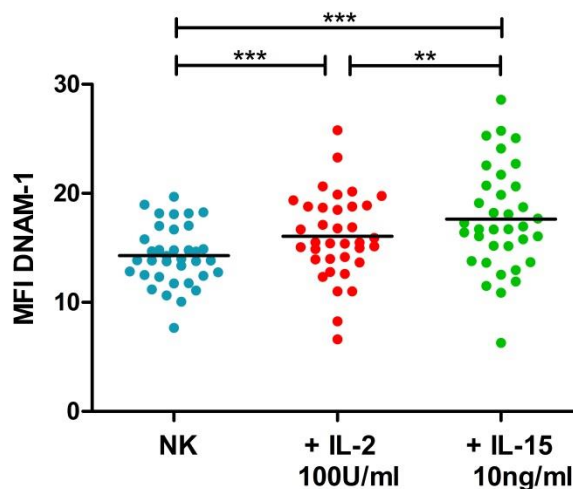


Abbildung 18: Expression von DNAM-1. MFI von DNAM-1 der untersuchten Spender ohne Zytokin-stimulierung sowie nach Voraktivierung mit Interleukin-2 (IL-2) (100 U/ml) und Interleukin-15 (IL-15) (10 ng/ml) über Nacht (***) = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$)

3. ERGEBNISSE

Tabelle 31: Expression von DNAM-1. Mittelwerte (\bar{x}) und SEM der Expressionshöhe (MFI) von DNAM-1 sowie Expressionsunterschiede nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-stimulation und deren Signifikanzen (p) nach Voraktivierung über Nacht (n = Anzahl)

Voraktivierung über Nacht (n = 36; $p_{ANOVA} < 0,0001$)		
Zytokinstatus	\bar{x}	SEM
kein IL	14,28	$\pm 0,45$
IL-2 100 U/ml	16,06	$\pm 0,64$
IL-15 10 ng/ml	17,64	$\pm 0,8$
	$\Delta \bar{x}$	p
kein IL vs. IL-2	+ 1,78	< 0,001
kein IL vs. IL-15	+ 3,36	< 0,001
IL-2 vs. IL-15	+ 1,58	< 0,01

3.8.8 Das Adhäsionsmolekül CD96

Das zweite untersuchte Adhäsionsmolekül CD96 wurde auf ruhenden NK-Zellen nur schwach exprimiert (vgl. Abb. 19, Tab. 32). Der Expressionsunterschied zur nach Voraktivierung mit IL-2 erreichten Expression war nicht signifikant (MFI: IL-2: 2,48 vs. kein IL: 2,33). Nach Kurzzeitaktivierung mit IL-15 war die gemessene Expression verglichen mit dem Ausgangswert nicht-voraktivierter NK-Zellen signifikant höher (MFI: IL-15: 2,69 vs. kein IL: 2,33; $p < 0,05$) (vgl. Abb. 19, Tab. 32).

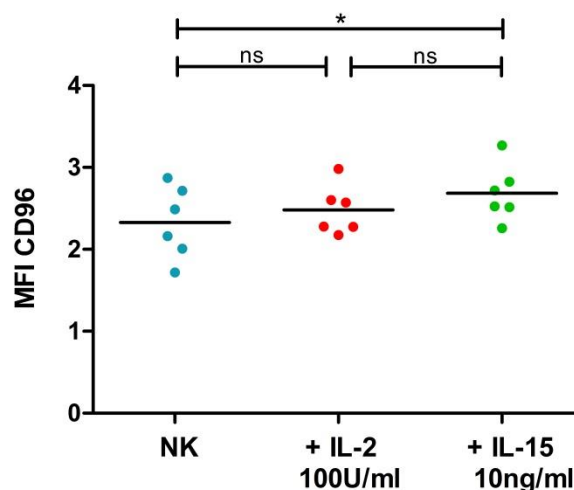


Abbildung 19: Expression von CD96. MFI von CD96 der untersuchten Spender ohne Zytokinstimulierung sowie nach Voraktivierung mit Interleukin-2 (IL-2) (100 U/ml) und Interleukin-15 (IL-15) (10 ng/ml) über Nacht (* = $p < 0,05$; ns = nicht signifikant)

3. ERGEBNISSE

Tabelle 32: Expression von CD96. Mittelwerte (\bar{x}) und SEM der Expressionshöhe (MFI) von CD96 sowie Expressionsunterschiede nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-stimulation und deren Signifikanzen (p) nach Voraktivierung über Nacht (n = Anzahl, ns = nicht signifikant)

Voraktivierung über Nacht (n = 6; $p_{ANOVA} = 0,041$)		
Zytokinstatus	\bar{x}	SEM
kein IL	2,33	$\pm 0,18$
IL-2 100 U/ml	2,48	$\pm 0,12$
IL-15 10 ng/ml	2,69	$\pm 0,14$
	$\Delta \bar{x}$	p
kein IL vs. IL-2	+ 0,15	ns
kein IL vs. IL-15	+ 0,36	< 0,05
IL-2 vs. IL-15	+ 0,21	ns

3.8.9 Expression von CD158a/h

Die mit CD158a/h-Antikörpern gemessene Gesamtexpression von KIR2DL1 und KIR2DS1 stieg vom Wert nicht-voraktivierter NK-Zellen ausgehend durch Voraktivierung mit IL-2 auf einen signifikant höheren Wert (MFI: IL-2: 6,98 vs. kein IL: 5,95; $p < 0,05$) (vgl. Abb. 20, Tab. 33). Nach Verwendung von IL-15 lag sie signifikant über dem Wert ruhender und dem mittels IL-2 kurzzeitaktivierter NK-Zellen (MFI: IL-15: 7,96 vs. kein IL: 5,95, IL-2: 6,98; $p < 0,001$ bzw. $p < 0,05$) (vgl. Abb. 20, Tab. 33).

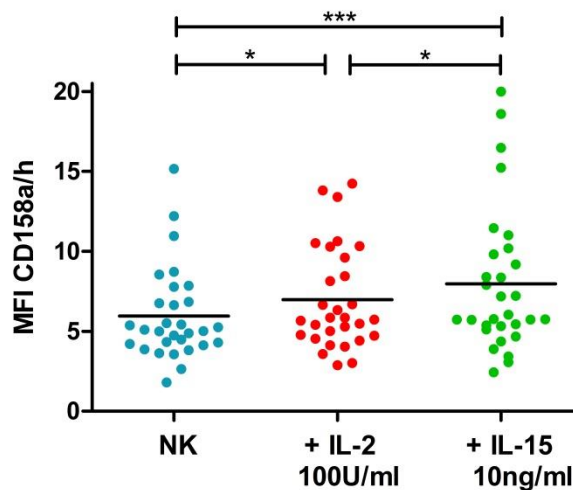


Abbildung 20: Expression von CD158a/h. MFI von CD158a/h der untersuchten Spender ohne Zytokinstimulierung sowie nach Voraktivierung mit Interleukin-2 (IL-2) (100 U/ml) und Interleukin-15 (IL-15) (10 ng/ml) über Nacht (***) = $p < 0,001$, * = $p < 0,05$)

3. ERGEBNISSE

Tabelle 33: Expression von CD158a/h. Mittelwerte (\bar{x}) und SEM der Expressionshöhe (MFI) von CD158a/h sowie Expressionsunterschiede nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-stimulation und deren Signifikanzen (p) nach Voraktivierung über Nacht (n = Anzahl)

Voraktivierung über Nacht (n = 30; $p_{ANOVA} < 0,0001$)		
Zytokinstatus	\bar{x}	SEM
kein IL	5,95	± 0,53
IL-2 100 U/ml	6,98	± 0,59
IL-15 10 ng/ml	7,96	± 0,82
	$\Delta \bar{x}$	p
kein IL vs. IL-2	+ 1,03	< 0,05
kein IL vs. IL-15	+ 2,01	< 0,001
IL-2 vs. IL-15	+ 0,98	< 0,05

3.8.10 Veränderung der CD158b1/b2/j-Expression

Die Gesamtexpression von KIR2DL2, KIR2DL3 und KIR2DS2 wurde mit CD158b1/b2/j-Antikörpern gemessen. Die Expression von CD158b1/b2/j war nach Voraktivierung mit IL-2 signifikant höher als auf nicht-voraktivierten NK-Zellen (MFI: IL-2: 5,48 vs. kein IL: 4,74; $p < 0,01$) (vgl. Abb. 21, Tab. 34). Wurde für die Stimulation IL-15 eingesetzt, stiegen die gemessenen MFI-Werte auf ein Niveau, das signifikant über dem ruhender NK-Zellen lag ($p < 0,01$). Der Wert lag ebenfalls über dem der mittels IL-2 voraktivierten Zellen, jedoch ohne signifikant zu sein (MFI: IL-15: 5,85 vs. kein IL: 4,74, IL-2: 5,48) (vgl. Abb. 21, Tab. 34).

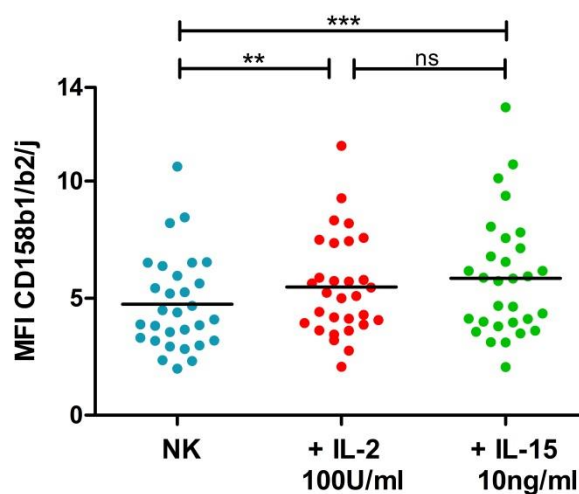


Abbildung 21: Expression von CD158b1/b2/j. MFI von CD158b1/b2/j der untersuchten Spender ohne Zytokinstimulation sowie nach Voraktivierung mit Interleukin-2 (IL-2) (100 U/ml) und Interleukin-15 (IL-15) (10 ng/ml) über Nacht (** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant)

3. ERGEBNISSE

Tabelle 34: Expression von CD158b1/b2/j. Mittelwerte (\bar{x}) und SEM der Expressionshöhe (MFI) von CD158b1/b2/j sowie Expressionsunterschiede nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-stimulation und deren Signifikanzen (p) nach Voraktivierung über Nacht (n = Anzahl, ns = nicht signifikant)

Voraktivierung über Nacht (n = 30; $p_{ANOVA} < 0,0001$)		
Zytokinstatus	\bar{x}	SEM
kein IL	4,74	$\pm 0,37$
IL-2 100 U/ml	5,48	$\pm 0,39$
IL-15 10 ng/ml	5,85	$\pm 0,47$
	$\Delta \bar{x}$	p
kein IL vs. IL-2	+ 0,74	< 0,01
kein IL vs. IL-15	+ 1,11	< 0,001
IL-2 vs. IL-15	+ 0,37	ns

3.8.11 Einfluss von IL-2 / IL-15 auf die Expression von CD158e1/e2

Mit CD158e1/e2-Antikörpern wurde die Gesamtexpression von KIR3DL1 und KIR3DS1 gemessen. Im Vergleich zu ruhenden NK-Zellen stieg nach Kurzzeitaktivierung mit IL-2 die Expression an und lag signifikant über der ruhender NK-Zellen (MFI: IL-2: 4,6 vs. kein IL: 4,21; $p < 0,01$) (vgl. Abb. 22, Tab. 35). Auch nach Voraktivierung mit IL-15 stiegen die gemessenen MFI-Werte an und lagen signifikant über denen ruhender NK-Zellen ($p < 0,001$) und knapp über dem Niveau der mittels IL-2 voraktivierten, ohne dass es einen signifikanten Unterschied gab (MFI: IL-15: 4,78 vs. kein IL: 4,21, IL-2: 4,6) (vgl. Abb. 22, Tab. 35).

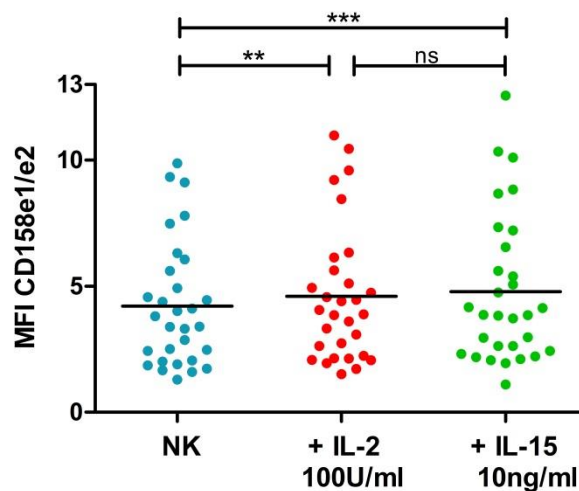


Abbildung 22: Expression von CD158e1/e2. MFI von CD158e1/e2 der untersuchten Spender ohne Zytokinstimulation sowie nach Voraktivierung mit Interleukin-2 (IL-2) (100 U/ml) und Interleukin-15 (IL-15) (10 ng/ml) über Nacht (** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant)

3. ERGEBNISSE

Tabelle 35: Expression von CD158e1/e2. Mittelwerte (\bar{x}) und SEM der Expressionshöhe (MFI) von CD158e1/e2 sowie Expressionsunterschiede nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-stimulation und deren Signifikanzen (p) nach Voraktivierung über Nacht (n = Anzahl, ns = nicht signifikant)

Voraktivierung über Nacht (n = 30; p _{ANOVA} < 0,0001)		
Zytokinstatus	\bar{x}	SEM
kein IL	4,21	± 0,45
IL-2 100 U/ml	4,6	± 0,49
IL-15 10 ng/ml	4,78	± 0,54
	$\Delta \bar{x}$	p
kein IL vs. IL-2	+ 0,39	< 0,01
kein IL vs. IL-15	+ 0,57	< 0,001
IL-2 vs. IL-15	+ 0,18	ns

3.8.12 Keine Induktion der CD158i-Expression auf CD158i⁻ Spendern

Die Expression von KIR2DS4 wurde mithilfe von Antikörpern gegen CD158i analysiert. Von 30 untersuchten Spendern exprimierten die NK-Zellen von 12 Spendern KIR2DS4 auf ihrer Oberfläche (vgl. Abb. 23). 18 Spender zeigten keine Expression von KIR2DS4. Auch nach Kurzzeitaktivierung wurde bei CD158i⁻ Spendern kein KIR2DS4 exprimiert. Bei den CD158i⁺ Spendern kam es verglichen mit den MFI-Werten der nicht-voraktivierten Zellen nach Voraktivierung mit IL-2 über Nacht zu einem Anstieg der Expression (MFI: IL-2: 7,76 vs. kein IL: 7,17) (vgl. Abb. 23, Tab. 36). Nach Kurzzeitaktivierung mit IL-15 lag die Expression von KIR2DS4 signifikant über dem Niveau der ruhenden und dem der mittels IL-2 aktivierten Zellen (MFI: IL-15: 8,62 vs. kein IL: 7,17, IL-2: 7,76; p < 0,001 bzw. p < 0,05) (vgl. Abb. 23, Tab. 36).

Tabelle 36: CD158i-Expression der CD158i exprimierenden Spender. Mittelwerte (\bar{x}) und SEM der Expressionshöhe (MFI) von CD158i sowie Expressionsunterschiede nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-stimulation und deren Signifikanzen (p) nach Voraktivierung über Nacht (n = Anzahl, ns = nicht signifikant).

Voraktivierung über Nacht (n = 12; p _{ANOVA} = 0,0002)		
Zytokinstatus	\bar{x}	SEM
kein IL	7,17	± 0,5
IL-2 100 U/ml	7,76	± 0,46
IL-15 10 ng/ml	8,62	± 0,47
	$\Delta \bar{x}$	p
kein IL vs. IL-2	+ 0,59	ns
kein IL vs. IL-15	+ 1,45	< 0,001
IL-2 vs. IL-15	+ 0,86	< 0,05

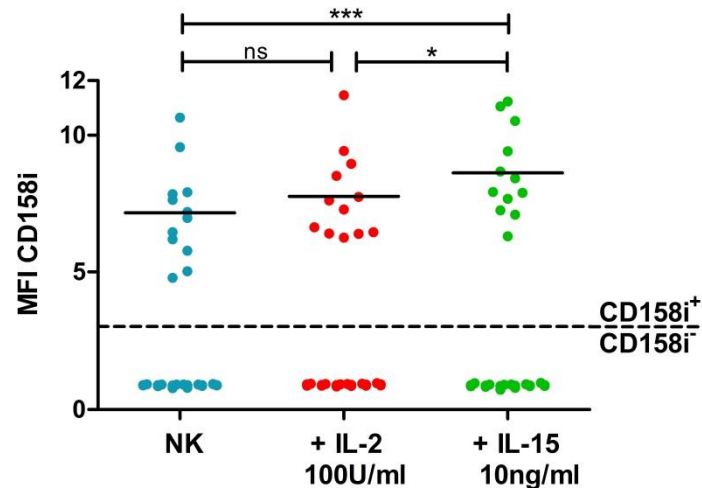


Abbildung 23: Expression von CD158i. MFI von CD158i der untersuchten Spender sowie Einteilung in CD158i exprimierende Spender (CD158i⁺) und nicht CD158i exprimierende Spender (CD158i⁻) ohne Zytokinstimulierung sowie nach Voraktivierung mit Interleukin-2 (IL-2) (100 U/ml) und Interleukin-15 (IL-15) (10 ng/ml) über Nacht (** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, * = $p < 0,05$, ns = nicht signifikant)

3.9 Molekulargenetische Untersuchung der KIR

Von 29 Spendern wurden die KIR-Typen bestimmt. Die daraus resultierende Verteilung der einzelnen Rezeptoren zeigt Abbildung 24.

Bei sechs der untersuchten Spender wurde der KIR-Typ sowohl bei nicht-voraktivierten als auch bei mit IL-2 bzw. IL-15 über Nacht voraktivierten NK-Zellen bestimmt. Bei allen sechs Spendern waren die ermittelten KIR-Typen der kurzzeitaktivierten Zellen verglichen mit den ruhenden NK-Zellen unverändert. Abbildung 25 zeigt exemplarisch das Ergebnis der drei durchgeführten Elektrophoresen eines Spenders und des unveränderten KIR-Typs. An fünf Spendern wurden die KIR-Typen im nicht-aktivierten Zustand und nach 21-tägiger Expansion bestimmt. Bei allen fünf kam es zu keiner Veränderung des KIR-Typs. In Abbildung 26 ist als Beispiel das Ergebnis der zwei Elektrophoresen für einen der fünf Spender aufgeführt.

3. ERGEBNISSE

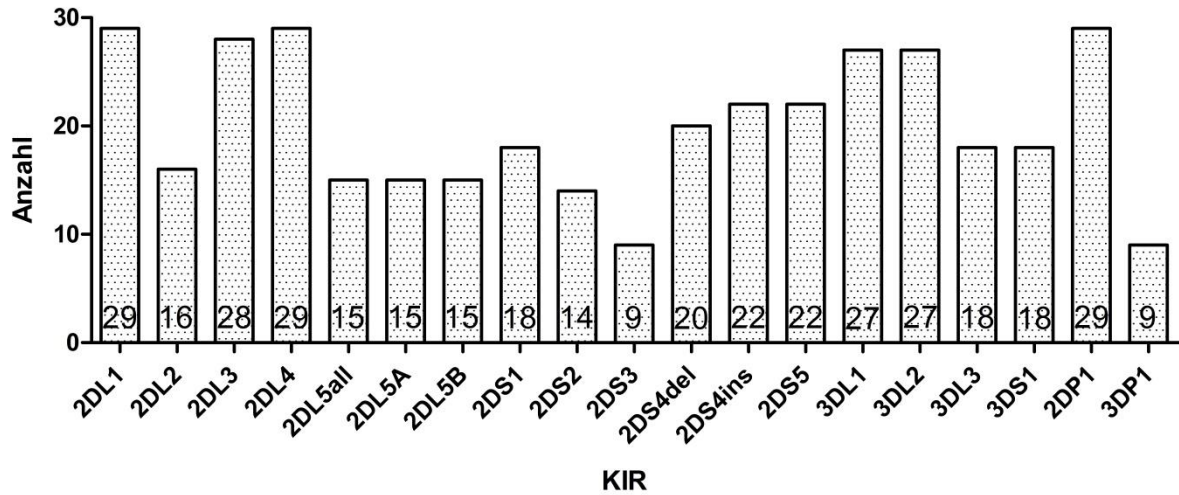


Abbildung 24: Häufigkeit der einzelnen KIR im untersuchten Spenderkollektiv. Absolute Häufigkeiten der verschiedenen Immunglobulin-ähnlichen Killerzellrezeptoren (KIR) nach Bestimmung der KIR-Typen von 29 Spendern mittels reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

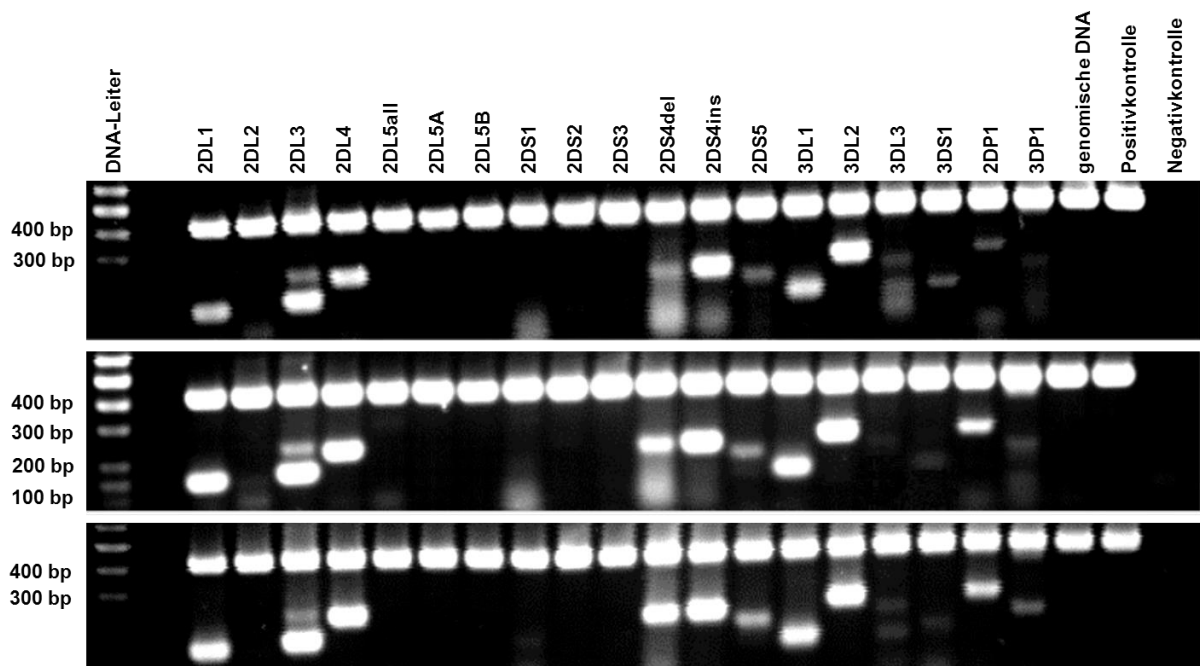


Abbildung 25: KIR-Phänotyp nach Kurzzeitaktivierung über Nacht. Phänotyp der Immunglobulin-ähnlichen Killerzellrezeptoren (KIR) eines Spenders nach Bestimmung mittels Reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR), oberes Elektrophoresebild: keine Interleukin-(IL)-Stimulation, mittleres Bild: nach IL-2-Stimulation (100 U/ml), unteres Bild: nach IL-15-Stimulation (10 ng/ml), interne Kontrolle mit β -Aktin (400 bp) (bp = Basenpaare, DNA = Desoxyribonukleinsäure)

3. ERGEBNISSE

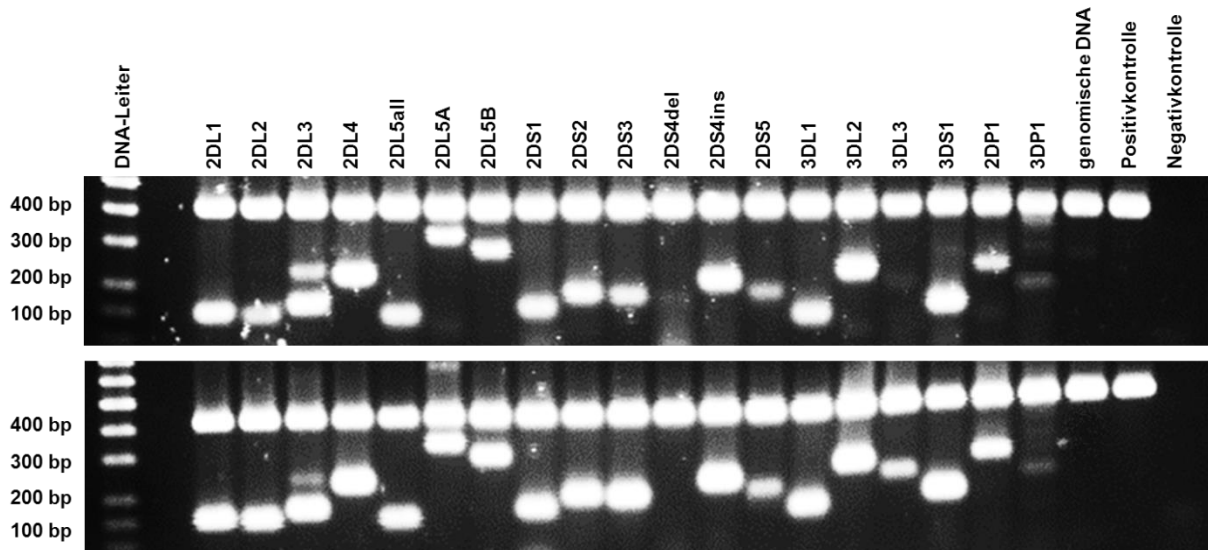


Abbildung 26: KIR-Phänotyp nach Expansion über 21 Tage. Phänotyp der Immunglobulin-ähnlichen Killerzellrezeptoren (KIR) eines Spenders nach Bestimmung mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR), oberes Elektrophoresebild: keine Interleukin-(IL)-Stimulation an Tag 1, unteres Bild: nach Expansion über 21 Tage mit IL-2 (500 U/ml), interne Kontrolle mit β -Aktin (400 bp) (bp = Basenpaare, DNA = Desoxyribonukleinsäure)

3.10 Einfluss der NKR-Expression auf die Lyse von Myelomzellen

3.10.1 Zytotoxizität gegenüber RPMI 8226 in Abhängigkeit vom KIR-Typ

Bei 17 der 20 gegen RPMI 8226 eingesetzten Spender wurde der KIR-Typ bestimmt. Da RPMI 8226 auf der Zelloberfläche HLA-Cw2 exprimiert, welches durch den inhibierenden Rezeptor KIR2DL1 und aktivierenden Rezeptor KIR2DS1 erkannt wird, wurden die untersuchten Spender anhand dieser detektierten Rezeptoren verschiedenen KIR-Typen zugeordnet. Da alle 17 Spender KIR2DL1⁺ waren, erfolgte die Einteilung in eine KIR2DL1⁺/KIR2DS1⁺ und eine KIR2DL1⁺/KIR2DS1⁻ Gruppe. In der KIR2DL1⁺/KIR2DS1⁺ Gruppe befanden sich drei *non-responder* und sieben *responder*, während in der KIR2DL1⁺/KIR2DS1⁻ Gruppe drei *non-responder* und vier *responder* waren (vgl. Tab. 37).

Tabelle 37: Spenderverteilung nach KIR-Typ und Ansprechen auf RPMI 8226. Aufteilung der RPMI 8226-*responder* und -*non-responder* nach KIR2DS1-Status (n = Anzahl)

Spenderverteilung nach KIR-Typ und Lysegruppe (n = 17)		
Lysegruppe	KIR-Typ	
	KIR2DL1 ⁺ /KIR2DS1 ⁺	KIR2DL1 ⁺ /KIR2DS1 ⁻
<i>responder</i>	7	4
<i>non-responder</i>	3	3

3. ERGEBNISSE

Mithilfe eines exakten Fisher-Testes wurde auf stochastische Unabhängigkeit geprüft und zweiseitige p-Werte berechnet. Der ermittelte Wert lag bei $p = 0,64$, so dass von einer stochastischen Unabhängigkeit zwischen KIR-Typ und Ansprechen auf RPMI 8226 ausgegangen werden muss.

3.10.2 Zytotoxizität gegenüber L363 in Abhängigkeit vom KIR-Typ

Bei 21 der 28 gegen L363 im ^{51}Cr -Freisetzungstest eingesetzten Spender wurde ebenfalls der KIR-Typ bestimmt. Die Zelllinie L363 exprimiert auf ihrer Oberfläche die HLA-C1-Allele Cw3 und Cw7, welche von den NK-Zellen durch die inhibitorischen Rezeptoren KIR2DL2 und KIR2DL3 sowie den aktivierenden Rezeptor KIR2DS2 erkannt werden. Tabelle 38 gibt einen Überblick über die KIR-Typen der 21 Spender hinsichtlich der drei zuvor genannten Rezeptoren.

Tabelle 38: KIR-Typverteilung hinsichtlich der für L363 relevanten KIR. Übersicht über die vier unter den gegen L363 im Chrom-51-Freisetzungstest eingesetzten Spendern vorkommenden KIR-Typen unter der Berücksichtigung der für HLA-Cw3 und -Cw7 korrespondierenden KIR ($n = \text{Anzahl}$)

KIR-Verteilung der gegen L363 eingesetzten Spender ($n = 21$)	
KIR-Typ	n
KIR2DL2 ⁺ /2DL3 ⁺ /2DS2 ⁺	10
KIR2DL2 ⁺ /2DL3 ⁻ /2DS2 ⁺	1
KIR2DL2 ⁺ /2DL3 ⁺ /2DS2 ⁻	2
KIR2DL2 ⁻ /2DL3 ⁺ /2DS2 ⁻	8

Da 20 der untersuchten Spender KIR2DL3⁺ waren und lediglich ein Spender KIR2DL3⁻, wurde die Prüfung auf stochastische Unabhängigkeit zwischen KIR-Status und Ansprechen auf L363 mittels exakten Fisher-Test nur für die Rezeptoren KIR2DL2 und KIR2DS2 durchgeführt. Wurden die Spender nach Vorhandensein des Rezeptor KIR2DL2 eingeteilt, ergab sich eine KIR2DL2⁺ Gruppe mit 13 Spendern und eine KIR2DL2⁻ Gruppe mit 8 Spendern. Tabelle 39 zeigt die Verteilung von L363-respondern und -non-respondern innerhalb dieser Gruppen. Die Assoziation zwischen Fehlen von KIR2DL2, also einem HLA-KIR-Mismatch, und einem besseren Ansprechen auf L363 war signifikant ($p = 0,02$).

Wurden die 21 Spender nach Vorhandensein des Rezeptors KIR2DS2 eingeteilt, ergab sich folgende, in Tabelle 40 dargestellte, Verteilung der Spender. Hier gab es

3. ERGEBNISSE

keine signifikante Assoziation zwischen KIR Rezeptor und dem Ansprechen auf L363.

Tabelle 39: Spenderverteilung nach KIR-Typ und Ansprechen auf L363. Aufteilung der L363-responder und –non-responder nach KIR2DL2-Status (n = Anzahl)

Spenderverteilung nach KIR-Typ und Lysegruppe (n = 21)		
Lysegruppe	KIR-Typ	
	KIR2DL2 ⁺	KIR2DL2 ⁻
responder	4	7
non-responder	9	1

Tabelle 40: Spenderverteilung nach KIR-Typ und Ansprechen auf L363. Aufteilung der L363-responder und –non-responder nach KIR2DS2-Status (n = Anzahl)

Spenderverteilung nach KIR-Typ und Lysegruppe (n = 21)		
Lysegruppe	KIR-Typ	
	KIR2DS2 ⁺	KIR2DS2 ⁻
responder	4	7
non-responder	7	3

3.10.3 Korrelation zwischen spezifischer Lyse und KIR-Expression

Bei einer E:T-Ratio von 1:1 bestand in der *responder*-Gruppe eine signifikante, sehr starke, negative Korrelation zwischen erzielter spezifischer Lyse durch nicht-voraktivierte sowie durch mittels IL-2 voraktivierter NK-Zellen und dem Anteil CD158b1/b2/j⁺ CD16^{bright} CD56^{dim}-NK-Zellen (kein IL: r = -0,82; p = 0,01; IL-2: r = -0,85; p < 0,01) (vgl. Abb. 27, Tab. 41). Nach Kurzzeitaktivierung mit IL-15 gab es eine negative Korrelation der untersuchten Parameter, die aber nicht signifikant war (vgl. Abb. 27, Tab. 41). Wurden die NK-Zellen in einer E:T-Ratio von 5:1 eingesetzt, zeigten sich vergleichbare Ergebnisse (r = -0,71; p = 0,04) (vgl. Abb. 27, Tab. 41). Nach Stimulation mit IL-2 oder IL-15 über Nacht lag eine nicht-signifikante, negative Korrelation vor (IL-2: r = -0,62; IL-15: r = -0,61) (vgl. Abb. 27, Tab. 41).

3. ERGEBNISSE

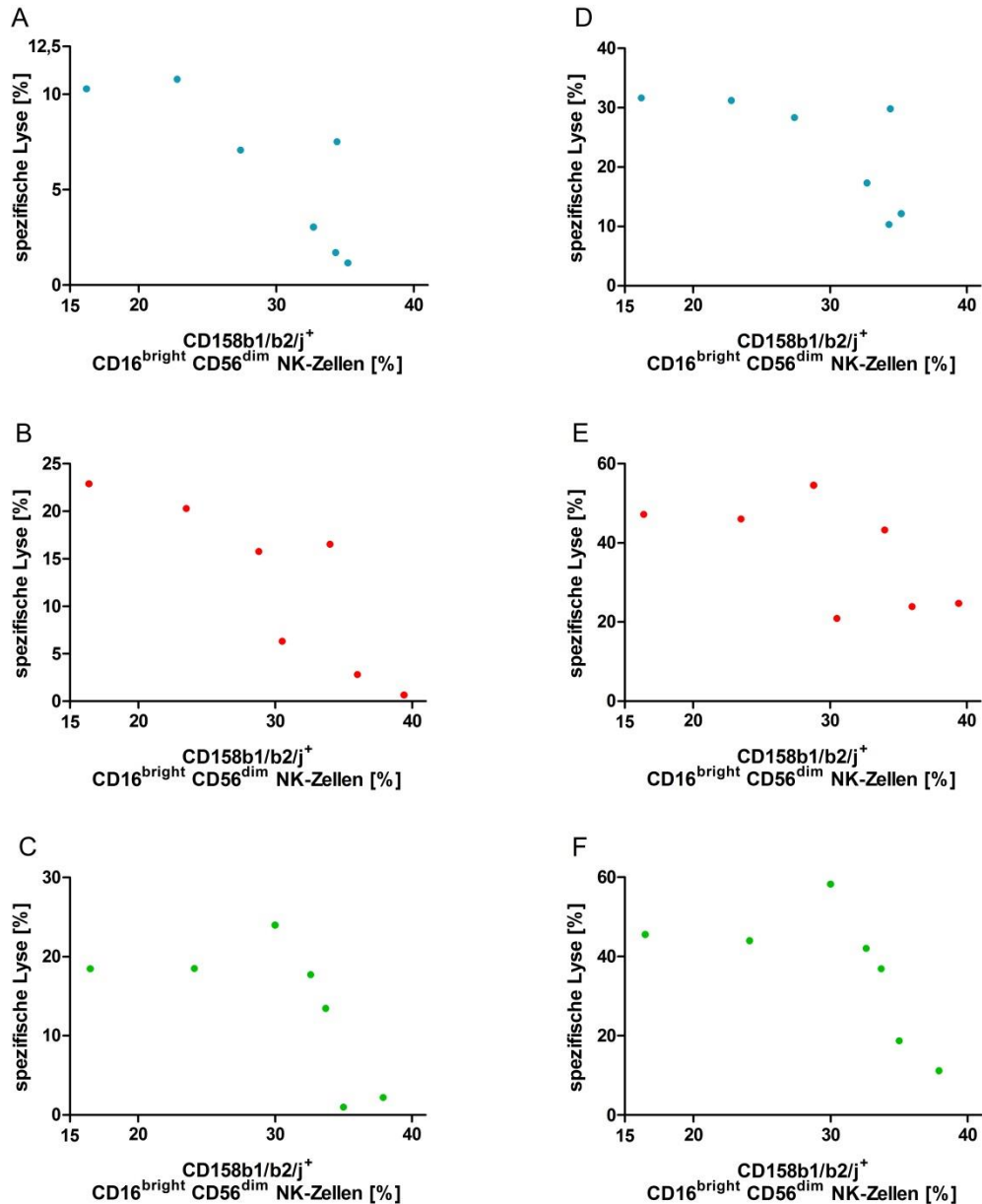


Abbildung 27: Korrelation zwischen spezifischer Lyse von L363 und der Größe der CD158b1/b2j⁺ CD16^{bright} CD56^{dim}-NK-Zellpopulation. Die erreichte, spezifische Lyse von L363 aufgetragen gegen den Anteil CD158b1/b2j⁺ zytotoxischen NK-Zellen der Spender; **(A-C)** E:T-Ratio 1:1 **(D-F)** E:T-Ratio 5:1 **(A, D)** nicht-voraktivierte NK-Zellen **(B, E)** Kurzzeitaktivierung mit IL-2 100U/ml **(C, F)** Kurzzeitaktivierung mit IL-15 10ng/ml

3. ERGEBNISSE

Tabelle 41: Korrelation zwischen Lyse von L363 und Anteil CD158b1/b2/j⁺ NK-Zellen an der CD16^{bright} CD56^{dim}-NK-Subpopulation der responder. Pearsonkorrelationskoeffizient (r) mit 95%-Konfidenzintervall (95%-KI) und p-Wert (p) für die Korrelation zwischen erreichter spezifischer Lyse von L363 und dem Anteil CD158b1/b2/j⁺ zytotoxischer NK-Zellen nach unterschiedlicher Interleukin-(IL)-Stimulation über Nacht bei einem Effektor-Zielzellverhältnis (E:T-Ratio) von 1:1 und 5:1 (ns = nicht signifikant).

Korrelation zwischen spezifischer Lyse von L363 und Anteil CD158b1/b2/j ⁺ CD16 ^{bright} CD56 ^{dim} -NK-Zellen				
Zytokinstatus	E:T-Ratio	r	95%-KI	p
kein IL	1:1	- 0,82	-0,97 - -0,17	0,01
	5:1	- 0,71	-0,95 - 0,09	0,04
+ IL-2 100U/ml	1:1	- 0,85	-0,98 - -0,27	< 0,01
	5:1	- 0,62	-0,94 - 0,26	ns (p = 0,07)
+ IL-15 10ng/ml	1:1	- 0,61	-0,93 - 0,26	ns (p = 0,07)
	5:1	- 0,61	-0,93 - 0,27	ns (p = 0,07)

4. DISKUSSION

NK-Zellen von Myelom-Patienten sind in ihrer natürlichen Zytotoxizität inhibiert (106). Dieser Effekt wird sowohl durch den Zell-Zell-Kontakt von NK- und malignen Plasmazellen, als auch durch die von den Plasmazellen sekretierten Zytokine bedingt (12,107). Myelom-Zellen sind zudem durch die hohe Expression von MHC Molekülen vor der Lyse durch NK-Zellen geschützt (108). NK-Zellen allogener Spender, die einen von den malignen Plasmazellen differenten KIR-Phänotyp aufweisen, sollten diese Inhibition überwinden können. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, die NK-Zellen des Fremdspenders ex vivo zu manipulieren, d.h. sie durch kurz- oder langzeitige Kultur unter definierten Bedingungen zu aktivieren bzw. zu expandieren. Der adoptive Transfer solcher alloreaktiver NK-Zellen im Rahmen einer allogenen Transplantation hämatopoetischer Progenitorzellen könnte daher einen erfolgsversprechenden Ansatz darstellen, residuelle Zellen des MM durch NK-Zell-vermittelte Lyse zu eliminieren.

4.1 NK-Zellvoraktivierung mittels Interleukin 2 bzw. Interleukin 15

Zur Voraktivierung der NK-Zellen gesunder Spender wurden isolierte NK-Zell-Populationen mit 100U/ml IL-2 bzw. 10ng/ml IL-15 über Nacht kultiviert. Durchflusszytometrisch konnte die Aktivierung über das Expressionsniveau des Oberflächenmarkers CD69 ermittelt werden. Die verstärkte Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 war bei IL-15 voraktivierten NK-Zellen deutlicher als bei IL-2 behandelten NK-Zellen messbar. Dieser Unterschied könnte auf eine stärkere Aktivierung der NK-Zellen durch IL-15 im Vergleich zu IL-2 hindeuten, was auf die unterschiedliche Konzentration der verwendeten Interleukine (IL-2: 100 U/ml, IL-15: 10 ng/ml) zurückgeführt werden kann.

Die Expression der darüber hinaus untersuchten aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren (NKG2D, DNAM-1, NKp30, NKp40, NKp46) steigt, mit Ausnahme von NKp46, durch die Voraktivierung der NK-Zellen über Nacht an. Der nur auf aktivierten NK-Zellen exprimierte NK-Zell-Rezeptor NKp46 scheint hingegen erst nach längerer Aktivierungsphase verstärkt exprimiert zu werden (109). Es zeigte sich bei den übrigen untersuchten NK-Zell-Markern ähnlich zu CD69 stets ein höherer Anstieg der Oberflä-

chendichte nach Inkubation mit IL-15 im Vergleich zu der Aktivierung mit IL-2. Eine verstärkte Expression der aktivierenden NK-Rezeptoren NKG2D, NKp30, NKp44 und DNAM-1 nach Voraktivierung mit IL-2 bzw. IL-15 wurde auch durch Hromadnikova et al. beschrieben, wobei ebenfalls eine höhere Expression nach IL-15-Voraktivierung nachgewiesen wurde (110). Folglich könnte die verstärkte Oberflächenexpression dieser Rezeptoren das erhöhte zytotoxische Potential der IL-2/IL-15 behandelten NK-Zellen bedingen.

Nachdem der Anstieg der Expression von CD69 mit einer Erhöhung des zytotoxischen Potentials der NK-Zellen einher gehen sollte (111), wurde nachfolgend die Lyse unterschiedlicher Zielzellpopulationen in Abhängigkeit von der Voraktivierung der Effektorzellen analysiert.

4.2 Anstieg der natürlichen Zytotoxizität durch NK-Zellstimulation

Die humane CML-Zelllinie K-562 exprimiert Liganden für die aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren NKG2D und DNAM-1, so dass sie als Zielzelle von NK-Zellen vermittelter natürlicher Zytotoxizität in Frage kommt (103,104). Zudem ist die Oberflächendichte von MHC I Molekülen auf diesen Zellen reduziert. Demnach sind diese Zielzellen nur geringfügig in der Lage, NK-Zellen über die Interaktion der MHC Moleküle mit den auf NK-Zellen exprimierten KIR-Rezeptoren zu inhibieren. Damit eignen sich diese Zielzellen besonders gut, um den Einfluss der Voraktivierung der NK-Zellen auf das zytotoxische Potential zu untersuchen, da so der Spender-abhängige KIR-Phänotyp die Lyserate der NK-Zellen nicht bzw. nur geringfügig beeinflussen kann.

Die Analyse des lytischen Potentials der NK-Zellen gegenüber K-562 Zielzellen zeigte, dass die natürliche Zytotoxizität vom Effektor- zu Zielzell-Verhältnis abhängig ist. So betrug die Lyserate bei einem Verhältnis von 1:1 lediglich 9%, während 33% der Zielzellen bei einem Verhältnis von 5:1 lysiert wurden. Die Höhe der erzielten Lyse lag dabei ungefähr auf dem Niveau der von Zhang et al. beschriebenen Lyserate (112).

Durch kurzzeitige Aktivierung der NK-Zellen mittels Interleukin 2 (IL-2) bzw. IL-15 über Nacht wurde die Effizienz der Zelllyse gesteigert. Insbesondere bei einem nied-

4. DISKUSSION

rigen Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 1:1 konnte eine Verdopplung der Lyserate von 9% auf 18% bei Voraktivierung der NK-Zellen mit IL-15 beobachtet werden.

Eine Gruppierung der Spender auf Basis der Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber K-562 in „non-“, „low-“, „medium-“ und „high-responder“ ermöglicht eine differenziertere Analyse. Das lytische Potential von NK-Zellen der „high-responder“, deren unstimulierte NK-Zellen bereits eine 50%-ige Lyse der Zielzellen induzieren, scheint bereits annähernd maximal zu sein. Eine Voraktivierung dieser NK-Zellen steigerte die Lyserate lediglich um 6% bzw. 10%. Gerade NK-Zellen von Spendern, die unstimuliert eine geringere Lyse von K-652 induzieren konnten („non-“ bzw. „low-responder“), profitierten besonders durch die Voraktivierung der NK-Zellen. So steigt nach IL-15-Voraktivierung bei einem Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 5:1 die Lyserate verglichen mit unstimulierten NK-Zellen etwa um den Faktor 2,5 („low-responder“: 13% vs. 33%) bzw. den Faktor 5 („non-responder“: 2% vs. 10%).

Demnach scheint der Einfluss der Interleukin 2 bzw. IL-15 vermittelten Voraktivierung die NK-Zell-vermittelte Lyse insbesondere bei ungünstigen Effektor- zu Zielzell-Verhältnissen wie auch bei NK-Zellen mit einer geringen basalen zytotoxischen Potenz zu verstärken.

4.3 Natürliche Zytotoxizität gegenüber malignen Plasmazellen

Ähnlich der Zelllinie K-562 weisen maligne Plasmazellen im Frühstadium der Erkrankung eine niedrige Expression von MHC I Molekülen bei gleichzeitig hoher Expressionsdichte von Liganden für aktivierende NK-Zell-Rezeptoren auf (7). Während diese Zellen einer NK-Zell-vermittelten Lyse zugänglich sein müssten, scheinen maligne Plasmazellen in der späteren Phase der Erkrankung der NK-Zell-vermittelte Lyse entzogen, da sie eine reduzierte Expression der Liganden für aktivierende Rezeptoren bei gleichzeitig hoher Expression von MHC I zeigen. Ein vergleichbarer Phänotyp liegt bei den hier untersuchten Myelomzelllinien (L363, RPMI 8226, INA-6) des multiplen Myeloms vor. Die drei Zelllinien exprimieren MHC I auf der Oberfläche, wobei die Stärke der Expression im Vergleich unterschiedlich hoch ist (L363 > INA-6 > RPMI 8226). Demnach sollten diese Zielzellen in der Lage sein, NK-Zellen gesunder Spender mit entsprechenden KIR-Phänotypen zu inhibieren. Zudem konnte die Ex-

4. DISKUSSION

pression bekannter Liganden für die aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren NKG2D und DNAM-1 gezeigt werden, so dass die Myelomzelllinien somit als Zielzellen für die NK-Zell-vermittelte Lyse in Frage kommen.

Nachdem die NK-Zell-vermittelte Lyse einiger Myelomzelllinien insbesondere durch die aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren DNAM-1 sowie NKG2D vermittelt wird (113), wurde die Oberflächenexpression der entsprechenden Liganden für DNAM-1 sowie NKG2D auf Seite der Myelomzelllinien L363, RPMI 8226 und INA-6 durchflusszytometrisch bestimmt. Während für einige Myelomzelllinien (JJN3, U226B und KMS11) gezeigt wurde, dass diese Zelllinien entweder DNAM-1 oder NKG2D-Liganden tragen (113), exprimieren die hier untersuchten Zelllinien gleichzeitig sowohl NKG2D als auch DNAM-1 Liganden.

Nectin-2 (CD112) sowie der Poliovirusrezeptor (PVR, CD155), beides Liganden für DNAM-1, sind auf den drei Zelllinien unterschiedlich stark exprimiert (L363 > RPMI 8226 > INA-6). Im Vergleich zu den DNAM-1 Liganden sind die NKG2D Liganden (ULBP 1-6 sowie MIC A und MIC B) etwas stärker exprimiert (RPMI 8226 > L363 > INA 6). Im Gegensatz zu L363 und RPMI 8226 weist die Zelllinie INA-6 sowohl für die DNAM-1- als auch für die NKG2D-Liganden die niedrigste Oberflächenexpression auf. Möglicherweise bedingt diese niedrige Expression der NK-Zell-Liganden bei gleichzeitig hoher Expression von MHC I die mangelhafte Aktivierung von NK Zellen, welche in einer nur minimalen lytischen Aktivität resultierte. So wurden INA-6 Zellen selbst bei einem Effektor- zu Zielzellverhältnis von 5:1 nur zu 0,3% lysiert. Ein ähnlicher auffälliger Einfluss der Expressionsdichte von NKG2D-Liganden auf die Höhe der NK-Zell-vermittelten Lyse konnte auch bei anderen Tumorzelllinien (K562: NKG2D-Liganden hoch exprimiert, hohe Lyserate vs. Raji: NKG2D-Liganden schwach exprimiert, niedrige Lyserate) beobachtet werden (104).

Eine Voraktivierung der NK-Zellen resultierte in einer erhöhten lytischen Aktivität der mit IL-2 bzw. IL-15 behandelten NK-Zellen gegenüber den verwendeten Zielzellen sowohl der Myelomzelllinie INA-6, RPMI 8226 als auch L363. Die Lyserate bei der durch unstimulierte NK-Zellen nicht bzw. nur schwer lysierbare Linie INA-6 war jedoch auch bei Interleukin-behandelten NK-Zellen trotz einem Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 5:1 nur leicht auf maximal 3,5% erhöht (unstimuliert 0,3%, IL-2 1%, IL-15 3,5%), was jedoch im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen einer Verstärkung

4. DISKUSSION

der Lyse bei IL-15 behandelten NK-Zellen um den Faktor 10 entspricht. Eine 3- bis 4-fach erhöhte Lyse konnte bei RPMI 8226 Zellen durch Voraktivierung der NK-Zellen erzielt werden (unstimuliert 3% vs. IL-15 14%). Die bereits einer Lyse durch unstimulierte NK-Zellen zugängliche Zelllinie L363 zeigte dem gegenüber einen geringeren Anstieg der Lyserate in Abhängigkeit von der Interleukin-Behandlung der NK-Zellen (unstimuliert 17%, IL-2 26%, IL-15 32%). Insbesondere bei nur schlecht durch NK-Zellen lysierbaren Zielzellen scheint die Zytokin-vermittelte Voraktivierung der Effektorzellen und das daraus resultierende erhöhte zytotoxische Potential der NK-Zellen demnach zu einer Verstärkung der Effektivität zu führen.

Die Blockierung der NK-Zell-Rezeptoren DNAM-1 und NKG2D durch monoklonale Antikörper führte zu einer Reduktion der NK-Zell-vermittelten Lyse der L363 Zielzellen. Während die NKG2D-Blockade zu einer Reduktion der Lyse um 57% führte, konnte eine 82%-ige Inhibition der Lyse durch Blockieren von DNAM-1 erzielt werden. Demnach sind die Liganden für DNAM-1 und NKG2D nicht nur simultan auf L363 exprimiert, sondern haben beide auch einen Anteil an der NK-Zell-vermittelten Lyse der Zellen. Der auffällige Unterschied in der Höhe der NK-Zell-Inhibition (DNAM-1 > NKG2D) mag auf die unterschiedlich hohe Oberflächenexpression von DNAM-1 und NKG2D auf den NK-Zellen zurückzuführen sein (DNAM-1: MFI 14,2 vs. NKG2D: MFI 3,5).

Der Einfluss der NK-Zell-Rezeptoren NKp30, NKp40 und NKp46 auf die Lyse der Zelllinie L363 wurde ebenfalls untersucht, da die Aktivierung von NK-Zellen durch Kostimulation mehrerer aktivierender Rezeptoren vermittelt wird (114). Im Vergleich zur Reduktion der Lyserate bei Blockade von NKG2D und DNAM-1 wird die Lyse von L363 bei der Antikörper-vermittelten Blockade der NK-Zell-Rezeptoren NKp30, NKp44 und NKp46 nur zu geringen Anteil verringert (NKp30 28%, NKp44 26%, NKp46 25%). Demnach dominieren die über NKG2D und DNAM-1 vermittelten aktivierende Signale hier die zytotoxische Potenz der NK-Zellen. Neben der geringen Expression dieser NK-Zell-Rezeptoren auf den NK-Zellen mag insbesondere die Expressionshöhe ihrer jeweiligen Liganden auf den Zielzellen ursächlich hierfür sein.

Durch Voraktivierung der NK-Zellen scheint der aktivierende Einfluss der NK-Zell-Rezeptoren NKp30, NKp44 und NKp46 zudem vermindert zu sein, da die Reduktion der Zielzellyse durch Blockade dieser Rezeptoren geringer ist als bei nicht aktivier-

4. DISKUSSION

ten NK-Zellen. Obwohl die Lyse der Zielzellen durch DNAM-1 Blockade weiterhin bei IL-2 behandelten NK-Zellen reduziert ist, führt der DNAM-1 Antikörper bei IL-15 voraktivierte NK-Zellen nur zu einer vergleichsweise geringen Reduktion der Lyserate (IL-2: 75% vs. IL-15: 21% Lysereduktion). Dies könnte darauf hindeuten, dass bei den Zytokin-behandelten, insbesondere den IL-15 aktivierten NK-Zellen, andere als die hier untersuchten NK-Zell-Rezeptoren für die Signalperzeption in der Synapse zwischen NK- und Zielzelle wichtig sind.

Die sich der Aktivierung anschließende Signalweiterleitung sowie die hieraus resultierenden Prozesse, d.h. die Polarisation und Degranulation der NK-Zelle, könnten ebenso durch die Zytokin-vermittelte Voraktivierung beeinflusst sein. Sowohl der IL-15 Rezeptor, als auch NKG2D vermitteln die aktivierenden Signale über ein gemeinsames Adapter-Protein (DAP10) (115). Folglich könnte hier eine IL-15 Stimulation der NK-Zellen zu einem erhöhten Anteil phosphorylierten Adapter-Proteins, d.h. einer Voraktivierung dieses Signalwegs der Zelle führen, so dass wenig über NKG2D-vermittelte Signale ausreichend sein könnten, um ein für die Degranulation der NK-Zelle ausreichend starkes aktivierendes Signal zu generieren.

4.4 HLA/KIR-Wechselwirkung beeinflusst Lyse der Zielzellen

INA-6, eine weitere humane Plasmazellleukämiezelllinie, wurde von allen eingesetzten Zielzellen am schlechtesten abgetötet. Eine Erklärung ist die hohe, schützende HLA-Expression bei im Vergleich zu RPMI 8226 und L363 geringer Expression von NKG2D- und DNAM-1-Liganden. Des Weiteren trägt INA-6 mit HLA-Bw4 ein Antigen auf der Oberfläche, welches durch den häufig vorkommenden inhibierenden KIR3DL1 erkannt wird. Vergleichsergebnisse zur natürlichen Zytotoxizität gegen INA-6 wurden bisher nicht publiziert. Für IL-2-voraktivierte transgene KIR3DL1⁺ NK-Zellen einer NK-Leukämiezelllinie wurde eine mit 5% ähnlich geringe Lyse der HLA-Bw4⁺ Zelllinie 721.221 beobachtet (116), so dass auch bei INA-6 eine vergleichsweise starke Inhibition der NK-Zellen mit dem KIR3DL1 Phänotyp vorliegen könnte. Eine Antikörper-vermittelte Blockade des KIR3DL1 auf Seite der NK-Zellen bzw. des entsprechenden HLA-BW4 bei INA-6 Zellen könnte einen Beleg für diese Vermutung liefern.

4. DISKUSSION

Eine mögliche Erklärung für die geringe Lyse der HLA-Cw2⁺ Zelllinie RPMI 8226 ist eine HLA-KIR-Inhibition, da alle untersuchten Spender positiv für den korrespondierenden inhibitorischen KIR2DL1 waren. Die Lysezunahme nach Voraktivierung der NK-Zellen mit IL-2 oder IL-15 kann wahrscheinlich, wie bei K-562, auf die gesteigerte Expression aktivierender Rezeptoren nach IL-Stimulation zurückgeführt werden. Dabei spielen nicht-HLA-Ia-spezifische Rezeptoren, wie NKG2D oder DNAM-1, eine größere Rolle als der aktivierende Rezeptor KIR2DS1, da es zu einem deutlicheren Expressionsanstieg dieser Rezeptoren nach IL-Voraktivierung kam. Ein weiterer Anhaltspunkt dafür ist der hier festgestellte fehlende Zusammenhang zwischen *responder*-Status für RPMI 8226 und KIR2DS1-Phänotyp.

Die Myelomzelllinie L363 exprimiert die HLA-C1-Allele Cw3 und Cw7, welche mit den inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren KIR2DL2 und KIR2DL3 interagieren. Daher wurde eine Korrelation der Daten zur NK-Zell-vermittelten Lyse der Zelllinie L363 mit den KIR-Phänotypen der NK-Zell-Spender vorgenommen. Ein signifikanter Anteil der Spender (7 von 8), die phänotypisch negativ für den inhibierenden Rezeptor KIR2DL2 sind, zeigten eine erhöhte Lyserate der Zielzellen. Dem gegenüber befanden sich in der KIR2DL2 exprimierenden Gruppe vermehrt Spender (9 von 13), deren NK-Zellen nicht bzw. kaum in der Lage waren L363 Zielzellen zu lysieren.

Da die geringere Korrelation zwischen Lyse der HLA⁺ Myelomzelllinie L363 und der Expression der korrespondierenden KIR nach IL-Voraktivierung auf einen IL-bedingten reduzierten Einfluss der HLA-KIR-Inhibition auf die Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber MM-Zellen hinweist, stellt die Voraktivierung der NK-Zellen mittels IL-2 oder IL-15 eine vielversprechende Möglichkeit dar, um den HLA-Klasse-I-vermittelten Schutz der MM-Zellen vor NK-Zytotoxizität auch *in vivo* zu überwinden. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang auch die Kombination einer Voraktivierung der NK-Zellen und des Einsatzes von Medikamenten, welche die HLA-Expression der MM-Zellen senken, um so den inhibierenden HLA-Einfluss weiter zu mindern und die Eliminierung residueller Tumorzellen zu steigern. In Frage käme etwa der Proteasom-Inhibitor Bortezomib, welcher die HLA-Expression auf der Zelloberfläche von MM-Zellen vermindert und so die Lyse sowohl durch autologe als auch allogene NK-Zellen steigern kann (117).

Zusammenfassend betrachtet scheint die NK-Zell-vermittelte Lyse von Myelomzellen durch das Ausmaß der HLA-Expression sowie deren HLA-Typ limitiert zu sein. Im Vergleich zur „HLA-schwachen“ Zelllinie K-562 ist demnach neben der Höhe der NCR-Ligandenexpression eine HLA-KIR-Diskrepanz zwischen Myelomzelle und NK-Zellen entscheidend für eine adäquate Lyse. Der Lysezuwachs nach IL-Stimulation wird wahrscheinlich dennoch über den Expressionsanstieg nicht-HLA-Ia-spezifischer NK-Zellrezeptoren und weniger über die Zunahme der Expression aktivierender KIR vermittelt. Diese Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass durch die Auswahl geeigneter HLA-KIR-diskrepanter Spender für allogene NK-Zellen und zusätzliche IL-Voraktivierung die Inhibierung der autologen NK-Zellen bei MM-Patienten überwunden werden kann.

4.5 Keine Änderung des KIR-Phänotyps durch NK-Zellstimulation

Für die beobachtete Zunahme der NK-Zell-vermittelten natürlichen Zytotoxizität durch kurzzeitige Voraktivierung der NK-Zellen könnte eine Veränderung der Oberflächenexpression aktivierender oder inhibierender NK-Zell-Rezeptoren verantwortlich sein. Hierdurch würde sich bei der Interaktion von NK-Zell-Rezeptoren und Liganden auf Seite der Zielzellen ein verändertes Verhältnis aktivierender und inhibierender Signale zu Gunsten der NK-Zell-Aktivierung und damit der Zelllyse ergeben.

Die quantitative Analyse der Oberflächenexpression der KIR-Rezeptoren mittels Durchflusszytometrie lässt auf einen leichten Anstieg der Oberflächendichte aller untersuchter KIR durch IL-2 bzw. IL-15 vermittelte Voraktivierung der NK-Zellen schließen. Da sich die aktivierende (DS) und inhibierende (DL) Varianten eines KIR Moleküls in ihren intrazellulären Domänen, nicht jedoch den auf der Zelloberfläche präsentierten Aminosäuren unterscheiden, konnte hierbei jedoch nicht zwischen diesen Varianten differenziert werden.

Die IL-vermittelte Expressionssteigerung von KIR2DL1/2DS1 (CD158a/h) steht im Einklang mit den Daten von Decot et al. (118). Neben KIR2DL1/2DS1 konnte auch eine gesteigerte Expression für KIR2DL2/2DL3/2DS2 (CD158b1/b2/j) nachgewiesen werden. Diese Beobachtung deckt sich erneut mit den Ergebnissen von Hromadni-

4. DISKUSSION

kova et al. (110). In dieser Arbeit wurde sowohl nach Voraktivierung mit IL-2 als auch mit IL-15 über Nacht eine erhöhte MFI von CD158e1/e2 nachgewiesen.

Da die Transkription der meisten KIR, inklusive KIR3DL1/3DS1, durch strukturell sehr ähnliche Promotoren reguliert werden (119,120) und eine Aktivierung speziell des KIR3DL1-Promotors durch IL-2 und IL-15 von Presnell et al. beschrieben wurde (121), erscheint eine Expressionssteigerung von KIR3DL1/3DS1 durch IL-2- bzw. IL-15-Voraktivierung ähnlich wie bei KIR2DL1/2DS1 und KIR2DL2/2DL3/2DS2 logisch.

Qualitativ konnte der KIR Typ der NK-Zellen verschiedener gesunder Spender mittels RT-PCR untersucht werden. Die Analysen zeigten, dass der KIR-Typ der NK-Zellen desselben Spenders vor und nach IL-2 bzw. IL-15 Voraktivierung sowie nach einer mehrtägigen Expansion unverändert ist. Folglich kommt es durch eine IL-2/IL-15 Behandlung der NK-Zellen zu einer geringfügig erhöhten Expression der KIR-Moleküle bei gleichbleibendem KIR-Phänotyp. Demnach sollten NK-Zellen auch nach Voraktivierung gegenüber Zielzellen, welche keine oder nur eine geringe Expression der aktivierenden NK-Zell-Rezeptorliganden aufweisen, inhibiert sein. Die exemplarisch als Zielzellen eingesetzten autologen B-Zellen wurden nicht durch Zytokin-aktivierte NK-Zellen lysiert, so dass die IL-2 bzw. IL-15 Voraktivierung der NK-Zellen nachweislich nicht zu einer Autoreaktivität führt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Zytotoxizität Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) wird über inhibierende und aktivierende Signale reguliert. Eine Aktivierung der NK-Zellen findet durch Interaktion der natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (*Natural Cytotoxicity Receptors*, NCR) und ihren korrespondierenden Liganden statt, die von gestressten oder malignen Zellen exprimiert werden. Inhibiert werden NK-Zellen durch die Wechselwirkung inhibitorischer Immunglobulin-ähnlicher Killerzellrezeptoren (*Killer cell Immunoglobulin-like Receptors*, KIR) und den korrespondierenden humanen Leukozytenantigen-(*Human Leukocyte Antigen*, HLA)-Klasse-I-Molekülen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer 16-stündigen Voraktivierung der NK-Zellen mittels Interleukin-(IL)-2 oder IL-15 auf das zytotoxische Potential dieser Effektorzellpopulation analysiert. Um einen inhibierenden Einfluss der KIR-HLA-Interaktion auf die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität auszuschließen, wurden zunächst HLA schwach exprimierende K-562 als Zielzellen verwendet. Im Vergleich zu unbehandelten NK-Zellen stieg die Lyse der Zelllinie K-562 nach IL-2- bzw. IL-15-vermittelter Voraktivierung der Effektorzellen signifikant an. Eine äquivalente, durch Voraktivierung der NK-Zellen induzierte, verstärkte Lyse konnte auch für drei Zelllinien des Multiplen Myeloms (INA-6, RPMI 8226, L363) als Zielzellen erzielt werden.

Im Gegensatz zu K-562-Zellen weisen die Myelomzelllinien INA-6, RPMI 8226 und L363 eine vergleichsweise hohe Expressionsdichte von HLA-Moleküle auf der Zelloberfläche auf, so dass von einer Inhibition der NK-Zellen mit entsprechendem KIR-Muster auszugehen ist. Die jeweiligen KIR-Phänotypen der NK-Zell-Donoren wurden auf Transkriptionsebene ermittelt. Die Korrelation des KIR-Typs mit dem zytotoxischen Potential der NK-Zellen weist darauf hin, dass im Fall eines KIR-MHC Mismatch (KIR2DL2⁻ Donor) die Lyse der HLA-Cw3/Cw7-positiven L363-Zellen besonders hoch ausfällt. Während die Oberflächenexpression der KIR auf den NK-Zellen nach Voraktivierung nur gering erhöht war, blieb der KIR-Phänotyp der NK-Zellen durch Voraktivierung bei allen untersuchten Spendern unbeeinflusst.

Nachdem die IL-2 bzw. IL-15 vermittelte Kurzzeitaktivierung die natürliche Zytotoxizität der NK-Zellen erhöht, ihre KIR-vermittelte Inhibition gegenüber gesunden Körperzellen jedoch unverändert bleibt, könnten voraktivierte NK-Zellen KIR-HLA-diskrepanter Donor eine wirkungsvolle NK-Zell-Quelle sein, um residuelle Tumorzellen bei Patienten in Remission zu eliminieren.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Dietel, M., Suttorp, N., Zeitz, M., *Harrisons Innere Medizin*, 18. Auflage, ABW Wissenschaftsverlag, Berlin; 2012, 1007-1014.
2. Multiples Myelom — Onkopedia [Internet]. Available from: <http://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/multiples-myelom>
3. Fernández de Larrea, C., Kyle, R.A., Durie, B.G.M., Ludwig, H., Usmani, S., Vesole, D.H., Hajek, R., San Miguel, J.F., Sezer, O., Sonneveld, P., Kumar, S.K., Mahindra, A., Comenzo, R., Palumbo, A., Mazumber, A., Anderson, K.C., Richardson, P.G., Badros, A.Z., Caers, J., Cavo, M., LeLeu, X., Dimopoulos, M.A., Chim, C.S., Schots, R., Noeul, A., Fantl, D., Mellqvist, U.H., Landgren, O., Chanan-Khan, A., Moreau, P., Fonseca, R., Merlini, G., Lahuerta, J.J., Bladé, J., Orlowski, R.Z., Shah, J.J., Plasma cell leukemia: consensus statement on diagnostic requirements, response criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group. *Leukemia*; 2013;27(4):780–91.
4. Greipp, P.R., San Miguel, J., Durie, B.G.M., Crowley, J.J., Barlogie, B., Bladé, J., Boccadoro, M., Child, J.A., Avet-Loiseau, H., Kyle, R.A., Lahuerta, J.J., Ludwig, H., Morgan, G., Powles, R., Shimizu, K., Shustik, C., Sonneveld, P., Tosi, P., Turesson, I., Westin, J., International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005;23(15):3412–20.
5. McCarthy, P.L., Hahn, T., Strategies for induction, autologous hematopoietic stem cell transplantation, consolidation, and maintenance for transplantation-eligible multiple myeloma patients. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013(1):496–503.
6. Klingemann, H., Grodman, C., Cutler, E., Duque, M., Kadidlo, D., Klein, A.K., Sprague, K.A., Miller, K.B., Comenzo, R.L., Kewalramani, T., Yu, N., Van Etten, R.A., McKenna, D.H., Autologous stem cell transplant recipients tolerate haploidentical related-donor natural killer cell-enriched infusions. *Transfusion*. 2013;53(2):412–8
7. Carbone, E., Neri, P., Mesuraca, M., Fulciniti, M.T., Otsuki, T., Pende, D., Groh, V., Spies, T., Pollio, G., Cosman, D., Catalano, L., Tassone, P., Rotoli, B., Venuta, S., HLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells. *Blood*. 2005;105(1):251–8.
8. Ruggeri, L., Mancusi, A., Capanni, M., Urbani, E., Carotti, A., Aloisi, T., Stern, M., Pende, D., Perruccio, K., Burchielli, E., Topini, F., Bianchi, E., Aversa, F., Martelli, M.F., Velardi, A., Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood*. 2007;110(1):433–40.

6. LITERATURVERZEICHNIS

9. Hanahan, D., Weinberg, R.A., Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
10. Viel, S., Charrier, E., Marçais, A., Rouzaire, P., Bienvenu, J., Karlin, L., Salles, G., Walzer, T., Monitoring NK cell activity in patients with hematological malignancies. *Oncoimmunology*. 2013;2(9):e26011.
11. Wen, J., Tao, W., Kuitse, I., Lin, P., Feng, Y., Jones, R.J., Orlowski, R.Z., Zu, Y., Dynamic balance of multiple myeloma clonogenic side population cell percentages controlled by environmental conditions. *Int J Cancer*. 2014; 136(5): 991-1002
12. Von Lilienfeld-Toal, M., Frank, S., Leyendecker, C., Feyler, S., Jarmin, S., Morgan, R., Glasmacher, A., Märten, A., Schmidt-Wolf, I.G., Brossart, P., Cook, G., Reduced immune effector cell NKG2D expression and increased levels of soluble NKG2D ligands in multiple myeloma may not be causally linked. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59(6):829–39.
13. Matzinger, P., The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002;296(5566):301–5.
14. Murphy, K.M., Travers, P., Walport, M.. *Janeway Immunologie*. 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; 2009, 53-581.
15. Medzhitov, R., Janeway, C.A., Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*. 1997; 9(1):4-9
16. Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H., “Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*. 1975;5(2):112–7.
17. Caligiuri, M.A., Human natural killer cells. *Blood*. 2008;112(3):461–9.
18. Lanier, L.L., Cwirla, S., Federspiel, N., Phillips, J.H., Human natural killer cells isolated from peripheral blood do not rearrange T cell antigen receptor beta chain genes. *J Exp Med*. 1986;163(1):209–14.
19. Westermann, J., Pabst, R., Distribution of lymphocyte subsets and natural killer cells in the human body. *Clin Investig*. 1992;70(7):539-44.
20. Zhang, Y., Wallace, D.L., de Lara, C.M., Ghattas, H., Asquith, B., Worth, A., Griffin, G.E., Taylor, G.P., Tough, D.F., Beverley, P.C., Macallan, D.C., In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology*. 2007;121(2):258–65.
21. Lanier, L.L., Testi, R., Bindl, J., Phillips, J.H., Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med*. 1989;169(6):2233–8.

6. LITERATURVERZEICHNIS

22. Ritz, J., Schmidt, R.E., Michon, J., Hercend, T., Schlossman, S.F., Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv Immunol.* 1988;42:181–211.
23. Unkeless, J.C., Scigliano, E., Freedman, V.H., Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu Rev Immunol.* 1988;6:251–81.
24. Ljunggren, H.G., Malmberg, K.J., Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(5):329–39.
25. Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Caligiuri, M.A., The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001(11):633–40.
26. Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Ponnappan, A., Mehta, V., Wewers, M.D., Caligiuri, M.A., Interleukin-1beta costimulates interferon-gamma production by human natural killer cells. *Eur J Immunol.* 2001;31(3):792–801.
27. Carson, W.E., Lindemann, M.J., Baiocchi, R., Linett, M., Tan, J.C., Chou, C.C., Narula, S., Caligiuri, M.A., The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. *Blood.* 1995;85(12):3577–85.
28. Desai, B.B., Quinn, P.M., Wolitzky, A.G., Mongini, P.K., Chizzonite, R., Gately, M.K., IL-12 receptor. II. Distribution and regulation of receptor expression. *J Immunol.* 1992;148(10):3125–32.
29. Carson, W.E., Giri, J.G., Lindemann, M.J., Linett, M.L., Ahdieh, M., Paxton, R., Anderson, D., Eisenmann, J., Grabstein, K., Caligiuri, M.A., Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med.* 1994;180(4):1395–403.
30. Kunikata, T., Torigoe, K., Ushio, S., Okura, T., Ushio, C., Yamauchi, H., Ikeda, M., Ikegami, H., Kurimoto, M., Constitutive and induced IL-18 receptor expression by various peripheral blood cell subsets as determined by anti-hIL-18R monoclonal antibody. *Cell Immunol.* 1998;189(2):135–43.
31. Sutlu, T., Alici, E., Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *J Intern Med.* 2009;266(2):154–81.
32. Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P., Diefenbach, A., Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity.* 2007;26(4):503–17.
33. Handa, K., Suzuki, R., Matsui, H., Shimizu, Y., Kumagai, K., Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin 2 (IL 2). II. IL 2-induced interferon gamma production. *J Immunol.* 1983;130(2):988–92.
34. Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E., Valiante, N.M., Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med.* 2002;195(3):335–41.

6. LITERATURVERZEICHNIS

35. André, P., Biassoni, R., Colonna, M., Cosman, D., Lanier, L.L., Long, E.O., Lopez-Botet, M., Moretta, A., Moretta, L., Parham, P., Trowsdale, J., Vivier, E., Wagtmann, N., Wilson, M.J., New nomenclature for MHC receptors. *Nat Immunol.* 2001;2(8):661.
36. Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M.C., Biassoni, R., Moretta, L., Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.*; 2001;19:197–223.
37. Cantoni, C., Bottino, C., Vitale, M., Pessino, A., Augugliaro, R., Malaspina, A., Parolini, S., Moretta, L., Moretta, A., Biassoni, R., NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med.* 1999;189(5):787–96.
38. Pessino, A., Sivori, S., Bottino, C., Malaspina, A., Morelli, L., Moretta, L., Biassoni, R., Moretta, A., Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med.* 1998;188(5):953–60.
39. Vilches, C., Parham, P., KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:217–51.
40. Parham, P., Norman, P.J., Abi-Rached, L., Guethlein, L.A., Variable NK cell receptors exemplified by human KIR3DL1/S1. *J Immunol.* 2011;187(1):11–9.
41. Miller, J.S., McCullar, V., Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2. *Blood.* 2001;98(3):705–13.
42. Valiante, N.M., Uhrberg, M., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K., Arnett, K.L., D'Andrea, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., Parham, P., Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity.* 1997;7(6):739–51.
43. Long, E.O., Barber, D.F., Burshtyn, D.N., Faure, M., Peterson, M., Rajagopalan, S., Renard, V., Sandusky, M., Stebbins, C.C., Wagtmann, N., Watzl, C., Inhibition of natural killer cell activation signals by killer cell immunoglobulin-like receptors (CD158). *Immunol Rev.* 2001;181:223–33.
44. Winter, C.C., Long, E.O., A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. *J Immunol.* 1997;158(9):4026–8.
45. Gumperz, J.E., Litwin, V., Phillips, J.H., Lanier, L.L., Parham, P., The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *J Exp Med.* 1995;181(3):1133–44.

6. LITERATURVERZEICHNIS

46. Pende, D., Biassoni, R., Cantoni, C., Verdiani, S., Falco, M., di Donato, C., Accame, L., Bottino, C., Moretta, A., Moretta, L., The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J Exp Med.* 1996;184(2):505–18.
47. Kikuchi-Maki, A., Catina, T.L., Campbell, K.S., Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK cells through association with the Fc receptor $\{\gamma\}$ protein. *J Immunol.* 2005;174(7):3859–63.
48. Rajagopalan, S., Long, E.O., A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med.* 1999;189(7):1093–100.
49. Estefanía, E., Flores, R., Gómez-Lozano, N., Aguilar, H., López-Botet, M., Vilches, C., Human KIR2DL5 is an inhibitory receptor expressed on the surface of NK and T lymphocyte subsets. *J Immunol.* 2007;178(7):4402–10.
50. Stewart, C.A., Laugier-Anfossi, F., Vély, F., Saulquin, X., Riedmuller, J., Tisserant, A., Gauthier, L., Romagné, F., Ferracci, G., Arosa, F.A., Sun, P.D., Vivier, E., Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(37):13224–9.
51. Liu, J., Xiao, Z., Ko, H.L., Shen, M., Ren, E.C., Activating killer cell immunoglobulin-like receptor 2DS2 binds to HLA-A*11. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(7):2662–7.
52. Moretta, L., Bottino, C., Pende, D., Castriconi, R., Mingari, M.C., Moretta, A., Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Semin Immunol.* 2006;18(3):151–8.
53. Katz, G., Markel, G., Mizrahi, S., Arnon, T.I., Mandelboim, O., Recognition of HLA-Cw4 but not HLA-Cw6 by the NK cell receptor killer cell Ig-like receptor two-domain short tail number 4. *J Immunol.* 2001;166(12):7260–7.
54. Gómez-Lozano, N., Estefanía, E., Williams, F., Halfpenny, I., Middleton, D., Solís, R., Vilches, C., The silent KIR3DP1 gene (CD158c) is transcribed and might encode a secreted receptor in a minority of humans, in whom the KIR3DP1, KIR2DL4 and KIR3DL1/KIR3DS1 genes are duplicated. *Eur J Immunol.* 2005;35(1):16–24.
55. Luo, L., Du, Z., Sharma, S.K., Cullen, R., Spellman, S., Reed, E.F., Rajalingam, R., Chain-terminating natural mutations affect the function of activating KIR receptors 3DS1 and 2DS3. *Immunogenetics.* 2007;59(10):779–92.
56. Braud, V.M., Allan, D.S., O’Callaghan, C.A., Söderström, K., D’Andrea, A., Ogg, G.S., Lazetic, S., Young, N.T., Bell, J.I., Phillips, J.H., Lanier, L.L.,

6. LITERATURVERZEICHNIS

- McMichael, A.J., HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*. 1998;391(6669):795–9.
57. Posch, P.E., Borrego, F., Brooks, A.G., Coligan, J.E., HLA-E is the ligand for the natural killer cell CD94/NKG2 receptors. *J Biomed Sci*. 1998;5(5):321–31.
58. Cosman, D., Müllberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., Chalupny, N.J., ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*. 2001;14(2):123–33.
59. Kim, D.K., Kabat, J., Borrego, F., Sanni, T.B., You, C., Coligan, J.E., Human NKG2F is expressed and can associate with DAP12. *Mol Immunol*. 2004;41(1):53–62.
60. Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A., Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med*. 1999;190(10):1505–16.
61. Brandt, C.S., Baratin, M., Yi, E.C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C.D., Kaifu, T., Chabannon, C., Moretta, A., West, R., Xu, W., Vivier, E., Levin, S.D., The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med*. 2009;206(7):1495–503.
62. Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L., Moretta, A., 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(12):2065–72.
63. Baychelier, F., Sennepin, A., Ermonval, M., Dorgham, K., Debré, P., Vieillard, V., Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Blood*. 2013;122(17):2935–42.
64. Welte, S., Kuttruff, S., Waldhauer, I., Steinle, A., Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nat Immunol*. 2006;7(12):1334–42.
65. López-Cabrera, M., Santis, A.G., Fernández-Ruiz, E., Blacher, R., Esch, F., Sánchez-Mateos, P., Sánchez-Madrid, F., Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J Exp Med*. 1993;178(2):537–47.
66. Wang, P.L., O'Farrell, S., Clayberger, C., Krensky, A.M., Identification and molecular cloning of tactile. A novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily. *J Immunol*. 1992;148(8):2600–8.

6. LITERATURVERZEICHNIS

67. Chan, C.J., Martinet, L., Gilfillan, S., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Chow, M.T., Town, L., Ritchie, D.S., Colonna, M., Andrews, D.M., Smyth, M.J., The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nat Immunol.* 2014;15(5):431–8.
68. Shibuya, A., Campbell, D., Hannum, C., Yssel, H., Franz-Bacon, K., McClanahan, T., Kitamura, T., Nicholl, J., Sutherland, G.R., Lanier, L.L., Phillips, J.H., DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity.* 1996;4(6):573–81.
69. Shiroishi, M., Tsumoto, K., Amano, K., Shirakihara, Y., Colonna, M., Braud, V.M., Allan, D.S., Makadzange, A., Rowland-Jones, S., Willcox, B., Jones, E.Y., van der Merwe, P.A., Kumagai, I., Maenaka, K., Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(15):8856–61.
70. Lanier, L.L., Corliss, B.C., Wu, J., Leong, C., Phillips, J.H., Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature.* 1998;391(6668):703–7.
71. Biassoni, R., Pessino, A., Malaspina, A., Cantoni, C., Bottino, C., Sivori, S., Moretta, L., Moretta, A., Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50.1 and p58.1 receptors for HLA-Cw4 molecules. *Eur J Immunol.* 1997;27(12):3095–9.
72. Parham, P., MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(3):201–14.
73. Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J.P., Lanier, L.L., Phillips, J.H., Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol.* 1996;157(11):4741–5.
74. Lanier, L.L., Corliss, B., Wu, J., Phillips, J.H., Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity.* 1998;8(6):693–701.
75. Sivori, S., Pende, D., Bottino, C., Marcenaro, E., Pessino, A., Biassoni, R., Moretta, L., Moretta, A., NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol.* 1999;29(5):1656–66.
76. Vitale, M., Falco, M., Castriconi, R., Parolini, S., Zambello, R., Semenzato, G., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A., Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells. *Eur J Immunol.* 2001;31(1):233–42.
77. Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., Cantoni, C., Grassi, J., Marcenaro, S., Reymond, N., Vitale, M., Moretta, L.,

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Lopez, M., Moretta, A., Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med.* 2003;198(4):557–67.
78. Pende, D., Spaggiari, G.M., Marcenaro, S., Martini, S., Rivera, P., Capobianco, A., Falco, M., Lanino, E., Pierri, I., Zambello, R., Bacigalupo, A., Mingari, M.C., Moretta, A., Moretta, L., Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood.* 2005;105(5):2066–73.
79. Fehniger, T.A., Shah, M.H., Turner, M.J., VanDeusen, J.B., Whitman, S.P., Cooper, M.A., Suzuki, K., Wechser, M., Goodsaid, F., Caligiuri, M.A., 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(8):4511–20.
80. Poli, A., Michel, T., Thérésine, M., Andrès, E., Hentges, F., Zimmer, J., CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology.* 2009;126(4):458–65.
81. Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.I., Loken, M.R., Phillips, J.H., The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* 1986;136(12):4480–6.
82. Mavilio, D., Lombardo, G., Benjamin, J., Kim, D., Follman, D., Marcenaro, E., O'Shea, M.A., Kinter, A., Kovacs, C., Moretta, A., Fauci, A.S., Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(8):2886–91.
83. Borrego, F., Alonso, M.C., Galiani, M.D., Carracedo, J., Ramirez, R., Ostos, B., Peña, J., Solana, R., NK phenotypic markers and IL2 response in NK cells from elderly people. *Exp Gerontol.* 1999;34(2):253–65.
84. Nagler, A., Lanier, L.L., Cwirla, S., Phillips, J.H., Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol.* 1989;143(10):3183–91.
85. Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., Sykora, K.W., Schmidt, R.E., CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol.* 2001;31(10):3121–7.
86. Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaheri, B.A., Ghayur, T., Carson, W.E., Caligiuri, M.A., Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood.* 2001;97(10):3146–51.
87. André, P., Spertini, O., Guia, S., Rihet, P., Dignat-George, F., Brailly, H., Sampol, J., Anderson, P.J., Vivier, E., Modification of P-selectin glycoprotein

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ligand-1 with a natural killer cell-restricted sulfated lactosamine creates an alternate ligand for L-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(7):3400–5.
88. Vitale, M., Zimmer, J., Castriconi, R., Hanau, D., Donato, L., Bottino, C., Moretta, L, de la Salle, H, Moretta, A., Analysis of natural killer cells in TAP2-deficient patients: expression of functional triggering receptors and evidence for the existence of inhibitory receptor(s) that prevent lysis of normal autologous cells. *Blood.* 2002;99(5):1723–9.
89. Caligiuri, M.A., Zmuidzinas, A., Manley, T.J., Levine, H., Smith, K.A., Ritz, J., 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(5):1509–26.
90. Baume, D.M., Robertson, M.J., Levine, H., Manley, T.J., Schow, P.W., Ritz, J., Differential responses to interleukin 2 define functionally distinct subsets of human natural killer cells. *Eur J Immunol.* 1992;22(1):1–6.
91. Caligiuri, M.A., Murray, C., Robertson, M.J., Wang, E., Cochran, K., Cameron, C., Schow, P., Ross, M.E., Klumpp, T.R., Soiffer, R.J., Selective modulation of human natural killer cells in vivo after prolonged infusion of low dose recombinant interleukin 2. *J Clin Invest.* 1993;91(1):123–32.
92. Darmon, A.J., Nicholson, D.W., Bleackley, R.C., Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature.* 1995;377(6548):446–8.
93. Clément, M.V., Haddad, P., Soulié, A., Legros-Maida, S., Guillet, J., Cesar, E., Sasportes, M., Involvement of granzyme B and perforin gene expression in the lytic potential of human natural killer cells. *Res Immunol.* 1990;141(6):477–89.
94. Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I.M., Azzoni, L., Alnemri, E.S., Perussia, B., Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med.* 1998;188(12):2375–80.
95. Langers, I., Renoux, V.M., Thiry, M., Delvenne, P., Jacobs, N., Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis. *Biologics.* 2012;6:73–82.
96. Kärre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., Kiessling, R., Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature.* 1986;319(6055):675–8.
97. Raulet, D.H., Vance, R.E., McMahon, C.W., Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:291–330.
98. Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Pérez-Villar, J.J., López-Botet, M., Duggan-Keen, M., Stern, P.L., Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today.* 1997;18(2):89–95.

6. LITERATURVERZEICHNIS

99. Tortorella, D., Gewurz, B.E., Furman, M.H., Schust, D.J., Ploegh, H.L., Viral subversion of the immune system. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:861–926.
100. Poggi, A., Zocchi, M.R., NK cell autoreactivity and autoimmune diseases. *Front Immunol.* 2014;5:27.
101. Dietz, A.B., Bulur, P.A., Emery, R.L., Winters, J.L., Epps, D.E., Zubair, A.C., Vuk-Paclovic, S., A novel source of viable peripheral blood mononuclear cells from leukoreduction system chambers. *Transfusion.* 2006;46(12):2083–9.
102. English, D., Andersen, B.R., Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *J Immunol Methods.* 1974;5(3):249–52.
103. Pende, D., Bottino, C., Castriconi, R., Cantoni, C., Marcenaro, S., Rivera, P., Spaggiari, G.M., Dondero, A., Carnemolla, B., Reymond, N., Mingari, M.C., Lopez, M., Moretta, L., Moretta, A., PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: involvement in tumor cell lysis. *Mol Immunol.* 2005;42(4):463–9.
104. Bae, D.S., Hwang, Y.K., Lee, J.K., Importance of NKG2D-NKG2D ligands interaction for cytolytic activity of natural killer cell. *Cell Immunol.* 2012;276(1-2):122–7.
105. Lotzová, E., Savary, C.A., Herberman, R.B., Induction of NK cell activity against fresh human leukemia in culture with interleukin 2. *J Immunol.* 1987;138(8):2718–27.
106. Jurisic, V., Srdic, T., Konjevic, G., Markovic, O., Colovic, M., Clinical stage-dependent decrease of NK cell activity in multiple myeloma patients. *Med Oncol.* 2007;24(3):312–7.
107. Fauriat, C., Mallet, F., Olive, D., Costello, R.T., Impaired activating receptor expression pattern in natural killer cells from patients with multiple myeloma. *Leukemia.* 2006;20(4):732–3.
108. Gao, M., Gao, L., Yang, G., Tao, Y., Hou, J., Xu, H., Hu, X., Han, Y., Zhang Q., Zhan, F., Wu, X., Shi, J., Myeloma cells resistance to NK cell lysis mainly involves an HLA class I-dependent mechanism. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2014;46(7):597–604.
109. Vacca, P., Martini, S., Garelli, V., Passalacqua, G., Moretta, L., Mingari, M.C., NK cells from malignant pleural effusions are not anergic but produce cytokines and display strong antitumor activity on short-term IL-2 activation. *Eur J Immunol.* 2013;43(2):550–61.
110. Hromadnikova, I., Pirkova, P., Sedlackova, L., Influence of in vitro IL-2 or IL-15 alone or in combination with Hsp-70-derived 14-mer peptide (TKD) on the expression of NK cell activatory and inhibitory receptors. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:405295.

6. LITERATURVERZEICHNIS

111. Lanier, L.L., Buck, D.W., Rhodes, L., Ding, A., Evans, E., Barney, C., Phillips, J.H., Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen. *J Exp Med.* 1988;167(5):1572–85.
112. Zhang, C., Zhang, J., Niu, J., Zhang, J., Tian, Z., Interleukin-15 improves cytotoxicity of natural killer cells via up-regulating NKG2D and cytotoxic effector molecule expression as well as STAT1 and ERK1/2 phosphorylation. *Cytokine.* 2008;42(1):128–36.
113. El-Sherbiny, Y.M., Meade, J.L., Holmes, T.D., McGonagle, D., Mackie, S.L., Morgan, A.W., Cook, G., Feyler, S., Richards, S.J., Davies, F.E., Morgan, G.J., Cook, G.P., The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res.* 2007;67(18):8444–9.
114. Bryceson, Y.T., March, M.E., Ljunggren, H.G., Long, E.O., Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood.* 2006;107(1):159–66.
115. Horng, T., Bezbradica, J.S., Medzhitov, R., NKG2D signaling is coupled to the interleukin 15 receptor signaling pathway. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1345–52.
116. Carr, W.H., Pando, M.J., Parham, P., KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J Immunol.* 2005;175(8):5222–9.
117. Shi, J., Tricot, G.J., Garg, T.K., Malaviarachchi, P.A., Szmania, S.M., Kellum, R.E., Storrie, B., Mulder, A., Shaughnessy, J.D., Barlogie, B., van Rhee, F., Bortezomib down-regulates the cell-surface expression of HLA class I and enhances natural killer cell-mediated lysis of myeloma. *Blood.* 2008;111(3):1309–17.
118. Decot, V., Voillard, L., Latger-Cannard, V., Aissi-Rothé, L., Perrier, P., Stoltz, J.F., Bensoussan, D., Natural-killer cell amplification for adoptive leukemia relapse immunotherapy: comparison of three cytokines, IL-2, IL-15, or IL-7 and impact on NKG2D, KIR2DL1, and KIR2DL2 expression. *Exp Hematol.* 2010;38(5):351–62.
119. Wilson, M.J., Torkar, M., Haude, A., Milne, S., Jones, T., Sheer, D., Beck, S., Trowsdale, J., Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(9):4778–83.
120. Körner, C., Altfeld, M., Role of KIR3DS1 in human diseases. *Front Immunol.* 2012;3:326.
121. Presnell, S.R., Chan, H.W., Zhang, L., Lutz, C.T., IL-2/IL-15 activate the human clonally restricted KIR3DL1 reverse promoter. *Genes Immun.* 2013;14(2):107–14.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Andreas Humpe für die Überlassung des Themas sowie für die fortwährende Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Martin Gramatzki für die Möglichkeit, die Arbeit in seinem Institut durchzuführen.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Matthias Staudinger bedanke ich mich ganz herzlich für die hervorragende Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit. Er stand mit bei allen Fragen des wissenschaftlichen Arbeitens stets mit seinem fachlichen und persönlichen Rat zur Seite. Weiterhin bedanke ich mich bei ihm für die freundschaftliche Stimmung im Laboralltag.

Mein Dank gilt auch den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Kathrin Richter und Frau Tanja Ahrens und allen anderen Labormitarbeitern, die mir bei der täglichen Arbeit im Labor stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meiner Familie und insbesondere meinem Vater, der mir meine gesamte Ausbildung ermöglicht hat. Sie und meine Ehefrau Franka haben mich stets liebevoll unterstützt und waren immer für mich da.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Marc André Schlegel
Geburtsdatum: 03.07.1986
Geburtsort: Göttingen

Beruflicher Werdegang

08/2014 bis heute Assistenzarzt in der 1. Medizinischen Klinik, Städtisches Krankenhaus Kiel

Studium

10/2007 bis 04/2014 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Abschluss: Staatsexamen, Note 1,5
02/2013 bis 01/2014 Praktisches Jahr:
Innere Medizin: Cairns Base Hospital, Cairns, Australien
Diakonissenkrankenhaus Flensburg
Anästhesie: Diakonissenkrankenhaus Flensburg
Chirurgie: UKSH, Campus Kiel
02/2012 bis 06/2012 Studium der Humanmedizin an der Universidad Miguel Hernández de Elche in Alicante, Spanien
08/2009 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note 1,5

Zivildienst

10/2006 – 06/2007 St. Elisabeth Krankenhaus in Kiel

Schulbildung

07/2006 bis 08/2006 Colégio Visconde de Porto Seguro, São Paulo, Brasilien
08/1997 bis 06/2006 Fördergymnasium Flensburg, Abschluss: Abitur, Note 1,6
08/1993 bis 07/1997 Fruerlunds Schule Flensburg

Promotion

07/2010 bis 08/2016 Experimentelle Doktorarbeit in der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie der II. Medizinischen Klinik an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

PUBLIKATIONEN

Vortrag:

Schlegel M.-A., Staudinger M., Peipp M., Kellner C., Gramatzki M., Humpe A. „Impact of cytokine activation on the expression of natural killer cell receptors and the lysis potential of natural killer cells“. Vortrag auf dem 46. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI), Münster, 24. - 27. September 2013; Transfus Med Hemother 2013;40 (suppl. 1):III

Poster:

Schlegel M.-A., Staudinger M., Peipp M., Kellner C., Gramatzki M., Humpe A. „Influence of pre-activation of natural killer (NK) cells with interleukin 2 or interleukin 15 on their natural cellular cytotoxicity and on expression levels of NK cell receptors“. Poster auf der Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, Wien, 18. - 22. Oktober 2013; Onkologie 2013;36(suppl 7):1-289

Schlegel M.-A. „Enrichment, activation and expansion of human NK cells“. Poster auf der Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen, Borstel, 12. November 2010; 33:48