

**Untersuchung der Expression und Regulation der
KIR Gene im Rahmen der Differenzierung humaner
Natürlicher Killerzellen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Martina Sribar

aus Hilden

Dezember 2007

Aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD Dr. Markus Uhrberg
Koreferent: Prof. Dr. Rolf Wagner

Abgabedatum: 12.12.2007
Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2008

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre in an Eides Statt, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Ich erkläre gleichzeitig, dass ich die vorgelegte Dissertation in dieser oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht habe. Weiterhin erkläre ich hiermit, dass vorher noch keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen wurden.

Düsseldorf, den 12.Dezember 2007

Martina Sribar

für meine Mutter

Der Wert davon, dass man zeitweilig eine strenge Wissenschaft streng betrieben hat, beruht nicht gerade auf deren Ergebnissen: denn diese werden, im Verhältnis zum Meere des Wissenswerten, ein verschwindend kleiner Tropfen sein. Aber es ergibt einen Zuwachs an Energie, an Schlussvermögen, an Zähigkeit der Ausdauer; man hat gelernt, einen Zweck zweckmäßig zu erreichen. Insofern ist es sehr schätzbar, in Hinsicht auf Alles, was man später treibt, einmal ein wissenschaftlicher Mensch gewesen zu sein.

Friedrich Nietzsche

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	II
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.2 Natürliche Killerzellen	3
1.3 NK-Zell-Rezeptoren	4
1.3.1 Die Natürlichen Zytotoxizitäts Rezeptoren.....	5
1.3.2 Rezeptoren der NKG2-Familie	5
1.3.3 Die KIR-Rezeptoren	6
1.3.3.1 KIR-Nomenklatur.....	6
1.3.3.2 Genetische Vielfalt der KIR-Rezeptoren.....	8
1.3.3.3 Liganden der KIR-Rezeptoren.....	9
1.3.3.4 Expression und Regulation der KIR-Gene	12
1.3.3.5 KIR-Toleranz.....	13
1.4 Entwicklung und Differenzierung der NK-Zelle aus CD34 Vorläuferzellen.....	14
1.5 Epigenetik.....	16
1.5.1 Histonmodifikationen	16
1.5.2 DNA-Methylierung.....	18
1.5.3 Methylbindende Proteine	19
1.6 Fragestellung und Konzeption der Arbeit.....	20
2 ERGEBNISSE	21
2.1 Sequentielle KIR-Expression während der NK-Zelldifferenzierung in Bulk Kulturen.....	21
2.1.1 Hintergrund und experimenteller Ansatz	21
2.1.2 Bestimmung und Aufreinigung der CD34-positiven Progenitor-Population	22
2.1.3 Vorarbeiten für die Differenzierung von NK-Zellen aus humanen, hämatopoetischen Progenitorzellen	24
2.1.3.1 NK-Zelldifferenzierung aus Progenitoren unterschiedlicher Herkunft	24
2.1.3.2 Vorarbeiten: Unterschiede der NK-Zellentwicklung bei Zugabe von IL-21	27
2.1.4 Darstellung und Übersicht der Experimente	28

2.1.5	Immungenetische Analysen der einzelnen Nabelschnurblute	29
2.1.6	Morphologische Veränderung während der NK-Zelldifferenzierung	30
2.1.7	Phänotypische Untersuchung NK-zellspezifischer Oberflächenmarker während der NK-Zelldifferenzierung aus Nabelschnurblut	33
2.1.7.1	Prinzip der NK-Zelldifferenzierung	36
2.1.8	Optimierung der RT-PCRs mit spezifischen KIR-Gensonden	37
2.1.9	Analyse der KIR-Transkription im Verlauf der NK-Zelldifferenzierung	38
2.1.10	Zusammenfassung der RT-PCR Ergebnisse aller Nabelschnurblut-Bulk-Kulturen	41
2.1.11	Korrelieren die Ergebnisse der phänotypischen und genotypischen Analysen miteinander?	42
2.1.12	Semiquantitative Analyse der Expression der inhibitorischen Rezeptoren KIR2DL1 und KIR2DL3 mittels Real-Time-PCR	46
2.1.12.1	Effizienz und Kontrolle der Real-Time-PCR	49
2.1.13	Zusammenfassung der Ergebnisse der Bulk-Kulturen	50
2.2	Untersuchung der sequenziellen KIR-Expression auf klonaler Ebene mittels Einzelzellablage	51
2.2.1	Hintergrund und experimenteller Ansatz	51
2.2.2	Klonierungseffizienz	51
2.2.3	Ergebnisse der RT-PCRs der NK-Zellklone mit spezifischen KIR-Gensonden	52
2.2.4	NK-Klone mit nur einem aktiven KIR-Gen	56
2.2.5	Sequenzielle KIR-Expression bei Klonen der Einzelzellablage mit partieller und zeitlich versetzter Zellentnahme	58
2.2.6	Zusammenfassung der Ergebnisse der EZ-Experimente	62
2.3	Epigenetik	63
2.3.1	Hintergrund und experimenteller Ansatz	63
2.3.2	Wie wirkt sich die Stimulation von AZA und TSA auf die Expression der KIR-Rezeptoren bei <i>in vitro</i> differenzierten NK-Zellen aus?	64
2.3.3	Expressionsstatus epigenetischer Enzyme und Repressoren im Verlauf der NK-Zelldifferenzierung	67
2.3.4	ChIP-Analysen	70
2.3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse des Epigenetik-Teils	78

3	DISKUSSION	79
3.1	Die Generierung Natürlicher Killerzellen	79
3.2	Die Expression der KIR-Rezeptoren von Natürlichen Killerzellen	80
3.2.1	Phänotypische KIR-Expression	80
3.2.2	Genotypische KIR-Expression.....	81
3.2.3	Die Korrelation phänotypischer und molekularbiologischer KIR-Analysen	83
3.2.4	Die Expression des KIR-Rezeptors KIR2DL4.....	84
3.3	Expressionsverhalten und klinische Relevanz von KIR2DL1 und KIR2DL3 für die Stammzelltransplantation.....	85
3.4	Der Einfluss von epigenetisch wirksamen Substanzen auf die KIR-Expression.....	86
3.5	Welche epigenetischen Faktoren beeinflussen die KIR-Expression?.....	87
3.6	Die Histonmodifikationen im Promotorbereich der KIR-Gene	90
4	MATERIAL.....	92
4.1	Geräte und Verbrauchsmaterial	92
4.2	Chemikalien	94
4.3	Zellkultur	95
4.3.1	Puffer und Medien	95
4.3.2	Reagenzien und Stimuli	97
4.3.3	Zelllinien.....	98
4.4	Blutproben	98
4.5	Antikörper.....	99
4.5.1	Primärantikörper	99
4.5.2	Sekundärantikörper	100
4.5.3	Antikörper und Systeme (Kits) zur Zeldepletion	100
4.5.4	Antikörper für die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	101
4.6	Molekularbiologie.....	102
4.6.1	Oligonukleotide.....	102
4.6.2	Reagenziensysteme	104
4.6.3	Reagenzien.....	104
4.6.4	Puffer	105
4.7	Herstellerverzeichnis	105

5	METHODEN	107
5.1	Methoden der Zellkultur	107
5.1.1	Allgemeine Bemerkung und Kultivierung der Zellen	107
5.1.2	Einfrieren von Zellen	107
5.1.3	Auftauen von Zellen	108
5.1.4	Bestimmung der Zellzahl	108
5.1.5	Kultivierung der AFT024 Zelllinie	109
5.1.5.1	Splitten der AFT024-Zelllinie	110
5.1.5.2	Herstellung der AFT024-Platten	111
5.1.6	Isolierung mononukleärer Zellen	111
5.1.7	Erythrozytenlyse	112
5.1.8	Zellisolierung über ferromagnetische Antikörper	113
5.1.9	Markieren der Zellen mit monoklonalen Antikörpern	114
5.1.9.1	Markieren der Zellen mit konjugierten Antikörpern	114
5.1.9.2	Markieren der Zellen mit unkonjugierten Antikörpern	114
5.1.10	Durchflusszytometrie	115
5.1.11	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung	116
5.1.11.1	Isolation der CD34 ⁺ CD38 ⁻ Lin ⁻ Population	117
5.1.12	Ausplattieren der sortierten Zellen und Ansetzen der Experimente (Bulk)	118
5.1.13	Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen in NK-Zellen	119
5.1.14	Differenzierung von NK-Zellklonen mittels Einzelzellablage	120
5.1.14.1	Unterteilung der Klone während der Zellentnahme und Weiterdifferenzierung	121
5.1.15	Stimulation mit 5'-Aza-2'-Deoxycytidin (AZA) und Trichostatin A (TSA)	122
5.2	Methoden der Molekularbiologie	123
5.2.1	Analyse der KIR-Expression auf Transkriptebene	123
5.2.1.1	RNA-Isolierung aus lymphatischen Zellen	123
5.2.1.2	Messung der RNA-Konzentration	123
5.2.1.3	Reverse Transkription (RT)	124
5.2.1.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	125
5.2.1.5	Real-Time-PCR (ABI Prism 7700 HT)	127
5.2.1.6	Agarosegelelektrophorese	129
5.2.2	KIR-Genotypisierung der verwendeten Proben	129
5.2.2.1	DNA-Isolation aus Vollblut	129
5.2.2.2	DNA-Messung	130
5.2.2.3	KIR-Typisierung	130
5.2.3	Analyse epigenetischer Faktoren	131
5.2.4	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	133
5.2.4.1	Fixieren der Zellen und des Chromatins	134
5.2.4.2	Scherung der DNA	134
5.2.4.3	Präzipitation der DNA-Histon-Komplexe	134

5.2.4.4	Entfernen der Histone.....	135
5.2.4.5	Aufreinigung der DNA und Amplifikation mittels Real-Time-PCR.....	136
5.2.4.6	Auswertung der Daten.....	136
6	LITERATURVERZEICHNIS	137
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	144
8	ANHANG.....	146
8.1	Vergleich der genotypischen und phänotypischen Resultate der KIR-Expression	146
8.2	Datentabellen der klonalen NK-Zelldifferenzierung.....	148
8.3	Untersuchung epigenetischer Faktoren im Lauf der NK-Zelldifferenzierung.....	152
	DANKSAGUNG	156

Zusammenfassung

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind große und granuläre Lymphozyten, die zum angeborenen Immunsystem gehören. Sie repräsentieren etwa 10 % der Lymphozyten im peripheren Blut und übernehmen wichtige Funktionen bei der Abwehr und Lyse von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen. NK-Zellen exprimieren MHC-Klasse-I-spezifische Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche, die sich Killer Immunglobulin-like Receptors (KIRs) nennen. KIRs sind sehr polymorph und werden klonal auf NK-Zellen exprimiert. KIR-Rezeptoren können sowohl stimulatorisch als auch inhibitorisch auf die NK-Zelle wirken und damit ggf. die Lyse der Zielzelle einleiten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der KIR-Rezeptoren im Zuge der NK-Zellentwicklung untersucht. Es wurde ein *in vitro* Modell zur NK-Zelldifferenzierung etabliert, anhand dessen hämatopoetische Progenitorzellen in NK-Zellen differenziert werden konnten. Dabei wurden im zeitlichen Verlauf der NK-Zellentwicklung Zellproben entnommen und hinsichtlich ihrer KIR-Expression untersucht. Zum einen wurde die KIR-Expression mit sequenzspezifischen Gensonden mittels RT-PCR analysiert und gleichzeitig wurden die Zellen mit KIR-spezifischen fluoreszenzkonjugierten Antikörpern phänotypisch untersucht. Die generierten Daten zeigen eine Korrelation von Expressions- und phänotypischen Analysen. Anhand dieser Resultate konnte aufgezeigt werden, dass die verschiedenen KIR-Gene in einer sequentiellen Art und Weise exprimiert werden, bei der zuerst KIR2DL4, dann KIR2DL3 und anschließend, abhängig vom jeweiligen Genotyp, weitere KIR-Gene aktiviert und dann auf der Oberfläche exprimiert werden.

Weiterhin wurden epigenetische Analysen der heranreifenden NK-Zellen durchgeführt, die bei der Behandlung mit demethylierenden (AZA) und chromatinöffnenden (TSA) Substanzen eine zusätzliche Induktion der KIR-Rezeptoren zeigten. Es konnten mittels Real-Time-PCR epigenetisch wichtige Enzyme charakterisiert werden, die im Verlauf der NK-Zelldifferenzierung verstärkt exprimiert werden. Dabei handelt es sich um DNA-Methyltransferasen (DNMT3A1, DNMT3L), Histondeacetylasen (HDAC4, HDAC9) sowie den Transkriptionsfaktor RUNX3 und dessen Korepressor TLE1. Zusätzlich wurde die Chromatinstruktur der KIR-Promotoren mittels ChIP-Assays untersucht. Dabei wurden Antikörper verwendet, die spezifisch für euchromatische (H4K8, H3K4) und heterochromatische (H3K9, H3K27) Modifikationen der Histone H3 und H4 waren. Aufgrund der Relation von euchromatischen zu heterochromatischen Histonmodifikationen konnte in der NK-Zelldifferenzierung folgende Reihung von bereits offener zu noch geschlossener Chromatinstruktur der untersuchten KIR-Promotoren beobachtet werden: 2DL4 > 2DL3 > 3DL1 > 2DL1, was wiederum mit den bereits generierten Daten zur sequentiellen KIR-Expression übereinstimmt.

Summary

Natural Killer (NK) cells are large granular lymphocytes that belong to the innate immune system. They represent a subpopulation between 10 % and 15 % of the human lymphocytes. NK cells are important mediators of virus- and tumour-specific immune responses. In humans, the killer cell Ig-like receptors (KIRs) contribute to this form of immunosurveillance by recognizing different subsets of HLA class I molecules on their target cells. Each NK cell expresses an individual subset of inhibitory and stimulatory KIRs and contributes to a diversified NK cell repertoire. In this study KIR expression during NK cell differentiation was examined. An *in vitro* model could be established by culturing hematopoietic progenitor cells and differentiating them into NK cells. During this time course of differentiation, samples of proliferating cells were harvested and analyzed with regard to their KIR expression. Samples were analyzed by RT-PCR using sequence-specific primers. Simultaneously, a phenotypical analysis concerning the expressed KIR on the cell surface was carried out by flow cytometry with KIR specific antibodies. The data reveal a correlation between the expressed KIR receptors on mRNA (RT-PCR) and protein level (flow cytometry). The results show a sequential expression of the different KIR genes where KIR2DL4 is expressed first followed by KIR2DL3. Subsequently other KIR genes were detected depending on the KIR genotype of the respective sample.

Moreover, epigenetic analysis of the KIR locus during NK cell proliferation and commitment were made using DNA demethylating (AZA) and chromatin remodelling (TSA) agents, where an additional induction of KIR expression could be observed. With real-time-PCR, some epigenetically important enzymes were detected, which are suggested to play a role in NK cell differentiation as they were expressed stronger than others. The candidates are DNA methyltransferases (DNMT3A1, DNMT3L), histone deacetylases (HDAC4, HDAC9) and the transcription factor RUNX3 and its corepressor TLE1. Furthermore, the chromatin structure of the KIR promoters was analyzed by ChIP assays using antibodies specific for euchromatic (H4K8, H3K4) and heterochromatic (H3K9, H3K27) status, looking for the modifications of this histones. By taking the ratio of the two opposing histone modifications, H4K8 as active mark and H3K9 as repressive mark a hierarchy was detectable from an open to a still closed chromatin structure revealing following order: 2DL4 > 2DL3 > 3DL1 > 2DL1. These results are in turn consistent with the already generated data of the sequential KIR expression.

1 Einleitung

1.1 *Das Immunsystem*

Der menschliche Körper muss sich im Laufe des Lebens gegen schädliche Eindringlinge verteidigen. Eine Vielzahl von gefährlichen Viren, Bakterien, Pilzen, Parasiten und anderen Pathogenen, mit denen der Organismus über die Luft oder die Nahrung in Berührung kommt, müssen erkannt und zerstört werden. Diese Aufgabe übernimmt das Immunsystem. Der Begriff „Immun“ stammt ab vom lateinischen Wort „immunis“ und bedeutet „frei sein, unberührt“.

Das Immunsystem hat sich auf die Abwehr von solchen Krankheitserregern spezialisiert. Aber es schützt auch vor körperfremden Eiweißen und vor krankhaft veränderten Zellen des eigenen Körpers, die zu Krebszellen entarten können.

Die erste Abwehr ist extern und besteht aus epithelialen Geweben wie der Haut und den Schleimhäuten mit ihren Sekreten. Die zweite Linie der Abwehr befindet sich innerhalb des Körpers und basiert auf den Reaktionen der weißen Blutzellen, den Leukozyten, die den Körper in den Blut- und lymphatischen Geweben verteidigen. Hier haben sich zwei ergänzende Abwehrsysteme entwickelt: zum einen gibt es die unspezifische (angeborene) Immunität und zum anderen die spezifische (erworbene, adaptive) Immunität. Das Prinzip der spezifischen Immunantwort beruht auf der Erkennung von Fremdanitigenen mittels antigenspezifischer Rezeptoren. Hierbei spielt die enorme Vielfalt der Antigenrezeptoren der T- und B-Lymphozyten eine zentrale Rolle. Durch somatische Rekombination variabler Genelemente entstehen so verschiedenste Rezeptoren, die alle unterschiedliche Antigene erkennen und damit eine Immunantwort einleiten können. Solche Antigenrezeptoren werden zum einen von B-Zellen in Form von Antikörpern gebildet und sezerniert und zum anderen von T-Zellen in Form von T-Zell-Rezeptoren (TCR) exprimiert (Siu et al., 1984). Man unterscheidet hierbei zwischen der humoralen und der zellulären Immunantwort. Im Rahmen der humoralen Immunantwort auf eine Infektion werden von B-Zellen Antikörper gebildet und sezerniert, die an das Antigen binden, wodurch das Pathogen von akzessorischen Zellen und Molekülen des humoralen Immunsystems beseitigt wird. Dabei entstehen so genannte B-Gedächtniszellen, die eine erneute Infektion mit demselben Mikroorganismus verhindern. Die humorale Antwort richtet sich in erster Linie gegen extrazelluläre Pathogene. Die

zelluläre Immunantwort wird durch den T-Zell-Rezeptor (TCR) vermittelt. Die Aktivierung der T-Zelle erfolgt über eine Begegnung mit einer Antigenpräsentierenden-Zelle (APC), wobei es sich dabei in den meisten Fällen um eine dendritische Zelle handelt. Eine Aktivierung über Makrophagen und B-Zellen ist ebenfalls möglich. Der stärkste Aktivator ist jedoch die dendritische Zelle, welche das Antigen an einem Infektionsherd aufgenommen hat, ins lokale Lymphgewebe gewandert ist und sich dort zum Aktivator naiver T-Zellen entwickelt hat. Durch den Kontakt mit der APC wird die aktivierte T-Zelle zur Vermehrung und Differenzierung angeregt, sodass die Tochterzellen zur Beseitigung des Antigens beitragen können. Solche T-Zellen bezeichnet man als T-Effektorzellen, da sie sehr schnell in Aktion treten können, wenn sie auf der Oberfläche einer anderen Zelle auf ein spezifisches Antigen stoßen. Dies kann zur direkten Tötung der Zielzelle führen oder es werden Makrophagen aktiviert, die angeregt werden, intrazelluläre Mikroorganismen effektiver zu zerstören. Außerdem können B-Zellen zur Differenzierung und Antikörperbildung stimuliert werden. Sobald das adaptive Immunsystem eine Infektion beseitigt hat, wird der größte Teil der Effektorzellen eliminiert, einige bleiben allerdings erhalten und liefern das Material für die Ausbildung von T- und B-Gedächtniszellen, welche für das immunologische Gedächtnis verantwortlich sind. Sie reagieren gegenüber Antigenen empfindlicher als naive T- und B-Lymphozyten und reagieren schnell bei einem erneuten Kontakt mit dem Antigen, das sie ursprünglich aktiviert hat.

Während die spezifische Abwehr Fremdantigene aufspürt und die entsprechende Zielzelle zerstört, sucht die unspezifische, angeborene Abwehr entweder nach pathogenen Strukturen (Makrophagen) oder nach bestimmten und vertrauten Strukturen (NK-Zellen) auf der Oberfläche der eigenen Körperzellen. So führt die Erkennung bestimmter Oberflächenmoleküle (MHC Klasse I, major histocompatibility complex class I) zur Inhibition der Immunantwort durch die NK-Zelle, und die untersuchte Zelle bleibt verschont. Fehlt die gesuchte Struktur, wird die entsprechende pathologisch veränderte Zelle beseitigt. Für die unspezifische Abwehr ist demnach keine antigene Aktivierung erforderlich. Phagozytotisch wirksame Zellen wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten bilden die erste Verteidigungslinie der angeborenen Immunität. Sie sind für die Bekämpfung häufiger bakterieller Infektionen von grundlegender Bedeutung, können infektiöse Organismen jedoch nicht immer vollständig beseitigen. Daher spielen die Zellen des angeborenen Immunsystems bei der Auslösung und der Steuerung der spezifischen Immunreaktion eine entscheidende Rolle. Durch das Sezernieren von Zytokinen und Chemokinen lösen die Zellen des

angeborenen Immunsystems zum einen eine Entzündung aus und locken zum anderen weitere Zellen zur Infektionsstelle. Darüber hinaus haben sie die wichtige Aufgabe, eine Infektion während der ersten vier bis sieben Tage, die bis zum Einsetzen der spezifischen Immunität vergehen, in Schach zu halten. Während Zytokine und Chemokine hauptsächlich bei bakteriellen Infektionen produziert werden, induziert die Infektion von Zellen mit Viren die Produktion von Interferonen. Diese hemmen in allen Wirtszellen die Virusreplikation und aktivieren so die oben bereits erwähnten NK-Zellen. Diese werden durch das Interferon veranlasst, virusinfizierte Zellen zu töten und setzen außerdem Zytokine frei, welche Lymphozyten des spezifischen Immunsystems rekrutieren.

1.2 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind eine Subpopulation der Lymphozyten und im Gegensatz zu T- und B-Zellen ein essentieller Teil des angeborenen Immunsystems. Ihr Anteil an der Lymphozytenpopulation im peripheren Blut beträgt ca. 10 %. NK-Zellen sind aufgrund ihrer unveränderlichen Rezeptoren in der Lage, virusinfizierte Zellen, Bakterien, Parasiten und Tumorzellen zu erkennen und zu töten (French and Yokoyama, 2003; Moretta et al., 2002; Robertson and Ritz, 1990; Yokoyama and Scalzo, 2002). NK-Zellen können anders als T- und B-Lymphozyten ohne vorherige, spezifische Antigenerkennung Tumor- oder Zielzellen lysieren (Trinchieri, 1989). Dabei wird das Vorgehen der NK-Zelle von komplexen Signalen inhibitorischer und stimulatorischer Rezeptoren bestimmt, welche klassische MHC-Moleküle (major histocompatibility complex, MHC) auf der Oberfläche der Zielzelle erkennen (Cerwenka and Lanier, 2001; Moretta et al., 2002). Darüber hinaus spielt die NK-Zelle als Bindeglied zwischen angeborener und spezifischer Immunität eine wichtige Rolle, weil sie nach einer Infektion zu den ersten Zellen gehört, die immunregulatorische Zytokine und Chemokine sezerniert. Damit sind sie behilflich, auf den Infektionsherd aufmerksam zu machen und locken die Zellen der spezifischen Immunität an (Azzoni et al., 2002; Cooper et al., 2001; Nguyen et al., 2002). Phänotypisch lassen sich NK-Zellen anhand ihrer Oberflächenproteine charakterisieren, welche laut internationaler Nomenklatur als Differenzierungscluster (cluster of differentiation, CD) bezeichnet werden. Hierbei handelt es sich um Rezeptoren und deren Liganden, die Signale und damit die spezifischen Funktionen ihrer Zellen vermitteln. Typisch für NK-Zellen ist die Expression von CD56 (neural cell adhesion molecule, NCAM) und die Abwesenheit des T-Zell-Rezeptormoleküls CD3 (Farag

et al., 2002; Lanier et al., 1991). Die Rolle von CD56 im Rahmen der NK-Zellfunktion konnte bis heute nicht geklärt werden.

Basierend auf der Dichte des CD56-Rezeptors lassen sich NK-Zellen in CD56^{bright} (hohe Dichte) und CD56^{dim} (geringe Dichte) unterteilen. Etwa 90 % der im peripheren Blut (PB) vorhandenen NK-Zellen sind CD56^{dim} und weisen gleichzeitig eine starke Expression des Fc γ Rezeptors CD16 auf (CD56^{dim} CD16⁺). Die CD56^{dim} CD16⁺ Population trägt Marker zur Zielsuche (homing-marker, CCR7 und CD62L) für sekundäre Lymphorgane und außerdem eine große Menge an Perforin-Granula, um sofort zytotoxisch aktiv sein zu können (Campbell et al., 2001; Jacobs et al., 2001).

Die übrigen 10 % der PB-NK-Zellen sind CD56^{bright} und exprimieren CD16 schwach bis gar nicht (CD56^{bright} CD16^{dim/-}). Diese Population enthält kein Perforin, sezerniert aber nach Aktivierung immunregulatorische Zytokine wie IL-3, IL-10, IL-13, IFN- γ und TNF- β (Cooper et al., 2001).

CD16 ist ein niedrigaffiner Rezeptor für den Fc-Teil des Immunglobulin G (IgG) und vermittelt so die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (antibody-dependent cellular Cytotoxicity, ADCC). Dabei bindet CD16 an antikörpermarkierte Zellen und leitet den Lysemechanismus ein, indem Granzym- und Perforin-Granula in Richtung Zielzelle ausgeschüttet werden. Diese Substanzen gelangen in die Zielzellen und lösen über Enzymkaskaden die Apoptose aus (Leibson, 1997). Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen wird jedoch nicht nur über CD16 vermittelt; es gibt eine Reihe von MHC-Klasse-I-spezifischen Rezeptoren, die das Verhalten der NK-Zelle beeinflussen.

1.3 NK-Zell-Rezeptoren

NK-Zellen haben im Vergleich zu anderen Lymphozyten nicht die Fähigkeit zur Umordnung ihrer spezifischen Rezeptorgene und sind demnach nicht zur spezifischen Antigenerkennung von Pathogenen geeignet. Stattdessen besitzen NK-Zellen ihr eigenes Repertoire verschiedener Klassen von Rezeptoren, die an MHC-Klasse-I oder Klasse-I-ähnliche Moleküle binden, welche die Reaktion der NK-Zelle regulieren. Die Balance der Signale ihrer inhibierenden und stimulierenden Rezeptoren entscheidet über die Fähigkeit der NK-Zelle, die Zielzelle zu lysieren (Farag et al., 2002; Moretta et al., 2001). Hierbei spielen vor allem drei NK-zellspezifische Rezeptorfamilien eine wichtige Rolle:

KIRs (killer cell immunoglobulin like receptors), C-Typ-Lectin-ähnliche Rezeptoren der NKG2-Familie und die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (natural cytotoxicity receptors, NCRs).

Die ersten beiden Gruppen beinhalten sowohl inhibierende als auch stimulierende Rezeptoren während NCRs immer stimulatorisch auf die NK-Zelle wirken und damit die Lyse der Zielzelle auslösen. Eine Einteilung der Rezeptoren mit den entsprechenden Liganden ist in Tabelle 1-1 dargestellt.

1.3.1 Die Natürlichen Zytotoxizitäts Rezeptoren

Die NCRs umfassen eine Gruppe von drei aktivierenden Rezeptoren, bestehend aus NKp30, NKp44 und NKp46 (Moretta et al., 2000). NCRs binden an spezielle, virale Oberflächenantigene, die Hämagglutinine und an tumorspezifische Antigene (Arnon et al., 2004; Sivori et al., 1997; Vitale et al., 1998). Die auf den Tumorzellen erkannten Liganden konnten bis jetzt nicht charakterisiert werden. NCRs werden auf allen NK-Zellpopulationen exprimiert und sind die einzigen bekannten Rezeptoren, deren Expression auf NK-Zellen beschränkt ist (Cantoni et al., 1999).

1.3.2 Rezeptoren der NKG2-Familie

Die NKG2-Familie gehört zu den C-Typ-Lektin-artigen Rezeptoren und umfasst im humanen System fünf Mitglieder: NKG2A, NKG2C, NKG2D, NKG2E und NKG2F (Glienke et al., 1998; Houchins et al., 1991; Lazetic et al., 1996; Plougastel et al., 1996). Mit Ausnahme von NKG2D, welches als Homodimer exprimiert wird, bilden die übrigen Rezeptoren Heterodimere mit CD94 einem weiteren C-Typ-Lektin-artigen Rezeptor, der zusammen mit den NKG2 Genen auf Chromosom 12 im sogenannten NKC (Natural Killer Cluster) lokalisiert ist. Die CD94/NKG2-Heterodimere werden nur von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen exprimiert (Aramburu et al., 1990). Außer CD94/NKG2A, welches ein inhibitorischer Rezeptor ist, senden die übrigen CD94/NKG2 Heterodimere stimulatorische Signale an die NK-Zelle. NKG2A und NKG2C binden beide das nicht-klassische HLA-Molekül HLA-E (Wada et al., 2004). HLA-E bindet bestimmte Signalpeptide der klassischen HLA-Moleküle A, B und C und kann nur so auf der Oberfläche exprimiert werden. Dort interagiert es mit dem NKG2A-Rezeptor der NK-Zelle und kann dadurch eine Lyse

verhindern. Ist die HLA-A, -B oder -C Expression in Folge von Virusinfektionen oder in Tumorzellen gestört, kann HLA-E die Zelloberfläche nicht erreichen, so dass keine Inhibition der NK-Zelle erfolgen kann und die Zielzelle infolgedessen lysiert wird.

Die Liganden des homodimeren NKG2D sind keine HLA-Moleküle, sondern die stressinduzierten Moleküle MICA und MICB (MHC class I chain-related antigens) und die virusinduzierten ULBPs (UL16 binding proteins) (Cosman et al., 2001; Steinle et al., 2001). Dieser Rezeptor besitzt besondere Bedeutung für die NK-Zellfunktion, da die Erkennung von Liganden durch NKG2D auch in Anwesenheit inhibitorischer Signale zur Aktivierung der NK-Zelle führen kann („inhibition override“). Die Liganden von NKG2E und NKG2F sind nicht bekannt.

1.3.3 Die KIR-Rezeptoren

Die ersten KIRs wurden in den frühen 90er Jahren entdeckt (Moretta et al., 1990; Moretta et al., 1993) und gehören aufgrund ihrer Struktur zur Immunglobulin-Superfamilie. Sie sind genetisch auf dem Chromosom 19p13.4, im sogenannten Leukozyten-Rezeptor-Komplex (LRC) lokalisiert (Torkar et al., 1998). KIRs sind spezifisch für HLA-Klasse-I-Moleküle (human leukocyte antigen, HLA), welche sehr polymorph sind und von den drei Genen HLA-A, -B und -C kodiert werden (Litwin et al., 1994; Miller et al., 1994; Moretta et al., 1990; Moretta et al., 1993; Vitale et al., 1996). Es gibt zwei funktionell verschiedene KIR-Gruppen: stimulatorische und inhibitorische. Diese besitzen unterschiedliche Domänen im zytoplasmatischen Bereich, von wo aus entweder ein stimulatorisches oder ein inhibitorisches Signal an die NK-Zelle übermittelt wird (Biassoni et al., 1996; Colonna and Samaridis, 1995).

1.3.3.1 KIR-Nomenklatur

Die konventionelle Nomenklatur der KIRs basiert auf den strukturellen Eigenschaften der extrazellulären und intrazellulären Anteile. Erstere verfügen über zwei (2D) oder drei (3D) Immunglobulin (Ig)-ähnliche Domänen und die intrazellulären, zytoplasmatischen Anteile werden anhand ihrer Länge mit einem L (long cytoplasmic tail) oder S (short cytoplasmic tail) gekennzeichnet (s. Abbildung 1.1).

Aufgrund der strukturellen und sequentiellen Gemeinsamkeiten der verschiedenen KIR-Moleküle lassen sich drei extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen definieren, die als D0, D1 und D2 bezeichnet werden. Alle KIR3D-Moleküle besitzen die D0-D1-D2 Konfiguration, und die

KIR2D-Moleküle weisen entweder eine D1-D2 (TypI) oder die D0-D2 (TypII) Konfiguration auf (Abbildung 1.1).

Die zytoplasmatischen und transmembranen Domänen der KIR-Moleküle vermitteln die funktionale Aktivität der NK-Zelle, wobei KIRs mit einem „long cytoplasmic tail“ (L) inhibitorisch (außer KIR2DL4) und KIRs mit einem „short cytoplasmic tail“ (S) stimulatorisch sind (Andre et al., 2001).

Die inhibitorischen Signale der KIRs mit langem zytoplasmatischen Anteil (L) resultieren aus ein oder zwei ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs), welche über Tyrosin-Phosphatasen eine Hemmung der NK-Zelle vermitteln. Die stimulatorischen KIRs mit den kurzen (S) cytoplasmatischen Domänen weisen eine positiv geladene Aminosäure (Arginin oder Lysin) in ihrer Transmembrandomäne auf, mit der sie über das negativ geladene Adaptermolekül DAP12 interagieren können (Lanier, 1998). Dieses Molekül enthält sogenannte ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activating motifs), die aktivierende Signale an die NK-Zelle weiterleiten können (Lanier et al., 1998; Olcese et al., 1997).

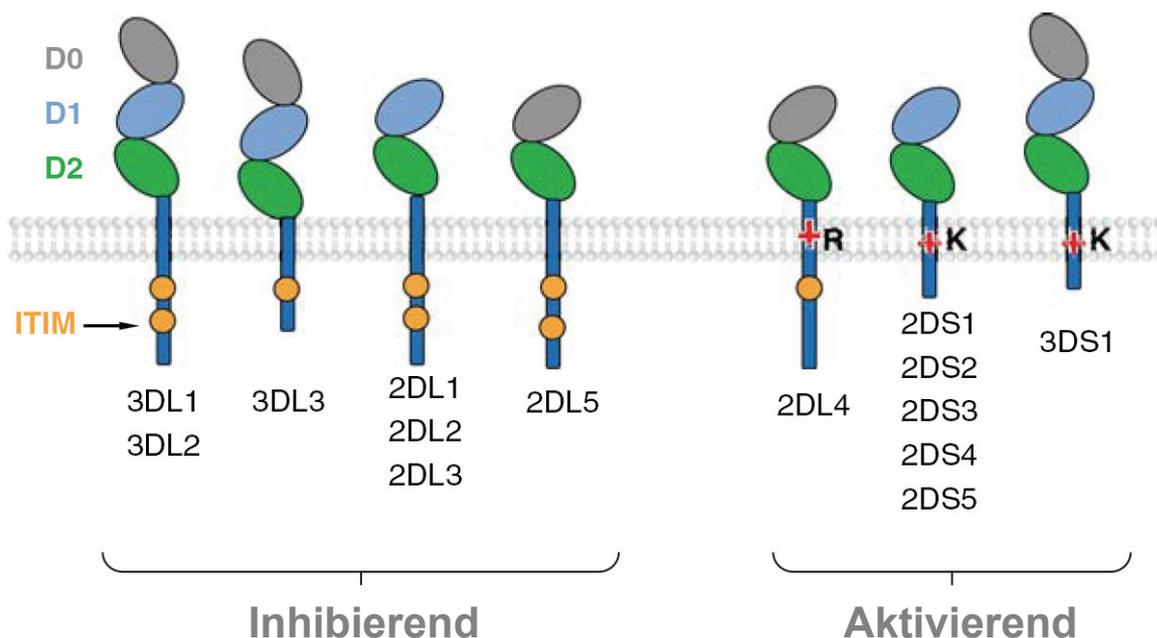


Abbildung 1.1 Organisation der Killer-Immunglobulin-like-Receptor (KIR) Domänen. Die extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen sind farblich markiert: D0 = grau, D1 = blau, D2 = grün. Inhibitorische KIRs und 2DL4 haben ITIMs in den zytoplasmatischen Anteilen und stimulatorische KIRs verfügen über eine positiv geladene Aminosäure in der transmembranen Domäne.

KIR2DL4

Der Rezeptor KIR2DL4 stellt aufgrund der Kombination von stimulatorischen und inhibitorischen Strukturen eine Besonderheit dar. Er besitzt sowohl eine positiv geladene Aminosäure (AS) in der transmembranen Region und eine lange (L) cytoplasmatische Domäne mit einem ITIM-Motiv. Es konnte gezeigt werden, dass KIR2DL4 mit dem Protein FcεRI-γ assoziiert ist, welches genau wie DAP-12, ein ITAM-Motiv beinhaltet und darüber stimulatorische Signale an die NK-Zelle übermitteln kann (Kikuchi-Maki et al., 2005). Im Folgenden wird aus Gründen der Übersichtlichkeit und je nach Kontext die Bezeichnung „KIR“ weggelassen; z.B. bei Aufzählungen dieser Rezeptoren. Andere Untersuchungen belegen allerdings eine Weiterleitung von inhibierenden Signalen, sowohl bei NK-Zellen aus peripherem Blut (Riteau et al., 2001) als auch aus dem Uterus (Ponte et al., 1999). Diese Daten lassen vermuten, dass KIR2DL4 unter verschiedenen Bedingungen unterschiedliche Funktionen wahrnehmen kann (Goodridge et al., 2003). Als einziger KIR wird 2DL4 von allen NK-Zellen entweder intrazytoplasmatisch oder auf der Zelloberfläche exprimiert (Cantoni et al., 1998; Husain et al., 2002; Valiante et al., 1997)

1.3.3.2 Genetische Vielfalt der KIR-Rezeptoren

Die Variation der KIR-Gene ist eine besondere Eigenschaft des KIR-Komplexes, und trotz der extrem hohen Variabilität haben Analysen gezeigt, dass es systematische Charakteristika innerhalb des KIR-Komplexes gibt (Hsu et al., 2002; Uhrberg et al., 2002). Vier *KIR*-Gene, 3DL3, 3DP1, 2DL4 und 3DL2, finden sich auf allen Haplotypen wieder und werden daher als sogenannte „Framework“-Gene bezeichnet. KIR3DP1 und auch 2DP1 sind Pseudogene (P) und werden nicht in Proteine translatiert.

Basierend auf der genetischen Struktur kann man zwei Gruppen von Haplotypen unterscheiden: Haplotyp A und B (Uhrberg et al., 1997). Haplotyp A beinhaltet neun *KIR*-Gene, wobei KIR2DS4 den einzigen stimulatorischen Rezeptor repräsentiert. Trotz dieser fixen Anzahl an KIR-Genen weist der Haplotyp A einige allelische Variationen auf.

Der Haplotyp B bietet, was die Anzahl der KIR-Gene und die allelischen Polymorphismen angeht, eine extrem hohe Vielfalt. Bisher wurden mehr als 39 verschiedene B-Haplotypen beschrieben (Hsu et al., 2002; Uhrberg et al., 2002; Yawata et al., 2002).

Die KIRs 2DL2 und 2DL3 wurden zunächst für Produkte zweier verschiedener Gene gehalten, bis sich herausstellte, dass es sich um Allele desselben Genlokus handelt.

Das gleiche gilt für 3DL1 und 3DS1. Fast alle Haplotypen beinhalten diese beiden Loci (2DL2/2DL3; 3DL1/3DS1), weshalb 2DL2 oder 2DL3 und 3DL1 oder 3DS1 in jedem KIR-Repertoire vorhanden sind. Daher kann man diese KIRs neben den bereits bekannten vier, ebenfalls als Framework-Gene betrachten, die immer vorhanden sind (Bashirova et al., 2006) (Abbildung 1.2).

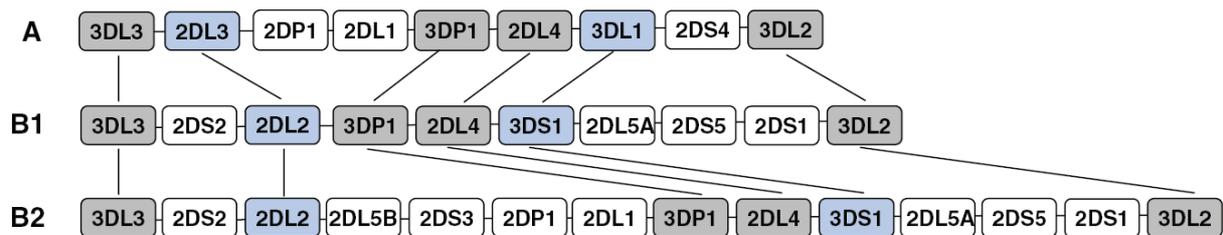


Abbildung 1.2 Definierte KIR-Haplotypen nach genomischer Sequenzierung. Dargestellt sind der Haplotyp A und zwei B-Haplotypen (B1 und B2). Die vier Framework-Gene sind grau markiert. Die 2DL2/2DL3 und 3DL1/3DS1 Loci (blau) sind auf fast allen KIR-Haplotypen präsent. Der Rezeptor KIR2DL5 ist ein weiteres Beispiel für die genetische Variation des KIR-Lokus. In diesem Fall handelt es sich um eine nichtallelische, homologe Rekombination, genauer um eine partielle Translokation des ursprünglichen KIR2DL5A mit 2DS3 oder 2DS5 (Martin et al., 2003).

1.3.3.3 Liganden der KIR-Rezeptoren

Bis jetzt konnten nur Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (HLA) der Klasse-I als Liganden für die KIRs identifiziert werden (Tabelle 1-1). Der HLA-Lokus wird auch als MHC (major histocompatibility complex = MHC) bezeichnet und kodiert eine Gruppe von Genen, welche die Immunantwort auf Transplantate stark beeinflusst. Der MHC ist ebenso wie die KIR-Gene polygen, d.h. es gibt mehrere MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II-Gene, und er ist sehr polymorph. Es gibt für jedes Gen innerhalb der Population mehrere Allele: HLA-A hat über 450 Allele, HLA-B mehr als 780 und für HLA-C sind mehr als 230 Allele bekannt. Es gibt zwei verschiedene Klassen von MHC-Molekülen: MHC-Klasse-I und -II (Abbildung 1.3). Beide transportieren Peptide aus verschiedenen Zellkompartimenten an die Oberfläche einer Zelle. Peptide (von Viren oder Bakterien) aus dem Zytosol werden an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden und auf der Zelloberfläche von zytotoxischen CD8-T-Zellen erkannt; Peptide, die in Vesikeln entstehen (Abbauprodukte durch Phagozytose und Endozytose), werden an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden und von CD4-T-Zellen erkannt.

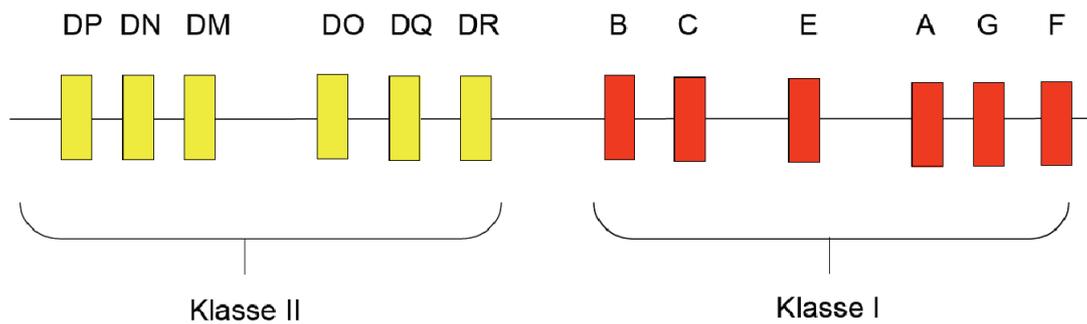


Abbildung 1.3 Anordnung der HLA-Klasse I und II Gene auf Chromosom 6.

Die NK-Zellrezeptoren KIR2DL2/3 und 2DL1 erkennen zwei verschiedene HLA-C-Gruppen, HLA-C1 und HLA-C2, welche sich durch einen Dimorphismus an Position 77 und 80 unterscheiden. Mittels kristallographischer Analysen konnten die beiden Komplexe 2DL2-C1 und 2DL1-C2 untersucht und dabei gezeigt werden, dass die Position 44 in der D1-KIR-Domäne und die Position 80 im HLA-Molekül wichtig für die Ausbildung der spezifischen Bindung sind (Fan et al., 2001).

Der Rezeptor 3DL1 interagiert mit HLA-B (Cella et al., 1994), welches auch in zwei Gruppen, nämlich Bw4 und Bw6, unterteilt werden kann. Diese beiden Gruppen kann man anhand der Sequenzmotive an Position 77-83 unterscheiden. 3DL1 bindet an Bw4 und zwar am stärksten, wenn an Position 80 ein Isoleucin vorhanden ist. Interessanterweise existiert für Bw6 kein entsprechender KIR.

Für HLA-A konnte gezeigt werden, dass nur bestimmte Allele (HLA-A3 und -A11) als Liganden für KIR fungieren (KIR3DL2) und dass die Erkennung abhängig von den Peptiden ist, die im HLA-A-Molekül präsentiert werden (Dohring et al., 1996). So erhöht ein bestimmtes EBV-kodiertes Peptid die Affinität von KIR3DL2 zu HLA-A3 (Hansasuta et al., 2004).

Der Ligand für 2DL4 ist HLA-G, neben HLA-E ein weiteres nicht-klassisches HLA-Klasse-I-Molekül, das auf fetalen Trophoblasten (Plazentazellen, die in die Uteruswand einwandern und dem Embryo als Ernährungsorgan dienen), Endothelzellen des Thymus und auf der Hornhaut zu finden ist (Janeway et al., Immunology, 2002). Es wird zudem in einigen Tumorzellen und während einigen Entzündung exprimiert (Carosella et al., 2003). Funktional führt die Erkennung von HLA-G durch KIR2DL4 zur Inhibition der NK-Zelle.

Die aktivierenden Rezeptoren 2DS1, 2DS2 und 3DS1 weisen in ihren extrazellulären Domänen sehr hohe Sequenzähnlichkeiten zu den inhibitorischen Rezeptoren 2DL1, 2DL2/3 und 3DL1 auf. Beispielsweise erkennt 2DS1 den HLA-C2-Liganden, 2DS2 bindet an HLA-C1 und 2DS4 komplexiert mit HLA-C2 (Cw4), aber die Bindung der stimulatorischen Rezeptoren an die entsprechenden HLA-Moleküle ist im Vergleich zu den inhibitorischen immer viel schwächer und teilweise nur schwer zu demonstrieren (Saulquin et al., 2003; Stewart et al., 2005; Vales-Gomez et al., 1998). Sowohl 3DL1 interagiert mit HLA-Bw4 als auch 3DS1 (Katz et al., 2001). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass KIR3DS1 die Entwicklung und das Fortschreiten von AIDS verlangsamt. Dies konnte bei Patienten, die HLA-Bw4 mit Isoleucin an Position 80 exprimieren, beobachtet werden (Alter et al., 2007). Die biologische Bedeutung der niedrig-affinen Interaktionen zwischen den stimulatorischen KIRs und den MHC-Klasse-I-Molekülen ist bisher nicht klar, könnte aber auch von der Anwesenheit bestimmter Peptide abhängen.

Tabelle 1-1 NK-Zell Rezeptoren und ihre Liganden

	Chromosom	Extrazelluläre Domäne	Ligand
Stimulatorische Rezeptoren			
CD16	1q23	Ig-ähnliche	IgG
NKp44	6p21	Ig-ähnliche	Influenza Hämagglutinin
NKp30	6p21	Ig-ähnliche	
NKp46	19q13	Ig-ähnliche	Influenza Hämagglutinin
KIR2DS1	19q13	Ig-ähnliche	HLA-C Gruppe 2
KIR2DS2	19q13	Ig-ähnliche	HLA-C Gruppe 1
KIR2DS3	19q13	Ig-ähnliche	
KIR2DS4	19q13	Ig-ähnliche	? HLA-C Cw4 (C2)
KIR2DS5	19q13	Ig-ähnliche	
KIR3DS1	19q13	Ig-ähnliche	HLA-B Bw4
NKG2D	12p12	C-Tpy Lektin-ähnliche	MICA, MICB, ULBPs
CD94/NKG2C	12p12	C-Tpy Lektin-ähnliche	HLA-E
Inhibitorische Rezeptoren			
KIR2DL1	19q13	Ig-ähnliche	HLA-C Gruppe 2
KIR2DL2	19q13	Ig-ähnliche	HLA-C Gruppe 1
KIR2DL3	19q13	Ig-ähnliche	HLA-C Gruppe 1
KIR2DL5	19q13	Ig-ähnliche	
KIR3DL1	19q13	Ig-ähnliche	HLA-B Bw4
KIR3DL2	19q13	Ig-ähnliche	HLA-A A3, A11
KIR3DL3	19q13	Ig-ähnliche	
CD94/NKG2A	12p12	C-Tpy Lektin-ähnliche	HLA-E
Stimulatorisch/Inhibitorisch			
KIR2DL4	19q13	Ig-ähnliche	HLA-G

1.3.3.4 Expression und Regulation der KIR-Gene

Die Expression der KIR-Gene ist den NK-Zellen und einer Subpopulation der T-Lymphozyten vorbehalten. Bisher konnten nicht alle KIRs auf mRNA Ebene nachgewiesen werden, wobei es sich um einige Allele von 2DL5, 2DP1 und 3DP1 handelt. Andere wiederum konnten mangels spezifischer Antikörper nicht auf Proteinebene detektiert werden: 3DL3, 2DS3 und 2DS5 (Bashirova et al., 2006).

Anhand von mRNA- und Protein-Analysen konnte gezeigt werden, dass nicht jeder NK-Zellklon in einem gegebenen Individuum das komplette Set an KIR-Genen exprimiert, welches im Genom kodiert ist. Vielmehr wurden verschiedene Kombinationen der KIR-Rezeptoren auf verschiedenen NK-Zellen detektiert (Valiante et al., 1997). Das heißt, jede NK-Zelle (auch als NK-Klon bezeichnet) exprimiert eine individuelle Auswahl der im Genom vorhandenen KIR-Gene. Die unterschiedlichen KIR-Muster auf den verschiedenen NK-Zellen bilden in ihrer Gesamtheit das KIR-Repertoire eines Individuums. Hat ein NK-Klon sein jeweiliges KIR-Expressionsmuster erworben, welches von nur einem KIR-Gen bis zur Expression aller auf dem Genom vorhandenen KIR-Gene variiert, so wird dieses im Verlauf nachfolgender Zellteilungen stabil weitergegeben (Miller and McCullar, 2001; Valiante et al., 1997). Die Ausbildung des KIR-Repertoires wird von endogenen und exogenen Faktoren beeinflusst. Zum einen hat der Haplotyp (A oder B) mit seiner genetischen Vielfalt der *KIR-Gene* und den jeweiligen allelischen Polymorphismen einen Einfluss auf die Expressionsstärke der KIRs auf der Zelloberfläche (Gardiner et al., 2001; Gumperz et al., 1996). Zum anderen gibt es eine regulatorische Verbindung zwischen den polymorphen HLA-Klasse-I-Molekülen und der KIR-Expression, was bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen beobachtet werden konnte. Es konnte an KIR- und HLA-identischen Geschwistern beschrieben werden, dass sie exakt das gleiche NK-Zell Repertoire aufweisen, während Geschwister mit verschiedenem KIR- oder HLA-Genotyp unterschiedliche NK-Phänotypen exprimieren (Gumperz et al., 1996; Shilling et al., 2002; Yawata et al., 2006).

Die Promotorregionen der *KIR-Gene* sind mit einer über 90 % igen Sequenzübereinstimmung sehr homolog, was eine ähnliche Regulation der Transkription vermuten lässt. Diesbezüglich wurden Analysen durchgeführt, bei denen drei unterschiedliche Promotortypen charakterisiert wurden. Demnach lassen sich drei klare und charakteristische Aussagen bezüglich der *KIR*-Expression machen: (a) es gibt *KIR-Gene*, die klonal auf NK-Zellen verteilt werden (z.B. 2DL3), (b) solche, deren Expression konstitutiv auf allen NK-Zellen gewährleistet ist (2DL4)

und (c) die niedrige bis undetektierbare Expression von 3DL3 (Trompeter et al., 2005). Diese Ergebnisse sind auf strukturell und funktionell unterschiedliche Promotoren zurückzuführen. Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass Transkriptionsfaktoren aus der AML/RUNX-Familie einen Einfluss auf die Expression der *KIR-Gene* haben. Es gibt drei Mitglieder (AML-1, AML-2, AML-3), die alle dieselbe konservierte Konsensus-Sequenz in den KIR-Promotoren erkennen. Dabei wurde AML-2 (auch als RUNX-3 bezeichnet), das in NK-Zellen stärker als AML1 und 3 exprimiert wird, als vorherrschender *KIR*-Bindungsfaktor identifiziert. In NK-Zellen scheint AML-2 als *KIR*-Repressor zu fungieren, denn bei einer Mutation der Konsensus-Sequenz in allen drei untersuchten Promotoren kam es im Rahmen von in vitro Reporter-Gen-Analysen zu einem Anstieg der *KIR*-Expression (Trompeter et al., 2005), was dafür spricht, dass AML an der Regulation der *KIR*-Expression während der NK-Zellentwicklung beteiligt ist.

Weiterhin scheinen epigenetische Mechanismen eine entscheidende Rolle für die Regulation der *KIR*-Gene zu spielen. Bisher gab es zur *KIR*-Expression zwei unabhängige Studien, die epigenetische Mechanismen, wie die DNA-Methylierungen im Promotorbereich, für die *KIR*-Regulation in Betracht ziehen (Chan et al., 2003; Santourlidis et al., 2002; Santourlidis et al. 2008).

1.3.3.5 KIR-Toleranz

Die Toleranz der NK-Zelle gegenüber körpereigenen Zellen beruht auf der Fähigkeit zur Erkennung von MHC-Molekülen. Mit ihren KIR-Rezeptoren hat sie die Möglichkeit zur Unterscheidung von Zellen, die „selbst“, d.h. MHC-Klasse-I-Moleküle, präsentieren und solchen, denen „selbst“ fehlt. Demnach kann eine MHC-Klasse-I-negative Zelle eine NK-Zelle nicht inhibieren und wird von ihr lysiert. Diese als „missing self“ bezeichnete Theorie wurde bereits 1990 von Ljunggren und Karre beschrieben (Ljunggren and Karre, 1990). Im humanen System tragen NK-Zellen ein Repertoire an Rezeptoren, das jeweils spezifisch für die eigenen MHC-Klasse-I-Moleküle ist, d.h. wenn die NK-Zelle autologes, körpereigenes Gewebe („selbst“) erkennen will, muss sie auch mindestens einen inhibitorischen Rezeptor auf der Oberfläche exprimieren, der „selbst“ erkennt („At least one“- Theorie) (Uhrberg et al., 1997; Valiante et al., 1997). Diese Regel, dass jede NK-Zelle mindestens einen inhibitorischen Rezeptor exprimiert, trifft allerdings nicht immer zu. Es gibt NK-Zellen, die weder KIR noch NKG2A auf der Oberfläche tragen, und es gibt solche, die zwar KIR-positiv sind, aber trotzdem keinen inhibitorischen Rezeptor für Selbst-MHC-Moleküle exprimieren.

Es konnte gezeigt werden, dass diese NK-Zellen kaum reaktiv oder zytotoxisch wirksam und außerdem sehr tolerant gegenüber autologen Zellen sind (Anfossi et al., 2006; Fernandez et al., 2005). Man geht daher davon aus, dass der Erwerb eines inhibitorischen KIR-Rezeptors, der Selbst-MHC-Klasse-I-Moleküle erkennt, zur funktionellen Reifung einer NK-Zelle benötigt wird. Dieser Prozess wird auch als Lizenzierung („licensing“) bezeichnet, und impliziert, dass eine NK-Zelle inaktiv bleibt solange sie nicht diesen MHC-Klasse-I-abhängigen Toleranzprozess durchlaufen hat (Kim et al., 2005; Yokoyama and Kim, 2006). Die molekularen Mechanismen, die einer NK-Zelle die „Lizenz zum Töten“ vermitteln, sind weitestgehend unbekannt. Vermutlich spielen die zytoplasmatischen Domänen der inhibitorischen KIRs dabei eine Rolle (Thananchai et al., 2007).

1.4 Entwicklung und Differenzierung der NK-Zelle aus CD34 Vorläuferzellen

Alle zellulären Bestandteile des Blutes - zu ihnen gehören die Erythrozyten, die den Sauerstoff transportieren, die Thrombozyten, die in verletzten Geweben die Blutgerinnung auslösen, und die Leukozyten des Immunsystems - stammen von denselben Vorläuferzellen ab, den hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) im Knochenmark. Diese zeichnen sich, genau wie alle anderen Stammzellen, durch zwei bestimmte Fähigkeiten aus: zum einen haben sie die Möglichkeit zur Selbsterneuerung und zum anderen die Fähigkeit zur Differenzierung in eine bestimmte Zelllinie.

in vivo

Über die frühe Phase der hämatopoetischen Entwicklung der HSZ zur lymphatischen NK-Zelle ist wenig bekannt. Hämatopoetische Vorläuferzellen kommen im Knochenmark, im Thymus, in der Milz und der Leber vor, wobei viele dieser Gewebe auch reife NK-Zellen enthalten. Allerdings haben diese ihren Ursprung im Knochenmark. Dieses stellt für eine optimale Entwicklung neben einem reichhaltigen Mix aus Zytokinen und Wachstumsfaktoren auch Stromazellen bereit, die für die Reifung der NK-Zelle essentiell sind. Speziell die vom Knochenmark bereitgestellten Zytokine FLT-3-Ligand und SCF (stem cell factor) sind von physiologischer Bedeutung für die Entstehung der NK-Zelle (Farag et al., 2002). Die Differenzierung der NK-Zelle aus der HSZ lässt sich in drei Phasen einteilen. In der initialen Phase kommt es zunächst zur Determination der HSZ in die lymphatische Richtung. An

diesem Zeitpunkt wird der NK-Progenitor (NKP) generiert, der nur noch in Richtung NK-Zelle ausdifferenzieren kann. Phänotypisch lässt sich der NKP über die Expression von CD34 und IL-2/IL-15 β und über die Abwesenheit von CD56 charakterisieren. In der zweiten Phase kommt es zur Ausreifung des NKPs in eine phänotypisch und funktional charakteristische NK-Zelle. In dieser Phase entwickelt sich das NK-Zell-Repertoire und es kommt zur Ausbildung der Effektorfunktionen (Zytotoxizität, Zytokinproduktion). Die finale Phase beinhaltet den Export der NK-Zellen zu den peripheren Organen (Colucci et al., 2003).

in vitro

Das Oberflächenantigen CD34 ist einer der wichtigsten Marker zur Charakterisierung der hämatopoetischen Stammzelle (Egeland, 1998) und wird meist zur Anreicherung der HSZ mittels Durchflusszytometrie verwendet. Ein anderer Stammzellmarker, der auch auf CD34-positiven Zellen gefunden wurde, ist CD133, auch AC133 oder Prominin genannt (Kobari et al., 2001). Zur Anreicherung der HSZ mittels Durchflusszytometrie wird das Oberflächenantigen CD34 verwendet. Die erhaltene Zell-Population ist allerdings sehr heterogen und enthält neben den wenigen Stammzellen auch liniendeterminierte Progenitoren, die bereits myeloide oder lymphatische Marker tragen. Für eine reine CD34-Population bedient man sich daher der Möglichkeit die Oberflächenmerkmale auszuschließen, die man auf frühen und reifen lymphatischen Zellen findet. Ein Marker ist z.B. CD38 (ADP-Ribosyl-Cyklase), der auf frühen B- und T-Zellen exprimiert wird. Weiterhin wird ein sogenannter „Lineage“-Cocktail (lin) zur Markierung und zum Ausschluss aller ausdifferenzierten Leukozyten verwendet.

Miller et al. haben bereits 1999 einen Ansatz entwickelt, anhand dessen die CD34⁺CD38⁻Lin⁻ Progenitor-Zellen in NK-Zellen differenziert werden können. Der Erfolg dieses *in vitro* Kultursystems beruht auf der Kokultivierung mit adhärenenten Stromazellen. Es stellte sich heraus, dass dafür die murine fetale Leberzelllinie AFT024 am besten geeignet war. Sie war in der Lage, primitive CD34⁺ lymphatische Vorläuferzellen zu generieren und expandieren (Punzel et al., 1999b; Punzel et al., 2002). Daneben war für die *in vitro* Differenzierung der NK-Zellen auch die Zugabe von Zytokinen wie IL-2, IL-3, IL-7, Flt-3-Ligand, SCF und IL-15 notwendig (Miller et al., 1999; Punzel et al., 1999a).

1.5 Epigenetik

Die Epigenetik beschreibt vererbare zelluläre Mechanismen, die den Expressionsgrad von Genen bestimmen und dabei nicht direkt von der Sequenzinformation der DNA beeinflusst werden. Diese Mechanismen, die sich „epi“, also auf oder neben der DNA abspielen und den Phänotyp einer Zelle entscheiden und mitbestimmen, bewirken dies u.a. dadurch, dass sie die Zugänglichkeit der Transkriptionsfaktoren beeinflussen. Der Charakter und die Funktion einer Zelle lassen sich über ihre konstituierenden Proteine definieren, welche aus ganz bestimmten Genexpressionsmustern der jeweiligen Zelle resultieren. Wichtige Determinanten der Genexpression sind DNA-bindende Transkriptionsfaktoren, die aktivierend auf ausgewählte Gene wirken, nachdem sie die passende DNA-Sequenz erkannt haben (Bird, 2002). Die Interaktion dieser Transkriptionsfaktoren mit der spezifischen DNA-Sequenz setzt eine Reihe von Abläufen in Gang, die den Fortbestand einer offenen Chromatinstruktur (Euchromatin) favorisieren. Das Heterochromatin dagegen zeichnet sich durch eine Strukturierung aus, die mit transkriptioneller Aktivität unvereinbar ist (Cosma et al., 1999).

1.5.1 Histonmodifikationen

Histonmodifikationen sind eine Möglichkeit, um epigenetisch Einfluss auf die Genexpression zu nehmen, indem die Dichte des Chromatins reguliert wird. Das Histon-Oktamer besteht aus jeweils zwei Kopien der Proteine H2A, H2B, H3 und H4. Diese weisen im N-terminalen Bereich sehr häufig die basische Aminosäure Lysin (K) auf und sind daher für die Interaktion mit den negativ geladenen Nukleinsäuren bestens geeignet. Die N-terminalen Enden der Histone ragen aus dem Chromatin hervor und können daher von Enzymen, die Acetyl-, Methyl- oder Phosphat-Gruppen übertragen, leicht modifiziert werden (Spencer and Davie, 2001; Strahl et al., 2001). Die strukturellen Eigenschaften des Chromatins werden zum einen durch Acetylierungs-/Deacetylierungs-Vorgänge reguliert (Acharya et al., 2005) und zum anderen durch Methylierung der Lysine, vor allem in den Histonen H3 und H4 (Lachner et al., 2003). Diese strukturellen Modifikationen sind von besonderer Bedeutung, weil sie eine Lockerung des Chromatins und damit einen Zugang der Transkriptionsfaktoren erst ermöglichen. Konstitutiv abgeschaltete Gene liegen demnach im dichteren und kompakteren Heterochromatin, während aktive bzw. transkriptionell kompetente Gene in aufgelockertem

und acetyliertem Euchromatin lokalisiert sind (Marks et al., 2003; Marks et al., 2004; Spencer and Davie, 2001).

HATs und HDACs / Acetylierungs-Deacetylierungs-Mechanismen

Der Acetylierungsgrad des Chromatins wird durch zwei verschiedene Gruppen von Enzymen vermittelt: den Histon Acetyl Transferasen (HATs) und den Histon Deacetylasen (HDACs), wobei beide nur in Multiproteinkomplexen vorkommen. HATs transferieren eine Acetyl-Gruppe von Acetyl-CoenzymA (acetyl-CoA) auf eine Amino-Gruppe der Aminosäure Lysin im N-terminalen Bereich der Histone H3 und H4 und sorgen so für eine Auflockerung des Chromatins (Loidl, 1994). Es gibt zwei Typen von HATs: die einen befinden sich im Nukleus und sind damit potentiell an der Transkription beteiligt, und die anderen sind im Zytoplasma lokalisiert, wo sie vermutlich neu synthetisierte Histone acetylieren und für den Transport in den Zellkern vorbereiten (Sterner and Berger, 2000). Im humanen System sind zwei HAT-Familien bekannt: die GNAT- (Gcn5-related N-acetyltransferase) - und MYST-Familie. Zur GNAT-Familie gehören die Gcn5-HAT und die PCAF (p300/CREB-binding protein-associated factor). Gcn5 befindet sich im Nukleus und ist in die Interaktion zwischen bestimmten Coaktivatoren mit dem Transkriptionskomplex involviert (Berger et al., 1992; Marcus et al., 1994). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Gcn5 Einfluss auf das Zellwachstum, *in vivo* Transkription und Histon-Acetylierung hat ((Li et al., 1995; Wang et al., 1998)). Gcn5 acetyliert vornehmlich K14 in H3 und K8 bzw. K16 in H4 (Kuo et al., 1996). Der PCAF ist genau wie die Gnc5 mit den Cofaktoren p300 und CREB-binding proteine (CBP) assoziiert (Yang et al., 1996) und acetyliert Nukleosomen an Position K14/H3 und an K8/H4 (Schiltz et al., 1999). Ein Mitglied der MYST-Familie ist der bereits erwähnte Coaktivator-Komplex p300/CBP, welcher an der Acetylierung des kompletten Histon-Oktamers (H2A, H2B, H3, H4) mit beteiligt ist. Sämtliche HATs und Kofaktoren sind neben der Acetylierungs-Aktivität generell für die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase II verantwortlich (Sun et al., 2003).

Im Gegensatz zu den HATs entfernen HDACs die Acetyl-Gruppen von den N-Termini der Histone und tragen damit wieder zu einer kompakteren Struktur der Nukleosomen bei. Es gibt drei Klassen von HDACs: Klasse I HDACs (HDAC1, 2, 3, 8); Klasse II HDACs (HDAC 4, 5, 6, 7, 9, 10) und Klasse III HDACs (SIRT1- SIRT7), wobei letztere sich strukturell von NAD-abhängigen Enzymen herleiten (Thiagalingam et al., 2003). Die Klasse I HDACs haben eine Länge von ca. 400-500 Aminosäuren, sind im Nukleus lokalisiert und Gegenstand großer Proteinkomplexe *in vivo*, welche verschiedene Aufgaben wie die Regulation der

Gentranskription, die Übermittlung von Hormonsignalen, den Zellzyklus, die Zelldifferenzierung und die DNA-Reparatur lenken (Dangond and Gullans, 1998). Die Klasse II HDACs umfassen etwa 1000 Aminosäuren und haben in der Regel eine katalytische Domäne am C-Terminus. Man findet sie hauptsächlich im Zytoplasma und sie werden nur zum Zellkern transportiert, wenn sie dort benötigt werden. Die Klasse II HDACs werden nicht in allen Geweben gleich stark exprimiert; den mengenmäßig größten Anteil hat man im Herzen, im Gehirn und in der Skelettmuskulatur nachweisen können (Zhou et al., 2000). Die HDAC II Moleküle sind ebenfalls eingebunden in Multiproteinkomplexen, in denen sie teilweise mit HDACs der Klasse I assoziieren (Grozinger et al., 1999). Die Klasse III HDACs gehören zu den Sirtuinen, von denen es im humanen System sieben gibt (SIRT1-7). Sie weisen eine Länge von 300-400 Aminosäuren auf und sind an der Verdichtung des Chromatins, am Zellmetabolismus und an Alterungsprozessen beteiligt (Guarente, 2000).

HMTasen / Methylierung der Lysine in Histon H3 und H4

Es existieren mindestens fünf Positionen in den N-Termini der Histone H3 und H4, die eine Methylierung der Lysine aufweisen. Im N-Terminus von Histon H3 sind es die Positionen H3K4, H3K9, H3K27 und H3K36 und bei Histon H4 handelt es sich um die Position H4K20. Enzyme, welche Methylgruppen auf die Lysine übertragen bezeichnet man als Histon-Lysin-Methyltransferasen (HMTs). SUV39h war die erste HMT, die im humanen System identifiziert werden konnte. Sie ist hauptsächlich für die Methylierung von Lysin 9 im Histon H3 zuständig (Rea et al., 2000). Je nach Kontext können die Methylgruppen an den Lysinen entweder auf aktive Gene in euchromatischen Bereichen (H4K8) oder auf inaktive Gene (H3K9, H3K27) im Heterochromatin hinweisen (Lachner et al., 2003).

1.5.2 DNA-Methylierung

Neben der Histonmodifikation ist auch die DNA-Methylierung ein wichtiger Bestandteil des Epigenoms und von großer Bedeutung für gewebespezifische Genexpressionsmuster (Li, 2002). In erster Annäherung lässt sich sagen, dass methylierte DNA-Bereiche transkriptionell inaktiv sind und oft in heterochromatischen Regionen vorkommen. Enzyme, die eine Methylierung katalysieren bezeichnet man als DNA-(Cytosin-5)-Methyltransferasen (DNMTs). Die katalytischen Zentren befinden sich bei allen DNMTs in den C-Termini, von wo aus eine Methylgruppe auf das 5'-C des Cytosins übertragen wird. Dieses sitzt dabei immer in direkter Nachbarschaft zu einer Guanin-Base (5'-CpG-3'). Diese CpG-Sequenzen

kommen als sogenannte CpG-Inseln vor und man findet sie sehr häufig in 5'-Genregionen, also im Promotor und im Bereich der ersten Exons von Housekeeping- oder gewebespezifisch-exprimierten Genen. Bisher sind drei DNMTs bekannt: DNMT1, DNMT3a und DNMT3b. Die beiden Methyltransferasen DNMT3a und 3b sind eng verwandt und weisen beide ein bestimmtes PWWP-Motiv, eine cysteinreiche, zinkbindende Region und eine katalytische Domäne auf (Nimura et al., 2006). Beide DNMTs sind für die Neumethylierung (*de novo*) während der Embryonalentwicklung zuständig. Teile der sehr gering methylierten Blastula werden dabei zur stärker methylierten Gastrula. Neben den beiden *de novo* DNMTs ist ein Mechanismus erforderlich, der gewährleistet, dass die in einer ausdifferenzierten Zelle vorhandenen Methylierungsmuster während einer Zellteilung unverändert auf die Tochterzellen übertragen werden. Die semikonservative DNA-Replikation dient demnach nicht nur zur Duplikation der genetischen Information, sondern auch zur Erhaltung der Methylierungsmuster, die vom parentalen Strang kopiert werden (Jaenisch and Bird, 2003). Das am besten charakterisierte Enzym, welches diese Erhaltungsmethylierung bewerkstelligt, ist die DNMT1 (major maintenance methyltransferase) (Schermler et al., 2007).

Es gibt noch ein drittes Mitglied der Dnmt3-Familie, die Dnmt3L, welche keinerlei Sequenzen aufweist, die auf ein katalytisches Zentrum schließen lassen. (Aapola et al., 2000; Chedin et al., 2002). Man hat herausgefunden, dass die Dnmt3L die beiden Enzyme DNMT3a und DNMT3b bindet und darüber die DNA-Methylierung aktiviert (Suetake et al., 2004). DNMT3L wird ausschließlich in Keimzellen und embryonalen Stammzellen exprimiert. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die DNMT3L für die methylierungsspezifische Prägung der mütterlichen Gameten benötigt wird (Hata et al., 2002).

1.5.3 Methylbindende Proteine

Die beiden Repressions-Mechanismen, DNA-Methylierung und Histon-Deacetylierung, sind gekoppelt an die Bindung von Methyl-CpG-bindenden Proteinen (MBPs) wie MeCP2, MBD2, MBD3, MBD4 und Kaiso. MeCP2 interagiert beispielsweise über den Korepressor Sin3 mit HDAC1 und HDAC2. MBD2 ist ebenfalls mit HDAC1 assoziiert und interagiert auch mit dem Sin3-Komplex (Zhang et al., 1999). Von vielen MBPs glaubt man, dass sie HDACs und damit die Deacetylierung aktivieren (Rountree et al., 2000). Direkte als auch indirekte Interaktionen der MBPs mit den verschiedenen DNMTs konnten ebenfalls demonstriert werden (Fuks et al., 2001; Deplus et al., 2002).

1.6 Fragestellung und Konzeption der Arbeit

Das Expressionsverhalten der KIR-Rezeptoren während der Differenzierung von Natürlichen Killerzellen aus der hämatopoetischen Stammzelle, gerade in Bezug auf die NK-Progenitoren, wurde bislang nicht untersucht. Speziell zur zeitlichen Abfolge der *KIR*-Genregulation gibt es keine Daten. Diese offenen Fragestellungen waren im Rahmen dieser Arbeit Gegenstand der Untersuchungen.

Zu Beginn der Arbeit sollte zunächst ein effektives und reproduzierbares Zellkulturmodell für die NK-Zelldifferenzierung aus hämatopoetischen Vorläuferzellen etabliert werden. Dabei sollte überprüft werden, welche HSZ-Quelle am besten für eine Ausdifferenzierung in Richtung NK-Zelle geeignet ist. Hierfür waren Differenzierungsexperimente mit aufgereinigten CD34-Zellen aus Apheresat (Anreicherung von G-CSF-stimulierten HSZ aus dem Knochenmark im peripheren Blut), Knochenmark und Nabelschnurblut vorgesehen. Die Kulturbedingungen sollten mit unterschiedlichen Zytokinen optimiert werden. Im Verlauf der Differenzierung sollten zu definierten Zeitpunkten Zellen entnommen und anhand durchflusszytometrischer Analysen und RT-PCR im Hinblick auf die Expression der verschiedenen KIR-Rezeptoren untersucht werden. Im Anschluss daran galt es, Experimente auf klonaler Ebene mittels Einzelzell-Ablage durchzuführen, um die klonale Expression der KIR-Rezeptoren zu beobachten und mit den ersten Experimenten zu vergleichen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich im zweiten Teil mit Untersuchungen zur Ausprägung epigenetisch wichtiger Enzyme und Faktoren. Während der Differenzierung von CD34-Vorläufer- zu NK-Zellen kommt es zu erheblichen Änderungen des Transkriptionsmusters, was durch epigenetische Mechanismen verursacht wird. Dazu gehören die DNA-Methylierung und die Modifikation von Histonen, welche die Determination einer Zelle regulieren. Am Modell der NK-Zell-Entwicklung aus CD34-Vorläuferzellen sollte daher untersucht werden, ob und welche der ausgewählten Proteine eine zentrale Rolle bei dem Differenzierungsprogramm zur NK-Zelle spielen. Um diese Frage experimentell anzugehen, sollten zum einen RNA-Proben mittels Real-Time-PCR zu definierten Zeitpunkten auf die quantitative Expression der epigenetisch interessanten Enzyme untersucht werden. Zum anderen sollten Veränderungen der Histonmodifikationen durch Chromatin-Immuno-Präzipitations (ChIP)-Analysen untersucht werden.

2 Ergebnisse

2.1 Sequentielle KIR-Expression während der NK-Zelldifferenzierung in Bulk Kulturen

2.1.1 Hintergrund und experimenteller Ansatz

Das Augenmerk dieser Arbeit liegt auf der sequentiellen Expression der KIR-Rezeptoren im Verlauf der NK-Zellentwicklung. Es wurde ein *in vitro* Modell verwendet, in dem humane, hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen, die keine linienspezifischen Antigene exprimieren (CD34⁺CD38⁻Lin⁻), zu reifen und funktionsfähigen NK-Zellen ausdifferenziert werden konnten. Ziel der Untersuchungen war es, zu verschiedenen Differenzierungsphasen der NK-Zellentwicklung Aliquots zu entnehmen und diese hinsichtlich ihrer phänotypischen und genotypischen KIR-Expression zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Zellen aus der *in vitro* Kultivierung zu bestimmten Zeitpunkten entnommen und mittels RT-PCR und Durchflusszytometrie analysiert, so dass der Status jedes einzelnen Rezeptors überprüft werden konnte. Erstes Ziel war es ein robustes und reproduzierbares *in vitro* System zu etablieren, in dem man primäre humane hämatopoetische Vorläuferzellen zu NK-Zellen ausdifferenzieren konnte. Dazu wurden etablierte und wissenschaftlich anerkannte *in vitro* Systeme entsprechend der Fragestellung adaptiert.

Bereits im Jahr 2001 konnte gezeigt werden, dass eine erfolgreiche NK-Zelldifferenzierung mittels Kokultur auf AFT024, einer murinen, fetalen Leberzelllinie und definierten Zytokin-Cocktails durchgeführt werden konnte. In Abwesenheit der Lymphozyten-stimulierenden Zytokine (IL-1, IL-15, IL-7) oder bei Verhinderung des direkten Zellkontakts mit AFT024, waren die NK-Zellabkömmlinge negativ für KIR- und CD94-Rezeptoren (Miller and McCullar, 2001). Da AFT024 für optimale Kulturbedingungen der hämatopoetischen Vorläuferzellen verantwortlich ist und im Vergleich zu anderen humanen und murinen Feederzelllinien wesentlich bessere Ergebnisse für den Erhalt und die Differenzierung der Progenitoren liefert (Moore et al., 1997; Nolta et al., 2002; Punzel et al., 2002), wurde sie auch in dieser Arbeit zur Erhaltung und Differenzierung der NK-Zellen verwendet.

2.1.2 Bestimmung und Aufreinigung der CD34-positiven Progenitor-Population

In einigen Publikationen wurde die CD34⁺CD38⁻Lin⁻-Zelle als lymphoide Vorläuferzelle charakterisiert (Fleming et al., 1993; Krause et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, dass die humane CD34⁺CD38⁻Lin⁻-Progenitorzelle in der Lage ist, NK-Zellen, B-Zellen, T-Zellen, Dendritische Zellen und myeloide Zellen hervorzubringen (Lotzova and Savary, 1993; Miller et al., 1994; Miller et al., 1999; Punzel et al., 1999c). Aufgrund dieser Vorarbeiten wurden in dieser Arbeit die Experimente der NK-Zellgenerierung ebenfalls mit oben genannter Population durchgeführt. Um die CD34-positiven Vorläuferzellen zu isolieren, wurden zunächst die mononukleären Zellen (MNCs) aus dem Blut isoliert, mit ferromagnetischen CD34-Antikörpern konjugiert und anschließend aufgereinigt (5.1.9). Die angereicherten CD34⁺-Zellen wurden einer Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern unterzogen:

Tabelle 2-1 Verwendete Antikörper für die Isolation der angereicherten CD34-Progenitorzellen. *Der Lineage-Cocktail (Lin) beinhaltet mehrere Antikörper in Kombination: CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 und CD56.

Antikörper	Lin*	CD38	CD34
Fluoreszenz	FITC	PE	PECy5

Die Zielpopulation für die weitere Arbeit wurde anschließend mit einer Reinheit von 99,9 % durchflusszytometrisch isoliert:

CD34⁺CD38⁻Lin⁻

Diese Population war positiv für den CD34-Marker, der spezifisch für die hämatopoetische Stammzelle ist, aber negativ für CD38 und für sämtliche lymphoide Marker (Lin⁻) wie sie auf NK-, T- und B-Zellen zu finden sind. Für die Generierung der NK-Zellen wurde die CD34⁺CD38⁻Lin⁻-Population in den Kulturplatten auf die AFT024-Feederzellen abgelegt und kultiviert (5.1.13).

Stellvertretend für sämtliche Nabelschnurblute, Apheresate und Knochenmarke ist in Abbildung 2.1 ein durchflusszytometrisches Isolierungsprotokoll (Sortierungsprotokoll) dargestellt. Alle Zellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind unter den gleichen Bedingungen aufgereinigt und sortiert worden.

In der Abbildung sind alle Sortierungs- und Isolierungsstrategien (Dotplots) dargestellt, die für den Sortierungsfortgang wichtig waren. Die einzelnen Fenster (Gates), welche speziell für die zu sortierende Population gesetzt werden mussten, um eine Abgrenzung zu den restlichen, nicht gewünschten Zellen zu bekommen, sind in den Dotplots A, B und C dargestellt. In Dotplot D ist die isolierte Zielpopulation ($CD34^+CD38^-Lin^-$) zu sehen, nachdem eine Nachsortierung durchgeführt wurde. Hierbei wurde die Zielpopulation nach bereits erfolgter Aufreinigung nochmals durchflusszytometrisch analysiert, um die Reinheit zu überprüfen.

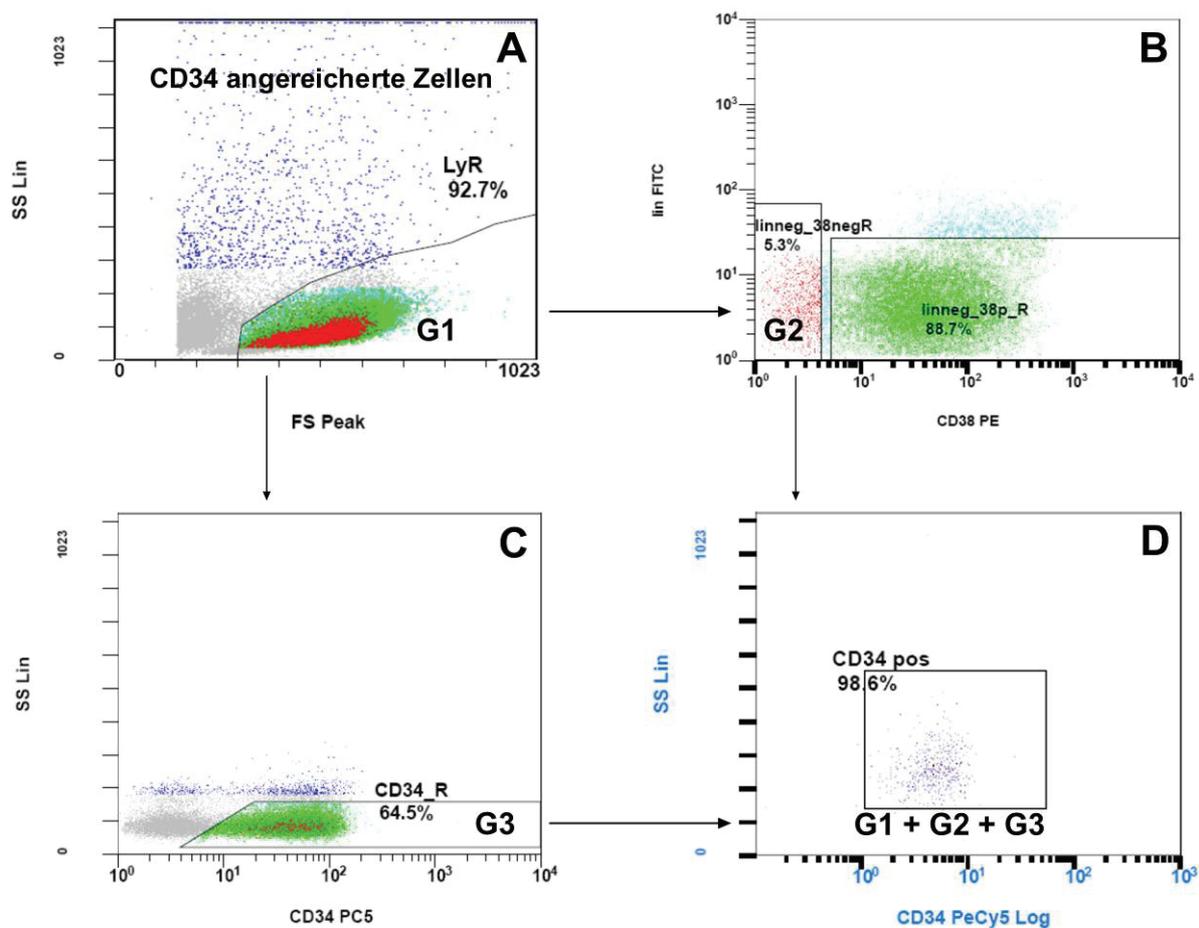


Abbildung 2.1 In dieser Abbildung ist das Sortierungsprotokoll dargestellt, welches zur Isolierung der undifferenzierten, hämatopoetischen Progenitorzellen ($CD34^+CD38^-Lin^-$) verwendet wurde. Die Beschriftung der einzelnen Achsen ist an den Dotplots wiederzufinden. Die Zielpopulation ist in (D) dargestellt und ergibt sich durch das Eingrenzen definierter Zellpopulationen. In (A) sind die mittels magnetischer Separation angereicherten CD34-Zellen dargestellt. Die lymphatische Population ist durch das Fenster (Gate) G1 eingegrenzt. (B) Darstellung der Zellmarker CD38 und Lin, wobei sich dieser Dotplot nur auf die lymphatische Population aus G1 bezieht. (C) Darstellung der CD34-Zellen im Sidescatter, auch auf die Lymphozyten in G1 bezogen. Durch das Setzen der Gates für die gewünschte Zellpopulationen in den einzelnen Dotplots kann man die Zielpopulation ($CD34^+CD38^-Lin^-$) genau definieren: G1+G2+G3.

2.1.3 Vorarbeiten für die Differenzierung von NK-Zellen aus humanen, hämatopoetischen Progenitorzellen

2.1.3.1 NK-Zelldifferenzierung aus Progenitoren unterschiedlicher Herkunft

Zu Beginn dieser Arbeit wurden Experimente durchgeführt, um die Möglichkeiten der NK-Zellgenerierung aus undifferenzierten CD34-positiven Vorläuferzellen unterschiedlicher Herkunft zu verifizieren. Dazu wurde die Zielpopulation, wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, aus Knochenmark (Bone Marrow, BM), aus Apheresat (Aph) und aus Nabelschnurblut (Cord Blood, CB) isoliert und anschließend in Kultur genommen. Die Zellen wurden für mehrere Wochen kultiviert und abschließend mit diversen NK-zellspezifischen Antikörpern (Tabelle 2-2) markiert und phänotypisch analysiert.

Tabelle 2-2 Übersicht und Definition der verwendeten Antikörper für die durchflusszytometrischen Endpunktanalysen

Antikörper	Definition
CD56	NK-Zellmarker
CD34	spezifisch für hämatopoetische Vorläuferzellen
NKB1	KIR3DL1
NKAT2	KIR2DL2/3, KIR2DS2
CD158a	KIR2DL1, KIR2DS1
CD158i	KIR2DS4
NKp30	NCR (natural cytotoxicity receptor) 30
NKp44	NCR (natural cytotoxicity receptor) 44
NKp46	NCR (natural cytotoxicity receptor) 46
NKG2A	inhibitorischer Rezeptor, spezifisch für HLA-E
CD94	inhibitorischer Rezeptor

Initial wurden isolierte CD34⁺CD38⁻Lin⁻-Zellen (d0) aus Nabelschnurblut (CB) durchflusszytometrisch auf NK-zellspezifische Marker und Rezeptoren untersucht. Mit Ausnahme des CD34-Rezeptors, der spezifisch für hämatopoetische Progenitorzellen ist, waren alle NK-zellspezifischen Marker phänotypisch nicht zu detektieren (Abbildung 2.2). Sowohl für die KIR- als auch für die NKp-Rezeptoren wurden Antikörpermische verwendet.

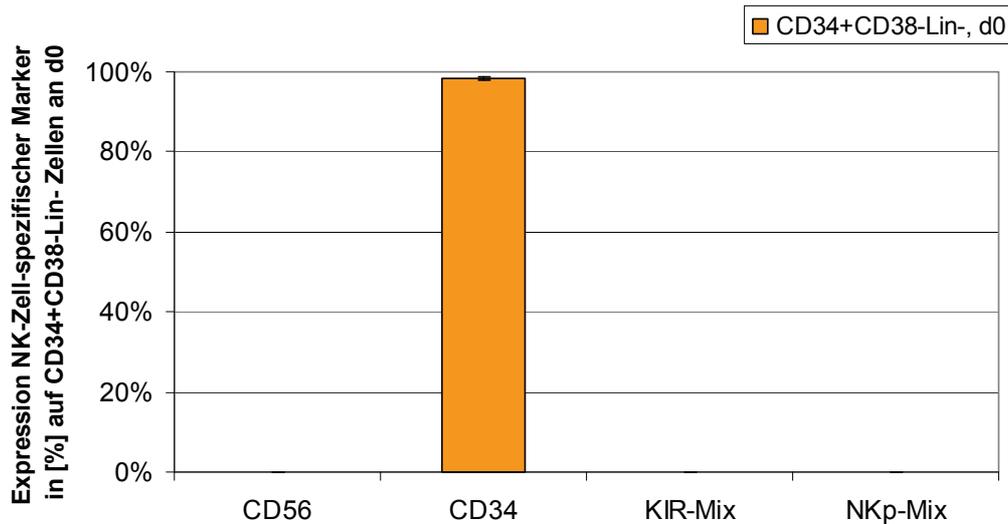


Abbildung 2.2 Graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Analysen zur Ausprägung NK-zellspezifischer Rezeptoren auf der Zelloberfläche der $CD34^+CD38^-Lin^-$ -Population an d0.

In Abbildung 2.3 ist die Expression verschiedener NK-Zellrezeptoren nach der Differenzierung der NK-Zellen aus Progenitoren unterschiedlicher Herkunft, wie Aph, BM und CB, dargestellt. Bei den *in vitro* generierten NK-Zellen aus CD34-positiven Progenitorzellen des Nabelschnurblutes, liegt die Expression der KIRs bei ca. 10 %, während im Apheresat nur NKAT2 ein positives Ergebnis liefert, das bei lediglich 1,5 % liegt. Die aus Knochenmark-Vorläuferzellen differenzierten NK-Zellen zeigen ähnliche Resultate: NKAT2 konnte nur mit 1,5 % und CD158i mit 1 % auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

Auch alle übrigen NK-zellspezifischen Rezeptoren, wie NKp30, 44 und 46, NKG2A, CD94 und CD56 werden auf NK-Zellen aus CB wesentlich stärker exprimiert als auf solchen aus Apheresat und Knochenmark. Um einen direkten Vergleich der NK-Zellentwicklung aus den unterschiedlichen Blutquellen der Progenitorzellen zu haben, sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen in Abbildung 2.3 zusammengefasst.

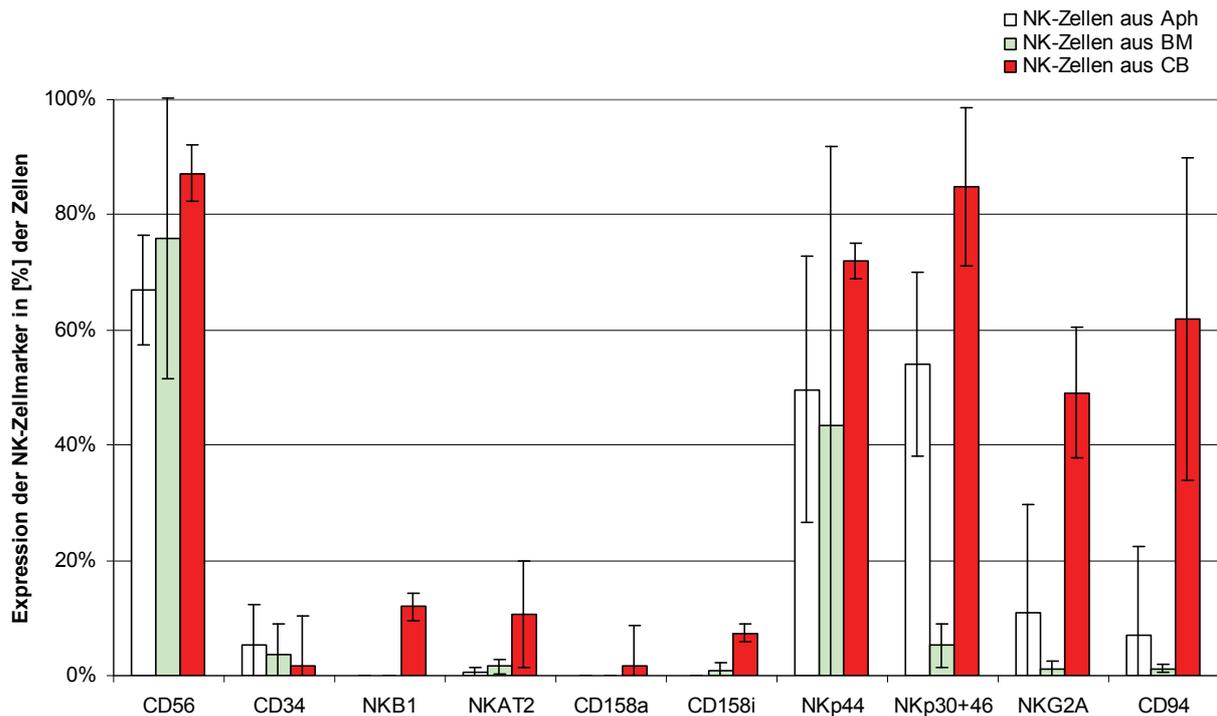


Abbildung 2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Endpunktanalysen von NK-zelltypischen Rezeptoren. Die Messungen wurden an NK-Zellen durchgeführt, die aus CD34-positiven Vorläuferzellen unterschiedlicher Herkunft stammen. Zu sehen ist die graphische Darstellung der Expression verschiedener NK-Zellrezeptoren nach mehrwöchiger Kultivierung. In dem Diagramm sind die Mittelwerte (n=6) mit den entsprechenden Standardabweichungen dargestellt. Die verwendeten Antikörper sind auf der x-Achse vermerkt.

Aus Abbildung 2.3 geht deutlich hervor, dass das Differenzierungspotenzial der CD34⁺-Progenitorzellen je nach Herkunft sehr unterschiedlich ist. Alle Versuchsansätze wurden unter kongruenten Bedingungen durchgeführt und die Zielzellen sind anhand desselben Sortierprotokolls isoliert worden. Die aus Nabelschnurblut generierten NK-Zellen (rot) zeigen eine wesentlich höhere Expression der KIR-Rezeptoren sowie der NKps, NKG2A und CD94, im Vergleich zu denen aus BM und Aph. Auch die generelle Effizienz der NK-Zellgenerierung bei den aus CB stammenden Vorläuferzellen ist generell um ca. 10 % erhöht. Speziell der Expressionsgrad der KIR-Rezeptoren bei den NK-Zellen aus CB fällt im Vergleich zu den generierten NK-Zellen aus Apheresat und BM wesentlich besser aus, wobei unter den verwendeten Bedingungen die Vorläuferzellen aus dem BM die schlechtesten Ergebnisse lieferten. Aufgrund der Resultate dieser Vorarbeiten wurde entschieden, dass für zukünftige Experimente nur Zellmaterial aus Nabelschnurblut verwendet werden sollte, da dieses die optimale Quelle darstellt.

2.1.3.2 Vorarbeiten: Unterschiede der NK-Zellentwicklung bei Zugabe von IL-21

Zu Beginn dieser Arbeit galt es nicht nur, die optimale Quelle für lymphatische Vorläuferzellen zu finden, sondern es musste auch untersucht werden, unter welchen Kulturbedingungen sich NK-Zellen am besten generieren lassen. Verwendet wurden dafür spezielle NK-Zellmedien mit diversen Zytokinen (4.3.1).

Aufgrund einiger Publikationen, in denen die positive Wirkung von Interleukin-21 auf die Entwicklung von NK- und anderen Lymphozytenzellen gezeigt werden konnte (Collins et al., 2003; Mehta et al., 2004; Parrish-Novak et al., 2000; Parrish-Novak et al., 2002), wurden auch in dieser Arbeit Versuchsansätze mit IL-21 durchgeführt, um eine bestmögliche NK-Zelldifferenzierung zu gewährleisten. Dabei wurde dem NK-Zelldifferenzierungsmedium, welches bereits mit diversen Zytokinen versetzt war, noch Interleukin-21 hinzugefügt. Für die Experimente wurden Nabelschnurblute aufgereinigt und in separaten Platten unterschiedlichen Kulturbedingungen (\pm IL-21) ausgesetzt. Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analysen ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

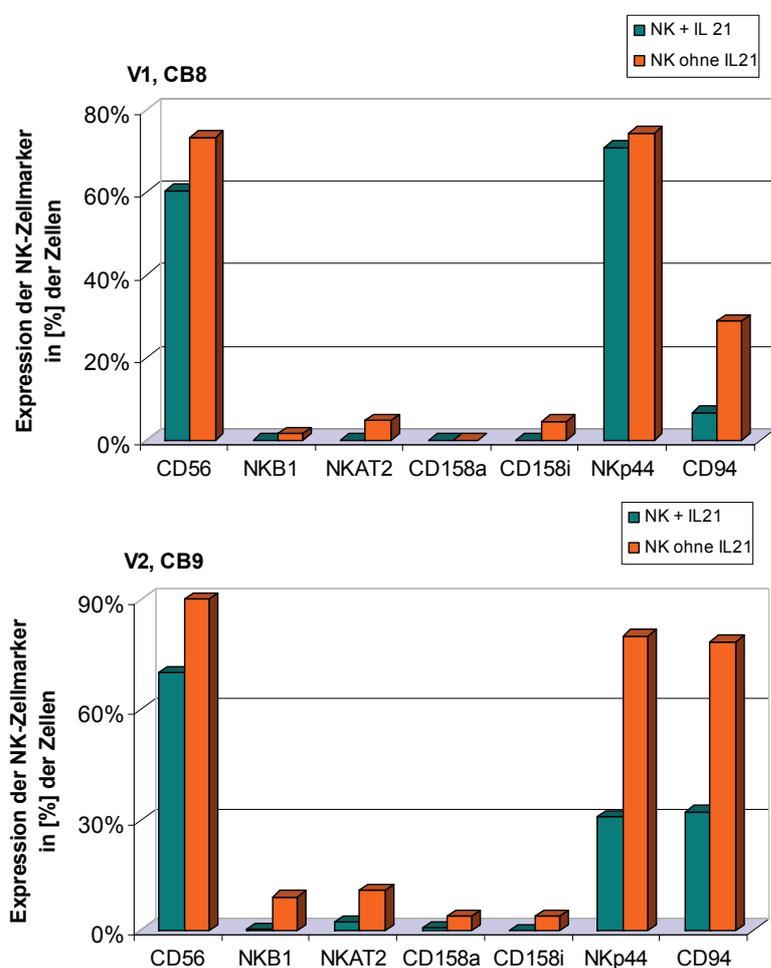


Abbildung 2.4 Graphische Darstellung der Wirkung von IL-21 auf die Entwicklung und Differenzierung von NK-Zellen und deren MHC-Klasse-I-spezifischen Rezeptoren. V1 = Versuch 1 mit CB8 und V2 = Versuch 2 mit CB9. Die Zellen wurden nach 19 Tagen (V1) bzw. 27 Tagen (V2) aus der Kultur entnommen, mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert und anschließend analysiert.

Im Gegensatz zu den publizierten Daten konnte mit diesen Versuchsansätzen nachgewiesen werden, dass ohne die Zugabe von IL-21 prozentual mehr NK-Zellen generiert werden konnten. Auch die Rezeptoren, die für zytotoxisch aktive und reife NK-Zellen stehen (KIR und NKp), sind bei den NK-Zellen ohne IL-21 deutlich stärker exprimiert, als in der mit IL-21 behandelten Population. Die Resultate dieses Experiments zeigen, dass die Zugabe von IL-21 keine signifikante Verbesserung bringt.

2.1.4 Darstellung und Übersicht der Experimente

Für die Verifizierung der KIR-Expression im Rahmen der NK-Zelldifferenzierung wurden im Anschluss an die Vorarbeiten diverse Nabelschnurblute verwendet, von denen 15 für die molekularbiologische Auswertung in Frage kamen. Bei elf CBs wurde eine Mischung von CD34⁺CD38⁻Lin⁻ hämatopoetischen Progenitoren angereichert (Bulk-Experimente, 5.1.13). Drei dieser Nabelschnurblute wurden parallel auch als Einzelzellablagen (5.1.15) angesetzt, anhand derer die Sequenz der KIR-Expression auf klonaler Ebene beobachtet werden konnte. Weiterhin wurden fünf CBs hinsichtlich der Expression epigenetischer Faktoren mittels Real-Time-PCR (Micro Fluidic Card) untersucht und weitere drei sind mit demethylierenden (AZA) und chromatin-“öffnenden“ Stimulanzen (TSA-Histondeacetylasehemmer) behandelt worden. Tabelle 2-3 gibt einen Überblick über die einzelnen Nabelschnurproben und die damit verbundenen Experimente.

Tabelle 2-3 Überblick über die verwendeten Nabelschnurblute und die damit verbundenen Experimente

CB	BULK FACS	BULK RT-PCR	EZ-Ablage RT-PCR	AZA RT-PCR	Micro Fluidic Card
1	+	+			
6	+	+			
7	+	+			
8	+	+			+
9					
10		+	+		+
13				+	
14		+	+		
15		+	+		+
16				+	
21				+	
23	+	+			+
24	+	+			
25	+	+			
26	+	+			+

2.1.5 Immungenetische Analysen der einzelnen Nabelschnurblute

Die immungenetischen Analysen wurden durchgeführt, weil der KIR-Lokus sehr polymorph ist und je nach Individuum der KIR-Genotyp stark variiert, so dass nur bestimmte KIR-Gene im Genom enthalten sind. Die HLA-Klasse-I-Moleküle zeichnen sich durch eine Vielzahl von allelischen Variationen aus, die ebenfalls individuell unterschiedlich vorhanden sind. In Tabelle 2-4 sind die Ergebnisse der KIR- und HLA-Typisierungen der verwendeten Nabelschnurblute dargestellt. Die KIR-Genotypen sind beschrieben und farblich gekennzeichnet.

Tabelle 2-4 In der Tabelle sind die Ergebnisse der HLA-B- und -C-Typisierungen, sowie der KIR-Typisierungen aufgelistet. Grün bedeutet positiv für das entsprechende KIR-Gen und weiß bedeutet negativ.

CB	HLA B	HLA C	KIR-Genotyp	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	3DL1	3DL2	3DL3	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1
1	Bw4/Bw4	C1/C2	1	■		■	■		■	■	■				■		
6	Bw4/Bw6	C1/C1	20	■		■	■		■	■	■	■			■		
7	Bw4/Bw6	C1/C1	1	■		■	■		■	■	■				■		
8	Bw4/Bw6	C1/C2	7	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■
10	Bw4/Bw6	C1/C1	1	■		■	■		■	■	■				■		
13	-	-	17	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
14	Bw4/Bw4	C1/C1	5	■	■		■	■	■	■	■			■	■		
15	Bw6/Bw6	C2/C2	7	■	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■		■
16	Bw4/Bw4	C1/C2	2	■		■	■		■	■	■		■		■		
21	Bw4/Bw6	C1/C2	7	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■
23	Bw4/Bw6	C1/C1	1	■		■	■		■	■	■				■		
24	Bw6/Bw6	C1/C1	2	■	■	■	■		■	■	■		■		■		
25	Bw4/Bw6	C1/C1	2	■	■	■	■		■	■	■		■		■		
26	Bw4/Bw6	C1/C2	1	■		■	■		■	■	■				■		

Die KIR- und HLA-Typisierungen dienen der Überprüfung der Ergebnisse der KIR-Expression. Mit den Daten aus Tabelle 2-4 konnte verglichen werden, ob sich die transkribierten KIR-Rezeptoren ggf. vom KIR-Genotyp (Uhrberg et al., 2002) unterscheiden. Des Weiteren konnten anhand der HLA-C- und B-Typisierungen Aussagen getroffen werden, ob der Ligand Auswirkungen auf die Expression des entsprechenden KIR-Rezeptors hat. Da jedoch nicht für alle KIR-Rezeptoren die entsprechenden Liganden bekannt sind, lassen sich nicht zu jedem KIR-Rezeptor Aussagen dazu treffen. Eine HLA-B und C-Typisierung für das CB13 konnte nicht durchgeführt werden.

2.1.6 Morphologische Veränderung während der NK-Zelldifferenzierung

Anhand der Morphologie der Zellen konnte auf den Status der Differenzierung geschlossen werden. Der genaue Differenzierungsverlauf und „Beginn“ einer *in vitro* Kultivierung konnte nicht genau bestimmt werden, aber die ersten Proliferationsinseln wurden in der Regel zwischen d7 und d14 sichtbar. Bei den Proliferationsinseln handelt es sich um Progenitorzellen, die pflastersteinartige Inseln ausbilden, und man geht davon aus, dass eine solche Inselformation aus einer einzelnen Progenitorzelle hervorgeht. Da es sich bei der NK-Zelldifferenzierung um einen mehrwöchigen Verlauf handelt, konnten keine Migrationsaufnahmen gemacht werden. Aber aufgrund von Beobachtungen ist davon auszugehen, dass die einzelnen Zellen einer Proliferationsinsel in verschiedene Richtungen migrieren und an einer bevorzugten Stelle zur NK-Zelle heranreifen. Die morphologische Veränderung von der rundlichen Vorläuferzelle zur Komma-ähnlichen NK-Zelle ließ sich mikroskopisch beobachten. Mittels Durchflusszytometrie und RT-PCR mit sequenzspezifischen Primern konnten die morphologischen Beobachtungen auf Expressionsebene bestätigt werden.

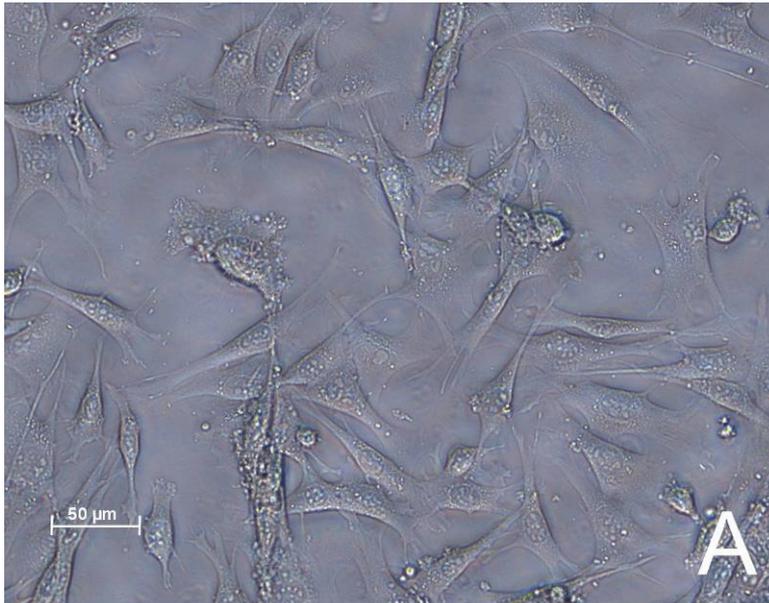
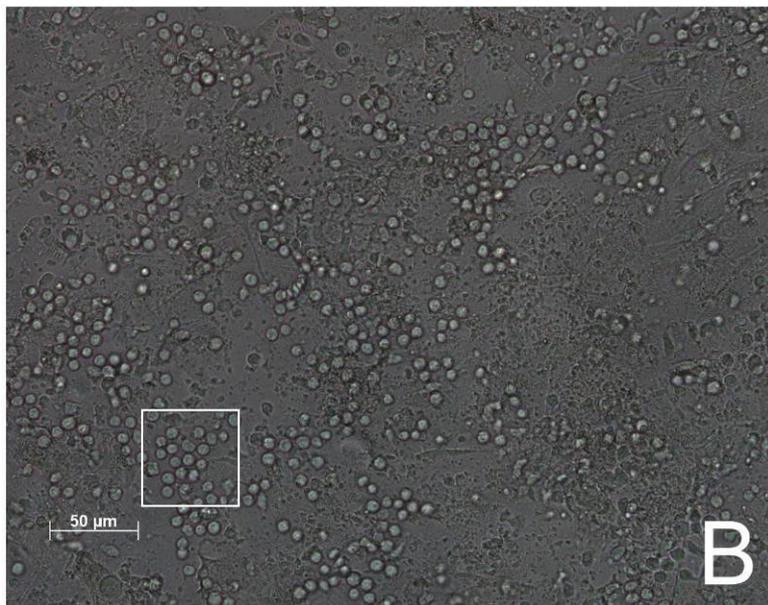
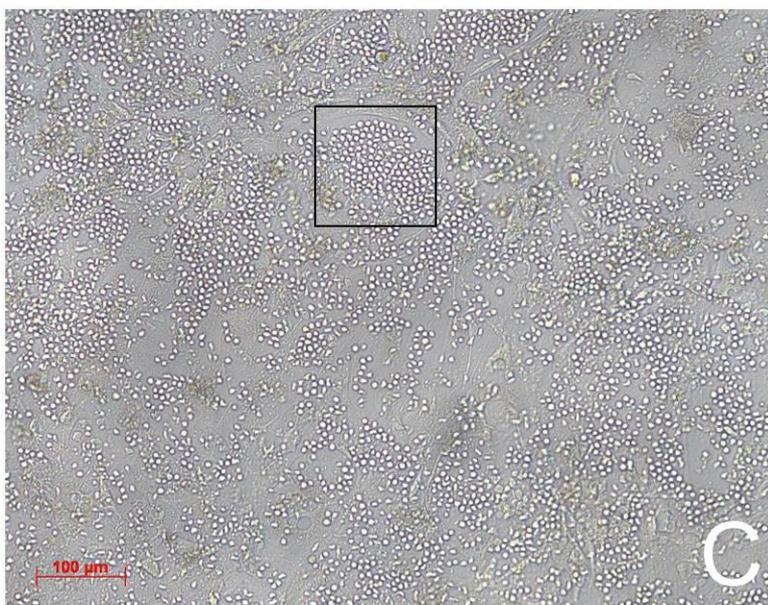


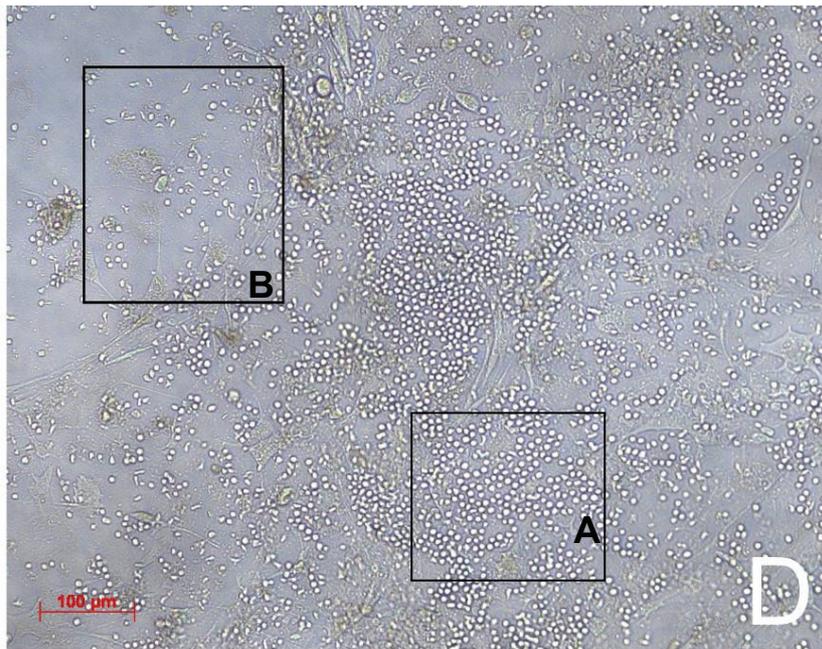
Abbildung 2.5 (A)
Mikroskopische Aufnahme an d0 einer NK-Zelldifferenzierung. Zu diesem Zeitpunkt erkennt man jedoch nur die AFT024-Zelllinie, die als unterstützender Zellrasen (Feeder) für die Differenzierung der NK-Zellen aus den CD34⁺ Vorläuferzellen fungierten. 20 x vergrößert.



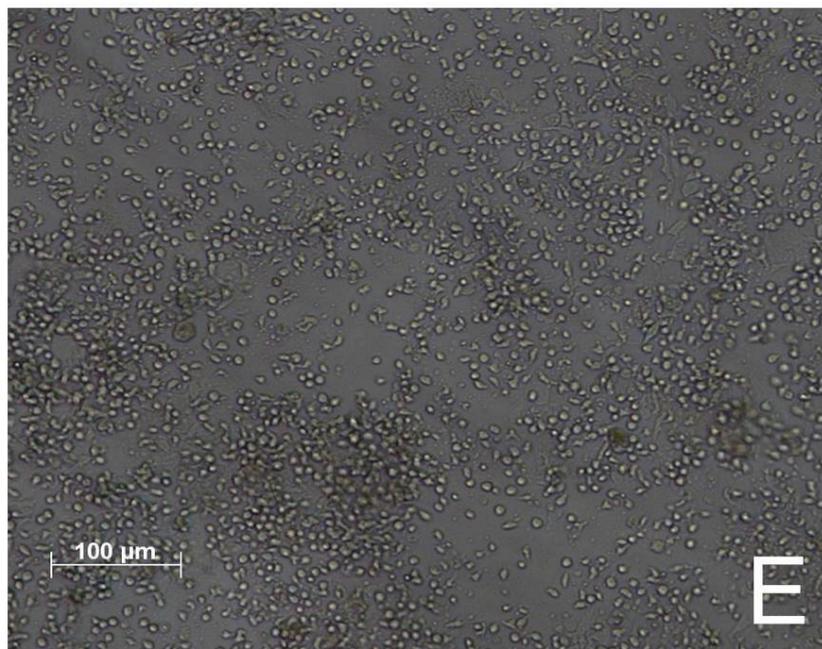
(B) Mikroskopische Aufnahme an d15. Der Zeitpunkt der Differenzierung ist bereits fortgeschritten, und man erkennt viele Proliferationsinseln (s. Umrandung), welche üblicherweise bereits nach etwa einer Woche der Differenzierung zu beobachten sind. Die veränderte Struktur der Feederzellen (AFT024) ist im Hintergrund zu erkennen. 20x vergrößert.



(C) Mikroskopische Aufnahme an d21. Zu erkennen sind immer noch große Proliferationsinseln (s. Umrandung). Auch die fibroblastenähnliche Feederzelllinie AFT024 ist im Hintergrund noch zu sehen. 10x vergrößert.



(D) Mikroskopische Aufnahme eines CB an d21. Es wurde eine andere Stelle der *in vitro* Kultivierung abgebildet. Man erkennt zum einen noch einige Proliferationsinseln (A) und zum anderen die ersten NK-Zellen, die sich aus solchen Formationen herauslösen und eine andere, Komma-ähnliche Form annehmen (B).
10x vergrößert



(E) Mikroskopische Aufnahme eines CB an d28. Zum Ende der Differenzierung erkennt man eine Vielzahl an Komma-ähnlichen, länglichen Zellen, bei denen es sich um ausdifferenzierte NK-Zellen handelt. Die pflastersteinartigen Formationen sowie die Feederzellen sind nicht mehr vorhanden.
20x vergrößert.

2.1.7 Phänotypische Untersuchung NK-zellspezifischer Oberflächenmarker während der NK-Zelldifferenzierung aus Nabelschnurblut

Unter optimalen Kulturbedingungen konnte im Lauf der Ausbildung von NK-Zellen aus CD34⁺-Vorläuferzellen gezeigt werden, dass es sich phänotypisch um NK-Zellen handelt, da spezifische NK-Zellmarker (CD56 und KIR-Rezeptoren) nachgewiesen werden konnten (2.1.3). Um den im Verlauf der NK-Zelldifferenzierung stattfindenden Erwerb von KIR-Rezeptoren detailliert dokumentieren zu können, wurde während der Differenzierungsphase zu definierten Zeitpunkten Zellmaterial entnommen und anschließend mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert. In den folgenden Abbildungen sind durchflusszytometrische Analysen beispielhaft dargestellt. In Abbildung 2.6 ist zunächst eine Färbung mit dem NK-zellspezifischen Antikörper CD56 (NCAM, neural cell adhesion molecule) und dem CD34-Marker, der für Vorläuferzellen spezifisch ist, dargestellt. Dabei sollte im Verlauf der Ausdifferenzierung die Veränderung von CD34 nach CD56 untersucht und demonstriert werden (5.1.10).

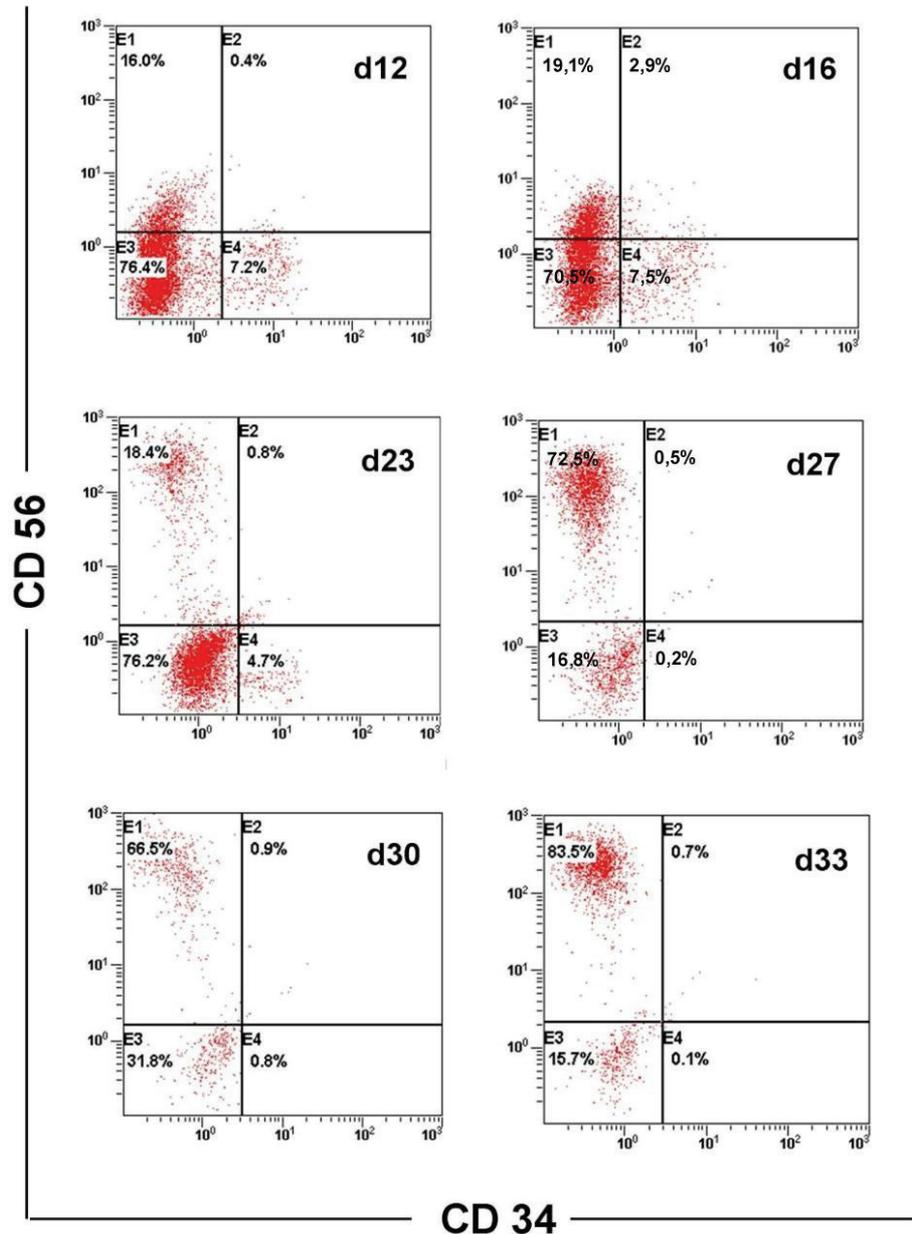


Abbildung 2.6 Beispielhafte Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse eines CB. Die Proben sind jeweils mit CD56 (PECy5) und CD34 (FITC) fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert. Bei den Proben handelt es sich um Zellaliquots, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultur entnommen worden sind.

Zwölf Tage nach Kultivierungsbeginn sieht man eine Zellpopulation, die CD34 exprimiert (7,2 %), jedoch sind bereits die ersten CD56-positiven Zellen zu erkennen. Dabei handelt es sich um eine unstrukturierte Population, die sich langsam aus der negativen Zellpopulation (d12, E3) heraus löst. Die große Menge der negativen Zellpopulation ergibt sich aus der Kokultur mit AFT024, welche die untersuchten Marker nicht auf der Oberfläche tragen. An Tag 16 ändert sich die Situation kaum, aber an Tag 23 sieht man eine Abnahme der CD34-positiven Population (4,7 %), während die Population der NK-Zellen deutlich größer wird und die ersten CD56^{bright}-Zellen zu erkennen sind. An Tag 27 sind keine CD34-positiven Zellen

mehr zu detektieren und die Differenzierung der NK-Zellen scheint abgeschlossen. Man erkennt eine klar definierte CD56^{bright}-Population (d27, E1). Das Bild, welches man an d27 anhand der durchflusszytometrischen Messungen erhält, bleibt auch an den folgenden Tagen der Kultivierung (d30 und d33) gleich. Im zeitlichen Verlauf der NK-Zelldifferenzierung wurde das Zellmaterial auch hinsichtlich der Expression der KIR-Rezeptoren untersucht. In Abbildung 2.7 ist exemplarisch eine Färbung mit CD56-Antikörpern und einem Mix aus verschiedenen KIR-Antikörpern dargestellt, um den Erwerb der NK-zelltypischen Marker der *in vitro* differenzierten NK-Zellen nachweisen zu können.

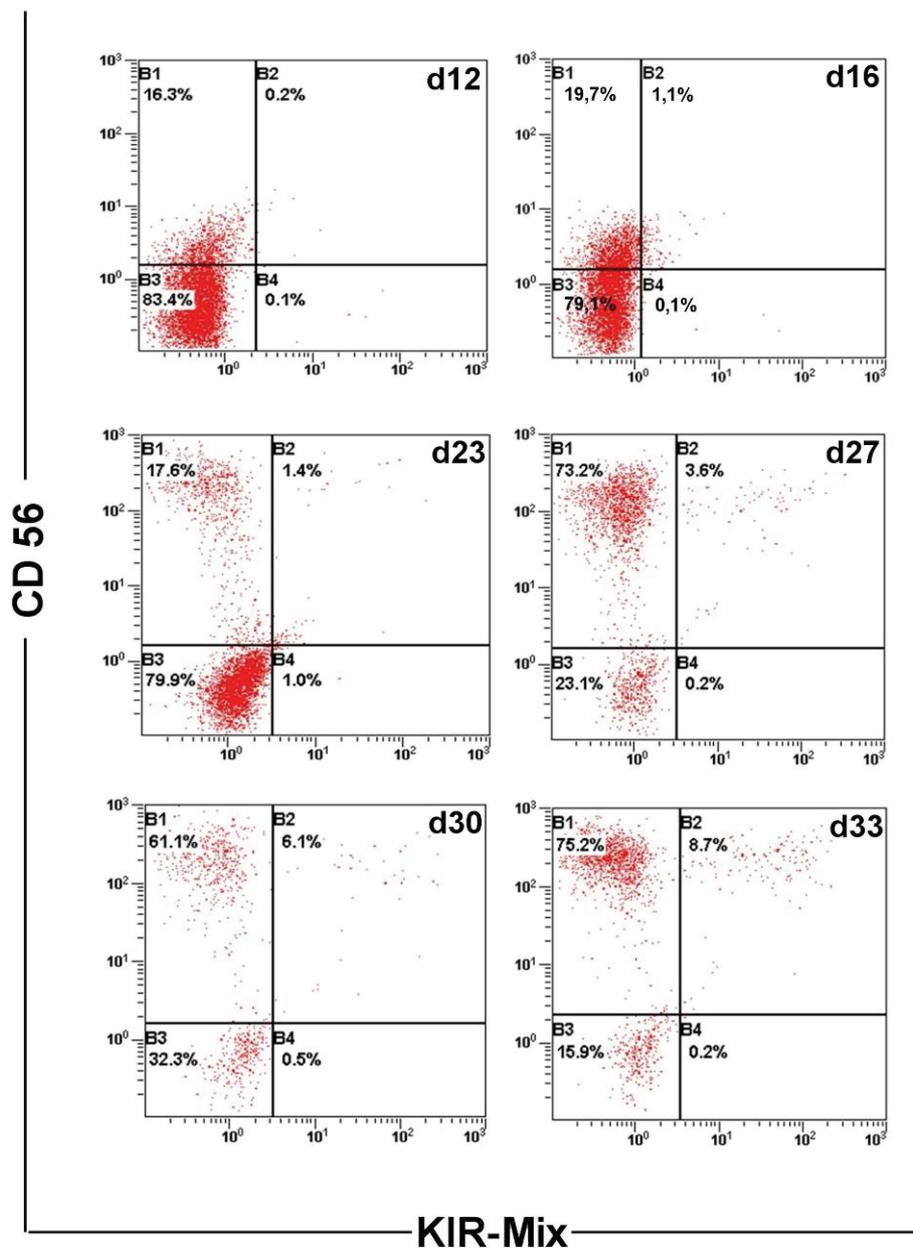


Abbildung 2.7 Beispielhafte Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse eines CB. Die Proben waren jeweils mit CD56 (PECy5) und einem Mix von KIR-AK (PE) markiert. Es handelt sich um Zellen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung entnommen worden sind.

In Abbildung 2.7 lassen sich die ersten KIR-Rezeptoren an d23 detektieren, was mit dem Verlust des CD34-Markers einhergeht (Abbildung 2.6). Die Expression der KIR-Rezeptoren wurde nur auf solchen Zellen detektiert, die bereits den NK-Zellmarker CD56 exprimierten. Die Population der NK-Zellen, die KIR-Rezeptoren auf der Zelloberfläche exprimieren, nimmt zum Ende der Kultivierung zu, was auch aus Abbildung 2.7 hervorgeht. Die doppelt positiven Zellen ($CD56^+KIR^+$) haben an d30 einen Anteil von 6,1 % und an d33 von 8,7 % der Lymphozyten.

2.1.7.1 Prinzip der NK-Zelldifferenzierung

Zusammenfassend für sämtliche durchflusszytometrischen Messungen ($n=17$), bei denen mit CD34-, CD56- und KIR-Antikörpern gearbeitet wurde, konnte gezeigt werden, dass die CD56 positive NK-Zellpopulation aus den CD34-positiven Vorläuferzellen hervorgegangen sind. Weiterhin lässt sich anhand der Versuche zeigen, dass Zellen generiert werden konnten, die Marker und Rezeptoren tragen, welche charakteristisch für funktionale und reife NK-Zellen sind. Dabei handelt es sich um KIR- und andere NK-zellspezifische Rezeptoren, wie CD94, NKG2A etc. (Kapitel 2.1.3). Schematisch lässt sich das Prinzip der NK-Zelldifferenzierung aus $CD34^+CD38^-Lin^-$ -Progenitorzellen aus Nabelschnurblut, wie in Abbildung 2.8 dargestellt, beschreiben. Diese Darstellung ergibt sich aus diversen durchflusszytometrischen Analysen unterschiedlicher Nabelschnurblute.

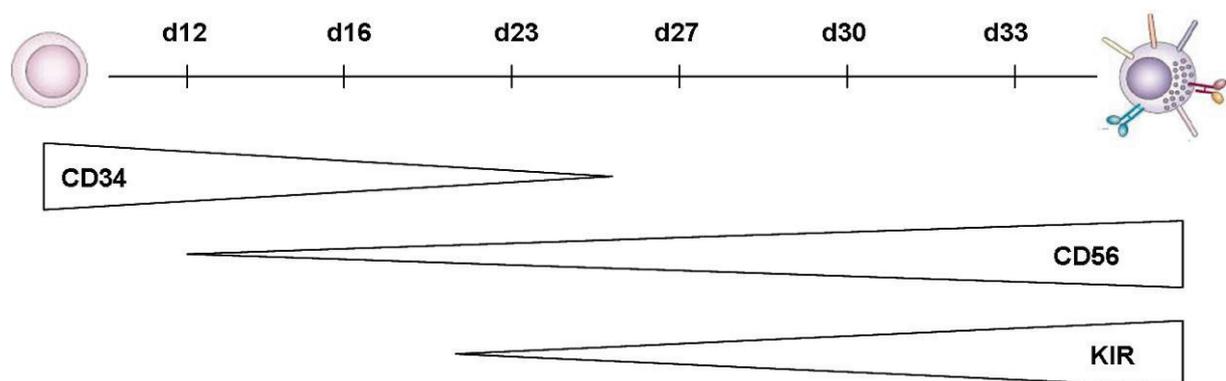


Abbildung 2.8 Schematische Darstellung durchflusszytometrischer Messungen der zeitlichen NK-Zelldifferenzierung und KIR-Expression aus undifferenzierten $CD34^+$ -Vorläuferzellen.

2.1.8 Optimierung der RT-PCRs mit spezifischen KIR-Gensonden

Eine der Kernaufgaben dieser Doktorarbeit bestand darin, im Verlauf der NK-Zelldifferenzierung aus CD34-positiven hämatopoetischen Vorläuferzellen Zellaliquots hinsichtlich des KIR-Status auf RNA-Ebene zu untersuchen. Von Interesse war hierbei, zu welchen Zeitpunkten die KIR-Rezeptoren transkribiert wurden. Da es sich bei diesen Versuchen auch um eine Kokultur mit der murinen Feederzelllinie AFT024 handelte, musste zunächst geklärt werden, ob die verwendeten Primer eventuell auch spezifische Produkte mit dieser Zelllinie produzieren würden. Das Ergebnis dieser Negativkontrollen ist in Abbildung 2.9 dargestellt.

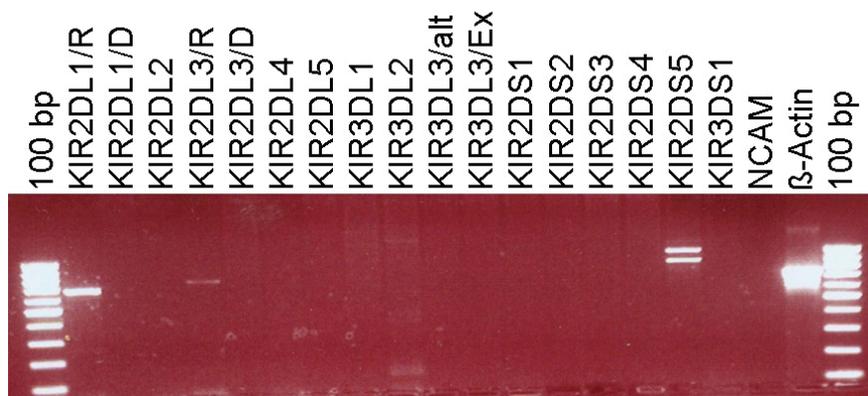


Abbildung 2.9 In der Abbildung ist das Ergebnis einer RT-PCR mit der Feederzelllinie AFT024 und den entsprechenden KIR-Primern zu sehen. Die Beschreibung der einzelnen Spuren ist der Abbildung zu entnehmen und die dazu gehörigen Fragmentlängen finden sich in Kapitel 4.6.1. R=RNA-Template, D=DNA-Template, alt=alte Sequenzen, Ex=Sequenzen liegen in Exon 4 bzw. 5.

Die Resultate der RT-PCR-Reaktionen mit der murinen Feederzelllinie AFT024 und den humanen KIR-Primern sollte keine Banden liefern. Tatsächlich sind aber in einigen Spuren deutliche PCR-Produkte zu erkennen. Mit den Primern KIR2DL1/R, KIR2DL3/R und KIR2DS5 sind unspezifische Banden amplifiziert worden, welche eine Länge von etwa 0,7 - 1,0 kb aufweisen. Die PCR-Fragmente der KIR-Primer mit einem RNA-Template sollten im humanen System eine Länge von 356, 352, bzw. 416 bp ergeben (s. Tabelle 4.6). Obwohl die entstandenen Banden mit der RNA der AFT024 Zelllinie zwar unspezifisch waren, wurden für die Gene 2DL1 und 2DL3 im Nachhinein nur noch die Primer für DNA-Template (2DL1/D und 2DL3/D) verwendet, weil es damit keine unspezifischen Reaktionen gab und ein optisch besseres Ergebnis ohne unspezifische PCR-Fragmente erzielt werden konnte.

Es war möglich die Primer, welche eigentlich für DNA-Templates konzipiert waren, auch für RNA zu verwenden, weil die Gensonden nicht über Exon-Intron Grenzen gelegt waren, sondern sich innerhalb verschiedener Exons erstreckten. Eine eventuelle Kontamination der RNA mit DNA wäre unproblematisch gewesen, da dies zu längeren PCR-Produkten geführt hätte. Die Doppelbande, die mit dem Primer für KIR2DS5 entstanden ist, konnte nach Erneuerung der Oligonukleotide eliminiert werden. Die resultierende Bande mit der Gensonde für die Positivkontrolle β -Aktin lieferte ein spezifisches Produkt bei 734 bp, obwohl dieses Primerpaar für die Amplifikation des humanen β -Aktins konzipiert worden war. Demnach war es sehr wichtig, dass Oligonukleotide verwendet wurden, die negativ für das murine β -Aktin war, damit eine korrekte Aussage über die Qualität der RT-PCR während der NK-Zelldifferenzierung getroffen werden konnte. Es wurden demnach neue human-spezifische β -Aktin-Primer konstruiert und verwendet, deren Sequenz sich in Kapitel 4.6.1 findet.

2.1.9 Analyse der KIR-Transkription im Verlauf der NK-Zelldifferenzierung

Die Transkription der KIR-Gene während der Entwicklung von NK-Zellen aus $CD34^+CD38^-Lin^-$ -Progenitorzellen aus Nabelschnurblut wurde mit den optimierten Gensonden mittels RT-PCR untersucht. Mehrmals pro Woche wurden dafür Zellen aus der *in vitro* Kultur entnommen und hinsichtlich ihrer KIR-Expression auf Transkriptebene analysiert. Bei dem dargestellten Experiment in Abbildung 2.10 handelt es sich um eine NK-Zelldifferenzierung aus Vorläuferzellen des CB14. Vor Kultivierungsbeginn mittels NK-Medium, wurden die $CD34^+CD38^-Lin^-$ -Vorläuferzellen in R-20-Medium synchronisiert und zur Proliferation, nicht aber zur Differenzierung, angeregt.

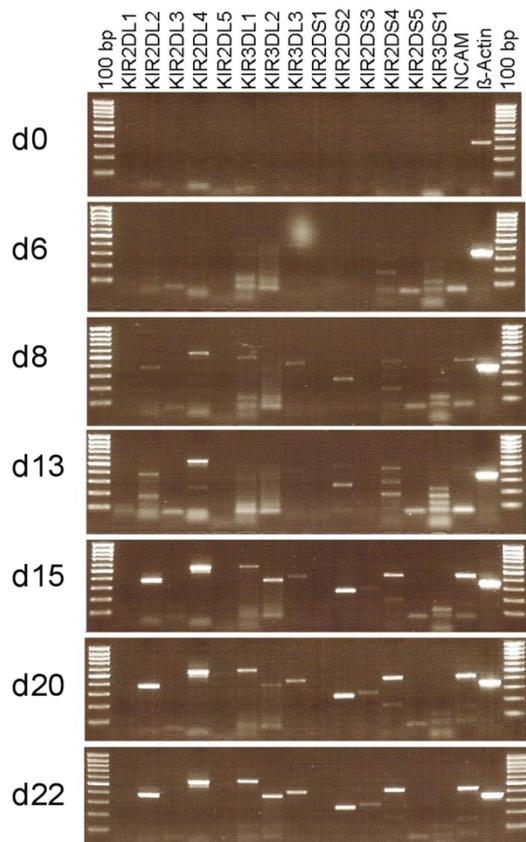


Tabelle 2-5

CB14	Genotyp5	d0	d6	d8	d13	d15	d20	d22
KIR2DL1	+							
KIR2DL2	+			1	2	3	3	3
KIR2DL4	+			2	3	3	3	3
KIR2DL5	+						1	1
KIR3DL1	+					2	2	3
KIR3DL2	+					3	1	3
KIR3DL3	+			1	1	2	2	3
KIR2DS2	+			2	2	3	3	3
KIR2DS3	+					1	1	1
KIR2DS4	+			1	2	3	3	3
NCAM				1	1	3	3	3
β -actin		3	3	3	3	3	3	3

Abbildung 2.10 Gelelektrophorese einer RT-PCR. Die Abbildung zeigt RT-PCRs mit RNA-Proben, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der NK-Zelldifferenzierung (d0-d22) isoliert und mit KIR-Gensonden analysiert wurden. Diese sind für jede Spur in der Abbildung beschrieben. Die CD34⁺-Vorläuferzellen stammen aus dem CB14. In der dazugehörigen **Tabelle 2-5** sind die Ergebnisse der RT-PCRs veranschaulicht. Den PCR-Banden wurden hier farblich hinterlegte Intensitäten von 1-3 zugeteilt, wobei 1=schwach (hellblau), 2=mittel (gelb) und 3=starke (rot) Bande bedeutet. Wie aus Tabelle 2-5 entnommen werden kann, hat der Spender dieses Blutes den KIR-Genotyp 5.

Der Genotyp 5 hat aufgrund seiner genetischen Ausstattung das Potential ein entsprechendes KIR-Muster zu exprimieren, welches Tabelle 2-5 entnommen werden kann. An d0 ist wie zu erwarten außer der Positivkontrolle β -Aktin keine weitere Bande zu sehen. An d6 handelt es sich um unspezifische PCR-Produkte. An d8 erkennt man neben dem NK-zellspezifischen Marker CD56 die ersten spezifischen KIR-Gentranskripte, wobei KIR2DL4 am stärksten exprimiert wird. Fast alle Banden werden an d13 wieder schwächer mit Ausnahme des Rezeptors KIR2DL4, dessen Bandenintensität zunimmt. Das Bild ändert sich an d15, an dem es zur Expression fast aller genotypisch vorhandener KIRs kommt. Dieses Muster ändert sich bis zum Ende der Differenzierung nur noch bezüglich der Bandenintensität, die an d20 zunimmt und an d22 ihr Maximum erreicht. Es wurde noch zu späteren Zeitpunkten der NK-Zelldifferenzierung Zellmaterial entnommen und mittels RT-PCR untersucht, aber die Zeitpunkte nach d22 ergaben keine weiteren Veränderungen (Daten nicht gezeigt).

Der Rezeptor KIR2DL1 wird nicht exprimiert, obwohl der KIR-Genotyp 5 diesen beinhaltet. KIR2DL5 wird sehr schwach exprimiert und ist erst an d20 und d22 zu detektieren. Generell kann man sagen, dass die stärkste Expression für die Gene KIR2DL4, 2DL2 und 2DS2 vorliegt.

In Abbildung 2.11 ist eine weitere beispielhafte Analyse dargestellt und um deren Ergebnisse besser überblicken zu können, wurde eine Tabelle erstellt (Tabelle 2-6).

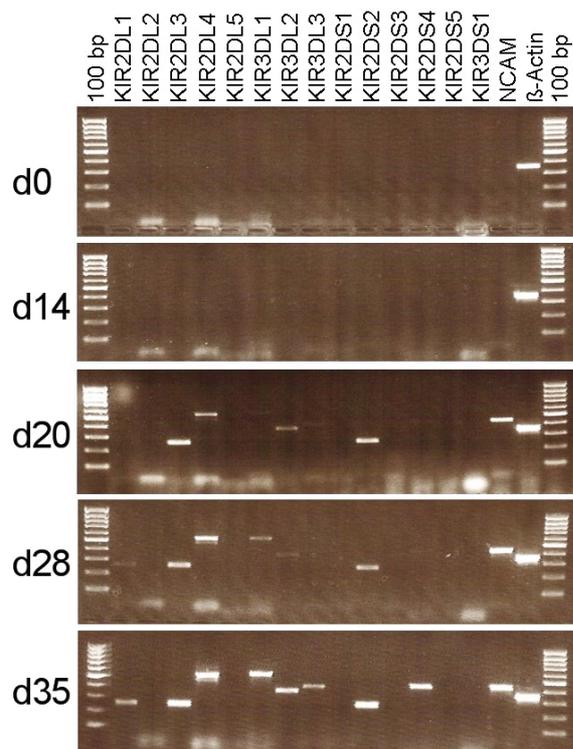


Tabelle 2-6

CB25	Genotyp2	d0	d14	d20	d28	d35
KIR2DL1	+				1	2
KIR2DL2	+					
KIR2DL3	+			3	3	3
KIR2DL4	+			2	3	3
KIR3DL1	+				2	3
KIR3DL2	+			2	1	3
KIR3DL3	+					2
KIR2DS2	+			3	2	3
KIR2DS4	+					3
NCAM				3	3	3
β-Aktin		3	3	3	3	3

Abbildung 2.11 Gelelektrophorese einer RT-PCR. Die Abbildung zeigt RT-PCRs mit RNA-Proben, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der NK-Zelldifferenzierung (d0-d35) isoliert und mit KIR-Gensonden analysiert wurden. Diese sind für jede Spur in der Abbildung beschrieben. Die CD34⁺-Vorläuferzellen stammen aus dem CB25. In der dazugehörigen **Tabelle 2-6** sind die Ergebnisse der RT-PCRs veranschaulicht. Den PCR-Banden wurden hier farblich hinterlegte, Intensitäten von 1-3 zugeteilt, wobei 1=schwach (hellblau), 2=mittel (gelb) und 3=starke (rot) Bande bedeutet.

Die RT-PCR-Analysen des CB25 (Abbildung 2.11) zeigen in den ersten zwei Wochen (d0-d14) keine Expression der KIR-Gene. Die ersten KIRs wurden an d20 detektiert: KIR2DL3, 2DL4 und 2DS2 werden sehr stark exprimiert und auch KIR3DL2 ist bereits zu sehen. In diesem Fall kann man schwer eine sequentielle Expression der KIR-Rezeptoren beobachten, die wahrscheinlich zwischen d14 und d20 stattfand. An d28 ändert sich das KIR-Muster dadurch, dass KIR2DL1 und 3DL1 nun ebenfalls gemessen werden können. Abschließend an d35 lässt sich neben KIR3DL3 auch der stimulatorische Rezeptor KIR2DS4 detektieren, womit der Erwerb des KIR-Repertoires abgeschlossen war. KIR2DL2 wurde zu keiner Zeit exprimiert, obwohl dieser genotypisch vorhanden war.

2.1.10 Zusammenfassung der RT-PCR Ergebnisse aller Nabelschnurblut-Bulk-Kulturen

In dieser Arbeit konnten elf erfolgreiche Bulk-Experimente (5.1.13) durchgeführt werden. Drei dieser Experimente wurden parallel zu den EZ-Ablagen (5.1.14) angesetzt und vor Beginn der Kultivierung mit R20-Medium synchronisiert, weshalb diese drei Experimente hier nicht mit den übrigen Bulk-Differenzierungen verglichen wurden. Sie fließen daher nicht in die zusammenfassende Auswertung mit ein. Die Resultate zweier Nabelschnurblute (Nr.14 und Nr.25) wurden in Kapitel 2.1.9 ausführlich vorgestellt. Damit ein umfassendes Bild der sequentiellen KIR-Expression entsteht, werden hier die Ergebnisse der RT-PCRs der NK-Zelldifferenzierungen zusammengefasst. Es muss hierbei beachtet werden, dass Nabelschnurblute unterschiedlichen KIR-Genotyps miteinander verglichen werden. Daher sind in der Auswertung (Tabelle 2-7) nur die KIRs berücksichtigt, die in allen KIR-Genotypen der untersuchten CBs vorhanden waren, was dem KIR-Repertoire des Genotyp 1 entspricht. In Tabelle 2-7 ist dargestellt, wie viele CBs zu definierten Zeitpunkten den entsprechenden KIR-Rezeptor exprimierten.

Tabelle 2-7 In der Tabelle ist dargestellt, wie viele von den untersuchten Nabelschnurbluten an ausgewählten Tagen der NK-Zelldifferenzierung den jeweiligen KIR-Rezeptor exprimierten. In die Auswertung wurden folgende Blute mit einbezogen: CB1, 6, 7, 8, 23, 24, 25 und 26 (n = 8). Rot bedeutet für den entsprechenden Zeitpunkt der am häufigsten gemessene KIR-Rezeptor auf den NK-Zellen der untersuchten CBs.

	d0	d12-14	d16-20	d21-25	d27-28	d33-37	d42
2DL1			1 / 8	5 / 8	6 / 8	5 / 8	3 / 8
2DL3		1 / 8	3 / 8	5 / 8	7 / 8	5 / 8	3 / 8
2DL4		4 / 8	6 / 8	6 / 8	8 / 8	5 / 8	3 / 8
3DL1			1 / 8	1 / 8	3 / 8	2 / 8	1 / 8
3DL2		1 / 8	3 / 8	3 / 8	4 / 8	4 / 8	3 / 8
3DL3			3 / 8	2 / 8	4 / 8	4 / 8	3 / 8
2DS4		2 / 8	1 / 8	3 / 8	3 / 8	5 / 8	3 / 8

Zu Beginn der Kultivierung und der NK-Zellgenerierung ist die Anzahl der exprimierten KIRs noch sehr niedrig. Z.B. sind es an d12-14 nur vier Rezeptoren, während im weiteren Verlauf der Differenzierung die exprimierten KIRs zunehmen. Der markanteste und am häufigsten exprimierte KIR-Rezeptor ist KIR2DL4 (Tabelle 2-7, rot). An d27-28 exprimieren 100 % der Zellen KIR2DL4. KIR2DL3 und 2DL1 werden ebenfalls von einem großen Prozentsatz der Zellen exprimiert. Was bei allen NK-Zelldifferenzierungen mit Nabelschnurblut beobachtet werden konnte, ist der Verlust der KIR-Rezeptoren zum Ende der Kultivierung, was vermutlich mit der Apoptose der Zellen einhergeht.

2.1.11 Korrelieren die Ergebnisse der phänotypischen und genotypischen Analysen miteinander?

Die sequentielle Induktion der KIR-Transkripte gelang mit vielen Nabelschnurbluten, die unterschiedliche KIR-Genotypen besaßen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der RT-PCRs und der durchflusszytometrischen Messungen eines weiteren CBs dargestellt und verglichen. Dabei handelt es sich um CB23, welches den KIR-Genotyp 1 hat und HLA-C1 homozygot ist.

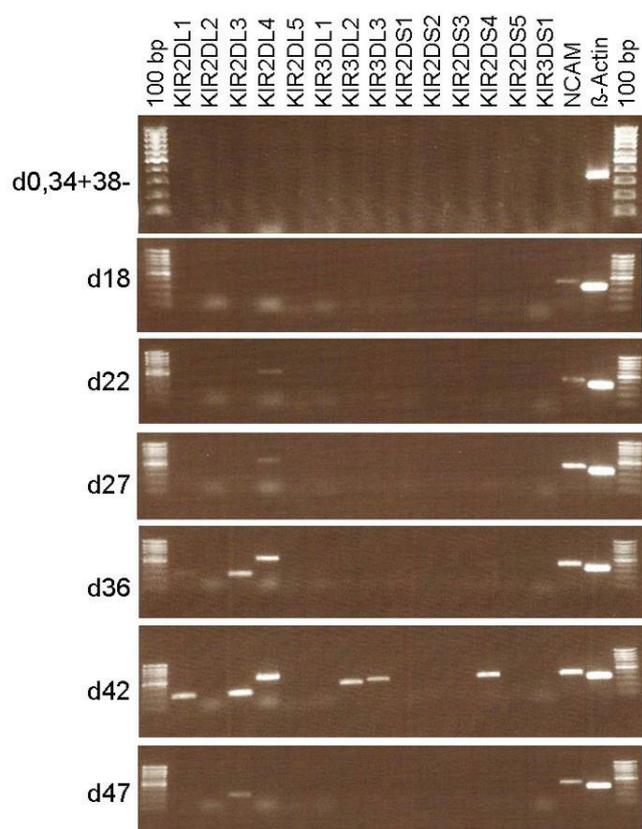


Tabelle 2-8

CB23	Genotyp1	d0	d18	d22	d27	d36	d42	d47
KIR2DL1	+					1	3	
KIR2DL3	+					2	3	2
KIR2DL4	+			2	2	3	3	
KIR3DL1	+							
KIR3DL2	+						2	
KIR3DL3	+						2	
KIR2DS4	+					1	2	
NCAM			2	2	3	3	3	2
beta-actin		3	3	3	3	3	3	3

Abbildung 2.12 Gelelektrophorese einer RT-PCR. Die Abbildung zeigt RT-PCRs mit RNA-Proben aus kultivierten Vorläuferzellen des CB23, welche in NK-Zellen differenziert wurden. Es wurden dabei zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung (d0-d47) Zellaliquots entnommen und hinsichtlich der KIR-Expression analysiert. Die verwendeten Primer sind über der Abbildung für jede Spur bezeichnet. In **Tabelle 2-8** ist die RT-PCR des CB23 vereinfacht dargestellt. Aufgeführt sind die Intensitäten der verifizierten PCR-Fragmente, wobei 1=schwach, 2=mittel und 3=stark bedeuten.

In **Abbildung 2.12** ist die zeitliche Expression der KIR-Gene von CB23 dargestellt. Dieses wurde an dieser Stelle exemplarisch ausgewählt, weil es sich um ein CB mit dem Genotyp 1 handelt, welches insgesamt nur sieben KIR-Rezeptoren kodiert, von denen die meisten durch spezifische Antikörper durchflusszytometrisch analysiert werden konnten. An d0 wird, so wie

erwartet, nur die Positivkontrolle (β -Aktin) exprimiert, denn es wurden $CD34^+CD38^-Lin1^-$ Zellen am Tag des Kultivierungsbeginns untersucht. An d18 kann der Rezeptor CD56 (NCAM) auf Transkriptebene nachgewiesen werden. Der erste KIR-Rezeptor, der mittels RT-PCR gemessen werden kann, ist 2DL4 an d22 und an d27 kommt KIR2DL3 hinzu. Eine deutliche Bande der KIRs 2DL1 und 2DL3 erkennt man an d36, wobei letzterer stärker exprimiert wird. Der einzige stimulatorische KIR-Rezeptor 2DS4 kann ebenfalls erst an d36 gemessen werden. Die übrigen KIRs werden erst an d42 transkribiert, mit Ausnahme von KIR3DL1, der nicht detektiert werden konnte. Aus den Ergebnissen des letzten Erntetages (d47) geht hervor, dass die Expression aller Rezeptoren wieder schwächer wurde. Aufgrund morphologischer Beobachtungen kann man sagen, dass zu einem so späten Zeitpunkt (d47) die Möglichkeiten der Kultivierung solcher *in vitro* differenzierten NK-Zellen erschöpft waren. Es kommt dann zur Apoptose der Zellen, die man mikroskopisch durch das Vorhandensein von Zelltrümmern beobachten kann.

Zeitgleich zu den Tagen der Probenentnahme für die RNA-Isolation wurde ein Teil der Zellen mit Fluoreszenz-konjugierten KIR-spezifischen Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch gemessen. Das Ergebnis der Durchflusszytometrie für CB23 ist in Abbildung 2.13 zu sehen. Die Spezifitäten der verwendeten Antikörper sind im Folgenden nochmals aufgeführt, da einige AK mehrere KIR-Rezeptoren gleichzeitig erkennen. In Tabelle 2-9 sind die entsprechenden KIR-Rezeptoren hervorgehoben, die bei dem Genotypen des CB23 vorhanden waren. Da die übrigen von diesen Antikörpern potentiell erkannten KIRs auf diesem Genotyp nicht enthalten waren, konnte es folgerichtig auch nicht zu einer Mehrfacherkennung der Rezeptoren kommen.

Tabelle 2-9 Antikörper und deren Spezifitäten

Antikörper	KIR-Rezeptor
NKAT2	2DL2 / 2DL3 / 2DS2
CD158a	2DL1 / 2DS1
NKB1	3DL1
CD158i	2DS4

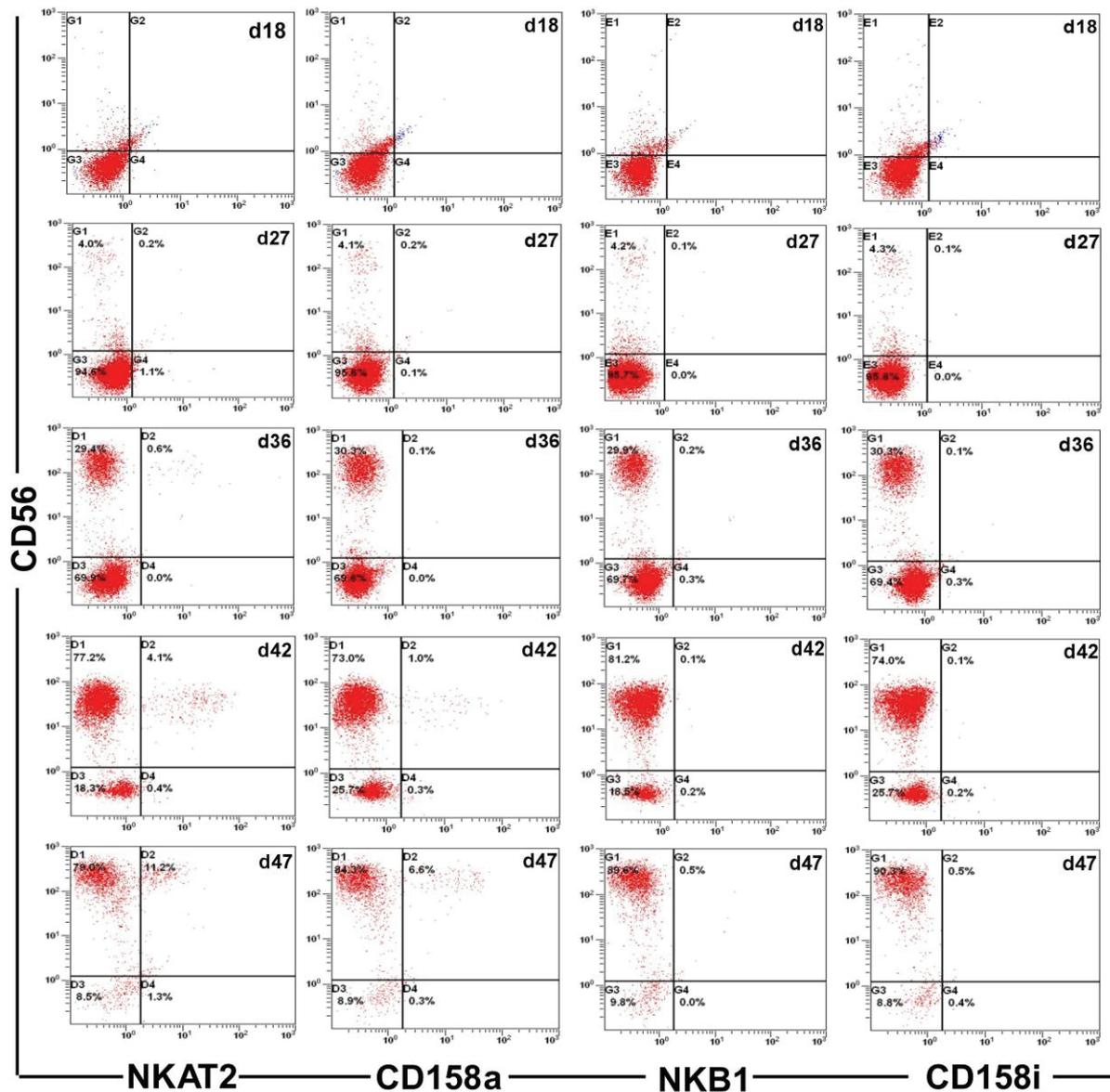


Abbildung 2.13 Durchflusszytometrische Analyse des CB23. In der Abbildung sind die Dotplots des Verlaufs der NK-Zelldifferenzierung (d18-47) zu sehen. Die Proben wurden mit CD56 und den KIR-spezifischen Antikörpern (NKAT2, NKB1, CD158a, CD158i) markiert.

Die durchflusszytometrischen Messungen zeigen an d18 der Differenzierung noch keine KIR-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, wohingegen CD56 schon in geringer Frequenz zu erkennen ist. Neun Tage später, an d27, gibt es bereits eine distinkte NK-Zellpopulation von CD56^{bright}-Zellen, während auch bei dieser Messung die KIR-Rezeptoren noch ausbleiben. Erst an d36 lässt sich der Rezeptor KIR2DL3 (NKAT) auch durchflusszytometrisch nachweisen. In diesem Fall kann man davon ausgehen, dass NKAT nur den Rezeptor 2DL3 erkennt, weil dieses Nabelschnurblut (CB23) den KIR-Genotyp 1 hat, der die Gene 2DL2 und 2DS2 nicht kodiert. Die Population der NK-Zellen mit 2DL3 auf der Oberfläche nimmt an d42 (4,1 %) und an d47 (11,2 %) noch mal deutlich zu.

Der Rezeptor für CD158i (2DS4) wird erst an d36 langsam hoch reguliert und wird auch bis d47 nicht viel stärker (0,4 %). Für den Rezeptor 2DL1 (CD158a) konnte an d42 eine kleine Population (1 %) gemessen werden, die an d47 noch stärker wurde (6,6 %). Auch hier lässt sich mit Sicherheit sagen, dass mit dem AK für CD158a nur der Rezeptor KIR2DL1 und nicht zusätzlich KIR2DS1 gemessen wurde, weil letzterer im Genotyp 1 nicht enthalten ist. KIR3DL1 konnte mit dem AK für NKb1 zu keiner Zeit auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

Tabelle 2-10 Vergleich der genotypischen und phänotypischen Analysen der KIR-Expression während der Differenzierung von NK-Zellen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen (CB23).

		KIR2DL1	KIR2DL3	KIR3DL1	KIR2DS4	
Methode		CD158a	NKAT2	NKB1	CD158i	
CB 23	RT-PCR					d0
	FACS					
	RT-PCR					d18
	FACS					
	RT-PCR					d22
	FACS					
	RT-PCR		+			d27
	FACS					
	RT-PCR	+	+		+	d36
	FACS		+			
	RT-PCR	+	+		+	d42
	FACS	+	+			
	RT-PCR		+			d47
	FACS	+	+		+	

Bei der Gegenüberstellung der Resultate konnten vier der sieben KIR-Rezeptoren miteinander verglichen werden. Der Vergleich der genotypischen und phänotypischen Analysen zeigt, dass nur wenige KIR-Rezeptoren zeitgleich mittels RT-PCR und Durchflusszytometrie nachgewiesen werden konnten. KIR2DL1 wurde auf Transkriptebene an d36 detektiert, lässt sich durchflusszytometrisch jedoch erst an d42 messen. An d47 scheint die Expression dieses KIR-Rezeptors bereits eingestellt zu sein, wobei er immer noch auf der Zelloberfläche zu finden ist. Für den Rezeptor KIR2DL3 ist eine eindeutige Korrelation erkennbar. An d27 kann man die Expression eines schwachen Transkriptes beobachten und ab d36 ist der Rezeptor genotypisch und phänotypisch nachzuweisen. KIR3DL1 kann während der NK-Zelldifferenzierung weder mittels RT-PCR noch durchflusszytometrisch detektiert werden. Für den Rezeptor KIR2DS4 trifft das nicht zu, denn an d36 und d42 konnte ein deutliches

PCR-Fragment amplifiziert werden und zu späterem Zeitpunkt (d47) war auch eine Detektion auf der Zelloberfläche möglich.

Eine Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Analysen und der Ergebnisse der RT-PCRs für die Nabelschnurblute CB24, CB25 und CB26 ist im Anhang in den Tabellen 8-3 bis 8-5 zusammengefasst. CB24 und CB25 haben den KIR-Genotyp 2, so dass der Antikörper für NKAT2 in diesem Ansatz spezifisch für KIR2DL2 und 2DL3 war. KIR2DL2 konnte für beide CBs zu keiner Zeit mittels RT-PCR nachgewiesen werden, so dass NKAT2 während der Markierung für die Durchflusszytometrie nur an KIR2DL3 binden konnte. Die Ergebnisse aus den Tabellen 8-3, 8-4 und 8-5 sind mit denen aus Tabelle 2-10 vergleichbar. Die untersuchten Rezeptoren wurden im Verlauf der NK-Zellentwicklung in der Regel zuerst mittels RT-PCR detektiert und konnten einige Tage später auch auf der Zelloberfläche gemessen werden.

2.1.12 Semiquantitative Analyse der Expression der inhibitorischen Rezeptoren KIR2DL1 und KIR2DL3 mittels Real-Time-PCR

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurde in unserer Arbeitsgruppe eine Studie zu Patienten mit Chronisch Myeloischer Leukämie (CML) durchgeführt (Fischer et al., 2007). Nach einer Stammzelltransplantation (*unrelated*) dieser Patienten wurde beobachtet, dass es eine allgemein und signifikant höhere Überlebensrate jener Patienten gab, die für HLA-C1 homozygot waren, im Vergleich zu solchen, die HLA-C2 homozygot waren (Fischer et al., 2007). Aufgrund der Tatsache, dass die KIR-Rezeptoren der NK-Zellen von HLA-Klasse-I-Liganden aktiviert werden und ggf. die Tötung der Zielzelle einleiten, galt es nun die für HLA-C1 und -C2 spezifischen KIR-Rezeptoren im Verlauf der NK-Zellentwicklung zu untersuchen. Bei diesen entsprechenden Rezeptoren für die Liganden C1 und C2 handelt es sich um KIR2DL3 bzw. KIR2DL1 (s.Tab 1-1). Aufgrund der Beobachtungen bei CML-Patienten wurden diese beiden Rezeptoren im Verlauf der NK-Zellgenerierung genauer untersucht. Hierzu wurden ebenfalls semiquantitative RT-PCRs mit RNA-Proben durchgeführt, die im Verlauf der NK-Zelldifferenzierung entnommen wurden, um den zeitlichen Ablauf, speziell für die Expression der KIRs 2DL1 und 2DL3, untersuchen zu können. Diesbezüglich sind in nachfolgender Abbildung zunächst die Ergebnisse der RT-PCR mit Proben des CB10 dargestellt (Genotyp 1).

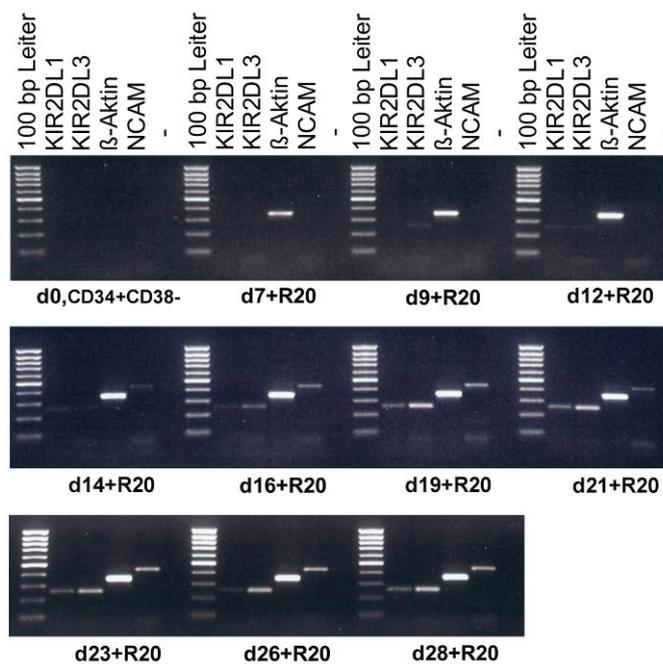


Abbildung 2.14 Ergebnisse der RT-PCR mit RNA-Proben des CB10. Die Tage der Probenentnahme während der NK-Zelldifferenzierung sind jeweils unter den einzelnen Spuren vermerkt. Die verwendeten Primer sind über jeder Spur beschrieben. Die resultierenden Fragmentlängen können der Tabelle 4-5 entnommen werden.

Das erste positive PCR-Fragment - neben der Positivkontrolle β -Aktin - ist an d9 der Rezeptor KIR2DL3. Erst drei Tage später wird auch KIR2DL1 schwach exprimiert. An d14 wird dann NCAM hoch reguliert, was sich bis zum Ende der Kultivierung nicht ändert. Nach 16 Tagen ist der Unterschied zwischen KIR2DL1 und 2DL3 deutlich zu sehen, denn die Bande für den Rezeptor 2DL3 wird während der gesamten Kultivierung konstant stärker exprimiert.

Dieses Experiment wurde mit RNA-Proben des Nabelschnurblut CB08 wiederholt (Genotyp7). In diesem Fall wurden jedoch Real-Time-PCRs durchgeführt, die in Triplikaten mit den entsprechenden und interessanten Primern angesetzt wurden. Das KIR-Gen 2DL2, welches ein Allel des Gens 2DL3 ist und auch den Liganden HLA-C1 erkennt, wurde dieses Mal mitgeführt. Die Auswertung erfolgte anhand der 2^{-ddCt} -Methode (Livak and Schmittgen, 2001; Radonic et al., 2004). Als Referenzprobe wurde die d0-RNA desselben Blutes (CB08) verwendet. Die Werte der relativen Genexpression nach den 2^{-ddCt} -Berechnungen variieren sehr stark, weshalb im Diagramm (Abbildung 2.15) zusätzlich eine Datentabelle integriert ist.

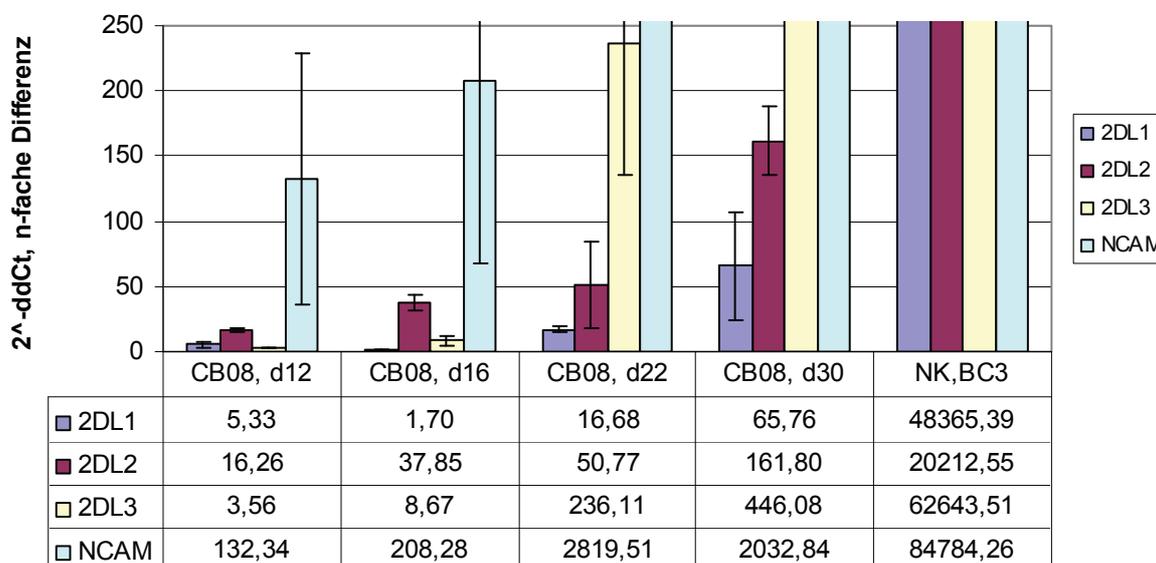


Abbildung 2.15 Ergebnisse der Real-Time-PCR mit CB08. Im Diagramm sind die 2^{-ddCt} -Werte der einzelnen RNA-Proben nach Normalisierung gegen die Referenzprobe (d0) dargestellt. Zusätzlich sind die Daten der Analyse aufgeführt, weil die Werte einiger Balken der n-fachen RNA-Expression zu hoch sind.

Anhand der Resultate der Real-Time-PCRs kann man Aussagen über die n-fache Differenz oder relative Menge des Transkriptes im Vergleich zur Kontrollprobe (d0) machen. Die größte Transkriptmenge findet sich zu allen untersuchten Zeitpunkten bei NCAM. Der Rezeptor KIR2DL2 wird zu Beginn der Differenzierung wesentlich schneller hoch reguliert als die beiden anderen Rezeptoren KIR2DL1 und KIR2DL3, an d22 ist jedoch 2DL3 das stärker exprimierte Allel. Im Vergleich zur Referenzprobe (d0) wird an d16 der Rezeptor 2DL2 etwa 38-fach und 2DL3 nur 8-fach stärker exprimiert. Dieses Bild ändert sich an d22 und liegt bei einer 236-fach stärkeren Expression für 2DL3 und bei einer 41-fachen Expression für 2DL2. Dagegen wird der Rezeptor KIR2DL1, welcher im Vergleich zu KIR2DL2/3 eine andere Spezifität besitzt (HLA-C2), nur sehr schwach transkribiert und erreicht selbst am Ende der Differenzierung nicht mehr als eine 65-fach stärkere Expression als die Referenzprobe an d0.

2.1.12.1 Effizienz und Kontrolle der Real-Time-PCR

Weil es sich bei den Ergebnissen einer Real-Time-PCR mit SYBR Green auch um unspezifische Produkte handeln kann, da der Farbstoff in alle doppelsträngigen Nucleinsäuren interkaliert, musste abschließend eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden (5.2.1.5), welche bei gegebener Temperatur einen Abfall der Fluoreszenz anzeigt (Daten hier nicht gezeigt). Zusätzlich dazu wurde der PCR-Ansatz auch auf ein Agarosegel aufgetragen, um die korrekte Länge der PCR-Fragmente zu bestätigen (Abbildung 2.16). Es konnten die erwarteten Fragmentlängen verifiziert werden. Allerdings zeigt die Analyse der PCR-Fragmente auf dem Agarosegel, dass der frühe Anstieg für das KIR-Gen 2DL2 an d12 auf unspezifische Produkte zurückzuführen ist und erst an d22 spezifische Signale für KIR2DL2 verifiziert werden können.

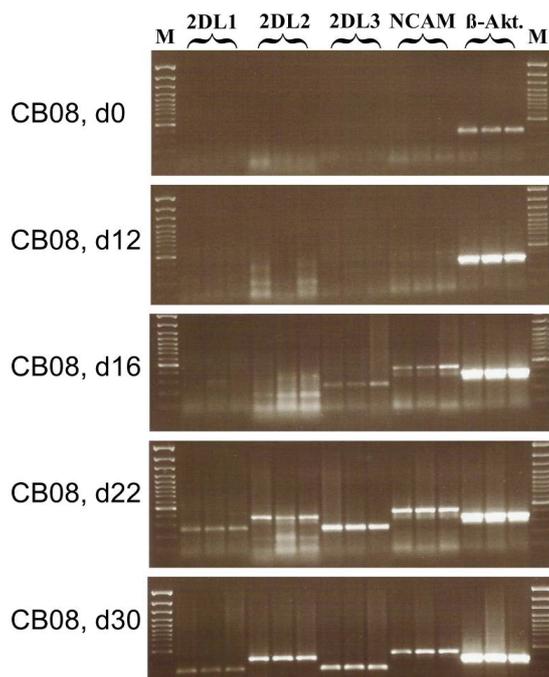


Abbildung 2.16 Nachweis der Real-Time-PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese. Links sind die Tage der Probenentnahme während der NK-Zelldifferenzierung beschrieben. Die RT-PCR wurde in Triplikaten durchgeführt. Die verwendeten Primer sind über jeder Spur vermerkt. M = 100 bp-Marker. Die Fragmentlängen sind der Tabelle 4-5 zu entnehmen.

In beiden Experimenten ergibt sich daher eine sequentielle Expression, bei der KIR2DL3 (C1-spezifisch) vor KIR2DL1 (C2-spezifisch), sowohl auf Transkriptebene als auch auf der Zelloberfläche, exprimiert wird.

2.1.13 Zusammenfassung der Ergebnisse der Bulk-Kulturen

Die am besten geeignete Quelle für die Ausgangspopulation zur Generierung von humanen NK-Zellen *in vitro* ist die hämatopoetische Vorläuferzelle aus dem Nabelschnurblut (Abbildung 2.3).

Die durchflusszytometrischen Analysen ergaben, dass nach Kultivierung der CD34-positiven Vorläuferzellen aus unterschiedlichen Blutquellen (Aph, KM, CB), NK-zellspezifische Rezeptoren in größerer Anzahl (%) auf NK-Zellen aus Nabelschnurblut detektiert werden konnten im Vergleich zu NK-Zellen aus Apheresat und Knochenmark.

Aus CD34-positiven Vorläuferzellen können reife NK-Zellen generiert werden, die KIR-Rezeptoren und andere NK-zelltypische Rezeptoren (NKps, NKG2A, CD94) exprimieren.

Eine Zugabe von IL-21 ergab, entgegen wissenschaftlicher Voruntersuchungen und Publikationen, keine verbesserte NK-Zelldifferenzierung und -Entwicklung.

Die morphologische Veränderung im Verlauf der Differenzierung von CD34⁺CD38⁻Lin⁻-Vorläuferzellen zu NK-Zellen konnte mikroskopisch gezeigt werden. Diese Beobachtungen konnten mittels RT-PCR und Durchflusszytometrie bestätigt werden. Es wurden NK-Zellen entsprechend ihres KIR- und HLA-Genotyps generiert.

Die ersten und am stärksten exprimierten KIR-Rezeptoren sind KIR2DL4 und KIR2DL3 (Tab.2-5 bis Tab.2-8).

Die genotypischen und phänotypischen Analysen korrelieren, sind aber zeitlich versetzt. Auf Transkriptebene konnten die KIR-Rezeptoren früher detektiert werden als auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie (Tabelle 2-10, Tabelle 8-1 bis 8-3).

Bei Untersuchungen der beiden inhibitorischen Rezeptoren KIR2DL1 und KIR2DL3 konnte mittels Real-Time-PCR gezeigt werden, dass KIR2DL3-Transkripte schneller zu detektieren sind und stärker in ihrer Expressionsstärke ausfallen als Transkripte des Rezeptors KIR2DL1. Dieses Ergebnis ist wichtig für allogene Stammzelltransplantationen und muss bei der Auswahl des Spenders beachtet werden, weil eine falsche Zuordnung (mismatch) zwischen den KIR-Rezeptoren des Spenders und dem HLA-Genotyp des Empfängers zur Abstoßung des Transplantats führen kann (Fischer et al., 2007).

2.2 Untersuchung der sequenziellen KIR-Expression auf klonaler Ebene mittels Einzelzellablage

2.2.1 Hintergrund und experimenteller Ansatz

Mit den Bulk-Experimenten, die in Kapitel 2.1 dargelegt wurden, konnte gezeigt werden, dass KIR2DL4 und KIR2DL2/3 definitiv als erste KIR-Gene auf Transkriptebene erscheinen und im Vergleich zu den übrigen KIR-Genen am stärksten exprimiert waren. Für die anderen KIR-Gene konnte keine definitive Reihenfolge der Expression gezeigt werden. Um noch detailliertere Informationen über die exprimierten KIR-Gene zu erhalten, und um die vorhandenen Ergebnisse zu bestätigen, wurde der Versuchsansatz der Bulk-Experimente erweitert und auf klonaler Ebene, d.h. mit einzelnen Zellen mittels Einzelzellablage (EZ), durchgeführt. Der Versuchsansatz der EZ ist in Kapitel 5.1.15 erklärt.

2.2.2 Klonierungseffizienz

Im Verlauf dieser Arbeit konnten drei Versuche der EZ-Ablage erfolgreich durchgeführt werden. Dabei ließ sich die Effizienz der NK-Zellgenerierung auf klonarer Ebene über die Anzahl positiver bzw. angewachsener und ausdifferenzierter Klone errechnen. Dafür wurden die angewachsenen Klone im Verhältnis zu den ausplattierten Zellen gesetzt. Es wurden pro Versuchsansatz zehn 96-Loch-Platten mit den Vorläuferzellen angefertigt und kultiviert. Pro Loch (Well) wurde mittels „Autoclone“ (Coulter®Epics®) durchflusszytometrisch nur eine Zelle abgelegt. Für die Nabelschnurblute CB10, CB14 und CB15 ergaben sich dadurch folgende Effizienzen (Tabelle 2-11):

Tabelle 2-11 Auswertung der Klonierungseffizienz der EZ-Ablage-Experimente

Anzahl positive Klone			
Platten-Nr.	CB10	CB14	CB15
1	21	22	48
2	29	27	41
3	28	32	47
4	26	37	48
5	24	39	46
6	24	32	49
7	24	23	49
8	18	29	48
9	17	29	47
10	27	28	53
Klonierungseffizienz			
	27%	34%	54%

2.2.3 Ergebnisse der RT-PCRs der NK-Zellklone mit spezifischen KIR-Gensonden

Neben den drei EZ-Ablagen wurden parallel dazu jeweils Bulk-Experimente desselben Blutes angesetzt, um eine Kontrolle über den Verlauf der KIR-Expression zu haben. Denn alle KIR-Rezeptoren eines NK-Zellklons, die auf klonaler Ebene aus einer einzelnen Zelle hervorgegangen sind, müssten demnach zum gegebenen Zeitpunkt auch in den Bulk-Kulturen wieder zu finden sein. KIR-Rezeptoren werden klonal exprimiert, d.h. es finden sich nicht zwangsläufig alle genotypisch vorhandenen KIRs auch auf der Oberfläche einer entsprechenden NK-Zelle. Es kann NK-Klone geben, die alle KIRs exprimieren, die genotypisch vorhanden sind, und es kann solche geben, die nur einige wenige der möglichen KIR-Rezeptoren exprimieren. Daher ist zu erwarten, dass die meisten Klone vom KIR-Muster der Bulk-Kulturen abweichen und nur in ihrer Gesamtheit diesem ähneln würden. Um auf die Beantwortung der Fragestellung zurückzukommen, ob eine bestimmte Sequenz der KIR-Expression vorhanden ist und auch nachgewiesen werden kann, werden nachfolgend zunächst tabellarisch die Ergebnisse der RT-PCRs der NK-Klone aufgeführt und gleichzeitig mit denen der Bulk-Kulturen verglichen (Tabelle 2-12).

Tabelle 2-12 Ergebnisse der RT-PCR der Einzelzellablage von CB10, verglichen mit den Ergebnissen der Bulk-Kultur (gelb). Pro Zeitpunkt wurden fünf Klone entnommen und untersucht. Die Intensitäten der Banden sind tabellarisch dokumentiert: 1= schwache, 2= mittlere, 3= starke Expression. Konnte nur ein KIR-Gen auf einem Klon detektiert werden, so ist dieses grün hinterlegt. Die Tage der Probenentnahme (d7+R20,...) befinden sich jeweils über den dargestellten Klone (Klon1-5).

CB10	BULK	d7+R20					BULK	d9+R20				
	d7+R20	Klon1	Klon2	Klon3	Klon4	Klon5	d9+R20	Klon1	Klon2	Klon3	Klon4	Klon5
KIR2DL1												
KIR2DL3												
KIR2DL4	2		1	1	1		1		1			
KIR3DL1												
KIR3DL2						1						
KIR3DL3				1		1						
KIR2DS4												
β-Aktin	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CB10	BULK	d12+R20					BULK	d14+R20				
	d12+R20	Klon1	Klon2	Klon3	Klon4	Klon5	d14+R20	Klon1	Klon2	Klon3	Klon4	Klon5
KIR2DL1												
KIR2DL3	1						1					
KIR2DL4	3						3					
KIR3DL1												
KIR3DL2												
KIR3DL3		1	1					2	2		1	
KIR2DS4												
β-Aktin	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CB10	BULK	d16+R20					BULK	d19+R20				
	d16+R20	Klon1	Klon2	Klon3	Klon4	Klon5	d19+R20	Klon1	Klon2	Klon3	Klon4	Klon5
KIR2DL1							1					
KIR2DL3	2						3					
KIR2DL4	3						3	2				1
KIR3DL1	1						2					
KIR3DL2	1						2					
KIR3DL3	1						1					
KIR2DS4							2					
β-Aktin	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CB10	BULK	d21+R20					BULK	d23+R20				
	d21+R20	Klon1	Klon2	Klon3	Klon4	Klon5	d23+R20	Klon1	Klon2	Klon3	Klon4	Klon5
KIR2DL1	2			1	2		3	1	1		2	1
KIR2DL3	3			2	3		3	3	2		2	2
KIR2DL4	3		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
KIR3DL1	3				1		2					1
KIR3DL2	3							1				
KIR3DL3	1	1					1					
KIR2DS4	2				1		2					
β-Aktin	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CB10	BULK	d26+R20					BULK	d28+R20				
	d26+R20	Klon1	Klon2	Klon3	Klon4	Klon5	d28+R20	Klon1	Klon2	Klon3	Klon4	Klon5
KIR2DL1							3			1		
KIR2DL3	3						3			3		
KIR2DL4	3	1	3	1	3	3	3			3		2
KIR3DL1	1						3			1		
KIR3DL2							3					
KIR3DL3	3						1					
KIR2DS4							3			3		
β-Aktin	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Die Ergebnisse der RT-PCR aus Tabelle 2-12 sind denen der Bulk-Experimente recht ähnlich. Generell kann man sagen, dass bei den Klonen zu Beginn der NK-Zelldifferenzierung auch wenig KIR-Gene exprimiert werden, denn im Verlauf sind bis d19 nur vereinzelte KIR-Rezeptoren nachzuweisen. Erst an d21 können klonal mehr KIRs gemessen werden, wobei kein Klon das Expressionsmuster der Bulk-Kultur erreicht. In den letzten Tagen der Differenzierung (d26, d28) nimmt die Expression ähnlich wie in den Bulk-Experimenten wieder ab. Es können entweder nur einzelne KIRs auf den Klonen nachgewiesen werden oder es werden keine KIRs mehr exprimiert.

Aus Tabelle 2-12 wurden einige Zeitpunkte der Differenzierungs-Kinetik ausgewählt, mit denen ein Diagramm (Abbildung 2.17) erstellt wurde, um die Expression der KIR-Gene zu veranschaulichen. Dabei wurde die Intensität der PCR-Fragmente der KIRs ebenfalls berücksichtigt.

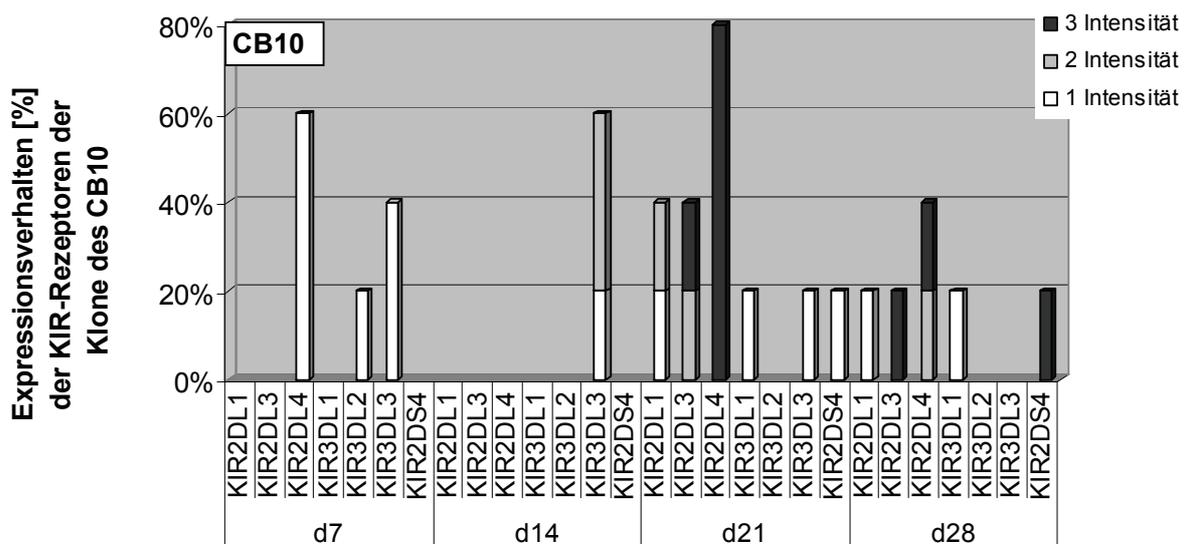


Abbildung 2.17 Resultate der RT-PCRs der EZ-Ablagen. Dargestellt ist das Expressionsverhalten der KIR-Rezeptoren [%] im Verlauf der NK-Zelldifferenzierung. Es wurden nur vier Zeitpunkte (d7, d14, d21, d28) aus der Differenzierungs-Kinetik ausgewählt. Die dafür benötigten Vorläuferzellen stammen aus dem CB10. Die genotypisch vorhandenen KIR-Rezeptoren sind auf der x-Achse dargestellt. Des Weiteren erkennt man die Intensitäten der KIR-Expression, die farblich untermalt sind: 1= schwache, 2= mittlere und 3= starke Intensität der Banden.

Im Diagramm sind die Ergebnisse der RT-PCR der NK-Klone im Verlauf der Differenzierung dargestellt. Auf der x-Achse sind die Zeitpunkte und die entsprechenden KIRs zu sehen, deren Expressionsstärke [%] für den jeweiligen Zeitpunkt angegeben ist. Dabei wurde zudem nach Intensitäten der Expression unterschieden, die mit 1 = schwach, 2 = mittel und 3 = stark bezeichnet sind. Die Höhe der Balken gibt demnach den prozentualen Anteil der Klone an,

die den jeweiligen KIR-Rezeptor zum gegebenen Zeitpunkt exprimieren. Die farbliche Gliederung der Balken weist auf die Intensität der Expression hin.

Zu Beginn der Differenzierung (d7) wurden die Rezeptoren KIR2DL4, 3DL2 und 3DL3 schwach detektiert. An d14 konnte auf den untersuchten Klonen nur der Rezeptor KIR3DL3 gemessen werden und an d21 nahm sowohl die Anzahl der exprimierten KIRs als auch deren Intensität zu. Stärkster Rezeptor ist hier 2DL4 mit 80 %. Zum Ende der Differenzierung (d28) wird die Expression wie in den Bulk-Experimenten wieder reduziert.

Die Ergebnisse aller drei EZ-Ablagen wurden in Abbildung 2.18 zusammengefasst. Die Daten sind zum einen aus Tabelle 2-12 und zum anderen aus den Tabellen 8-4 und 8-5 zusammengestellt, welche sich im Anhang befinden. Die Diagramme in Abbildung 2.17 und Abbildung 2.18 ähneln sich sehr stark. In den ersten beiden Wochen der Differenzierung sind die Expressionsstärke und die Anzahl der exprimierten KIRs gering, was sich im weiteren Verlauf ändert. Auffälligster Rezeptor ist wieder KIR2DL4, welcher auch zum Ende der NK-Zellentwicklung (d27-28) noch dominiert.

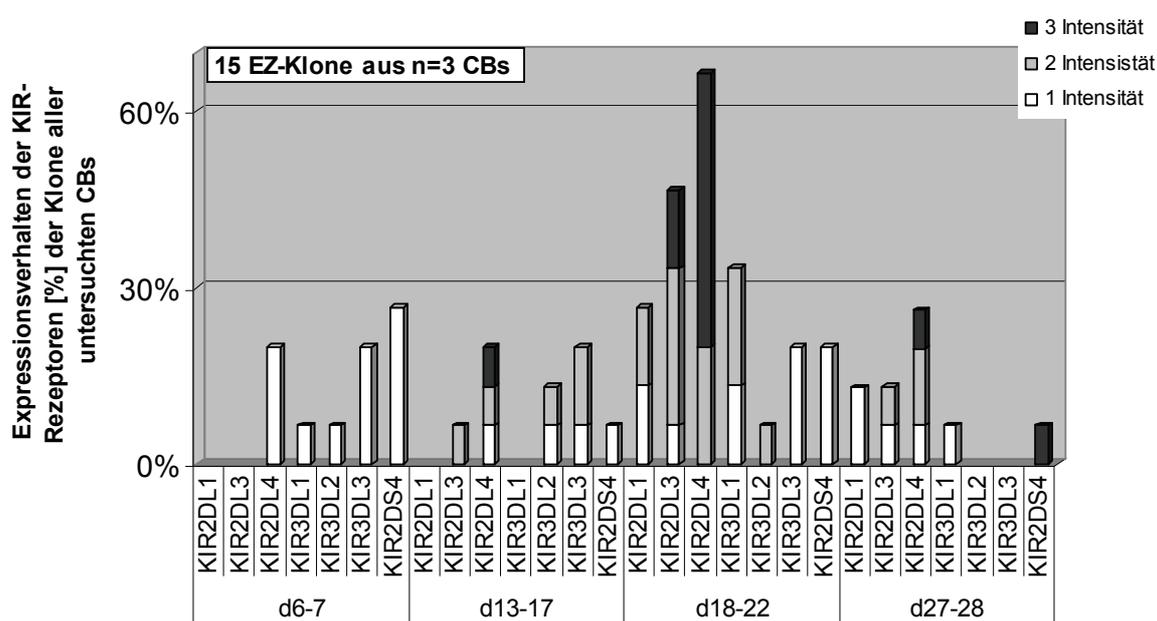


Abbildung 2.18 Resultate der RT-PCRs der EZ-Ablagen. Dargestellt ist das Expressionsverhalten der KIR-Rezeptoren in [%] im Verlauf der NK-Zelldifferenzierung. Es wurden vier Zeitpunkte aus der Differenzierungs-Kinetik ausgewählt. Die Ergebnisse wurden aus allen EZ-Ablagen zusammengefasst (CB10, CB14, CB15). Die KIR-Rezeptoren sind auf der x-Achse dargestellt. Des Weiteren erkennt man die Intensitäten der KIR-Expression, die farblich untermalt sind: 1 = schwache, 2 = mittlere und 3 = starke Intensität der Banden.

2.2.4 NK-Klone mit nur einem aktiven KIR-Gen

Um weitere Anhaltspunkte für eine sequentielle KIR-Expression zu erhalten, wurden aus den Einzelzellablagen jeweils die Klone untersucht, welche während der NK-Zellkultivierung nur einen einzigen KIR-Rezeptor exprimierten. Die nachfolgenden Kreis-Diagramme fassen diese Beobachtungen zusammen. Es sind immer nur die Klone mit jeweils einem exprimierten KIR berücksichtigt, wobei diese in den Tabellen 2-2, 8-4, 8-5 grün hinterlegt sind.

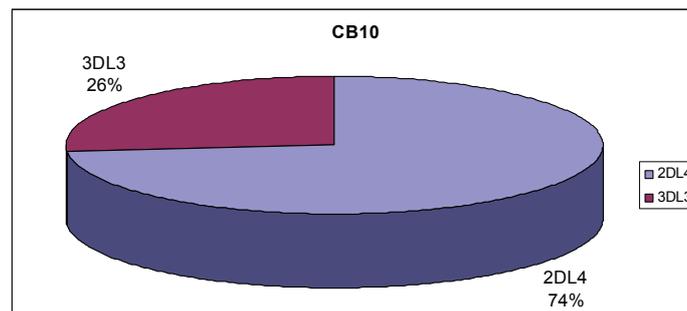


Abbildung 2.19 Darstellung der prozentualen Verteilung der KIR-Rezeptoren. Berücksichtigt sind nur die Klone der EZ-Ablage, die einen einzigen KIR exprimiert hatten. Die Ergebnisse in dieser Abbildung beziehen sich auf das Nabelschnurblut CB10 (Tabelle 2-12).

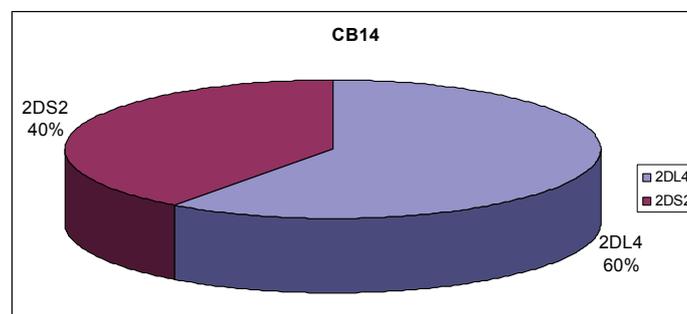


Abbildung 2.20 Darstellung der prozentualen Verteilung der KIR-Rezeptoren. Berücksichtigt sind nur die Klone der EZ-Ablage, die einen einzigen KIR exprimiert hatten. Die Ergebnisse in dieser Abbildung beziehen sich auf das Nabelschnurblut CB14 (Tabelle 8-4).

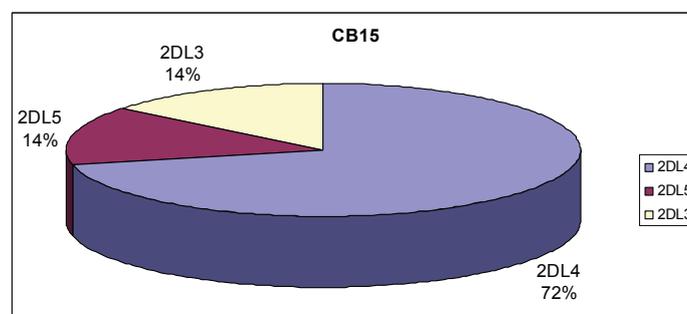


Abbildung 2.21 Darstellung der prozentualen Verteilung der KIR-Rezeptoren. Berücksichtigt sind nur die Klone der EZ-Ablage, die einen einzigen KIR exprimiert hatten. Die Ergebnisse in dieser Abbildung beziehen sich auf das Nabelschnurblut CB15 (Tabelle 8-5).

Die Ergebnisse aus den Diagrammen der Abbildung 2.19, Abbildung 2.20 und Abbildung 2.21 sind für die Nabelschnurblute CB10, CB14 und CB15 in Tabelle 2-13 zusammengefasst. Unabhängig von KIR-Genotyp und Haplotyp der untersuchten CBs kann gezeigt werden, dass der Rezeptor KIR2DL4 mit einem Anteil von 60-74 % am häufigsten als einziger KIR exprimiert wird. Dann folgen die inhibitorischen KIRs 3DL3, 2DL3 und 2DL5. Der stimulatorische Rezeptor KIR2DS2 hat bei CB14 einen Anteil von 40 %. KIR2DS2 ist der einzige stimulatorische Rezeptor, der zu einem so frühen Zeitpunkt auch ohne die anderen KIR-Rezeptoren exprimiert wird und konnte nur bei CB14 beobachtet werden.

Tabelle 2-13 Zusammenfassung der RT-PCR Ergebnisse der Klone, die zu Beginn der Differenzierung nur einen KIR-Rezeptor exprimieren. Die einzelnen KIR-Gruppen sind farblich zusammengefasst und haben sonst keine weitere Bedeutung.

	CB10	CB14	CB15
KIR2DL1			
KIR2DL2			
KIR2DL3			14%
KIR2DL4	74%	60%	72%
KIR2DL5			14%
KIR3DL1			
KIR3DL2			
KIR3DL3	26%		
KIR2DS1			
KIR2DS2		40%	
KIR2DS3			
KIR2DS4			
KIR3DS1			

Generell kann man sagen, dass hauptsächlich inhibitorische Rezeptoren als erstes exprimiert werden, wobei 2DL4 mit durchschnittlich 68,6 % überwiegt. Die Ergebnisse der klonalen NK-Zelldifferenzierung machen deutlich, dass es abhängig vom Nabelschnurblut ist, welche KIR-Rezeptoren als erste exprimiert werden. Gemeinsam ist jedoch allen drei durchgeführten EZ-Experimenten, dass der Rezeptor KIR2DL4 zum einen sehr häufig als erster KIR und zum anderen sehr beständig in allen drei Versuchsansätzen detektiert werden konnte.

2.2.5 Sequenzielle KIR-Expression bei Klonen der Einzelzellablage mit partieller und zeitlich versetzter Zellentnahme

Mit dem Nabelschnurblut CB15 wurde parallel zum Bulk- und EZ-Experiment ein Versuchsansatz durchgeführt, bei dem die einzelnen Klone zunächst nur zur Hälfte geerntet und anschließend für einige Tage weiter kultiviert wurden. Dieser Ansatz wurde durchgeführt, um zu untersuchen, wie sich die sequentielle KIR-Expression auf klonaler Ebene eines einzelnen Klones darstellt. Über die zeitlich versetzte Ernte eines NK-Zellklons konnte die KIR-Expression auf Transkriptebene detaillierter überprüft werden. Der Versuch war so konzipiert, dass entsprechende Klone mikroskopisch ausgewählt und gekennzeichnet wurden, um anschließend (nur) zur Hälfte geerntet zu werden. Die zweite Hälfte des Klons wurde nach einigen Tagen ebenfalls entnommen und untersucht. Solche Klone sind im Folgenden mit 1/2 und 2/2 gekennzeichnet. Andere Klone wurden beim zweiten Mal nochmals geteilt und analysiert und erst beim dritten Mal wurden die Zellen komplett entnommen und entsprechend experimentell überprüft (1/3, 2/3 und 3/3). In folgender Abbildung ist das Prinzip des Versuchs skizziert.

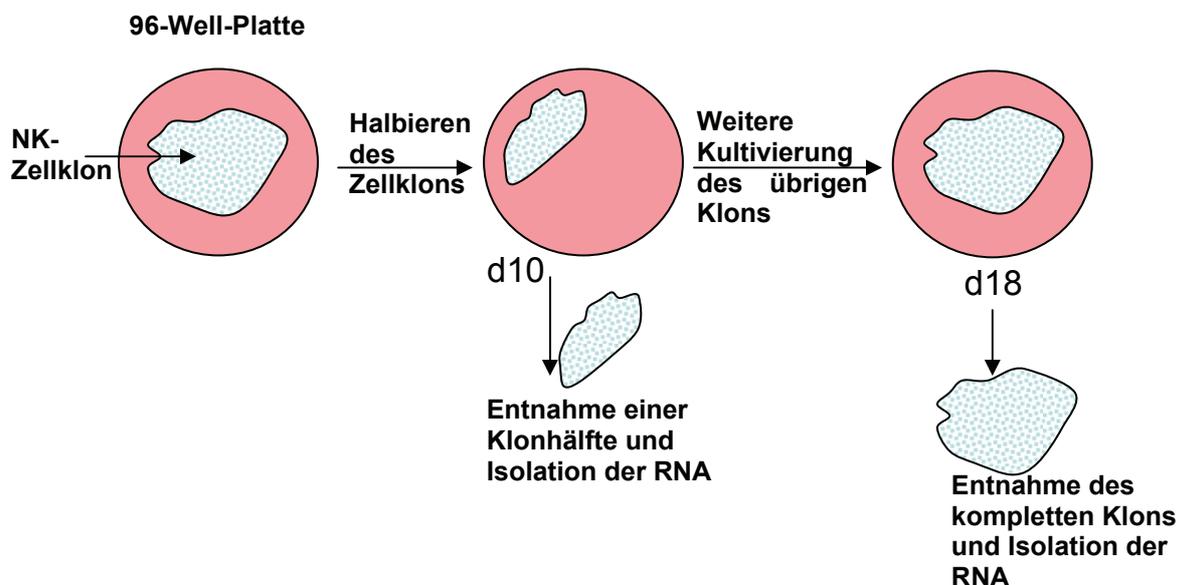


Abbildung 2.22 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus bei partieller und zeitlich versetzter Entnahme der Zellen während der klonalen NK-Zelldifferenzierung.

Insgesamt wurde mit 25 Klonen auf diese Weise verfahren.

n = 7 Klone: Zunahme der KIR-Expression (Tabelle 2-14)

n = 9 Klone: Verlust der bereits erworbenen KIR-Transkripte (Tabelle 2-15)

n = 9 Klone: keine KIR-Expression. Es konnten nur PCR-Fragmente für NCAM und β -Aktin nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

In Tabelle 2-14 sind die Klone dargestellt, bei denen eine Zunahme der KIR-Expression zum späteren Zeitpunkt der Zellentnahme beobachtet werden konnte.

Tabelle 2-14 Ergebnisse der RT-PCRs der partiell und zeitlich versetzt entnommenen Klone. Gezeigt sind die Klone, bei denen eine Zunahme der Expression gemessen wurde. Oben ist die Bezeichnung des Klons vermerkt (hellblau) und darunter ist dargestellt, welcher Anteil des Klons (1/2, 1/3...) zu welchem Zeitpunkt (d20+R20) zur Analyse entnommen wurde (gelb). R20 bedeutet, dass die Zellen während einer zweiwöchigen Vorkultur mit R20-Medium synchronisiert wurden. Die Intensitäten der PCR-Fragmente sind mit 1-3 gekennzeichnet (1= schwach, 2= mittel, 3= stark).

KIR3DL2		2						
KIR3DL3	1	1						
KIR2DS1						1		
KIR2DS2		3						
KIR2DS3		2						
KIR2DS4		2						
KIR3DS1		3				2		
NCAM		3	2	2		2		2
β -Aktin	3	3	3	3	3	3	3	3

	Klon 5		Klon 6			Klon 7		
	1/2	2/2	1/3 PN	2/3 N	3/3 N	1/3	2/3	3/3
	d7+R20	d20+R20	d11+R20	d20+R20	d26+R20	d11+R20	d20+R20	d22+R20
KIR2DL1								
KIR2DL2							1	
KIR2DL3		2		1	1		2	2
KIR2DL4		1		2	2	1	2	3
KIR2DL5								
KIR3DL1						1		1
KIR3DL2								1
KIR3DL3								
KIR2DS1		1						
KIR2DS2						1		1
KIR2DS3							1	2
KIR2DS4			1		1			
KIR3DS1		1		1		1	1	2
NCAM				1	2	1	1	2
β -Aktin	3	3	3	3	3	3	3	3

Die Daten aus Tabelle 2-14 spiegeln auch hier die Ergebnisse der Bulk-Experimente wieder. Die Klone aus Tabelle 2-14 wurden für die erste Messung recht früh (d7, d11) entnommen und untersucht. Zum späteren Zeitpunkt der zweiten Messung war eine höhere Anzahl an KIR-Genen transkribiert. Zum ersten Zeitpunkt der Probeentnahme exprimierten drei von sieben (3/7) Klonen den Rezeptor KIR2DL4. Die zweite Hälfte der Klone, die zu späterem Zeitpunkt analysiert wurde exprimierten alle (7/7) den Rezeptor KIR2DL4, gefolgt von KIR2DL3 und 3DS1 (je 5/7). Bei diesen drei erwähnten KIRs handelt es sich um die am häufigsten exprimierten KIR-Gene bei den Klonen aus Tabelle 2-14. Generell lässt sich sagen, dass die Klone aus Tabelle 2-14, die bezüglich ihrer KIR-Expression zu einem frühen Zeitpunkt (d7, d11) das erste Mal untersucht wurden, zum späteren Zeitpunkt mehr KIRs exprimierten, was sich mit den Daten der Bulk-Experimente deckt.

Die Klone, die zu späteren Zeitpunkten bereits erworbene KIR-Rezeptoren reprimiert haben, sind in Tabelle 2-15 dargestellt. Auch hier sind mehr KIRs auf den Klonen exprimiert, die während der stabilen Phase der *in vitro* NK-Zellentwicklung (d20, d22) entnommen und untersucht wurden. Da ein Großteil der neun Klone aus Tabelle 2-15 das erste Mal zu diesem recht späten Zeitpunkt analysiert wurde, fällt die Expression im weiteren Verlauf ab, was wiederum mit den Bulk-Experimenten korreliert. Der KIR-Rezeptor 2DL4 ist erneut am häufigsten vertreten. Zum ersten untersuchten Zeitpunkt exprimierten sechs von neun (6/9) Klonen KIR2DL4, welcher auch bei den zweiten bzw. späteren Messungen am stärksten exprimiert wurde und dominierte (3/9).

Tabelle 2-15 Ergebnisse der RT-PCRs der partiell und zeitlich versetzt entnommenen Klone. Gezeigt sind die Klone, bei denen eine Abnahme der Expression gemessen wurde. Oben ist die Bezeichnung des Klons vermerkt (orange) und darunter ist dargestellt, welcher Anteil des Klons (1/2, 2/2) zu welchem Zeitpunkt (d20+R20) zur Analyse entnommen wurde (gelb). R20 bedeutet, dass die Zellen während einer zweiwöchigen Vorkultur mit R20-Medium synchronisiert wurden. Die Intensitäten der PCR-Fragmente sind mit 1-3 gekennzeichnet (1 = schwach, 2 = mittel, 3 = stark).

CB15	Klon 8		Klon 9		Klon 10		Klon 11		Klon 12	
	1/2	2/2	1/2	2/2	1/2	2/2	1/2	2/2	1/2	2/2
	d20+R20	d34+R20	d20+R20	d34+R20	d11+R20	d22+R20	d18+R20	d26+R20	d22+R20	d32+R20
KIR2DL1	1								3	
KIR2DL2									3	
KIR2DL3	2	1							3	
KIR2DL4	3	3			1	1			3	
KIR2DL5	1				3	1	1		3	
KIR3DL1	1		1						3	
KIR3DL2	1				1				3	
KIR3DL3			1							
KIR2DS1									1	
KIR2DS2	1								2	
KIR2DS3	1	1							2	
KIR2DS4	1	1			1				2	
KIR3DS1	2	2							3	
NCAM	3	2							3	
β-Aktin	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

	Klon 13		Klon 14		Klon 15		Klon 16	
	1/2	2/2	1/2	2/2	1/2	2/2	1/2	2/2
	d22+R20	d32+R20	d13+R20	d22+R20	d11+R20	d20+R20	d13+R20	d22+R20
KIR2DL1	1	1						
KIR2DL2	2							
KIR2DL3	2	2						
KIR2DL4	3	3	1				1	1
KIR2DL5			1		2			
KIR3DL1								
KIR3DL2			1					
KIR3DL3			1				1	
KIR2DS1	1							
KIR2DS2	1		1					
KIR2DS3	1							
KIR2DS4	2		2					
KIR3DS1	1		1					1
NCAM	3	2					1	2
β-Aktin	3	3	3	3	3		3	3

2.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der EZ-Experimente

Anhand der Experimente der EZ-Ablagen konnten einige Ergebnisse der Bulk-Kulturen bestätigt werden:

Der Zeitpunkt der Expression der ersten KIR-Gene variiert und hängt vom Nabelschnurblut ab. In den ersten zehn Tagen kann man wenig oder keine KIR-Rezeptoren mittels RT-PCR nachweisen. Die Anzahl der exprimierten KIR-Rezeptoren steigt mit zunehmendem Differenzierungsverlauf und nimmt zum Ende der Kultivierung (ca. 4 Wochen) wieder ab.

Der Rezeptor KIR2DL4 wird mit durchschnittlich 70 % am häufigsten als erster Rezeptor während der NK-Zellentwicklung exprimiert.

Anhand der generierten Daten lässt sich die Aussage machen, dass der erste exprimierte KIR-Rezeptor in der Regel inhibitorisch ist.

KIR2DS2 war der einzige stimulatorische Rezeptor, der zu Beginn der NK-Zell-differenzierung (CB14) auf klonaler Ebene ohne die übrigen KIRs detektiert werden konnte.

Unabhängig davon, ob die KIR-Rezeptoren exprimiert oder reprimiert wurden, konnte anhand der Klone, die zeitversetzt untersucht wurden, gezeigt werden, dass KIR2DL4 stets am häufigsten exprimiert wurde. Eine Reihenfolge der KIR-Expression konnte mit den EZ-Experimenten nicht nachgewiesen werden. Allerdings lassen die Resultate die Aussage zu, dass Klone, die am Anfang ihrer Entwicklung stehen, überwiegend inhibitorische KIR-Rezeptoren exprimieren, während solche, deren Differenzierung bereits weiter fortgeschritten ist, ein größeres KIR-Spektrum aufweisen.

Klone, welche die Expression der KIR-Rezeptoren scheinbar herunter regulieren, weisen ebenfalls mehr inhibitorische Rezeptoren auf als stimulatorische.

Eine genaue Aussage zur Sequenz aller KIR-Rezeptoren lassen die Daten nicht zu.

2.3 *Epigenetik*

2.3.1 Hintergrund und experimenteller Ansatz

Bereits in der Einleitung wurde über die Bedeutung der DNA-Methylierung gesprochen und darüber, dass die Gene, deren CpG-Inseln im Promotorbereich methyliert sind, inaktiv sind und nicht transkribiert werden. Für die *KIR*-Gene konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass sie durch epigenetische Mechanismen reguliert werden. So führt die DNA-Methylierung der *KIR*-Promotoren zur Abschaltung der *KIR*-Expression (Santourlidis et al., 2002; Santourlidis et al., 2008). Weiterhin kann durch Behandlung mit dem demethylierenden Agens 5'-Aza-2'-Deoxycytidin (AZA), welches die Methylierung der CpG-Sequenzen verhindert, die Expression der *KIR*-Gene induziert werden. Die Genexpression wird aber nicht nur durch das Agens AZA beeinflusst, denn neben der Methylierung spielt auch die Veränderung der Chromatindichte eine Rolle für den Transkriptionsstatus eines Gens. Die Struktur des Chromatins wird von dem epigenetisch wirksamen Agens Trichostatin A (TSA) beeinflusst. TSA ist ein Deacetylaseinhibitor und verhindert, dass die Acetylgruppen an den Histonen entfernt werden, so dass das Chromatin nicht wieder verdichtet werden kann. Eine Stimulation mit diesem Agens kann bei einigen Genen auch zur Aktivierung des Promotors und damit zur Transkription führen. Die Acetylierung der Histone und die damit verbundene Strukturveränderung des Chromatins gekoppelt mit der Methylierung von CpG-Inseln sind wichtige Mechanismen der epigenetischen Regulation der Genexpression der *KIR*-Gene (Uhrberg, 2005; Yasui et al., 2003).

Das in dieser Arbeit etablierte Modell der NK-Zelldifferenzierung wurde genutzt, um im Verlauf der Entwicklung der NK-Zellen den Effekt von AZA und TSA auf die Expression der *KIR*-Gene zu untersuchen. Es war von Interesse, in welchem Ausmaß diese Modulatoren das Epigenom und damit die *KIR*-Induktion während der Entwicklung von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu NK-Zellen beeinflussen.

Weiterhin wurde untersucht, ob sich die Expression bestimmter epigenetischer Schlüsselfaktoren, wie DNMTs, HDACs oder HATs während der NK-Zelldifferenzierung ändert. Schließlich wurden Zellen im Verlauf der NK-Zelldifferenzierung mittels ChIP-Analysen hinsichtlich der Histonmodifikationen im Bereich der *KIR*-Promotoren untersucht.

2.3.2 Wie wirkt sich die Stimulation von AZA und TSA auf die Expression der KIR-Rezeptoren bei *in vitro* differenzierten NK-Zellen aus?

Der Einfluss von AZA und TSA auf die Expression und Transkription der *KIR*-Gene wurde von mehreren Arbeitsgruppen bereits an NK-Zellen aus peripherem Blut sowie an NK-Zelllinien untersucht, mit dem Ergebnis, dass transkribierte und aktive *KIR*-Gene einen demethylierten Promotor aufweisen und methylierte CpG-Inseln in den Promotoren eine Inhibition der Transkription bewirken (Chan et al., 2005; Santourlidis et al., 2002).

Diese epigenetische Repression sollte im Zuge der *in vitro* Differenzierung von NK-Zellen ebenfalls untersucht werden. Eine eventuelle Verstärkung der Transkription nach Behandlung der Zellen mit AZA und TSA sollte mittels RT-PCR nachgewiesen werden. In jedem Versuchsansatz wurden parallel Kontrollen mitgeführt, so dass der normale Verlauf der Differenzierung kontrolliert werden konnte. Dabei waren die Zellen denselben Kulturbedingungen ausgesetzt, wurden jedoch ohne die Zugabe von AZA und TSA kultiviert.

Tabelle 2-16 Auswertung und Darstellung der NK-Zelldifferenzierung mit und ohne AZA bzw. TSA. Ergebnisse der RT-PCR mit CB13 und CB21. Im Versuchsansatz mit CB13 wurden angereicherte CD34⁺-Zellen auf AFT024 kultiviert (30000/well). Mit CB21 wurden sortierte Vorläuferzellen (CD34⁺CD38⁻Lin⁻) in einer Kokultur mit AFT024 differenziert. Die Abkürzungen bedeuten: Ko=Kontrolle, A=AZA, T=TSA.

CB13	Genotyp17	d14,Ko	d14, AZA	d14,TSA	d14, A+T	CB21	Genotyp7	d25, Ko	d28, Ko	d28, AZA	d28, TSA	d28, A+T
KIR2DL1	+		+		+	KIR2DL1	+					
KIR2DL2	+		+	+	+	KIR2DL2	+	+	+			
KIR2DL3						KIR2DL3	+			+		
KIR2DL4	+	+	+	+	+	KIR2DL4	+	+	+	+	+	+
KIR2DL5	+		+		+	KIR2DL5	+			+		+
KIR3DL1	+					KIR3DL1	+					
KIR3DL2	+	+	+	+	+	KIR3DL2	+		+	+	+	+
KIR3DL3	+	+	+	+	+	KIR3DL3	+					
KIR2DS1	+		+	+	+	KIR2DS1	+					
KIR2DS2	+		+	+	+	KIR2DS2	+					
KIR2DS3						KIR2DS3	+					
KIR2DS4	+					KIR2DS4	+			+	+	+
KIR2DS5	+		+		+	KIR2DS5						
KIR3DS1	+		+	+	+	KIR3DS1	+					
NCAM		+	+	+	+	NCAM			+	+	+	+
β-Aktin		+	+	+	+	β-Aktin		+	+	+	+	+

In Versuchsansatz mit CB13 konnte eine Zunahme und Stimulation der KIR-Expression durch die Behandlung der Zellen mit AZA und TSA gezeigt werden. An d14 wurden in der Kontrollprobe nur drei KIR-Rezeptoren exprimiert. Im Vergleich zur Kontrollprobe konnten bei den AZA-stimulierten NK-Zellen sieben weitere KIRs induziert werden und mit TSA

alleine vier weitere KIR-Rezeptoren. Im Gegensatz zu reifen NK-Zellen führte die Blockade der Histondeacetylasen in unreifen NK-Progenitorzellen zu einer Aktivierung weiterer KIR-Rezeptoren (Santourlidis et al., 2002). Bei der Stimulation der Zellen mit beiden Substanzen stimmt das Ergebnis mit dem Resultat der AZA-stimulierten Zellen überein.

Die Wirkung von AZA und TSA wurde in einem weiteren Experiment der NK-Zelldifferenzierung mit CB21 untersucht. Hierbei wurden sortierte Vorläuferzellen in einer Kokultur mit AFT024 differenziert. Es konnte abermals eine Steigerung der KIR-Expression nach Stimulation mit AZA induziert werden. Die Behandlung mit TSA alleine brachte keine zusätzliche Expression der KIR-Gene. Durch AZA und TSA in Kombination konnte KIR2DL5 zusätzlich zur Kontrollprobe exprimiert werden.

Mit CB16 (Tabelle 2-17) wurden zwei Versuchsansätze parallel durchgeführt. Im ersten Ansatz wurden 20000 Zellen pro Well ohne unterstützende Feederzellen kultiviert, und beim zweiten Ansatz wurde die gleiche Zellmenge in einer Kokultur mit AFT024 differenziert. Der Effekt, den diese Zellen bei einer Stimulation mit AZA und TSA auf die differenzierenden Zellen haben, sollte dabei untersucht werden. Die Vorläuferzellen wurden vor Kulturbeginn zweimal nacheinander mit CD34-MicroBeads (5.1.9) aufgereinigt, so dass die Population sehr rein war und anschließend in den 24-Well-Platten kultiviert werden konnte (\pm AFT024).

Tabelle 2-17 Auswertung und Darstellung der NK-Zelldifferenzierung mit und ohne AZA bzw. TSA. Ergebnisse der RT-PCR mit CB16. In diesem Ansatz wurden CD34-positive Zellen ausplattiert (30000/well), welche 2x mit CD34-MicroBeads aufgereinigt und separiert wurden. In diesem Fall wurden parallel zwei Versuchsansätze durchgeführt: (A) Kultivierung der Zellen ohne AFT024, (B) Kultivierung der Zellen auf AFT024-Feederzellen.

(A)		ohne AFT024					(B)		auf AFT024				
CB16	Genotyp2	d11, Ko	d15, Ko	d15, AZA	d15, TSA	d15, A+T	CB16	d11, Ko	d15, Ko	d15, AZA	d15, TSA	d15, A+T	
KIR2DL1	+						KIR2DL1				+	+	
KIR2DL2	+						KIR2DL2					+	
KIR2DL3	+						KIR2DL3						
KIR2DL4	+	+	+		+		KIR2DL4					+	
KIR2DL5							KIR2DL5						
KIR3DL1	+						KIR3DL1						
KIR3DL2	+	+	+			+	KIR3DL2	+	+	+		+	
KIR3DL3	+						KIR3DL3						
KIR2DS1							KIR2DS1						
KIR2DS2	+						KIR2DS2						
KIR2DS3							KIR2DS3						
KIR2DS4	+						KIR2DS4						
KIR2DS5							KIR2DS5						
KIR3DS1							KIR3DS1						
NCAM		+	+	+	+	+	NCAM	+	+	+	+	+	
β -Aktin		+	+	+	+	+	β -Aktin	+	+	+	+	+	

Während der Kultivierung der CD34-positiven Zellen ohne Feederlayer (Tabelle 2-17, A) konnte mit der AZA- und TSA-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle keine weitere KIR-Expression induziert werden. Im Gegensatz dazu lieferte die Kultivierung der Zellen auf den AFT-Feederlayern (Tabelle 2-17, B) nach Zugabe der epigenetisch wirksamen Agenzien in Kombination von AZA und TSA eine zusätzliche Expression der Gene KIR2DL1, KIR2DL2 und KIR2DL4. AZA alleine ergab in diesem Fall keine weitere KIR-Expression, und TSA konnte KIR2DL1 induzieren, jedoch blieb die Expression des zuvor beobachteten Rezeptors KIR3DL2 aus.

Ein weiterer Versuch der NK-Zelldifferenzierung wurde mit einem Apheresat durchgeführt (Tabelle 2-18). Bevor am achten Tag der Kultur AZA und TSA zu den Zellen hinzu gegeben wurden, wurden einige Zellen entnommen, um die KIR-Expression auf RNA-Ebene zu kontrollieren. Damit wurde der Ausgangsstatus der Zellen am Tag der Stimulation bestimmt. An d8 wurde der Rezeptor KIR3DL2 sehr schwach exprimiert. An d13 wurden die behandelten Zellen komplett entnommen und mittels RT-PCR analysiert. Das Ergebnis zeigt, dass im Vergleich zur Kontrollprobe die Stimulation mit AZA die Rezeptoren KIR2DL1 und KIR2DL3 zusätzlich induzieren konnte. Die Expression des Rezeptors KIR3DL3 ist allerdings nur in der Kontrolle zu erkennen und kann weder nach Behandlung mit AZA noch mit TSA beobachtet werden. Generell kann man für den Versuch der stimulierten KIR-Expression während der Differenzierung eines Apheresats sagen, dass die deutlichsten Effekte zu sehen sind, wenn mit AZA stimuliert wird. Die Gabe von TSA bzw. TSA und AZA in Kombination ergab im Vergleich zur Kontrolle keine Zunahme der Expression. Der Genotyp des Apheresats konnte nicht bestimmt werden.

Tabelle 2-18 Auswertung und Darstellung der KIR-Expression während der Differenzierung von CD34-positiven Progenitorzellen eines Apheresats in NK-Zellen mit und ohne AZA bzw. TSA. Ergebnisse der RT-PCR mit CB Nr.21. In diesem Ansatz wurden CD34-positive Zellen auf AFT-Feederzellen ausplattiert (30000/Well), welche mit MACS aufgereinigt und separiert wurden.

Aph	d8, Ko	d13, Ko	d13, AZA	d13, TSA	d13, A+T
KIR2DL1			+		
KIR2DL2					
KIR2DL3			+		
KIR2DL4		+	+	+	+
KIR2DL5					
KIR3DL1					
KIR3DL2	+	+	+	+	
KIR3DL3		+			
KIR2DS1					
KIR2DS2					
KIR2DS3					
KIR2DS4					
KIR2DS5					
KIR3DS1					
NCAM		+	+	+	+
β -Aktin	+	+	+	+	+

2.3.3 Expressionsstatus epigenetischer Enzyme und Repressoren im Verlauf der NK-Zelldifferenzierung

Da KIR-Gene epigenetisch reguliert werden, wurden im Zuge der NK-Zelldifferenzierung einige RNA-Proben hinsichtlich epigenetisch wichtiger und interessanter Enzyme analysiert. Dafür wurde die RNA der Zellen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der NK-Zelldifferenzierung entnommen wurden, zunächst einer Reversen Transkription mit Random-Primern unterzogen und anschließend auf die Micro Fluidic Card aufgetragen (5.2.3). Während nachfolgender Real-Time-PCR konnte mittels TaqMan-Sonden über die emittierte Fluoreszenz die Menge des transkribierten Genprodukts ermittelt werden. Es wurden zum einen epigenetisch relevante Proteingruppen untersucht und zum anderen wurden Transkriptionsfaktoren analysiert, von denen man bereits weiß, dass sie einen Einfluss auf die KIR-Transkription haben:

- DNA-Methyltransferasen (DNMTs)
- Histon-Deacetylasen (HDACs)
- Histon-Acetylasen (HATs)
- Transkriptionsfaktoren (RUNX, TLE)

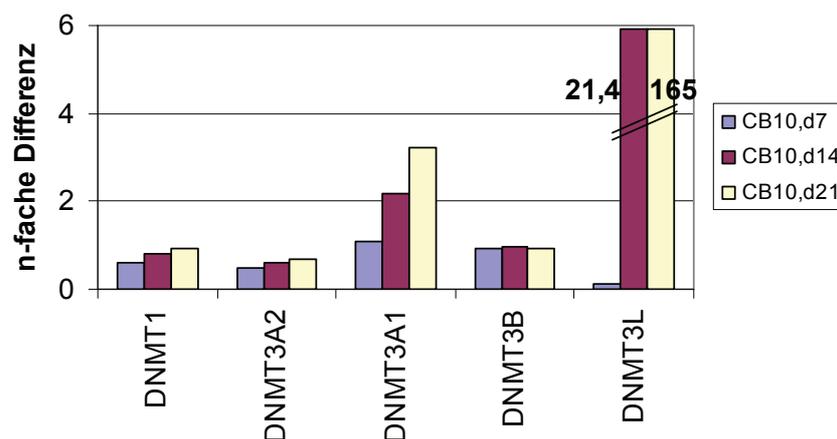


Abbildung 2.23 Graphische Darstellung der Real-Time-TaqMan™ RT-PCR-Ergebnisse der DNMTs. Dargestellt ist die quantitative (n-fache) Menge an drei Zeitpunkten im Vergleich zur Referenzprobe (d0, CD34+CD38^{Lin}). Auf der x-Achse sind die untersuchten Faktoren dargestellt. Für die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode wurde GAPDH als endogene Kontrolle verwendet.

Es wurden fünf CBs untersucht. Beispielfhaft werden die Resultate des CB10 gezeigt. Die Diagramme der übrigen Nabelschnurblute finden sich im Anhang (Abb. 8.1- Abb. 8.4). In den Diagrammen ist jeweils die n-fache Differenz angezeigt und auf der x-Achse sind die

untersuchten Enzyme oder Transkriptionsfaktoren dargestellt. Es wurden für das CB10, welches hier gezeigt ist, drei Zeitpunkte der NK-Zelldifferenzierung ausgewählt (d7, d14, d21). Bei den Erläuterungen der Ergebnisse werden im Folgenden auch die übrigen untersuchten CBs berücksichtigt (Abb. 8.1- Abb. 8.4). Bei den DNMTs war die *de novo* DNA-Methyltransferase 3A1 durchweg stärker exprimiert als die Isoform DNMT3A2. DNMT3A1 und 3A2 sind Isoformen der DNMT3A (Galetzka et al., 2007). Die *de novo* DNMT3B konnte zwar etwas stärker detektiert werden als die Referenzprobe (d0), wurde aber in der Regel im Verlauf der NK-Zelldifferenzierung reprimiert. Die Expression der Erhaltungs-DNMT1 nahm nur bei CB10 im Verlauf der Differenzierung leicht zu. Bei den übrigen CBs wurde eine Expressionsabnahme der DNMT1 im zeitlichen Verlauf beobachtet. Auffällig in allen untersuchten CBs war die DNMT3L. Diese ist selbst nicht katalytisch aktiv, bindet und aktiviert aber die *de novo* DNMTs (1.5.2). Ein sehr starker und stetiger Anstieg im Verlauf der Differenzierung konnte beobachtet werden.

In Abbildung 2.24 sind die Histondeacetylasen aufgeführt. HDAC4 zeigte einen starken Anstieg im Zuge der NK-Zelldifferenzierung und war im Vergleich zu den übrigen Histondeacetylasen immer stärker exprimiert. Auch HDAC9 wurde anfangs verstärkt exprimiert, sank im weiteren Verlauf jedoch wieder etwas ab. Dieses Verhalten der HDAC9 konnte bei allen untersuchten CBs beobachtet werden, genau wie die stärkere Expression dieser beiden HDACs, die für alle untersuchten CBs ähnlich ausfiel.

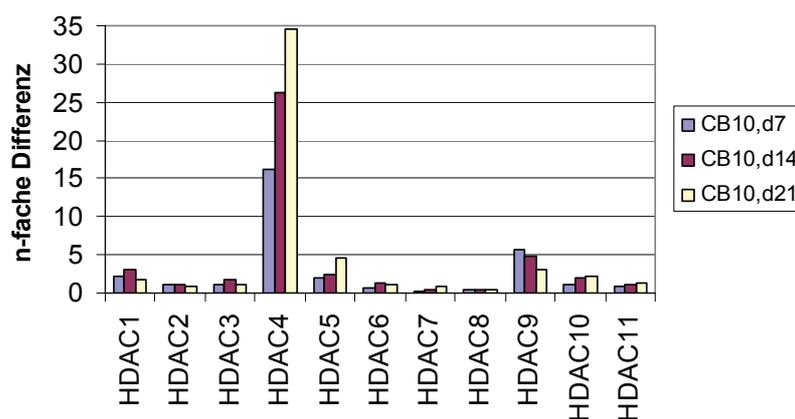


Abbildung 2.24 Graphische Darstellung der Real-Time-TaqManTM RT-PCR Ergebnisse der HDACs. Dargestellt ist die quantitative (n-fache) Menge an drei Zeitpunkten im Vergleich zur Referenzprobe (d0, CD34⁺CD38⁻Lin⁻). Auf der x-Achse sind die untersuchten Faktoren dargestellt. Für die 2^{- $\Delta\Delta C_t$} -Methode wurde GAPDH als endogene Kontrolle verwendet.

Die Histone werden über die Histonacetylasen (HATs) an den Lysin-Resten im N-terminalen Bereich acetyliert. In diesem Zusammenhang wurden zwei Spleißvarianten des Enzyms GCN5L (1 und 2) und die HAT PCAF untersucht (Abbildung 2.25). Sin3A ist Teil eines Korepressorkomplexes und damit für das Abschalten der Transkription verantwortlich. Die methylbindenden Proteine MeCP2 und MBD2 interagieren über Sin3A mit einigen HDACs und sind für die Repression bestimmter Gene zuständig. Die Expressionstärke dieser Proteine im Vergleich zur Referenzprobe d0 ist schwach, jedoch gibt es auch hier Kandidaten, die stärker als andere exprimiert werden. GCN5L1 wurde in allen CBs stärker exprimiert als die Spleißvariante, und die Expression der dritten Histonacetylase PCAF nahm im Verlauf der Differenzierung bei allen CBs stärker zu als die GCN5Ls. Sin3A nimmt abhängig vom Nabelschnurblut entweder ab oder zu. Das gleiche gilt für MeCP2. Auch MBD2 sticht nicht sonderlich hervor, wird aber im zeitlichen Verlauf stärker exprimiert als die Kontrollprobe (d0).

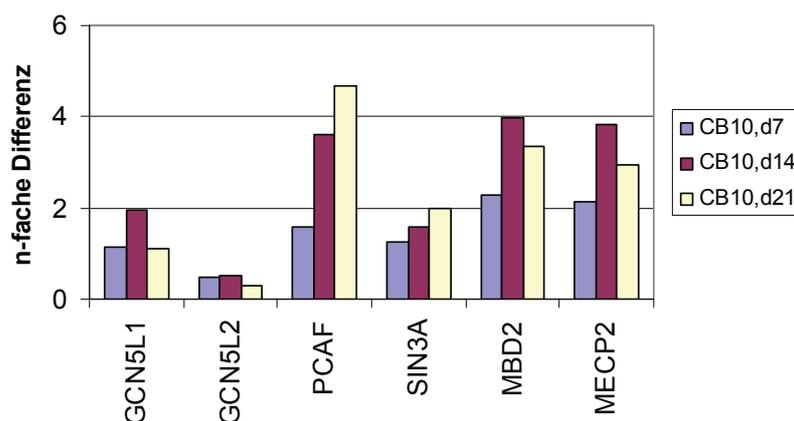


Abbildung 2.25 Graphische Darstellung der Real-Time-TaqMan™ RT-PCR Ergebnisse der HATs und MBPs. Dargestellt ist die quantitative (n-fache) Menge an drei Zeitpunkten im Vergleich zur Referenzprobe (d0, CD34+CD38-Lin-). Auf der x-Achse sind die untersuchten Faktoren dargestellt. Für die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode wurde GAPDH als endogene Kontrolle verwendet.

In Abbildung 2.26 sind die Transkriptionsfaktoren RUNX1-3 und die Korepressoren TLE1-4 analysiert worden. Die Interaktion von RUNX3 mit den KIR-Promotoren wurde bereits publiziert (Trompeter et al., 2005). Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass RUNX3 in allen untersuchten CBs stärker exprimiert wird als RUNX1 und RUNX2. RUNX3 nimmt im Verlauf der NK-Differenzierung kontinuierlich zu.

Das gleiche gilt für TLE1; bei den TLEs handelt es sich um Korepressoren der RUNX-Faktoren. Für TLE1 konnte in allen untersuchten CBs eine höhere Expression beobachtet

werden als für die übrigen TLEs, die im Vergleich zur Referenzprobe (d0) nur unwesentlich zunahm.

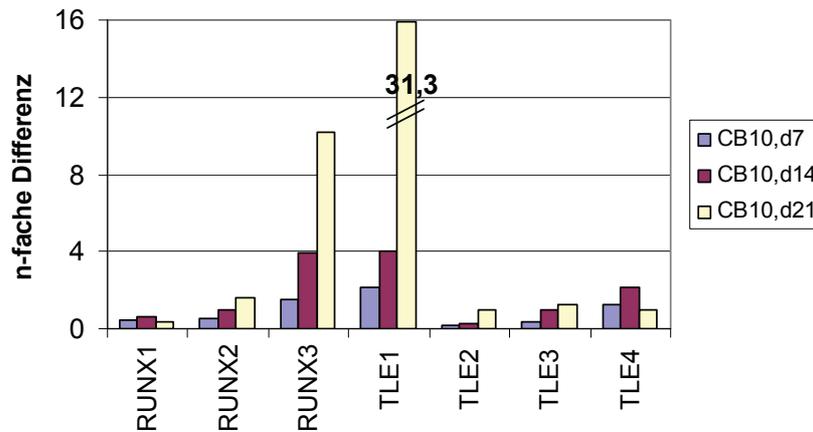


Abbildung 2.26 Graphische Darstellung der Real-Time-TaqMan™ RT-PCR-Ergebnisse der Transkriptionsfaktoren (RUNX) und deren Korepressoren (TLE1-4). Dargestellt ist die quantitative (n-fache) Menge an drei Zeitpunkten im Vergleich zur Referenzprobe (d0, CD34+CD38-Lin-). Auf der x-Achse sind die untersuchten Faktoren dargestellt. Für die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode wurde GAPDH als endogene Kontrolle verwendet.

2.3.4 ChIP-Analysen

Anhand von ChIP-Analysen der Histonmodifikationen kann man Aussagen über die transkriptionelle Kompetenz von Genen machen. Es wurde bereits publiziert, dass die klonotypische Expression der KIR-Gene in NK-Zellen von der DNA-Methylierung der KIR-Promotoren abhängt (Santourlidis et al., 2002). Um den Zusammenhang zwischen den Histonmodifikationen der KIR-Promotoren und dem Expressionsstatus zu durchleuchten, wurden ChIP-Analysen durchgeführt.

Die Promotoren von KIR2DL1, 2DL3, 2DL4 und 3DL1 wurden hinsichtlich euchromatischer und heterochromatischer Histonmodifikationen untersucht. Es wurden Vorläuferzellen eines Apheresats verwendet und in NK-Zellen differenziert. Zu fünf verschiedenen Zeitpunkten wurde Zellmaterial entnommen und mittels ChIP analysiert. Abschließend wurden die DNA-Proben mit sequenzspezifischen Gensonden einer Real-Time-PCR unterzogen.

(Siehe Abb. 2.27.)

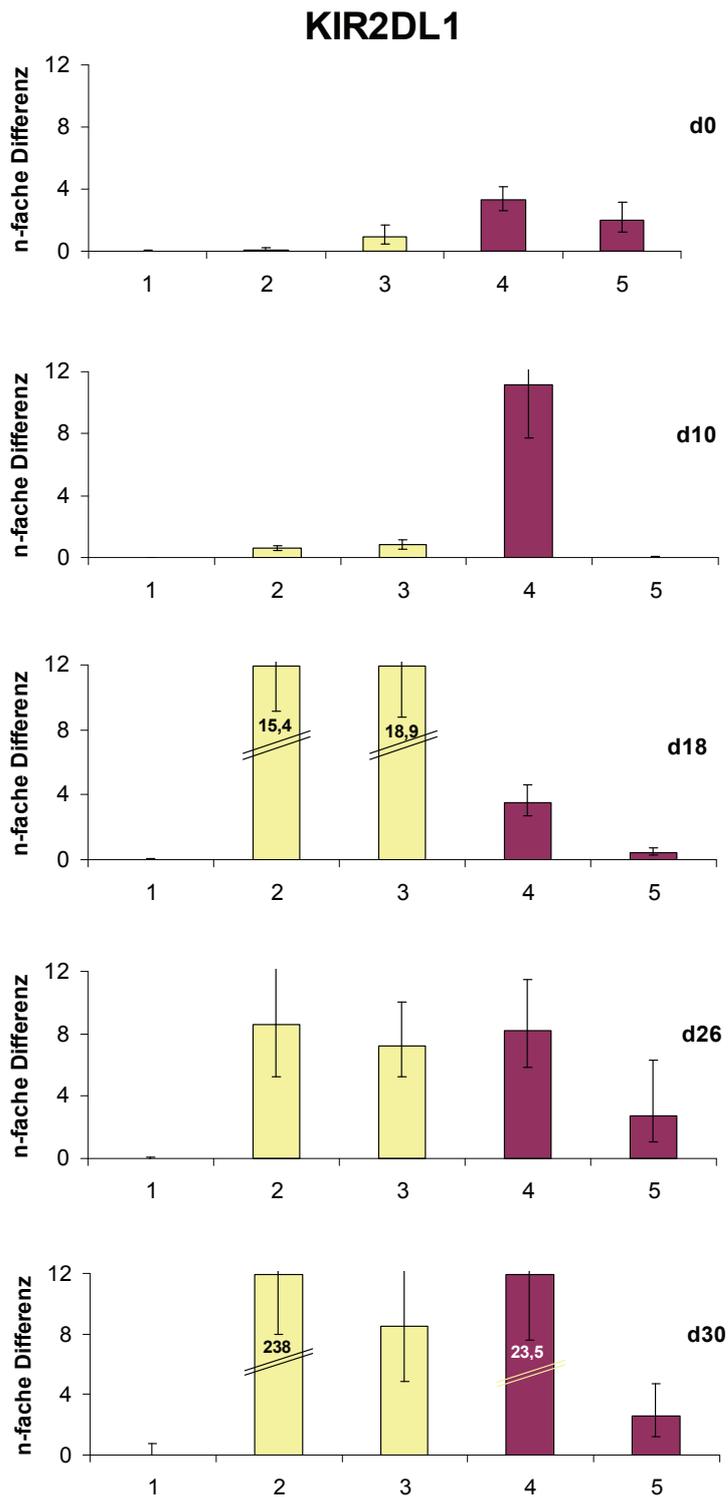


Abbildung 2.27 Ergebnisse der ChIP-Analysen. Untersuchung der Promotorregion von *KIR2DL1* im Verlauf der NK-Zelldifferenzierung. Dabei wurden Histonmodifikationen betrachtet, die auf euchromatische (H4K8ac, H3K4trime) und heterochromatische (H3K9dime, H3K27trime) Zustände hinweisen. Die Zahlen unter den Balken stehen für die jeweiligen Antikörper. 1: Kontroll-AK, 2: H4K8ac, 3: H3K4trime, 4: H3K9dime, 5: H3K27trime.

Für die Untersuchung der Histonmodifikationen während der KIR-Expression wurde eine Auswahl an histonspezifischen AK getroffen. Anhand derer konnten bestimmte Modifikationen gemessen werden, von denen man weiß, dass sie entweder mit exprimierten Genen assoziiert (H4K8ac, H3K4trime) oder an eine inaktive Chromatinstruktur gekoppelt sind (H3K9dime, H3K27trime). Das Ausmaß der Histonmodifikationen konnte im KIR2DL1 Promotor mittels ChIP nachgewiesen werden (Abbildung 2.27). An d0 und d10 dominieren die heterochromatischen Marker H3K9 und H3K27. Diese wurden an d18 schwächer, was mit einer Zunahme der euchromatischen Modifikationen an H4K8 und H3K4 einhergeht. Zu späterem Zeitpunkt der Differenzierung (d26) wird der heterochromatische Marker H3K9 wieder stärker gemessen und nimmt an d30 um das dreifache zu. H4K8 wird an d30 sehr stark exprimiert, so dass trotz Zunahme der Modifikationen für inaktive Genbereiche die Marker für aktive überwiegen. Die Kinetik der Histonmodifikationen passt zum Verlauf der KIR-Expression, die noch zwei bis drei Wochen stark ansteigt und nach weiterer Inkubationszeit wieder abfällt. (Siehe Abb. 2.8.)

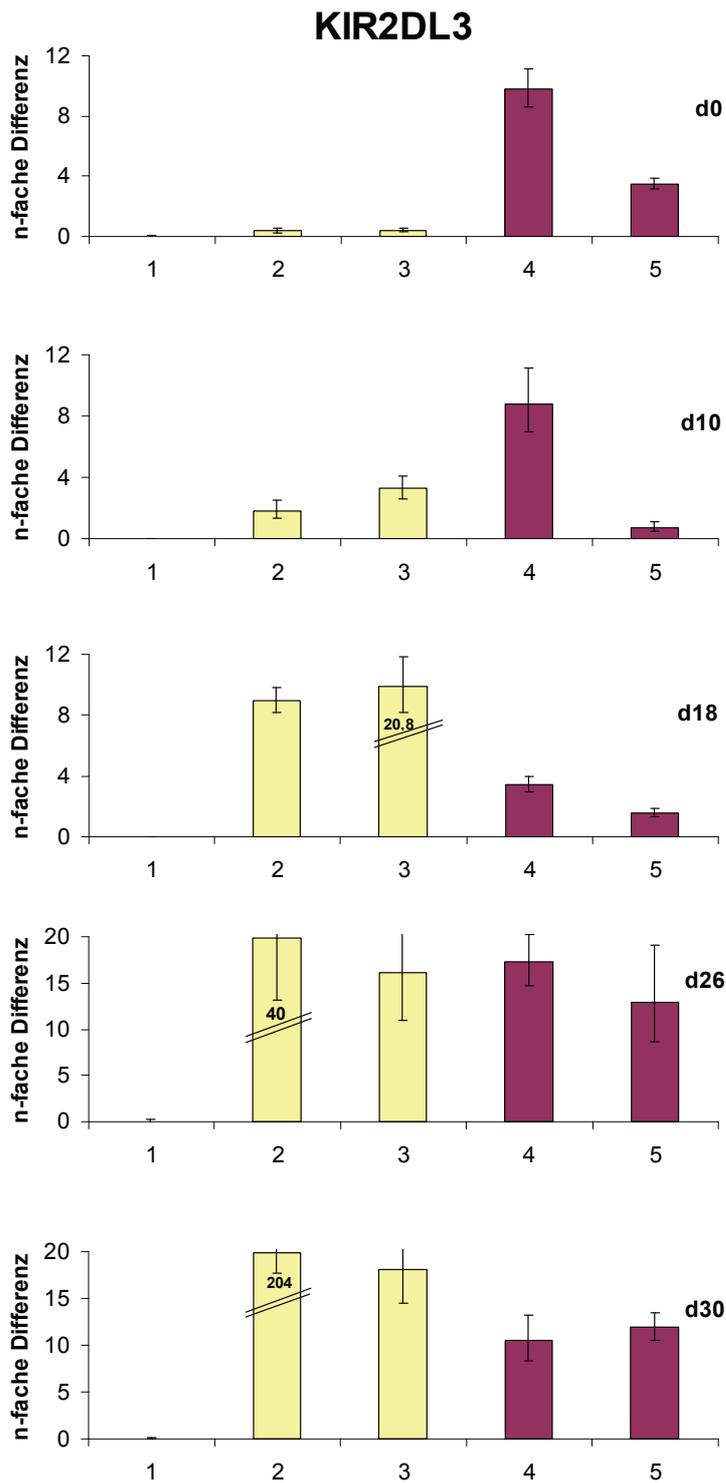


Abbildung 2.28 Ergebnisse der ChIP-Analysen. Untersuchung der Promotorregion von *KIR2DL3* im Verlauf der NK-Zelldifferenzierung. Dabei wurden Histonmodifikationen betrachtet, die auf euchromatische (H4K8ac, H3K4trime) und heterochromatische (H3K9dime, H3K27trime) Zustände hinweisen. Die Zahlen unter den Balken stehen für die jeweiligen Antikörper. 1: Kontroll-AK, 2: H4K8ac, 3: H3K4trime, 4: H3K9dime, 5: H3K27trime.

Für den Bereich des KIR2DL3-Promotors ergibt sich ein ähnliches Bild (Abbildung 2.28), wobei H4K8ac und H3K4trime schon an d10 ansteigen, während zu diesem Zeitpunkt der KIR2DL1-Promotor noch keine Veränderung aufweist, sondern nur einen Anstieg der reprimierten H3K9dime-Markierung zeigt. In den ersten 10 Tagen werden die heterochromatischen Marker stärker detektiert, während die Marker für aktive Gene erst an d18 deutlich zunehmen. An d26 überwiegt H4K8, der an d30 mit einer 208-fachen Menge noch steigt. Die übrigen Marker werden an d26 und d30 etwa gleich stark angezeigt mit einer ca. 15-fach stärkeren Expression im Vergleich zur Negativkontrolle (ohne ChIP-AK).

Die gleichen Resultate wurden für KIR3DL1 erzielt (Abbildung 2.29). KIR2DL4 weist zu Beginn der Differenzierung (d0) die gleichen Ergebnisse auf (Abbildung 2.30). KIR2DL4 ist jedoch der einzige KIR-Rezeptor, der bereits an d10 einen starken Abfall der reprimierten Histonmarker, insbesondere H3K9dime, zeigt. KIR2DL4 weicht an d26 und d30 von den übrigen untersuchten KIRs ab, denn der Marker für aktive Gene (H4K8ac) kann nur schwächer detektiert werden, als es bei den Promotoren von KIR2DL1, KIR2DL3 und KIR3DL1 beobachtet werden konnte.

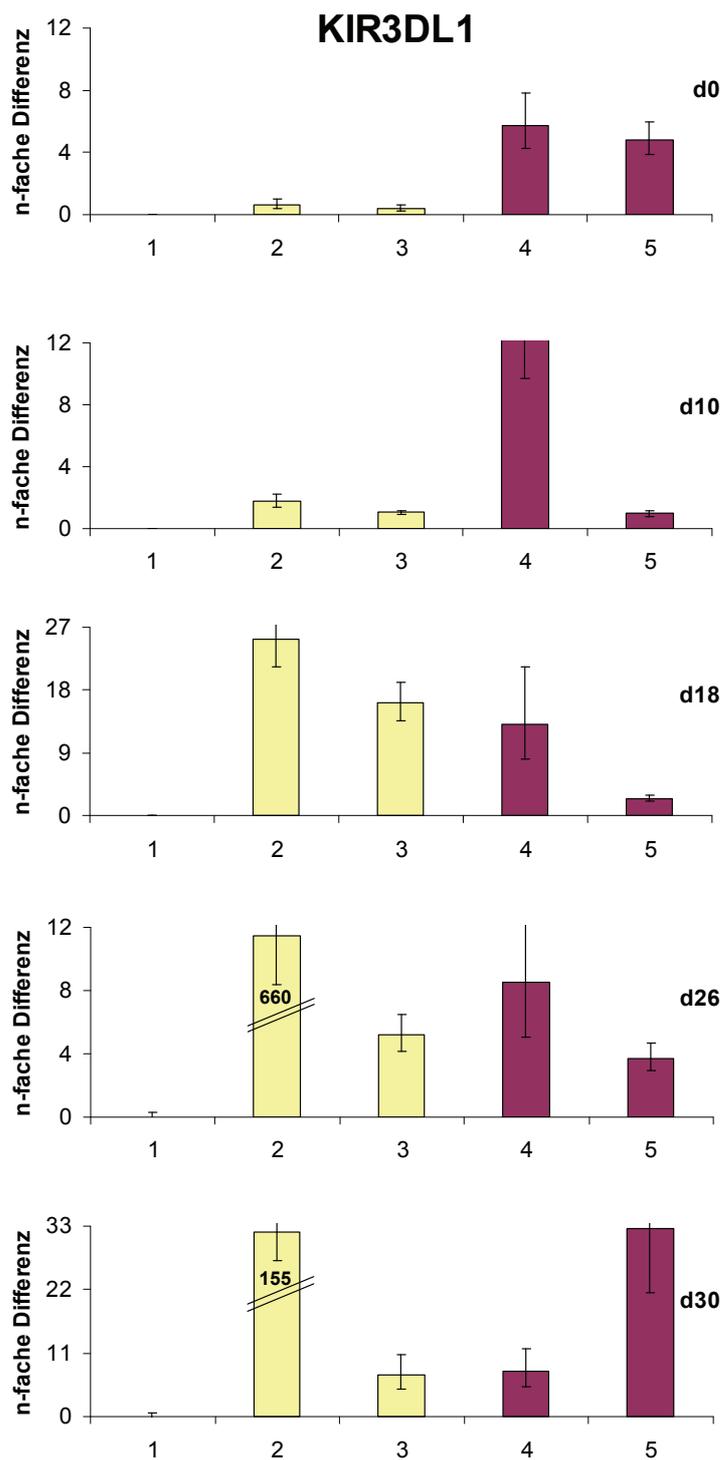


Abbildung 2.29 Ergebnisse der ChIP-Analysen. Untersuchung der Promotorregion von *KIR3DL1* im Verlauf der NK-Zelldifferenzierung. Dabei wurden Histonmodifikationen betrachtet, die auf euchromatische (H4K8ac, H3K4trime) und heterochromatische (H3K9dime, H3K27trime) Zustände hinweisen. Die Zahlen unter den Balken stehen für die jeweiligen Antikörper. 1: Kontroll-AK, 2: H4K8ac, 3: H3K4trime, 4: H3K9dime, 5: H3K27trime.

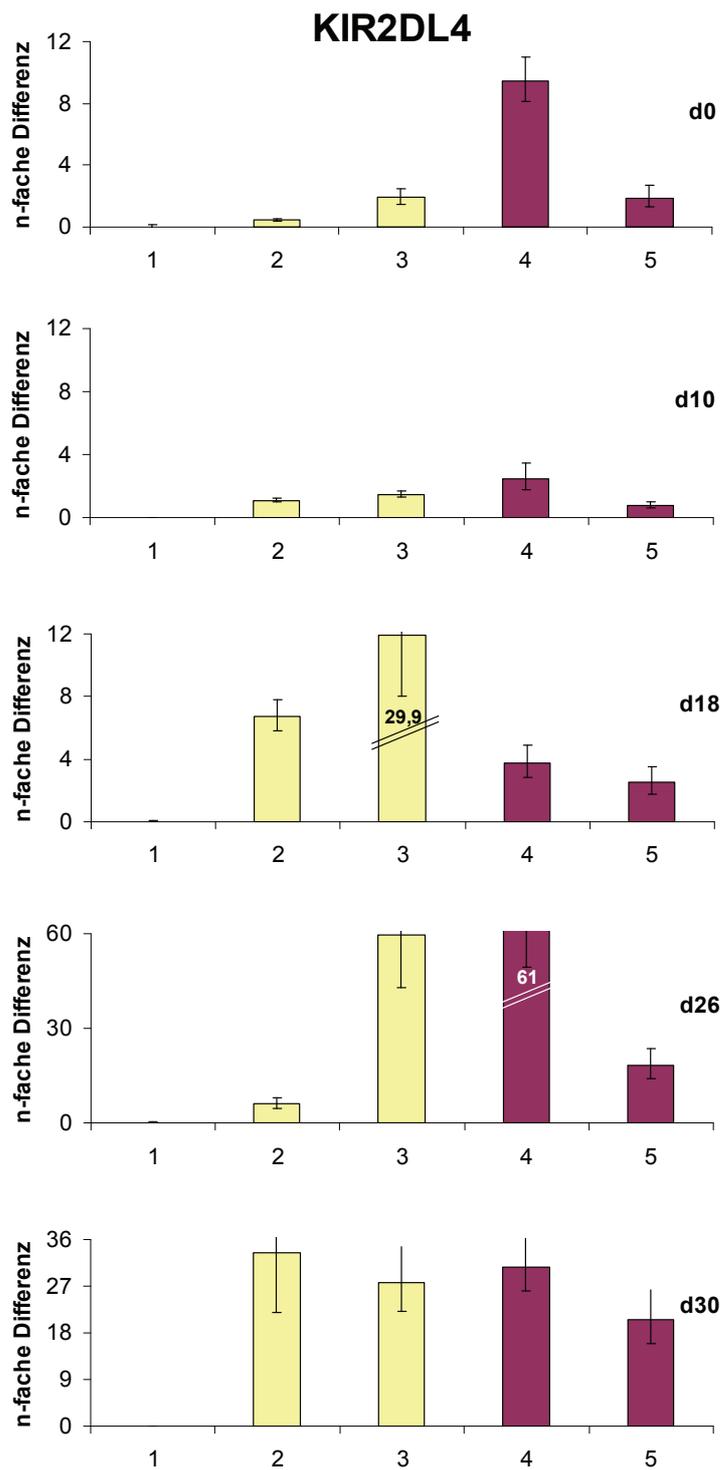


Abbildung 2.30 Ergebnisse der ChIP-Analysen. Untersuchung der Promotorregion von *KIR2DL4* im Verlauf der NK-Zelldifferenzierung. Dabei wurden Histonmodifikationen betrachtet, die auf euchromatische (H4K8ac, H3K4trime) und heterochromatische (H3K9dime, H3K27trime) Zustände hinweisen. Die Zahlen unter den Balken stehen für die jeweiligen Antikörper. 1: Kontroll-AK, 2: H4K8ac, 3: H3K4trime, 4: H3K9dime, 5: H3K27trime.

Aus den obigen Abbildungen (Abbildung 2.27 bis Abbildung 2.30) geht bereits hervor, dass nicht alle KIR-Promotoren in gleicher Weise reguliert werden, was den zeitlichen Ablauf von geschlossener zu offener Chromatinstruktur betrifft. Interessant in diesem Zusammenhang sind die Daten an d10, weil dies der erste Zeitpunkt ist, an dem die aktiven Marker stärker gemessen werden können. Um eine Aussage zum epigenetischen Status der vier untersuchten Promotoren machen zu können, wurde ein Quotient der beiden gegensätzlichen Histonmodifikationen mit H4K8ac als aktivem Marker und H3K9dime als reprimierendem Marker gebildet. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Abbildung 2.31 dargestellt, wobei ein hoher Wert für eine offenere und aktivere Promotorstruktur spricht und niedrige Werte eine anhaltende Repression an d10 widerspiegeln.

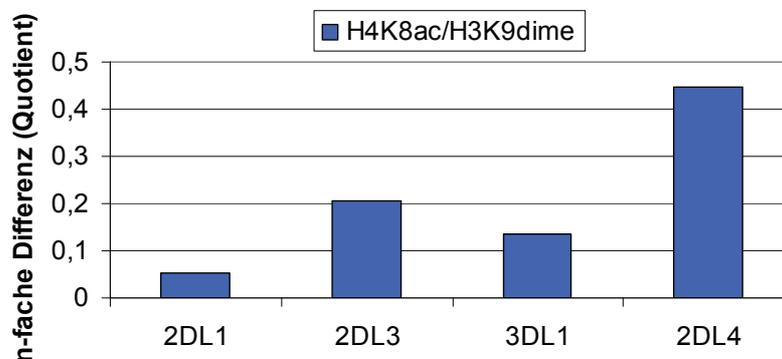


Abbildung 2.31 Darstellung des Quotienten aus H4K8ac und H3K9dime. Der Betrag des Quotienten ist für die untersuchten KIR-Promotoren 2DL1, 2DL3, 3DL1 und 2DL4 wiedergegeben. Die Werte spiegeln den epigenetischen Status der Promotoren wider.

Anhand des Quotienten aus H4K8ac/H3K9dime wird ersichtlich, dass die untersuchten KIR-Promotoren an d10 der NK-Zelldifferenzierung unterschiedlich weit fortgeschritten sind, was die Öffnung des Chromatins betrifft. Von bereits offener zu geschlossener Chromatinstruktur ergibt sich für die untersuchten KIRs folgende Reihung:

$$2DL4 > 2DL3 > 3DL1 > 2DL1.$$

Diese Daten korrelieren mit den bisher gezeigten Ergebnissen.

2.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse des Epigenetik-Teils

Eine Induktion der KIR-Gene mit dem demethylierenden Agenez AZA konnte in den meisten Fällen beobachtet werden. Die Stimulation mit dem Histondeacetylase-Hemmer TSA zeigte teilweise eine Zunahme der KIR-Expression im Vergleich zur Kontrollprobe, was auch bei gleichzeitiger Zugabe beider Stimulanzen beobachtet wurde. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nach der Stimulation mit AZA und TSA die Expression der KIR-Gene zunahm, wenn die hämatopoetischen Vorläuferzellen in einer Kokultur mit der AFT024-Zelllinie differenzieren konnten.

Bei der Untersuchung epigenetischer Faktoren konnten einige Enzyme, Transkriptionsfaktoren und Korepressoren identifiziert werden, die bei der Differenzierung von NK-Zellen aus hämatopoetischen Progenitorzellen stärker exprimiert wurden als andere. Herausragend bei den Analysen waren dabei folgende Proteine:

DNMT3A2, DNMT3L

HDAC4, HDAC9

RUNX3, TLE1

Alle weiteren Faktoren, die mittels RT-PCR untersucht wurden, waren im Vergleich zur Referenzprobe (d0) nur leicht aber nicht signifikant erhöht.

Die Resultate der ChIP-Analysen weisen bezüglich der KIR-Expression im Verlauf der NK-Zellentwicklung auf eindeutige Muster der Histonmodifikationen im Promotorbereich hin. In den ersten zehn Tagen der Differenzierung waren die Marker für heterochromatische Modifikationen stärker ausgeprägt als zu späteren Zeitpunkten. Diese Transkriptions-reprimierenden Histonmodifikationen mussten zuerst herunter reguliert werden, bevor nach 18 Tagen der NK-Zelldifferenzierung ein Anstieg der euchromatischen Marker beobachtet werden konnte.

Zum Ende der Differenzierung (d26, d30) war der Marker H4K8 (aktive Gene) in den Promotoren von KIR2DL1, 2DL3 und 3DL1 sehr stark erhöht. Für KIR2DL4 traf dieser Effekt nicht zu. Die übrigen Marker (H3K4, H3K9, H3K27) waren in den letzten Tagen der NK-Zelldifferenzierung im Vergleich zur Referenzprobe (ohne AK) zwar stärker ausgeprägt, jedoch lassen die Resultate keine Aussage zu, ob zu spätem Zeitpunkt der NK-Zelldifferenzierung euchromatische oder heterochromatische Modifikationen dominieren.

3 Diskussion

3.1 Die Generierung Natürlicher Killerzellen

Ziel dieser Arbeit war es, in einem Modellsystem NK-Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) zu generieren und im Laufe der Differenzierung die Regulation der KIR-Rezeptoren zu untersuchen. Zu diesem Zweck konnte ein reproduzierbares *in vitro* System etabliert werden, welches die Entwicklung von NK-Zellen ermöglichte. Wie sich herausstellte, war die am besten geeignete Quelle für die Ausgangspopulation der hämatopoetischen Progenitorzellen das Nabelschnurblut (Cord Blood, CB). Ein Grund für die guten Resultate mit den Progenitoren aus CB könnte sein, dass diese eine höhere Frequenz primitiver Stammzellen enthalten, die über ein qualitativ und quantitativ größeres Differenzierungspotential verfügen als HSZ aus Knochenmark und Apheresat. Die aus CB stammenden HSZ konnten in NK-Zellen generiert werden, welche entsprechend ihres KIR- und HLA-Genotyps NK-zellspezifische Rezeptoren exprimierten, was durchflusszytometrisch nachgewiesen werden konnte (Abb.2.3, Abb.2.13). Das verwendete *in vitro* System basierte auf dem Modell von Miller et al., die zeigen konnten, dass eine *in vitro* Differenzierung von NK-Zellen aus HSZ ($CD34^+CD38^-Lin^-$) des Knochenmarks und des Nabelschnurblutes auf der fetalen hepatischen Stromazelllinie AFT024 möglich ist (Miller and McCullar, 2001). Es wurde gezeigt, dass der direkte Zellkontakt dieser Zelllinie mit den HSZ optimal für die NK-Zelldifferenzierung und die Expression spezifischer NK-Rezeptoren war. Es stellte sich weiterhin heraus, dass die AFT024 einer adhäsionsabhängigen Inhibition der Zellteilung entgegenwirkte und tatsächlich bessere Resultate durch direkten Zell-Zell-Kontakt brachte als die Knochenmarkstromazelllinie M2-10B, welche eine Proliferation und Differenzierung der HSZ zu behindern scheint (Punzel et al., 2002). Das Medium zur Differenzierung der NK-Zellen enthielt die Zytokine IL-2, IL-3, IL-7, IL-15, SCF und FLT-3-Ligand. Die damit erzielten Erfolge waren gut, sollten mit IL-21 aber optimiert werden. Über den Rezeptor IL-21R werden Proliferation, Differenzierung und die Effektormechanismen der B-, T- und NK-Zellen aktiviert (Mehta et al., 2004). Die Zugabe von IL-21 zum NK-Zelldifferenzierungs-Medium brachte keine Verbesserung der NK-Zellentwicklung: Die Anzahl der NK-Zellen und die Expression der NK-zelltypischen Marker reduzierte sich. Die Wirkung

von IL-21 könnte daher abhängig vom umgebenden Milieu sein und nur in Kombination mit bestimmten Medien und Zytokinen optimale Wirkung zeigen.

3.2 Die Expression der KIR-Rezeptoren von Natürlichen Killerzellen

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der KIR-Rezeptoren während der NK-Zelldifferenzierung. Im Folgenden sollen die gewonnenen Ergebnisse, die durchflusszytometrisch und mittels RT-PCR erhalten wurden, diskutiert werden.

3.2.1 Phänotypische KIR-Expression

Die hämatopoetischen Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut konnten in reife und funktionale NK-Zellen differenziert werden. Der Verlauf wurde mikroskopisch beobachtet (Abb. 2.5). Dabei konnte zunächst die Entstehung von Proliferationsinseln verfolgt werden, die aus einer einzelnen Zelle hervorgehen. Im weiteren Verlauf war eine Formveränderung der rundlichen Progenitorzelle in eine längliche, Komma-ähnliche NK-Zelle zu beobachten. Während dieser Entwicklung wurden mehrfach Zellen entnommen und mit fluoreszenzkonjugierten Antikörpern markiert. Von Interesse waren die Marker CD34 und CD56, durch die eine immunhistochemische Veränderung der NK-Zelldifferenzierung dokumentiert werden konnte sowie eine Reihe von KIR-spezifischen Antikörpern. Es konnte gezeigt werden, dass die NK-Zellpopulation aus der hämatopoetischen Vorläuferzelle hervorgeht. Dabei nahm, wie erwartet, mit zunehmendem Verlauf der Differenzierung der prozentuale Anteil der NK-Zellen zu und der Anteil der CD34-Progenitorzellen ab (Abb. 2.6 und 2.7). Es gab während der durchflusszytometrischen Untersuchungen nur wenige Zellen, die doppelt positiv für CD34 und CD56 waren. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Vorläuferzellen nach Festlegung der Differenzierungsrichtung und der damit einhergehenden Expression von CD56 den Progenitor-spezifischen Marker CD34 sehr schnell reprimieren, so dass diese beiden Marker nur in einem sehr kleinen Zeitfenster auf der Zelloberfläche koexprimiert werden. Die KIR-Rezeptoren konnten zwischen d20 und d30 auf der Zelloberfläche detektiert werden. Für einige Experimente fiel der Zeitpunkt der ersten KIR-Expression auf der Zelloberfläche deutlich später aus (Abb.2.13). Ein genaues Zeitfenster für die Expression der ersten KIR-

Rezeptoren konnte anhand der Daten nicht gemacht werden. In vielen Versuchen war eine phänotypische Reihung von früher zu später Expression der KIR-Rezeptoren ersichtlich, (z.B. Abb. 2.13) und zwar

NKAT2 (KIR2DL2/3/S2) > CD158a (KIR2DL1/S1) > NKB1 (KIR3DL1/S1) > CD158i (KIR2DS4)

Die KIR-Rezeptoren 2DL2, 2DL3 und 2DS2 wurden als erste auf der Zelloberfläche detektiert. 2DL1/S1 kam im zeitlichen Verlauf etwas später auf die Zelloberfläche, konnte aber vor dem Rezeptor 3DL1 gemessen werden. Als einer der letzten KIR konnte in den meisten Experimenten KIR2DS4 nachgewiesen werden. Miller et al. hatten bereits zuvor mit den Antikörpern NKAT2, CD158a und NKB1 die Expression der KIR-Gene in *in vitro* generierten NK-Zellen analysiert. Dabei handelte es sich jedoch um einen anderen Ansatz, denn es wurden nach Vollendung der NK-Zelldifferenzierung nur abschließende durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten sie zeigen, dass NKAT2 (2DL2, 2DL3, 2DS2) am stärksten auf der Oberfläche zu detektieren war. CD158a und NKB1 wurden zu etwa gleichen Anteilen gemessen (Miller and McCullar, 2001).

Da die zur Verfügung stehenden KIR-Antikörper in vielen Fällen nicht zwischen verschiedenen, sehr ähnlichen KIR unterscheiden (z.B. NKAT2, s.o.) und außerdem mit den zur Verfügung stehenden AK nicht alle vorhandenen KIR-Rezeptoren abgedeckt werden können, war für eine genauere Untersuchung der KIR-Regulation im Zuge der Differenzierung eine Analyse auf Transkriptebene notwendig.

3.2.2 Genotypische KIR-Expression

Durch immunhistochemische Analysen konnte man anhand der vorhandenen Antikörper auf eine Reihung der KIR-Expression schließen. Um alle KIR-Rezeptoren während der Differenzierungskinetik der NK-Zellen zu erfassen, wurden RT-PCRs mit sequenzspezifischen Gensonden durchgeführt. Betrachtet man die Abbildungen 2.10-2.12 kann man zunächst sagen, dass alle KIR-Gensonden die erwarteten Ergebnisse bzw. Fragmentlängen gezeigt haben. Die genotypisch vorhandenen KIR-Rezeptoren konnten detektiert werden. Die Daten zeigen einheitlich eine sehr frühzeitige und starke Expression des Rezeptors KIR2DL4 für den kein entsprechender AK zur Verfügung stand. Der Zeitpunkt der Expression variiert,

was vermutlich vom Differenzierungspotential des jeweiligen Nabelschnurbluts abhängig ist. Beispielsweise lag der früheste Zeitpunkt für die Detektion von KIR2DL4 an d12 (CB01) und der späteste lag bei d28 (CB26). Je später der erste KIR-Rezeptor auf Transkriptebene nachgewiesen werden konnte, umso langsamer war die generelle Entwicklung der NK-Zellen und umso länger konnten sie kultiviert werden (d47).

In den meisten Experimenten wurde KIR2DL3 gleichzeitig, aber schwächer als KIR2DL4 exprimiert. Die in der vorliegenden Arbeit generierten Daten lassen demnach die Aussage zu, dass es sich bei KIR2DL4 und KIR2DL3 um die ersten exprimierten KIR-Rezeptoren handelt. Dann erst werden die anderen KIRs transkribiert, aber eine Reihung der übrigen kann nicht definitiv festgestellt werden.

Auch die Daten der EZ-Experimente lassen die Schlussfolgerung zu, dass KIR2DL4 präferenziell der erste exprimierte KIR-Rezeptor ist. Er konnte durchschnittlich auf ca. 70 % aller untersuchten Klone als einziger exprimierter KIR-Rezeptor detektiert werden. Die übrigen Klone exprimierten folgende KIR-Rezeptoren: KIR3DL3 (CB10), KIR2DS2 (CB14), KIR2DL3 und 2DL5 in gleichen Anteilen (CB15). Alle drei verwendeten CBs hatten verschiedene KIR-Genotypen, so dass eventuell ein Zusammenhang zwischen der Reihung der KIR-Expression und dem vorliegenden Genotyp besteht. Es müssten vergleichende Untersuchungen mit Vorläuferzellen von Nabelschnurbluten desselben KIR-Genotyps durchgeführt werden, um diese Frage zu beantworten.

Auch die Ergebnisse der partiell entnommenen Klone weisen auf eine präferenzielle Expression des Rezeptors KIR2DL4 hin. Bei etwa 1/3 der Klone nahm die Anzahl der exprimierten KIRs im Verlauf der Kultivierung zu. Sowohl die frühen als auch die späteren Analysen der Klone zeigen, dass KIR2DL4 von den meisten Klonen exprimiert wurde (3/7, 7/7, Tab. 2-4). Weiterhin zeigen die Klone, die im zeitlichen Verlauf die Anzahl der KIR-Rezeptoren reprimierten das gleiche Bild, denn KIR2DL4 konnte eindeutig am häufigsten auf den meisten Klonen gemessen werden. Generell reflektieren die Ergebnisse der klonalen KIR-Expression (Tabellen 2-12, 2-14, 2-15, 8-4, 8-5) die Resultate der Bulk-Experimente. Klone, die früh untersucht wurden, zeigen einen Anstieg der KIR-Expression, und bei Klonen, die spät analysiert wurden, konnte ein Verlust der KIR-Rezeptoren beobachtet werden, wobei jeder Klon seine eigene Kinetik aufwies. Die Daten beider Versuchsansätze (Bulk und EZ-Ablagen) zeigen, dass die NK-Zelldifferenzierung in drei Phasen eingeteilt werden kann, was die Expression der KIR-Gene betrifft: In allen untersuchten CBs konnte beobachtet werden,

dass zu Beginn der Differenzierung keine oder nur sehr wenige KIRs transkribiert wurden. Im weiteren Verlauf kam es langsam zur Ausbildung des kompletten, vorhandenen KIR-Repertoires, welches für einige Tage stabil blieb und in der letzten Phase der Differenzierung wieder herunter reguliert wurde. Eine mögliche Erklärung für den Verlust der KIR-Rezeptoren ist, dass die natürliche Lebensphase der NK-Zellen beendet ist und die Zellen apoptotisch werden, was mikroskopisch beobachtet werden konnte. Über die Lebensdauer von NK-Zellen *in vivo* ist bisher nur wenig bekannt, weshalb es sich auch um ein Zellkulturartefakt handeln könnte, wodurch NK-Zellen *in vitro* nur einige Wochen überlebensfähig sind.

3.2.3 Die Korrelation phänotypischer und molekularbiologischer KIR-Analysen

Die Expression der KIR-Gene konnte sowohl durchflusszytometrisch als auch molekularbiologisch mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Beide Methoden wurden für einige CBs parallel durchgeführt, was einen direkten Vergleich zwischen Transkriptionsstatus und der Expression der KIRs auf der Zelloberfläche zuließ. Ein Vergleich war jedoch nur für die Rezeptoren KIR2DL1, 2DL3, 3DL1 und 2DS4 möglich, weil für die übrigen KIRs keine spezifischen Antikörper vorhanden waren (3.2.1). Die vergleichenden Analysen wurden für CB23 (Tab. 2-10), CB24 (Tab. 8-1), CB25 (Tab. 8-2) und CB26 (Tab. 8-3) durchgeführt. Bei Betrachtung der Tabellen erkennt man, dass die KIR-Rezeptoren in der Regel zunächst mittels RT-PCR nachgewiesen werden konnten und einige Tage später auch auf der Zelloberfläche zu messen waren. Diese Beobachtungen sind nicht überraschend, denn bevor der Rezeptor generiert und an seinen Bestimmungsort transportiert werden kann, muss er transkribiert werden. Einige der untersuchten Rezeptoren wurden gleichzeitig auf RNA-Ebene und auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Hier kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Zeitpunkt der Untersuchung im zeitlichen Verlauf zu spät gewählt war und damit die Detektion der vorzeitigen Expression des Rezeptors auf Transkriptionsebene verpasst wurde. KIR-Rezeptoren, die mittels RT-PCR nicht nachgewiesen werden konnten, wurden auch nicht durchflusszytometrisch auf der Zelloberfläche verifiziert.

3.2.4 Die Expression des KIR-Rezeptors KIR2DL4

Eine Frage, die sich stellt, lautet: Warum wird KIR2DL4 als erster Rezeptor exprimiert? Denn KIR2DL4 kann auf der Zelloberfläche nur auf einer kleinen Population von CD56^{bright}-Zellen detektiert werden. Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein eines bestimmten Allels, welches die vollständige Ausbildung des Proteins gewährleistet (Goodridge et al., 2003). KIR2DL4 ist als Mitglied der KIR-Familie einzigartig in seiner Funktion, denn es kann aufgrund seiner Struktur inhibitorische und stimulatorische Funktionen ausüben (Trowsdale et al., 2001), und es ist als Framework-KIR-Gen in allen KIR-Genotypen enthalten. Eine mögliche Erklärung für die sehr frühe Expression des KIR2DL4 im Vergleich zu den anderen KIR-Mitgliedern könnte in der bivalenten Struktur dieses Rezeptors liegen, der mit stimulatorischen und inhibitorischen Motiven beide Mechanismen für intakte NK-Zellen vereint und damit die Zelle minimal, aber vollständig ausstattet. Zusätzlich zu dieser Erklärung kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Position des *KIR2DL4*-Gens im Leukozyten-Rezeptor-Komplex auf Chromosom 19 eine Rolle spielt, denn *KIR2DL4* ist mittig auf dem KIR-Lokus platziert (Abbildung 3.1).

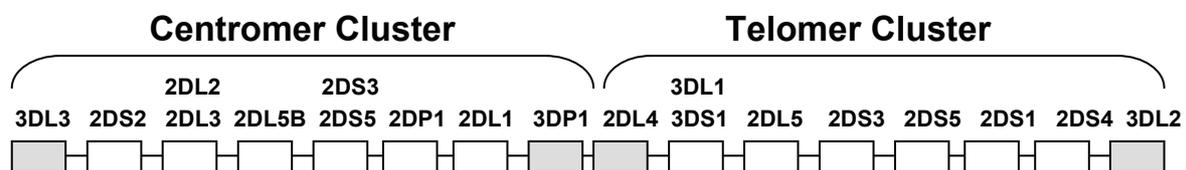


Abbildung 3.1 Anordnung der KIR-Gene im KIR-Lokus. Die Framework-Gene, welche in jedem KIR-Genotyp enthalten sind, wurden grau hervorgehoben. Der KIR-Lokus kann in einen Centromer-naheren Cluster und einen Telomer-naheren Cluster unterteilt werden.

Eine Theorie geht davon aus, dass der KIR-Lokus im Verlauf der NK-Zellentwicklung verschiedene epigenetische Phasen durchläuft (Uhrberg, 2005). Initial sind die Promotoren der KIR-Gene in der NK-Progenitorzelle stark methyliert und damit unzugänglich für Transkriptionsfaktoren und Polymerasen. Auch die Kondensation des Chromatins spielt für die Transkription der KIR-Gene eine Rolle, weil die Histone deacetyliert vorliegen, was eine heterochromatische Konformation der Gene zur Folge hat. Im weiteren Verlauf der NK-Zellentwicklung werden zunächst die Histone um den KIR-Lokus acetyliert, so dass es zu einer offenen Chromatinstruktur kommt. Man geht davon aus, dass die KIR-Gene zu diesem

Zeitpunkt durch Methylierung der CpG-Dinukleotide in den Promotoren epigenetisch noch immer nicht zugänglich sind. Die Demethylierung der KIR-Gene beginnt im Verlauf der NK-Zellreifung sequentiell, beginnend mit KIR2DL4 (Uhrberg, 2005). Diese Hypothese korreliert mit den Daten aus dieser Arbeit. Für die frühe Expression dieses Rezeptors spricht auch die Tatsache, dass KIR2DL4 der einzige KIR ist, der auf NK-Zellen aus peripherem Blut und auch auf T-Zellen alleine exprimiert werden kann (Valiante et al., 1997; Young et al., 2001).

3.3 *Expressionsverhalten und klinische Relevanz von KIR2DL1 und KIR2DL3 für die Stammzelltransplantation*

Die funktionelle Kapazität einer NK-Zelle wird von der Expression ihrer Rezeptoren bestimmt. Yu et al. haben gezeigt, dass die inhibitorischen KIRs, die spezifisch für HLA-Klasse-I-Moleküle sind, zu den wichtigsten Mediatoren der Effektorfunktion von NK-Zellen gehören (Yu et al., 2007). Einer der KIR-Rezeptoren, der HLA-Klasse-I-Moleküle erkennt, ist der HLA-C1-spezifische KIR2DL3. Er wird neben KIR2DL4 als einer der ersten KIR-Rezeptoren exprimiert. Die Resultate bezüglich der sequentiellen KIR-Expression speziell für die frühe Expression des Rezeptors KIR2DL3 korrelieren mit den Beobachtungen beim Transplantationsverlauf von CML-Patienten. Dabei wurde beobachtet, dass Patienten, die HLA-C1 homozygot sind, eine bessere „allgemeine Überlebensrate“ (overall survival) hatten, als solche, die HLA-C2 homozygot waren (Fischer et al., 2007). Da HLA-C1 und HLA-C2 Liganden der inhibitorischen Rezeptoren KIR2DL3 (C1) und KIR2DL1 (C2) sind, wurde die Hypothese aufgestellt, dass der unterschiedliche klinische Verlauf mit der unterschiedlichen Expression der entsprechenden KIRs zusammenhängt (Fischer et al., 2007). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden semiquantitative Real-Time-PCR-Analysen mit sequenzspezifischen Gensonden für die Rezeptoren KIR2DL1 und 2DL3 durchgeführt. Die Ergebnisse der zuvor durchgeführten RT-PCRs (Abb.2.14) konnten mit den Real-Time-PCRs bestätigt werden. 2DL1 wird im zeitlichen Verlauf der NK-Zellentwicklung nicht nur später, sondern auch schwächer exprimiert als KIR2DL3 (Abb.2.15, Abb.2.16). Im Verlauf der NK-Zellreifung entstehen damit zunächst C1-kompetente NK-Zellen, die KIR2DL3 auf der Zelloberfläche tragen und erst später C2-kompetente, KIR2DL1-exprimierende NK-Zellen. Die Abwesenheit von NK-Zellen mit spezifischen KIR-Rezeptoren in der frühen Phase nach Stammzelltransplantation könnte für C2-homozygote Patienten einen entscheidenden Nachteil darstellen, der zu einer verspäteten Rekonstitution eines funktionalen NK-Zellrepertoires

führt. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die deutlich schlechteren Überlebensraten der C2-homozygoten CML-Patienten sein. Die hier gewonnenen Daten wurden bereits publiziert (Fischer et al., 2007) und konnten die klinische Relevanz der KIR-Rezeptoren und des KIR-Polymorphismus für die Transplantation von HSZ nachweisen.

3.4 Der Einfluss von epigenetisch wirksamen Substanzen auf die KIR-Expression

NK-Zellen lassen sich anhand der Expression ihrer KIR-Rezeptoren charakterisieren. Dabei exprimiert jede NK-Zelle einen individuellen Bestand an inhibitorischen und stimulatorischen KIRs, welchen sie beständig beibehält und somit zu einem breit gefächerten Repertoire der NK-Zellpopulation eines Organismus beiträgt. Die klonale Expression der KIR-Rezeptoren korreliert mit dem DNA-Methylierungsstatus der CpG-Inseln im Promotor der KIR-Gene (Chan et al., 2003; Santourlidis et al., 2002). Santourlidis et al. untersuchten DNA-Methylierungsmuster im Bereich der KIR-Promotoren und konnten zeigen, dass CpG-Inseln den Transkriptionsstart jedes KIR-Gens umgeben. Die CpGs waren durchweg unmethyliert bei exprimierten KIR-Rezeptoren und methyliert bei nicht-exprimierten KIRs (Santourlidis et al., 2002). Die Resultate der vorliegenden Arbeit sind mit diesen Beobachtungen kompatibel: eine Behandlung mit dem DANN-demethylierenden Agenz AZA führte zu einer zusätzlichen Induktion der klonal exprimierten KIR-Rezeptoren. Die proliferierenden NK-Zellen wurden während ihrer Differenzierung mit AZA behandelt und die nachfolgenden Untersuchungen ergaben, dass im Vergleich zur Kontrollprobe (ohne AZA) zusätzliche KIRs mittels RT-PCR gemessen werden konnten (Tab. 2-16, Tab. 2-18). Im Gegensatz zu den bisherigen Beobachtungen mit ausgereiften NK-Zellen konnte die Anzahl der KIRs in manchen Experimenten nur durch zusätzliche Gabe von Trichostatin A (TSA) in Kombination mit AZA herbeigeführt werden (Tab. 2-17). Da TSA als Histondeacetylasehemmer wirkt und eine offene Chromatinstruktur induziert, kann man davon ausgehen, dass in diesen Fällen der KIR-Lokus noch stark kondensiert und verschlossen war, so dass eine effektive epigenetische Aktivierung nur synergistisch mit AZA und TSA zu erreichen war. Überraschenderweise führte die Behandlung der NK-Zellen mit TSA, aber ohne AZA in einem Experiment zur Induktion der KIR-Expression (Tab. 2.16, CB13). In reifen NK-Zellen konnte dieser Effekt nie beobachtet werden. Eine wahrscheinliche Erklärung für diese wichtige Rolle von TSA für die Expression von KIR im Verlauf der NK-Zelldifferenzierung ist die Tatsache, dass der

KIR-Lokus in unreifen NK-Zellen sowohl DANN-methyliert als auch heterochromatisch ist, während er in reifen NK-Zellen eine aktive Histonsignatur aufweist (Santourlidis et al., 2008). Aus diesem Grund sollte TSA in reifen NK-Zellen keine zusätzliche Histonacetylierung d.h. Aktivierung hervorrufen, während es in unreifen NK-Vorläuferzellen sehr wohl zur *de novo* Expression von KIR beitragen könnte. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die Funktion epigenetisch wirksamer Agenzien entscheidend vom Zeitpunkt der Gabe abhängt. So zeigte TSA aufgrund des oben gesagten keine Wirkung mehr, wenn es zu einem späten Zeitpunkt der NK-Zelldifferenzierung gegeben wurde. Im Gegensatz dazu führte AZA nicht nur in unreifen sondern auch reifen NK-Zellen zu einer KIR-Induktion. Dies hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass auch in reifen NK-Zellen immer eine signifikante Anzahl der KIR-Gene durch DNA-Methylierung reprimiert ist, so dass eine durch AZA hervorgerufene Hemmung der DNMT1-Methyltransferase zu einer Aktivierung dieser abgeschalteten Gene führt.

3.5 Welche epigenetischen Faktoren beeinflussen die KIR-Expression?

Es gibt mittlerweile viele Hinweise auf eine Beteiligung epigenetischer Mechanismen an der Modulation von Immunreaktionen (Jones and Takai, 2001). Diesbezüglich wurden bisher die meisten Studien an B- und T-Zellen durchgeführt. Dabei konnte z.B. demonstriert werden, dass die Organisation der B- und T-Zell-Rezeptoren abhängig von epigenetischen Modifikationen der entsprechenden Gene ist (Krangel, 2001; Lee et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit lag das Augenmerk auf der Differenzierung von NK-Zellen und im Zuge dieser Entwicklung bestand die Möglichkeit eine Anzahl von epigenetischen Schlüsselfaktoren zu analysieren. Bei der Untersuchung dieser Faktoren konnten einige Enzyme, Transkriptionsfaktoren und Korepressoren identifiziert werden, die eine Rolle bei der Differenzierung von NK-Zellen aus hämatopoetischen Progenitorzellen zu spielen scheinen. Herausragend und stark exprimiert waren bei den Analysen folgende Proteine:

DNMT3A2, DNMT3L

RUNX3, TLE1

HDAC4, HDAC9

DNA-Methyltransferasen

Die DNA-Methyltransferasen (DNMTs) sind verantwortlich für die Übertragung von Methylgruppen auf die CpG-Dinukleotide. Es gibt ein Modell, das besagt, dass die DNMT3A und 3B die Rolle der *de novo* Methyltransferasen einnehmen und damit in der Gametogenese und frühen Zellentwicklung aktiv beteiligt sind. Im Gegensatz dazu ist in diesem Modell die DNMT1 die „erhaltende“ Methyltransferase und methyliert bevorzugt hemimethylierte DNA-Stränge (Okano et al., 1999). Die tatsächliche Situation ist jedoch komplizierter, da die DNMT1 unter bestimmten Umständen nicht nur hemimethylierte, sondern auch unmethylierte DNA methyliert, also ähnlich wie DNMT3A und DNMT3B als *de novo* Methylase wirken kann (Yoder et al., 1997). In allen fünf untersuchten CBs war die DNMT3A1 im Vergleich zur Isoform DNMT3A2 stärker exprimiert und nahm im zeitlichen Verlauf an Transkriptmenge zu. Die Daten zeigen eine Abnahme der DNMT1 im zeitlichen Verlauf der NK-Zelldifferenzierung, was mit der Einschränkung der Proliferation der Zellen und deren Apoptose einhergeht. Noch höher war die n-fache RNA-Menge der DNMT3L, die katalytisch nicht aktiv ist (Chedin et al., 2002), aber über die Bindung an die *de novo* DNMTs diese wiederum aktiviert (Gowher et al., 2005; Suetake et al., 2004). Nimura et al. konnten zeigen, dass die DNMT3L in embryonalen Stammzellen physikalisch und funktionell mit der DNMT3A2 verknüpft ist und nicht mit der Isoform DNMT3A1 (Nimura et al., 2006). Aufgrund der Expressionstärke dieser Enzyme aus den Daten der vorliegenden Arbeit könnte eher vermutet werden, dass in NK-Zellen die DNMT3A1 und DNMT3L interagieren. Anhand des Transkriptionsstatus eines Enzyms kann natürlich nicht auf dessen Funktion und Interaktion geschlossen werden. Im Gegensatz zu DNMT3A1 und DNMT3L waren DNMT3A2 und DNMT3B im Vergleich zur Referenzprobe an d0 der NK-Zelldifferenzierung nur leicht erhöht, so dass deren aktive Gestaltung an der NK-Zellentwicklung nicht besonders wahrscheinlich ist.

RUNX-Faktoren

RUNX-Faktoren (RUNX1, RUNX2, RUNX3) regulieren die Entwicklung und Funktion vieler Zelltypen einschließlich hämatopoetischer Zellen (de Bruijn and Speck, 2004). Eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor RUNX3 innerhalb der KIR-Promotoren konnte bereits nachgewiesen werden (Trompeter et al., 2005). Trompeter et al. konnten zeigen, dass der Transkriptionsfaktor RUNX3 als Repressor der KIR-Promotoren fungiert. Einzige Ausnahme ist der KIR-Rezeptor KIR2DL5, der RUNX3 für seine Transkription rekrutiert, und im Gegenzug nicht exprimiert und transkribiert werden kann, wenn die Bindestelle für

RUNX3 im Promotor mutiert ist, was für einige Allele von KIR2DL5 zutrifft, weil dadurch die Bindung des Faktors RUNX3 ausgeschlossen wird (Gomez-Lozano et al., 2007). Die Resultate in dieser Arbeit zeigen eine progradiente Verstärkung der Transkription von RUNX3 während der NK-Zelldifferenzierung, was zu einer Beteiligung dieses Faktors an der KIR-Expression passen würde. Speziell die Zunahme des Transkriptionsfaktors im zeitlichen Verlauf der NK-Zelldifferenzierung weist auf eine zunehmende Repression der KIR-Gene nach einigen Wochen der Kultivierung hin. Eine eventuelle Beteiligung von RUNX3 an der Zelldeterminierung und Entwicklung kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, da RUNX-Proteine an der Regulation linienspezifischer Gene und damit an der Determinierung von Zellen beteiligt sind (Speck et al., 1999). Über die Rolle von RUNX1 und RUNX2, welche im Vergleich zu d0 keine signifikante Erhöhung zeigten, kann anhand der vorliegenden Daten keine Aussage gemacht werden. Die RUNX-Faktoren haben an ihren C-Termini eine Bindungsstelle für die Transducin-like-enhancer (TLE) Proteine. Javed et al. konnten mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie zeigen, dass TLE1 und TLE2 mit der Zellkernmatrix assoziiert sind und gleichzeitig mit den RUNX-Faktoren im Zellkern kolokalisiert sind. Eine Interaktion der TLEs mit den RUNX-Faktoren konnte nachgewiesen werden, wodurch die Aktivierung der RUNX-Zielgene reprimiert wurde (Javed et al., 2000). Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen in allen untersuchten CBs eine konstant höhere Expression von TLE1 im Vergleich zu den anderen TLEs. Betrachtet man die beiden Faktoren RUNX3 und TLE1 hinsichtlich ihrer Expressionsstärke kann man erwägen, dass diese beiden Faktoren zusammen einen Repressorkomplex bilden, der RUNX3 abhängige Gene inhibiert. Weil zum Ende der NK-Zelldifferenzierung eine Abnahme der KIR-Rezeptoren beobachtet werden konnte und man von der Repression der KIR-Gene mittels RUNX3 weiß, korrelieren die generierten Daten miteinander.

HDACs, HATs, methylbindende Proteine

Die Funktionen der Histondeacetylasen (HDACs) und Histonacetylasen (HATs) sind bekannt und wurden in der Einleitung ausführlich beschrieben. Die Resultate dieser Arbeit deuten auf eine aktive Beteiligung der HDAC4 und der HDAC9 an der NK-Zelldifferenzierung hin. Beide Enzyme wurden in allen untersuchten CBs stärker als die übrigen HDACs exprimiert.

Die Ergebnisse der Real-Time-PCR für die HATs (GCN5L1, GCN5L2, PCAF) und die methylbindenden Proteine (MBD2, MeCP2) zeigen eine recht konstante und gleichmäßige Expression aller Faktoren, die zwei- bis sechs-fach stärker waren als im Vergleich zur

Referenzprobe an d0. Einen Kandidaten bezüglich einer Beteiligung an der NK-Zelldifferenzierung kann man anhand der Daten nicht feststellen. Bis auf die Histonacetylase GCN5L2, welche sehr schwach exprimiert wird, werden die übrigen Faktoren etwa gleich stark gemessen. Die Ergebnisse fallen je nach untersuchtem Nabelschnurblut verschieden aus, dass heißt man erkennt in einem Fall eine Zunahme der Expression der HATs oder des MBPs während der NK-Zelldifferenzierung und im nächsten Fall eine Abnahme der Expression im Differenzierungsverlauf. Dabei sind GCN5L1 und PCAF in der Regel stärker exprimiert als die dritte HAT GCN5L2. Die methylbindenden Proteine halten sich die Waage und sind scheinbar beide involviert in die NK-Zellentwicklung.

Die mittels Real-Time-PCR erhaltenen Ergebnisse können lediglich dazu dienen, eine Selektion der epigenetisch interessanten Enzyme zu erstellen, welche im Verlauf der NK-Zellentwicklung und in der Expression deren Rezeptoren eine Rolle zu spielen scheinen. Darauf müssen weitere funktionale Analysen folgen, um den betreffenden Faktoren bezüglich ihrer tatsächlichen Funktion im Verlauf der NK-Zelldifferenzierung auf den Grund zu gehen.

3.6 Die Histonmodifikationen im Promotorbereich der KIR-Gene

Linienspezifische Unterschiede einzelner Zellen korrelieren mit spezifischen Modifikationen der Histone und der DNA. Auch die klonale Verteilung der KIR-Rezeptoren wird epigenetisch reguliert. Um epigenetische Veränderungen beurteilen zu können, die sich während der hämatopoetischen Entwicklung der NK-Zelle abspielen, wurde die Chromatinstruktur der KIR-Promotoren hinsichtlich ihrer Histonmodifikationen untersucht. Die Resultate dieser Arbeit deuten auf ein Modell hin, bei dem das Vorhandensein euchromatischer Histonmarker Grundvoraussetzung für die anschließende Gen-spezifische Demethylierung ist, mit abschließender Expression der KIR-Gene. Bei Betrachtung der Abbildungen 2.27- 2.30 kann eine Abfolge von hetero- zu euchromatischer Modifikation der KIR-Promotoren im zeitlichen Verlauf der NK-Zelldifferenzierung nachgewiesen werden. Die gewonnenen Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass Histonsignaturen, die für inaktive Gene sprechen und über die Antikörper H3K9dime und H3K27trime charakterisiert werden, im frühen Stadium der NK-Zellreifung stärker zu messen sind (d0, d10), was den undifferenzierten Status von Vorläuferzellen kennzeichnet. Im weiteren Verlauf weisen die Histone Modifikationen auf, die charakteristisch für aktive Gene sind (H4K8ac und H3K4trime, d18). Zum Ende der Differenzierung (d26, d30) konnte beobachtet werden, dass

sowohl die Marker für aktive als auch für inaktive Gene etwa gleich stark vorhanden waren. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass sich zu diesem späten Zeitpunkt Populationen unterschiedlicher Entwicklungsstadien in der Kultur befanden. In diesem Szenario haben einige NK-Zellen ihre Entwicklung und KIR-Expression bereits vollendet und eingestellt, während die übrigen NK-Zellen noch in die Ausbildung ihres KIR-Repertoires involviert sind.

Die gewonnenen Ergebnisse dieser Arbeit sind gut vereinbar mit den kürzlich publizierten Daten von Santourlidis et al. zur epigenetischen Regulation der KIR-Gene (Santourlidis et al., 2008). Anhand von Untersuchungen der KIR-Promotoren konnten Santourlidis et al. zeigen, dass aktive Histonsignaturen auf lymphatische Zellen der NK- und T-Zellreihe begrenzt sind. Es wird jedoch auch hervorgehoben, dass die tatsächliche klonale KIR-Expression sehr eng mit der Demethylierung der KIR-Promotoren zusammenhängt (Santourlidis et al., 2002). Im Gegensatz dazu müssen die N-terminalen Histonmodifikationen als genspezifische Daten angesehen werden, die nicht nur den aktuellen Status transkriptioneller Aktivität, sondern auch die Informationen liefern, ob ein bestimmtes Gen bereits bereit ist zur Expression. Anhand der Berechnung des Quotienten der Marker H4K8ac (aktive Gene) und H3K9dime (inaktive Gene) konnte ein Wert ermittelt werden, der Auskunft über den epigenetischen Status des jeweiligen KIR-Promotors gibt (Santourlidis et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit weist dieser Quotient auf einen direkten Zusammenhang zwischen einer offenen Chromatinstruktur und der frühzeitigen Expression des entsprechenden KIR hin (Abb. 2.31). Beispielsweise war der Quotient für KIR2DL4 im Vergleich zu den anderen KIRs höher, was wiederum auf eine frühe Expression dieses Rezeptors hinweist. Die Quotienten dieser gegenläufigen Marker H4K8ac/H3K9dime lassen wiederum auf eine Reihung von offener zu geschlossener Chromatinstruktur der KIR-Gene schließen, die für die untersuchten KIRs folgendermaßen ausschaut:

$$2DL4 > 2DL3 > 3DL1 > 2DL1.$$

Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate der sequentiellen KIR-Expression im Verlauf der NK-Zelldifferenzierung. KIR2DL4 war stets der stärkste und häufigste exprimierte KIR-Rezeptor, gefolgt von KIR2DL3. Auch die Tatsache, dass KIR2DL1 an d10 der CHIP-Analysen einen noch sehr geschlossenen Promotor aufweist, korreliert mit den Ergebnissen der Real-Time-PCR-Analysen, die für die Studie der CML-Patienten durchgeführt wurde.

4 Material

4.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Gerät	Hersteller
ABI Prism 7700 Sequence Detector	AB Applied Biosystems
ABI Prism 7900HT Sequence Detector	AB Applied Biosystems
Analysewaage	Kern
Brutschrank	Former Scientific
Brutschrank (33°C, AFT024)	Binder
Tele-Cobald-Gerät	Phillips
Cell Dyn (3500 R)	Abbott
Coulter® Epics® (Sorter)	Beckmann Coulter
Durchflusszytometer (FACS Calibur)	Becton Dickinson
Durchflusszytometer (Cytomics FC 500)	Beckmann Coulter
Fotodokumentationssystem (P91)	Herolab, Mitsubishi
Gelelektrophoresekammer	BioRad
Gelelektrophoresekammer	Peqlab
Heizblock (neoBlock II)	neolab
Mehrkanalpipette (20-200 µl)	Eppendorf
Mikroskop (Inversmikroskop)	Hund
Mikrowelle	Moulinex
Mini- und Medi-MACS Magneten	Miltenyi Biotec
Nanodrop NK-1000 Spektrophotometer	NanoDrop Technologies
Neubauer-Zählkammer	SuperRior Marienfeld
Pipetten	Gilson
Pipettierhilfe	IBS, Integra Bioscience
Power-Supply: Power Pak 300	BioRad
Spectrometer DU 640	Beckmann
Sterilwerkbank	Gelair
Sterilwerkbank MCS 12	Jouan

Thermocycler (Gene Amp PCR System 2700)	AB Applied Biosystems
Thermocycler (Gene Amp PCR System 9700)	AB Applied Biosystems
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge: Mikro 20	Hettich
Vortexer (REAX top)	Heidolph
Wasserbad	GFL- Gesellschaft für Labortechnik
Zentrifuge Sigma 2K5	Sigma
Zentrifuge: Rotina 46 R	Hettich

Verbrauchsmaterial**Hersteller**

0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße	Robbins Scientific
0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
5 ml Polypropylen Röhren	Becton Dickinson
15 ml und 50 ml Röhren	Falcon Becton Dickinson
75 cm ² Zellkulturflaschen	Nunc
75 cm ² Zellkulturflaschen	Greiner
24-Well Zellkulturplatten	Corning Incorporated
96-Well Zellkulturplatten (flacher Boden)	Cellstar Greiner bio-one
Bottletop Filter (150 ml, 500 ml) 0,22 µm PES	Corning Incorporated
Einfrierröhren (Cryo™)	Greiner
Handschuhe SensiCleanII - NitraTex	Ansell
MACS™- Säulen (LS, MS)	Miltenyi Biotec
Micro Fluidic Card	Applied Biosystems
PCR-Platten (96 well)	Abgene
Pre-Separation Filter	Miltenyi Biotec
Reagent Reservoir (50 ml)	Corning Incorporated
Spritzenfilter Minisart (0,2 µm)	Satorius
Stabpipetten	Corning-Costar
Ultra Clean Cap Strips (und Platten)	Abgene
Zellsiebe (40 µm Nylon)	Becton Dickinson

4.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ascorbinsäure	Sigma
Ammoniumchlorid-Lösung	Universitätsapotheke
Aqua injectabilia	Braun
Aqua HPLC	Merck
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Sigma
Broth Base (Lennox L Broth Base)	Gibco
Chloroform	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Ethanol	Roth
Ethanolamin	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll (Biocoll)	Biochrom
Glycerin	Roth
Isopropanol	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydroxid	Roth
PBS (Phosphat gepufferte Saline)	Serag Wiessner
Phenol	Sigma
Sodium-Selenit	Sigma
Tetrazyklin	Sigma
Tris-Base	Roth
Trypanblau Lösung (0,4 %)	Gibco
Xylencyanol	Sigma

4.3 Zellkultur

4.3.1 Puffer und Medien

- Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM),
low Glucose (1000mg/L) Gibco
- DMEM, high Glucose (4500mg/L) Sigma
- Iscove's Modified Dulbeccos Medium (IMDM) Gibco
- HAM's F12 Medium (1x) Biochrom AG
- RPMI 1640 Cambrex

- NK1-Medium:
 - DMEM (high Glucose) (2/3, v/v)
 - HAM's F12 (1/3, v/v)
 - 20 % humanes Albumin Serum (hitzeinaktiviert)
 - 20 mg/L Ascorbinsäure
 - 50 µM Ethanolamin
 - 50 µg/L Natrium-Selenit
 - 24 µM β-Mercaptoethanol
 - 1 % Penicillin/Streptomycin
 - 1000 U/ml IL-2
 - 5 ng/ml IL-3
 - 20 ng/ml IL-7, SCF
 - 10 ng/ml Flt-3-Lig

-
- NK2-Medium: DMEM (high Glucose) (2/3, v/v)
HAM's F12 (1/3, v/v)
10 % humanes Albumin Serum (hitzeinaktiviert)
20 mg/L Ascorbinsäure
50 µM Ethanolamin
50 µg/L Natrium-Selenit
24 µM β-Mercaptoethanol
1 % Penicillin/Streptomycin
1000 U/ml IL-2
20 ng/ml IL-7, SCF
10 ng/ml Flt-3-Lig, IL-15

 - AFT-Medium: 20 % FCS
1 % Penicillin/Streptomycin
1 % L-Glutamin
30 µM β-Mercaptoethanol
in DMEM (low Glucose)

 - Iscove's 20 (I20)-Medium: 20 % FCS
1 % Penicillin/Streptomycin
in Iscove's Modified Dulbeccos Medium (IMDM)

 - R20-Medium: 20 % FCS
1 % Penicillin/Streptomycin
1 % L-Glutamin
30 µM β-Mercaptoethanol
10 ng/ml Flt-3-Lig, SCF, TPO
20 ng/ml IL-7
in RPMI 1640

 - Einfrriermedium: 20 % DMSO
in AFT-Medium

- MACS-Puffer: 2 mM EDTA [0,5 M]
 0,3 % HSA [20 %]
 in PBS

4.3.2 Reagenzien und Stimuli

Reagenzien

Bovine Serum Albumin (BSA)	Roth
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom AG
Human Albumin Serum (20 %)	Aventis-Behring GmbH
Human Serum Typ AB	Cambrex
L-Glutamin	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Trypsin/EDTA	Gibco
β-Mercaptoethanol	Gibco
Gelatine (0,1 %)	Stem Cell Technologies

Stimuli

5'-Aza-2'-deoxycytidin (AZA)	Sigma
Trichostatin A (TSA)	Sigma

Cytokine

rh IL-2	Chiron
rh IL-3	TeBu
rh IL-7	TeBu / Immunotools
rh IL-15	TeBu / Immunotools
rh IL-21	Zymogenetics, Seattle, USA
rh Flt-3-Lig	TeBu / Immunotools
rh SCF	TeBu / Immunotools
rh TPO	Stem Cell Technologies

4.3.3 Zelllinien

Feederzelllinie

AFT024 murine fetale Leberzelllinie (Moore et al., 1997)

4.4 Blutproben

Die verwendeten Nabelschnurblute (Cord Blood, CB) stammten alle aus der José Carreras Stammzellbank der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Gesine Kögler zur Verfügung gestellt. Alle Nabelschnurblute in dieser Arbeit waren aufgrund des geringen Gewichtes und der niedrigen Zellzahl monoklonärer Zellen (MNCs) für weitere Transplantationen ungeeignet und wären ansonsten entsorgt worden. Die verwendeten Apheresate und Knochenmarkproben stammten alle aus unserem Institut (ITZ) und waren für weitere Transplantationszwecke nicht mehr geeignet, dienten in dieser Arbeit aber als Quelle für die hämatopoetische Vorläuferzellen. Die Apheresate und Knochenmarkproben wurden freundlicherweise von Herrn Dr. med. Johannes Fischer zur Verfügung gestellt.

4.5 Antikörper

4.5.1 Primärantikörper

Die Antikörper aus Tabelle 4-1 wurden für durchflusszytometrische Messungen verwendet. Es handelt sich um monoklonale Antikörper, die mit Ausnahme von KIR2DL5 und KIR3DL2 vom Hersteller bereits mit einem fluoreszierenden Molekül (FITC, PE, etc.) versehen waren.

Tabelle 4-1 Primärantikörper

Spezifität	Konjugation	Isotyp	Klon	Firma/Hersteller
Isotyp-Kontrolle	PE	IgG2b		Beckmann Coulter
	FITC	IgG1		Beckmann Coulter
CD3	PE-Cy5	IgG1	UCHT1	Beckmann Coulter
CD16	FITC	IgG1	3G8	Beckmann Coulter
CD34	FITC	IgG1	5B1	Beckmann Coulter
CD45	FITC	IgG1	Ox-1	BD Biosciences
CD56	PE	IgG1	NKH-1	Beckmann Coulter
CD56	PE-Cy5	IgG1	N9D1	Pharmingen
CD94	FITC	IgG1	HP-3D9	BD Biosciences
CD161	FITC	IgG1	DX12	Pharmingen
NKB1 (KIR3DL1)	FITC	IgG1	DX9	BD Biosciences
NKB1 (KIR3DL1)	PE	IgG1	DX9	BD Biosciences
KIR-NKAT2	FITC	IgG2a	DX27	Pharmingen
KIR2DL5	unkonjugiert	IgG1		Vilches, Madrid
KIR3DL2	unkonjugiert	IgM	Q66	Moretta, Genua
CD158a	FITC	IgM	HP-3E4	Pharmingen
CD158i	PE	IgG2a	FES172	Beckmann Coulter
NKG2A	PE	IgG2b	Z199	Beckmann Coulter
NKG2C	PE	IgG1	134591	R&D Systems
NKG2D	PE	IgG1	148910	R&D Systems
NKp30	PE	IgG1	Z25	Beckmann Coulter
NKp44	PE	IgG1	Z231	Beckmann Coulter
NKp46	PE	IgG1	BAB281	Beckmann Coulter

Mit den Antikörpern aus Tabelle 4-2 wurden die über CD34 MicroBeads angereicherten CD34⁺-Zellen markiert und anschließend mit dem Durchflusszytometer „Coulter Epix“ von Beckmann Coulter sortiert.

Tabelle 4-2 Die Antikörper dieser Tabelle wurden für die durchflusszytometrische Sortierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen verwendet.

Spezifität	Konjugation	Isotyp	Klon	Firma/Hersteller
CD34	PE-Cy5	IgG1	QBEnd10	Beckman Coulter
CD 38	PE	IgG1	HB7	BD Biosciences
Lineage-Cocktail*	FITC	IgG1/IgG2b	Mix (s.*)	Becton Dickinson

*Der Lineage-Cocktail 1 (Lin) beinhaltet mehrere Antikörper-Klone in Kombination: CD3 (Klon SK7), CD14 (MoP9), CD16 (3G8), CD19 (SJ25C1), CD20 (L27), CD56 (NCAM16.2).

4.5.2 Sekundärantikörper

Tabelle 4-3 In dieser Tabelle sind fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper aufgeführt, welche spezifisch für einige Erstantikörper aus Tabelle 4-1 waren. Die unkonjugierten Primärantikörper wurden mit den Sekundärantikörpern versehen, die spezifisch für den Isotyp des Primärantikörpers waren und die gewünschte Fluoreszenz trugen.

Spezifität	Konjugation	Isotyp	Firma/Hersteller
Anti-Mouse IgM	FITC	IgM	Beckmann Coulter
Anti-Mouse IgG	FITC	IgG	BD Biosciences

4.5.3 Antikörper und Systeme (Kits) zur Zelledepletion

NK Cell Isolation Kit

CD34 MicroBead Kit, human

CD56 MultiSort Kit, human

CD8 MultiSort Kit

CD3 MicroBead Kit, human

Anti-FITC MicroBeads

Anti-PE MicroBeads

Goat Anti-Mouse IgG MicroBeads

alle von Miltenyi Biotec

4.5.4 Antikörper für die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Tabelle 4-4 Die Antikörper aus dieser Tabelle wurden für die Präzipitation des gescherten Chromatins verwendet.

Spezifität	Isotyp	Firma/Hersteller
Isotypkontrolle	Kaninchen/IgG	Upstate
Anti-acetyl-Histone H4 (Lys8)	Kaninchen antiserum	Upstate
Anti-trimethyl-Histone H3 (Lys4)	Kaninchen polyklonal IgG	Abcam
Anti-dimethyl-Histone H3 (Lys9)	Kaninchen polyklonal IgG	Upstate
Anti-trimethyl-Histone H3 (Lys27)	Kaninchen polyklonal IgG	Abcam

4.6 Molekularbiologie

4.6.1 Oligonukleotide

Die DNA-Oligonukleotide (Primer) in folgenden Tabellen wurden bei der Firma Thermo Electron Corporation bestellt und für RT-PCR oder Real-Time-PCR Analysen verwendet. Die Sequenzen der KIR-Gensonden in Tabelle 4-5 sind aus Trundley et al., 2006 bzw. Uhrberg et al., 1997 oder wurden teilweise während dieser Arbeit konstruiert.

Tabelle 4-5 Primer zur Analyse der KIR-Expression auf RNA-Ebene

Gen	Template	Sense-Primer 5'-3'	Antisense-Primer 5'-3'	Fragmentlänge (bp) des PCR-Produkts
KIR2DL1	RNA	GCA GCA CCA TGT CGC TCT	GTC ACT GGG AGC TGA CAC	356
KIR2DL1	DNA	ACT CACTCC CCC TAT CAG G	AGG GCC CAG AGG AAA GTC A	255
KIR2DL2	RNA	CCA CTG CTT GTT TCT GTC AT	CAG CAT TTG GAA GTT CCG C	370
KIR2DL3	RNA	CCA CTG AAC CAA GCT CCG	CAG GAG ACA ACT TTG GAT CA	352
KIR2DL3	DNA	CCT TCA TCG CTG GTG CTG	CAG GAG ACA ACT TTG GAT CA	252
KIR2DL4	RNA	CTG TCC CTG AGC TCT ACA A	CAC TGA GTA CCT AAT CAC AG	541
KIR2DL5	RNA	TGC CTC GAG GAG GAC AT	GGT CTG ACC ACT CAT AGG GT	504
KIR3DL1	RNA	ACA TCG TGG TCA CAG GTC C	TGC GTA TGT CAC CTC CTC	556
KIR3DL2	RNA/DNA	CGG TCC CTT GAT GCC TGT	GAC CAC ACG CAG GGC AG	368
KIR3DL3,c1	RNA	GGA CCT ACA GAT GTT GC	TAG TTG ACC TGG GAA CCC	268
KIR3DL3, Ex4-s, Ex5-as	RNA	TCT GCA CAG AGA GGG GAT CA	GTA GTT CCC TCC GTG GGT CA	437
KIR2DS1	RNA/DNA	TCT CCA TCA GTC GCA TGA A/G	AGG GCC GAC AGG AAA GTT	313
KIR2DS2	RNA/DNA	TGC ACA GAG AGG GGA AGT A	CAC GCT CTC TCC TGC CAA	256
KIR2DS3	RNA/DNA	TCA CTC CCC CTA TCA GTT T	GCA TCT GTA GGT TCC TCC T	279
KIR2DS4	RNA/DNA	CTG GCC CTC CCA GGT CA	GGA ATG TTC CGT TGA TGC	450
KIR2DS4	RNA	GGT TCA GGC AGG AGA GAA T	GGA ATG TTC CGT TGA TGC	109
KIR2DS5	RNA/DNA	AGA GAG GGG ACG TTT AAC C	TCC GGT CCT TAG AGA TCC A	416
KIR3DS1	RNA	GGC ACC CAG CAA CCC CA	AAG GGC ACG CAT CAT GGA	246
NCAM	RNA	TTC TTC GCT GCT GAT GTT CC	TTG TGA ATG TGC CAC CTA CC	437
β-Aktin	RNA	CGC GAG AAG ATG ACC CAG ATC	TTG CTG ATC CAC ATC TGC TGG	734
β-Aktin-human	RNA	GAA GAT CCT CAC CGA GCG C	AGG GTA CAT GGT GGT GCC G	352

Zusätzlich wurden für die KIR-Typisierung weitere DNA-Oligonukleotide verwendet, welche in Tabelle 4-6 aufgeführt sind. Einige dieser Primer finden sich bereits in obiger Tabelle, aber um einen Überblick über die Primer für die KIR-Typisierung zu haben, sind die dafür verwendeten KIR-Gensonden nochmals zusammengefasst.

Tabelle 4-6 Primer für die KIR-Typisierung nach Uhrberg et al., 2002

KIR-Gen	Sense-Primer 5'-3'	Antisense-Primer 5'-3'	Fragmentlänge (bp) des PCR-Produkts
KIR2DL1	ACT CAC TCC CCC TAT CAG G	AGG GCC CAG AGG AAA GTC A	1750
		AGG GCC CAG AGG AAA GTT	
KIR2DL2	CCA TGA TGG GGT CTC CAA A	GCC CTG CAG AGA ACC TAC A	1800
KIR2DL3	CCT TCA TCG CTG GTG CTG	CAG GAG ACA ACT TTG GAT CA	798
KIR2DL5	TGC CTC GAG GAG GAC AT	GGT CTG ACC ACT CAT AGG GT	1600
KIR3DL1	TAC AAA GAA GAC AGA ATC CAC A	TAG GTC CCT GCA AGG GCA A	1600
	TCC CAT CTT CCA TGG CAG AT		
KIR3DL2	CGG TCC CTT GAT GCC TGT	GAC CAC ACG CAG GGC AG	1900
KIR2DS1	TCT CAA TCA GTC GCA TGA A/G	AGG GCC CAG AGG AAA GTT	1800
KIR2DS2	TGC ACA GAG AGG GGA AGT A	CAC GCT CTC TCC TGC CAA	1750
KIR2DS3	TCA CTC CCC CTA TCA GTT T	GCA TCT GTA GGT TCC TCC T	1800
KIR2DS4	CTG GCC CTC CAA GGT CA	GGA ATG TTC CGT TGA TGC	1950
KIR2DS5	AGA GAG GGG ACG TTT AAC C	TCC GTG GGT GGC AGG GT	1950
KIR3DS1	GGC AGA ATA TTC CAG GAG G	AGG GGT CCT TAG AGA TCC A	1750

Tabelle 4-7 Primer für die HLA-C-Typisierung der Blutproben nach Frohn et al., 1998

HLA C	Sense-Primer 5'-3'	Antisense-Primer 5'-3'	Fragmentlänge (bp) des PCR-Produkts
C1	CGC CGC GAG TCC RAG AGG	GTT GTA GTA GCC GCG CAG G	142
C2		GTT GTA GTA GCC GCG CAG T	142

Tabelle 4-8 Primer für die Real-Time-PCR-Analysen nach der Chromatin-Immunopräzipitation

KIR-Gen	Sense-Primer 5'-3'	Antisense-Primer 5'-3'
KIR2DL1	GTT TTG AGT TGG TCA TAG TGA AGG ACA	GAC ATG GTG CTG CCG GA
KIR2DL3	GTG TAT GAG AGG TTG GAT CTG AG	GCC CTT CCA GGA CTC ACC
KIR2DL4	GTT GCG CAT GAT GTG AAG TGA	TGA CAC ATT GAC CAC AAC ATG T
KIR3DL1	GTT AGC ACA GAT TTT AGG CAT C	CAT ATC TTT ACC TVV AGG TCC AG

4.6.2 Reagenziensysteme

RNeasy Micro Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick Nucleotide removal Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
RNase-free DNase Set	Qiagen
iSript cDNA Synthesis Kit	Biorad
TaqMan Universal PCR Master Mix	AB Applied Biosystems
Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit	upstate

4.6.3 Reagenzien

Reverse Transkription

DTT, 0,1M	Promega
dNTPs	Peqlab
M-MLV, Reverse Transkriptase	Promega
M-MLV, Reverse Transkriptase	Invitrogen
Oligo-(dT)-Primer	Promega
Omniscript	Invitrogen
Random Primer (Hexamere)	Promega
Recombinant RNasin, Ribonuclease Inhibitor	Promega
RNase-free water	Qiagen
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen
5x Puffer	Promega

PCR

HotStarTaq DNA Polymerase [5 U/μl]	Qiagen
Taq DNA Polymerase	Qiagen
dNTPs [10 nmol/μl]	Peqlab
Puffer (10x)	Qiagen

Quantitative Real-Time-PCR am ABI Prism 7700

SYBR Green I, MasterMix plus pPCR™	Eurogentec
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen

DNA-Agarosegelelektrophorese

Agarose	Invitrogen
100 bp DNA-Leiter	Peqlab
1 kb DNA-Leiter	Invitrogen

4.6.4 Puffer

- TE-Puffer: 10 mM Tris-Base (pH 7,4)
1 mM EDTA (pH 8,0)
in Aqua dest.
(autoklaviert)
- TBE-Puffer (10x): 890 mM Tris-Base
890 mM Borsäure
10 mM EDTA
in Aqua dest.
- Blaumarker: 35 ml Wasser
15 ml Glycerin
1 Spatelspitze Bromphenolblau
1 Spatelspitze Xylencyanol

4.7 Herstellerverzeichnis

Hersteller	Institut/Sitz
Applied Biosystems	Darmstadt, Deutschland
BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
Beckmann Coulter/ Immunotech	Palo Alto, Kalifornien, USA

Becton Dickinson Biosciences	Jersey City, New Jersey, USA
Biochrom	Berlin, Deutschland
Bio-Rad Laboratories	Richmond, Kalifornien, USA
BIORAD	München, Deutschland
Biozym	Oldendorf, Deutschland
Cambrex	Verviers, Belgien
Corning Incorporated	Acton, Massachusetts, USA
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Falcon	Oxnard, Kalifornien, USA
Greiner	Nürtingen, Deutschland
Heidolph	Schwabach, Deutschland
Heraeus	Hanau, Deutschland
Hettich Zentrifugen	Tuttlingen, Deutschland
hund	Wetzlar, Deutschland
IBS Integra Bioscience	Chur, Schweiz
Invitrogen/ Life Technologies	Karlsruhe, Deutschland
Jouan	Fernwald, Deutschland
KERN	Balingen-Frommern, Deutschland
Labsystems	Langenselbold, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
NanoDrop Technologies	Wilmington, USA
neolab	Heidelberg, Deutschland
peqlab	Erlangen, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
R&D Systems	Wiesbaden Nordenstadt, Deutschland
Roth	Karlsruhe, Deutschland
SERAG Wiessner	Naila, Deutschland
Sigma	Steinheim, Deutschland
Thermo LifeSciences	Egelsbach, Deutschland

5 Methoden

5.1 Methoden der Zellkultur

5.1.1 Allgemeine Bemerkung und Kultivierung der Zellen

Alle Schritte, die das Arbeiten mit vitalen Zellen beinhalteten, wurden unter der Sterilbank durchgeführt, um Kontaminationen mit Bakterien und Pilzen zu vermeiden. Wenn nicht anders erwähnt, wurden sämtliche Medien vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt.

Alle Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und wassergesättigter Luftfeuchte kultiviert. Einzige Ausnahme war die murine Leberzelllinie AFT024, welche mit dem Temperatur-sensitiven SV40 T-Antigen transformiert und immortalisiert wurde. Aufgrund dieses Virus haben die AFT024-Zellen ihr Wachstums- und Zellteilungsoptimum bei einer Temperatur von 33 °C und wurden somit unter diesen Temperaturbedingungen separat kultiviert.

5.1.2 Einfrieren von Zellen

Für die Langzeitlagerung von Zellen in flüssigem Stickstoff musste dem Medium ein Gefrierschutzmittel zugesetzt werden, um die Bildung von Eiskristallen zu verhindern, die das Platzen der Zellen verursachen würden. Hierfür wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet, das jedoch bei Raumtemperatur toxisch auf stoffwechselaktive Zellen wirkt. Alle Arbeitsschritte wurden deshalb zügig und auf Eis durchgeführt. Die einzufrierenden Zellen wurden sedimentiert und in kaltem Medium resuspendiert (800 µl). Die Suspension wurde im Verhältnis 1:2 mit kaltem Einfriermedium gemischt und in einem Volumen von jeweils 1,6 ml auf Einfrier Röhrchen verteilt. Die Röhrchen wurden in eine Einfrierbox überführt, die für 24 Stunden bei -80 °C gelagert wurde. Dabei sorgte die durch Isopropanol gekühlte Einfrierbox bei -80 °C für eine schonende Erniedrigung der Temperatur um ca. 1 °C pro Minute. Anschließend wurden die Zellen in der Gasphase über flüssigem Stickstoff gelagert (-196 °C).

5.1.3 Auftauen von Zellen

Zu Beginn des Vorgangs wurde ein Falcon-Röhrchen mit 30 ml Kulturmedium (20 % FCS) gefüllt und im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Dann wurden die Einfrierröhrchen auf Eis aus dem Stickstofftank ins Labor transportiert und in der Hand so lange erwärmt, bis die Zellsuspension am Rand des Röhrchens angetaut war. Mit der Pipette wurde warmes Medium auf die angetauten Zellen gegeben und nach kurzer Einwirkzeit unter der Sterilbank in das Röhrchen mit dem vorgewärmten Medium zurückpipettiert. Dadurch war gewährleistet, dass die Zellen direkt warm und verdünnt waren. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt bis das Einfrierröhrchen leer war. Dann wurde das Zellgemisch in Kulturflaschen überführt und in den Brutschrank gelegt. In der Regel wurde am nächsten Tag ein Mediumwechsel vorgenommen, um das immer noch vorhandene, aber stark verdünnte DMSO vollständig zu entfernen.

5.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl und die Konzentration der Zellen wurden entweder am CellDyn oder mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Das CellDyn-Gerät wird routinemäßig in der Klinik (Apherese) zur maschinellen Erstellung von Blutbildern genutzt. Als Ergebnis erhält man u. a. den WBC (WhiteBloodCount), wobei die Konzentration in „Zellen/ μl “ angezeigt wird. Für eine Messung am CellDyn wurden 300 μl der zuvor isolierten Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß überführt und anschließend über eine Kapillare im CellDyn zur Analyse aufgesaugt. Über die angegebene Konzentration und das Volumen der Zellsuspension konnte die genaue Zellzahl ermittelt werden.

Bei der Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer mussten zunächst lebende von toten Zellen unterschieden werden. Dazu wurde eine Zellprobe (i. d. R. 20 μl) im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau verdünnt. Dieser Farbstoff wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, während tote Zellen dunkelblau gefärbt werden. Die Zellen wurden in allen vier Großquadranten der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und die Werte gemittelt. Die Zellzahl pro ml Suspension wurde anhand folgender Formel errechnet:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \text{mittlere Zellzahl pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

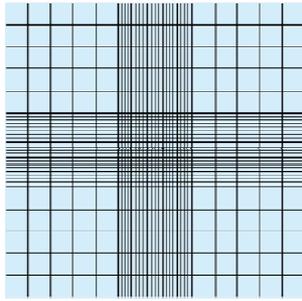


Abbildung 5.1 Schematische Darstellung der Neubauer-Zählkammer. Es sind die vier Großquadrate, die aus jeweils 4x4 kleinen Quadraten bestehen, abgebildet

5.1.5 Kultivierung der AFT024 Zelllinie

Bei der AFT024 handelt es sich um eine murine fetale Leberzelllinie, die durch das Einsetzen des temperatur-sensitiven SV40 Large T-Antigens transformiert und immortalisiert wurde (Moore et al., 1997). Dadurch ergibt sich für diese Feederzelllinie ein Wachstums- und Zellteilungsoptimum bei einer Temperatur von 33 °C, weshalb sie separat in einem speziell temperierten Brutschrank kultiviert werden musste. Bei 33 °C bindet das T-Antigen an Anti-Onkogene und ermöglicht so die Zellteilung. Bei höheren Temperaturen wird das T-Antigen inaktiviert und die Zellen können sich nicht länger teilen. Um sicher zu stellen, dass alle AFT024-Zellen mitotisch inaktiv sind, ist eine radiologische Bestrahlung mit 35 Gray notwendig.

AFT024-Zellen exprimieren Betaglycan und membrangebundenes Heparin-Sulfat, welches sich normalerweise auf der Oberfläche von hämatopoetischen Stromazellen befindet und eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und dem Wachstum von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen spielt (Arcanjo et al., 2002). Die AFT024-Zellen sind in der Lage, sowohl murine Stammzellen *in vitro* zu erhalten (Lewis and Verfaillie, 2000) als auch über direkten Zellkontakt humane CD34⁺CD38⁻ Progenitorzellen bei der Proliferation und Differenzierung zu unterstützen (Thiemann et al., 1998).

Aufgrund der zahlreichen Publikationen, die gezeigt haben, dass die AFT024 verglichen mit humanen Stromazellen eine erfolgreichere und stabilere Erhaltung der hämatopoetischen Vorläuferzellen *in vitro* bewirkt (Moore et al., 1997; Nolte et al., 2002), wurde die Feederzelllinie auch in dieser Arbeit für den Erhalt der Progenitoren und die Generierung der NK-Zellen verwendet.

Die Kultivierung dieser adhärent wachsenden Zelllinie (Abbildung 5.2) erfolgte in dem für den Zelltyp optimalen Medium (AFT-Medium). Das Mediumvolumen betrug in einer 75 cm² Zellkulturflasche 30 ml und in einer 175 cm² Flasche 60 ml. Einmal pro Woche wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und je nach Konfluenz erfolgte eine Aufteilung der Zellen in separate Flaschen zur weiteren Kultivierung. Es war darauf zu achten, dass die Feederzelllinie nicht zu konfluent wurde, da es sonst zur Ablösung des Zellrasens kam und damit auch zur Unbrauchbarkeit der Zellen.

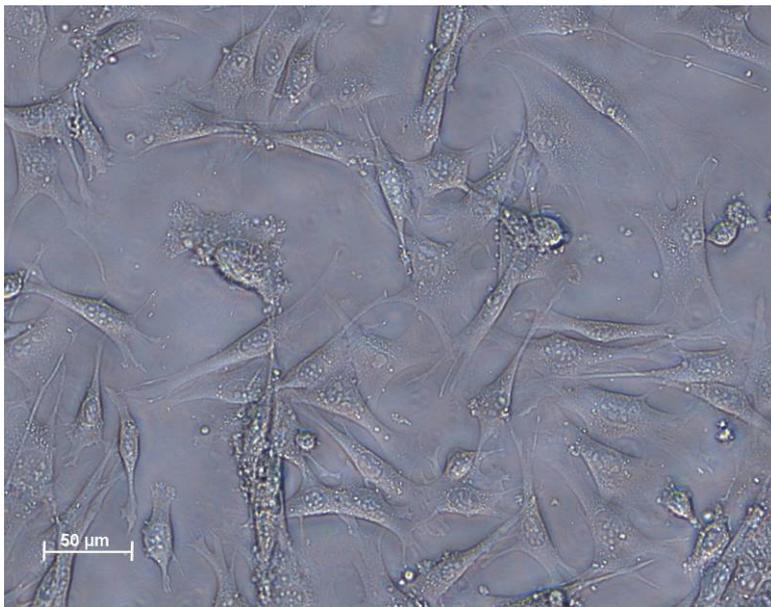


Abbildung 5.2 Mikroskopische Aufnahme der AFT024 Feeder-Zelllinie. 10x vergrößert.

5.1.5.1 Splitten der AFT024-Zelllinie

Bei hoher Konfluenz der AFT024 Zellen wurde das komplette Medium entnommen, und um inhibierende Reste von FCS zu entfernen, wurden die Zellen in der Kulturflasche mit PBS abgespült. Nach Zugabe von 10 ml 37 °C warmem Trypsin/EDTA (1x) wurde die Kulturflasche für 5 min in den Brutschrank gelegt, um die Wirkung des Trypsins noch zu verstärken. Anschließend wurden die Zellen durch heftiges und mehrmaliges Klopfen der Kulturflasche vom Boden und voneinander gelöst. Die Trypsinierungs-Reaktion wurde durch Zugabe von kaltem Iscove's 20 Medium gestoppt, die Zellen in ein Falcon-Röhrchen überführt und mit PBS auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt. Es folgte eine Zentrifugation (7 min, 400 x g, 4 °C) und anschließend die Resuspension des Zellpellets in AFT-Medium. Die resuspendierten Zellen wurden in der Regel im Verhältnis 1:5 auf neue Kulturflaschen

aufgeteilt oder je nach Gebrauch direkt in entsprechender Menge in die 24- oder 96-well-Platten ausplattiert.

5.1.5.2 Herstellung der AFT024-Platten

Für die Versuche der NK-Zelldifferenzierung mussten AFT-Platten im Format 24- oder 96-well vorbereitet werden. Dafür wurden die Zellen wie unter 5.1.5.1 beschrieben trypsiniert, in der Neubauerkammer gezählt und auf eine Konzentration von 1×10^5 Zellen / ml eingestellt. Bevor die Zellsuspension in die Wells der Platten pipettiert werden konnte, musste der Boden mit Gelatine (0,1 %) vorbehandelt werden. Dafür wurden die 24-Well-Platten mit 300 μ l und die 96-Well-Platten mit 50 μ l Gelatine beschichtet und nach 30 min Einwirkzeit wurde die überschüssige Gelatine entfernt. Nachdem die Platten unter der Sterilbank getrocknet waren, konnte die AFT-Zellsuspension in die Wells pipettiert werden (1 ml pro 24 well und 150 μ l pro 96 Well). Die Zellen wurden zügig in den 33 °C Brutschrank gelegt und nach 72 h Inkubation bei 35 Gray (1Gy = 1J/kg = 100 rad) bestrahlt. Die Bestrahlung diente zur Inaktivierung des Zellwachstums der AFT-Zelllinie, welche nach dieser Prozedur zwar nicht mehr teilungsfähig, aber immer noch in der Lage war, die CD34-positiven Vorläuferzellen über Zytokin-Produktion und Zell-Zell-Kontakte zu unterstützen. Um toxische Nebenprodukte, die nach der Bestrahlung von den Zellen sezerniert wurden, zu entfernen, wurde nach 24 h ein Mediumwechsel durchgeführt. Danach waren die AFT024-Zellen für die Experimente vorbereitet und konnten als Feederlayer für die NK-Zelldifferenzierung genutzt werden.

5.1.6 Isolierung mononukleärer Zellen

Um die hämatopoetischen Vorläuferzellen zu isolieren, musste aus den verwendeten Bluten zunächst eine Population von mononukleären Zellen (MNCs) angereichert werden. Deren Isolierung erfolgte aus Nabelschnurblut, welches direkt nach der Geburt aus der Nabelschnur gewonnen und in sterile Beutel überführt wurde. Für die Isolierung der MNCs wurde das Blut zunächst im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt und dann auf 17 ml Ficoll-Lösung (Dichte = 1,078 g/ml) in ein 50 ml Falcon-Röhrchen geschichtet.

Es folgte eine Dichtegradientenzentrifugation in einem Ausschwingrotor (35 min, 440 x g, Raumtemperatur). Um nach der Zentrifugation eine optimale Schichtung der verschiedenen

Fraktionen zu gewährleisten, wurde das Ende der Zentrifugation ohne Einschalten der Bremse abgewartet.

Die im Interphasering zwischen Ficoll (transparente Schicht) und Blutplasma (oberste, gelbliche Schicht) befindlichen MNCs wurden mit einer Pasteurpipette in ein frisches Falcon-Röhrchen überführt und anschließend zweimal mit 50 ml MACS-Puffer für 7 min bei 400 x g und 4 °C gewaschen. Der Überstand wurde jeweils verworfen und das Pellet zum Schluss in 2 ml MACS-Puffer resuspendiert.

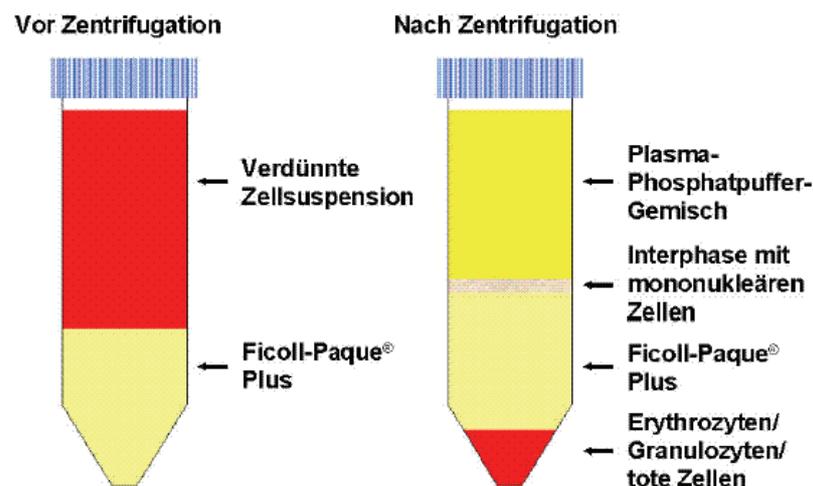


Abbildung 5.3 Isolierung von MNCs mittels Ficoll und Dichtegradientenzentrifugation

5.1.7 Erythrozytenlyse

Obwohl die Erythrozyten während der Dichtegradientenzentrifugation von den MNCs getrennt wurden, ließ es sich nicht immer vermeiden, dass einige der roten Blutkörperchen mit den MNCs abpipettiert wurden. Aus diesem Grund musste eine Erythrozytenlyse durchgeführt werden. Dafür wurden die MNCs zunächst in 2 ml 4 °C-kaltem Ammoniumchlorid resuspendiert. Anschließend wurde das Volumen auf 50 ml erhöht. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis inkubiert und durch gelegentliches Schwenken wurde die Intensität der Reaktion etwas verstärkt. Verbleibende Zelltrümmer wurden durch zweimaliges Waschen (7 min, 400 x g, 4 °C) mit MACS-Puffer entfernt.

5.1.8 Zellisolierung über ferromagnetische Antikörper

Für die Isolierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen (CD34⁺) wurden Zellseparationen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern durchgeführt, die chemisch an superparamagnetische Partikel (Microbeads) gebunden waren (magnet activated cell sorting, MACS). Das Prinzip dieser magnetbasierenden Zellisolation beruht auf der Verwendung von Säulen (MS-, LS-Säulen), die in einen starken Magneten gehängt werden, wodurch in der Säule ein magnetisches Feld entsteht. Trägt man dann die Zellen auf die Säule auf, werden solche, die den Antikörper mit den Microbeads tragen, durch das magnetische Feld in der Säule zurückgehalten, während Zellen, die den Antikörper nicht gebunden haben, die Säule passieren. Entfernt man die Säule dann aus dem Magneten, können die zurückgehaltenen Zellen mit Hilfe eines Stempels eluiert werden. Es gibt zwei Möglichkeiten, um die gewünschte Zellpopulation zu isolieren: positive Selektion, d.h. die zu isolierende Population wird mit den Antikörpern markiert und negative Selektion (Depletion); hierbei werden die unerwünschten Zellen markiert. Die CD34-positiven Zellen wurden über positive Selektion isoliert, während NK-Zellen mittels Depletion und mit Hilfe des NK Cell Isolation Kits isoliert wurden.

Die Isolation der gewünschten Zellpopulation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Bindung des MicroBead-gekoppelten Antikörpers erfolgte für etwa 30 min bei 4 °C. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen mit MACS-Puffer und nachfolgender Zentrifugation (7 min, 400 x g, 4 °C) entfernt. Je nach Zellzahl wurde entweder eine MS-Säule (Maximalkapazität: 1×10^7 Zellen) oder eine LS-Säule (Maximalkapazität: 1×10^8 Zellen) verwendet. Um ein Verstopfen der Säulen durch aneinanderhaftende Zellen zu vermeiden, war zum einen EDTA dem Puffer zugesetzt und zum anderen wurden die Zellen vor dem Auftragen auf die Säulen durch einen Pre-Separation-Filter filtriert. Dieser war mit einer Nylonmembran mit einer Porengröße von 30 µm versehen und diente zur Filtration von Zellsuspensionen, um eventuell aneinanderhaftende Zellverbände zu entfernen. Bevor die Säule aus dem Magneten entfernt wurde, musste sie zwei- bis dreimal mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen werden, um Zellen zu entfernen, die aufgrund der hohen Zelldichte und Säulenstruktur auch ohne MicroBead-Antikörper in der Säule verblieben waren. Erst danach wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und die gewünschte Population eluiert.

5.1.9 Markieren der Zellen mit monoklonalen Antikörpern

5.1.9.1 Markieren der Zellen mit konjugierten Antikörpern

Für die Markierung von Zelloberflächenmarkern wurden die Zellen in 200 µl PBS/EDTA aufgenommen und damit auf eine Zelldichte von etwa $0,1 - 1 \times 10^6$ Zellen pro 200 µl gebracht. Pro Ansatz wurden jeweils 5 µl der fluoreszenzmarkierten Antikörper zur Zellsuspension pipettiert und für 30 min auf Eis oder im Kühlschrank inkubiert. Um einen Verlust der Fluoreszenzaktivität zu verhindern, wurden die Ansätze im Dunkeln gelagert. Nach Inkubation, einem Waschschrift mit 2 ml PBS und anschließender Zentrifugation (7 min, 400 x g, 4 °C,) wurden die Zellen in 500 µl PBS/EDTA resuspendiert und bis zur Analyse, welche immer am selben Tag erfolgte, bei 4 °C deponiert.

5.1.9.2 Markieren der Zellen mit unkonjugierten Antikörpern

Das Färben der Zellen mit den unmarkierten Antikörpern (AK) für KIR2DL5 und KIR3DL2 wurde in drei Schritten durchgeführt. Zuerst wurden die Zellen mit einer Zelldichte von $\geq 0,1 \times 10^6$ in 100 µl PBS/EDTA aufgenommen, dann mit jeweils 100 µl des AKs versehen und für 30 min auf Eis oder im Kühlschrank inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit 2 ml PBS und eine anschließende Zentrifugation (7 min, 400 x g, 4 °C), um nicht gebundene AK zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet erneut in 100 µl PBS/EDTA resuspendiert und für den zweiten Färbeschritt wurden jeweils 5 µl FITC-konjugierte AK (Anti-IgM für 3DL2 und Anti-IgG für 2DL5) zu den Zellen pipettiert und inkubiert. Abermals wurde der Ansatz für 30 min kalt und dunkel deponiert und daraufhin mit 2 ml PBS gewaschen und zentrifugiert. Das Pellet wurde für die dritte Färbung diesmal in 200 µl PBS/EDTA aufgenommen und mit den antigenspezifischen, fluorochrommarkierten Antikörpern versehen. Es wurden 5 µl CD56 (PE-Cy5) und 5 µl eines PE-konjugierten Antikörpers (NKG2D, NKG2A, CD94, NKp44 oder CD16) hinzu pipettiert. Nachdem die ungebundenen AK mit 2 ml PBS heraus gewaschen wurden, konnte das Zellpellet in 500 µl PBS/EDTA aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert werden.

5.1.10 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lässt sich die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle einer Zelle über fluorochrommarkierte, monoklonale Antikörper analysieren (Immunphäotypisierung). Dabei wurden Antikörper verwendet, die gegen bestimmte Proteine (Antigene) auf der Zelloberfläche gerichtet waren. Die gefärbten Zellen wurden auf Lichtstreuung und Fluoreszenzintensität analysiert. Die Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung (180°-Forward Scatter) gilt als Maß für die Größe der Zellen, die in 90°-Richtung (Side Scatter) als Maß für die Granularität. Das Cytomics FC 500 ist mit einem Laser (488 nm, Argon) ausgestattet, der es erlaubt verschiedene Farbstoffe simultan anzuregen. Diese emittieren daraufhin Licht unterschiedlicher Wellenlängen, welches von Photozellen im Gerät qualitativ und quantitativ gemessen wird, so dass die Expression bestimmter Moleküle und deren Expressionsstärke auf jeder einzelnen Zelle bestimmt werden können. Im Durchflusszytometer ist somit eine simultane Messung sowohl der Größe und Granularität als auch der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle einer Zelle möglich.

In dieser Arbeit wurden Antikörper verwendet, die mit den Farbstoffen Fluorescein-isothiocyanat (FITC, Emissionsmaximum bei 530 nm), Phycoerythrin (PE, Emissionsmaximum bei 585 nm) oder einem Tandemkonjugat aus Phycoerythrin und Cyanin5 (PE-Cy5, Emissionsmaximum bei 670 nm) konjugiert waren. Alle drei Farbstoffe wurden durch den Argonlaser (488 nm) zur Emission von Lichtimpulsen angeregt.

Da Zellen bei vielen Wellenlängen eine Autofluoreszenz aufweisen bzw. unspezifische Antikörper-Antigenbindungen resultieren können, wurde eine Isotypkontrolle angesetzt, um unspezifische Bindungen auszuschließen.

Des Weiteren wurde bei jeder Messung eine Kompensation vorgenommen, um in einer zweidimensionalen Darstellung (Dot-Plot) eine zweifelsfreie Zuordnung vornehmen zu können, da bei Farbstoffen wie z.B. FITC und PE eine spektrale Überlappung auftritt. Für die Kompensation der unerwünschten Einstrahlung eines Fluorochroms in den "falschen" Fluoreszenzkanal musste anteilig ein Spannungswert subtrahiert werden (z.B. FL2- % FL1 bei FITC-Einstrahlung in den PE/FL2-Kanal). Hierfür mussten geeignete Kontrollansätze mit jeweils nur einem Fluoreszenzmarker vorbereitet werden.

5.1.11 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

Um für die Versuche der NK-Zelldifferenzierung eine reine Population der hämatopoetischen Vorläuferzellen (CD34⁺) zu erhalten, mussten die mit magnetischen MicroBeads angereicherten Zellen (5.1.8) anschließend noch sortiert werden. Das Prinzip der Zellsortierung ist dem der Durchflusszytometrie sehr ähnlich (Abbildung 5.4). Neben der Charakterisierung von fluoreszenzmarkierten Zellen, besteht beim Sortier-Gerät zusätzlich die Möglichkeit Zellen in definierte Populationen zu trennen. Dabei geben Streulicht und Fluoreszenz Auskunft über die verschiedenen Eigenschaften der Zellen wie bei der Durchflusszytometrie, aber die gemessenen Parameter werden direkt dazu genutzt, um die fluoreszenzmarkierten Zellen nach unterschiedlichen Eigenschaften zu sortieren. In der vorliegenden Arbeit wurde das Gerät „Coulter® Epics®“ von Beckmann Coulter für die Sortierung der Zellen genutzt.

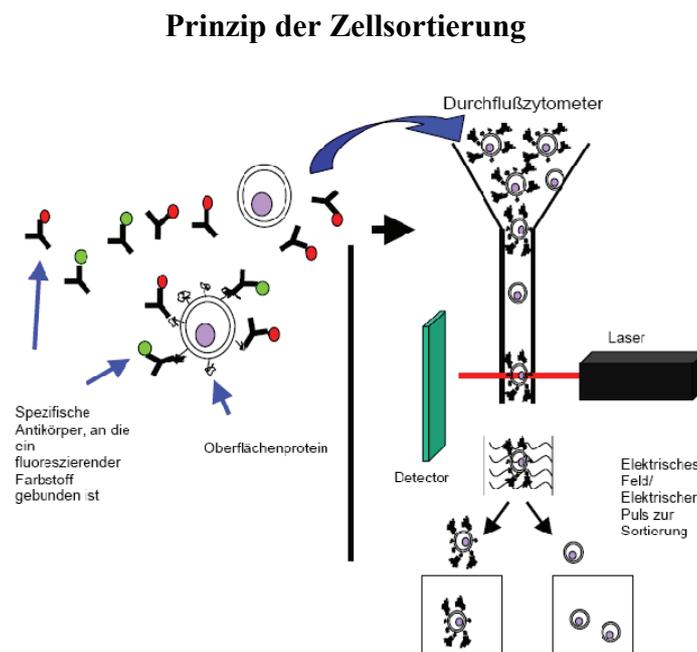


Abbildung 5.4 Das Durchflusszytometer verpackt die Zellen nach dem Durchgang durch den Laserstrahl in winzige Flüssigkeitstropfen, die mit einer positiven oder negativen Ladung versehen werden. Ein elektrisches Feld lenkt die geladenen Zelltröpfchen ab und leitet sie in sterile Auffanggefäße. Auf diese Weise lässt sich eine gewünschte Zellpopulation aus einem Zellgemisch isolieren.

Die Zellsuspension wird in einem dünnen Probenstrahl fokussiert und passiert dann einen Laserstrahl-beleuchteten Messbereich, in dem es zu besagter Lichtstreuung und Fluoreszenzemission kommt. Dann zerlegt ein Ultraschall-Generator die Zellsuspension am Ausgang einer Düse in einzelne Tröpfchen, wobei pro Tropfen nur eine Zelle enthalten sein sollte. Der Sortiermodus war so eingestellt, dass Tropfen mit mehreren Zellen verworfen wurden (single cell modus). Dadurch ergab sich zwar eine niedrigere Ausbeute, aber auch eine höhere Reinheit der sortierten Zellen. Wenn eine fluorchromhaltig, markierte Zelle das Messfenster passiert, gelangt ein Signal zu den Lichtdetektoren (Photomultiplier, PMT), und das Gerät sorgt dafür, dass der Tropfen, der die fluoreszierende Zelle enthält, eine elektrische Ladung erhält. Markierte Zellen fließen demnach in geladenen Tropfen, unmarkierte Zellen in ungeladenen Tropfen durch das Gerät, so dass nur die ersteren im elektrischen Feld zwischen den Ablenkplatten eine Änderung der Fallrichtung erfahren und in sterile Auffangröhrchen gelenkt werden.

5.1.11.1 Isolation der CD34⁺CD38⁻Lin⁻Population

Für die Sortierung der angereicherten CD34-positiven Population wurde folgende Färbung angesetzt:

Tabelle 5-1 Verwendete Antikörper zur Isolation der CD34⁺CD38⁻Lin⁻Population

Antikörper	Lin*	CD38	CD34
Konjugierte Fluoreszenz	FITC	PE	PE-Cy5

*Der Lineage Cocktail 1 (Lin) beinhaltet mehrere Antikörper in Kombination: CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56.

Dabei befanden sich die Zellen in 200 µl MACS-Puffer. Die Zelldichte schwankte je nach Nabelschnurblut zwischen 0,5-2 x 10⁶ Zellen / 200 µl, wobei jeweils 20 µl jedes Antikörpers auf die Zellen pipettiert wurden. Nach 30 min Inkubation auf Eis und im Dunkeln folgte ein Waschschrift und anschließende Zentrifugation (7 min, 400 x g, 4 °C), um ungebundene Antikörper zu entfernen. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation verworfen und das Pellet in 500 µl PBS/EDTA resuspendiert. Die Zellen wurden in sterilen Röhrchen aufgefangen, welche ca. 3-4 ml I20-Medium enthielten.

Folgende Populationen wurden in dieser Arbeit sortiert:

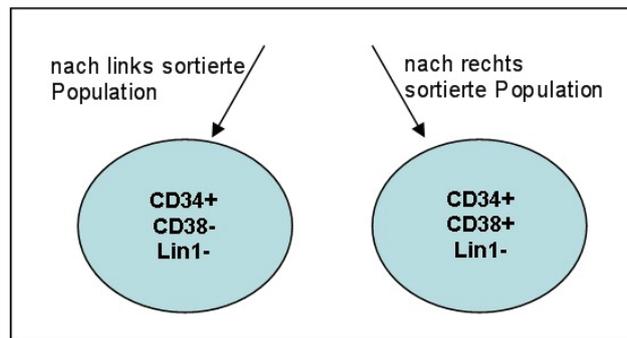


Abbildung 5.5 Darstellung und Charakterisierung der sortierten Populationen

Es gab zwei Sortierungs-Varianten, die namentlich als Bulk- oder Einzelzellablage-Experiment bezeichnet wurden. Für die Bulk-Experimente (Bulk = Masse, Gros) wurden die beiden in Abbildung 5.5 dargestellten Populationen in zwei Röhrcchen sortiert, gesammelt und anschließend in die vorbereiteten AFT-24-Well-Platten ausplattiert. Die zweite Sortierungs-Variante wurde mittels *autoclone* durchgeführt und diente zum Ansetzen der Einzelzellablagen, wobei die undifferenzierte Zellpopulation ($CD34^+CD38^-Lin1^-$) direkt in 96-Well-Platten sortiert wurde. Dabei war der Modus so eingestellt, dass nur ein Tropfen und damit nur eine Zelle pro well abgelegt werden konnte (Einzelzellablage, EZ). In der Regel blieben noch Zellen übrig, die nach der EZ-Ablage in Röhrcchen sortiert wurden, und anschließend parallel zum EZ-Experiment als Bulk-Kultur in 24-Well Platten ausplattiert werden konnten. Das Bulk-Experiment diente in diesem Fall als Kontrolle für die klonale NK-Zelldifferenzierung der Einzelzellablagen.

5.1.12 Ausplattieren der sortierten Zellen und Ansetzen der Experimente (Bulk)

Die $CD34^+CD38^-Lin1^-$ -Population wurde während des Sortiervorgangs in sterilen Falconröhrcchen (15 ml) aufgefangen und dann zentrifugiert (7 min, 400 x g, 4 °C). Anschließend wurde das Pellet in 1 ml NK1-Medium resuspendiert, um die Zellen danach auf die gewünschte Konzentration einstellen zu können. Alle Bulk-Experimente waren so konzipiert, dass 300-400 sortierte Vorläuferzellen pro Well auf die Feederzellen (AFT) ausplattiert wurden.

Die Versuche der klonalen NK-Zelldifferenzierung (Einzelzellablage) wurden, wie bereits in Kapitel 5.1.11 beschrieben, direkt und automatisch während des Sortier-Prozesses angesetzt, wobei das entsprechende Kulturmedium bereits in den 96-Well Platten vorpipettiert war.

5.1.13 Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen in NK-Zellen

Für die Kokultur der sortierten CD34⁺38⁻Lin1⁻-Zellen auf AFT024-Zellen wurde das Differenzierungsmedium zu Kulturbeginn mit 20 % hitzeinaktiviertem, humanem Albumin-Serum supplementiert (NK1-Medium). Nach sieben Tagen wurde das NK1- durch NK2-Medium ersetzt, wobei das humane Albumin-Serum auf 10 % reduziert wurde. Der Zytokinmix bestand aus 1000 U/ml IL-2, 20 ng/ml IL-7, 20 ng/ml SCF, 10 ng/ml FLT-3-Ligand und 5 ng/ml IL-3 bei Kulturstart, welches später durch 10 ng/ml IL-15 ersetzt wurde (NK2-Medium). Es wurde ein wöchentlicher Mediumwechsel durchgeführt, wobei das alte Medium zunächst aus den Wells entfernt wurde, welche dann mit 1 ml frischem, vorgewärmten Medium aufgefüllt wurden. Die Dauer der Differenzierungsversuche betrug je nach Eigenschaften des verwendeten CBs etwa fünf bis sechs Wochen. Die ersten NK-Zellklone wurden erst nach 7-14 Tagen sichtbar. Dies war auch der Zeitpunkt der ersten Zellprobenentnahme. Je nach CB und zur Verfügung stehender Zellzahl konnte pro Woche mindestens einmal eine Entnahme durchgeführt werden, so dass pro CB in der Regel fünf unterschiedliche Zeitpunkte vorlagen. Bei der Probenentnahme wurden die Zellen aus 2-3 Wells mit Hilfe der Pipette durch mehrmaliges auf- und abpipettieren vom Boden abgetragen, entnommen und in einem frischen Röhrchen vereinigt. Um sicher zu gehen, dass keine Zellen im Well verblieben, wurde 3x mit 1 ml Iscove's 20-Medium nachgespült und ebenfalls zu den geernteten Zellen ins Röhrchen pipettiert. Beim Abtragen der Zellen war speziell darauf zu achten, dass kein Schaum produziert wurde, um ein Platzen der Zellen zu vermeiden. Abschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, und das Pellet wurde entweder für durchflusszytometrische Analysen oder zur RNA-Isolation vorbereitet. Die morphologische Veränderung der Zellen während der Differenzierung wurde mikroskopisch beobachtet.

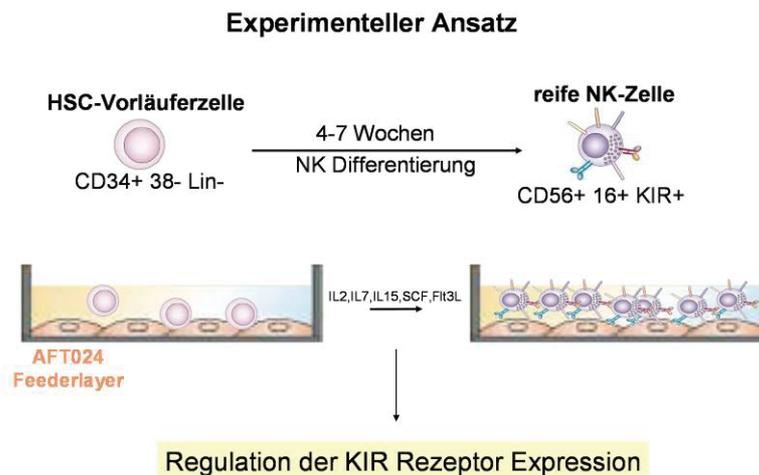


Abbildung 5.6 Graphische Darstellung des experimentellen Ansatzes zur Differenzierung von NK-Zellen. Links ist zu sehen, dass die hämatopoetischen Vorläuferzellen ($CD34^+38^-Lin^-$) auf den Feederzellen abgelegt werden. Im Verlauf von 4-7 Wochen werden daraus reife NK-Zellen, die KIR- und CD16-Rezeptoren tragen (rechts). Die notwendigen Zytokine sind ebenfalls in der Abbildung vermerkt (mitte).

5.1.14 Differenzierung von NK-Zellklonen mittels Einzelzellablage

Um eine genaue Aussage über die sequentielle KIR-Expression treffen zu können, musste die NK-Zelldifferenzierung auf klonaler Ebene durchgeführt werden. Dazu wurden die Zellen wie oben bereits beschrieben aufgereinigt (5.1.11, 5.1.12), gefärbt und in die vorbereiteten 96-Well-AFT-Platten sortiert. Die Klone der Einzelzellablage (EZ) wurden direkt in R20-Medium in die 96-Well-Platten sortiert, um die Zellen zu synchronisieren. Dies sollte ein im Medium enthaltener Zytokinmix (Flt-3-Lig, SCF, TPO, IL-7) gewährleisten. Nach zweiwöchiger Kultivierung und Synchronisation wurde mit der eigentlichen NK-Zelldifferenzierung begonnen, indem das Differenzierungsmedium (NK1-Medium) auf die Zellen gegeben wurde, welches nach sieben Tagen Kultur durch das NK2-Medium ersetzt wurde. Dieses wurde bis zum Schluss für die Differenzierung verwendet. Alle Medien wurden 1x wöchentlich gewechselt, bei Bedarf auch öfter, d.h. wenn der im Medium enthaltene Farb-Indikator Phenolrot ein Abweichen des pH-Wertes anzeigte. Das Optimum liegt bei pH 7,2 - 7,4. Da Zellkulturen meist geschlossene Systeme sind, sinkt der pH-Wert in Abhängigkeit von der Stoffwechselaktivität der Zellen stetig. Ein entsprechend gesunkener pH-Wert macht einen Mediumwechsel erforderlich. Zur Kontrolle des pH-Werts dient der Farbumschlag des Phenolrot. Es ist bei pH 7,4 rot und wird über orange (pH 7,0) schließlich

gelb (pH 6,5). Im Alkalischen ($> \text{pH } 7,6$) wird es bläulichrot bis lila. Für den Mediumwechsel werden 130 μl /well entnommen und 150 μl frisches, vorgewärmtes Medium hinzupipettiert.

Die ersten NK-Zellklone konnte man nach etwa drei Wochen Kultivierung beobachten. Die Zellen befanden sich direkt und solide auf dem Feederlayer (AFT024), und mussten daher wie bereits für die Bulk-Kulturen beschrieben, aus den Wells abgetragen werden. Zu diesem Zweck wurde eine 200 μl -Pipette benutzt, mit deren Spitze die Zellen vom Boden abgespült und zusätzlich sehr vorsichtig abgekratzt werden konnten. Die Zellen eines Wells wurden abzentrifugiert und das Pellet in RLT-Puffer zur RNA-Isolation lysiert. Da in der Regel 10 96-Well-Platten aus einem CB angesetzt werden konnten, war genügend Material vorhanden, um 3x pro Woche 10 Klone zu ernten. Die Zellen wurden dafür morphologisch und nach Erfahrungswert mikroskopisch ausgewählt.

5.1.14.1 Unterteilung der Klone während der Zellentnahme und Weiterdifferenzierung

Nachdem einige Experimente der klonalen Einzelzellablage erfolgreich durchgeführt werden konnten, wurde während der NK-Zelldifferenzierung aus Nabelschnurblut Nr.15 der Versuch unternommen, einige Klone nicht ganz aus dem Well abzutragen, sondern eine Hälfte zur weiteren Kultivierung im Well zu belassen. Das sollte der genaueren Analyse der KIR-Expression während der NK-Zelldifferenzierung aus $\text{CD}34^+$ -Vorläuferzellen dienen.

Dazu wurden die ausgewählten, adhären Klone unter der Sterilbank mit einer sterilen 200 μl -Spitze halbiert, indem die Spitze als „Messer“ verwendet wurde, um den Klon in zwei Hälften zu teilen. Dann konnte eine Hälfte mit derselben Spitze vorsichtig vom Boden abgehoben und abgespült werden, um dann mit dem Medium in ein vorbereitetes Eppendorfgefäß überführt zu werden. Es folgte eine Zentrifugation (7 min, 3000 rpm, 4 °C) und eine Lyse des Zellpellets mit RLT-Puffer zur Vorbereitung auf die RNA-Präparation.

5.1.15 Stimulation mit 5'-Aza-2'-Deoxycytidin (AZA) und Trichostatin A (TSA)

Bei den Experimenten mit AZA und TSA war darauf zu achten, dass nur proliferierende Zellen stimuliert wurden, da sich die Agenzien nur in solchen voll auswirken können. Es wurden im Vergleich zu den Bulk-Experimenten mehr Zellen eingesetzt (~ 20000/Well), da die Chemikalien sehr zytotoxisch wirken und so die Zellausbeute verringern. Die Stimulation mit AZA (1 μ M) und TSA (25 nM) erfolgte durch Zugabe der Substanzen zum Zelldifferenzierungs-Medium, welches auf die Zellen in den 24-Well Platten gegeben wurde. Es wurde immer eine Kontrolle ohne AZA und TSA mitgeführt, weiterhin ein Ansatz nur mit AZA oder TSA und einer mit beiden Stimulanzien. Nach 48 h erfolgte eine zweite Stimulation, indem die gleiche Menge an AZA bzw. TSA dem Medium hinzugefügt wurde. Dies war notwendig, da die Chemikalien bei 37 °C nicht sehr stabil sind. Die Zellen wurden weitere 24 h kultiviert und dann für durchflusszytometrische Analysen oder zur RNA-Isolation abzentrifugiert.

5.2 Methoden der Molekularbiologie

5.2.1 Analyse der KIR-Expression auf Transkriptebene

5.2.1.1 RNA-Isolierung aus lymphatischen Zellen

Die Isolierung von RNA aus vitalen Zellen wurde mit Hilfe des *RNeasy Kits* von Qiagen durchgeführt. Dabei wurden pro Ansatz $0,5-5 \times 10^6$ Zellen mit $350 \mu\text{l}$ ($5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Zellen in $600\mu\text{l}$) RLT- Puffer (nach Zugabe von $10 \mu\text{l}$ β -Mercaptoethanol auf 1 ml Puffer) behandelt, der die Zellen aufschließt und Ribonukleasen inhibiert. Dieses Lysat wurde bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert. Bei der weiteren Aufarbeitung entsprechend des Herstellerprotokolls wurde die RNA über Silica-Membran-Säulchen gereinigt. Durch einen zusätzlichen DNase-I-Verdau (RNase-free DNase Set, Qiagen) auf der Säule wurden Reste von kontaminierender DNA abgebaut. Die Elution erfolgte in $30 \mu\text{l}$ RNase-freiem Wasser. Nach der Isolierung wurde die RNA bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und bei Bedarf in cDNA umgeschrieben.

5.2.1.2 Messung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Das verwendete Photometer (GeneQuantPro, Pharmacia) misst die Extinktion bei vier unterschiedlichen Wellenlängen: 230 , 260 , 280 und 320 nm . Bei einzelsträngiger Nukleinsäure entspricht eine Extinktion von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm einer Konzentration von $40 \mu\text{g/ml}$. Zur Messung wurde eine UV-durchlässige Quarzküvette (1 cm Schichtdicke) verwendet, welche ein Mindestvolumen von $7 \mu\text{l}$ erforderte. Als Referenz diente RNase-freies Wasser, welches zur Elution der RNA benutzt wurde. Zwischen den Messungen wurde die Küvette mit Aqua dest. gespült. Störende Kontaminationen (Proteine) konnten durch den Quotienten von Extinktion $A_{260} : A_{280}$ bestimmt werden, der im Bereich von $1,8- 2,0$ liegen sollte. Wenn nur wenige Zellen für die RNA-Aufreinigung eingesetzt werden konnten, wurde die Messung mit $1,5 \mu\text{l}$ des Eluats am Nanodrop (Nanodrop Technologies) durchgeführt, um eine schnelle und genaue Messung zu gewährleisten und ohne zu viel Material zu verlieren.

5.2.1.3 Reverse Transkription (RT)

Für die RT-PCR musste die isolierte RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden, weil Ribonukleinsäuren nicht als Vorlage (Template) in einer PCR-Reaktion verwendet werden können; es gibt kein entsprechendes, hitzestabiles Enzym zur Polymerisation der RNA. Die Synthese der cDNA aus RNA wurde mit der Reversen Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) durchgeführt. Da die mRNA als Träger der Proteininformation spezifisch in cDNA umgeschrieben werden sollte, wurden Oligo-dT-Nukleotide (15-mer) verwendet, welche an die Poly(A)-Schwänze der mRNAs hybridisieren und als Primer für die M-MLV dienen. Durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT, Reduktionsmittel) wurde die enzymatische Reaktion der M-MLV stabilisiert sowie durch Zugabe von RNasin die RNA vor möglichen Ribonukleasen geschützt. Für einen einfachen Ansatz wurde folgendes Protokoll pipettiert:

1-2 µg RNA	10 µl
Oligo dT (0,5 µg/1 µg RNA)	1-2 µl
H ₂ O RNase-frei	ad 15 µl

Dieser Mix wurde 5 min bei 65 °C denaturiert, um vorhandene Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen und eine effektive Hybridisierung der Oligo-dT-Primer zu gewährleisten. Danach wurde die Probe sofort im Eis abgekühlt und entstandene Kondensationsströpfchen herunter zentrifugiert. Folgender Reagenzienmix wurde dann hinzugefügt:

Puffer (5x)	6,4 µl
DTT (0,1 M)	3,2 µl
RNasin (40 U/µl)	1,6 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1,6 µl

Der Ansatz wurde gut gemischt und 2 min bei 37 °C erwärmt, dann wurde das Enzym hinzu pipettiert und wieder vorsichtig gemischt:

M-MLV (200 U/µl)	1,75 µl
------------------	---------

Die Reverse Transkription erfolgte für 50 min bei 42 °C und für Random Primer bei 37 °C. Letztere sind Oligonukleotid-Hexamere aller 4⁶ möglichen Sequenzen. Um die Reaktion zu stoppen, wurde der Ansatz für 15 min bei 70 °C erhitzt. Es folgte abermals eine Abkühlung auf Eis mit anschließender kurzer Zentrifugation. Die cDNA konnte sofort in einer PCR eingesetzt oder bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert werden.

Eine weitere Möglichkeit der cDNA-Synthese war die Verwendung des cDNA-Synthesis Kits von Biorad. Der Vorteil bei Benutzung dieses Kits bestand darin, dass Oligo-(dT)- und Random-Primer gleichzeitig verwendet werden konnten. Letztere binden aufgrund der Vielfalt der Hexamer-Sequenzen an diversen Positionen der zu transkribierenden RNA, was eine sichere cDNA-Synthese des gesamten RNA-Moleküls gewährleistet. Dies war besonders wichtig, wenn die Sequenz-spezifischen Primer für die PCR-Reaktion im 5'-Teil der transkribierten RNA hybridisieren sollten; bei alleiniger Verwendung der Oligo-(dT)-Primer konnte es, je nach Größe des RNA-Moleküls, zum frühzeitigen Abbruch der cDNA-Synthese kommen, wenn die Reverse Transkriptase nicht mehr 100 %-ig aktiv war.

5.2.1.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase-chain-reaction, PCR), ein von Mullis und Faloona (Mullis and Faloona, 1987) beschriebenes Verfahren, ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen. Mit Hilfe zweier synthetischer DNA-Oligonukleotide, welche gegen die flankierenden Bereiche der beiden komplementären Stränge der Ziel-DNA hybridisieren und einer hitzestabilen DNA-Polymerase ist es möglich, durch wiederholte Zyklen der DNA-Denaturierung, Oligonukleotidbindung (Annealing) und Verlängerung der gebundenen Primernukleotide (Elongation) geringste Mengen an Ziel-DNA um ein Vielfaches zu amplifizieren. Die hitzestabile DNA-Polymerase aus dem thermophilen Organismus *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA-Polymerase) stellt durch ihre Stabilität bei 95 °C ein geeignetes Enzym für die Methodik dar.

Mithilfe der PCR wurden bestimmte Sequenzen der cDNA spezifisch amplifiziert, um zu untersuchen, ob diese Sequenzen in der zuvor isolierten RNA-Probe enthalten waren. Dies wurde mit spezifischen Primern für die Sequenzen der KIR-Rezeptoren durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde jeweils ein Ansatz mit Primern für β -Aktin mitgeführt, ein Protein, das von jeder Zelle exprimiert wird und deshalb auch als eines der Haushaltsgene (*housekeeping gene*) bezeichnet wird. Ein weiteres Primerpaar, welches spezifisch für die Sequenz des

CD56-Rezeptors (NCAM) war und als Kontrolle für den Fortschritt der NK-Differenzierung diente, wurde ebenfalls mitgeführt. Ein Reaktionsansatz (25 μ l) enthielt die folgenden Reagenzien:

cDNA (~ 80 ng)

1 x PCR-Puffer

0,25 mM dNTPs

12,5 pmol Primer (*Sense*)

12,5 pmol Primer (*Antisense*)

0,75 U HotStar-Taq-DNA-Polymerase [5 U/ μ l]

H₂O ad 25 μ l

Die Amplifikation im Thermocycler erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Tabelle 5-2

Initiale Aktivierung / Denaturierung	15 min	bei 95 °C
Amplifikation (5 Zyklen)	20 Sek	bei 96 °C
	45 Sek	bei 62 °C
	45 Sek	bei 72 °C
Amplifikation (30 Zyklen)	20 Sek	bei 95 °C
	45 Sek	bei 60 °C
	45 Sek	bei 72 °C
Endpolymerisation	7 min.	bei 72 °C
Lagerung	∞	bei 4 °C

5.2.1.5 Real-Time-PCR (ABI Prism 7700 HT)

Die Technik der Real-Time-PCR kombiniert Polymeraseketten-Reaktion mit der Möglichkeit das entstehende PCR-Produkt im Moment der Synthese (in Echtzeit, real time) durch interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe zu detektieren und quantifizieren. Der Anstieg der emittierten Fluoreszenz ist proportional zum Anstieg der Konzentration des doppelsträngigen Amplifikationsproduktes. Der meistverwendete Farbstoff ist SYBR Green™, er besitzt eine Anregungswellenlänge von 497 nm und eine Emissionswellenlänge von 520 nm, die erst detektiert wird, wenn er in doppelsträngige DNA eingebaut wird. Dieses unspezifische Verhalten ist allerdings auch ein Nachteil, da nicht zwischen korrektem Produkt und Artefakten wie Primerdimeren unterschieden werden kann. Jede Real-Time-PCR mit SYBR Green™ muss deshalb einer Schmelzpunktanalyse unterzogen werden. Diese Analyse wird am Ende der eigentlichen Real-Time-PCR durchgeführt, indem das Reaktionsgemisch in 1 °C-Schritten von 50 °C auf 95 °C erhitzt und kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen wird. Der Punkt, an dem das DNA Produkt schmilzt, ist durch einen Abfall der Fluoreszenz gekennzeichnet, da der interkalierende Farbstoff von der nun einzelsträngig vorliegenden DNA dissoziiert. Liegen mehrere Produkte mit unterschiedlicher Länge vor, gibt es auch mehrere Fluoreszenzabfälle im Verlauf der Analyse. Um weitere Unsicherheit zu vermeiden, wurden alle Produkte noch mal einer Agarosegelelektrophorese unterzogen, um so die korrekten Produkte zu visualisieren.

Die Phase vor dem Übergang zur linearen bzw. logarithmischen Fluoreszenzunahme ist die Basislinie (Baseline), sie stellt das Hintergrundrauschen dar und wird von der eigentlichen Produktfluoreszenz abgezogen (Abbildung 5.7). Für die Errechnung der Probenkonzentration wird der sogenannte Grenzyklus (threshold cycle; Ct) herangezogen. Das ist die Zyklenanzahl, bei der die Fluoreszenz einer Probe die erste größere Steigung erfährt und das erste Mal klar zu detektieren ist, dies entspricht laut Definition dem 10-fachen Wert der Standardabweichungen der Fluoreszenzsignale der ersten 15 Zyklen. Man vergleicht zwei Proben, indem man ihre Ct-Werte vergleicht, d.h. eine Probe mit geringem Ct-Wert (geringer Zyklenzahl bis zur Grenze) lag in höherer Konzentration vor als eine Probe mit höherem Ct-Wert.

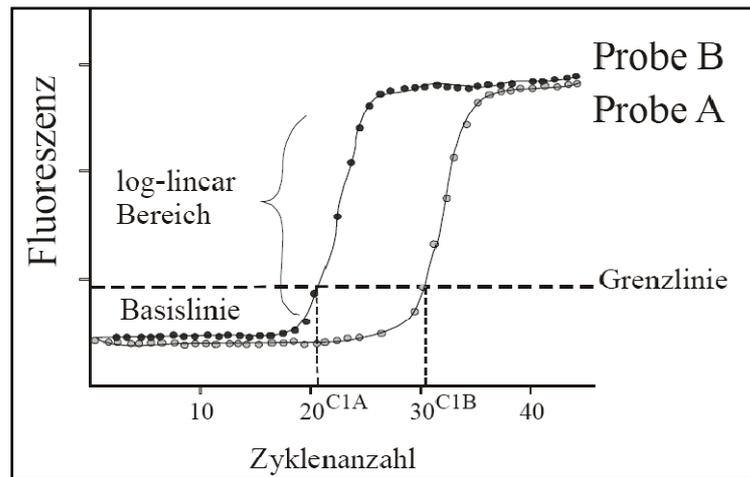


Abbildung 5.7 Amplifikationsplot aus QuantiTec Syber Green PCR-Handbuch

Die Auswertung der Real-Time PCR erfolgt über die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode, wobei die relative RNA-Menge im Verhältnis zu einer Referenzprobe nach folgender Formel errechnet wurde:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}, \text{ wobei}$$

$$\Delta Ct = Ct (\text{Zielgen}) - Ct (\text{Endogene Kontrolle}) \text{ und}$$

$$\Delta\Delta Ct = dCt (\text{Probe}) - dCt (\text{Kalibrator-Probe})$$

Es wurden folgende Komponenten für die Real-Time-PCR pipettiert:

cDNA	2,0 μ l
5'-Primer	1 μ l
3'-Primer	1 μ l
SYBR Green I	12,5 μ l
H ₂ O (nukleinsäurefrei)	8,5 μ l

Real-Time-PCR-Protokoll, 40 Zyklen:

Tabelle 5-3

Enzymaktivierung	10 min bei 95 °C
Amplifikation (40 Zyklen)	Denaturierung, 3 min bei 95 °C Primerannealing, 30 sec bei 55 °C Polymerisation, 30 sec bei 72 °C

Die Datenanalyse erfolgte unter Verwendung des Analyseprogramms „*Sequence Detection System*“. Es wurde mit Hilfe des Programms die *Baseline* und die Zyklusanzahl bestimmt, die die größte Steigung hatte (Threshold Cycle; Ct). Die Ct-Werte der einzelnen Proben, die als Triplikate gemessen worden sind, wurden gemittelt und Ausreißerwerte herausgenommen.

5.2.1.6 Agarosegelelektrophorese

Die Nukleinsäuren wurden nach der PCR über ein 1,2 %-Agarosegel aufgetrennt. Hierfür wurde die entsprechende Menge Agarose in 1 x TBE-Puffer in einem Mikrowellen-Gerät aufgeköcht und auf etwa 60 °C abgekühlt. Anschließend wurden 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) auf 100 ml Volumen zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in die doppelsträngigen Nukleinsäuren und emittiert unter UV-Bestrahlung sichtbares Licht. Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer gegossen und nach Polymerisation des Gels wurde der Laufpuffer in die Kammer hinzugegeben. Die Proben (je 25 µl) wurden mit Blaumarker versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Es wurde ein elektrisches Feld von ca. 200 mA angelegt. Zur Abschätzung der Fragmentlängen wurde bei jedem Lauf ein Standard mit definierten Fragmentlängen mitgeführt. Nach einer ausreichenden Auftrennung der Proben wurde das Gel unter UV-Licht mit einer Kamera aufgenommen.

5.2.2 KIR-Genotypisierung der verwendeten Proben

5.2.2.1 DNA-Isolation aus Vollblut

Die DNA-Extraktion wurde mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit von Qiagen durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Abschließend wurde die DNA nicht wie angegeben in 200 µl sondern in 100 µl Elutionspuffer aufgenommen.

5.2.2.2 DNA-Messung

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge entspricht eine Extinktion von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml. Zur Messung wurden UV-durchlässige Quarzküvetten (7 µl, 70 µl Volumen). Als Referenzwert diente RNase-freies Wasser. Zwischen zwei Messungen verschiedener DNA-Proben wurde die Küvette mit Aqua dest. gespült.

5.2.2.3 KIR-Typisierung

Das Prinzip der KIR-Typisierung basiert auf der Methode der PCR-SSP (Polymerase chain reaction, sequence specific primer). Die Methode der PCR wurde bereits unter 5.2.1.4 beschrieben. Bei der für die KIR-Typisierung verwendeten DNA-Polymerase handelt es sich um die thermostabile Taq-Polymerase. Die verwendeten SSP-Oligonukleotide sind aus Uhrberg et al., 1997 und die Primer für die KIR-Typisierung finden sich in Tabelle 4.6.

PCR-Ansatz (1x):

PCR-Puffer [10 x]	2,5 µl
dNTPs (10 nmol/µl)	0,55 µl
Primer (Sense) (2,5 pmol/µl)	2,5 µl
Primer (Antisense) (2,5 pmol/µl)	2,5 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,17 µl
DNA (50-200 ng/µl)	2 µl
H ₂ O (nukleinsäurefrei)	ad 25 µl

Auf einer 96-Well-PCR-Platte wurden acht KIR-Typisierungen durchgeführt, da für eine Typisierung 12 Reaktionen benötigt wurden. Bei nicht eindeutigen Ergebnissen wurde die Reaktion mit Hilfe der HotStarTaq-DNA-Polymerase wiederholt, um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen. Dazu wurden 0,14 µl der HotStarTaq-Polymerase (5 U/µl) verwendet. Ansonsten wurde der PCR-Ansatz beibehalten. Die Primer wurden jeweils in die PCR-Platten vorpipettiert und bei -80 °C bis zum Gebrauch eingefroren. Als Positivkontrolle wurde bei der ersten der vorpipettierten Platten eine bereits bekannte Probe mit einem definierten Genotyp, der alle KIR-Rezeptoren beinhaltet bzw. dem nur KIR2DS5 fehlt, mitgeführt. Als Negativkontrolle wurde bei einer Probe Aqua dest. anstelle des DNA-Templates verwendet. Die KIR-Typisierung wurde im Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 5-4

Initiale Aktivierung / Denaturierung	3 min	bei 95 °C
Amplifikation (5 Zyklen)	20 Sek	bei 96 °C
	45 Sek	bei 62 °C
	90 Sek	bei 72 °C
Amplifikation (30 Zyklen)	20 Sek	bei 95 °C
	45 Sek	bei 60 °C
	90 Sek	bei 72 °C
Endpolymerisation	7 min.	bei 72 °C
Aufbewahrung	∞	bei 4 °C

Wurde die HotStarTaq-Polymerase verwendet, betrug die initiale Denaturierungsphase 15 min anstatt 3 min, um das Enzym zu aktivieren. Anschließend wurde die PCR-Platte bis zum gelelektrophoretischen Nachweis im Kühlschrank gelagert.

5.2.3 Analyse epigenetischer Faktoren

Die Analyse epigenetischer Faktoren während der NK-Zelldifferenzierung wurde mittels Real-Time-PCR durchgeführt. Diese Methode wurde bereits in Kapitel 5.2.1.5 erklärt, aber in diesem Fall wurde eine sog. *Micro Fluidic Card* (MFC) verwendet, anhand derer man mit vorkonstruierten, anwenderspezifischen Primern und TaqMan-Sonden bestimmte Gene und deren Transkriptionsstatus untersuchen kann. Das PCR-Produkt wurde mittels einer fluoreszenzmarkierten TaqMan-Sonde fluorimetrisch während jedes PCR-Zyklus nachgewiesen. Die Position der Sonde war so gewählt, dass eine Hybridisierung mit der cDNA zwischen den beiden Sequenz-spezifischen Primern möglich war, damit es während der Amplifikation zu einem Abbau und somit zu einer Fluoreszenz kommen konnte. Die TaqMan-Sonden waren an ihrem 5'-Ende mit dem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff FAM (6-carboxy-fluorescein) und an ihrem 3'-Ende mit dem Quencher TAMRA (6-Carboxy-tetramethylrhodamin) markiert.

Für die quantitative Detektion der amplifizierten Real-Time-PCR-Produkte wurde die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq-DNA*-Polymerase ausgenutzt, indem die zwischen den beiden Sequenz-spezifischen Primern hybridisierte TaqMan-Sonde während der Polymerisation gespalten und dadurch der fluoreszierende Farbstoff (FAM) vom Quencher (TAMRA) getrennt wurde (Holland et al., 1991). Die Zunahme der für den Farbstoffe FAM spezifischen Fluoreszenz-Signale ist direkt proportional zur Anzahl der PCR-amplifizierten DNA-Fragmente des entsprechenden Gens. Die Anzahl der Zyklen, bei der das gemessene

Fluoreszenz-Signal einen vorgegebenen Schwellenwert übersteigt, ergibt den Ct-Wert. Für die Quantifizierung der Menge an Genom Kopien in der Probe wird der Ct-Wert der Probe mit dem Ct-Wert eines Standards (Referenz-Probe) in Beziehung gebracht. Die relative Quantität der RNA-Menge wurde dabei nach folgender Formel berechnet:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}, \text{ wobei}$$

$$\Delta Ct = Ct (\text{Zielgen}) - Ct (\text{Endogene Kontrolle}) \text{ und}$$

$$\Delta\Delta Ct = dCt (\text{Probe}) - dCt (\text{Kalibrator-Probe})$$

17 unique assays + 1 mandatory control, 1 replicate per biological sample, 8 unique port set																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	PORT	SAMPLE
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	1	1
B	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47		
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	2	2
D	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47		
E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	3	3
F	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47		
G	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	4	4
H	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47		
I	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	5	5
J	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47		
K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	6	6
L	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47		
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	7	7
N	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47		
O	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	8	8
P	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47		

(A)



(B)



(C)

Abbildung 5.8 (A) Schematische Darstellung der Micro Fluidic Card (MFC). In der Abbildung sind rechts die acht Eingänge (Ports) der Karte gezeigt, in denen acht verschiedene Proben (Samples) aufgetragen werden können. Diese verteilen sich mittels Zentrifugation auf je 48 Wells, in denen die Primer und Sonden der jeweiligen Gensequenz bereits vorpipettiert sind (1-47, wobei CTL die endogene Kontrolle- hier GAPDH- darstellt). (B) Fotografie der MFC. Rechts sind die Eingänge zum Auftragen der Proben zu erkennen und an der Seite sieht man einen Barcode, anhand dessen das ABI Prism 7900 HT-Gerät die Karte mit den entsprechenden Genen einlesen kann.

(C) Fotografie der MFC von oben und nach Beladen der Karte mit den Proben. Durch das Färben der Proben mit einem roten Farbstoff erkennt man die Verteilung derselben auf die 48 Wells.

Bevor die gewünschten cDNA-Proben auf die Micro-Fluidic-Card geladen werden konnten, mussten sie zunächst mittels Random-Primern und der M-MLV in cDNA transkribiert werden (5.2.1.3). Der RT-PCR-Ansatz wurde zum Schluss mit Aqua dest. auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. Die gleiche Menge eines Master-Mixes von Applied Biosystems wurde ebenfalls dazu pipettiert, so dass sich ein Endvolumen von 100 µl für eine Probe und damit für einen Karteneingang ergab. Der Mix wurde gut gemischt und, um verspritzte Tropfen an Wand und Deckel des Eppendorfgefäßes wieder zu vereinigen, bei Raumtemperatur, 13000 rpm und für einige Sekunden zentrifugiert. Die fertigen (acht) Proben wurden kurz vor Beginn der Real-Time-PCR auf die Karte pipettiert, welche dann 2x für 1 min bei 1200 rpm in einem dafür vorgesehenen Einsatz in einem Ausschwingrotor zentrifugiert wurde. Danach mussten eventuell entstandene Luftbläschen entfernt und das Volumen in den Wells optimiert werden. Dafür wurde die Karte waagrecht (mit der Aluminiumseite nach oben) in einen Schieber gelegt, der eine Vorrichtung hatte, anhand derer die Volumina in den Wells angeglichen und Luftblasen entfernt werden konnten. Dazu wurde über die in horizontaler Position befindliche MicroFluidicCard ein Druck ausgeübt, indem manuell, gleichmäßig und langsam von unten nach oben (in Richtung der Ports) diese Vorrichtung über die Karte bewegt wurde. Die Karte wurde dann sofort aus dem Schiebegerät entfernt, und erst dann wurde der Schieber wieder in seine Ausgangsposition (unten) gebracht. Bevor die Karte in das vorbereitete ABI Prism-Gerät gelegt werden konnte, mussten die Proben-Eingänge (Ports) mit einer Schere abgeschnitten werden.

5.2.4 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) ist eine Technik, mit der nichtkovalente Proteinbindungen an Nukleinsäuren (*in vivo*) nachgewiesen werden können. Mittels spezifischer Antikörper können so molekular modifizierte Histonvarianten einem bestimmten genomischen Sequenzabschnitt von 500-1000 bp Länge zugeordnet werden. Dabei macht man sich die Kenntnis des Histoncodes zunutze und kann je nach Modifikation (Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinylierung) der Aminosäure-Reste in den Histonen Aussagen zum Status der Genaktivität machen. Die Nukleosomen spielen für den Grad der Chromatindichte eine entscheidende Rolle. Sind die Histone beispielsweise acetyliert, liegt die DNA in einer aufgelockerten Struktur vor und das Gen kann transkribiert werden. Mittels Histondeacetylasen (HDACs) werden die Acetylgruppen entfernt, was zu einer dichteren

Chromatinstruktur führt, die den Zugang für Transkriptionsfaktoren erschwert. Die Methylierung der Histone durch Histonmethyltransferasen (HMTs) kann sowohl auf aktive als auch auf transkriptionell inaktive Gene hinweisen, was abhängig vom Kontext der übrigen Modifikationen des jeweiligen Histons ist. Phosphorylierung und Ubiquitinylierung der Histone werden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

5.2.4.1 Fixieren der Zellen und des Chromatins

Für den ChIP-Assay waren etwa 1×10^6 Zellen erforderlich, die in eine 6-Well Kulturschale gegeben und durch Zugabe von Formaldehyd (1 % Endkonzentration) fixiert wurden. Die Zellen wurden für 10 min bei 37 °C inkubiert, wobei die DNA mit den Histonen stabil vernetzt (cross-linked) wurde. Danach musste das Medium inklusive Formaldehyd entfernt und die Zellen 2x mit eiskaltem PBS bei 4 °C mit 2000 rpm für 5 min gewaschen werden. Das PBS wurde zuvor mit Proteasen (1 mM Phenylmethyl-sulfonyl-fluorid (PMSF), 1 µg/ml Pepstatin A, 1 µg/ml Aprotinin) versetzt. Das Zellpellet wurde nach dem zweiten Waschschrift in 200 µl warmem SDS-Lyse-Puffer bei Raumtemperatur resuspendiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation erfolgte die Scherung der DNA.

5.2.4.2 Scherung der DNA

Für die DNA-Scherung wurden die Zellysate in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, gut gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Proben in eiskaltem Wasser mit einer 2 mm Mikrosonde des Ultraschall-Desintegrator-130W sonifiziert. Dabei wurde die DNA mit 30 % maximaler Amplitude 6 mal für 10 Sekunden in 200-800 bp lange Fragmente geschert.

5.2.4.3 Präzipitation der DNA-Histon-Komplexe

Die sonifizierten Zellysate wurden bei 13000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert und jeweils 200 µl Überstand in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 1,8 ml Dilutionspuffer (mit 100 mM PMSF, Leupeptin und Pepstatin) wurde eine Kontrollprobe (input control) von 120 µl abgenommen. Die übrige Probe wurde mit 70 µl „Salmon Sperm DNA/ProteinA Agarose“ versetzt, gut gemischt und für 30 min bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 1800 rpm bei Raumtemperatur für 1,5 min, wonach der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Dann wurden die folgenden Immunopräzipitations-Antikörper hinzugefügt:

- 1) Kontrolle: kein Antikörper
- 2) Isotypkontrolle: Kaninchen IgG 2,5 µl
- 3) Anti-acetyl-Histone H4 (Lys8) 5,0 µl
- 4) Anti-trimethyl-Histone H3 (Lys4) 1,0 µl
- 5) Anti-dimethyl-Histone H3 (Lys9) 5,0 µl
- 6) Anti-trimethyl-Histone H3 (Lys27) 3,0 µl

Die Proben wurden gemischt und bei 4 °C über Nacht und unter Rotation inkubiert. Es erfolgte eine erneute Zugabe von „Salmon Sperm DNA/ProteinA Agarose“ (60 µl) mit neuerlicher Inkubation unter Rotation für 1 h bei 4 °C. Anschließend wurden die Proben bei 1800 rpm für 1,5 min bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen, während der Agarose-Antikörper-Histon-Komplex im Pellet enthalten war. Der Komplex wurde in mehreren Waschschritten gereinigt, wobei 1 ml des jeweiligen Waschpuffers hinzu gegeben wurde, um für 4 min unter Rotation wirken zu können. Anschließend wurde das Waschpuffer/Komplex-Gemisch bei 1800 rpm für 1,5 min bei RT zentrifugiert. Die Puffer, die im Kit enthalten waren, wurden in folgender Reihenfolge verwendet: Low Salt Immune Complex Wash Buffer (1x), High Salt Immune Complex Wash Buffer (1x), LiCl Immune Complex Wash Buffer (1x), TE-Buffer (2x).

5.2.4.4 Entfernen der Histone

Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und verworfen und das Pellet in 250 µl frisch erstelltem Elutionspuffer (1 % SDS, 0,1 M NaHCO₃ in Aqua dest.) resuspendiert. Die Probe wurde für 15 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert, dann bei 1800 rpm für 1,5 min bei RT zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Um die Histone von der DNA zu entfernen, wurden zu jeder Probe 20 µl 5 M NaCl hinzu pipettiert und für 4 h bei 65 °C inkubiert. Nachdem die Probe abgekühlt war, erfolgte die Zugabe von 10 µl EDTA (0,5 M), 20 µl Tris-HCl (1 M, ph 6,5) und 2 µl Proteinase K (10 mg/ml) und abschließend eine letzte Inkubation bei 45 °C für 1 h.

5.2.4.5 Aufreinigung der DNA und Amplifikation mittels Real-Time-PCR

Die Proben wurden mittels QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt und bis auf die abschließende Elution mit 50 µl TE-Puffer erfolgte die Durchführung laut Herstellerangaben. Die erhaltenen Immunpräzipitate wurden anhand Sequenz-spezifischer Gensonden (Kapitel 4.6.1, Tabelle 4.8) in einer Real-Time-PCR (40 Zyklen) amplifiziert, die unter Zugabe von SYBR Green™ als Fluoreszenzmarker erfolgte. Je Probe wurde ein Ansatz in Triplikaten pipettiert:

DNA	1,5 µl
5'-Primer	1 µl
3'-Primer	1 µl
SYBR Green I	12,5 µl
Merck Wasser	9,0 µl

Das Protokoll der Real-Time-PCR für die ChIP-Proben umfasste folgende Reaktionsschritte:

Tabelle 5-5

Enzymaktivierung	12 min bei 95 °C
Amplifikation (40 Zyklen)	Denaturierung, 55 sec bei 95 °C Primerannealing, 35 sec bei 57 °C Polymerisation, 25 sec bei 72 °C

5.2.4.6 Auswertung der Daten

Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung des Analyseprogramms „Sequence Detection System 1.7“, nachdem die Input-Kontrolle und die Immunpräzipitate (output) mittels sequenz-spezifischen Gensonden in einer Real-Time-PCR amplifiziert wurden (40 Zyklen). Die Ct-Werte der einzelnen Proben, die als Triplikate gemessen wurden, sind gemittelt und Ausreißerwerte herausgenommen worden. Es wurde der delta Ct (ΔCt) gebildet ($Ct_{\text{Output}} - Ct_{\text{Input}}$) und wie in Kapitel 5.2.1.5 die relative DNA-Menge des Immunpräzipitats im Verhältnis zur Input-Kontrolle anhand der $2^{-\Delta Ct}$ -Methode berechnet. Der $\Delta \Delta Ct$ -Wert wurde dabei gebildet, indem der ΔCt der Probe „ohne Antikörper“ von dem ΔCt -Wert der jeweiligen Probe subtrahiert wurde. Das heißt die Menge der präzipitierten DNA wurde gegen die Input-Kontrolle normalisiert und relativ zur Probe „ohne Antikörper“ gesetzt. Die Standardabweichungen ergaben sich aus $\Delta \Delta Ct + s$ und $\Delta \Delta Ct - s$, wobei „s“ mit der Standardabweichung des $\Delta \Delta Ct$ -Wertes gleichgesetzt werden kann.

6 Literaturverzeichnis

- Aapola U., Kawasaki K., Scott H. S., Ollila J., Vihinen M., Heino M., Shintani A., Kawasaki K., Minoshima S., Krohn K., Antonarakis S. E., Shimizu N., Kudoh J. and Peterson P. (2000) Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family. *Genomics* **65**, 293-8.
- Acharya M. R., Sparreboom A., Venitz J. and Figg W. D. (2005) Rational development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents: a review. *Mol Pharmacol* **68**, 917-32.
- Alter G., Martin M. P., Teigen N., Carr W. H., Suscovich T. J., Schneidewind A., Streeck H., Waring M., Meier A., Brander C., Lifson J. D., Allen T. M., Carrington M. and Altfeld M. (2007) Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J Exp Med* **204**, 3027-36.
- Andre P., Biassoni R., Colonna M., Cosman D., Lanier L. L., Long E. O., Lopez-Botet M., Moretta A., Moretta L., Parham P., Trowsdale J., Vivier E., Wagtmann N. and Wilson M. J. (2001) New nomenclature for MHC receptors. *Nat Immunol* **2**, 661.
- Anfossi N., Andre P., Guia S., Falk C. S., Roeytynck S., Stewart C. A., Bresó V., Frassati C., Reviron D., Middleton D., Romagne F., Ugolini S. and Vivier E. (2006) Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* **25**, 331-42.
- Aramburu J., Balboa M. A., Ramirez A., Silva A., Acevedo A., Sanchez-Madrid F., De Landazuri M. O. and Lopez-Botet M. (1990) A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor-gamma/delta+ T lymphocytes. I. Inhibition of the IL-2-dependent proliferation by anti-Kp43 monoclonal antibody. *J Immunol* **144**, 3238-47.
- Arcanjo K., Belo G., Folco C., Werneck C. C., Borojevic R. and Silva L. C. (2002) Biochemical characterization of heparan sulfate derived from murine hemopoietic stromal cell lines: a bone marrow-derived cell line S17 and a fetal liver-derived cell line AFT024. *J Cell Biochem* **87**, 160-72.
- Arnon T. I., Achdout H., Lieberman N., Gazit R., Gonen-Gross T., Katz G., Bar-Ilan A., Bloushtain N., Lev M., Joseph A., Kedar E., Porgador A. and Mandelboim O. (2004) The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46. *Blood* **103**, 664-72.
- Azzoni L., Papanavvas E., Chehimi J., Kostman J. R., Mounzer K., Ondercin J., Perussia B. and Montaner L. J. (2002) Sustained impairment of IFN-gamma secretion in suppressed HIV-infected patients despite mature NK cell recovery: evidence for a defective reconstitution of innate immunity. *J Immunol* **168**, 5764-70.
- Bashirova A. A., Martin M. P., McVicar D. W. and Carrington M. (2006) The Killer Immunoglobulin-Like Receptor Gene Cluster: Tuning the Genome for Defense (*). *Annu Rev Genomics Hum Genet* **7**, 277-300.
- Berger S. L., Pina B., Silverman N., Marcus G. A., Agapite J., Regier J. L., Triezenberg S. J. and Guarente L. (1992) Genetic isolation of ADA2: a potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains. *Cell* **70**, 251-65.
- Biassoni R., Cantoni C., Falco M., Verdiani S., Bottino C., Vitale M., Conte R., Poggi A., Moretta A. and Moretta L. (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**, 645-50.
- Bird A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**, 6-21.
- Campbell J. J., Qin S., Unutmaz D., Soler D., Murphy K. E., Hodge M. R., Wu L. and Butcher E. C. (2001) Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J Immunol* **166**, 6477-82.
- Cantoni C., Bottino C., Vitale M., Pessino A., Augugliaro R., Malaspina A., Parolini S., Moretta L., Moretta A. and Biassoni R. (1999) NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med* **189**, 787-96.
- Cantoni C., Verdiani S., Falco M., Pessino A., Cilli M., Conte R., Pende D., Ponte M., Mikaelsson M. S., Moretta L. and Biassoni R. (1998) p49, a putative HLA class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily. *Eur J Immunol* **28**, 1980-90.
- Carosella E. D., Moreau P., Le Maoult J., Le Discorde M., Dausset J. and Rouas-Freiss N. (2003) HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv Immunol* **81**, 199-252.
- Cella M., Longo A., Ferrara G. B., Strominger J. L. and Colonna M. (1994) NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80. *J Exp Med* **180**, 1235-42.
- Cerwenka A. and Lanier L. L. (2001) Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol* **1**, 41-9.

- Chan H. W., Kurago Z. B., Stewart C. A., Wilson M. J., Martin M. P., Mace B. E., Carrington M., Trowsdale J. and Lutz C. T. (2003) DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. *J Exp Med* **197**, 245-55.
- Chan H. W., Miller J. S., Moore M. B. and Lutz C. T. (2005) Epigenetic control of highly homologous killer Ig-like receptor gene alleles. *J Immunol* **175**, 5966-74.
- Chedin F., Lieber M. R. and Hsieh C. L. (2002) The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16916-21.
- Collins M., Whitters M. J. and Young D. A. (2003) IL-21 and IL-21 receptor: a new cytokine pathway modulates innate and adaptive immunity. *Immunol Res* **28**, 131-40.
- Colonna M. and Samaridis J. (1995) Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science* **268**, 405-8.
- Colucci F., Caligiuri M. A. and Di Santo J. P. (2003) What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol* **3**, 413-25.
- Cooper M. A., Fehniger T. A. and Caligiuri M. A. (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* **22**, 633-40.
- Cosma M. P., Tanaka T. and Nasmyth K. (1999) Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* **97**, 299-311.
- Cosman D., Mullberg J., Sutherland C. L., Chin W., Armitage R., Fanslow W., Kubin M. and Chalupny N. J. (2001) ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* **14**, 123-33.
- Dangond F. and Gullans S. R. (1998) Differential expression of human histone deacetylase mRNAs in response to immune cell apoptosis induction by trichostatin A and butyrate. *Biochem Biophys Res Commun* **247**, 833-7.
- de Bruijn M. F. and Speck N. A. (2004) Core-binding factors in hematopoiesis and immune function. *Oncogene* **23**, 4238-48.
- Deplus R., Brenner C., Burgers W. A., Putmans P., Kouzarides T., de Launoit Y. and Fuks F. (2002) Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase. *Nucleic Acids Res* **30**, 3831-8.
- Dohring C., Scheidegger D., Samaridis J., Cella M. and Colonna M. (1996) A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J Immunol* **156**, 3098-101.
- Egeland T. (1998) The CD34 molecule and hematopoietic progenitor cell studies--a challenge in clinical medicine. *Vox Sang* **74 Suppl 2**, 467-8.
- Fan Q. R., Long E. O. and Wiley D. C. (2001) Crystal structure of the human natural killer cell inhibitory receptor KIR2DL1-HLA-Cw4 complex. *Nat Immunol* **2**, 452-60.
- Farag S. S., Fehniger T. A., Ruggeri L., Velardi A. and Caligiuri M. A. (2002) Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* **100**, 1935-47.
- Fernandez N. C., Treiner E., Vance R. E., Jamieson A. M., Lemieux S. and Raulet D. H. (2005) A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood* **105**, 4416-23.
- Fischer J. C., Ottinger H., Ferencik S., Sribar M., Punzel M., Beelen D. W., Schwan M. A., Grosse-Wilde H., Wernet P. and Uhrberg M. (2007) Relevance of C1 and C2 Epitopes for Hemopoietic Stem Cell Transplantation: Role for Sequential Acquisition of HLA-C-Specific Inhibitory Killer Ig-Like Receptor. *J Immunol* **178**, 3918-23.
- Fleming W. H., Alpern E. J., Uchida N., Ikuta K., Spangrude G. J. and Weissman I. L. (1993) Functional heterogeneity is associated with the cell cycle status of murine hematopoietic stem cells. *J Cell Biol* **122**, 897-902.
- French A. R. and Yokoyama W. M. (2003) Natural killer cells and viral infections. *Curr Opin Immunol* **15**, 45-51.
- Frohn C., Schlenke P., Ebel B., Dannenberg C., Bein G. and Kirchner H. (1998) DNA typing for natural killer cell inhibiting HLA-Cw groups NK1 and NK2 by PCR-SSP. *J Immunol Methods* **218**, 155-60.
- Fuks F., Burgers W. A., Godin N., Kasai M. and Kouzarides T. (2001) Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *Embo J* **20**, 2536-44.
- Galetzka D., Weis E., Tralau T., Seidmann L. and Haaf T. (2007) Sex-specific windows for high mRNA expression of DNA methyltransferases 1 and 3A and methyl-CpG-binding domain proteins 2 and 4 in human fetal gonads. *Mol Reprod Dev* **74**, 233-41.
- Gardiner C. M., Guethlein L. A., Shilling H. G., Pando M., Carr W. H., Rajalingam R., Vilches C. and Parham P. (2001) Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. *J Immunol* **166**, 2992-3001.
- Glienke J., Sobanov Y., Brostjan C., Steffens C., Nguyen C., Lehrach H., Hofer E. and Francis F. (1998) The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex. *Immunogenetics* **48**, 163-73.

- Gomez-Lozano N., Trompeter H. I., de Pablo R., Estefania E., Uhrberg M. and Vilches C. (2007) Epigenetic silencing of potentially functional KIR2DL5 alleles: Implications for the acquisition of KIR repertoires by NK cells. *Eur J Immunol* **37**, 1954-65.
- Goodridge J. P., Witt C. S., Christiansen F. T. and Warren H. S. (2003) KIR2DL4 (CD158d) genotype influences expression and function in NK cells. *J Immunol* **171**, 1768-74.
- Gowher H., Liebert K., Hermann A., Xu G. and Jeltsch A. (2005) Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *J Biol Chem* **280**, 13341-8.
- Grozinger C. M., Hassig C. A. and Schreiber S. L. (1999) Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4868-73.
- Guarente L. (2000) Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Dev* **14**, 1021-6.
- Gumperz J. E., Valiante N. M., Parham P., Lanier L. L. and Tyan D. (1996) Heterogeneous phenotypes of expression of the NKB1 natural killer cell class I receptor among individuals of different human histocompatibility leukocyte antigens types appear genetically regulated, but not linked to major histocompatibility complex haplotype. *J Exp Med* **183**, 1817-27.
- Hansasuta P., Dong T., Thananchai H., Weekes M., Willberg C., Aldemir H., Rowland-Jones S. and Braud V. M. (2004) Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur J Immunol* **34**, 1673-9.
- Hata K., Okano M., Lei H. and Li E. (2002) Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* **129**, 1983-93.
- Houchins J. P., Yabe T., McSherry C. and Bach F. H. (1991) DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* **173**, 1017-20.
- Hsu K. C., Chida S., Geraghty D. E. and Dupont B. (2002) The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev* **190**, 40-52.
- Husain Z., Alper C. A., Yunis E. J. and Dubey D. P. (2002) Complex expression of natural killer receptor genes in single natural killer cells. *Immunology* **106**, 373-80.
- Jacobs R., Hintzen G., Kemper A., Beul K., Kempf S., Behrens G., Sykora K. W. and Schmidt R. E. (2001) CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol* **31**, 3121-7.
- Jaenisch R. and Bird A. (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* **33 Suppl**, 245-54.
- Javed A., Guo B., Hiebert S., Choi J. Y., Green J., Zhao S. C., Osborne M. A., Stifani S., Stein J. L., Lian J. B., van Wijnen A. J. and Stein G. S. (2000) Groucho/TLE/R-esp proteins associate with the nuclear matrix and repress RUNX (CBF(alpha)/AML/PEBP2(alpha)) dependent activation of tissue-specific gene transcription. *J Cell Sci* **113 (Pt 12)**, 2221-31.
- Jones P. A. and Takai D. (2001) The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* **293**, 1068-70.
- Katz G., Markel G., Mizrahi S., Arnon T. I. and Mandelboim O. (2001) Recognition of HLA-Cw4 but not HLA-Cw6 by the NK cell receptor killer cell Ig-like receptor two-domain short tail number 4. *J Immunol* **166**, 7260-7.
- Kikuchi-Maki A., Catina T. L. and Campbell K. S. (2005) Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK cells through association with the Fc receptor gamma protein. *J Immunol* **174**, 3859-63.
- Kim S., Poursine-Laurent J., Truscott S. M., Lybarger L., Song Y. J., Yang L., French A. R., Sunwoo J. B., Lemieux S., Hansen T. H. and Yokoyama W. M. (2005) Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* **436**, 709-13.
- Kobari L., Giarratana M. C., Pflumio F., Izac B., Coulombel L. and Douay L. (2001) CD133+ cell selection is an alternative to CD34+ cell selection for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *J Hematother Stem Cell Res* **10**, 273-81.
- Krangel M. S. (2001) V(D)J recombination becomes accessible. *J Exp Med* **193**, F27-30.
- Krause D. S., Ito T., Fackler M. J., Smith O. M., Collector M. I., Sharkis S. J. and May W. S. (1994) Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* **84**, 691-701.
- Kuo M. H., Brownell J. E., Sobel R. E., Ranalli T. A., Cook R. G., Edmondson D. G., Roth S. Y. and Allis C. D. (1996) Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* **383**, 269-72.
- Lachner M., O'Sullivan R. J. and Jenuwein T. (2003) An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci* **116**, 2117-24.
- Lanier L. L. (1998) Follow the leader: NK cell receptors for classical and nonclassical MHC class I. *Cell* **92**, 705-7.
- Lanier L. L., Chang C., Azuma M., Ruitenberg J. J., Hemperly J. J. and Phillips J. H. (1991) Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol* **146**, 4421-6.

- Lanier L. L., Corliss B. C., Wu J., Leong C. and Phillips J. H. (1998) Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* **391**, 703-7.
- Lazetic S., Chang C., Houchins J. P., Lanier L. L. and Phillips J. H. (1996) Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol* **157**, 4741-5.
- Lee P. P., Fitzpatrick D. R., Beard C., Jessup H. K., Lehar S., Makar K. W., Perez-Melgosa M., Sweetser M. T., Schlissel M. S., Nguyen S., Cherry S. R., Tsai J. H., Tucker S. M., Weaver W. M., Kelso A., Jaenisch R. and Wilson C. B. (2001) A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* **15**, 763-74.
- Leibson P. J. (1997) Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity* **6**, 655-61.
- Lewis I. D. and Verfaillie C. M. (2000) Multi-lineage expansion potential of primitive hematopoietic progenitors: superiority of umbilical cord blood compared to mobilized peripheral blood. *Exp Hematol* **28**, 1087-95.
- Li E. (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* **3**, 662-73.
- Li Y., Bjorklund S., Jiang Y. W., Kim Y. J., Lane W. S., Stillman D. J. and Kornberg R. D. (1995) Yeast global transcriptional regulators Sin4 and Rgr1 are components of mediator complex/RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10864-8.
- Litwin V., Gumperz J., Parham P., Phillips J. H. and Lanier L. L. (1994) NKB1: a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *J Exp Med* **180**, 537-43.
- Livak K. J. and Schmittgen T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-8.
- Ljunggren H. G. and Karre K. (1990) In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* **11**, 237-44.
- Loidl P. (1994) Histone acetylation: facts and questions. *Chromosoma* **103**, 441-9.
- Lotzova E. and Savary C. A. (1993) Human natural killer cell development from bone marrow progenitors: analysis of phenotype, cytotoxicity and growth. *Nat Immun* **12**, 209-17.
- Marcus G. A., Silverman N., Berger S. L., Horiuchi J. and Guarente L. (1994) Functional similarity and physical association between GCN5 and ADA2: putative transcriptional adaptors. *Embo J* **13**, 4807-15.
- Marks P. A., Miller T. and Richon V. M. (2003) Histone deacetylases. *Curr Opin Pharmacol* **3**, 344-51.
- Marks P. A., Richon V. M., Miller T. and Kelly W. K. (2004) Histone deacetylase inhibitors. *Adv Cancer Res* **91**, 137-68.
- Martin M. P., Bashirova A., Traherne J., Trowsdale J. and Carrington M. (2003) Cutting edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over. *J Immunol* **171**, 2192-5.
- Mehta D. S., Wurster A. L. and Grusby M. J. (2004) Biology of IL-21 and the IL-21 receptor. *Immunol Rev* **202**, 84-95.
- Miller J. S., Alley K. A. and McGlave P. (1994) Differentiation of natural killer (NK) cells from human primitive marrow progenitors in a stroma-based long-term culture system: identification of a CD34+7+ NK progenitor. *Blood* **83**, 2594-601.
- Miller J. S. and McCullar V. (2001) Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2. *Blood* **98**, 705-13.
- Miller J. S., McCullar V., Punzel M., Lemischka I. R. and Moore K. A. (1999) Single adult human CD34(+)/Lin-/CD38(-) progenitors give rise to natural killer cells, B-lineage cells, dendritic cells, and myeloid cells. *Blood* **93**, 96-106.
- Moore K. A., Ema H. and Lemischka I. R. (1997) In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells. *Blood* **89**, 4337-47.
- Moretta A., Biassoni R., Bottino C., Mingari M. C. and Moretta L. (2000) Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* **21**, 228-34.
- Moretta A., Bottino C., Mingari M. C., Biassoni R. and Moretta L. (2002) What is a natural killer cell? *Nat Immunol* **3**, 6-8.
- Moretta A., Bottino C., Pende D., Tripodi G., Tambussi G., Viale O., Orengo A., Barbaresi M., Merli A., Ciccone E. and et al. (1990) Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J Exp Med* **172**, 1589-98.
- Moretta A., Bottino C., Vitale M., Pende D., Cantoni C., Mingari M. C., Biassoni R. and Moretta L. (2001) Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* **19**, 197-223.
- Moretta A., Vitale M., Bottino C., Orengo A. M., Morelli L., Augugliaro R., Barbaresi M., Ciccone E. and Moretta L. (1993) P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC)

- class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med* **178**, 597-604.
- Mullis K. B. and Faloona F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.
- Nguyen K. B., Salazar-Mather T. P., Dalod M. Y., Van Deusen J. B., Wei X. Q., Liew F. Y., Caligiuri M. A., Durbin J. E. and Biron C. A. (2002) Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol* **169**, 4279-87.
- Nimura K., Ishida C., Koriyama H., Hata K., Yamanaka S., Li E., Ura K. and Kaneda Y. (2006) Dnmt3a2 targets endogenous Dnmt3L to ES cell chromatin and induces regional DNA methylation. *Genes Cells* **11**, 1225-37.
- Nolta J. A., Thiemann F. T., Arakawa-Hoyt J., Dao M. A., Barsky L. W., Moore K. A., Lemischka I. R. and Crooks G. M. (2002) The AFT024 stromal cell line supports long-term ex vivo maintenance of engrafting multipotent human hematopoietic progenitors. *Leukemia* **16**, 352-61.
- Okano M., Bell D. W., Haber D. A. and Li E. (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247-57.
- Olcese L., Cambiaggi A., Semenzato G., Bottino C., Moretta A. and Vivier E. (1997) Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells. *J Immunol* **158**, 5083-6.
- Parrish-Novak J., Dillon S. R., Nelson A., Hammond A., Sprecher C., Gross J. A., Johnston J., Madden K., Xu W., West J., Schrader S., Burkhead S., Heipel M., Brandt C., Kuijper J. L., Kramer J., Conklin D., Presnell S. R., Berry J., Shiota F., Bort S., Hambly K., Mudri S., Clegg C., Moore M., Grant F. J., Lofton-Day C., Gilbert T., Rayond F., Ching A., Yao L., Smith D., Webster P., Whitmore T., Maurer M., Kaushansky K., Holly R. D. and Foster D. (2000) Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* **408**, 57-63.
- Parrish-Novak J., Foster D. C., Holly R. D. and Clegg C. H. (2002) Interleukin-21 and the IL-21 receptor: novel effectors of NK and T cell responses. *J Leukoc Biol* **72**, 856-63.
- Plougastel B., Jones T. and Trowsdale J. (1996) Genomic structure, chromosome location, and alternative splicing of the human NKG2A gene. *Immunogenetics* **44**, 286-91.
- Ponte M., Cantoni C., Biassoni R., Tradori-Cappai A., Bentivoglio G., Vitale C., Bertone S., Moretta A., Moretta L. and Mingari M. C. (1999) Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5674-9.
- Punzel M., Gupta P., Roodell M., Mortari F. and Verfaillie C. M. (1999a) Factor(s) secreted by AFT024 fetal liver cells following stimulation with human cytokines are important for human LTC-IC growth. *Leukemia* **13**, 1079-84.
- Punzel M., Gupta P. and Verfaillie C. M. (2002) The microenvironment of AFT024 cells maintains primitive human hematopoiesis by counteracting contact mediated inhibition of proliferation. *Cell Commun Adhes* **9**, 149-59.
- Punzel M., Moore K. A., Lemischka I. R. and Verfaillie C. M. (1999b) The type of stromal feeder used in limiting dilution assays influences frequency and maintenance assessment of human long-term culture initiating cells. *Leukemia* **13**, 92-7.
- Punzel M., Wissink S. D., Miller J. S., Moore K. A., Lemischka I. R. and Verfaillie C. M. (1999c) The myeloid-lymphoid initiating cell (ML-IC) assay assesses the fate of multipotent human progenitors in vitro. *Blood* **93**, 3750-6.
- Radonic A., Thulke S., Mackay I. M., Landt O., Siegert W. and Nitsche A. (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* **313**, 856-62.
- Rea S., Eisenhaber F., O'Carroll D., Strahl B. D., Sun Z. W., Schmid M., Opravil S., Mechtler K., Ponting C. P., Allis C. D. and Jenuwein T. (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**, 593-9.
- Riteau B., Menier C., Khalil-Daher I., Martinozzi S., Pla M., Dausset J., Carosella E. D. and Rouas-Freiss N. (2001) HLA-G1 co-expression boosts the HLA class I-mediated NK lysis inhibition. *Int Immunol* **13**, 193-201.
- Robertson M. J. and Ritz J. (1990) Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* **76**, 2421-38.
- Rountree M. R., Bachman K. E. and Baylin S. B. (2000) DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* **25**, 269-77.
- Santourlidis S., Graffmann N., Christ J., and Uhrberg M. (2008) Lineage-Specific Transition of Histone Signatures in the Killer Ig-Related Receptor Locus from Hematopoietic Progenitor to NK cells. *J Immunol* **180**.
- Santourlidis S., Trompeter H. I., Weinhold S., Eisermann B., Meyer K. L., Wernet P. and Uhrberg M. (2002) Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *J Immunol* **169**, 4253-61.

- Saulquin X., Gastinel L. N. and Vivier E. (2003) Crystal structure of the human natural killer cell activating receptor KIR2DS2 (CD158j). *J Exp Med* **197**, 933-8.
- Schermelleh L., Haemmer A., Spada F., Rosing N., Meilinger D., Rothbauer U., Cardoso M. C. and Leonhardt H. (2007) Dynamics of Dnmt1 interaction with the replication machinery and its role in postreplicative maintenance of DNA methylation. *Nucleic Acids Res* **35**, 4301-12.
- Schiltz R. L., Mizzen C. A., Vassilev A., Cook R. G., Allis C. D. and Nakatani Y. (1999) Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *J Biol Chem* **274**, 1189-92.
- Shilling H. G., Young N., Guethlein L. A., Cheng N. W., Gardiner C. M., Tyan D. and Parham P. (2002) Genetic control of human NK cell repertoire. *J Immunol* **169**, 239-47.
- Siu G., Clark S. P., Yoshikai Y., Malissen M., Yanagi Y., Strauss E., Mak T. W. and Hood L. (1984) The human T cell antigen receptor is encoded by variable, diversity, and joining gene segments that rearrange to generate a complete V gene. *Cell* **37**, 393-401.
- Sivori S., Vitale M., Morelli L., Sanseverino L., Augugliaro R., Bottino C., Moretta L. and Moretta A. (1997) p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med* **186**, 1129-36.
- Speck N. A., Stacy T., Wang Q., North T., Gu T. L., Miller J., Binder M. and Marin-Padilla M. (1999) Core-binding factor: a central player in hematopoiesis and leukemia. *Cancer Res* **59**, 1789s-1793s.
- Spencer V. A. and Davie J. R. (2001) Dynamically acetylated histone association with transcriptionally active and competent genes in the avian adult beta-globin gene domain. *J Biol Chem* **276**, 34810-5.
- Steinle A., Li P., Morris D. L., Groh V., Lanier L. L., Strong R. K. and Spies T. (2001) Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* **53**, 279-87.
- Sterner D. E. and Berger S. L. (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 435-59.
- Stewart C. A., Laugier-Anfossi F., Vely F., Saulquin X., Riedmuller J., Tisserant A., Gauthier L., Romagne F., Ferracci G., Arosa F. A., Moretta A., Sun P. D., Ugolini S. and Vivier E. (2005) Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 13224-9.
- Strahl B. D., Briggs S. D., Brame C. J., Caldwell J. A., Koh S. S., Ma H., Cook R. G., Shabanowitz J., Hunt D. F., Stallcup M. R. and Allis C. D. (2001) Methylation of histone H4 at arginine 3 occurs in vivo and is mediated by the nuclear receptor coactivator PRMT1. *Curr Biol* **11**, 996-1000.
- Suetake I., Shinozaki F., Miyagawa J., Takeshima H. and Tajima S. (2004) DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem* **279**, 27816-23.
- Sun J. M., Spencer V. A., Chen H. Y., Li L. and Davie J. R. (2003) Measurement of histone acetyltransferase and histone deacetylase activities and kinetics of histone acetylation. *Methods* **31**, 12-23.
- Thananchai H., Gillespie G., Martin M. P., Bashirova A., Yawata N., Yawata M., Easterbrook P., McVicar D. W., Maenaka K., Parham P., Carrington M., Dong T. and Rowland-Jones S. (2007) Cutting Edge: Allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B. *J Immunol* **178**, 33-7.
- Thiagalingam S., Cheng K. H., Lee H. J., Mineva N., Thiagalingam A. and Ponte J. F. (2003) Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann NY Acad Sci* **983**, 84-100.
- Thiemann F. T., Moore K. A., Smogorzewska E. M., Lemischka I. R. and Crooks G. M. (1998) The murine stromal cell line AFT024 acts specifically on human CD34+CD38- progenitors to maintain primitive function and immunophenotype in vitro. *Exp Hematol* **26**, 612-9.
- Torkar M., Norgate Z., Colonna M., Trowsdale J. and Wilson M. J. (1998) Isotypic variation of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex. *Eur J Immunol* **28**, 3959-67.
- Trinchieri G. (1989) Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* **47**, 187-376.
- Trompeter H. I., Gomez-Lozano N., Santourlidis S., Eisermann B., Wernet P., Vilches C. and Uhrberg M. (2005) Three structurally and functionally divergent kinds of promoters regulate expression of clonally distributed killer cell Ig-like receptors (KIR), of KIR2DL4, and of KIR3DL3. *J Immunol* **174**, 4135-43.
- Trowsdale J., Barten R., Haude A., Stewart C. A., Beck S. and Wilson M. J. (2001) The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunol Rev* **181**, 20-38.
- Trundley A. E., Hiby S. E., Chang C., Sharkey A. M., Santourlidis S., Uhrberg M., Trowsdale J. and Moffett A. (2006) Molecular characterization of KIR3DL3. *Immunogenetics* **57**, 904-16.
- Uhrberg M. (2005) Shaping the human NK cell repertoire: an epigenetic glance at KIR gene regulation. *Mol Immunol* **42**, 471-5.
- Uhrberg M., Parham P. and Wernet P. (2002) Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasian population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics* **54**, 221-9.

- Uhrberg M., Valiante N. M., Shum B. P., Shilling H. G., Lienert-Weidenbach K., Corliss B., Tyan D., Lanier L. L. and Parham P. (1997) Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* **7**, 753-63.
- Vales-Gomez M., Reyburn H. T., Erskine R. A. and Strominger J. (1998) Differential binding to HLA-C of p50-activating and p58-inhibitory natural killer cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14326-31.
- Valiante N. M., Uhrberg M., Shilling H. G., Lienert-Weidenbach K., Arnett K. L., D'Andrea A., Phillips J. H., Lanier L. L. and Parham P. (1997) Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* **7**, 739-51.
- Vitale M., Bottino C., Sivori S., Sanseverino L., Castriconi R., Marcenaro E., Augugliaro R., Moretta L. and Moretta A. (1998) NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* **187**, 2065-72.
- Vitale M., Sivori S., Pende D., Augugliaro R., Di Donato C., Amoroso A., Malnati M., Bottino C., Moretta L. and Moretta A. (1996) Physical and functional independency of p70 and p58 natural killer (NK) cell receptors for HLA class I: their role in the definition of different groups of alloreactive NK cell clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1453-7.
- Wada H., Matsumoto N., Maenaka K., Suzuki K. and Yamamoto K. (2004) The inhibitory NK cell receptor CD94/NKG2A and the activating receptor CD94/NKG2C bind the top of HLA-E through mostly shared but partly distinct sets of HLA-E residues. *Eur J Immunol* **34**, 81-90.
- Wang L., Liu L. and Berger S. L. (1998) Critical residues for histone acetylation by Gcn5, functioning in Ada and SAGA complexes, are also required for transcriptional function in vivo. *Genes Dev* **12**, 640-53.
- Yang X. J., Ogryzko V. V., Nishikawa J., Howard B. H. and Nakatani Y. (1996) A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**, 319-24.
- Yasui W., Oue N., Ono S., Mitani Y., Ito R. and Nakayama H. (2003) Histone acetylation and gastrointestinal carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **983**, 220-31.
- Yawata M., Yawata N., Abi-Rached L. and Parham P. (2002) Variation within the human killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene family. *Crit Rev Immunol* **22**, 463-82.
- Yawata M., Yawata N., Draghi M., Little A. M., Partheniou F. and Parham P. (2006) Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med* **203**, 633-45.
- Yoder J. A., Soman N. S., Verdine G. L. and Bestor T. H. (1997) DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J Mol Biol* **270**, 385-95.
- Yokoyama W. M. and Kim S. (2006) How do natural killer cells find self to achieve tolerance? *Immunity* **24**, 249-57.
- Yokoyama W. M. and Scalzo A. A. (2002) Natural killer cell activation receptors in innate immunity to infection. *Microbes Infect* **4**, 1513-21.
- Young N. T., Uhrberg M., Phillips J. H., Lanier L. L. and Parham P. (2001) Differential expression of leukocyte receptor complex-encoded Ig-like receptors correlates with the transition from effector to memory CTL. *J Immunol* **166**, 3933-41.
- Yu J., Heller G., Cheuning J., Kim S., Yokoyama W. M. and Hsu K. C. (2007) Hierarchy of the human natural killer cell response is determined by class and quantity of inhibitory receptors for self-HLA-B and HLA-C ligands. *J Immunol* **179**, 5977-89.
- Zhang Y., Ng H. H., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Bird A. and Reinberg D. (1999) Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* **13**, 1924-35.
- Zhou X., Richon V. M., Rifkind R. A. and Marks P. A. (2000) Identification of a transcriptional repressor related to the noncatalytic domain of histone deacetylases 4 and 5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1056-61.

7 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zelle (antigen presenting cell)
AZA	5'-Aza-2'-Deoxycytidin
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CT	Grenzyklus (cycle threshold)
d	Tag (day)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonucleosintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESC	Embryonale Stammzelle
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	vorwärts gerichtetes Streulicht (forward scatter)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphate-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten koloniestimulierender Faktor (granulocyte colonystimulating)
GFP	green fluorescent protein
GVHD	Spender gegen Empfänger Krankheit (graft-versus-host-disease)
HAT	Histonacetyl-Transferase
HDAC	Histondeacetylase
HLA	humanes Leukozytenantigen (human leukocyte antigen)
HSA	Humanes Serum Albumin
HSC	Hämatopoetische Stammzelle (hematopoietic stem cell)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMEM	Iscoves modified Eagle Medium
ITAM	immunoreceptor tyrosin-based activating motif
ITIM	immunoreceptor tyrosin-based inhibiting motif
KIR	killer cell immunoglobulin-like receptor
LGL	große granulierte Lymphozyten (large granular lymphocytes)
M	molar (Mol:L)
MACS	Magnet-vermittelte Zellisolation (magnet activated cell sorting)

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MICA	MHC-Klasse-1-verwandtes Molekül A (MHC-class-I-chain-related)
MICB	MHC-Klasse-1-verwandtes Molekül B (MHC-class-I-chain-related)
min	Minuten
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MNC	Mononukleäre Zellen
mRNA	messenger RNA
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmoleküle (neural cell-adhesion molecule)
NCR	natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren (natural cytotoxicity receptors)
NK	Natürliche Killerzellen
PBMC	periphere mononukleäre Zellen (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphat-buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
rh	rekombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription/Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptions Polymerase Kettenreaktion
SCF	Stammzellfaktor (stem cell factor)
SDS	Sodium dodecyl sulphate
sec	Sekunden
SSC	seitwärts gerichtetes Streulicht (side scatter)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCR	T-Zell-Rezeptor (T cell receptor)
TE	Tris-EDTA-Puffer
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TSA	Trichostatin A
U	Einheit (unit)
ULBPs	U16-bindende Proteine (U16-binding proteins)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

8 Anhang

8.1 Vergleich der genotypischen und phänotypischen Resultate der KIR-Expression

Tabelle 8-1 Vergleich der genotypischen und phänotypischen Analysen der KIR-Expression während der Differenzierung von NK-Zellen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen (CB24). Es handelt sich hierbei um CB24, welches den KIR-Genotyp 2 hat, so dass demnach mit NKAT2 die Rezeptoren KIR2DL2 und 2DL3 gemessen werden konnten. 2DL2 wurde mittels RT-PCR jedoch nicht detektiert. FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) = Durchflusszytometrie, d = day.

Genotyp2	Methode	KIR2DL1	KIR2DL2/3	KIR3DL1	KIR2DS4	
		CD158a	NKAT2	NKB1	CD158i	
CB 24	RT-PCR					d0
	FACS					
	RT-PCR					d18
	FACS					
	RT-PCR	+	+			d22
	FACS					
	RT-PCR	+	+			d27
	FACS					
	RT-PCR	+	+		+	d36
	FACS	+	+			
	RT-PCR	+	+		+	d42
	FACS	+	+			
RT-PCR	+	+		+	d47	
FACS	+	+				

Tabelle 8-2 Vergleich der genotypischen und phänotypischen Analysen der KIR-Expression während der Differenzierung von NK-Zellen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen (CB25). Es handelt sich hierbei um CB25, welches ebenfalls den KIR-Genotyp 2 aufweist, so dass mit NKAT2 die Rezeptoren KIR2DL2 und 2DL3 gemessen werden konnten. 2DL2 konnte auch hier nicht mittels RT-PCR detektiert werden. FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) = Durchflusszytometrie, d = day.

Genotyp2	Methode	KIR2DL1	KIR2DL2/3	KIR3DL1	KIR2DS4	
		CD158a	NKAT2	NKB1	CD158i	
CB 25	RT-PCR					d0
	FACS					
	RT-PCR					d14
	FACS					
	RT-PCR		+			d20
	FACS					
	RT-PCR	+	+	+		d25
	FACS	+	+			
	RT-PCR	+	+	+		d35
	FACS	+	+	+		

Tabelle 8-3 Vergleich der genotypischen und phänotypischen Analysen der KIR-Expression während der Differenzierung von NK-Zellen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen (CB26). CB26 hat den KIR-Genotyp 1, so dass durch die Antikörper keine Mehrfacherkennung der KIR-Rezeptoren möglich war. FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) = Durchflusszytometrie, d = day.

Genotyp1	Methode	KIR2DL1	KIR2DL3	KIR3DL1	KIR2DS4	
		CD158a	NKAT2	NKB1	CD158i	
CB 26	RT-PCR					d0
	FACS					
	RT-PCR					d20
	FACS					
	RT-PCR					d25
	FACS					
	RT-PCR		+			d28
	FACS					
	RT-PCR	+	+	+	+	d35
	FACS					
	RT-PCR	+	+	+	+	d42
	FACS	+	+	+	+	

8.2 Datentabellen der klonalen NK-Zelldifferenzierung

Tabelle 8-4 Ergebnisse der RT-PCR der EZ-Ablage von CB14 verglichen mit den Ergebnissen der Bulk-Kultur (gelb) – ebenfalls von CB14. Pro Tag wurden fünf Klone geerntet und untersucht. Die Bedeutung der Intensitäten lautet: 1 = schwache, 2 = mittlere, 3 = starke Expression. Konnte nur ein KIR-Gen auf einem Klon detektiert werden, so ist dieser grün hinterlegt.

CB14	BULK	d6+R20					BULK	d8+R20				
	d6 + R20	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5	d8 + R20	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5
KIR2DL1												
KIR2DL2							2					
KIR2DL4							2					
KIR2DL5												
KIR3DL1												
KIR3DL2												
KIR3DL3	1						1					
KIR2DS2							2					
KIR2DS3												
KIR2DS4												
NCAM							2					1
β-actin	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CB14	BULK	d10+R20					BULK	d13+R20				
	d10 + R20	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5	d13 + R20	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5
KIR2DL1												
KIR2DL2							2					
KIR2DL4	2						3					
KIR2DL5												
KIR3DL1												
KIR3DL2	1											
KIR3DL3	1											
KIR2DS2	2						2					
KIR2DS3												
KIR2DS4							2					
NCAM	1						1					
β-actin	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CB14	BULK	d15+R20					BULK	d17+R20				
	d15 + R20	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5	d17 + R20	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5
KIR2DL1												
KIR2DL2	3						3		3			
KIR2DL4	3						3		2			
KIR2DL5												
KIR3DL1	2						1					
KIR3DL2	3						1		2			
KIR3DL3	2						2					
KIR2DS2	3						3		3			1
KIR2DS3	1						1		3			
KIR2DS4	2						1		1			
NCAM	3			1			3		3			2
β-actin	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Fortsetzung der Tabelle 8-4:

CB14	BULK	d20+R20					BULK	d22+R20				
	d20 + R20	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5	d22 + R20	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5
KIR2DL1												
KIR2DL2	3						3	2				
KIR2DL4	3				3		3	3				2
KIR2DL5												
KIR3DL1	2						3	2				
KIR3DL2	1						3	2				
KIR3DL3	2						3	1				
KIR2DS2	3						3			3		
KIR2DS3	2						1			3		
KIR2DS4	3						3			1		
NCAM	3				3	1	3	2		3		3
β-actin	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	BULK	d24+R20					BULK	d27+R20				
	d24 + R20	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5	d27 + R20	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5
KIR2DL1												
KIR2DL2	3						3					
KIR2DL4	3	3	2	3	2		3		2			
KIR2DL5												
KIR3DL1	3						3					
KIR3DL2	3						3					
KIR3DL3	3						3					
KIR2DS2	3	3		3	2		3	1	1			
KIR2DS3	1	3		3	1		1					
KIR2DS4	3						3					
NCAM	3	3	3	3	3	2	3					
β-actin	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Tabelle 8-5 Ergebnisse der RT-PCR der EZ-Ablage von CB15, verglichen mit den Ergebnissen der Bulk-Kultur (gelb) - ebenfalls CB15. Pro Zeitpunkt wurden fünf Klone entnommen und analysiert. Die Bedeutung der Intensitäten ist: 1 = schwache, 2 = mittlere, 3 = starke Expression. Konnte nur ein KIR-Gen auf einem Klon detektiert werden, so ist dieser grün hinterlegt.

CB15	BULK	d7+R20					BULK	d11+R20				
	d7+R20	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5	d11+R20	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5
KIR2DL1												
KIR2DL2												
KIR2DL3					1							
KIR2DL4	2						3					
KIR2DL5	2		1				3	2				
KIR3DL1		1										
KIR3DL2	1						2					
KIR3DL3	1						2					
KIR2DS1												
KIR2DS2			1									
KIR2DS3												
KIR2DS4		1	1	1								
KIR3DS1		1	1	1								
NCAM	3						3		2	2	1	
β-actin	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

	BULK	d13+R20					BULK	d18+R20				
	d13+R20	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5	d18+R20	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5
KIR2DL1							3			1	2	
KIR2DL2							3				3	
KIR2DL3	1						3		2	2	3	1
KIR2DL4	3			1			3		3	2	3	2
KIR2DL5	3			2			3					
KIR3DL1							3		2	1	2	
KIR3DL2	1			1			3					
KIR3DL3	2						3				1	
KIR2DS1							3		2		2	1
KIR2DS2							3			1	2	1
KIR2DS3	1						3		1	1	2	1
KIR2DS4							3				1	
KIR3DS1				1			3		2	2	3	2
NCAM	3	1		2	1		3		3	2	3	2
β-actin	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

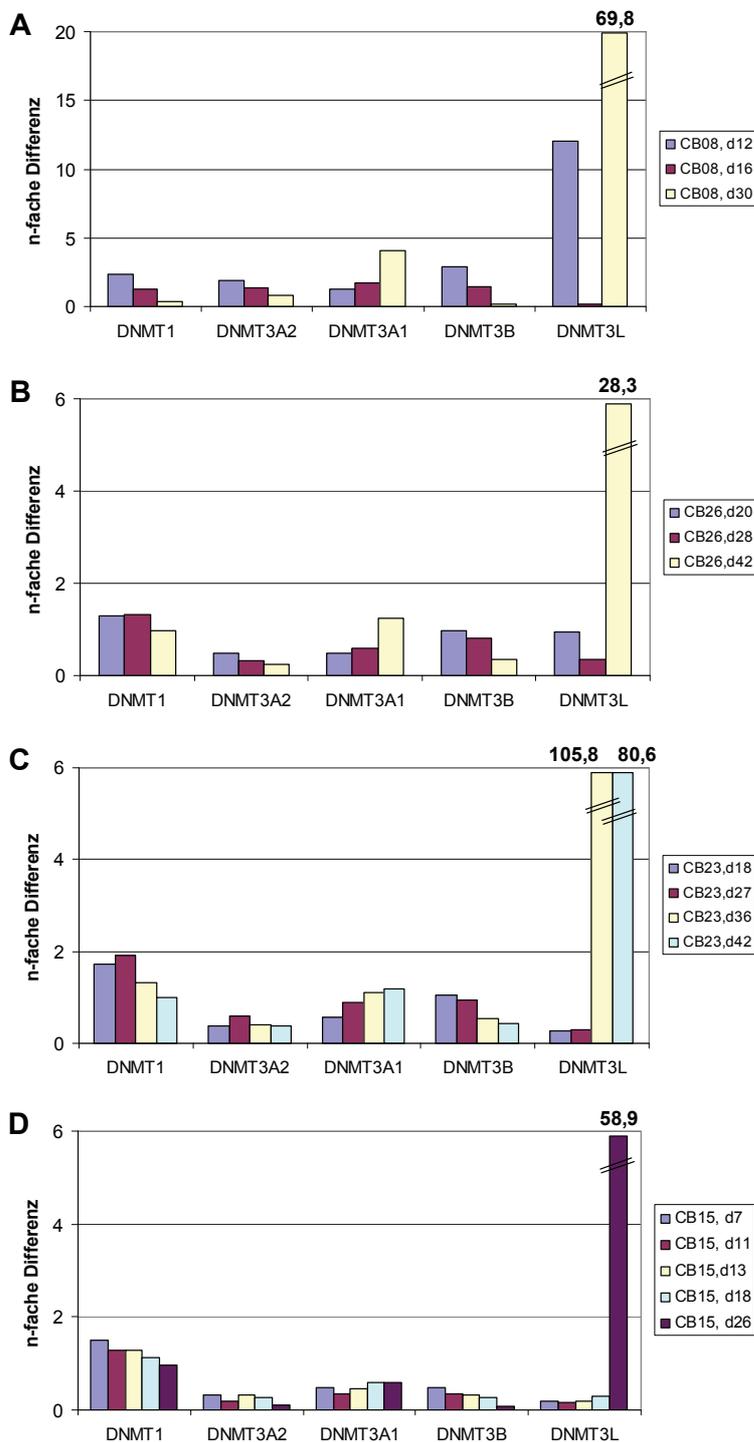
	BULK	d20+R20					BULK	d22+R20				
	d20+R20	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5	d22+R20	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5
KIR2DL1	3			2			3					2
KIR2DL2	3			2			3					3
KIR2DL3	3			3	1		3			1		3
KIR2DL4	3		2	3	1		3	1	1	3		3
KIR2DL5	3			2			3					2
KIR3DL1	3			3	1		3					2
KIR3DL2	3			1			3					1
KIR3DL3	3			1			3					
KIR2DS1	3			2			3					2
KIR2DS2	3			3			3		1			2
KIR2DS3	3			2			3					2
KIR2DS4	3			2			3					1
KIR3DS1	3			3	1		3			1		3
NCAM	3		3	3	2		3	1	1	3		3
β-actin	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Fortsetzung der Tabelle 8-5:

CB15	BULK	d26+R20					BULK	d28+R20				
	d26+R20	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5	d28+R20	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5
KIR2DL1	3				1		3				1	
KIR2DL2	3				1		3					
KIR2DL3	3				2		3			2	1	
KIR2DL4	3			2	3		3				1	
KIR2DL5	3						3					
KIR3DL1	3						3					
KIR3DL2	3						3					
KIR3DL3	3				1		3					
KIR2DS1	3						3			1		
KIR2DS2	3						3			1		
KIR2DS3	3				1		3			1		
KIR2DS4	3				1		3					
KIR3DS1	3				2		3			2		
NCAM	3			3	3		3			1	2	2
β -actin	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

	BULK	d32+R20					BULK	d34+R20				
	d32+R20	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5	d34+R20	Klon 1	Klon 2	Klon 3	Klon 4	Klon 5
KIR2DL1					2							
KIR2DL2					3							
KIR2DL3					3	1						
KIR2DL4					3	2			1	2		
KIR2DL5					1							
KIR3DL1					2							
KIR3DL2												
KIR3DL3												
KIR2DS1					2							
KIR2DS2					2							
KIR2DS3				3								
KIR2DS4				1		1						
KIR3DS1										1		
NCAM		1	1	3	3	1			2	2		
β -actin	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		

8.3 Untersuchung epigenetischer Faktoren im Lauf der NK-Zelldifferenzierung



$2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode wurde GAPDH als endogene Kontrolle verwendet. In den Diagrammen A, B, C und D sind die DNA-Methyltransferasen (DNMTs) der jeweiligen CBs zusammengefasst.

Abbildung 8.1 Graphische Darstellung der Real-Time-TaqManTM RT-PCR-Ergebnisse. Aufgetragen ist die quantitative n-fache Menge an RNA-Template im Vergleich zur Referenzprobe (d0, CD34+CD38-Lin-). Auf der x-Achse sind die untersuchten Faktoren dargestellt. Für die

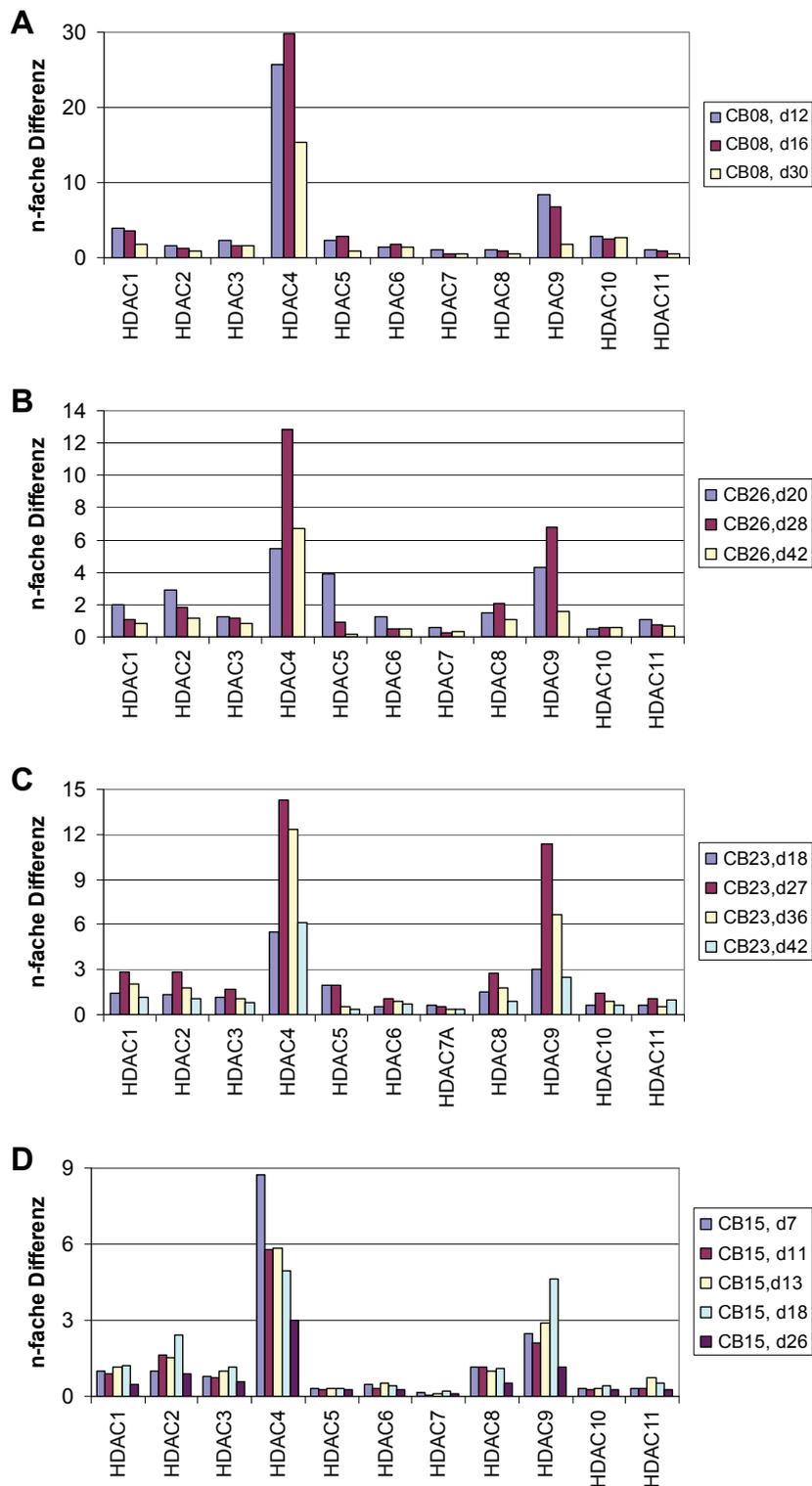


Abbildung 8.2 Graphische Darstellung der Real-Time-TaqMan™ RT-PCR-Ergebnisse. Aufgetragen ist die quantitative n-fache Menge an RNA-Template im Vergleich zur Referenzprobe (d0, CD34+CD38-Lin-). Auf der x-Achse sind die untersuchten Faktoren dargestellt. Für die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode wurde GAPDH als endogene Kontrolle verwendet. In den Diagrammen A, B, C und D sind die Histondeacetylasen (HDACs) der jeweiligen CBs zusammengefasst.

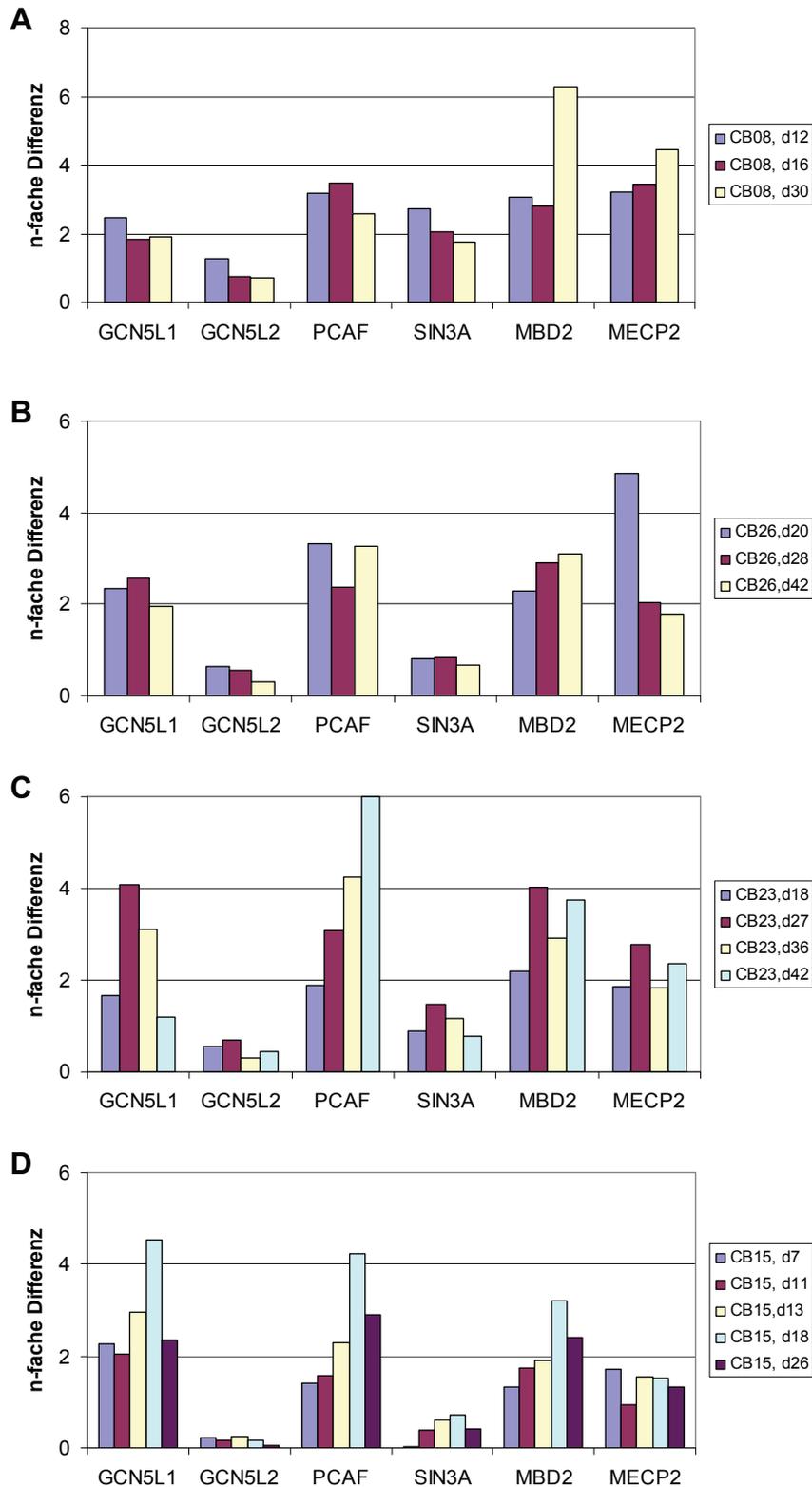


Abbildung 8.3 Graphische Darstellung der Real-Time-TaqMan™ RT-PCR-Ergebnisse. Aufgetragen ist die quantitative n-fache Menge an RNA-Template im Vergleich zur Referenzprobe (d0, CD34+CD38-Lin-). Auf der x-Achse sind die untersuchten Faktoren dargestellt. Für die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode wurde GAPDH als endogene Kontrolle verwendet. In den Diagrammen A, B, C und D sind die Histonacetylasen (HATs) und Methylbindenden Proteine der jeweiligen CBs zusammengefasst.

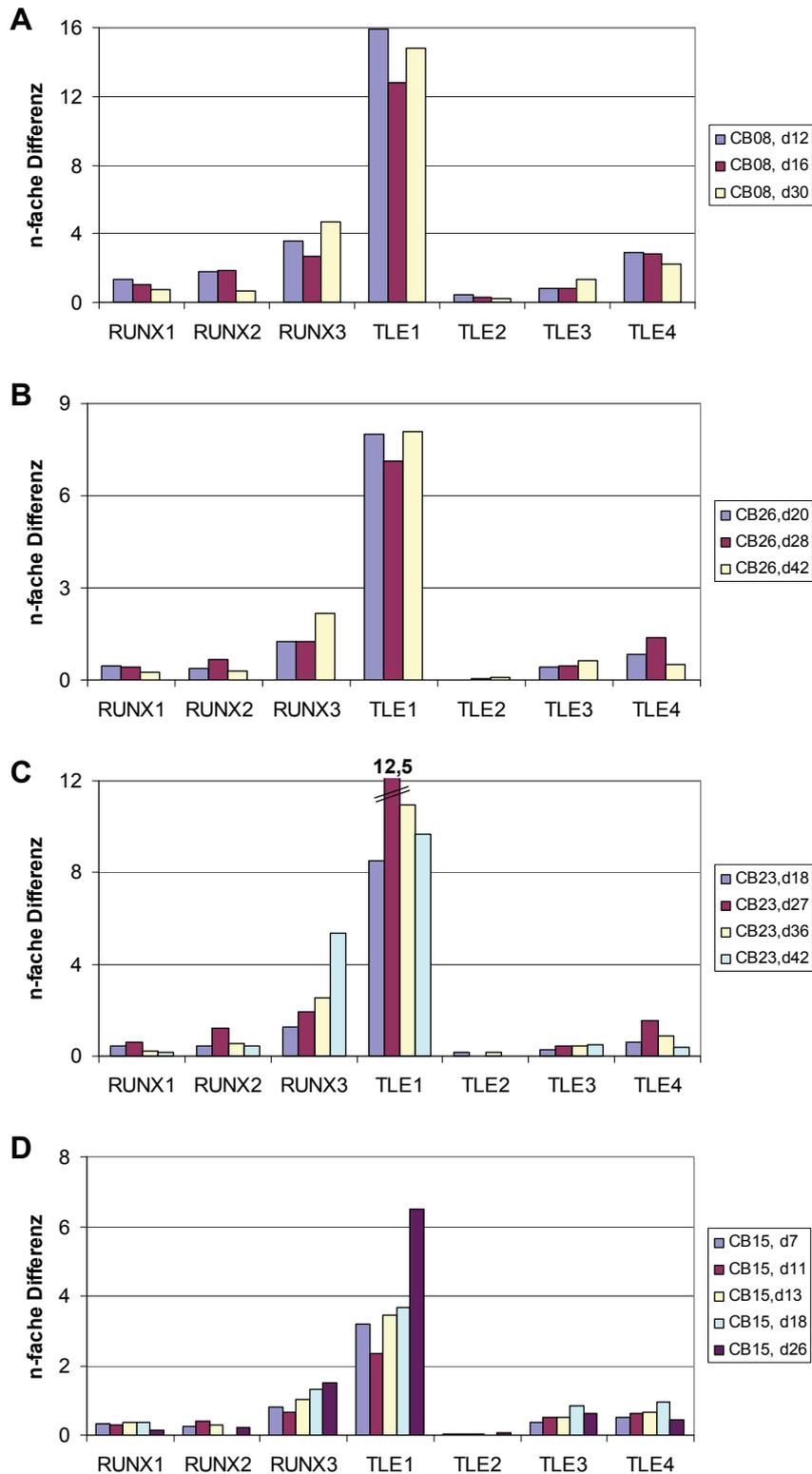


Abbildung 8.4 Graphische Darstellung der Real-Time-TaqMan™ RT-PCR-Ergebnisse. Aufgetragen ist die quantitative n-fache Menge an RNA-Template im Vergleich zur Referenzprobe (d0, CD34+CD38-Lin-). Auf der x-Achse sind die untersuchten Faktoren dargestellt. Für die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode wurde GAPDH als endogene Kontrolle verwendet. In den Diagrammen A, B, C und D sind die RUNX-Faktoren und die Korepressoren (TLE1-4) der jeweiligen CBs zusammengefasst.

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Markus Uhrberg bedanken, der mir dieses spannende Projekt anvertraut hat. Er hat mir die Möglichkeit gegeben, sehr eigenständig zu arbeiten und hatte für alle Probleme jederzeit ein offenes Ohr. Vielen Dank auch dafür, dass wir diese Arbeit noch kurz vor Schluss einreichen konnten.

Ein Dank gilt dem kommissarischen Institutsdirektor Dr. med. Johannes Fischer, der sich einige Abende und Nächte um die Ohren geschlagen hat, um mir den Sorter einzustellen und mich den komplexen Wirren des FACS etwas näher gebracht hat. Danke auch für die Bereitstellung der Apheresate und der Knochenmarkproben.

Ganz besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. Rolf Wagner danken, der mich nicht nur während meiner Diplomarbeit exzellent betreut hat, sondern auch Fakultäts-extern das Koreferat für meine Dissertation übernommen hat. Darüber freue ich mich sehr und möchte mich damit auch für seine sehr freundliche und schnelle Hilfe bei allen Fragen zu Promotion und Co bedanken.

Vielen Dank an Dr. med. Michael Punzel, bei dem ich sehr viel über die Generierung von NK-Zellen gelernt habe. Ohne ihn wären die ersten Versuche in der Zellkultur nicht so erfolgreich gewesen. Danke auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit und hilfreiche Ratschläge zur Umgestaltung.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Prof. Dr. Gesine Kögler für die Bereitstellung der Nabelschnurblute und bei Dr. Jürgen Enczmann für die Durchführung der HLA-B-Typisierungen.

Ganz lieben Dank an Dr. Simon Santourlidis für sein großes Interesse an meiner Arbeit und viele konstruktive Vorschläge und Kritik und danke fürs Lesen und Korrigieren. Danke auch an Dr. Ingo Trompeter für das Lesen meiner Arbeit und das ein oder andere Streitgespräch ;)

Glücklicherweise hatte ich während dieser Arbeit sehr nette Kollegen, die auch Freunde geworden sind und hoffentlich bleiben. Ihr wart mit ein Grund, warum ich immer gerne zur Arbeit gekommen bin: Danke an Dr. Jin Mann für unsere schönen Joggingtouren mit anschließendem McDonalds-Stopp; aber ich wollte es ja auch ;). Danke an Kathrin (Schönschweiger-) Schönberg fürs walken;) und Korrekturlesen dieser Arbeit und auch für ihre FACS-Hilfe im letzten Versuch. Danke an Christophe Klumb fürs Laufen und Springen um den U-See, für Blödsinn im Labor und den Französischsprachunterricht zwischen den Pipetten. Thanks to Rui P. L. d. Neves for the singing and joking and the ear-massages in the lab and for some very tasty dinners- I am thankful that I didn't had to eat the chicken hearts! Danke auch an Nina Graffmann und Theodora Ribarska, dass wir diesen 'harten' Laboralltag wenigstens für einige Zeit geteilt haben. Ganz besonders möchte ich mich bei Julia Christ, der besten TA auf der Welt bedanken. Für ihre Hilfsbereitschaft, speziell bei dem ChIP-Versuch aber auch während meiner ganzen Arbeit, für ihre guten Ratschläge und dafür, dass sie immer alles gefunden hat in (Gefrier)Schränken, die ich selber schon durchsucht hatte ☺.

Danke an die Mädels aus 14.88: Sandra Weinhold für den Ct-Wert bei 5 und für das RNase-freie Wasser ;) und Sabine Krause für den Drucker(Reparatur)Service und außerdem für die zuverlässigen Lieferungen der Riesen-Super-Leckeren-Ost-Waffeln.

Ein Gruß auch an Julia Beckmann und Gregor von Levetzow, ich fand's schön, dass wir unsere Doktorandenzeit gemeinsam am ITZ verbra(u)cht haben.

Zu meinem Glück habe ich noch mehr liebe Freunde, die mich während der Entstehung dieser Arbeit bei Laune gehalten haben: Danke an Sabine und Mark für viele schöne Koch- und Doppelkopfabende. Wenn ich gute Blätter hatte, hat mich das echt entspannt ☺.

Danke an Kyra, Isi, Zois, Lutz, Cori, Vicki, Carmen u.v.m. für alles Mögliche.

Ganz lieben Dank an Andi für seine Geduld mit mir während meiner Arbeit. Er musste einiges ertragen und hat ganz tapfer ausgehalten. Danke auch fürs Aufmuntern, für viel zu lange und zu teure Shoppingtouren und für jede Menge Spaß und Ablenkung zwischendurch.

Vielen Dank an meine Geschwister Josef und Maria, die mich motiviert haben und an mich geglaubt haben, dass ich es schaffe, diese Arbeit zu Ende zu bringen. Danke an meinen Bruder, der mich seit meiner Schulzeit motiviert hat und ohne den ich vielleicht gar nicht studiert hätte. Danke an meine Schwester für ein paar sehr schöne und entspannte Wochenenden im Westerwald. Danke auch an die übrigen Familienmitglieder: Egon, Lisa, Diana, Aljosha, Cedrik und Celina fürs Ablenken hin zu den wichtigen Dingen des Lebens.

Nicht zuletzt möchte ich vor allem meiner Mutter danken, die mich während der Doktorarbeit finanziell unterstützt und auch für mein leibliches Wohl gesorgt hat. Sie hat am aller festesten die Daumen gedrückt und alles geduldig mitgetragen.

Diese Danksagung mag den allgemein üblichen Rahmen sprengen. Für mich wird es allerdings die einzige Dissertation und zum Abschluss meiner so langen Ausbildung auch die einzige Möglichkeit bleiben, mich bei den wichtigsten Personen zu bedanken.

Ich bin der Wahrheit verpflichtet, wie ich sie jeden Tag erkenne, und nicht der Beständigkeit.

Mahatma Gandhi