

**Untersuchungen zum zytotoxischen Verhalten einer seltenen Population  
Natürlicher Killerzellen gegenüber humanen hämatopoetischen  
Progenitor- und Stammzellen**

D i s s e r t a t i o n  
zur Erlangung des Grades des Doktors  
der Naturwissenschaften  
  
der Fakultät für Biologie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von  
Roger Grau  
aus Ellwangen

2002



Tag der mündlichen Prüfung:

22. März 2002

Dekan:

Prof. Dr. H.-U. Schnitzler

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. R. Handgretinger

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. H.-G. Rammensee



Ob Sonnenschein, ob Sternenfunkel,  
im Tunnel bleibt es immer dunkel.  
*Erich Kästner*

„people think it's all about misery and desperation and death and all that s--- which is not to be ignored, but what they forget is the pleasure of it. Otherwise we wouldn't do it. After all we're not f----ng stupid.“  
Mark Renton in *Trainspotting*, the movie

Diese Arbeit wurde vom 1.9.1997 bis 31.8.1999 durch Fördermittel der Deutschen Krebshilfe e.V. Mildred Scheel, vom 1.9.1999 bis 31.3.2000 durch Mittel der Jose Carreras Stiftung e.V. , vom 1.4. bis 30.9.2000 durch ein Stipendium des Tübinger Graduiertenkollegs „Zellbiologie in der Medizin“ der DFG und vom 1.10.2000 bis 31.12.2001 durch ein Stipendium des forüne-Förderprogramms der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen und den SFB510 „Stammzellbiologie und Antigenprozessierung“ der DFG finanziell gefördert.



## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Hämatologie Onkologie der Universitäts-Kinderklinik I Tübingen durchgeführt.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. R. Handgretinger (Hämatologie Forschung I, Universitätskinderklinik) für die Überlassung des Arbeitsthemas, für die Unterstützung meiner Belange und seine Offenheit gegenüber meinen Vorschlägen zur Bearbeitung des Projekts. Herrn Prof. Dr. H.G. Rammensee (Institut für Immunologie, Universität Tübingen) gilt mein besonderer Dank für sein stets offenes Ohr und seine wertvollen Hinweise und Ratschläge. Herrn Prof. Dr. D. Niethammer danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Arbeitsmittel und für das gute Arbeitsklima in den Labors der Kinderklinik. Frau PD Dr. D. Wernet möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und für die gute Zusammenarbeit danken. Herrn OA Dr. P. Lang danke ich für seine Geduld während der Schreibphasen dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. G. Bruchelt, Prof. Dr. P.G. Schlegel, PD Dr. P. Bader und Dr. S. Kuci danke ich für die ihre stete Hilfsbereitschaft und manchen guten Rat. Herzlich danken möchte ich Andreas Geiselhart für seine Anteilnahme und die Betreuung meines Projekts. Ebenso herzlich möchte ich Arnault Moris für die Zusammenarbeit und wertvolle Diskussionen danken. Für die Durchsicht dieser Arbeit danke ich Thomas Steinmann, Carsten Pusch und ganz besonders Oliver Kempf.

Allen Arbeitsgruppen der Universitätskinderklinik, in Forschung und Routine, gilt mein Dank für eine freundliche und kollegiale Atmosphäre. Den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen aller Arbeitsgruppen danke ich für ein stets angenehmes Arbeitsklima, für manches offene Ohr und manche helfende Hand. Dank an Hermann Kreyenberg, Shangara Lal, Dorothee Brügger, Claudia Gerber, Stefan Neu, Matthias Eyrich, Christel Winkler, Peter Weber, Gerd Klein, Harpreet Singh-Jasuja, Alexander Steinle Karl Lang und all die anderen aus den Katakomben der Hämatologie Forschung der Kinderklinik und des Lehrstuhls für Immunologie.

All denen, die mich im Verlauf dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben, meinen Freunden, danke ich herzlich.

An dieser Stelle möchte ich meiner Mutter danken ohne deren rückhaltlose Hilfe ich sicherlich nicht bis zu diesem Punkt gelangt wäre.



## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	9
-------------------------	---

### **A EINLEITUNG.....13**

1	Zelluläre Immunantwort des Menschen .....	13
2	Oberflächenmoleküle auf Zellen des Blutsystems .....	14
2.1	MHC I.....	14
2.2	MHC II .....	16
2.2.1	Steuerung der Immunantwort durch T-Helfer-Zellen .....	17
2.3	T-Zell Rezeptor .....	17
3	Tötungsmechanismen der NK- und T-Zellen .....	19
3.1	Rolle der Zytokine bei der Immunabwehr .....	20
4	„T-cell education“ .....	21
5	Natürliche Killer-Zellen .....	23
5.1	Die Hypothese des „missing self“ .....	25
5.2	NK-Rezeptoren.....	26
3.2.1	Bindungsspezifität der NK-Rezeptoren.....	26
3.2.1	Ort der Bindung der NK-Rezeptoren.....	27
3.2.2	KIR/KAR-Signalling.....	29
3.3	Entwicklung der NK-Zellen.....	30
3.3.1	Entwicklung der NKT-Zellen .....	30
3.4	„NK-cell education“ .....	31
3.4.1	Hypothese der „Rezeptor Kalibrierung“ .....	32
3.4.2	Hypothese der „allelic exclusion“ .....	33
4	Hypothese der Arbeit.....	36

### **B ERGEBNISSE .....37**

#### **B 1 ERSTES TEILPROJEKT: NACHWEIS DER ERYTHROBLASTOPENIE ALS KRANKHEIT DES „MISSING SELF“ AM BEISPIEL DER „PURE RED CELL APLASIA“.....37**

1.1	Nachweis der „pure red cell aplasia“ und Ausschluß anderer Ursachen der Erythroblastopenie .....	38
1.1.1	Verteilung der Differenzierungsreihen des Blutes im Knochenmark des Patienten fs.....	38
1.1.2	Analyse der Expressionsdichte von MHC I auf Zellen unterschiedlicher Progenitor-Zellpopulationen gesunder Individuen .....	40
1.1.3	Phänotypisierung der klonal expandierten LGL-Zellen des „prca“ Patienten fs.....	43
1.1.3.1	Durchflußzytometrische Typisierung des TCR-Subtyps der expandierten LGL Zellen .....	44
1.1.4	Histologisches Bild eines Knochenmarkausstrichs des Patienten fs.....	47
1.1.5	Kolonieformen aus in vitro Differenzierungskulturen der Stammzellen des Patienten fs: Vergleich mit gesunden Spendern.....	47
1.1.6	Untersuchung auf Autoantikörper gegen erythroide Vorläuferzellen (Charles, 1996) .....	49
1.2	Experimente zum Nachweis der LGL-Zellen als Ursache der Erythroblastopenie .....	50
1.2.1	Zytotoxizität-Tests mit LGL von fs gegen erythroide Vorläuferzellen aus Knochenmark und in vitro Expansionskulturen .....	51

1.2.1.1	Zytotoxizität-Tests mit Erythroblasten aus Knochenmarkpunktaten und in vitro Expansions-Kulturen.....	51
1.2.1.2	Blockierungs-Experimente von MHC I und NK-Rezeptoren.....	55
1.2.1.3	Reinheit der als Zielzellen aufgereinigten erythroiden Vorläuferzellen .....	59
1.2.1.4	Reinheit und MHC I Oberflächenexpression erythroider Progenitor-Zellen einer in vitro Expansion von CD34+ Zellen des Patienten fs.....	60
1.2.2	Unterschiedliche Suszeptibilität erythroider Differenzierungsstadien gegenüber den $\square$ -T-Zellen von fs.....	61
1.2.2.1	Unterschiedliche Suszeptibilität verschiedener erythroider Differenzierungsstadien gegenüber $\square$ -T-Zellen des Patienten fs.....	61
1.2.2.2	Erythrozytäres Differenzierungsstadium mit maximaler Suszeptibilität für LGL des Patienten fs.....	63
1.2.2.2	Verlauf der Reduktion der Oberflächen-Expression von MHC I auf Zellen der erythrozytären Differenzierungsreihe .....	65
1.2.3	„Rescue“ des LGL Killings durch Erhöhung der MHC I Oberflächen-Expression durch g-Interferon-Inkubation.....	66
1.2.3.1	Steigerung der MHC I Oberflächen-Expression auf Erythroblasten durch $\square$ -Interferon-Inkubation.....	67
1.2.3.2	„Rescue“ des Killings der Erythroblasten durch MHC I-Expressionssteigerung.....	67
1.2.3.3	Verminderung der LGL-Reaktivität durch Blockade der NK-Rezeptoren .....	69
1.2.4.2	Nachweis der Apoptose durch Fas-Ligand Expressions-Steigerung.....	74
1.2.4.3	Intrazellulärer Perforin-Nachweis.....	75
1.2.4.4	Intrazelluläre Färbungen für Zytokine bei fs.....	75
1.3.1	Klonierung von $\square$ -T-Zellen und Einsatz dieser Klone als Effektorzell-Kontrolle in Zytotoxizität-Tests .....	77
1.3.2	Zytotoxischen Verhalten von NK-Klonen gegenüber Erythroblasten .....	81
1.3.3	Zytotoxisches Verhalten von $\square$ -T-Zell-Klonen und NK-Klonen gegenüber CD34+ Stammzellen.....	84
1.4	Ein weiterer Fall von „pure red cell aplasia“.....	86
1.4.1	Reaktivität von MNC und LGL-Linien des Patienten mr gegenüber Erythroblasten .....	88
1.4.2	Selektive Reaktivität der klonal expandierten LGL des Patienten mr gegen HLA-C transfizierte LCL-Linien .....	90

**B 2 ZWEITES TEILPROJEKT: EXISTENZ HUMANER, AUTOAGGRESSIVER NK-ZELLEN UND DIE BEDEUTUNG VON INHIBIERENDEN REZEPTOREN DER KIR2D\*-FAMILIE BEI EINER GEGEN AUTOLOGE CD34-POSITIVE STAMMZELLEN GERICHTETEN REAKTIVITÄT .....****92**

2.1	Nachweis der Existenz einer autoreaktiven NK-Population.....	93
2.1.1	Nachweis einer NK-Zell-Population mit nicht-„selbst“-bindenden NK-Rezeptoren der KIR2DL-Familie.....	93
2.1.1.1	Reinheit der angereicherten NK-Zell-Subpopulation und Verteilung der Expression der unterschiedlichen NK Rezeptoren .....	94
2.1.1.1.1	Reinheit der Anreicherung von PBL auf einen KIR2DL Rezeptor.....	94
2.1.1.1.2	Expression einer Reihe von NK Rezeptoren auf der angereicherten NK-Zell Population.....	96
2.2	Nachweis des autoreaktiven Verhaltens einer kleinen NK-Population mit „selbst“-HLA-C nicht bindenden KIR2DL Rezeptoren.....	99
2.2.1	Kolonie-Inhibitions-Tests mit die auf „selbst“-HLA-C nicht erkennenden KIR2DL Rezeptoren selektionierten NK-Zellen.....	100
2.2.1.1	Kolonie-Inhibitions-Tests der Spender mit HLA-C Gruppe 1 .....	101
2.2.1.2	Kolonie-Inhibitions-Tests der Spender mit HLA-C Gruppe 2 .....	103
2.2.1.3	Reproduzierbarkeit der Kolonie-Inhibitions-Tests.....	105
2.2.1.4	Autoreaktives Potential KIR2DL1+ NK-Zellen von HLA-C Gruppe 1 Spendern.....	105
2.2.2	Effektormechanismen der KIR2DL2+ NK-Subpopulation .....	106

2.2.2.1	Test auf verschiedene Effektormechanismen während der Inhibition der Stammzell-Proliferation .....	107
2.2.2.2	Intrazelluläre Färbung von Zytokinen als Nachweis der Aktivierung der NK-Zellen.....	109
2.2.2.3	Intrazelluläre Färbung von Perforin als Nachweis der NK-Zell-Aktivierung.....	109
2.2.2.4	Verlauf des Expressionsdichte von inhibierenden NK-Rezeptoren nach Aktivierung der NK-Zellen durch autologe Stammzellen .....	110
2.2.2.5	Verlauf der Expressionsdichte von Fas-Ligand nach Aktivierung der NK-Zellen durch autologe Stammzellen .....	110
2.2.2.6	Nachweis von Apoptose durch Annexin V .....	111
2.2.2.7	Ausschluß eines aktivierenden Potentials der NK-Rezeptoren .....	113
2.2.2.8	Aktivierung der NK-Zellen durch autologe Stammzellen – Nachweis der Zytokin-Freisetzung durch ELI-Spot Tests .....	114
2.2.3.1	Reinheit der zur Klonierung verwendeten KIR2DL2+ NK-Zellen .....	116
2.2.3.2	Spezifität der NK-Klone für HLA-C-Gruppen.....	116
2.2.3.3	Aktivierung der NK-Klone durch autologe und allogene Stammzellen.....	117

## **C DISKUSSION.....119**

## **D MATERIAL UND METHODEN .....130**

Methoden.....	130
---------------	-----

1	Isolation von Mononucleären Zellen aus Peripherblut, Nabelschnurblut, Knochenmarkspunktat, Leukozytenkonzentraten und Decidua: .....	130
1.1	Herkunft der Proben .....	130
1.2	Auftauen von Zellen.....	130
1.3	Isolierung mononukleärer Zellen aus Blutproben und Leukozytenkonzentraten .....	131
1.4	Isolation von NK-Zellen aus Dezidua .....	131
2	Zellsortierung.....	132
2.1	Zellsortierung mit Hilfe von FACS-Sortierung (Becton Dickinson): .....	132
2.1.1	Prinzip des FACStar <sup>PLUS</sup> .....	132
2.2	Magnetpartikel-Konzentrations-System (Dynal).....	132
2.3	Zellisolationen mit Hilfe von paramagnetischen Microbeads (MACS <sup>TM</sup> , Miltenyi Biotech) .....	133
3	Characterisierung und Phänotypisierung von Zellen .....	134
3.1	Zytospin .....	134
3.2	Durchflußzytometrie: FACS-Analyse und Auswertung.....	134
3.2.1	Auswertung der gemessenen Proben .....	135
3.2.2	Färben der Zellen mit mAk für die Durchflußzytometrie.....	136
3.2.2	Intrazellulärer Nachweis von Proteinen mit Hilfe der Durchflußzytometrie .....	136
3.2.3	Nachweis des frühen Apoptose-Markers PS mit Annexin V.....	137
3.3	Nachweis von zellulärer Zytokin-Sekretion.....	138
3.3.1	Cytokine Sekretion Assay <sup>TM</sup> (Miltenyi Biotech) .....	138
3.3.2	Cytokine Capture Assay <sup>TM</sup> (Hölzel).....	138
3.3.3	ELI-Spot Assay .....	139
3.3.4	QIFIKIT <sup>TM</sup> von DAKO .....	140
4	Zellkultur und Zelllinien.....	140
4.1	Zelllinien.....	140
4.2	Zellkultur .....	141
4.2.1	Zellzahlbestimmung .....	141
4.2.2	Suspensions-Kultursysteme .....	141
4.2.3	Semi-solide Kultursysteme .....	142
4.2.3.1	Kultivierung CD34+ Zellen unter Zusatz von Wachstumsfaktoren.....	143

4.2.3.2	Qualitative und quantitative Analyse semi-solider Stammzell-Kulturen.....	143
5	Zytotoxizitäts Test.....	145
5.1	Prinzip des Europium-Release-Tests.....	145
5.2	Auswertung des Zytotoxizitäts-Tests.....	146
5.3	Durchführung des Zytotoxizitäts-Tests.....	147
5.3.1	Aufbereitung der Target-Zellen.....	147
5.3.2	Aufbereitung der Effektor-Zellen.....	148
5.3.3	Test-Ansatz.....	148
6	Arbeiten mit DNA und RNA.....	149
6.1	Isolierung und Charakterisierung von RNA.....	149
6.1.1	Ultrazentrifugation.....	149
6.1.2	Phenol-Chloroform Extraktion.....	149
6.1.3	RNA-Aufreinigung mit Silicat-Säulen.....	150
6.1.2	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	150
6.1.3	DNase-Verdau isolierter RNA.....	150
6.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR) und Reverse Transkriptase Reaktion (RT).....	151
6.2.1	Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion.....	151
6.2.1.1	Synthese von cDNA aus RNA.....	151
6.2.2	PCR.....	152
6.2.2.1	Analyse der PCR-Produkte im Polyacrylamidgel.....	153
6.2.2.2	SSCP humaner Microsatelliten DNA.....	153
6.2.2.3	Real-Time PCR mit der TaqmanTechnik (Applied Biosystems).....	154
6.2.2.4	HLA-Typisierung mittels PCR (Dynal).....	154
6.2.2.5	Mycoplasma-Test.....	154
	Auswertung der Daten auf PC und Apple Rechnern.....	155
	<b>MATERIALLISTE.....</b>	<b>155</b>
	Geräte und Festmaterialien.....	155
	Antikörper, Reagenzien und Lösungen.....	157
	Stammlösungen, Puffer und Medien.....	160
	<b><u>E ZUSAMMENFASSUNG.....</u></b>	<b><u>165</u></b>
	<b><u>F LITERATUR.....</u></b>	<b><u>167</u></b>
	<b><u>G ANHANG.....</u></b>	<b><u>186</u></b>

## A Einleitung

### 1 Zelluläre Immunantwort des Menschen

Die Funktion der Zellen, die aus den verschiedenen Differenzierungslinien des Blutes entspringenden, läßt sich durch die Bezeichnung der Gruppen der zellulären Immunantwort des Menschen gut beschreiben. Zum einen ist das die *natürliche Immunabwehr*; ihr gehören Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen an. Sie greifen Fremdkörper ohne vorherigen Lernprozeß an und erkennen ihre Ziele selektiv mit Hilfe von *pattern-recognition-* und *toll like-* Rezeptoren (Akira, 2001). Eine wichtige Rolle spielen hierbei die Bestandteile des *humoralen Immunsystems*, die Ziele der *natürlichen Immunabwehr* binden und auf diese Weise kenntlich machen. Zum anderen sind es die Zellen der *adaptiven Immunantwort*, also B- und T-Zellen. Sie können, auf Populationsebene betrachtet, nur durch einen Lernprozeß aktiviert werden, erkennen dann aber ihre Ziele sehr spezifisch und können ein immunologisches Gedächtnis bilden, das wiederholt eindringende Bakterien und Viren schnell und effektiv bekämpfen kann.

Die Aufgabe der aus der lymphoiden Differenzierungsreihe abgeleiteten NK-Zellen besteht darin, diejenigen Zellen zu zerstören, die von intrazellulär persistierenden Parasiten oder Viren befallen wurden. Ebenso greifen die NK-Zellen körpereigene Zellen an, die durch maligne Transformationen verändert wurden. Myeloide Granulozyten greifen in den Körper eingedrungene Bakterien an, die sie ebenfalls selektiv erkennen, phagozytieren und durch Enzyme und freie Sauerstoffradikale in intrazellulären Kompartimenten zerstören. Beide Zellpopulationen bilden also eine erste Barriere für eindringende Pathogene.

Eine ganz ähnliche Aufgabe haben Makrophagen und Dendritische Zellen unterschiedlichsten Ursprungs. Sie umfließen fremdes Material und präsentieren Peptid-Bruchstücke davon den T-Zellen in den Organen des lymphatischen Systems; die T- und B-Zellen werden daraufhin aktiviert und starten eine Reaktion des *adaptiven Immunsystems*. Dendritische Zellen und Makrophagen fungieren hier also als Antigen-präsentierende Zellen (APC). B-Zellen beginnen auf diesen ersten Kontakt hin mit der Produktion von Antikörpern. T-Zellen werden ebenfalls aktiviert und beginnen gegen erkannte Ziele vorzugehen (eine detaillierte Auflistung der Differenzierungsreihen ist in Abb. I im Anhang einzusehen). Aktivierte zytotoxische T-Zellen zerstören die für sie erkennbaren Ziele sehr effektiv, während T-Helfer-Zellen zur zentralen Schaltstelle für die *adaptive Immunantwort* des Menschen werden. Hierbei lassen sich zwei

Reaktionen der T-Helfer-Zellen unterscheiden, die Th<sub>1</sub>- und Th<sub>2</sub>-Antwort. Im Verlauf einer Th<sub>1</sub> Antwort werden zytotoxische T-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen rekrutiert. Während einer Th<sub>2</sub> Antwort werden B-Zellen aktiviert und damit zur Antikörperproduktion veranlaßt (Burmester, 1998; Parham, 2000). Diese Wirkung haben T-Helfer-Zellen vorwiegend aufgrund der Sekretion von verschiedenen Zytokinen.

## **2 Oberflächenmoleküle auf Zellen des Blutsystems**

Für einige der bereits vorgestellten Eigenschaften oder Funktionen von Zellen des Immunsystems sind einzelne membranständige Oberflächenproteine verantwortlich. Sie sind entweder Liganden oder Rezeptoren und vermitteln durch eine Bindung spezifische Signale an die Zelle. Bei Zellen der Immunabwehr des Menschen werden auf diese Weise z.B. die Zellaktivität, ihr Migrationsverhalten in Geweben und in der Blutbahn und die Interaktion untereinander gesteuert. Da diese spezifische Funktion der Membranproteine charakteristisch für spezielle Zellpopulationen oder Differenzierungsstadien ist, waren sie ein ideales Instrument um die Entwicklung, Funktion und Anzahl von einzelnen Zellpopulationen zu beobachten und sie anhand dieser Proteine zu benennen.

Als es durch die Erfindung monoklonaler Antikörper möglich wurde, Oberflächenantigene eindeutig zu bestimmen, begann man auf Betreiben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) eine international gültige Nomenklatur einzuführen, das „Cluster of Differentiation“ (CD-chart, Leukozyten-Differenzierungsmoleküle). Die Spezifität der durch die CD-chart definierten Membranproteine für Funktionen oder Populationen von Zellen gab ihnen im allgemeinen Sprachgebrauch dann ihren Namen. So werden B-Zellen als CD19+ Zellen oder NK-Zellen als CD56+ Zellen bezeichnet, selbst wenn, wie bei CD56, ihre Funktion noch nicht bekannt ist.

Im Folgenden werden einige Oberflächenmoleküle beschrieben, die essentiell für die meisten der hier beschriebenen Interaktionen der Zellen des Immunsystems sind.

### **2.1 MHC I**

Eine zentrale Rolle in der Immunabwehr des Menschen spielt der Major Histocompatibility Complex Klasse I (MHC I), auch Humanes Leukozyten Antigen-System Klasse I genannt (HLA

I). Moleküle dieser Gattung sind mit sehr wenigen Ausnahmen immunprivilegierter Bereiche auf allen menschlichen Körperzellen zu finden. Sie sind Teil eines Kontrollsystems, das überprüfen soll, ob sich „Fremde“ im eigenen Körper befinden. Diese „Fremde“ können intrazellulär lebende Bakterien oder Parasiten, Viren oder Organtransplantate sein.

Alle Proteine einer Zelle werden im Rahmen eines ständigen Neuproduktions- und Abbauprozesses in der Zelle zu kleinen Protein-Fragmenten abgebaut. Diese kleinen Stücke werden von MHC I gebunden und auf der Zelloberfläche den Zellen des Immunsystems präsentiert. Diese Zellen kontrollieren mit Strukturen wie dem T-Zell Rezeptor, ob es sich dabei um „fremde“ oder „eigene“ Proteinbruchstücke handelt und entscheiden, ob das Immunsystem einen potentiell schädlichen Eindringling bekämpfen soll oder nicht.

Die Moleküle des MHC I sind auf beinahe allen Zellen des Körpers zu finden und bestehen aus einer schweren Kette (hc), einem  $\beta$ 2-Microglobulin und einem meist 9 Aminosäuren langen Peptid. Das Peptid liegt der Zellmembran abgewandt in einer Grube, die durch 2  $\beta$ -Helices seitlich und einer 8-strängigen  $\beta$ -Faltblattstruktur am Boden gebildet wird (Bjorkman, 1987; Branden, 1991). Die drei Komponenten werden im endoplasmatischen Reticulum (ER) zusammengesetzt. Die schwere Kette wird als Typ I Membranprotein in der ER-Membran inseriert und bindet mit Hilfe des Chaperons Calnexin an ein  $\beta$ 2-Microglobulin. An das Chaperon Calreticulin gebunden wird der ganze Komplex vermittelt durch Tapasin an den TAP Transporter geführt (Transporterproteine assoziiert mit Antigen Prozessierung) (Sadasivan, 1996; Elliot, 1997). Hier wird der Komplex mit Peptiden beladen und als Trimer, ohne die Chaperone, an die Zelloberfläche transportiert. Kann sich dieses Trimer nicht ausbilden, führt das zu einer uneffektiven Antigenpräsentation (Rammensee, 1996). Die Peptide, die auf MHC I präsentiert werden, sind intrazellulären Ursprungs und wurden im Rahmen des normalen Protein-turnovers abgebaut. Das sind entweder normale oder durch eine maligne Transformation der Zelle veränderte, zelleigene Proteine, oder aber zellfremde Proteine, die in der Zelle z.B. aufgrund einer Virusinfektion gebildet wurden. Der Abbau dieser Proteine erfolgt in Proteasomen, zylindrischen Komplexen, an deren Innenseite mehrere katalytische Zentren liegen. Diese proteolytisch aktiven Zentren haben unterschiedliche Schnittverhalten und Vorlieben für bestimmte Aminosäurekombinationen und zerlegen die Proteine in kleinere Stücke. Die Proteinbruchstücke gelangen teilweise mit Hilfe des TAP Transporters in das ER und werden dort auf MHC I gebunden (Groettrup, 1995, 1996). Die Bindung dieser Peptide an MHC I Moleküle ist selektiv, d.h. verschiedene MHC I Moleküle haben unterschiedliche Vorlieben für Aminosäuren an zwei Ankerpositionen, die tiefer in der Bindungsgrube liegen. Der Rest des Peptids wird nach außen präsentiert und kann mit T-Zellen, B-Zellen und

Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) interagieren (Rammensee, 1995). Die verschiedenen Loci des MHC I auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6, HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G und -H, werden in Gruppen unterteilt. Die Moleküle der HLA-A, -B und -C Loci werden als „klassische“ MHC I-Gene und die Loci der HLA-E, -F, -G und das bisher funktionslose HLA-H als „nicht-klassische“ MHC I-Gene bezeichnet.

## 2.2 MHC II

Auch auf den Molekülen des MHC II werden Peptide präsentiert. Anders als beim MHC I sind diese Peptide jedoch häufig extrazellulären Ursprungs. Proteine, die nicht durch die Zelle selbst hergestellt wurden, können nur von solchen Zellen präsentiert werden, die im Serum gelöste Stoffe oder ganze Partikel und Zellen phagozytieren und intrazellulär verdauen können. Die hergestellten Proteinbruchstücke, die Antigene, präsentieren die APC auf dem MHC II den Zellen des adaptiven Immunsystems. Falls diese T-Helfer-Zellen die Antigene als „fremd“ erkennen, wird eine Antwort des Immunsystems auf die potentiell schädlichen Fremdkörper eingeleitet.

Die auf den Molekülen des MHC II präsentierten Aminosäureketten extrazellulären Ursprungs sind 11 bis 25 Aminosäuren lang und werden in einer Bindungsgrube auf der Zellmembran präsentiert. Diese wird aus zwei unabhängigen  $\alpha$ -Helices ( $\alpha$  und  $\beta$ ) gebildet, die an den Seiten offen ist (Stern, 1994). Die Moleküle des MHC II werden in drei Untergruppen HLA-DR, -DQ und -DP unterteilt. MHC II findet man hauptsächlich auf antigenpräsentierenden Zellen (APCs), also auf Dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen, die zusammen etwa 20% der Lymphozyten ausmachen. Auch die Ketten des MHC II werden erst in die Membran des ER inseriert und durch die Chaperone Calnexin und BiP an die invariante Kette gebunden. Diese *Invariant Chain* verhindert eine vorzeitige Antigenbindung indem sie die Bindungsgrube mit den drei Ankerpositionen blockiert. Erst nach dem Transport im Golgi zu den endosomalen Vesikeln erfolgt die Beladung mit Fremdprotein. Dazu muß die invariante Kette abgespalten und verdrängt werden (Busch, 1996).

Die durch Endozytose aufgenommenen Fremdpeptide können nach einem Abbau in Lysosomen auf MHC II präsentiert und von T-Zellen auf „fremd“ oder „eigen“ kontrolliert werden. Hierbei binden T-Helfer-Zellen mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR) so an das beladene MHC II, daß der TCR das Peptid in der Grube erkennen kann. Seitlich an den MHC II bindet hierbei ein CD4-

Molekül. „Paßt“ das präsentierte Peptid zu einem der enorm vielfältigen TCRs, beginnt die T-Helfer-Zelle die Rolle der zentralen Schaltstelle für die *adaptive Immunantwort* des Menschen.

### **2.2.1 Steuerung der Immunantwort durch T-Helfer-Zellen**

Es lassen sich zwei Reaktionen der T-Helfer-Zellen unterscheiden, die Th<sub>1</sub> und die Th<sub>2</sub> Antwort. Im Verlauf der Th<sub>1</sub> Antwort werden zytotoxisch aktive Zellen und Makrophagen aktiviert während Th<sub>2</sub> Zellen vorwiegend auf die Reifung von B-Zellen wirken.

Im Verlauf einer Th<sub>1</sub> Antwort schütten T-Zellen vor allem IL-2, Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), Tumor-Nekrose-Faktor-beta (TNF- $\beta$ ) und GM-CSF (granulocyte-macrophage-colony stimulating factor) aus. Angestoßen wird diese Reaktion hauptsächlich durch Interleukin-12 (IL-12). Die T-Helfer-Zellen aktivieren dadurch zytotoxische T-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen, die wiederum infizierte oder veränderte Zellen phagozytieren, durch Perforin direkt töten oder durch Granzym oder Fas-Ligand einen induzierten Tod der Zielzelle (Apoptose) einleiten. Während einer Th<sub>2</sub> Antwort wird von durch ein Zytokin (IL-6) angestoßenen T-Zellen IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10 und IL-14 sezerniert. Diese Interleukine aktivieren gemeinsam mit einer Erkennung von Antigen auf MHC II z.B. B-Zellen und veranlassen sie zur Produktion und Freisetzung von Antikörpern (Burmester, 1998; Parham, 2000). Diese Antikörper sind spezifisch für das auslösende Antigen und binden an alle Zellen oder Fremdkörper, auf denen sie ein spezifisches antigenes Epitop finden. Gebundene Antikörper induzieren wiederum eine Complement-Lyse der Zelle oder binden mit ihrem konstanten Fc-Teil an die Fc-Rezeptoren (CD16) auf Makrophagen, Monozyten und NK-Zellen (etwa 10 bis 40% der Lymphozyten), die dann die Antikörper behafteten Zellen töten (Nagler 1989; Ravetch 1991).

### **2.3 T-Zell Rezeptor**

Der Interaktionspartner der MHC Moleküle auf der Seite der T-Zellen ist der T-Zell-Rezeptor (TCR). Dieser Rezeptor erkennt sehr spezifisch nur ein einziges Antigen in der Bindungsgrube eines MHC I oder II. Die Fähigkeit an MHC I oder II zu binden wird durch ein weiteres Molekül auf der Seite der T-Zelle definiert. Für MHC I ist das CD8, für MHC II ist es CD4. Diese Moleküle binden seitlich am MHC und sind essentiell für die Weitergabe eines Signals in die

Zelle. Da jede T-Zelle entweder CD4 oder CD8 besitzt, ist sie zeitlebens in ihrer Funktion auf eine Rolle als zytotoxische T-Zelle oder als T-Helfer-Zelle festgelegt. Die Einmaligkeit des TCR in der Erkennung nur eines Antigens entsteht ähnlich wie bei den Immunglobulinen durch einen somatischen Rekombinationsvorgang. Hier werden DNA-Komponenten zusammengefügt, die jeweils aus einem aus einer Vielzahl verschiedener Elemente bestehen.

Die Ko-Rezeptoren des TCR, CD4 oder CD8, bestehen aus Immunglobulindomänen. CD4 ist ein Monomer und besteht aus 4 dieser loops, CD8 hingegen ist ein Homo- oder Heterodimer aus zwei Ketten, die jeweils nur aus einem loop bestehen. Beide Moleküle wechselwirken bei einer Bindung mit analogen Domänen des MHC I bzw. des MHC II (König, 1992), wobei die Domänen D3 und D4 des CD4 bei einer Bindung auch mit den TCR interagieren (Vignali, 1996).

Für eine Signaltransduktion durch den TCR sind noch weitere Moleküle nötig. Das ist während der Bindung die kostimulatorisch wirkende Bindung von CD28/CTLA4 an CD80 oder CD86 (die Moleküle B 7.1-3), ohne die keine T-Zell Antwort zustande kommen würde. Nach der Bindung initiieren vor allem die Moleküle CD3, besonders deren  $\zeta$ - und  $\eta$ -Kette unter Einbeziehung der Tyrosinphosphatase CD45 die Signaltransduktion.

Der T-Zell Rezeptor besteht aus zwei Ketten,  $\alpha$  und  $\beta$  oder  $\gamma$  und  $\delta$ , die jeweils wieder aus zwei Immunglobulindomänen bestehen. Die variablen Regionen der  $\alpha\alpha$  und  $\beta\beta$  Ketten des TCR, CDR1-3, liegen am N-terminalen Ende des TCR und bilden bei einer Bindung der T-Zelle an eine beliebige andere Zelle einen Komplex mit dem präsentierten Peptid, der  $\alpha$ 1- und der  $\beta$ 2-Domäne des MHC I dieser Zelle. Hierbei scheint die CDR 3 Region besonders bedeutend für die Peptiderkennung durch den TCR zu sein. Selbst während des Andockens des TCR an den MHC I scheint aber ein Teil der  $\alpha$ 1 Helix frei zugänglich und kann von inhibitorischen Killer-Zell-Rezeptoren (KIR) gebunden werden (Gumperz, 1995; Mandelboim, 1997). Für die Bindung dieser NK-Rezeptoren scheint der Bereich  $\alpha$ 1 Helix, der die Aminosäuren 77-83 beinhaltet, von entscheidender Bedeutung für die Aktivierung dieser Rezeptoren zu sein.

T-Zellen, deren TCR aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten besteht, bilden etwa 70-80% der Lymphozytenpopulation. Demgegenüber sind  $\gamma\delta$ -T-Zellen eher selten und bilden in der Regel nur etwa 1-5% der T-Zellpopulation. Sie sind zwar CD3-positiv aber zu etwa 70% doppelt negativ für CD4 und CD8. Sie scheinen, ähnlich wie NK-Zellen, keiner vorherigen Aktivierung zu bedürfen und greifen Zellen an, die von Pathogenen oder Viren befallen oder maligne transformiert sind. Als Liganden der  $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptoren werden durch Retinsäure induzierbare Antigene diskutiert, Phosphoantigene oder die Stressproteine MIC-A und MIC-B (Parker, 1990; Davodeau, 1993; Groh, 1998; Cerwenka, 2000). Es kann unterschieden werden

zwischen CD4-negativen und CD4-positiven  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Letztere zeigen *in vitro* keine direkt zytolytische Aktivität, aktivieren jedoch andere Zellen durch Ausschüttung von Zytokinen.

### 3 Tötungsmechanismen der NK- und T-Zellen

NK-Zellen, ein Teil der *natürlichen Immunabwehr*, benötigen keine Aktivierung durch andere Zellen. Sie sind andauernd und selbständig auf der Suche nach potentiellen Zielzellen und töten diese Zellen ohne zuvor durch „Fremd“-Protein auf MHC I oder II aktiviert worden zu sein.

NK-Zellen töten ihre Opfer auf folgende Weise. Sie benutzen ähnliche Mittel wie die schon erwähnten zytotoxischen T-Zellen (CTL). Beiden gemeinsam sind Perforin- und Granzym-haltige Granula als schnell wirkende Waffen, die sie bei Kontakt in Richtung der Zielzelle ausschütten. Ebenso exprimieren beide Zellpopulationen Liganden für „Todes“-Rezeptoren (Proteine der Tumor-Nekrose-Faktor Familie), welche bei einer Bindung in den Zielzellen eine Signalkaskade in Gang setzt, die letztlich zum Tod der Zielzelle führt. NK-Zellen eliminieren ihre Ziele wie CTL vorwiegend durch einen schnell wirkenden Perforin-vermittelten Mechanismus.

Für den schnell wirkenden Mechanismus verfügen CTL und NK-Zellen über intrazellulär gespeicherte Vesikel, auch Granula genannt, die eine etwa 66 bis 75 kDa schwere Serinesterase Perforin (Masson, 1985; Galandrini, 1999) enthalten. Diese Vesikel degranulieren nach einer Bindung an die Zielzelle, dem raschen Zusammenfließen von Membranproteinen an der Bindungsstelle und der Polarisierung des intrazellulären Zytoskeletts in Richtung der gebundenen Zelle in den intrazellulären Raum zur Zielzelle (Lou, 2000). Diese Ausschüttung wird durch den Calcium-Influx in die Zelle ausgelöst. Hierauf folgen eine Reihe von intrazellulären Signalwegen (Spaner, 1998), das schnelle Zusammenfließen von Membranpeptiden an der Bindungsstelle und die Bildung eines ringförmigen Komplexes durch Integrine und das Adhäsionsmolekül LFA1 der NK-Zelle (CD11a, CD18) und ICAM1 auf der Zielzelle (CD54) (Vales-Gomez, 1998, 2000; Davis, 1999). Auf der Zellmembran der angegriffenen Zelle polymerisieren die ursprünglich hydrophilen Perforin-Monomere in Anwesenheit von Calcium zu einem 12- bis 18-mer und bilden, ähnlich wie die Komponente C9 des humanen Complements, einen Porus von etwa 6 bis 16 nm Durchmesser in der Zellmembran. Durch diese Poren kann es zu unkontrolliertem Ionenflux und in dessen Folge zu einem Zusammenbrechen des Homöostase der Zellen kommen (Eischen, 1996; Roger, 1996; Mori, 1997): die getroffene Zelle stirbt einen schnellen Tod.

Neben diesem sehr schnell wirkenden Mechanismus (Moretta, 1997) attackieren NK-Zellen und zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) die Zielzellen durch die Induktion des programmierten Zelltods, der Apoptose (Oshimi, 1996). Die Induktion einer Apoptose ist für zytotoxische T-Zellen der am häufigsten beobachtete Effektorweg (Killing-Aktivität). Hier binden Moleküle der Tumor Nekrose Faktor-Familie (TNF) an ihre Rezeptoren auf der angegriffenen Zelle und führen letztlich durch mehrere redundante und voneinander unabhängig wirkende Signalwege zur Fragmentierung des Chromatins des Zellkerns und schließlich zum Zelltod. Als Mitglieder der Familie der Tumor Nekrose Faktoren (TNF) sind vor allen TNF- $\alpha$ , TRAIL und CD95-Ligand (Fas- oder Apo1-Ligand; CD178) zu nennen, die von CTL und NK-Zellen auf ihrer Zellmembran exprimiert werden oder aus intrazellulären Speicher-Vesikeln ausgeschüttet werden (Verhoven, 1995; Vermes, 1995; Mori 1997; Zamai, 1998; Bossi, 1999).

### **3.1 Rolle der Zytokine bei der Immunabwehr**

Die schon erwähnte Oberflächen-Expression oder Sekretion von Mitgliedern der TNF Familie ist ein Teil eines weiteren Killing-Mechanismus der Effektor-Zellen des Immunsystems. Es ist eine Möglichkeit, Zielzellen durch Sekretion löslicher Mediatoren, der Zytokine, zu töten. Zytokine sind eine sehr heterogene Gruppe löslicher Proteine und Peptide, die als humorale Regulatoren in pico- und nanomolaren Konzentrationen Einfluß auf die Aktivität von meist nahegelegenen Zellen und Geweben haben. Die Gruppe der Zytokine beinhaltet eine Reihe von Wachstumsfaktoren, Interferonen, Interleukinen und das Koloniewachstum stimulierenden Faktoren. Da sie als nicht-membrangängige Glycoproteine vorliegen, benötigen Zytokine einen entsprechenden Rezeptor um ihre Wirkung zu entfalten. Zytokine und Chemokine werden von den Zellen des Bluts selbst gebildet und sezerniert und dienen der Verständigung der Zellen untereinander.

Als Beispiel einer durch Zytokine regulierten Kaskade der zellulären Immunantwort dient eine reife Dendritische Zelle (DC), die während der MHC II-vermittelten Antigenerkennung über die Bindung von CD40 und CD40-Ligand aktiviert wurde und nun IL-12 sezerniert. IL-12 stimuliert T-Helfer-Zellen zur Differenzierung zu aktiven Th<sub>1</sub>-Zellen und zu einer Freisetzung von Interferon- $\gamma$  welches Makrophagen stimuliert und die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen auslöst. IL-12 ist zugleich ein starker Stimulus für NK-Zellen und lockt sie in Regionen der ursprünglichen DC-Aktivierung, wo sie ebenfalls Interferon- $\gamma$  sezernieren und dadurch ihrerseits

Makrophagen anlocken (Parham, 2000). Ein besonders für CTL häufig beobachteter Tötungsmechanismus ist die Expression oder Sekretion von Molekülen der Tumor-Nekrose-Faktor Familie (TNF). Hier kommt dem CD95-Ligand (CD178) und dem TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) die größte Bedeutung zu. Sie lösen durch Bindung an ihre Rezeptoren auf den Zielzellen eine Kaskade von Enzymaktivierungen aus, die schließlich in eine Apoptose der Zielzelle mündet.

Die große Vielfalt an Wachstumsfaktoren, Interferonen, Interleukinen und das Koloniewachstum stimulierenden Faktoren wirken in ihrer Vielzahl redundant, synergistisch oder antagonistisch. So wirkt IL-10 inhibierend auf T-Zellen und NK-Zellen, während IL-2, IL-12 und IL-15 aktivierend wirken. Diese Effektorzellen sezernieren daraufhin ihrerseits IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, Interferone und TNFs und regulieren damit die Differenzierung anderer Zellen, oder aber sie töten dadurch ihre Ziele (Burmester, 1998).

#### **4 „T-cell education“**

Die enorme Vielfalt der T-Zell-Rezeptoren, die durch die Rekombinationsereignisse entsteht, ermöglicht auch die Bildung solcher Kombinationen, die körpereigene Antigene auf MHC I erkennen. Damit diese T-Zellen durch die Erkennung von „selbst“-Antigenen nicht aktiviert werden, müssen sie ausgeschaltet werden; das gesamte T-Zell-Repertoire muß gewissermaßen „erzogen“ werden. Diesen Vorgang nennt man Selektion. Die Erziehung der T-Zell-Vorläufer, der Pro-Thymozyten, die über den fetalen Dottersack, die fetale Leber und schließlich das Knochenmark in den Thymus gelangen, findet in den verschiedenen Kompartimenten des Thymus statt (Lansdorp, 1993; Ohashi, 1996; Miller, 1996).

Der Vorgang der Erziehung der T-Zellen wird unterteilt in die Prozesse der negativen und positiven T-Zell Selektion, wobei die negative Selektion den Anfang der T-Zell Erziehung darstellt. Zu Beginn dieses ersten Schritts der negativen Selektion tritt der TCR der Pre-T-Zellen in Kontakt mit MHC auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC), also Makrophagen und Dendritischen Zellen, und mit MHC der Epithelzellen des Thymus.

Kann der pre-TCR nicht an den körpereigenen MHC binden, würden die T-Zellen später Fremd-Antigen nicht erkennen. Diese Zellen wären dem eigenen Körper zwar ungefährlich, aber auch unnützlich und sterben durch einen programmierten Selbstmord beziehungsweise durch das Ausbleiben eines rettenden Signals durch MHC Bindung.

In einem zweiten Schritt werden pre-T-Zellen, die hoch-affin an „selbst“-MHC binden, ausgeschaltet. Diese Zellen könnten später zytotoxische Reaktionen gegenüber eigenen APCs verursachen, da sie unabhängig von der Antigenbeladung des MHC zu einer Aktivierung der T-Zelle führen würden. Auch diese Zellen werden der Apoptose überlassen, wobei hierbei die von den Thymusepithelzellen sezernierten Zytokine IL-1, IL-2, IL-6 und IL-7 eine wichtige Rolle spielen (DiSanto, 1999).

T-Zellen, welche die körpereigenen MHC nicht sehr stark gebunden hatten, entkamen den Mechanismen der negativen Selektion bisher unbeschadet und werden nun der positiven Selektion unterzogen. Diesen T-Zellen wird durch Dendritische Zellen ein Repertoire an autolog exprimierten Antigenen präsentiert. Diese Antagonisten der positiven Selektion repräsentieren die etwa 10.000 Einzelpeptide einer lebenden Zelle. Eine Pre-T-Zelle, die das auf MHC präsentierte Peptid erkennt, könnte potentiell autoreaktiv werden und wird dadurch ebenfalls eliminiert. So gehen etwa 90% der ursprünglich gebildeten Zellen unter, während die verbleibenden 10% den Thymus verlassen und durch das periphere Blut und die Organe zirkulieren. Für die Aktivierung einer T-Zelle ist sowohl die Bindung an einen Peptid-MHC Komplex als auch ein kostimulatorisches Signal durch eine APC nötig. Auf Seiten der APC sind an der Generierung eines kostimulatorischen Signals die Moleküle CD80 und CD86, auf Seiten der T-Zelle das Molekül CD28 beteiligt. Fehlt ein kostimulatorisches Signal während der Antigenerkennung, kann es dazu führen, daß T-Zellen anerg und somit dem eigenen Körper aber auch infizierten oder transformierten Zellen ungefährlich werden (Arnold, 1992, 1993; Schönrich, 1993).

Parallel zu den hier beschriebenen Vorgängen arrangieren die noch unreifen, für die Oberflächenproteine CD4 und CD8 doppelt-negativen Pro-Thymozyten ihren TCR durch den Mechanismus der somatischen Rekombination. Die Reihenfolge des Rearrangements beginnt bei der  $\alpha$ -Kette, gefolgt von der  $\beta$ -Kette und den anderen Ketten  $\gamma$  und  $\delta$ . Jede dieser Ketten besteht aus ein oder zwei immunglobulinähnlichen Domänen. Im Verlauf dieser Umgestaltung werden zunächst sowohl CD4 als auch CD8 exprimiert. Die Zelle „entscheidet“ sich erst danach für eines der beiden Oberflächenproteine und ist letztlich nur einfach positiv für CD4 oder CD8 („lineage commitment“). Damit ist zugleich auch ihre zukünftige Funktion als T-Helfer-Zelle oder als zytotoxische T-Zelle determiniert (Robey, 1990; Buslinger, 2000; Asnagli, 2001; MacDonald, 2001).

Die Regionen des TCR, die das Peptid in der MHC Bindungstasche erkennen, sind in drei hypervariablen Regionen der  $\alpha$ -Kette zusammengefaßt, wobei letztlich nur die dritte Region (CDR3) über die Antigen-Bindung entscheidet.  $\alpha\alpha$  TCR-negative T-Zellen können nicht

spezifisch an Antigen-präsentierenden MHC binden und unterliegen folglich auch nicht den beschriebenen Selektionsprozessen. Die Entscheidung für die Entstehung einer  $\alpha$ -TCR-positiven T-Zelle fällt im Thymus etwa im Stadium des CD4- und CD8- doppelt-negativen, pre-TCR exprimierenden Thymozyten (Mallick-Wood, 1998; Hayday, 1999). Das kritische Ereignis hierbei scheint die Anwesenheit der  $\beta$ -Kette des allgemeinen Zytokin-Rezeptors zu sein (DiSanto, 1996; Rodewald, 1997; Malissen, 1997), wobei auch extra-thymische Rekombinationsereignisse diskutiert wurden (Parker, 1990; Sharara, 1997).

Als Liganden der verschiedenen  $\alpha$ -T-Zell-Rezeptoren werden Phosphoantigene, Glycoproteine oder MICA und MICB diskutiert (Davodeau, 1993; Groh, 1998; Wu, 2000; Lohwasser, 2001). Als Regulativ der Aktivierung durch diese sehr weit verbreiteten Antigene besitzen  $\alpha$ -T-Zellen inhibierende NK-Rezeptoren, die durch Bindung an spezifische MHC I Moleküle eine Lyse der Zielzelle verhindern. Es kann unterschieden werden zwischen CD4-negativen und CD4-positiven  $\alpha$ -T-Zellen. Letztere exprimieren keine NK-Rezeptoren und zeigen bei einer Bindung ihres Liganden keine direkte zytolytische Aktivität, sondern wirken immunoregulativ durch Ausschüttung von Zytokinen (Moris, 1999; Hayday, 2000).

## 5 Natürliche Killer-Zellen

Die Wurzeln der zellulären Immunabwehr liegen weit in der Entwicklungsgeschichte der Tiere zurück. So sind etwa ab der Stufe der Knochenfische allen Lymphozyten-ähnlichen Zellen ihre Lymphopoese, die Signalwege in der Differenzierung der Zelllinien und die Struktur des MHC gemeinsam. Erste Formen einer Antikörper-vermittelten Abwehr werden schon bei frühen Vertebraten wie dem Zwölfauge gefunden (Hansen, 1998), eine induzierbare humorale Immunabwehr ist sogar für Mollusken beschrieben. Immunkompetente Zellen selbst werden in Tieren phylogenetisch noch älteren Ursprungs gefunden und sind im ganzen Tierreich weit verbreitet. Schon Anneliden, primitive Schnecken oder Insekten besitzen Abwehrzellen, die eingedrungene Mikroben phagozytieren und lysieren, oder die sich um größere Fremdkörper lagern, sie einschließen und encystieren und auf diese Weise unschädlich machen. Selbst Schwämme stoßen allogene Transplantate ab und ein immunologisches Gedächtnis existiert bereits bei einfachen Deuterostomen wie den Echinodermen. Diese Zellen einer natürlichen Immunabwehr erkennen auf sehr einfache und wenig spezifische Weise viele Pathogene

(Horton, 1989). Das Prinzip dieser Immunabwehr scheint jedoch eher auf einer Erkennung von „nicht-selbst“ zu basieren, als auf einer Abwehr von als „fremd“ erkannten Strukturen.

Natürliche Killerzellen gehen bei der Abwehr von Virus-Infektionen oder malignen Transformationen körpereigenen Gewebes nach einem ähnlichen Prinzip vor. Sie attackieren Zellen, die keine Merkmale von „selbst“ erkennen lassen. NK-Zellen töten speziell diejenigen Zellen, die ihre MHC I Expression verändert oder verringert haben (Stern, 1980; Ljunggren, 1985; Kärre, 1988). Sie komplementieren damit die Funktionsweise der T-Zellen, die Peptide intrazellulären Ursprungs auf MHC beinahe jeder Körperzelle auf „selbst“ oder „fremd“ überprüfen und gegen „fremd“-Protein präsentierende Zellen vorgehen.

Als Teil der natürlichen Immunabwehr wurden NK-Zellen als selbständige Lymphozytenpopulation noch Mitte der 70-er Jahre von Kiessling (1975) lediglich funktionell durch ihre zytolytische Aktivität ohne vorherige Aktivierung oder Immunisierung charakterisiert oder durch ihr histologisches Bild als Large Granular Lymphocytes (LGL) definiert. Seit Ende der 70er Jahre sind sie jedoch als eigenständige Lymphozytenpopulation anerkannt. Zu ihrer Identifizierung dient als einziger ausschließlich NK-Zell spezifischer Marker das Adhäsionsmolekül CD56, dessen genaue Funktion jedoch nicht bekannt ist. Als NK-typische, aber nicht NK-spezifische Oberflächenantigene dienen der niedrig-affin bindende Rezeptor für den Fc Teil der Antikörper FcIII<sub>R</sub> (CD16), und NK-Rezeptoren mit immunglobulin-ähnlicher Struktur (Lanier, 1986). NK-Zellen teilen viele ihrer Charakteristika mit NK-T-Zellen und  $\alpha$ -T-Zellen, wie beispielsweise extrazelluläre Marker, das histologische Erscheinungsbild oder die Art, ihre Opfer zu töten.

Die ersten Untersuchungen zu NK-Zellen beschrieben sie als Killerzellen, die besonders effektiv diejenigen Zellen angreifen und lysieren, die von Protozoen befallen wurden oder von Viren wie HSV, EBV, HCMV und HPV (reviewed von Biron, 1997) infiziert wurden. Auch wurden sie als Quelle protektiver Lymphokine bei einem Befall durch intrazellulär lebende Protozoen beschrieben (Unanue, 1997).

NK-Zellen schienen in einem stets aktivierten Zustand dieser Vor-Aktivierung durch MHC nicht zu bedürfen. Ihre Aufgabe wurde in der Suche nach Zellen mit reduzierter oder veränderter MHC I Expression gesehen. Anhand verschiedener Tiermodelle konnte jedoch gezeigt werden, daß NK-Zellen verantwortlich für die Abstoßung von Transplantaten sind, wie z.B. von ganzem Knochenmark oder von aufgereinigten hämatopoetischen Stammzellen. Auch die Abstoßung eines parentalen Knochenmark-Transplantats, die sogenannte „hybrid resistance“, konnte auf die

Beteiligung von NK-Zellen zurückgeführt werden (reviewed von Yokoyama, 1995; Ohlen, 1995).

## **5.1 Die Hypothese des „missing self“**

Diese Beobachtungen führten 1985 zur Formulierung der Hypothese des „missing self“ durch Kärre und Ljunggren (1985, 1986). Die Beteiligung von NK-Zellen konnte für die Abstoßung eines Tumor-Transplantats in Empfängermäusen, denen ein H2-I Allel fehlte, gezeigt werden (Ljunggren, 1985, 1990; Kärre, 1986, 1997). Der Angriff auf das Tumorgewebe folgte dem Prinzip einer fehlenden Inhibition der NK-Zellen durch „selbst“-MHC I - also eine Lyse aufgrund des „missing self“ statt eines „non self“.

Diese Inhibition der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen sollte durch inhibierende Mechanismen oder Rezeptoren gewährleistet werden, die Kärre (1986) postulierte und die nach ihrer erstmaligen Beschreibung auf NK-Zellen der Maus „NK-Rezeptoren“ oder „killer cell inhibitory receptors“ (KIR) genannt wurden.

In den folgenden Jahren wurden eine ganze Reihe solcher Rezeptoren gefunden und ihre Bindungsspezifität (Moretta, 1996; Rajagopalan, 1999), die Lokalisation auf dem humanen Chromosom 19, 19q13.4 (Dupont, 1997), intrazelluläre Signalwege (Blery, 2000) und ihre Rolle bei der Bindung der NK-Zellen an ihre Zielzellen (Vales-Gomez, 2000; Long, 2000) aufgeklärt. Allen diesen Rezeptoren ist gemeinsam, daß ihre Liganden auf den kontrollierten Partnerzellen MHC I Moleküle sind.

Das Charakteristikum der NK-Zellen, das zu der Definition als selbständige Gruppe der Lymphozyten führte, ist ihre spontane Aggressivität die keiner vorherigen Antigen-spezifischen Aktivierung bedarf. Selbst eine Anlockung oder Aktivierung durch Zytokine wie IL-2, IL-12 oder IL-15 ist nicht essentiell für eine Reaktivität gegenüber potentiellen Zielzellen (Glas, 2000). Als Grund hierfür wurden lange Zeit unbekannte, NK-eigene Rezeptoren oder der Rezeptor für die Fc-Domäne von Antikörpern, CD16, diskutiert (Lanier, 1998). Diese Rezeptoren sollten an Liganden auf den kontrollierten Zellen binden und dadurch eine Aktivierung der NK-Zellen auslösen. Während des letzten Jahres wurden von den Gruppen von Colonna in Basel und der Brüder Moretta in Genua mehrere Kandidaten für jene Rezeptoren und deren Liganden vorgestellt (Moretta, 2000; Mingari, 2000; Nakajima, 2000).

## 5.2 NK-Rezeptoren

Die von Kärre (1986) postulierten Rezeptoren der NK-Zellen, die durch eine Interaktion mit dem MHC I der kontrollierten Körperzellen die für NK-Zellen charakteristische spontane Reaktivität inhibieren, wurden in den letzten fünf Jahren sehr intensiv beforscht. In internationalen Datenbanken sind mittlerweile mehr als 130 cDNAs von humanen inhibierenden oder aktivierenden Rezeptoren verfügbar. NK-Rezeptoren lassen sie sich in zwei große Gruppen unterteilen:

Zum einen sind dies Rezeptoren, die eine C-Lektin ähnliche Struktur (CD94) besitzen und den inhibierenden Rezeptoren der NK-Zellen der Maus homolog sind. Sie assoziieren mit einem der Moleküle der NKG2-Familie zu einem Hetero-Dimer, wobei das NKG2-Molekül den funktionellen zytoplasmatischen Teil beisteuert (Lanier, 1998; Colonna, 1998). Bei Bindung an NKG2C, -D oder -E bilden diese durch Assoziation mit DAP10- oder DAP12-Moleküle ein Heterodimer und steuern dadurch jeweils zwei ITAM Motive (immunoreceptor tyrosine-based activatory motifs) zu diesem Zytotoxizität aktivierenden Komplex bei.

Zum anderen sind es Rezeptoren mit Immunglobulin-ähnlicher Struktur. Diese werden in eine Reihe weiterer Gruppen unterteilt, die sich in Molekulargewicht und Bindungsspezifität unterscheiden. Auf NK-Zellen finden sich vor allem Rezeptoren der Sub-Gruppen der p58-KIR (CD158a/b, NKAT1/2, KIR2DL1-3; Döhning, 1996), der p70-KIR (KIR3DL1, NKAT3-4; Colonna, 1995), der LAIR (Meyaard, 1997) und der p140-KIR (Pende, 1996). Zu jedem dieser inhibierenden Rezeptoren gibt es ein aktivierendes Pendant, das sich im extrazellulären Teil des Proteins nicht vom inhibierenden „Zwilling“ unterscheidet (Biassoni, 1996). Der Unterschied zwischen inhibierender und aktivierender Form liegt zum einen im Fehlen des zytoplasmatischen Anteils des Rezeptors, einer positiv geladenen Aminosäure im Transmembranteil, an die akzessorischen Transmembranproteine assoziieren, sowie in der von ihnen angestoßenen intrazellulären Signalkaskade (Blery, 2000).

### 3.2.1 Bindungsspezifität der NK-Rezeptoren

Jeder NK-Rezeptoren besitzt eine genau definierte Spezifität für wenige Subtypen des MHC I (Colonna, 1997). NK- und  $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimieren normalerweise ständig mehrere verschiedene Mitglieder der unterschiedlichen Gruppen und Rezeptor-Familien. Somit ist ständig

gewährleistet, daß mindestens ein Rezeptor seinen Liganden auf der kontrollierten Zielzelle findet und ein inhibierendes Signal generiert werden kann.

CD94 und die verschiedenen Formen seiner inhibierend wirkenden, akzessorischen Moleküle NKG2A-B binden mit hoher Affinität nur HLA-E. Und auch das nur, wenn im HLA-E Molekül das Signalpeptid einer Reihe der klassischen MHC I Moleküle präsentiert wird (Braud, 1998).

Die fünf Rezeptoren der KIR2DL-Familie (CD158, p58) bestehen aus zwei extrazellulären Immunglobulindomänen und erkennen ausschließlich jeweils nur eine kleine Zahl der Moleküle der HLA-C Untergruppe des MHC I (Winter, 1998). In Tabelle 1 wurden die in der Literatur am häufigsten untersuchten NK-Rezeptoren herausgegriffen und den sie bindenden MHC I Molekülen zugeordnet. Im Detail ist dies in Abbildung II dargestellt (Abb. II siehe Anhang; leicht verändert nach Pierre Coulie, Brüssel, 1998, unveröffentlicht), auf der NK-Rezeptoren und ihre Liganden auf der Seite der Zielzellen gegenübergestellt werden.

### **3.2.1 Ort der Bindung der NK-Rezeptoren**

Der Ort der Bindung der KIR an den MHC I ist nicht die Antigenbindungsgrube, sondern das Ende der  $\alpha$ 1-Helix der schweren Kette (Gumperz, 1995, hieraus auch Abb. 1), wobei hier die Aminosäuren 77 bis 83 essentiell für eine erfolgreiche Signaltransduktion durch den KIR sind (Biassoni, 1995; Mandelboim, 1997). Die Bindung und das darauf folgende Signal des KIR scheint unabhängig von einer Glycosilierung und, vor allem, fast unabhängig von einer Peptidbeladung des MHC zu sein (Rajagopalan, 1997; Mandelboim, 1997).

## Von NK-Zellen am häufigsten exprimierte Rezeptoren

### Ig-like Rezeptoren

Rezeptoren	Funktion	Liganden	
KIR2DL1	p58.1 , CD158a	inhibierend	HLA-Cw2, Cw4, Cw5, Cw6
KIR2DL2	p58.2 , CD158b	inhibierend	HLA-Cw1, Cw3, Cw7, Cw8
KIR2DL3	p58.3	inhibierend	HLA-Cw1, Cw3, Cw7, Cw8
KIR2DS1	p50.1 , CD158a	nicht-inhibierend	HLA-Cw2, Cw4, Cw5, Cw6
KIR2DS2	p50.2 , CD158b	nicht-inhibierend	HLA-Cw1, Cw3, Cw7, Cw8
KIR3DL1	p70 , NKB1	inhibierend	HLA-Bw4 Gruppe
KIR3DL2	p140	inhibierend	HLA-A
By55	CD160	inhibierend	HLA-G (?)
LAIR		inhibierend	?
2B4	CD244	aktivierend	CD48

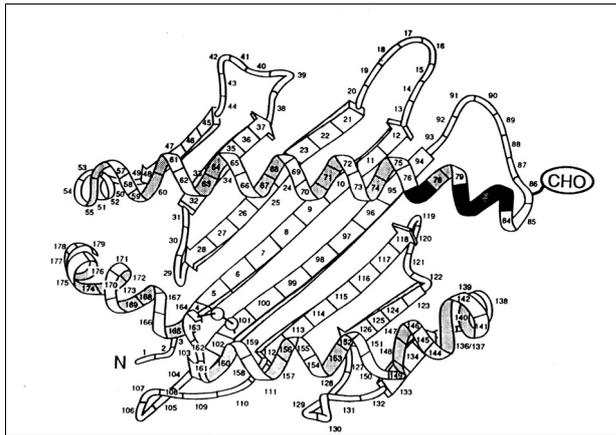
### Lektin-like Rezeptoren

	CD94/NKG2A, -B	inhibierend	HLA-E
	CD94/NKG2C	nicht-inhibierend	HLA-E
	CD94/NKG2D	nicht-inhibierend	MIC-A, MIC-B
	CD94/NKG2E	nicht-inhibierend	?
	CD161/P1-A, -B	nicht-inhibierend	CD1d, Heparine

**Tab. 1: Liste humaner NK-Rezeptoren, ihrer angenommenen Funktion und ihrer MHC I-Liganden.**

(Maiza, 1993; Biassoni, 1995; Colonna, 1995; D'Andrea, 1995; Wagtmann, 1995; Döhning, 1996; Selvakumar, 1996; Colonna, 1997; Anumanthan, 1998; Braud, 1998; Lanier, 1998; Agrawal, 1999; Lohwasser, 1999; Lopez-Botet, 1999; Vales-Gomez, 1999, Muench, 2000).

Dies ist ein weiteres Indiz für die Peptid-unspezifische Erkennung maligne veränderter Zellen durch NK-Zellen (Zappacosta, 1997; Carbone, 1997). Für die Bindung von KIR an MHC I wurde eine 1:1 Stöchiometrie gefunden (Fan, 1996) wobei an der Bindung an den MHC I auf der Seite der KIR2DL/KIR3DL jeweils alle 2 bzw. 3 Immunglobulindomänen beteiligt sind (Rojo, 1997). Weiterhin wurde für inhibierende NK-Rezeptoren eine etwa 3- bis 10-fach höhere Bindungsenergie gemessen, als dies für einen Komplex von MHC Ligand und aktivierendem NK Rezeptor beobachtet werden konnte. Bei Anwesenheit von inhibierenden Rezeptoren scheinen also aktivierende Rezeptoren keine Rolle zu spielen (Vales-Gomez, 1998).



**Abb. 1: KIR Bindungsstelle am MHC I (HLA-A2)**

Banddiagramm-Darstellung der MHC I Bindungsgrube für das Allel HLA-Bw4 in Aufsicht –aus Sicht des T-Zell-Rezeptors. Dunkel hervorgehoben sind die Aminosäuren 77 bis 83 der  $\alpha$ 1-Helix der schweren Kette. An diesen Aminosäure-Positionen findet eine Bindung von NK-Rezeptoren statt (Gunperz, 1995). Gut zu sehen ist die nach auswärts gerichtete Stellung und eine dadurch erleichterte Bindung der NK-Rezeptoren an den MHC I.

### 3.2.2 KIR/KAR-Signalling

Verantwortlich für eine inhibierende Wirkung der Bindung NK-Rezeptor/Target-MHC I sind ein oder mehrere zytoplasmatische ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs). Bei Bindung eines KIR an MHC I werden diese ITIMs SH2-domänenvermittelt durch eine Protein-Tyrosin-Phosphatase (SHP1) phosphoryliert. Durch die nun angestoßene Enzymkaskade wird die vorherige Aktivierung der NK-Zelle dominant blockiert und somit die Lyse der Zielzelle verhindert (Colonna, 1997). Hierauf löst sich die Bindung zur Zielzelle, die durch das Adhäsionsmolekül LFA1 auf der NK-Zelle vermittelt wird (Long, 2000), und beide Zellen trennen sich ohne weitere Wechselwirkung.

Die aktivierenden NK-Rezeptoren assoziieren durch eine positiv geladene Aminosäure (Lysin) im Transmembran-Bereich mit zwei DAP12 Molekülen (Lanier, 1998), die in ihrem zytoplasmatischen Bereich zwei ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activatory motifs) tragen. Die Tyrosin-Phosphorylierungs-Stellen dieser ITAMs werden durch die Tyrosinkinasen der *src*-Familie, *ZAP-70* und *syk*, aktiviert. Die hierauf folgenden intrazellulären Phosphorylierungen führen zu einer weiteren Aktivierung und zur zytotoxischen Reaktion der NK-Zelle. Andere aktivierende Rezeptoren auf humanen NK-Zellen sind der FCIII-Rezeptor (CD16), der durch Bindung des Fc-Teils eines Antikörpers aktiviert wird, und der CD40-Ligand

(CD154), der durch Bindung an CD40 eine Lyse der Zielzelle herbeiführt (Mirtin-Fontecha, 1999; Zheng, 1998; Carbone, 1997).

Eine Besonderheit stellen einige humane Zytomegalie-Virus-Stämme (hCMV) dar, die durch ihre Wirtszelle in einer Art Mimikry ein Peptid, UL18, auf deren Zelloberfläche präsentieren lassen (Tomasec, 2000; Kärre, 2000), das an inhibierende Rezeptoren bindet und dadurch NK-Zellen inhibiert. Für T-Zellen erscheint UL18 jedoch nicht als MHC, wodurch die Wirtszelle nach wie vor für T-Zellen unsichtbar ist und dadurch einer Eliminierung durch das Immunsystem entgeht (Rayburn, 1997).

### **3.3 Entwicklung der NK-Zellen**

Es wird angenommen, daß die NK-Zellen zwar wie T- und B-Zellen Mitglied der lymphoiden Differenzierungsreihe sind, aber nicht den Weg der zytotoxischen T-Zellen einschlagen und zum Thymus wandern oder dort gebildet werden (Metcalf, 1984). Vielmehr werden sie direkt von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks abgeleitet, ohne einem positiven oder negativen Selektionsprozeß unterzogen worden zu sein (Uhrberg, 2000). Rolink (1999) konnte zeigen, daß in ihrer Differenzierung arretierte Pax5<sup>-/-</sup> pre-B-Zellen durch Zugabe von IL-2 zum Kulturmedium ohne weiteres dazu veranlaßt werden können, in NK-Zellen zu differenzieren. Diese NK-Zellen bedurften also keiner Thymuspassage (Nutt, 1997; Rolink, 1999).

#### **3.3.1 Entwicklung der NKT-Zellen**

Die Entwicklung der NK-Zellen war lange Zeit unklar und ist noch immer Gegenstand kontroverser Diskussionen (Lanier, 1986; Buer, 1997). Auch war die Unterscheidung zwischen NK-Zellen und NKT-Zellen unklar; NKT sind T-Zellen die zusätzlich NK-Zell Marker tragen (Lanier, 1986).

Effektor-Zellen, die sowohl T-Zell, wie auch NK-Zell-Marker tragen, werden mittlerweile als NKT-Zellen bezeichnet. Zur Charakterisierung dieser Lymphozyten-Population dienen vorwiegend die Oberflächenmarker CD56 und CD3. Vorläufer der Zellen, die für die Marker CD56 und CD3 doppelt-positiv sind, können im Maus-Modell sehr gut studiert werden. Aus

diesem Grund existieren zu ihrer Entwicklung deutlich mehr Daten und Ergebnisse als zu CD3 negativen NK-Zellen.

Sie wurden, wie auch die Vorläufer der T-Zellen, in der Fetalen Leber, im Knochenmark und im Thymus gefunden und durch Oberflächenmarker der lymphoiden Reihe wie CD2, CD5 und CD7 charakterisiert. Sie sind daher sehr gut zu beobachten und leicht in ihrer Entwicklung zu verfolgen. Diese NKT-Zellen benötigen für ihre Entwicklung Signale durch eine Bindung der pre-T-Zell-Rezeptoren und der inhibitorischen Rezeptoren an ihre Liganden (Held, 1996). Bei CD1-positiven Thymozyten entscheidet zum Zeitpunkt des „lineage Commitment“ die Interaktion des CD1 mit einem Liganden im Thymus-Kortex über ihr Schicksal. Eine frühe Interaktion führt zu CD8-positiven NKT-Zellen während eine Bindung nach der Entscheidung für eine T-Zell-Linie nur noch die Entstehung CD4-positiver NKT-Zellen zulässt. Ebenso scheint die Fähigkeit zur Produktion von IL-4 durch frühe Thymozyten entscheidend für eine weitere Entwicklung zur NKT-Zelle zu sein (Lantz, 1997). Diese NKT-Zellen exprimieren KIR-Rezeptoren in hoher Dichte und tragen einen rearrangierten T-Zell-Rezeptor. Bei einem Teil der NKT-Zellen vermag der TCR MHC nicht zu erkennen, kann aber an Glycolipide binden, die auf CD1 präsentiert wurden (MacDonald, 1997; Ohteki, 1998). Für die Entwicklung zur reifen NKT-Zelle konnten einige essentielle Ereignisse oder Marker definiert werden. Dies ist die Expression der *Ikaros*-Transkriptionsfaktoren während des Schritts von der CD34-positiven hämatopoetischen Stammzelle zur pre-NKT-Zelle. Der nächste Schritt dieser lymphoiden Progenitorzelle zur CD25-positiven pre-NKT-Zelle kann nicht ohne Signale der  $\alpha\beta$  oder  $\gamma\delta$  Kette des IL-2 Rezeptors, des *jak3*-Rezeptors oder der  $\alpha\beta$  Kette des IL-15 Rezeptors ablaufen. Der nächste Schritt benötigt die Aktivierung des *ETS1*- und des *Irf1*-Transkriptionsfaktors. Letztlich reifen NKT-Zellen nur durch Signale von IL-12 oder IL-18. Eine NK-Zell-Aktivität ist schließlich ohne die Tyrosinkinasen der *src*-Familie, *vav* und *syk* nicht möglich (Mingari, 1997; Billadeau, 1998; Fujii, 1998; Ogasawara, 1998; Lantz, 1997; Boggs, 1999; Galandrini, 1999; Nicol, 2000).

### 3.4 „NK-cell education“

Ähnlich wie für T-Zellen wurde auch für NK-Zellen ein Mechanismus vermutet, der die Toleranz dieser spontan reaktiven Killerzellen gegenüber dem eigenen Körper gewährleistet. Für diese Erziehung der NK-Zellen existieren derzeit zwei Hypothesen, die jedoch durchaus miteinander vereinbar sind, bzw. kombiniert werden können.

### 3.4.1 Hypothese der „Rezeptor Kalibrierung“

Die Theorie der „Rezeptor-Kalibrierung“ geht zurück auf Arbeiten der Gruppe von Kärre in Stockholm (Sentman, 1995; Olsson, 1995; Hoglund, 1997). Kärre und seine Mitarbeiter isolierten bei H2-D<sup>d</sup> Mäusen verschiedene NK-Populationen, deren „selbst“-erkennender KIR (Ly49A) sowohl in hoher als auch in niedriger Expressionsdichte vorlag. Eine Tumortalie, deren H2-D<sup>d</sup>-Expression verringert war, konnte nur von Ly49<sup>low</sup>-NK-Zellen lysiert werden.

Hieraus leitete die Arbeitsgruppe um Kärre ab, daß eine zytolytische Aktivität von NK-Zellen, bzw. das Ausbleiben eines inhibierenden Signals auf die NK-Zelle einer gewissen Anzahl von inhibierenden Signalen pro NK-Zelle bedarf. Die Inhibition einer NK-Zell-Aktivität wird demnach durch einen Schwellenwert an Signalen in der Zelle geregelt. Der kritische Schwellenwert für die Inhibition kann leichter überschritten werden, wenn wenigen Ziel-MHC I Molekülen eine Vielzahl an Rezeptoren gegenüberstehen. Eine Vielzahl von Ziel-MHC I Molekülen hingegen - der Normalfall für eine gesunde Körperzelle - wird ebenfalls genügend viele inhibierende Signale generieren, wenn eine geringe Anzahl von NK-Rezeptoren vorhanden ist.

NK-Zellen, deren „selbst“-erkennende KIRs nur in geringer Dichte vorliegen, sind jedoch viel effizienter und empfindlicher in der Erkennung von körpereigenen Zellen, deren MHC I Expression verändert oder reduziert wurde. Hierfür muß jedoch eine Rezeptor-Kalibrierung vorausgegangen sein, die zwar eine NK-Toleranz gewährleistet, zugleich aber empfindlich gegenüber veränderter MHC I Expression ist.

Diese Rezeptor-Kalibrierung, wie die Regulation der TCR-Expressionsdichte bei T-Zellen (Rocha, 1991; von Boehmer, 1991; Schönrich, 1992), kann jederzeit durch eine Anpassung an die momentan herrschenden Bedingungen in der Umgebung der Zelle erfolgen. Die NK-Zelle ist also imstande auf unterschiedliche Einflüsse wie z.B. Zytokine oder die MHC I Dichte und MHC I Expression der kontrollierten Zellen zu reagieren (Karlhofer, 1993; Johansson, 1997). Denkbar ist aber genauso, daß der Zeitpunkt dieser Kalibrierung während der Entwicklung oder Reifung der NK-Zellen zu suchen ist. Die Rezeptorexpression der Killerzellen kann auf eine minimale, für eine Inhibition noch ausreichende Dichte eingestellt und an die im Körper herrschenden Normalbedingungen anpaßt werden. Sie ist sozusagen auf den Normalzustand eingestellt. Diese Regulationsmechanismen kommen bei Killerzellen sicherlich zu verschiedenen Zeitpunkten vor und bestimmen die Expressionsdichte „selbst“-erkennender KIRs

auf NK-Zellen, um sie optimal an physiologische Prozesse im Organismus anzupassen (Sykes, 1993; Salcedo, 1997; Johansson, 1997).

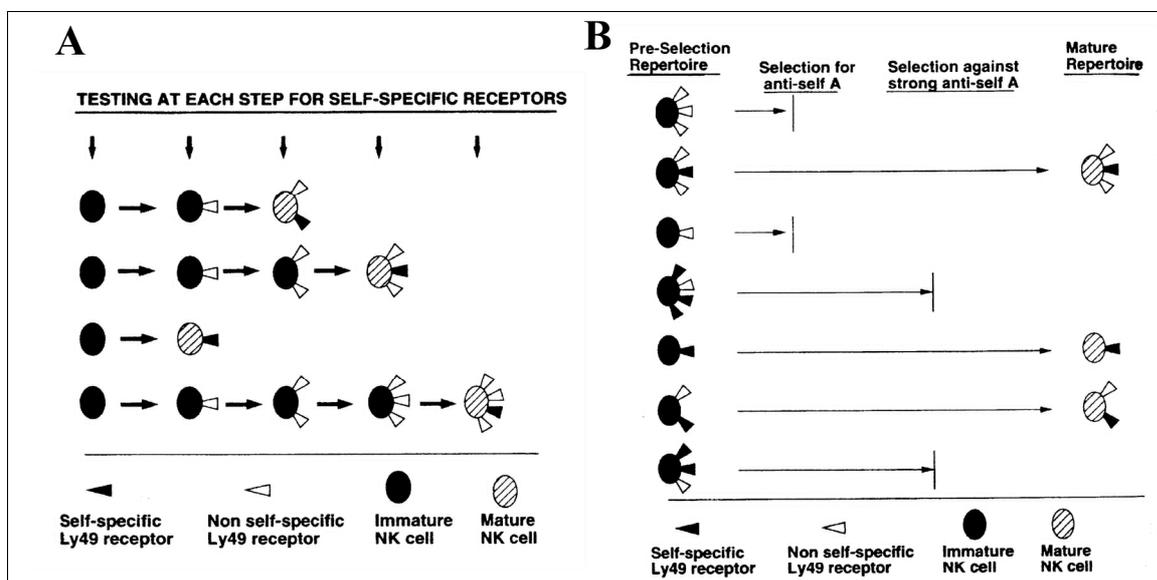
Für beide Fälle wurde angenommen, daß jede NK-Zelle eine Reihe verschiedener inhibierender Rezeptoren exprimiert, von denen zumindest einer immer einen Liganden auf der Zielzelle finden kann (Lanier, 1996; Valiante, 1997). KIRs, die „selbst“-MHC nicht erkennen, sind nach Sentman (1995) also weder schädlich noch nützlich und können neben anderen Rezeptoren unbehelligt weiter auf den NK-Zellen koexistieren. Sie sollten sogar in hoher Dichte vorliegen, da eine Kalibrierung an den nicht vorhandenen Bindungspartnern eine hohe Expressionsdichte zur Folge hat (Olsson, 1995, 1997; Johansson, 1997).

### **3.4.2 Hypothese der „allelic exclusion“**

Diese zweite Hypothese wurde von der Arbeitsgruppe um Raulet formuliert und gründet auf der Frage nach den Mechanismen der „selbst“-Toleranz der NK-Zellen (Held, 1995; Raulet, 1997; Dorfman, 1998). Sie schlagen ein Modell der „allelic exclusion“ für die Regulation der Expression verschiedener inhibierender Rezeptoren auf NK-Zellen vor, ähnlich der Regulation des Aufbaus der  $\alpha$ -Kette des T-Zell-Rezeptors und der schweren Kette des Immunglobulins-G (Coleclough, 1981; Storb, 1987; Malissen, 1992). Hier wird die Expression eines Allels die des jeweils anderen hemmen, bis in einer Art MHC-abhängigem „Lern“-Prozeß eine optimal passende Kombination von Rezeptoren gefunden wird. Eine Reihe von inhibierenden Rezeptoren werden nach stochastischem Prinzip exprimiert, wobei verschiedene NK-Zellen unterschiedliche KIRs exprimieren können. In diesem Prozeß einer positiven Selektion sollte die Expression neuer Rezeptoren und der Rekombinationsprozeß gestoppt werden, sobald ein „selbst“-MHC-erkennender KIR ein inhibierendes Signal gibt (Raulet, 1997, daraus Abb. 2; Shilling, 1998). Klonale Unterschiede werden durch spätere Lernprozesse reguliert. Hierbei anerkennen sie (Held, 1996, 1997) das Modell der Rezeptor-Kalibrierung für einen späteren Zeitpunkt der Erziehung der NK-Zellen als praktikabel. Die Bedeutung von Kärres Modell (1995) sehen sie aber lediglich im „fine tuning“ der Rezeptorexpression der Killerzellen. Für die Anpassung der gegebenen klonalen Rezeptorverteilung an die in unterschiedlichen Geweben differierenden Anforderungen der Toleranz oder Aktivität der NK-Zellen führen sie den Beweis, daß es sich dabei nur um eine posttranskriptionelle Regulation der Oberflächenexpression der KIRs handelt. Alternativ präsentiert Held (1996, 1997, 1998) ein Modell der „sequential receptor activation“, bei dem ebenfalls nach einem stochastischen Prinzip eine Reihe unterschiedlicher inhibierender

Rezeptoren transkribiert werden. Hier wird aber ein Innehalten und Fixieren des Rezeptorrepertoires durch den Summeneffekt der Signalstärke aller bis dahin exprimierten KIRs ausgelöst (Held 1996, daraus Abb. 3).

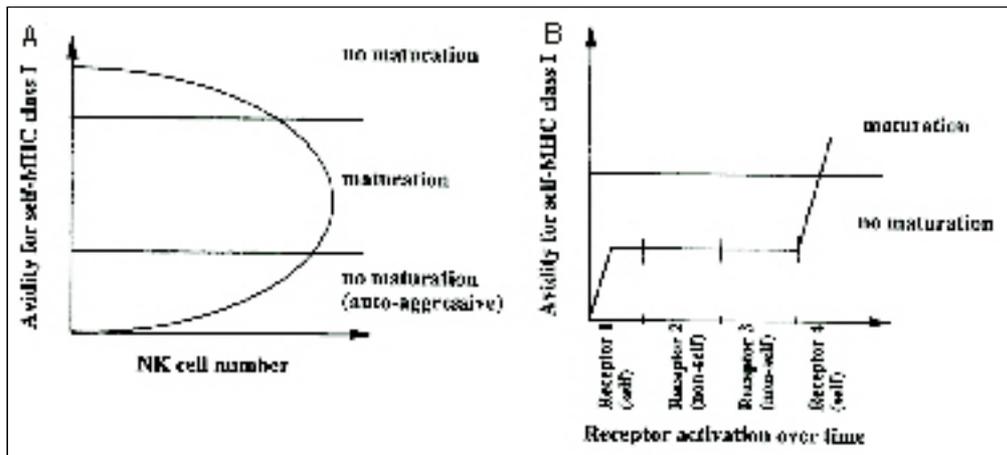
Auch hier lassen beide Modelle (Held, 1995; Raulat, 1997) ausdrücklich die Möglichkeit zu, daß NK-Zellen zusätzlich zu „mindestens einem“ „selbst“-MHC I bindenden inhibierenden Rezeptor noch eine Reihe anderer Rezeptoren exprimieren. Unter diesen KIR können auch „selbst“-MHC I nicht-erkennende Rezeptoren sein, deren Expressionsdichte im Peripherblut oder in den Organen durch andere Mechanismen, wie etwa der Rezeptor-Kalibrierung, reguliert werden.



**Abb. 2: „sequential receptor activation“ und „allelic exclusion model“ nach Raulat (1997)**

**A** NK-Rezeptor-Repertoire Bildung nach Raulat. In sequenziell erfolgreicher, aber Zufalls-bestimmter Abfolge werden von jeder unreifen NK-Zelle Rezeptoren gebildet und am MHC I der umgebenden Zellen des Knochenmarks auf eine Bindung an „selbst“-MHC I getestet. Sobald ein genügend starkes inhibierendes Signal zustandekommt, werden keine neuen NK Rezeptor gebildet und das Repertoire fixiert.

**B** In diesem älteren Modell der „allelic exclusion“ der Bildung von NK-Rezeptoren auf NK-Zellen wurde eine initiale Bildung eines vollständigen Repertoires auf jeder Zelle angenommen. Erst in einem nachfolgendem Schritt sollte durch negative Selektion potentiell autoreaktiven NK-Zellen die Reifung verwehrt werden (reviewed in Raulat, 1997).



**Abb. 3: „allelic exclusion model“ nach Held (1996)**

Darstellung der Rezeptor-Repertoire Bildung in NK-Zellen nach Held. Obwohl die Expression der Rezeptoren auch hier nach dem Zufalls-Prinzip erfolgt, wird jeder neu gebildete NK-Rezeptoren auf Interaktion mit dem MHC I der umgebenden Stroma-Zellen des Knochenmark getestet. Erst nachdem ein ausreichend starkes, inhibierendes Signal generiert wurde, stoppt die Expression; die „NK-cell education“ ist abgeschlossen und die NK-Zellen werden in das periphere Blut entlassen. Für den Fall, daß nur „selbst“-MHC I nicht bindende NK-Rezeptoren gebildet werden, darf diese Zelle nicht in die Peripherie entlassen werden und stirbt.

#### 4 Hypothese der Arbeit

Die von Kärre (1985,1990) aufgestellte Hypothese des „Missing Self“ erklärt die NK-vermittelte Tilgung von Zellen mit tumorbedingter Verringerung der MHC I-Expression. Unter pathologischen Bedingungen kann es im Rahmen einer malignen Transformation von Tumorgewebe und bei Infektionen mit einer Reihe humanpathogener Viren (Burmester, 1998) zu einer Veränderung oder Expressionsverminderung des MHC I kommen. Hier stehen somit NK-Zellen in der ersten Reihe der Abwehr von Virusinfektionen und Tumor-Bildungen. Diese Reduktion der MHC I Expressionsdichte kommt hingegen unter normalen physiologischen Bedingungen nur in wenigen Geweben des Menschen vor, z.B. in immun-privilegierten Bereichen wie in der Testis, in den Geweben des Augenhintergrundes und im Gehirn (Schiebler, 1995), oder während der Erythropoese und der Reifung der Erythrozyten (Handgretinger, 1999). Es wäre also vorstellbar, daß Autoimmunität durch NK-Zellen verursacht werden kann, die sich gegen körpereigene Zellen richtet, deren MHC I Expressionsdichte unter normalen physiologischen Bedingungen reduziert wird. Durch die Reduzierung des MHC I könnte die Schwelle für eine Inhibition unterschritten werden und autologe Zellen werden für eine NK-vermittelte Lyse angreifbar (Porgador, 1997; Moretta, 1998). Die Frage nach einer Beteiligung der inhibierenden NK-Rezeptoren liegt deshalb nahe und soll im ersten Teilprojekt dieser Arbeit am Beispiel der „pure red cell aplasia“ untersucht werden.

Der zweite theoretisch mögliche Fall einer Autoimmunität durch NK-Zellen sind solche, deren KIRs den autolog exprimierten MHC I nicht erkennen und die dadurch eine Gefahr für den eigenen Körper darstellen könnten. Diese von den Gruppen von Raulet und Kärre (Olsson, 1995; Held, 1996; Raulet, 1997) bereits postulierte Situation hätte für die NK-Zelle die gleiche Wirkung wie ein autologes „missing self“ (Olsson, 1995; Held, 1996; Valiante, 1997). Als ursächlich pathologischer Mechanismus ist dies bisher nicht nachgewiesen und scheint im gesunden Menschen keine große Rolle zu spielen. In den letzten Jahren wurde aber z.B. für seltene Fälle einer Virus-induzierten LGL-Expansion ein ähnlicher Zusammenhang beschrieben (Mori, 1997; Jaffe, 1999). Die Existenz solcher potentiell autoreaktiver NK-Populationen soll im Rahmen des zweiten Teilprojekts gezeigt werden. Ebenso soll der Nachweis einer Reaktivität dieser Zellen gegen autologe Stammzellen und eine Reihe anderer Modell-Zelllinien erbracht werden.

## **B Ergebnisse**

### **B 1 Erstes Teilprojekt: Nachweis der Erythroblastopenie als Krankheit des „missing self“ am Beispiel der „pure red cell aplasia“.**

Vor der Vorstellung der Ergebnisse soll die hier untersuchte Erythroblastopenie oder „pure red cell aplasia“ kurz vorgestellt werden.

Viele der häufigen leukämischen Erkrankungen im Kindesalter sind charakterisiert durch eine hohe Proliferationsrate der leukämischen Blasten, die eine normale Hämatopoese unterdrücken; nicht selten führt dies zu einer Anämie, also zum Fehlen der Nachbildung einer genügenden Anzahl von roten Blutkörperchen, den Erythrozyten.

Dasselbe kann bei einer selteneren Erkrankung, der Erythroblastopenie oder „pure red cell aplasia“, beobachtet werden, die als Komplikation bei chronisch lymphatischen Leukämien und anderen Thymomen auftreten kann. Hier kommt es zur mangelnden Versorgung der Gewebe mit Sauerstoff, da die Zahl der Erythrozyten im peripheren Blut zu gering ist. Die Besonderheit der Erythroblastopenie liegt darin, daß außer dem Fehlen der Erythrozyten nicht Außergewöhnliches zu beobachten ist. Im histologischen Präparat eines Knochenmarkausstrichs, das bei einer Knochenmarkpunktion gewonnen wurde, ist vom fast vollständigen Fehlen jeglicher erythrocytärer Vorläuferzellen gekennzeichnet. Die aus solchen Knochenmarkpunktionen gewonnenen hämatopoetischen Stammzellen differenzieren *in vitro* in alle Richtungen der Hämatopoese, zeigen also auch keinen Defekt in der Zell-Differenzierung. Ursache des selektiven Fehlens erythroider Progenitoren können chromosomale bzw. Gen-Abberationen sein oder auch Eisen- oder Vitamin-Mangelercheinungen (Lacy, 1996), Infektionen mit dem humanpathogenen Parvovirus B19 (Frickhofen, 1994) oder Autoantikörper (Charles, 1996), die zu einer Hämolyse führen können. Es kann zu einer Verschiebung der Häufigkeit der Lymphozytenpopulationen untereinander kommen, wobei die Anzahl der T- und NK-Zellen erhöht sein kann; auch eine Verminderung der Gesamtzahl neutrophiler Zellen (Neutropenie) oder eventuell sogar aller Lymphozyten (Lymphozytopenie) ist möglich. Die übliche Therapie dieser Erkrankung ist die Substitution der fehlenden Erythrozyten durch Spender-Erythrozyten-Konzentrate. Eine Behandlung durch Chemotherapie oder Knochenmark-Transplantation ist eher selten. Auf die Aufklärung der Ursache dieser Erkrankung soll im folgenden eingegangen werden.

Durchgeführt wurden die Untersuchungen mit Blut und Material aus Knochenmarkpunktionen zweier Patienten mit absoluter Erythroblastopenie. Im ersten Fall handelte es sich um einen 52-jährigen Patienten mit spontan auftretender Erythroblastopenie, hier weiter nur fs genannt. Im zweiten Fall ist dies ein 16-jähriger Patient mit ebenfalls spontan auftretender Erythroblastopenie nach Stammzell-Transplantation als Therapie einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL), hier mit dem Synonym mr gekennzeichnet.

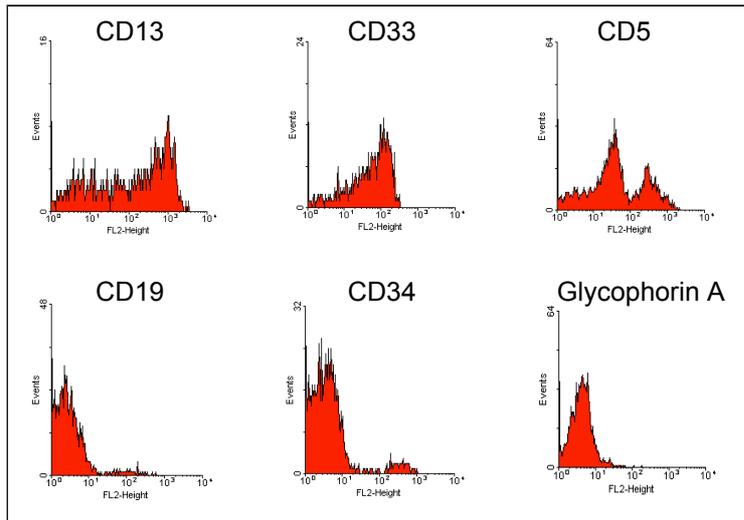
Für das Arbeiten mit Zellen aus dem Blut dieser Patienten und weiterer freiwilliger Spender wurde zuvor deren Einverständnis und ein Votum der Ethik-Kommission der Universität Tübingen eingeholt. Alle hier beschriebenen Arbeiten wurden als ethisch unbedenklich und konform mit den Statuten der Ethik-Kommission bewertet.

## **1.1 Nachweis der „pure red cell aplasia“ und Ausschluß anderer Ursachen der Erythroblastopenie**

Die „pure red cell aplasia“ ist eine seltene Erkrankung und die während dieser Krankheit auftretende Symptomatik kann ebenso durch eine Reihe anderer Ursachen bedingt sein. An erster Stelle sollte folglich die Verifizierung der Diagnose durch Abklären der oben genannten Parameter stehen. Hier soll dies in einzelnen Schritten nachvollzogen und, falls notwendig, die Situation des Patienten mit der gesunder Personen verglichen werden.

### **1.1.1 Verteilung der Differenzierungsreihen des Blutes im Knochenmark des Patienten fs**

In einem ersten Schritt wurde ein Knochenmarkpunktat des Patienten auf eine Reihe von Oberflächenmarkern untersucht. Diese Oberflächenantigene wurden so ausgewählt, daß alle im Knochenmark vorhandenen Differenzierungsreihen detektiert werden konnten (detaillierte Auflistung der Differenzierungsreihen und der Struktur des Knochenmarks siehe in Abb. I im Anhang).



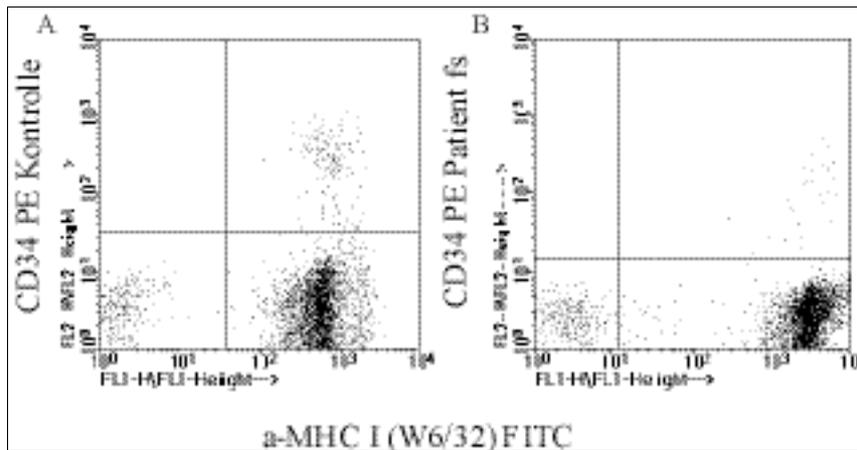
**Abb.4: Selektives Fehlen erythroider Progenitor-Zellen im Knochenmark des „prca“-Patienten fs**

Das Histogramm einer durchflußzytometrischen Analyse unterschiedlicher Zelllinien und Zellpopulationen zeigt Zellen, die aus einem Knochenmarkpunktat des Patienten mit absoluter Erythroblastopenie mit gleichzeitigen Expansion von LGL Zellen (fs) gewonnen wurden. Die Intensität der Färbung aller lebenden Zellen ist für einen der Zell-Marker auf der x-Achse und die Anzahl der positiv gefärbten Zellen auf der y-Achse dargestellt.

Die untersuchten Zellen wurden mit einem mAk gegen einen der Zelllinien-Marker (PE-konjugiert und im FL2-Kanal gemessen) und dem mAk gegen klassischen MHC I (W6/32; FITC-konjugiert und im FL1-Kanal gemessen) gefärbt. Im FACS-Bild für forward/sideward scatter wurde ein Lymphozyten-gate gesetzt und damit eine Auswertung der Daten für die MNC von fs ermöglicht. Die Punktwolke, die positiv für die Färbung für einen der Marker war wurde durch ein weiteres gate markiert und die in ihm detektierten Zellen im obigen Schaubild dargestellt. Auf der x-Achse ist die Intensität des Signals für den FL1-Kanal zu sehen, der einer Färbung mit FITC entspricht. Hier stellt dieses Signal die Stärke der Anfärbung mit dem gegen MHC I gerichteten Antikörper dar. Auf der y-Achse ist die Anzahl der Zellen, die mit einer bestimmten Signalstärke detektiert wurden linear aufsummiert. Gezählt wurden jeweils 10.000 Zellen.

In diesem Histogramm ist deutlich zu sehen, daß sowohl lymphoide (CD5) wie myeloide Progenitor-Zellen (CD13 und CD33), als auch CD34<sup>+</sup> Stammzellen in normaler Häufigkeitsverteilung in Knochenmark auftreten. Auffallend ist die verringerte Anzahl von B-Zell-Vorläufern (CD19) und das völlige Fehlen von Glycophorin-A<sup>+</sup> erythrozytären Progenitoren, das eines der Kriterien für die Diagnose der „pure red cell aplasia“ darstellt. Bemerkenswert ist ebenfalls, daß die mit mAk gegen CD5, CD13 und CD34 angefärbten Zellpopulationen eine überdurchschnittlich hohe MHC I Expressionsdichte zeigen.

Dieser Sachverhalt wurde mit vergleichenden Messungen zu Zellen aus Knochenmarkpunktaten gesunder Individuen untersucht.



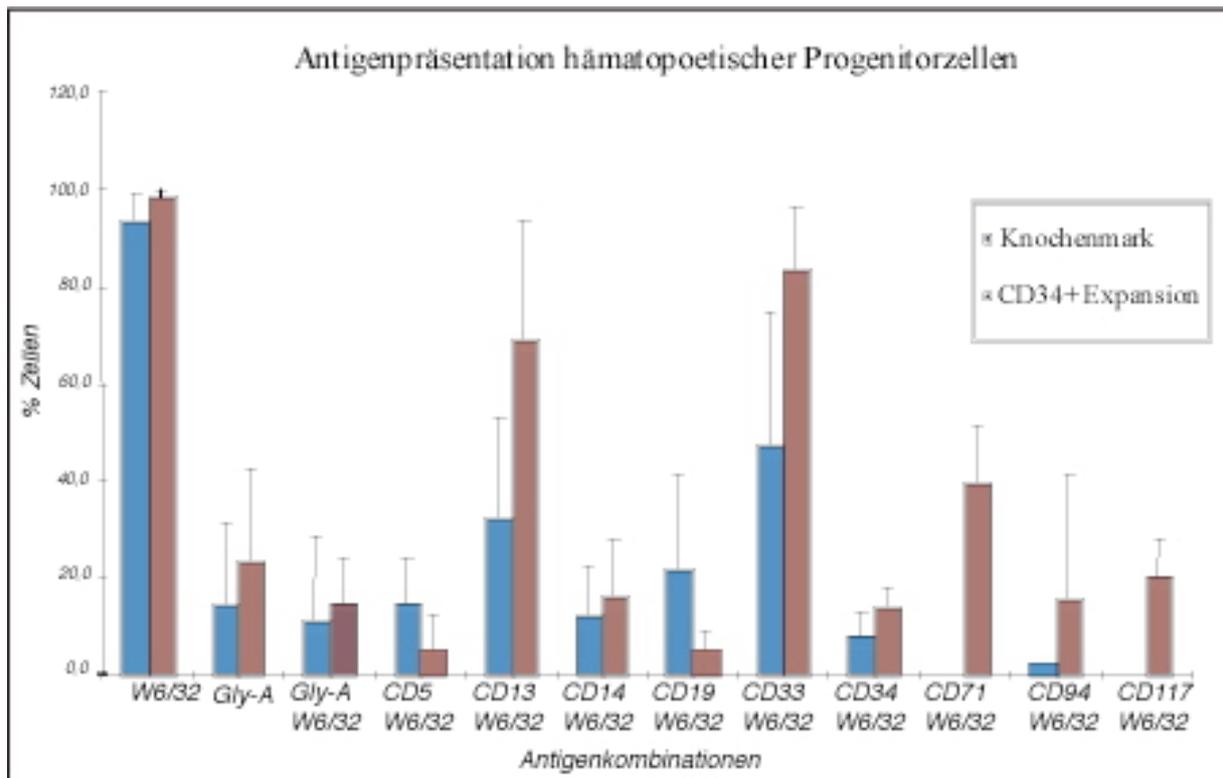
**Abb.5: Gesteigerte MHC I-Expression auf Progenitoren der lymphoiden Differenzierungsreihe im Knochenmark des „prca“-Patienten**

Die Expressionsdichte von MHC I auf CD34+ Stammzellen des Knochenmarks gesunder Spender (A) und des Patienten fs (B) wurde analysiert indem auf die Gesamtzellen im forward/sideward scatter im FACS mit Hilfe eines Life-gate tote Zellen von der Auswertung ausgeschlossen wurden. In den hier gezeigten Dot-Plots wurde auf der Ordinate die Stärke der MHC I-Färbung aufgetragen, auf der Abszisse die Intensität der Färbung für CD34. Alle vitalen Zellen wurden entweder einfach positiv angefärbt für FITC (x-Koordinate; jeweils rechter unterer Quadrant) oder für Phycoerythrin; jeweils linker oberer Quadrant) oder sie waren für beide Merkmale positiv und kommen deshalb im rechten oberen Quadranten zu liegen. Die hier getroffenen Aussagen betreffen die Zellen, die im rechten oberen Quadranten des Dot-Plot in Abb.5 liegen und positiv für beide Merkmale sind.

Die sehr kleine Population der Stammzellen sowohl des gesunden Individuums wie auch des Patienten fs zeigt eine schwache Färbung für das Glycoprotein CD34, den allgemein üblichen Marker für frühe und undifferenzierte hämatopoetische Stammzellen. Die wenigen Stammzellen zeigen jedoch ein starkes Signal für MHC I. Hier zu sehen ist eine deutlich erhöhte Oberflächen-Expression von MHC I auf den Stammzellen des Patienten im Vergleich zu der auf Stammzellen des gesunden Spenders.

### 1.1.2 Analyse der Expressionsdichte von MHC I auf Zellen unterschiedlicher Progenitor-Zellpopulationen gesunder Individuen

Die durchflußzytometrische Analyse der Dichte von MHC I auf Zellen verschiedener Progenitor-Populationen und deren Verteilung in Knochenmark (n=19) und in *in vitro* Expansionskulturen CD34+ Stammzellen (n=8) wurde durchgeführt, um repräsentative Werte für den Vergleich zu den Progenitor-Populationen von Erythroblastopeniepatienten zu erhalten.



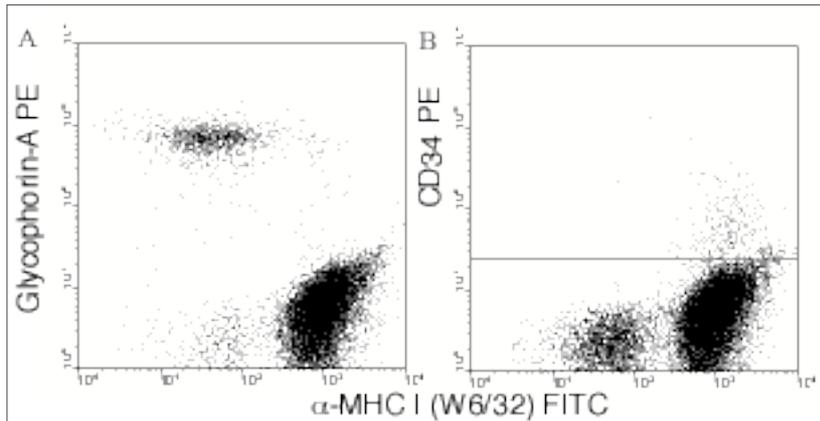
**Abb. 6: Auftreten hämatopoetischer Progenitor-Linien in Knochenmark und *in vitro* Stammzell-Expansionskulturen gesunder Spender**

Die relative Häufigkeit der verschiedenen Zellpopulationen im Knochenmark, bzw. in *in vitro* Stammzell-Expansionskulturen wurde in insgesamt 19 Spendern von Knochenmark und in 8 *in vitro* Expansionskulturen CD34+ Zellen bestimmt.

CD13 wurde als Marker für frühe myeloide und monozytäre Vorläuferzellen, CD14 für differenziertere Makrophagen-Progenitoren verwendet, CD33 diente als Marker für frühe myeloide Vorläuferzellen, CD5 für T-Zell Progenitoren, CD19 für B-Zell Progenitoren, CD34 für hämatopoetische Progenitoren und Glycophorin-A als typisches Oberflächenprotein für Zellen der erythroiden Differenzierungsreihe. Für *in vitro* Stammzell-Expansionskulturen wurde zusätzlich noch CD117 als Marker für frühe hämatopoetische Stammzellen verwendet, CD94:NKG2A als Marker für lymphoide Effektorzellen und CD71 für aktivierte B- und T-Zellen. Alle Zelltyp-spezifischen mAbs wurden mit Phycoerythrin konjugiert. Der FITC-markierte monoklonale Antikörper W6/32 diente zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der MHC I Expression. Die %-Werte, die dieser Darstellung zugrunde liegen, stammen aus der Quadranten-Statistik der Dot-Plot-Darstellung der Messung der lebenden Zellen des jeweiligen Spenders. Die Standardabweichung ist auf jedem Balken angegeben.

Der Vergleich der Häufigkeit der Progenitor-Populationen aus gesundem Knochenmark und aus *in vitro* Stammzell-Expansionskulturen ergab keine deutlichen Unterschiede. In Knochenmark konnten mehr B-Zell-Progenitoren (CD19) beobachtet werden, während kulturbedingt in Expansionskulturen mehr myeloide Vorläuferzellen (CD13, CD33) zu sehen sind.

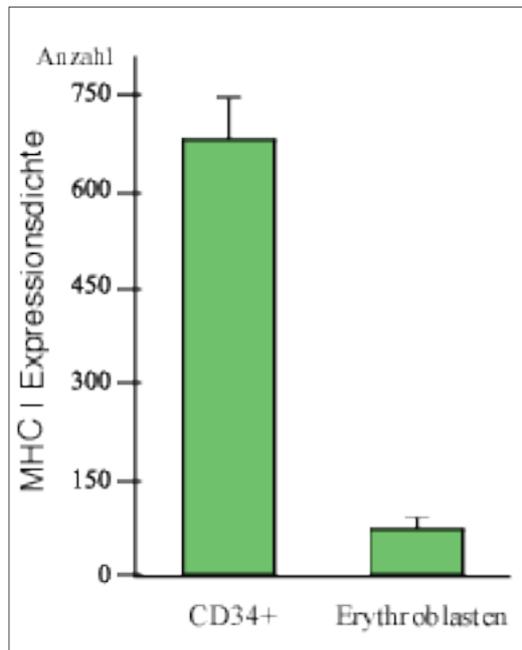
Die quantitative Auswertung der Expressionsdichte von MHC I auf den Zellen der unterschiedlichen Progenitor-Populationen wurde wie in Abb. 4 beschrieben durchgeführt. Es ergaben sich keine deutlichen Unterschiede in der Expressionsdichte von MHC I auf Lymphozyten-Vorläuferzellen. Es war jedoch eine deutliche Verringerung des Oberflächen-MHC I auf Erythroblasten zu beobachten.



**Abb. 7: Verminderte Expressionsdichte von MHC I auf Erythroblasten in gesundem Knochenmark**

Die Expressionsdichte von MHC I auf Glycophorin-A+ Erythroblasten (A) und auf CD34+ Stammzellen (B) aus dem Knochenmark gesunder Spender wurde wie in Abb. 4 beschrieben analysiert.

In diesem repräsentativen Bild einer durchflußzytometrischen Analyse lebender Zellen aus Knochenmark eines der untersuchten gesunden Spenders sind die Populationen der Glycophorin-A+ Erythroblasten (A) und der CD34+ Stammzellen (B) in den oberen Quadranten der Dot-Blot-Diagramme deutlich zu sehen. Die kleine Population der CD34+ Zellen zeigt eine schwache Färbung für das Glycoprotein CD34. Die Erythroblasten-Population zeigt eine deutliche Färbung für Glycophorin-A, das für die erythroide Differenzierungsreihe charakteristische Oberflächenantigen. Die Oberflächenexpression von MHC I auf Erythroblasten ist jedoch um das 1 log-Stufe geringer, als bei der CD34+ Vergleichspopulation.



**Abb. 8: Statistische Auswertung der MHC I Expressionsdichte auf Erythroblasten aus dem Knochenmark gesunder Spender**

Die mittlere Intensität der Anfärbung für MHC I der erythroiden Progenitoren (rechts) im Vergleich mit denjenigen für die CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen (links). Die Population der Stammzellen wurde als repräsentatives Beispiel für alle anderen Zellpopulationen des Knochenmarks gewählt. Während der Auswertung wurde ein „gate“ auf diejenigen Zellen gelegt, die für der Erythroblasten-Marker Glycophorin-A, bzw. für CD34 und für MHC I doppelt positiv angefärbt wurden. Ermittelt wurde die mittlere Intensität des Signals dieser Zellpopulationen für MHC I. Als Grundlage hierfür dienten alle Experimente, bei denen aus Knochenmark gewonnene Zellen phänotypisiert wurden, wie beispielhaft in der Dot-Plot-Auswertung (Abb. 7) gezeigt.

Diese Darstellungsform zeigt sehr deutlich den Unterschied der FITC-Färbung und die daraus abgeleitete Differenz für die Expressionsdichte von MHC I auf Erythroblasten und Stammzellen gesunder Spender.

Diese bei gesunden Menschen einzigartige Situation einer verminderten Expression von MHC I auf Zellen des Körpers ist in der Literatur bislang in dieser Form nicht berichtet. Eine Reduktion oder ein Fehlen von MHC I auf einzelnen Zellen oder Geweben wurde in „immun-privelegierten Geweben“ wie der Testis, einigen Bereichen des Augenhintergrundes und im ZNS beobachtet.

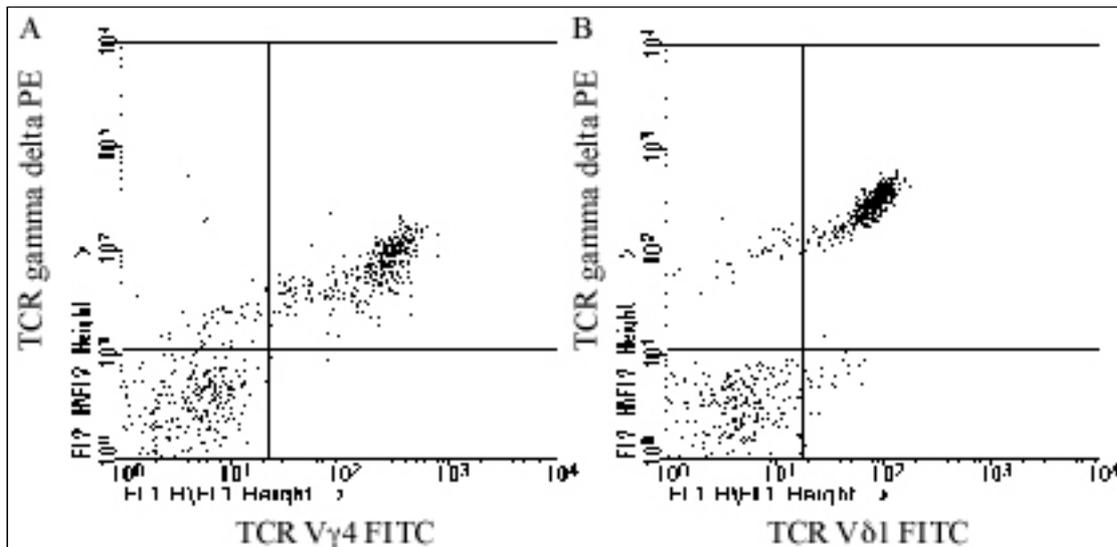
### 1.1.3 Phänotypisierung der klonal expandierten LGL-Zellen des „prca“ Patienten fs

Der Patient fs litt unter einer Anämie, bei der aber außer einem Fehlen der Erythrozyten keine gravierenden Veränderungen im Blutbild zu beobachten waren. Bei einer leichten

Leukozytopenie dominierten T-Zellen mit überdurchschnittlich hohem Prozentsatz das Blutbild. Die Fraktion der T-Zellen bestand wiederum zu 70% aus normalerweise seltenen  $\alpha\alpha$ T-Zellen, d.h. etwa 50% aller Lymphozyten des Patienten waren  $\alpha\alpha$ T-Zellen. Die Klonalität dieser  $\alpha\alpha$ T-Zellen wurde im Chimärismuslabor der Kinderklinik mit Hilfe einer PCR-Analyse der variablen Region des V $\alpha$  des T-Zell Rezeptors nachgewiesen. Ein nachfolgender RFLP (DNA-Restriktionsenzym-Verdau des PCR-Produkts), Southern Blotting und eine autoradiographische Analyse der Hybridisierung von Standardproben auf der elektrophoretisch aufgetrennten DNA auf der Membran kamen zum selben Ergebnis. Eine durchflußzytometrische Analyse des T-Zell Rezeptors ergab für den Klon ein sehr seltenes V $\alpha$ 4-V $\alpha$ 1-Rearrangement. Für den Besatz mit inhibierenden Rezeptoren ergab die durchflußzytometrische Analyse des Klons positive Signale für CD94:NKG2A, für den p70-KIR (NKAT4, KIR3DL1) und für CD158a (p58.1, KIR2DL1), ausgeschlossen wurde jedoch eine Expression von CD158b, NKG2A/B und p140-KIR. Weitere Phänotypisierungen ergaben positive Signale für CD2, CD3, CD5, CD8 und CD45, und negative Signale für CD4 und CD56. Auch in einer Verlaufskontrolle von länger als 2 Jahren änderte sie sich nicht.

### **1.1.3.1 Durchflußzytometrische Typisierung des TCR-Subtyps der expandierten LGL Zellen**

Die Typisierung des TCR-Subtyps der expandierten LGL-Zellen des Patienten soll Aufschlüsse über das Rearrangement dieser TCR-Region und den Modus der Aktivierung der  $\alpha\alpha$ T-Zellen geben. Das unterschiedliche Bindungsverhalten der  $\alpha\alpha$ TCR-Subtypen an ihre Liganden und die daraus resultierende Aktivierung der LGL-Zellen (Hayday, 2000) kann Hinweise auf den Auslöser einer Aktivierung oder Expansion dieser Zellen geben.



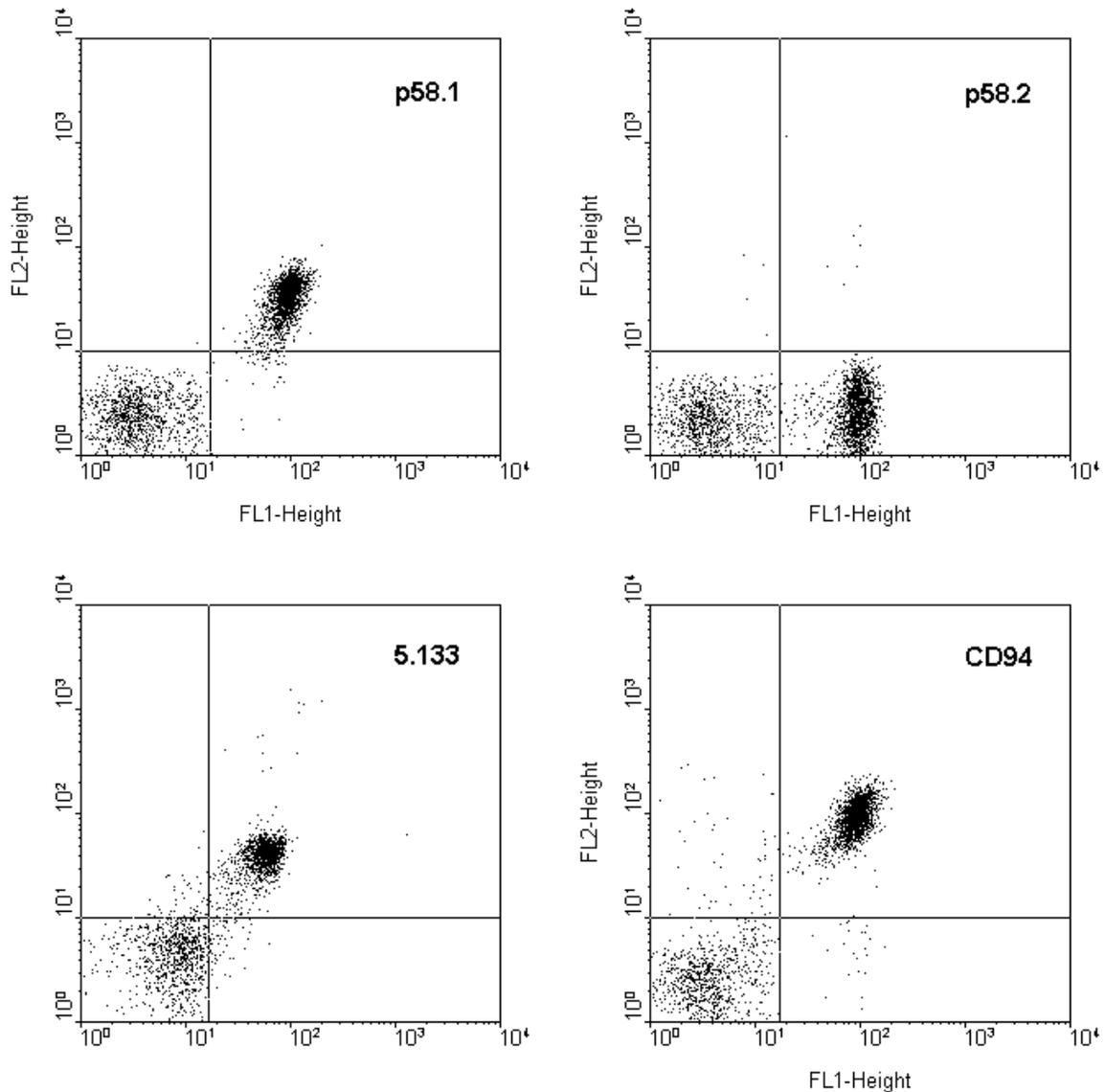
**Abb. 9: FACS-Auswertung der  $\gamma\delta$ -TCR-Subtypen des LGL-Klons des Patienten fs**

Eine durchflußzytometrische Phänotypisierung der V-gamma und V-delta Subtypen des TCR der expandierten LGL wurde mit PBMC des „prca“ Patienten durchgeführt. Im FACS-Bild für forward/sideward scatter wurde durch ein Lymphozyten-gate gesetzt und damit eine Auswertung der expandierten Zellen erleichtert. Abb. 9 zeigt Anfärbungen der LGL Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen die TCR Subtypen V $\gamma$ 4 (A) und V $\delta$ 1 (B), die jeweils an das Chromophor FITC gekoppelt sind und im ersten Fluoreszenz-Kanal (FL1) auf der x-Achse erscheinen. Zur Kontrolle wurden die LGL mit einem mAk gegen pan- $\gamma\delta$ -TCR markiert, der an das Chromophor Phycoerythrin (PE) konjugiert war. Diese Kontrolle erscheint im zweiten FL2-Kanal auf der y-Achse.

Die Zell-Population im rechten oberen Quadranten des Dot-Plot zeigt die positive Färbung des LGL-Klons für eine seltene Rekombination des  $\gamma\delta$ -Locus des TCR. Die Homogenität der LGL-Population kann dadurch gut gezeigt werden. Hier nicht dargestellt sind Auswertungen der Färbungen für die Oberflächenantigene CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD19, CD45, CD45Ro, CD56 und CD117. Ebenso wenig sind die negativen Anfärbungen für V $\gamma$ 5, V $\gamma$ 6, V $\gamma$ 7, V $\gamma$ 8, V $\gamma$ 9, V $\delta$ 1, V $\delta$ 2, V $\delta$ 3, V $\delta$ 4 und pan- $\gamma\delta$ -TCR aufgeführt.

### 1.1.3.2 Durchflußzytometrische Typisierung des Besatzes mit NK-Rezeptoren der expandierten LGL Zellen

Eine Aktivierung und der nachfolgende Angriff durch  $\gamma\delta$ -T-Zellen kann durch inhibierende NK-Rezeptoren eingedämmt werden. Diese Rezeptoren werden von den meisten  $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimiert (Hack, 1992; Davodeau, 1993).



**Abb. 10: Expression inhibierender NK-Rezeptoren auf den Zellen des LGL-Klons des Patienten fs**

Die Expression von verschiedenen NK-Rezeptoren auf der Oberfläche der LGL-Zellen wird durchflußzytometrisch analysiert indem auf die Gesamtzellen im forward/sideward scatter im FACS mit Hilfe eines Life-gate tote Zellen von der Auswertung ausgeschlossen wurden. Durch ein Lymphozyten-gate kann eine detaillierte Auswertung der expandierten Zellen vorgenommen werden. Abb. 10 zeigt auf der Ordinate die Population der V $\alpha$ I-TCR positiven Zellen und auf der Abszisse eine Anfärbung dieser Zellpopulation für unterschiedliche NK-Rezeptoren.

Alle Lymphozyten wurden entweder einfach positiv angefärbt für FITC (x-Kordinate; rechter unterer Quadrant) oder sie waren für beide Merkmale positiv und kommen deshalb im rechten oberen Quadranten zu liegen. Eine Anfärbung ausschließlich für Phycoerythrin (linker oberer Quadrant) war hier aufgrund der sehr geringen Zahl anderer Lymphozyten wie NK-Zellen und Monozyten fast nicht zu beobachten. Dies ist recht deutlich auch an der geringen Zahl von Zellen im linken unteren Quadranten zu sehen, die weder für einen TCR noch für einen NKR

positiv angefärbt wurden. Deutlich wird, daß die für V- $\alpha$ 1-TCR positiven Zellen mehrere NK-Rezeptoren tragen. KIR2DL1 (CD158a, p58.1; mit dem mAk EB6 von Moretta angefärbt), CD94:NKG2A und KIR3DL1 (p70; mit dem mAk 5.133 von Colonna angefärbt). Negative Färbungen sind zu beobachten für KIR2DL2 (CD158b, p58.2; mit dem mAk GL183 von Moretta angefärbt), NKAT3 (p70, Spleiß-Variante von NKAT4, mit dem mAk DX9 von Lanier angefärbt) und für p140 (KIR3DL2, mit den mAk Q140 und Q66 von Moretta angefärbt und hier nicht gezeigt).

Die von diesen NK-Rezeptoren erkannten MHC I Subtypen sind der Tabelle 1 und der Abb. II (siehe Anhang) zu entnehmen. Der „prca“ Patient fs ist HLA-A2/32, B65/38, Bw6/4, Cw7/8 positiv; die auf den LGL Zellen exprimierten p70 konnten HLA-Bw4 und die CD94:NKG2A den HLA-A2 und Bw6 erkennen. Die HLA-Subgruppe Bw4 beinhaltet die Allele HLA-B2705, B5101, B5801 und B1513, während HLA-Bw6 den Allelen HLA-B0702, B1502, B3501 und B5401 entspricht. Der p58 Rezeptor konnte autolog an keinen Liganden binden.

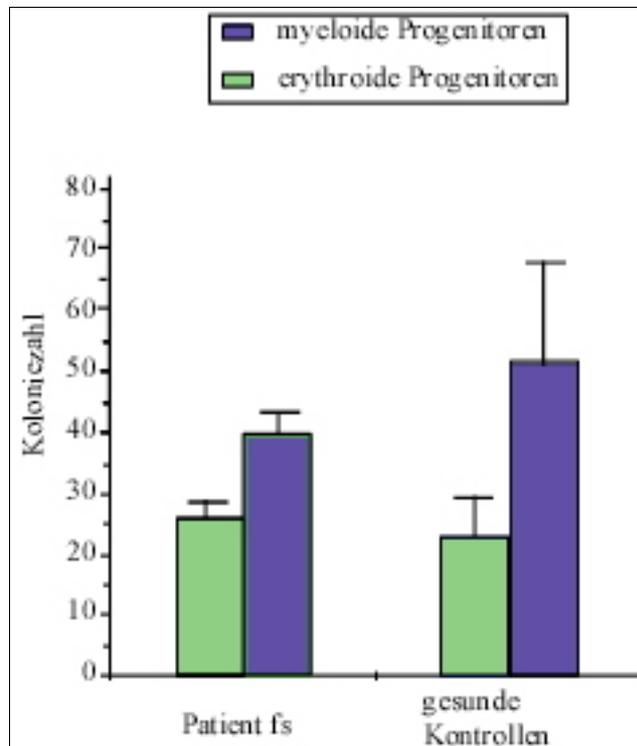
#### **1.1.4 Histologisches Bild eines Knochenmarkausstrichs des Patienten fs**

Im Knochenmarkausstrich des Patienten fs ist eine Anfärbung fast aller Zellen durch eine Leder'sche Färbung (AS-D-Chloresterase Reaktion zu sehen, die nur Zellen myeloischen Ursprungs färbt. Die wenigen ungefärbten Zellen entsprachen ihrer nach B-Zell-Progenitoren. Durch eine immunohistochemische Färbung mit CD8 detektierendem mAk konnte eine ungewöhnliche CTL-Infiltration beobachtet werden. Erythroide Progenitoren fehlen völlig.

#### **1.1.5 Koloniformen aus *in vitro* Differenzierungskulturen der Stammzellen des Patienten fs: Vergleich mit gesunden Spendern**

Die aus Knochenmarkpunktat des Patienten fs gewonnenen CD34<sup>+</sup> Stammzellen wurden in semisoliden Stammzell-Expansionsmedium (H4433 Vollmedium, Stem Cell Technologies) für 2 Wochen im Brutschrank expandiert. Durch Direktsortierung mit dem CD34-direct-enrichment Kit für MACS (Milteyi Biotech) konnten Stammzellen in sehr hoher Reinheit (96% Reinheit) gewonnen werden. Nach zwei Wochen bildeten sich Kolonien der unterschiedlichen Zelllinien. Die Kolonien wurden mit dem Mikroskop ausgezählt und in die verschiedenen Koloniformen

blutbildender Zelllinien differenziert. Die Anzahl und Form dieser Kolonien wurde mit Kolonien einer Reihe von Expansionen CD34<sup>+</sup> Stammzellen gesunder Spender verglichen und sollen Aufschluß über einen Stammzell-Defekt bei Patient fs geben, der das Fehlen erythroider Vorläuferzellen erklären würde.



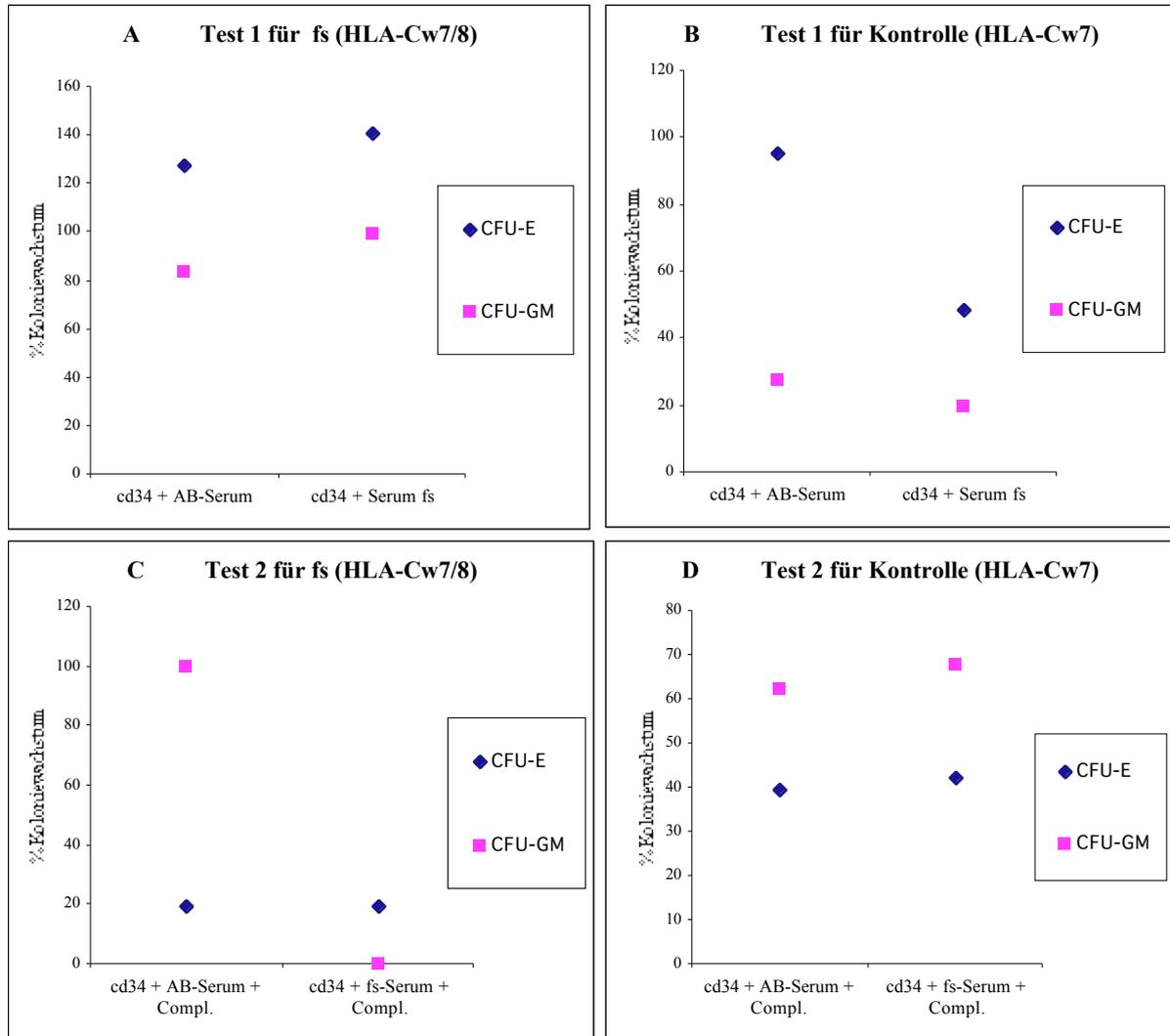
**Abb. 11: Vergleich der Kolonie-Formen aus *in vitro* Differenzierungskulturen CD34<sup>+</sup> Stammzellen gesunder Spender und von Patient fs**

Die Anzahl der Kolonien der erythroiden Progenitoren (CFU-E; Colony Forming Unit-Erythroid) und der Progenitoren von Monozyten und Granulozyten (CFU-GM; Colony Forming Unit-Granulocyte-Monocyte) im Vergleich mit *in vitro* Expansion CD34<sup>+</sup> Stammzellen des Patienten fs und den *in vitro* Expansionen CD34<sup>+</sup> Stammzellen von gesunden Spender (n=8). Die Balken für *in vitro* Differenzierungskulturen für CD34<sup>+</sup> Stammzellen des Patienten fs repräsentieren Mittelwerte aus Triplet-Ansätzen. Die Standardabweichung ist mit den Balken angegeben.

Es ist kein deutlicher Unterschied zu sehen; weder in der Zahl der gebildeten Kolonien, noch in der Häufigkeit der unterschiedlichen Koloniefornen. Bemerkenswert ist besonders, daß auch erythroide Kolonien von den Stammzellen des Patienten fs in normaler Häufigkeit gebildet wurden. Diese Kolonien entsprachen in Zahl und Größe den Kolonien von zehn Vergleichsexpansionen von hämatopoetischen Stammzellen gesunder Spender.

### 1.1.6 Untersuchung auf Autoantikörper gegen erythroide Vorläuferzellen (Charles, 1996)

Eine Hämolyse oder die Lyse erythroider Progenitorzellen kann auch durch Antikörper verursacht



werden, die sich gegen Epitope auf der Oberfläche von Erythrozyten oder Erythroblasten richten

#### Abb. 12: Test auf Autoantikörper gegen Erythroblasten im Serum von Patient fs

Um eine Lyse der Erythroblasten durch Autoantikörper auszuschließen (nach R.J. Charles et al. (1996) wurden zwei Tests durchgeführt.

Im ersten Test (A und B) werden Stammzellen des Patienten und zweier gesunder Spender in Expansions-Vollmedium (H4433, Stem Cell Technologies) für zwei Wochen expandiert. An den Tagen sieben und vierzehn werden die Kolonien qualitativ und quantitativ unter dem Mikroskop nach CFU-E, CFU-B und CFU-GM untersucht. Expandiert werden  $CD34^+$  Stammzellen ohne Vorbehandlung sowie nach Vorinkubation mit Hasen-Komplement, mit Serum des Patienten fs und mit AB-Serum. Hierbei kann die Proliferationsfähigkeit der Stammzellen allgemein überprüft und eine mögliche Beeinflussung durch die verwendeten Seren erkannt werden. Nach dreißig-minütiger Inkubation werden Reste der Seren durch zweimaliges Waschen entfernt.

Im zweiten Test (C und D) werden Stammzellen auf gleiche Weise expandiert. Hier werden die Zellen nach Inkubation mit AB- oder fs-Serum anschließend für dreißig Minuten mit Hasen-Komplement inkubiert, zwei mal gewaschen und erst dann zur weiteren Expansion in das Medium gegeben. Dieser Test des Experiments zeigt eine spezifische Bindung von Antikörpern an die Stammzellen, da sie in diesem Fall durch die Inkubation mit Hasen-Komplement lysiert werden. Beobachtet werden kann dies durch eine deutlich verringerte Proliferationsfähigkeit der Stammzellen oder durch einen selektiven Ausfall bestimmter Kolonie-Arten, hier speziell der Progenitoren der erythroiden Differenzierungsreihe. Alle gezeigten Schaubilder zeigen die quantitative Darstellung der Koloniezahl am Tag 14 der *in vitro* Kultur bezogen auf eine unbehandelte Stammzell-Expansion, die als 100% gewertet wurde.

Der HLA-Typ des Patienten war HLA-Cw7/8 (HLA-A2/32, -B65/38, -Bw6/4), derjenige der beiden gesunden Spender war HLA-Cw7/\* (HLA-A2/28, -B8/39) und HLA-Cw4/6 (HLA-A30/32, -B35/13; Ergebnisse nicht dargestellt).

In keiner der untersuchten Stammzell-Expansionen konnte ein Effekt durch das Serum des Patienten fs beobachtet werden. Stets war die Zahl der Kolonien der Expansionen mit AB- oder fs-Serum in etwa gleich. Sowohl in Test 1 wie auch in Test 2 ist kein Effekt einer spezifischen Verminderung der Kolonie-Zahl und -Art durch Inkubation mit Serum des Patienten fs zu erkennen. Lediglich eine generelle Verminderung der Proliferationsfähigkeit der Stammzellen gegenüber der unbehandelten Kontrolle war zu beobachten.

## **1.2 Experimente zum Nachweis der LGL-Zellen als Ursache der Erythroblastopenie**

Nachdem das selektive Fehlen von erythroiden Vorläuferzellen als hinreichendes Kriterium für die seltene „pure red cell aplasia“ festgestellt werden konnte, wurde nach den Ursachen dieser Form der Aplasie gesucht. Wie bereits weiter oben beschrieben, konnten Auto-Antikörper, die sich gegen hämatopoetische Vorläuferzellen richten, ausgeschlossen werden. Ebenso konnte in *in vitro* Differenzierungskulturen gezeigt werden, daß kein Stammzelldefekt vorlag. Im folgenden sollte getestet werden, ob die ebenfalls beobachtete, sehr ungewöhnliche Expansion einer  $\gamma$ -T-Zellpopulation für das Fehlen von Erythroblasten ursächlich verantwortlich war.

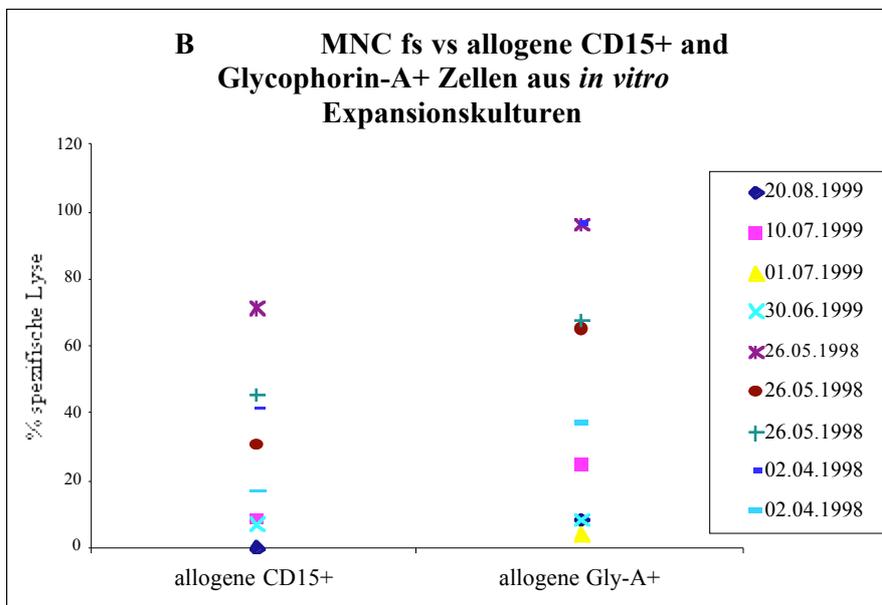
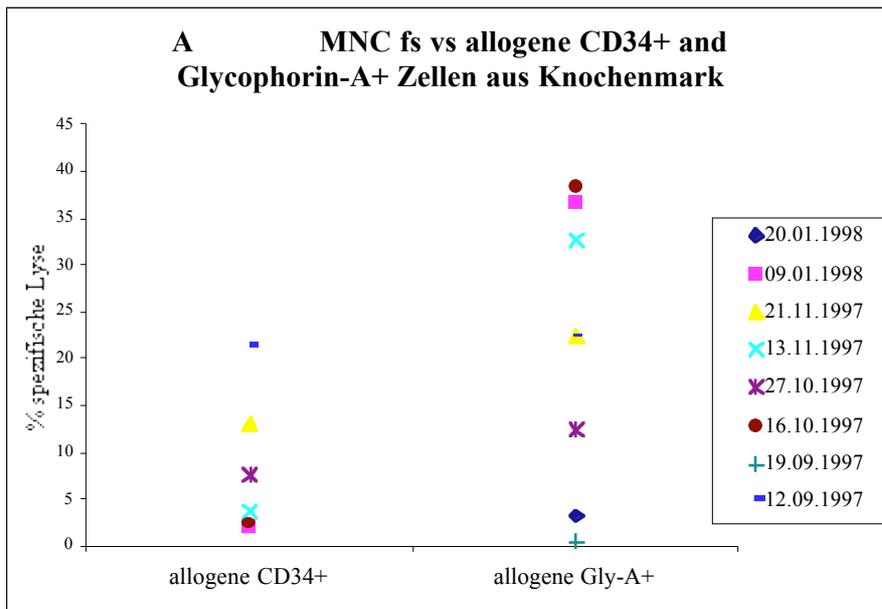
### **1.2.1 Zytotoxizität-Tests mit LGL von fs gegen erythroide Vorläuferzellen aus Knochenmark und *in vitro* Expansionskulturen**

Da bei einer „pure red cell aplasia“ ausschließlich Erythroblasten des Knochenmarks betroffen sind, soll gezeigt werden, daß sich eine zelluläre Autoreaktivität nur gegen erythroide Vorläuferstadien richtet.

Hierzu werden Erythroblasten aus Knochenmarkpunktaten freiwilliger Spender aufgereinigt und als Zielzellen für die LGL des Patienten fs eingesetzt. Als MHC I stark exprimierende Kontrollpopulation werden CD34+ Stammzellen aus den gleichen Proben isoliert und als Zielzellen verwendet. In Vergleichsexperimenten werden CD34+ Stammzellen in *in vitro* Expansionskulturen zu Erythroblasten differenziert, aufgereinigt und ebenfalls als Ziel für MNC des Patienten fs in Zytotoxizität-Tests und als Stimulatoren in Zytokin-Sekretions-Experimenten (ELI-Spot Assay für  $\gamma$ -Interferon) verwendet.

#### **1.2.1.1 Zytotoxizität-Tests mit Erythroblasten aus Knochenmarkpunktaten und *in vitro* Expansions-Kulturen**

Um eine selektive Reaktivität gegen Erythroblasten nachzuweisen, werden erythroide Progenitorzellen aus Knochenmarkpunktaten freiwilliger Spender (n=8; A), ebenso wie aus soliden und flüssigen *in vitro* Expansionskulturen CD34+ Stammzellen (n=9; B) isoliert und als Zielzellen in Zytotoxizität-Tests eingesetzt. Als Vergleich wurden MHC I hoch exprimierende Zellpopulationen aus derselben Spende oder derselben Expansionskultur verwendet.



**Abb. 13: Zytotoxizität-Tests mit Erythroblasten aus Knochenmarkpunktaten und *in vitro* Expansions-Kulturen**

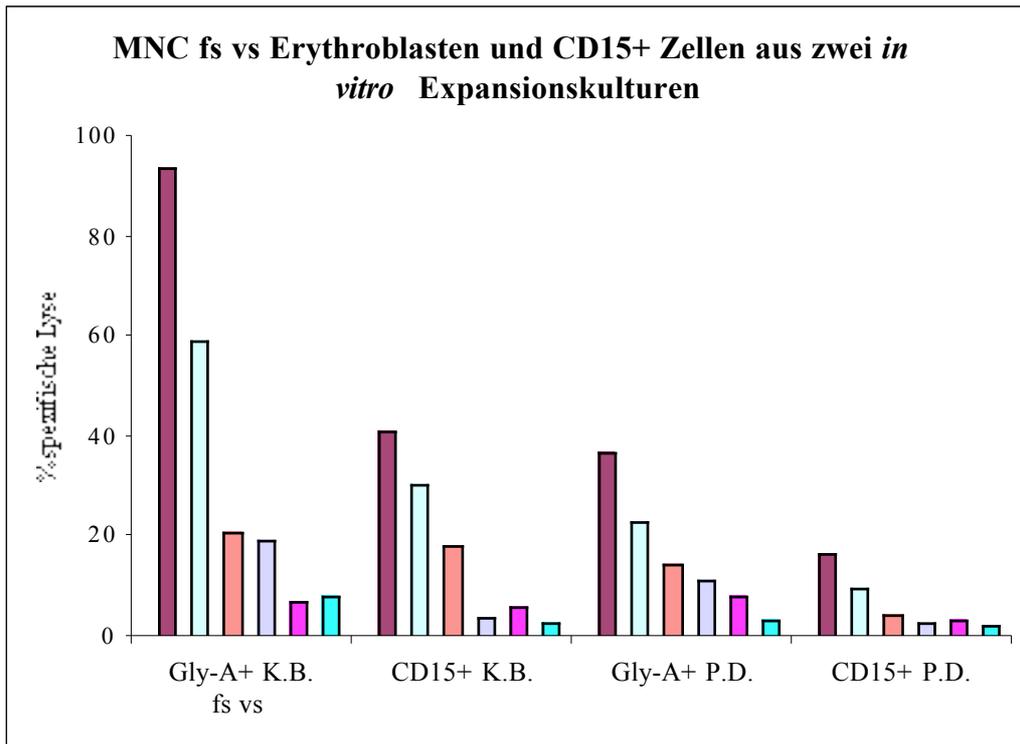
Zusammenfassung der Experimente mit MNC des Patienten fs als Effektorzellen gegen Erythroblasten allogener Spender. Abb. 13 zeigt die Ergebnisse von 17 Zytotoxizität-Tests mit mononucleären Zellen des „prca“-Patienten fs als Effektorzellen. Dargestellt ist jeweils die spezifische Lyse der Zielzellen im unmittelbaren Vergleich der MHC I niedrig und hoch exprimierenden Zielzellen.

Als Zielzellen mit geringer Oberflächenexpression von MHC I wurden erythroide Vorläuferzellen isoliert und angereichert. Als typischer Oberflächenmarker erythroider Progenitorzellen diente Glycophorin-A. Mit mAbs gegen diesen Marker konnten Erythroblasten in hoher Reinheit isoliert werden. Als Kontrolle dienten MHC I hoch exprimierende Zellen aus den gleichen Ausgangsmaterialien; für Knochenmarkpunktate (A) sind dies CD34+ Stammzellen, für *in vitro* Expansionkulturen (B) CD13+ oder CD15+ Zellen der myeloiden Differenzierungsreihe. Verwendet wurden Knochenmarkpunktate freiwilliger Spender ebenso wie solide und flüssige *in vitro* Expansionskulturen CD34+ Stammzellen. Die Anreicherung wurde jeweils mit dem MACS System durchgeführt.

Durchgeführt wurden die Zytotoxizität-Tests mit einem Europium-Release Assay der Firma Wallac. Das Effektor zu Target Verhältnis betrug jeweils 40 zu 1. Die Titration erfolgte in mehreren Schritten. Die Titrationsschritte ergaben jeweils eine klare Verringerung der spezifischen Lyse der Targetzellen, MHC I niedrig exprimierenden erythroiden Progenitor-Zellen und jeweils rechts dargestellt die CD34+ oder CD13+ Kontrollpopulation. Werte aus denselben Versuchen sind durch Linien verbunden. Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwerten aus Triplett-Versuchen.

Beiden Abbildungen gemeinsam ist eine erhöhte spezifische Lyse der MHC I niedrig exprimierenden erythroiden Vorläuferzellen gegenüber den Kontrollen. Den Expansionskulturen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultur die Erythroblasten entnommen. Für den 26.5.98 und den 2.4.98 war das nach zwei Wochen, am 30.6.99 am Tag 5, am 1.7. und am 10.7.99 war das nach einer Woche Kulturhaltung. Auffällig ist, daß die bei diesen Kulturbedingungen nur kurz expandierten Erythroblasten die geringsten Werte für die spezifische Lyse zeigen.

CD34+ Stammzellen des Patienten fs wurden aus einem Knochenmarkpunktat gewonnen und ebenfalls in einem Zytotoxizität-Test als Zielzellen eingesetzt. Der Wert der spezifischen Lyse dieser autologen Stammzellen lag mit 3% im unteren Bereich der hier gezeigten Experimente. In *in vitro* Expansions-Kulturen wurden Stammzellen des Patienten kultiviert, in zwei Versuchen wurden Erythroblasten angereichert und in Killing Assays eingesetzt. Einer der Versuche schlug fehl, während der zweite eine spezifische Lyse durch autologe MNC von 7,8% ergab. Dieser Wert liegt zwar deutlich höher als der Wert für undifferenzierte Stammzellen, befindet sich aber dennoch ebenfalls am unteren Rand der Skala der Vergleichsexperimente mit Erythroblasten allogener Spender.



**Abb. 14: Zytotoxizität-Test gegen Erythroblasten aus *in vitro* Expansionskulturen**

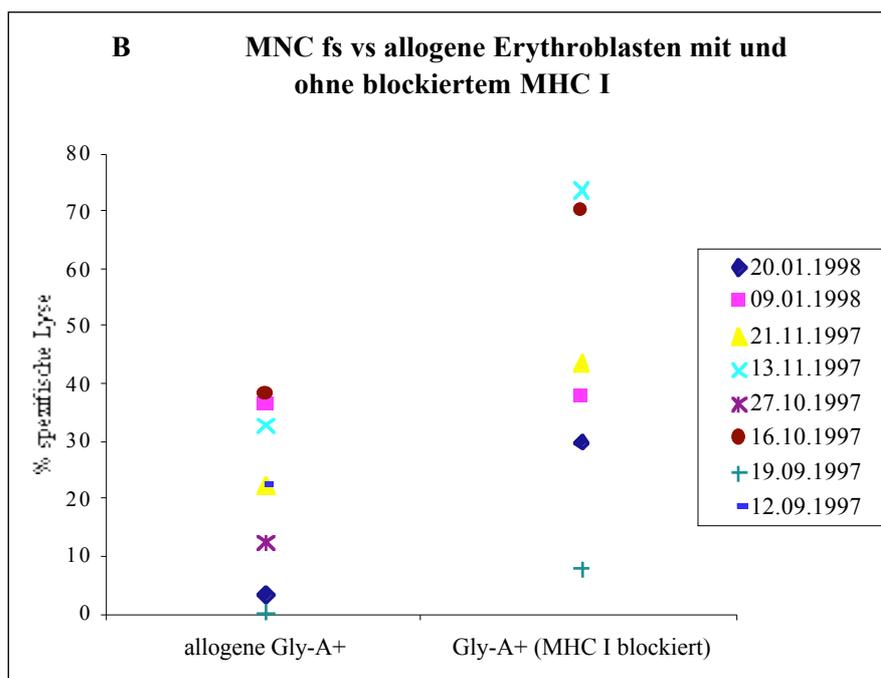
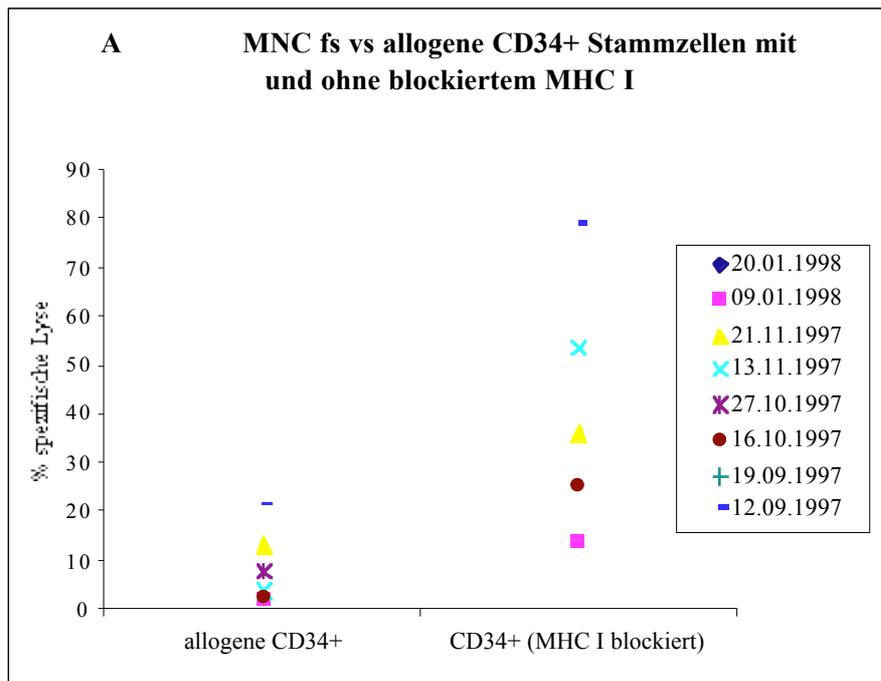
Abb. 14 veranschaulicht das Ergebnis eines Zytotoxizität-Tests für den zwei *in vitro* Expansionskulturen zweier unterschiedlicher Spender angelegt wurden. Am Tag fünfzehn der Kulturzeit war die Differenzierung der Erythroblasten soweit fortgeschritten, daß aus jeder Kultur sowohl Glycophorin-A+ Erythroblasten als auch CD15+ myeloide Progenitoren isoliert wurden. Dargestellt sind die Titrationsschritte des Effektor zu Target Verhältnisses, beginnend mit einem Verhältnis von 80 zu 1 und in fünf Schritten jeweils halbiert. Von links nach rechts aufgetragen ist die spezifische Lyse der Erythroblasten und Myeloblasten des Spenders KB, gefolgt von Erythroblasten und Myeloblasten des Spenders PD.

Bemerkenswert an diesem Experiment ist, daß die Zellen des Spenders KB einen HLA-C tragen, der nicht an den KIR2DL1 der  $\alpha\alpha$ -T-Zellen des Patienten fs binden kann und eine deutlich höhere spezifische Lyse zeigen, wohingegen der HLA-C des Spenders PD ein Ligand des KIRs der T-Zellen ist und die Zellen aus dessen Expansionskultur einer viel geringeren Lyse unterliegen. Der HLA-C Typ der Spender unterschied sich insofern, als nur der Spender KB (linke Diagrammseite) mit seinem HLA-C dem von  $\alpha\alpha$ -T-Zellen des Patienten fs exprimierten KIR2DL1 einen Liganden bot.

### **1.2.1.2 Blockierungs-Experimente von MHC I und NK-Rezeptoren**

Die in der Einleitung diskutierte Hypothese des „missing self“ besagt, daß die Bindung eines NK-Rezeptors an den MHC-I-Liganden auf der Zielzelle essentiell für eine Inhibition einer zytotoxischen Aktivität der NK-Zelle ist. Dies wird hier durch die Blockade der zwei interagierenden Moleküle, des MHC I der Zielzellen und der NK-Rezeptoren der Effektorzellen untersucht.

Der MHC I wurde meist mit dem monoklonalen Antikörper W6/32 und in einigen Experimenten mit dem mAk B1.32.1 blockiert. Die NK-Rezeptoren wurden mit den mAks EB6 und GL183 blockiert, die sich gegen die KIR2DL1 bzw. 2 richten. Die Erfahrungen aus hier nicht aufgeführten KIR-Blockierungs-Versuchen mit dezidualen NK-Zellen hatten gezeigt, daß die direkte Blockade eines Rezeptors mit dem für ihn spezifischen mAk meist einen inhibierenden Effekt auf die zytolytische Aktivität der NK-Zellen zeigte. Die Blockade eines der KIR2DL-Rezeptoren zugleich mit beiden mAks verstärkte diesen inhibierenden Effekt deutlich. Da sich die beiden inhibierenden KIR2DL-Rezeptoren nur an wenigen Positionen der Aminosäureabfolge in der Liganden-bindenden Region unterscheiden (Mandelboim, 1997) und die mAks von Moretta (EB6 und GL183) selektiv nur diese KIRs erkennen, liegt die Vermutung nahe, daß eine Antikörperbindung der Rezeptoren die Generierung eines inhibierenden Signals zur Folge haben könnte.



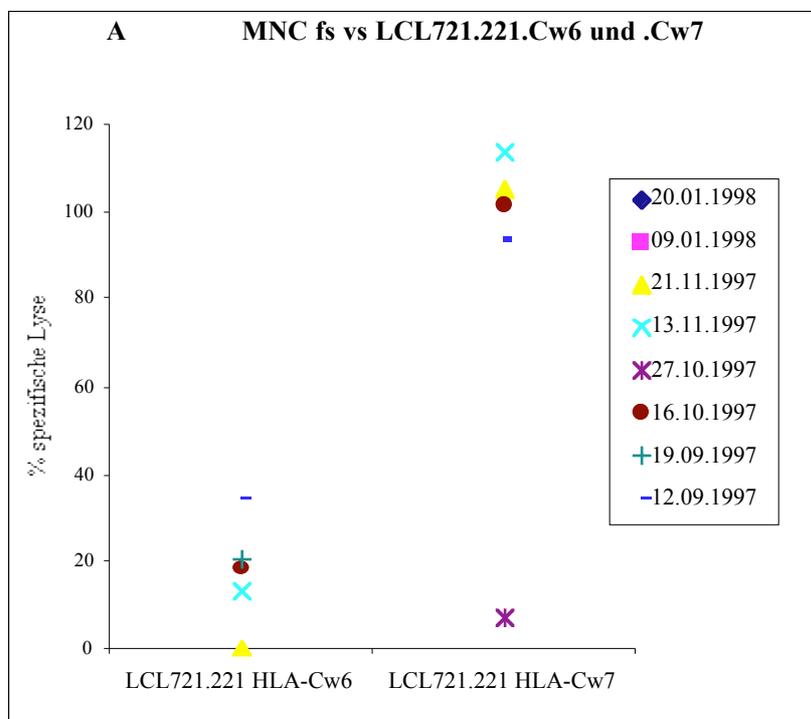
**Abb. 15: Zytotoxizität-Tests mit Erythroblasten aus Knochenmarkpunktaten und in vitro Expansions-Kulturen mit und ohne MHC I-Blockade**

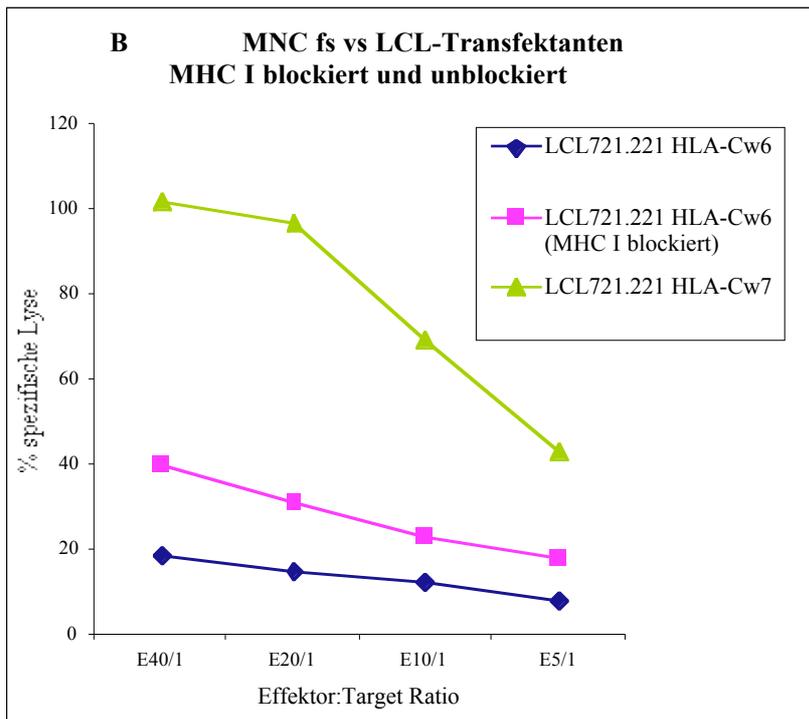
Zusammenfassung der Ergebnisse der Blockierungsversuche. Die Zielzellen wurden 30 Minuten mit mAk gegen MHC I inkubiert (Klon W6/32; 2,5 µg je Well), bevor die jeweils andere Zellpopulation zugegeben wurde. Das Effektor zu Target Verhältnis in diesen Zytotoxizität-Tests betrug jeweils 80 oder 40 zu 1 und wurde in mehreren Schritten titriert. Die Titrationsschritte ergaben auch hier eine klare Verringerung der spezifischen Lyse der Zielzellen. Hier gezeigt ist jeweils das Ergebnis der 40 zu 1 Verdünnung. Links sind jeweils die Zellen mit unblockiertem, rechts die mit blockiertem MHC I aufgetragen.

**A** Tests während derer CD34+ Stammzellen als Zielzellen verwendet wurden. Die Lyse-Raten für diese MHC I in hohem Maße exprimierenden Zellen sind links für unbehandelte Stammzellen und auf der rechten Diagrammseite nach einer Blockade des MHC I dargestellt.

**B** Tests in denen MNC des Patienten fs auf Erythroblasten trafen. Auf der linken Seite sind die Werte für Erythroblasten ohne Behandlung, rechts für Erythroblasten nach MHC I-Blockade dargestellt.

Die Abb. 15 zeigt sowohl bei Glycophorin-A+ Erythroblasten als auch bei CD34+ Stammzellen, daß eine Blockade des MHC I zu einer deutlichen Erhöhung der spezifischen Lyse der Zielzellen führt. Als weitere Kontrolle wurden LCL721 Zelllinien eingesetzt, die fast völlig MHC I defizient, und sekundär mit einzelnen Allelen von HLA-Cw transfiziert wurden (Steinle, 1994). Es werden hier HLA-Cw6 und HLA-Cw7 Transfektanten verwendet. Die HLA-Cw Subtypen wurden so gewählt, daß jeweils nur eine der zwei KIR2DL Rezeptorgruppen an sie binden können und dadurch ein inhibierendes Signal vermittelt bekommen. Die MNC des Patienten fs besitzen mit KIR2DL1 (CD158a, p58.1) nur Rezeptoren für die HLA-C Gruppe 2 (HLA-Cw2, 4, 5 und 6), sollten also ein deutliche Spezifität für eine der beiden Transfektanten zeigen und die LCL721.221 HLA-Cw7 Linie deutlich besser lysieren. Dies wird verdeutlicht durch die in Abb.16 gezeigten Ergebnisse der Zytotoxizität-Tests mit den transfizierten LCL Linien als Zielzellen und MNC des Patienten fs als Effektorzellen.





**Abb. 16: Selektivität der  $\gamma\delta$ -T-Zellen von fs für Zelllinien mit HLA-C Gruppe 1 oder 2 Allelen**

**A** Ergebnisse dreier Zytotoxizität-Tests, während derer die transfizierten LCL-Linien LCL.Cw6 und LCL.Cw7 als Zielzellen verwendet wurden. Links wurde die spezifische Lyse der LCL HLA-Cw6 Linie dargestellt, rechts die der HLA-Cw7 Linie. Daten, die in denselben Experimenten gewonnen wurden, sind mit Linien verbunden. Das Effektor zu Target Verhältnis in diesen Zytotoxizität-Tests betrug jeweils 80 oder 40 zu 1 und wurde in mehreren Schritten titriert. Die Titrationsschritte ergaben auch hier eine klare Verringerung der spezifischen Lyse der LCL-Linien.

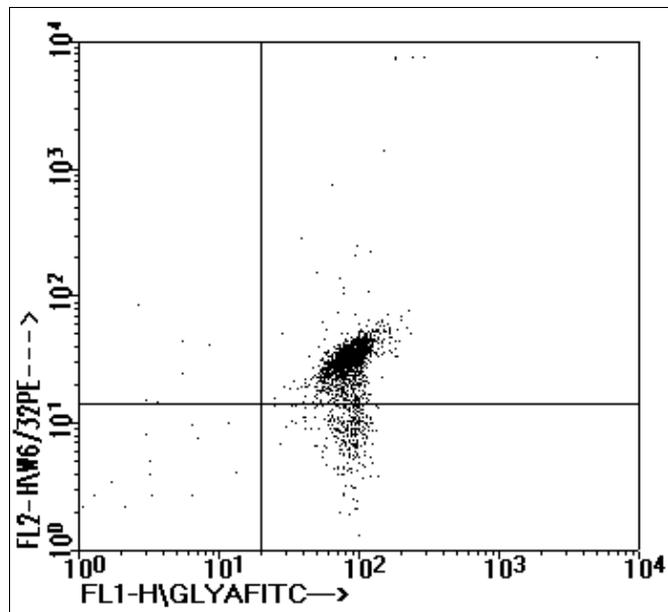
**B** Ergebnisse eines der unter A aufgeführten Experimente. Zu sehen ist die spezifische Lyse der LCL Linien in vier Titrationstufen des Effektor zu Target Verhältnisses. In diesem Versuch wurde der MHC I der HLA-Cw6 transfizierten Linie durch einen mAk (Klon W6/32) blockiert.

Die Versuche mit parallel dazu als Zielzellen verwendeten Zelllinien K562 und LCL721.221 wurden hier nicht einzeln aufgeführt. Beide Linien sind MHC I defizient und stellen somit klassische Ziele für NK-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen dar. Sie dienen als Positivkontrolle für die Verwertbarkeit der einzelnen Tests. Diese Versuche wurden parallel zu den in Abb. 15 gezeigten Versuchen durchgeführt.

Die Ergebnisse der in Abb. 16 abgebildeten Tests zeigen eine deutlich höhere Lyse-Rate der HLA-Cw7 im Vergleich zu der HLA-Cw6 exprimierenden LCL-Linie. Eine Blockade des MHC I der Zielzellen erhöhte geringfügig die Lyse der Zellen durch MNC von fs.

Erythroblasten wurden meist aus Knochenmark oder *in vitro* Expansionskulturen aufgereinigt und für Zytotoxizitätstests eingesetzt. Verunreinigungen dieser Zell-Population konnten zu unerwünschten Artefakten führen. Aus diesem Grund wurde besonders viel Wert auf die Reinheit der aufgereinigten erythroiden Vorläuferstadien gelegt.

### 1.2.1.3 Reinheit der als Zielzellen aufgereinigten erythroiden Vorläuferzellen



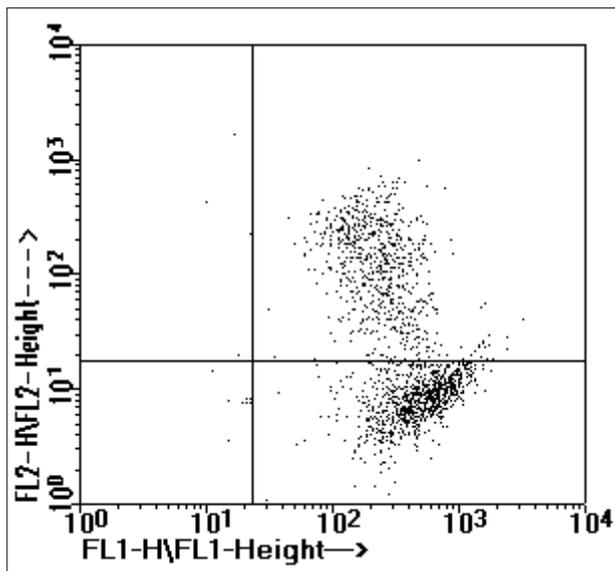
**Abb. 17: Reinheit der als Zielzellen aus Knochenmark aufgereinigten erythroiden Vorläuferzellen**

Diese Dot-Blot-Auswertung zeigt die Anfärbungen aller aus einer repräsentativen Aufreinigung erhaltenen Erythroblasten. Auf der x-Achse ist die Anfärbung für das erythroide Marker-Protein Glycophorin-A, auf der y-Achse die Färbung für MHC I dargestellt.

Erythroblasten wurden aus Knochenmark gesunder freiwilliger Spender mit der bereits beschriebenen Methode mittels magnetisch aktivierter Mikropartikel angereichert. Hierfür wurde eine indirekte Markierung gewählt: als erster Schritt wurden alle Glycophorin-A positiven Zellen der roten Progenitor-Linie mit einem FITC-konjugierten mAk gefärbt und in einem zweiten Schritt wurde sie mit einem gegen das FITC-Chromophor gerichteten mAk inkubiert und angereichert. Die Reinheit der Erythroblasten-Aufreinigung betrug im Mittel  $93,5\% \pm 5,9\%$ . Die Ausbeute an Erythroblasten war im Mittel  $69,0\% \pm 24,4\%$ . CD34+ hämatopoetische Stammzellen wurden ebenfalls mit MACS direkt angereichert. Die Reinheit der Stammzellen betrug im Mittel  $81,5\% \pm 10,0\%$ . Die Recovery der Stammzellen war ähnlich hoch wie die der Erythroblasten.

### 1.2.1.4 Reinheit und MHC I Oberflächenexpression erythroider Progenitor-Zellen einer *in vitro* Expansion von CD34+ Zellen des Patienten fs

Auch aus CD34+ Stammzellen des Patienten fs wurden in zwei *in vitro* Expansionskulturen (Protokoll RM und ReH) erythroide Progenitorzellen generiert, die nach zwei Wochen Kulturzeit isoliert und für Zytotoxizitätstests eingesetzt wurden. Die Stammzellen waren aus einer Knochenmarkpunktion des Patienten fs gewonnen worden.



**Abb. 18: Reinheit und MHC I Oberflächenexpression erythroider Progenitor-Zellen einer *in vitro* Expansion von CD34+ Zellen des Patienten fs**

Dieser Dot Blot zeigt die durchflußzytometrische Auswertung einer *in vitro* Expansionskultur CD34+ Zellen nach zwei Wochen Kulturzeit. Die Stammzellen waren aus einer Knochenmarkpunktion des Patienten fs isoliert worden. Die Zellen der Expansionskultur wurden mit dem mAk W6/32 gegen MHC I (FITC-konjugiert, gemessen im FL1-Kanal) und Glycophorin-A (PE-konjugiert, gemessen im FL2-Kanal) gefärbt. Die Punktwolken der zwei rechten Quadranten zeigen die Expression von MHC I; die Zellpopulation, die im rechten oberen Quadranten zu sehen ist, repräsentiert die Glycophorin-A+ Erythroblasten. Bemerkenswert ist, daß die Expressionsdichte von MHC I auf den Erythroblasten am unteren Rand oder noch unter dem aller anderen Zellen der Expansionskultur liegt.

Der Anteil der Glycophorin-A+ Zellen an der Gesamt-Zellzahl betrug 29,9%, beziehungsweise 43,7% der lebenden Zellen. Die Erythroblasten aus beiden *in vitro* Flüssig-Expansionskulturen wurden für Zytotoxizitätstests verwendet.

## **1.2.2 Unterschiedliche Suszeptibilität erythroider Differenzierungsstadien gegenüber den CD8-T-Zellen von fs**

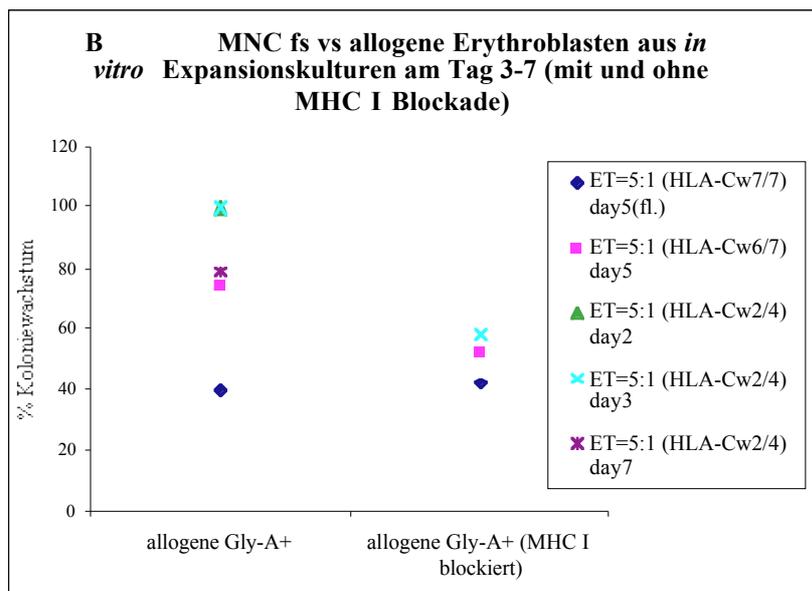
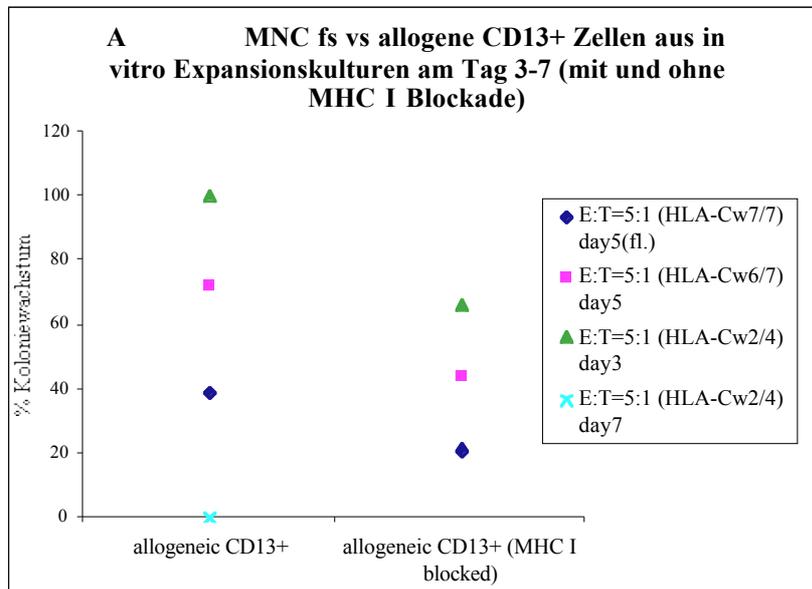
Das Ziel dieser Versuchsreihe war es, das Stadium der erythroiden Differenzierungsreihe zu finden, das die höchste Suszeptibilität gegenüber dem reaktiven Verhalten der CD8-T-Zellen von Patient fs zeigt. Es sollte untersucht werden, ob die erhöhte Lyse-Rate der Erythroblasten mit einer Verminderung der Expressionsdichte des MHC I korreliert. Um den Beweis hierfür zu erbringen und die zentrale Rolle der Verminderung des MHC I für das beschriebene autoreaktive Verhalten der CD8-T-Zellen dieses Patienten zu belegen, sollte eine Steigerung der Expression des MHC I auf Erythroblasten durch deren Inkubation mit Interferon- $\gamma$  erreicht werden. Diese Expressionssteigerung sollte die Erythroblasten vor einer Lyse durch die CD8-T-Zellen schützen. Dieser Schutz sollte durch Blockierung des MHC I auf den Zielzellen reversibel sein.

### **1.2.2.1 Unterschiedliche Suszeptibilität verschiedener erythroider Differenzierungsstadien gegenüber CD8-T-Zellen des Patienten fs**

Um den Verlauf der Suszeptibilität der erythroiden Vorläufer-Stadien gegenüber den LGL des Patienten fs zu demonstrieren wurden CD34+ Stammzellen von sieben verschiedenen allogenen Spendern in *in vitro* Expansionskulturen zu erythroiden Progenitoren differenziert. Die aufgereinigten Erythroblasten unterschiedlicher Differenzierungsstadien wurden über Nacht mit MNC des Patienten fs inkubiert und danach erneut in einem semisoliden Differenzierungsmedium ausplattiert. Nach einer Expansionszeit von insgesamt zwei Wochen konnten die im Medium gewachsenen Kolonien mit dem Mikroskop ausgezählt und ausgewertet werden.

Um Zellen der erythroiden und myeloiden Differenzierungsreihen zu erhalten wurden Expansions-Kulturen sowohl in Flüssigkultur Medien als auch in semisoliden Medien der Firma Stem Cell Technologies durchgeführt. Hierbei wurden verschiedenste Kombinationen einer Reihe von Zytokinen zugesetzt, die die Bildung der unterschiedlichen Kolonieformen unterstützen. Erythroide Vorläuferzellen wurden an unterschiedlichen Tagen der Differenzierung aus den Kulturmedien isoliert. Auch hier diente der erythrozytäre Marker Glycophorin-A als typisches Epitop zur Aufreinigung mit der MACS-Technik. Kolonien wurden nach zwei Wochen

Kulturzeit quantitativ ausgezählt und qualitativ in die verschiedenen Kolonieformen differenziert.



**Abb. 19: Kolonie-Inhibitions-Tests mit erythroiden Differenzierungsstadien nach Inkubation mit MNC von Patient fs**

Abb. 19 veranschaulicht die Ergebnisse von vier Kolonie-Inhibitions-versuchen, während derer Erythroblasten an den Tagen 2, 3, 5 und 7 aus semisoliden und flüssigen Differenzierungs-Kulturmedien isoliert und über Nacht mit MNC von fs inkubiert wurden.

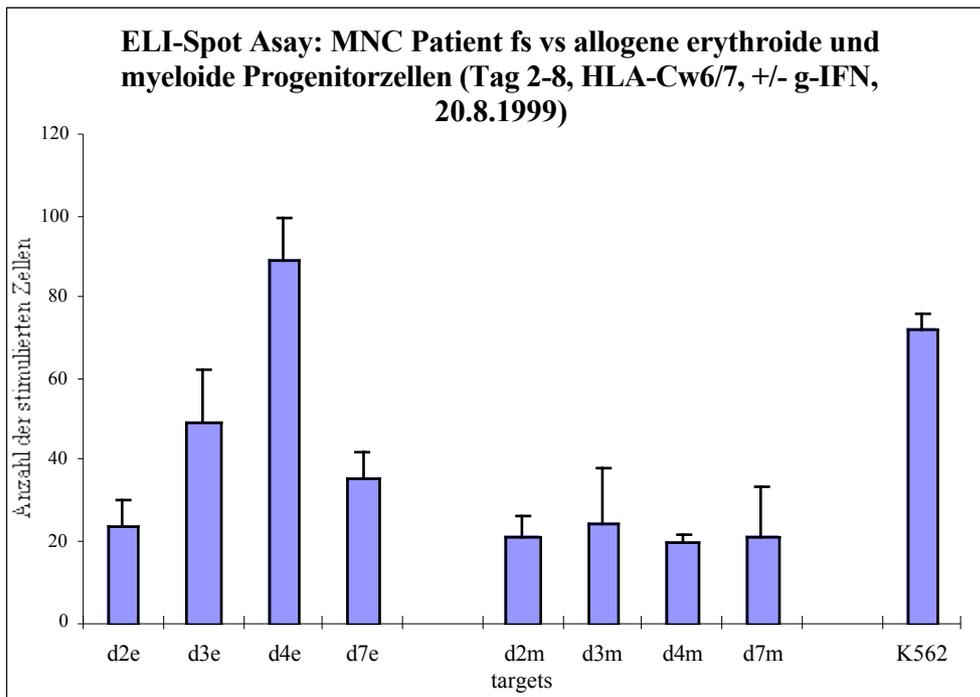
In A sind die Werte für CD13+ myeloide Progenitor-Zellen und in B die Werte für erythroide Vorläuferzellen aufgetragen, jeweils ohne und mit blockiertem MHC I. Für Zellen, die am Tag 2 und 7 der Differenzierungskultur isoliert wurden, existieren nur als Werte für Erythroblasten und CD13+ Zellen. Als MHC I hoch exprimierende Kontrollpopulation wurden CD13+ bzw. CD15+ Zellen isoliert und genauso behandelt wie die Zellen der

erythroiden Kulturen. Als weitere Kontrollen wurden der MHC I der differenzierten Zellen mit mAk blockiert. Ausgangswert sind 1000 CD34+ Stammzellen pro Well einer 96-well Microtiter-Platte. Aufgeführt sind Prozent überlebender Stammzellen bzw. gewachsener Kolonien gegenüber einer Kontrolle von CD34+ Stammzellen, die unbeeinträchtigt und ohne Kontakt mit Effektorzellen für zwei Wochen differenzierten. Diese Kontrollkultur wurde sonst genau gleich behandelt wie die Versuchskulturen.

Die Überlebenswerte für Erythroblasten am Tag 5 der Kultur sind durchweg am geringsten, insbesondere bei Zellen die aus einer Flüssigkultur gewonnen wurden. Die Blockade des MHC I führt bei Kolonie-Populationen beider Differenzierungsreihen zu deutlich verringerten Wachstumswerten.

### **1.2.2.2 Erythrozytäres Differenzierungsstadium mit maximaler Suszeptibilität für LGL des Patienten fs**

Bei der Isolation einer Glycophorin-A+ Zell-Fraktion aus Knochenmark werden alle Differenzierungsstadien erythrozytärer Progenitoren aufgereinigt. Anders ist das bei *in vitro* Expansionskulturen. Durch den gleichzeitigen Start der Kultur aus CD34+ Stammzellen entwickeln sich die Erythroblasten-Differenzierungsstadien synchron. Um für die vorliegende Fragestellung mit dem Mittel der *in vitro* Kultur Aussagen treffen zu können, müssen zunächst die optimalen Kulturbedingungen und das am besten geeignete Stadium in der Erythroblasten-Differenzierung gefunden werden. Hierfür wurden Erythroblasten aus Differenzierungskulturen eines Stammzell-Spenders zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert und in einem ELI-Spot Test als Stimulator-Zellen eingesetzt. Die Aktivierung der LGL wurde anhand ihrer  $\gamma$ -Interferon Sekretion gemessen. Der ELI-Spot Test wurde gewählt, da er hoch sensitiv ist und gegenüber üblichen Killer Tests viel geringere Zellzahlen erforderlich sind. Mit diesem Test können sogar einzelne Interferon-sezernierende Zellen nachgewiesen werden. Parallel dazu wurden die isolierten Erythroblasten durchflußzytometrisch auf die Dichte ihrer MHC I Expression untersucht.

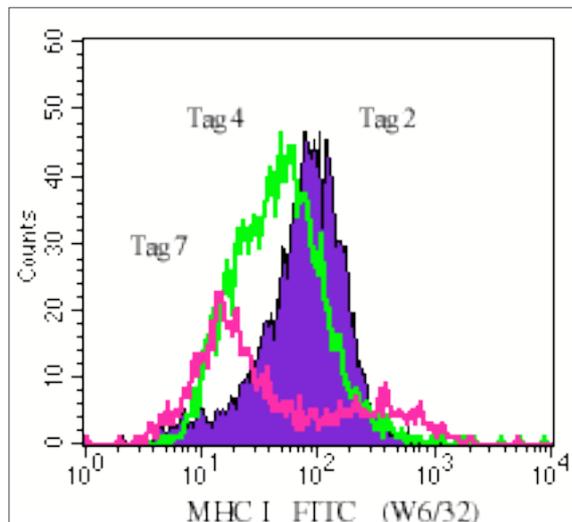


**Abb. 20: Zeitpunkt maximaler Angreifbarkeit der Erythroblasten durch  $\alpha$ -T-Zellen von Patient fs**

Im Experiment vom 20.8.99 wurden Erythroblasten nach 2, 3, 4 und 7 Kulturtagen aus semisolidem Kulturmedium isoliert und als Stimulator-Zellen der MNC von fs eingesetzt. Die Zusammensetzung der zu den Kulturmedien gegebenen Zytokinkombinationen war so gewählt worden, daß vornehmlich erythroide oder myeloide Progenitoren gebildet wurden, die dann mit MACS nach Glycophorin-A und CD13 aufgereinigt wurden. Das Verhältnis der  $\alpha$ -T-Zellen zu den Target Verhältnis betrug hier 5 zu 1. Links ist die Zahl der stimulierten Zellen für erythroide, rechts die Zahl für myeloide Stimulator-Zellen dargestellt. Als Kontrolle für die maximale Stimulation der Effektorzellen wurde die Zelllinie K562 verwendet. Es wurden 5000 Target-Zellen pro Well eingesetzt. Die Farbsignale auf der Nitrocellulosemembran, die einzelne Zytokin-sezernierende LGL repräsentieren wurden computergesteuert ausgezählt. Die hier präsentierten Werte sind Mittelwerte aus Tripletbestimmungen.

Die Zahl der durch erythroide Progenitoren stimulierten MNC von fs steigt bis zum Tag 4 der Differenzierungskultur und fällt danach wieder ab. Myeloide Progenitor-Zellen stimulierten MNC von fs in keinem der Differenzierungsstadien mehr als in einem anderen. Diese Einzelergebnis konnten in gleicher Weise reproduziert werden, können also als repräsentativ angesehen werden.

### 1.2.2.2 Verlauf der Reduktion der Oberflächen-Expression von MHC I auf Zellen der erythrozytären Differenzierungsreihe



**Abb. 21: MHC I Expressionsdichte auf Erythroblasten-Differenzierungsstadien**

Diese Überlagerung mehrerer Histogramme zeigt die Entwicklung der MHC I Expressionsdichte auf erythroiden Vorläuferzellen während verschiedener Differenzierungsstadien in einer *in vitro* Expansionskultur CD34+ Stammzellen.

Beginnend mit der ausgefüllten Kurve, die die Expression am Tag 2 der *in vitro* Expansionskultur zeigt, nimmt die Anzahl der MHC I Moleküle je erythroider Progenitor-Zelle kontinuierlich innerhalb von fünf Tagen um mehr als das zehnfache ab. Die mittlere helle Kurve zeigt den Wert für Erythroblasten am Tag 4 der Expansionskultur. Die linke dunkle Kurve repräsentiert den Wert für die Dichte von MHC I auf Erythroblasten nach 7 Tagen Kultur und stellt annähernd den Wert für das endgültige Stadium als Erythrozyt dar.

Die Zellen der Expansionskultur wurden mit einem mAk gegen MHC I (W6/32, FITC-konjugiert und im FL1-Kanal gemessen) und einem mAk gegen Glycophorin-A (PE-konjugiert, gemessen im FL2-Kanal) gefärbt. Im FACS-Bild für forward/sideward scatter wurde ein Lymphozyten-gate gesetzt und damit eine Auswertung der Daten für die expandierten Zellen erleichtert. Die Punktwolke, die positiv für die Färbung für Glycophorin-A war, wurde durch ein weiteres gate markiert und die in ihm detektierten Zellen im obigen Schaubild dargestellt. Auf der x-Achse ist die Intensität des Signals für den FL1-Kanal zu sehen, der einer Färbung mit FITC entspricht. Hier stellt dieses Signal also die Stärke der Anfärbung mit dem gegen MHC I gerichteten Antikörper dar. Auf der y-Achse ist die Anzahl der Zellen, die mit einer bestimmten Signalstärke detektiert wurden linear aufsummiert. Die hier gezeigten Zellen stammen aus Expansionskulturen CD34+ Stammzellen in semisolidem Medium (collagenhaltiges Medium der Firma Stem Cell Technologies mit/ohne Zytokine und dem Zusatz von 100 ng/ml SCF, IL-3 und 3 U/ml rhEPO) und wurden für die durchflußzytometrische Analyse des MHC I und andere Zytotoxizität- und Kolonie Wachstumstests mit Collagenase V (10 µg/ml Endkonzentration) vorsichtig aus dem umgebenden Medium herausgedaut.

Diese Darstellung der Expressionsdichte des MHC I auf Erythroblasten in *in vitro* Expansionskulturen CD34+ Stammzellen veranschaulicht die kontinuierliche Reduktion von MHC I im Verlauf der Reifung der erythroiden Progenitorzellen. Die geringste noch problemlos detektierbare Menge an MHC I ist am Tag 7 der Differenzierungskultur zu messen.

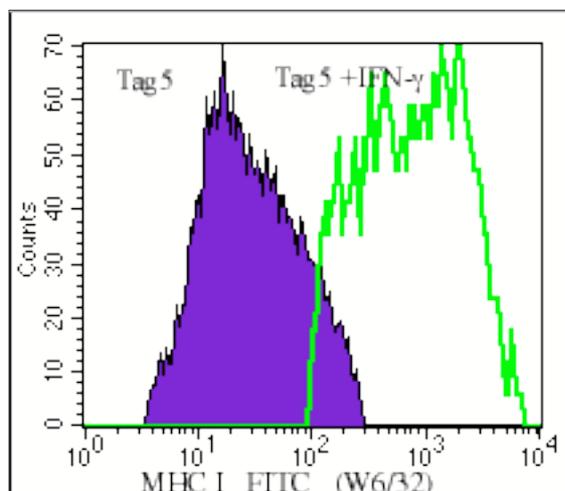
Diese funktionell sinnvolle allmähliche Reduktion des MHC I während der Differenzierung der Erythroblasten zu den MHC I-defizienten und Zellkern-losen Erythrozyten ist in der Literatur bislang noch nicht beschrieben. Der Mechanismus dieser Reduktion ist nicht bekannt.

### **1.2.3 „Rescue“ des LGL Killings durch Erhöhung der MHC I Oberflächen-Expression durch $\gamma$ -Interferon-Inkubation**

Ein klassischer Beweis für einen Mechanismus ist der „Rescue“ eines durch den Mechanismus ausgelösten Effekts. Die Beseitigung der als ursächlich postulierten Ursache für die gemachte Beobachtung ist Beweis für die Richtigkeit der Hypothese, wenn durch diese Änderung der Versuchsbedingungen der beobachtete Effekt selektiv aufgehoben werden kann.

Die in den Abb. 19, 20 und 21 zusammengefaßten Beobachtungen zeigen, daß eine geringe Expressionsdichte von MHC I auf den Erythroblasten sie im Vergleich zu MHC I hoch exprimierenden Kontrollen wie CD34+ oder CD13+ Zellen deutlich angreifbarer macht gegenüber LGL-Zellen von Patient fs. Diese Erythroblasten sollten also im geringeren Maß zum Ziel der LGL werden, wenn sie größere Mengen von MHC I auf ihrer Oberfläche präsentierten. Ein klinisch bereits erprobtes Mittel, diese Erhöhung zu erreichen, ist die Gabe von  $\gamma$ -Interferon.

### 1.2.3.1 Steigerung der MHC I Oberflächen-Expression auf Erythroblasten durch $\gamma$ -Interferon-Inkubation



**Abb. 22: MHC I Expressionsdichte auf Erythroblasten nach Inkubation mit IFN- $\gamma$**

Die Überlagerung zweier Histogramme zeigt die Expressionsdichte von MHC I auf erythroiden Vorläuferzellen am Tag 5 einer *in vitro* Expansionskultur CD34+ Stammzellen. Die ausgefüllte blaue Kurve repräsentiert den Wert für die Dichte der MHC I Moleküle auf Erythroblasten nach 5 Tagen Kultur. Die grüne Linie zeigt die Expressionsdichte von MHC I auf Erythroblasten einer Parallel-Kultur, der jedoch 48 Stunden vor dieser Messung und den in Abb. 23 beschriebenen, nachfolgenden Experimenten 20 ng/ml (=200 iU/ml)  $\gamma$ -Interferon zugegeben wurde. Ziel war die Steigerung der Oberflächen-Expression von MHC I.

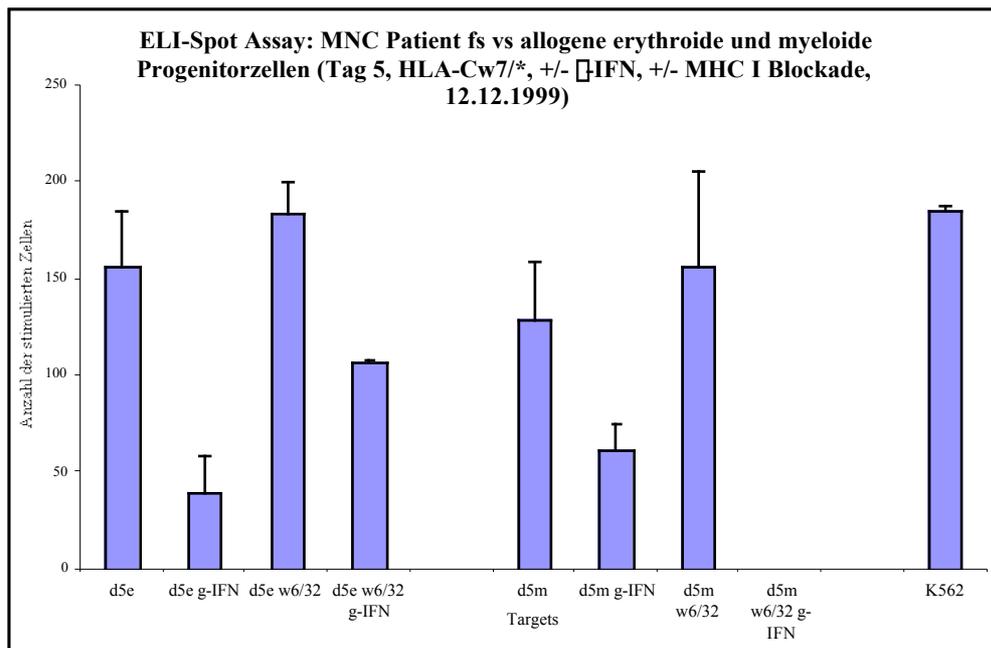
Der Modus der Kultivierung und der Färbung der Erythroblasten ist gleich wie in Abb. 21. Der Zusatz von 20 ng/ml (=200 iU/ml)  $\gamma$ -Interferon erfolgte nach Isolation der Erythroblasten aus semisolidem Kulturmedium in ein neues Kulturmedium, wo die Zellen für die nächsten 48 Stunden verblieben.

Die Zugabe von IFN- $\gamma$  ergibt eine Steigerung der Oberflächenexpression von MHC I auf Erythroblasten aus *in vitro* Expansionskulturen auf etwa den 100fachen Wert im Vergleich zu Kulturen ohne Interferonbehandlung.

### 1.2.3.2 „Rescue“ des Killings der Erythroblasten durch MHC I-Expressionssteigerung

Die Hypothesen des „missing self“ und der „Rezeptorkalibrierung“ (Ljunggren, 1985; Sentman, 1995) besagen, daß die wichtigsten Parameter für die Inhibition einer NK-vermittelten Lyse von

Zielzellen deren Expressionsdichte von MHC I Molekülen und der Besatz der Killerzelle mit NK-Rezeptoren sind. Die Veränderung eines dieser beiden Parameter reicht aus, um die Reaktivität der LGL-Zellen des Patienten fs gegenüber Erythroblasten in ihrer Wirksamkeit einzuschränken. Die in Abb. 22 gezeigte Steigerung der Expression von MHC I sollte einen protektiven Effekt für Erythroblasten bewirken. Der protektive Effekt soll dann durch die Blockade des neu gewonnenen MHC I (mAk, W6/32) wieder rückgängig gemacht werden.



**Abb. 23: Protektiver Effekt einer MHC I Expressionssteigerung auf Erythroblasten**

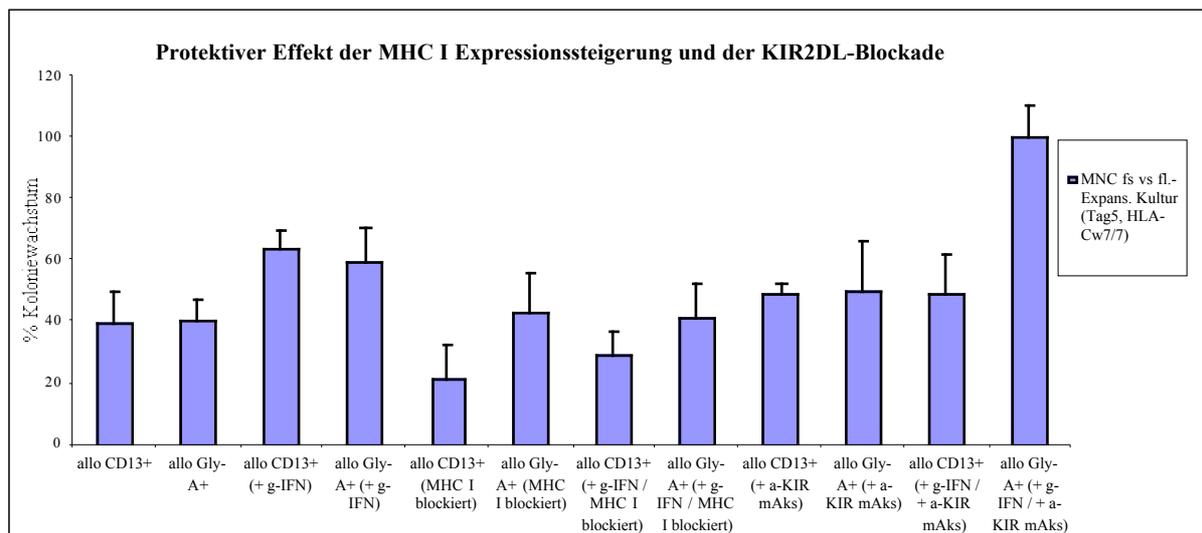
Hier dargestellt ist ein ELI-Spot Test mit Stimulatorzellen, die nach 5 Tagen Kultur aus *in vitro* Expansionskulturen isoliert wurden und als Kontrolle mit  $\gamma$ -Interferon inkubiert wurden. Aufgetragen ist die Anzahl der spezifisch aktivierten Effektorzellen. Die Ergebnisse für erythroide Progenitor-Zellen (d5e) sind links, die für myeloide (d5m) rechts dargestellt. Das Ergebnis für d5m mit vorausgehender  $\gamma$ -Interferon-Inkubation und MHC I-Blockade liegt in dieser Auswertung nicht vor. Auch dieses Einzelergebnis konnte in gleicher Weise reproduziert werden und kann somit ebenfalls als repräsentativ angesehen werden.

Für Erythroblasten, deren MHC I-Expression durch eine Inkubation mit  $\gamma$ -Interferon gesteigert wurde, ist eine deutliche Verringerung der Stimulation der LGL-Zellen zu beobachten. Die Blockade des MHC I auf den Stimulator-Zellen führt zu einer starker Steigerung der LGL-Aktivierung, die noch über den Werten für unbehandelte Zellen liegt. Die Blockade des vermehrten MHC I auf Erythroblasten führt nur zu einer teilweisen Aufhebung des rettenden

Effekts der Inkubation mit  $\gamma$ -Interferon. Die Werte für die Stimulation der LGL von fs liegen hier in der Mitte zwischen den Ergebnissen für die einfach behandelten Zielzellen.

### 1.2.3.3 Verminderung der LGL-Reaktivität durch Blockade der NK-Rezeptoren

Der zweite Parameter, der eine Inhibition einer NK-vermittelten Lyse durch Killerzellen beeinflusst, ist die Expression und die Funktionalität von inhibierenden NK-Rezeptoren. Eine Blockade, bzw. eine Aktivierung der durch diese Rezeptoren ausgelösten inhibitorischen Signalwege sollte ebenso wie die Steigerung der Expressionsdichte von MHC I das reaktive Verhalten der LGL-Zellen des Patienten fs deutlich einschränken.



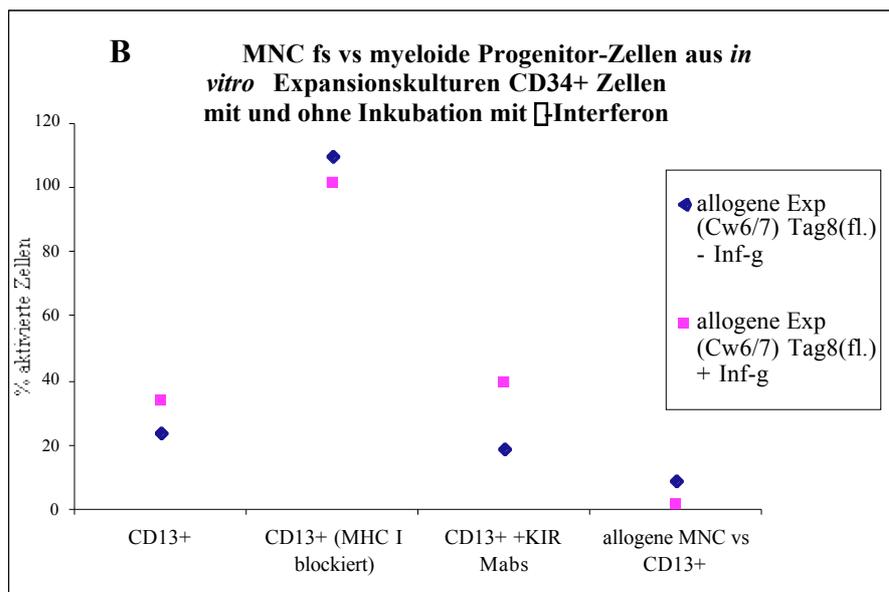
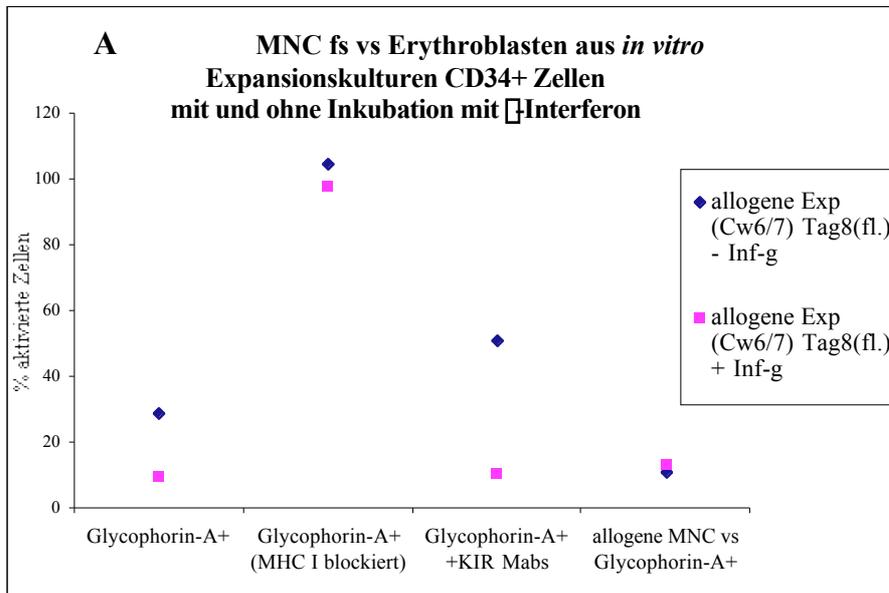
**Abb. 24: Versuch der Inhibition der LGL-Reaktivität durch KIR2DL-Blockade**

In dem hier gezeigten Versuch soll die Reaktivität der LGL-Zellen gegenüber Erythroblasten und myeloiden Progenitorzellen durch KIR2DL-Blockade und  $\gamma$ -Interferon-induzierte Expressionssteigerung des MHC I vermindert werden.

Verwendet wurden Glycophorin-A<sup>+</sup> und CD13<sup>+</sup> Zellen aus *in vitro* Expansions-Kulturen allogener CD34<sup>+</sup> Stammzellen, die am Tag 5 isoliert wurden. Der MHC I der Progenitorzellen wurde durch 30-minütige Inkubation mit einem mAk (W6/32) blockiert. Der KIR2DL1 (CD158a) der LGL-Zellen des Patienten fs wurde durch die Inkubation mit mAks gegen beide der KIR2DL-Rezeptoren (EB6 und GL183) blockiert. Erythroide und myeloide Vorläuferzellen von Tag 3 bis Tag 5 der Kultur wurden als Aliquot mit 200 U/ml  $\gamma$ -Interferon inkubiert. Dieses Zytokin bewirkt eine starke Expression von MHC I auf den inkubierten Zellen. Mit den derart behandelten Zellen wurden identisch alle Versuchsanordnungen wie mit unbehandelten Zellen durchgeführt. Der HLA-Typ des gesunden Stammzellspenders ist HLA-A/32,-B51/8,-Bw4/6, Cw7/7. Die MNC von fs waren im Verhältnis von 5 zu

1 gegenüber den Progenitor-Zellen eingesetzt worden. Die hier dargestellten Werte stellen wiederum Mittelwerte aus Triplett-Ansätzen dar. Der Wert für das Koloniewachstum einer unbehandelten Stammzellkontrolle wurde als 100% gesetzt.

Ein erhöhtes Koloniewachstum der Interferon-behandelten Zellen ist nach Inkubation mit MNC von Patient fs zu erkennen (Balken 3 und 4). Der Effekt der MHC I Blockade der Zielzellen ist in etwa äquivalent zu dem der unbehandelten Zellen (Balken 6 und 2, von links ausgehend). Die Inkubation der MNC von fs mit mAks gegen beide KIR2DL-Rezeptoren (CD158a/b, Klone EB6 und GL183) hatte zwar einen protektiven Effekt im Vergleich zu unbehandelten Effektorzellen; für Interferon-behandelte Progenitoren konnte eine Verbesserung des Koloniewachstums jedoch nur für erythroide Zellen beobachtet werden (Balken 9 bis 12 auf der rechten Diagrammseite).



**Abb. 25: ELI-Spot Test zur Verminderung der LGL-Reaktivität durch KIR2DL-Blockade**

Für diesen ELI-Spot Test wurden erythroide (A) und myeloide (B) Progenitoren nach einer Woche aus *in vitro* Expansions-Kulturen in Flüssigmedium isoliert. Ein Aliquot der Kulturen wurde zwei Tage zuvor mit  $\gamma$ -Interferon inkubiert und die hieraus isolierten Zellen ebenfalls als Stimulator-Zellen für MNC von fs eingesetzt. Jede der Stimulatorzell-Populationen wurde jeweils in einem Kontrollansatz mit MNC von Patient fs inkubiert, deren KIR durch mAk blockiert war. In einem weiteren Ansatz wurde der MHC I der Stimulator-Zellen mit mAk blockiert. Unblockierte Stimulator-Zellen wurden zudem mit allogenen MNC als Effektor-Kontroll-Population inkubiert. Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwerten aus Triplet-Versuchen.

Die Darstellung der Ergebnisse dieses ELI-Spot Test zeigt eine enorme Steigerung der Stimulation der MNC von fs durch Zellen, deren MHC I blockiert worden war. Die Blockade der KIR der Effektorzellen hatte hingegen keinen merklichen Effekt auf die Aktivierung durch die allogenen Progenitor-Zellen. Für die Ansätze mit myeloiden Zellen (B) ergab sich auch durch die  $\gamma$ -Interferon-Inkubation keine Steigerung der Stimulierung der MNC von Patient fs, wogegen die Effektorzellen durch die Interferon-behandelten erythroiden Zellen (A) deutlich weniger stimuliert wurden als durch unbehandelte Erythroblasten. Keine der verwendeten Zellpopulationen stimulierte die allogene MNC-Kontrolle merklich.

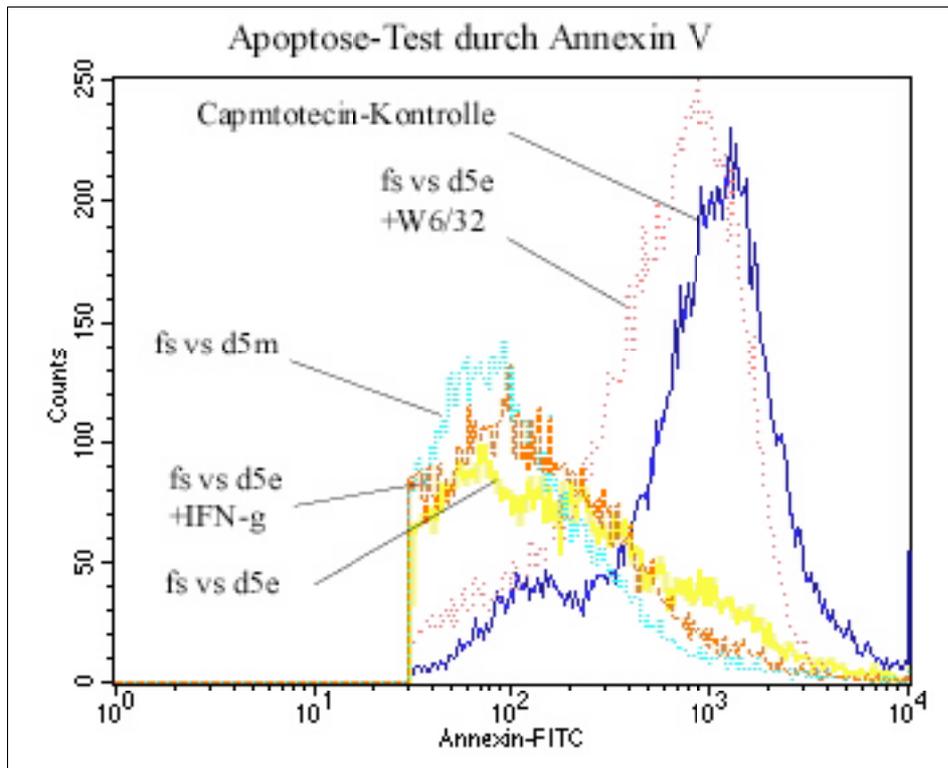
## **1.2.4 Mechanismen des zytotoxischen Verhaltens der LGL des Patienten fs**

### **1.2.4.1 Nachweis der Apoptose durch Annexin**

Die MNC des Patienten fs zeigen *in vitro* eine außerordentlich starke Zytotoxizität gegenüber einer Reihe von Zielzellen. Da  $\gamma$ -T-Zellen ihre Ziele sowohl durch Perforin als auch durch Induktion der Apoptose töten, stellt sich die Frage nach dem Mechanismus der Zytolyse der Zielzellen. Durch die Stellung der  $\gamma$ -T-Zellen zwischen NK-Zellen und T-Zellen stehen dieser Zellpopulation beide Effektorwege offen.

Die bereits gezeigte Reaktivität gegenüber MHC I in geringem Umfang exprimierender Ziele ist bei  $\gamma$ -T-Zellen nicht MHC-restringiert, sie tragen eine Reihe von NK-Rezeptoren und zeigen eine gut nachweisbare Oberflächenexpression von CD95-Ligand (CD178).

Als Test für die Induktion der Apoptose bei Zielzellen, die als Effektor-Mechanismus eher für CD8<sup>+</sup> CTL typisch ist, wurde ein durchflußcytometrischer Nachweis von Annexin V durchgeführt. Annexin V bindet an das bei apoptotischen Zellen auf die äußere Zellmembran translozierte Phosphatidylserin (van Engeland, 1996; Vermes, 1995; Fadok, 1992). Bei fünf Experimenten mit Erythroblasten als Zielzellen wurde mit Hilfe des Annexin V<sup>™</sup> Fluos-Tests (Böhringer Mannheim/Roche diagnostics) versucht, erste Zeichen apoptotischer Veränderung auf den Zielzellen nachzuweisen.



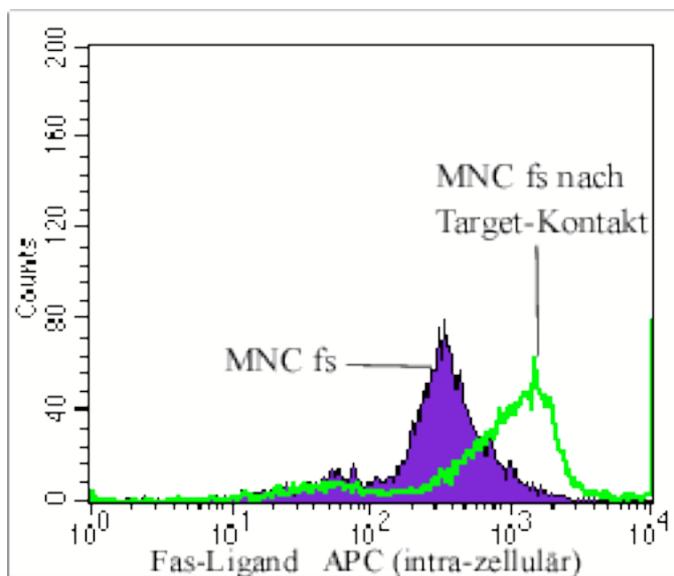
**Abb. 26: Apoptose- Nachweis durch Annexin V auf Erythroblasten**

Diese Histogramm-Darstellung zeigt eine Messung von Annexin V auf Stammzellen nach Inkubation MNC des Patienten fs. Die Zellen der Kontrolle wurden für zehn Minuten mit dem Zytostatikum Camptotecin inkubiert. Die Erythroblasten wurden mit dem Protein Annexin V (FITC-konjugiert und im FL1-Kanal gemessen) inkubiert, das in Anwesenheit von Calcium spezifisch an den Apoptose-Marker PS bindet. Zusätzlich wurde unmittelbar vor der Messung Propidium-Iodid zugegeben, das in die DNA toter Zellen interkaliert und unter Laserlicht-Anregung im FL2- und FL3-Kanal fluoresziert. Alle hier dargestellten Zellen waren negativ für eine Färbung mit Propidium-Iodid. Im FACS-Bild für forward/sideward scatter wurde ein Lymphozyten-gate gesetzt und damit eine Auswertung der Daten für die Stammzellen ermöglicht. Die Punktwolke, die positiv für die Färbung für PS war wurde durch ein weiteres gate markiert. Als Zielzellen im hier dargestellten Versuch dienten Erythroblasten (d5e) und myeloide Progenitorzellen (d5m), die aus einer *in vitro* Expansionskultur nach fünf Tagen Kulturzeit isoliert wurden. Einem Aliquot der *in vitro* Expansionskultur für erythroide Zellen (d5e +IFN- $\gamma$ ) wurde 50 Stunden vor der Isolation der Zellen Interferon- $\gamma$  zugegeben. Der MHC I der Erythroblasten wurde mit mAk blockiert. Diese Kontrolle (d5e +W6/32) ist ebenfalls in Abb. 26 auf der rechten Schaubildseite zu erkennen.

Bei keinem der Experimente konnte eine klare Färbung der Zielzellen mit Annexin festgestellt werden. Die hier dargestellten Messungen für Erythroblasten, für myeloide Progenitorzellen und für Erythroblasten, die für 50 Stunden mit IFN- $\gamma$  inkubiert wurden, exprimierten kein Annexin V auf Ihrer Oberfläche. Lediglich Erythroblasten, die zuvor mit mAk gegen MHC I inkubiert wurden, und die Positivkontrolle, in der durch das Zytostatikum Camptotecin bei Erythroblasten Apoptose induziert wurde, zeigen ein deutliches Signal für Annexin V.

### 1.2.4.2 Nachweis der Apoptose durch Fas-Ligand Expressions-Steigerung

Als Effektorwege stehen für  $\text{CD}4^+$ -T-Zellen sowohl Perforin als auch die Induktion der Apoptose in den Zielzellen bereit. Im zweiten Fall werden in der Target-Zelle durch das Binden von Mitgliedern der TNF-Protein-Familie an deren Rezeptoren Signalkaskaden in Gang gesetzt, die letztlich in der Fragmentierung des zellulären Chromatins münden. Die Effektorzelle steigert in Verlauf dieser Reaktion die Expression z.B. von Fas-Ligand (CD178). Diese Steigerung kann durchflußzytometrisch detektiert werden.



**Abb. 27: Oberflächen-Expressionsdichte von Fas-Ligand auf  $\text{CD}4^+$ -T-Zellen des Patienten fs**

Diese Überlagerung zweier Histogramme zeigt einen Vergleich der Expressionsdichte von Fas-Ligand (CD178) auf  $\text{CD}4^+$ -T-Zellen des Patienten fs. Die blaue ausgefüllte Kurve stellt die Kontrolle dar: MNC des Patienten fs wurden durchflußzytometrisch auf die Expression von CD178 getestet ohne zuvor auf Zielzellen getroffen zu sein. Die helle Kurve rechts daneben zeigt die Expression von CD178 auf den MNC von fs, nachdem sie mit erythroiden Progenitorzellen für 10 Stunden inkubiert wurden, die zuvor 4Tage in einer *in vitro* Differenzierungskultur CD34<sup>+</sup> Zellen worden waren.

Die Zellen der Expansionskultur wurden mit einem mAk gegen CD178 (FITC-konjugiert und im FL1-Kanal gemessen) gefärbt. Im FACS-Bild für forward/sideward scatter wurde ein Lymphozyten-gate gesetzt und damit eine Auswertung der Daten für die MNC von fs ermöglicht. Die Punktwolke, die positiv für die Färbung für CD178 war wurde durch ein weiteres gate markiert und die in ihm detektierten Zellen im obigen Schaubild dargestellt. Auf der x-Achse ist die Intensität des Signals für den FL1-Kanal zu sehen, der einer Färbung mit FITC entspricht. Hier stellt dieses Signal also die Stärke der Anfärbung mit dem gegen MHC I gerichteten Antikörper dar. Auf der y-Achse ist die Anzahl der Zellen, die mit einer bestimmten Signalstärke detektiert wurden linear aufsummiert. Die hier gezeigten Zellen stammten aus Expansionskulturen CD34<sup>+</sup> Stammzellen in semisolidem Medium (collagenhaltiges

Medium der Firma Stem Cell Technologies mit/ohne Zytokine und dem Zusatz von 100 ng/ml SCF, IL-3 und 3 U/ml rhEPO) und wurden für die durchflußzytometrische Analyse des MHC I und andere Zytotoxizität- und Kolonie Wachstumstests mit Collagenase V (10 µg/ml Endkonzentration) vorsichtig aus dem umgebenden Medium herausgedaut.

Parallel zu fünf Zytotoxizitätstests oder Kolonie-Inhibitions-Tests wurden vergleichende Messungen der Oberflächenexpression von Fas-Ligand (CD95-Ligand, CD178) durchgeführt.

In zwei dieser Versuche konnte eine Erhöhung der intrazellulären Expression von Fas-Ligand um etwa das 10-fache festgestellt werden. Die Messungen während der drei anderen Experimente zeigten lediglich leichte Veränderungen.

#### **1.2.4.3 Intrazellulärer Perforin-Nachweis**

Ein von NK-Zellen sehr häufig benutzter Effektor-Mechanismus ist der durch Perforin ausgelöste Zusammenbruch der zellulären Homöostase (Moretta, 1996). Perforin wird in intrazellulären Vesikeln gespeichert und bei Aktivierung der Killerzelle in Richtung der Zielzelle ausgeschüttet. Die Perforin-Monomere polymerisieren in Anwesenheit von Calcium und bilden ähnlich dem Faktor 9 des humanen Complement-Systems einen Tunnel durch die Zellmembran der angegriffenen Zelle.

Die CD4-T-Zellen des Patienten fs wurden in drei Experimenten auf eine Steigerung intrazellulär gespeicherten Perforins untersucht. Der Nachweis erfolgte durch intrazelluläre Färbung von Perforin (FITC-konjugierter mAk, Fa. Hölzel). Durch den an den mAk gekoppelten FITC-Farbstoff ist Perforin im Durchflußcytometer leicht nachzuweisen.

Es konnte jedoch in keinem der drei Experimente eine Steigerung des intrazellulär nachweisbaren Perforin festgestellt werden.

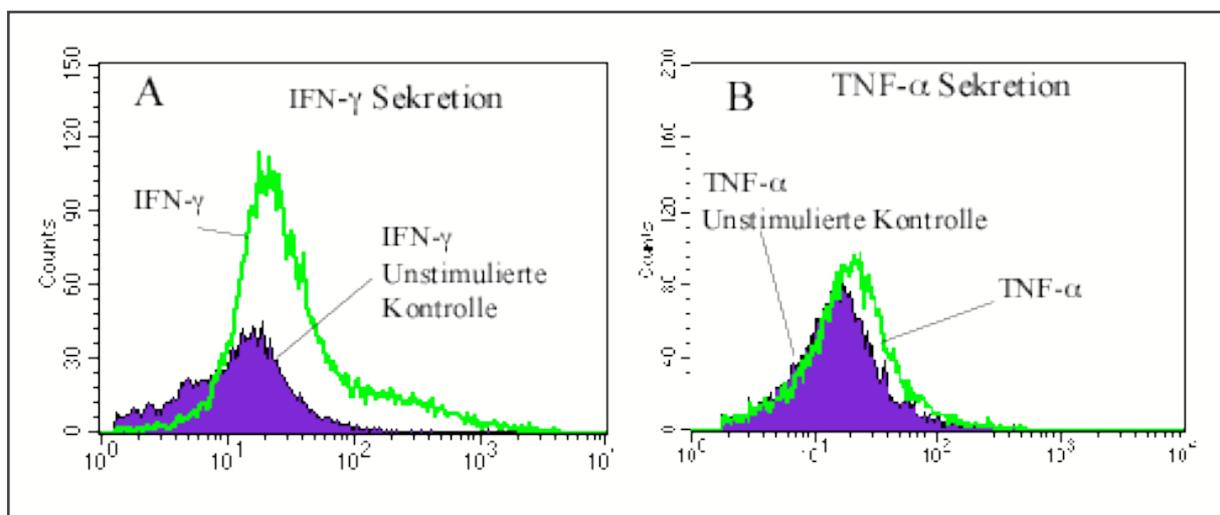
#### **1.2.4.4 Intrazelluläre Färbungen für Zytokine bei fs**

Zytokine freigesetzt. Diese Botenstoffe rufen anti-inflammatorische Reaktionen des direkt umgebenden Gewebes aus und locken andere Zellen des natürlichen und adaptiven Immunsystems an.

Interferon- $\gamma$  wird sowohl von NK-Zellen als auch von T-Zellen sezerniert, während TNF- $\alpha$  meist

nur bei T-Zellen ausgeschüttet wird. Die Zytokine IL-2 und IL-12 werden meist in den Kulturüberständen gemischter Lymphozytenkulturen gefunden, rekrutieren und aktivieren Makrophagen und NK-Zellen. IL-4, IL-5 und IL-10 wird dagegen bei der Aktivierung und Regulation von T-Zellen freigesetzt.

Die  $\alpha\beta$ -T-Zellen des Patienten fs wurden auf alle diese Zytokine untersucht. Der Nachweis erfolgte durch intrazelluläre Färbung der Proteine mit gegen sie gerichteten mAk. Hierzu waren die Zytokine zehn Stunden zuvor durch das Zellgift Monensin in den Vesikeln des Golgi fixiert worden. Die mAk waren mit dem Fluorochrom APC konjugiert und konnten im Durchflußcytometer nachgewiesen werden.



**Abb. 28: Nachweis intrazellulärer Bildung von Zytokinen in  $\alpha\beta$ -T-Zellen von fs**

Diese Überlagerung jeweils zweier Histogramme zeigt die intrazelluläre Produktion zweier Zytokine (TNF- $\alpha$  in B und IFN- $\gamma$  in A) durch die  $\alpha\beta$ -T-Zellen des Patienten fs nach Stimulation durch MHC I-defiziente LCL-Linien.

Die ausgefüllte blaue Kurve zeigt jeweils die Messung der unstimulierten Kontrollfärbung. Die grüne Kurve zeigt die intrazelluläre Färbung für die zwei hier dargestellten Zytokine. Für diese Messung wurden MNC des Patienten fs verwendet, die aus kurz zuvor abgenommenem peripherem Blut des Patienten isoliert wurden. Sie Stimulation der MNC erfolgte durch Inkubation mit MHC I-defizienten LCL.721.221 und PHA über Nacht. Zehn Stunden vor der Messung wurde Monensin (Golgi-Stop<sup>TM</sup>) zugegeben und somit der Transport neu gebildeten Proteins zur Zelloberfläche gestoppt. Die Oberflächenfärbung der Zellen wurde in zwei Ansätzen vorgenommen. Zum einen war das V $\alpha$ 1-TCR FITC, CD4 PE, CD8PerCP und ein APC-konjugierter mAk gegen sieben die zu messenden Zytokine; zum anderen wurde als Kontrolle derselbe Ansatz mit einem pan- $\alpha\beta$ -TCR FITC mAk gefärbt, um Artefakte auszuschließen, die eine Stimulation von  $\alpha\beta$ -T-Zellen ergeben können.

Im FACS-Bild für forward/sideward scatter wurde ein Lymphozyten-gate gesetzt und damit eine Auswertung der Daten für die MNC von fs erleichtert. Die Punktwolke, die positiv für die Färbung für V $\alpha$ 1-TCR war, wurde durch ein weiteres gate markiert und die in ihm detektierten Zellen im obigen Schaubild dargestellt. Auf der x-Achse ist die Intensität des Signals für den FL4-Kanal zu sehen, der einer Färbung mit APC entspricht. Hier stellt dieses

Signal also die Stärke der Anfärbung mit den gegen die Zytokine gerichteten Antikörper dar. Alle in diesem Schaubild dargestellten Meßpunkte repräsentieren Zellen, die sowohl für V $\alpha$ 1-TCR, als auch für CD8 positiv gefärbt wurden, jedoch negativ für CD4 waren.

Die  $\alpha$ -T-Zellen des Patienten fs produzierten nach einer Stimulation durch Phytohämagglutinin (PHA) oder einer Inkubation mit MHC I defizienten Stimulatorzellen lediglich  $\alpha$ -IFN. Die positiven Signale für IL-2 und TNF- $\alpha$  waren nur sehr wenig höher als für die unstimulierte Kontrolle. Für IL-4, IL-5, IL-10 und IL-12 konnte keine positive Färbung beobachtet werden. Ein Versuch, TNF- $\alpha$ -Sekretion durch aktivierte  $\alpha$ -T-Zellen im ELI-Spot Test nachzuweisen, schlug ebenfalls fehl.  $\alpha$ -IFN wurde in ELI-Spot Tests als Marker für eine spezifische Aktivierung in den folgenden Experimenten verwendet.

### **1.3 Generierung eines Laborsystems zur Untersuchung der Mechanismen der „pure red cell aplasia“: Untersuchungen des zytotoxischen Verhaltens von $\alpha$ -T-Zell-Klonen und NK-Linien gegenüber Erythroblasten und Stammzellen**

Unter 1.1 und 1.2 wurde der Beweis geführt, daß klonal expandierte  $\alpha$ -T-Zellen die Ursache für das selektive Fehlen von erythroiden Vorläuferstadien im Knochenmark eines Patienten mit „pure red cell aplasia“ sein können. Im nun folgenden Teil 1.3 soll ein Modellsystem entwickelt werden, mit dem die Ursachen dieser und anderer Autoimmunerkrankungen untersucht werden können.

#### **1.3.1 Klonierung von $\alpha$ -T-Zellen und Einsatz dieser Klone als Effektorzell-Kontrolle in Zytotoxizität-Tests**

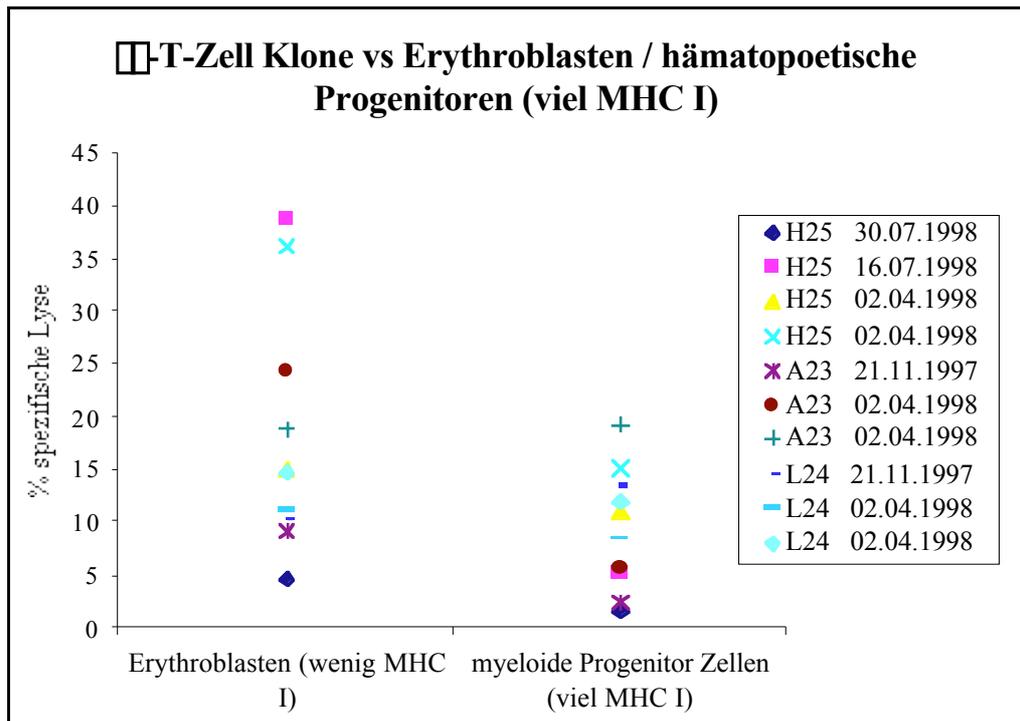
Ziel dieser Experimente ist es zu zeigen, daß die MHC I Expressionsdichte eine entscheidende Rolle bei der Empfindlichkeit gegenüber dem Killing durch  $\alpha$ -T-Zellen spielt. Als Effektorzellen dienten  $\alpha$ -T-Zell-Klone, die nur einen oder wenige NK-Rezeptoren exprimierten. Ihnen gegenübergestellt wurden Erythroblasten und CD34+ Stammzellen aus Knochenmarkpunktaten und *in vitro* Expansionskulturen.

Testdatum	Effektoren		% spezifische Lyse
30.7.1998	□□ T-Zell Klon H25	<i>In vitro</i> Expansionskultur	allogener CD34+ Zellen
	□□ T-Zell Klon H25	Gly-A+ (Tag 14) und CD34+ Zellen HLA-Cw4/4	Gly-A+: 4,7 (89,6) CD34+: 1,7 (45,3) CD13+: 2,4 (15,0) LCL721.221: 5,6 (14,6)
16.7.1998	□□ T-Zell Klon H25	<i>In vitro</i> Expansions-Kultur	allogener CD34+ Zellen
	□□ T-Zell Klon H25	Gly-A+ (Tag 15) und CD34+ Zellen HLA-Cw4/4	Gly-A+: 38,8 (73,8) CD13+: 5,4 (66,2)
2.4.1998	□□ T-Zell Klone H25, A23, L24	<i>In vitro</i> Expansions-Kultur	allogener CD34+ Zellen
	□□ T-Zell Klon H25	Gly-A+ (Tag 15) und CD15+ Zellen Spender PD und KB	Gly-A+: 14,9 – 36,3 CD13+: 11,2 – 15,3
	□□ T-Zell Klon A23	Gly-A+ (Tag 15) und CD15+ Zellen Spender PD und KB	Gly-A+: 24,5 – 18,8 CD13+: 5,7 – 19,2
	□□ T-Zell Klon L24	Gly-A+ (Tag 15) und CD15+ Zellen Spender PD und KB	Gly-A+: 11,2 – 14,7 CD13+: 8,6 – 12,1
21.11.1997	□□ T-Zell Klone H25 und A23	allogenes Knochenmark	
	□□ T-Zell Klon H25	Gly-A <sup>+</sup> und CD34 <sup>+</sup> Zellen HLA-Cw7/7	Gly-A <sup>+</sup> : 9,2 (13,5) CD34 <sup>+</sup> : 2,6 (27,4)
	□□ T-Zell Klon A23	Gly-A <sup>+</sup> und CD34 <sup>+</sup> Zellen HLA-Cw7/7	Gly-A <sup>+</sup> : 10,2 (28,8) CD34 <sup>+</sup> : 13,4 (32,1)

**Tab. 2: Zytotoxisches Verhalten von □□-T-Zell-Klonen gegenüber Erythroblasten aus *in vitro* Expansionskulturen allogener CD34+ Stammzellspender**

Tab. 2 faßt die Ergebnisse der Zytotoxizität-Tests verschiedener □□ T-Zell Klone zusammen. Diese Klone wurden freundlicherweise von Arnaud Moris (Universität Tübingen, Lehrstuhl f. Immunologie) zur Verfügung gestellt. Als Target-Zellen dienten jeweils Glycophorin-A<sup>+</sup> Erythroblasten aus einer Knochenmarkpunktion (21.11.1997) oder aus *in vitro*-Flüssig-Expansionskulturen (2.4.1998, 16.7.1998 und 30.7.1998). Als Vergleich zu den MHC I gering exprimierenden Erythroblasten wurden jeweils MHC I hoch exprimierende CD34<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup> oder CD15<sup>+</sup> Zellen verwendet. In einem der Experimente konnte noch die MHC I defiziente LCL721.221 B-Zell-Linie als Kontrolle verwendet werden. Das Effektor zu Target Verhältnis betrug jeweils 10 zu 1 und wurde in mehreren Schritten titriert. Die Titrationsschritte ergaben jeweils eine klare Verringerung der spezifischen Lyse der . Der KIR-Besatz der □□□T-Zell Klone war: Klone A23 (CD94, p70, CD158a), L24 (CD94, p70, CD158b), H25 (CD94, CD158b). Ausgangsmaterial für die MACS-Aufreinigung und Klonierung dieser □□□T-Zellen war ein Leukozytenkonzentrat eines Blutspenders der Blutbank Tübingen.

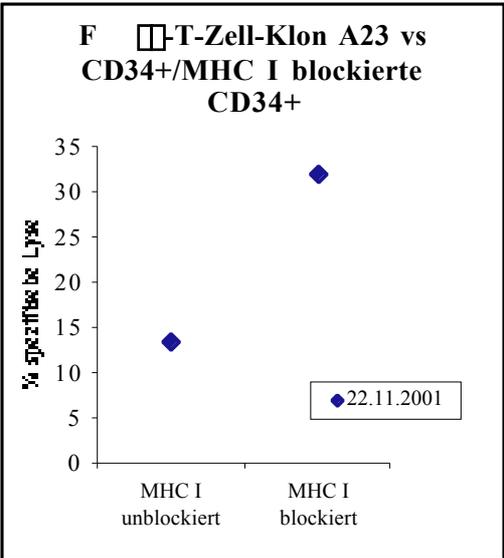
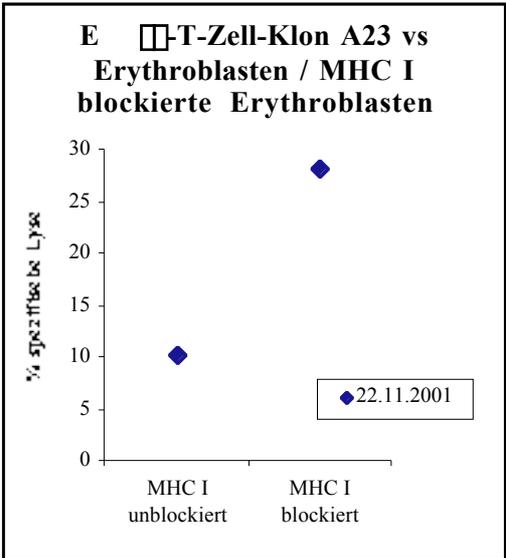
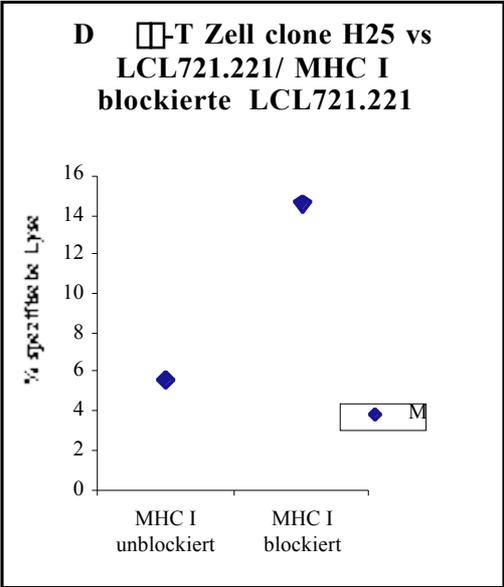
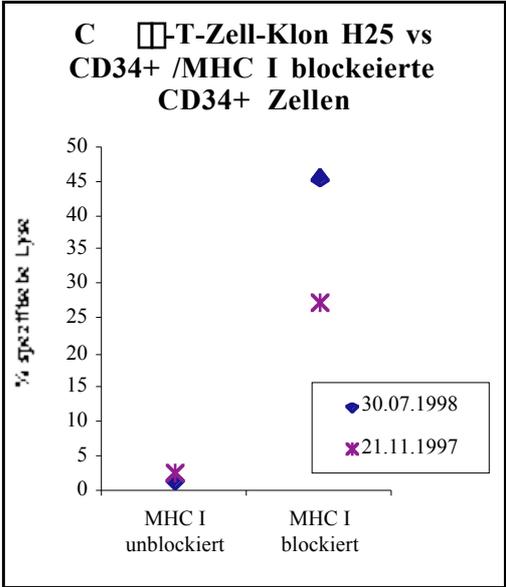
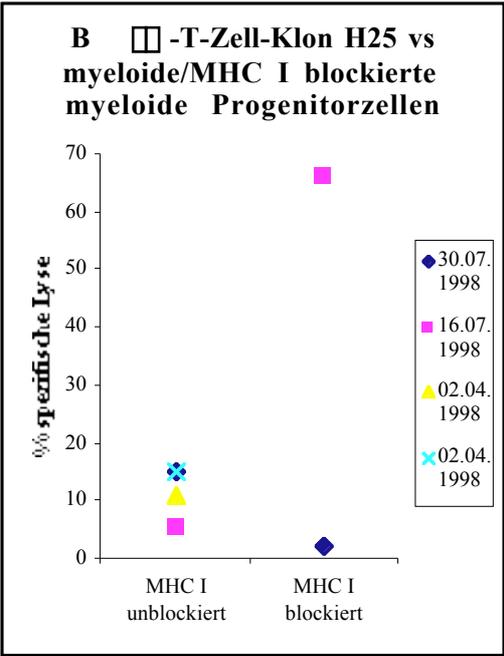
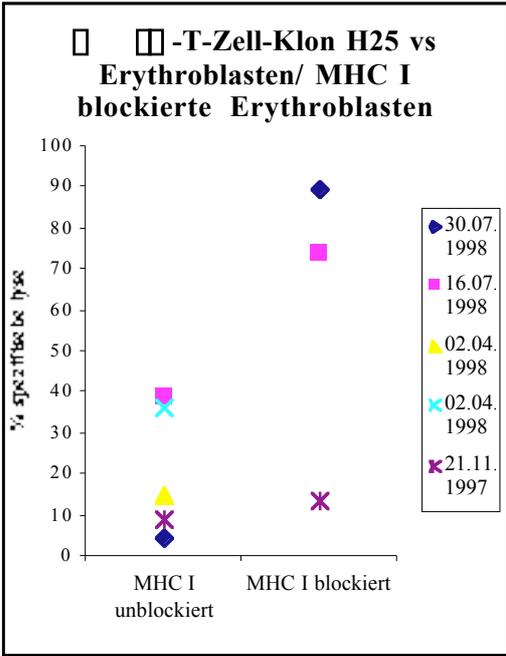
MHC I wurde durch einen mAk (W6/32) blockiert – Mittelwerte in Klammern dargestellt. Der Spender des Knochenmarks für den Versuch vom 21.11.1997 war HLA-Cw7/7, die Spender der Stammzellen für die anderen Versuche waren HLA-A3/26, B35/51, Bw6/4, Cw4 (16.7.1998), HLA-A1/11, B37/62 und HLA-A2/3, B51/18, Bw4/16, Cw4 (30.7.1998). CD34+ Stammzellen wurden in der Freiburger Med. Klinik von Herrn Dr. Reinhard Henschler bereitgestellt. Der HLA-Typ der Spender KB und PD (2.4.1998) wurde so gewählt, daß der HLA-C jeweils nur einer der zwei „Bindungs-Gruppen“ für KIR2DL Rezeptoren angehörten, also eine Bindung des HLA-C an z.B. KIR2DL1 nur durch einen der Spender gewährleistet war.



**Abb. 29: Zytotoxisches Verhalten von □□-T-Zell-Klonen gegenüber Erythroblasten und myeloiden Progenitorzellen**

Zusammenfassung der Ergebnisse von vier Zytotoxizität-Tests. Als Effektorzellen wurden □□-T-Zell-Klone verwendet, die freundlicherweise von Arnaud Moris (Universität Tübingen, Lehrst. f. Immunologie) zur Verfügung gestellt wurden. Als Targetzellen dienten jeweils Glycophorin-A<sup>+</sup> Erythroblasten aus einer Knochenmarkpunktion (21.11.1997) oder aus *in vitro*-Flüssig-Expansionskulturen (2.4.1998, 16.7.1998 und 30.7.1998). Als Vergleich zu den MHC I gering exprimierenden Erythroblasten wurden jeweils MHC I hoch exprimierende CD34<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup> oder CD15<sup>+</sup> Zellen verwendet. Im Experiment vom 30.7.98 konnte noch die MHC I defiziente LCL721.221 B-Zell-Linie als Kontrolle verwendet werden. Das Effektor zu Target Verhältnis betrug in allen Tests 10 zu 1 und wurde in mehreren Schritten titriert. Die Titrationsschritte ergaben jeweils eine klare Verringerung der spezifischen Lyse der . Der KIR-Besatz der □□□T-Zell-Klone war: Klone A23 (CD94:NKG2A, KIR3DL1, KIR2DL1), L24 (CD94:NKG2A, KIR3DL1, KIR2DL2), H25 (CD94:NKG2A, KIR2DL2). Ausgangsmaterial für die MACS-Aufreinigung und Klonierung dieser □□□T-Zellen war ein Leukozytenkonzentrat eines Blutspenders der Blutbank Tübingen.

Auf der linken Seite zu sehen sind die Werte für die spezifische Lyse erythroider Vorläuferzellen, auf der rechten Seite die Werte für myeloide Progenitoren. Die Zielzellen wurden aus Knochenmarkpunktaten und aus *in vitro* Expansionskulturen CD34<sup>+</sup> Zellen gewonnen. Als Kontrolle wurde der vorhandene MHC I durch einen mAk (W6/32) blockiert. Der Spender des Knochenmarks für den Versuch vom 21.11.1997 war HLA-Cw7/7, die Spender der Stammzellen für die anderen Versuche waren HLA-A3/26, B35/51, Bw6/4, Cw4 (16.7.1998), HLA-A1/11, B37/62 und HLA-A2/3, B51/18, Bw4/16, Cw4 (30.7.1998). CD34<sup>+</sup> Stammzellen wurden in der Freiburger Med. Klinik von Herrn Dr. Reinhard Henschler bereitgestellt. Der HLA-Typ der Spender KB und PD (2.4.1998) wurde so gewählt, daß der HLA-C jeweils nur einer der zwei „Bindungs-Gruppen“ für KIR2DL Rezeptoren angehörten, also eine Bindung des HLA-C an z.B. CD158a nur durch einen der Spender gewährleistet war.



### **Abb. 30: Zytotoxisches Verhalten von $\alpha\beta$ -T-Zell-Klonen gegenüber Erythroblasten und myeloischen Progenitorzellen mit blockiertem MHC I**

Diese Abbildungen zeigen die Werte für die spezifische Lyse der erythroiden und myeloiden Zielzellen, deren MHC I durch den mAk W6/32 blockiert wurde. Die Darstellung ist nach Effektor-T-Zell-Klonen aufgegliedert. Die Diagramme A-D zeigen die Ergebnisse aus Experimenten mit Klon H25, jeweils mit einer anderen Zielzell-Gruppe. Links sind Werte für die spezifische Lyse der Zielzellen aufgeführt, rechts die Werte für diese Targets nach Blockade ihres MHC I durch den mAk W6/32. Auf der y-Achse ist der Wert für die spezifische Lyse aufgetragen. Die Abbildungen E und F zeigen das zytotoxische Verhalten des  $\alpha\beta$ -T-Zell-Klons A23 durch Blockade des MHC I der Zielzellen durch W6/32 zu sehen. Alle hier dargestellten Werte sind Mittelwerte aus Triplettsansätzen, deren Standardabweichung hier stets unter 5% des Gesamtwertes blieb und hier nicht angezeigt wurde.

In allen Experimenten ist zu sehen, daß die Erythroblasten deutlich stärker durch die  $\alpha\beta$ -T-Zellen lysiert wurden als die Zellen der MHC I stark exprimierenden Kontrollgruppen. Die Blockade des MHC I durch mAks zeigt eine deutliche Steigerung der spezifischen Lyse der Targetzellen.

### **1.3.2 Zytotoxischen Verhalten von NK-Klonen gegenüber Erythroblasten**

Wie in Abschnitt 1.3.1 soll auch durch die Klonierung von NK-Zellen ein Mittel geschaffen werden, mit dem die Angreifbarkeit von Zellen unterschiedlicher Stadien der erythroiden und myeloiden Differenzierungsreihen durch NK-vermitteltes Killing untersucht werden kann.

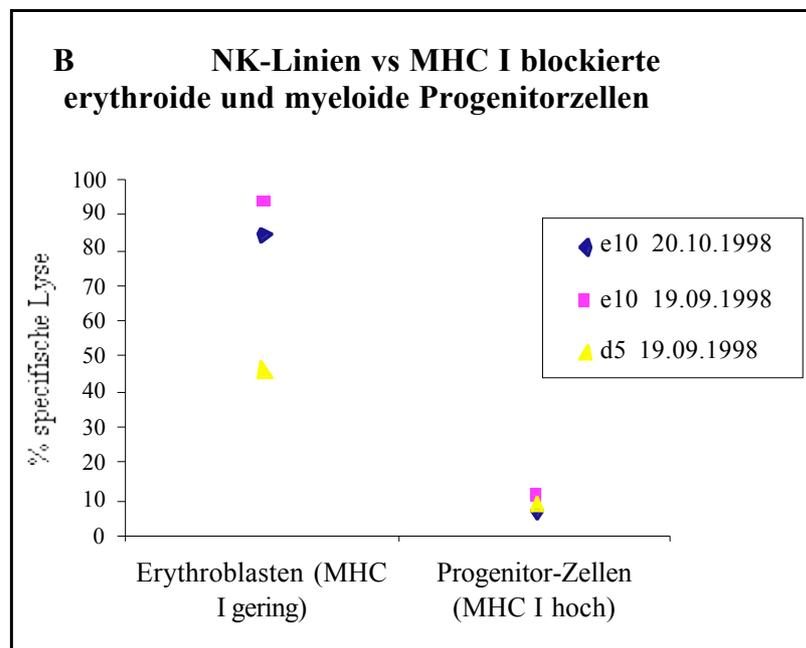
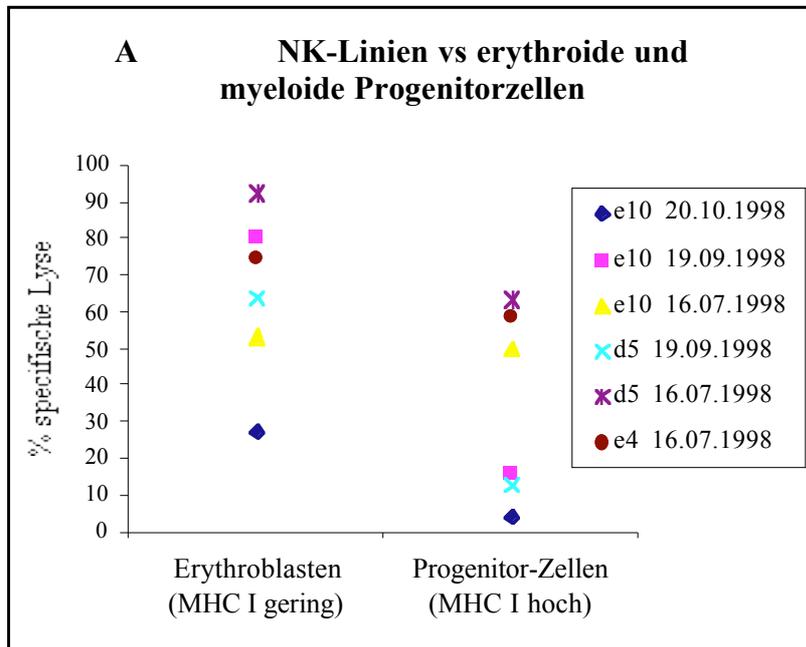
Hierfür wurden NK-Zellen kloniert und als Effektorzellen verwendet. Erythroblasten und myeloide Progenitorzellen aus *in vitro* Differenzierungskulturen von CD34+ Zellen allogener Spender und die CD34+ Stammzellen selbst wurden als Zielzellen verwendet. Die Blockade von MHC I sollte auch hier den Zusammenhang zwischen der Expressionsdichte von MHC I auf den Targetzellen und einer Inhibition der NK-Zellen durch eine Bindung an MHC I zeigen.

Testdatum	Effektoren		% spezifische Lyse
20.10.1998	NK-Zell Linie E10	<i>In vitro</i> Expansions-Kultur	allogener CD34 <sup>+</sup> Zellen und CD34 <sup>+</sup> Zellen
	NK-Zell Linie E10	Gly-A <sup>+</sup> , CD13 <sup>+</sup> (Tag 14) und CD34 <sup>+</sup> Zellen - HLA-Cw1/4	Gly-A <sup>+</sup> : 27,9 (84,5) CD34 <sup>+</sup> : 4,6 (10,9) CD13 <sup>+</sup> : 6,1 (7,2)
19.9.1998	NK-Zell-Linien E10 und D5	<i>In vitro</i> Expansions-Kultur	allogener CD34 <sup>+</sup> Zellen
	NK-Zell Linie E10	Gly-A <sup>+</sup> , CD13 <sup>+</sup> (Tag 14) und CD34 <sup>+</sup> Zellen - HLA-Cw4/5	Gly-A <sup>+</sup> : 80,6 (94,4) CD34 <sup>+</sup> : 16,4 (11,2) CD13 <sup>+</sup> : 29,0 (16,7) LCL721.221: 35,5
	NK-Zell Linie E10	Gly-A <sup>+</sup> , CD13 <sup>+</sup> (Tag 14) und CD34 <sup>+</sup> Zellen - HLA-Cw4/5	Gly-A <sup>+</sup> : 64,1 (46,6) CD34 <sup>+</sup> : 13,4 (8,9) CD13 <sup>+</sup> : 38,8 (24,1) LCL721.221: 25,4
30.7.1998	NK-Zell-Linien E10 und D5	<i>In vitro</i> Expansions-Kultur	allogener CD34 <sup>+</sup> Zellen
	NK-Zell Linie E10	Gly-A <sup>+</sup> , CD13 <sup>+</sup> (Tag 14) und CD34 <sup>+</sup> Zellen - HLA-Cw4/4	Gly-A <sup>+</sup> : 30,1 (42,6) CD34 <sup>+</sup> : 44,7 (76,3) CD13 <sup>+</sup> : 38,1 (37,7) LCL721.221: 52,5 (59,8)
	NK-Zell Linie D5	Gly-A <sup>+</sup> , CD13 <sup>+</sup> (Tag 14) und CD34 <sup>+</sup> Zellen - HLA-Cw4/4	Gly-A <sup>+</sup> : 80,0 (95,8) CD34 <sup>+</sup> : 103,7 (35,8) CD13 <sup>+</sup> : 77,5 (84,2) LCL721.221: 84,7 (91,7)
2.4.1998	NK-Zell-Linien E4, E10 und D5	<i>In vitro</i> Expansions-Kultur	allogener CD34 <sup>+</sup> Zellen
	NK-Zell Linie E10	Gly-A <sup>+</sup> , CD13 <sup>+</sup> (Tag 14) Zellen HLA-Cw4/4	Gly-A <sup>+</sup> : 53,7 CD13 <sup>+</sup> : 50,4
	NK-Zell Linie D5	Gly-A <sup>+</sup> , CD13 <sup>+</sup> (Tag 14) Zellen HLA-Cw4/4	Gly-A <sup>+</sup> : 92,2 CD13 <sup>+</sup> : 63,8
	NK-Zell Linie D5	Gly-A <sup>+</sup> , CD13 <sup>+</sup> (Tag 14) Zellen HLA-Cw4/4	Gly-A <sup>+</sup> : 74,8 CD13 <sup>+</sup> : 59,2

**Tab. 3: Zytotoxisches Verhalten von NK-Zell-Klonen gegenüber Erythroblasten und myeloischen Progenitorzellen**

Die Ergebnisse der Zytotoxizität-Tests dreier NKT-Zelllinien als Effektorzellen; als Targetzellendienten dienten jeweils Glycophorin-A<sup>+</sup> Erythroblasten und CD13<sup>+</sup> myeloide Vorläuferzellen aus *in vitro* Expansionskulturen von CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Stammzellen sowie Stammzellen derselben allogenen Spender. Im Experiment vom 30.7.1998 wurden zusätzlich Stammzellen eines Spenders als Targetzelleneingesetzt, die nicht für die Zell-Expansion in Erythroblasten und myeloide Progenitoren gedient hatten. Die Stammzellen wurden in Flüssigkulturen für zwei Wochen expandiert und schließlich mit MACS auf den erythroiden Marker Glycophorin-A und den myeloiden Marker CD13 aufgereinigt und als Zielzellen verwendet. Die HLA-Typen der Spender waren: am 20.10.1998 HLA-A3/26, B35/62, Cw1/4, am 19.9.1998 HLA-A2/68, B44/53, Bw4, Cw4/5, am 30.7.1998 HLA-A2/3, B51/18, Bw4/6, Cw4 (HLA-A1/11, B37/62 Stammzell-Kontrolle) und am 16.7.1998 HLA-A3/26, B35/51, Bw6/4, Cw4. Der Oberflächen-Antigen-Besatz der NK-Zellen war für die Linie E10: CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD158a/b<sup>-</sup>, NKB1<sup>-</sup> und NKAT1<sup>-</sup>. Für die Linien D5 und E4 war das CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD158a/b<sup>-</sup> und NKAT1<sup>-</sup>. Das Effektor zu Target Verhältnis betrug jeweils 5 zu 1. Ausgangsmaterial die MACS-Aufreinigung und nachfolgende Klonierung dieser □□-Zellen war ein Leukozytenkonzentrat eines Blutspenders der Blutbank

Tübingen. MHC I wurde durch einen mAk (W6/32, bzw. B1.23.2 am 20.10.1998) blockiert – Mittelwerte in Klammern dargestellt.



**Abb. 31: Zytotoxisches Verhalten von NK-Zell-Klonen gegenüber Erythroblasten und myeloischen Progenitorzellen**

Hier wurden die Ergebnisse der Zytotoxizität-Tests dreier NKT-Zelllinien dargestellt. Beide Schaubilder zeigen jeweils auf der linken Seite die Werte für die spezifische Lyse erythroider Progenitorzellen durch Effektorzellen der NK-Linien e10, d5 und e4. Rechts sind die Werte für myeloide Zielzellen dargestellt.

Als Targetzellen dienten jeweils Glycophorin-A<sup>+</sup> Erythroblasten und CD13<sup>+</sup> myeloide Vorläuferzellen aus *in vitro*-Flüssig-Expansionskulturen von CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Stammzellen und Stammzellen der selben allogenen

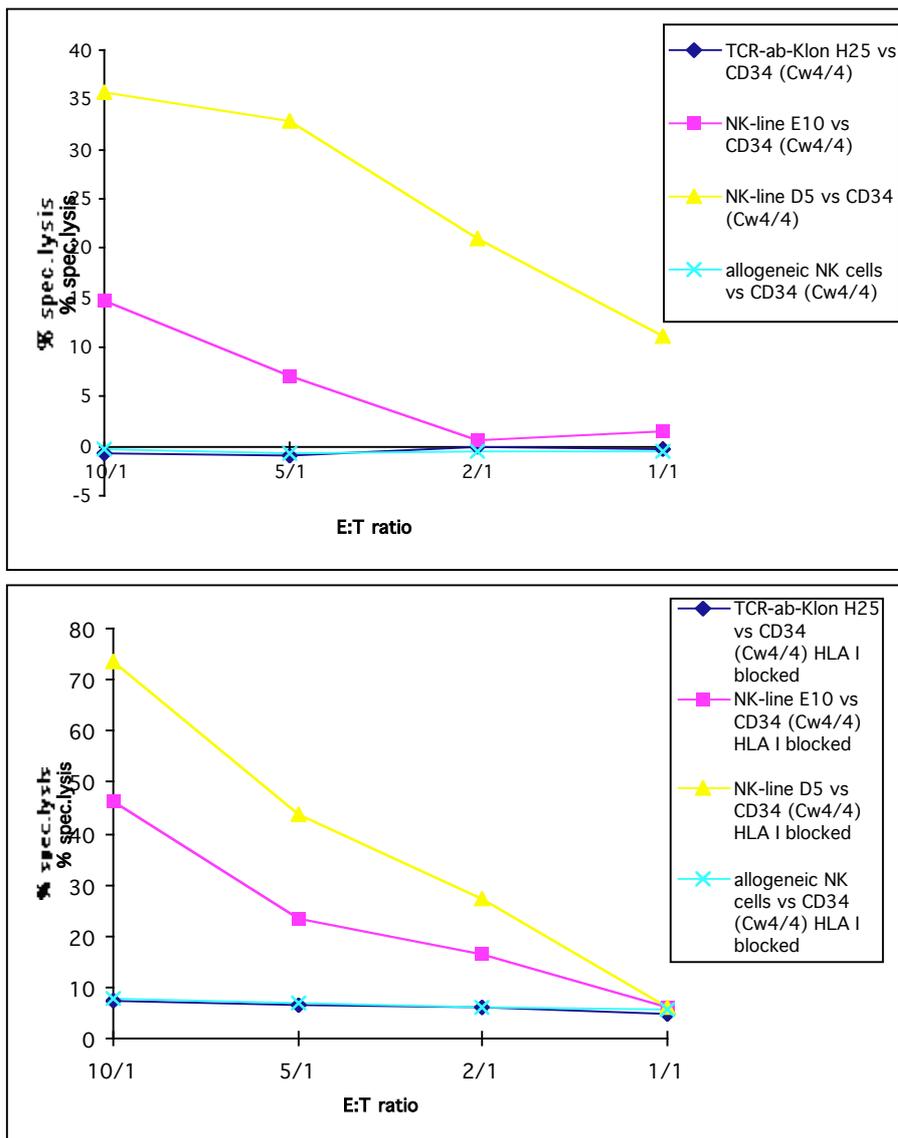
Spender selbst (A). Im Experiment vom 30.7.1998 wurden zusätzlich Stammzellen eines Spenders als Targetzellen eingesetzt, die nicht für die Zell-Expansion in Erythroblasten und myeloide Progenitoren gedient hatten. Als Kontrolle wurde der vorhandene MHC I durch einen mAk (W6/32, bzw. B1.23.2 am 20.10.1998) blockiert (B). Die Stammzellen wurden in Flüssigkulturen für zwei Wochen expandiert und schließlich mit MACS auf den erythroiden Marker Glycophorin-A und den myeloiden Marker CD13 aufgereinigt und als Zielzellen verwendet. Der HLA-Typ der Spender war: am 20.10.1998 HLA-A3/26, B35/62, Cw1/4, am 19.9.1998 HLA-A2/68, B44/53, Bw4, Cw4/5, am 30.7.1998 HLA-A2/3, B51/18, Bw4/6, Cw4 (und HLA-A1/11, B37/62, Cw-/- Stammzell-Kontrolle), und am 16.7.1998 HLA-A3/26, B35/51, Bw6/4, Cw4. Der Oberflächen-Antigen-Besatz der NK-Zellen war für die Linie E10: CD3+, CD8-, CD4-, CD56+, KIR2DL1/2-, KIR3DL1- und KIR3DL2-. Für die Linien D5 und E4 war das CD3+, CD8-, CD4-, CD56+, KIR2DL1/2- und KIR3DL1-. Alle Linien bestanden also aus NKT Zellen und hatten keinerlei KIR oder andere inhibierende Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Das Effektor zu Target Verhältnis betrug jeweils 5 zu 1. Ausgangsmaterial die MACS-Aufreinigung und nachfolgende Klonierung dieser  $\square\square$ -Zellen war ein Leukozytenkonzentrat eines Blutspenders der Blutbank Tübingen.

In allen hier aufgeführten Experimenten ist zu sehen, daß Erythroblasten deutlich stärker von den NK-Linien lysiert werden als die ebenfalls aus Expansionskulturen isolierten myeloiden Vorläuferzellen. Die MHC I hoch exprimierenden CD34<sup>+</sup> Stammzellen werden wie die CD13<sup>+</sup> myeloiden Progenitoren nur schwach angegriffen. Zielzellen, deren MHC I zuvor durch einen Antikörper blockiert wurde, unterlagen einer sehr starken Lyse durch die NK-Zellen. Die Blockade des MHC I der Zielzellen sollten den Zusammenhang zwischen der Expressionsdichte von MHC I auf den Targetzellen und einer Inhibition der NK-Zellen durch eine Bindung an MHC I zeigen.

### **1.3.3 Zytotoxisches Verhalten von $\square\square$ -T-Zell-Klonen und NK-Klonen gegenüber CD34+ Stammzellen**

CD34<sup>+</sup> Stammzellen exprimieren MHC I in hoher Dichte auf ihrer Oberfläche. Sie wurden in keinem der bisher gezeigten Experimente angegriffen und werden deshalb als interne Negativkontrolle in der Tests mitgeführt. Die in 1.3.2. untersuchten NK-Linien exprimieren keinen durchflußzytometrisch meßbaren NK-Rezeptor. Dieser Mangel an inhibierenden Rezeptoren sollte ihnen die Fähigkeit geben, auch Zellen mit hoher MHC I Oberflächenexpression anzugreifen.

Dies sollte im hier dargestellten Experiment untersucht werden. Als Zielzellen wurden CD34<sup>+</sup> Stammzellen allogener Spender verwendet. Als Vergleich zu den NK-Zellen wurde der  $\square\square$ -T-Zell-Klon H25 und NK-Zellen des Stammzellspenders verwendet.



**Abb. 32: Vergleich des zytotoxischen Verhaltens von  $\alpha$ -T-Zell-Klonen und NK-Klonen gegenüber CD34+ Stammzellen**

In Abb. 32 sind die Ergebnisse des Versuchs vom 30.7.98 zusammengefaßt. Im oberen Schaubild werden die Werte für die spezifische Lyse von vier Effektorzell-Populationen gegenüber allogenen CD34+ Stammzellen dargestellt. Im unteren Schaubild sind die Werte eines parallel durchgeführten Versuchs zu sehen, wobei hier der MHC I der allogenen CD34+ Zielzellen zuvor durch einen mAk blockiert wurde.

Die Steigerung der Lyse der Stammzellen nach MHC I Blockierung durch die NK-Linien e10 und d5 ist recht gut in den Abb. 31 und 32 zu sehen. Diejenigen Effektor-Zelllinien, auf denen durchflußzytometrisch kein KIR nachgewiesen werden konnte, griffen spontan allogene Stammzellen an. Ein solch ungewöhnliches Verhalten konnte mit anderen Effektor-Linien, wie

□□-T-Zellen oder NK-Klonen mit KIR Besatz nicht oder nur in sehr viel geringerem Umfang beobachtet werden.

#### 1.4 Ein weiterer Fall von „pure red cell aplasia“

Bei einem weiteren Fall von absoluter Erythroblastopenie konnte die Ursache der Fehlens von erythroiden Progenitorzellen ebenfalls auf das Verhalten der □□-T-Zellen des Patienten zurückgeführt werden.

Die Diagnose einer „pure red cell aplasia“ wurde anhand der unter 1.1.1 bis 6 aufgeführten Kriterien gestellt werden. Ein CD34+ Stammzell-Kolonie-Bildungs Test verlief normal. Die Stammzellen des Patienten bildeten alle Kolonie-Formen in normaler Anzahl und Qualität in einer *in vitro* Differenzierungskultur aus. Ein Stammzell-Defekt konnte somit ausgeschlossen werden. Anders als bei Patient fs konnten bei mr gegen „selbst“-Erythrozyten-Antigene gerichtete Autoantikörper gefunden werden. Diese Antikörper richteten sich nicht gegen Erythroblasten und waren nicht Ursache des selektiven Fehlens der erythrozytären Progenitorzellen im Knochenmark des Patienten. Bei dem Patienten mr wurde eine Expansion von LGL beobachtet, die eine seltene Rekombination ihres □□-TCR besaßen. Der Anteil dieser LGL am Gesamtvolumen der T-Zellen betrug etwa 40%. Die klonal expandierten □□-T-Zellen exprimierten außer CD94:NKG2A noch KIR2DL2 und KIR3DL1 als inhibierende NK-Rezeptor. Die ungewöhnliche V $\beta$ -V $\alpha$ 1-Rekombination des TCR wurde mit einer RT-PCR der Variablen Regionen der V $\beta$  und V $\alpha$ -Bereiche der mRNA festgestellt (Pongers-Willemsse, 1999; Knechtli, 1998). Die Klonalität der Expansion dieser Zellen konnte mit einer SSCP-Analyse der Mikrosatelliten-DNA der V $\beta$ -Region des TCR nachgewiesen werden. Die Monoklonalität konnte hieraus folgend durch die Sequenzierung des codierenden Bereichs der V $\beta$  und V $\alpha$ -Region des TCR gezeigt werden.

Bei mr war es mehrmals möglich, □□-T-Zellen aus peripherem Blut zu isolieren und in Kultur zu nehmen. Diese Kultur wurde zuvor nicht wie bei einer Zell-Klonierung unter „limiting dilution“ Bedingungen angelegt, die Kulturbedingungen wurden aber im weiteren wie die einer T-Zell Klonierung gehandhabt. Die Isolation der LGL erfolgte über eine FACS-Sortierung der auf CD158b vorangereicherter Zellen.

Die Besonderheit des Auftretens einer „prca“ bei Patient mr liegt in der Pathogenese. Der Patient mr wurde nach Diagnose einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) mit Stammzellen eines Fremdspenders transplantiert. Nach einer myeloablativen Hochdosistherapie, mit der durch Zytostatika und Ganzkörperbestrahlung das alte blutbildende System zerstört wurde, konnte der Patient mr mit CD34+ Stammzellen aus einem Knochenmarkpunktat des Spenders transplantiert werden. Es war kein Rückfall der Leukämie zu beobachten, jedoch dauerte es außergewöhnlich lange, bis die Stammzellspende anwuchs und das neue Knochenmark gebildet wurde. Als weitere Komplikation hatte der Patient über Monate mit einer CMV-Infektion zu kämpfen. Etwa ein halbes Jahr nach Abheilen der CMV-Infektion und nach Regeneration seines Immunsystems entwickelte er eine hämolytische Erythropenie. Ab diesem Zeitpunkt war auch eine LGL-Expansion zu beobachten. Der HLA-Typ des Patienten mr ist HLA A24/36, B35/7, Cw4/7. Der HLA-Typ des ebenfalls männlichen Spenders ist HLA A24/36, B35/7, Cw4. Es bestand kein klassischer „mismatch“ im HLA-Typ; nur eine Differenz im üblicherweise nicht mit in die Erwägungen einbezogenen HLA-Cw-Typs. Die im Patienten klonal expandierten  $\gamma\delta$ -T-Zellen trugen nur KIR1DL2 (CD158b, p58.2) und KIR3DL1 (CD, p70). Sollten die LGL von mr also auf MHC I gering exprimierende autologe Zellen treffen konnte es gemäß der bekannten Bindungsspezifitäten für NK-Rezeptoren auf den Effektorzellen nicht zu einer Inhibition kommen und die autologen Zielzellen werden getötet. Dies konnte für fs gezeigt werden und wurde als Arbeitshypothese auch für die Klärung der Ursache der „prca“ bei mr aufgestellt.

### 1.4.1 Reaktivität von MNC und LGL-Linien des Patienten mr gegenüber Erythroblasten

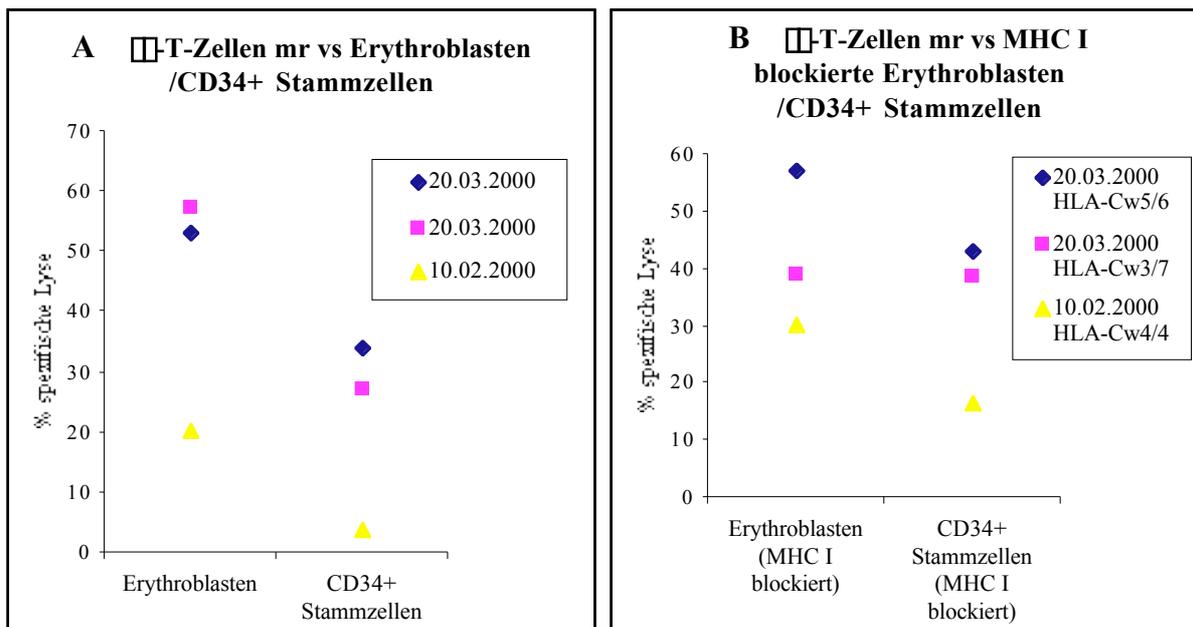
Testdatum	Effektoren		
20.03.2000		<i>In vitro</i> Exp.Kultur	allogener CD34 <sup>+</sup> Zellen
	MNC mr	Gly-A <sup>+</sup> (Tag 4) und CD34 <sup>+</sup> Zellen HLA-Cw5/6	Gly-A <sup>+</sup> : 53,0 (57) CD34 <sup>+</sup> : 34 (43)
	MNC mr	Gly-A <sup>+</sup> (Tag 4) und CD34 <sup>+</sup> Zellen HLA-Cw3/7	Gly-A <sup>+</sup> : 57,4 (39,2) CD34 <sup>+</sup> : 27 (38,6)
	kontr. MNC vp als Effektoren		Gly-A <sup>+</sup> : 3,3 (Cw5/6) 21,4 (Cw3/7) CD34 <sup>+</sup> : 1 (Cw5/6) 3,4 (Cw3/7)
10.02.2000		Allogenes Knochenmark	
	□□ T-Zellen mr	Gly-A <sup>+</sup> und CD34 <sup>+</sup> Zellen HLA-Cw4	Gly-A <sup>+</sup> : 20,3 (30,2) CD34 <sup>+</sup> : 4,0 (16,5)
	□□ T-Zellen mr	LCL721.221 HLA-Cw6 bzw. Cw7	LCL HLA-Cw6: 10,1 (37,6) LCL HLA-Cw7: 10,1 (23,7)

**Tab. 4: Reaktivität von MNC und □□ T-Zelllinien des Patienten mr gegenüber Erythroblasten allogener Spender im Zytotoxizität-Test**

Die Ergebnisse zweier Zytotoxizitäts-Experimente, die mit MNC (10.2.2000) und *in vitro* kultivierten und expandierten □□ T-Zellen (20.3.2000) des Patienten mr durchgeführt wurden, zeigen für Erythroblasten deutlich höhere Stimulationswerte als für die CD34<sup>+</sup> Stammzellen. Beide Werte konnten durch MHC I-Blockade gesteigert werden.

Die Zahlen demonstrieren den Mittelwert der spezifischen Lyse der Targetzellen durch die Effektoren. Im unteren Experiment wurden aus Knochenmarkspunktat eines freiwilligen Spenders (HLA-Cw4/4) CD34<sup>+</sup> Stammzellen und Glycophorin-A<sup>+</sup> Erythroblasten isoliert und als Target für die MNC von mr verwendet. Als Kontrollen wurden LCL-Linien verwendet, die mit einem HLA-C Allel transfiziert wurden und nur einen Subtyp exprimieren. Die Subtypen wurden so gewählt, daß sie jeweils nur einem der Liganden der HLA-C Gruppen entsprechen die von einer der beiden Gruppen von KIR2DL-Rezeptoren erkannt und gebunden wurden. MHC I wurde durch einen mAk (W6/32) blockiert – Mittelwerte in Klammern dargestellt. Der Spender des Knochenmarks für Patient mr ist HLA A24/36, B35/7, Cw4, der Patient mr selbst ist HLA A24/36, B35/7, Cw4/7. Die im Patienten klonal expandierten □□ T-Zellen tragen nur KIR1DL2 (CD158b) und KIR3DL1 (p70). Das Effektor zu Target Verhältnis betrug jeweils 40 zu 1 und wurde in mehreren Schritten titriert. Die Titrationsschritte ergaben jeweils eine klare Verringerung der spezifischen Lyse der Targetzellen.

Im zweiten Experiment wurden Stammzellen zweier freiwilliger Spender aus Cryokonserven aufgetaut und für vier Tage *in vitro* expandiert. Aus diesen Kulturen wurden Glycophorin-A<sup>+</sup> Erythroblasten isoliert und als Targets eingesetzt. Als Kontrolle wurde ein weiteres Aliquot der cryokonservierten Stammzellen aufgetaut und ebenfalls als Target verwendet. Die freiwilligen Spender der Stammzellen waren Gruppe O, Rhes. +, HLA-A3/24, B18/57, Cw5/6 und Gruppe A, Rhes. neg., HLA-A1/2, B8/62, Cw3/7. Als Kontrolle wurde wiederum der MHC I mit mAk blockiert und als weitere Kontrolle MNC der Spenderin vp eingesetzt. Das Effektor zu Target Verhältnis betrug hier 5 zu 1. Die Titrationsschritte ergaben ebenfalls eine klare Verringerung der spezifischen Lyse der Targetzellen.



**Abb. 33: Reaktivität von MNC und LGL-Linien des Patienten mr gegenüber Erythroblasten im Zytotoxizität-Test**

Darstellung der Ergebnisse zweier Zytotoxizitäts-Experimente, die mit MNC (10.2.2000) und in vitro kultivierten und expandierten □-T-Zellen (20.3.2000) des Patienten mr durchgeführt wurden.

Der Spender des Knochenmarks für Patient mr ist HLA A24/36, B35/7, Cw4, der Patient mr selbst ist HLA A24/36, B35/7, Cw4/7. Die im Patienten klonal expandierten □-T-Zellen tragen nur KIR1DL2 (CD158b) und KIR3DL1 (p70).

**A** Im Experiment vom 10.2.2000 wurde aus Knochenmarkpunktat eines freiwilligen Spenders (HLA-Cw4/4) CD34+ Stammzellen und Glycophorin-A+ Erythroblasten isoliert und als Target für die MNC von mr verwendet. Als Kontrollen wurden LCL-Linien verwendet, die mit einem HLA-C Allel transfiziert wurden und nur einen Subtyp exprimieren. Die Subtypen wurden so gewählt, daß sie jeweils nur einem der Liganden der HLA-C Gruppen entsprechen die von einem der beiden KIR2DL-Rezeptoren erkannt und gebunden wurden. Das Effektor zu Target Verhältnis betrug jeweils 40 zu 1 und wurde in mehreren Schritten titriert. Die Titrationsschritte ergaben jeweils eine klare Verringerung der spezifischen Lyse der Targetzellen. Im Experiment vom 20.3.2000 wurden Stammzellen zweier freiwilliger Spender aus Cryokonserven aufgetaut und für vier Tage in vitro expandiert. Aus diesen Kulturen wurden Glycophorin-A+ Erythroblasten isoliert und als Targets eingesetzt. Als Kontrolle wurde ein weiteres Aliquot der cryokonservierten Stammzellen aufgetaut und ebenfalls als Target verwendet. Die freiwilligen Spender der Stammzellen waren Gruppe O, Rhes. +, HLA-A3/24, B18/57, Cw5/6 und Gruppe A, Rhes. neg., HLA-A1/2, B8/62, Cw3/7. Das Effektor zu Target Verhältnis betrug hier 5 zu 1. Die Titrationsschritte ergaben ebenfalls eine klare Verringerung der spezifischen Lyse der Targetzellen. Die Zahlen repräsentieren den Mittelwert der spezifischen Lyse der Targetzellendurch die Effektoren aus Triplet-Versuchen.

**B** Als Kontrolle wurde der vorhandene MHC I durch einen mAk (W6/32) blockiert und somit eine Inhibition der Effektorantwort durch Bindung eines KIR an MHC I verhindern.

Erythroblasten wurden in hohem Maße attackiert, Stammzellen hingegen weniger. Bei beiden Zellpopulationen war eine Steigerung der Zell-Lyse durch mr durch MHC I Blockade zu sehen. Eine Präferenz der expandierten  $\alpha\beta$ -T-Zellen des Patienten mr für Targetzellen eines bestimmten HLA-Typs konnte aus keinem der beiden Experimente abgeleitet werden.

#### 1.4.2 Selektive Reaktivität der klonal expandierten LGL des Patienten mr gegen HLA-C transfizierte LCL-Linien

Die unter 1.4.1 dargestellten Ergebnisse zeigen keine Selektivität der MNC des Patienten mr oder expandierter  $\alpha\beta$ -T-Zellen für Zielzellen, die einer der beiden HLA-C Gruppen angehören und an die jeweils einer der KIR2DL-Rezeptoren binden kann. In einem weiteren Versuch sollte dies nochmals untersucht werden. Als Effektorzellen dienten wiederum expandierter  $\alpha\beta$ -T-Zellen des Patienten mr. Als Zielzellen wurden MHC I-defiziente LCL-Linien eingesetzt, die jeweils nur mit einem HLA-C Allel transfiziert wurden. Die Allele wurden so gewählt, daß sie jeweils nur einem der Liganden der HLA-C Gruppen entsprechen die von einem der beiden KIR2DL-Rezeptoren erkannt und gebunden wurden.

Testdatum	Effektoren	Stimulator-Zellen
14.4.2000		LCL Zelllinien
	$\alpha\beta$ -T-Zellen mr	MHC I defiziente Zelllinien LCL721.221: 47 LCL721.221 und K562                      K562: 8
	$\alpha\beta$ -T-Zellen mr	HLA-C Transfektante LCL- LCL HLA-Cw6: 17 (12 / 12 / 15) Linien für HLA-Cw6 bzw. 7      LCL HLA-Cw7: 8 (17 / 7 / 13)
		MHC I unblockiert (MHC I-blockiert / KIR-blockiert / MHC I- und KIR-blockiert)

**Tab. 5: Selektive Reaktivität der  $\alpha\beta$ -T-Zellen des Patienten mr**

Im diesem Experiment wurden zwei MHC I-defiziente Zelllinien als Stimulator-Zellen für die  $\alpha\beta$ -T-Zellen von mr verwendet. Zum einen war das die erythroide Tumorzelllinie K562, ein klassisches NK Target; zum anderen die B-Zelllinie LCL 721.221, wiederum ein klassisches Target für  $\alpha\beta$ -T-Zellen. Als Stimulatoren für den Test einer selektiven Stimulierbarkeit durch HLA-Subtypen wurden LCL-Linien verwendet, die mit einem HLA-C Allel transfiziert wurden und nur einen MHC I-Subtyp exprimieren. Die Subtypen wurden so gewählt, daß sie jeweils nur einem der Liganden der HLA-C Gruppen entsprechen die von einer der beiden Gruppen von KIR2DL-Rezeptoren

erkannt und gebunden werden. Als weitere Kontrolle sollte der vorhandene MHC I durch einen mAk (W6/32) blockiert werden und somit eine Inhibition der Effektorantwort durch Bindung eines KIR an MHC I verhindert werden – Mittelwerte hier in Klammern dargestellt. Die im Patienten oligoklonal expandierten  $\gamma\delta$ -T-Zellen tragen nur KIR1DL2 (CD158b) und KIR3DL1 (p70) und können somit nur an HLA-Cw7 und HLA-Bw4 binden. Die Zahlen zeigen den Mittelwert der Anzahl der stimulierten Effektorzellen aus Triplett-Messungen.

Das Ergebnis eines ELI-Spot-Experiment zeigt für die MHC I defiziente LCL-Linie eine deutlich stärkere Stimulation der *in vitro* kultivierten und expandierten  $\gamma\delta$ -T-Zellen des Patienten mr als für die NK-Zell Target K562.

Ein Unterschied in der Stimulierbarkeit der Effektorzellen ist auch bei den HLA-Transfektanten zu sehen. Die LCL-Linie, die HLA-Cw6 exprimiert stimuliert die Effektoren etwa doppelt so stark wie LCL.Cw7, die wie K562 nur sehr geringe Werte für Stimulation und Interferon-Sekretion zeigt. Eine Blockade des MHC I zeigt eine deutliche Erhöhung der Stimulation nur bei HLA-Cw7. Eine Blockade des KIR2DL-Rezeptors auf den  $\gamma\delta$ -T-Zellen des Patienten mr durch mAks zeigt keine weitere Verringerung der Aktivität der Stimulierbarkeit der Effektorzellen, vermag jedoch die Steigerung durch MHC I Blockade zumindest teilweise aufzuheben. Bei der HLA-Cw6 exprimierenden Linie zeigte die mAk Behandlung keine Effekte.

## **B 2 Zweites Teilprojekt: Existenz humaner, autoaggressiver NK-Zellen und die Bedeutung von inhibierenden Rezeptoren der KIR2D\*-Familie bei einer gegen autologe CD34-positive Stammzellen gerichteten Reaktivität**

In Rahmen des zweiten Teilprojekts soll gezeigt werden, daß NK-Zellen im gesunden Individuum existieren, die aufgrund ihres KIR-Besatzes potentiell autoaggressiv sein können. Dies ist dann möglich, wenn die Effektorzellen keinen „selbst“-MHC I bindenden KIR exprimieren. Die Autoren beider derzeit geltender Modelle für die Entwicklung des KIR-Repertoires auf NK-Zellen erwähnen die Möglichkeit deren Bildung, postulieren aber zugleich Regulationsmechanismen, um das autoreaktive Potential dieser Zellen (Sentman, 1995; Held, 1995) für den Körper nicht schädlich werden zu lassen. Valiante (1997) und Frohn (1997) beschrieben eine solche Zellpopulation bereits, wobei sie den Rezeptor CD94 und dessen akzessorische Moleküle NKG2-A und DAP10/12 außer Acht ließen (Valiante, 1997; Frohn, 1997). Diese seltene NK-Population soll daher aus dem Peripherblut gesunder Spender isoliert und für die hier beschriebenen Experimente als Effektorzellen eingesetzt werden.

Ein weiteres Ziel dieses Teilprojekts ist zu zeigen, daß körpereigene Zellen zum Ziel dieser Killer Zellen werden können. Als Zielzellen wurden hämatopoetische Stammzellen gewählt, da sie sehr viel MHC I auf ihrer Oberfläche exprimieren und selbst geringfügige Schädigungen dieser Zellen durch die Verringerung bzw. einen Ausfall ihrer Proliferationsfähigkeit nachweisbar sind. Im autologen System konnte diese Angreifbarkeit von Stammzellen durch NK-vermitteltes Killing bisher noch nicht beschrieben werden (Bellone, 1993; Meyer, 1997). Als Nachweis-Syteme für diese Autoreaktivität wurden daher zwei sehr empfindliche Testverfahren verwendet. Zum einen der Kolonie-Bildungs-Test, durch den die Vitalität der Stammzellen nach Kontakt mit den Killerzellen gezeigt werden kann. Zum anderen der ELI-Spot Test, durch den selbst die Stimulation einzelner NK-Zellen nachgewiesen wird. Dieses *in vitro* Modell dient dazu, den Beweis für die Existenz solch auto-aggressiver NK-Populationen zu führen.

Lange Zeit schien die „pure red cell aplasia“ die einzige klinisch relevante Erkrankung zu sein, deren Ursache in einer Proliferation von NK-Zellen gesehen wurde. Seit Ende der 90er Jahre werden jedoch Erkrankungen ursächlich mit einer Expansion auto-aggressiver NK-Zellen in Verbindung gebracht (Johansson, 1997; Jaffe, 1999).

Gegenstand der Untersuchungen waren Lymphozytenkonzentrate (Buffy-Coats) anonymer, freiwilliger, gesunder Spender. Diese Lymphozytenkonzentrate wurden von der Blutbank

Tübingen bezogen. Für das Arbeiten mit Zellen aus dem Blut freiwilliger Spender wurde ein Votum der Ethik-Kommission der Universität Tübingen eingeholt. Alle hier beschriebenen Arbeiten wurden als ethisch unbedenklich und konform mit den Statuten der Ethik-Kommission bewertet.

## **2.1 Nachweis der Existenz einer autoreaktiven NK-Population**

### **2.1.1 Nachweis einer NK-Zell-Population mit nicht-„selbst“-bindenden NK-Rezeptoren der KIR2DL-Familie**

Die von Valiante (1997) und von Frohn (1997) beschriebenen NK-Zell-Populationen zeigen einen sehr heterogenen Besatz mit verschiedenen NK-Rezeptoren. Unter den beschriebenen Rezeptoren wurden auch solche nachgewiesen, die in dem autolog exprimierten MHC I keinen Liganden finden konnten. Diese Rezeptoren waren nicht imstande beim Kontakt einer NK-Zelle mit einer körpereigenen Zelle ein inhibierendes Signal zu generieren. Die Kombination der unterschiedlicher Rezeptoren einer Killerzelle gewährleistete jedoch immer, daß zumindest ein Rezeptor einen Bindungspartner finden konnte und somit eine Inhibition der NK-vermittelten Lyse der Zielzelle verhindert wurde.

Das Ziel des ersten Arbeitsschritts ist Zellpopulation nachzuweisen und anzureichern, die außer dem ubiquitär exprimierten CD94:NKG2 keine inhibierenden Rezeptoren haben, die bei einer Bindung an den körpereigenen MHC I ein inhibierendes Signal generieren. Folglich wurden aus dem Blut gesunder freiwilliger Spender mit ausgewähltem HLA-Typ solche NK-Zellen isoliert, die einen der KIR2DL (CD158) exprimierten; meist exprimierten sie sogar nur diesen einen und keinen anderen der KIR dieser Rezeptor-Familie. Der NK-Rezeptor, der als Merkmal für die Aufreinigung der NK-Population dient wurde so gewählt, daß dessen Bindungsspezifität für HLA-C Moleküle den eigenen, autolog exprimierten HLA-Typ nicht beinhaltet.

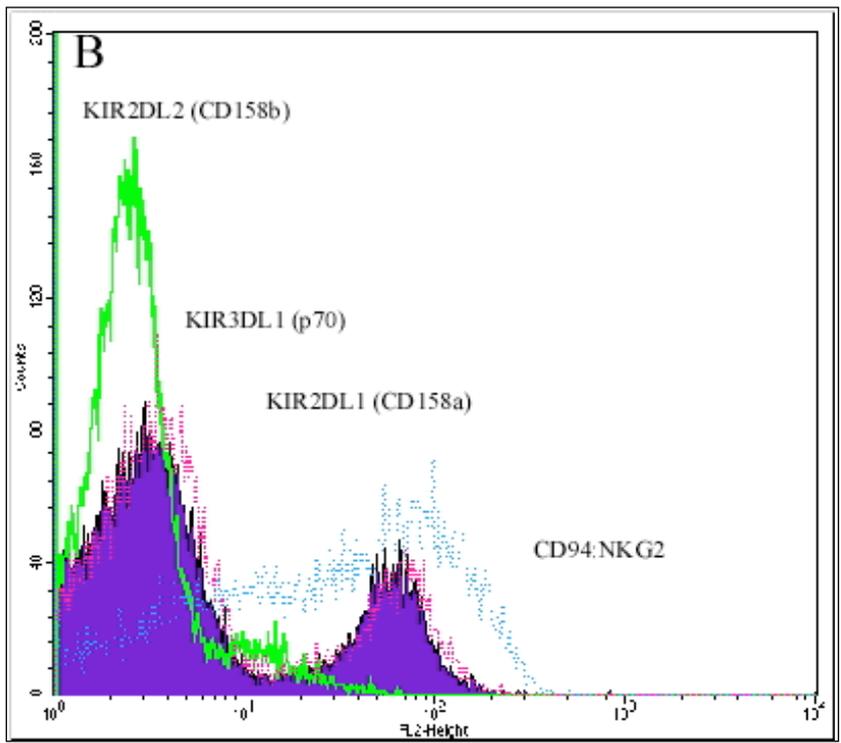
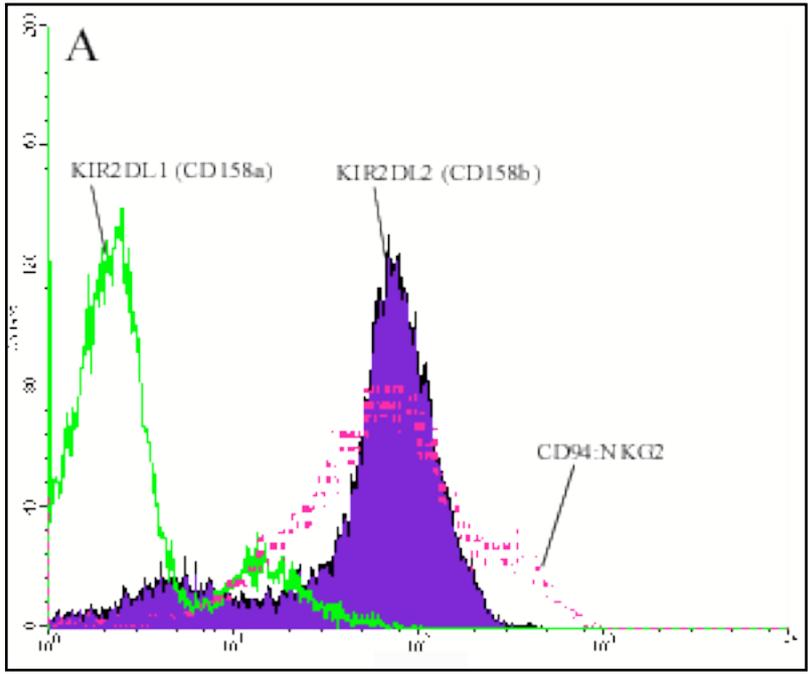
Aus dem Lymphozytenkonzentrat einer Blutspende werden hierfür verschiedene Zell-Populationen mittels magnetischer Zell-Sortierung (MACS) in mehreren Schritten angereichert. In einem ersten Schritt wurden CD34+ Stammzellen gewonnen. Die Reinheit dieser Aufreinigung lag zwischen 69% und 96%, im Mittel bei  $82,1\% \pm 10,0\%$ . Nachfolgend wurde aus den Stammzell-depletierten PBL die CD56+ Zellen aufgereinigt. Nach Entfernen der paramagnetischen Micropartikel von dem gebundenen anti-CD56 Antikörper wurden die NK-

Zellen erst mit KIR2DL1 beziehungsweise KIR2DL2 erkennenden Maus-anti-Mensch mAk inkubiert, die in einem zweiten Schritt mit Microbead-konjugierten Ratte-anti-Maus mAk aufgereinigt wurden. Die Reinheit dieser NK-Zell-Subpopulation schwankte zwischen 53% und 98% mit einem Mittel von  $75,7\% \pm 13,6\%$ . Nach den beschriebenen Aufreinigungs-Schritten resultierte aus einer Gesamtmenge von 7 bis  $9 \times 10^8$  PBMC schließlich eine Population von  $0,2-1 \times 10^6$  KIR-positiver NK-Zellen. Die  $1-8 \times 10^6$  KIR-negativen NK-Zellen wurden als Kontrolle für die Spezifität des Killings stets mitgeführt.

### **2.1.1.1 Reinheit der angereicherten NK-Zell-Subpopulation und Verteilung der Expression der unterschiedlichen NK Rezeptoren**

#### **2.1.1.1.1 Reinheit der Anreicherung von PBL auf einen KIR2DL Rezeptor**

Dank der aufwendigen Anreicherung der KIR2DL+ NK-Zell-Population wurden Reinheiten von 53% bis 97% erreicht (Mittelwert bei  $75,7\% \pm 13,6\%$ ). Abb.34 zeigt anhand von mehreren überlagerten Histogrammen ein typisches Beispiel für die Reinheit und Verteilung der KIR-Expression der KIR2DL+ und KIR2DL- Fraktion der angereicherten NK-Zellen. Die durchflußzytometrische Messung der Expressionsdichte verschiedener NK-Zell relevanter Marker auf den Zellen ist logarithmisch auf der x-Achse aufgetragen, die aufsummierte Anzahl der auf diese Weise gemessenen Zellen sind linear auf der y-Achse zu sehen ist.



**Abb. 34: Messung verschiedener NK-Rezeptoren und auf angereicherter NK-Population**

Durchflußzytometrische Messung verschiedener NK-Rezeptoren und Histogram-Plot Overlay für die positiv angereicherte NK-Population und die NK-Kontrollpopulation.

**A** KIR-Besatz der positiv angereicherten CD158b+ NK-Zell-Population. In der Reihenfolge von links nach rechts KIR2DL1 als helle Linie, CD94:NKG2 als helle Linie und KIR2DL2 als ausgefüllte dunkle Linie.

**B** KIR-Besatz der KIR2DL2- NK-Kontrollpopulation. In der Reihenfolge von links nach rechts KIR2DL2 als dunkle Linie, p70/KIR3DL1 als dunkle Linie darunter, KIR2DL1 als ausgefüllte Linie und CD94:NKG2 als helle Linie daneben.

Die Zellen der Anreicherung wurden mit einem mAk gegen KIRs (FITC- oder PE-konjugiert und im FL1- oder FL2-Kanal gemessen) gefärbt. Im FACS-Bild für forward/sideward scatter wurde ein Lymphozyten-gate gesetzt und damit eine Auswertung der Daten für die NK-Zellen ermöglicht. Die Punktwolke, die positiv für die Färbung für einen KIR war wurde durch ein weiteres gate markiert und die in ihm detektierten Zellen im obigen Schaubild dargestellt. Auf der x-Achse ist die Intensität des Signals für den FL1-Kanal zu sehen, der einer positiven Färbung entspricht. Hier stellt dieses Signal also die Stärke der Anfärbung mit dem gegen MHC I gerichteten Antikörper dar. Auf der y-Achse ist die Anzahl der Zellen, die mit einer bestimmten Signalstärke detektiert wurden linear aufsummiert.

Diese Überlagerung mehrerer Histogram-Plots zeigt einen Vergleich der Expressionsdichte von einer Reihe von NK-Rezeptoren, hier exemplarisch dargestellt für den Versuch mit dem Blut des Spenders I-2. Die Zellen dieser Anreicherung auf KIR2DL2+/CD56+ Zellen zeigen als inhibierende Rezeptoren lediglich CD94:NKG2A und KIR2DL2. Andere Rezeptoren konnten in nur sehr viel geringer Konzentration gemessen werden. Die NK-Kontrollpopulation exprimieren KIR3DL1 und KIR2DL2 in geringer Menge und CD94:NKG2A.

#### **2.1.1.1.2 Expression einer Reihe von NK Rezeptoren auf der angereicherten NK-Zell Population**

Die Anreicherungen von CD56+/KIR2DL2+ Zellen aus Leukozytenkonzentraten ist hier nach Zugehörigkeit des HLA-Typs der Spender zu einer der zwei Bindungsgruppen der untersuchten Rezeptorgruppen geordnet. Aufgeführt sind die Reinheit der aufgereinigten Zell-Populationen und der Anteil der NK-Zellen, für die eine Expression eines der NK-relevanten Marker gemessen werden konnte.



Tab. 6 zeigt die Aufteilung der Kolonie Inhibition Experimente nach der Zugehörigkeit des Spenders zu einer der beiden HLA-C Gruppen; diese HLA-C Gruppen werden durch die Bindungsspezifität der zwei wichtigsten Gruppen von KIR2DL Rezeptoren definiert. An HLA-C Gruppe 1 (HLA-Cw1, 3, 7 und 8) bindet KIR2DL2 (CD158b, p58.2) und an HLA-C Gruppe 2 (HLA-Cw2, 4, 5 und 6) bindet KIR2DL1 (CD158a, p58.1). In allen hier dargestellten Experimenten wurden KIR2DL2+ NK-Zellen als Effektorzell-Population verwendet.

Die durchflußzytometrische Phänotypisierungen der aufgereinigten NK-Zellen ergab für die CD56/KIR2DL2 doppelt-positiven NK-Zellen -individuell nach Spender unterschiedlich- ein recht heterogenes Bild. 5% - 34% (Mittelwert 10,3%) waren doppelt positiv für KIR2DL2 und KIR2DL1, 83% - 99% (Mittel 95,5%) exprimierten zusätzlich CD94:NKG2, KIR3DL1 (p70) konnte nur bei etwa der Hälfte der Spender und bei nicht mehr als 30% der NK-Zellen gefunden werden (0% - 56%, Mittel 9,5%). Mangels ausreichender Mengen an nicht frei erhältlichem mAk gegen p140 (KIR3DL4) konnte nicht alle Zellen überprüft werden. Die untersuchten Zellaufreinigungen exprimierten aber bis auf eine Ausnahme kein p140. Etwa 50% der NK-Zellen, die doppelt positiv für beide KIR2DL Rezeptoren waren, trugen zusätzlich auch KIR3DL1 (p70). CD3-positiv waren etwa 10% - 30% der NK-Zellen, wobei die Mehrzahl einen  $\alpha\alpha$ -TCR trug und nur maximal 30% dieser NKT-Zellen  $\beta\beta$ -TCR positiv waren; die Werte der FACS-Auswertung lagen zwischen 0 und 90% (Mittel 12,0%).

Die KIR2DL2- Fraktion der NK-Zellen wurde ebenfalls auf NK-typische Marker hin untersucht. In diese Kontrollfraktion waren mit einem Mittel von 7,2% erstaunlich wenige KIR2DL2+ bzw. KIR2DL1+ NK-Zellen, was durch die etwa 10-fach höhere Zellzahl erklärt werden kann. Der Wert für KIR3DL1 (p70) lag mit 6,4% ebenfalls sehr niedrig. Keine der Proben für einen dieser 3 KIRs zeigte mehr als 14% positiv gefärbte Zellen. Diese Werte liegen unter dem Wert der jeweils korrespondierenden KIR2DL2+ NK-Zell-Fraktion. Dieselbe Beobachtung konnte für die CD94:NKG2-Expression gemacht werden. Nur etwa 75% der KIR2DL2- NK-Zellen (Mittel bei  $76,7\% \pm 9,3\%$ ) exprimierte diesen KIR. Ganz im Gegensatz dazu lag der Anteil der CD3+ NK-Zellen in der KIR2DL2- NK-Fraktion mit Werten von 14% - 94% (Mittel  $62,0\% \pm 26,7\%$ ) deutlich über dem der positiv angereicherten NK-Population.

## **2.2 Nachweis des autoreaktiven Verhaltens einer kleinen NK-Population mit „selbst“-HLA-C nicht bindenden KIR2DL Rezeptoren**

In diesem Teil des Projekts wurden vierzig Experimente mit frischen Lymphozytenkonzentraten durchgeführt. Unterteilt wurden die Experimente in mehrere Gruppen. Zum einen waren das Experimente, in deren Verlauf NK-Zellen nach KIR2DL1 oder KIR2DL2 aufgereinigt wurden. Die Versuche mit KIR2DL2+ NK-Zellen wurden weiter unterteilt nach HLA-Typ der Spender. Sie wurden je nach Zugehörigkeit zu einer der beiden HLA-C Gruppen, die als Liganden für KIR2DL1 bzw. 2 beschrieben sind (Döhning, 1996) unterschieden. Zusätzlich ausgegliedert wurden diejenigen Versuche, in denen wiederholt Blut der gleichen Spender verwendet wurde, ebenso wie Versuche, in denen ein direkter Kontakt der Targetzellen und Effektorzellen durch eine Membran verhindert wurde.

Als Zielzellen für die angereicherten Killerzellen wurden aus derselben Blutspende CD34+ Stammzellen isoliert. Diese wurden nach einer Inkubation über Nacht mit den NK-Zellen in semisolidem Differenzierungsmedium ausplattiert und für zwei Wochen kultiviert (5% CO<sub>2</sub>, 36,7°C). Die gewachsenen Kolonien wurden qualitativ und quantitativ ausgewertet, indem Anzahl und Art der Kolonien lichtmikroskopisch bestimmt wurden. Als Maß für die Vitalität der Stammzellen wurde ihr koloniebildendes Potential (Bellone, 1993; Meyer, 1997) genutzt. Je weniger Kolonien die Stammzellen nach einem solchen Langzeit-Zytotoxizität-Test im Vergleich zu Kontrollen bildeten, desto mehr dieser Stammzellen waren durch die NK-Zellen geschädigt oder in ihrer Proliferationsfähigkeit zumindest teilweise beeinträchtigt.

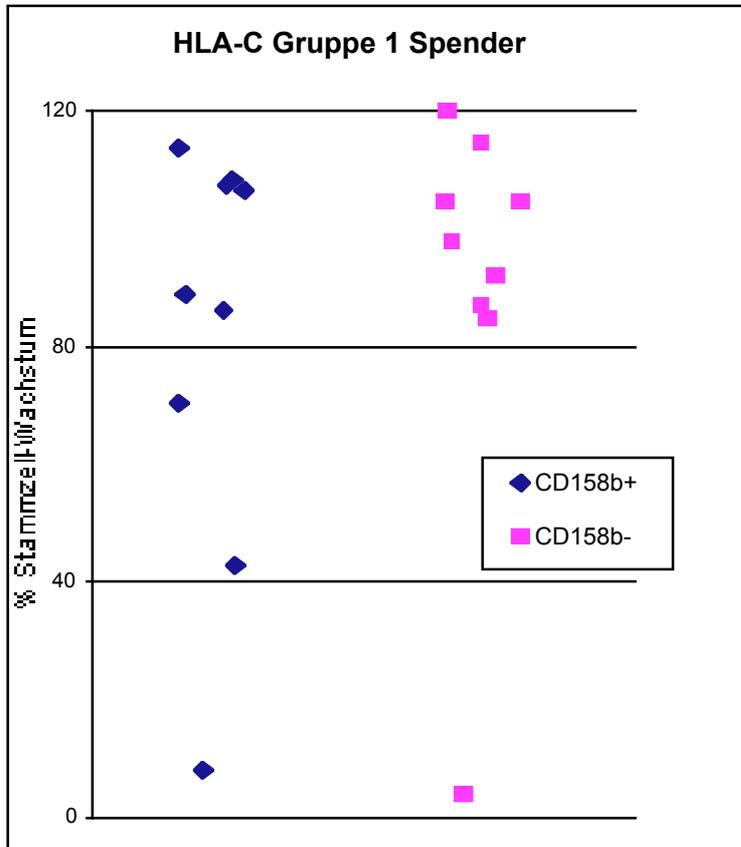
Die überwiegende Mehrheit der NK-Zellen wurde durch das Resuspendieren des Zell-Pellets von den Targetzellen getrennt; dies konnte durch hier nicht gezeigte FACS-Kontrollen gezeigt werden. NK-Zellen überleben in dieser Art Medium nicht sehr lange und können schon nach zwei bis drei Tagen Kulturzeit mikroskopisch nur noch als tote Zellen beobachtet werden. In diesem semisoliden Medium waren die NK-Zellen auch nicht mehr mobil oder in der Lage, zu anderen Zellen zu migrieren. Diese Eigenschaft des Mediums wurde für eine weitere Kontrolle genutzt, für die Stammzellen und NK-Zellen erst direkt vor dem Ausplattieren in das Kulturmedium gegeben wurden, so daß sie keinen direkten Kontakt haben konnten. In einem weiteren Kontrollversuch wurden Stammzellen und NK-Zellen getrennt durch eine Membran mit 5µm Weite inkubiert. Die Diffusion löslicher Stoffe war so jederzeit möglich, nicht jedoch ein direkter Kontakt der Killerzellen mit den Stammzellen. In beiden Kontrollversuchen zeigten die Stammzellen stets volle Proliferations-Fähigkeit.

Der Nachweis, daß es sich um inhibierende oder aktivierende Rezeptoren handelt, kann an der lebenden Zelle nur indirekt geführt werden. Hier erfolgte der Nachweis durch die Kreuzvernetzung der Rezeptoren durch mAbs. Dies führte zu einer Aktivierung der Rezeptoren. NK-Zellen deren KIR durch Antikörper zur Generierung eines Signals veranlaßt wurden, zeigten im darauf folgenden Zytotoxizität-Test keine lytische Aktivität mehr gegenüber Stammzellen oder anderen Zelllinien. Die kreuzvernetzten Rezeptoren waren also inhibierende Rezeptoren. Im Fall der KIR2DL- Familie (Valiante, 1997) wurden für diesen Zweck die zwei monoklonalen Antikörper EB6 (an Rezeptoren bindend, die spezifisch sind für HLA-Cw 2, 4, 5 und 6) und GL183 (an zwei Rezeptorklassen bindend, die spezifisch sind für HLA-Cw 1, 3, 7 und 8) (Vitale, 1994) eingesetzt.

### **2.2.1 Kolonie-Inhibitions-Tests mit die auf „selbst“-HLA-C nicht erkennenden KIR2DL Rezeptoren selektierten NK-Zellen**

Die Summe der Kolonie-Inhibitions-Tests mit Zellen freiwilliger Spender (n=43) wurde aufgeteilt in diejenigen Experimenten, in denen KIR2DL2+ (CD158b) bzw. KIR2DL1+ (CD158a) NK-Zellen aufgereinigt wurden. In der überwiegenden Mehrheit der Experimente wurden jedoch KIR2DL2+ NK-Zellen untersucht, wobei dieser Experimentblock zu gleichen Teilen nach der Zugehörigkeit des Spenders zu einer der beiden HLA-C Gruppen unterteilt wird und folgt der in Tab.6 erfolgten Aufgliederung der Experimente.

### 2.2.1.1 Kolonie-Inhibitions-Tests der Spender mit HLA-C Gruppe 1



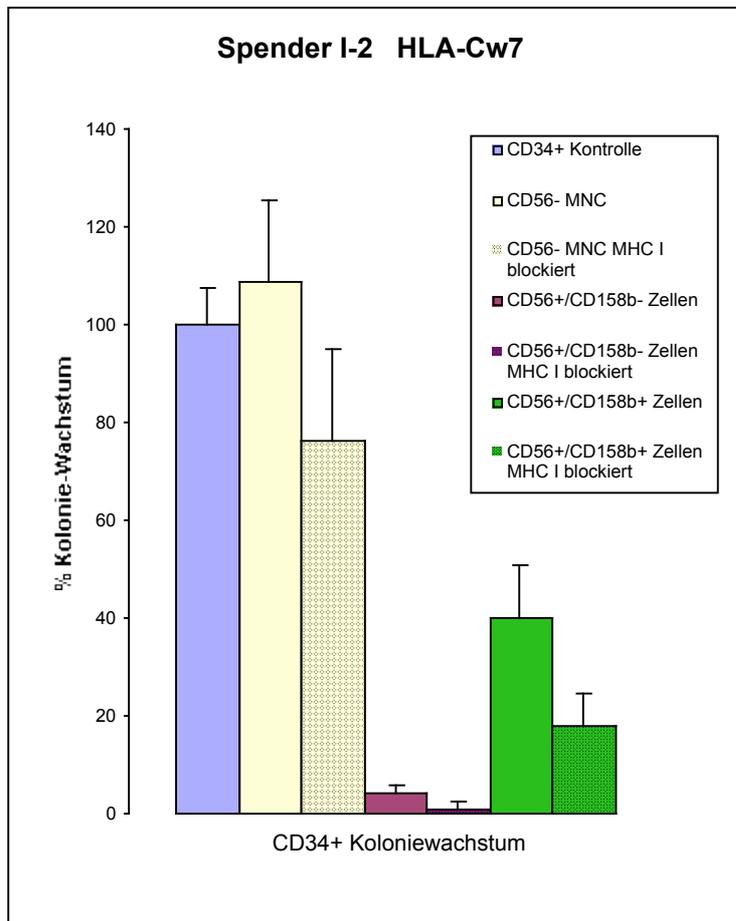
**Abb. 35: Experimente mit Blut der Spender mit HLA-C Gruppe 1 (HLA-Cw1, 3, 7 und 8).**

Die Proliferations-Fähigkeit der CD34+ Stammzellen nach Kontakt mit der KIR2DL2+ (CD158b+) NK-Population ist auf der linken Seite, die der KIR2DL2-/CD56+ Kontrollpopulation auf der rechten Diagrammseite dargestellt.

Die Proliferation der CD34+ Stammzellen, die ohne vorherigen Kontakt mit Effektorzellen ausplattiert worden waren, wurde als 100% der Stammzell-Proliferation gewertet. Höhere Werte in anderen Versuchsansätzen resultierten aus einem Eintrag an Progenitor-Zellen durch die Effektorzellen, die zu einer Koloniebildung fähig waren, oder eine durch die PBL geschaffene Umgebung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die ein Wachstum der Kolonien begünstigten. Die Proliferationsfähigkeit der Cd34+ Stammzellen nach Kontakt mit NK-Zellen wurde in 3 Kategorien eingeteilt, die jeweils in 40%-Schritten die Gesamtzahl der gemessenen Werte umspannen. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert der Summe der Werte für die unterschiedlichen, einzeln ausgezählten Kolonieformen.

Die Zusammenfassung der Experimente mit KIR2DL+ NK-Zellen von Spendern der HLA-C Gruppe 1 zeigt, daß nur vereinzelt Fälle deutlicher Inhibition der Proliferation der autologen Stammzellen beobachtet werden konnten. Bei einem der Spender wurde die Proliferation der CD34+ Stammzellen durch die positiv angereicherte KIR2DL2+ NK-Fraktion auf Werte

zwischen 0% und 40% reduziert. Bei zwei weiteren Spendern verringerte diese NK-Subpopulation das Koloniewachstum auf Werte zwischen 40% und 80%. Interessanterweise unterdrückten die KIR2DL2- NK-Zellen eines der Spender die Kolonie-Bildung autologer Stammzellen fast völlig.



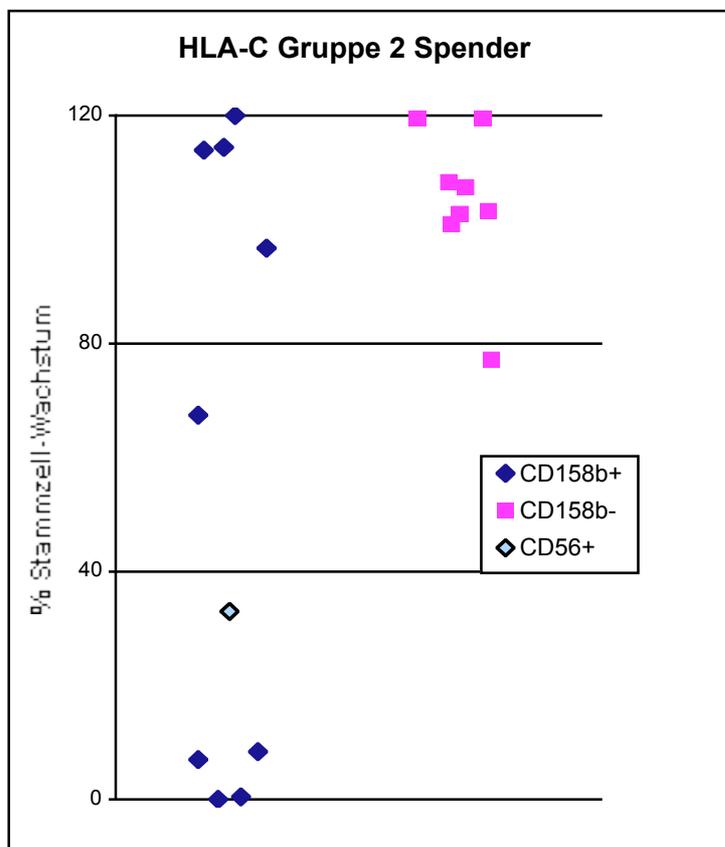
**Abb. 36: Ergebnis eines Kolonie-Inhibitions-Tests mit Zellen eines HLA-C Gruppe 1 Spenders.**

Hier exemplarisch das Ergebnis eines Kolonie-Inhibitions-Tests mit Zellen eines Spenders, dessen HLA-Cw7 der HLA-C Gruppe 1 angehört. Der Spender der Lymphozyten für dieses Experiment exprimiert HLA-Cw7 homozygot. Auf 23% der KIR2DL2- NK-Zellen wurde KIR2DL1 nachgewiesen, wobei fast kein KIR2DL2 mehr gefunden wurde. 25% der NK-Kontrollpopulation trugen KIR3DL1 und 83% CD94:NKG2. Hier fand nur CD94:NKG2 mindestens einen inhibierenden Liganden auf den autologen Stammzellen. Die Zahl der Kolonien der CD34+ Stammzellen, die ohne vorherigen Kontakt mit Effektorzellen ausplattiert worden waren, wurde als 100% der Stammzell-Proliferation gewertet. In Abb. 36 entspricht daher jede Säule dem Mittelwert einer Triplet-Bestimmung, die wiederum jeweils die Summe der Werte für die unterschiedlichen, einzeln ausgezählten Kolonieformen darstellt. Die Standardabweichung ist jeweils als Abweichung nach oben angezeigt. Die linke Säule zeigt die unbehandelte Stammzell-Kontrolle. Nach rechts folgen die Werte für die Proliferation der Stammzellen nach Kontakt mit CD56-depletierten Lymphozyten. Für die Proliferation der CD34+ Stammzellen nach Inkubation mit KIR2DL2-depletierten NK-Zellen wurde der selbe Versuchsansatz auch mit vorheriger Blockade des MHC I der

Stammzellen durch den mAk W6/32 durchgeführt. In gleicher Weise sind die Werte für die Inkubation der CD34+ Zellen mit KIR2DL2+ NK-Zellen nach rechts fortlaufend dargestellt.

Diese Experiment zeigt, daß die Proliferationsfähigkeit der CD34+ Stammzellen durch autologe KIR2DL2- NK-Zellen aus der gleichen Blutspende vollständig und durch autologe KIR2DL2+ NK-Zellen um über 50% inhibiert wurde. Eine Blockade des MHC I der Stammzellen verringerte die Vitalität derjenigen Stammzellen deutlich.

### 2.2.1.2 Kolonie-Inhibitions-Tests der Spender mit HLA-C Gruppe 2

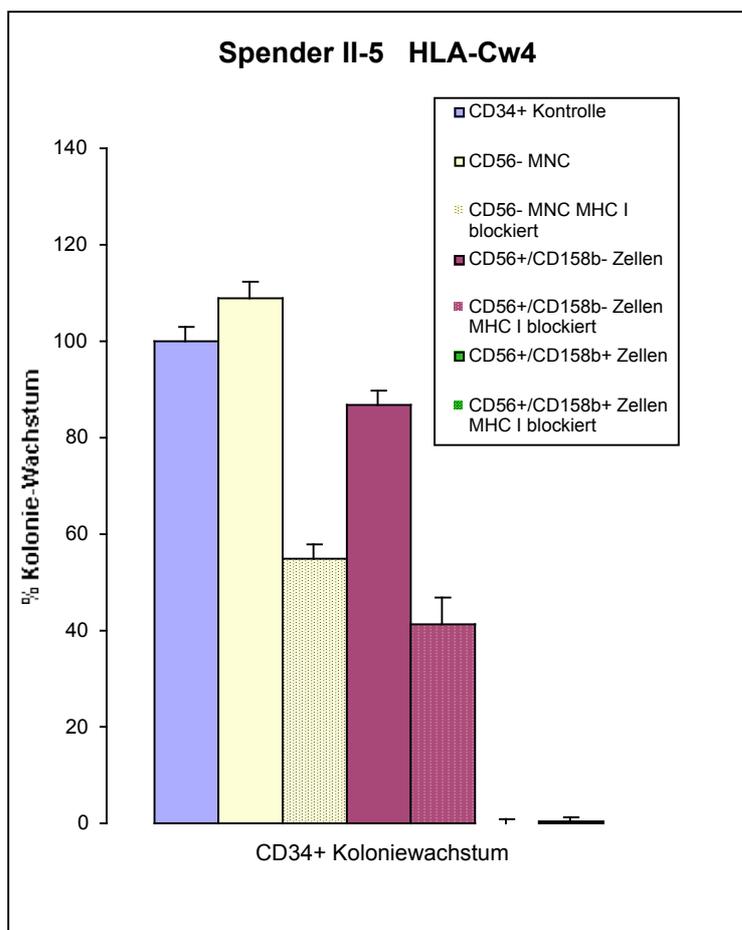


**Abb. 37: Experimente mit Blut der Spender mit HLA-C Gruppe 2 (HLA-Cw2, 4, 5 und 6).**

Zusammenfassung der Ergebnisse zur Inhibition der Proliferations-Fähigkeit der CD34+ Stammzellen nach Kontakt mit der KIR2DL2+ (CD158b+) NK-Population. Wieder sind auf der linken Seite die Versuche mit der positiv angereicherten NK-Zell-Fraktion aufgeführt, auf der rechten Diagrammseite die der KIR2DL2-/CD56+ Kontrollpopulation. Einer dieser fünf Spender hatte einen Anteil von etwa 50% an KIR2DL2+ Zellen an der vorselektierten NK-Population und wurde nicht weiter auf den KIR angereichert (CD56+ auf der linken Diagrammseite).

Die Proliferations-Fähigkeit der Stammzellen wurde wie in Abb. 35 auf die CD34+ Kontrolle als 100%-Wert bezogen. Auch die Einteilung der Werte in drei Kategorien wurde wie in Abb. 35 durchgeführt. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert der Summe der Werte für die unterschiedlichen, einzeln ausgezählten Kolonieformen.

Die Zusammenfassung der Experimente mit KIR2DL+ NK-Zellen von Spendern der HLA-C Gruppe 2 zeigt ein deutlich verändertes Bild im Vergleich zu Versuchen mit Spendern der Gruppe 1. Durch die positiv angereicherte KIR2DL2+ NK-Fraktion von fünf Spendern wurde die Proliferation der CD34+ Stammzellen auf Werte zwischen 0% und 40% unterdrückt. Bei einem dieser fünf Spender betrug der Anteil an KIR2DL2+ Zellen an der vor-selektierten NK-Population etwa 50% und wurde nicht weiter auf den KIR angereichert. Die KIR2DL2+ NK-Zellen eines Spenders und die KIR2DL2-/CD56+ Fraktion eines weiteren Spenders inhibierte das Stammzell-Wachstum schwach.



**Abb. 38: Ergebnis eines Kolonie-Inhibitions-Tests mit Zellen eines HLA-C Gruppe 2-Spenders.**

In dieser exemplarischen Darstellung dieses Kolonie-Inhibitions-Tests mit CD34+ Stammzellen eines Spenders der HLA-C Gruppe 2 zeigt die erste Säule auf der linken Seite die Stammzell-Kontrolle. Rechts davon folgt der Wert für die Stammzellen-Proliferation nach Inkubation mit autologen CD56-depletierten Lymphozyten. Die Werte für

die Inkubation der Stammzellen mit KIR2DL2- und KIR2DL2+ NK-Zellen setzen die Reihe nach rechts fort, jeweils begleitet von einem Versuchsansatz mit Blockade des MHC I der Stammzellen. Die Proliferation der CD34+ Stammzellen, die ohne vorherigen Kontakt mit Effektorzellen ausplattiert worden waren, wurde als 100% der Stammzell-Proliferation gewertet. In dieser Darstellung entspricht jede Säule dem Mittelwert einer Triplett-Bestimmung, die wiederum jeweils die Summe der Werte für die unterschiedlichen, einzeln ausgezählten Kolonieformen darstellt. Die Standardabweichung wurde jeweils als Abweichung nach oben angezeigt.

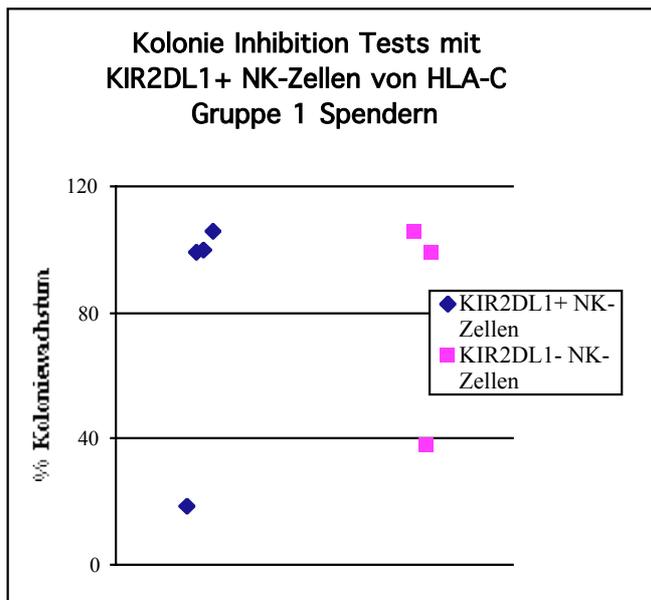
In diesem Experiment verringerte die Blockade des MHC I der Stammzellen ihr Proliferationsvermögen um bis zu 50%. Die Kolonie-Bildung wurde durch KIR2DL2- NK-Zellen schwach und durch autologe KIR2DL2+ NK-Zellen vollständig inhibiert. Der Spender der Lymphozyten für dieses Experiment exprimierte HLA-Cw4 homozygot. Auf 32% der KIR2DL2+ NK-Zellen wurde KIR2DL1 nachgewiesen und 86% trugen CD94:NKG2. Beide Rezeptoren fanden zumindest einen inhibierenden Liganden auf den autologen Stammzellen.

### **2.2.1.3 Reproduzierbarkeit der Kolonie-Inhibitions-Tests**

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Kolonie-Inhibitions-Tests zu zeigen, wurden alle Spender erneut einbestellt. Drei davon kamen dieser Bitte um erneute Blutspende nach, darunter zwei regelmäßige Blutspender, die in regelmäßigen Abständen von 5 bzw. 8 Monaten Blut spenden. Mit den Lymphozytenkonzentraten dieser Spender wurde ebenso wie bei der ersten Aufreinigung verfahren. Es wurde jeweils eine Wiederholung des ersten Experiments durchgeführt. Das Ergebnis dieser Versuche bestätigt die ursprünglichen Beobachtungen.

### **2.2.1.4 Autoreaktives Potential KIR2DL1+ NK-Zellen von HLA-C Gruppe 1 Spendern**

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Lymphozytenkonzentrate von vier gesunden Spendern, deren HLA-C der Gruppe 1 angehörte (jeweils zwei mal homozygot HLA-Cw1 bzw. Cw7), auf die KIR2DL1+ NK-Subpopulation hin angereichert. Es wurde ebenso verfahren wie bei den Vergleichsexperimenten, bei denen KIR2DL2+ NK-Zellen angereichert wurden.



**Abb. 39: Kolonie Inhibition Experimente mit KIR2DL1+ NK-Zellen von Gruppe 1-Spendern**

Zusammenfassung der Experimente mit dem Blut der HLA-C Gruppe 1-Spender (HLA-Cw1, 3, 7 und 8), aus deren NK-Zellen eine KIR2DL1+ Subpopulation aufgereinigt wurde. Die Proliferations-Fähigkeit der CD34+ Stammzellen nach Kontakt mit der KIR2DL1+ NK-Population ist auf der linken Seite, diejenige der KIR2DL1-/CD56+ Kontrollpopulation rechts zu sehen.

Die Proliferations-Fähigkeit der Stammzellen wurde wie in Abb. 35 auf die CD34+ Kontrolle als 100%-Wert bezogen. Auch die Einteilung der Werte in drei Kategorien wurde wie in Abb. 35 durchgeführt.

In den Kolonie-Inhibitions-Tests mit HLA-C Gruppe 1-Spendern, aus deren Blut KIR2DL1+/CD56+ Zellen angereichert wurde, zeigte je einer der Spender eine Reduktion der Kolonie-Bildung der CD34+ Stammzellen durch die positiv angereicherten KIR2DL1+ NK-Fraktion, bzw. durch die KIR2DL1-/CD56+ Kontrollzellen. Das Koloniewachstum wurde auf Werte zwischen 0% und 40% reduziert. Bei allen anderen Versuchsansätzen lies sich kein inhibierender Effekt nachweisen.

## 2.2.2 Effektormechanismen der KIR2DL2+ NK-Subpopulation

NK-Zellen unterscheiden sich von  $\alpha\alpha$ -T-Zellen oder CD8+  $\alpha\alpha$ -T-Zellen nur wenig in der Wahl der Effektormechanismen. Ähnlich wie zytolytische T-Zellen töten NK-Zellen ihre Zielzellen durch einen schnell wirkenden Effektorweg. So berichteten z.B. Moretta (1996) und Sentman (1996) von einem Killing der Zielzellen durch die Ausschüttung von Perforin durch NK-Zellen. Auf die Degranulation der Effektoren und die Lyse der Targets folgt eine Erhöhung der

Expressionsdichte inhibierender NK-Rezeptoren und die Ausschüttung von Zytokinen durch die NK-Zellen (Akdis, 1995; Lischke, 1996; Kala, 1997).

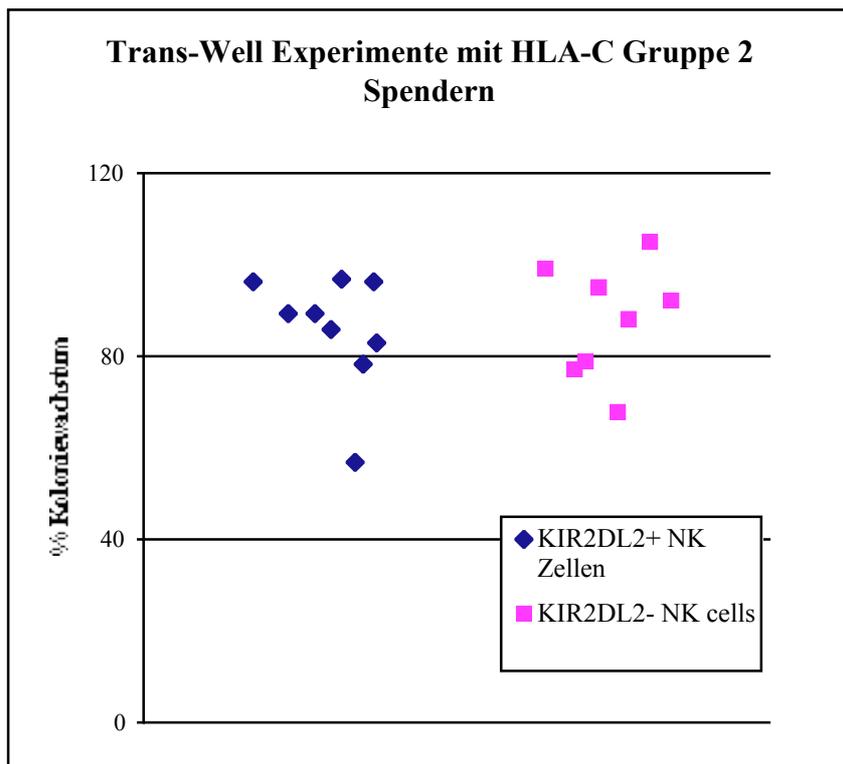
Für eine Perforin-vermittelte Lyse der Zielzellen durch die NK-Zellen ist ein direkter Kontakt nötig. Um die Rolle von Perforin bei der Inhibition der Proliferation der Stammzellen zu zeigen, müssen Stammzellen und Killerzellen physisch getrennt werden. Die Diffusion niedermolekularer Stoffe wie Wachstumsfaktoren, Zytokine oder löslicher Formen von Molekülen der Familie der Tumor-Nekrose-Faktoren sollte dabei jedoch nicht unterbunden werden. Parallel hierzu müßte eine Veränderung der Expressionsdichte von NK-Rezeptoren und membranständigem Fas-Ligand auf den Killerzellen beobachtet werden. In weiteren Versuchen müßte die Expression von intrazellulär gebildeten Zytokinen in den NK-Subpopulationen begleitend untersucht werden. Um eine Lyse der Stammzellen durch Mitglieder der TNF-Molekül-Familie wie CD95-Ligand (CD178), TNF- $\alpha$  oder TRAIL zu demonstrieren, müssen die Zielzellen durchflußzytometrisch auf den Nachweis der Expression eines frühen Apoptose-Markers untersucht werden. Dieser Marker, der durch dessen Liganden Annexin V nachgewiesen wird ist Phosphatidylserin (Koopmann, 1994; Verhoven, 1995).

#### **2.2.2.1 Test auf verschiedene Effektormechanismen während der Inhibition der Stammzell-Proliferation**

Für die Lyse der Zielzellen durch Perforin ist der direkte Kontakt zwischen Ziel- und Effektorzelle nötig. Daher soll ein Versuchsaufbau, der diesen direkten Kontakt verhindert, über die Rolle dieses direkten Zell-zu-Zell Kontakts Aufschluß geben.

Während der ersten Versuche wurden in einer Proliferations-Kontrolle die CD34+ Stammzellen und die autologen Effektor-Populationen erst direkt vor dem Ausplattieren zum semisoliden Differenzierungsmedium zugegeben. Dies verhindert nicht nur einen direkten Kontakt der Zellen, sondern auch die Migration der Killerzellen. In keinem der Experimente wurde ein Proliferations-Hemmung der Stammzellen beobachtet.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Effektorzellen von autologen CD34+ Stammzellen durch eine kleinporige Membran getrennt, die direkten Kontakt ebenfalls unterbindet aber die Diffusion von löslichen Botenstoffen zuläßt. Diese Versuchsansätze wurden parallel zu regulär durchgeführten Kolonie-Inhibitions-Tests durchgeführt. Auch hierbei wurde bei keinem der Versuche eine deutliche Verringerung der Proliferations-Fähigkeit der CD34+ Stammzellen durch autologe NK-Populationen beobachtet.



**Abb. 40: Trans-Well-Experimente mit Blut der Spender mit HLA-C Gruppe 2**

Zusammenfassung der Ergebnisse zur Inhibition der Proliferations-Fähigkeit der CD34+ Stammzellen nach Inkubation mit KIR2DL2+ NK-Zellen in Trans-Well Gefäßen ohne direkten Zell zu Zell Kontakt. Auf der linken Diagrammseite sind die Versuche mit der positiv angereicherten NK-Zell-Fraktion aufgeführt, auf der rechten Seite die der KIR2DL2-/CD56+ Kontrollpopulation.

Die Stammzellen wurden 30 Stunden mit den NK-Populationen im Brutschrank in 6-well Platten inkubiert und danach in semisolidem Differenzierungsmedium ausplattiert. Nach zwei Wochen wurden die Kolonien ausgezählt und nach Kolonie-Typen differenziert. Die Proliferations-Fähigkeit der Stammzellen wurde wie in Abb. 35 auf die CD34+ Kontrolle als 100%-Wert bezogen. Auch die Einteilung der Werte in drei Kategorien wurde wie in Abb. 35 durchgeführt. Jeder Punkt entspricht dem Mittel einer Triplet-Messung.

In den hier dargestellten 9 Trans-Well-Experimenten konnte in zwei Experimenten eine Inhibition des Koloniewachstums der CD34+ Stammzellen durch KIR2DL2+ NK-Zellen beobachtet werden, die unterhalb der 80%-Schwelle des Koloniewachstums lag (57% und 79%). In den Kontrollexperimenten mit KIR2DL2- NK-Zellen wurde eine vergleichbare Inhibition des Koloniewachstums drei mal beobachtet (68%, 78% und 79%). Die Werte für das Koloniewachstum in allen anderen Versuchen lagen über 80%.

Es gab keinerlei Verschiebungen in der Häufigkeit der unterschiedlichen Kolonie-Typen untereinander im Vergleich zur CD34+ Kontrolllexpansion. Die NK-Populationen wurden in drei Versuchen nach der Inkubationszeit durchflußzytometrisch auf ihre Expression von KIRs und

Fas-Ligand (CD178) untersucht. Es konnten keine Unterschiede im Vergleich zur NK-Kontrolle festgestellt werden.

#### **2.2.2.2 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen als Nachweis der Aktivierung der NK-Zellen**

Der Aktivierung einer NK-Zelle folgt in der Regel die Produktion und Sekretion einer Reihe von Zytokinen durch die NK-Zelle (Nakjima, 2000). Der am häufigsten beobachtete Aktivierungs-Marker bei NK-Zellen ist IFN- $\gamma$ . Eine Aktivierung von T-Zellen folgt typischerweise die Sekretion von TNF- $\alpha$ , die für NK-Zellen jedoch seltener beobachtet wird. Beide Zytokine können in KIR2DL2+ NK-Zellen nach Kontakt mit autologen Stimulator-Zellen cytoplasmatisch nachgewiesen werden. Als Kontrolle dient IL-2, das eine Chemotaxis bei Aktivierung der NK-Zellen bewirkt, aber normalerweise nicht von ihnen selbst produziert wird.

In keinem der drei Versuche wurde der Nachweis erbracht, daß KIR2DL2+ oder KIR2DL2- NK-Zellen nach Kontakt mit autologen Stammzellen IFN- $\gamma$  TNF- $\alpha$  oder IL-2 produzieren.

#### **2.2.2.3 Intrazelluläre Färbung von Perforin als Nachweis der NK-Zell-Aktivierung**

Von Patienten, deren Immunsystem sich nach einer Stammzelltransplantation regeneriert, ist bekannt, daß die Gabe von geringen Dosen von humanem, rekombinantem IL-2 die NK-Aktivität beträchtlich zu steigern vermag. Ebenso ist in fast allen Protokollen zur Klonierung von  $\alpha$ -T-Zellen oder NK-Zellen eine Zugabe von großen Mengen IL-2 zum Selektionsmedium erforderlich. In der Klinik wird der Erfolg einer durch IL-2 Gabe erreichten Steigerung der NK- oder LAK-Zell-Aktivität (Lymphokin aktivierte Zellen) durch die Kontrolle intrazellulär gebildeten Perforins durchgeführt. Der Nachweis einer gesteigerten Expression und Speicherung von Perforin in den Granula von NK-Zellen wird dabei als Anzeichen einer Aktivierung dieser Zellen gewertet.

Der Nachweis gesteigerter Produktion und intrazellulärer Speicherung von Perforin wurde auch für KIR2DL2+ NK-Zellen nach Ko-Inkubation mit autologen Stammzellen durchgeführt. Es wurde jedoch kein deutliches Signal für eine Zunahme intrazellulär vorliegenden Perforins nachgewiesen.

#### **2.2.2.4 Verlauf des Expressionsdichte von inhibierenden NK-Rezeptoren nach Aktivierung der NK-Zellen durch autologe Stammzellen**

Die Steigerung der Expressionsdichte von inhibierenden NK-Rezeptoren nach Stimulation und Aktivierung einer NK-Zelle schafft die Voraussetzungen für eine ausreichende Inhibition der Killerzelle bei Kontakt mit einer gesunden, unveränderten Zelle. Dieser Mechanismus verhindert eine ausufernde zytolytische Aktivität der Killerzelle, die z.B. auf der Zielzelle benachbarte Zellen oder Gewebe übergreifen könnte.

Bei KIR2DL2<sup>+</sup> und KIR2DL2<sup>-</sup> NK-Populationen wurde im Verlauf der Kolonie Inhibition Experimente die durchflußzytometrische Typisierung einer Reihe von NK-Rezeptoren vorgenommen, um daraus einen Hinweis auf Aktivierung dieser Effektor-Population zu gewinnen. Untersucht wurde auf die beiden KIR2DL KIR2DL1 und KIR2DL2, auf KIR3DL1 mit dem mAk DX9 und auf CD94: NKG2. Zusätzlich wurden Kombinationen der Einzelmessungen vorgenommen, um die Ko-Expression mehrerer NK-Rezeptoren festzustellen. Ebenso wurde in Mehrfachbestimmungen noch die NK-Zell-Marker CD56 und der T-Zell-Marker CD3 untersucht. Teilweise wurden die T-Zellen noch untergliedert in  $\alpha\alpha$ - und  $\beta\beta$ -T-Zellen.

Insgesamt wurden siebzehn Experimente parallel auf die KIR-Expressionsdichte untersucht. Es konnten große Unterschiede der Expressionsdichte der verschiedenen NK-Rezeptoren zwischen Individuen festgestellt werden. Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede für die KIR-Expression auf den Killerzellen eines Spenders innerhalb eines Experiments.

Außerhalb dieses Teilprojekts durchgeführte MLCs und anschließend durchgeführte quantitative Messungen der KIR-Expressionsdichte ergaben ein sehr ähnliches Bild.

#### **2.2.2.5 Verlauf der Expressionsdichte von Fas-Ligand nach Aktivierung der NK-Zellen durch autologe Stammzellen**

Zytotoxische T-Zellen, NK-T-Zellen, und  $\alpha\alpha$ -T-Zellen töten Zielzellen meist durch die Induktion der Apoptose in diesen Zellen. Die Werkzeuge der Effektorzellen sind hierbei Moleküle der TNF-Familie, die sie membranständig exprimieren oder aus Speichervesikeln in den extrazellulären Raum in Richtung der Zielzellen sezernieren. Die wichtigsten Mitglieder der

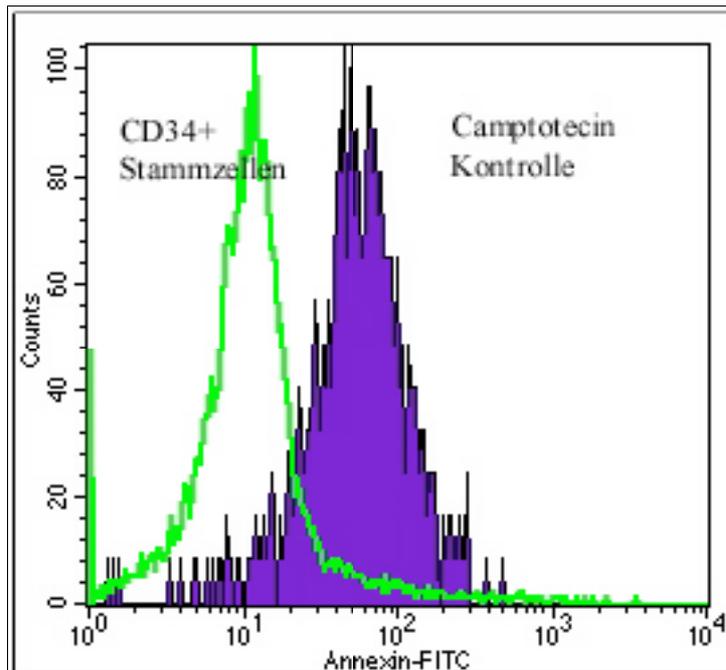
TNF-Moleküle sind Fas-Ligand (CD95-Ligand, CD178), TNF- $\alpha$  und TRAIL. Nach einer Stimulation von Effektorzellen durch Kontakt mit Zielzellen wird meist eine Steigerung der Expression dieser Moleküle beobachtet.

Die Steigerung der Expressionsdichte beispielsweise von Fas-Ligand kann also als direkter Hinweis gewertet werden, daß Effektorzellen den Tod einer Zelle durch einen dieser Faktoren induziert hat. Die in den hier gezeigten Kolonie Inhibition Assays verwendeten NK-Populationen wurden im Verlauf der Experimente durchflußzytometrisch auf eine Veränderung der Expressionsdichte von CD95-Ligand untersucht. Diese Kontrolle erfolgte bei elf Experimenten begleitend zum Test der Proliferations-Fähigkeit der Stammzellen. Es wurden jedoch keine Veränderungen in der Signalstärke für Fas-Ligand gemessen.

#### **2.2.2.6 Nachweis von Apoptose durch Annexin V**

In Kapitel 2.2.2.6 wurde die Notwendigkeit eines direkten Zell-zu-Zell Kontakts für das zytotoxische Verhalten der KIR2DL+ NK-Zellen gezeigt. Ein durch direkten Zell-Kontakt vermittelter Zelltod kann durch Perforin und den Zusammenbruch der zellulären Homöostase oder durch die Induktion eines autonomen Todesweges der Zelle verursacht werden. Für den Fall eines Killing durch Induktion der Apoptose in den Zielzellen kann dies mittlerweile durch eine Vielzahl von Tests nachgewiesen werden. So kann die Aktivierung eines der zahlreichen Enzyme aus einem der vielen Signalwege als Protein oder mRNA bewiesen werden, es können zudem elektronenmikroskopisch Veränderungen im tunel-Test gezeigt werden. Einer der am einfachsten durchzuführenden Tests ist der Nachweis von frühen Schädigungen der Integrität der Zellmembran durch das Phosphatidylserin (PS)-bindende Protein Annexin V. PS wird von intakten Zellen nicht auf die Außenseite der Zellmembran transloziert, kann aber bei apoptotischen Zellen und auf apoptotischen Körperchen (Apoptotic Blebs) als Oberflächenmarker verwendet werden (Koopmann, 1994; Verhoven, 1995; Vermes, 1995).

Durch ein an Annexin V gekoppeltes Fluorochrom (z.B. FITC) kann das Erscheinen von PS auf der Zellmembran apoptotischer Zellen schon nach kurzer Zeit durchflußzytometrisch gezeigt werden. In drei Experimenten wurde nach Ko-Inkubation der CD34+ Stammzellen mit der KIR2DL2+ NK-Population ein Nachweistest von Annexin V durchgeführt. In keinem der Tests konnte Annexin V nachgewiesen werden.



**Abb. 41: Messung der Expressionsdichte des Apoptose-Markers PS mit Annexin V (FITC) auf Stammzellen nach Inkubation mit autologen KIR2DL2+ NK-Zellen**

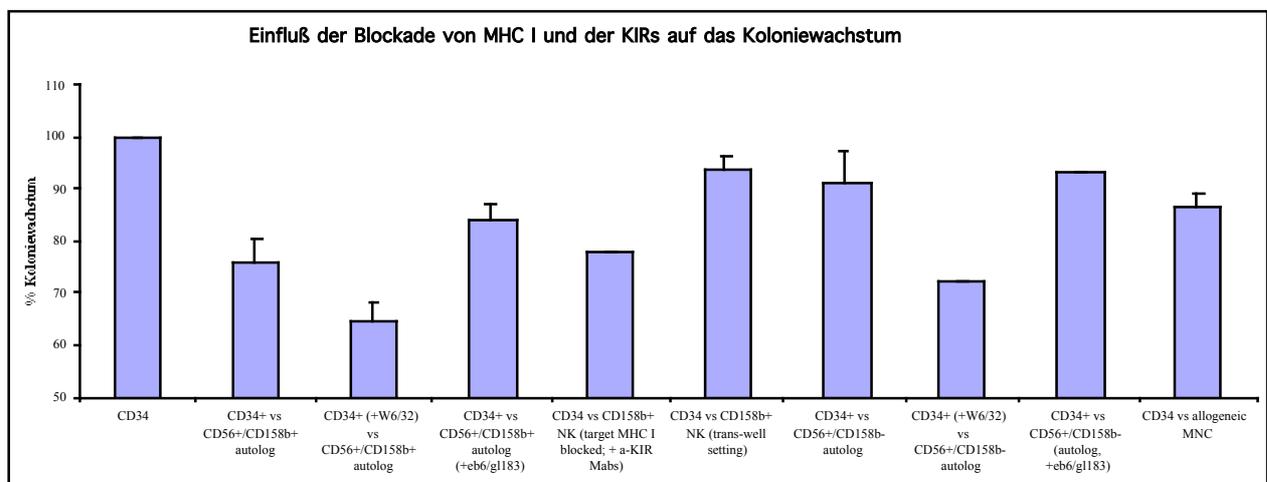
Zwei sich überlagernde Histogramme zeigen eine Messung von Annexin V auf Stammzellen nach Inkubation mit autologen KIR2DL2+ NK-Zellen (grüne Linie) im Vergleich zur Messung dieses Markers auf Zellen der Positivkontrolle (ausgefüllte Fläche). Die Zellen der Kontrolle wurden für zehn Minuten mit dem Zytostatikum Camptotecin inkubiert. Die Stammzellen wurden mit dem Protein Annexin V (FITC-konjugiert und im FL1-Kanal gemessen) inkubiert, das in Anwesenheit von Calcium spezifisch an den Apoptose-Marker PS bindet. Zusätzlich wurde unmittelbar vor der Messung Propidium-Iodid zugegeben, das in die DNA toter Zellen interkaliert und unter Laserlicht-Anregung im FL2- und FL3-Kanal fluoresziert. Im FACS-Bild für forward/sideward scatter wurde ein Lymphozyten-gate gesetzt und damit eine Auswertung der Daten für die Stammzellen ermöglicht. Die Punktwolke, die positiv für die Färbung für PS war wurde durch ein weiteres gate markiert und nach Ausschluß der durch Propidium-Iodid angefärbten toten Zellen in Abb. 41 dargestellt. Diese Art der Darstellung trägt die durchflußzytometrische Messung der Dichte des auf der Zelloberfläche gebundenen Annexins logarithmisch auf der x-Achse auf, die aufsummierte Anzahl der auf diese Weise gemessenen Zellen linear auf der y-Achse.

Beispielhaft ist hier die Oberflächenexpression von PS auf CD34+ Stammzellen nach Inkubation mit autologen KIR2DL2+ NK-Zellen für eines der Experimente dargestellt. Die Positivkontrolle für die durch das Zytostatikum Camptotecin bei Stammzellen induzierten Apoptose ist im Vergleich gezeigt.

### 2.2.2.7 Ausschluß eines aktivierenden Potentials der NK-Rezeptoren

Der extrazelluläre Teil der inhibierenden Rezeptoren der KIR2DL Familie ist identisch mit denen der aktivierenden Formen KIR2DS1-5. Eine Unterscheidung dieser Rezeptoren mittels einer durchflußzytometrischen Typisierung ist daher nicht möglich. Der direkte Nachweis des aktivierenden oder inhibierenden Charakters der Rezeptoren kann nur mittels einer PCR für diese Rezeptoren geführt werden. Eine weitere Möglichkeit bietet der indirekte Nachweis durch eine Blockade bzw. Aktivierung der Rezeptoren durch mAKs und der daraus folgenden Änderung des zytolytischen Verhaltens der Killerzellen.

Während eines Tests zum zytotoxischen Verhalten humaner Decidua-NK-Zellen wurden Blockierungs-Experimente der KIR2DL-Rezeptoren vorgenommen. Die Reaktivität der Killerzellen gegenüber einer Reihe von einzelnen MHC I Allelen exprimierenden Zelllinien konnte mit der Blockade einzelner KIRs (KIR2DL1 bzw. 2) nicht beeinflusst werden. Die Inkubation mit mAKs gegen beide KIRs der KIR2DL-Familie (KIR2DL1 und 2) bewirkte eine Verringerung der NK-Aktivität. Diese Aktivierung der NK-Rezeptoren, wahrscheinlich durch deren Kreuzvernetzung durch die mAKs, zeigte hier den inhibierenden Charakter der NK-Rezeptoren. Die Aktivierung von KARs hätte zu einer Erhöhung der Lyse der Zielzellen führen müssen. Die Blockade der NK-Rezeptoren ohne gleichzeitige Aktivierung müßte ebenso zu einer Erhöhung der NK-Aktivität führen, da eine inhibierend wirkende Bindung an MHC I unmöglich würde.



**Abb.42: Einfluß der Blockade des MHC I der Zielzellen und der KIRs der NK-Zellen auf das Koloniewachstum CD34+ Stammzellen nach Inkubation mit autologen KIR2DL2+ NK-Zellen**

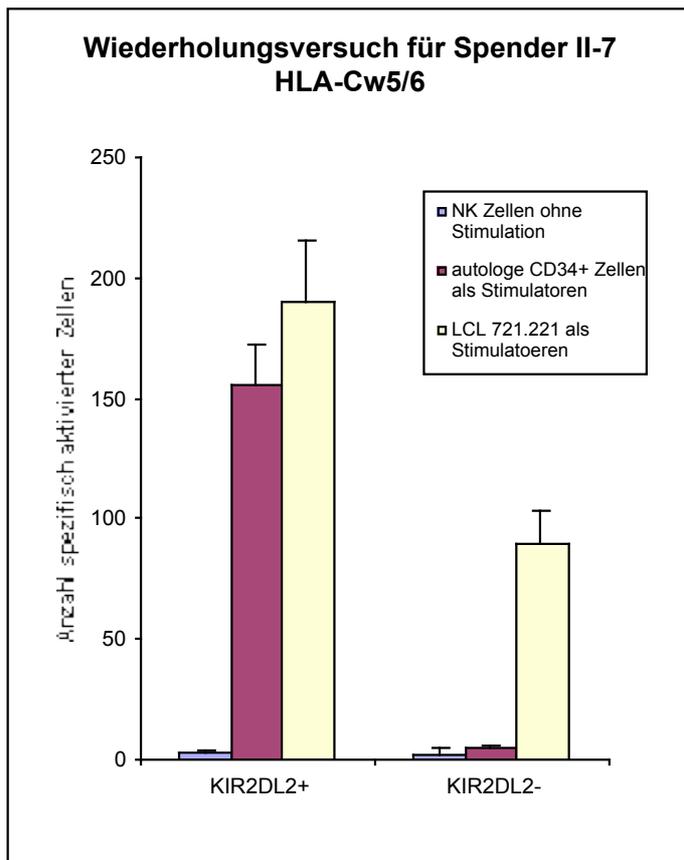
Abb. 42 zeigt die Daten für einen der sechs Kolonie-Inhibitions-Tests, während derer zusätzlich zum normalen Setting eine Blockade des MHC I der Stammzellen und der KIR2DL der NK-Zellen vorgenommen wurde. Links steht der als 100% gesetzte Wert für unbehandelte CD34+ Stammzellen anhand dessen alle anderen Werte des Experiments berechnet wurden. Nach rechts folgen fünf Säulen, die die Werte für die Proliferations-Fähigkeit der Stammzellen wiedergeben, nachdem sie mit KIR2DL2+ NK-Zellen inkubiert worden waren. Links die Inkubation mit KIR2DL2+ NK-Zellen, gefolgt von den Werten für eine vorherige Inkubation der Stammzellen bzw. der Killerzellen mit mAks gegen MHC I und KIR2DL1 und 2. Rechts schließen sich der Wert für ein vorausgegangene Blockade beider Epitope und der Wert für eine Inkubation mit trennender Membran im Trans-Well-Versuchsaufbau an. Nach rechts folgen die drei Werte für die Inkubation mit KIR2DL2- NK-Zellen: ohne mAk-Inkubation, mit vorheriger MHC I-Blockade bzw. KIR-Blockade. Rechts außen ist der Kontrollwert für eine Inkubation mit allogenen MNC dargestellt. Jede Säule repräsentiert den Mittelwert der durchgeführten Experimente. Die Standardabweichung ist für jede Säule angegeben.

Bei sechs Kolonie-Inhibitions-Tests wurde der Einfluß der Blockade der Interaktionspartner auf Stammzellen und NK-Zellen auf das Koloniewachstum untersucht; die Werte eines dieser Experimente ist hier dargestellt. Nach Inkubation beider KIR2DL1 und 2 mit mAks gegen diese KIRs wurde bei allen Experimenten eine deutlich höhere Proliferation der Stammzellen beobachtet. Eine MHC I-Blockade steigert das Stammzell-Killing durch autologe KIR2DL2+ NK-Zellen deutlich, wogegen die KIR-Blockade das NK-vermittelte Killing vermindert. Die KIR-Blockade vermag die Aktivierung durch die MHC I-Blockade jedoch nicht aufzuheben. Die Werte für die Inkubation mit KIR2DL2- NK-Zellen sowie für die Trans-Well-Experimente unterscheiden sich kaum vom Wert für die Stammzell-Kontrollexpansion.

#### **2.2.2.8 Aktivierung der NK-Zellen durch autologe Stammzellen – Nachweis der Zytokin-Freisetzung durch ELI-Spot Tests**

Nach Stimulation einer NK-Zelle durch eine Zielzelle sezerniert diese Killerzelle in der Regel  $\gamma$ -Interferon. Der Nachweis dieses Aktivierungs-Markers in einer intrazellulären Färbung der gesamten NK-Population schlug jedoch fehl. Durch den sehr viel empfindlicheren ELI-Spot Test konnte die Zytokin-Freisetzung schließlich auf Einzel-Zell Niveau nachgewiesen werden.

In anfänglich durchgeführten ELI-Spot Tests wurde keine spontane  $\gamma$ -Interferon-Freisetzung durch die NK-Zell Population festgestellt. Eine Stimulation der KIR2DL2+ NK-Zellen konnte jedoch durch Kontakt mit MHC I defizienten K562-Zellen gezeigt werden. Auch eine MHC I-Blockade allogener Stammzellen konnte eine Stimulation der NK-Zellen auslösen.



**Abb. 43: Stimulation KIR2DL2+ NK-Zellen durch autologe Stammzellen: Freisetzung von IFN- $\gamma$**

Wiederholungsexperiment der Inkubation von Stammzellen mit autologen NK-Populationen. ELI-Spot Test Das Verhältnis der NK-Zellen zu den Stammzellen betrug hier 5 zu 1. Links ist die Zahl der spezifisch stimulierten Zellen für KIR2DL2+ NK-Zellen, rechts die Zahl für die NK-Kontrollpopulation dargestellt. Es wurden 5000 Targetzellen pro Well eingesetzt. Die Farbsignale auf der Nitrocellulosemembran, die einzelne Zytokinsezernierende NK-Zellen repräsentieren wurden computergesteuert ausgezählt. Die hier präsentierten Werte sind Mittelwerte aus Tripletbestimmungen. Die Standardabweichungen sind auf den Balken angezeigt.

Das Ergebnis dieses ELI-Spot Tests zeigt die Stimulation der KIR2DL2+ NK-Zellen durch autologe CD34+ Stammzellen (HLA-Cw5/6); die KIR2DL2- NK-Population hingegen war durch autologe Stammzellen nicht stimulierbar. Beide Effektor-Populationen zeigen eine starke Stimulierbarkeit durch die MHC I-defiziente Referenz-Zelllinie LCL721.221. Das Effektor zu Target Verhältnis betrug bei diesem Experiment 2:1.

### **2.2.3.1 Reinheit der zur Klonierung verwendeten KIR2DL2+ NK-Zellen**

Die Typisierung der NK-Rezeptoren von autoreaktiven KIR2DL2+ NK-Zellen hatte gezeigt, daß in Bezug auf den KIR-Besatz in keinem der Experimente eine vollständig homogene NK-Population vorlag. Annähernd alle KIR2DL2+ NK-Zellen hatten zusätzlich noch CD94:NKG2 exprimiert (Mittel 92,6%). Es wurden auch KIR3DL1+ (p70) und KIR2DL1+ NK-Zellen festgestellt. Bei einigen der Spender wäre eine Bindung dieser KIR-tragenden Zellpopulationen an den autolog exprimierten MHC I und somit eine Inhibition möglich gewesen. Nur durch eine Klonierung der NK-Zellen konnte geklärt werden, welche Zellpopulation der aufgereinigten KIR2DL2+ NK-Zellen das beobachtete autoreaktive Verhalten gezeigt hatten.

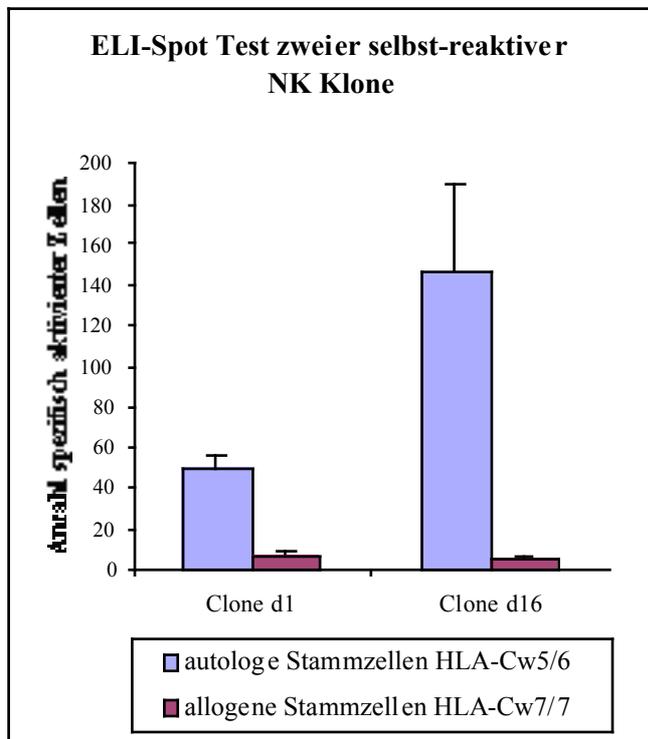
Die KIR2DL2+ NK-Zellen eines Spenders, dessen Killerzellen wiederholt Autoreaktivität gezeigt hatten, wurden aus einer erneuten Blutspende isoliert und in limitierenden Verdünnungsreihen zur Klonierung ausplattiert. Die Reinheit der KIR2DL2-Aufreinigung betrug 87%. Die Klone wurden wie von Münz (Munz, 1997) und von Cella und Colonna (Cella, 2000) beschrieben vorgenommen und nach dieser Beschreibung expandiert und gepflegt.

### **2.2.3.2 Spezifität der NK-Klone für HLA-C-Gruppen**

Da die durchflußzytometrische Typisierung der CD56+/CD3- NK-Klone das heterogene Bild der gesamten KIR2DL2+ NK-Population widerspiegelte (CD94:NKG2 96%, KIR3DL1+ (p70) 9% und KIR2DL1 (CD158a, p58.1) 10%), wurden die einzelnen NK-Klone mit der ELI-Spot Methode auf ihre Spezifität für eine der beiden HLA-C Bindungsgruppen der KIR2DL-Familie getestet. Als Stimulatorzellen wurden MHC I-defiziente LCL721.221 Zellen verwendet, die mit einzelnen HLA-C Allelen (HLA-Cw6, bzw. Cw7) stabil transfiziert worden waren. Von 89 gezogenen NK-Klonen wurden 19 auf diese Weise getestet.



getestet wurden. Klon d1 war als spezifisch für HLA-C Gruppe 1 und Klon d16 als spezifisch für HLA-C Gruppe 2 tragende Zellen getestet worden.



**Abb.45: Selektivität zweier NK-Klone für autologe Stammzellen**

Die Klone d1 und d16 wurden gegen autologe (HLA-Cw5/6) und allogene (HLA-Cw7) Cd34+ Stammzellen als Stimulatoren in einem  $\gamma$ -IFN detektierenden ELI-Spot Test eingesetzt. Die Anzahl der spezifisch aktivierten Zellen des Klons d1 ist auf der linken Diagrammhälfte, die des Klons d16 auf der rechten Seite dargestellt. Links ist jeweils die Aktivierung durch autologe, rechts durch allogene Stammzellen wiedergegeben.

Die Klone d1 und d16 wurden gegen autologe (HLA-Cw5/6) und allogene (HLA-Cw7) Stammzellen als Stimulator-Zellen eingesetzt. Die NK-Zellen der beiden Klone wurden deutlich stärker durch autologe Stammzellen stimuliert, wobei die Stimulation für Klon d16 deutlich stärker war, als für Klon d1.

## C Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle inhibierender Rezeptoren auf Natürlichen Killer-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen bei der Regulation des zytolytischen Verhaltens dieser Zellen gegenüber verschiedenen autologen Zellpopulationen untersucht.

Im Rahmen des ersten Teilprojekts ( Kapitel B1: Nachweis der „pure red cell aplasia“ als Krankheit des „missing self“) konnte erstmalig gezeigt werden, daß sich die MHC I Expressionsdichte von erythroiden Progenitoren im Knochenmark im Verlauf ihrer Differenzierung zu Erythroblasten und reifen Erythrozyten kontinuierlich verringert. Die durchflußzytometrische Phänotypisierung von Knochenmarkproben von 19 gesunden Spender ergab ein einheitliches Bild in Bezug auf die Expressionsdichte von MHC I Molekülen auf verschiedenen Zellpopulationen wie hämatopoetischen Stammzellen, sowie verschiedenen Linien der lymphoiden und der erythroiden Progenitoren. Alle untersuchten Populationen lagen um etwa das 80-fache über den Werten für die erythroiden Vorläuferzellen. Diese Beobachtung ist insofern neu, als bisher angenommen wurde, daß die Expression von MHC I auf erythroiden Progenitoren wie bei der Maus bis kurz vor dem Stadium des reifen Erythrozyten recht konstant auf hohem Niveau gehalten wird. Reife Erythrozyten besitzen keine Expression von MHC I mehr auf ihrer Oberfläche und sind durch den Verlust des Zellkerns während ihrer Differenzierung auch nicht mehr zu einer Produktion dieses Selbstantigens in der Lage (Parham, 2000).

Da Zellen, die kein oder nur wenig MHC I exprimieren, ein klassisches Ziel für NK-Zellen oder  $\gamma\delta$ -T-Zellen darstellen, muß es Mechanismen geben, die eine NK-vermittelte Tilgung der Erythroblasten verhindert. Diese Mechanismen sind bislang jedoch unbekannt. Sehr wahrscheinlich spielen inhibierende NK-Rezeptoren bei der Toleranz dieser annähernd MHC I defizienten Zellpopulation eine wichtige Rolle.

Die beiden derzeit diskutierten Theorien für die Toleranz von NK-Zellen für „selbst“ MHC I in Geweben mit unterschiedlicher MHC I Expression (Olsson, 1995; Held, 1995) erklären eine Anpassung der Toleranzschwelle für eine Zytolyse durch NK-Zellen durch die Erhöhung der Expression von inhibierenden NK-Rezeptoren auf den Effektorzellen. Dieser Mechanismus konnte im Mausmodell anhand von „selbst“- und „fremd“-MHC I tragenden Tumorklinen

demonstriert werden (Olsson, 1995). Der als „selbst“ erkennbare Tumor wurde toleriert, der andere abgestoßen. Dieser Unterschied war selbst dann noch zu beobachten, wenn beide Tumoren nur geringe Mengen an MHC auf der Zelloberfläche exprimierten.

Ein in der Universitäts-Klinik Tübingen aufgetretener Fall von „pure red cell aplasia“ zeigte zusätzlich zum normalen Befund des Fehlens von Erythroblasten im Knochenmark keinerlei Mangelerscheinungen, genetische Veränderungen oder Virusinfektionen. Autoantikörper als Ursache der Erkrankung konnten durch einen Vitalitätstest (Charles, 1996) der Stammzellen des Patienten nach Inkubation mit Patienten-Serum ausgeschlossen werden. Ebenso differenzierten diese Stammzellen *in vitro* in alle Reihen der Hämatopoese, wodurch ein Stammzelldefekt ebenfalls ausgeschlossen werden konnte. Als Besonderheit zeigte der Patient, bei einer leichten Verringerung der Leukozytenzahl eine extreme Expansion klonaler CD4-negativer  $\gamma\delta$ -T-Zellen, die etwa 50% der Lymphozyten ausmachten. Diese T-Zellen waren dem histologischen Erscheinungsbild nach LGL-Zellen, also aktivierte NK-Zellen, und exprimierten eine sehr seltene Kombination des  $\gamma\delta$ -TCR und eine Reihe inhibierender NK-Rezeptoren. In 10 Zytotoxizitätstests gegen Erythroblasten und CD34-positive Stammzellen aus dem Knochenmark gesunder Spender zeigte dieser LGL-Klon eine eindeutige Präferenz in seinem zytotoxischen Verhalten gegenüber den Erythroblasten. Diese Präferenz ließ sich durch Blockade des MHC I anderer Zielzellen eindeutig belegen, da deren MHC I verdeckt und dadurch die Lyse dieser Zellen erhöht wurde. Auch zeigte dieser LGL-Klon eine klare Präferenz für eine Zelllinie, die ausschließlich ein HLA-C Allel exprimierte (LCL721.221 HLA-Cw7), das dem HLA-Typ des Patienten entsprach (HLA-A2/32, -B65/38, -Cw7/8).

Diese Beobachtung erklärt sich durch das Rezeptorrepertoire für KIR bzw. CD94/NKG2. Durchflußzytometrisch waren CD158a (p58.1, KIR2DL1), p70 (KIR3DL1) und CD94:NKG2A feststellbar, nicht jedoch CD158b (p58.2, KIR2DL2) und p140 (KIR3DL2). Dies bedeutet, daß die Effektoren nicht an das HLA-Cw7 Molekül der Zelllinie binden konnten und daß die inhibierenden Rezeptoren des LGL-Klons nur jeweils einen einzigen schwachen Liganden für den KIR3DL1 und CD94 auf körpereigenen Zellen finden konnten (Lanier, 1998). In der Situation eines reduzierten MHC I bedeutet dies ein autologes „missing self“ für die  $\gamma\delta$ -T-Zellen (Ljunggren, 1990). In ELI-Spot Tests konnte der Zeitpunkt der höchsten Angreifbarkeit der Erythroblasten auf ein spätes Differenzierungsstadium der Erythropoese festgelegt werden, in dem die MHC I Expression der Erythroblasten schon stark reduziert war. Eine Expressionssteigerung von MHC I durch Zugabe von  $\gamma$ -Interferon zum Expansionsmedium

fürte nahezu zum Verschwinden der zuvor beobachteten hohen Werte für die spezifische Lyse der Erythroblasten.

Durch diese Beobachtungen war es gelungen, gleich mehrere Sachverhalte erstmalig zu beschreiben:

(1) Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, daß die Reduktion der Expression des MHC I auf Erythroblasten während der Differenzierung zu reifen Erythrozyten schrittweise verläuft und nicht, wie bisher angenommen, schlagartig. Diese schrittweise Verringerung birgt potentiell die Gefahr für die Erythroblastenpopulation, von NK-Zellen oder  $\gamma\delta$ -T-Zellen nicht mehr als „selbst“ erkannt zu werden und von diesen Zellen der *innate immunity* getötet zu werden. Daß dem im gesunden Organismus nicht so ist, kann durch das Modell der Rezeptor-Kalibrierung von Kärre (Olsson, 1995; Sentman, 1995; Glas, 2000) zufriedenstellend erklärt werden. Indem NK-Zellen und andere KIR-positive Zellen die Oberflächenexpression von inhibierenden Rezeptoren sowohl quantitativ als auch qualitativ der MHC I Expression in den Geweben anpassen können, bleibt die Sensibilität der NK-Zellen gegenüber verändertem MHC I erhalten und ein Erkennen von abnormalen Veränderungen ist gewährleistet. NK-Zellen können auch nach ihrer Reifung den Schwellenwert für eine Inhibition durch „selbst“ MHC I verändern und damit auf die Entwicklung der Erythroblasten reagieren.

(2) Es konnte für den Menschen erstmalig gezeigt werden, daß NK-Rezeptoren exprimierende  $\gamma\delta$ -T-Zellpopulationen existieren, die vom autolog exprimierten MHC I nicht inhibiert werden. Dies wurde für H2-D<sup>b</sup> Mäuse zwar bereits gezeigt (Dorfman, 1996), konnte für den Menschen bislang aber nur postuliert werden. Dieser Fall von potentiell autoreaktiven, KIR-positiven Zellen kann sowohl durch das Modell der Rezeptor-Kalibrierung als auch durch das Modell der „allelic exclusion“ gerechtfertigt werden. Für die Reifung der KIR-positiven Zellen fordern beide Modelle lediglich ein genügend starkes Signal der „selbst“ MHC I erkennenden Rezeptoren, schließen aber die gleichzeitige Expression von anderen Rezeptoren nicht aus. Diese wurden zwar als potentiell gefährlich eingestuft, nicht aber als schädlich bewertet (Olsson, 1995; Raulet, 1997), da jederzeit andere Rezeptoren durch eine MHC I-Erkennung inhibierende Signale generieren können. Held (1997) fordert zwar einen negativen Selektionsmechanismus oder zumindest eine Regulation für diese Zellen, erkennt aber die offensichtliche Ungefährlichkeit der in der Maus schon beschriebenen Zell-Population an.

(3) Das wohl bedeutsamste Ergebnis dieses ersten Teilprojekts ist der Nachweis eines Krankheitswerts dieser potentiell autoaggressiven KIR-positiver Zellen im Menschen.

Der hier beschriebene  $\alpha\beta$ -T-Zell-Klon scheint durch ein längere Zeit zurückliegendes Ereignis zu einer starken klonalen Expansion veranlaßt worden zu sein. Die Art dieses Ereignisses war jedoch nicht mehr nachvollziehbar. Nach Groh (1998) binden V $\alpha$ 1-TCR, wie das des V $\alpha$ 4- $\beta$ 1-Rearrangement des Patienten, an streßinduzierte MHC Klasse Ib ohne Microglobulin- $\beta$ , MIC-A und MIC-B, die für intestinale Tumoren beschrieben wurden, wie auch auf CD1 exprimierenden T-Zell ALL-Blasten (akute lymphatische Leukämie). Tumoren dieser Art sind für den Patienten bisher jedoch nicht beschrieben worden. Für extranoduläre periphere neoplastische Erkrankungen wurden vor kurzem virale Infektionen mit HCMV oder EBV als ein auslösendes Moment für eine Aktivierung und Expansion von NK- und T-Zelle nachgewiesen (Jaffe, 1999). Dies scheint als Auslöser möglich, da in der Anamnese eine normal verlaufene EBV-Infektion erwähnt wurde.

Eine Selektivität für erythroide Vorläuferzellen aufgrund einer Bindung des  $\alpha\beta$ -TCR an exklusiv erythrocytäre Oberflächenproteine konnte zwar nicht ausgeschlossen werden, war in diesem Fall aber unwahrscheinlich, da Erythroblasten weder CD1 exprimieren noch MIC-A- oder MIC-B-positiv sind. Die Erhöhung der spezifischen Lyse sowohl der Erythroblastenpopulationen, als auch der Kontrollpopulationen (CD34-positive Stammzellen, CD15-positive myeloide Progenitoren, B-Zelllinie LCL721.221 HLA-Cw6 bzw. -Cw7) nach Blockierung des MHC I durch einen monoklonalen Antikörper ( $\alpha$ -MHC I Mab, W6/32), sprach ebenfalls gegen eine Spezifität aufgrund eines erythroblastären  $\alpha\beta$ -TCR Liganden. Eine Aktivierung der  $\alpha\beta$ -T-Zellen durch eine TCR-Bindung war also auch für andere Zellpopulationen beobachtbar. Die Expressionsdichte des MHC I der Kontrollpopulationen erlaubte aber scheinbar das Erreichen eines Schwellenwerts der inhibierenden Signale durch Einbeziehen der anderen NK-Rezeptoren. Der ebenfalls durchgeführte „rescue“ erythroider Progenitorzellen aus *in vitro* Expansionskulturen CD34+ Zellen durch Zugabe von  $\beta$ -Interferon zum Kulturmedium und eine darauf folgende Steigerung der MHC I-Expression der Erythroblasten, bzw. dessen Zurücknahme durch Blockierung des neu gewonnenen MHC I, deuten in die selbe Richtung. Die Blockierung der verschiedenen inhibierenden Rezeptoren mit  $\alpha$ -KIR Mabs beleuchtete die andere Seite der Bindungsscheibe. Alle vorgefundenen Rezeptoren waren inhibierend und nicht aktivierend, und in ihrer inhibierenden Wirkung deutlich gestaffelt. An HLA-C bindende KIRs generieren um einen Faktor 2 bis 5 höhere bzw. stärkere Signale (van der Merve, pers. Komm. Unveröffentlicht). Unterstützt wurde diese Beobachtung durch Messungen der Bindungsenergie,

der Thermodynamik und Kinetik der Bindung KIR:HLA-C und der Expressionsdichte für verschiedene KIRs (Döhning, 1996; Valiante, 1997).

Die Ursache für die pathogene Wirkung des vor-aktivierten LGL-Klons liegt also nicht in der spezifische Bindung seines  $\alpha\beta$ -TCR an Erythroblasten, sondern vielmehr am Fehlen eines inhibierenden Signals des „selbst“ HLA-C nicht erkennenden KIR2DL1.

Die hier beschriebene Konstellation der Expression von NK-Rezeptoren und MHC I Subtypen mag zwar sehr selten sein, scheint aber sowohl in der Maus (Olsson, 1997), wie auch im Menschen (Neu, Brockmann, Grau, Geiselhart, Handgretinger und Speer zur Publikation eingereicht; Frohn, 1997) keine Ausnahme darzustellen. Zunehmend verbesserte diagnostische Möglichkeiten und eine wachsende Aufmerksamkeit auf NK-Zellen, insbesondere auf deren inhibierende Rezeptoren, werden in naher Zukunft sicher noch mehr Licht in die bisher kaum bekannten Zusammenhänge der Pathogenese vieler Erkrankungen und dem System der inhibierenden Rezeptoren der Zellen lymphoiden Ursprungs bringen können.

In einem zweiten Fall von absoluter Erythroblastopenie zeigte der Patient ebenfalls eine klonale Expansion von  $\alpha\beta$ -T-Zellen, die reaktives zytolytisches Verhalten gegenüber Erythroblasten allogener Spender beobachten ließen. In diesem Fall trat die Erythroblastopenie nach Behandlung einer B-Zell-Leukämie durch eine Stammzelltransplantation auf. Nach erfolgreicher Transplantation und einer mehrere Wochen dauernden Komplikation durch eine HCMV-Infektion des Patienten trat eine hämolytische Erythropenie auf. Als Ursache hierfür konnte die  $\alpha\beta$ -T-Zell-Expansion insofern gezeigt werden, als die Symptomatik der Erythroblastopenie nach längerer Gabe von Cyclosporin A mitsamt der  $\alpha\beta$ -T-Zell-Population verschwand.

Ein weiterer Beweis für einen ursächlichen Zusammenhang der Erythroblastopenie und der klonalen Expansion dieser T-Zellen mit einer ungewöhnlichen V $\beta$ 1- $\beta$  TCR Rekombination konnte *in vitro* erbracht werden. Versuche mit unseparierten Lymphozyten ergaben eine deutliche Präferenz in der Lyse allogener Erythroblasten gegenüber CD34+ Stammzellen des gleichen Spenders. Im Gegensatz zu den LGL-Zellen des ersten Patienten mit „pure red cell aplasia“, bei dem mehrere Versuche den reaktiven  $\alpha\beta$ -T-Zell-Klon *in vitro* zu kultivieren fehlschlagen, konnten beim zweiten Fall dieser Erkrankung Zelllinien der klonal expandierten Zellen angelegt werden. Auch diese Zelllinien zeigten zytotoxisches Verhalten gegenüber Zielzellen, deren MHC I-Expression reduziert war. Dies konnte in Zytotox-Tests wie auch in ELI-Spot Tests gezeigt werden, in deren Verlauf bei den Patienten-Zelllinien eine starke Stimulierbarkeit beobachtet werden konnte. Dieser zweite Fall einer absoluten

Erythroblastopenie kann somit als Bestätigung der Aussagen gewertet werden, die aufgrund der Untersuchungen mit Zellen des ersten „pure red cell aplasia“-Patienten getroffen wurden.

Im Rahmen weiterer Versuchsreihen wurden  $\square$ -T-Zell-Klone und NK-Klone aus dem Blut gesunder Spender generiert. Das Ziel dieser Versuche war es, ein Laborsystem zu errichten, mit dessen Hilfe Mechanismen in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen aufgeklärt werden können. Die mit diesen Klonen durchgeführten Versuche entsprachen denen, die mit  $\square$ -T-Zellen der beiden Erythroblastopenie-Patienten unternommen wurden.

Die  $\square$ -T-Zell-Klone H25 und A23 zeigen, ebenso wie die Zelllinien des zweiten Erythroblastopenie-Patienten eine Selektivität gegenüber Zellen, deren MHC I den inhibierenden NK-Rezeptoren der  $\square$ -T-Zell-Klone keinen Bindungspartner bot. Erythroblasten wie auch MHC I in höherem Maße exprimierende myeloide Vorläuferzellen von Spendern, deren MHC I von den KIR der getesteten Klone gebunden werden konnte, wurden in deutlich geringerem Maße lysiert.

Die Ergebnisse der Versuche mit den NK-Zelllinien E4, E10 und D5 weisen in die gleiche Richtung. Keine der drei Zelllinien exprimierte einen durchflußzytometrisch meßbaren KIR. Dies ließ eine starke zytotoxische Aktivität dieser Zelllinien erwarten, da eine Inhibition durch eine Bindung der -nicht vorhandenen- NK-Rezeptoren an den MHC I der Zielzellen ausbleiben mußte. Diese Erwartungen erfüllend zeigten die NK-Zellen starkes zytolytisches Verhalten gegenüber allen allogenen Zielzellen. Besonders hohe Lyse-Raten waren gegenüber Erythroblasten-Populationen sowohl aus Knochenmark als auch aus *in vitro* Expansions-Kulturen zu beobachten, die MHC I in nur geringem Maße bildeten. Eine geringere spezifische Lyse von CD34+ Stammzellen und myeloiden Progenitor-Zellen im Vergleich zu Erythroblasten kann durch eine zumindest geringe Bindung von HLA-E an den von allen NK-Zelllinien exprimierten CD94/NKG2A Rezeptor erklärt werden. Auf diese Weise erklärt sich die überdurchschnittlich hohe spezifische Lyse von allogenen CD34+ Zielzellen eines Spenders, dessen MHC I nicht als Leader-Peptid auf HLA-E präsentiert werden konnte, da die Peptide dieser Allele nicht an HLA-E binden. Eine Selektivität der NK-T-Zelllinien in Bezug auf den HLA-Typ der getöteten Zielzellen konnte nicht beobachtet werden.

Die Beobachtungen aus den Versuchsreihen mit NK-Zelllinien und  $\square$ -T-Zell-Klonen bestätigen die Schlüsse, die aus den Untersuchungen mit dem Blut der Erythroblastopenie-Patienten gewonnen wurden. Hier konnte mit Klonen, also auf dem Niveau einzelner Effektorzellen gezeigt werden konnte, daß eine verminderte Expression von MHC I diese Zellen zum Ziel von Effektor-Populationen der *natürlichen Immunabwehr* werden lassen kann.

Eine wesentliche Rolle spielen hierbei die Rezeptoren der KIR2DL-Familie. Sie scheinen für die Selektivität der Killerzellen gegenüber Zielzellen verantwortlich zu sein. Das zeigten Eli-Spot- und Zytotoxizitätstests in denen die Effektorzellen durch autologe Stammzellen oder Erythroblasten stimuliert werden konnten, deren MHC I den Rezeptoren dieser Familie keinen Bindungs-Partner bietet.

Im Rahmen des zweiten Teilprojekts (Kapitel B2: Existenz von humanen, autoaggressiven NK-Zellen und die Bedeutung von inhibierenden Rezeptoren der KIR2DL-Familie bei einer gegen autologe Stammzellen gerichteten Reaktivität dieser Zellen) konnte erstmals die Existenz humaner autoaggressiver NK-Zellen nachgewiesen werden. Am Beispiel einer bislang in der Literatur noch nicht beschriebenen Reaktivität dieser NK-Zellen gegen autologe CD34-positive hämatopoetische Stammzellen gelang es, die Bedeutung von inhibitorischen Rezeptoren der KIR2D-Familie aufzuklären.

Diese NK-Zellen, in deren Rezeptorrepertoire auch solche Rezeptoren beinhaltet sind, die „selbst“ MHC I nicht erkennen, sind in der Lage körpereigene Gewebe zu schädigen. Diese Möglichkeit besteht, da aufgrund einer fehlenden Bindung dieser Rezeptoren an MHC I der für eine Inhibition der NK-vermittelten Lyse von Zielzellen erforderliche Signal-Schwellenwert nicht erreicht wird.

Diese, durch ihr Repertoire an inhibierenden NK-Rezeptoren gekennzeichnete NK-Zell-Population konnte durch mehrere Sortierschritte aus dem Lymphozytenkonzentrat einer Blutspende gewonnen werden. Die Wahl der KIR2DL-Rezeptoren, auf deren Expression hin die Zellen einer bereits reinen NK-Population von mir sortiert wurden, war so getroffen worden, daß die Rezeptoren auf körpereigenen Zellen keinen inhibierenden Liganden finden konnten. Die aufgereinigte Zellpopulation, unter deren Rezeptoren zumindest ein „selbst“ MHC I nicht-bindender KIR zu finden wäre, repräsentierte -individuell nach Spendern unterschiedlich- etwa 1% - 5% der CD56-positiven Zellen. Bezogen auf etwa 0,5-0,9 Milliarden Lymphozyten aus einen halben Liter Blut eines gesunden Spenders sind dies etwa 0,2-1,2 Millionen Zellen, die doppelt-positiv für KIR2DL2 (p58.2, CD158b) und CD56 sind,. Die NK-Zellen wurden ohne vorherige Inkubation mit Mitogenen oder den aktivierenden Zytokinen IL-2 oder IL-12 in einer Reihe von Tests oder für eine Klonierung in limitierender Verdünnungsreihe eingesetzt.

Bei etwa der Hälfte der 19 untersuchten Spender zeigte diese NK-Population reaktives Verhalten gegenüber autologen hämatopoetischen CD34-positiven Stammzellen, deren Kolonie-bildendes-Potential dadurch stark oder völlig unterdrückt wurde.

Alle untersuchten NK-Populationen exprimierten mit KIR3DL1 oder CD94/NKG2 einen Rezeptor, der ein HLA-Allel des autolog exprimierten MHC I erkennen konnte. Die Bindung war gleichwohl sehr viel schwächer (Döhning, 1996) und die Expressionsdichte der Rezeptoren und deren inhibierende Wirkung sehr viel geringer (Vales-Gomez, 1998).

Die Steigerung der NK-Reaktivität durch eine Blockade des MHC I der Zielzellen beweist die Bindung an MHC als essentiell für die Erzeugung des inhibierenden Signals. Dies kann insbesondere an der Verminderung der Stammzell-Vitalität der Negativkontrollen beobachtet werden, die ohne MHC I Blockade keine Verringerung der Koloniezahl zeigen. Durch die Blockade und Kreuzvernetzung der KIR2DL und die dadurch verursachte Aktivierung der Rezeptoren konnte ebenfalls gezeigt werden, daß die an HLA-C bindenden NK-Rezeptoren für die Inhibition des Koloniewachstums verantwortlich waren. Der Beweis für die Notwendigkeit eines direkten Zell-zu-Zell-Kontakts erbrachte das Trans-Well Experiment. Vor kurzem veröffentlichte Untersuchungen über die Kinetik und die Dynamik der Bindung der NK-Zellen an ihre Zielzellen (Long, 2000) weisen in die gleiche Richtung und unterstreichen die wichtige Rolle der KIR2DL-Rezeptorfamilie für die Kontrolle und die Inhibition NK-vermittelter Lyse autologer Zellen. Indizien für die Art des inhibierenden Mechanismus liefert der Nachweis eines größtenteils intakten Chromatins der proliferationsunfähigen Stammzellen durch die Anfärbung mit Propidium-Iodid. Sowohl das Ausbleiben einer Expressionssteigerung von KIR und Fas-Ligand (CD178) auf den Effektoren, als auch das Fehlen des frühen Apoptose-Markers Phosphatidylserin auf den Stammzellen deuten auf einen sehr schnellen Effektorweg. Die Aktivierung autonomer Todesmechanismen der Zielzellen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, erscheint jedoch unwahrscheinlich.

Diese Beobachtungen sowie das Ausbleiben einer Zytokin-Produktion durch die NK-Zellen deuten auf eine denkbare Rolle der untersuchten Zellpopulation als einsame Jäger im Dienste einer peripheren Kontrolle aberranter Zellen des Blutes. Ein Krankheitswert dieser NK Population, wie er bei der LGL-induzierten Erythroblastopenie bewiesen werden konnte, kann diskutiert werden (Valiante, 1997), ist aber eher unwahrscheinlich, zumal sich alle Blut-Spender der KIR2DL-positiven NK-Zellen bester Gesundheit erfreuen.

Die beiden derzeit diskutierten Modelle für die Regulation der Expression von NK-Rezeptoren, die Rezeptor-Kalibrierung (Olsson, 1995) und die „allelic exclusion“ (Held, 1995), postulieren

das Vorkommen solcher NK-Zellen für den Menschen. In der Maus konnte die Existenz dieser Zellpopulation bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen werden (Höglund, 1997, 1998; Salcedo, 1997; Held, 1998).

Das Modell der Rezeptor-Kalibrierung erklärt die Expression von funktionslosen, da ligandenlosen KIR einerseits mit der zufälligen Auswahl der exprimierten Rezeptoren während der NK-Reifung und andererseits mit der Fähigkeit, auch nach ihrer Reifung die Oberflächenexpression der KIR an die Expressionsdichte des MHC I in peripheren Geweben anzupassen und Rezeptoren auch *de novo* zu präsentieren (Johansson, 1997). Ein autoaggressives Potential wird von Kärre (Kärre, 1997) zwar eingeräumt, die Gefahr einer Autoreaktivität jedoch als unwahrscheinlich angesehen. Andere Rezeptoren sollten durch die Bindung an MHC I jederzeit in der Lage sein, inhibierende Signale in genügender Zahl und Stärke generieren zu können, daß das Fehlen der Inhibition durch ein HLA Allel durch andere ausgeglichen werden kann (Olsson, 1997). Im Rahmen der Anpassung der Rezeptordichte auf NK-Zellen könnten diese Rezeptoren sogar hohe Expressionsdichten zeigen, da ihre Zahl nach oben reguliert werden würde. Dadurch können schwache Bindungen oder eine geringe Expression des Liganden auf den Zielzellen ausgeglichen und ein ausreichend starkes inhibierendes Signal generiert werden (reviewed in Höglund, 1997).

Auch das Modell der „allelic exclusion“ und der „sequential receptor activation“ von Raulet und Held (in Held, 1995), schließen „fremd“-erkennende Rezeptoren auf NK-Zellen nicht aus. Beide Theorien akzeptieren die Expression dieser Rezeptoren während des Verlaufs der NK-Reifung und ihre Fixierung im Rezeptorrepertoire. Nachdem ein ausreichend starkes inhibierendes Signal durch die Bindung eines KIR an autolog exprimierten MHC I erzeugt worden ist, würde der Rekombinationsprozeß in der unreifen NK-Zelle abgeschlossen und die bis zu diesem Zeitpunkt durch die Zelle exprimierten Rezeptoren dort auch weiterhin gebildet werden. Die Erzeugung eines inhibierenden Signals durch Bindung zumindest eines Rezeptors an MHC I würde die Lyse normalen Gewebes durch autologe NK-Zellen verhindern und könnte fehlende Signale anderer Rezeptoren kompensieren. Die Regulation der Expressionsdichte dieser ligandenlosen KIRs sollte in einem später einsetzenden Prozeß erfolgen. Hierfür zieht Raulet (in Held, 1996) den Mechanismus einer Rezeptor-Kalibrierung in Betracht, für den er eine flexible posttranskriptionelle Regulation der KIR-Oberflächenexpression (Held, 1997) vorschlägt. Eine für diese Zellen in Erwägung gezogene Anergie konnte in allen bisher berichteten Untersuchungen ausgeschlossen werden (Dorfman, 1996).

Die im Teilprojekt B2 untersuchte KIR2DL2-positive NK-Population entspricht, der Stadieneinteilung von Raulet (1997) und Held (1996) folgend, einer unreifen NK-Zelle. Beide Autoren postulieren für diese NK-Stadien einen Selektionsmechanismus, der diese potentiell autoaggressiven Killerzellen ausschaltet. Das hier gezeigte autoreaktive Potential einer NK-Population, deren inhibierende NK-Rezeptoren autolog keinen Bindungspartner finden, steht folglich im Widerspruch zu den hier nochmals dargestellten Modellen.

Eine Übertragung der *in vitro* gewonnenen Daten auf die *in vivo* Situation im Menschen ist in Hinsicht auf die Interaktion mit anderen Zellen des Immunsystems jedoch schwierig, da in dem hier entwickelten Laborsystem weder T-Zellen noch Dendritische Zellen, Macrophagen oder B-Zellen anwesend waren. Ein Wechselspiel gegenseitiger Aktivierung oder Hemmung durch Zytokine und Chemokine kann nicht ausgeschlossen werden (Wiltrout, 2000). Eine Klärung dieser Frage könnte durch ein Tiermodell geleistet werden. In „knock out“ oder „knock in“ Mäusen könnte durch gezielte Manipulation des Genoms eine Situation geschaffen werden, die dem hier beschriebenen *in vitro* System entsprechen würde. Denkbar wäre eine Veränderung der regulativen Bereiche der Genexpression oder der Gene inhibierender Rezeptoren selbst, oder aber der codierenden Bereiche des MHC I (Johansson, 2000). Nur auf diese Weise kann geklärt werden, ob eine klonale Expansion oder Aktivierung dieser NK-Zellen, die den eigenen Organismus nicht als „selbst“ erkennen, zu Ausfällen oder sichtbaren Erkrankungen führt. Denkbar wäre, daß diese NK-Zellen einen wichtigen Baustein bei der Entstehung von verschiedenen Krankheiten darstellen, wie zum Beispiel für Aplastischen Anämien (Teramura, 1996), virusinduzierter rheumatoider Arthritis (Frickhofen, 1994; Altschuler, 1999), oder anderer Autoimmunerkrankungen (Sivakumaran, 1997). Hierbei scheinen NK-Zellen durch eine vorangegangene Virusinfektion mit humanen Eppstein-Barr-Virus oder Zytomegalie-Virus jenen nötigen Anstoß zu erfahren (Pellenz, 1996; Hart, 1992), der nötig ist, um anerge und tolerante Zellen zu aktivieren und zu klonaler Expansion zu veranlassen (Johansson, 1997; Jaffe, 1999).

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte *in vitro* System ermöglicht es, die Rolle der KIR2DL-Rezeptoren bei der Inhibition der NK-vermittelten Lyse anderer Zellen zu untersuchen und wird für die klinische Forschung in der Stammzell-Transplantation in nicht allzu ferner Zukunft eine Anwendung finden. Die Suszeptibilität peripherer CD34-positiver hämatopoetischer Stammzellen gegenüber NK-vermitteltem Killing eröffnet erstmals die Möglichkeit der Untersuchung der von aktivierenden Rezeptoren der NK-Zellen (NCR) erkannten Liganden auf humanen Stammzellen (Moretta, 2000; Bottino, 2000; Carbone, 2000). Bisher wurden MIC-A

und Retinsäure-induzierbares-Antigen als MHC I-verwandte Liganden für aktivierende Varianten der CD94/NKG2G Rezeptoren identifiziert (Lopez-Botet, 2000; Perez-Rodriguez, 2000; Diefenbach, 1999). Untersuchungen hierzu sind für CD34-positive hämatopoetische Stammzellen aber leider noch nicht durchgeführt worden.

Ebenso reizvoll ist die Untersuchung der Gründe dieser Angreifbarkeit der Stammzellen durch NK-Zellen, da autologe Stammzellen in der Literatur bisher als nicht angreifbar definiert wurden (Olsson, 1995; Raulet, 1997).

## **D Material und Methoden**

### **Methoden**

#### **1 Isolation von Mononucleären Zellen aus Peripherblut, Nabelschnurblut, Knochenmarkspunktat, Leukozytenkonzentraten und Decidua:**

##### **1.1 Herkunft der Proben**

Als Probenmaterial wurden Nabelschnurblut von Neugeborenen, Peripherblut und Leukozytenkonzentrat, sowie Leukaphereseprodukt und Knochenmark gesunder erwachsener Spender verwendet. Zusätzlich wurde aus Decidua-Präparaten der Schwangerschaftswochen 6-12 die Leukozyten isoliert. Leukaphereseprodukt, Reste der Stammzellaufreinigungen und Knochenmark wurde freundlicherweise vom KMT-Labor der Kinderklinik, Universität Tübingen zur Verfügung gestellt. Proben von Erythropenie-Patienten wurde von der Medizinischen Klinik, Abteilung II und der Kinderklinik, Kinderheilkunde 1, Abteilung Hämatologie/Onkologie, Universität Tübingen nach Absprache mit den Patienten und Prüfung und Einverständnis der örtlichen Ethikkommission zur Verfügung gestellt. Nabelschnurblut wurde freundlicherweise von der Geburtshilflichen Abteilung der Frauenklinik, Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt. Bei den Decidua-Präparaten handelte es sich um Gewebe, das aus Schwangerschaftsabbrüchen gewonnen wurde. Es wurde von Ärzten der örtlichen Frauenklinik präpariert und sofort aufgearbeitet. Die Schwangerschaften wurden zwischen der 6. und 12. Schwangerschaftswoche beendet.

Für das Arbeiten mit humanem Geweben und Zellen aus dem Blut freiwilliger Spender wurde ein Votum der Ethik-Kommission der Universität Tübingen eingeholt. Alle hier beschriebenen Arbeiten wurden als ethisch unbedenklich und konform mit den Statuten der Ethik-Kommission bewertet.

##### **1.2 Auftauen von Zellen**

Tiefgefrorene Zellen (Stammzellen, lagern in einer Mischung aus FCS und DMSO in flüssigem Stickstoff bei etwa  $-176^{\circ}\text{C}$  oder für kürzere Zeit bei  $-80^{\circ}\text{C}$  im Kühlschrank. DMSO lagert sich in die Zellmembran jeder Zelle ein und destabilisiert die Zelle und führt auf diese Weise zur Lyse der Zelle. Da DMSO während des Einfriervorgangs die Zellen vor Schäden durch Kristallbildung schützt, schädigt DMSO die Zellen im warmem, aufgetauten Zustand. Beim Auftauen tiefgefrorener Zellen ist daher ein schnelles Arbeiten unerlässlich.

Zellen werden in einem Wasserbad bei 37°C kurz aufgetaut und sofort in 10 ml kaltes RPMI 1640-Kulturmedium überführt. DMSO wurde durch Zentrifugation der Zellen entfernt (Hettich Rottixa/RP; Zentrifugation bei 450 g, 6 min, 20°C; Auslauf mit maximaler Bremse), ein weiteres mal auf diese Weise gewaschen und mit frischem Medium versorgt.

Durch Zentrifugation pelletierte Zellen wurden in Einfriermedium resuspendiert und schnellstmöglichst bei -80°C gelagert und gegebenenfalls danach in Flüssigstickstoff überführt.

### **1.3 Isolierung mononukleärer Zellen aus Blutproben und Leukozytenkonzentraten**

Mononukleäre Zellen wurden mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation angereichert (Böyum, 1968). Hepariniertes Vollblut wurde hierzu mit PBS/EDTA 5 mM im Verhältnis 1:2 (v/v) verdünnt. In 50-ml-Plastikröhrchen wurden 15 ml Lymphoprep™ (Nycomed) vorgelegt. Lymphoprep ist ein nichtionisches synthetisches Polymer aus Saccharose. Bis zu 35 ml des verdünnten Blutes wurden vorsichtig überschichtet; da Vermischungen an der Grenzschicht die Auftrennung stören, sollten sie vermieden werden. Zur Ausbildung eines Gradienten wird das Röhrchen zentrifugiert (Hettich Rottixa/RP; Zentrifugation bei 400 g, 30 min, RT; Auslauf mit kleiner Bremse). An der ursprünglichen Grenzschicht zwischen Lymphoprep und verdünntem Blut ist ein weiter Ring erkennbar. Dabei handelt es sich um die Zone mononukleärer Zellen. Der Überstand im Bereich oberhalb des mononukleären Zellrings enthielt vorwiegend Thrombozyten und wurde verworfen, die Schicht mononukleärer Zellen großzügig abpipettiert und in ein frisches 50-ml-Plastikröhrchen überführt. Um die Dichte der Lymphoprep-suspension herabzusetzen, wurde die Suspension aus mononukleären Zellen mindestens 1:2 (v/v) mit PBS/EDTA 5 mM verdünnt. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert (Zentrifugation bei 550 g, 15 min, 20°C). Das Zellsediment wurde erneut in PBS/EDTA 5 mM gewaschen und durch Zentrifugation aufkonzentriert.

### **1.4 Isolation von NK-Zellen aus Dezidua**

Die Gewebeprobe wurde unter sterilen Bedingungen mit Schere und Pinzette in einer Petrischale kleingeschnitten und das zerkleinerte Gewebe mit einer Pipette in Medium resuspendiert und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurde Kollagenase (Endkonzentration der Kollagenase 2mg/ml) dem Gewebe zugegeben und ca. 2h bei Raumtemperatur geschüttelt bis eine gleichmäßige Zellsuspension entstand. Danach wurde die Zellsuspension mit PBS verdünnt, gut gemischt und 5 min in Ruhe gelassen, so daß sich die noch vorhandenen Gewebestücke absetzen konnten. Der Überstand wurde vorsichtig auf Trennmedium (Lymphoprep™) aufgeschichtet und zentrifugiert (800g, keine Bremse, 20°C) (Timonen, 1980, 1982). Der mononukleäre Ring wurde abgesaugt, in neues PBS gegeben und 12 min bei 450 g und 12°C abzentrifugiert (1. Waschgang); ein zweiter Waschschriff mit PBS erfolgte für 10 min bei 400 g und 4°C. Die Zellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen, gezählt und sind für die weitere Versuche zur Verfügung.

Alternativ zur enzymatischen Zellaufbereitung wurden die Decidua-Präparate auch rein mechanisch mit Pinzette und Schere und durch ein engmaschiges Metallsieb zerkleinert und nachfolgend weiter aufbereitet (s.o.).

## **2 Zellsortierung**

### **2.1 Zellsortierung mit Hilfe von FACS-Sortierung (Becton Dickinson):**

#### **2.1.1 Prinzip des FACStar<sup>PLUS</sup>**

Der FACStar<sup>PLUS</sup> ist eine Weiterentwicklung des herkömmlichen Durchflußzytometers und basiert auf dem Grundprinzip der Vermessung der gefärbten Zellen auf die Parameter FSC, SSC, FL1, FL2 und FL3. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse können die Zellen sortiert werden. Das Gerät ist in der Lage, gleichzeitig zwei unterschiedliche Populationen aus einer Zellsuspension herauszusortieren und sie einzeln in je ein Well einer 96-Well-Platte zu platzieren. Technisch wird diese Möglichkeit dadurch ermöglicht, daß der Flüssigkeits-Trägerstrahl, der die Zellen perlschnurartig aufgereiht enthält (und so den Laser passiert) mit kurzen elektrischen Signalen auflädt. Dieser Trägerstrahl wird durch einen Oszillations-Mechanismus in einzelne Tropfen zerlegt, die idealerweise jeweils eine Zelle enthalten. Bevor die Tropfen den Abfallbehälter erreichen werden sie zwischen zwei Metallplatten vorbeigeführt, die ebenfalls mit einem kurzen elektrischen Signal belegt werden können. Die Elektronik des Gerätes ist in der Lage, Meßergebnis, Aufladung des Trägerstrahls (Tropfen) und Aufladung der Metallplatten so zu synchronisieren, daß gezielt einzelne Zellen aufgrund der elektrischen Polarisationsverhältnisse aus dem Trägerstrahl heraus in ein Sammelgefäß hinein abgelenkt werden können.

Die technisch notwendige Anordnung dieser zusätzlichen Komponenten bedingt einen wesentlichen Unterschied zum FACScan<sup>TM</sup> oder FACScalibur<sup>TM</sup>. Die Lagerung der Optik erfolgt beim FACStar<sup>PLUS</sup> in Luft und führt so zu einer schlechteren Sensitivität für einzelne Signale.

Für das Sortieren wurden die Zellen nach enzymatischer Isolation, Voraufreinigung durch Dichtegradienten-Zentrifugation oder MACS-Sortierung gefärbt und anschließend sortiert. Ein wesentliches Problem besteht in der maximalen Geschwindigkeit des Zellsorters. Es werden nur maximale Meßraten von 2000-5000 Events pro Sekunde erreicht; der Prozeß des Sortierens erfolgt bei großen Zellmengen für bis zu 10 Stunden.

### **2.2 Magnetpartikel-Konzentrations-System (Dynal)**

Die Isolierung z.B. CD34+ Stammzellen erfolgt durch ein immunomagnetisches Isolierungsverfahren (Smeland 1992; Egeland, 1994). Die Zellen wurden mit einem CD34-spezifischem Antikörper markiert (Sutherland, 1992). Hierbei lag der Antikörper gekoppelt an superparamagnetische Polyesterkügelchen vor, die etwa in der Größenordnung von mononukleären Zellen (Durchmesser 4,5 µm) lagen und im lichtmikroskopischen Bild deutlich sichtbar waren. Die Anreicherung CD34+ Zellen erfolgte im „Batch“-Verfahren, ein säulenchromatografisches Verfahren wurde nicht verwendet. Hierzu wurden Zellen im Probenröhrchen unter dem Einfluß eines von außen

angelegten Magnetfeldes in antikörpermarkierte und nichtantikörpermarkierte Zellen getrennt. Nichtantikörpermarkierte Zellen, die frei in Suspension vorliegen, werden verworfen. Antikörpermarkierte Zellen, die sich unter dem Einfluß des Magnetfeldes am Röhrchenrand gesammelt haben, werden mehrfach mit Puffer nachgewaschen. Zur Ablösung der Magnetpartikel werden die isolierten Zellen mit DETACHaBEAD™-Lösung inkubiert. Dabei handelt es sich um eine Mischung polyklonaler Antikörper, die spezifisch das Fab-Fragment des CD34-Antikörpers erkennen (Egeland, 1993). Freie, magnetgekoppelte Antikörper werden durch erneute Verwendung eines Magnetfeldes abgetrennt, Zielzellen ohne Antikörpermarkierung werden mehrfach nachgereinigt. Der Verlauf der Reinigung wurde im lichtmikroskopisch verfolgt. Mit dieser Methode konnte sehr effizient und schnell die CD3<sup>+</sup> Zell-Fraktion aus einer auf CD56 vorangereicherten Zellpopulation depletiert werden. Die Konzentration der eingesetzten Dynal-Beads wurde nach den Angaben des Herstellers berechnet.

### **2.3 Zellisolationen mit Hilfe von paramagnetischen Microbeads (MACS™, Miltenyi Biotech)**

Dieses Isolierungssystem ist ein säulenchromatographisches System zur Isolation mAk-markierter Zellen (Miltenyi 1990; Radbruch 1994). Zellmaterial unterschiedlicher Herkunft wurde mit Antigen-spezifischem mAk inkubiert, wobei unspezifische Bindungen zuvor durch Zugabe von humaner Immunglobulinmischung abgesättigt wurden. Die von Miltenyi angebotenen Antikörper sind durch Haptenbrücken an superparamagnetische Partikel (Microbeads, Durchmesser 50 nm) gekoppelt, die nur elektronenmikroskopisch darstellbar sind. Eine Anreicherung markierter Zielzellen erfolgt mit Hilfe eines Magnetfeldes und der Säulentypen MS<sup>+</sup> und VS<sup>+</sup> (Miltenyi Biotec). Sie verfügen über eine magnetisierbare Matrix, die durch beschichtete Kunststoff ummantelt ist.

Die Zellen wurden in Gegenwart eines sehr starken Magnetfeldes auf die Säule aufgetragen, das laut Herstellerangaben bei mehr als 10.000 T/m liegt. Ungebundene Zellen wurden mehrmals mit MACS-Puffer gewaschen und gebundene Zellen schließlich außerhalb des Magnetfeldes mit MACS-Puffer durch Stempeldruck schnell aus der Säule entfernt. Um einem Verstopfen der Säulen vorzubeugen, sollte der MACS-Puffer im Ultraschallbad zuvor entgast worden sein und während der Zell-Separation stets auf Eis gelagert werden. Da Zellen aus Leukapheresematerial und Knochenmark während der Isolation großem mechanischem Streß ausgesetzt ist und stets einen Anteil an leicht adhärierenden roten Blutzellen enthalten, besteht die Gefahr, daß geschädigte Zellen Chromatin frei setzten, das Zellen verklebt und an die Säulenmatrix adhärirt. Bei diesen Ausgangsmaterialien ist es daher ratsam, vor dem Auftragen auf die Säule einen DNase- oder Collagenase-Verdau durchzuführen. Ein Dnase-Verdau erfolgt für 45-120 min bei Raumtemperatur im Drehschüttler bei einer Endkonzentration der Dnase 1 von 200U/ml. Collagenase B wird in einer Endkonzentration von 0,02 % eingesetzt. Danach die Zellsuspension über ein Nylonsieb der Maschenweite 40 oder 70 µm (Falcon Cell strainer, Becton Dickinson) filtriert werden.

Die Bindung der Microbead-gekoppelten mAk (Milteyi Biotech, Bergisch Gladbach) erfolgt bei 4-8°C im Dunkel für etwa 15 bis 30 min. Hierbei sollte das Gesamtvolumen aus Kostengründen klein gehalten werden, da laut Herstellerangaben etwa 20 % (v/v) Antikörperlösung zugegeben wird. Ungebundene mAk werden durch zweimaliges Waschen mit MACS-Puffer und nachfolgende Zentrifugation der Zellen entfernt. Die Aufreinigung wurde ansonsten nach Herstellerangeben durchgeführt (Miltenji, Bergisch Gladbach). Verwendet wurden Anreicherungs-Säulen der Formate Mini-, Midi-, Maxi-, Vario- und AutoMACS. Die Oberflächenantigene, gegen

die sich mAk richteten, die zur Aufreinigung von Lymphozyten-Populationen verwendet wurden, waren CD3, CD4, CD8, CD13, CD14, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD56,  $\alpha$ -TCR, Glycophorin-A und gegen FITC, gegen PE und gegen Maus gerichtete Antikörper für eine indirekte Anreicherung (Handgretinger, 1990; Häcker, 1992; Pfeffer, 1992; Semple, 1993; Neu, 1996; Kuypers, 1996; Hildebrandt, 1997).

Für eine indirekte Anreicherung, wie z.B. der Glycophorin-A<sup>+</sup> Erythroblasten, KIR2DL1/2<sup>+</sup> NK-Zellen oder Zytokin-sezernierender Effektorzellen waren die Microbeads an den zweiten Antikörper gekoppelt. Dieser Zweitantikörper richtete sich spezifisch gegen Fluorochrome wie FITC oder PE oder gegen Isotypen artfremder IgG (z.B. Ratte-anti-Maus IgG1).

### **3 Characterisierung und Phänotypisierung von Zellen**

#### **3.1 Zytospin**

Für Zytospinpräparate werden jeweils 40.000-50.000 Zellen in 100  $\mu$ l PBS unter Zentrifugation (5min, geringe Beschleunigung, 500 Upm, RT) auf Objektträger aufgetragen. Zur Zentrifugation verwendet wurde ein Cytospin 2 (Shandon, Pittsburgh, Pennsylvania, USA).

Im allgemeinen wurden Zytospinpräparate einer phänoptischen Färbung nach Pappenheim (kombinierte May-Grünwald-Giemsa-Färbung) unterworfen.

#### **3.2 Durchflußzytometrie: FACS-Analyse und Auswertung**

Das Prinzip der Messung mit Hilfe eines Durchflußzytometers besteht darin, daß Zellen durch eine hydrodynamische Fokussierung einzeln durch einen Laserstrahl (Argon-Laser, 488 nm) geführt werden. Dabei werden neben Streuungseffekten, die einen Rückschluß über Größe (Forward light Scatter, FSC) und Granularität (Side Scatter, SSC) einer Zelle zulassen, die Fluoreszenzen (FL1, FL2, FL3 und FL4) der verwendeten fluoreszierenden Antikörper oder Farbstoffe gemessen, die Aussagen über die Expression verschiedener Oberflächenantigene erlauben (Raffael, 1988; Poncelet, 1985). Die detektierten Antigene können Chromatinfärbungen, membrangebundene oder intrazellulär vorliegende Glycoproteine sein (North, 1996; Carrock-Sewell, 1997).

Die Markierung dieser Antigene erfolgt üblicherweise durch Fluorochrom-konjugierte mAk. Der größte Teil der käuflich erhältlichen epitopspezifischen mAk ist an ein Fluorochrom gekoppelt, wobei hier hauptsächlich FITC, PE, PerCP, APC, Cy5 und Cy3 verwendet wurden. Falls keine Direktmarkierung mit einem dieser mAk möglich war wurde Fluorochrom-gekoppelten mAk gearbeitet, die spezifisch den ersten, nicht-Fluorochrom-gekoppelten mAk erkannten.

Da durchflußzytometrische Fluoreszenzsignale nicht Absolutwerte darstellen, benötigt man zur Auswertung Kontrollmarkierungen um die Einstellung und die Verstärkung der Licht-Detektoren vornehmen zu können.

Bezüglich der genaueren Funktionsweise und der Handhabung eines Durchflußzytometers wird auf Schmitz und Rothe (1994) und Knüchel (1994) verwiesen. Die Messung der gefärbten Zellen erfolgte mit den Durchflußzytometern von Becton Dickinson, FACScan™ und FACScalibur™, die Auswertung mit der Software Lysys™ II, PCLySys™ oder CellQuest™.

Prinzipiell wurde folgendermaßen vorgegangen.

Die angefertigten Kontrollfärbungen wurden verwendet, um unspezifische Bindungen auszuschließen und eine genaue Messeinstellung zu gewährleisten. Zu Beginn wurden die Verstärker-Spannungen für FSC und SSC so eingestellt, daß das übliche Scatter zur Darstellung kommt. Anhand des FSC und SSC Scatter wird die Zielpopulation (meist die Lymphozyten-Population) eingegrenzt (Gate) gesetzt. Dies ermöglicht die Darstellung von Meßergebnissen in einem neuen Achsenkreuz, die in diesem Gate liegen (also Lymphozyten), im Hinblick auf deren Fluoreszenz (FL1 auf der x-Achse, FL2 auf der y-Achse). Mit Hilfe der Kontrollfärbung werden die Verstärkerspannungen für FL1 und FL2 nun so eingestellt, daß sich die Zielpopulation im FL1/FL2 Scatter zwischen  $10^0$  und  $10^1$  abbildet. Die Einstellung der Kompensation wurde anhand zweier einfach gefärbter Proben durchgeführt, z.B. CD56 PE, CD3 FITC. Danach konnten die Proben gemessen werden. Die Geräte-Einstellungen und Messungen mussten für einige mAk gesondert vorgenommen werden, da durch besondere optische Eigenschaften dieser mAk die Messung verfälscht wurde.

### 3.2.1 Auswertung der gemessenen Proben

Die Auswertung wurde mit Hilfe der Software Lysys™ II, PCLySys™ oder CellQuest™ durchgeführt. Meist wurde aus den Meßdaten ein Punktdiagramm (Dot Plot) erstellt. Dabei wurde ein Meßereignis bezüglich zweier Parameter als Punkt in ein Achsenkreuz eingetragen. Zunächst wurde bei der Darstellung FSC/SSC ein Gate auf die Zielpopulation gesetzt. In einem weiteren Schaubild wurden die Meßereignisse, die in besagtem Gate liegen, (Lymphozyten) hinsichtlich ihrer Fluoreszenz dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde in dieses Schaubild ein Quadrant gesetzt. Die Software rechnet Häufigkeiten für jeden Quadranten aus.

Der Anteil x% der doppelpositiven Zellen wurden in einen Bruchteil (Prozent) der Gesamtpopulation an positiven Zellen umgerechnet entsprechend der Formel:

$$x\% = \frac{\text{Doppelpositive}}{(\text{Einfachpositive} + \text{Doppelpositive})} \cdot 100$$

Eine weitere Möglichkeit der Auswertung war die Histogrammdarstellung und Histogrammstatistik. Im Histogramm wird die Signalstärke (Abszisse) gegen die Anzahl von Zellen (Ordinate) aufgetragen. So erhält man eine Häufigkeitsverteilung, die die Verteilung eines Meßparameters in einer Population beschreibt. Ein möglicher Meßparameter war die Fluoreszenzintensität. Zur Erfassung der Intensität eines Signals konnten die statistischen Optionen „Peak“, „Mean“ und „Median“ herangezogen werden. Bei einer Idealverteilung nach Gauß ergibt sich für diese Parameter derselbe Wert.

### **3.2.2 Färben der Zellen mit mAk für die Durchflußzytometrie**

Die Markierung von Antigenen erfolgt üblicherweise durch Fluorochrom-konjugierte mAk. Als Fluorochrome wurden hier meist FITC (FL1), PE (FL2), PerCP (FL3), APC (FL4), PE-Cy5 (FL3) und Cy3 (FL4) verwendet. Falls keine Direktmarkierung mit einem mAk möglich war, wurde ein Fluorochrom-gekoppelter mAk eingesetzt, der spezifisch den ersten, nicht-Fluorochrom-gekoppelten mAk erkannte.

Beide Möglichkeiten der Antigenfärbung wurden im Dunkel bei 4-8°C oder auf Eis vorgenommen. Um Zellschädigungen und unspezifische Markierungen zu vermeiden wurden die Zellen zuvor mit humanen Immunglobulinmischungen (Ferrick, 1995) und im Falle einer indirekten Markierung zwischen den Färbeschritten mit Maus-Serum inkubiert. Jedem Färbeschritt folgt stets mindestens ein Waschschriff (Hettich Rottixa/RP, 450g, 8 min, 4°C), um nicht-gebundene mAk zu entfernen und somit Messungen nicht zu verfälschen.

Auf Zellen gebundene mAk werden von den Zellen nach einer gewissen Zeit internalisiert, wodurch die Fluoreszenzen nicht mehr meßbar wird. Aus diesem Grunde und weil diese Zellen nicht unbegrenzt am Leben zu erhalten sind, besteht die Möglichkeit der Zellfixierung mit Formaldehyd-haltigen Fixierungslösungen (Lyse-Puffer, Becton Dickinson). Durch diese Zell-Fixierung werden die Zellen abgetötet und ihre Membran stabilisiert. Eine Markierung mit mAk sollte vor der Fixierung stattfinden, da einige Oberflächenantigene durch Formaldehyd chemisch verändert werden und nicht mehr von den für sie spezifischen mAk erkannt werden können. Auf diese Weise kann eine Färbung solcher fixierter Zellen für Tage und Wochen erhalten werden.

In der Regel wurden Färbungen wie folgt durchgeführt:

Isolierte Zellen wurden abzentrifugiert und in Immunfluoreszenz-Puffer aufgenommen. Die für die Färbung vorgesehene Kombination von Antikörpern wurde zu den in etwa 100 µl gelösten Zellen auf Eis gegeben, wobei üblicherweise 10 µl gelöste mAk zugegeben wurden. Die Zellen wurden gut gemischt und im Kühlschrank oder im Dunkel auf Eis für 15-30 min inkubiert. Nach Inkubation und einem ersten Waschschriff erfolgte die Zugabe von 2 ml Lyselösung (zur Lyse von Erythrozyten und zur Fixierung der Zell-Färbung). Die Inkubation der Lyselösung erfolgt unter Lichtabschluß bei Raumtemperatur für 6 und 9 min. Danach folgten zwei weitere Waschschriffe mit PBS (Zentrifugation für 8 min bei 12°C, 450g).

### **3.2.2 Intrazellulärer Nachweis von Proteinen mit Hilfe der Durchflußzytometrie**

Für den Nachweis intrazellulärer Antigene wie von Zytokinen im Golgi oder der in Granula gespeicherten Serinesterase Perforin wurde im Prinzip die selbe Methodik angewandt wie bei der Färbung membranständiger Antigene (Liton, 1996; Prussin, 1995). Um Fluorochrom-gekoppelte mAk ins Zellinnere zu schleusen, mußte die Zellmembran permeabilisiert werden. Da lebende Zellen diese Permeabilisierung nicht ohne weiteres überstehen, mußten sie zuvor durch Formaldehyd fixiert werden. Eine nachfolgende Klonierung dieser Zellen, z.B. nach einer Zellsortierung mit dem FACSsort war also nicht möglich. Eine weitere Besonderheit des Nachweises intrazellulär vorliegender Proteine ist die Notwendigkeit, den Transport dieser Proteine im Zellinneren, im Golgi oder ER,

anzuhalten. Dies ist nötig, da sonst zu wenig des nachzuweisenden Proteins vorhanden ist. Dieser Transport-Arrest wurde durch die Inkubation der Zellen mit dem Zellgift Monensin erreicht. Die Gabe dieses Zellgifts limitierte die Versuchsdauer, da Monensin nach etwa 10-12 Stunden beginnt toxisch auf die Zellen zu wirken. Die Methode der intrazellulären Färbung von Proteinen kombiniert die Vorteile der durchflußzytometrischen Phänotypisierung von Zellen und die Möglichkeit -ähnlich dem Western Blot-Verfahren- Proteine nachzuweisen.

Im Zusammenhang mit den hier vorgestellten Arbeiten wurden intrazelluläre Färbungen für eine Reihe von Antigenen durchgeführt. Die für diese Antigene spezifischen mAk waren mit den Fluorochromen FITC, PE oder APC konjugiert. Die verwendeten mAk richteten sich gegen Perforin (Hözel, Köln, Deutschland), IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-12 (Pharmingen, San Diego, CA, USA).

In dieser Arbeit wurden in zeitlicher Reihenfolge mehrere Protokolle für die intrazelluläre Färbung verwendet. Das Cytotfix/Cytoperm Plus™ Kit (mit Golgi-Stop™) von Pharmingen (San Diego, CA, USA) erwies sich als sehr gut geeignet für normale Anwendungen intrazellulärer Färbungen. Für detaillierte Fragen wird auf die Empfehlungen und Anweisungen des Herstellers verwiesen. Das allen Protokollen gemeinsame Vorgehen soll im folgenden skizziert werden:

Nach der Stimulation der Zellen, bzw. der positiv-Kontrollen wird Monensin (Golgi-Stop™) zu den Kulturen zugegeben. Nach 4-10 Stunden wurde eine Färbung der Oberflächenantigene vorgenommen. Nach erfolgter Oberflächenmarkierung wurden die Zellen fixiert und danach mit einem Saponin-haltigen Medium die Membran der Zellen permeabilisiert. Nun wurde die Färbung der intrazellulären Antigene vorgenommen und anschließend konnten die Zellen durchflußzytometrisch analysiert werden. Jedem der beschriebenen Schritte folgte zumindest ein Waschschritt. Länge und Beschleunigung der Zentrifugation der Zellen wurde der Größe und Granulation der Zellen angepaßt (Sander, 1991; Assenmacher, 1994; Singh-Jasuja, 2000; Schild, 2000).

### **3.2.3 Nachweis des frühen Apoptose-Markers PS mit Annexin V**

Cytotoxische T-Zellen, NK-T-Zellen, und  $\gamma\delta$ -T-Zellen töten Zielzellen meist durch die Induktion der Apoptose in diesen Zellen. Die Werkzeuge der Effektorzellen sind hierbei Moleküle der TNF-Familie, die sie membranständig exprimieren oder aus Speichervesikeln in den extrazellulären Raum in Richtung der Zielzellen sezernieren. Die wichtigsten Mitglieder der TNF-Moleküle sind CD95-Ligand (Fas-Ligand, APO1-Ligand, CD178), TNF- $\alpha$  und TRAIL.

Der Nachweis von frühen Schädigungen der Integrität der Zellmembran durch das Phosphatidylserin (PS)-bindende Protein Annexin V. PS wird von intakten Zellen nicht auf die Außenseite der Zellmembran transloziert, konnte aber bei apoptotischen Zellen und auf apoptotischen Körperchen (Apoptotic Blebs) als Oberflächenmarker gezeigt werden (Koopmann, 1994; Verhoven, 1995; Vermes, 1995). Durch das an Annexin V gekoppelte Fluorochrom FITC kann das Erscheinen von PS auf der Oberfläche apoptotischer Zellen schon nach kurzer Zeit durchflußzytometrisch gezeigt werden.

Die Referenzfärbungen für die Einstellung des Durchflußzytometers sind für die Annexin-Färbung die positiv-Kontrolle einer Zelle, in der durch Zytostatika Apoptose induziert wurde. Wichtig ist ebenfalls die Kontrolle, bzw.

der Ausschluß bereits toter Zellen durch das ins Chromatin interkalierende Propidium-Iodid (PI). Propidium-Iodid strahlt, durch den Argon-Laser angeregt, im zweiten und dritten Fluoreszenz-Kanal. Es mußte also für weitere Oberflächenmarkierungen durch mAk bedacht werden, daß nur noch der vierte Fluoreszenz-Kanal für eine Phänotypisierung der apoptotischen Zellen zur Verfügung stand.

Durchgeführt wurde die Annexin V Färbung mit dem Annexin-Fluos-Kit™ (Böhringer Mannheim/Roche, Basel) und nach Anleitung des Herstellers. Da die Annexin-Bindung Calcium-abhängig ist, wurde der im Kit enthaltene Inkubations-Puffer verwendet. Eine Färbung mit weiteren Fluorochrom-gekoppelten mAk konnte gleichzeitig vorgenommen werden. Die Färbung mit PI wurde erst unmittelbar vor der durchflußzytometrischen Messung vorgenommen.

### **3.3 Nachweis von zellulärer Zytokin-Sekretion**

#### **3.3.1 Cytokine Sekretion Assay™ (Miltenyi Biotech)**

Der Cytokine Sekretion Assay der Firma Miltenyi Biotech bietet die Möglichkeit, Zytokin-Sekretion bei lebenden Zellen nachzuweisen und diese Zellen in einem zweiten Schritt auch anzureichern. Diese Zellen stehen also einer Klonierung oder anderen Tests noch zur Verfügung, und können noch weiter charakterisiert werden.

Das Prinzip dieses Assays besteht in einer Bindung sezernierten Zytokins an die Zelle, der Detektion des gebundenen Zytokins durch einen sekundär-mAk und optional in der Anreicherung dieser Zellen durch durchflußzytometrische Zell-Sortierung oder durch MACS-Sortierung (Ouyang, 2000; Zhang, 1999; Brosterhus, 1999).

Die Bindung des Zytokins erfolgt durch eine Matrix von mAks. Diese mAk-Matrix besteht aus zwei mAks, die über eine Haptenbindung miteinander verbunden sind. Einer der beiden mAk ist spezifisch für ein pan-leukozytäres Antigen, das CD45 Protein, und sorgt für eine Bindung der Matrix an die zu untersuchenden Zellen (Assanmacher, 1998). Der zweite mAk ist spezifisch für ein Zytokin und bindet diese Proteine an die Zellen. Untersuchte Zellen können auf die Sekretion einer Reihe von Zytokinen untersucht werden, die eine Aktivierung der Zellen nachweisen; zur Zeit sind dies IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 und IL-10. Um in dieser Phase des Assays einen Bystander-Effekt zu vermeiden ist es unerlässlich die Inkubation im Drehschüttler o.ä. vorzunehmen. Der direkte Nachweis der Zytokin-Sekretion erfolgt durch einen Zytokin-spezifischen, PE-markierten zweit-Antikörper. In dieser Phase des Tests kann schon eine Aussage über diese Zellen durch eine durchflußzytometrische Analyse gemacht werden. Alternativ ist die Sortierung im FACS möglich. Mit Hilfe eines dritten mAk, der an Microbeads gekoppelt wurde, können die Zellen dann durch eine MACS-Anreicherung sortiert werden. Dieser Dritt-Antikörper ist spezifisch für PE. Die sortierten Zellen können nun weiteren Tests oder einer Klonierung zugeführt werden.

#### **3.3.2 Cytokine Capture Assay™ (Hölzel)**

Auch der Cytokine Capture Assay™ der Firma Hölzel bietet die Möglichkeit, die getesteten und noch lebenden Zellen nach dem Test noch weiter zu charakterisieren oder zu klonieren. In diesem Test werden jedoch nicht spezifisch Zellen charakterisiert, sondern das Verhalten einer Zell-Population bezüglich ihrer Protein-Sekretion auf eine Stimulation hin. Der Nachweis der Sekretion ist also quantitativ und weniger Zell-spezifisch qualitativ.

Das Grundprinzip dieses Tests entspricht in etwa dem eines ELISA. Hier wurde der Protein-spezifische mAk an magnetisierbare Partikel gekoppelt. Diese Partikel werden den zu untersuchenden Zellen und deren Stimulanz für kurze Zeit zugegeben und fangen sekretiertes Protein aus der Suspensionslösung ab (Akdis, 1995; Lischke, 1996; Kala, 1997). Wie bei den Tests mit Reagenzien der Firma Dynal werden die Partikel im Magnetfeld in den Behältern gehalten. Die dekantierten, lebenden Zellen stehen weiteren Versuchen zur Verfügung. Die Quantifizierung der abgefangenen Proteine erfolgt durch einen Protein-spezifischen und Fluorochrom-gekoppelten zweit-Antikörper und kann durchflußzytometrisch gemessen werden. Um dieses Signal beurteilen zu können muß eine Eichkurve erstellt werden. Hierzu werden im Zell-freien Medium definierte Mengen von Protein zu den Magnet-Partikeln gegeben werden. Anhand der Signale dieser Messungen können Aussagen über die Menge sezernierten Proteins in den Tests gemacht werden. Zur Zeit ist es möglich die Sekretion von IFN- $\gamma$  Fas-Ligand und Granzyme-B auf diese Weise zu quantifizieren.

### 3.3.3 ELI-Spot Assay

Der „enzyme-linked immunospot“ (ELI-Spot)-Assay ist einem klassischen ELISA-Test sehr nahe. Auch hier werden Multititerplatten mit Antikörpern beschichtet durch die letztlich eine Eigenschaft einer inkubierten Flüssigkeit sichtbar gemacht werden kann. Diese Eigenschaft ist in dem hier verwendeten ELI-Spot Assay eine Zytokin-Sekretion von stimulierten Effektorzellen (Kabilan, 1990; Amano, 1991; Calabresi, 1998). Der Vorteil des ELI-Spot-Tests ist seine sehr große Sensitivität; anhand dieses Tests können noch einzelne Zytokin-sezernierende Zellen detektiert werden. Selbst der Nachweis kleiner Populationen Peptid-spezifischer T-Zellen aus Peripherblut ist möglich (Carvalho, 2001).

In die mit IFN- $\gamma$ -spezifischen mAk (Biosource, Camarillo, CA, USA oder Hölzel, Köln, Deutschland) beschichteten Multititerplatten (MAHA 45, Millipore, Bedford, MA, USA) wurden Effektorzellen, Makrophagen oder B-Zellen pipettiert und durch Zugabe von Peptiden oder anderen Zellen stimuliert. Auf diesen Stimulus hin, produzierten die zu testenden Zellen Zytokine, die wiederum von den mAk am Boden der Platte gebunden wurden. Nachdem die Zellsuspension durch fünfmaliges Waschen mit Tensid-haltigem (0,05% Tween20) PBS entfernt worden war, konnte das auf der Membran gebundene Zytokin durch Inkubation mit löslichen mAk detektiert werden. Sichtbar wurden diese Signale durch die Umsetzung eines Substrats zu einem farbigen Niederschlag durch Enzyme, die an den zweit-Antikörper gekoppelt sind (Avidin Peroxidase Komplex; ABC Vectastain-Elite kit™, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Dieser Niederschlag hat die Form von kleinen Punkten wobei jeder Punkt einer Zelle entspricht. Diese Microtiterplatten werden durch Computer-gestützte Spezialmikroskope ausgezählt (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), wobei Parameter wie Kontrast, Durchmesser, Form, Farbe und Farbsättigung an jede Platte angepasst werden können und die gesamte Platte mit konstanten Bedingungen ausgezählt wird (Carl Zeiss Vision, Hallbergmoos, Deutschland).

Die Inkubationszeit der Effektorzellen der *natürlichen Immunabwehr* mit Stimulatorzellen betrug 40 Stunden, kann aber auch kürzer gewählt werden. In den in dieser Arbeit durchgeführten Tests wurden jeweils 5000 Stimulatorzellen in jedes Well gegeben und Effektorzellen im Verhältnis 20:1 bis hin zu Verdünnungen im Verhältnis von 1:1 eingesetzt. Die Beschichtung der Microtiterplatten wurde nach Anleitung und Angaben des Herstellers (Biosource bzw. Hölzel) vorgenommen, ebenso wie die Durchführung der Substrat-Umsetzung (Vector Laboratories) und der Test-Analyse (Carl Zeiss Vision).

### **3.3.4 QIFIKIT™ von DAKO**

Mit diesem Test der Firma Dako (Glostrup, Dänemark) können durchflußzytometrisch Oberflächen-Expressionen verschiedener Antigene quantitativ bestimmt werden. Die Quantifizierung der Expressions-Dichte erfolgt mit Hilfe eines Vergleichs gemessener Signalstärken mit einer Eichkurve. Die Erstellung dieser Eichkurve ist der eigentliche Test (Poncelet, 1993). Die Punkte dieser Eichkurve werden durch durchflußzytometrische Analyse 10 µm großer Partikel gegeben. Diese Partikel wurden vom Hersteller mit einer definierten Menge (Poncelet, 1985) von Maus IgG beschichtet. Diese Maus-Antikörper werden im FACS durch Fluorochrom-gekoppelte sekundär-mAk sichtbar gemacht, die sich spezifisch gegen Maus-IgG richten. Das zu untersuchende Antigen auf humanen Zellen sollte parallel dazu ebenfalls mit einem Maus-IgG angefärbt werden, der jedoch nicht an ein Fluorochrom gekoppelt wurde. Test-Partikel und untersuchte Zellen werden mit der selben Menge an anti-Maus mAk gefärbt und die Meßwerte verglichen.

Der QIFIKIT™ Test von DAKO wurde in dieser Arbeit zur Bestimmung der MHC I Dichte auf verschiedenen Zelllinien und Zielzell-Populationen verwendet.

## **4 Zellkultur und Zelllinien**

### **4.1 Zelllinien**

Während der Versuche wurden in beiden Teilprojekten eine Reihe von Zelllinien verwendet. Dies waren EBV-transformierte B-Zelllinien deren Transfektanten und Tumorklinen. In die erste Kategorie gehören die klassische MHC I nicht exprimierende Zelllinie LCL721.221 (Kavathas, 1980) und die Zelllinie C1R (Storkus, 1986), die MHC I in reduziertem Umfang exprimiert (nur HLA-B35 und HLA-Cw4; Zemmour, 1992). Ferner die Mutterlinie der LCL721.221, die Zelllinie LCL721, die MHC I in vollem Umfang exprimiert (HLA-A1/2, B5/8, Cw1/7). Folgende Transfektanten wurden benutzt: LCL721.221.G, transfiziert mit 5,4kb genomischer DNA kodierend für den HLA-G-Locus (Munz, 1997), LCL721.221.Cw1, LCL721.221.Cw4, LCL721.221.Cw6 und LCL721.221.Cw7, transfiziert jeweils mit genomischer DNA für eines der HLA-C Allele (Orr, 1983; Shimizu, 1989; Steinle, 1994 und 1992; Falk, 1995).

An Tumorklinen wurden verwendet:

- K562, eine chronisch myeloische Leukämie-Linie erythrozytären Ursprungs (Lozzio, 1975), die kein MHC I exprimiert und als klassisches NK-Target verwendet wird,
- die Burkitt's Lymphom Linien Raji (Pulvertaft, 1964; Epstein, 1965) und Daudi (Klein, 1968), die eine Targetzelle für T-zellen darstellen und ebenfalls kein MHC I exprimieren,
- THP-1, eine Linie monozytischen Ursprungs, die aus einer akuten myeloischen Leukämie abgeleitet wurde (Tsuchiya, 1980),
- die erythroleukämische Linie KG-1, die aus einer akuten myeloischen Leukämie abgeleitet wurde (Koeffler, 1978) und als weitgehend undifferenziert gilt und deren differenzierterer Subklon KG-1a (Koeffler, 1980), beide mit dem HLA-Typ HLA-A30/31, B35/35, Cw4/4,
- die murine Linie P815 (Ralph, 1976), die vorwiegend als Helferzell im „redirected Killing“ eingesetzt wird
- und die Neuroblastomlinie LS (Rudolph, 1991).

Alle Zellen wurden in Zellkultur-Medium kultiviert. Zum Medium der Transfektanten wurde 200 µg/ml Hygromycin B (Sigma, St.Louis, MO, USA) als Selektionsmarker zugegeben. Adhärenente Zelllinien, LS und teilweise LCL721.221.Cw6) wurden vor dem Umsetzen trypsinisiert. Hierfür wurde das Medium vorsichtig abgenommen und mit etwa 8 ml pro 250 ml Kulturflasche Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco BRL, Paisley, Großbritannien) 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Klopfen an der Kulturflasche abgelöst, aus der Flasche entnommen, durch zentrifugation konzentriert und für Tests benutzt oder in eine neue Kulturflasche gegeben.

## **4.2 Zellkultur**

### **4.2.1 Zellzahlbestimmung**

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mit der Zählkammer nach Neubauer (Quadratische Gesamtfläche 9 mm, Höhe 0,1 mm; 9 Großquadrate; pro Großquadrat je 16 Kleinquadrate). Ausgezählt werden je 4 Eckgroßquadrate. Verdünnt wurden Zellsuspensionen mit PBS bzw., bei Vital-Färbungen, mit Trypanblau. Tote Zellen besitzen keine intakte Membranbarriere, lassen sich daher durch den Farbstoff Trypanblau anfärben und waren als blau-schwarze Punkte zu sehen.

Darüber hinaus wurde die Zelldichte mit dem vollautomatischen Zellanalysator Technicon H3 (Bayer) bestimmt, der sich einer kombinierten Messung von Streulicht und Peroxidaseaktivität bedient. Dadurch ist nicht nur eine Bestimmung der Zellzahl, sondern auch einer Zelldifferenzierung in automatisierter Form möglich.

Bei Zellen, die über mehrere Tage oder Wochen in Kultur waren, wurde auf eine automatische Zellzählung verzichtet, da hierbei eine Diskriminierung von lebenden und toten Zellen nicht möglich zu sein schien.

### **4.2.2 Suspensions-Kultursysteme**

Die oben aufgeführten transformierten Zelllinien und die Tumorkulturen wurden in Suspensions-Kultursystemen gehalten. Das heißt, sie wurden in Flachboden-Kulturflaschen unterschiedlichen Volumens als Suspension in flüssigem Medium kultiviert. Als Medium für diese Kulturen wurde im allgemeinen RPMI-Medium I-IV verwendet, das einer Reihe von Zusätzen bedarf, um gutes Zellwachstum zu gewährleisten. RPMI-Medium ohne Phenolrot wurde verwendet, falls darin Langzeit- oder Stammzell-Differenzierungs-Kulturen gehalten oder kultivierte Zellen nach 1-2 Wochen durchflußzytometrisch typisiert werden sollten. Phenolrot wird von Zellkulturen aufgenommen und führt durch seine Autofluoreszenz bei Anregung durch Laser-Licht zu methodischen Schwierigkeiten bei der Phänotypisierung mit dem FACS.

Einer der Zusätze war Glutamin als Stickstoffquelle für die Zelllinien. Da Glutamin bei 37°C sehr instabil ist und bereits nach 3 Tagen etwa 80 % des zugesetzten Glutamins nicht mehr nachweisbar sind, wurde als Alternative für Langzeitkulturen ein stabiles Glutaminderivat eingesetzt. Als Quelle von Wachstumsfaktoren und anderen Nährstoffen wurde nicht-hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS; 10%, v/v) verwendet. Eine Hitze-Inaktivierung des FCS (56°C für 30 min) war nur dann notwendig, wenn eine Complement-abhängige Lyse von Zellen vermieden werden sollte. Als Puffersystem wurde HEPES (5%) zugegeben. Um bakterielle Kontaminationen zu vermeiden wurde die für humane Zellen verträgliche Antibiotikum-Kombination 50 U Penicilin/ 50 µg/ml Streptomycin (Biowhittaker, Verviers, Belgien) dem Medium zugesetzt.

Für Klonierungen von NK- und T-Zellen wurden Kulturmedien verwendet, denen eine Reihe von Zusatzstoffen fehlten, die nachträglich zugefügt werden konnten. Diesen Medien wurde meist 5% (bis zu 20%) humanes Serum (HS) anstatt des FCS zugesetzt und auf das HEPES-Puffersystem verzichtet.

Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>, Brutschrank „CO<sub>2</sub>-Auto-Zero“ (Heraeus).

### **4.2.3 Semi-solide Kultursysteme**

Semi-solide Kultursysteme auf der Basis von Collagen oder Methyl-Cellulose wurden meist für Differenzierungskulturen CD34+ Stammzellen oder anderer lymphoider und myeloider Progenitor-Zellen verwendet. Diesen kommerziell bezogenen Kulturmedien wurde als Geliermittel Collagen zugesetzt. Dadurch nahm die Viskosität dieser Medien stark zu. Eine Migration oder Diffusion der Zellen war nur noch bedingt möglich. Der Vorteil dieser Kulturform liegt in der stabilen Assoziation direkt benachbarter Zellen und eines dadurch gewährleisteten stabilen Mileaus von Wachstumsfaktoren (Petzer, 1996).

Die zu expandierenden Zellen wurden in etwa 100 µl RPMI oder MEM zum aliquotierten Expansions-Medium gegeben und gut gemischt. Das Kulturvolumen betrug pro Ansatz 1,1ml. Zur Kultivierung verwendet werden 35-mm-Kulturschalen (Nunc, Helsinki). Durch vorsichtiges Schwenken wurde gewährleistet, daß der gesamte Schalenboden von der Zellsuspension bedeckt war. Blasenbildung in der Kulturschale störte nur bedingt, da sich Luftblasen bei der anschließenden Kultivierung zurückbildeten. Jede Kultur wurde als Trippel-Ansatz durchgeführt. Pro Ansatz wurden stets 1000 Zellen der zu expandierenden Zell-Population eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte meist für 2 Wochen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre.

#### **4.2.3.1 Kultivierung CD34+ Zellen unter Zusatz von Wachstumsfaktoren**

Kulturansätze mit unterschiedlichem Zusätzen an Wachstumsfaktoren wurden eingesetzt, um gezielt eine oder wenige Zell-Populationen aus CD34+ Stammzellen zu generieren. Hierzu wurden ausschließlich Medien der Firma Stem Cell Technologies (Vancouver, BC, Canada) und Zytokine und Wachstumsfaktoren der Firma Genzyme/R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) verwendet.

Eine Liste der Medien und der Kombination verschiedener Wachstumsfaktoren kann der Aufstellung im Material-Teil entnommen werden.

#### **4.2.3.2 Qualitative und quantitative Analyse semi-solider Stammzell-Kulturen**

Nach einer Inkubationszeit von mindestens 14 Tagen wurden die Kulturen lichtmikroskopisch quantitativ und qualitativ analysiert. Die Gesamtzahl der Kolonien wurde durch Auszählen der gesamten Kulturschale ermittelt. Als Kolonien galten Zellhaufen, die aus mehr als 40 Einzelzellen bestanden. Zell-Cluster mit einem Anteil von weniger als 40 Zellen werden nicht gezählt. Eine Zell-Klassifizierung in erythroide Kolonien (BFU-E, CFU-E), myeloide Kolonien (CFU-G, CFU-M), Kolonien aus Dendritischen Zellen (DC) und pluripotente Kolonien (CFU-GM, CFU-GEMM und CFU-Mix) wurde anhand von Tabellen und Veröffentlichungen (McCulloch, 1984; Metcalf, 1984; Eaves, 1995; Cruse, 1999) vorgenommen. Als Mikroskop wurde ein Telaval 31 (Zeiss) mit inversem Strahlengang verwendet.

#### **4.2.3.3 Isolation von Progenitorzellen aus semi-solidem Differenzierungsmedium**

Progenitor-Zellen der verschiedenen myeloiden und lymphoiden Differenzierungslinien konnten zu jedem Zeitpunkt und in jedem Stadium wieder aus semi-solidem Differenzierungsmedium isoliert werden. Hierfür wurde bei Collagenase-haltigen Kultur-Medien Collagen Typ V verwendet (Hogge, 1997).

Der Inhalt einer Kulturschale wurde entnommen und mit RPMI-Medium und Collagenase (Endkonzentration 1 µg/ml) im Drehschüttler bei 37°C für 30-40 min inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit RPMI konnten dies Zellen in durchflußzytometrischen Analysen oder anderen Tests verwendet werden.

### **4.3 NK-Zell Klonierung, $\alpha$ - und $\beta$ -T-Zell Klonierung in „Limiting Dilution“**

#### **4.3.1 Isolation, Klonierung und Stimulation von NK-Zellen**

$10^9$  PBL wurden in etwa 1,5 ml MACS-Puffer aufgenommen und 200 µl  $\alpha$ -CD56-Microbeads-Lösung (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland; mAk-Isotyp IgG1a) zugegeben und 25 min bei 4-8°C im Dunkeln

inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch zweimaliges Waschen mit 5ml MACS-Puffer und Zentrifugation für 8 min bei 10°C und 450g von nicht gebundenen mAk befreit. Das Zell-Pellet wurde in 5ml MACS-Puffer aufgenommen und auf die mit 3ml MACS-Puffer vor-äquilibrierte VS-Säule im Magnetfeld aufgetragen. Unspezifisch adhärierende Zellen wurden durch zweimaliges Waschen der Säule mit jeweils 4ml MACS-Puffer weggewaschen. Die an die Säule gebundenen Zellen wurden außerhalb des Magnetfeldes mit 5ml MACS-Puffer schnell eluiert. CD56- Zellen befanden sich nach diesem ersten Aufreinigungsschritt im Durchlauf. Die Microbeads wurden anschließend durch 10 min Inkubation bei 4°C im Dunkel mit 200 µl Release-Puffer (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) von den gebundenen mAk getrennt. Danach wurden die abgetrennten Microbeads im Magnetfeld von den CD56+ Zellen separiert und die Zellen durch Zentrifugation (s.o.) auf 0,5ml aufkonzentriert. Anschließend wurden die NK-Zellen mit  $\alpha$ KIR2DL1/2 mAK (Immunotech, Marseilles, Frankreich, mAk-Isotyp IgG2a) für 25 min bei 4-8°C im Dunkel inkubiert, zwei mal mit MACS-Puffer gewaschen und in einem zweiten Schritt mit einem Microbead-gekoppelten, Ratte- $\alpha$ -Maus mAk im Magnetfeld die KIR2DL1/2+ Zellen isoliert (Ablauf s.o.). Die KIR2DL1/2- NK-Zellen waren hier im Säulendurchlauf enthalten und konnten als Kontrollpopulation eingesetzt werden. Anschließend wurden die drei Zell-Fractionen, CD56-, KIR2DL1/2- NK Zellen und KIR2DL1/2+ NK-Zellen (CD56+ CD158a/b+) im Durchflußzytometer phänotypisiert.

Zur Klonierung wurden die KIR2DL1/2+ (CD158a/b) NK-Zellen aufkonzentriert und in NK-Medium aufgenommen. Es wurden 30 Zellen in 100 µl NK-Medium pro Well ausgesät und anschließend  $10^4$  bestrahlte LCL721.221 (300Gy) sowie  $10^5$  bestrahlte PBL (30Gy) pro Well zugegeben. In den ersten 2 bis 4 Wochen empfahl es sich, syngene PBL als „feeder“-Zellen (PBL) zu verwenden, danach konnten PBL jedwedens Spenders eingesetzt werden. Nach 14 bis 21 Tagen mußten die inzwischen expandierten NK-Zellen in gleicher Weise restimuliert werden und wurden im Verhältnis 2 zu 1 auf neue Wells verteilt (Munz, 1997; Colonna, 2000). Hierfür wurden 100 µl Medium aus jedem Well entnommen und durch frisches NK-Medium mit bestrahlten „feeder“- und Stimulator - Zellen (LCL721.221) ersetzt.

#### **4.3.2 Isolation, Klonierung und Stimulation von $\alpha$ $\beta$ - und $\alpha$ $\gamma$ -T-Zellen**

$10^9$  PBL wurden in etwa 1,5 ml MACS-Puffer aufgenommen und 100 µl anti- $\alpha$  $\beta$ - oder anti- $\alpha$  $\gamma$ -TCR mAk für 20 min bei 4-8°C im Dunkel inkubiert. Die anti-TCR mAk sind FITC konjugiert. Nach zweimaligem Waschen der zellen wurden sie in einem zweiten Schritt mit anti-FITC-mAk, die an Microbeads gekoppelt waren (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland), in gleicher Weise gefärbt und im Magnetfeld isoliert (Ablauf s.o.). Anschließend wurden die aufgereinigten Zell-Fractionen und die Durchlauf-Fractionen im FACS phänotypisiert.

Zur Klonierung wurden die  $\alpha$  $\beta$ - oder  $\alpha$  $\gamma$ -T-Zellen aufkonzentriert und in Klonierungs-Medium aufgenommen. Es wurden 3 Zellen in 100 µl NK-Medium pro Well ausgesät und anschließend  $5 \times 10^3$  bestrahlte LCL721 (300Gy) sowie  $5 \times 10^4$  bestrahlte PBL (30Gy) pro Well zugegeben. Auch hier empfahl es sich, in den ersten 1 bis 2 Wochen, syngene PBL als feeder-Zellen (PBL) zu verwenden, danach konnten PBL jedwedens Spenders eingesetzt werden. Für die Klonierung von  $\alpha$  $\gamma$ -T-Zellen durften ausschließlich syngene PBL für eine Re-Stimulation eingesetzt werden. Nach 7 bis 14 Tagen mußten die inzwischen expandierten T-Zellen in gleicher Weise restimuliert werden und wurden im Verhältnis 3:1 auf neue Wells verteilt (Munz, 1997; Colonna, 2000). Hierfür wurden 100 µl Medium aus jedem Well entnommen und durch frisches Klonierungs-Medium mit bestrahlten feeder- und Stimulator -Zellen (LCL721) ersetzt.

Alternativ wurden die T-Zellen im FACSsort (Beckton Dickinson, San Jose, CA, USA) aufgereinigt, der genaue Ablauf einer Aufreinigung mit FACSsort ist weiter oben beschrieben. Um die Aufreinigungsdauer zu verkürzen wurden die Zellen mit MACS wie beschrieben auf  $\alpha$ -TCR vorangereichert und dann maschinell in verschiedene KIR+ Fraktionen aufgereinigt, wobei hier die KIR2DL2+ Fraktion, die KIR2DL1+/KIR2DL2- Fraktion und die KIR2DL1/2+ doppelt-positive Fraktion getrennt gesammelt und für Klonierungen eingesetzt wurden.

## 5 Zytotoxizitäts Test

Als Zytotoxizitätstest wurde in dieser Arbeit ein nicht-radioaktiver Test als Alternative zum  $^{51}\text{Chrom}$ -Release Test eingesetzt. Der hier verwendete Test beruht auf der Freisetzung von Europium (Blomberg, 1986; Ritson, 1987) und dessen Komplexierung. Der Europium-Komplex fluoresziert zeitverzögert auf die Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge. Die Intensität dieser Fluoreszenz ist proportional der durch Zell-Lyse freigesetzten Menge an Europium und erlaubt somit eine Quantifizierung der im Test zerstörten Zielzellen.

### 5.1 Prinzip des Europium-Release-Tests

Sowohl beim  $^{51}\text{Chrom}$ - als auch beim Europium-Release Zytotoxizitäts-Test kommt das gleiche Prinzip zur Anwendung. Targetzellen die von den Effektorzellen lysiert werden sollen, werden mit einem chemischen Element oder Molekül intrazellulär markiert. Bei diesem Markierungsschritt wird das Reagenz entweder spontan von der Zelle aufgenommen ( $^{51}\text{Chrom}$ ) oder aber durch zusätzliche Techniken, wie Permeabilisieren und anschließendes Wiederverschließen der Zellmembran, in die Zelle eingebracht. Im Anschluß an die Markierung wird der überschüssige Markierungsstoff aus dem Medium ausgewaschen. Die Targetzellen werden nun mit den Effektorzellen inkubiert. Werden Targetzellen von den zytotoxischen Effektorzellen lysiert, so diffundiert das intrazellulär gespeicherte Reagenz in den Zell-Überstand, wo es nach der Inkubation nachgewiesen wird. Dabei ist die Menge im Überstand proportional zur Anzahl an lysierten Zellen. Beim  $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest erfolgt der Nachweis über die radioaktive Strahlung im Gammacounter. Beim Europium-Freisetzungstest diffundiert zunächst ein lipophiler Ligand (BATDA) durch die Zellmembran in das Zellinnere. Intrazellulär werden die Esterbindungen der fluoreszenzverstärkenden Verbindung hydrolysiert, so daß ein hydrophiler Ligand (TDA) entsteht, der die Membran nicht mehr passieren kann. Wurden die Targetzellen mit den Effektorzellen inkubiert und lysiert, trat der intrazellulär vorliegende Ligand in den Zell-Überstand. Ein Teil des Zell-Überstands wurde abgenommen und mit einer Enhancement-Lösung inkubiert. Das freie TDA bildet hier einen stark fluoreszierenden und stabilen Chelatkomplex (EuTDA), der über eine zeitverzögerte Fluoreszenz im Fluorometer meßbar wird. In der hier vorgestellten Arbeit wurde der Europium-BATDA-Release-Assay<sup>TM</sup> verwendet (Wallac, Helsinki, Finnland).

## 5.2 Auswertung des Zytotoxizitäts-Tests

Die Zytotoxizität der Effektorzellen, ausgedrückt in einem prozentualen Anteil an lysierten Targetzellen, kann nun errechnet werden, indem das Ergebnis auf die Anzahl an maximal lysierbaren Zellen bezogen wurde.

Im Test müssen deshalb folgende Werte zusätzlich bestimmt werden:

- I. Maximallyse ist der Wert, der maximal erreicht werden kann, wenn alle Targetzellen lysiert wurden.
- II. Spontanlyse ist der Wert, der dadurch zustande kommt, daß Targetzellen ohne Kontakt mit Effektorzellen den Liganden freisetzen, weil sie absterben oder TDA spontan freisetzen.
- III. Background ist der Wert, der als Hintergrund schon im Überstand der markierten Zielzellen zur Zeit des Pipettierens der Tests enthalten war.

Die Berechnung der spezifischen Lyse in Prozent ergibt sich aus der Formel:

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

Von jedem Meßwert muß die Spontanlyse abgezogen werden, da jeder Meßwert einen Anteil enthält, der auf die Spontanlyse zurückgeführt werden kann. Dieser Wert wird nun auf die Differenz von Maximallyse und Spontanlyse bezogen, da dies dem Anteil entspricht, der maximal durch die Lyse von Targetzellen durch Effektorzellen erreichbar werden kann. Aus dieser Formel ist ein Hauptproblem des Zytotoxizitätstests zu ersehen: wird die Spontanlyse zu groß, wird das Meßfenster (Differenz von Maximal- und Spontanlyse) zu klein - schon geringe Schwankungen im Meßwert wirken dann sich überproportional stark im Endergebnis aus, da der Nenner kleiner wird. Gleichzeitig wird der Test weniger sensitiv, weil kleinere zytotoxische Effekte im Hintergrund-Rauschen der hohen Spontanlyse untergehen und so nicht mehr nachgewiesen werden. Die Spontanlyse hat deshalb einen wesentlichen Einfluß auf die Qualität des Tests und sollte deshalb stets möglichst gering gehalten werden.

Die Spontanlyse sollte 30% nicht übersteigen.

$$\text{Spontanlyse des Assays in \%} = \frac{(\text{Meßwert der Spontanlyse})}{(\text{Meßwert der Maximallyse})} \cdot 100$$

Jeder Ansatz wurde als Triplet ausgeführt, um eine Aussage über die Homogenität der Messungen machen zu können. Dieser Triplet-Ansatz wurde jeweils zwei mal mit kurzer Zeitverzögerung gemessen. In Auswertungen angegebene Werte sind stets der Mittelwert dieser sechs Messungen. Background, Spontanlyse und Maximallyse wurden in Vierer-Ansätzen durchgeführt und ebenfalls je zwei mal gemessen.

Die Effektorzellen wurden in Verdünnungsschritten eingesetzt. Eine Verdünnungsreihe war für die Beurteilung des Tests unerlässlich, da nur bei der Verdünnung proportional absteigenden Lyse-Raten das Killing der Targetzellen eindeutig auf die Effektorzellen zurückgeführt und Artefakte ausgeschlossen werden konnten.

### 5.3 Durchführung des Zytotoxizitäts-Tests

Die Durchführung des Tests wurde nach Anleitung und Angaben des Herstellers (Wallac, Helsinki, Finnland) durchgeführt. Die Effektorzellen wurden in drei bis sechs Verdünnungsschritten eingesetzt. Eine Verdünnungsreihe war für die Beurteilung des Tests unerlässlich, um Artefakte auszuschließen.

Alle Ansätze wurden als Triplett durchgeführt, Background, Spontanlyse und Maximallyse in Vierer-Ansätzen. Meist wurde zusätzlich nochmals für jeden Target-Ansatz eine Spontanlyse separat durchgeführt. Dies war besonders bei Einsatz von MHC I-blockierenden mAk (W6/32, B1.32.1) nötig, da Effekte durch die Zugabe dieser mAk-Lösungen ausgeschlossen werden sollten, etwa durch das in jeder Protein-Lösung enthaltene Na-Azid.

Eine weitere Fehlerquelle waren Effektor-Populationen, die erst aus Blut oder anderen Dauer-Kulturen. Aufgereinigt werden mußten. Diese Aufreinigung und Anreicherung der Effektoren wurde meist mit MACS durchgeführt. Das Phosphat-Puffersystem des MACS-Puffers kompetiert um die Komplexbildung des durch lysierte Zellen freigesetzten DTA. Es war also angeraten die Effektoren vor Erstellen der Verdünnungsreihen zwei Mal in RPMI-Medium zu waschen.

Alle Target-Zellen wurden in Aliquots von 5.000 Zellen/Well eingesetzt. Die Effektor zu Target-Konzentration variierte je nach Anzahl der für den Test zur Verfügung stehenden Effektorzellen recht stark von 100:1 bis zu einem Verhältnis von 10:1.

Alle Reagenzien, Medien und Zellsuspensionen sollten bei Test-Beginn Raumtemperatur, bzw. 37°C haben. Um eine Complement-vermittelte Lyse der Zellen auszuschließen, muß das FCS, das dem RPMI-Medium zugesetzt wurde, Hitze-inaktiviert sein.

Da die Durchführung des Tests teilweise stark von der Anleitung des Herstellers abweicht, möchte ich die einzelnen Schritte hier kurz skizzieren:

#### 5.3.1 Aufbereitung der Target-Zellen

Die Targetzellen sollten in einer Konzentration von 1 Mio. Zellen/ml eingestellt werden. Üblicherweise wurden 2ml dieser Zellsuspension zur Markierung mit BATDA-Ligand eingesetzt. Die Menge an zugegebenem Ligand differierte je nach Art der Zelllinie und deren proliferativem Status erheblich und muß jeder Target-Population angepaßt werden. Das Spektrum reichte von 5 µl/ 2 ml bei K562 bis zu 10 µl/ 2 ml bei *in vitro* differenzierten Erythroblasten. Auch die Inkubationszeit der Zielzellen mit BATDA-Ligand variierte von 20 min bei der Neuroblastom-Linie LS bis zu 1 Stunde bei Erythroblasten, die frisch aus Cryokonservaten aufgetaut worden waren. Die Inkubation wurde bei 37°C im Brutschrank durchgeführt. Die markierten Zellen wurden in 5 Waschschritten von Resten gelösten BATDAs befreit. Die Dauer und Beschleunigung einer Zentrifugation wurde den Zellen angepaßt. Bei der Zentrifugation der schon BATDA-markierten Zielzellen sollte generell vorsichtig vorgegangen werden, da die Zellen durch den zytotoxischen Liganden schon leicht geschädigt sind. Große Blasten wurden meist für 5 min bei 250 g, 15°C und kleiner Bremse, kleine Targetzellen für 8 min bei 350 g bis 450 g, 15°C und kleiner Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen mit 6ml Medium kurz resuspendiert. Nach dem letzten Waschschriff wurden die Targetzellen erneut gezählt und in einer Konzentration von 50.000 Zellen/ml eingestellt. Die Targetzellen wurden nun in Aliquots von 100 µl zur Inkubation mit

Effektorzellen in 96-Well Multititerplatten pipettiert. Ein Aliquot der Targetzellen wurde abgenommen und in der Zentrifuge pelletiert, um den Zellüberstand für die Messung des Backgrounds einzusetzen. Ab dem Schritt des ersten Waschschriffs war es geboten, schnell zu arbeiten, da ab diesem Zeitpunkt die Uhr für die Spontanlyse lief.

Falls eine Blockade des Targetzell-MHC I vorgesehen war, wurden entweder 2,5 µg mAk/Well vorgelegt und Targetzellen für eine Inkubationszeit von etwa 20 min zupipettiert. Um Pipettierfehler beim Vorlegen des mAk zu vermeiden wurde alternativ ein Aliquot der Targetzellen abgenommen und mit einer entsprechenden Menge an mAk inkubiert. Auf gleiche Weise wurde vorgegangen, wenn eine Inkubation der Effektorzellen z.B. mit  $\alpha$ -KIR mAk vorgesehen war.

### **5.3.2 Aufbereitung der Effektor-Zellen**

Parallel zu der Aufbereitung der Targetzellen sollte eine Verdünnungsreihe der Effektorzellen angelegt werden. Da die Konzentration der Targetzellen immer konstant mit 5.000 Zellen/Well gehalten war, wurde die Konzentration der Effektorzellen variiert. Es wurden drei bis sechs Verdünnungsschritten eingesetzt. Das Effektor zu Target Verhältnis variierte je nach Menge der für den Test zur Verfügung stehenden Effektorzellen und begann mit Konzentrationen von 100:1 bis 5:1.

### **5.3.3 Test-Ansatz**

Nachdem die Targetzellen in die Wells einer Rundboden-Multititerplatte pipettiert waren, wurden die Effektorzellen in Aliquots von 100 µl zugegeben. Es empfahl sich schon vor Beginn des Tests die Zusammensetzungen von Target- und Effektorzellen auf der Platte zu skizzieren. Die Platte wurde hierauf für 2 min bei 100 g, 15°C und kleiner Bremse anzentrifugiert, um beide Zellpopulationen auf dem Boden der Platte zu vereinigen. Die Inkubationszeit der Zellen im Brutschrank variierte und war abhängig von der Sensitivität der Targetzellen gegenüber den Effektoren und der Empfindlichkeit der Targetzellen für eine BATDA-vermittelte Toxizität. Letzteres hatte direkten Einfluß auf die Spontanlyse der Targetzellen und somit auf die Aussagekraft des gesamten Tests. Eine lange Inkubationszeit dagegen war wünschenswert, um den Effektorzellen möglichst lange Gelegenheit zur Lyse der Targetzellen zu geben. Im <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungstest beträgt die Inkubationszeit etwa 4 Stunden. Im hier vorgestellten Test dauerte die Inkubation meist nicht länger als 2 Stunden. Die Inkubationszeit der Zellpopulationen mit mAk zur Blockade von Oberflächenantigenen wurde in diese Zeit nicht mit einberechnet. Ansätze, in denen Spender-Seren die Rolle des Effektormechanismus übernahmen, waren nur Inkubationszeiten von 40 min bis zu 1 Stunde nötig.

Nach Ende der Inkubation der Zellen im Brutschrank wurden sie erneut für 2 min bei 100 g, 15°C und kleiner Bremse am dem Boden der Platte vereinigt und 20 µl/Well des Zellüberstands in eine Flachbodenplatte überführt. Nun wurden 200 µl/Well der Chelat-bildenden Lösung (Eu-Solution) zugegeben, die Platte unter Lichtabschluß für 15 min auf dem Schüttler inkubiert und anschließend zur Analyse des Tests in den Fluorometer gebracht.

## **6 Arbeiten mit DNA und RNA**

### **6.1 Isolierung und Charakterisierung von RNA**

Zur Isolierung von RNA wurden mehrere Verfahren angewandt. Dies waren die Ultrazentrifugation mit einem Caesiumchlorid Gradienten, eine Phenol-Chloroform Extraktion und die Aufreinigung durch Bindung an Silicatmaterialien in Trennsäulen.

#### **6.1.1 Ultrazentrifugation**

Diese Methode entspricht dem Prinzip der isopyknischen Zentrifugation. Zur Trennung von Materialien unterschiedlicher Dichte werden sie auf einen Dichtegradienten gegeben, dessen Dichte die maximale Dichte der zu trennenden Materialien übersteigt (Chambers, 1978; Rickwood, 1981). Der Dichtegradient des Trennmittels besteht entweder schon vor Beginn der Zentrifugation (Saccharose-Gradient) oder stellt sich mit der Zentrifugation ein (CsCl-Gradient). Die aufzutrennenden Materialien wandern im Verlauf der Zentrifugation entlang des aufsteigenden Dichtegradienten, bis sie den Punkt des Gradienten erreicht haben, der ihrer eigenen Dichte entspricht. Die Dichte im Gradienten nimmt von oben nach unten zu. Im CsCl-Gradienten lassen sich Proteine, DNA und RNA aufgrund ihrer unterschiedlichen Schweb-Dichte trennen. RNA sedimentiert, DNA bildet eine oder mehrere viskose Banden im unteren Drittel des Gradienten, Proteine bleiben im oberen Gardientenbereich. Mit dieser Methode können sehr große Mengen von RNA gewonnen werden, bzw. große Mengen von Zellen verarbeitet werden.

Zur Gewinnung von RNA wurde die Methode nach Chirgwin (Chirgwin, 1979) verwendet. Die zu untersuchenden Zellen wurden mit Guanidinthiocyanat aufgeschlossen, lysiert, ihre RNA denaturiert und die Aktivität von RNasen gehemmt. Die viskose Lösung wurde im Verhältnis 1:1 auf ein CsCl-Kissen überschichtet und für 12-20 Stunden bei 40.000 g bis 220.000 g zentrifugiert. Nach der Auftrennung wurde der Überstand verworfen, die DNA-Bande abpipettiert und eingefroren, die sedimentierte RNA zwei mal mit 70% Ethanol gewaschen und in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Die gelöste RNA wurde daraufhin zwei mal bei 65°C denaturiert und auf Eis gekühlt und schließlich bei -80°C gelagert.

#### **6.1.2 Phenol-Chloroform Extraktion**

Mit dieser Methode der RNA-Aufreinigung können in kurzer Zeit Nucleinsäuren von Proteinen getrennt werden. Jedoch müssen noch vorhandene DNA-Kontaminationen durch Silicatsäulen oder Silicatgranula nachträglich von der RNA getrennt werden. Hierbei wird ausgenutzt, daß RNA und DNA pH-abhängig unterschiedliche Bindungsaffinität zu Silicatmineralien haben.

Hier eingesetzt wurde das InViSorb RNA Kit<sup>TM</sup> II (InViTek) wobei nach Anleitung des Herstellers verfahren wurde.

Nach Lyse von 0,2 bis  $5 \times 10^6$  Zellen wurde die verbliebene DNA durch Bindung an Silicatkügelchen durch kurze Zentrifugation abgetrennt und die im Überstand gelöste RNA mit Phenol und Chloroform vermischt. Nach der Phasentrennung der Lösungsmittel auf Eis wird die RNA mit der wässrigen Phase abgenommen, mit einer gleichen Menge Iso-Propanol und 5% NaAcetat vermischt und bei  $-20^\circ\text{C}$  gefällt. Nach 20-minütiger Zentrifugation mit 15.000 g bei  $4^\circ\text{C}$  wird die RNA abgetrennt und danach bis zum Verschwinden des Phenolgeruchs mit kaltem Ethanol gewaschen und wieder abzentrifugiert. Ethanol wird in der „Speed-Vac“ Vakuum-Zentrifuge entfernt und die RNA in DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  gelöst, denaturiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### **6.1.3 RNA-Aufreinigung mit Silicat-Säulen**

Hier werden Zellen unter stark denaturierenden Bedingungen lysiert und homogenisiert, so daß selbst RNAsen denaturieren, also ein enzymatischer Abbau von RNA findet nicht stattfinden kann (Vogelstein, 1979). In einem Puffer hoher Salzkonzentration erfolgt die Bindung von RNA und DNA an Silikamembranen. Durch Zugabe eines Puffersystems mittlerer Salzkonzentration werden hydrophobe Wechselwirkungen an der Silikamatrix eliminiert, Proteine gelöst und abzentrifugiert. Danach wird RNA mit DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und durch erneute Zentrifugation eluiert. DNA bleibt zum großen Teil gebunden an die Silikonmatrix. Auf diese Weise können maximal 100  $\mu\text{l}$  Material ( $1 \times 10^7$  eukaryontische Zellen) ab einer Länge von 200 Einzelnukleotiden gewonnen werden. Bei der RNA-Isolierung wurde nach den Angaben des Herstellers (Qiagen) vorgegangen.

Verwendet wurde das RNeasy™-Total-System (Qiagen). Jeweils 2 Mio. Zellen wurden mit guanidiniumsalzhaltigem Lysepuffer inkubiert, mit dem Qiasredder™-System (Qiagen) homogenisiert und nach Verdünnung mit Ethanol auf eine RNeasy-Mikrosäule aufgetragen. Durch Zentrifugation wurde die Proteinfraction entfernt und durch 4 weitere Waschschrirte das verbliebene Ethanol entfernt. Die getrocknete Säule wird gleichmäßig mit DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  getränkt und die RNA durch eine letzte Zentrifugation eluiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### **6.1.2 RNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentration von RNA wurde photometrisch bei 260nm bestimmt. Das hier verwendete Photometer GeneQuant II (Pharmacia) mißt die Extinktion bei vier festen Wellenlängen; 230, 260, 280 und 320nm. Eine Extinktion von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm entsprach einer Konzentration von 40  $\mu\text{l}/\text{ml}$ . Zur Messung wurden UV-durchlässige Quarzküvetten (Pharmacia) mit einem Mindestprobenvolumen von 70  $\mu\text{l}$  verwendet. Als Leerwert diente DEPC- $\text{H}_2\text{O}$ . Zwischen der Messung zweier unterschiedlicher RNA-Proben wurde die Küvette mehrmals mit DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  gespült.

Störende Protein-Kontaminationen konnten durch den Quotienten von Extinktion bei 260nm zu Extinktion bei 280nm bestimmt werden, der im Bereich von 1,6-1,8 liegen sollte.

### **6.1.3 DNase-Verdau isolierter RNA**

RNA, die über CsCl-Dichtegradienten oder in einer Phenol-/Chloroform-Extraktion gewonnen wurde, war frei von DNA. Über Silikatsäulen aufgereinigte RNA enthielt jedoch stets DNA-Kontaminationen, die durch einen DNase-Verdau entfernt wurden. Verwendet wurde hier DNase 1 (Amplification Grade, Gibco BRL). Es wurde nach Anleitung des Herstellers verfahren. Die durch kurze Inkubation der Lösung bei 100°C inaktivierte Dnase stellte eine Protein-Kontamination dar und konnte mit dem unter 6.1.1.3. beschriebenen Verfahren entfernt werden.

## **6.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR) und Reverse Transkriptase Reaktion (RT)**

### **6.2.1 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion**

Die mRNA einer Zelle besitzt durch interne Regulationsmechanismen gesteuert nur eine sehr geringe Halbwertszeit und bildet durch den Prozeß der Translation in der Regel ein entsprechendes Protein. Die in der Zelle enthaltene messenger-RNA (mRNA) repräsentiert also alle zu einem bestimmten Zeitpunkt gebildeten Proteine.

Diese Gesamt-m-RNA kann mit der Methode der Reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) in stabile cDNA übersetzt werden und erlaubt die Analyse aller dieser in Bildung begriffener Proteine einer Zelle oder Zellpopulation.

Mit der Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können nun einzelne, für spezifische Gene typische Nucleotid-Basen-Sequenzen nachgewiesen werden. Hierbei wird nicht wie bei der RT-PCR die vollständige in der mRNA enthaltene Information vervielfältigt, sondern nur ein kleiner Teil davon. Der in der PCR amplifizierte Teil einer mRNA ist typisch für ein Protein und beweist eindeutig die Möglichkeit dieses Protein in der Zelle zu finden. Der immuno-chemische Nachweis durch den Western-Blot oder einen ELISA erbringt schließlich den endgültigen Nachweis des Proteins.

#### **6.2.1.1 Synthese von cDNA aus RNA**

Die Synthese von cDNA aus RNA wurde mit der Reversen Transkriptase RAV-2 (Amersham Buchler) durchgeführt. Als Primer dienten synthetisch hergestellte Hexanukleotide in statistisch verteilten Mischung (Random primer) (Hara, 1991). Es wurde nach Anleitung des Herstellers verfahren.

Für eine Reaktion von 1 µg RNA wurde sie in 5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Es wurden 4 µl dNTPs, 1,5 µl Random-Primer, 9 U RAV Reverse Transkriptase, 2 µl 10xReaktions-Puffer und DEPC-H<sub>2</sub>O ad 20 µl zugegeben. Die Reaktion wurde auf Eis pipettiert, die RNA vor Zugabe 5 min bei 65°C denaturiert und auf Eis schockgekühlt und das Enzym einzeln und ganz am Ende zugegeben. Die Reaktion wurde bei 37°C für 60 min durchgeführt. Eine Aufreinigung der cDNA und das Entfernen der Enzyme und Nucleotide erfolgte durch Micro-Säulen-Zentrifugation nach Anleitung des Herstellers (Qiagen, QIAprep/QIAquick Nucleotide Removal Kit).

## 6.2.2 PCR

Für die Polymerasekettenreaktion wurde das Expand High Fidelity™ PCR System (Boehringer Mannheim/Roche) verwendet, das aus einem Enzymgemisch aus hitzestabiler Taq- und Pwo-DNA-Polymerase besteht und in der Lage ist besonders lange Transkripte herzustellen (Barnes, 1995; Scharf, 1986; Saiki, 1985).

Eine PCR-Reaktion ist zusammengesetzt wie die schon erwähnte RT-Reaktion. Statt der Random-Primer werden aber normalerweise „sense“- und „reverse“-Primer eingesetzt. Die Nucleotidsequenz der Primer ist so gewählt, daß sie immer wieder an die Produkte einer Polymerase-Reaktion binden können und so zum exponentiellen Wachstum des PCR-Produkts beitragen.

In einer linearen PCR-Reaktion wird nur ein Primer verwendet. Diese Option wird vorwiegend bei der Direkt-Sequenzierung (cycle-Sequencing) von PCR-Produkten gewählt und erlaubt nur eine lineare Vermehrung der eingesetzten DNA-Menge.

Eine PCR-Reaktion besteht aus mehreren Zyklen einer Abfolge von drei Schritten. Im ersten Schritt werden DNA-Doppelstränge bei 95°C Hitze-denaturiert, so daß sie nur noch in Einzelsträngen vorliegen. Im zweiten Schritt wird die Temperatur auf einen Wert gesenkt, der etwa 5°C unter der Schmelztemperatur der Primer liegt und es den Primern ermöglicht an komplementäre Sequenzen der eingesetzten DNA zu binden („annealing“). In einem dritten Schritt wird die Temperatur auf etwa 72°C erhöht; dies entspricht der optimalen Reaktionstemperatur der eingesetzten Taq-Polymerase.

Zu Anfang der Zyklen steht ein langer Denaturierungs-Schritt von 5 min bei 95°C. Je nach den spezifischen Eigenschaften der Taq-Polymerase ist diese erste Denaturierung („hot start“) von Vorteil für die Lebensdauer des Enzyms, d.h. daß einige Polymerasen erst nach diesem Schritt zugegeben werden sollten. Die Dauer der einzelnen Schritte kann frei gewählt werden, um auf verschiedene Rahmenbedingungen einzugehen. So können die annealing-Zeiten verlängert werden, um eine vollständigere Bindung der Primer zu erreichen oder es kann die Reaktionszeit verändert werden, um genügend Zeit für die Transkription langer Produkte bereitzustellen. Auch die Zeiten zwischen den einzelnen Schritten kann verändert werden, um z.B. eine langsame Annäherung an die annealing-Temperatur und eine exaktere Bindung der Primer zu erreichen oder eine vollständigere Denaturierung der DNA durch schnelleres Aufheizen und Abkühlen zu gewährleisten.

In der Regel werden 25 bis 40 Zyklen durchgeführt. Da die Polymerase jedoch nach etwa 25 Zyklen in ihrer spezifischen Aktivität abnimmt und in der Folge z.B. vermehrt fehlerhafte Nucleotide einbaut, ist es geboten die Zyklenzahl trotz Verringerung des entstehenden Produkts klein zu halten. Es besteht auch die Möglichkeit die Dauer der Einzelschritte mit zunehmender Zyklenzahl zu verlängern („ramping“), um diese Ermüdungserscheinung der Polymerase zu kompensieren.

Ein Standard-Protokoll sieht in etwa wie folgt aus:

Phase I	(Denaturierung)	15 s	94°C
Phase II	(Primerhybridisierung)	30 s	60°C
Phase III	(Polymerisation)	90 s	72°C

Da die eingesetzten Enzyme nach der PCR erschöpft sind, ist es nicht nötig diese Protein-Kontamination zu entfernen. Das PCR-Produkt kann bei -20°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden. Die Reinigung des PCR-

Produkts erfolgt entweder wie bei der RNA-Aufreinigung durch Ausschütteln mit Phenol-Chloroform, Silicat-Bindungs-Verfahren oder schlicht durch Fällung mit Iso-Propanol und Na-Acetat.

### **6.2.2.1 Analyse der PCR-Produkte im Polyacrylamidgel**

Für die Analyse wurde ein 8%iges Polyacrylamidgel oder ein 1,2%-iges Agarosegel verwendet. Als Vergleichsmöglichkeit zur Abschätzung der PCR-Produktlänge wurden DNA-Längenstandards (Boehringer Mannheim) verwendet. Aliquots der PCR-Produkte wurden mit Lade-Puffer vermischt und in die Ladetaschen der Gele aufgetragen und in 0,8xTAE- oder 0,8xTBE-Puffer unter Anlegen von elektrischer Spannung aufgetrennt werden. Um die elektrophoretische Auftrennung der DNA sichtbar zu machen, wurden die Gele 7-10 min in EtBr-Färbelösung (2,5 µg/ml) gefärbt und in einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 312nm betrachtet. Ein Bild der Gele konnte mit einer CCD-Kamera Cybertech CS-1 (Cybertech) digitalisiert gespeichert oder sofort ausgedruckt werden.

Die Konzentration der Auftrennungsgel kann verändert werden, um eine optimalere Auftrennung der Proben in Abhängigkeit von ihrer Länge zu erreichen (Sambrook, 1989).

Die Einzelbanden dieser Längenstandards haben zudem definierte Mengen an DNA im Verhältnis zu der aufgetragenen DNA-Gesamtmenge. Die Luminiszenz des durch UV-Licht angeregten Ethidium-Bromids ist proportional der DNA-Menge. Anhand der Intensität der Längenstandard-Vergleichsbanden kann die DNA-Menge einer Bande des aufgetrennten PCR-Produkts abgeschätzt werden. Dies wurde bei der Beurteilung der Auftrennung von Restriktions-Längenpolymorphismen eingesetzt.

Eine vergleichende, quantitative Bestimmung der DNA-Menge des PCR-Produkts wurde durch standardisierte Vergleichs-PCR vorgenommen. Hierfür wurde eine definierte DNA-Menge eines konstitutiv exprimierten Gens in Beziehung eingesetzt. Voraussetzung für die Auswahl dieses Gens ist, daß das Expressionsniveau bei allen eingesetzten Proben konstant ist. Hier wurde das Gen für für  $\beta$ 2-Microglobulin gewählt. Dabei muß die Zyklenzahl für das konstitutiv exprimierte Gen ( $\beta$ 2-Microglobulin) so gewählt werden, daß sich das Signal noch nicht in der Sättigung befindet, d.h. vor Erreichen der Plateauphase ist.

### **6.2.2.2 SSCP humaner Microsatelliten DNA**

Zum Nachweis der Klonalität einer expandierten Population von NK-Zellen oder T-Zellen erfolgte durch PCR. Die Nucleotid-Sequenzen der hierfür verwendeten Primer-Sets wurden über die BIOMED-1 Aktion der „Investigation of minimal residual disease in acute leukemia: international standardization and clinical evaluation“ bezogen. Um das hier in Frage kommende Rearrangement der V $\lambda$ -Regionen zu untersuchen wurden Gen-spezifische 5'-Primer in die V $\lambda$ -Region und 3'-Primer downstream der junctional J $\lambda$ -Region gelegt. Eine Unterscheidung der verschiedenen Gen-Loci konnte über die Länge des entstandenen PCR-Produkts festgestellt werden. Hierzu wurde das Produkt auf einem 8%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, mit EtBr angefärbt und dokumentiert. Für die V $\lambda$ -Region wurde mit Gen-spezifischen 5'-Primern auf identische Weise verfahren. Die Produkte konnten über ihre Länge während einer

Auftrennung der SSCP identifiziert werden. Nachfolgend wurden die PCR-Produkte aus einem Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten, die DNA isoliert (QIAprep) und in einen weiteren Schritt ein Sequenzier-Reaktion mit Cycle-Sequencing direkt während einer PCR-Reaktion durchgeführt. Dieses neue PCR-Produkt wurde auf dem ABI310 aufgetrennt und die Nucleotid-Sequenz analysiert. Primer-Nucleotid-Sequenzen wurden der Literatur entnommen (Knechtli, 1998; Pongers-Willemse, 1999; Bader, 2000).

PCR-Reaktionen und cycle-Sequencing wurden nach Protokollen, Anleitung, mit Geräten und Enzymen des Herstellers (ABI310-Sequencer; Appliel Biosystems/Perkin-Elmer, Foster City, CT, USA) durchgeführt.

### **6.2.2.3 Real-Time PCR mit der Taqman Technik (Applied Biosystems)**

Eine weitere Möglichkeit der Quantifizierung von PCR-Produkten ist die Methode fluorometrisch kontrollierter Produkt-Mengen Berechnung nach jedem Amplifikationsschritt (Taqman™). Hier wird die zeitverzögerte Fluoreszenz von Fluorochrom-markierten DNA-Fragmenten nach jedem PCR-Zyklus gemessen. Die Quantifizierung erfolgt durch Vergleich mit einer Eichkurve, die anhand der Fluoreszenz-Signale einer standardisierten Vergleichs-PCR errechnet wird. Die Real-Time PCR wurde nach Anleitung und mit Geräten des Herstellers durchgeführt (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Foster City, CT, USA).

Eine klinisch relevante Anwendung findet diese Technik z.B. im Nachweis noch verbliebener leukämischer Blasten nach erfolgter Chemotherapie und Stammzell-Transplantation. Auf diese Weise können wieder expandierende Blasten frühzeitig erkannt werden. Es kann mit dieser Methode aber ebenso die Expressions-Dichte von Rezeptoren wie Toll-Like- und NK-Rezeptoren auf zu untersuchenden Zellen gemessen werden.

### **6.2.2.4 HLA-Typisierung mittels PCR (Dynal)**

Die Typisierung der HLA I Allelen ach HLA-A, -B und -C in verschiedener Zelllinien und von Spenderblut wurde mit dem Dynal HLA-SSP™ Kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Vom Hersteller fertig präparierte Multititerplatten wurden nur noch definierte Mengen an DNA und das Taq-Enzym zugegeben. PCR-Protokolle sind vom Hersteller vorgegeben. Die PCR-Produkte wurden auf einem 0,8%igen Agarose-Gel aufgetrennt und in einem Transilluminator mit einer CCD-Kamera fotografiert. Die Auswertung der digitalisierten Gel-Bilder wurde mit der Auswertungs-Software von Dynal vorgenommen.

### **6.2.2.5 Mycoplasma-Test**

Mycoplasmen-Kontaminationen stellen eine der größten Gefahren beim Führen von Zellkulturen dar. Quellen dieser Kontamination sind vorwiegend FCS, Laborpersonal oder schon zuvor kontaminierte Zellkulturen. Mycoplasmen sind eukaryontische, einzellige Pathogene, die sich innerhalb der Wirtszellen vermehren. Infektionen sind meist

makroskopisch nicht zu erkennen, zumal infizierte Zellkulturen unter Umständen nicht sofort zerstört werden. Dennoch hat die Infektion mit Mycoplasmen Einfluß auf das Wachstum, die Vitalität, den Metabolismus und die RNA-Synthese. Einige der von Mycoplasmen hergestellten Proteine z.B. haben toxische Wirkung auf viele Zelllinien oder sie stellen ein aktivierendes Agens für Effektorzellen dar und verfälschen somit Tests, mit denen die spezifische Aktivität, Stimulierbarkeit oder Zytotoxizität beurteilt werden soll.

Die während dieser Arbeit über lange Zeit geführten Zellkulturen und Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf Mycoplasmen überprüft (Mycoplasmen-PCR-ELISA Kit<sup>TM</sup> von Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics, Basel, Schweiz). Aus Zellkulturüberstand wurde DNA aufgereinigt, eine PCR nach Herstellerangaben durchgeführt, das eine konservierte Region des Mycoplasmen Genoms amplifizierte. Die einzelsträngigen PCR-Produkte wurden durch Hybridisierung an eine biotin-markierte Sonde gebunden und an einer Streptavidin-beschichteten Microtiterplatte immobilisiert. Das immobilisierte PCR-Produkt wurde anhand eines gegen Digoxigenin gerichteten mAk und der an diesen mAk gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (POD) und des sensitiven Substrats 3,3',5,5',Tetramethylbenzidin (TMB) nachgewiesen. Durchgeführt wurde der Test nach Anleitung des Herstellers.

## **Auswertung der Daten auf PC und Apple Rechnern**

Die Auswertung der aus Nucleotidsequenzen gewonnenen Information und daraus sich ergebender Schlüsse wurde unter Zuhilfenahme der in Internet abfragbaren Datenbanken des NIH (Bethesda, MA, USA) vorgenommen. Für PCR-Primer Design und Auswertung der Ergebnisse aus Datenbanken und Literatur-Recherchen wurde mit der Software Vector NTI<sup>TM</sup> (Informax, Bethesda, MA, USA) verwendet. Zur Auswertung der während dieser Arbeit entstandenen Daten und zum Schreiben dieser Arbeit wurden folgende Programme benutzt:

Adobe Acrobat<sup>TM</sup>, Adobe Reader<sup>TM</sup>, Adobe Illustrator<sup>TM</sup>, Adobe Photoshop<sup>TM</sup>, Aldus Pagemaker<sup>TM</sup>, Canvas<sup>TM</sup>, Endnote<sup>TM</sup>, Reference Manager<sup>TM</sup>, Microsoft Access<sup>TM</sup>, Filemaker<sup>TM</sup>, Deltagraph<sup>TM</sup>, Kaleidagraph<sup>TM</sup>, JMP<sup>TM</sup>, SPSS<sup>TM</sup>, die Programme des Microsoft-Office<sup>TM</sup> Microsoft-Word<sup>TM</sup> und Microsoft-Excel<sup>TM</sup>, Schreib- und tabellenkalkulationsprogramme des Apple Works<sup>TM</sup>, diverse Netzwerk-Programme zur Betreuung eines Apple Networks in der Kinderklinik, Netscape Communicator<sup>TM</sup>, Dynal SSP<sup>TM</sup>, Cell-Quest<sup>TM</sup> und Jo-Flo<sup>TM</sup>.

## **MATERIALLISTE**

### **Geräte und Festmaterialien**

#### allgemeine Laborgeräte und Laborartikel:

- Sterile Werkbank Variolab Mobilien W 90 Waldner
- Brutschrank Heraeus
- Pipetten Abimed

- Pipettiergerät "Pipettboy" Tecnomara
- 50 ml PPN-Röhrchen, steril Greiner
- 15 ml PPN-Röhrchen, steril Greiner
- Sterile Plastikpipetten 1, 2, 5, 10 und 25 ml Costar
- Drehschüttler Heidolph
- Vortexer Heidolph
- Laborzentrifuge Rotixa /RP Hettich
- Waage zum Austarieren
- Gewebekulturflaschen: 75cm<sup>3</sup> Costar
- 

für Zytospins:

- Zentrifuge Cytospin 2 (Cytospin) Hettich
- Cytospin Filtercards Shandon

für die Mikroskopie:

- Photomikroskop; Okular 1:12,5; vier Objektive:
- 1:10 - 1:100 (Oel); Lichtquelle von unten Carl Zeiss
- Film für Diapositive: Kodak Ektachrom 64 T
- Lichtmikroskop (Zellzahlbestimmung) Carl Zeiss
- Objektträger 76 x 26 mm Langenbrinck
- Neubauer Zählkammer Brandt
- Deckgläser Knittel Gläser
- Inversionsmikroskop (Zellkulturbeobachtung) Olympus

für den Europiumfreisetzungstest

- Fluorometer LKB Wallac 1230 ARCUS m. Drucker Wallac
- Sonifier Cell Disruptor B-12 (Zellyse) Branson Sonic Power
- Immuno-Module Maxisorb C 12 (Meßracks) Nunc
- Mikrotiterplatte, 96 Kavitäten Costar

für die Polymerasekettenreaktion

- Ultrazentrifuge Beckmann Spinco Beckmann
- Eppendorfzentrifuge Typ 5415 C Eppendorf
- Vakuumzentrifuge Bachhofer
- Eppendorfcup Sarstedt
- CCD Kamera Cybertech CS-I Cybertech
- Filme Kodak
- Software zur Auswertung: Wincam Version 2.1 Cybertech
- UV- Lichtquelle Dunco
- Vakuumzentrifuge Bachhofer
- Gelkammer Eigenbau

- Stromquelle

Bachhofer

## Antikörper, Reagenzien und Lösungen

### allgemeine Reagenzien

- Phosphat buffered saline Spezial
- w/o Calcium/Magnesium Gibco
- Aqua bidest Apotheke
- Dimethylsulfoxid (DMSO) Sigma
- Trypsin/EDTA Biochrom

### Enzymatischer Verdau und Dichtezentrifugation

- Kollagenase Typ V Sigma
- Lymphoprep Nycomed

### Medium

- RPMI 1640 Biochrom
- Fetales Kälberserum (FCS) Biochrom
- Penicillin Biochrom
- Streptomycin Biochrom
- L-Glutamin Seromed
- Hepes Biochrom

### Monoklonale Antikörper, die in der Durchflußzytometrie verwendet wurden.

Erkanntes Zellepitop	Subtyp	Markierung	Hersteller
CD2	IgG1	FITC	Becton Dickinson
CD3	IgG1	FITC/PE	Becton Dickinson
CD4	IgG1	FITC/PE	Becton Dickinson
CD5	IgG1	FITC/PE	Becton Dickinson
CD7	IgG1	FITC	Becton Dickinson
CD8	IgG1	FITC/PE	Becton Dickinson
CD10	IgG1	FITC/PE	Becton Dickinson
CD11a	IgG1	FITC	Becton Dickinson
CD13	IgG1	FITC/PE	Becton Dickinson
CD14	IgG2a	FITC	Becton Dickinson
CD15	IgG1	FITC/PE	Becton Dickinson
CD16	IgG1	FITC	Becton Dickinson
CD18	IgG1	FITC	Becton Dickinson
CD19	IgG1	FITC/PE	Becton Dickinson
CD20	IgG1	FITC/PE	Becton Dickinson

CD22	IgG1	FITC	Becton Dickinson
CD25	IgG1	FITC	Becton Dickinson
CD33	IgG1	FITC/PE	Becton Dickinson
CD34	IgG1	FITC/PE/ PerCP/APC	Becton Dickinson
CD38	IgG1	FITC	Immunotech
CD40	IgG1	No/FITC/PE	
CD44	IgG1	FITC	Becton Dickinson
CD45	IgG1	FITC/PE	Becton Dickinson
CD49a (VLA-1)	IgG1	FITC	T - Cell Sciences über Biermann, Wiesbaden,
CD54 (ICAM-1)	IgG1	FITC	Immunotech
CD56	IgG1	FITC/PE/ PerCP/APC	Becton Dickinson
CD57	IgG1	FITC	Becton Dickinson
CD94	IgG1	PE	Immunotech
CD95	IgG1	No/FITC/PE	Pharmingen , R&D Systems
CD117	IgG1	FITC/PE	Immunotech
CD154	IgG1	No/FITC/PE	Pharmingen , R&D Systems
CD158a	IgG2a	No/FITC/PE	Immunotech
CD158b	IgG2a	No/PE	Immunotech
CD161	IgG1	No/FITC/PE	Pharmingen
CD178 (CD95- Ligand)	IgG1	No/FITC/PE	Hölzel , Pharmingen R&D Systems
Granzyme-B	IgG1	FITC/PE	Hölzel
W6/32 (HLA-A,B,C)	IgG1	No/FITC	Haarlan
B1.32.1 (HLA-B,C)	IgG1	No	P.Fisch/H.G.Rammensee
HLA-DR	IgG2a	FITC/PE	Becton Dickinson
IFN-g	IgG1	FITC/PE/APC	Miltenyi , Pharmingen
Goat-a-mouse IgG1	IgG1	FITC	Becton Dickinson
Rat-a-mouse IgG1a		FITC/PE	Serotec
Rat-a-mouse IgG2a	IgG1	FITC/PE	Serotec
IL-2	IgG1	APC	Miltenyi , Pharmingen
IL-4	IgG1	APC	Pharmingen
IL-5	IgG1	APC	Pharmingen
IL-10	IgG1	APC	Miltenyi , Pharmingen
IL-12	IgG1	APC	Pharmingen
Kontroll-antikörper □/□ <sub>a</sub>	IgG1 IgG2a	FITC PE	Becton Dickinson Becton Dickinson
Perforin	IgG1	FITC/PE	Hölzel
TCR- □/□	IgG1	FITC	Becton Dickinson
TCR- □□	IgG1	FITC	Becton Dickinson
TCR- □4	IgG1	FITC	Natutec , Serotec
TCR- □5	IgG1	FITC	Natutec , Serotec
TCR- □6	IgG1	FITC	Natutec , Serotec
TCR- □9	IgG1	FITC	Natutec , Serotec
TCR- □1	IgG1	FITC	Natutec , Serotec
TCR- □2	IgG1	FITC	Natutec , Serotec
TCR- □3	IgG1	FITC	Natutec , Serotec
TCR- □4	IgG1	FITC	Natutec , Serotec
TNF-a	IgG1	FITC/PE/APC	Miltenyi , Pharmingen

Durchflußzytometrie :

- Polyglobin N (5%);
- Natriumazid

Troponwerke

Sigma

- FACS-Lysing-Solution; 10-fach Konzentrat Becton Dickinson

#### RNA-Isolierung

- Guanidinthiocyanat Merck
- Natrium-N-Laurylsarcosin Merck
- $\beta$ -Mercaptoethanol Merck
- NaOH Merck
- Caesiumchlorid Merck
- EDTA Apotheke
- Formamid Merck
- Tris-HCl, pH 8,3 Merck
- KCl, Merck
- $MgCl_2$  Merck
- DTT Merck
- Nonidet P-40 Merck

#### cDNA Synthese

- Reverse Transkriptase RAV-2 Amersham
- Random Primer Böhringer Mannheim

#### Polymerasekettenreaktion

- Taq-Polymerase Boehringer Mannheim
- ddNTP  
Nukleotidemischung bestehend zu gleichen  
Volumenteilen aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP,  
je 100 mM Böhringer Mannheim

#### Gelelektrophorese

- Rotiphorese Gel 30 (37,5:1),  
gebrauchsfertig, stabilisiert Roth
- Auftragspuffer für DNA-Längenstandard  
und PCR-Produkte Merck
- Glycerol Merck
- Bromphenolblau Merck
- Xylencyanol Merck
- Tetraethylenmethyldiamin Merck
- Ammoniumperoxodisulfat, 1% Merck
- Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) Merck
- Borsäure Merck
- EDTA-Lösung, 0,25 M, pH 8,0 Apotheke
- Längenstandard VIII (19-1114 Bp) Böhringer Mannheim

### Zellkultur:

#### Wachstumsfaktoren

Erythropoetin (rhEPO),  $\gamma$ -Interferon (rhIFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  (rhTNF- $\alpha$ ), Stem Cell Factor (rhSCF), Granulocyte-Colony-Stimulating Factor (G-CSF), Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15.

Alle Wachstumsfaktoren und Zytokine sind rekombinant human hergestellt und wurden von Genzyme/R&D Systems, Minneapolis, MN, USA bezogen.

## **Stammlösungen, Puffer und Medien**

### Durchflußzytometrie:

- Immunfluoreszenzpuffer:

PBS ohne  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$

0,1%  $\text{NaN}_3$

5% Polyglobin N

- Lyselösung:

1:10 Verdünnung der FACS-Lysing-Solution mit Aqua bidest.

### Zellkultur:

#### Medium

500 ml Medium RPMI 1640

$5 \times 10^5$  U Penicillin

$5 \times 10^5$  Streptomycin

2 mM Glutamin

12,5 mM HEPES

50 ml FCS

#### MACS-Puffer

PBS-Spezial (Life Technologies)

25 mM EDTA

15% BSA

#### Zellkultur-Medium

RPMI 1640 (low enterotxin)

(Gibco BRL, Paisley, Großbritannien)

10% FCS

(Gibco BRL, Paisley, Großbritannien)

2 mM N-Glutamin

(Biowhittaker, Verviers, Belgien)

50 U Penicillin/ 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Dstreptomycin

(Biowhittaker, Verviers, Belgien)

1 M HEPES

(Gibco BRL, Paisley, Großbritannien)

#### NK-Medium

aMEM Medium Lösung	(Gibco BRL, Paisley, Großbritannien)
5% HS	(Q-Sera, Diagast, Marseilles, Frankreich)
2 mM N-Acetyl-Glutamin	(Gibco BRL, Paisley, Großbritannien)
50 U Penicilin/ 50 µg/ml Streptomycin	(Biowhittaker, Verviers, Belgien)
1x nichtessentielle Aminosäuren	(NEAA; Gibco BRL, Paisley, Großbritannien)
1mM NaPyruvat	(Gibco BRL, Paisley, Großbritannien)
1000 U/ml rhIL-2	(Proleukin; Chiron, Ratingen, Deutschland)

#### Klonierungs-Medium für T-Zellen

aMEM Medium Lösung	(Gibco BRL, Paisley, Großbritannien)
5% HS	(Q-Sera, Diagast, Marseilles, Frankreich)
2 mM N-Acetyl-Glutamin	(Gibco BRL, Paisley, Großbritannien)
50 U Penicilin/ 50µg/ml Dtreptomycin	(Biowhittaker, Verviers, Belgien)
1 M nichtessentielle Aminosäuren	(NEAA; Gibco BRL, Paisley, Großbritannien)
1 mM NaPyruvat	(Gibco BRL, Paisley, Großbritannien)
200-400 U/ml rhIL-2	(Proleukin; Chiron, Ratingen, Deutschland)
0,25 µg/ml PHA	(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

#### Trypsin-Lösung

0,5 g/l Trypsin
0,2 g/l EDTA
0,4 g/l KCl
8 g/l NaCl
0,35 g/l NaHCO <sub>3</sub>
1 g/l Glucose
0,005 g/l Phenolrot

#### **Liste der Differenzierungsmedien für die in vitro Expansion CD34<sup>+</sup> Stammzellen und Progenitorzellen myeloiden und lymphoiden Ursprungs:**

In vitro Stammzellerexpansionen in flüssigen und semi-soliden Medien wurde wie oben beschrieben oder nach Anleitung des Herstellers (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC) und mit im folgendem aufgeführten Zusätzen durchgeführt

In vitro Expansionen von CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen:

#### Mischung RM:

Spezial Medium (freundlicherweise durch Robert Müller und Benedikt Ziegler (Med. Klinik II, Tübingen) zur Verfügung gestellt)

Zusätze: 10 ng/ml Medium SCF, 100 ng/ml IL-3, 100 ng/ml IL-6, 50ng/ml GM-CSF , +/- 2-3 iU/ml EPO (alle recombinant human hergestellt)

Differenzierungsmuster: 25-35% rote Reihe, Rest in normaler Verteilung  
Vervielfachung der eingesetzten Zellzahl um: 30-50 fach

#### Mischung ReH:

Spezial Medium (freundlicherweise durch Reinhardt Henschler (Med. Klinik, Freiburg) zur Verfügung gestellt)  
Zusätze: 10 ng/ml SCF, 100 ng/ml IL-3, 100 ng/ml IL-6, +/- 2 iU/ml EPO (day1 / day1, 4, 10)  
Differenzierungsmuster: 30-40% rote Reihe, Rest in normaler Verteilung  
Vervielfachung der eingesetzten Zellzahl um: 40-60 fach

#### Mischung RuH:

Normalmedium für Zellkultur (RPMI, L-Glu, Penicillin/Streptomycin, HEPES, 10% FCS)  
Zusätze: 10 ng/ml Medium SCF, 100 ng/ml IL-3, 100 ng/ml IL-6, +/- 2 iU/ml EPO  
Differenzierungsmuster: 10-20% rote Reihe, Rest in normaler Verteilung  
Vervielfachung der eingesetzten Zellzahl um: 20-40 fach

#### Mischung SN:

RPMI 1640 (ohne Phenol-Rot), 10% FCS (vorselektiert), Glutamin (dauerhaftere Form), Penicillin/Streptomycin  
Zusätze: 50 ng/ml Medium SCF, 10 ng/ml IL-3, 100 ng/ml IL-6, 1 ng/ml IL-1b, +/- 1iU/ml EPO (day1 / day1, 4, 8)  
Differenzierungsmuster: 20-30% rote Reihe, Rest in normaler Verteilung  
Vervielfachung der eingesetzten Zellzahl um: 35-50 fach

#### Mischungen R & S:

RPMI 1640, 10% FCS, L-Glutamin, Penicillin-Streptomycin, (+/-) HEPES-Puffer  
Zusätze: 10 ng/ml Medium SCF, 100 ng/ml IL-3, 100 ng/ml IL-6, +/- 2-3 iU/ml EPO  
oder 50 ng/ml Medium SCF, 100 ng/ml IL-3, 100 ng/ml IL-6, +/- 2-3 iU/ml EPO (day1 / day1, 4, 7)  
oder 100 ng/ml Medium SCF, 100 ng/ml IL-3, +/- 3 iU/ml EPO (day1 / day1,3,6)  
Zusätze: 100 ng/ml Medium SCF (day1 / day1,3,5,8), 100 ng/ml IL-3, +/- 3 iU/ml EPO (day1 / day1, 3, 6)  
oder 50 ng/ml Medium SCF, 100 ng/ml IL-3, 100 ng/ml IL-6, 1 ng/ml IL-1b, +/- 3 iU/ml EPO (day1 / day1, 4, 8)  
Differenzierungsmuster: 20-45% rote Reihe, Rest in normaler Verteilung  
Vervielfachung der eingesetzten Zellzahl um: 35-55 fach

#### collagenhaltiges Medium (Stem Cell Technologies)

Medium mit Serum (Herstellergeheimnis), 60-90% rote Reihe

Zusätze: 10 ng/ml Medium SCF, 100 ng/ml IL-3, 100 ng/ml IL-6, 2-3 iU/ml EPO  
oder 10 ng/ml Medium SCF, 100 ng/ml IL-3, 2-3 iU/ml EPO  
oder 100 ng/ml Medium SCF, 100 ng/ml IL-3, 2-3 iU/ml EPO

Medium mit Serum, 60-90% weisse Reihe, fast keine rote Reihe

Zusätze: 10 ng/ml Medium SCF, 100 ng/ml IL-3, 100 ng/ml IL-6, 30 ng/ml GM-CSF

- oder 50 ng/ml Medium SCF, 100 ng/ml IL-3, 100 ng/ml IL-6 , 30 ng/ml GM-CSF
- oder 10 ng/ml Medium SCF, 100 ng/ml IL-3, 100 ng/ml GM-CSF
- oder 100 ng/ml Medium SCF, 100 ng/ml IL-3, 100 ng/ml IL-6 , 2 ng/ml IL-10

Spezialmedium für Megacaryozytenexpansion , 80-100% CFU-M oder CFU-GM, fast keine CFU-E

Vervielfachung der eingesetzten Zellzahl um: 30-55 fach

Zur Expressionssteigerung von MHC I wurden 200 iU/ml Interferon-g für 40 Stunden zugegeben. Es konnte eine Steigerung der MHC I Expression bei MHC I<sup>low</sup> Erythroblasten um 1,5-2,5 log-Stufen erreicht werden. Zur Expressions-Steigerung von CD94:NKG2A wurden, wie von Moretta (1999) beschrieben, 2ng IL-10 (und/oder 5ng/ml IL-12) für 10-20 Stunden zugegeben. Eine Steigerung konnte nicht beobachtet werden. Alle hier verwendeten Zytokine wurden rekombinat human hergestellt und von Genzyme/R&D Systems und Böhlingen Mannheim/Roche bezogen.

#### Einfrieren von Zellen:

Einfrieremedium:

90% Fetales Kälberserum

10% Dimethylsulfoxid (DMSO)

bei 48°C lagern oder besser frisch vor Gebrauch herstellen und kühl aufbewahren.

#### Polymerasekettenreaktion

RNA-Isolierung

- GuaSCN-Lyselösung:
  - 4,0 M Guanidinthiocyanat
  - 0,5% Natrium-N-Laurylsarcosin
  - nach dem Autoklavieren wird
  - 0,1 M  $\beta$ -Mercaptoethanol
  - zugegeben und mit
  - 12 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt
- CsCl/EDTA:
  - 5,7 M Caesiumchlorid
  - 0,1 M EDTA und mit
  - 12 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt
- 70% EtOH/ 30%Formamid-Waschlösung,
- cDNA-Synthese-Puffer, 10x:
  - 500 mM Tris-HCl, pH 8,3
  - 500 mM KCl,
  - 100 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 30 mM DTT
  - 1% Nonidet P-40

### Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

- Rotiphorse Gel30 (37,5:1), gebrauchsfertig, stabilisiert  
30%ige (g/v)Acrylamid-Stammlösung mit 0,8% (g/v) Bisacrylamid  
Lagerung bei 4°C
- APS (Ammoniumperoxodisulfat) 1%  
Lagerung bei 4° C
- PAGE-Auftragspuffer für DNA-Längenstandard:  
30% Glycerol  
0,025% Bromphenolblau  
0.025% Xylencyanol
- PAGE-Auftragspuffer für PCR-Produkte:  
30% Glycerol  
0,010 Bromphenolblau

### Polyacrylamidgel, 8%

Acrylamid-Lösung, 8%  
10x TBE  
aqua bidest.  
Tetraethylenmethyldiamin  
Ammoniumperoxodisulfat, 1%

### TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer), 10x

0,9 M Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)  
0,9 M Borsäure  
0,02 M EDTA-Lösung, pH 8,0

## **E Zusammenfassung**

Zielsetzung dieser Untersuchungen war es, NK-Zellen mit autoaggressivem Potential zu isolieren und auf dieses reaktive Potential hin zu untersuchen.

In beiden Teilprojekte wurden außergewöhnliche Situationen behandelt, in denen die Immunabwehr körpereigene Gewebe oder Zellen nicht mehr als „selbst“ erkennt und daher angreift. Hierbei sollte die Rolle inhibierender Rezeptoren der KIR2DL-Familie bei einer beobachteten Autoaggression untersucht werden.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde dies am Modell der Erkrankung der absoluten Erythroblastopenie („pure red cell aplasia“) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß ein Grund für das selektive Fehlen sämtlicher erythroider Progenitoren im Knochenmark eines Patienten das Repertoire der NK-Rezeptoren von klonal expandierten LGL-Zellen war. Dieser Klon exprimiert ausschließlich einen inhibierenden Rezeptor (KIR2DL1), dessen Bindungsspezifität für MHC I den autolog präsentierten HLA-C nicht einschließt. Als weitere Ursache wurde eine kontinuierliche Expressionsverminderung von MHC I auf erythroiden Vorläuferzellen während ihrer Differenzierung zum Erythroblasten ausgemacht, die beim Menschen bisher noch nicht gezeigt werden konnte. Die Kombination beider ist die Ursache für das Auftreten dieser seltenen Form der Anämie. Die vorliegende Arbeit liefert die erste Beschreibung einer Erkrankung, deren Ursache das Fehlen der „selbst“-MHC I Erkennung durch LGL-Zellen ist.

Im zweiten Teil konnte die Existenz einer kleinen Population von NK-Zellen im gesunden Menschen gezeigt werden, deren Besatz an inhibierenden NK-Rezeptoren den autolog exprimierten MHC I nicht erkennt. Aufgrund einer fehlenden Bindung und somit einer fehlenden Inhibition durch „selbst“-MHC I können diese Killerzellen zur Gefahr für körpereigenen Zellen und Organe werden. In mehreren Isolationsschritten wurde eine NK-Population aus dem Blut gesunder Spender gewonnen, deren einziger inhibierender Rezeptor den autolog exprimierten HLA-C nicht erkennt. In Langzeit-Zytotoxizitätstests wurde diese Population und die von ihr abgeleiteten NK-Klone gegen autologe CD34-positive hämatopoetische Stammzellen eingesetzt. Bei einer Reihe von Spendern ließen die hämatopoetischen Stammzellen ein stark verringertes koloniebildendes Potential erkennen. Es konnte gezeigt werden, daß der Grund des autoreaktiven Verhaltens der NK-Zellen das Fehlen des Liganden für den HLA-C bindenden inhibierenden NK-Rezeptor der NK-Zellen war. Hierbei spielte es keine Rolle, daß die Expressionsdichte von

MHC I auf den Zielzellen sehr hoch war und somit für andere Rezeptoren genügend Bindungspartner bereit standen. Entgegen den bislang vorherrschenden Theorien über die Regulation von inhibierenden Rezeptoren auf NK-Zellen konnte hier erstmals der Nachweis erbracht werden, daß NK-Zellen aufgrund eines Fehlens der Bindung an „selbst“-HLA-C körpereigene Zellen angreifen.

Diese NK-Zellen, deren autoreaktives Potential im Fehlen „selbst“-erkennender KIRs gründet, scheinen während ihres Reifungsprozesses, noch vor Bildung dieser Rezeptoren, ihr KIR-Repertoire fixiert zu haben. Das für diesen Differenzierungs-Stop verantwortliche Signal ist unbekannt. Es mag spekuliert werden, ob virale Proteine, die von infizierten Zellen gebildet werden um der NK-vermittelten Immunantwort zu entkommen, hierfür verantwortlich sind.

## F Literatur

- Abkowitz, J. L., S. N. Catlin and P. Guttorp (1996). "Evidence that hematopoiesis may be a stochastic process in vivo." Nat Med **2**(2): 190-7.
- Akdis, A. C., H. Towbin, P. Libsig, J. Motz and S. S. Alkan (1995). "Cytokine immunotrapping: an assay to study the kinetics of production and consumption or degradation of human interferon-gamma." J Immunol Methods **182**(2): 251-61.
- Akira, S., K. Takeda and T. Kaisho (2001). "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity." Nat Immunol **2**(8): 675-80.
- Altschuler, E. L. (1999). "Parvovirus B19 and the pathogenesis of rheumatoid arthritis: a case for historical reasoning." Lancet **354**(9183): 1026-7.
- Altschuler, E. L. and E. L. Altshuler (1999). "Antiquity of Epstein-Barr virus, Sjogren's syndrome, and Hodgkin's disease--historical concordance and discordance [letter] [published erratum appears in J Natl Cancer Inst 2000 Feb 2;92(3):275]." J Natl Cancer Inst **91**(17): 1512-3.
- Amano, M., J. C. Martin, J. R. McGhee, M. J. McCutcheon and H. Kiyono (1991). "Immunofluorescence-digital image processing system for the quantitation of secreted immunoglobulin by single cells." J Immunol Methods **144**(1): 127-40.
- Arnold, B., G. Schonrich and G. J. Hammerling (1992). "Extrathymic T-cell selection." Curr Opin Immunol **4**(2): 166-70.
- Arnold, B., G. Schonrich and G. J. Hammerling (1993). "Multiple levels of peripheral tolerance." Immunol Today **14**(1): 12-4.
- Asnagli, H. and K. M. Murphy (2001). "Stability and commitment in T helper cell development." Curr Opin Immunol **13**(2): 242-7.
- Assenmacher, M., M. Lohning, A. Scheffold, R. A. Manz, J. Schmitz and A. Radbruch (1998). "Sequential production of IL-2, IFN-gamma and IL-10 by individual staphylococcal enterotoxin B-activated T helper lymphocytes." Eur J Immunol **28**(5): 1534-43.
- Assenmacher, M., M. Lohning, A. Scheffold, A. Richter, S. Miltenyi, J. Schmitz and A. Radbruch (1998). "Commitment of individual Th1-like lymphocytes to expression of IFN-gamma versus IL-4 and IL-10: selective induction of IL-10 by sequential stimulation of naive Th cells with IL-12 and IL-4." J Immunol **161**(6): 2825-32.
- Assenmacher, M., J. Schmitz and A. Radbruch (1994). "Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon-gamma and in interleukin-4-expressing cells." Eur J Immunol **24**(5): 1097-101.
- Bader, P., K. Stoll, S. Huber, A. Geiselhart, R. Handgretinger, C. Niemeyer, H. Einsele, P. G. Schlegel, D. Niethammer, J. Beck and T. Klingebiel (2000). "Characterization of lineage-specific chimaerism in patients with acute leukaemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation before and after relapse." Br J Haematol **108**(4): 761-8.

- Barnes, R. C. and D. M. Worrall (1995). "Identification of a novel human serpin gene; cloning sequencing and expression of leupin." FEBS Lett **373**(1): 61-5.
- Basch, R. S. (1995). Isolation and characterization of hematopoietic stem cells. New York, Basel, Hong Kong, Marcel Dekker.
- Bellone, G., N. M. Valiante, O. Viale, E. Ciccone, L. Moretta and G. Trinchieri (1993). "Regulation of hematopoiesis in vitro by alloreactive natural killer cell clones." J Exp Med **177**(4): 1117-25.
- Biassoni, R., C. Cantoni, M. Falco, S. Verdiani, C. Bottino, M. Vitale, R. Conte, A. Poggi, A. Moretta and L. Moretta (1996). "The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions." J Exp Med **183**(2): 645-50.
- Biassoni, R., M. Falco, A. Cambiaggi, P. Costa, S. Verdiani, D. Pende, R. Conte, C. Di Donato, P. Parham and L. Moretta (1995). "Amino acid substitutions can influence the natural killer (NK)-mediated recognition of HLA-C molecules. Role of serine-77 and lysine-80 in the target cell protection from lysis mediated by "group 2" or "group 1" NK clones." J Exp Med **182**(2): 605-9.
- Billadeau, D. D., K. M. Brumbaugh, C. J. Dick, R. A. Schoon, X. R. Bustelo and P. J. Leibson (1998). "The Vav-Rac1 pathway in cytotoxic lymphocytes regulates the generation of cell-mediated killing." J Exp Med **188**(3): 549-59.
- Biron, C. A. (1997). "Activation and function of natural killer cell responses during viral infections." Curr Opin Immunol **9**(1): 24-34.
- Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger and D. C. Wiley (1987). "Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2." Nature **329**(6139): 506-12.
- Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger and D. C. Wiley (1987). "The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens." Nature **329**(6139): 512-8.
- Blery, M., L. Olcese and E. Vivier (2000). "Early signaling via inhibitory and activating NK receptors." Hum Immunol **61**(1): 51-64.
- Blomberg, K., C. Granberg, I. Hemmila and T. Lovgren (1986). "Europium-labelled target cells in an assay of natural killer cell activity. II. A novel non-radioactive method based on time-resolved fluorescence. significance and specificity of the method." J Immunol Methods **92**(1): 117-23.
- Blomberg, K., C. Granberg, I. Hemmila and T. Lovgren (1986). "Europium-labelled target cells in an assay of natural killer cell activity. I. A novel non-radioactive method based on time-resolved fluorescence." J Immunol Methods **86**(2): 225-9.
- Boggs, S. S., M. Trevisan, K. Patrene and K. Geogopoulos (1999). "Lack of natural killer cell precursors in fetal liver of ikaros knockout mutant mice [In Process Citation]." Nat Immun **16**(4): 137-45.
- Bossi, G., M. G. Bottone and C. Pellicciari (1998). "LFA-1 mediated cell adhesion induces G0-G1 transition of human T lymphocytes in vitro." Eur J Histochem **42**(4): 277-85.
- Bossi, G. and G. M. Griffiths (1999). "Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells." Nat Med **5**(1): 90-6.
- Bottino, C., R. Biassoni, R. Millo, L. Moretta and A. Moretta (2000). "The human natural cytotoxicity receptors (NCR) that induce HLA class I-independent NK cell triggering." Hum Immunol **61**(1): 1-6.

- Boyum, A. (1968). "Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction." Scand J Clin Lab Invest Suppl **97**: 7.
- Branden, C. and J. Tooze (1991). Introduction to protein structure. London, New York, Garland.
- Braud, V. M., D. S. Allan, C. A. O'Callaghan, K. Soderstrom, A. D'Andrea, G. S. Ogg, S. Lazetic, N. T. Young, J. I. Bell, J. H. Phillips, L. L. Lanier and A. J. McMichael (1998). "HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C [see comments]." Nature **391**(6669): 795-9.
- Brosterhus, H., S. Brings, H. Leyendeckers, R. A. Manz, S. Miltenyi, A. Radbruch, M. Assenmacher and J. Schmitz (1999). "Enrichment and detection of live antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cells based on cytokine secretion." Eur J Immunol **29**(12): 4053-9.
- Brugger, W., S. Scheduling, B. Ziegler, H. J. Buhring and L. Kanz (2000). "Ex vivo manipulation of hematopoietic stem and progenitor cells." Semin Hematol **37**(1 Suppl 2): 42-9.
- Buer, J., I. Aifantis, J. P. DiSanto, H. J. Fehling and H. von Boehmer (1997). "T-cell development in the absence of the pre-T-cell receptor." Immunol Lett **57**(1-3): 5-8.
- Buhring, H. J., M. Seiffert, T. A. Bock, S. Scheduling, A. Thiel, A. Scheffold, L. Kanz and W. Brugger (1999). "Expression of novel surface antigens on early hematopoietic cells." Ann N Y Acad Sci **872**: 25-38; discussion 38-9.
- Buhring, H. J., P. J. Simmons, M. Pudney, R. Muller, D. Jarrossay, A. van Agthoven, M. Willheim, W. Brugger, P. Valent and L. Kanz (1999). "The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors." Blood **94**(7): 2343-56.
- Bulte, J. W., Y. Hoekstra, R. L. Kamman, R. L. Magin, A. G. Webb, R. W. Briggs, K. G. Go, C. E. Hulstaert, S. Miltenyi, T. H. The and et al. (1992). "Specific MR imaging of human lymphocytes by monoclonal antibody-guided dextran-magnetite particles." Magn Reson Med **25**(1): 148-57.
- Burmester, G.-R., A. Pezzuto, T. Ulrichs, A. Aicher and J. Wirth (1998). Immunologie. Stuttgart, Georg-Thieme-Verlag.
- Busch, R. and E. D. Mellins (1996). "Developing and shedding inhibitions: how MHC class II molecules reach maturity." Curr Opin Immunol **8**(1): 51-8.
- Busslinger, M., S. L. Nutt and A. G. Rolink (2000). "Lineage commitment in lymphopoiesis." Curr Opin Immunol **12**(2): 151-8.
- Calabresi, P. A., N. S. Fields, E. C. Farnon, J. A. Frank, C. N. Bash, T. Kawanashi, H. Maloni, S. Jacobson and H. F. McFarland (1998). "ELI-spot of Th-1 cytokine secreting PBMC's in multiple sclerosis: correlation with MRI lesions." J Neuroimmunol **85**(2): 212-9.
- Carbone, E., G. Ruggiero, G. Terrazzano, C. Palomba, C. Manzo, S. Fontana, H. Spits, K. Karre and S. Zappacosta (1997). "A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction." J Exp Med **185**(12): 2053-60.
- Carbone, E., G. Terrazzano, A. Melian, D. Zanzi, L. Moretta, S. Porcelli, K. Karre and S. Zappacosta (2000). "Inhibition of human NK cell-mediated killing by CD1 molecules." J Immunol **164**(12): 6130-7.
- Carvalho, L. H., J. C. Hafalla and F. Zavala (2001). "ELISPOT assay to measure antigen-specific murine CD8(+) T cell responses." J Immunol Methods **252**(1-2): 207-18.
- Cella, M. and M. Colonna (2000). "Cloning human natural killer cells." Methods Mol Biol **121**: 1-4.

- Cerboni, C., M. Mousavi-Jazi, A. Linde, K. Soderstrom, M. Brytting, B. Wahren, K. Karre and E. Carbone (2000). "Human cytomegalovirus strain-dependent changes in NK cell recognition of infected fibroblasts." J Immunol **164**(9): 4775-82.
- Cerwenka, A., A. B. Bakker, T. McClanahan, J. Wagner, J. Wu, J. H. Phillips and L. L. Lanier (2000). "Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice." Immunity **12**(6): 721-7.
- Chambers, J., Rickwood, A (1978). Centrifugation: A practical Approach. London , Washington DC.
- Charles, R. J., K. M. Sabo, P. G. Kidd and J. L. Abkowitz (1996). "The pathophysiology of pure red cell aplasia: implications for therapy." Blood **87**(11): 4831-8.
- Chirgwin, J. M., A. E. Przybyla, R. J. MacDonald and W. J. Rutter (1979). "Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease." Biochemistry **18**(24): 5294-9.
- Christiansen, F. T., C. S. Witt, E. Ciccone, D. Pende, O. Viale, R. L. Dawkins and L. Moretta (1993). "Natural killer defined haplotypes are associated with particular ancestral haplotypes: implications for bone marrow transplantation." Transplant Proc **25**(1 Pt 2): 1259-60.
- Colonna, M. (1997). "Specificity and function of immunoglobulin superfamily NK cell inhibitory and stimulatory receptors." Immunol Rev **155**: 127-33.
- Colonna, M. (1998). "Immunology. Unmasking the killer's accomplice [news; comment]." Nature **391**(6668): 642-3.
- Colonna, M., G. Borsellino, M. Falco, G. B. Ferrara and J. L. Strominger (1993). "HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(24): 12000-4.
- Colonna, M., E. G. Brooks, M. Falco, G. B. Ferrara and J. L. Strominger (1993). "Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C." Science **260**(5111): 1121-4.
- Colonna, M. and J. Samaridis (1995). "Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells." Science **268**(5209): 405-8.
- Cruse, J., Lewis, RE (1999). Atlas of Immunology. London, CRC Press.
- Davis, D. M., I. Chiu, M. Fassett, G. B. Cohen, O. Mandelboim and J. L. Strominger (1999). "The human natural killer cell immune synapse." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 15062-7.
- Davodeau, F., M. A. Peyrat, M. M. Hallet, J. Gaschet, I. Houde, R. Vivien, H. Vie and M. Bonneville (1993). "Close correlation between Daudi and mycobacterial antigen recognition by human gamma delta T cells and expression of V9JPC1 gamma/V2DJC delta-encoded T cell receptors." J Immunol **151**(3): 1214-23.
- Davodeau, F., M. A. Peyrat, I. Houde, M. M. Hallet, G. De Libero, H. Vie and M. Bonneville (1993). "Surface expression of two distinct functional antigen receptors on human gamma delta T cells." Science **260**(5115): 1800-2.
- Di Santo, J. P., I. Aifantis, E. Rosmaraki, C. Garcia, J. Feinberg, H. J. Fehling, A. Fischer, H. von Boehmer and B. Rocha (1999). "The common cytokine receptor gamma chain and the pre-T cell receptor provide independent but critically overlapping signals in early alpha/beta T cell development." J Exp Med **189**(3): 563-74.
- Diefenbach, A. and D. H. Raulet (1999). "Natural killer cells: stress out, turn on, tune in." Curr Biol **9**(22): R851-3.
- DiSanto, J. P., D. Guy-Grand, A. Fisher and A. Tarakhovsky (1996). "Critical role for the common cytokine receptor gamma chain in intrathymic and peripheral T cell selection." J Exp Med **183**(3): 1111-8.

- Dohring, C., J. Samaridis and M. Colonna (1996). "Alternatively spliced forms of human killer inhibitory receptors." *Immunogenetics* **44**(3): 227-30.
- Dorfman, J. R. and D. H. Raulet (1996). "Major histocompatibility complex genes determine natural killer cell tolerance." *Eur J Immunol* **26**(1): 151-5.
- Dorfman, J. R. and D. H. Raulet (1998). "Acquisition of Ly49 receptor expression by developing natural killer cells." *J Exp Med* **187**(4): 609-18.
- Dupont, B., A. Selvakumar and U. Steffens (1997). "The killer cell inhibitory receptor genomic region on human chromosome 19q13.4." *Tissue Antigens* **49**(6): 557-63.
- Eaves, C., Lambie, K (1995). *Atlas of Human Hematopoietic Colonies*. Vancouver, BC, Canada, Stem Cell Technologies.
- Eaves, C. (1995). Assays of hematopoietic progenitor cells. *Williams Hematology*. E. Beutler, Lichtman, MA , Coller, BS , Kipps, TJ, McGraw-Hill. **5**: L22-26.
- Egeland, T., G. Tjonnfjord, R. Steen, G. Gaudernack and E. Thorsby (1993). "Positive selection of bone marrow-derived CD34 positive cells for possible stem cell transplantation." *Transplant Proc* **25**(1 Pt 2): 1261-3.
- Egeland, T. G., G (1994). Immunomagnetic isolation of CD34+ cells: methodology and monoclonal antibodies. *The Mulhouse manual*. W. E. S. H. H. P. S. S. Dayton, Ohio, USA, AlphaMed Press: 141-148.
- Eischen, C. M. and P. J. Leibson (1997). "Role for NK-cell-associated Fas ligand in cell-mediated cytotoxicity and apoptosis." *Res Immunol* **148**(3): 164-9.
- Eischen, C. M. and P. J. Leibson (1997). "The Fas pathway in apoptosis." *Adv Pharmacol* **41**(3): 107-32.
- Elliott, T. (1997). "How does TAP associate with MHC class I molecules?" *Immunol Today* **18**(8): 375-9.
- Elliott, T. (1997). "Transporter associated with antigen processing." *Adv Immunol* **65**: 47-109.
- Epstein, M. A., Y. M. Barr and B. G. Achong (1965). "Studies with Burkitt's lymphoma." *Wistar Inst Symp Monogr* **4**: 69-82.
- Falk, C. S., A. Steinle and D. J. Schendel (1995). "Expression of HLA-C molecules confers target cell resistance to some non-major histocompatibility complex-restricted T cells in a manner analogous to allospecific natural killer cells." *J Exp Med* **182**(4): 1005-18.
- Fan, Q. R., D. N. Garboczi, C. C. Winter, N. Wagtmann, E. O. Long and D. C. Wiley (1996). "Direct binding of a soluble natural killer cell inhibitory receptor to a soluble human leukocyte antigen-Cw4 class I major histocompatibility complex molecule." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(14): 7178-83.
- Ferrick, D. A., M. D. Schrenzel, T. Mulvania, B. Hsieh, W. G. Ferlin and H. Lepper (1995). "Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo." *Nature* **373**(6511): 255-7.
- Frickhofen, N., Z. J. Chen, N. S. Young, B. J. Cohen, H. Heimpel and J. L. Abkowitz (1994). "Parvovirus B19 as a cause of acquired chronic pure red cell aplasia." *Br J Haematol* **87**(4): 818-24.
- Frohn, C., P. Schlenke and H. Kirchner (1997). "The repertoire of HLA-Cw-specific NK cell receptors CD158 a/b (EB6 and GL183) in individuals with different HLA phenotypes." *Immunology* **92**(4): 567-70.
- Fujii, H., K. Ogasawara, H. Otsuka, M. Suzuki, K. Yamamura, T. Yokochi, T. Miyazaki, H. Suzuki, T. W. Mak, S. Taki and T. Taniguchi (1998). "Functional dissection of the cytoplasmic subregions of the IL-2 receptor betac chain in primary lymphocyte populations." *Embo J* **17**(22): 6551-7.
- Galandrini, R., G. Palmieri, M. Piccoli, L. Frati and A. Santoni (1999). "Role for the Rac1 exchange factor Vav in the signaling pathways leading to NK cell cytotoxicity." *J Immunol* **162**(6): 3148-52.

- Geiselhart, A., S. Neu, F. Buchholz, P. Lang, D. Niethammer and R. Handgretinger (1996). "Positive selection of CD56+ lymphocytes by magnetic cell sorting." Nat Immun **15**(5): 227-33.
- Glas, R., L. Franksson, C. Une, M. L. Eloranta, C. Ohlen, A. Orn and K. Karre (2000). "Recruitment and activation of natural killer (NK) cells in vivo determined by the target cell phenotype. An adaptive component of NK cell-mediated responses." J Exp Med **191**(1): 129-38.
- Goldman, J. (1995). "Peripheral blood stem cells for allografting [editorial] [see comments]." Blood **85**(6): 1413-5.
- Graf, N. (1995). "Maligne Erkrankungen im Kindesalter; in: Pädiatrie." MLP: Duale Reihe: 532 - 580.
- Groettrup, M., T. Ruppert, L. Kuehn, M. Seeger, S. Standera, U. Koszinowski and P. M. Kloetzel (1995). "The interferon-gamma-inducible 11 S regulator (PA28) and the LMP2/LMP7 subunits govern the peptide production by the 20 S proteasome in vitro." J Biol Chem **270**(40): 23808-15.
- Groettrup, M., A. Soza, M. Eggers, L. Kuehn, T. P. Dick, H. Schild, H. G. Rammensee, U. H. Koszinowski and P. M. Kloetzel (1996). "A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation." Nature **381**(6578): 166-8.
- Groettrup, M., A. Soza, U. Kuckelkorn and P. M. Kloetzel (1996). "Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency." Immunol Today **17**(9): 429-35.
- Groh, V., A. Steinle, S. Bauer and T. Spies (1998). "Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells." Science **279**(5357): 1737-40.
- Gumperz, J. E., V. Litwin, J. H. Phillips, L. L. Lanier and P. Parham (1995). "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 **181**(3): 1133-44.
- Gumperz, J. E. and P. Parham (1995). "The enigma of the natural killer cell." Nature **378**(6554): 245-8.
- Gunji, Y. and T. Suda (1995). "Characterisation and enrichment of human hematopoietic stem cells." 1 - 26.
- Hacker, G., S. Kromer, M. Falk, K. Heeg, H. Wagner and K. Pfeffer (1992). "V delta 1+ subset of human gamma delta T cells responds to ligands expressed by EBV-infected Burkitt lymphoma cells and transformed B lymphocytes." J Immunol **149**(12): 3984-9.
- Handgretinger, R., R. Dopfer, S. Hammer, P. Lang, B. Daurer, A. Kimmig, R. Siedner, B. Jalowy, J. Treuner and D. Niethammer (1990). "The efficiency of a new cell separation technique in bone marrow purging without damaging the purged tumor cells." Prog Clin Biol Res **333**: 303-9.
- Handgretinger, R., A. Geiselhart, A. Moris, R. Grau, O. Teuffel, W. Bethge, L. Kanz and P. Fisch (1999). "Pure red-cell aplasia associated with clonal expansion of granular lymphocytes expressing killer-cell inhibitory receptors [see comments]." N Engl J Med **340**(4): 278-84.
- Handgretinger, R., M. Schumm, P. Lang, J. Greil, A. Reiter, P. Bader, D. Niethammer and T. Klingebiel (1999). "Transplantation of megadoses of purified haploidentical stem cells." Ann N Y Acad Sci **872**: 351-61; discussion 361-2.
- Hansen, J. D. and A. G. Zapata (1998). "Lymphocyte development in fish and amphibians." Immunol Rev **166**: 199-220.
- Hara, E., T. Kato, S. Nakada, S. Sekiya and K. Oda (1991). "Subtractive cDNA cloning using oligo(dT)30-latex and PCR: isolation of cDNA clones specific to undifferentiated human embryonal carcinoma cells." Nucleic Acids Res **19**(25): 7097-104.

- Hart, D. N., B. W. Baker, M. J. Inglis, J. C. Nimmo, G. C. Starling, E. Deacon, M. Rowe and M. E. Beard (1992). "Epstein-Barr viral DNA in acute large granular lymphocyte (natural killer) leukemic cells [see comments]." Blood **79**(8): 2116-23.
- Hayday, A. C. (2000). "[gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection." Annu Rev Immunol **18**: 975-1026.
- Hayday, A. C., D. F. Barber, N. Douglas and E. S. Hoffman (1999). "Signals involved in gamma/delta T cell versus alpha/beta T cell lineage commitment." Semin Immunol **11**(4): 239-49.
- Held, W., D. Cado and D. H. Raulet (1996). "Transgenic expression of the Ly49A natural killer cell receptor confers class I major histocompatibility complex (MHC)-specific inhibition and prevents bone marrow allograft rejection." J Exp Med **184**(5): 2037-41.
- Held, W., J. R. Dorfman, M. F. Wu and D. H. Raulet (1996). "Major histocompatibility complex class I-dependent skewing of the natural killer cell Ly49 receptor repertoire [published erratum appears in Eur J Immunol 1996 Dec;26(12):3242]." Eur J Immunol **26**(10): 2286-92.
- Held, W. and B. Kunz (1998). "An allele-specific, stochastic gene expression process controls the expression of multiple Ly49 family genes and generates a diverse, MHC-specific NK cell receptor repertoire." Eur J Immunol **28**(8): 2407-16.
- Held, W., B. Kunz, V. Ioannidis and B. Lowin-Kropf (1999). "Mono-allelic Ly49 NK cell receptor expression." Semin Immunol **11**(5): 349-55.
- Held, W. and D. H. Raulet (1997). "Expression of the Ly49A gene in murine natural killer cell clones is predominantly but not exclusively mono-allelic." Eur J Immunol **27**(11): 2876-84.
- Held, W., J. Roland and D. H. Raulet (1995). "Allelic exclusion of Ly49-family genes encoding class I MHC-specific receptors on NK cells." Nature **376**(6538): 355-8.
- Hildebrandt, M., M. Y. Mapara, I. J. Korner, R. C. Bargou, G. Moldenhauer and B. Dorken (1997). "Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)-controlled immunomagnetic purging of breast cancer cells using the magnetic cell separation (MACS) system: a sensitive method for monitoring purging efficiency." Exp Hematol **25**(1): 57-65.
- Hogge, D., S. Fanning, K. Bockhold, A. Petzer, K. Lambie, P. Lansdorp, A. Eaves and C. Eaves (1997). "Quantitation and characterization of human megakaryocyte colony-forming cells using a standardized serum-free agarose assay." Br J Haematol **96**(4): 790-800.
- Hogge, D. E., P. M. Lansdorp, D. Reid, B. Gerhard and C. J. Eaves (1996). "Enhanced detection, maintenance, and differentiation of primitive human hematopoietic cells in cultures containing murine fibroblasts engineered to produce human stem cell factor, interleukin-3, and granulocyte colony-stimulating factor." Blood **88**(10): 3765-73.
- Hoglund, P., R. Glas, C. Menard, A. Kase, M. H. Johansson, L. Franksson, F. Lemmonier and K. Karre (1998). "Beta2-microglobulin-deficient NK cells show increased sensitivity to MHC class I-mediated inhibition, but self tolerance does not depend upon target cell expression of H-2Kb and Db heavy chains." Eur J Immunol **28**(1): 370-8.
- Hoglund, P., J. Sundback, M. Y. Olsson-Alheim, M. Johansson, M. Salcedo, C. Ohlen, H. G. Ljunggren, C. L. Sentman and K. Karre (1997). "Host MHC class I gene control of NK-cell specificity in the mouse." Immunol Rev **155**: 11-28.
- Horton, J. and A. Lackie (1991). Immunologie. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.

- Ibelgaufts, H. (1995). Dictionary of cytokines. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, VCH Verlagsgesellschaft.
- Jaffe, E. S., L. Krenacs, S. Kumar, D. W. Kingma and M. Raffeld (1999). "Extranodal peripheral T-cell and NK-cell neoplasms." Am J Clin Pathol **111**(1 Suppl 1): S46-55.
- Johansson, M. H., C. Bieberich, G. Jay, K. Karre and P. Hoglund (1997). "Natural killer cell tolerance in mice with mosaic expression of major histocompatibility complex class I transgene." J Exp Med **186**(3): 353-64.
- Johansson, M. H., C. Bieberich, A. Kase-Sjostrom, T. Yoshioka, E. Hoglund, B. A. Christy, G. Scangos, K. Karre, G. Jay and P. Hoglund (2000). "Differential effects on T cell and NK cell development by tissue-specific expression of H-2D(d) transgene." Eur J Immunol **30**(2): 525-33.
- Johnstone, R. M., M. Adam, J. R. Hammond, L. Orr and C. Turbide (1987). "Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)." J Biol Chem **262**(19): 9412-20.
- Kabilan, L., G. Andersson, F. Lolli, H. P. Ekre, T. Olsson and M. Troye-Blomberg (1990). "Detection of intracellular expression and secretion of interferon-gamma at the single-cell level after activation of human T cells with tetanus toxoid in vitro." Eur J Immunol **20**(5): 1085-9.
- Kala, M., K. Bajaj and S. Sinha (1997). "Magnetic bead enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detects antigen-specific binding by phage-displayed scFv antibodies that are not detected with conventional ELISA." Anal Biochem **254**(2): 263-6.
- Karlhofer, F. M., R. Hunziker, A. Reichlin, D. H. Margulies and W. M. Yokoyama (1994). "Host MHC class I molecules modulate in vivo expression of a NK cell receptor." J Immunol **153**(6): 2407-16.
- Karre, K. (1997). "How to recognize a foreign submarine." Immunol Rev **155**: 5-9.
- Karre, K., H. G. Ljunggren, G. Piontek and R. Kiessling (1986). "Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy." Nature **319**(6055): 675-8.
- Kavathas, P., F. H. Bach and R. DeMars (1980). "Gamma ray-induced loss of expression of HLA and glyoxalase I alleles in lymphoblastoid cells." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(7): 4251-5.
- Kavathas, P., R. DeMars and F. H. Bach (1980). "Hemizygous HLA mutants of lymphoblastoid cells: a new cell type for histocompatibility testing." Hum Immunol **1**(4): 317-24.
- Kiessling, R., E. Klein and H. Wigzell (1975). "'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 **5**(2): 112-7.
- Klein, E., G. Klein, J. S. Nadkarni, J. J. Nadkarni, H. Wigzell and P. Clifford (1968). "Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines." Cancer Res **28**(7): 1300-10.
- Klein, G., G. Pearson, J. S. Nadkarni, J. J. Nadkarni, E. Klein, G. Henle, W. Henle and P. Clifford (1968). "Relation between Epstein-Barr viral and cell membrane immunofluorescence of Burkitt tumor cells. I. Dependence of cell membrane immunofluorescence on presence of EB virus." J Exp Med **128**(5): 1011-20.
- Knechtli, C. J., N. J. Goulden, J. P. Hancock, V. L. Grandage, E. L. Harris, R. J. Garland, C. G. Jones, A. W. Rowbottom, L. P. Hunt, A. F. Green, E. Clarke, A. W. Lankester, J. M. Cornish, D. H. Pamphilon, C. G. Steward and A. Oakhill (1998). "Minimal residual disease status before allogeneic bone marrow transplantation is an important determinant of successful outcome for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia." Blood **92**(11): 4072-9.

- Knechtli, C. J., N. J. Goulden, J. P. Hancock, E. L. Harris, R. J. Garland, C. G. Jones, V. L. Grandage, A. W. Rowbottom, A. F. Green, E. Clarke, A. W. Lankester, M. N. Potter, J. M. Cornish, D. H. Pamphilon, C. G. Steward and A. Oakhill (1998). "Minimal residual disease status as a predictor of relapse after allogeneic bone marrow transplantation for children with acute lymphoblastic leukaemia." *Br J Haematol* **102**(3): 860-71.
- Knuchel, R. (1994). "[Analysis by flow cytometry and cell sorting. Report of current status and perspectives for pathology]." *Pathologie* **15**(2): 85-95.
- Koeffler, H. P. and D. W. Golde (1978). "Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity." *Science* **200**(4346): 1153-4.
- Koeffler, H. P. and D. W. Golde (1980). "Human myeloid leukemia cell lines: a review." *Blood* **56**(3): 344-50.
- Konig, R., L. Y. Huang and R. N. Germain (1992). "MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8." *Nature* **356**(6372): 796-8.
- Koopman, G., C. P. Reutelingsperger, G. A. Kuijten, R. M. Keehnen, S. T. Pals and M. H. van Oers (1994). "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis." *Blood* **84**(5): 1415-20.
- Kuby, J. (1997). "Immunology."
- Kuci, S., M. Schumm, G. Seitz, P. Lang, R. Grau, D. Niethammer and R. Handgretinger (1999). "Enrichment and ex vivo expansion of mobilized peripheral AC133 hematopoietic stem cells." *Haematologica* **84**: 73.
- Kuypers, F. A., R. A. Lewis, M. Hua, M. A. Schott, D. Discher, J. D. Ernst and B. H. Lubin (1996). "Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V." *Blood* **87**(3): 1179-87.
- Lacy, M. Q., P. J. Kurtin and A. Tefferi (1996). "Pure red cell aplasia: association with large granular lymphocyte leukemia and the prognostic value of cytogenetic abnormalities [see comments]." *Blood* **87**(7): 3000-6.
- Lanier, L. L. (1998). "NK cell receptors." *Annu Rev Immunol* **16**: 359-93.
- Lanier, L. L. (1998). "Follow the leader: NK cell receptors for classical and nonclassical MHC class I." *Cell* **92**(6): 705-7.
- Lanier, L. L. (1998). "Activating and inhibitory NK cell receptors." *Adv Exp Med Biol* **452**: 13-8.
- Lanier, L. L. and J. H. Phillips (1996). "Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells [see comments]." *Immunol Today* **17**(2): 86-91.
- Lanier, L. L., J. H. Phillips, J. Hackett, M. Tutt and V. Kumar (1986). "Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function." *J Immunol* **137**(9): 2735-9.
- Landsorp, P. M., W. Dragowska and H. Mayani (1993). "Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells." *J Exp Med* **178**(3): 787-91.
- Lantz, O., L. I. Sharara, F. Tilloy, A. Andersson and J. P. DiSanto (1997). "Lineage relationships and differentiation of natural killer (NK) T cells: intrathymic selection and interleukin (IL)-4 production in the absence of NKR-P1 and Ly49 molecules." *J Exp Med* **185**(8): 1395-401.
- Lischke, A., M. Pagany, W. Kammer and K. Friedrich (1996). "A chemiluminescence-based method for the detection and quantification of antigen-antibody interactions on the surface of eukaryotic cells." *Anal Biochem* **236**(2): 322-6.
- Litton, M., Andersson, J., Bjork, L., Fehninger, T., Ulfgren, A-K, Andersson, U (1996). Cytoplasmic cytokine staining in individual cells. *Human Cytokine Protocols*. S. Debts. New York, Humana Press.

- Ljunggren, H. G. and K. Karre (1985). "Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism." *J Exp Med* **162**(6): 1745-59.
- Ljunggren, H. G. and K. Karre (1990). "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition [see comments]." *Immunol Today* **11**(7): 237-44.
- Ljunggren, H. G., K. Sturmhofel, E. Wolpert, G. J. Hammerling and K. Karre (1990). "Transfection of beta 2-microglobulin restores IFN-mediated protection from natural killer cell lysis in YAC-1 lymphoma variants." *J Immunol* **145**(1): 380-6.
- Lohwasser, S., A. Kubota, M. Salcedo, R. H. Lian and F. Takei (2001). "The non-classical MHC class I molecule Qa-1(b) inhibits classical MHC class I-restricted cytotoxicity of cytotoxic T lymphocytes." *Int Immunol* **13**(3): 321-327.
- Long, E. O. and S. Rajagopalan (2000). "HLA class I recognition by killer cell Ig-like receptors." *Semin Immunol* **12**(2): 101-8.
- Lopez-Botet, M., M. Llano, F. Navarro and T. Bellon (2000). "NK cell recognition of non-classical HLA class I molecules." *Semin Immunol* **12**(2): 109-19.
- Lou, Z., D. Jevremovic, D. D. Billadeau and P. J. Leibson (2000). "A balance between positive and negative signals in cytotoxic lymphocytes regulates the polarization of lipid rafts during the development of cell-mediated killing." *J Exp Med* **191**(2): 347-54.
- Lozzio, C. B. and B. B. Lozzio (1975). "Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome." *Blood* **45**(3): 321-34.
- MacDonald, H. R. (1997). "V alpha 14 NKT cells--a novel lymphoid cell lineage." *Jpn J Cancer Res* **88**(10): inside front cover.
- MacDonald, H. R., F. Radtke and A. Wilson (2001). "T cell fate specification and alphabeta/gammadelta lineage commitment." *Curr Opin Immunol* **13**(2): 219-24.
- Malissen, M., P. Pereira, D. J. Gerber, B. Malissen and J. P. DiSanto (1997). "The common cytokine receptor gamma chain controls survival of gamma/delta T cells." *J Exp Med* **186**(8): 1277-85.
- Malissen, M., J. Trucy, E. Jouvin-Marche, P. A. Cazenave, R. Scollay and B. Malissen (1992). "Regulation of TCR alpha and beta gene allelic exclusion during T-cell development." *Immunol Today* **13**(8): 315-22.
- Mallick-Wood, C. A., J. M. Lewis, L. I. Richie, M. J. Owen, R. E. Tigelaar and A. C. Hayday (1998). "Conservation of T cell receptor conformation in epidermal gammadelta cells with disrupted primary Vgamma gene usage." *Science* **279**(5357): 1729-33.
- Mandelboim, O., H. T. Reyburn, E. G. Sheu, M. Vales-Gomez, D. M. Davis, L. Pazmany and J. L. Strominger (1997). "The binding site of NK receptors on HLA-C molecules." *Immunity* **6**(3): 341-50.
- Martin-Fontecha, A., E. Assarsson, E. Carbone, K. Karre and H. G. Ljunggren (1999). "Triggering of murine NK cells by CD40 and CD86 (B7-2)." *J Immunol* **162**(10): 5910-6.
- Masson, D., P. Corthesy, M. Nabholz and J. Tschopp (1985). "Appearance of cytolytic granules upon induction of cytolytic activity in CTL-hybrids." *Embo J* **4**(10): 2533-8.
- Masson, D. and J. Tschopp (1985). "Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes." *J Biol Chem* **260**(16): 9069-72.
- McCulloch, E. A. (1984). "Diversity in normal and leukemic hemopoiesis." *Prog Clin Biol Res* **148**: 59-70.
- Metcalf, D. (1984). "Clonal culture of hemopoietic cells: techniques and applications."

- Meyaard, L., G. J. Adema, C. Chang, E. Woollatt, G. R. Sutherland, L. L. Lanier and J. H. Phillips (1997). "LAIR-1, a novel inhibitory receptor expressed on human mononuclear leukocytes." *Immunity* **7**(2): 283-90.
- Meyer, D., J. Schubert, C. Scholz, S. Braun and R. E. Schmidt (1997). "MHC-I antigen expression determines sensitivity of hematopoietic progenitor cells as targets for NK cells." *Immunobiology* **197**(5): 494-504.
- Miller, J. F. and A. Basten (1996). "Mechanisms of tolerance to self." *Curr Opin Immunol* **8**(6): 815-21.
- Miltenyi, S., W. Muller, W. Weichel and A. Radbruch (1990). "High gradient magnetic cell separation with MACS." *Cytometry* **11**(2): 231-8.
- Mingari, M. C., C. Vitale, C. Cantoni, R. Bellomo, M. Ponte, F. Schiavetti, S. Bertone, A. Moretta and L. Moretta (1997). "Interleukin-15-induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors: selective expression of CD94/NKG2-A as the only HLA class I-specific inhibitory receptor." *Eur J Immunol* **27**(6): 1374-80.
- Miraglia, S., W. Godfrey, A. H. Yin, K. Atkins, R. Warnke, J. T. Holden, R. A. Bray, E. K. Waller and D. W. Buck (1997). "A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning." *Blood* **90**(12): 5013-21.
- Moretta, A. (1997). "Molecular mechanisms in cell-mediated cytotoxicity." *Cell* **90**(1): 13-8.
- Moretta, A., R. Biassoni, C. Bottino, M. C. Mingari and L. Moretta (2000). "Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity." *Immunol Today* **21**(5): 228-34.
- Moretta, A., R. Biassoni, C. Bottino and L. Moretta (2000). "Surface receptors delivering opposite signals regulate the function of human NK cells." *Semin Immunol* **12**(2): 129-38.
- Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, R. Biassoni, M. C. Mingari and L. Moretta (1996). "Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells." *Annu Rev Immunol* **14**: 619-48.
- Mori, S., A. Jewett, K. Murakami-Mori, M. Cavalcanti and B. Bonavida (1997). "The participation of the Fas-mediated cytotoxic pathway by natural killer cells is tumor-cell-dependent." *Cancer Immunol Immunother* **44**(5): 282-90.
- Mori, S. and H. Katano (1997). "[EBV-associated lymphoma]." *Nippon Rinsho* **55**(2): 391-3.
- Moris, A., S. Rothenfusser, E. Meuer, R. Hangretinger and P. Fisch (1999). "Role of gammadelta T cells in tumor immunity and their control by NK receptors." *Microbes Infect* **1**(3): 227-34.
- Munz, C., N. Holmes, A. King, Y. W. Loke, M. Colonna, H. Schild and H. G. Rammensee (1997). "Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G molecules inhibit NKAT3 expressing natural killer cells." *J Exp Med* **185**(3): 385-91.
- Nagler, A., L. L. Lanier, S. Cwirla and J. H. Phillips (1989). "Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells." *J Immunol* **143**(10): 3183-91.
- Nakajima, H. and M. Colonna (2000). "2B4: an NK cell activating receptor with unique specificity and signal transduction mechanism." *Hum Immunol* **61**(1): 39-43.
- Neu, S., A. Geiselhart, S. Kuci, F. Baur, D. Niethammer and R. Handgretinger (1996). "Isolation and phenotypic characterization of CD117-positive cells." *Leuk Res* **20**(11-12): 963-71.
- Nicol, A., M. Nieda, Y. Koezuka, S. Porcelli, K. Suzuki, K. Tadokoro, S. Durrant and T. Juji (2000). "Human invariant valpha24+ natural killer T cells activated by alpha-galactosylceramide (KRN7000) have cytotoxic anti-tumour activity through mechanisms distinct from T cells and natural killer cells." *Immunology* **99**(2): 229-34.

- Nutt, S. L., P. Urbanek, A. Rolink and M. Busslinger (1997). "Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus." Genes Dev **11**(4): 476-91.
- Ogasawara, K., S. Hida, N. Azimi, Y. Tagaya, T. Sato, T. Yokochi-Fukuda, T. A. Waldmann, T. Taniguchi and S. Taki (1998). "Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells [published erratum appears in Nature 1998 Apr 23;392(6678):843]." Nature **391**(6668): 700-3.
- Ohlen, C., P. Hoglund, C. L. Sentman, E. Carbone, H. G. Ljunggren, B. Koller and K. Karre (1995). "Inhibition of natural killer cell-mediated bone marrow graft rejection by allogeneic major histocompatibility complex class I, but not class II molecules." Eur J Immunol **25**(5): 1286-91.
- Ohteki, T., H. Yoshida, T. Matsuyama, G. S. Duncan, T. W. Mak and P. S. Ohashi (1998). "The transcription factor interferon regulatory factor 1 (IRF-1) is important during the maturation of natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ (NK1+ T) cells, natural killer cells, and intestinal intraepithelial T cells." J Exp Med **187**(6): 967-72.
- Olsson, M. Y., K. Karre and C. L. Sentman (1995). "Altered phenotype and function of natural killer cells expressing the major histocompatibility complex receptor Ly-49 in mice transgenic for its ligand." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1649-53.
- Olsson-Alheim, M. Y., M. Salcedo, H. G. Ljunggren, K. Karre and C. L. Sentman (1997). "NK cell receptor calibration: effects of MHC class I induction on killing by Ly49Ahigh and Ly49Alow NK cells." J Immunol **159**(7): 3189-94.
- Orr, H. T. and R. DeMars (1983). "Class I-like HLA genes map telomeric to the HLA-A2 locus in human cells." Nature **302**(5908): 534-6.
- Oshimi, K. (1996). "Lymphoproliferative disorders of natural killer cells." Int J Hematol **63**(4): 279-90.
- Oshimi, Y., S. Oda, Y. Honda, S. Nagata and S. Miyazaki (1996). "Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells." J Immunol **157**(7): 2909-15.
- Oshimi, Y., K. Oshimi and S. Miyazaki (1996). "Necrosis and apoptosis associated with distinct Ca<sup>2+</sup> response patterns in target cells attacked by human natural killer cells." J Physiol (Lond) **495**(Pt 2): 319-29.
- Ouyang, W., M. Lohning, Z. Gao, M. Assenmacher, S. Ranganath, A. Radbruch and K. M. Murphy (2000). "Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment." Immunity **12**(1): 27-37.
- Parham, P. (2000). Immunology.
- Parham, P. (2000). "NK cell receptors: of missing sugar and missing self." Curr Biol **10**(5): R195-7.
- Parker, C. M., V. Groh, H. Band, S. A. Porcelli, C. Morita, M. Fabbi, D. Glass, J. L. Strominger and M. B. Brenner (1990). "Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire." J Exp Med **171**(5): 1597-612.
- Pellenz, M., R. Zambello, G. Semenzato and T. P. Loughran, Jr. (1996). "Detection of Epstein-Barr virus by PCR analyses in lymphoproliferative disease of granular lymphocytes." Leuk Lymphoma **23**(3-4): 371-4.
- Pende, D., L. Accame, L. Pareti, A. Mazzocchi, A. Moretta, G. Parmiani and L. Moretta (1998). "The susceptibility to natural killer cell-mediated lysis of HLA class I-positive melanomas reflects the expression of insufficient amounts of different HLA class I alleles." Eur J Immunol **28**(8): 2384-94.
- Pende, D., R. Biassoni, C. Cantoni, S. Verdiani, M. Falco, C. di Donato, L. Accame, C. Bottino, A. Moretta and L. Moretta (1996). "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 **184**(2): 505-18.
- Perez-Rodriguez, M., A. Corell, J. R. Arguello, S. T. Cox, A. McWhinnie, S. G. Marsh and J. A. Madrigal (2000). "A new MICA allele with ten alanine residues in the exon 5 microsatellite." Tissue Antigens **55**(2): 162-5.
- Perussia, B., G. Trinchieri, A. Jackson, N. L. Warner, J. Faust, H. Rumpold, D. Kraft and L. L. Lanier (1984). "The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies." J Immunol **133**(1): 180-9.
- Petzer, A. L., D. E. Hogge, P. M. Landsdorp, D. S. Reid and C. J. Eaves (1996). "Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long-term-culture-initiating cells) in vitro and their expansion in defined medium." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(4): 1470-4.
- Petzer, A. L., P. W. Zandstra, J. M. Piret and C. J. Eaves (1996). "Differential cytokine effects on primitive (CD34+CD38-) human hematopoietic cells: novel responses to Flt3-ligand and thrombopoietin." J Exp Med **183**(6): 2551-8.
- Pfeffer, K., B. Schoel, N. Plesnila, G. B. Lipford, S. Kromer, K. Deusch and H. Wagner (1992). "A lectin-binding, protease-resistant mycobacterial ligand specifically activates V gamma 9+ human gamma delta T cells." J Immunol **148**(2): 575-83.
- Poncelet, P. (1993). Immunological detection of membrane-bound antigens and receptors. Methods of Immunological Analysis. R. Masseyeff. Weinheim, Germany, VCH: 388-418.
- Poncelet, P. and P. Carayon (1985). "Cytofluorometric quantification of cell-surface antigens by indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies." J Immunol Methods **85**(1): 65-74.
- Porgador, A., O. Mandelboim, N. P. Restifo and J. L. Strominger (1997). "Natural killer cell lines kill autologous beta2-microglobulin-deficient melanoma cells: implications for cancer immunotherapy." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(24): 13140-5.
- Prussin, C. and D. D. Metcalfe (1995). "Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies." J Immunol Methods **188**(1): 117-28.
- Pulvertaft, R. (1964). "Cytology of Burkitt's tumor (African lymphoma)." Lancet **1**: 238-240.
- Radbruch, A., B. Mechtold, A. Thiel, S. Miltenyi and E. Pfluger (1994). "High-gradient magnetic cell sorting." Methods Cell Biol **42 Pt B**: 387-403.
- Raffael, A. (1988). Grundlagen der analytischen Durchflußzytometrie. Labor Medizin: 89-97.
- Rajagopalan, S. and E. O. Long (1997). "The direct binding of a p58 killer cell inhibitory receptor to human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-Cw4 exhibits peptide selectivity." J Exp Med **185**(8): 1523-8.
- Rajagopalan, S. and E. O. Long (1999). "A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells [published erratum appears in J Exp Med 2000 Jun 5;191(11):following 2027]." J Exp Med **189**(7): 1093-100.
- Ralph, P., M. A. Moore and K. Nilsson (1976). "Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines." J Exp Med **143**(6): 1528-33.
- Rammensee, H. G. (1995). "Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules." Curr Opin Immunol **7**(1): 85-96.
- Rammensee, H. G., T. Friede and S. Stevanović (1995). "MHC ligands and peptide motifs: first listing." Immunogenetics **41**(4): 178-228.

- Rammensee, H. G. and K. F. Lindhal (1996). "Less scholasticism, more exact immunology." Curr Opin Immunol **8**(1): 49-50.
- Raulet, D. H., W. Held, I. Correa, J. R. Dorfman, M. F. Wu and L. Corral (1997). "Specificity, tolerance and developmental regulation of natural killer cells defined by expression of class I-specific Ly49 receptors." Immunol Rev **155**: 41-52.
- Ravetch, J. V. and J. P. Kinet (1991). "Fc receptors." Annu Rev Immunol **9**: 457-92.
- Reyburn, H. T., O. Mandelboim, M. Vales-Gomez, D. M. Davis, L. Pazmany and J. L. Strominger (1997). "The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells [see comments]." Nature **386**(6624): 514-7.
- Rickwood, D., J. A. Chambers and M. Barat (1981). "Isolation and preliminary characterisation of DNA-protein complexes from the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*." Exp Cell Res **133**(1): 1-13.
- Rigby, M. C. and J. Jokela (2000). "Predator avoidance and immune defence: costs and trade-offs in snails." Proc R Soc Lond B Biol Sci **267**(1439): 171-6.
- Ritson, A. and J. N. Bulmer (1987). "Endometrial granulocytes in human decidua react with a natural-killer (NK) cell marker, NKH1." Immunology **62**(2): 329-31.
- Robey, E. A., B. J. Fowlkes and D. M. Pardoll (1990). "Molecular mechanisms for lineage commitment in T cell development." Semin Immunol **2**(1): 25-34.
- Rocha, B. and H. von Boehmer (1991). "Peripheral selection of the T cell repertoire." Science **251**(4998): 1225-8.
- Rodewald, H. R., M. Ogawa, C. Haller, C. Waskow and J. P. DiSanto (1997). "Pro-thymocyte expansion by c-kit and the common cytokine receptor gamma chain is essential for repertoire formation." Immunity **6**(3): 265-72.
- Roger, R., J. Breard, M. Comisso, C. Bohuon, M. Pallardy and J. Bertoglio (1996). "CD28-mediated cytotoxicity of YT natural killer cells on B7-positive targets induces rapid necrotic death independent of granule exocytosis." Cell Immunol **168**(1): 24-32.
- Roger, R., C. Issaad, M. Pallardy, M. C. Leglise, A. G. Turhan, J. Bertoglio and J. Breard (1996). "BCR-ABL does not prevent apoptotic death induced by human natural killer or lymphokine-activated killer cells." Blood **87**(3): 1113-22.
- Rojo, S., N. Wagtmann and E. O. Long (1997). "Binding of a soluble p70 killer cell inhibitory receptor to HLA-B\*5101: requirement for all three p70 immunoglobulin domains." Eur J Immunol **27**(2): 568-71.
- Rolink, A. G., S. L. Nutt, F. Melchers and M. Busslinger (1999). "Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell progenitors [see comments]." Nature **401**(6753): 603-6.
- Rudolph, G., K. Schilbach-Stuckle, R. Handgretinger, P. Kaiser and H. Hameister (1991). "Cytogenetic and molecular characterization of a newly established neuroblastoma cell line LS." Hum Genet **86**(6): 562-6.
- Rust, C., Y. Kooy, S. Pena, M. L. Mearin, P. Kluin and F. Koning (1992). "Phenotypical and functional characterization of small intestinal TcR gamma delta + T cells in coeliac disease." Scand J Immunol **35**(4): 459-68.
- Sadasivan, B., P. J. Lehner, B. Ortmann, T. Spies and P. Cresswell (1996). "Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP." Immunity **5**(2): 103-14.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230**(4732): 1350-4.

- Salcedo, M., A. D. Diehl, M. Y. Olsson-Alheim, J. Sundback, L. Van Kaer, K. Karre and H. G. Ljunggren (1997). "Altered expression of Ly49 inhibitory receptors on natural killer cells from MHC class I-deficient mice." J Immunol **158**(7): 3174-80.
- Sambrook, J., Fritsch, EF, Maniatis, T, Ed. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Plainview, NY USA, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sander, B., J. Andersson and U. Andersson (1991). "Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure." Immunol Rev **119**: 65-93.
- Scharf, S. J., G. T. Horn and H. A. Erlich (1986). "Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences." Science **233**(4768): 1076-8.
- Schiebler, T. H. and W. Schmidt (1995). Anatomie des Menschen. Heidelberg, Springer.
- Schild, H. and H. G. Rammensee (2000). "gp96--the immune system's Swiss army knife." Nat Immunol **1**(2): 100-1.
- Schmitz, G., Rothe, G, Ed. (1994). Durchflußzytometrie in der klinischen Diagnostik. Stuttgart, New York, Schattauer.
- Schonrich, G., F. Momburg, G. J. Hammerling and B. Arnold (1992). "Anergy induced by thymic medullary epithelium." Eur J Immunol **22**(7): 1687-91.
- Schonrich, G., F. Momburg, M. Malissen, A. M. Schmitt-Verhulst, B. Malissen, G. J. Hammerling and B. Arnold (1992). "Distinct mechanisms of extrathymic T cell tolerance due to differential expression of self antigen." Int Immunol **4**(5): 581-90.
- Seiple, J. W., D. Allen, W. Chang, P. Castaldi and J. Freedman (1993). "Rapid separation of CD4+ and CD19+ lymphocyte populations from human peripheral blood by a magnetic activated cell sorter (MACS)." Cytometry **14**(8): 955-60.
- Sentman, C. L., M. Y. Olsson and K. Karre (1995). "Missing self recognition by natural killer cells in MHC class I transgenic mice. A 'receptor calibration' model for how effector cells adapt to self." Semin Immunol **7**(2): 109-19.
- Sharara, L. I., A. Andersson, D. Guy-Grand, A. Fischer and J. P. DiSanto (1997). "Deregulated TCR alpha beta T cell population provokes extramedullary hematopoiesis in mice deficient in the common gamma chain." Eur J Immunol **27**(4): 990-8.
- Sharara, L. I., C. A. Vosshenrich, W. Muller and J. P. DiSanto (1997). "On the role of the common cytokine receptor gamma chain in B-cell vs. T-cell development." Res Immunol **148**(7): 449-53.
- Shilling, H. G., K. Lienert-Weidenbach, N. M. Valiante, M. Uhrberg and P. Parham (1998). "Evidence for recombination as a mechanism for KIR diversification." Immunogenetics **48**(6): 413-6.
- Shimizu, Y. and R. DeMars (1989). "Production of human cells expressing individual transferred HLA-A,-B,-C genes using an HLA-A,-B,-C null human cell line." J Immunol **142**(9): 3320-8.
- Singh-Jasuja, H., R. E. Toes, P. Spee, C. Munz, N. Hilf, S. P. Schoenberger, P. Ricciardi-Castagnoli, J. Neefjes, H. G. Rammensee, D. Arnold-Schild and H. Schild (2000). "Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis." J Exp Med **191**(11): 1965-74.
- Sivakumaran, M. and S. Richards (1997). "Immunological abnormalities of chronic large granular lymphocytosis." Clin Lab Haematol **19**(1): 57-60.

- Smeland, E. B., S. Funderud, G. Kvalheim, G. Gaudernack, A. M. Rasmussen, L. Rusten, M. Y. Wang, R. W. Tindle, H. K. Blomhoff and T. Egeland (1992). "Isolation and characterization of human hematopoietic progenitor cells: an effective method for positive selection of CD34+ cells." Leukemia **6**(8): 845-52.
- Spaner, D., K. Raju, L. Radvanyi, Y. Lin and R. G. Miller (1998). "A role for perforin in activation-induced cell death." J Immunol **160**(6): 2655-64.
- Steinle, A., E. Nossner and D. J. Schendel (1992). "Isolation and characterization of a genomic HLA-Cw6 clone." Tissue Antigens **39**(3): 134-7.
- Steinle, A. and D. J. Schendel (1994). "HLA class I alleles of LCL 721 and 174 x CEM.T2 (T2)." Tissue Antigens **44**(4): 268-70.
- Stern, L. J., J. H. Brown, T. S. Jardetzky, J. C. Gorga, R. G. Urban, J. L. Strominger and D. C. Wiley (1994). "Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide." Nature **368**(6468): 215-21.
- Stern, P., M. Gidlund, A. Orn and H. Wigzell (1980). "Natural killer cells mediate lysis of embryonal carcinoma cells lacking MHC." Nature **285**(5763): 341-2.
- Storb, U. (1987). "Transgenic mice with immunoglobulin genes." Annu Rev Immunol **5**: 151-74.
- Storkus, W. J., J. Alexander, J. A. Payne, J. R. Dawson and P. Cresswell (1989). "Reversal of natural killing susceptibility in target cells expressing transfected class I HLA genes." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(7): 2361-4.
- Sutherland, D. R. and A. Keating (1992). "The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications." J Hematother **1**(2): 115-29.
- Sutherland, D. R., A. Keating, R. Nayar, S. Anania and A. K. Stewart (1994). "Sensitive detection and enumeration of CD34+ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry." Exp Hematol **22**(10): 1003-10.
- Sykes, M., M. W. Harty, F. M. Karhofer, D. A. Pearson, G. Szot and W. Yokoyama (1993). "Hematopoietic cells and radioresistant host elements influence natural killer cell differentiation." J Exp Med **178**(1): 223-9.
- Teramura, M. and H. Mizoguchi (1996). "Special Education: Aplastic Anemia." Oncologist **1**(3): 187-189.
- Till, J. E. and E. A. McCulloch (1961). "A discrete measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." Radiat. Res. **14**: 213-222.
- Timonen, T., C. W. Reynolds, J. R. Ortaldo and R. B. Herberman (1982). "Isolation of human and rat natural killer cells." J Immunol Methods **51**(3): 269-77.
- Timonen, T. and E. Saksela (1980). "Isolation of human NK cells by density gradient centrifugation." J Immunol Methods **36**(3-4): 285-91.
- Tomasec, P., V. M. Braud, C. Rickards, M. B. Powell, B. P. McSharry, S. Gadola, V. Cerundolo, L. K. Borysiewicz, A. J. McMichael and G. W. Wilkinson (2000). "Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40." Science **287**(5455): 1031.
- Tsuchiya, S., M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno and K. Tada (1980). "Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)." Int J Cancer **26**(2): 171-6.
- Tsukamoto, A. S., B. P. Chen, R. Hoffman, N. Uchida, D. L. DiGusto, I. L. Weissman and C. M. Baum (1995). Phenotypic and functional analysis of hematopoietic stem cells in mouse and human. New York, Basel, Hong Kong, Marcel Dekker.
- Uhrberg, M., N. M. Valiante, N. T. Young, L. L. Lanier, J. H. Phillips and P. Parham (2001). "The Repertoire of Killer Cell Ig-Like Receptor and CD94:NKG2A Receptors in T Cells: Clones Sharing Identical alphabeta

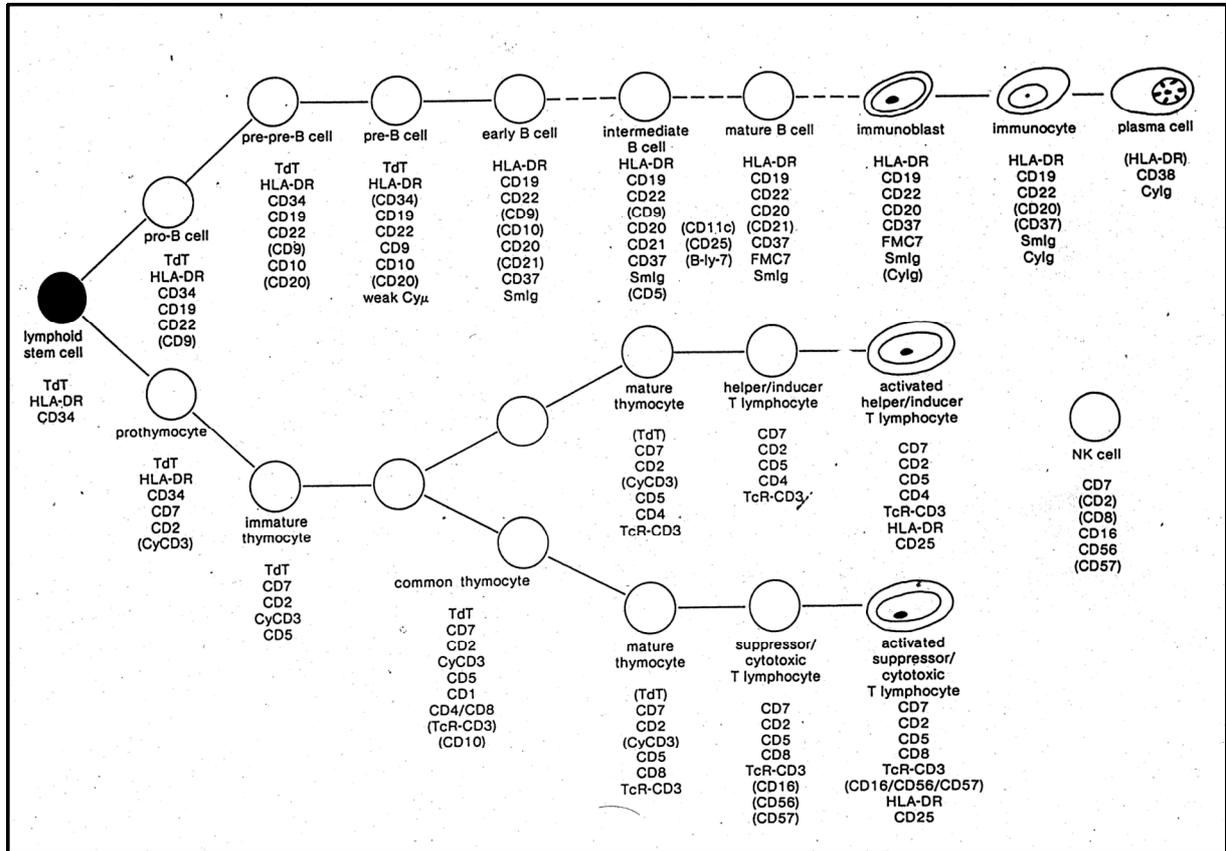
- TCR Rearrangement Express Highly Diverse Killer Cell Ig-Like Receptor Patterns." *J Immunol* **166**(6): 3923-32.
- Unanue, E. R. (1997). "Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of *Listeria* resistance." *Curr Opin Immunol* **9**(1): 35-43.
- Une, C., J. Andersson, M. L. Eloranta, D. Sunnemark, R. A. Harris and A. Orn (2000). "Enhancement of natural killer (NK) cell cytotoxicity and induction of NK cell-derived interferon-gamma (IFN-gamma) display different kinetics during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*." *Clin Exp Immunol* **121**(3): 499-505.
- Vales-Gomez, M., H. Reyburn and J. Strominger (2000). "Interaction between the human NK receptors and their ligands [In Process Citation]." *Crit Rev Immunol* **20**(3): 223-44.
- Vales-Gomez, M., H. Reyburn and J. Strominger (2000). "Molecular analyses of the interactions between human NK receptors and their HLA ligands." *Hum Immunol* **61**(1): 28-38.
- Vales-Gomez, M., H. T. Reyburn, R. A. Erskine and J. Strominger (1998). "Differential binding to HLA-C of p50-activating and p58-inhibitory natural killer cell receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(24): 14326-31.
- Vales-Gomez, M., H. T. Reyburn, M. Mandelboim and J. L. Strominger (1998). "Kinetics of interaction of HLA-C ligands with natural killer cell inhibitory receptors [published erratum appears in *Immunity* 1998 Dec;9(6):892]." *Immunity* **9**(3): 337-44.
- Valiante, N. M., M. Uhrberg, H. G. Shilling, K. Lienert-Weidenbach, K. L. Arnett, A. D'Andrea, J. H. Phillips, L. L. Lanier and P. Parham (1997). "Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors." *Immunity* **7**(6): 739-51.
- Verhoven, B., R. A. Schlegel and P. Williamson (1995). "Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes." *J Exp Med* **182**(5): 1597-601.
- Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken and C. Reutelingsperger (1995). "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V." *J Immunol Methods* **184**(1): 39-51.
- Vignali, D. A., R. T. Carson, B. Chang, R. S. Mittler and J. L. Strominger (1996). "The two membrane proximal domains of CD4 interact with the T cell receptor." *J Exp Med* **183**(5): 2097-107.
- Vitale, M., S. Sivori, L. Sanseverino, M. Barbaresi, L. Morelli, L. Olcese, R. Agugliano, C. Bottino and A. Moretta (1994). "Negative signalling via the P58/NKR for HLA.C alleles." *Eur J Histochem* **38 Suppl 1**: 69-76.
- Vogelstein, B. and D. Gillespie (1979). "Preparative and analytical purification of DNA from agarose." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(2): 615-9.
- von Boehmer, H., J. Kirberg and B. Rocha (1991). "An unusual lineage of alpha/beta T cells that contains autoreactive cells." *J Exp Med* **174**(5): 1001-8.
- Wiltrout, R. H. (2000). "Regulation and antimetastatic functions of liver-associated natural killer cells." *Immunol Rev* **174**: 63-76.
- Winter, C. C., J. E. Gumperz, P. Parham, E. O. Long and N. Wagtmann (1998). "Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition." *J Immunol* **161**(2): 571-7.
- Wu, J., H. Cherwinski, T. Spies, J. H. Phillips and L. L. Lanier (2000). "DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells." *J Exp Med* **192**(7): 1059-68.

- Wu, J., Y. Song, A. B. Bakker, S. Bauer, T. Spies, L. L. Lanier and J. H. Phillips (1999). "An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10." Science **285**(5428): 730-2.
- Yin, A. H., S. Miraglia, E. D. Zanjani, G. Almeida-Porada, M. Ogawa, A. G. Leary, J. Olweus, J. Kearney and D. W. Buck (1997). "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells." Blood **90**(12): 5002-12.
- Yokoyama, W. M. (1995). "Hybrid resistance and the Ly-49 family of natural killer cell receptors [comment]." J Exp Med **182**(2): 273-7.
- Zamai, L., M. Ahmad, I. M. Bennett, L. Azzoni, E. S. Alnemri and B. Perussia (1998). "Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells." J Exp Med **188**(12): 2375-80.
- Zappacosta, F., F. Borrego, A. G. Brooks, K. C. Parker and J. E. Coligan (1997). "Peptides isolated from HLA-Cw\*0304 confer different degrees of protection from natural killer cell-mediated lysis." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(12): 6313-8.
- Zemmour, J., A. M. Little, D. J. Schendel and P. Parham (1992). "The HLA-A,B "negative" mutant cell line C1R expresses a novel HLA-B35 allele, which also has a point mutation in the translation initiation codon." J Immunol **148**(6): 1941-8.
- Zhang, J., I. Scordi, M. J. Smyth and M. G. Lichtenheld (1999). "Interleukin 2 receptor signaling regulates the perforin gene through signal transducer and activator of transcription (Stat)5 activation of two enhancers." J Exp Med **190**(9): 1297-308.
- Zitvogel, L., A. Regnault, A. Lozier, J. Wolfers, C. Flament, D. Tenza, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo and S. Amigorena (1998). "Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes." Nat Med **4**(5): 594-600.



# G Anhang

A



**Abb. I: Hämatopoetische Differenzierungsreihen**

Die myeloide (B) und die lymphoide (A) Differenzierungsreihe ist jeweils einzeln aufgeführt. Ausgehend von einer pluripotenten Progenitorzelle wurden für jeden Schritt der Differenzierung zur reifen Blutzelle die wichtigsten Oberflächenmarker zu der schematischen Darstellung der einzelnen Stadien gestellt.

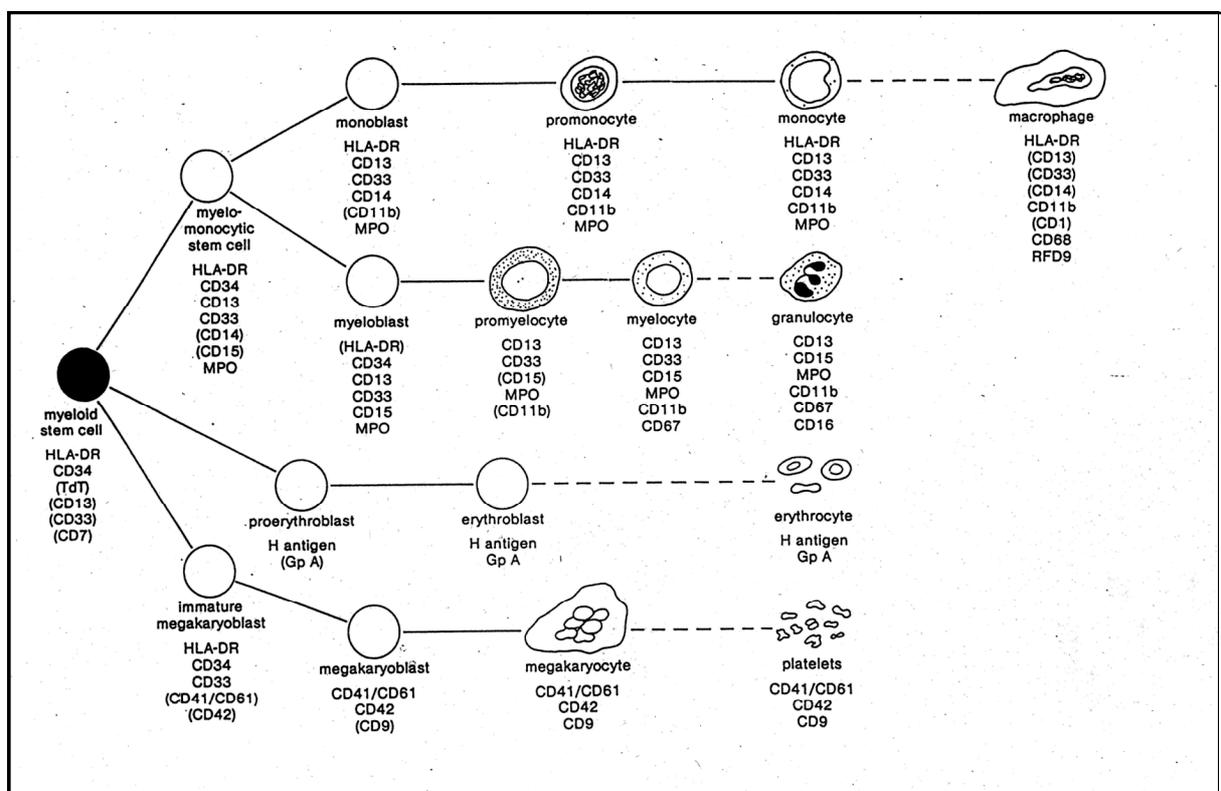
Das von den Stammzellen gebildete Blutsystem wird grundsätzlich unterschieden in Zellen, die der myeloiden und der lymphoide Differenzierungsreihe (Metcalfe, 1984) entspringen. Bei einem normalen Erwachsenen bestehen die Leukozyten etwa je zur Hälfte aus lymphoiden und myeloiden Zellen. Von Teilen dieser Zellreihen (A) (verändert nach Stem Cell Technologies, 1992) wird die *humorale Immunabwehr* des Menschen gebildet. Sie besteht aus verschiedenen löslichen Proteinen des Blutserums, z. B. aus den neun Faktoren Komplementsystem, den Thrombozyten und den Antikörper gegen spezifische körperfremde Stoffe und Proteine. Ebenfalls lösliche Bestandteile des Blutsystems sind Hormone, Zytokine und Chemokine. Sie werden von den Zellen des Bluts selbst gebildet und sezerniert und dienen der Verständigung der Zellen untereinander.

In der myeloiden Differenzierungsreihe (B) (verändert nach Stem Cell Technologies, 1992) entstehen über unterschiedliche Zwischenstadien Erythrozyten, neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, Monozyten

und Macrophagen, Dendritische Zellen, Megakaryozyten und Thrombozyten. Aus der lymphoiden Reihe entspringen Natürliche Killer Zellen, B- und T-Zellen.

Eine Untersuchung der verschiedenen Zellpopulationen kann *in vitro* erfolgen oder durch Aufreinigung aus Blut oder Organen. In *in vitro* Kulturen lassen sich die Progenitoren der myeloischen Reihe anhand der lichtmikroskopisch gut unterscheidbaren Kolonieförmigen und -typen recht gut identifizieren (Ibelgauf, 1995). Die *in vitro* Generierung von NK- und T-Zellen hingegen schien lange Zeit unmöglich und wurde erst in letzter Zeit durch aufwendige Kultivierungsbedingungen möglich (Rolink, 1999; Uhrberg, 2001). Die Charakterisierung der Zellen *ex vivo* erfolgt meist wieder durch Färben mit monoklonalen Antikörpern gegen populations-typische Oberflächenantigene.

## B



Ursprung aller Blutzellen ist das Knochenmark in den Hohlräumen der flachen Knochen (Till&McCulloch, 1961). Dort befinden sich eine kleine Zahl von hämatopoetisch aktiven Stammzellen, aus denen sich das gesamte Blutsystem des Menschen entwickelt. Daneben gibt es im Knochenmark auch Retikulozyten, Gewebsmastzellen, Lymphozyten, Plasmazellen, Gefäßendothelzellen und die noch unreifen, unipotenten Formen von Erythrozyten, Granulozyten oder Thrombozyten. Hämatopoetisch aktive Stammzellen ersetzen durch fortwährende Zellteilungen alle gealterten und toten Zellen des Bluts innerhalb kurzer Zeit - täglich werden von den Stammzellen etwa  $3,7 \times 10^{11}$  Zellen (Kuby, 1997) produziert. Die Teilungen der Stammzellen sind asymmetrisch, das heißt bei einer Zellteilung bleibt eine der beiden Tochterzellen pluripotent während die andere differenziert. In Abhängigkeit von der sie umgebenden Kombination von Zytokinen und Chemokinen wählt sie einen Weg in eine der vielen Differenzierungsreihen. Dadurch erhalten sich die Stammzellen selbst („self renewal“, Basch, 1995), während sie zugleich schnell viele unterschiedliche Blutzellen produzieren können. Die Regulation dieser Zellteilung ist bislang

nicht geklärt. Es ist bisher auch nicht gelungen, verschiedene Stadien der Differenzierung sich selbst erneuernder hämatopoetischer Stammzellen eindeutig zu definieren. Eine Möglichkeit hierfür wäre die *in vitro* Kultivierung über längere Zeit, was aber bisher ebenfalls noch nicht zufriedenstellend gelungen ist (Abkowitz, 1996; Tsukamoto, 1995; Kuci, 1999). Neuere Untersuchungen zeigen eine essentielle Rolle der Interaktion von Stammzellen und Stromazellen für die Eigenschaft des „self renewal“ (Kuci, submitted & pers. Komm.). Der Nachweis von hämatopoetischen Stammzellen z.B. durch immunohistochemische Methoden wird momentan sehr intensiv betrieben. Obwohl mittlerweile eine Reihe von Kandidaten für Oberflächenantigene für frühe hämatopoetische Stammzellen vorgestellt wurden, werden momentan fast ausschließlich monoklonale Antikörper gegen das Oberflächenantigen CD34 genutzt. CD34 ist ein monomeres, transmembranäres Phosphoglycoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 110kD (Sutherland, 1992; Gunji, 1995; Miraglia, 1997; Yin, 1997; Buhring, 1999) und scheint sowohl auf frühen als auch auf weiter differenzierten Stammzellen exprimiert zu sein.

Ein kleiner Teil der Stammzellen wird ins periphere Blut ausgeschwemmt und siedelt sich in verschiedenen Organen an, wie z.B. im zentralen Nervensystem, in der Leber, im Mesenchym oder in der Niere, oder die Stammzellen zirkulieren mit dem Blut durch den Körper.

Für eine Therapie verschiedenster Tumore können die Blut-Stammzellen im Rahmen einer Transplantation eingesetzt werden. Die früher übliche Methode der Transplantation des ganzen Knochenmarks wurde durch die Gabe reiner Stammzellpräparate abgelöst. Hierfür können die Stammzellen aus Knochenmark, aber auch mittels einer Leukapherese aus peripherem Blut isoliert werden (Goldman, 1995).



**Abb. II: Gegenüberstellung der wichtigsten NK-Rezeptoren und der an sie bindenden Liganden  
(verändert nach Coulie, 1998, unveröffentlicht)**

## **Aus dieser Arbeit entstandene Veröffentlichungen**

Handgretinger, R., Geiselhart A., Moris A., Grau R., Teuffel O., Bethge W., Kanz L., P. Fisch. „Pure red-cell aplasia associated with clonal expansion of granular lymphocytes expressing killer-cell inhibitory receptors“. *N Engl J Med.* 1999; 340: 278-84

Grau R., Lang K.S., Wernet D., Niethammer D., Pusch C.M. and R. Handgretinger. „Autoreactive NK cells in healthy donors“; Manuskript in Bearbeitung

Grau R., Lang K., Handgretinger R., Niethammer D., Rammensee H.-G. and P. Lang; „Erythropenia caused by expansion of V $\alpha$ 1 $\beta$ -T-cells with non-self binding inhibitory NK-receptors in an ALL-patient after stem cell transplantation“; Manuskript in Bearbeitung

Grau R., Brockmann Y., Neu S., Geiselhart A., Röhm S., Rau C., Eckle J.C.F., Lal S., Niethammer D., Lang P., Speer C.P., Rammensee H.-G., R. Handgretinger. „Characterisation of neonatal, decidual and adult CD56<sup>+</sup> cells“; Manuskript in Bearbeitung

## **Veröffentlichte Kongreßbeiträge**

„KIR-Expression by neonatal and adult zytotoxic CD56 pos. cells“. Neu S., Brockmann Y., Grau R., Geiselhart A. and Ch. P. Speer; European Society for Paediatric research conference; Belfast 1998; *Ped Res* 1998;44:444

„Lysis of erythroblasts by Killer Cell Inhibitory Receptor (KIR) expressing lymphocytes is associated with low erythroblastic expression of HLA class I“. Grau R., Geiselhart A., Moris A., Kuci S., Henschler R., Gonzales-Ramella O., Lang P., Niethammer D., Handgretinger R. and P.-G. Schlegel; 40<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Haematology; Miami 4-8 Dez 1998; *Blood* 1998 Nov 15;92(10)Suppl.1:522.

„Large scale isolation of anti-leukemic donor lymphocytes without alloreactivity for posttransplant immunotherapy“. Lang P., Gonzales O., Schumm M., Grau R., Teuffel O., Eyrich M., Geiselhart A., Schlegel P.-G., Klingebiel T., Niethammer D. and R. Handgretinger; 40<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Haematology; Miami 4-8 Dez 1998; *Blood* 1998 Nov 15;92(10)Suppl.1:437.

„Enrichment and ex vivo expansion of mobilized peripheral AC133 hematopoietic stem cells“. Kuci S., Schumm M., Seitz G., Lang P., Grau R., Niethammer D. and R. Handgretinger; 4<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Hematology Association (EHA); Barcelona 9-12 June 1999; *Haematologica* 1999 June; 84:73

„Killing of human stem cells by autologous NK cells“. Grau R., Kuci S., Lang K., Wernet D., Niethammer D., Rammensee H.G., and R. Handgretinger; Immunology 2000 and Annual Meeting of the American Association of Immunologists; Seattle 12-16 May 2000; *FASEB Journal*. 2000 April; 14(6):19.29 A1025

## Lebenslauf

### Curriculum Vitae

#### Persönliche Daten

Joachim Roger Grau

geboren am 21.3.1966 in Ellwangen an der Jagst

#### Schulbildung

1972 bis 1976

Pestalozzi-Grundschule Ludwigsburg

1976 bis 1985

Friedrich-Schiller-Gymnasium in Ludwigsburg am Neckar

1985

Allgemeine Hochschulreife

1985 bis 1987

Zivildienst, Deutsches Rotes Kreuz und Kreiskrankenhaus Ludwigsburg

#### Hochschulausbildung

4.1987 bis 3.1990

Studium der Physik an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen mit dem Abschluß Vordiplom.

10.1988 bis 7.1995

Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen mit dem Abschluß Diplom.

4.1994 bis 7.1995

Diplomarbeit am Lehrstuhl für Populationsgenetik bei Herrn Prof. Dr. D. Sperlich.

Titel der Diplomarbeit:

”Isolierung und Charakterisierung der 5S-rDNA Spacer von Arten der *Drosophila obscura* Gruppe”

6.1997 bis 11.2001

Doktorarbeit in der Abteilung Hämatologie/Onkologie der Kinderklinik der Universität Tübingen bei Herrn Prof. Dr. R. Handgretinger und Prof. Dr. H.G. Rammensee

2.1996 bis 5.1997

Mitarbeit im Lehrstuhl für Entwicklungsgenetik bei Herrn Prof. Dr. G. Jürgens

9.1997 bis 8.1999

Forschungs-Stipendiat der Deutschen Krebshilfe Stiftung Mildred Scheel DKMS

4.1999 bis 9. 2000

Mitglied des Landesgraduierten-Kollegs „Zellbiologie in der Medizin“

9.1999 bis 4.2000

Forschungs-Stipendiat der Jose-Carreras-Stiftung für Leukämieforschung

5. 2000 bis 9. 2000

Forschungs-Stipendiat des Landesgraduierten-Kollegs „Zellbiologie in der Medizin“ the Eberhard-Karls-Universität Tübingen

10.2000 bis 9.2001

fortüne-Forschungsprojekt (Universität Tübingen) „Die Rolle inhibitorischer Rezeptoren auf Natürlichen Killerzellen und  $\gamma\delta$  T-Zellen bei der Differenzierung CD34+ Stammzellen anhand des Modells der „pure red cell aplasia“

10.2000 bis 12. 2001

Mitglied des Sonderforschungsbereichs SFB510 „Stammzellbiologie und Antigenpräsentationen“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft DFG Project ”Immunorekonstitution and Immunmodulation nach Transplantation allogener, hoch angereicherter CD34 pos. Stammzellen”

Im Selbstverlag herausgegeben von:

Grau, Roger

Hafengasse 2

72070 Tübingen