

**Expression und Regulation des
KIR-Repertoires von humanen Natürlichen
Killerzellen**

Kumulative

Inaugural  Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Kathrin Schönberg

aus Düsseldorf

Düsseldorf 2011

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: Prof. Dr. Markus Uhrberg

Koreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 14.04.2011

„Das Leben ist wert, gelebt zu werden, sagt die Kunst, die schönste Verführerin; das Leben ist wert, erkannt zu werden, sagt die Wissenschaft.“

Friedrich Nietzsche (1844-1900)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Zusammenfassung	V
Summary	VI
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.2 Die Natürliche Killer-Zelle.....	4
1.2.1 Phänotyp und Funktion von NK-Zellen	4
1.2.2 Effektormechanismen der NK-Zellen.....	6
1.3 NK-Zellrezeptoren	7
1.3.1 NCR und LIR.....	7
1.3.2 NKG2 Familie.....	8
1.4 KIR.....	9
1.4.1 KIR-Nomenklatur	9
1.4.2 KIR-Genetik	11
1.4.3 KIR-Liganden	13
1.4.3.1 HLA (Aufbau, Funktion und Struktur)	13
1.4.3.2 KIR-Rezeptoren und ihre Liganden	15
1.4.4 KIR-Expression und Regulation.....	16
1.4.4.1 Endogene und exogene Faktoren.....	17
1.4.4.2 Toleranz	18
1.4.4.3 Einfluss von HLA-Klasse I-Liganden auf das Repertoire	18
1.4.4.4 Einfluss von HLA-Klasse I-Liganden auf die Funktion	19
1.5 NK-Zellen im Nabelschnurblut	21
1.6 NK-Zellen in der Klinik	23
1.6.1 NK-Zellen und Schwangerschaft	23
1.6.2 NK-Zellen und Stammzelltransplantationen	24
1.6.3 NK-Zellen und Krankheiten.....	26
1.7 Ziel dieser Arbeit	27

2	Ergebnisse und Diskussion	29
2.1	Überblick	29
2.2	Clonal analysis of NK cell effector functions by multi-parameter flow cytometry..	30
2.2.1	Zusammenfassung	31
2.2.2	Publikation	33
2.3	Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition.....	52
2.3.1	Zusammenfassung	53
2.3.2	Publikation	56
2.4	Neonatal NK cell repertoires are functionally but not structurally biased towards recognition of self HLA class I	72
2.4.1	Zusammenfassung	73
2.4.2	Publikation	75
2.5	Expansion of NKG2A ⁺ LIR1 ⁺ NK cells in HLA-Matched, KIR/HLA-Ligand Mismatched Patients following Hematopoietic Cell Transplantation	88
2.5.1	Zusammenfassung	89
2.5.2	Publikation	91
2.6	iNKT cell reference values in children: The absolute iNKT cell count is stable from birth to adulthood	105
2.6.1	Zusammenfassung	106
2.6.2	Publikation	107
2.7	Ausblick	129
3	Literatur	130
4	Lebenslauf.....	138
5	Publikationen im Rahmen der Doktorarbeit	139
5.1	Veröffentlichungen	139
5.2	Kongressbeiträge, Poster und Vorträge	140
6	Danksagung.....	141
7	Erklärung.....	143

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität)
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigenpräsentierende Zelle
CB	Cordblood (Nabelschnurblut)
CD	Cluster of differentiation (Unterscheidungsgruppen)
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CLP	Common lymphoid progenitor (gemeinsamer lymphoider Vorläufer)
CMV	Zytomegalie-Virus
et al.	et alias, lateinisch: und andere
GvHD	Graft-versus-host-disease
GvL	Graft-versus-Leukemia
HCT	Hematopoietic cell transplantation (Hämatopoietische Zelltransplantation)
HCV	Hepatitis C-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Human leukocyte antigen (Humanes Leukozyten Antigen)
HLA-C1,2	HLA-C Gruppe 1,2
HSC	Hematopoietic stem cell (Hämatopoietische Stammzelle)
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation (Hämatopoietische Stammzelltransplantation)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNKT	Invariante NKT-Zellen
ITAM	Immunoreceptor tyrosin-based activating motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
KIR	Killer cell immunoglobulin-like receptor
LAMP-1,2	Lysosomal-associated membrane protein 1,2
LIR	Leukocyte Ig-like receptor
LRC	Leukocyte receptor complex (Leukozyten Rezeptor Komplex)
MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NCR	Natural cytotoxicity receptors (Natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren)
NKC	NK cell cluster
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PB	Peripheres Blut

PBMC	Peripheral blood mononuclear cells (Periphere mononukleäre Zellen)
PI	Propidium Iodid
TCR	T cell receptor (T-Zellrezeptor)
TNF	Tumornekrosefaktor

Zusammenfassung

Natürliche Killer (NK)-Zellen detektieren Veränderungen in der Expression von HLA-Klasse I-Molekülen (MHC-Klasse I-Moleküle des Menschen) auf Körperzellen mit Hilfe bestimmter inhibitorischer Rezeptoren, insbesondere der KIR- (*killer cell Ig-like receptors*) und NKG2-Rezeptorfamilien. Während KIR-Rezeptoren hochspezifisch für bestimmte HLA-Klasse I-Epitope sind, handelt es sich bei NKG2A um einen Pan-HLA-Klasse I-Rezeptor. Diese Rezeptoren werden klonal verteilt exprimiert, d.h. von NK-Zelle zu NK-Zelle unterschiedlich, und bilden zusammen das sogenannte NK-Zellrepertoire. Bisher war unklar, ob und wie das humane NK-Zellrepertoire durch die Interaktion dieser Rezeptoren mit ihren spezifischen HLA-Klasse I-Liganden geformt wird. Um die Prinzipien dieser Interaktion besser zu verstehen, wurden NKG2A und KIR-Rezeptoren sowie ihrer HLA-Klasse I Liganden in peripherem Blut und Nabelschnurblut analysiert. Um die gleichzeitige Detektion der klonalen Expression und Funktion aller wichtigen inhibitorischen Rezeptoren auf NK-Zellen zu ermöglichen, wurde hierfür ein durchflusszytometrisches Verfahren etabliert, bei dem die KIR- und NKG2A-Expression zusammen mit funktionalen Markern wie CD107 und Interferon- γ bestimmt werden kann.

Die präsentierten Ergebnisse zeigen, dass sich KIR und NKG2A-Rezeptoren gegenläufig zueinander verhalten, und zwar sinkt die Frequenz von NKG2A-exprimierenden NK-Zellen von der Geburt bis zum Erwachsenenalter um 50%, während sich reziprok dazu die KIR-Expression fast verdoppelt. Diese Ergebnisse deuten auf eine Transition von einem unspezifischen neonatalen zu einem hochspezifischen adulten NK-Zellrepertoire hin. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass in adulten NK-Zellen eine signifikante Adaption der KIR-Expressionsfrequenzen zum entsprechenden HLA-Klasse I-Liganden auftritt, während dieser Effekt im neonatalen Blut nicht nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise zeigen sowohl neonatale als auch adulte NK-Zellen eine funktionale Adaption an HLA-Klasse I in Bezug auf Zytotoxizität und Zytokinproduktion, ein Prozess der auch als Lizenzierung bezeichnet wird. Insgesamt konnte damit in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Lizenzierung der strukturellen Adaptation des NK-Zellrepertoires vorausgeht und beide Prozesse wahrscheinlich nicht direkt miteinander verknüpft sind.

Summary

Natural killer (NK) cells sense changes in the expression of HLA class I molecules (human MHC class I molecules) to target cells using specific inhibitory receptors, especially the KIR (killer cell Ig-like receptors) and NKG2 receptor families. While KIR receptors are highly specific for certain HLA class I epitopes, NKG2A is a Pan-HLA class I receptor. These receptors are clonally expressed, i.e. different from NK cell to NK cell, and form together the so-called NK cell repertoire. However, it was unclear whether and how the human NK cell repertoire is shaped by the interaction of these receptors with their specific HLA class I ligands. To understand the principles of this interaction better, NKG2A and KIR receptors and their HLA class I ligands were analyzed in peripheral blood and cord blood. To enable the simultaneous detection of clonal expression and function of all major inhibitory receptors on NK cells, a flow cytometric protocol was established, in which the KIR and NKG2A expression can be determined together with functional markers such as CD107 and Interferon- γ .

The results show that KIR and NKG2A receptors act in opposite directions. The frequency of NKG2A-expressing NK cells decreases from birth to adulthood by 50% while reciprocally the KIR expression almost doubled. These results suggest a transition from a non-specific neonatal to a highly specific adult NK cell repertoire. This hypothesis is supported by the observation that in adult NK cells a significant adaptation of KIR expression frequencies for the HLA class I ligands occurs while this effect in neonatal blood was not detectable. Interestingly, both neonatal and adult NK cells show a functional adaptation to HLA class I in terms of cytotoxicity and cytokine production, a process which is also referred to as licensing. Furthermore, the study suggests that functional education of cognate KIR by self-HLA class I precede structural adaptation of KIR repertoires and that both processes are not directly linked to each other.

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist das biologische Abwehrsystem des Körpers gegen Krankheitserreger wie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten und besteht aus vielen zellulären und humoralen Bestandteilen, die ein komplex miteinander verflochtenes System bilden, um pathogene und körperfremde Strukturen zu erkennen und zu vernichten. Das Immunsystem lässt sich in eine angeborene und eine adaptive Immunantwort unterteilen.

Das angeborene Immunsystem bekämpft Krankheitserreger ohne vorherige Stimulation oder zuvor Kontakt mit dem Erreger gehabt zu haben. Neben anatomischen und physiologischen Barrieren und dem Komplementsystem ist ein Teil des angeborenen Immunsystems auch zellvermittelt. Dem gehören Granulozyten, Monozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) an. Diese Zellen sind in der Lage, körperfremde von körpereigenen Zellen und Strukturen zu unterscheiden. Entweder sie erkennen das Fehlen von körpereigenen Strukturen oder das Vorhandensein konservierter Pathogenstrukturen als körperfremd und vernichten die Erreger entweder durch Phagozytose- oder Lysemechanismen. Zudem produzieren viele dieser Zellen chemische Stoffe wie Interleukine (IL) und Interferone (IFN), die andere Immunzellen aktivieren und die Immunantwort verstärken.

Das adaptive Immunsystem besteht aus humoralen und zellulären Komponenten, die mit Hilfe von Rezeptoren in der Lage sind, spezifische Strukturen der Angreifer als körperfremd zu erkennen und zu vernichten. Es zeichnet sich durch seine Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Erregern aus und vermittelt Immunität durch gezielte Zellabwehrmechanismen und Antikörper. Eine weitere Eigenschaft des adaptiven Immunsystems ist die Ausbildung so genannter „Memory-Zellen“. Dies sind Gedächtniszellen, die es ermöglichen, bei einer erneuten Ansteckung schneller und effizienter zu reagieren.

Die Besonderheit des adaptiven Immunsystems besteht in der Diversität und Spezifität der Rezeptoren von B- und T-Zellen. Durch verschiedene genetische Mechanismen wird eine Vielzahl von verschiedenen Rezeptoren erzeugt, die alle eine unterschiedliche Spezifität

aufweisen. Die humorale Immunantwort wird hauptsächlich durch B-Zellen vermittelt. B-Zellen erkennen mittels ihrer Rezeptoren sowohl gebundene als auch freie Antigene und können nach Aktivierung proliferieren und zu Plasmazellen differenzieren. Diese produzieren dann Antikörper, die an die fremden Strukturen binden und diese markieren. Sowohl Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems sind mittels Rezeptoren in der Lage die Immunglobuline zu erkennen und die Lyse oder Phagozytose einzuleiten.

Die zelluläre Immunantwort wird durch T-Zellen vermittelt. T-Zellen sind Lymphozyten, die sich nicht wie die übrigen Lymphozyten im Knochenmark entwickeln, sondern ihre Reifung im Thymus vollziehen. Sie tragen den T-Zellrezeptor (*T-Cell Receptor*, TCR), mit dem jede Zelle ein anderes, spezifisches Antigen erkennen kann. Es gibt verschiedene T-Zellpopulationen, die sich in ihren Oberflächenrezeptoren und Funktionen unterscheiden. Durch so genannte Differenzierungscluster (*Cluster of differentiation*, CD) lassen sich alle Zellen charakterisieren. CD3 ist ein T-Zellmarker, der auf T-Zellen mit dem TCR assoziiert exprimiert wird. CD3 dient dabei der Signalweiterleitung.

CD4-positive T-Zellen sind T-Helferzellen. Sie erkennen Antigene, die mit Hilfe von MHC-Klasse II-Molekülen (*Major histocompatibility complex*, MHC) auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen, B-Zellen und Monozyten, präsentiert werden. Dadurch werden diese T-Zellen aktiviert und setzen Interleukine frei, die wiederum andere Immunzellen, wie B-Zellen oder auch zytotoxische T-Zellen aktivieren.

CD8-positive T-Zellen sind zytotoxische T-Zellen, die Antigene erkennen, die an MHC-Klasse I-Moleküle gebunden sind. MHC-Klasse I-Moleküle werden auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Bei Erkennung der Antigene durch den TCR und seinen Co-Rezeptor CD8 wird die Lyse der Zielzelle eingeleitet (Janeway et al., 2002).

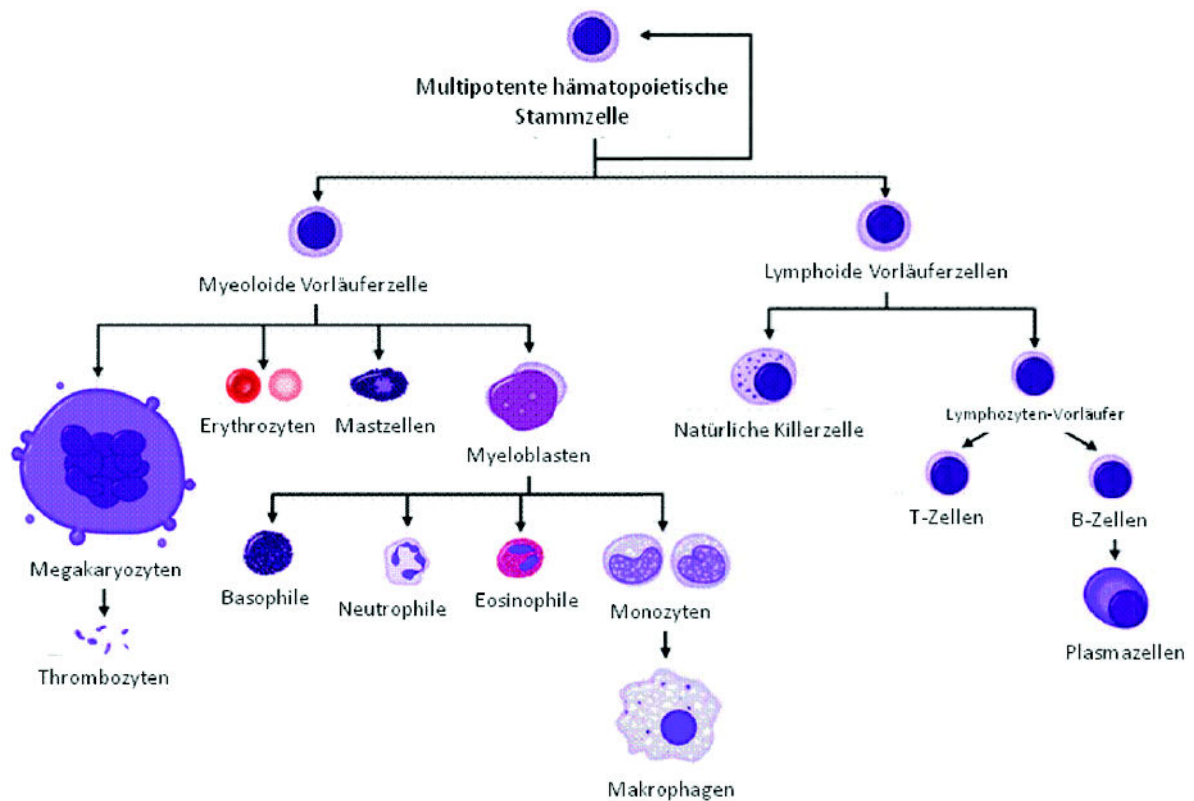


Abbildung 1-1: Darstellung der Hämatopoiese. Geändert nach www.allthingsstemcell.co

Der Hauptteil der Immunzellen zirkuliert im peripheren Blut des Menschen, das sich aus verschiedenen Bestandteilen zusammensetzt. Zunächst lässt sich das Blut in Blutplasma und zelluläre Bestandteile unterteilen. Im Plasma sind Proteine, Salze, Zucker und Nährstoffe gelöst. Die zellulären Bestandteile lassen sich noch einmal in Gruppen unterteilen. Erythrozyten (rote Blutkörperchen) sind für den Sauerstofftransport im Blut verantwortlich, Thrombozyten (Blutplättchen) für die Blutgerinnung, und Leukozyten (weiße Blutkörperchen) enthalten die Zellen des Immunsystems: Granulozyten (Eosinophile, Neutrophile, Basophile), Monozyten und Lymphozyten (T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen).

Alle hämatopoietischen Zellen stammen von einer Vorläuferzelle, der sogenannten hämatopoietischen Stammzelle (hematopoietic stem cell, HSC) ab. Diese Zellen erneuern sich zum einen selbst und differenzieren zum anderen in reife hämatopoietische Zellen über verschiedene Zwischenstufen, die über ihre Oberflächenmarker definiert werden.

Alle hämatopoietischen Zellen sind positiv für CD34, die gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle (common lymphoid progenitor, CLP) ist weiterhin positiv für CD45RA und CD7 (Blom and Spits, 2006).

Im ersten Schritt der Differenzierung bilden sich myeloide oder lymphoide Vorläuferzellen. Aus den myeloiden Vorläuferzellen entstehen Erythrozyten, Megakaryozyten, Granulozyten und Monozyten, während die lymphoiden Vorläufer zu NK-, T- oder B-Zellen differenzieren (Abbildung 1-1). Für die weiteren Differenzierungsschritte sind zum einen Transkriptionsfaktoren verantwortlich, zum anderen Zytokine sehr entscheidend. Beispielsweise benötigen T-Zellen für ihre Entwicklung IL-7, während NK-Zellen u.a. IL-15 brauchen. Es konnten noch nicht alle Schritte der lymphoiden Entwicklung geklärt werden. Besonders die Zellstadien der frühen Vorläufer sind in vielen Fällen noch weitestgehend unbekannt.

Des Weiteren zeigen neueste Studien zur Transdifferenzierung, dass auch aus myeloiden Vorläufern *in vitro* NK-Zellen generiert werden können (Grzywacz et al., 2010) was belegt, dass ein bestimmter hämatopoietischer Differenzierungsweg nicht endgültig determiniert sein muss. Weiterhin zeigt die Möglichkeit, aus Fibroblasten hämatopoietische Zellen zu generieren (Szabo et al., 2010), dass vermeintlich enddifferenzierte nicht-hämatopoietische Zellen durch Überexpression wichtiger Transkriptionsfaktoren, sogenannter Masterregulatoren, in ein hämatopoietisches Differenzierungsschicksal überführt werden können.

1.2 Die Natürliche Killer-Zelle

1.2.1 Phänotyp und Funktion von NK-Zellen

NK-Zellen sind eine Subpopulation der Lymphozyten, die als Teil der angeborenen Immunantwort für die Bekämpfung von virusinfizierten und tumorösen Zellen verantwortlich sind. Sie sind große, granuläre Lymphozyten, deren Anteil an Lymphozyten im Blut durchschnittlich 10-15 % beträgt.

NK-Zellen können im Gegensatz zu T- und B-Zellen virusinfizierte Zellen und Tumorzellen ohne vorherige Antigenerkennung töten. Damit bilden sie ein wichtiges Bindeglied zwischen

angeborener und adaptiver Immunantwort. Sie sind als eine der ersten Zellen am Infektionsort und bekämpfen diese zu einem sehr frühen Zeitpunkt. Dabei dämpfen sie die Infektion ein, bis die T-Zellantwort startet und rekrutieren durch Zytokinausschüttung weitere Immunzellen.

NK-Zellen zeichnen sich durch die Anwesenheit der Oberflächenmarker CD56 sowie die Abwesenheit von CD3 aus (Lanier et al., 1991). CD56 gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und ist ein neurales Zelladhäsionsmolekül (*Neural Cell Adhesion Molecule*, NCAM), dessen Bedeutung auf NK-Zellen noch nicht vollständig geklärt ist. Basierend auf der Dichte von CD56 auf der Oberfläche der NK-Zellen lassen sich NK-Zellen in zwei Populationen unterteilen, die sich phänotypisch und funktionell voneinander unterscheiden (Cooper et al., 2001; Jacobs et al., 2001). Die Zellen, die viel CD56 auf ihrer Oberfläche tragen, nennt man CD56^{bright}-Zellen, sie machen bis zu 10% der NK-Zellpopulation aus. CD56^{dim}-Zellen dagegen sind Zellen mit einer geringeren Zahl an CD56-Molekülen auf der Oberfläche und bilden mit ca. 90% den Großteil der NK-Zellen. Funktionell unterscheiden sich diese beiden NK-Zellpopulationen darin, dass die CD56^{bright}-Zellen in ihrer Immunantwort vorwiegend Zytokine produzieren, während CD56^{dim}-Zellen vorwiegend zytotoxische Aufgaben erfüllen. Weiteres Unterscheidungsmerkmal ist die Expression des Fc-Rezeptors CD16, auf CD56^{bright} ist er kaum oder gar nicht vorhanden, während die CD56^{dim} ihn in hoher Dichte exprimieren.

CD16, ein niedrigaffiner Rezeptor für den Fc-Teil des Immunglobulin G (IgG) vermittelt die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC). Dabei erkennt und bindet CD16 antikörpermarkierte Zellen und leitet daraufhin einen Lysemechanismus ein.

Es gibt eine kleine Population von T-Zellen, die neben ihren T-Zellmarkern wie CD3 oder TCR auch Merkmale von NK-Zellen aufweisen. Diese so genannten NK-ähnlichen T-Zellen tragen CD56 sowie NK-Zellrezeptoren auf ihrer Oberfläche. Ihre Aufgabe im Immunsystem ist noch nicht vollständig geklärt. Man weiß nur, dass es insbesondere CD8⁺-Memory-T-Zellen sind, die diese Merkmale aufweisen (Young and Uhrberg, 2002).

1.2.2 Effektormechanismen der NK-Zellen

Der NK-Zelle stehen verschiedene Mechanismen zu Verfügung eine Zielzelle zu töten. Der erste Weg führt über zytotoxische Granula, die durch Degranulation in Richtung der Zielzelle ausgeschüttet werden. Es sind spezialisierte Lysosomen, die Granzym B und Perforin enthalten. Der saure pH der Granula hält die Enzyme inaktiv, bis sie in das Zytosol der Zielzelle gelangen. Ein Molekül namens Serglycin bindet im sauren Milieu stärker an Granzym B und inhibiert es bis es im neutralen Zytoplasma ankommt und die Bindung sich löst. Perforin wird ebenfalls inhibiert, und zwar durch Calreticulin (Lieberman, 2003). Die Membran wird durch lysosomale Proteine, wie z.B. CD107a und b (*lysosomal-membran associated proteins*, LAMP1 und 2) stabilisiert, welche die Selbstzerstörung der NK-Zellen durch die Effektormoleküle verhindern (Chavez-Galan et al., 2009).

Gegenstand der Diskussion ist immer noch, auf welchem Weg Granzym B dabei in die Zelle gelangt. Sicher ist lediglich, dass Perforin dazu benötigt wird. Möglich sind zwei Szenarien: Perforin ist in der Lage, die Zellmembran der Zielzelle zu perforieren und die Granzyme gelangen durch die entstandenen Poren in die Zelle. (Cullen and Martin, 2008; Voskoboinik et al., 2010). Der zweite mögliche Mechanismus ist, dass Granzym B über Rezeptoren der Zelle endozytotisch aufgenommen und Perforin dazu benötigt wird die Endosomen zu perforieren, damit die Granzyme in das Zytosol gelangen (Lieberman, 2003; Lord et al., 2003). Dort angekommen, können sie zur Tat schreiten: Es gibt fünf verschiedene Granzyme im humanen System: A, B, H, K und M. Die genaue Funktion der Granzyme H, K und M ist nicht bekannt, aber sie haben wohl nicht die starke zytotoxische Funktion wie A und B. Granzym B ist wie alle Granzyme eine Serin-Protease und ist zudem das wichtigste Granzym der NK-Zellen. Es initiiert den Caspase-Signalweg, der letztendlich zur Apoptose der Zielzelle führt, indem es direkt die Caspase-3 schneidet oder indirekt über die Mitochondrien die Freisetzung apoptotischer Faktoren aktiviert. Granzym A ist in der Lage auf einem langsameren und Caspase-unabhängigen Weg Apoptose einzuleiten (Lieberman, 2003). Die Konsequenz beider Wege ist der Zelltod.

Die Induktion der Apoptose kann jedoch auch über Rezeptoren vermittelt werden. Der Fas-Rezeptor der Zielzelle bindet an den Fas-Liganden der NK-Zelle und löst damit ebenfalls den Caspase-Signalweg aus, der über eine Kette von Enzymreaktionen zur Apoptose führt (Chavez-Galan et al., 2009).

Ein weiterer wichtiger Effektormechanismus der NK-Zellen ist die Ausschüttung von Zytokinen. Es werden sowohl Interleukine wie IL-3, IL-10 und IL-13 sowie Interferon- γ (IFN- γ) ausgeschüttet, um andere Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems zu aktivieren. Ein Beispiel ist die Bekämpfung virusinfizierter Zellen. Die infizierten Zellen produzieren bei Auftreten von viraler doppelsträngiger RNA IFN- α und IFN- β , welche wiederum die NK-Zelle aktivieren. Durch diese Aktivierung schüttet sie IFN- γ aus, das Makrophagen aktiviert und die Expression der MHC-Klasse I-Moleküle und somit die Antigenpräsentation erhöht. Dadurch sind wiederum T- und B-Zellen in der Lage, diese Zellen als fremd zu erkennen und ihre Lysemechanismen in Gang zu setzen.

Ist man zunächst davon ausgegangen, dass lediglich die CD56^{bright} NK-Zellen Zytokine ausschütten, ist nun bekannt, dass auch die CD56^{dim} dazu in der Lage sind (Fauriat et al., 2009).

1.3 NK-Zellrezeptoren

Neben den *Killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIR), die in Kapitel 1.4 ausführlich behandelt werden, gibt es noch weitere Rezeptoren auf NK-Zellen, die durch eine Balance aus inhibitorischen und stimulatorischen Signalen Lyse der Zielzelle auslösen oder verhindern. Die meisten dieser Rezeptoren werden in einem Komplex, dem NK-Zellcluster (*NK cell cluster*, NKC) auf Chromosom 12p13.1, kodiert.

1.3.1 NCR und LIR

Die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (*natural cytotoxic receptor*, NCR) NKp30, NKp44 und NKp46 sind aktivierende Rezeptoren und werden auf NK-Zellen exprimiert. Dabei werden NKp30 und NKp46 auf ruhenden sowie aktivierten NK-Zellen exprimiert, wogegen NKp44 erst nach IL-2 Aktivierung exprimiert wird. (Pende et al., 1999; Sivori et al., 1997; Vitale et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass NKp46 und NKp44 an verschiedene virale Hämagglutinine binden können und dadurch aktiviert werden (Mandelboim et al., 2001). NKp30 induziert Zelllyse und ist in die Interaktion mit dendritischen Zellen involviert. Außerdem bindet NKp30 an BAT3, einen von Tumorzellen bei Stress ausgeschütteten Faktor

und ist damit notwendig für die Tumorbekämpfung (Moretta et al., 2006; Pogge von Strandmann et al., 2007). Die NCR sind die einzigen Rezeptoren, deren Expression auf die NK-Zelle beschränkt ist (Bianchini et al., 2001).

Die inhibitorischen LIR (*leukocyte Ig-like receptor*) LIR-1 und LIR-2 sind inhibitorische Rezeptoren mit vier extrazellulären Domänen und ebenfalls einer ITIM-Domäne im Zytoplasma. LIR-1 erkennt HLA-G (*human leucocyte antigen*, HLA), hat eine breite HLA-Klasse I-Spezifität und erkennt das virale Homolog UL18, wogegen LIR-2 HLA-F als Liganden hat (Vitale et al., 1999; Lepin et al., 2000).

1.3.2 NKG2 Familie

Eine Gruppe von MHC-abhängigen Rezeptoren ist die NKG2-Familie, die zu den C-Typ-Lektin-ähnlichen Rezeptoren gehört. Sie besteht aus fünf Mitgliedern: NKG2A, NKG2C, NKG2D, NKG2E und NKG2F. Während alle anderen Mitglieder der NKG2-Familie Heterodimere mit CD94 bilden, kommt NKG2D nur als Homodimer vor.

NKG2A ist der einzige inhibitorische Rezeptor dieser Familie. Sein Ligand ist HLA-E. HLA-E ist ein nicht-klassisches HLA-Molekül, das ubiquitär exprimiert wird und die Signalpeptide der HLA-Moleküle A, B und C (anstelle von antigenen Peptiden) bindet. Somit erkennt CD94:NKG2A lediglich, ob HLA-Klasse I in seiner Gesamtheit herunter reguliert wird, da er nicht zwischen HLA-A, -B und -C unterscheiden kann. Auch NKG2C, ein stimulatorischer Rezeptor, kann an HLA-E binden, jedoch ist die Affinität des Liganden zum inhibitorischen Rezeptor (NKG2A) höher (Vales-Gomez et al., 2000).

Ein weiteres Mitglied ist der stimulatorische Rezeptor NKG2D, der eine wichtige Funktion bei der Erkennung von stressinduzierten Liganden wie MIC-A und MIC-B (*MHC class I chain-related gene A/B*) sowie ULB-P erfüllt (Sutherland et al., 2001). Die Liganden der stimulatorischen Rezeptoren NKG2E und NKG2F sind bisher unbekannt.

1.4 KIR

KIR steht für *Killer cell immunoglobulin-like receptor*. Sie sind die charakteristischen Rezeptoren reifer NK-Zellen und nehmen im Rahmen dieser Doktorarbeit auch den wichtigsten Part ein. Die Gene sind Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie und werden auf Chromosom 19q13.4 im Leukozyten-Rezeptorkomplex (*leukocyte receptor complex*, LRC) kodiert (Trowsdale, 2001; Wilson et al., 2000). Sie werden nur von NK-Zellen und einer kleinen Subpopulation von T-Zellen, den NK-ähnlichen T-Zellen, exprimiert.

1.4.1 KIR-Nomenklatur

Es gibt 15 verschiedene *KIR*-Gene, die alle einer einheitlichen Nomenklatur unterliegen und sich anhand ihrer extra- und intrazellulären Struktur in Gruppen einteilen lassen (Marsh et al., 2003).

Die erste Gruppe der KIRs wirkt inhibitorisch und hat einen langen (*Long* = L) zytoplasmatischen Teil, in dem sich ITIM-Domänen (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) befinden. Diese ITIMs sind essentiell für die Transduktion der inhibitorischen Signale, die durch den Rezeptor in das Innere der NK-Zelle vermittelt werden (Long, 1999).

Die zweite Gruppe der KIRs wirkt stimulatorisch und besitzt im Gegensatz zu den inhibitorischen Rezeptoren nur eine kurze (*Short* = S) zytoplasmatische Domäne, sowie eine basische Aminosäure in der Transmembran-Region. Die stimulatorischen Signale werden nicht über zytoplasmatische Domänen, sondern über das Adaptermolekül DAP12 weitergeleitet (Abbildung 1-2).

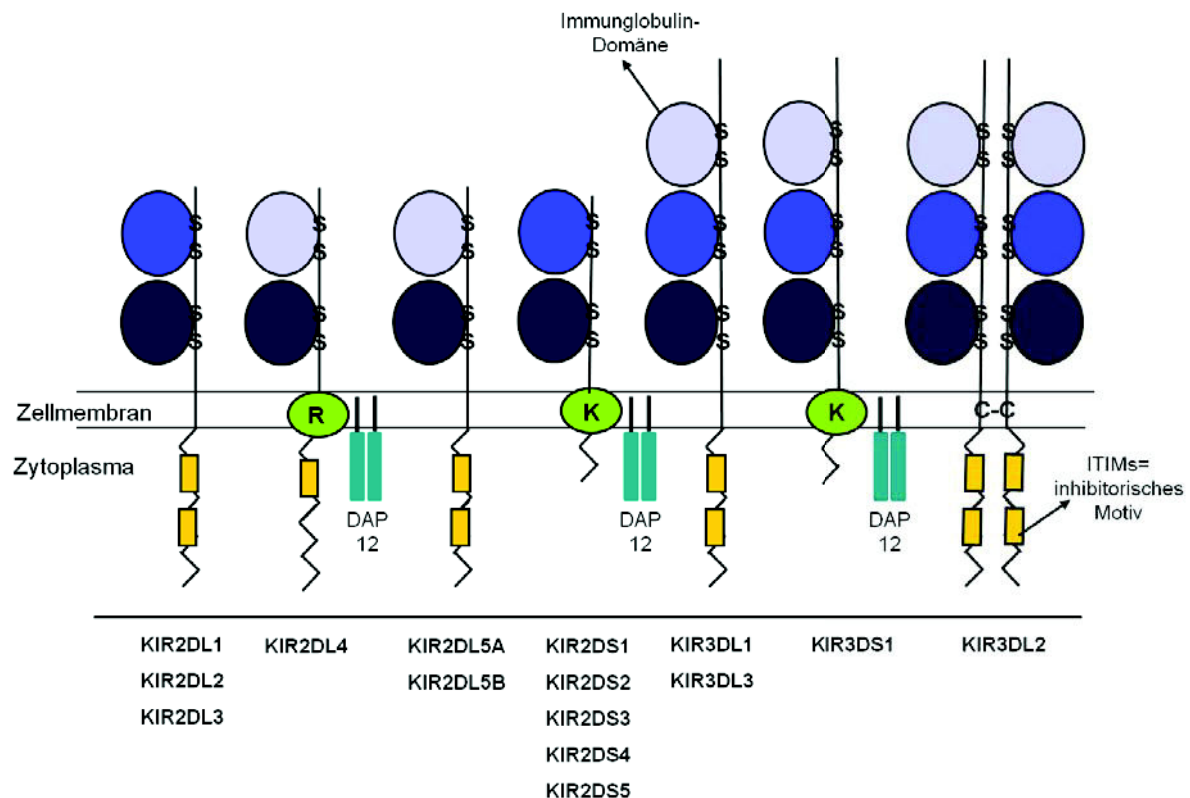


Abbildung 1-2: Aufbau der KIRs. Die blauen Domänen sind die Immunglobulin-Domänen, von denen die KIRs entweder zwei oder drei besitzen. Die gelben Domänen innerhalb des Zytoplasmas sind die ITIMs, an denen die inhibitorischen Signale weitergeleitet werden. Die Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R) in der Zellmembran sind Kennzeichen der stimulatorischen KIRs (dunkelblau=D2, mittelblau= D1 und hellblau = D0 Domäne).

Der Rezeptor KIR2DL4 besitzt sowohl eine lange zytoplasmatische Domäne als auch eine basische Aminosäure in der transmembranen Region und hat damit sowohl Merkmale der inhibitorischen als auch der stimulatorischen KIRs (Selvakumar et al., 1996). Das KIR2DL4-Gen ist als einziger KIR in allen NK-Zellen konstitutiv exprimiert.

KIR besitzen entweder zwei (2D) oder drei (3D) extrazelluläre Domänen. Dabei lassen sich drei konservierte Domänen definieren, die als D0, D1 und D2 Domänen bezeichnet werden (Vilches and Parham, 2002). Alle KIR mit drei Domänen haben die D0-D1-D2 Konfiguration, während es bei den KIR mit zwei Domänen zwei unterschiedliche Konfigurationen gibt: D0-D2 und D1-D2 (Abbildung 1-2).

Neben den 15 funktionalen *KIR*-Genen, existieren noch zwei Pseudogene: *KIR2DP1* und *KIR3DP1*, die jeweils durch eine Mutation ein vorzeitiges Stopcodon und damit lediglich ein *nonsense*-Transkript erzeugen. KIR3DL2 ist der einzige KIR, der als Homodimer vorliegt. *KIR2DL5A* und *KIR2DL5B* sind zwei strukturell ähnliche Varianten und werden auf zwei

unterschiedlichen Loci an unterschiedlichen Regionen im Cluster kodiert (Gomez-Lozano et al., 2007).

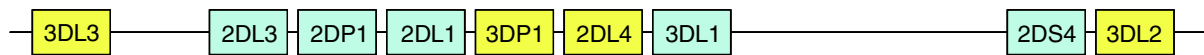
1.4.2 KIR-Genetik

Die KIR-Genfamilie ist ebenso wie ihre Liganden, die HLA-Klasse I-Moleküle, hochpolymorph (Uhrberg, 2005; Uhrberg et al., 1997). Der genetische Polymorphismus spielt sich sowohl auf der Ebene der Zahl und Art der Gene als auch der Allele ab. So lassen sich aufgrund der An- bzw. Abwesenheit eines *KIR*-Gens viele verschiedene KIR-Haplotypen definieren. Dabei haben alle Individuen vier *KIR*-Gene gemeinsam: *KIR3DL3*, ein Gen mit bisher unbekannter Funktion am zentromernahen Ende des *KIR*-Genclusters, *KIR3DL2* am telomeren Ende und *KIR2DL4* sowie *KIR3DP1* in der Mitte des Clusters (Wilson et al., 2000). Diese so genannten „*Framework*“-Gene bilden den nicht-variablen Rahmen für die übrigen polygenen *KIR*-Gene. Als Polygenie bezeichnet man dabei das Vorkommen mehrerer verschiedener, miteinander verwandter Gene mit ähnlicher Funktion.

Die *KIR*-Gene sind nicht nur polygen, sondern auch hochgradig polymorph auf allelischer Ebene. Insbesondere von *KIR3DL1* und *KIR3DL2* existieren viele verschiedene Allele in der Bevölkerung (Carrington and Martin, 2006). Dabei unterscheiden sich die Allele in ihrer Frequenz, mit der sie in der Bevölkerung vorkommen und auch in ihrer Expression (Gardiner et al., 2001). Wichtig zu erwähnen ist in diesem Kontext auch, dass *KIR2DL2* und *KIR2DL3* bzw. *KIR3DL1* und *KIR3DS1* jeweils Allele desselben Genlokus darstellen. In diesen beiden Fällen ist die bestehende Nomenklatur also etwas irreführend, da unterschiedliche Gen-Namen verwendet werden, was historische Gründe hat.

Die verschiedenen Haplotypen, die sich in Art und Anzahl der Gene unterscheiden, lassen sich in zwei Gruppen einteilen (Abbildung 1-3): Gruppe A Haplotypen und Gruppe B Haplotypen (Uhrberg et al., 1997).

Haplotyp A



Haplotyp B

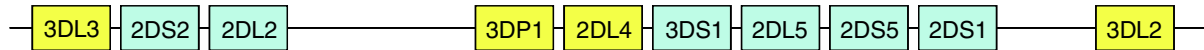


Abbildung 1-3: Haplotypgruppen A und B. Die gelb gekennzeichneten *KIR*-Gene sind die „Framework“-Gene, die allen Haplotypen gemeinsam sind. Die Gene *KIR2DP1* und *KIR3DP1* sind Pseudogene, die ein unvollständiges Transkript produzieren. *KIR2DL2* und *KIR2DL3* sowie *KIR3DL1* und *KIR3DS1* sind Allele des gleichen Gens. Alle Haplotypen der Gruppe A haben nur eine bestimmte, hier dargestellte, Genkonfiguration. Die Haplotypgruppe B ist so definiert, dass dort alle Genkonfigurationen zusammengefasst sind, die anders als die der Haplotypgruppe A aufgebaut sind. Hier ist daher nur eine beispielhafte Genkonfiguration der Haplotypgruppe B skizziert.

Die Haplotypgruppe A besitzt eine fixe Zahl von sechs exprimierten Genen: *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2* und *KIR2DS4*. Mit Ausnahme von *KIR2DS4* haben alle KIRs inhibitorisches Potential. Die Genkonfiguration der Haplotypgruppe A findet sich in unterschiedlicher Frequenz in allen Bevölkerungsgruppen und weist eine sehr hohe Zahl unterschiedlicher alleler Varianten auf. In den Gruppe B Haplotypen wurden alle anderen Genkonfigurationen zusammengefasst, wodurch sich diese Gruppe wesentlich komplexer darstellt und eine sehr variable Anzahl an Genen aufweist. Hier können bis zu zwölf KIR-Gene vorhanden sein, von denen mehrere stimulatorische KIR sind.

Zwei Haplotypen werden jeweils in diploiden Organismen zu einem Genotyp kombiniert und können daher homozygot (*AA*, *BB*) oder heterozygot (*AB*) vorkommen. Ein Genotyp der homozygot für *AA* ist, setzt sich aus folgenden Genen zusammen: *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2* und *KIR2DS4*. Ein Genotyp, der heterozygot für Haplotyp A und B ist, besitzt alle Gene des Gruppe A Haplotyps plus mindestens ein zusätzliches Gen. KIR-Genotypen, die homozygot für Gruppe B sind, fehlt mindestens ein Gruppe A Gen.

Die Komplexität der Gruppe B Haplotypen erschwert ihre Expressions-Analyse, insbesondere serologisch, da zum einen nicht für alle Rezeptoren Antikörper existieren und zum anderen sich die stimulatorischen Rezeptoren extrazellulär kaum von ihren inhibitorischen Gegenspielern unterscheiden. Das bedeutet, dass ein für *KIR2DL1* verwendeter Antikörper nicht zwischen *KIR2DL1* und *KIR2DS1* unterscheiden kann.

Zusammenfassend lässt sich für die beiden Haplotypgruppen sagen, dass Gruppe A Haplotypen aus wenigen Genen besteht, die jedoch hochgradig allelisch polymorph sind, während Gruppe B Haplotypen eine Vielzahl an verschiedenen Genkonfigurationen aufweisen. Damit entsteht eine große Vielfalt an *KIR*-Genotypen in der Bevölkerung (Shilling et al., 2002a).

Unterschiedliche Bevölkerungsgruppen unterscheiden sich auch in der Zusammensetzung der *KIR*-Genotypen innerhalb der Population. Es gibt zum einen sehr homogene Kohorten, in denen Gruppe A Haplotypen dominieren, wie die Japaner, wo mehr als 50% der Bevölkerung homozygot für Haplotyp A sind und das Verhältnis von Gruppe A zu Gruppe B Haplotypen 3:1 beträgt (Yawata et al., 2002). Zum anderen gibt es im Gegensatz dazu Bevölkerungsgruppen, wie die australischen Aborigines, in denen die Frequenz der Gruppe A Haplotypen sehr gering ist. Nur eines von 67 untersuchten Individuen war in einer Studie homozygot für Haplotyp A (Toneva et al., 2001). Die kaukasoide Bevölkerung ist sehr heterogen, doch auch hier ist der Genotyp, der homozygot für Haplotyp Gruppe A ist, der am häufigsten vertretene Genotyp. Ca. 1/3 der Bevölkerung ist homozygot für Haplotyp A (Hsu et al., 2002; Uhrberg et al., 2002). Diese sind nur wenige Beispiele für die Verteilung von *KIR* in der Bevölkerung. Mittlerweile gibt es zahlreiche Publikationen über die Verteilung der *KIR*-Genotypen in den verschiedensten Bevölkerungsgruppen, welche die Basis für nachfolgende Studien zur klinischen Relevanz im Rahmen von Krankheitsassoziationen der *KIR*-Gene bilden (Denis et al., 2005; Jiang et al., 2005; Norman et al., 2002; Rajalingam et al., 2002).

1.4.3 *KIR*-Liganden

Die Effektorfunktion der NK-Zelle wird durch das Verhältnis komplexer Signale der stimulatorischen und inhibitorischen Rezeptoren bestimmt, welche MHC-Klasse I auf der Oberfläche erkennen. Die verschiedenen *KIRs* haben unterschiedliche MHC-Liganden. Allerdings sind nicht für alle *KIRs* die entsprechenden Liganden bekannt.

1.4.3.1 HLA (Aufbau, Funktion und Struktur)

Der Haupthistokompatibilitätskomplex ist eine Gruppe von Genen, die Proteine kodieren, die für die Antigenpräsentation auf Zellen essentiell sind. Im menschlichen Genom liegt

dieser Komplex auf Chromosom 6p21.3. Beim Menschen nennt man die MHC-Moleküle auch HLA-Moleküle. Sie lassen sich in zwei Klassen unterteilen (Abbildung 1-4).

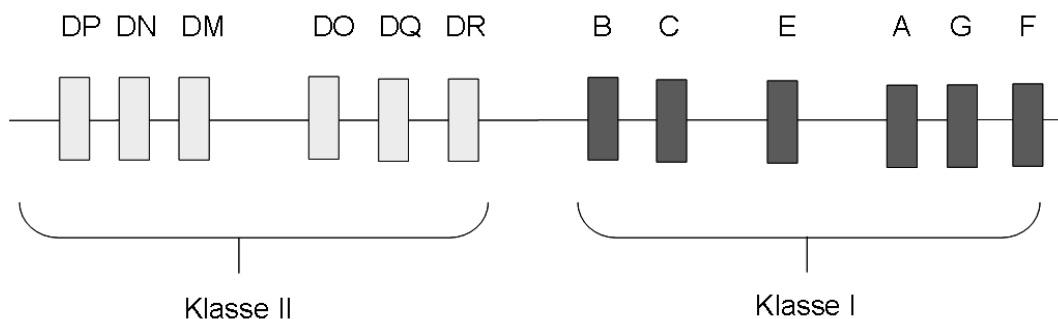


Abbildung 1-4: Anordnung der HLA-Gene auf Chromosom 6

HLA-Klasse II-Moleküle werden von antigenpräsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen, Monozyten und B-Zellen exprimiert. Sie binden Proteine extrazellulären Ursprungs mit einer Länge von ≥ 13 Aminosäuren.

Moleküle der HLA-Klasse I binden Peptide zytosolischen Ursprungs mit einer Länge von 8-9 Aminosäuren und werden mit wenigen Ausnahmen auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. HLA-Klasse I-Moleküle zeigen den immunologischen Status jeder Körperzelle an. Bei der Präsentation von körpereigenen Peptiden sind die T-Zellen gegenüber den präsentierenden Zellen tolerant, präsentieren diese jedoch virale oder andere körperfremde Antigene, werden zytotoxische T-Zellen aktiviert, die die Zielzelle lysieren. Einige virusinfizierte oder entartete Zellen sind ihrerseits in der Lage, die Expression der HLA-Klasse I-Moleküle zu vermindern, um so der zytotoxischen Immunantwort durch T-Zellen zu entgehen. Diesem Mechanismus zur Umgehung des Immunsystems kann durch NK-Zellen mithilfe von HLA-Klasse I-spezifischen Rezeptoren entgegen gewirkt werden.

Die HLA-Klasse I Gene zeichnen sich, ebenso wie die *KIR*-Gene, durch einen hohen Polymorphismus aus, der sich aber nur auf der Ebene der allelischen Vielfalt abspielt. Diese allelische Vielfalt macht sie zu der Region mit der bisher höchsten bekannten Polymorphismus-Rate im menschlichen Genom. Beispielsweise sind für *HLA-A* über 450 Allele, für *HLA-B* mehr als 780 Allele und für *HLA-C* über 230 verschiedene Allele bekannt.

1.4.3.2 KIR-Rezeptoren und ihre Liganden

Unterschiedliche KIR erkennen unterschiedliche HLA-Klasse I-Moleküle. Es sind jedoch nicht für alle KIR die entsprechenden Liganden bekannt (Tabelle 1-1).

Tabelle 1-1: Zusammenfassung der KIR-Rezeptoren und ihrer Liganden

KIR	Funktion	Ligand
KIR2DL1	Inhibitorisch	HLA-C Gruppe 2
KIR2DL2	Inhibitorisch	HLA-C Gruppe 1 und 2
KIR2DL3	Inhibitorisch	HLA-C Gruppe 1
KIR2DL4	Inhibitorisch und Stimulatorisch	HLA-G
KIR2DL5A	Inhibitorisch	Unbekannt
KIR2DL5B	Inhibitorisch	Unbekannt
KIR3DL1	Inhibitorisch	HLA-Bw4
KIR3DL2	Inhibitorisch	HLA-A*03,A*11
KIR3DL3	Unbekannt	Unbekannt
KIR2DS1	Stimulatorisch	HLA-C Gruppe 2
KIR2DS2	Stimulatorisch	Unbekannt
KIR2DS3	Stimulatorisch	Unbekannt
KIR2DS4	Stimulatorisch	HLA-A*11
KIR2DS5	Stimulatorisch	Unbekannt
KIR3DS1	Stimulatorisch	Unbekannt
KIR2DP1	Pseudogen	-
KIR3DP1	Pseudogen	-

Die NK-Zellen, die KIR2DL2 oder KIR2DL3 auf ihrer Oberfläche tragen, werden durch HLA-C Gruppe 1 (HLA-C1), NK-Zellen mit KIR2DL1 auf der Oberfläche durch HLA-C Gruppe 2 (HLA-C2) inhibiert (Colonna et al., 1993; Colonna and Samaridis, 1995). Die Epitope der Liganden HLA-C1 und HLA-C2 unterscheiden sich in zwei Aminosäuren: an Position 77, wo bei HLA-C1 Serin und bei HLA-C2 Asparagin vorhanden ist, sowie an Position 80, wo sich Asparagin bei HLA-C1 und Lysin bei HLA-C2 an dieser Stelle befindet. Neue Studien haben gezeigt, dass KIR2DL2 eine Sonderstellung einnimmt. Er ist in der Lage sowohl HLA-C1 als auch HLA-C2 zu erkennen und durch beide inhibiert zu werden (Moesta et al., 2008; Winter et al., 1998).

KIR3DL1-exprimierende Zellen werden durch HLA-Bw4 auf den Oberflächen ihrer Zielzellen inhibiert (D'Andrea et al., 1995; Gumperz et al., 1995). HLA-B Allele, die das Bw4-Epitop besitzen, unterscheiden sich in den Aminosäuren 77-83 von den übrigen Allelen, die als HLA-Bw6 bezeichnet werden.

Die Bindung von KIR3DL2 an die HLA-A Allele -A3 und -A11 ist schwach und die Inhibition durch diese Liganden ist abhängig von den präsentierten Peptiden (Dohring et al., 1996; Hansasuta et al., 2004; Pende et al., 1996; Valiante et al., 1997).

Für KIR2DL4 wurde HLA-G als Ligand identifiziert, wobei die physiologische Relevanz dieser Ligand-Rezeptor-Beziehung noch nicht endgültig geklärt ist. HLA-G wird vor allem auf den Trophoblasten in der Gebärmutter während der Schwangerschaft exprimiert. NK-Zellen mit KIR2DL4 auf ihrer Oberfläche könnten somit eine Rolle bei der Akzeptanz des Fetus durch das Immunsystem der Mutter spielen (Faure, 2002; Rajagopalan, 1999).

KIR2DL5 ist der einzige inhibitorische Rezeptor, für den kein Ligand bekannt ist (Vilches et al., 2000).

Für KIR2DS1 steht HLA-C2 als Ligand fest (Moesta et al., 2010), jedoch ist bekannt, dass bei gleichem Liganden und gleicher Spezifität der inhibitorische Rezeptor eine höhere Affinität zum Liganden besitzt als der stimulatorische Rezeptor (Stewart et al., 2005). Bekommt die Zelle sowohl ein inhibitorisches als auch ein stimulatorisches Signal überwiegt also stets das inhibitorische Signal, so dass die Lyse körpereigener Zellen verhindert wird. KIR2DS4 ist ein Produkt einer Genkonversion mit KIR3DL2 und hat den gleichen Liganden wie der inhibitorische Rezeptor, nämlich HLA-A11 (Graef et al., 2009). Für die anderen stimulatorischen KIR sind die Liganden nicht sicher oder nicht bekannt.

1.4.4 KIR-Expression und Regulation

Die KIR-Rezeptoren werden klonal exprimiert, das bedeutet, NK-Zellen exprimieren unterschiedliche Kombinationen der genomisch vorhandenen KIRs. Alle theoretisch möglichen Kombinationen konnten *ex vivo* mittels durchflusszytometrischer Analysen in Menschen mit Gruppe A Haplotypen nachgewiesen werden (Yawata et al., 2008). Im Gegensatz zu Gruppe B Haplotypen ist die Anzahl der exprimierten Rezeptoren auf 5

begrenzt. In Spendern mit Haplotypgruppe B werden zusätzlich stimulatorische Rezeptoren exprimiert, die durch ihre Ähnlichkeit zu ihrer inhibitorischen Entsprechung nicht von diesen zu unterscheiden sind. Damit ist die Analyse der NK-Zellen auf klonaler Ebene nicht möglich.

Das KIR-Repertoire bezeichnet die Gesamtheit der NK-Zellen mit unterschiedlichen Rezeptorkombinationen. Es bleibt im Erwachsenenalter weitgehend stabil. Nicht nur von Zelle zu Zelle können unterschiedliche Kombinationen der KIRs festgestellt werden, auch von Mensch zu Mensch sind die Frequenzen und die Expressionsintensität sehr variabel (Shilling et al., 2002b). Durch verschiedene Regulationsmechanismen entwickeln sich je nach genetischem Hintergrund und anderen Faktoren unterschiedliche Repertoires.

1.4.4.1 Endogene und exogene Faktoren

Wie bereits in 1.4.2 erwähnt, unterliegen die *KIR*-Gene einem starken Polymorphismus. Diese genetische Vielfalt beeinflusst auch die Rezeptor-Expression. Anhand von KIR3DL1 konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Allele auch unterschiedlich stark exprimiert werden, was anhand von Antikörpern nachgewiesen werden konnte (Gardiner et al., 2001; Gumperz et al., 1996).

Die *KIR*-Gene unterliegen darüber hinaus weiteren Regulationsmechanismen. Trotz dieser unterschiedlichen Expressionsdichte und –frequenz fällt zunächst einmal auf, dass die Promotoren der verschiedenen *KIR*-Gene zu über 90% homolog sind. Lediglich KIR2DL4, der Rezeptor, der in allen NK-Zellen konstitutiv exprimiert wird, und KIR3DL3, der niedrig bis gar nicht exprimiert wird, zeigen eine andere Struktur (Trompeter et al., 2005). Die Promotorregionen weisen darüber hinaus eine hohe Dichte an so genannten CpG–Inseln auf, CpG-Dinukleotiden, die die Erkennungssequenz für die DNA-Methylierung darstellen. Santourlidis et al. konnten nachweisen, dass exprimierte *KIR*-Gene unmethyliert sind und nicht exprimierte *KIR*-Gene einen methylierten Promotor besitzen (Santourlidis et al., 2008; Santourlidis et al., 2002). Durch 5-Aza-Desoxy-Cytidin, einem Methyltransferase-Inhibitor konnte die Expression vorher aufgrund von Methylierung nicht exprimierter *KIR*-Gene induziert werden. Damit steht die Epigenetik als weiterer Regulationsmechanismus für NK-Zellen fest. Dabei spielen neben der DNA-Methylierung auch Veränderungen der Chromatinstruktur durch Histonmodifikationen eine Rolle (Santourlidis et al., 2008).

1.4.4.2 Toleranz

Aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften von NK-Zellen ist es wichtig zu wissen, wie sie zu ihrer Toleranz gegenüber körpereigenen Zellen gelangen. Obwohl NK-Zellen bereits 1975 identifiziert wurden (Herberman et al., 1975; Kiessling et al., 1975), dauerte es weitere 15 Jahre bis veröffentlicht wurde, mit welchem Mechanismus NK-Zellen ihre Zielzellen erkennen. Dieser Frage sind Ljunggren und Kärre bereits in den 1980er Jahren nachgegangen und haben schließlich das Prinzip des „*missing self*“ postuliert (Karre, 1997; Ljunggren and Karre, 1990). Das besagt, dass NK-Zellen ihre Zielzellen an ihrem „fehlenden Selbst“ identifizieren, d.h. sie erkennen ihre Zielzellen daran, dass bestimmte Moleküle auf der Oberfläche fehlen. Kärre konnte zeigen, dass diese „*missing self*“-Strukturen MHC-Klasse I-Moleküle sind. Die intakte Expression von HLA-Klasse I-Molekülen auf den eigenen Körperzellen wird von NK-Zellen mithilfe von inhibitorischen Rezeptoren, die dann ein inhibitorisches Signal an das Zellinnere leiten, erkannt. Dadurch wird die Lyse verhindert. Können die inhibitorischen Rezeptoren nicht an eine Zelle binden, weil diese kein oder sehr wenig HLA-Klasse I exprimiert, gibt es kein inhibitorisches Signal und Lyse findet statt. Die Lyse wird somit erst eingeleitet, wenn die Zielzelle der NK-Zelle kein „Selbst“ präsentiert.

Das bedeutet im Gegenzug, dass jede NK-Zelle mindestens einen Rezeptor für körpereigenes MHC exprimieren muss („*At least One*“-Theorie) (Uhrberg et al., 1997; Valiante et al., 1997). Diese Regel trifft aber möglicherweise nur auf funktional reife NK-Zellen zu. Neuere Studien zeigen, dass es eine Population von NK-Zellen gibt, die keine inhibitorischen Rezeptoren, also weder NKG2A noch KIR, exprimieren, und theoretisch autoreaktiv sein müssten (Anfossi et al., 2006; Fernandez et al., 2005). Zudem sind auch Zellen entdeckt worden, die KIR⁺ sind, jedoch keinen KIR für körpereigenes HLA tragen und somit nicht tolerant gegenüber „Selbst“ sein dürften. In funktionellen Tests wurde jedoch gezeigt, dass beide Arten von NK-Zellen eine verringerte Zytotoxizität besitzen und damit vermindert reaktionsfähig im Vergleich zu solchen Zellen sind, die KIR oder NKG2A exprimieren (Anfossi et al., 2006; Cooley et al., 2007).

1.4.4.3 Einfluss von HLA-Klasse I-Liganden auf das Repertoire

Das Repertoire setzt sich aus NK-Zellen mit unterschiedlichen Rezeptor-Kombinationen zusammen. Bei der Ausbildung des KIR-Repertoires wird die NK-Zelle vor folgendes Problem gestellt: Zum einen liegen der KIR- und der HLA-Lokus auf zwei unterschiedlichen

Chromosomen, zum anderen sind die KIR-HLA-Interaktionen einem hohen genetischen Polymorphismus unterworfen. Trotz dieser Schwierigkeiten in der gemeinsamen Regulation muss gewährleistet werden, dass die NK-Zellen gegenüber körpereigenen Zellen tolerant sind. So liegt die Vermutung nahe, dass das KIR-Repertoire durch HLA beeinflusst wird.

Ein Einfluss der HLA-Klasse I-Moleküle, welche ja die Liganden der KIR-Rezeptoren darstellen, auf die KIR-Expression konnte lange nicht gezeigt werden (Frohn et al., 1997; Gumperz et al., 1996). Da KIR und HLA auf unterschiedlichen Chromosomen liegen, werden sie unabhängig voneinander vererbt und stehen in keinem unmittelbaren genetischen Zusammenhang. In Mäusen, die anstelle von KIR, lektin-ähnliche Rezeptoren, genannt Ly-49, haben, wurde eine Verschiebung des Repertoires zu NK-Zellen hin, die spezifisch für Selbst-MHC- Klasse I bereits Mitte der 1990er beobachtet (Held et al., 1996). Im Menschen konnte zunächst lediglich gezeigt werden, dass sich Geschwister mit identischem genetischen Hintergrund bezüglich ihrer HLA-Klasse I und KIR-Gene weniger stark im Repertoire unterscheiden als Geschwister mit unterschiedlichem HLA-Klasse I (Shilling et al., 2002b). In Japanern, einer Bevölkerungsgruppe mit begrenztem genetischen Polymorphismus, konnte 2006 zum ersten Mal deutlich gezeigt werden, dass es eine strukturelle Adaption des Repertoires gibt. Die Anwesenheit eines HLA-Klasse I-Liganden erhöhte die Frequenz der NK-Zellen, die den passenden KIR exprimieren (Yawata et al., 2006). Die Diskussion wurde wieder neu entfacht, als Andersson et al. eine Studie veröffentlichten, in der wiederum kein Zusammenhang des KIR-Repertoires mit dem HLA-Klasse I-Typ gefunden werden konnte (Andersson et al., 2009).

1.4.4.4 Einfluss von HLA-Klasse I-Liganden auf die Funktion

Neben der strukturellen Adaption wurde ebenfalls vor kurzem erkannt, dass auch eine funktionale Erziehung („*Education*“) der NK-Zellen abhängig vom körpereigenen HLA-Klasse I vorhanden ist. Dabei konnte der Beweis erbracht werden, dass NK-Zellen mit einem inhibitorischen Rezeptor für Selbst eine höhere funktionale Aktivität haben als NK-Zellen ohne inhibitorischen Rezeptor für „Selbst“ (Anfossi et al., 2006; Fernandez et al., 2005; Kim et al., 2005).

Um die Anwesenheit von NK-Zellen ohne inhibitorischen Rezeptor für körpereigene HLA-Moleküle zu erklären, wird zurzeit postuliert, dass NK-Zellen erst über einen Prozess der Erziehung („*Education*“), auch Lizenzierung („*Licensing*“) genannt, ihre funktionelle Kompetenz erlangen. In diesem Prozess gelangt die NK-Zelle zu funktionaler Reife und

exprimiert die dafür notwendigen Rezeptoren auf der Oberfläche (Kim et al., 2005; Yokoyama and Kim, 2006). Demnach gibt es im Immunsystem zwei Arten von NK-Zellen: lizenzierte NK-Zellen, die funktional aktiv (aber auch tolerant) sind, weil sie einen inhibitorischen Rezeptor für „Selbst“ besitzen, sowie unlizenzierte NK-Zellen, die keinen inhibitorischen Rezeptor für „Selbst“ besitzen und hyporeaktiv sind. Man geht also 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 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). Doch auch für diesen Mechanismus wurden bereits Ausnahmen beschrieben. So belegen neueste Studien, dass auch sogenannte „unlizenzierte“ Zellen in der Lage sind, Virusinfektionen zu regulieren (Orr et al., 2010). In diesem Fall kann also die Hyporeaktivität dieser unlizenzierten NK-Zellen durch entsprechende Stimulation im Rahmen einer Immunantwort überwunden werden.

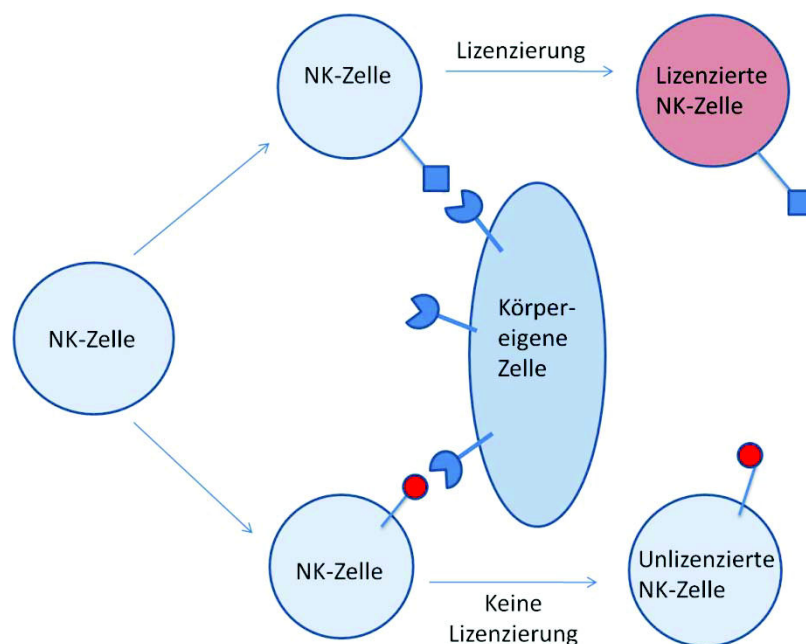


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der Lizenzierung von NK-Zellen. Eine NK-Zelle exprimiert Rezeptoren, die entweder, die körpereigenen HLA-Moleküle erkennt (Blau) oder Rezeptoren, die das nicht tun (Rot). Besitzt sie solche Rezeptoren wird sie lizenziert und wird funktional kompetent.

Die Mechanismen, mit denen die NK-Zellen lizenziert werden, sind weitestgehend unbekannt. Zurzeit werden vor allem zwei Szenarien diskutiert, die mit den klangvollen Namen „*Arming*“ und „*Disarming*“ belegt wurden. Beim „*Arming*“ (Raulet and Vance, 2006; Wu and Raulet, 1997), sind die NK-Zellen ursprünglich nicht reaktiv und werden mit der Akquisition des richtigen Rezeptors funktional. Sie werden sozusagen bewaffnet. Diejenigen, die nicht den passenden Rezeptor besitzen, bleiben hyporeaktiv. Beim „*Disarming*“ passiert genau das Gegenteil. Die Zellen sind reaktiv und nur diejenigen, die durch Fehlen eines inhibitorischen Rezeptors ständig stimuliert werden, werden anergisch und damit entwaffnet.

In der Maus konnte außerdem gezeigt werden, dass hyporeaktive (also unlizenzierte) NK-Zellen ihr funktionales Potential wieder herstellen können, wenn sie in ein passendes MHC-Klasse I-Umfeld transferiert werden (Elliott et al., 2010; Joncker et al., 2010). Dies gilt im speziellen nur für die Zellen, die einen passenden Rezeptor für „Selbst“ exprimieren. Auch das Umgekehrte ist der Fall. Wenn Zellen, die lizenziert waren in ein Umfeld kommen, in das sie nicht hineinpassen, verlieren sie ihre funktionale Kompetenz (Joncker et al., 2010). Damit scheint es zumindest in der Maus wahrscheinlich zu sein, dass die eigenen MHC-Klasse I-Produkte absolut notwendig für die funktionale Erziehung von NK-Zellen sind und dieser Prozess nicht unumkehrbar ist.

1.5 NK-Zellen im Nabelschnurblut

Natürliche Killerzellen aus Nabelschnurblut (*Cordblood*, CB) spielen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Infektionen in Neugeborenen, da das adaptive Immunsystem, im speziellen die T-Zellantwort, noch nicht vollständig ausgebildet ist. Des Weiteren nimmt ihre Bedeutung weiter zu, da Nabelschnurblute in den letzten 20 Jahren zu einer wichtigen Quelle für allogene Stammzelltransplantationen geworden sind.

Trotz dieser Wichtigkeit ist das Wissen über NK-Zellen aus dem Nabelschnurblut begrenzt und nicht konsistent. Es besteht Uneinigkeit darüber, ob die NK-Zellen denen im adulten Organismus ähneln oder nicht. Es gibt Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen peripherem Blut (PB) und CB in der Rezeptorexpression, der Zytokinproduktion und der Zytotoxizität (Verneris and Miller, 2009).

NK-Zellen aus Nabelschnurblut und adultem peripheren Blut (PB) unterscheiden sich zunächst in ihrer spezifischen Zusammensetzung der NK-Zellsubpopulationen. Im CB gibt es eine Population von NK-Zellen, die im adulten Blut nicht vorkommen. Sie exprimieren CD16 auf der Oberfläche, sind jedoch negativ für den NK-Zellmarker CD56 sind (CD16⁺CD56⁻). Es besteht die Vermutung, dass es sich hierbei um einen Vorläufer von NK-Zellen handelt (Fan et al., 2008; Gaddy and Broxmeyer, 1997; Gaddy et al., 1995).

Ein Hinweis auf die mögliche Unreife der NK-Zellen im CB ist die eindeutig festgestellte verminderte Zytotoxizität (Hoshina et al., 1999; Tanaka et al., 2003; Wang et al., 2007). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Zytotoxizität durch den Einsatz von Zytokinen (IL-15, IL-12) auf ein ähnliches Niveau wie im peripheren Blut stimuliert werden kann (Dalle et al., 2005; Fan et al., 2008).

Andererseits ergab eine detailliertere Analyse der NK-Zellen auf ihren Perforin und Granzym B-Gehalt keine eindeutigen Hinweise auf funktionale Defizienzen. Hierzu gibt es zwei Veröffentlichungen und beide zeigen entgegengesetzte Ergebnisse. In der Studie von Dalle et al. wurden mehr Granzym B- und Perforin-positive Zellen gemessen als im peripheren Blut (Dalle et al., 2005), in der zweiten Studie von 2007 wurden gar keine positiven Zellen für Granzym B und Perforin im CB gefunden (Wang et al., 2007).

Die Rezeptor-Expression im CB ist weniger genau erforscht ebenso wie die Frage auf welche Weise sich das NK-Zellrepertoire während der Entwicklung bzw. im Alter verändert. Bekannt ist, dass sich die Verteilung von T-, NK- und NK-ähnlichen T-Zellen ändert, sowie eine reziprokes Verhältnis zwischen NKG2A und KIR besteht, wobei ersteres im Alter abnimmt und letzteres im Gegenzug ansteigt (Lutz et al., 2005). Sundström et al zeigten, dass diese Veränderungen im Wesentlichen in den ersten 5 Jahren stattfindet (Sundstrom et al., 2007). Hier wurden Blutproben von Kindern im Alter von 2-5 Jahren mit ihrem eigenen Nabelschnurblut verglichen und herausgefunden, dass die Zahl der NK-Zellen mit dem Alter abnimmt und das Level der NCR-Expression ebenso reduziert ist. Hier fehlt jedoch die Analyse der wichtigsten inhibitorischen Rezeptoren auf NK-Zellen, KIR und NKG2A.

Le Garff Tavernier et al. zeigten im vergangenen Jahr zum ersten Mal eine systematische Analyse der wichtigsten NK-Zellrezeptoren als Vergleich im CB, in einer Kontrollgruppe mittleren Alters, sowie alten (60-80 Jahre) und sehr alten (>80 Jahre) Erwachsenen. Dabei

wurde ersichtlich, dass die inhibitorischen Rezeptoren, die HLA-Klasse I erkennen, in den verschiedenen Altersgruppen unterschiedlich exprimiert werden. Während im Nabelschnurblut mehr als 75% der Zellen NKG2A exprimieren, sinkt diese Frequenz in den Erwachsenen auf ca. 50%. Im Gegensatz dazu stehen die KIR-exprimierenden NK-Zellen. Ihre Frequenz steigt signifikant in den Erwachsenen an. In einigen Fällen sogar noch weiter bis ins hohe Alter. (Le Garff-Tavernier et al., 2010).

Die Frage nach dem Einfluss der Liganden auf die Rezeptorexpression als auch auf die Funktion der NK-Zellen ist im Nabelschnurblut unbeantwortet. Wie bereits erwähnt, zeigen NK-Zellen im adulten peripheren Blut eine Anpassung des Rezeptorrepertoires in Abhängigkeit zum passenden Liganden (Schönberg et al., 2011; Yawata et al., 2006) und auch der Prozess der Lizenzierung ist für das periphere Blut ausreichend beschrieben. Zu beiden Prozessen liegen bisher keine Daten aus dem Nabelschnurblut vor.

1.6 NK-Zellen in der Klinik

1.6.1 NK-Zellen und Schwangerschaft

Deciduale NK-Zellen sind die größte Gruppe unter den maternalen Leukozyten im Uterus während einer Schwangerschaft (Trowsdale and Moffett, 2008). Sie exprimieren neben HLA-C-spezifischen KIR auch KIR2DL4 (Male et al., 2010). KIR2DL4 ist der KIR, der in jeder NK-Zelle exprimiert wird. Er erkennt HLA-G, das nur in wenigen Geweben exprimiert wird, unter anderem den Trophoblasten. Trophoblasten bilden die äußere Zellschicht einer Blastozyste und verbindet diese mit der Gebärmutterwand. Somit können NK-Zellen beitragen, dass eine Immunreaktion der NK-Zellen gegen das Kind verhindert wird.

Eine schwerwiegende Schwangerschaftskomplikation ist Präeklampsie, bei der es durch einen Fehler in der Invasion der Trophoblasten in die Gebärmutter zu verengten Blutgefäßen in der Plazenta kommt, wodurch zum einen eine Unterernährung des Babys entsteht und zum anderen Bluthochdruck und Proteinurie bei der Mutter auftreten, beides Zeichen einer gestörten Adaptation des mütterlichen Organismus an die Schwangerschaft. Es konnte gezeigt werden, dass das Risiko ansteigt, wenn die Mutter homozygot für KIR-Haplotyp A ist. Dies ist jedoch nur ein Problem, wenn der Fötus positiv für HLA-C2 Allele ist. (Hiby et al.,

2004; Moffett and Hiby, 2007). Eine Begründung für das Ansteigen eines Präeklampsie-Risikos in Schwangerschaften mit HLA-C2 positiven Föten könnte sein, dass deciduale NK-Zellen von HLA-C2 stärker inhibiert werden als von HLA-C1 (Die Bindung von KIR2DL1 an HLA-C2 ist stärker als die von KIR2DL3 an HLA-C1) (Winter et al., 1998). Ein weiterer Grund könnte ebenso das Fehlen des aktivierenden KIR2DS1 sein, der ebenfalls HLA-C2 erkennt und in der Lage ist, inhibitorische Signale zu übertönen (Sivori et al., 2011). Offenbar fördern aktivierende Signale die Trophoblasten-Invasion. In Müttern mit Gruppe A Haplotypen fehlt dieses aktivierende Signal (Moffett and Hiby, 2007).

1.6.2 NK-Zellen und Stammzelltransplantationen

NK-Zellen spielen in vielerlei Hinsicht eine wichtige Rolle bei Stammzelltransplantationen (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT). Zum Ersten macht man sich die NK-Alloreaktivität zu Nutze. Die NK-Alloreaktivität leitet sich aus einem „*Mismatch*“ zwischen Spender NK-Zellklonen, die einen spezifischen KIR für HLA-Klasse I-Moleküle exprimieren, und den HLA-Klasse I-Molekülen des Empfängers her. Hier kommt dann das bereits erwähnte „*missing-self*“-Konzept zum Tragen (Vgl. Kapitel 1.4.4.2). Fehlt dem Empfänger beispielsweise ein HLA-C Gruppe 1 Molekül, sind alle NK-Zellen, des Spenders, die KIR2DL3 tragen, alloreaktiv. In jüngster Zeit gewinnt die KIR-Typisierung zur Bestimmung von potentiellen alloreaktiven NK-Zellen der Spender immer mehr an Bedeutung (Schellekens et al., 2008). Alloreaktive NK-Zellen haben folgende Vorteile: Sie töten die T-Zellen des Empfängers und fördern die Rekonstitution und das Anwachsen des Transplantats. Desweiteren werden auch antigenpräsentierende Zellen des Empfängers getötet. Diese können nun keine Antigene präsentieren und es werden mögliche „*Graft-versus-Host*“-Reaktionen verhindert (Giebel et al., 2003). Die wichtigste Eigenschaft dieser alloreaktiven NK-Zellen ist aber wohl der „*Graft-versus-Leukemia*“(GvL)-Effekt, den sie auslösen, indem sie die leukämischen Zellen töten (Ruggeri et al., 2007; Ruggeri et al., 2005). Das Fehlen passender HLA-Antigene als Liganden für KIRs in einem Transplantationsansatz wird auch „*KIR/Ligand mismatch*“ genannt. Mehrere Studien zeigen einen positiven Einfluss, wenn mindestens ein „*KIR/Ligand-mismatch*“ besteht. In dieser Konfiguration steigt die Überlebensrate und die Rückfallrate wird gesenkt (Giebel et al., 2003; Miller et al., 2007). Grundsätzlich lässt sich sagen, dass sich so ein „*mismatch*“ positiv auf die Alloreaktivität der

NK-Zellen auswirkt, und damit die NK-Aktivität gegen leukämische Zellen, gegen T-Zellen sowie dendritische Zellen des Empfängers erhöht. Aber auch hier gibt es Unterschiede: Patienten mit einem „*KIR/Ligand mismatch*“ für HLA-C1, was bedeutet, dass der Empfänger kein Epitop für KIR2DL3 besitzt, zeigen eine höhere Überlebensrate als Patienten mit einem „*HLA-C2 mismatch*“ (Stern et al., 2010).

Auch der *KIR*-Genotyp scheint eine Rolle bei der Überlebensrate nach HSCT zu spielen. Patienten, die ein Transplantat mit mindestens einem Gruppe *B* Haplotypen bekommen haben, hatten eine signifikant höhere Überlebensrate als Patienten mit zwei Gruppe *A* Haplotypen (Cooley et al., 2009). Hier könnten die zusätzlichen stimulatorischen KIR eine positive Wirkung haben. KIR2DS1-positive NK-Zellen beispielsweise, sind in der Lage, T-Zell-Blasten und Dendritische Zellen zu töten und begrenzen damit den GvHD Effekt (Sivori et al., 2011).

Bei Stammzelltransplantationen können sich nicht nur *KIR*- sondern auch *HLA*-Typ des Spenders und Empfängers positiv oder negativ auf die Genesung auswirken. Besonders die HLA-C-Epitope in Spender und Empfänger haben einen großen Einfluss auf das klinische Resultat. So wurde beobachtet, dass *HLA-C1/C2* heterozygote Patienten aufgrund der geringeren „*mismatch*“-Rate eine geringere Überlebensrate haben als homozygote Patienten (Sobecks et al., 2007).

Durch die Dokumentation der Rezeptorakquisition nach HSCT konnte in mehreren Studien ebenfalls Hinweise darauf gefunden werden, dass es zum einen eine sequentielle Expression der KIR gibt und diese zum anderen eine Rolle beim Erfolg der Therapie der Patienten spielt. Somit hat die NK-Zellrekonstitution großen Einfluss auf den Erfolg einer Stammzelltransplantation. Hierbei spielt sicherlich auch eine Rolle, dass NK-Zellen die ersten Lymphozyten sind, die nach einer Stammzelltransplantation im peripheren Blut zu finden sind. Dabei entwickeln sie ihr Repertoire offenbar in einer bestimmten Reihenfolge. Es konnte gezeigt werden, dass nach einer geraumen Zeit, dass Repertoire im Empfänger dem des Spenders gleicht (Shilling et al., 2003). *In vitro* Experimente sowohl in unserer als auch in anderen Arbeitsgruppen, in denen NK-Zellen aus hämatopoietischen Stammzellen generiert wurden, konnten zeigen, dass KIR2DL3 als erster KIR auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Ebenso gibt es eine präferentielle Expression von KIR2DL3 in den generierten NK-Zellen (Fischer et al., 2007; Miller and McCullar, 2001). Durch die frühere Akquisition von KIR2DL3

gelangen HLA-C1 homozygote Patienten früher zu einem funktionalem NK-Zellrepertoire, das in der Lage ist die HLA-C Expression leukämischer oder virusinfizierter Zellen zu überwachen und falls notwendig aktiv zu werden. In Patienten mit HLA-C2 fehlen durch das spätere Aufkommen KIR2DL1 positiver NK-Zellen diese überwachenden Zellen und es kommt zu einer erhöhten Frequenz von Virusinfektionen sowie Rezidiven (Fischer et al., 2007).

Wichtig in diesem Zusammenhang zu erwähnen ist, dass in neueren Konzepten neben der HLA-Typisierung auch der *KIR*-Genotyp und das Rezeptorrepertoire des Spenders bestimmt werden, um die Zahl der alloreaktiven Zellen zu bestimmen, die einen positiven Effekt auf die Wirksamkeit der Stammzelltransplantation des Patienten haben.

1.6.3 NK-Zellen und Krankheiten

NK-Zellen und ihre Rezeptoren spielen auch bei einer Vielzahl von Krankheiten eine Rolle. Vor allem die Polymorphismen der *KIRs* und ihrer Liganden sind mit verschiedenen Krankheiten assoziiert. Bestimmte Kombinationen aus *KIR* und *HLA* wurden vermehrt bei bestimmten Infektionen und Autoimmunkrankheiten beobachtet, wo Genotypen mit aktivierenden *KIRs* entweder schützend wirken oder aber im Gegenteil die Anfälligkeit erhöhen. Ein Beispiel hierfür ist die zervikale Neoplasie, bei der bestimmte Kombinationen aus *KIR* und *HLA* vermindert vorkommen, wogegen die Anwesenheit von KIR3DS1 das Risiko einer Erkrankung erhöht (Carrington and Martin, 2006). Weiterhin fördern verschiedene aktivierende Rezeptoren (KIR2DS1, KIR2DS2) das Auftreten von Arthritis in Psoriasis-Patienten. Dieser Effekt verstärkt sich in Patienten, in denen ein inhibitorischer KIR keinen Liganden besitzt (Nelson et al., 2004).

Besonders bei Virusinfektionen gibt es viele Hinweise darauf, dass KIR- und HLA-Genetik sowohl begünstigend oder als auch nachteilig wirken können. KIR2DL3 in Kombination mit seinem Liganden HLA-C1 hat einen direkten Einfluss auf den Rückgang einer Infektion mit Hepatitis C-Viren (HCV). In verhältnismäßig schwachen Infektionen verschlechtert die Kombination aus KIR2DL3 und HLA-C1 die Heilung (Khakoo et al., 2004). Bei chronischen HCV-Infektionen konnte gezeigt werden, dass die NKG2A-Expressionslevel erhöht waren. Das Ansprechen auf eine Therapie mit Interferon oder einem antiviralen Polymerase-Hemmer ist in diesen Fällen mit einer hohen Zahl an NKG2A-positiven NK-Zellen assoziiert

(Harrison et al., 2010). Bei Infektionen mit dem Zytomegalie-Virus (CMV) reduziert sich das Risiko einer Erkrankung nach Knochenmarktransplantation, wenn mehr als ein aktivierender KIR vorhanden ist (Boyton and Altmann, 2007). Der humane Immundefizienz-Virus (HIV) ist ebenfalls ein Virus, bei dessen Erkrankung KIR eine Rolle zu spielen scheint, sowohl in der Anfälligkeit als auch in der Progression (Boyton and Altmann, 2007). HLA-Bw4 als Ligand für KIR3DL1/S1 scheint einen beschützenden Effekt auf die Progression der Infektion zu haben. Dieser Effekt ist begrenzt auf diejenigen, die die Aminosäure Isoleucin an Position 80 des HLA-Bw4-Moleküls haben. Allele mit Isoleucin an dieser Stelle binden besser an KIR3DL1 und vielleicht auch an KIR3DS1. Diese starke Bindung scheint die Progression der HIV-Erkrankung zu verlangsamen (Martin et al., 2002).

Zusammenfassend scheinen in vielen Fällen die Assoziationen bestimmter KIR- und KIR-Liganden-Konfigurationen mit einer bestimmten Erkrankung ein Ungleichgewicht von Inhibition und Aktivierung widerzuspiegeln. Hierbei gilt es jedoch zu bedenken, dass dieser Hypothese bisher nur genetische Assoziationen zugrunde liegen, bei denen die biologische und medizinische Bedeutung weiter erforscht werden muss.

1.7 Ziel dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das KIR-Repertoire von humanen NK-Zellen untersucht werden. Dabei sollten Faktoren identifiziert werden, welche die Regulation und Ausbildung des individuellen Repertoires beeinflussen. Ziel war es zum Einen, dass KIR-Repertoire auf struktureller Ebene zu charakterisieren. Zum anderen galt es, die Charakterisierung um funktionale Aspekte zu ergänzen. Dabei sollte ein besonderes Augenmerk auf die Unterschiede zwischen den verschiedenen KIR-Haplotypgruppen gelegt werden.

Um festzustellen wie sich das KIR-Repertoire entwickelt und zu welchem Zeitpunkt eine mögliche Adaption an die HLA-Klasse I-kodierten KIR-Liganden stattfindet, wurden sowohl Proben aus adultem peripherem Blut sowie aus Nabelschnurblut untersucht. Hierbei war es vor allem von Interesse festzustellen, ob es Unterschiede in der Ausbildung und Zusammensetzung des KIR-Repertoires zwischen neonatalen und adulten NK-Zellen gibt. Diese Frage ist zum einen von grundlegender biologischer Relevanz um zu verstehen, ob und inwieweit sich das NK-Zellrepertoire von einer naiven Konfiguration im neonatalen

Repertoire zu einer durch verschiedene Infektionen geprägte Historie im adulten Immunsystem verändert. Zum anderen ist die Frage von großer klinischer Relevanz, da sowohl Nabelschnurblut als auch peripheres Blut im Rahmen der klinischen Stammzelltransplantation eingesetzt werden und die Rolle der NK-Zellen für den Ausgang der Transplantation als hochrelevant einzuschätzen ist.

Um festzustellen, inwiefern die Anwesenheit der Liganden das KIR-Repertoire in Struktur und Funktion beeinflusst, ob eine entsprechende Adaption an die Liganden ein intrinsischer Teil der NK-Zellentwicklung ist oder erst später stattfindet und ob es überhaupt eine Transition von einem neonatalen zu einem adulten NK-Zellrepertoire gibt, werden im Rahmen dieser Arbeit eine ausreichende Zahl an adulten Spendern sowie Nabelschnurblut-Proben hinsichtlich der polymorphen *KIR* und *HLA-Klasse I* Loci genotypisch untersucht und anschließend mit der phänotypischen KIR-Expression sowie NK-Zellfunktion verglichen. Dabei werden Mehrfarben-Protokolle für die Durchflusszytometrie entwickelt, die es ermöglichen alle wichtigen inhibitorischen HLA-spezifischen NK-Rezeptoren zusammen mit verschiedenen funktionalen Parametern in einer Messung zu analysieren. Die Multifarben-Durchflusszytometrie ermöglicht hierbei die gleichzeitige Analyse aller Parameter auf klonaler Ebene. Die klonale Information über NK-Zell-Funktion und Phänotyp wurde dann mit dem genetischen KIR und HLA-Klasse I-Hintergrund korreliert. Dieser Versuchsansatz sollte es ermöglichen, erstmals die Beziehungen zwischen KIR-Expression, ihrer Regulation und den passenden Liganden detailliert zu beleuchten.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Überblick

Die grundlegende Idee dieser Arbeit war es, das KIR-Repertoire von NK-Zellen auf klonaler Ebene zu untersuchen und damit dessen Regulation und funktionale Bedeutung besser zu verstehen. Die Basis für den Großteil der hier präsentierten Daten bildete eine von mir etablierte durchflusszytometrische Methode zur gleichzeitigen Analyse der fünf wichtigsten inhibitorischen NK-Zellrezeptoren, nämlich KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2 sowie dem ebenfalls HLA-Klasse I-spezifischen Rezeptor NKG2A. In Kombination mit funktionalen Assays auf ebenfalls durchflusszytometrischer Ebene ermöglichte dieser Ansatz erstmals, Daten über die NK-Zellfunktion auf Einzelzellniveau zu erheben.

Die Kombination der Analyse des NK-Zellrepertoires mit der funktionalen Analyse wurde für adultes peripheres Blut (Kapitel 2.3) sowie Nabelschnurblut (Kapitel 2.4) angewendet. Desweiteren wurden alle Proben sowohl hinsichtlich ihrer *KIR*- als auch *HLA*-Genetik charakterisiert. Bei der Analyse der Daten konnte neben gravierenden Unterschieden in der Funktionalität ein eindeutiger Unterschied in der Adaption des KIR-Repertoires an die polymorphen HLA-Klasse I-Liganden gefunden werden. Während adulte NK-Zellen einen Frequenzanstieg solcher Klone zeigten, die einen „passenden“ Rezeptor für Selbst-HLA-Klasse I-Liganden aufwiesen, war diese Adaption an autologe KIR-Liganden im Nabelschnurblut nicht vorhanden.

Der oben dargestellte methodische Ansatz wurde ebenfalls auf die Analyse von NK-Zellen in Transplantationspatienten (Kapitel 2.5) und die Charakterisierung von sogenannten iNKT-Zellen angewendet (Kapitel 2.6), d.h. einer Population von T-Zellen, die einen nichtvariablen T-Zellrezeptor besitzen und sich durch die Expression bestimmter NK-Rezeptoren auszeichnen. Hierbei wurde deutlich, dass die *KIR*-Typisierung sowie die Analyse des NK-Zellrepertoires aus klinischer Sicht immer mehr Bedeutung erlangt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der Rezeptorexpression und der Entwicklung des Rezeptorrepertoires gewonnen werden, die uns helfen die Bedeutung der NK-Zellen für das natürliche, aber auch das adaptive Immunsystem, besser zu verstehen.

2.2 Clonal analysis of NK cell effector functions by multi-parameter flow cytometry

Status: im Druck

Methods in Molecular Biology, Impact Factor: 1,2

Eigener Anteil an der Publikation:

- Planung und Durchführung der Experimente
- Schreiben des Manuskriptes (mit Markus Uhrberg)

2.2.1 Zusammenfassung

NK-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der frühen Bekämpfung von viralen Infektionen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die HLA-Klasse I-spezifischen Rezeptoren der NK-Zellen, KIR, einen großen Anteil an der NK-zellvermittelten Antwort gegen HCV und HIV haben (Vgl. Kapitel 1.6). Um die NK-Zellfunktion von Patienten mit viralen Infektionen zu untersuchen, ist es sinnvoll funktionale Marker und die Expression der KIR-Rezeptoren parallel zu analysieren.

Um die Funktion und die Rezeptorexpression von NK-Zellen zusammenhängend zu untersuchen, mussten im Rahmen dieser Arbeit mehrere durchflusszytometrische Protokolle etabliert werden.

Für die Bestimmung der NK-Zellfunktion gab es lange Zeit nur einen klassischen *Target-Killing-Assay*, den *Chrom-Release-Assay*. Dabei werden NK-Zellen mit Chrom-markierten Targetzellen kokultiviert. Wenn die Targets getötet werden, setzen sie das radioaktive Chrom in den Überstand frei, welches im Strahlungsmessgerät detektiert werden kann. In neuester Zeit wurden CFSE-markierte Zellen für diesen Assay bevorzugt, da sie den Vorteil haben, im Durchflusszytometer gemessen werden zu können. CFSE-markierte Zellen werden nach der Kokultur mit NK-Zellen, in Kombination mit Propidiumiodid (PI), einem Marker für Apoptose, gemessen, um so den Anteil der CFSE-positiven Zellen zu bestimmen, die durch NK-Zellen getötet wurden. Beide Assays haben aber einen entscheidenden Nachteil: Sie messen lediglich die getöteten Targets und können nicht identifizieren, welche Klone einer gemischten NK-Zellpopulation aktiv geworden sind. Dieses Problem konnte mit einem Assay gelöst werden, der ursprünglich für T-Zellen entwickelt worden war, aber auch auf NK-Zellen angewendet werden konnte. Bei diesem Assay misst man die Degranulation der Effektorzellen mit Hilfe eines CD107-spezifischen Antikörpers.

CD107 (LAMP-1, *lysosomal-associated membrane protein-1*) ist ein Molekül, das auf der Innenseite der in den NK-Zellen befindlichen Granula lokalisiert ist. Wenn diese Granula bei Aktivierung an die Oberfläche gebracht werden, um Perforin und Granzym B in Richtung Zielzelle zu entlassen, erscheint dieser Marker auf der Zelloberfläche und kann mit einem Antikörper detektiert werden. Erst im aktivierten Stadium, wenn die Granula an die

Oberfläche gelangen, haben die CD107-spezifischen Antikörper die Möglichkeit an CD107 zu binden, im ruhenden Stadium ist es nicht auf der Oberfläche zu detektieren. Dieser Marker wurde zunächst bei der Degranulation von CD8⁺-T-Zellen beobachtet, wird aber auch bei NK-Zellen nach Stimulation mit MHC-defizienten Zielzellen hochreguliert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde CD107 in Kombination mit den vier wichtigsten inhibitorischen Rezeptoren (KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR3DL1 und NKG2A) gemessen, um darstellen zu können, welcher NK-Zellklon beim Aufeinandertreffen mit den Targets aktiviert wird und CD107 mobilisiert. Dies erlaubte eine präzise Bestimmung der zytolytischen NK-Zellen mit spezifischen Rezeptoren für HLA-Klasse I.

Hierbei gilt es zu beachten, dass der CD107-Assay nur dann eine zuverlässige Aussage über die Zytotoxizität zulässt, wenn die zytotoxischen Granula der NK-Zellen mit den entsprechenden Effektormolekülen Granzym und Perforin gefüllt sind. Tatsächlich konnte bei der parallelen Untersuchung von CD107 und CFSE bei unreifen NK-Zellen aus dem Nabelschnurblut oder Patienten mit bestimmtem pathologischen Hintergrund nicht immer eine Korrelation festgestellt werden. Mit dem Hinzunehmen der intrazellulären Marker Perforin und Granzym B stellten wir dann fest, dass die lytischen Granula in diesen Fällen oft nicht beladen waren.

In der Veröffentlichung *„Clonal analysis of NK cell effector functions by multi-parameter flow cytometry“* (Vgl. Kapitel 2.2.2) haben wir ein Protokoll entwickelt, in dem Schritt für Schritt erklärt wird, wie solche funktionale Analysen durchzuführen sind. Dabei präsentieren wir einen durchflusszytometrischen Assay, bei dem die Zelloberflächen-Mobilisierung von CD107 in Kombination mit den intrazellulären Markern Perforin und Granzym B gemessen wird. Diese funktionalen Parameter werden parallel zu drei verschiedenen KIR gemessen, die eine hochauflösende Analyse des NK-Zellrepertoires auf klonaler Ebene ermöglichen.

CHAPTER X

Clonal analysis of NK cell effector functions by multi-parameter flow cytometry

Kathrin Schönberg, Maryam Hejazi, and Markus Uhrberg

Institute for Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics, University Clinic, Heinrich-Heine University Düsseldorf, Germany

Abstract

Natural killer (NK) cells provide a first line of defense against viral infections and prepare the ground for subsequent action of virus-specific T cells in a concerted way. Human NK cells use a sophisticated system of inhibitory and stimulatory receptors of the KIR gene family, which are expressed in a clonally-distributed manner. Several studies suggest that KIR play a critical role in NK cell-mediated protection against HCV and HIV infection. As each NK cell expresses an individual set of KIR receptors that enables them to sense differences in HLA class I expression, classical measurement of NK cell function by analysis of target cell killing does not enable to define and isolate the clinically relevant NK cell effector subsets. Here, we have developed a flow-cytometry-based protocol to measure cytolytic activity together with KIR expression in a clonal level. Combined analysis of KIR expression in conjunction with cell surface mobilization of CD107 enables precise enumeration of cytolytic NK cells with defined specificity for HLA class I. Moreover, via inclusion of intracellular perforin or alternatively granzyme B, NK cells with deficient loading of cytotoxic granula can be identified. The present protocol enables identification and isolation of cytotoxic NK cells on a clonal level and enables reliable measurement in healthy as well as pathological settings such as virus infection and hematological disease.

Key words

NK cells, NK cell function, cytotoxicity, CD107, granzyme B, perforin, flow cytometry

1. Introduction

Natural Killer (NK) cells are lymphocytes that play a vital role in the early immune defense against tumor cells and viral infections. In this regard, it is long known that patients with NK cell deficiencies suffer from recurrent viral infections such as herpes viruses *(1)*. Moreover, genetic and functional evidence is now accumulating that the course of HIV infection is significantly influenced by NK cells on the levels of resistance to infection, protection from maternal-infant transmission, and the delay in disease progression *(2-4)*. Similarly, a protective role of NK cells was suggested in hepatitis C by a study showing linkage between NK cell receptor genes and resolution of infection *(5)*.

In contrast to lymphocytes of the B and T cell lineage, NK do not express an antigen-specific and somatically-rearranged receptor. Instead, NK cells express a variety of MHC class I-specific inhibitory and stimulatory receptors, either encoded by the killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) family in primates and humans or the Ly-49 family in rodents *(6)*. In humans, 12 functional KIR genes are known that can be expressed in a clonally-distributed fashion, i.e. a single NK cell can express all possible combinations of KIR starting from one receptor up to all receptors encoded in the genome of that individual. The system is complemented by the more conserved CD94:NKG2A heterodimer that is specific for HLA-E and is expressed in a clonally-distributed manner as well *(7)*. Restrictions to the repertoire of expressed receptors on each NK cell are set by the HLA class I ligands, which introduce a bias towards expression of cognate inhibitory receptors for self class I

molecules (8, 9). Nonetheless, NK cells lacking receptors for self and NK cells not expressing any HLA class I-specific NK receptors are commonly found in the repertoire of most individuals(10). As these NK cells are potentially autoreactive, mechanisms should be in place to inhibit their inappropriate activation. Indeed, in recent years it was shown that only NK cells expressing an inhibitory receptor for self are fully activated by MHC class I-negative target cells whereas NK cells that lack cognate NK cell receptors are hyporesponsive with regard to cytokine production and target cell killing (10, 11).

The classical method to determine cytotoxicity of NK cells is the Chromium release assay (12). In this assay, a bulk population of NK cells is co-cultivated with ⁵¹Cr labeled target cells. When target cells are killed, chromium is released to the supernatant, which can be analyzed for radioactivity in a gamma counter. In recent years, non-radioactive cytotoxicity assays are becoming more popular. In particular, carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-labeling of target cells in combination with propidium iodide (PI) staining of dead cells is now a reliable alternative to measure target cell killing by flow cytometry (13).

Although the lysis of target cells provides a good estimation of the cytotoxicity of lymphocytes, it does not enable direct identification and enumeration of cytotoxic NK cells. To this end, the recently developed CD107 mobilization assay fills exactly this gap. Originally developed for the identification of cytotoxic T cells (14), it was quickly adapted for measuring cytotoxic NK cells (15). Recent studies have integrated the CD107 assay in multicolor flow cytometric protocols thereby enabling identification and isolation of cytolytic NK cells that express defined NK cell receptors (9).

The CD107a and b molecules, also known as lysosome-associated membrane proteins (LAMP1 and 2) line the inner membrane of lytic granules. In the course of the degranulation

process the granules fuse with the outer cell membrane and the CD107 molecules become accessible to the cell surface. Consequently, whereas resting NK cells are negative for CD107 cell surface expression, activated cytolytic NK cells mobilize CD107 to the cell surface and expression can be measured by flow cytometry. Importantly, CD107 is not a direct marker for killing but a suitable marker for degranulation. Thus, only if the granules are filled with the necessary lytic components, the CD107 assay constitutes a suitable correlate of cytotoxic function. Lytic granules contain granzyme B, a serinprotease, and perforin, a membrane disrupting protein (*16*). Both proteins cooperatively induce cell death by apoptosis in the target cell (*17*). Importantly, NK cells do not always express the same amount of lytic substances: under certain circumstances, for example when analyzing immature NK cells or in certain pathological settings, lytic granules might not be properly loaded with perforin or granzyme B and in these cases the lytic exocytosis will not be effective (data not shown).

Here, a flow cytometry-based protocol is presented, in which cell surface mobilization of CD107 is analyzed in combination with intracellular perforin and granzyme B staining. These functional parameters are measured together with three different inhibitory KIR receptors, which enables a high-resolution analysis of NK cell receptor repertoires on a clonal level. Moreover, clonal analysis of NK cell function is then compared with flow cytometric analysis of target cell killing using a CFSE/PI assay.

2. Materials

2.1. Cell culture

1. K562 cells, HLA-class I-deficient erythroleukemic cell line.
2. 10 ml peripheral blood from patients and healthy controls.
3. Rosette Sep NK cell enrichment cocktail (Stemcell Technologies).
4. PBS/EDTA: PBS, 2mM EDTA.
5. Ficoll separating solution.
6. K562 medium: DMEM, 4.5g/L Glucose, 2mM L-glutamine, 10% (v/v) fetal calf serum (FCS), 100U/mL penicillin, 0.1mg/mL streptomycin.
7. NK medium: RPMI 1640, 25mM HEPES, 2mM L-glutamine, 10% (v/v) FCS, 5% (v/v) human AB-serum, 100 U/mL penicillin, 0.1mg/mL streptomycin, 1000U/mL rh interleukin-2 (IL-2).

2.2. Degranulation assay

1. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) - Prepare a dilution of 50 µg/mL in distilled water.
2. Ionomycine - Prepare a dilution of 10 µg/mL in distilled water.
3. 96well plate (u bottom).
4. NK-Medium: RPMI 1640, 25mM HEPES, 2mM L-glutamine, 10% (v/v) FCS, 5% (v/v) human AB-serum, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, 1000 U/mL rh IL-2.
5. Golgistop containing monensin (BD Biosciences).
6. Monoclonal antibodies against CD107, CD56, CD3, KIR, NKG2A, granzyme B and perforin (see Table 1 for details of specificity, labeling, and clones).
7. Cytofix/Cytoperm Fixation/ Permeabilization Solution Kit (BD Biosciences).

8. PBS/EDTA: PBS, 2mM EDTA.
9. FACSCanto II with FACS Diva Software 6.0.
10. FlowJo Software v8.7.

2.3. CFSE killing Assay

1. Vybrant® CFDA SE Tracer Kit (Invitrogen) - Prepare a dilution of 0.5mM CFDA-SE in DMSO.
2. PBS.
3. PBS/FCS: PBS, 20% (v/v) FCS.
4. PBS/EDTA: PBS, 2mM EDTA.
5. 96well plate (u-bottom).
6. Propidium Iodide Staining Solution (PI).
7. FACSCanto II with FACS Diva Software 6.0.
8. FlowJo Software v8.7.

3. Methods

3.1. Cell isolation and culture conditions

1. K562 cells were cultured in K562 medium at 37 °C and 5 % CO₂.
2. To isolate NK cells from peripheral blood, use the NK cell enrichment cocktail (*see Note 1 and 2*).
3. Add 50 µL of the NK cell enrichment cocktail per mL blood (*see Note 3*) and incubate for 20 min. at room temperature (RT).
4. Dilute the blood 1:1 with PBS and add it slowly to a 50 mL tube, prefilled with 15 mL Ficoll. Centrifuge the sample for 35 min. at 440xg and RT without brake. Carefully harvest the interphase (*see Note 4*).
5. Wash the cells with PBS/EDTA (7 min., 440xg, RT).
6. To isolate mononuclear cells (MNCs) from peripheral blood, add 15 mL Ficoll to a 50 mL tube and slowly add 30 mL of blood, diluted 1:1 with PBS. Centrifuge the sample for 35 min. at 440xg and RT without brake. Carefully harvest the interphase and wash the cells with PBS/EDTA (7 min., 440xg, RT).
7. Primary NK cells or MNC's are cultured overnight in NK medium at a concentration of 0.5-1x10⁶/mL at 37 °C and 5 % CO₂.

3.2. CD107 degranulation assay

1. Count and harvest the required number of NK cells or MNCs. The cells are pre-incubated with IL-2 for at least 16h (*see Note 5*). For the optimal 1:1 ratio, you need at least 1x10⁵ NK cells or 1x10⁶ MNCs. For controls, 0.5-1x10⁵ NK cells or MNCs are sufficient (Table 2).

2. Count and harvest the appropriate number of K562 cells to reach a 1:1 ratio with NK cells during co-cultivation (*see Note 6 and 7*). Although a 1:1 ratio is usually best, it is recommended to perform titration of effector/target ratios when setting up the method for the first time (Table 2).
3. Centrifuge the cells (7 min., 440xg, RT).
4. Prepare a 96-well plate with 5 μ L of CD107 antibody in each well including negative and positive controls.
5. Prepare the positive control: 10 μ L of PMA (final concentration: 2.5 μ g/mL) and 10 μ L of ionomycin (final concentration: 0.5 μ g/mL).
6. Resuspend cell pellets in NK medium at a concentration of 1×10^7 cells/mL.
 - 6.1. Add 10 μ L of K562 (1×10^5) and 10 μ L of NK (1×10^5) cells to the sample well (*see Note 8*).
 - 6.2. Add 10-50 μ L of NK cells (0.5 - 1×10^5) to the negative, positive, and unstained control wells.
 - 6.3. Fill up the wells to 200 μ L with NK-Medium (*see Note 9*).
7. Incubate for a total of 6 hours at 37°C and 5 % CO₂ (*see Note 10*).
8. After 1 hour, add 2 μ L monensin to the wells (*see Note 11*).
9. Harvest the cells in 4 ml round bottom tubes ('FACS tubes').
10. Wash the cells with PBS/EDTA (7 min., 440xg, RT) and resuspend the pellet in 100 μ L PBS/EDTA.
11. Stain the cells with the following monoclonal antibodies (different protocols for staining with NKG2A (11.1) or perforin and granzyme B (11.2):
 - 11.1. CD56, CD3, KIR, and NKG2A-specific mAbs according to Table 1. Put 5 μ L of each antibody (in case of CD56 and CD3, signals are usually strong and 2,5 μ L might also be sufficient) to the cells and mix briefly (*see Note 12*).

- 11.2. CD56, CD3, and KIR-specific mAbs. Put 5 μ L of each antibody (in case of CD56 and CD3, see step 11.1) to the cells and mix briefly.
12. Incubate for 20 min. at 4°C.
13. Wash the cells with PBS/EDTA (7 min., 440xg, RT). For NKG2A-stained samples continue directly with flow cytometrical analysis (step 21). For additional analysis of granzyme B and/or perforin continue with step 14.
14. Start with the intracellular staining protocol using the Cytotfix/Cytoperm kit. Resuspend the cell pellet in 250 μ L Permwash Solution and incubate for 20 min. at 4°C.
15. Prepare Permwash Buffer by diluting 5x Buffer 5:1 with distilled water.
16. Wash 2x with Permwash Buffer and centrifuge the cells (7 min., 440xg, RT). Resuspend in 100 μ L Perwash Buffer.
17. Add 20 μ L of antibody against granzyme B or perforin and mix well.
18. Incubate for 30 min at 4°C.
19. Wash with Permwash Buffer and centrifuge 2x (7 min., 440xg, RT).
20. Wash the cells with PBS/EDTA (7 min., 440xg, RT), resuspend the pellet in 300 μ L PBS.
21. To start flow cytometrical analysis, set a gate on the lymphocyte population in a FSC vs. SSC dot plot (Fig. 1) (*see Note 13, 14*).
22. Create a dot plot of CD56-PC5 vs. CD3-Pacific blue and determine the percentage of NK cells by gating on CD56⁺CD3⁻ lymphocytes. (*see Note 15*).
23. Analyze these NK cells in a CD107 histogram and gate on CD107-positive cells in comparison to the negative control (Fig. 1).
24. Do the same for perforin and/or granzyme B to determine the frequency of NK cells stained for these intracellular markers. Calculate the frequency of the respective marker as percentage of NK cells (*see Note 16 and 17*).

3.3. CFSE killing assay

1. Harvest the required number of K562 cells and wash with PBS (7 min., 440xg, RT). For every well, at least 1×10^5 K562 are required. For the calculation of the required number of cells, see Table 3.
2. Incubate the required number of NK cells (*see* Table 3) overnight in NK medium (at least for 16h, **Note 5**).
3. Centrifuge the NK cells (7 min., 440xg, RT).
4. Resuspend K562 cells in PBS in a concentration of 1×10^7 cells/mL and put 2 μ L of CFDA-SE (0.5 mM) per mL into the tube.
5. Incubate for 10 min. at 37°C, invert 2x during the incubation.
6. Wash K562 cells 2x with PBS/FCS (7 min., 440xg, RT).
7. Resuspend both NK cells and K562 pellets to a final concentration of 1×10^7 cells/mL in NK medium.
8. The following controls have to be prepared (Table 3):
 - 8.1. 10-50 μ L unlabelled K562 ($0.1-0.5 \times 10^6$).
 - 8.2. 10-50 μ L CFSE-labeled K562 cells as control for the CFSE staining ($0.1-0.5 \times 10^6$).
 - 8.3. 10-50 μ L CFSE-labeled K562 as a negative control ($0.1-0.5 \times 10^6$) (*see* **Note 18**).
9. Add 100 μ L NK cells (1×10^6) and 10 μ L K562 (1×10^5) in one well for an optimal E:T ratio of 10:1 (*see* **Note 19**).
10. Add NK medium to all wells to a final volume of 200 μ L.
11. Incubate the 96-well plate for 6 hours at 37 °C and 5 % CO₂.
12. Harvest the wells in 4 mL round bottom tubes ('FACS tubes') for flow cytometry.
13. Wash the cells with PBS/EDTA (7 min., 440xg, RT) and resuspend the pellet in 300 μ L PBS.
14. Stain the cells with PI shortly before analysis (except unstained and CFSE controls).
15. Start flow cytometrical analysis and create FSC vs. SSC dot plot (*see* **Note 20 and 21**).

16. Determine the CFSE-positive cells in a histogram by setting a gate (*see Note 22*).
17. Show the CFSE-positive cells in a new dot plot.
18. Determine the frequency of CFSE⁺PI⁺ cells as percentage of CFSE-positive K562 in a dot plot or histogram.
19. Calculate the number of killed target cells (Fig. 2) (*see Note 23*).

4. Notes

1. Flow cytometrical analysis of enriched NK cells is in some cases superior to direct analysis of MNCs due to higher and more discriminative signals for CD107, granzyme B, and perforin. Nonetheless, analysis can also be done directly from MNCs.
2. Depending on the blood source and frequency of lymphocytes one usually obtains 5 to 10x10⁶ NK cells from 10 mL blood.
3. It is possible to use less kit, i.e. up to 1/3 of the recommended volume. In this case the purity of NK cells will go down to about 70 % but the recovery rate will considerably increase.
4. Sometimes it is difficult to locate the cells in the interphase. It is then advisable to remove some of the Serum or Ficoll along with the enriched cells in order to ensure their complete recovery.
5. Stimulation with IL-2 is recommended for the CD107 assay as well as the CFSE killing assay to increase the frequency of responding NK cells in order to ensure reliable statistical analysis.
6. We have observed that K562 is very well suited for CD107 analysis, whereas 721.221 gave the best results for stimulation of IFN- γ production.
7. Typically, a 1:1 effector/target ratio is optimal for K562, but may have to be adjusted for other target cells.
8. Whenever possible, increase the number of analyzed cells. A high number of recorded NK cells leads to a better identification of small populations.
9. Optimal volume in each well is 200 μ L medium but smaller medium volumes might be used if the number of cells is limited.
10. Shorter incubation periods (4h) lead to weaker CD107 signal, longer incubation periods (12-16h) are possible but do not necessarily increase CD107 signal or frequency.

11. Addition of monensin is recommended to avoid internalization of CD107. Of note, in pilot experiments without monensin CD107 signals were somewhat weaker but could still be evaluated.
12. Inclusion of KIR antibodies into the flow cytometry panel enables functional analysis of NK cells at the clonal level. Calculate percentage of desired KIR-positive NK cells that have mobilized CD107.
13. Lymphocytes are small in comparison to K562. Additionally, intracellular staining leads to even smaller cell volumes. Carefully adjust FSC and SSC channels to enable exact enumeration of lymphocytes.
14. Depending on the number of killed K562, many dead cells will be present in FSC and SSC dotplots. Be sure to exclude the dead cells when gating on lymphocytes.
15. Compensation between the strong signals of PE-Cy5 and ECD is critical. Generally, do not use CD56 and CD3 in fluorochromes that are analyzed in neighbouring channels.
16. To calculate the frequency of degranulated NK cells, subtract the percentage of CD107⁺ NK cells present in the negative control from the percentage of CD107⁺ NK cells present in co-culture with K562.
17. Not only the frequency but also the mean fluorescence intensity (MFI), i.e. the expression levels per cell, of perforin, granzyme B, and CD107 can vary between samples and should be analyzed when evaluating effector function of NK cells.
18. A CFSE-labeled negative control is necessary to determine the number of K562, which lyse spontaneously.
19. A typical suitable effector/target ratio for CFSE with K562 is 10:1, but has to be adjusted for every given cell line separately. For every new set up, prepare a killing curve with different E:T ratios (i.e. 10:1, 5:1, 1:1, 1:5 and 1:10) and determine the optimal ratio with the best killing efficiency and discriminative power in flow cytometry.
20. In a CFSE/PI assay also the dead target cells have to be measured. Take care to keep the FSC threshold low, otherwise dead cells might be excluded from analysis.
21. PI is measured best in ECD or PE-Cy5 channel. Care has to be taken to enable good compensation between the strong signals of CFSE and PI.
22. The CFSE signal can be very strong. In this case, adjust the voltage of the CFSE channel accordingly.
23. To calculate the frequency of lysed target cells, subtract the percentage of spontaneous lysis of K562 from the percentage of K562 in co-culture with NK cells.

5. Literature

1. Orange JS. Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes Infect* 2002;4:1545-58.
2. Tiemessen CT, Shalekoff S, Meddows-Taylor S, et al. Cutting Edge: Unusual NK cell responses to HIV-1 peptides are associated with protection against maternal-infant transmission of HIV-1. *J Immunol* 2009;182:5914-8.
3. Martin MP, Gao X, Lee JH, et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 2002;31:429-34.
4. Jennes W, Verheyden S, Demanet C, et al. Cutting edge: resistance to HIV-1 infection among African female sex workers is associated with inhibitory KIR in the absence of their HLA ligands. *J Immunol* 2006;177:6588-92.
5. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004;305:872-4.
6. Trowsdale J, Barten R, Haude A, Stewart CA, Beck S, Wilson MJ. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunol Rev* 2001;181:20-38.
7. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 1997;7:739-51.
8. Schonberg K, Srihar M, Enczmann J, Fischer JC, Uhrberg M. Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood*.
9. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med* 2006;203:633-45.
10. Anfossi N, Andre P, Guia S, et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 2006;25:331-42.
11. Yokoyama WM, Kim S. Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol Rev* 2006;214:143-54.
12. Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC, Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 1968;14:181-96.
13. Jedema I, van der Werff NM, Barge RM, Willemze R, Falkenburg JH. New CFSE-based assay to determine susceptibility to lysis by cytotoxic T cells of leukemic precursor cells within a heterogeneous target cell population. *Blood* 2004;103:2677-82.
14. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 2003;281:65-78.
15. Penack O, Gentilini C, Fischer L, et al. CD56^{dim}CD16^{neg} cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets. *Leukemia* 2005;this issue.
16. Peters PJ, Borst J, Oorschot V, et al. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med* 1991;173:1099-109.
17. Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003;3:361-70.

6. Figure legends

Fig. 1. Analysis of CD107 mobilization and intracellular expression of perforin and granzyme B in neonatal and adult NK cells. Mononuclear cells (MNCs) from umbilical cord blood and adult peripheral blood were each co-cultured with K562 target cells for 6h and subsequently surface-stained with mAbs against CD56, CD3, KIR, and CD107. Surface staining was followed by intracellular staining for either granzyme B or perforin. (A) For flow cytometrical analyses, lymphocytes are displayed in a FSC vs. SSC dot plot, as shown here for an MNC sample. (B) NK cells were defined as CD56⁺CD3⁻ fraction of lymphocytes and analysis is restricted to NK cells as shown here for an MNC sample. The results of the CD107, granzyme B, and perforin analysis are presented as histogram overlays (blue graphs) together with the respective negative control samples (red graphs) from a healthy adult (C) and a neonatal sample (D). Maximum cell counts are set to 100%. The frequency of NK cells expressing CD107 after degranulation is comparable in both samples (left panel). Notably, the percentage of cells expressing granzyme B (middle panel) and perforin (right panel) among NK cell differs substantially. In the adult sample (upper panel), most NK cells contain granzyme B and perforin, whereas in the neonatal sample (lower panel) only a minority of cells contain both effector molecules.

Fig. 2: Analysis of NK cell function with the CFSE/PI assay. Mononuclear cells from the same donors shown in Fig. 1 were co-cultured with CFSE-labeled K562 for 6h in a 10:1 ratio and after co-culture stained with PI. Double-positive cells (CFSE⁺PI⁺, light grey bars) were compared to a negative control (CFSE-labeled K562 without effector cells, dark grey bars). Consistent with the results shown in Fig. 1 for granzyme B and perforin, the adult sample showed a substantially higher killing frequency compared to the neonatal sample.

Table 1: Antibody staining panel for CD107 assay.

Antibody¹	Clone	Conjugate²	Company	Excitation/ Emission (nm)
CD107	H4A3	FITC	BD Biosciences	488/518
NKG2A or Perforin or Granzyme B	Z199 δG9 GB11	PE	Beckman Coulter BD Biosciences BD Biosciences	488/575
KIR3DL1	Z27.3.7	ECD	Beckman Coulter (custom conjugate)	488/620
CD56	N901	PE-Cy5	BD Biosciences	488/670
KIR2DL1/S1	EB6	APC	Beckman Coulter	633/660
KIR2DL2/3/S2	GL183	APC-Cy7	Beckman Coulter (custom conjugate)	633/775
CD3	UCHT1	Pacific Blue	Beckmann Coulter	405/455

¹ Instead of surface staining for NKG2A, intracellular staining for either granzyme B or perforin can be performed.

²FITC=Fluorescein isothiocyanate); PE=R-Phycoerythrin; ECD=PE-Texas Red; APC=Allophycocyanin; Cy5= Cyanine Dye 5, Cy7= Cyanine Dye 7.

Table 2. CD107 degranulation assay: exemplified sample set up

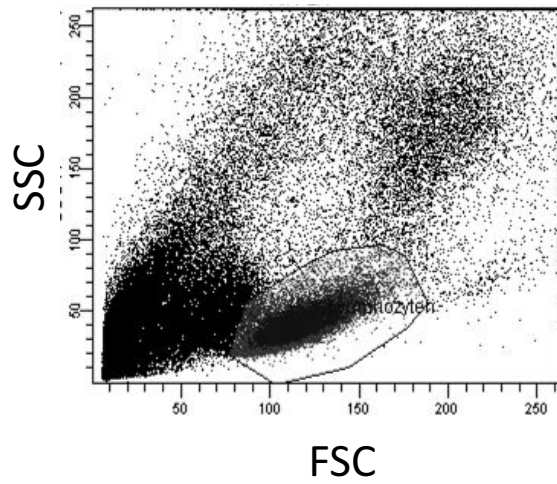
Sample	NK cells¹	K562	PMA/Ionomycin	CD107-antibody
Unstained control	0.5-1x10 ⁵	-	-	
Negative control	0.5-1x10 ⁵	-	-	+
Positive control	0.5-1x10 ⁵	-	+	+
10:1	1x10 ⁶	1x10 ⁵	-	+
5:1	5x10 ⁵	1x10 ⁵	-	+
1:1	1x10 ⁵	1x10 ⁵	-	+
1:5	1x10 ⁵	5x10 ⁵	-	+
1:10	1x10 ⁵	1x10 ⁶	-	+

¹Calculate a 10x higher cell number when using MNCs instead of NK cells

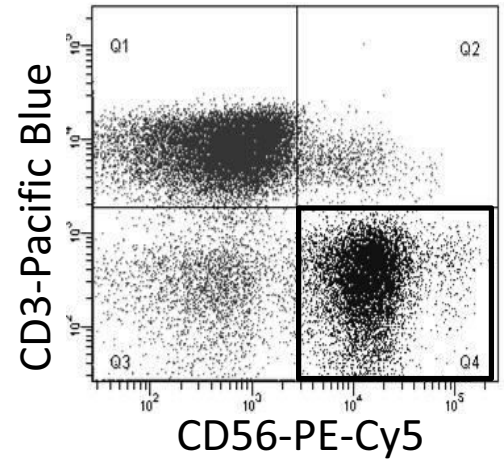
Table 3. CFSE assay: exemplified sample set up

Sample	NK cells	K562	PI
Unlabelled control	-	$0.5-1 \times 10^5$	-
CFSE-labelled control	-	$0.5-1 \times 10^5$	-
CFSE-labelled negative control	-	$0.5-1 \times 10^5$	+
10:1	1×10^6	1×10^5	+
5:1	5×10^5	1×10^5	+
1:1	1×10^5	1×10^5	+
1:5	1×10^5	5×10^5	+
1:10	1×10^5	1×10^6	+

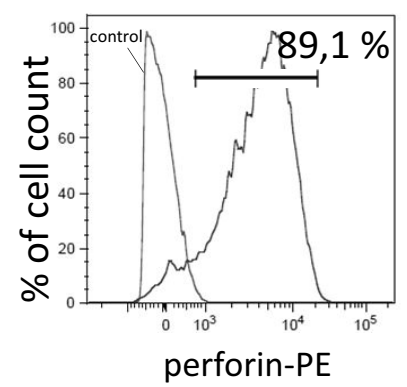
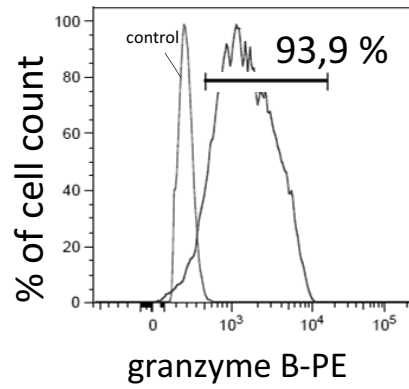
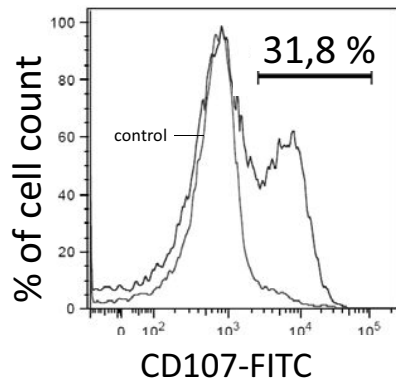
A



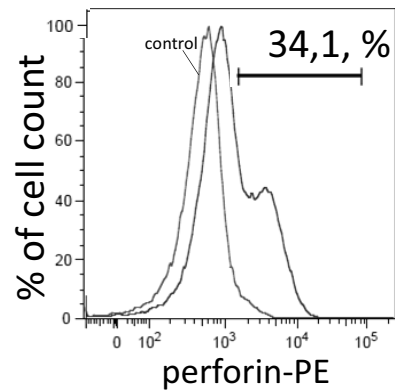
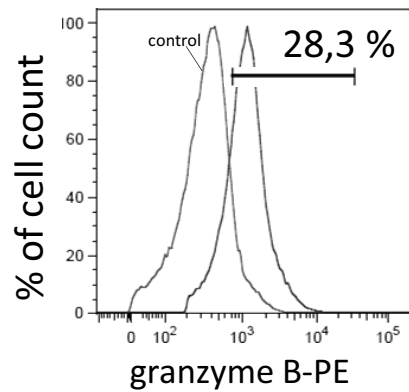
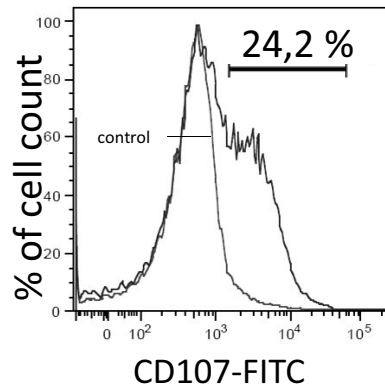
B



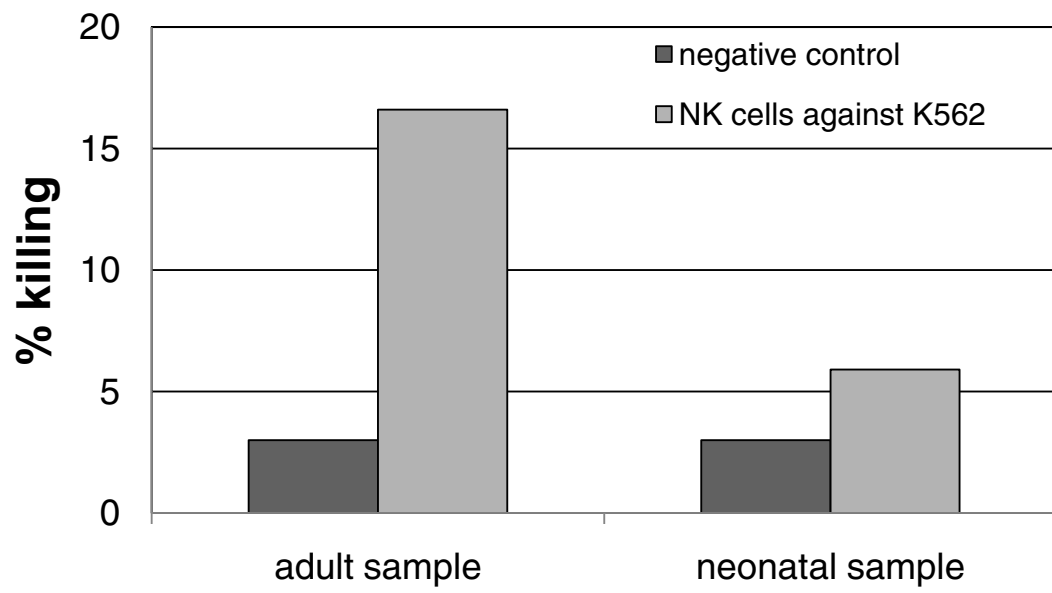
C



D



CFSE



2.3 Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group *A* and *B* haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition

Status: publiziert

Blood, Impact Factor: 10,555

Eigener Anteil an der Publikation:

- Planung und Durchführung der Experimente
- Schreiben des Manuskriptes (mit Markus Uhrberg)

2.3.1 Zusammenfassung

Wie bereits in der Einleitung dargelegt, exprimieren NK-Zellen HLA-Klasse I spezifische Rezeptoren (Vgl. Kapitel 1.4.3.2). Durch klonale Expression, *KIR*- und *HLA*-Genetik ergibt sich für jeden Menschen ein spenderspezifisches Repertoire. Über die Frage, wie sich dieses Repertoire im Menschen formiert, herrschte lange Unklarheit, bis 2006 veröffentlicht wurde, dass in Japanern, einer Bevölkerungsgruppe mit geringer genetischer Variation der *KIR*-Gene, eine strukturelle Adaption des Repertoires an HLA stattfindet (Vgl. Kapitel 1.4.4.3).

Um der Fragestellung nachzugehen, von welchen Faktoren das KIR-Repertoire von NK-Zellen beeinflusst wird und dies sowohl für Gruppe A als auch Gruppe B KIR-Haplotypen eingehend zu beleuchten, wurde eine vergleichende Analyse mit 150 Spendern durchgeführt. Dazu wurden alle Spender für ihre *KIR*- und *HLA-C*-Gene typisiert sowie eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt, in der mithilfe der Durchflusszytometrie alle inhibitorischen HLA-spezifischen Rezeptoren gemessen werden konnten. Anschließend wurden die Proben anhand der durchgeführten Typisierungen in Gruppe A und B Haplotypen sowie in ihre *HLA-C* Subgruppen unterteilt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten drei bestimmende Faktoren identifiziert werden, die die Struktur und auch die Funktion des KIR-Repertoires auf NK-Zellen beeinflussen, um ein Repertoire zu erschaffen, das darauf ausgerichtet ist, spezifisch Selbst-HLA-Klasse I zu erkennen. Diese drei Faktoren sind:

1. Passender HLA-Klasse I-Ligand

In Spendern mit Gruppe A Haplotyp konnte eine starke Adaption der Frequenzen des passenden KIR an HLA festgestellt werden. So stieg die Frequenz von KIR2DL1 exprimierenden Zellen, insbesondere die Frequenz der Zellen, die nur KIR2DL1 auf der Oberfläche trugen, in Spendern mit HLA-C2 signifikant an, während umgekehrt die Frequenz der Zellen die KIR2DL3 tragen, in Spendern mit HLA-C1 höher war als in Spendern mit HLA-C2. Sehr aussagekräftig war in diesem Zusammenhang auch das Verhältnis der KIR2DL1⁺- und KIR2DL3⁺-Zellen zueinander. Während in HLA-C1 immer mehr KIR2DL3 als KIR2DL1 Zellen vorhanden sind, dreht sich dieses Verhältnis komplett

ins Gegenteil wenn man sich HLA-C2 Spender ansieht, hier sieht man mehr KIR2DL1 als KIR2DL3-positive Zellen.

2. KIR-Haplotyp-Diversität

Wir konnten weiterhin zeigen, dass sich die Regeln für Gruppe A nicht einfach auf Gruppe B Haplotypen übertragen lassen. Der KIR-Haplotyp scheint ebenfalls eine Rolle bei der Anpassung des Repertoires zu spielen, denn die beobachtete Expansion der KIR2DL1⁺-Zellen in Spendern mit HLA-C2, die in Gruppe A Haplotypen so deutlich war, war in Gruppe B Haplotypen nicht zu sehen. Bei der genauen Betrachtung der verschiedenen *KIR*-Genotypen mit Gruppe B Haplotypen konnten wir *KIR2DL2/KIR2DS2* als die Faktoren identifizieren, die einen unerwarteten und starken Einfluss auf die Expression von KIR2DL1 ausüben. In Gruppe B Haplotypen ohne *KIR2DL2/S2* konnte nämlich erneut der Einfluss der Liganden auf die Frequenz der passenden Rezeptoren beobachtet werden. Dieser dominant repressive Einfluss beschränkt sich nicht nur auf die strukturelle Adaption, sondern betrifft auch die Funktion. So sind die KIR2DL1⁺ Zellen in Spendern mit *KIR2DL2* weniger funktional als die gleichen Zellen in Spendern ohne *KIR2DL2*. Ein Grund hierfür mag sein, dass KIR2DL2 anders als KIR2DL3, wie von uns erneut nachgewiesen werden konnte, sowohl HLA-C1 als auch HLA-C2 erkennt.

3. Sequentielle Rezeptorexpression während der NK-Zellentwicklung

Doch warum inhibiert *KIR2DL2* die Expression von KIR2DL1, wenn das Repertoire rein stochastisch exprimiert wird? Die Antwort liegt in der NK-Zellentwicklung. Sowohl in *in vitro* Assays unserer Arbeitsgruppe als auch nach Stammzelltransplantationen konnte gezeigt werden, dass KIR2DL2 und KIR2DL3 wesentlich früher exprimiert werden als KIR2DL1, es scheint ein festgelegtes Programm für die sequentielle Expression der KIR zu geben (Vgl. Kapitel 1.6.2).

Insgesamt muss festgestellt werden, dass sich die Regeln für Spender mit HLA-C1 und HLA-C2 unterscheiden. Durch die sequentielle Expression wird KIR2DL3 sehr früh während der NK-Zellentwicklung exprimiert. In Spendern mit HLA-C1 ist das sehr vorteilhaft und das Repertoire ist bereit richtig ausgerichtet. In Spendern mit HLA-C2 muss es daher eine wesentlich stärkere Anpassung, geben, da KIR2DL2 erst spät exprimiert wird. Somit ist es

nicht verwunderlich, dass die Signifikanz der Anpassung in HLA-C2 Spendern für KIR2DL1 wesentlich stärker ist, als für KIR2DL3 in HLA-C1.

Letztendlich spricht vieles für ein *Ligand-instructed* Modell der Rezeptorakquisition, bei dem ein ursprünglich stochastisches KIR-Repertoire durch passende HLA-Klasse I-Liganden modifiziert wird, abhängig vom genetischen Hintergrund des KIR-Polymorphismus. Das Programm der sequentiellen Expression wird solange ausgeführt bis ein passender KIR für Selbst auf der Oberfläche der NK-Zelle erscheint.

Analyses of HLA-C–specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition

Kathrin Schönberg,¹ Martina Sribar,¹ Jürgen Enczmann,¹ Johannes C. Fischer,¹ and Markus Uhrberg¹

¹Institute for Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics, University of Düsseldorf Medical School, Düsseldorf, Germany

To determine the influence of *KIR* and *HLA* class I polymorphism on human NK cell repertoires, 32 different clonotypes representing all possible combinations of 4 inhibitory KIR and NKG2A were analyzed by multicolor flow cytometry. In donors homozygous for the common group A *KIR* haplotype, a significant influence of HLA-C ligands was seen: KIR repertoires were dominated by clonotypes expressing a single KIR for the respective cognate ligand, either the C1-specific KIR2DL3 or

C2-specific KIR2DL1. In contrast, in donors possessing the polymorphic group B haplotypes, a similar adaptation to cognate HLA-C was lacking. We suggest that this discrepancy is largely the result of a suppressive effect of the group B-specific KIR2DL2 on the frequency of KIR2DL1⁺ NK cells. In functional assays, KIR2DL2 not only recognized C1 but also C2 ligands, showing overlapping specificity with KIR2DL1. Moreover, using an NK cell differentiation assay we show sequential acquisition of KIR2DL2 before KIR2DL1 on developing NK cells. Together, these observations are compatible with a ligand-instructed model of NK cell education, in which recognition of HLA class I by an inhibitory receptor (KIR2DL2) suppresses subsequent expression of a second receptor (KIR2DL1) of related specificity. Importantly, the ligand-instructed model fits to the observed KIR repertoires in both broad KIR haplotype groups. (*Blood*. 2011;117(1):98-107)

tion of KIR2DL2 before KIR2DL1 on developing NK cells. Together, these observations are compatible with a ligand-instructed model of NK cell education, in which recognition of HLA class I by an inhibitory receptor (KIR2DL2) suppresses subsequent expression of a second receptor (KIR2DL1) of related specificity. Importantly, the ligand-instructed model fits to the observed KIR repertoires in both broad KIR haplotype groups. (*Blood*. 2011;117(1):98-107)

Introduction

A hallmark of natural killer (NK) cells is the expression of major histocompatibility complex (MHC) class I–specific inhibitory receptors, either encoded by the Ly-49 family in rodents¹ or the killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) family in humans.² According to the missing self-model, lack of MHC class I expression leads to elimination of target cells by NK cells expressing a cognate inhibitory receptor for the respective MHC class I molecule.³ The concept implicates an educational system that shapes the repertoire of inhibitory receptors to ensure NK cell self-tolerance. In this regard, it was shown that expression of MHC class I leads to specific adjustment of NK cell frequency expressing cognate Ly-49 in the mouse.^{4,5}

In human subjects, analysis of NK cell clones demonstrated that functional NK cell repertoires have a high propensity to express at least 1 inhibitory receptor for self-MHC class I.⁶ However, the influence of the polymorphic human histocompatibility leukocyte antigen (HLA) class I genes on NK cell education is not obvious: firstly, NK cells express inhibitory KIR in the absence of cognate HLA class I ligands at a considerable frequency; secondly, self-tolerant NK cells without any HLA class I–specific inhibitory receptor exist in the periphery.⁷ Moreover, several studies failed to correlate the frequency of any particular KIR to the presence of cognate HLA class I ligands.^{8,9} Clear evidence for a direct influence of HLA class I on the KIR repertoire of NK cells came from studies of a Japanese cohort, characterized by very limited *KIR* gene polymorphism.¹⁰ The influence of HLA class I was again challenged by a recent study in which KIR expression frequencies were found to be independent of class I ligands.¹¹

The influence of MHC class I ligands on NK cell function is another actual matter of debate. In this regard, it was shown in mice

and humans that those NK cells that express inhibitory receptors for host-encoded MHC class I ligands exhibit an increased responsiveness against MHC-deficient target cells.^{7,12,13} The model implicates that NK cells lacking inhibitory receptors for self-MHC class I are hyporesponsive or anergic. However, it was recently shown that these so-called ‘unlicensed’ NK cells are readily able to control viral infection.¹⁴

Human NK cell repertoires are also influenced by the extensive polymorphism of *KIR* genes.¹⁵ *KIR* genes are organized in different haplotypes: an abundant group of haplotypes that generally consist of a defined set of 7 functional *KIR* genes was designated group A haplotypes. Group B haplotypes are more variable and are characterized by presence/absence polymorphisms of 5 additional different stimulatory *KIR* and the inhibitory *KIR2DL5*.^{16,17} Because of the higher complexity of group B haplotypes, detailed information on KIR repertoire formation is so far mostly restricted to donors of the A/A haplotype group as these can be unambiguously monitored by multicolor flow cytometry.¹⁰ However, in many ethnic groups, except East Asian populations, group A/B or B/B configurations dominate, and it is so far not known if the rules found in cohorts with A/A haplotypes do similarly apply to other populations and ethnic groups with much higher frequencies of group B haplotypes.

Although the rules governing the formation of NK cell repertoires are a matter of debate, it is already evident that the underlying *KIR* and KIR ligand genetic polymorphisms are of predictive value in different clinical settings such as chronic hepatitis C infection,¹⁸ control of HIV infection,¹⁹ resistance to cervical neoplasia,²⁰ and hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) for leukemia.^{21,22} Moreover, during pregnancy, certain

Submitted March 23, 2010; accepted September 29, 2010. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, October 8, 2010; DOI 10.1182/blood-2010-03-273656.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked “advertisement” in accordance with 18 USC section 1734.

© 2011 by The American Society of Hematology

combinations of maternal *KIR* genes and fetal *KIR* ligands are associated with pre-eclampsia, a condition characterized by a placental defect that is hazardous for mother and baby.²³

In an attempt to shed light on the formation of *KIR* repertoires across the full range of *KIR* haplotype diversity, a comparative analysis of donors with group *A* and group *B* haplotypes was performed in a genetically diverse cohort of white subjects. We demonstrate that the rules applying to formation of HLA-C–specific *KIR* repertoires found in group *A* haplotypes cannot simply be conferred to group *B* haplotypes. Some of the most evident functional and structural differences could be linked to presence of *KIR2DL2* and *KIR2DS2* on group *B* haplotypes, which has an unexpected and strong epistatic influence on the expression of *KIR2DL1*. The observations are compatible with a ligand-instructed model of receptor acquisition in which initially stochastic *KIR* repertoires are modified by cognate HLA class I ligands in ways that depend on the genetic background of *KIR* gene polymorphism.

Methods

KIR and HLA-C genotyping

Blood was obtained from healthy white donors after giving informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The study was approved by the University of Düsseldorf ethics committee. Genomic DNA was isolated from whole blood via QiaAmp DNA Blood Mini kit (QIAGEN). *KIR* genotyping was performed by polymerase chain reaction–sequence specific primer (PCR-SSP) as reported previously.²⁴ As quality control, several samples were independently *KIR*-genotyped with a different PCR-SSP protocol.²⁵ Group *A* and *B* haplotypes were defined as previously described leading to the following genotype classification: genotype *A/A*: *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR2DS4*; genotype *A/B*: all group *A* genes plus at least 1 additional *KIR* gene; genotype *B/B*: at least 1 group *A* gene missing. Notably, some of the donors with genotype *A/B* might in fact be *B/B* donors that coincidentally possess all group *A* genes on a group *B* background.

HLA-C group 1 (C1) and HLA-C group 2 (C2) genotyping was performed by PCR-SSP as described.⁹ HLA-C subtyping was performed using Luminex technology according to the manufacturers instructions (One Lambda).

Flow cytometry

For flow cytometric analyses, the following mouse anti-human monoclonal antibodies (mAbs) were used: PC5-conjugated CD56 (clone N901), phycoerythrin (PE)-conjugated CD159a (NKG2A, clone Z199), allophycocyanin (APC)-conjugated CD158a,h (KIR2DL1/S1, clone EB6), ECD-conjugated CD3 (clone UCHT1), PE- or ECD-conjugated CD158e (KIR3DL1/S1, clone Z27.3.7), PE- or APC-cyanin 7- (Cy7) or APC-Alexa Fluor 750-conjugated CD158b,j (KIR2DL2/3/S2, clone GL183) all from Beckman Coulter. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated KIR2DL1 (clone 143211; R&D Systems), and Pacific Blue-conjugated CD3 (clone UCHT1; BD Biosciences) were also used. The CD158k-specific mAb Q66 (KIR3DL2), kindly provided by A. Moretta (Università di Genova, Genova, Italy), was used in combination with anti-mouse immunoglobulin M-FITC (Beckman Coulter). A 7-color flow cytometric analyses was performed on FACSCanto II (BD Biosciences) using FACS-Diva 5.0.1 software.

Cell isolation and cell culture

NK cells were isolated from fresh peripheral blood using the RosetteSep method (NK cell enrichment kit; StemCell Technologies). The HLA class I-deficient target cell line K562 and 721.221 as well as the transfected 721.221 (Cw04, Cw07) were cultured in RPMI 1640 (Lonza) with

1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) and 10% FCS (Biocrom). Cell line 721.221 and the HLA class I-transfected sublines were kindly provided by Salim Khakoo (Imperial College London, London, United Kingdom).

Interferon- γ production and degranulation assay

Freshly isolated NK cells were cultured overnight in the presence of 1000 U/mL recombinant interleukin-2 (Chiron). The following day, NK cells were cocultured with HLA class I-deficient K562 or 721.221 cells or with HLA-C-transfected 721.221 at a 1:1 ratio. Negative controls were performed with NK cells alone. In the positive control, phorbol myristate acetate and ionomycin (both Sigma-Aldrich) were added to NK cell cultures. To measure degranulation, CD107a-FITC (clone H4A3; BD Biosciences) was added. After 1 hour of incubation, monensin (GolgiStop; BD Biosciences) or alternatively brefeldin A (Sigma-Aldrich) was added. The cells were incubated for another 5 hours. The cells were washed and stained with antibodies against CD56, KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR3DL1, and NKG2A. For the interferon- γ (IFN- γ) assay, cells were fixed and permeabilized with Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences) and intracellular IFN- γ production was measured using anti-IFN- γ FITC mAb (clone B27; Invitrogen). HLA class I-mediated inhibition of NK cells was assessed by comparison of transfected versus untransfected 721.221 target cells.

Differentiation of NK cells from hematopoietic progenitors

Human CD34⁺CD38[−]Lin[−] hematopoietic progenitor cells were enriched from cord blood using the CD34 Progenitor Cell Isolation kit (Miltenyi Biotec) and subsequent flow cytometric cell sorting. CD34⁺CD38[−]Lin[−] cells were plated in 24-well plates in direct contact with irradiated AFT024 stromal cells and differentiated into mature NK cells as described.²⁶ *KIR* expression was analyzed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and real-time polymerase chain reaction (PCR) as described.^{16,22,27}

Statistics

Statistical analyses were performed with SPSS 15 software. Significance was determined with ANOVA or 2-tailed *t* test. Values for *P* less than .05 were significant.

Results

Differential influence of cognate HLA-C ligands on *KIR* repertoires in donors with group *A* and *B* haplotypes

Repertoires of HLA class I-specific inhibitory receptors were determined in CD56⁺ NK cells in a cohort of 150 white donors (Table 1) by multicolor flow cytometry, simultaneously using antibodies with specificity for all 4 HLA class I-specific inhibitory *KIR* (including cross-reactive stimulatory *KIR*), namely KIR2DL1/KIR2DS1 (C2 group), KIR2DL2/KIR2DL3/KIR2DS2 (C1 group), KIR3DL1/KIR3DS1 (Bw4), and KIR3DL2 (HLA-A3/A11), as well as the HLA-E-specific NKG2A. To simplify designation of the 32 different receptor combinations (clonotypes) that can be distinguished by this approach, an abbreviated nomenclature is used omitting cross-reactive stimulatory *KIR*, such as clonotype KIR2DL1_2DL2/3 refers to a combination of the antibody specificities KIR2DL1/KIR2DS1 and KIR2DL2/KIR2DL3/KIR2DS2. In concordance with previous studies,^{11,28} major deviations from the product rule were noted (supplemental Figure 1, available on the Blood Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). Firstly, NKG2A in combination with 1 or more *KIR* was less frequently observed than expected (*P* < .05 in 9 of 15 possible combinations) and clonotypes with 2 or more *KIR* in the absence of NKG2A were more frequently observed (*P* < .05 in 7 of 11 possible combinations).

Table 1. Distribution of KIR genotypes in the cohort*

Haplotype	Genotype	KIR Group													Repertoire analysis	
		2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	3DL1	3DL2	3DL3	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5		3DS1
AA	1	■		■	■		■	■	■				■			68
AB	2	■	■	■	■		■	■	■		■		■			23
AB	3	■	■	■	■	■	■	■	■		■	■	■			4
AB	4	■		■	■	■	■	■	■	■			■	■	■	6
BB	5	■	■		■	■	■	■	■		■	■	■			2
AB	7	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■	■		■	10
AB	8	■	■	■	■	■	■	■	■		■		■			2
BB	9	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1
BB	10		■		■		■	■	■		■		■			3
AB	11	■		■	■	■	■	■	■	■		■	■		■	1
AB	12	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■	■	■	6
AB	13	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■		■	1
AB	14	■		■	■	■	■	■	■	■			■		■	7
AB	15	■	■	■	■		■	■	■				■			1
AB	16		■	■	■		■	■	■		■		■			1
BB	17	■	■		■	■	■	■	■	■	■		■	■	■	1
BB	18	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■		■	1
AB	19	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			1
AB	22	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■			3
BB	23		■		■	■	■	■	■	■	■		■	■	■	1
BB	25	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■		■	■	1
BB	28	■	■		■	■	■	■	■		■		■			1
BB	30	■	■	■	■	■		■	■	■	■	■		■	■	2
BB	35	■	■	■	■	■		■	■	■	■	■			■	1
BB	42	■		■	■	■		■	■	■	■			■	■	1
BB	44	■		■	■	■		■	■	■				■	■	1
Total																150

*Nomenclature of KIR genotypes according to Uhrberg et al²⁴ except genotype 42 and 44, which represent novel genotypes. Presence of a KIR gene is represented by a shaded box.

We next subdivided the cohort on the basis of *KIR* haplotype groups and HLA-C ligands (Table 2). In the *A/A* haplotype subgroup (Figure 1A), the repertoires of C1 and C2 donors were largely similar except for 3 clonotypes: firstly, a pronounced increase of single-positive KIR2DL1 (single-KIR2DL1⁺) NK cells was observed in presence of cognate C2/C2 ligands; secondly, single-KIR2DL3⁺ cells were more prevalent in donors with cognate C1/C1 ligands; in both cases the respective self-specific clonotype represented the most frequent KIR-expressing clonotype in that cohort; thirdly, the KIR2DL1_2DL2/3 clonotype was more abundant in C2 donors. In contrast, no such increase of single-KIR⁺ clonotypes for cognate HLA-C ligands was seen in the *B/B* haplotype subgroup (Figure 1B). A minor increase in presence of cognate C2 was seen for 3 clonotypes involving KIR2DL1 (KIR2DL1_3DL2, KIR2DL1_NKG2A, and KIR2DL1_2DL2/3_NKG2A). It should be mentioned that in group *B* donors, it was not possible to differentiate between KIR2DL2, KIR2DL3, and KIR2DS2 because of cross-reactivity of the GL183 antibody.

Separate analysis for the 3 subgroups of HLA-C ligands revealed that in donors homozygous for group *A* haplotypes (*A/A*), the overall frequency of NK cells expressing KIR2DL1 (sum

of all 16 clonotypes expressing KIR2DL1) as well as single-KIR2DL1⁺ NK cells increased in presence of cognate ligands in a gene dose-dependent way (Figure 2A). A similar, but less pronounced increase in response to cognate ligand was seen for the frequency of KIR2DL3-expressing NK cells. Remarkably, in group *A/A* donors the ratio of single-KIR2DL1⁺/single-KIR2DL3⁺ frequencies is reversed from 0.6 in C1/C1 donors to 4.3 in the presence of cognate C2/C2 ligands (Table 3). Increased NK cell frequency went along with decreased cell surface expression levels for KIR2DL1 but not KIR2DL3 (supplemental Figure 2), as previously described.¹⁰ In contrast to the group *A* haplotype cohort, no significant changes in this ratio and no bias of KIR2DL1 expression toward cognate ligands were seen for group *B* haplotypes (*A/B* and *B/B*; Table 3 and Figure 2B).

The KIR2DL2/3 allelic pair affects frequency and function of the KIR2DL1⁺ NK cell subpopulation

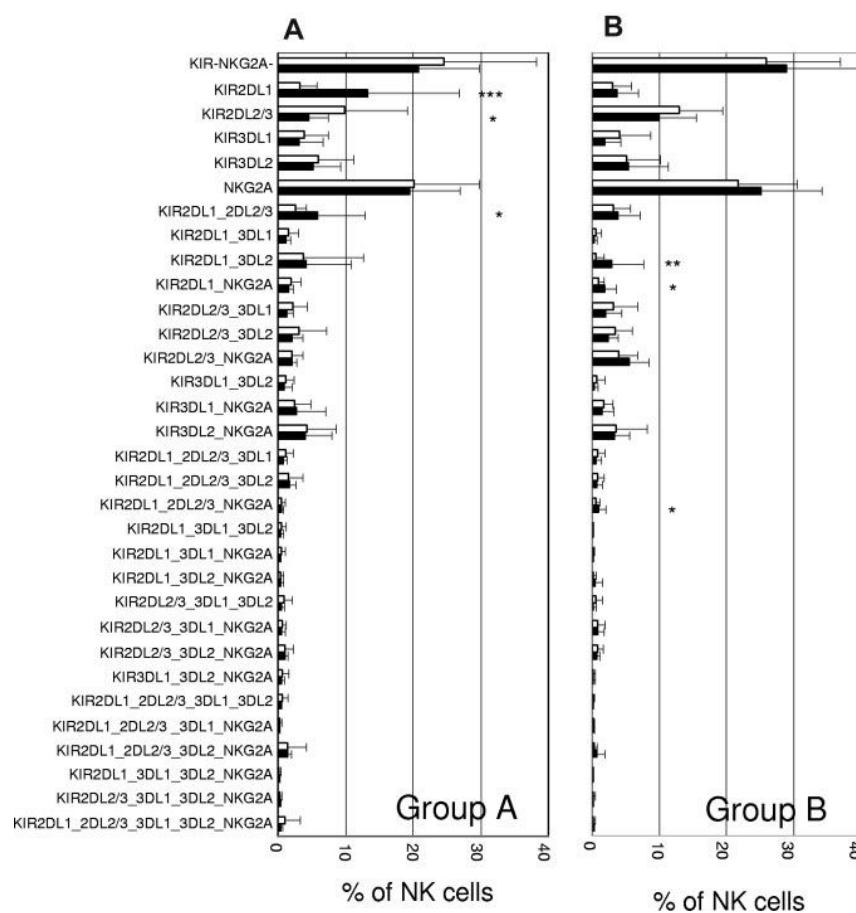
The next aim was to find out which features of the genetically heterogeneous group *B* haplotypes might explain the apparent differences in HLA-C-specific NK cell repertoires. When analysis was restricted to the most frequent group *B* genotype (genotype 2),²⁴ possessing all KIR genes of group *A* haplotypes plus *KIR2DL2* and *KIR2DS2*, the frequency of KIR2DL1⁺ NK cells again did not increase in the presence of cognate ligands (Figure 2C). This suggested that the observed difference in the frequency of KIR2DL1⁺ NK cells between group *A* and *B* haplotypes was associated with *KIR2DL2* and *KIR2DS2*. To cross-check this association, we next restricted the analysis to those group *B* genotypes lacking *KIR2DL2* and *KIR2DS2* (Figure 2D). This cohort indeed showed changes similar to the *A/A* haplotype group,

Table 2. Distribution of KIR haplotypes*

HLA-C group	Haplotype group			Total
	A/A	A/B	B/B	
C1/C1	28	30	6	65
C1/C2	30	22	7	58
C2/C2	10	13	4	27
Total	68	65	17	150

*Distribution depends on the subgroups of HLA-C ligands.

Figure 1. KIR repertoires are shaped by HLA class I-dependent mechanisms. The repertoire of donors with group A/A haplotypes (A) and group B/B haplotypes (B) is shown for C1/C1 (□) versus C2/C2 (■) donors. HLA class I ligand and haplotype group distribution of samples is shown in Table 2. Designation of clonotypes does not include cross-reactive stimulatory KIR. KIR⁺ NKG2A⁺ refers to NK cells expressing no inhibitory receptors. Statistical significance was determined by 2-tailed *t* test at **P* < .05, ***P* < .01, ****P* < .001. SD is indicated by error bar.



such as frequency of KIR2DL1 and KIR2DL3 was increased in the presence of the respective cognate ligand. In the remaining group B genotypes (*KIR2DL2*^{+/2DS2} but not genotype 2) again no significant influence of HLA-C ligands was observed (data not shown). Remarkably, the KIR2DL1/KIR2DL3 frequency ratio was strongly affected by the presence of the *KIR2DL2* gene: in group B donors lacking *KIR2DL2*, ratios were highly responsive to the presence of cognate ligands similar to what was seen in donors with group A/A haplotypes (Table 3). In contrast, in group B donors having *KIR2DL2*, the ratio remained unaffected.

These study observations already suggested that the frequency of KIR2DL1⁺ NK cells is influenced by the allelic state of the *KIR2DL2/3* gene. Indeed, the frequency of KIR2DL1⁺ NK cells decreased significantly and in a gene-dose dependent way in presence of 0, 1, or 2 *KIR2DL2* alleles (Figure 3A). Consequently, the frequency of cytotoxic KIR2DL1⁺ NK cells is influenced by the allelic state of the *KIR2DL2/3* gene, (Figure 3B): flow cytometric analysis of CD107 expression revealed a significantly reduced fraction of degranulating KIR2DL1-expressing NK cells in *KIR2DL2*⁺ donors. In contrast, the frequency of degranulating

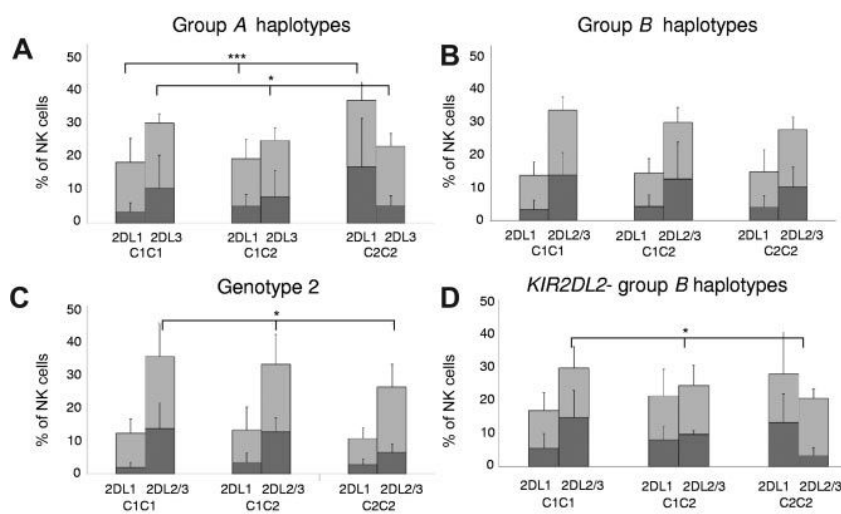


Figure 2. HLA-C ligands differentially affect frequencies but not expression levels of cognate KIR in donors with group A and group B haplotypes. (A) The cohort was divided into 4 genetic subgroups: donors with group A (A/A) haplotypes (*n* = 68), donors with group B (A/B and B/B) haplotypes (*n* = 82), donors with genotype 2 (*KIR2DL2*⁺; *n* = 23), and donors with group B haplotypes lacking *KIR2DL2* (*n* = 13). In panels A through D, the frequency of NK cells expressing KIR2DL1 or KIR2DL2/3 is separately shown for the 3 subgroups of HLA-C ligands. Results are shown as stapled bars with overall frequency of NK cells expressing a given KIR (□) and frequency of single-positive NK cells, that is NK cells expressing a given KIR without coexpression of any other detectable KIR or NKG2A (■). Results represent mean and an error bar represents SD. Statistical significance was determined by ANOVA at **P* < .05, ***P* < .01, ****P* < .001 and is shown for single-positive KIR frequencies.

Table 3. Ratio of KIR2DL1- to KIR2DL2/3-expressing NK cells

KIR Haplotype group	HLA-C ligand	Ratio KIR2DL1/KIR2DL2/3 (single/single KIR)*	P†
Group A	C1/C1	0.69 (0.55)	< .001 (< .001)
	C1/C2	0.87 (1.04)	
	C2/C2	1.51 (4.39)	
Group B	C1/C1	0.40 (0.28)	.330 (.356)
	C1/C2	0.67 (0.81)	
	C2/C2	0.58 (0.59)	
Group B KIR2DL2 ⁺	C1/C1	0.40 (0.27)	.748 (.660)
	C1/C2	0.62 (0.80)	
	C2/C2	0.42 (0.36)	
Group B KIR2DL2 ⁻	C1/C1	0.61 (0.49)	.011 (.005)
	C1/C2	0.84 (0.84)	
	C2/C2	1.42 (1.79)	

*Expression frequency of KIR2DL1 divided by expression frequency of KIR2DL2/3. Parentheses are ratio of single-KIR2DL1⁺/single-KIR2DL2/3.

†P values were calculated by ANOVA. Values for P less than .05 are significant.

KIR2DL2/3-expressing NK cells remained unchanged (Figure 3C). Thus, KIR2DL2⁺ donors possess less NK cells that are exclusively specific for C2 ligands than KIR2DL2⁻ donors.

The correlation of KIR2DL1 expression with the allelic state of KIR2DL2/3 was observed across all combinations of HLA-C ligands (Figure 4A). We further concentrated our analysis on the subgroup of C2/C2 donors, as their NK cell repertoire is functionally most strongly affected by the observed changes in KIR2DL1 frequency. Among the 8 KIR2DL1⁺ clonotypes that were most abundant (frequency > 1%) in donors lacking KIR2DL2, all but 1 clonotype exhibited strongly decreased levels in donors possessing the KIR2DL2 gene (Figure 4B). The correlation was gene dose-dependent and most strongly seen in donors with 2 copies of KIR2DL2. Interestingly, no dependency on the presence of KIR2DL2 was seen in case of the KIR2DL1_3DL2 clonotype, suggesting that KIR2DL1 expression is not affected by the presence of the HLA-A3- and HLA-A11-specific inhibitory receptor KIR3DL2.

KIR2DL1 but not KIR2DS1 expression is affected by the presence of KIR2DL2

As a result of serologic cross-reactivity of the EB6 antibody with KIR2DL1 and KIR2DS1, it was unclear in how far both receptors were affected by the presence of KIR2DL2. Generally, single-KIR2DS1⁺ NK cells should be rare in the presence of C2 ligands as these cells are potentially autoreactive. Indeed, when we analyzed the NK cell repertoire of a donor possessing KIR2DS1 but not KIR2DL1 (genotype 23),²⁴ single-KIR2DS1⁺ NK cells were rare (< 0.3% of 6% overall KIR2DS1 frequency; supplemental Figure 3), an observation that is in line with previous studies of NK cell clones.^{6,29,30} To exactly determine how the KIR2DS1⁺ subset of NK cells is influenced by KIR2DL2, the subset of KIR2DL1⁺/KIR2DS1⁺ donors (n = 29) were analyzed with 2 different KIR2DL1-specific antibodies, 1 cross-reacting (mAb EB6) and 1 not cross-reacting (mAb 143211) with KIR2DS1.³¹ Whereas the frequency of single-KIR2DL1⁺ as well as double-positive NK cells significantly decreased in the presence of KIR2DL2, the frequency of single-KIR2DS1⁺ NK cells was not influenced (Figure 4C). These data demonstrate that expression of the inhibitory KIR2DL1, but not the closely related stimulatory KIR2DS1, is affected by KIR2DL2.

KIR2DL2 can functionally replace KIR2DL1 as C2-specific inhibitory receptor

These study data demonstrate that KIR2DL1 expression is suppressed by KIR2DL2 in NK cell repertoires of most donors with

group B/B haplotypes. One key question was whether the lack of KIR2DL1-expressing NK cells leads to a general lack of NK cells that are able to recognize C2 ligands in these donors. In this regard, it was recently shown that KIR2DL2 and to a lesser extent KIR2DL3 are not solely specific for HLA-C alleles with C1 epitopes, as originally reported, but can also bind to C2 ligands.^{32,33} To this end, we compared the effector functions of NK cells from donors lacking KIR2DL2 with those having 1 or 2 copies of KIR2DL2 (Figure 5A). Single-KIR2DL3⁺ NK cells (KIR2DL2⁻ donors) were strongly inhibited by 721.221 transfectants expressing the cognate C1 group ligand Cw*0701 but not by cells expressing the C2 group ligand Cw*0401. Significant differences in effector functions were seen on the level of CD107 mobilization (Figure 5B) as well as production of interferon- γ (data not shown). In contrast, single-KIR2DL2/3⁺ NK cells from KIR2DL2⁺ donors were inhibited by C1 as well as C2 transfectants without showing significant differences in the degree of inhibition (Figure 5B). In control experiments, single-KIR2DL1⁺ cells were strongly inhibited by C2 but not C1 ligands, as expected (data not shown). These

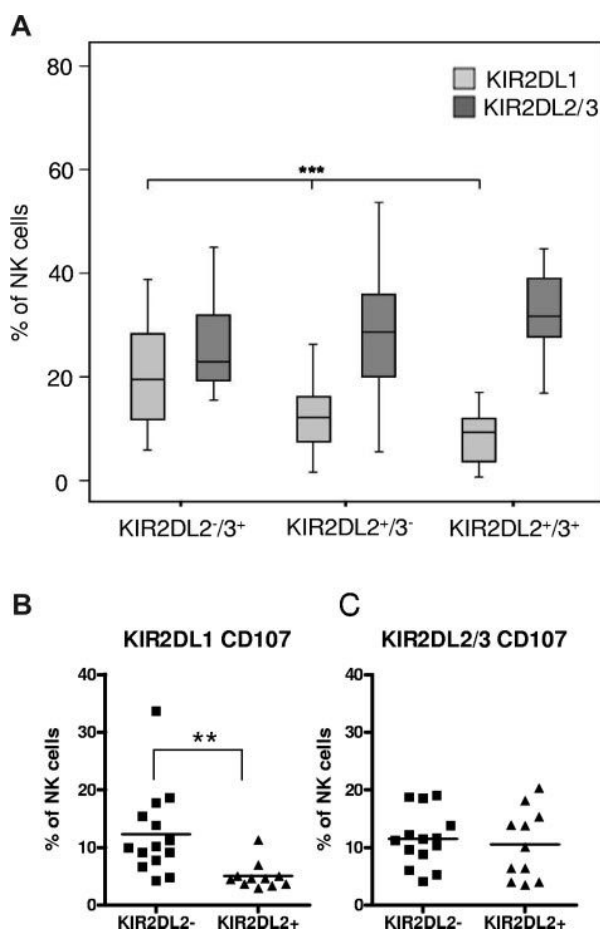
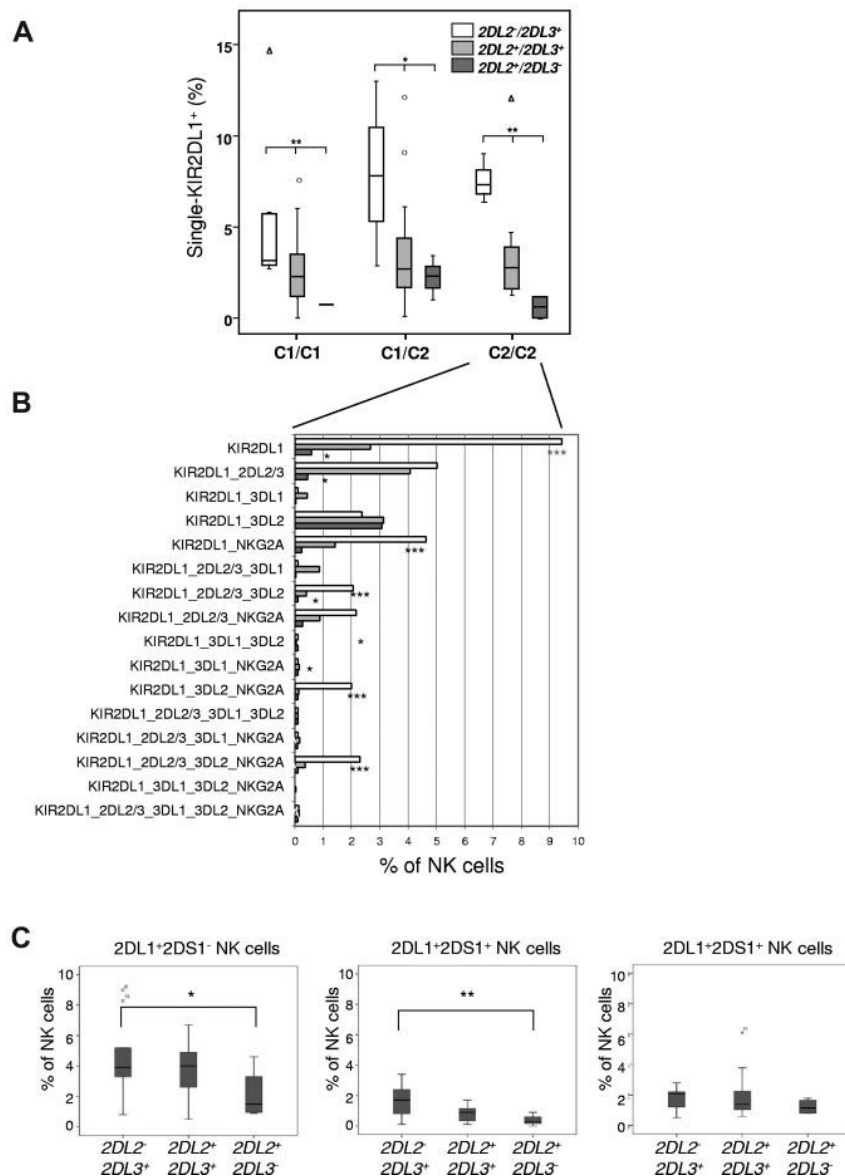


Figure 3. The KIR2DL1⁺ NK cell compartment is influenced by the allelic state of KIR2DL2/3. (A) The frequency of NK cells expressing KIR2DL1 and KIR2DL2/3 is shown for donors with group B haplotypes (A/B and B/B) who were divided into 3 groups according to the allelic state of the KIR2DL2/3 gene. Data are represented as box plots: that represent the median and 25/75 percentiles, whiskers the lowest and largest non-outlier data points (at most 1.5 times the box width). Statistical significance was determined by ANOVA at ***P < .001. (B-C) Frequency of NK cells expressing KIR2DL1 (B) or KIR2DL2/3 (C) in a CD107 mobilization assay against K562 target cells. Samples from donors without (n = 14) and with (n = 11) KIR2DL2 genes are presented in scatter plots with each dot representing 1 sample. Results are expressed as fraction of all CD56⁺ NK cells. Statistical significance was calculated by 2-tailed t test as **P < .01.

Figure 4. *KIR2DL2*-associated changes in *KIR2DL1* expression are independent of the presence of cognate HLA-C ligands and expression of *KIR2DS1*.

(A) Frequency of single-*KIR2DL1*⁺ NK cells is shown for donors with group B haplotypes (A/B and B/B) who were divided into 9 groups according to the allelic state of the *KIR2DL2/3* gene and the HLA-C ligands C1 and C2. (B) All 16 different clonotypes that express *KIR2DL1* are shown for C2/C2 donors with zero (□), 1 (▨), or 2 (■) copies of the *KIR2DL2* gene. (C) Frequency of single-*KIR2DL1*⁺, *KIR2DL1*⁺*KIR2DS1*⁺, and single-*KIR2DS1*⁺ NK cells was measured with multi-color flow cytometric analysis with the following antibody combinations: *KIR2DL1*(143211)-FITC, CD158a,h(EB6)-APC, *KIR3DL1*/*KIR2DL2/3*/NKG2A-PE, CD56-PC5 and CD3-ECD. Donors had a *KIR2DL1*⁺/*KIR2DS1*⁺ genotype (n = 29) and were divided into *KIR2DL2*[−]*KIR2DL3*⁺, *KIR2DL2*⁺*KIR2DL3*⁺, and *KIR2DL2*⁺*KIR2DL3*[−] as indicated on the x-axis. Statistical significance was determined by ANOVA as **P* < .05, ***P* < .01, ****P* < .001).



data demonstrate that the decreased frequency of *KIR2DL1*-expressing NK cells in donors having the *KIR2DL2* gene does not lead to a general lack of NK cells that are able to recognize C2 ligands. Instead, it suggests that *KIR2DL2*⁺ NK cells can take over the function as C2-specific receptor but without the ability to discriminate between C1 and C2 ligands.

Sequential acquisition of HLA-C-specific KIR during NK cell differentiation in vitro

These study data suggest that *KIR2DL3* is mainly C1-specific, whereas *KIR2DL1* as well as *KIR2DL2* both can serve as C2-specific receptors. The question remained as to why *KIR2DL1* is largely replaced by *KIR2DL2* in C2/C2 donors: if both KIR types can serve a similar function as C2-specific receptor they should be selected at comparable frequencies as self-specific receptors. Notably, we have previously shown that in the course of NK cell differentiation, *KIR2DL3* is expressed before and at a higher frequency than *KIR2DL1*.²² Here, the same in vitro NK cell

differentiation assay, with a hepatic stroma cell line as support, was used to analyze if the nonrandom sequential acquisition of KIR similarly applies to *KIR2DL2*. To this end, CD34⁺CD38[−]Lin[−] hematopoietic progenitors from cord blood were differentiated into mature NK cells. To distinguish between *KIR2DL2* and *KIR2DS2*, analyses were performed on the mRNA expression level. In a *KIR2DL2*⁺*KIR2DL3*[−] donor, *KIR2DL2* mRNA was detected on day 15 of in vitro culture together with several other KIR (Figure 6A). Remarkably, no signal for *KIR2DL1* was detectable until the last time point of analysis (day 28). In a *KIR2DL2*[−]*KIR2DL3*⁺ donor (group A/A), a similar sequential expression mode (albeit with a somewhat slower kinetics) with detection of *KIR2DL3* mRNA (day 22) before *KIR2DL1* (day 28) as well as other KIR was seen, (Figure 6B). Finally, in a *KIR2DL2*⁺*KIR2DL3*⁺ donor, a semi-quantitative evaluation of expression was done by real-time PCR. Again, *KIR2DL2* was earlier and stronger expressed than *KIR2DL1*. Notably, *KIR2DL3* was strongest expressed at later time points (Figure 6C). Thus,

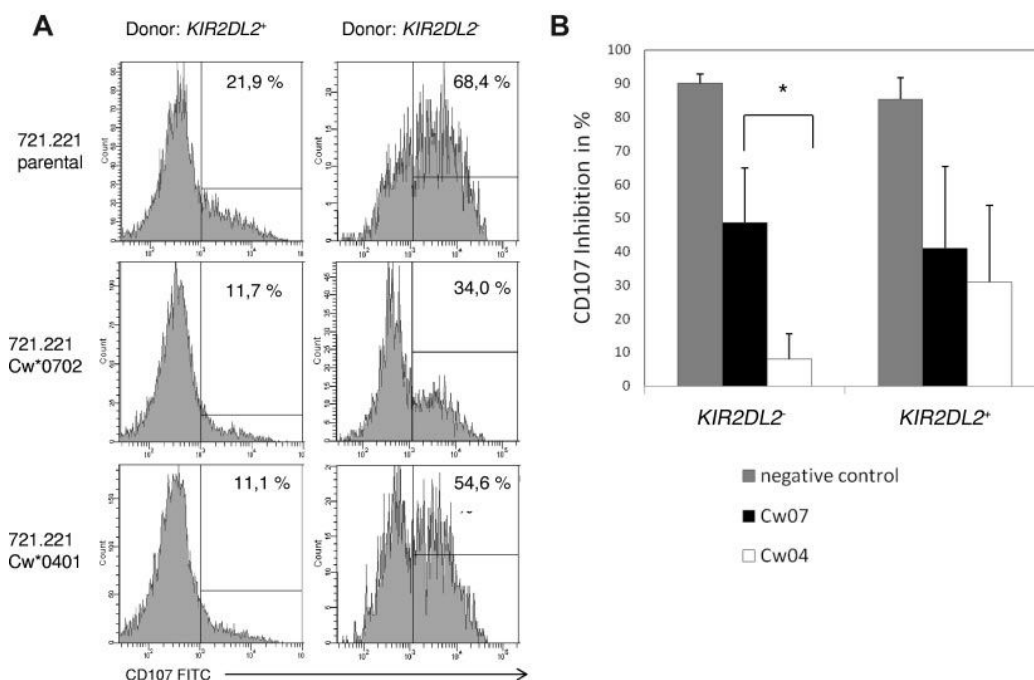


Figure 5. *KIR2DL2*-expressing NK cells are inhibited by C1 as well as C2 ligands. Flow cytometric analysis of CD107 mobilization and intracellular IFN- γ on NK cells using 721.221 and HLA-transfected sublines Cw*0702 and Cw*0401 as target cell lines. (A) Histograms show CD107 expression of *KIR2DL2*⁺ cells from a donor with *KIR2DL2* (genotype 12) and 1 donor without *KIR2DL2* (genotype 1). (B) Functional inhibition was calculated by measuring reduction of CD107 mobilization NK cells in response to Cw*0401 (C2), Cw*0702 (C1)-transfected 721.221, and no targets (negative control). Values are calculated relative to NK cells cultured with untransfected 721.221. Analysis was gated on single-*KIR2DL2*⁺ NK cells in donors with ($n = 6$) or without ($n = 5$) *KIR2DL2*. Statistical analysis was performed by 2-tailed t test for $*P < .05$.

KIR2DL1 was consistently expressed subsequent to *KIR2DL2* (or *KIR2DL3*).

Discussion

The intrinsic and extrinsic factors that shape human NK cell repertoires are incompletely defined, in particular the contribution of stochastic versus ligand-instructed mechanisms.^{8,10,11} The 3 major determinants that influence the structure and function of KIR repertoires could be distinguished, namely cognate HLA class I ligands, *KIR* haplotype diversity, and a hardwired program of sequential receptor acquisition during NK cell development. Together, these factors seem to efficiently adjust a basically stochastic repertoire toward specific recognition of self-HLA class I.

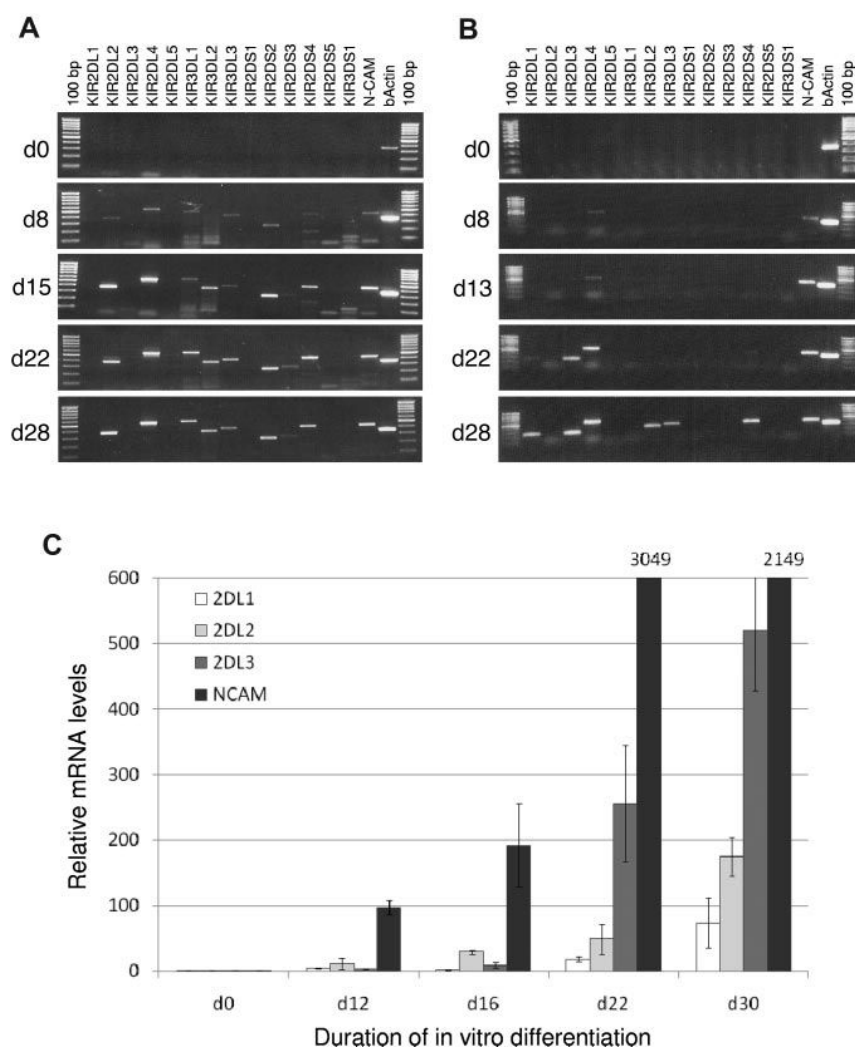
The influence of HLA class I was clearly evident in group A/A haplotype donors. Analysis of individual clonotypes revealed highly specific changes in response to HLA class I ligands: in C1/C1 as well as C2/C2 donors the specific single-KIR⁺ clonotype that recognizes cognate HLA in a mono-specific way was found at frequencies exceeding any other KIR-expressing clonotype. Moreover, the ratio of *KIR2DL1*⁺/*KIR2DL3*⁺ NK cells was significantly different between C1/C1 and C2/C2 donors. Especially the ratio of single-*KIR2DL1*⁺/single-*KIR2DL3*⁺ frequencies provided a highly reliable parameter that was consistently well below 1 in C1/C1 and well above 1 in C2/C2 donors. It thus appears that the relative proportions of C1- and C2-specific NK cells are a parameter that is tightly controlled in the process of HLA class I-dependent KIR repertoire development. It should be noted that also the frequency of *KIR3DL1*-expressing NK cells significantly increases with the presence of the respective Bw4 ligand (data not shown). Our results are thus in agreement with a previous study in

the Japanese population showing adjustment of KIR expression frequency by cognate HLA class I.¹⁰

The second major component shaping HLA-C-specific NK cell repertoires is the genetic diversity of KIR, which is characterized by extensive variation in KIR haplotypes. Comparative analysis of clonotype profiles in group A and group B donors revealed pronounced differences: the expansion of single-KIR⁺ NK cells for cognate HLA-C, a highly significant and consistent finding in group A/A donors, was not detectable in donors with group B haplotypes. Subsequent analyses demonstrate that this difference is not a general property of all group B haplotypes but segregates with the presence of *KIR2DL2*. Not only the frequency but also the function of *KIR2DL1*⁺ NK cells was influenced by the presence of *KIR2DL2*. There were less *KIR2DL1*⁺ NK cells that degranulated in the presence of HLA-deficient target in donors with *KIR2DL2* compared with donors with homozygous *KIR2DL3* (Figure 3B). Moreover, *KIR2DL2* exhibited specific inhibition of IFN- γ production not only by C1 but also by C2 ligands. In fact, inhibition of *KIR2DL2* by the C2 allele Cw*0401 was slightly lower but not significantly different to the inhibition of *KIR2DL1*. Because Cw*0401 does represent a ligand of intermediate affinity in binding assays,³² it is likely that many other C2 alleles will similarly serve as inhibitory ligands for *KIR2DL2*. Notably, HLA-C subtyping of C2/C2 donors (supplemental Table 2) did not reveal any HLA-C alleles not supporting the *KIR2DL2*-specific effect on HLA-C-specific KIR repertoires. These findings together with previous studies suggest that the specificity of *KIR2DL2* transcends the distinction of HLA-C ligands in C1 and C2.^{32,34}

The presence of *KIR2DL2* had a dominant suppressive effect on expression of *KIR2DL1*. We hypothesize that the impact of *KIR2DL2* on the formation of HLA-C-specific KIR repertoires is not only based on its broad specificity but also on the mode of

Figure 6. Sequential acquisition of KIR during NK cell differentiation. In vitro differentiation of NK cells from hematopoietic stem cells was performed as described in "Methods." RT-PCR results from a donor with KIR genotype 5 (*KIR2DL2*⁺*KIR2DL3*⁻; A) and a donor with KIR genotype 1 (*KIR2DL2*⁻*KIR2DL3*⁺; B). Neural cell adhesion molecule (NCAM, CD56) intensity was used as correlate for NK cell development, β -actin as positive control for PCR. (C) Expression levels of *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, and NCAM normalized against β -actin from a donor with KIR genotype 7 (*KIR2DL2*⁻*KIR2DL3*⁺) were measured with real-time PCR. NCAM levels greater than 600 are indicated.



receptor acquisition during NK cell differentiation. In an in vitro NK cell differentiation model it could be shown that *KIR2DL2* and *KIR2DL3* expression preceded expression of *KIR2DL1*, both on mRNA and, as shown by us and others, cell surface expression levels.^{22,26} Similar observations were made during NK cell reconstitution in clinical stem cell transplantation.^{35,36} The molecular basis for the observed sequential KIR acquisition mode is unclear. Although KIR regulatory regions are highly homologous, distinct differences exist between promoters of *KIR2DL1* and *KIR2DL2/3* in terms of transcription factor binding sites.³⁷ It is thus possible, that small differences in promoter strength or the recently described antisense activity of KIR promoters³⁸ might be involved in the control of sequential KIR acquisition.

We suggest that the presence of *KIR2DL2* on developing NK cells does not favor subsequent expression of *KIR2DL1* on the same clones. Because single-*KIR2DL2*⁺ NK cells are already self-specific in C1/C1 as well as C2/C2 donors, further acquisition of *KIR2DL1* is not required for induction of tolerance in any circumstance. In contrast, single-*KIR2DL3*⁺ NK cells are largely specific for C1 ligands and would thus not be selected for in C2/C2 donors. Thus, in these donors *KIR2DL1* is required for induction of tolerance to C2 ligands. These considerations readily explain why in C2/C2 donors that possess the *KIR2DL2* allele, single-*KIR2DL1*⁺ NK cells are exceedingly rare, whereas C2/C2 donors

possessing 2 *KIR2DL3* alleles exhibit a substantial expansion of single-*KIR2DL1*⁺ NK cells. In this context, we could exclude a major role for *KIR2DS1*, as the presence of *KIR2DL2* did not affect expression level or frequency of *KIR2DS1*. Notably, it was recently shown that *KIR2DS1* expression is not influenced by HLA-C either.^{39,40} In contrast, we could not differentiate between expression of *KIR2DL2* and *KIR2DS2* by flow cytometry. Because *KIR2DL2* and *KIR2DS2* are in strong linkage disequilibrium and we did not have any donors lacking 1 but not the other gene in our cohort, we cannot exclude the *KIR2DS2* gene as a confounding factor. Nonetheless, as *KIR2DS2* has no detectable affinity for HLA-C ligands, *KIR2DL2* is likely to be the main factor leading to the shift in HLA-C2-specific NK cell frequencies. Another ambiguity that remains to be resolved as a result of the lack of discriminating antibodies is the effect of *KIR2DL2* on *KIR2DL3*. In fact it is likely that *KIR2DL3* frequencies are lower in *KIR2DL2/3* heterozygotes than in *KIR2DL3* homozygotes as a result of a gene dose effect.

The study strongly suggests that the order in which NK cell receptors are acquired during NK cell development is a crucial factor that shapes HLA class I-specific NK cell repertoires, a notion that pertains to KIR as well as NKG2A. During NK cell development, NKG2A expression is initiated at an earlier stage than KIR expression (K.S., unpublished observations, November

2009).²⁶ Those NK cells that express NKG2A as their only inhibitory receptor, are already self-specific and thus do not require further acquisition of cognate inhibitory KIR. Indeed, the NKG2A⁺KIR⁻ clonotype is significantly more frequent than expected by the product rule, an effect that is independent of KIR haplotype groups. Vice versa, combinations of NKG2A with cognate KIR are less frequently found than statistically expected, an effect previously described for NK cell clones.⁶

The observed bias toward single-KIR⁺ NK cells for cognate ligands, the repression of KIR2DL1 expression in the presence of *KIR2DL2* in C2/C2 donors, as well as the preponderance of single-NKG2A⁺ NK cells all point toward a system that favors NK cells with restricted specificity for 1 major HLA class I ligand (HLA class I or HLA-E, respectively). In line with this observation, human NK cell repertoires are dominated by clonotypes with few HLA class I-specific inhibitory receptors: among the 32 different clonotypes, NK cells expressing combinations of 0 to 2 receptors (representing 16 different clonotypes) comprised more than 90% of the repertoire (Figure 1 and supplemental Figure 1). These observations are compatible with a ligand-instructed model: upon interaction of an inhibitory receptor with a self-ligand, up-regulation of additional receptors ceases or at least becomes less likely. Only in the absence of a cognate ligand, more inhibitory receptors are up-regulated until self-specificity is ensured. Of note, the functional significance of the KIR⁻NKG2A⁻ population, which is the largest clonotype in all analyzed cohorts, is still unclear. It could be speculated that it provides a reservoir of still immature NK cells that is shaped in the periphery toward expression of cognate HLA class I. This notion is compatible with the observation that the overall frequency of KIR⁻NKG2A⁻ cells is inversely correlated to the frequency of KIR⁺NKG2A⁻ NK cells.²⁸ In this context, it has to be noted that we have not assessed expression of LILRB1, an inhibitory receptor with ubiquitous specificity for HLA class I.⁴¹ Given the comparably low affinity for HLA class I and the fact that LILRB1 in contrast to KIR and NKG2A does not confer enhanced self responses,²⁸ the impact of LILRB1 expression on KIR repertoire acquisition is likely to be limited.

The present results appear to contradict a recent study claiming that KIR repertoires are generated through a sequential but random acquisition mode without any selection.¹¹ The model is based on the observation that combinations of 2 or more KIR are more abundant than expected by the product rule and independent of selection by cognate HLA class I. Indeed, we also observe that NK cells expressing 3 to 5 KIR receptors in the absence of NKG2A are more frequent than expected by the product rule. Although these clonotypes are rare and add up to a cumulative frequency of 2% to 3% of NK cells, the effect is highly significant (supplemental Figure 4). However, this observation does not exclude an influence of HLA class I on the formation of KIR repertoires. The failure of Andersson et al¹¹ to detect HLA class I-mediated adaptation could rather be because the authors did not break down the analysis to single clonotypes and did not consider the major class I ligands separately. In fact, if our data are calculated similarly, that is cumulative consideration of KIR ligands and KIR receptors, the influence of HLA class I ligands is no longer detectable: donors with 1 major HLA class I ligand do not express significantly more inhibitory receptors than donors with 2 or more HLA class I ligands (supplemental Figure 4).

It is important to note that the rules governing formation of KIR repertoires in group A/A donors are different for C1/C1 and C2/C2 subgroups. Because of the early acquisition of KIR2DL2/3,

the repertoire of a C1/C1 donor is inherently biased toward expression of self-specific KIR. In contrast, the repertoire of a C2/C2 donor is dependent on selection of KIR2DL1⁺ NK cells, which are per se less frequent in an unbiased KIR repertoire because of their late appearance. This asymmetry, caused by the nonrandom sequential acquisition mode, has various consequences for the formation of KIR repertoires that are clearly visible in the present study, such as single-KIR2DL1⁺ NK cells show much stronger adaptation toward cognate class I than single-KIR2DL3⁺ NK cells. Moreover, the KIR2DL1_2DL3 clonotype is significantly more frequent in C2 than in C1 donors (Figure 1A). Together, these observations clearly indicate that it is generally crucial to perform the analysis of individual KIR clonotypes in the context of individual HLA class I ligands to provide the necessary resolution to detect the influence of HLA class I on the KIR repertoire.

In the clinical setting of allogeneic HSCT, the observed differences in expression of HLA-C-specific KIR between group A and group B donors might have important consequences for the composition of alloreactive NK cell repertoires. As shown in this study, a gradual depletion of KIR2DL1⁺ NK cells is seen in donors having 1 and an even greater depletion in donors with 2 copies of *KIR2DL2*. Notably, only NK cells expressing the C2-specific KIR2DL1⁺ have the potential to recognize a C2/C1 mismatch in graft-versus-host direction, whereas KIR2DL2⁺ NK cells would not discriminate between the 2 ligands. Thus, even if 2 donors share the same HLA class I type they still might provide qualitatively and quantitatively divergent alloreactive NK cell repertoires just on the basis of the KIR2DL2/3 polymorphism. It is likely that specificity and activation threshold of NK cells is further modified by coexpression of stimulatory KIR. Interestingly, Pende et al³³ have recently shown that after haploidentical HSCT, donor-derived KIR2DL2/3⁺ NK cells poorly recognize C2 leukemic blasts unless KIR2DS1 was coexpressed. This as well as observations showing that donors with group B haplotypes are associated with less bacterial infections and improved outcome in HSCT suggest that inhibitory KIR repertoires indeed are modified by coexpression of stimulatory KIR.^{42,43}

In summary, the present study shows how HLA-C-specific NK cell repertoires are structurally and functionally affected by both *HLA class I* and *KIR* genotype. We suggest that the assessment of KIR and HLA class I type in conjunction with high-dimensional flow cytometry provides a promising approach to predict NK cell function in the clinical setting such as haploidentical HSCT or novel adoptive immunotherapy protocols.^{21,44}

Acknowledgments

We thank all donors that volunteered for blood donation. We also thank Dr A. Moretta for the CD158k-specific antibody (Q66, KIR3DL2) and Dr S. Khakoo for the HLA-deficient 721.221 and the HLA class I-transfected sublines.

This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft grants UH 91/2-1 and UH91/5-1 (M.U.).

Authorship

Contribution: K.S. designed the project, performed the experiments, and wrote the manuscript; M.S. performed the NK cell differentiation assays; J.E. performed the HLA-C typing; J.C.F.

designed the project and performed statistical analysis; and M.U. designed the project and wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Markus Uhrberg, PhD, University Clinic of Düsseldorf, Institute for Transplantation Diagnostics, and Cell Therapeutics, Bldg 14.80, Moorenstrasse 5, D-40225 Düsseldorf, Germany; e-mail: uhrberg@itz.uni-duesseldorf.de.

References

- Raulet DH, Held W, Correa I, Dorfman JR, Wu MF, Corral L. Specificity, tolerance and developmental regulation of natural killer cells defined by expression of class I-specific Ly49 receptors. *Immunol Rev*. 1997;155:41-52.
- Moretta L, Moretta A. Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(5):626-633.
- Ljunggren H, Karre K. In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. 1990;12(2):237-244.
- Held W, Dorfman JR, Wu MF, Raulet DH. Major histocompatibility complex class I-dependent skewing of the natural killer cell Ly49 receptor repertoire. *Eur J Immunol*. 1996;26(10):2286-2292.
- Johansson S, Johansson M, Rosmaraki E, et al. Natural killer cell education in mice with single or multiple major histocompatibility complex class I molecules. *J Exp Med*. 2005;201(7):1145-1155.
- Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity*. 1997;7(6):739-751.
- Anfossi N, Andre P, Guia S, et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*. 2006;25(2):331-342.
- Gumperz JE, Valiante NM, Parham P, Lanier LL, Tyán D. 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*. 1996;183(4):1817-1827.
- Frohn C, Schlenke P, Kirchner H. The repertoire of HLA-Cw-specific NK cell receptors CD158 a/b (EB6 and GL183) in individuals with different HLA phenotypes. *Immunology*. 1997;92(4):567-570.
- Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med*. 2006;203(3):633-645.
- Andersson S, Fauriat C, Malmberg JA, Ljunggren HG, Malmberg KJ. KIR acquisition probabilities are independent of self-HLA class I ligands and increase with cellular KIR expression. *Blood*. 2009;114(1):95-104.
- Fernandez NC, Treiner E, Vance RE, Jamieson AM, Lemieux S, Raulet DH. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood*. 2005;105(11):4416-4423.
- Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*. 2005;436(7051):709-713.
- Orr MT, Murphy WJ, Lanier LL. 'Unlicensed' natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection. *Nat Immunol*. 2010;11(4):321-327.
- Carrington M, Martin MP. The impact of variation at the KIR gene cluster on human disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;298:225-257.
- Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*. 1997;7(6):753-763.
- Vilches C, Parham P. KIR: Diverse, Rapidly evolving receptors of innate and adoptive immunity. *Annu Rev Immunol*. 2001;20:217-251.
- Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science*. 2004;305(5685):872-874.
- Martin MP, Gao X, Lee JH, et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet*. 2002;31(4):429-434.
- Carrington M, Wang S, Martin MP, et al. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J Exp Med*. 2005;201(7):1069-1075.
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002;295(5562):2097-2100.
- Fischer JC, Ottinger H, Ferencik S, et al. Relevance of C1 and C2 epitopes for hematopoietic stem cell transplantation: role for sequential acquisition of HLA-C-specific inhibitory killer Ig-like receptor. *J Immunol*. 2007;178(6):3918-3923.
- Hiby SE, Walker JJ, O'Shaughnessy KM, et al. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med*. 2004;200(8):957-965.
- Uhrberg M, Parham P, Wernet P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics*. 2002;54(4):221-229.
- Vilches C, Castano J, Gomez-Lozano N, Estefania E. Facilitation of KIR genotyping by a PCR-SSP method that amplifies short DNA fragments. *Tissue Antigens*. 2007;70(5):415-422.
- Miller JS, McCullar V. Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2. *Blood*. 2001;98(3):705-713.
- Trundley AE, Hiby SE, Chang C, et al. Molecular characterization of KIR3DL3. *Immunogenetics*. 2006;57(12):904-916.
- Yawata M, Yawata N, Draghi M, Partheniou F, Little AM, Parham P. MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response. *Blood*. 2008;112(6):2369-2380.
- Foley B, De Santis D, Lathbury L, Christiansen F, Witt C. KIR2DS1-mediated activation overrides NKG2A-mediated inhibition in HLA-C C2-negative individuals. *Int Immunol*. 2008;20(4):555-563.
- Chewning JH, Gudme CN, Hsu KC, Selvakumar A, Dupont B. KIR2DS1-positive NK cells mediate alloresponse against the C2 HLA-KIR ligand group in vitro. *J Immunol*. 2007;179(2):854-868.
- Morvan M, David G, Sebille V, et al. Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions. *Eur J Immunol*. 2008;38(12):3474-3486.
- Moesta AK, Norman PJ, Yawata M, Yawata N, Gleimer M, Parham P. Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J Immunol*. 2008;180(6):3969-3979.
- Pende D, Marcenaro S, Falco M, et al. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood*. 2009;113(13):3119-3129.
- Winter CC, Long EO. A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. *J Immunol*. 1997;158(9):4026-4028.
- Shilling HG, McQueen KL, Cheng NW, Shizuru JA, Negrin RS, Parham P. Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2003;101(9):3730-3740.
- Stern M, de Angelis C, Urbani E, et al. Natural killer-cell KIR repertoire reconstitution after haploidentical SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45(11):1607-1610.
- van Bergen J, Stewart CA, van den Elsen PJ, Trowsdale J. Structural and functional differences between the promoters of independently expressed killer cell Ig-like receptors. *Eur J Immunol*. 2005;35(7):2191-2199.
- Li H, Pascal V, Martin MP, Carrington M, Anderson SK. Genetic control of variegated KIR gene expression: polymorphisms of the bidirectional KIR3DL1 promoter are associated with distinct frequencies of gene expression. *PLoS Genet*. 2008;4(11):e1000254.
- Fauriat C, Ivarsson MA, Ljunggren HG, Malmberg KJ, Michaelsson J. Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors. *Blood*. 2010;115(6):1166-1174.
- Cognet C, Farnier C, Gauthier L, et al. Expression of the HLA-C2-specific activating killer-cell Ig-like receptor KIR2DS1 on NK and T cells. *Clin Immunol*. 2010;135(1):26-32.
- Chapman TL, Heikeman AP, Bjorkman PJ. The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity*. 1999;11(5):603-613.
- Tomblyn M, Jo-Anne HY, Haagenson MD, et al. Decreased infections in recipients of unrelated donor hematopoietic cell transplantation from donors with an activating KIR genotype. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16:1155-1161.
- Cooley S, Trachtenberg E, Bergemann TL, et al. Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2009;113(3):726-732.
- Miller JS, Soignier Y, Panoskaltis-Mortari A, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*. 2005;105(8):3051-3057.

Table S1. Distribution of HLA-C subtypes in donors with C2/C2 ligands

	<i>KIR</i> genotype	<i>KIR</i> haplotype	<i>KIR2DL2</i>	HLA-C epitope	HLA-C allele	HLA-C allele	Ratio: Single- KIR2DL1 ⁺ / Single- KIR2DL2/3 ⁺
1	1	AA	-	C2/C2	0202	0501	2.456
2	1	AA	-	C2/C2	0401	1701	0.970
3	1	AA	-	C2/C2	0501	0602	3.438
4	1	AA	-	C2/C2	0202	1701	1.122
5	1	AA	-	C2/C2	0202	0401	1.222
6	1	AA	-	C2/C2	1502	1502	10.124
7	1	AA	-	C2/C2	0202	0202	9.214
8	1	AA	-	C2/C2	0401	1502	0.771
9	1	AA	-	C2/C2	0602	07xx *	1.321
10	4	AB	-	C2/C2	0202	0401	1.875
11	4	AB	-	C2/C2	0202	0602	1.698
12	4	AB	-	C2/C2	0202	0501	1.316
13	2	AB	+	C2/C2	0401	0602	0.371
14	2	AB	+	C2/C2	0401	0602	0.676
15	3	AB	+	C2/C2	0202	0602	0.241
16	3	AB	+	C2/C2	0602	1502	0.099
17	7	AB	+	C2/C2	0602	0602	0.412
18	7	AB	+	C2/C2	0202	0401	0.545
19	12	AB	+	C2/C2	0202	0501	0.303
20	12	AB	+	C2/C2	0501	0602	0.116
21	17	BB	+	C2/C2	0202	0501	0.000
22	18	BB	+	C2/C2	0501	0501	0.076
23	44	BB	+	C2/C2	0602	1502	0.788

*Luminex method was not able to discriminate between different Cw07 alleles, but HLA-C PCR-SSP confirmed this allele as C2.

Figure S1. KIR repertoire is shaped by different mechanisms. Observed (white bars) vs. expected (black bars) frequencies of NK cells expressing 32 different combinations (clonotypes) of NKG2A and KIR inhibitory receptors are shown in a cohort of 150 mostly Caucasian donors. Expected frequencies were calculated by the product rule as defined the following way: The expected frequency of each clonotype was calculated by the “product rule” according to Yawata et al.¹⁰ For example, the expected frequency of single-KIR2DL1⁺-NK cells is given by the following equation: $a \cdot (1-b) \cdot (1-c) \cdot (1-d) \cdot (1-e)$ with $a = \%KIR2DL1$, $b = \%KIR2DL2/3$, $c = \%KIR3DL1$, $d = \%KIR3DL2$, and $e = \%NKG2A$. Statistical analyses were performed with SPSS 15 software. Significance was determined with Anova or two-tailed t-test. P-values below 0.05 were significant (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Figure S2. HLA-C ligands did not affect expression levels of cognate KIR in donors with group A and B haplotypes. In each of the four plots the mean fluorescence intensity (MFI) of KIR2DL1 and KIR2DL2/3 is shown separately for the three subgroups of HLA-C ligands in donors with *A/A* haplotypes (upper panel, $n=63$) and in donors with *A/B* and *B/B* haplotypes (lower panel, $n=68$). Data are presented as scatter plots with each dot representing one sample. Statistical significance was determined by Anova (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) and is shown for MFI of all NK cells expressing the respective receptor in (B).

Figure S2. Analysis of the NK cell repertoire of a donor possessing *KIR2DS1* but not *KIR2DL1*. The NK cell repertoire of a donor with *KIR* genotype 23 (see Table 1) and C1/C2 ligands was determined by multicolor flow cytometry analysis as described in Materials and Methods. The bars represent NK cell frequencies for each of the possible 32 different receptor combinations resulting from variegated expression of *KIR2DS1*, *KIR2DL2* (including *KIR2DS2*), *KIR3DL1*, *KIR3DL2* and NKG2A on CD56⁺ NK cells.

Figure S4. The cumulative number of cognate KIR receptors does not reveal any association with the number of KIR ligands. Frequencies of NKG2A⁺ NK cells expressing 0 to 4 KIRs in donors with 1 ($n=9$), 2 ($n=19$), 3 ($n=44$), or 4 ($n=8$) ligands are shown in box plots representing the median and 25/75 percentiles, whiskers the lowest and largest non-outlier data points (at most 1.5 times the box width).

Figure S1

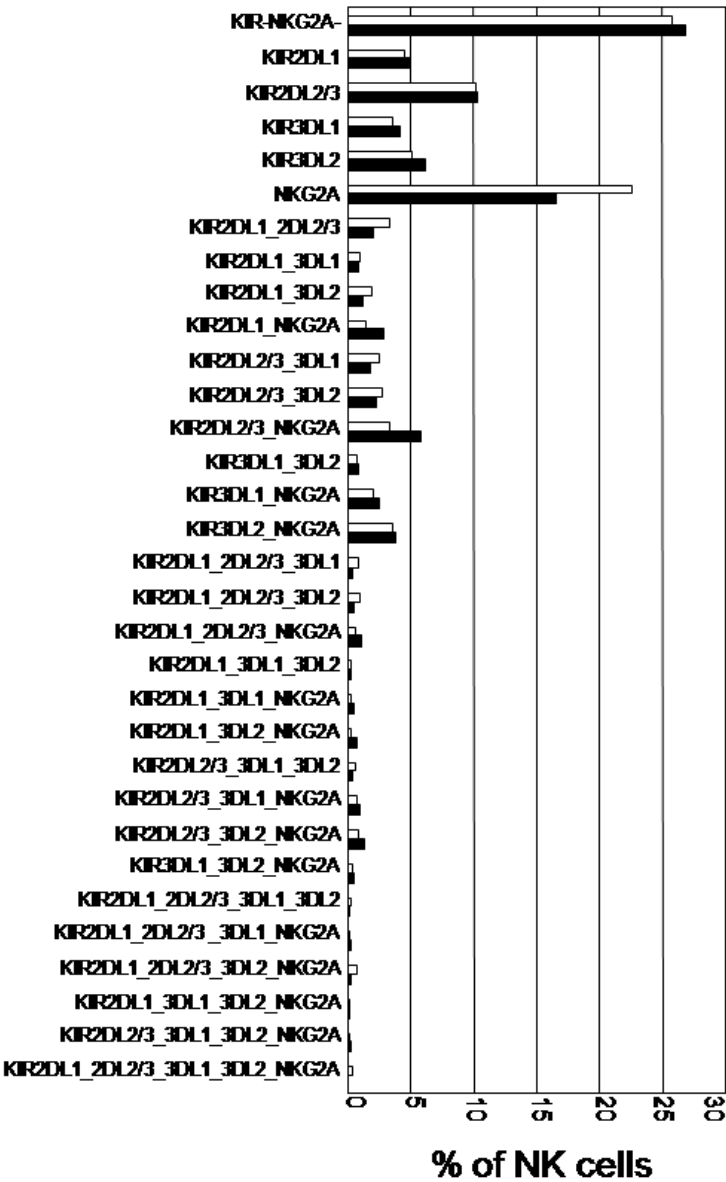


Figure S2

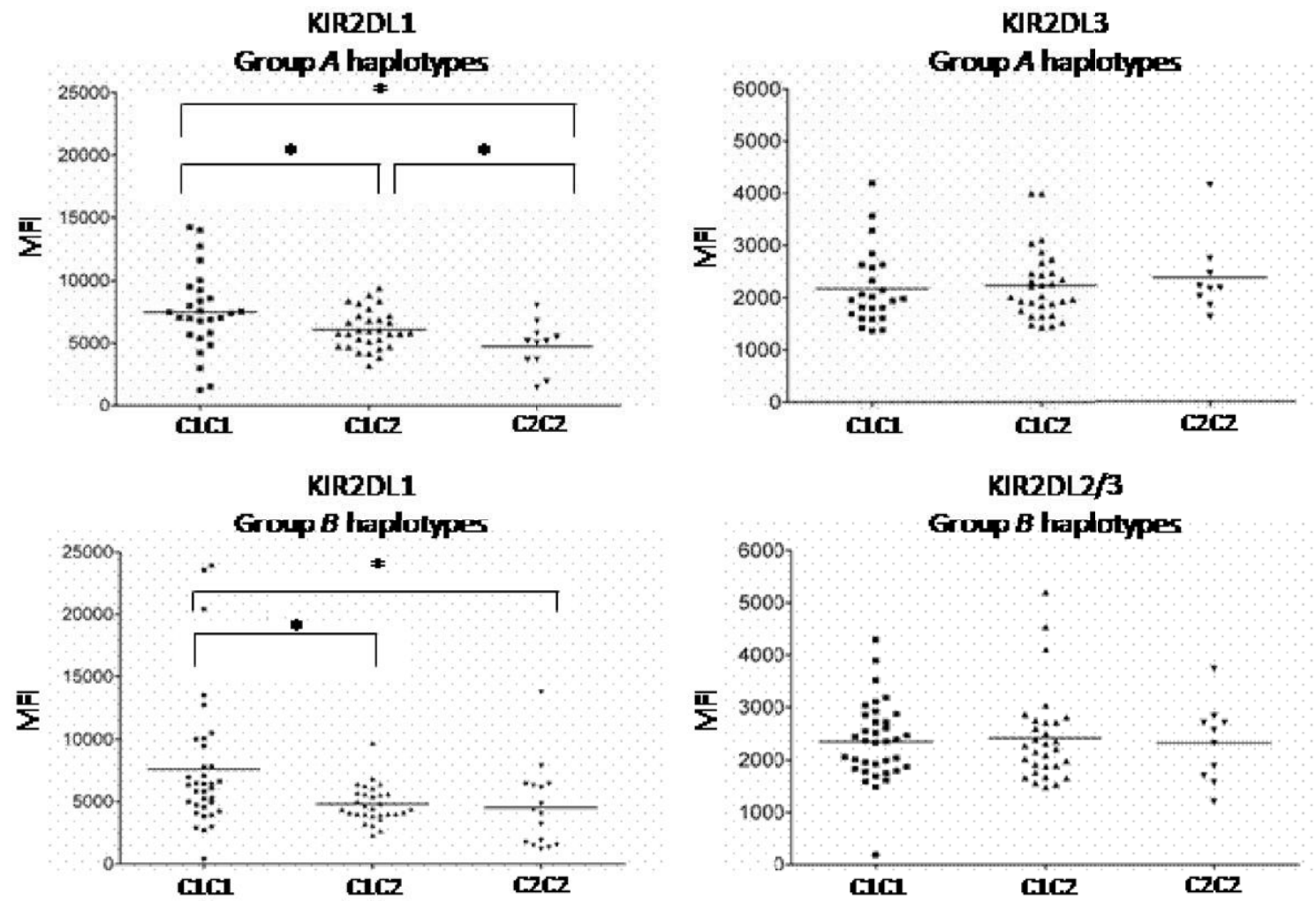


Figure S3

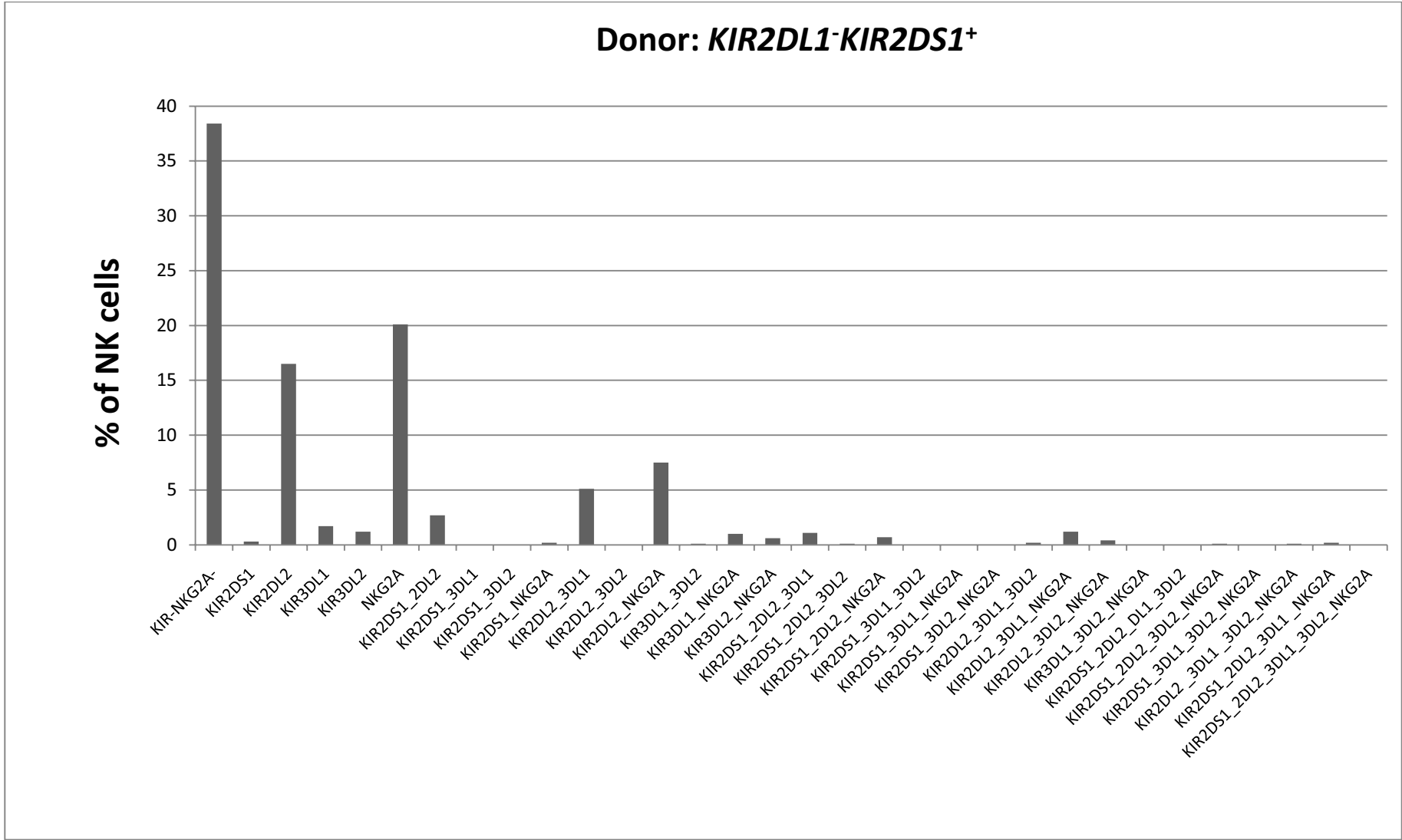
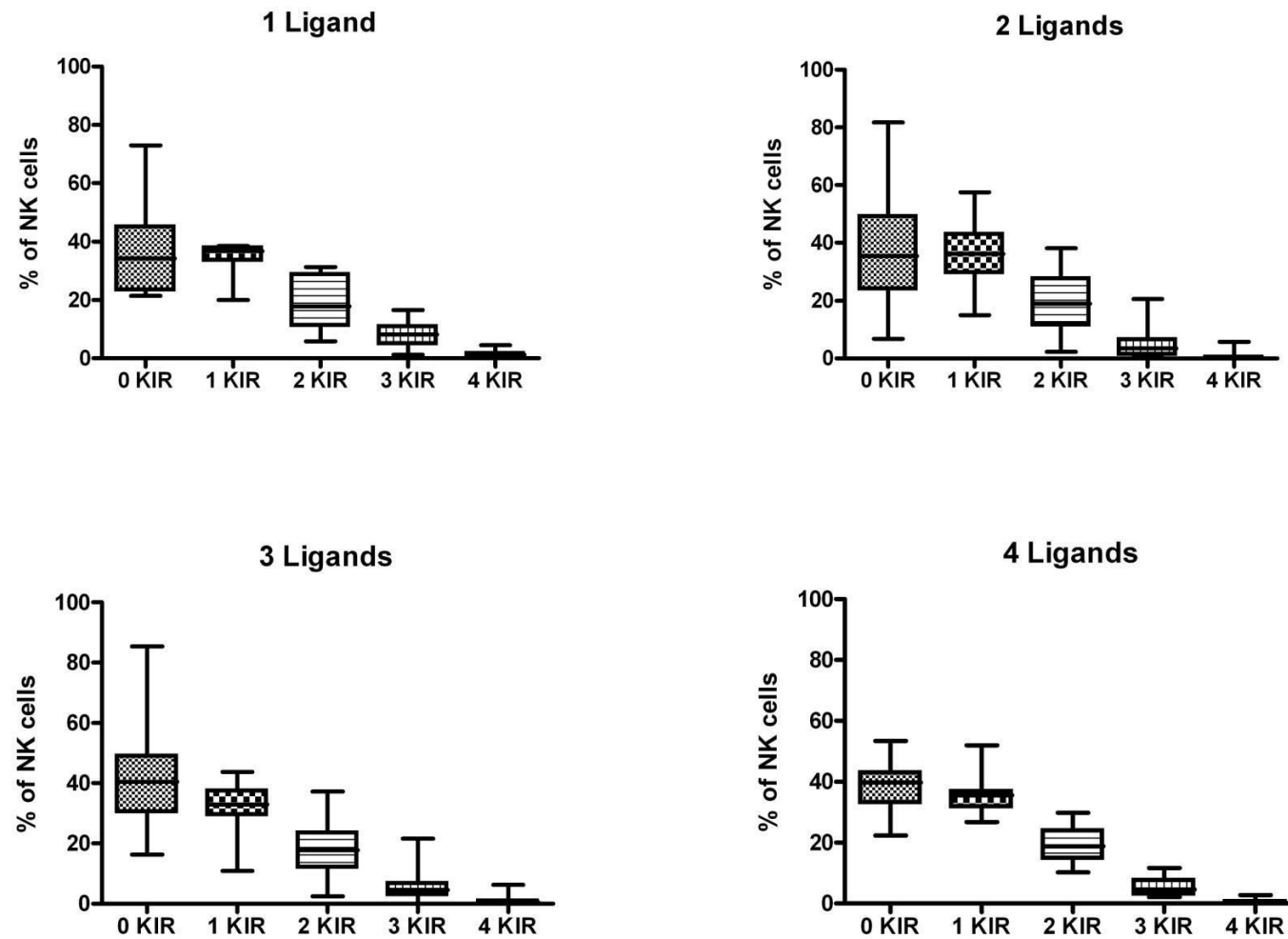


Figure S4



2.4 Neonatal NK cell repertoires are functionally but not structurally biased towards recognition of self HLA class I

Status: akzeptiert (März 2011)

Blood, Impact Factor: 10,555

Eigener Anteil an der Publikation:

- Planung und Durchführung der Experimente
- Schreiben des Manuskriptes (mit Markus Uhrberg)

2.4.1 Zusammenfassung

Nachdem wir im adulten Blut feststellen konnten, dass es eine Adaption des Repertoires an das eigene HLA-Klasse I gibt und diese durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird, stellte sich die Frage, wann in der Entwicklung diese Adaption stattfindet. Aus diesem Grund untersuchten wir mehr als 100 CBs mit der bereits erwähnten Methode der Durchflusszytometrie. Da die strukturelle Adaption ein raffinierter Prozess ist, der der gemeinsamen Betrachtung aller relevanten inhibitorischen Rezeptoren auf klonaler Ebene bedarf, wurde zunächst das Repertoire der 32 möglichen Populationen bestimmt und mit PB verglichen.

Dabei konnten zunächst folgende Erkenntnisse gewonnen werden. In Einklang mit der Literatur konnte gezeigt werden, dass NKG2A exprimierende Zellen sind häufiger in CB als in PB sind. Dies gilt sowohl für die Zellen, die nur NKG2A (*single*-NKG2A⁺) als auch für Zellen, die NKG2A mit einem oder mehr KIR koexprimieren. Alle diese Populationen sind signifikant häufiger vorhanden in CB. Das Umgekehrte gilt für KIR exprimierende Zellen. Die Zellen, die nur KIR auf ihrer Oberfläche tragen, werden im adulten Organismus in wesentlich höherer Frequenz exprimiert als in CB.

Wie schon im PB wurde auch die Kohorte der Nabelschnurblutproben für Gruppe A und B Haplotypen typisiert, sowie die Subgruppen für *HLA-C* unterschieden, um den Einfluss der HLA-Liganden auf die Rezeptorexpression zu begutachten. Diese Unterteilung ist wichtig, denn zuvor konnte von uns gezeigt werden, dass der KIR-Haplotyp eine wesentliche Rolle bei der Formation des Repertoires im PB einnimmt. Überraschenderweise gab es keinen Einfluss der Liganden auf die Frequenz, weder in Gruppe A noch Gruppe B Haplotypen konnte eine Anpassung der Frequenz des passenden KIR an seinen Liganden gezeigt werden. KIR2DL1 ist nicht in Spendern mit HLA-C2 erhöht und KIR2DL3 ist nicht in Spendern mit HLA-C1 erhöht. Auch HLA-Bw4 als Ligand für KIR3DL1 wurde getestet, doch auch hier war ebenfalls kein Einfluss auf die Frequenz zu sehen.

Die nächste Frage, die beantwortet werden sollte, war folgende: Hat das Fehlen einer strukturellen Adaptionen auch ein Fehlen einer funktionalen Erziehung zur Folge? Dazu wurde die Degranulation von HLA-C1 und HLA-C2 spezifischen NK-Zellen in HLA-C1 und HLA-

C2 Spendern verglichen. Hier gab es keinen Unterschied zwischen PB und CB. Der Effekt des „*Licensing*“ oder „*Education*“ war sowohl in neonatalen als auch in adulten NK-Zellen zu sehen und miteinander vergleichbar. In HLA-C1 homozygoten Spendern funktionieren KIR2DL3-positive NK-Zellen besser als KIR2DL1-positive NK-Zellen, d.h. die Frequenz an degranulierenden Zellen mit KIR2DL3 ist höher die Frequenz von degranulierenden KIR2DL1-positiven Zellen. In HLA-C2 ist es umgekehrt, die Frequenz an degranulierenden KIR2DL1-positiven Zellen ist höher als die Frequenz der KIR2DL3-positiven degranulierenden Zellen. Besonders deutlich wurde in der Auftragung, dass diese Tendenz in jedem einzelnen Spender zu erkennen war. Auch hier ermittelten wir eine Ratio zwischen den KIR2DL1- und den KIR2DL2/3-Zellen, die degranulieren und, erneut war hier die stärkste Unterscheidung sichtbar. Wie erwartet gab es In HLA-C1/C2 Spendern keinen Unterschied in der Frequenz von KIR2DL2 zu KIR2DL3 Zellen, die CD107 exprimieren. Weiterhin konnten wir zeigen, dass diese funktionale Erziehung nicht nur mit CD107 sondern auch mit IFN- γ nachzuweisen war.

Die Tatsache, dass CB NK-Zellen strukturell nicht an HLA adaptiert sind, spricht dafür, dass diese Adaption kein integraler Part der NK-Zellentwicklung ist. Im Gegensatz dazu ist die funktionale Adaption des Repertoires von Anfang an vorhanden. Es ist wahrscheinlich, dass diese beiden Anpassungen voneinander unabhängige Prozesse sind. Die Reduktion von NKG2A ist Teil dieser strukturellen Adaption. Somit gelangt der Spender von einem allgemein inhibitorischen Repertoire mit breiter Spezifität zu einem spezifischen Repertoire, das von KIR dominiert wird. Ziel dieser Prozesse ist es letztendlich ein für Selbst-HLA-Klasse I-spezifisches und funktionales Repertoire auszubilden.

**Neonatal NK cell repertoires are functionally but not structurally biased
towards recognition of self HLA class I**

Short title: Neonatal KIR repertoires

Scientific category: Immunobiology

Kathrin Schönberg, Johannes C. Fischer, Gesine Kögler, and Markus Uhrberg¹

¹Institute for Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics, Heinrich-Heine
University Düsseldorf, Germany

Abstract word count: 152

Total text word count: 1482

Figure/Table count: 2

Reference count: 19

Corresponding Author: Markus Uhrberg, PhD
University Clinic of Düsseldorf
Institute for Transplantation Diagnostics
and Cell Therapeutics,
Building 14.80
Moorenstrasse 5
D-40225 Düsseldorf
Phone: +49-211-81-19529
Fax: +49-211-81-19429
e-mail: uhrberg@itz.uni-duesseldorf.de

Abstract

Human NK cell repertoires are biased towards more frequent expression of inhibitory KIR receptors for self-HLA class I. Moreover, only those NK cells that express cognate receptors for self are fully functional in terms of cytotoxicity and cytokine production. It is so far unknown if functional education and structural adaptation to HLA class I are implemented during NK cell development and if both processes are mechanistically connected. Here, we show that NK cell repertoires in cord blood are not yet shaped towards increased clonal frequencies of KIR for self-HLA class I as determined for the three major KIR ligands C1, C2, and Bw4. Nonetheless, neonatal NK cells expressing cognate KIR exhibited enhanced effector function on the level of degranulation and cytokine production. The study suggests that functional education of cognate KIR by self-HLA class I precede structural adaptation of KIR repertoires and that both processes are not directly linked to each other.

Introduction

Human natural killer (NK) cells express inhibitory receptors with specificity for MHC class I, encoded by the *killer cell Ig-like receptor (KIR)* family.¹ A characteristic feature of KIR, similar to the functionally-related Ly-49 family in rodents, is the clonally-distributed expression mode, which creates a functionally diverse repertoire of NK cells that differ in the kind and number of receptors expressed on each given NK cell.^{2, 3} The factors that govern formation of these NK cell repertoires are incompletely understood but involve a strong stochastic component.^{4, 5} In addition, the extensive polymorphisms of *MHC class I* and *KIR* genes represent additional parameters that influence repertoire and function of NK cells.⁶ In humans, analogous to mice, structural adaptation of NK cell repertoires to the highly polymorphic *HLA class I* genes involves increase in frequency of NK cells expressing cognate inhibitory receptors.⁷⁻⁹ Moreover, the presence of MHC class I-encoded ligands also influences NK cell function: NK cells expressing an inhibitory receptor for self-MHC class I exhibit increased effector functions compared to NK cells lacking a cognate inhibitory receptor.¹⁰⁻¹² Together, functional education and structural adaptation increase the frequency of self-specific, functionally competent NK cells, which constitutes an efficient strategy to deal with the polymorphic nature of *KIR* and *HLA class I* genes.

It is so far unknown, how and when functional and structural adaptation of NK cells to autologous MHC class I molecules occurs and if this process is an integral part of NK cell development or if it rather acts on the stage of mature NK cells. In the latter case, differences in cognate receptor expression would be expected between naïve and experienced NK cell repertoires. In this regard, umbilical cord blood (CB) constitutes a source of neonatal NK cells that typically were not yet exposed to a broad range of pathogens including viral infections and thus provides a correlate of naïve NK cells. In this study, a thorough analysis of KIR and NKG2A repertoires was performed in NK cells from CB to better understand how naïve NK cells are educated by self-HLA class I.

Materials and Methods

Cell isolation, *KIR* and *HLA class I* genotyping

CB samples were kindly provided by the José Carreras Stem Cell Bank, Düsseldorf. Data of PB samples were extracted from Schönberg et al.⁹ HLA-C frequencies were similar between the CB and PB cohorts. The *KIR* haplotype distribution was slightly different with haplotype group A/A = 45.3%, A/B = 44.0%, and BB = 10.7% in PB vs. haplotype group A/A = 34.5%, A/B = 52.2%, and B/B = 13.3% in CB. NK cells were isolated using the RosetteSep method (Stemcell Technologies). *KIR* and *HLA class I* genotyping were performed by PCR-SSP as reported previously.^{9, 13}

Flow Cytometry

The following mouse anti-human mAbs were used as previously described: CD56-PC5, CD159a-PE (NKG2A), CD158a-APC (KIR2DL1/S1), CD158e-ECD (KIR3DL1), CD158b-APC-Cy7 (KIR2DL2/3/S2) (Beckman Coulter), and CD3-Pacific Blue (BD Biosciences). The CD158k-specific mAb Q66 (KIR3DL2, kindly provided by A. Moretta) was used in combination with anti-mouse-IgM-FITC (Beckman Coulter).

The CD107 degranulation assay was done as previously described using CD107a-FITC (BD Biosciences).⁹ NK cells were co-cultured with K562 cells at 1:1 ratio for 6 hours. For measurement of intracellular IFN- γ , cells were fixed and permeabilized with Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences) and intracellular IFN- γ production was measured using anti-IFN- γ FITC mAb (Invitrogen).

Results and Discussion

We have previously shown that adaptation to self-HLA class I is a subtle process that requires conjoint consideration of all relevant inhibitory receptors on the clonal level.⁹ A similar approach was taken here for the analyses of neonatal NK cell repertoires: KIR2DL1, KIR2DL2/3, and KIR3DL1, specific for the three major HLA class I-encoded ligands C2, C1, and Bw4, respectively, were measured together with the A3/A11-specific KIR3DL2 and the HLA-E-specific NKG2A by multicolor flow cytometry on CD56⁺CD3⁻ NK cells.

In the absence of published data on clonal NK cell repertoires in CB, we first analyzed the distribution of the 32 clonal populations (i.e. clonotypes) of inhibitory receptors in comparison to NK cells from adult peripheral blood (PB). Similar to PB,

all 32 receptor combinations were expressed in the NK cell repertoires from CB (Figure 1A).¹⁴ Also in concordance with previous studies, NKG2A-expressing NK cells were much more abundant in CB than in PB (overall frequency: 67,9% vs. 37,4%).^{15, 16} Clonal analysis revealed that single-NKG2A⁺ as well as clonotypes co-expressing NKG2A together with one or more KIR were significantly more abundant in CB (Figure 1A). On the other hand, a significant decrease was seen in clonotypes expressing single KIR or multiple KIR without NKG2A. Finally, NKG2A⁻KIR⁻ NK cells, which were previously shown to be hyporesponsive in peripheral blood, were significantly less abundant in CB.¹⁰

To explore the influence of HLA class I-encoded ligands on shaping of inhibitory KIR repertoires, the cohort was stratified according to the presence of C1 and C2 epitopes. Since previous analyses of NK cells from PB have shown that the dependence on HLA class I ligands was most easily detected in donors that were homozygous for the *KIR* haplotype group A, which encodes for a defined set of six *KIR* genes, the CB cohort was accordingly broken down.^{9,17} Surprisingly, no bias towards recognition of self-HLA class I could be detected in donors with group A/A or group B/B haplotypes (Figure 1B-C): in C2/C2 donors, clonotypes with cognate KIR2DL1 were not found at higher frequencies than in C1/C1 donors and similarly, KIR2DL3 frequencies were not increased in C1/C1 donors. Moreover, neither the frequency of single-KIR nor the cumulative frequency of all NK cells expressing a given cognate KIR was biased towards self-ligands (Figure 1D). Whereas in PB we had previously observed a 4-fold difference in single-KIR2DL1⁺ NK cells between C1/C1 and C2/C2 donors, not even a tendency towards a similar bias was detected in CB.⁹ Analysis of statistical power revealed a high probability that the lack of bias was not due to insufficient sampling ($\beta = 0,92$ calculated with GPower 3.1). Similar results were obtained for KIR3DL1, which did not show a frequency bias towards the Bw4 epitope (Figure 1D). Finally, there was also no correlation found for KIR3DL2 and the presence of A3 and A11 epitopes (data not shown).

We next asked if the lack of structural adaptation of KIR repertoires in CB was accompanied by a lack of functional education. To this end, we compared the degranulation responses of C1- and C2-specific NK cells against the class I-negative target cell line K562. The overall effector responses were generally lower in CB (Figure 2A,C) than in PB (Figure 2B,D), which is in agreement with previous

literature.¹⁸ However, the educational impact of cognate ligands was comparable and highly significant in both sources. In C1/C1 donors, single-KIR2DL2/3⁺ NK cells exhibited higher effector responses than single-KIR2DL1⁺ NK cells (Figure 2A-B). Vice versa, single-KIR2DL1⁺ NK cells from C2/C2 donors exhibited higher effector responses than single-KIR2DL2/3⁺ NK cells from the same donors (Figure 2C-D). Direct comparison of donors according to presence or absence of HLA-C ligands shows a dose-dependent and highly significant increase of CD107-producing single-KIR2DL1⁺ NK cells in presence of cognate ligands (Figure 2E). As expected, no difference in CD107 mobilization was seen between the two clonotypes in C1/C2 donors (Figure 2E). Finally, an educational impact was also seen on IFN- γ production. As shown in Figure 2F, the ratio of single-KIR2DL1⁺ to single-KIR2DL2/3⁺ IFN- γ -producing cells did significantly increase in presence of cognate C2 ligands in a dose-dependent manner, again in concordance with previous observations in PB¹⁰.

This is the first study to address the influence of HLA class I on KIR expression in CB. The present data suggest that HLA class I has no effect on initial KIR repertoire formation. The fact that NK cell repertoires from CB are not biased towards expression of cognate inhibitory KIR suggests that adaptation of KIR expression towards self-HLA class I ligands is not an integral part of NK cell development. In contrast, functional education, also referred to as licensing, is already in place in neonatal NK cells.¹² Thus, the structural adaptation of adult KIR repertoires towards self-ligands is mechanistically uncoupled from the 'tuning' of cognate receptors towards increased effector function. Importantly, in the light of the present data in neonatal blood, the original model of a ligand-instructed KIR repertoire development has to be modified.⁹ In fact, our data suggest that the 'instruction' process is somehow ineffective at the neonatal stage and is initiated only postnatally and in an antigen-experienced environment. An important question arising from this work is what triggers the change from an unbiased neonatal to a biased adult KIR repertoire. A plausible explanation would be, that the frequency of NK cells expressing cognate KIR for self-HLA class I is affected by the individual immunological experience that donors accumulate throughout life. In this regard, it was recently shown that viral infection can lead to specific and long-lasting expansion of NK cell clones that express single cognate KIR.¹⁹ We thus consider the possibility that specific expansion of functionally educated NK cells in response to certain pathogens successively shapes naïve NK cell repertoires towards recognition of self-HLA class

I. The accompanied substantial decrease in NKG2A frequency from birth to adulthood would be part of this structural transition from a more generic NK cell repertoire that is able to accommodate a broad range of KIR and HLA class I polymorphisms *ab initio* to a more specific, KIR-dominated repertoire. The present work suggests that NK cell repertoires go through major structural changes from birth to adulthood and raises the question how this process influences clinical susceptibility to infection and disease. In this regard, it remains to be determined how unbiased neonatal NK cell repertoires change during childhood and which role the individual infection history plays in this process.

Acknowledgments

We thank all donors that volunteered for blood donation. We also thank Dr A. Moretta for the CD158k-specific antibody (Q66, KIR3DL2). This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft grant UH91/5-1 (M.U.).

Authorship

Contribution: K.S. designed the project, performed the experiments, and wrote the manuscript; J.C.F. designed the project and performed statistical analysis; G.K. organized the cord blood sampling workflow; and M.U. designed the project and wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

References

1. Moretta A, Locatelli F, Moretta L. Human NK cells: from HLA class I-specific killer Ig-like receptors to the therapy of acute leukemias. *Immunol Rev.* Aug 2008;224:58-69.
2. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity.* Dec 1997;7(6):739-751.
3. Raulet DH, Vance RE, McMahon CW. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:291-330.
4. Uhrberg M. Shaping the human NK cell repertoire: an epigenetic glance at KIR gene regulation. *Mol Immunol.* Feb 2005;42(4):471-475.
5. Andersson S, Fauriat C, Malmberg JA, Ljunggren HG, Malmberg KJ. KIR acquisition probabilities are independent of self-HLA class I ligands and increase with cellular KIR expression. *Blood.* Jul 2 2009;114(1):95-104.
6. Vilches C, Parham P. KIR: Diverse, Rapidly Evolving Receptors of Innate and Adaptive Immunity. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:217-251.
7. Johansson S, Salmon-Divon M, Johansson MH, et al. Probing natural killer cell education by Ly49 receptor expression analysis and computational modelling in single MHC class I mice. *PLoS One.* 2009;4(6):e6046.
8. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med.* Mar 20 2006;203(3):633-645.
9. Schonberg K, Srihar M, Enczmann J, Fischer JC, Uhrberg M. Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood.* Jan 6;117(1):98-107.
10. Anfossi N, Andre P, Guia S, et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity.* Aug 2006;25(2):331-342.
11. Kim S, Sunwoo JB, Yang L, et al. HLA alleles determine differences in human natural killer cell responsiveness and potency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 26 2008;105(8):3053-3058.

12. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*. Aug 4 2005;436(7051):709-713.
13. Uhrberg M, Parham P, Wernet P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics*. Jul 2002;54(4):221-229.
14. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Partheniou F, Little AM, Parham P. MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK cell repertoires towards a balance of missing-self response. *Blood*. Jun 26 2008.
15. Sundstrom Y, Nilsson C, Lilja G, Karre K, Troye-Blomberg M, Berg L. The expression of human natural killer cell receptors in early life. *Scand J Immunol*. Aug-Sep 2007;66(2-3):335-344.
16. Le Garff-Tavernier M, Beziat V, Decocq J, et al. Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell*. Aug;9(4):527-535.
17. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*. Dec 1997;7(6):753-763.
18. Verneris MR, Miller JS. The phenotypic and functional characteristics of umbilical cord blood and peripheral blood natural killer cells. *Br J Haematol*. Oct 2009;147(2):185-191.
19. Bjorkstrom NK, Lindgren T, Stoltz M, et al. Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. *J Exp Med*. Dec 20.

Figure Legends

Figure 1. The KIR repertoires of neonatal NK cells are diverse but not biased towards recognition of cognate HLA class I

(A) The frequencies of all 32 KIR and NKG2A receptor combinations (clonotypes) that can be distinguished by the present flow cytometry approach are shown for CB (black bars, n=90) and PB (white bars, n=150) as mean with error bars representing SD. Clonotypes are ordered according to the number of expressed receptors starting with no receptor (KIR⁻NKG2A⁻), one receptor (either a single KIR or NKG2A), two receptors (i.e. KIR2DL1_3DL1 refers to a clone expressing KIR2DL1 and KIR3DL1 and no other KIR or NKG2A), and so forth. Designation of clonotypes does not include cross-reactivity with stimulatory KIR. (B) Inhibitory receptor repertoires of CB donors with group A/A KIR haplotypes. The order of clonotypes was similar to (A) but without consideration of KIR3DL2. Donors were divided into subgroups possessing C1/C1 (white bars, n=19) and C2/C2 (black bars, n=11) ligands. (C) Inhibitory receptor repertoires of CB donors with group A/B and B/B KIR haplotypes. Donors were divided into subgroups possessing C1/C1 (white bars, n=31) and C2/C2 (black bars, n=22) ligands. (D) Frequency of CB and PB-derived NK cells expressing KIR2DL1, KIR2DL3, or KIR3DL1 in donors with group A/A KIR haplotypes. For each given KIR, donors were stratified according to the indicated HLA class I ligands. Results are shown as stapled bars with overall frequency of NK cells expressing a given KIR (light grey) and the corresponding fraction of single-KIR⁺ NK cells (dark grey). Sample distribution was: C1/C1 (n=19/38 for CB/PB), C1/C2 (n=20/30), and C2/C2 (n=11/10) as well as Bw4/Bw4 (n=5 for CB), Bw4/Bw6 (n=16), and Bw6/Bw6 (n=9). Results are shown as mean with error bars representing SD. Data for PB were calculated from the cohort analyzed in Schönberg et al.⁹ Statistical significance was determined by two-tailed t-test (*p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001).

Figure 2. Neonatal NK cells are functionally educated by autologous HLA class I ligands

CD107 mobilization against K562 was measured in single-KIR2DL1⁺ and single-KIR2DL2/3⁺ NK cells from CB of C1/C1 (A) and C2/C2 (C) donors and similarly in PB of C1/C1 (B) and C2/C2 (D) donors. In each case, data are depicted as individual frequencies with statistical significance calculated for the ratio of KIR2DL1 to KIR2DL2/3 (left side) and as box plots (right side). Boxes represent the median and 25/75 percentiles, whiskers the lowest and highest data points without outliers.

Statistical significance was determined by two-tailed t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). The sample distribution was C1/C1 ($n=10$) and C2/C2 ($n=15$) for CB and C1/C1 ($n=14$) and C2/C2 ($n=6$) for PB. (E) Changes in frequency of CD107-mobilizing single-KIR2DL1⁺ (light grey) and single-KIR2DL2/3⁺ (dark grey) NK cells of CB donors. Donors were the same as in (A, C) but including C1/C2 ($n=25$) donors. Throughout the figure, functional analysis was done without further subdivision into KIR haplotype groups. Values represent the mean, error bars represent the SD. (F) Production of IFN- γ in NK cells from CB after 6h co-culture with K562. Donors were divided into C1/C1 ($n=8$), C1/C2 ($n=25$) and C2/C2 ($n=11$) subgroups. Box plots represent the ratio between IFN- γ -producing single-KIR2DL1⁺ and single-KIR2DL2/3⁺ NK cells. P values were calculated by ANOVA (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Figure 1

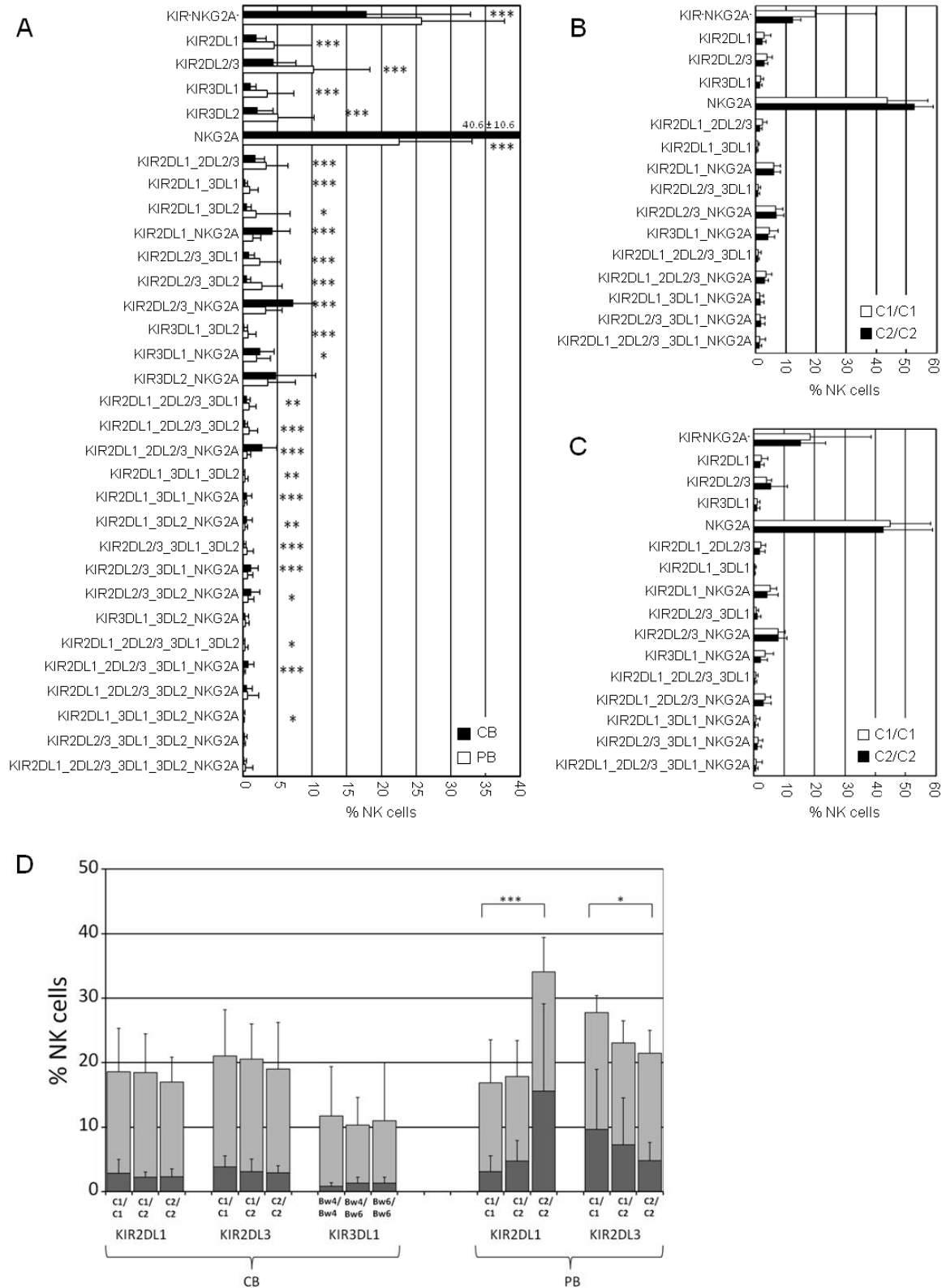
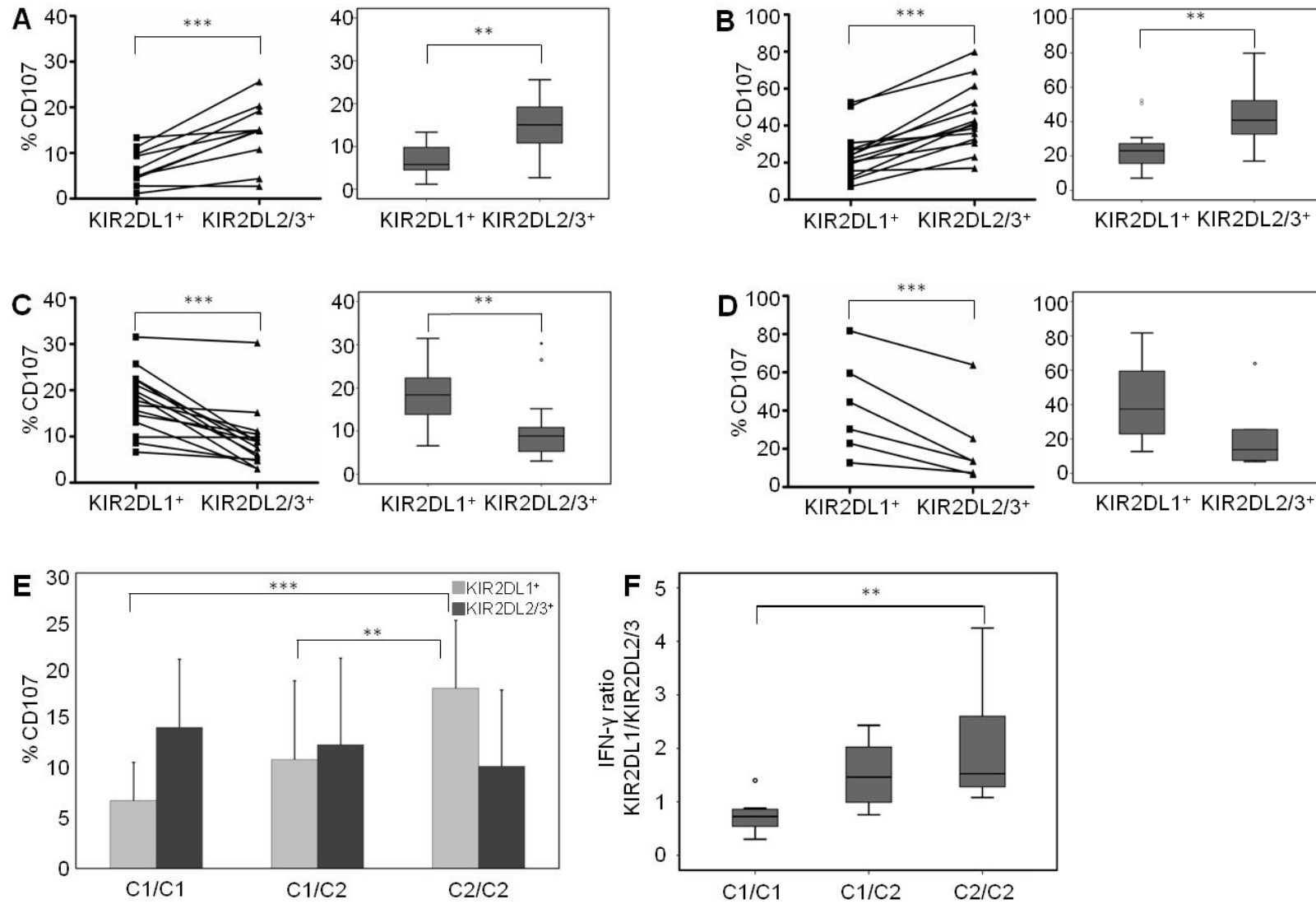


Figure 2



2.5 Expansion of NKG2A⁺LIR1⁺ NK cells in HLA-Matched, KIR/HLA-Ligand Mismatched Patients following Hematopoietic Cell Transplantation

Status: publiziert

Biology of Blood and Marrow Transplantation, Impact Factor: 3,149

Eigener Anteil an der Publikation:

- Durchführung und Auswertung der KIR-Typisierungen

2.5.1 Zusammenfassung

Bei Stammzelltransplantationen („*hematopoietic cell transplantation*“, HCT) als kurative Behandlung von Leukämien oder Lymphomen wird die Prognose stark durch die NK-Zellen des Spenders beeinflusst. Der Empfänger profitiert hierbei von alloreaktiven NK-Zellen, die einen KIR exprimieren, für den der Empfänger keinen Liganden besitzt (Vgl. Kapitel 1.6.2).

Aufgrund ihrer wichtigen Rolle im Ergebnis nach HCT wurde im Rahmen dieser Publikation das NK-Zellrepertoire mit Hilfe von Mehrfarben-Durchflusszytometrie bei 22 Patienten mit „*KIR/Liganden Mismatch*“ und 14 Patienten mit „*KIR/Liganden Match*“ vor und nach der Transplantation analysiert. Dabei wurden die NK-Zellen mit breiter Spezifität (NKG2A⁺ und LIR1⁺) identifiziert und von der Analyse ausgeschlossen. Die Entwicklung der NKG2A⁻LIR1⁻-NK-Zellen wurde in den Spender/Empfänger-Paaren analysiert. Dabei konnte eine Expansion dieser Zellen in folgenden Gruppen ermittelt werden:

- In Patienten in Remission im Vergleich zu Patienten mit Rezidiv
- In gesunden Spendern im Vergleich zu Patienten vor HCT
- In „*KIR/Liganden Mismatch*“ Patienten im Vergleich zu Patienten mit „*KIR/Liganden Match*“

Damit wurde deutlich gezeigt, dass NKG2A⁻LIR1⁻-NK-Zellen einen positiven Einfluss auf die Prognose des Patienten nach HCT haben. Die Frequenz dieser Zellen steigt nach HCT stark an. NKG2A⁻LIR1⁻-NK-Zellen senken das Risiko eines Rezidivs. Umgekehrt gilt auch, dass sinkende Frequenzen dieser Zellen Rezidiven vorausgehen. Bei der Analyse der Patienten über einen längeren Zeitraum nach HCT konnte ermittelt werden, dass es wichtig ist, dass auch lange nach der HCT die Zahl dieser Zellen erhöht bleibt, um in Remission zu bleiben.

Die meisten dieser NKG2A⁻LIR1⁻-Zellen sind reife NK-Zellen, die positiv für KIR sind. Diese NK-Zellen tragen einen spezifischen KIR gegen den Liganden, bei dem ein „*Mismatch*“ vorliegt. So vermitteln sie den GvL-Effekt und töten leukämische Zellen ab, und die Patienten bleiben in Remission.

Bei einer weiteren Beobachtung spielt der *KIR*-Genotyp eine entscheidende Rolle: In Patienten, die heterozygot für Gruppe A/B *KIR-Haplotypen* sind, expandieren die NKG2A⁻

LIR1⁻-Zellen stärker als in Patienten, in denen das Transplantat homozygot für Gruppe A KIR-Haplotypen ist. Durch die größere Diversität im Repertoire der Spender mit Gruppe B Haplotypen entstehen mehr KIR-positive Zellen. Des Weiteren verstärken aktivierende Rezeptoren den GvL-Effekt.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Patienten mit einem „*KIR/Liganden Mismatch*“ stärker vom GvL-Effekt profitieren als Patienten ohne „*Mismatch*“. Damit steigt die Bedeutung der KIR-Typisierung bei Stammzelltransplantation stark an.

Expansion of NKG2A⁺LIRI⁺ Natural Killer Cells in HLA-Matched, Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors/HLA-Ligand Mismatched Patients following Hematopoietic Cell Transplantation

Silvia Rathmann,^{1,2} Sabine Glatzel,^{1,2} Kathrin Schönberg,³ Markus Uhrberg,³ Marie Follo,¹ Christian Schulz-Huotari,⁴ Markus Kaymer,⁵ Hendrik Veelken,¹ Jürgen Finke,¹ Paul Fisch²

The prognosis after hematopoietic cell transplantation (HCT) for the treatment of leukemia or lymphoma in humans is influenced by donor-derived natural killer (NK) cells, which enhance the graft-versus-leukemia (GVL) effect. Such alloreactive killer cells can be generated in vivo after HCT if the donor expresses killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs), such as KIR2DL1, KIR2DL2/3, or KIR3DL1, for which the recipient lacks HLA class I ligands. We studied effector cells from 22 KIR/HLA-ligand mismatched and 14 KIR/HLA-ligand matched, primarily HLA-matched patient-donor pairs after allogeneic HCT. A novel 8-color flow cytometry panel allowed us to characterize effector-cell populations without "broadly reactive" inhibitory receptors such as CD94/NKG2A or LIRI. The numbers of such NKG2A⁺LIRI⁺ NK cells increased following HCT in patients transplanted by KIR/HLA-ligand mismatched grafts, compared to KIR/HLA-ligand matched grafts, and in patients transplanted from donors of the A/B, compared to A/A, KIR haplotypes. NKG2A⁺LIRI⁺ NK cells expressing only those inhibitory KIRs for which the patient had no HLA class I ligands could be stimulated by HLA class I-deficient cells to express CD107a. Thus, NKG2A⁺LIRI⁺ NK cells may be important GVL effector cells following HCT, even in patients transplanted from HLA-matched donors.

Biol Blood Marrow Transplant 16: 469-481 (2010) © 2010 American Society for Blood and Marrow Transplantation

KEY WORDS: Allogeneic hematopoietic cell transplantation, NK cells, HLA-matched, KIR/HLA-ligand mismatch

INTRODUCTION

Allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT) is often the only possibility to cure acute myelogenous leukemias, myelodysplastic syndromes, and aggressive leukemias/lymphomas. A key to survival in this situation is the graft-versus-leukemia (GVL) effect, mediated by effectors from the donor that destroy residual leukemia cells in the patient. These include do-

nor-derived natural killer (NK) cells, which have been shown to play an important role in the outcome of allogeneic HCT [1,2]. The function of NK cells is regulated by the balance of signals from clonally distributed inhibitory and activating cell surface receptors [3]. The same receptors can be expressed on resting or activated $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T cells [4]. The most important ones are the inhibitory NK receptors, which induce tolerance against self. These include the lectin-like receptor CD94/NKG2A, which is specific for the nonclassical class I molecule HLA-E, and is stabilized by leader peptides from most classical HLA-A, -B, and -C allotypes [5]. The Ig-like receptors, encoded in the leukocyte receptor complex of chromosome 19, can be divided into the killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) and the leukocyte Ig-like receptors [6]. The leukocyte Ig-like receptors (CD85), previously called immunoglobulin-like transcripts or leukocyte immunoglobulin-like receptors (LIR), are broadly reactive inhibitory receptors against the HLA-A, -B, and -C allotypes. Similar to CD94/NKG2A, they enable NK cells to survey for overall class I expression [7]. In contrast, 3 different KIRs can distinguish between groups

From the ¹Department of Hematology/Oncology, Freiburg University Hospital, Freiburg, Germany; ²Department of Pathology, Freiburg University Hospital, Freiburg, Germany; ³Institute for Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany; ⁴Center for Transfusion Medicine, Freiburg University Hospital, Freiburg, Germany; and ⁵Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Germany.

Financial disclosure: See Acknowledgments on page 480.

Correspondence and reprint requests: Paul Fisch, MD, Professor of Molecular Pathology, Immunology and Genetics, Department of Pathology, Breisacher Str. 115A, 79106 Freiburg, Germany (e-mail: paul.fisch@uniklinik-freiburg.de).

Received September 18, 2008; accepted December 23, 2009

© 2010 American Society for Blood and Marrow Transplantation

1083-8791/10/164-0002\$36.00/0

doi:10.1016/j.bbmt.2009.12.008

of HLA-A, -B, and -C allotypes [8-10]. KIR2DL1 recognize HLA-C allotypes with a lysine at position 80 (C2 ligands such as Cw02, 0307, 0310, 04, 05, or 06). KIR2DL2 and KIR2DL3 recognize HLA-C allotypes with an asparagine at position 80 (C1 ligands, such as Cw01, 03, 07, or 08). KIR3DL1 molecules recognize HLA-B-allotypes with a polymorphic sequence motif at position 77-83 (Bw4 epitope), whereas KIR3DL2 interacts with the HLA-A3 and A11 allotypes.

Besides inhibition, NK cells require activation by virus-infected or leukemic cells to mediate their protective functions [11,12]. Stimulatory receptors on NK cells include lectin-like receptors such as CD94/NKG2C and the KIRDS molecules. The HLA class I specificities and antibody reactivities of activating KIRs overlap with those of the corresponding inhibitory KIRs. Other activating receptors on NK cells are the NKG2D homodimers whose ligands include MHC class-I-related chain A/B (MICA/B) [13]. A third class of activating receptors on NK cells, as well as some T cells, are the natural cytotoxic receptors (NCR), NCR1 (NKp46), NCR2 (NKp44), and NCR3 (NKp30) [9]. Although the ligands for these receptors have not been fully elucidated, they may be important in the recognition of leukemic cells [9,11,12]. Inhibitory NK receptor signals generally overrule signaling through stimulatory receptors [10,14]. Several clinical studies demonstrated improved survival post allogeneic HCT, along with a strong GVL effect against myelogenous leukemias when the patient was lacking 1 of the 3 major KIR/HLA-ligands present in the donor, the Bw4 epitope in HLA-B, or the C1 or C2 ligands in HLA-C [1,15-20]. The likely mechanism for this is that NK cells derived from the graft express a "leukemia-reactive" profile of inhibitory receptors. These inhibitory KIR do not find an HLA class I ligand on the recipient's cells, including residual leukemia cells. Because all KIRs are encoded on chromosome 19, they are segregated independently of the HLA alleles on chromosome 6. Thus, transplants from HLA identical family donors may be KIR-mismatched [21], whereas only transplants from identical twins are HLA- and KIR-matched. We studied regenerating NK and T cells following allogeneic HCT in adult patients, most of which were HLA-matched. According to the expression of KIRs in the donor's blood, the patients were divided into KIR/HLA-ligand matched and mismatched groups. In an effort to better understand the GVL effect we focused our analysis on the regenerating NK cells without expression of broadly reactive inhibitory NK receptors (CD94/NKG2A and LIR1 [CD85j]) and monitored their regeneration in KIR/HLA-ligand matched as well as mismatched patients post-HCT. In addition, we monitored NK receptor expression on other innate effector cell populations that may be relevant for the GVL effect postallogeneic HCT, such as NKT cells, NKT-like cells, and $\gamma\delta$ T cells.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The study included 36 consecutive adult patients treated by allogeneic HCT in the Division of Allogeneic Stem Cell Transplantation, Department of Hematology/Oncology, Freiburg University Hospital. The details of their transplant history are given in Tables 1, S1, and S2. This study was approved by the University of Freiburg Hospital Ethics Committee; all clinical investigations were conducted according to the Declaration of Helsinki Ethical Principles. The patients provided informed written consent prior to inclusion in this study. All patients received granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilized peripheral blood progenitor cells from HLA A-, B-, and C-locus matched donors (32 patients) or HLA A-, B-locus matched, but C-locus mismatched donors (4 patients). The patients were only considered C-locus mismatched if the donor and recipient were assigned to different HLA-C allele groups (C1 or C2). For the purpose of this study we assigned the patients to the groups "KIR/HLA-ligand match" and "KIR/HLA-ligand mismatch," as defined shortly.

Sample Collection and Preparation

Blood samples were drawn from donors and recipients before and after transplantation. The blood samples post-HCT were collected on days 14 (n = 36), 28 (n = 35), 56 (n = 35), 84 (n = 33), 112 (n = 30), 140 (n = 29), 168 (n = 31), 252 (n = 16), and 336 (n = 1). All blood samples were drawn within 1 week of the specified day. In the case of missed collections, samples were obtained at interim time points whenever

Table 1. Characteristics of the KIR-Ligand Mismatched and KIR-Ligand Matched HCT Patients

	KIR-Ligand Mismatch	KIR-Ligand Match
N	22	14
Age	62.5 $\pm$ 8	56.5 $\pm$ 15
Sex (male / female)	18 / 4	6 / 8
Diagnosis (n)	AML/MDS = 16 B-NHL = 6	AML/MDS = 9 B-NHL = 5
HLA class I mismatch in GVHD direction (n)		
A	0	0
B	0	0
C	3	1
KIR haplotype (n)		
A/B	14	5
A/A	7	4
B/B	1	5
Transplantation (n)		
Related	5 (23%)	9 (64%)
Unrelated	17 (77%)	5 (36%)

AML indicates acute myelogenous leukemia; MDS, myelodysplastic syndrome; NHL, non-Hodgkin lymphoma; GVHD, graft-versus-host disease; KIR, killer cell immunoglobulin-like receptor.

possible. Three relapsed patients were excluded from further analysis when they had to undergo a second transplantation. All blood samples were freshly processed by isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) on Ficoll gradients (LSM 1077, PAA, Pasching, Austria), followed by staining for flow cytometry analysis.

KIR-Polymerase Chain Reaction (PCR) Genotyping

Donor DNA samples were extracted using QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). KIR genotyping was performed according to published protocols with minor modifications [20,22] to differentiate inhibitory KIRs from activating KIRs (KIR2DL1/S1, KIR2DL2/S2, KIR2DL3/S3, KIR2DL5, KIR3DL1/S1, KIR3DL2) and determine the KIR haplotypes.

Antibodies and Flow Cytometry

The following mouse antihuman monoclonal antibodies (mAbs) were used: CD3-FITC (UCHT1), TCR $\gamma\delta$ -FITC (IMMU 510), NKG2A-PE (Z199), CD85j-PE (HP-F1), TCR V α 24-FITC (C15), NKG2D-PE (ON72), NKp30-PE (Z25), NKp44-PE (Z231), NKp46-PE (BAB281), CD3-ECD (UCHT1), CD244-PE-Cy5 (C1.7.1), CD56-PE-Cy7 [N901(NKH-1)], CD158a,h-APC (EB6.B) (all from Beckman Coulter, Krefeld, Germany), and TCR $\alpha\beta$ -FITC (BMA031) (Serotec, Oxford, UK). The mAb TCR V β 11-PE-Cy7 (C21), CD158e-ECD (Z27), and CD158b,j-APC-Cy7 (GL183) were purchased as custom-conjugates (Beckman Coulter, Custom Design Service). For surface staining, PBMC were incubated with different mAb panels, as shown in Table S3. Following 15 minutes of incubation, 50 μ L of OptiLyse B solution (Beckman Coulter) were added for red cell lysis. After 15 minutes 500 μ L of double-distilled water (Braun, Melsungen, Germany) were added and the tubes were incubated for a further 20 minutes. The samples were washed (PBS + 1% human serum), fixed in 250 μ L 1% paraformaldehyde (IOTest 3 Fixative Solution; Beckman Coulter), and events were acquired on a CyAnTM ADP Flow Cytometer (Beckman Coulter). Voltage of the CyAn FlowCytometer was first adjusted using appropriate isotype controls for each color. Then, compensation beads for each color (antimouse Ig CompBeads, BD) were run on the instrument. Upon analysis of the surface markers automatic compensation was preformed using the FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA) program.

CD107a and Interferon (IFN)- γ Assay

PBMC were incubated in complete medium (IMDM, supplemented with L-Arginine, L-Asparagine, L-Glutamine, penicillin, streptomycin [all

from Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Germany] and heat-inactivated 10% male human serum [PAN-Biotech, Aidenbach, Germany]) for 4 hours at 37°C in the presence of monensin (GolgiStop; BD) the CD107a-PE-Cy5.5 mAb (H4A3) (Beckman Coulter, Custom Design Service) [23-25] and K562 cells (50.000 K562/150.000 PBMC). Then, the cells were washed (phosphate-buffered saline [PBS] + 1% human serum), stained for surface markers (30 minutes), fixed, and permeabilized by IntraPrep Permeabilization Reagent (Beckman Coulter). For intracellular staining we used the IFN- γ -Pacific Blue mAb (4S.B3) (eBioscience, Frankfurt, Germany). Following 30 minutes of incubation, the cells were washed, resuspended in 250 μ L IOTest 3 Fixative solution (Beckman Coulter) and analyzed (8 colors) on an LSR II cytometer using automatic compensation and the Diva software (BD Biosciences).

Definition of KIR/HLA-Ligand Match and KIR/HLA-Ligand Mismatch

Donor-recipient pairs were divided into the categories "KIR/HLA-ligand match" and "KIR/HLA-ligand mismatch" according to the receptor (KIR)-ligand (HLA) model [17,18]. Using high-resolution HLA typing all patients were assigned to C1, C2, or C1/C2 groups (HLA-C) and to the Bw4 group (HLA-B). In addition, donors' PBMC were examined by multicolor flow cytometry for NK cells expressing KIR2DL1/S1 (C2-specific), KIR2DL2/DL3/S2 (C1-specific), or KIR3DL1/S1 (Bw4-specific) (Table S4). A patient was assigned to the group "KIR/HLA-ligand match" if the KIR expressed by the donor's NK cells matched the patient's HLA-C or -Bw4 ligands. Thus, most patients in the KIR-ligand matched group expressed all 3 KIR ligands C1, C2, and Bw4. In contrast, a patient was assigned to the group "KIR/HLA-ligand mismatch" if the donor had NK cells expressing KIR for which the patient had no HLA-C or Bw4 ligand. This would mean that there was a KIR-mismatch in the graft-versus-host (GVH) direction. Although patients #14 and #18 were missing HLA C2 KIR ligands, they were assigned to the KIR/HLA-ligand match group because phenotypic analysis of their donors' effector cells failed to demonstrate KIR2DL1 expression [26].

Statistical Analyses

For a statistical comparison of the study groups 20,000 viable lymphocytes were collected per sample. All data were analyzed using SPSS software (Version 14.0 SPSS, Munich, Germany). The significance of the differences in cell counts between donor and recipient pairs following HCT were tested using the non-parametric Mann-Whitney *U*-test.

RESULTS

A New 6-Color Flow Cytometry Panel Differentiating NK and T Cell Subpopulations

We used special mAb panels to characterize inhibitory receptors on NK and T cells (Table S3, panels 1-4). To identify MHC unrestricted effector cells, we first gated on the NKG2A⁻ LIR1⁻ effector cells and, alternatively, on effector cells that expressed either NKG2A or LIR1. Then, we identified the NK (CD3⁻ CD56⁺) (panel 1), NKT-like (TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD56⁺) (panel 2), $\gamma\delta$ T cell (TCR $\gamma\delta$ ⁺) (panel 3), and NKT (V α 24⁺ V β 11⁺) (panel 4) cell subsets within this population. Because both NKG2A/CD94 and LIR1 (CD85j) represent inhibitory receptors with broad reactivity against different HLA class I alleles, we designated NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells as "potentially alloreactive." The NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cell subset was further gated on cells which were single-, double-, or triple-positive for KIR2DL1/S1 (CD158a,h), KIR2DL2/L3/S2, (CD158b,j), and KIR3DL1/S1 (CD158e). In addition, we used 4- or 5-color flow cytometry to investigate the expression of activating receptors NKG2D, CD244 (2B4), NKp30, NKp44, and NKp46 on each of these effector cell subsets (Table S3, panels 5-8).

NKG2A⁻ LIR1⁻ NK Cells in the Course of HCT

Initially, we compared patients before HCT and their healthy donors for the presence of MHC unrestricted killer cells without broadly reactive NK-inhibitory receptors, designated here the NKG2A⁻ LIR1⁻ phenotype (Figure 1A). Only NK cells of the NKG2A⁻ LIR1⁻ phenotype, but not NKG2A⁻ LIR1⁻ NKT-like T cells or $\gamma\delta$ T cells, were decreased in the patients before HCT, when compared to the healthy donors ($P < .001$). In contrast, donors and patients had similar levels of NK cells expressing 1 or both of the broadly reactive NK inhibitory receptors NKG2A and LIR1 (Figure 1B). NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells were already detectable in the donors and became a prominent NK cell subpopulation in the late time course following HCT in some of the patients (Figure 2). There was a relatively sharp rise of NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells between days 28 and 84 post-HCT. Although NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells were, overall, a relatively small population, compared to NK cells expressing NKG2A and/or LIR1, this population continued to rise until approximately day 112 post-HCT, when the levels of the other NK cells were decreasing (Figure 3). As determined by donor KIR genotyping, increased levels of NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells post-HCT were more prominent in patients of the A/B than A/A haplotypes, but there was no apparent difference in the levels of NKG2A⁺ and/or LIR1⁺ NK cells (Figure 3). Interestingly, patients re-

maining in complete remission (CR) had significantly more NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells, but not NKG2A⁺ and/or LIR1⁺ NK cells, compared to relapsed patients as observed at 3 independent time points following HCT (Figure 4).

Increased NKG2A⁻ LIR1⁻ NK Cells in KIR/HLA-Ligand Mismatched Patients following HCT

We monitored NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells from day 14, up to day 168 post-HCT (Figure 5). Assignment of the patients to the "KIR/HLA-ligand match" and "mismatch" groups was performed according to the "KIR/HLA-ligand model" (see the Methods section) [18,26]. We noticed significantly increased levels of NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells in the blood of the KIR/HLA-ligand mismatched patients compared to the matched patients (Figure 5). This difference was mainly caused by an increase in the amount of NKG2A⁻ LIR1⁻ CD56-dim NK cells (Figure S1a). Nevertheless, the KIR/HLA-ligand mismatched patients also had a tendency toward higher levels of NKG2A⁻ LIR1⁻ CD56-bright NK cells after HCT than the matched patients (Figure S1b). These statistically significant differences were present at several independent time points following HCT, suggesting that these were biologically relevant.

Next, we analyzed the NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells in more detail with regard to expression of the relevant KIR, as well as functional capacity using 8-color flow cytometry. NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells expressing KIR for which the patient had no HLA class I ligand (designated KIR-mismatched NK cells) were detectable at relatively low levels before HCT. Following HCT these KIR mismatched NK cells increased in most patients to higher levels than observed in the particular donors with the 2 representative patients shown in Figure 6. Patient #21 had 2 KIR/HLA-ligand mismatches in the presence of an HLA-C group mismatch (donor C1/C2 and patient C2/C2), whereas patient #28 was HLA identical to his donor but still had a KIR3DL1-Bw4 mismatch (Tables 2 and S1). Because the donors for patients #21 and #28 did not carry KIR3DS1, all NK cells expressing KIR3DL1/S1 in these patients following HCT expressed the inhibitory form KIR3DL1. However, patient #21 carried the KIR2DL2/3 and KIR2DS2/3 genes; therefore, both forms of this receptor could be expressed by the single KIR2DL2/L3/S2⁺ cells in this patient. We examined the functional activity of these potentially alloreactive NK cells by measuring their surface CD107a expression and IFN- γ secretion following stimulation by K562 cells [23-25]. NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells expressing the mismatched KIRs, as well as other inhibitory KIRs (marked by an arrow in Figure 6A) could clearly be stimulated by K562 cells, revealing their alloreactive potential against target cells that did not express

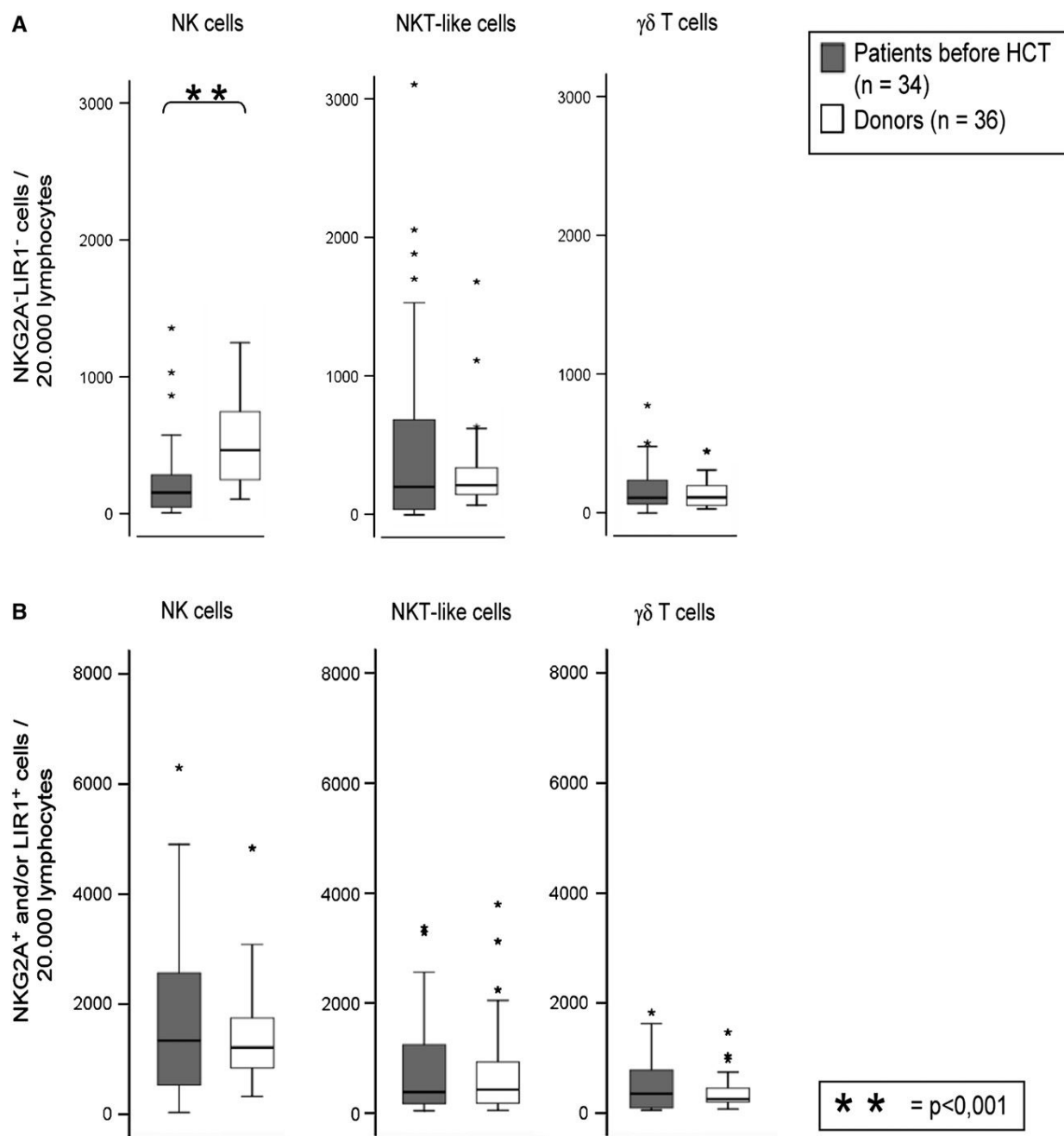


Figure 1. Characterization of effector cells positive or negative for NKG2A/LIR1 inhibitory receptors in patients before HCT and their donors. The numbers of NK cells, NKT-like cells (TCR $\alpha\beta^+$, CD56⁺) and $\gamma\delta$ T cells were gated on (A) all NKG2A⁺LIR1⁺, as well as on (B) NKG2A⁺ and/or LIR1⁺ effector cells. "NKG2A⁺ and/or LIR1⁺ effector cells" include the NKG2A⁺LIR1⁺, the LIR1⁺NKG2A⁺, and the LIR1⁺NKG2A⁺ cell populations. Cell numbers were determined by flow cytometry from a total of 20,000 cells in patients before HCT and their donors. Highly statistical significant differences (Mann-Whitney U-Test) ($P < .001$) are indicated by **.

a corresponding inhibitory HLA class I ligand (Figure 6B). In addition, we gated on NKG2A⁺LIR1⁺ NK cells that expressed only the mismatched KIR but none of the KIR/HLA-ligand matched inhibitory or activating receptors because such NK cells should find no inhibitory HLA class I ligands on the patient's leukemia cells. Remarkably, even these single mismatched KIR⁺ NK cells appeared to be functional

effector cells showing a 2- to 4-fold increase in CD107a expression while there was some, albeit lower, induction of INF- γ secretion.

Activating Receptors on NK Cells Post-HCT

Besides analysis of the diverse KIR, NKG2A, and LIR1, we studied expression of the activating receptors NKG2D, 2B4, NKp30, NKp44, and NKp46 on

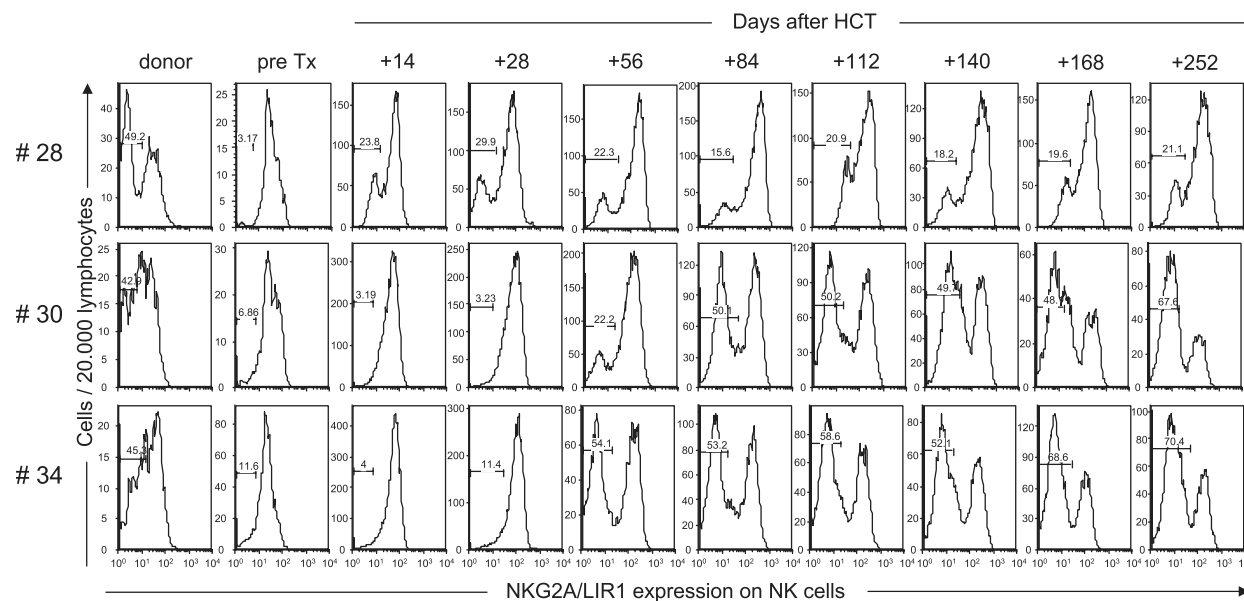


Figure 2. NKG2A/LIR1 expression on NK cells of representative KIR/HLA-ligand mismatched donor/patient pairs. The NK cells of particular donors and representative patients #28, #30, and #34 were analyzed for NKG2A/LIR1 expression by gating on CD3⁺ CD56⁺ lymphocytes before HCT (pre Tx) and at different time points following HCT.

patients' NK cells using separate mAb panels (Figure 7, Table S3, panels 5-8). The mean-fluorescence index (MFI) was more informative than percentages of positive cells because most NK cells expressed NKG2D, 2B4, and NKp46, whereas NKp44 was only expressed by the CD56-bright NK cells (Figure 7, and data not shown). During the observation period (168 days) there was a remarkable increase in the expression levels of NKG2D in both KIR/HLA-ligand matched as well as mismatched patients, although it appears that the KIR/HLA-ligand mismatched patients might have transiently higher expression levels of NKG2D than KIR/HLA-ligand matched patients. Similarly, the expression levels of NKp30, NKp44, and NKp46 increased following HCT, and this phenomenon was observed in both the KIR/HLA-ligand mismatched and matched patients. These expression levels were measured on all NK cells because gating on the NKG2A⁺ LIR1⁺ NK cell subpopulation would have involved additional customized mAb that were unavailable at the time of our study.

NK Receptor Expression on T Cells Post-HCT

Besides typical NK cells we also measured the blood percentages of the other effector cell subsets (NKT-like, $\gamma\delta$ T cells, $\alpha\beta$ T cells) and their differential expression of KIR (Table S3). The percentages of NKT cells and $\gamma\delta$ T cells in our patients were rather low compared to NK cells (data not shown). KIR expression on these subsets increased posttransplant in only a few of the patients. Typical NKT cells (V α 24⁺ V β 11⁺) were extremely rare in the patients' and donors' blood. Therefore, the amount of blood

obtained and the samples stained did not allow detailed analysis of the NKT cells. However, when staining more lymphocytes we found that most V α 24⁺ V β 11⁺ NKT cells expressed KIRs, whereas T cells that were single positive for V α 24 or V β 11 did not (data not shown). Naturally, conventional $\alpha\beta$ T cells of donor origin increased in these patients post-HCT, but KIR expression on these $\alpha\beta$ T cells was only noticed in exceptional patients.

DISCUSSION

In normal donors 20% to 50% of NK cells belong to the NKG2A⁺ LIR1⁺ subset, whereas approximately 40% to 50% of NK cells express NKG2A and 15% to 50% LIR1, representing nonoverlapping NK cell subsets (our unpublished results). To our knowledge, NKG2A⁺ LIR1⁺ NK cells have not been specifically examined to date [19,27]. This subset was increased in healthy donors compared to the patients before HCT, in patients that remained in remission compared to relapsed patients, and in KIR-ligand mismatched patients compared to KIR/HLA-ligand matched patients. Interestingly, there was no difference between patients in remission and relapsed patients in the percentages of NKG2A⁺ NK cells. The most straightforward interpretation of our observations is that NKG2A⁺ LIR1⁺ NK cells play a protective role in the GVL effect. The tendency toward significance of different NKG2A⁺ LIR1⁺ NK cell numbers in KIR/HLA-ligand mismatched and matched patients was already present by days 56 and 84 post-HCT (Figure 5). Because at these time points most

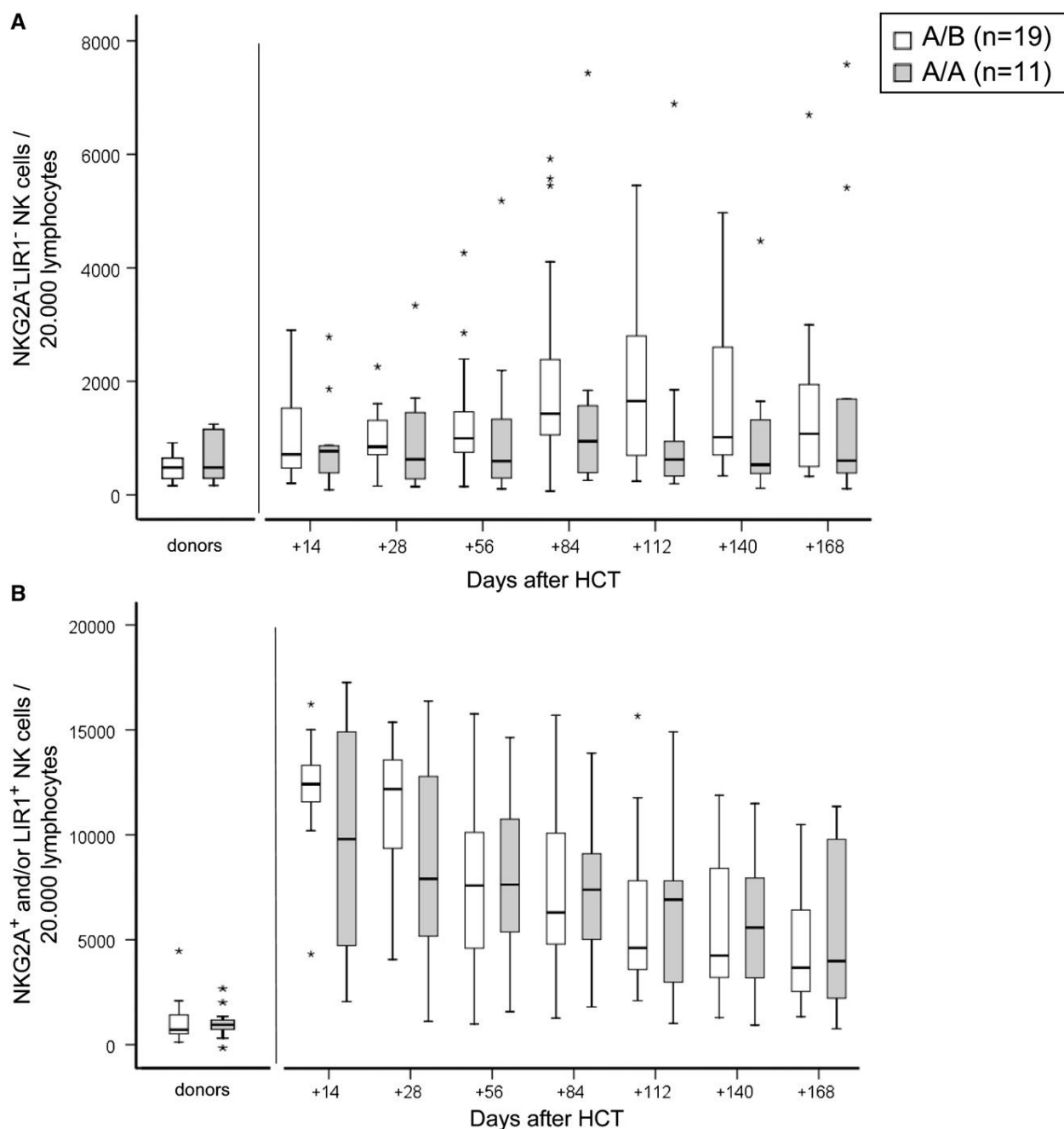


Figure 3. NK cell levels following HCT analyzed by the donor KIR haplotype. The numbers of (A) NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells and (B) NKG2A⁺ and/or LIR1⁺ NK cells, determined from a total of 20,000 effector cells by flow cytometry at different time points following HCT, were analyzed in the donors and their recipients according to the A/B and A/A KIR haplotypes. Patients of the B/B haplotype were not included in this analysis because 5 of 6 B/B patients were KIR-ligand matched.

patients were still in clinical remission, this suggests that decreasing percentages of NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells preceded leukemic relapses and not vice versa. Thus, higher numbers of antileukemic NK cells may be important for maintaining remission in the time period after day 112. Extrapolating from these data we propose that the adoptive transfer of donor NK cells [28] at some point during the time period between 1 and 3 months after HCT may protect against leukemia

relapse, and that prophylactic infusions of enriched NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells may be particularly protective. Furthermore, we observed that expansion of NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells was more evident in patients with the A/B haplotype than in patients with the A/A haplotype. However, there was no apparent difference in the post-HCT rise of the NKG2A⁺ and/or LIR1⁺ NK cells associated with the different KIR haplotypes (Figure 3). Patients with A/B KIR haplotypes carry

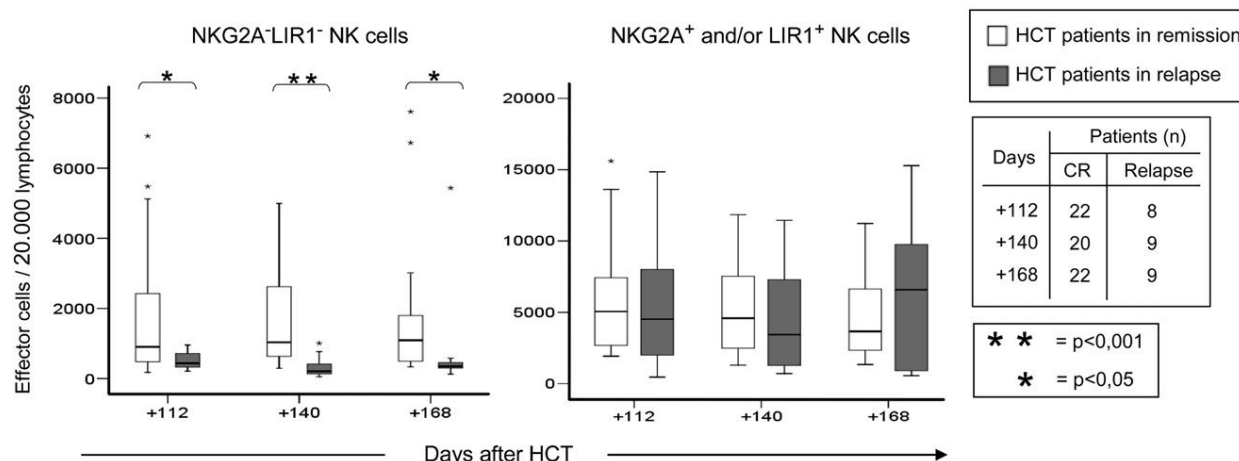


Figure 4. Effector cells positive or negative for NKG2A/LIR1 inhibitory receptors in the posttransplant course. The numbers of NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells as well as NKG2A⁺ and/or LIR1⁺ NK cells in patients in CR and in relapse were measured by flow cytometry on days 112, 140, and 168 following HCT. "NKG2A⁺ and/or LIR1⁺ NK cells" include the NKG2A⁺ LIR1⁻, the LIR1⁻ NKG2A⁺, and the LIR1⁺ NKG2A⁺ subpopulations. The number of patients (n) in both groups at each of these time points is shown on the right. Statistically significant differences (Mann-Whitney U-test) ($P < .05$) are indicated by * and highly significant differences ($P < .001$) are indicated by **.

a greater diversity of HLA allele-specific inhibitory and activating receptors than A/A or B/B patients. The presence of the A-haplotype with allele-specific inhibitory KIRs may be required for education of NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells because these cells express less inhibitory receptors than NKG2A⁺ and/or LIR1⁺ NK cells. In addition, the presence of activating KIR-genes in the B-haplotypes may enhance NK cell proliferation and the GVL effect [29,30].

Most of the NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells that were increased in the KIR/HLA-ligand mismatched patients were of the CD56-dim phenotype (Figure S1). CD56-dim NK cells are the more cytotoxic NK cell subset, naturally expressing lower levels of NKG2A than CD56-bright NK cells that produce cytokines [31]. The NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells could be considered developmentally immature, but this probably only applies to NKG2A⁻ LIR1⁻ KIR⁻ NK cells that produce less IFN- γ and lack cytotoxic potential [32].

However, the vast majority of the NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells are mature NK cells because they express various KIRs and are functional effector cells against HLA deficient target cells (Figure 6). The engrafted NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells expressing KIRs for which the patient had no HLA class I ligand also increased post-HCT and remained at these levels for at least 6 to 9 months, suggesting that their GVL effect is maintained for a long period of time [33,34]. The potential for alloreactivity by single KIR⁺ NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells was documented for several patients using the CD107a assay following stimulation by K562 cells [23] (Figure 6). These experiments confirmed that, regardless of potential expression of an activating KIR, these were functional alloreactive NK cells. In a recent related study [35], single KIR⁺ NK clones from transplanted pediatric patients were tested for lysis of autologous leukemia cells using conventional 51-Cr release cytotoxicity assays. Our CD107a flow cytometry assay

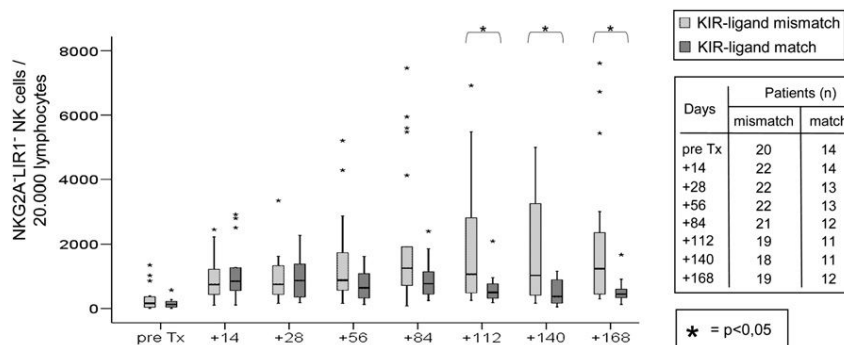
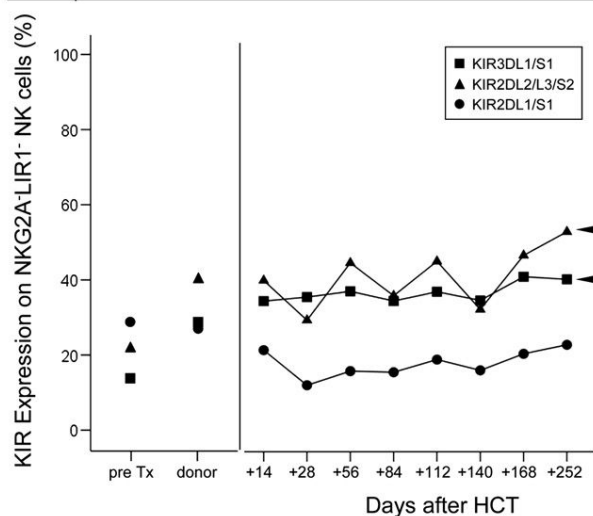
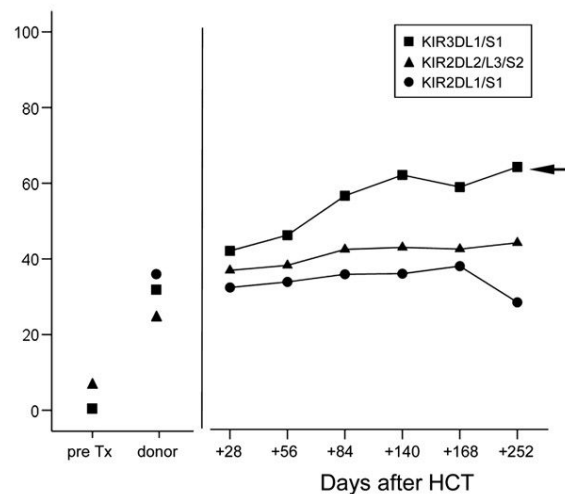


Figure 5. Comparison of NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cell subpopulations in KIR/HLA-ligand mismatched and KIR/HLA-ligand matched patients. NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells were measured in KIR/HLA-ligand mismatched and KIR/HLA-ligand matched transplanted patients before HCT (pre Tx) and at different time points following HCT until day 168. The numbers of all NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells from a total of 20,000 lymphocytes for each patient are compared. For each time point, the numbers of patients (n) analyzed in the KIR/HLA-ligand mismatched and matched groups are given. Statistically significant differences between the groups are indicated by * (Mann-Whitney U-test).

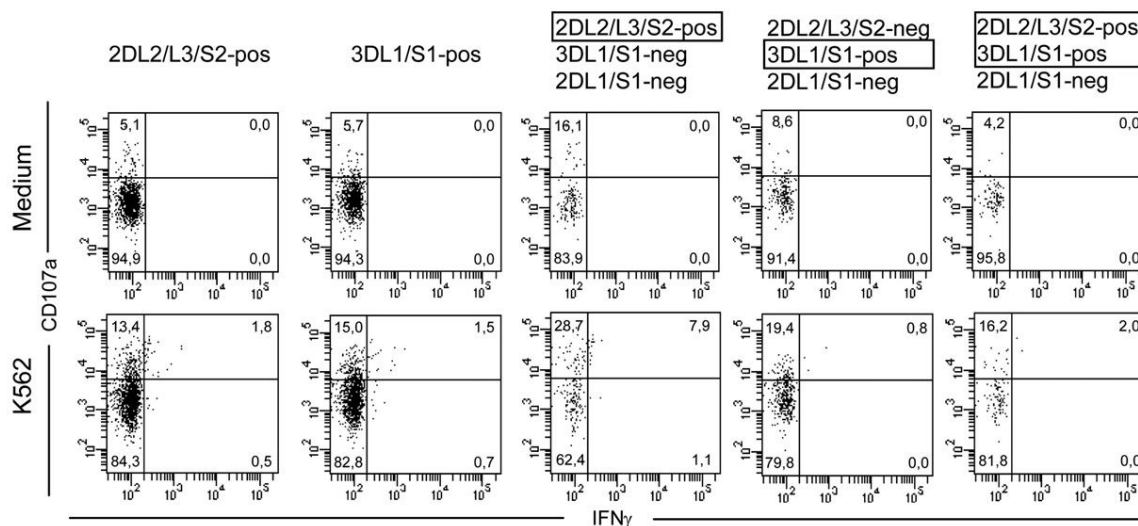
A # 21 (KIR2DL2/3 - C1 and KIR3DL1 - Bw4 mismatch)



28 (KIR3DL1 - Bw4 mismatch)



B # 21 (KIR2DL2/3 - C1 and KIR3DL1 - Bw4 mismatch)



28 (KIR3DL1 - Bw4 mismatch)

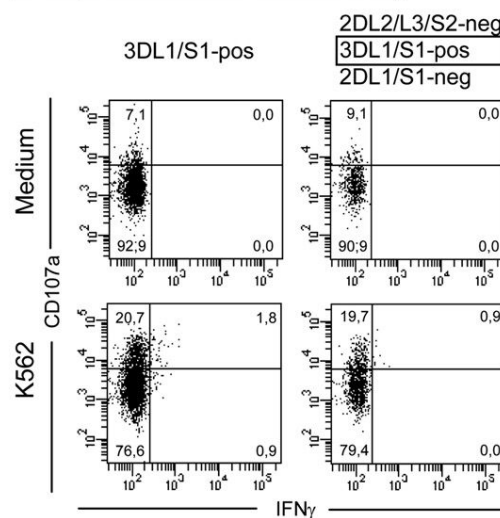


Table 2. Clinical Details of KIR-Ligand Mismatched Transplanted Patients #21 and #28 Who Were Examined in Detail in Figure 6

	# 21	# 28
Age/sex	57/f	52/m
Diagnosis	MDS	MDS
Disease status at HCT	untreated	untreated
Donor type	unrelated	unrelated
KIR ligand (donor)	C1,C2	C1,C2
KIR ligand (patient)	C2	C1,C2
KIR haplotype (donor)	A/B	A/A
Inhibitory KIR (donor)	2DL1,2DL2/3,3DL1	2DL1,2DL3,3DL1
Activating KIR (donor)	2DS2/3	No
KIR-ligand mismatch	KIR2DL2/3 - HLA-C1 KIR3DL1 - HLA-Bw4	KIR3DL1 - HLA-Bw4
GVHD (acute)	Grade 1 (skin)	Grade 4 (skin, gut)
GVHD (chronic)	mild day +192 (skin)	severe day +179 (gut) until day +195
Donor chimerism	Yes	Yes
Outcome	CR (+32 months) Alive	CR (+30 months) Alive

MDS indicates myelodysplastic syndrome; f, female; m, male; CR, complete remission; KIR, killer cell immunoglobulin-like receptor; HCT, hematopoietic cell transplant; GVHD, graft-versus-host disease.

offers the advantage of analyzing very rare NK cell subpopulations that have not been activated by IL-2 *in vitro* directly upon isolation from the patients' blood. Expression of CD107a on the surface of NK cells correlates with degranulation following stimulation and represents a sensitive marker of NK cell activity [23,36]. Testing autologous leukemia cells for "the lack of inhibition" of NK cell lysis by a missing HLA class I ligand offers, in our opinion, no definitive advantage to K562 cells. Nevertheless, K562 cells differ from autologous leukemia cells in the spectrum of ligands for NK activating receptors, most of which are yet uncharacterized [11,12]. Autologous leukemia cells were only available in a few patients, and are frequently contaminated by normal bone marrow cells. These facts and the condition of the leukemia cells following thawing prevented meaningful functional experiments in our system. This may be why other studies used fresh allogeneic leukemia cells as well as the HLA class I A, B, and C negative Epstein-Barr virus transformed B cell line .221 as target cells [34].

The GVL effect by NK cells implies that leukemia cells express ligands for activating NK receptors. Because ligands for these receptors on leukemia cells remain poorly characterized [9,11,12], it is still impossible to predict which patients' leukemia cells will be GVL targets. Although the expression of activating receptors on leukemia cells cannot be influenced, it is possible to select donors expressing an inhibitory KIR without a corresponding HLA class I ligand on

the recipient's leukemia cells [37]. This can occur in both the HLA-mismatched or HLA-matched setting of HCT. Nevertheless, most studies on the protective role of potentially alloreactive NK cells were conducted in the haploidentical setting of HCT [15,17,33-35,38-40] or investigated both HLA-matched and mismatched patients [19,20]. Only a few groups have focused their analysis on HLA-matched patients or HLA-identical siblings [18,21,30,41,42]. However, there is clearly a lower incidence of treatment related complications following HLA matched allogeneic HCT [37], whereas a mismatch at a single or multiple loci is associated with higher treatment-related mortality and graft-versus-host disease, regardless of other factors such as patient age, disease status, or use of T cell depletion [43]. For fully HLA-matched patients, haplotype matching seems to further decrease the likelihood of severe graft-versus-host disease [44]. Thus, practically all patients in our institution were HLA-matched because our donors were HLA-identical siblings or unrelated donors, primarily selected based on a match in HLA A, B and -DRB1.

One may question if functional alloreactive NK cells exist post-HCT in the situation of an HLA-match. We found at least 9 donors in our relatively small study that expressed KIR for which they themselves lacked an HLA class I ligand ("aberrant" KIR). Most aberrant KIRs were expressed by NK cells that coexpressed additional inhibitory receptors. Although

Figure 6. Subpopulations of NKG2A⁺ LIR1⁺ NK cells expressing individual KIR and their alloreactive potential. (A) The numbers of NKG2A⁺ LIR1⁺ NK cells, expressing different KIR, from KIR/HLA-ligand mismatched patients #21 and #28 before (pre Tx) and at several time points following HCT, compared to their donors. NK cell subsets expressing the KIR for which the patients had no HLA class I ligand (marked by an arrow). (B) CD107a expression and intracellular IFN- γ secretion following stimulation by medium or K562 cells were measured by flow cytometry in subpopulations of the NKG2A⁺ LIR1⁺ NK cells from patients #21 (days 331 post-HCT) and #28 (day 357) (subsets indicated above the dot plots), expressing KIR for which the patients had no HLA class I ligands (outlined by a frame). The percentages of positive cells are indicated in the quadrants. KIR2DL2/L3/S2⁺ or KIR3DL1/S1⁺ gated dot plots included NKG2A⁺ LIR1⁺ NK cells expressing their only inhibitory KIR. Analysis of dot plots gated on multiple KIR was restricted to NK cells expressing the mismatched KIR as their only inhibitory receptors (for patient #21 KIR2DL2/L3/S2⁺ and/or KIR3DL1/S1⁺ and for #28 KIR3DL1/S1⁺) (for the KIR genotype see Tables 2/S1).

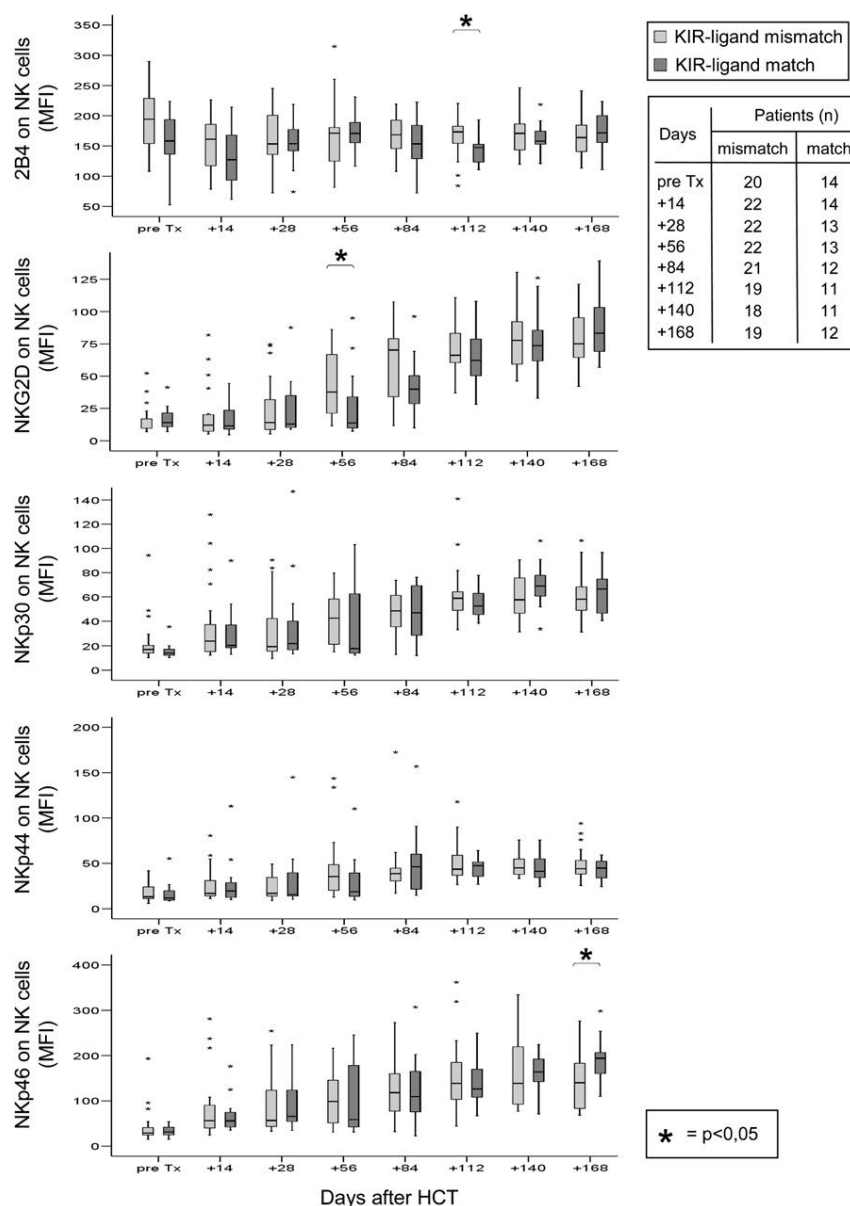


Figure 7. Activating receptors on NK cells following KIR/HLA-ligand matched and mismatched HCT. The mean fluorescence index (MFI) was determined by flow cytometry for the activating receptors 2B4, NKG2D, NKP30, NKP44, and NKP46 expressed by NK cells from KIR/HLA-ligand mismatched and KIR/HLA-ligand matched transplanted patients before HCT (pre Tx) and at different time points following HCT. The numbers of patients (n) in the KIR/HLA-ligand mismatched and matched groups for each time point are indicated on the right. Statistically significant differences between the KIR/HLA-ligand mismatched and matched patients are indicated (*).

this would prevent most autoreactivity against normal cells, such NK cells may still mediate a significant GVL effect because leukemia cells may express ligands for activating NK receptors so that the total activating signals may prevail over the inhibitory signals [9,11]. In addition, leukemia cells may lose single HLA class I alleles that would make them sensitive for GVL effects by rare NK cell subsets [45]. We show that such NK cells expressing aberrant KIR increase post-HCT (eg, KIR3DL1⁺ cells in patients #21 and #28; Figure 6). Although NK cells lacking self-HLA class I receptors are normally considered to be developmen-

tally and functionally immature [24,46], the present data and a study published recently [42] suggest that NK cells expressing the HLA-mismatched KIRs, and no other inhibitory receptors, may actually be functional following HCT (Figure 6B). Nevertheless, we cannot exclude that they are somewhat functionally impaired, as has been suggested by another study in a haploidentical setting [34]. Such single KIR⁺ NK cells with alloreactive potential may be present in all HLA-matched HCT-patients who are not positive for all 3 KIR/HLA ligands (C1, C2, and Bw4). An intriguing hypothesis is that, even in the healthy donors,

such NK cells might have a "leukemia-protective" effect. Further experiments are needed to investigate how NK education following stem cell transplantation might differ from the physiological development of NK cells.

Expression levels of the activating receptors NKG2D, NKp30, NKp44, and NKp46 on NK cells increased in both patient groups during the observation period following HCT (until day 168) (Figure 7). Most remarkable was the rise in NKG2D-expression on NK cells that could be observed in KIR/HLA-ligand mismatched patients around day +56 and in the KIR/HLA-ligand matched patients around day +112. Increased expression levels of NK activating receptors at later time points following HCT may represent a mechanism in maintaining remission following HLA mismatched, as well as matched transplants.

In addition to NK cells, we also investigated the expression of NK receptors on other effector cell populations such as NKT cells, NKT-like cells, as well as other $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells. It appears that NKG2A⁻ LIR1⁻ NKT-like cells and NKG2A⁻ LIR1⁻ $\gamma\delta$ T cells expressing KIRs transiently increased following HCT compared to the levels in the patient pre-HCT or those seen in the donor. The vast majority of cytotoxic $\gamma\delta$ T cells expressed CD94/NKG2A [4,47] and the NKG2A⁻ LIR1⁻ phenotype on T cells is rather infrequent. Expression of broadly reactive inhibitory receptors is restricted to T cells with a potential for autoreactivity. These receptors downmodulate the activating signals from the TCR and protect from the autoimmune capacity of these effector cells. In other words, T cells expressing broadly reactive inhibitory receptors need additional signals from the TCR to play a role in GVH and GVL responses, and the antigenic specificities of these cells depend on the T cell repertoire of the particular donor. Our data showing relatively few KIR-expressing T cells after HCT suggest that such MHC unrestricted and potentially autoreactive T cells are less important for the GVL effect than NK cells.

In summary, our data suggest that NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells are important effector cells in GVL. NK cells, expressing only 1 inhibitory KIR for which the patient has no ligand, may mediate GVL effects in haploidentical, KIR/HLA-ligand mismatched, as well as in HLA-matched, KIR/HLA-ligand mismatched HCT patients. The function of such NK cells following HCT needs to be compared to similar NK cells present in normal donors, as well as to regular NKG2A⁺ NK cells.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the staff of the bone marrow transplantation clinics, laboratories, and Station

Löhr for their assistance and support, Irmgard Matt for organizing the clinical and HLA typing data, and Roland Mertelsmann and Martin Werner for support and encouragement.

Financial disclosure: This work was supported by grant DJCLS R 05/01 from the Deutsche José Carreras Leukämie Stiftung to J.F. and P.F. and SFB 620 Z2 to P.F. Markus Kaymer is employed by Beckman Coulter, Krefeld, Germany, a company acting in health care. The other authors declare no competing financial interests.

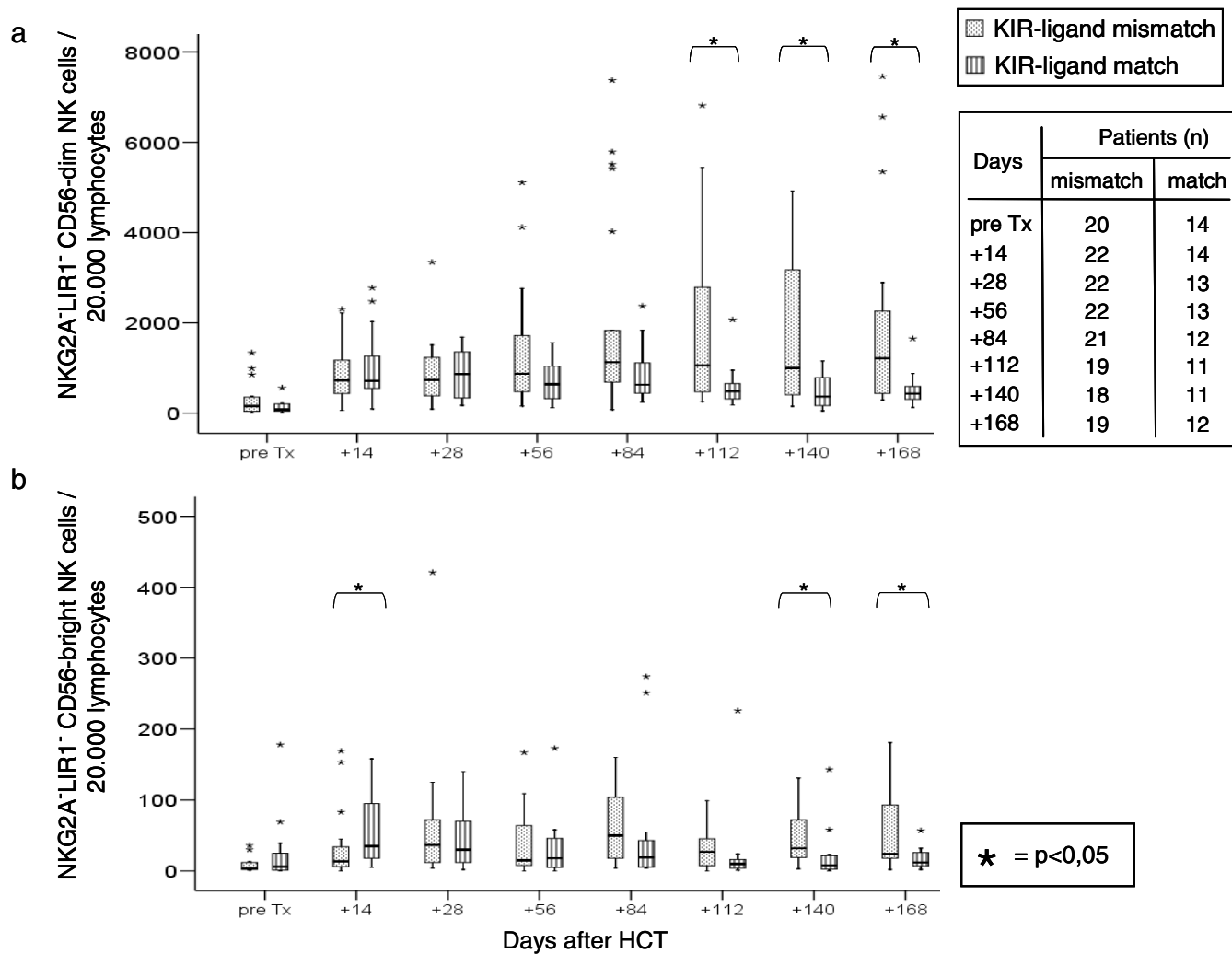
SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbmt.2009.12.008.

REFERENCES

1. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002;295:2097-2100.
2. Velardi A. Role of KIRs and KIR ligands in hematopoietic transplantation. *Curr Opin Immunol*. 2008;20:581-587.
3. Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:201-214.
4. Mingari MC, Vitale C, Cambiaggi A, et al. Cytolytic T lymphocytes displaying natural killer (NK)-like activity: expression of NK-related functional receptors for HLA class I molecules (p58 and CD94) and inhibitory effect on the TCR-mediated target cell lysis or lymphokine production. *Int Immunol*. 1995;7:697-703.
5. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*. 1998;391:795-799.
6. Trowsdale J. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. *Immunity*. 2001;15:363-374.
7. Cosman D, Fanger N, Borges L, et al. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity*. 1997;7:273-282.
8. Hansasuta P, Dong T, Thananchai H, et al. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur J Immunol*. 2004;34:1673-1679.
9. Moretta A, Bottino C, Vitale M, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:197-223.
10. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity*. 1997;7:739-751.
11. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol*. 2008;9:495-502.
12. Lanier LL. Evolutionary struggles between NK cells and viruses. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:259-268.
13. Bahram S. MIC genes: from genetics to biology. *Adv Immunol*. 2000;76:1-60.
14. Pende D, Cantoni C, Rivera P, et al. Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur J Immunol*. 2001;31:1076-1086.
15. Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood*. 2003;102:814-819.

16. Beelen DW, Ottinger HD, Ferencik S, et al. Genotypic inhibitory killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility enhances the long-term antileukemic effect of unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias. *Blood*. 2005;105:2594-2600.
17. Leung W, Iyengar R, Turner V, et al. Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. *J Immunol*. 2004;172:644-650.
18. Hsu KC, Keever-Taylor CA, Wilton A, et al. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood*. 2005;105:4878-4884.
19. Miller JS, Cooley S, Parham P, et al. Missing KIR ligands are associated with less relapse and increased graft-versus-host disease (GVHD) following unrelated donor allogeneic HCT. *Blood*. 2007;109:5058-5061.
20. Fischer JC, Ottinger H, Ferencik S, et al. Relevance of C1 and C2 epitopes for hematopoietic stem cell transplantation: role for sequential acquisition of HLA-C-specific inhibitory killer Ig-like receptor. *J Immunol*. 2007;178:3918-3923.
21. Shilling HG, McQueen KL, Cheng NW, Shizuru JA, Negrin RS, Parham P. Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2003;101:3730-3740.
22. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*. 1997;7:753-763.
23. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*. 2004;294:15-22.
24. Anfossi N, Andre P, Guia S, et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*. 2006;25:331-342.
25. Uhrberg M. The CD107 mobilization assay: viable isolation and immunotherapeutic potential of tumor-cytolytic NK cells. *Leukemia*. 2005;19:707-709.
26. Leung W, Iyengar R, Triplett B, et al. Comparison of killer Ig-like receptor genotyping and phenotyping for selection of allogeneic blood stem cell donors. *J Immunol*. 2005;174:6540-6545.
27. Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Natural killer cell alloreactivity in allogeneic hematopoietic transplantation. *Curr Opin Oncol*. 2007;19:142-147.
28. Passweg JR, Tichelli A, Meyer-Monard S, et al. Purified donor NK-lymphocyte infusion to consolidate engraftment after haploidentical stem cell transplantation. *Leukemia*. 2004;18:1835-1838.
29. Cooley S, Trachtenberg E, Bergemann TL, et al. Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2009;113:726-732.
30. Verheyden S, Schots R, Duquet W, Demanet C. A defined donor activating natural killer cell receptor genotype protects against leukemic relapse after related HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2005;19:1446-1451.
31. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001;22:633-640.
32. Cooley S, Xiao F, Pitt M, et al. A subpopulation of human peripheral blood NK cells that lacks inhibitory receptors for self-MHC is developmentally immature. *Blood*. 2007;110:578-586.
33. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 1999;94:333-339.
34. Vago L, Forno B, Sormani MP, et al. Temporal, quantitative, and functional characteristics of single-KIR-positive alloreactive natural killer cell recovery account for impaired graft-versus-leukemia activity after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2008;112:3488-3499.
35. Pende D, Marcenaro S, Falco M, et al. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and re-definition of inhibitory KIR specificity. *Blood*. 2008.
36. Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G, Deniz G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol*. 2009;254:149-154.
37. Appelbaum FR. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia when a matched related donor is not available. *Hematology (Educ Program Am Soc Hematol)*. 2008;2008:412-417.
38. Davies SM, Ruggieri L, DeFor T, et al. Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor. *Blood*. 2002;100:3825-3827.
39. Nguyen S, Dhedin N, Vernant JP, et al. NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood*. 2005;105:4135-4142.
40. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, et al. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood*. 2007;110:433-440.
41. Cook MA, Milligan DW, Fegan CD, et al. The impact of donor KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia. *Blood*. 2004;103:1521-1526.
42. Yu J, Venstrom JM, Liu XR, et al. Breaking tolerance to self, circulating natural killer cells expressing inhibitory KIR for non-self HLA exhibit effector function after T cell-depleted allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2009;113:3875-3884.
43. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood*. 2007;110:4576-4583.
44. Petersdorf EW, Malkki M, Gooley TA, Martin PJ, Guo Z. MHC haplotype matching for unrelated hematopoietic cell transplantation. *PLoS Med*. 2007;4:e8.
45. Demanet C, Mulder A, Deney V, et al. Down-regulation of HLA-A and HLA-Bw6, but not HLA-Bw4, allospecificities in leukemic cells: an escape mechanism from CTL and NK attack? *Blood*. 2004;103:3122-3130.
46. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*. 2005;436:709-713.
47. Fisch P, Meuer E, Pende D, et al. Control of B cell lymphoma recognition via natural killer inhibitory receptors implies a role for human Vgamma9/Vdelta2 T cells in tumor immunity. *Eur J Immunol*. 1997;27:3368-3379.



2.6 iNKT cell reference values in children: The absolute iNKT cell count is stable from birth to adulthood

Status: eingereicht (Februar 2011)

Scandinavian Journal of Immunology, Impact Factor: 2,108

Eigener Anteil an der Publikation:

- Entwicklung der durchflusszytometrischen Protokolle
- Hilfe bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

2.6.1 Zusammenfassung

Invariante NKT (iNKT)–Zellen sind eine Subpopulation der T-Zellen, deren TCR aus einer invarianten α -Kette (V α 24) in Kombination mit einer β -Kette (V β 11) besteht. Dieser TCR bindet an ein MHC-ähnliches Molekül, CD1d, das nicht Peptide sondern Glycolipide präsentiert. Erkennen iNKT-Zellen diese Lipide kommt es zu einer Ausschüttung der Zytokine IL-4, IFN- γ und IL-10. Dies führt zu einer Aktivierung weiterer Immunzellen. Die Fähigkeit, schnell große Mengen an Zytokine zu sekretieren, macht sie zu einer Brücke zwischen angeborenen und adaptiven Immunsystem.

Die Frequenz dieser iNKT-Zellen ist in adulten Proben sehr gering. Im Rahmen dieser Veröffentlichung wurden 64 Proben von Kindern im Alter zwischen 7 Monate bis 18 Jahren analysiert. Mit zwei verschiedenen durchflusszytometrischen Färbungen wurden iNKT-Zellen identifiziert und quantifiziert. In der ersten Färbung wurden CD3 positive T-Zellen gefärbt, die TCRV α 24 und TCRV β 11 exprimieren, in der zweiten Färbung wurde mit dem monoklonalen Antikörper 6B11 gefärbt. Die absoluten Zahlen liegen mit der ersten Färbung bei 100-6624 und 515-8762 bei der zweiten Färbung pro ml Blut. Es konnte kein Unterschied in der absoluten Zahl der iNKT-Zellen zwischen Kindern und Erwachsenen, zwischen den Geschlechtern und auch ebenso kein Unterschied zwischen Kindern und Nabelschnurblut festgestellt werden. Die Frequenz bewegte sich von 0.008-0.374 bzw. 0.021-0.712 in der zweiten Färbung. Es konnte ein moderater, jedoch signifikanter Anstieg in der Frequenz im Alter festgestellt werden. Dieser Anstieg lässt sich mit dem bekannten Rückgang der absoluten Zahl an T-Zellen im Alter erklären.

Diese Werte sind die ersten dieser Art, die Referenzwerte für iNKT-Zellen zeigen. Bei der Durchführung dieses Projektes wurden zum einen die Referenzwerte für iNKT-Zellen in Kindern erstellt, zum anderen auch das KIR-Repertoire dieser Kinder analysiert. Es wurden auch hier durchflusszytometrische Analysen in Kombinationen mit der Bestimmung des genetischen Hintergrunds durchgeführt, die Aufschluss über die Verteilung der Rezeptoren in Kindern und Jugendlichen geben sollen. Diese Studie muss durch weitere Proben vervollständigt werden (Manuskript in Vorbereitung).



iNKT cell reference values in children: The absolute iNKT cell count is stable from birth to adulthood

Journal:	<i>Scandinavian Journal of Immunology</i>
Manuscript ID:	SJI-11-031
mstype:	Regular Manuscript
Date Submitted by the Author:	28-Jan-2011
Complete List of Authors:	Bienemann, Klaus; Heinrich Heine University, Department of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology Iouannidou, Kasiani; Klinikum Dortmund gGmbH, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Schoenberg, Kathrin; Heinrich Heine University, Institute for Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics Feyen, Oliver; Tavarlin AG Reuther, Susanne; Heinrich Heine University, Department of Pediatric Hematology, Oncology and Clinical Immunology Bienemann, Kirsten; Heinrich Heine University, Department of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology Schuster, Friedhelm; Heinrich Heine University, Department of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology Uhrberg, Markus; Heinrich Heine University, Institute for Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics Laws, Hans-Jürgen; Heinrich Heine University, Department of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology Borkhardt, Arndt; Heinrich Heine University, Department of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology
Keywords:	Natural Killer T Cells < Cells, T Cell Receptors < Molecules, Human < Subject, Blood < Tissues

SCHOLARONE™
Manuscripts

iNKT cell reference values in children: The absolute iNKT cell count is stable from birth to adulthood

Short Title: iNKT cell reference values in children

Klaus Bienemann¹, Kasiani Iouannidou², Kathrin Schoenberg³, Susanne Reuther¹, Oliver Feyen⁴, Kirsten Bienemann¹, Friedhelm Schuster¹, Markus Uhrberg³, Hans-Jürgen Laws¹, Arndt Borkhardt¹

1) Department of Pediatric Hematology, Oncology and Clinical Immunology, Heinrich Heine University, Duesseldorf, Germany

2) Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Klinikum Dortmund gGmbH, Germany

3) Institute for Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany

4) Tavarlin AG, Darmstadt, Germany

Address:

Corresponding author

Prof. Dr. Arndt Borkhardt

Department of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology

Center for Child and Adolescent Health

Heinrich Heine University

Moorenstr. 5

40225 Duesseldorf, Germany

Phone: +49-211/8117680

Fax: +49-211/8116206

Mail to: arndt.borkhardt@med.uni-duesseldorf.de

Word counts:

Whole manuscript: 2850 words

Abstract: 151 words

Introduction, results and discussion: 1876 words

Clinical Immunology

Abstract

Human invariant natural killer T cells (iNKT cells) are a unique population of T-cells that express a semi-invariantly rearranged T cell receptor (TCR) and are involved in a variety of immunoregulatory processes. We established reference values for iNKT cells in 64 healthy children from 7 months to 18 years of age and 5 cord blood samples by flow cytometry. iNKT cells were measured as CD3⁺ cells co-expressing TCRV α 24 and TCRV β 11, and by using the monoclonal antibody 6B11, which recognizes specifically their invariant TCR rearrangement. The absolute number of iNKT cells ranged from 86 to 10499 (CD3⁺/TCRV α 24⁺/TCRV β 11⁺) and 233 to 11167 (CD3⁺/6B11⁺) iNKT cells per milliliter of blood. This range is stable from birth to adulthood. The relative iNKT cell count was found to be 0.003 to 0,71 % (CD3⁺/TCRV α 24/TCRV β 11) and 0.019 to 0.776 % (CD3/6B11) of peripheral blood T cells and shows only a slight increase with age.

Key word

iNKT cells, reference values, children, anti-TCRV α 24, anti-TCRV β 11, monoclonal antibody 6B11

Introduction

Invariant natural killer T cells (iNKT cells) are a unique subset of innate immune cells that have features of both T cells and natural killer (NK) cells. They express a semi-invariant T cell receptor, characterized in mice by V α 14-J α 18 and V β 8.2, V β 7, or V β 2, and in humans by V α 24-J α 18 and V β 11, although the β chain can be somewhat variable [1-3]. This TCR recognizes lipid-based antigens in the context of CD1d molecules, an MHC Class I-like molecule expressed on antigen presenting cells (APCs) and other cell types. iNKT cells were initially discovered based on the finding that a novel glycolipid compound, α -galactosyl ceramide (α -GalCer), had anti-tumor activity [4]. It could be shown that α -GalCer binds CD1d and then α -GalCer-CD1d complex activates NKT cells through their TCR. Their ability to rapidly secrete large amounts of pre-formed cytokines upon activation allows them to bridge the innate and adaptive immune responses by downstream recruitment and activation of dendritic cells (DCs), NK cells and CD4⁺ and CD8⁺ T cells [5]. Therefore iNKT cells are thought to play crucial roles in modulating antitumour, autoimmune and antimicrobial responses [6–8]. While the function of iNKT cells has been studied extensively in mouse models, less is known about human iNKT cells. Absence or low numbers of peripheral blood iNKT cells have been associated with diverse autoimmune diseases in humans [9]. Their role in infectious and malignant diseases still has to be determined [10]. Data on children are sparse. iNKT cells are thought to play a role in the immune escape of neuroblastoma cells [11] and have been found to be reduced in children with EBV-associated lymphoproliferative diseases due to SAP- and XIAP- deficiency [12] as well as ITK-deficiency [13]. However, the contribution of these cells to human diseases remains controversial [10, 14-16]. Moreover, there are no generally accepted reference values, especially with respect to the lower normal limit.

1
2
3 The evaluation of human iNKT cells in peripheral blood is particularly complicated by
4
5 different factors. First, their frequency in the peripheral blood is extremely low.
6

7
8 Second, different detection methods may limitate the comparability of the results.
9

10 Basically, three different staining methods have become widely accepted to evaluate
11
12 human iNKT cells by flow cytometry:
13

14
15 Classically, they have been identified using CD1d tetramers loaded with α -GalCer
16
17 [17-19].
18

19
20 Recently, it has been shown that iNKT cells can be easily identified by co-expression
21
22 of TCRV α 24 and TCRV β 11 or by using the monoclonal antibody (mAb) 6B11, which
23
24 recognizes the invariant CDR3 loop of their TCR α -chain, with good correlation to the
25
26 classical method [20,21].
27

28
29 In this study we established reference values for iNKT cells in healthy children using
30
31 the latter staining methods.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Patients and methods

Reference values for iNKT cells and NKT like cells

Age related reference values for iNKT cells were generated from 64 FACS analyses in a healthy paediatric population. The group consisted of children undergoing elective surgery and children presenting to our outpatient hemostasiology clinic prior to surgery.

In this group a bleeding disorder was ruled out if the past medical history and family history did not suggest a bleeding disorder and there were normal results of standard hemostasiologic tests. Children with acute infections, underlying illness or on any medication were excluded. Adult control samples were obtained from 12 healthy adult volunteers associated with our children's hospital. Five cord blood samples of healthy newborns were obtained from the Jose-Carreras cord blood bank Dusseldorf. Ethical approval was obtained from the Ethics committee from the Heinrich-Heine University Dusseldorf

Immunophenotyping of iNKT cells

Whole blood was anticoagulated with EDTA and processed within 24 h. A differential white blood cell count was done automatically. Three colour FACS analysis was performed with a FACS Canto (Becton Dickinson (BD), Heidelberg, Germany) flow cytometer. iNKT and NKT like cells were analysed by FACS staining using fluorescein isothiocyanate, phycoerythrin and peridinin-chlorophyll-protein labelled monoclonal antibodies (Becton Dickinson (BD), Heidelberg, Germany or Immunotech (IM), Marseille, France) following the manufacturer's instructions. Antibodies (clone) against the following epitopes were used: CD3 (SK7,BD), V α 24 (C15,IM), V β 11

(C21,IM), anti human iNKT (6B11, BD); mouse-IgG1 (MOPC-21/X40,BD) mouse-IgG2a (X39,BD) (negative control). After gating on CD3⁺ T-lymphocytes the percentages of iNKT cells (CD3⁺ V α 24⁺ V β 11⁺ and CD3⁺6B11⁺) were determined. For all staining experiments, appropriate isotypematched controls were included. Because of the low frequency of iNKT cells in PB, 1–5 x 10⁵ lymphocyte gated cells were analysed.

Statistical analysis

The statistical analysis of control results was performed using Student's t-test after log-transformation of the data to account for the skewed data distribution.

Correlations were calculated using Spearman (r_s) correlation coefficients, depending on the result of Shapiro-Wilk W tests of normality. Statistical significance was considered for $p = 0.05$.

Results

After gating on the lymphocyte population the iNKT cell population could easily be identified and quantified based on CD3/TCRV α 24/TCRV β 11 as well as on CD3/6B11 expression (Fig.1).

The CD3/TCRV α 24/TCRV β 11 co-expression was analyzed in all 64 children. In 46 out of these 64 children we measured the CD3/6B11 co-expression in parallel. The age ranges for the two groups were 7 months to 18 years with a median age of 8.25 years (TCRV α 24/TCRV β 11) and 1 year to 18 years with a median age of 10.5 years (CD3/6B11). 34% (TCRV α 24/TCRV β 11) and 33% (CD3/6B11) of the children were female. Additionally, the iNKT cell population was analysed in 5 cord blood samples and 12 adults (age range 25 to 41 years, median age 31 years, 50% female) with both methods. In the pediatric group (cord blood samples excluded) we found absolute iNKT cell counts ranging from 86 to 10,499 iNKT cells/ml blood using the CD3/TCRV α 24/TCRV β 11 staining and from 233 to 11,167 /ml using the CD3/6B11 staining, respectively (Fig. 2a/b). Given such a wide range, simple determination of a normal range by calculation of the mean $\pm$ 2 standard deviations was not possible. Therefore, outliers constituting approximately 2,5 % of the samples at both the lower and upper ranges were excluded, creating a normal range of 100 – 6624/ml (CD3/TCRV α 24/TCRV β 11) and 515 – 8762/ml (CD3/6B11). The median value was 560 cells/ml and 1972 cells/ml, respectively. (Fig 2a/b).

The data was next log-transformed for further analysis (Fig. 3a). Using the mean $\pm$ 2 standard deviations of the log transformed data we calculate a normal iNKT range of 76 – 5764/ml (CD3/TCRV α 24/TCRV β 11) and 411 – 9003/ml (CD3/6B11), verifying our accepted range above.

The absolute iNKT cell count was not found to be linearly associated with age (Fig 3a) (p -value=0.79 from regression analysis $R^2=0.0014$ and p -value=0.87 from regression analysis $R^2=0.0004$). There was no statistically significant difference between children and adults (Fig. 4a) ($p=0.29$ and $p=0.61$), between children and cord blood (Fig.4a) ($p=0.18$ and $p=0.19$) or between genders (Fig. 4c) ($p=0.28$ and $p=0.65$). The relative count of iNKT cells among total peripheral blood T cells (iNKT in % CD3) ranged from 0.003% to 0.71% (CD3/TCRV α 24/TCRV β 11) and 0.019 to 0.776% (CD3/6B11), respectively (Fig. 2c/d). After exclusion of outliers we accepted a range of 0.008% – 0.374% (CD3/TCRV α 24/TCRV β 11) and 0.021% – 0.712% (CD3/6B11). This range was verified after a log transformation of the data and the calculation of a normal iNKT range of 0.004% – 0.340% (CD3/TCRV α 24/TCRV β 11) and 0.026% - 0.548% (CD3/6B11) as described above. In contrast to the absolute iNKT cell count, the regression analysis of the log transformed data show a moderate but significant increase of the relative iNKT cell count (iNKT in % CD3) with age (Fig 3b)(p -value=0.03 from regression analysis $R^2=0,0568$ and p -value=0.05 from regression analysis $R^2=0,0569$). Accordingly, we found significantly higher iNKT cell percentages in the adult control group (Fig. 4b) ($p=0.03$ and $p=0.04$). Analysing the CD3+ T cell population in our control groups we found a decrease with age (Fig. 5) (p -value<0.01 from regression analysis $R^2=0.3452$). According to the absolute iNKT cell numbers we did not find a statistically significant difference in the relative iNKT cell count between children and cord blood (Fig. 4b) ($p = 0.31$ and $p=0.52$) or gender (Fig. 4d) ($p=0.17$ and $p=0.8$). iNKT reference values are summarized in the tables 1a/b. Comparing both staining methods we measured 2 to 3 fold higher absolute and relative iNKT cell counts using the CD3+/6B11+ staining. We calculated a positive correlation between both methods ($r_{p\text{ rel}}= 0.73$ and $r_{p\text{ abs}}=0.71$).

Discussion

We used two antibody combinations (CD3+/V α 24+/V β 11+ and CD3+/6B11+) to detect the iNKT cell population by flow cytometry. To our knowledge our study is the first one using the 6B11 antibody in children. Both methods show a strong positive correlation, but in contrast to a single study in adults [20] which showed no significant difference between the frequency of total iNKT cells measured by CD3+/6B11+ and CD3+/V α 24+/V β 11+ staining, we found a higher iNKT cell count using the CD3+/6B11+ staining. Similar results were obtained by the study of Fereidouni et al [21]. This observation may be explained by the fact, that the 6B11 monoclonal antibody recognizes all T-cell receptors with the invariant V α 24-J α 18 CDR3 loop [22]. The invariant alpha chain occasionally pairs with other β -chains than V β 11 [10]. This variable pairing may contribute in some degree to a lower iNKT cell count using the CD3+/V α 24+/V β 11+ staining. Further analyses will be necessary to clarify the reasons for the differing results obtained by the different staining methods. Nevertheless, our data show that with respect to the used detection method different reference values should be applied.

Our study had the objective to create iNKT cell normal values for children. We measured the iNKT cell population in a large cohort of healthy children, cord blood samples and adults and found a broad iNKT cell range in all age groups. The absolute iNKT cell count was not age dependent but was stable from birth to adulthood, which is in contrast to almost all other routinely determined lymphocyte subpopulations. In contrast to the work of Marsh et al. [23] we found a moderate increase of the relative iNKT cell count (iNKT in % of CD3+ T cells) with age with both staining methods. This might easily be explained by the known constant decrease of the absolute CD3+ T cell count during ageing [24,25]. We therefore conclude that for the interpretation of iNKT cells in children the absolute iNKT cell

count should be favoured. Especially in young children with high T cell numbers the relative iNKT cell count may be falsely low.

A major problem in the interpretation of human peripheral blood iNKT cell counts is the very low frequency and the wide variability. We found values as low as 80 iNKT cells and values as high as 11.000 iNKT cells/ml of blood in healthy children. The lower reference range is in a region where flow cytometry reaches its methodological limits, what makes it difficult to decide if an iNKT cell number below this lower limit is of pathological significance. This implies that measuring iNKT cells in an individual person may be validated by repeated measurements at various time points. Consistently low numbers of iNKT cells, as it has e. g. been shown in patients with XLP due to SAP deficiency, may then allow to establish a link between NKT cell number and disease [12,13]. The endogenous factors that contribute to the inter-individual variability still have to be elucidated. Furthermore, longitudinal studies in single individuals are necessary to examine intra-individual changes in response to exogenous factors, that may account in part for the observed variability.

References

- [1] Dellabona P, Casorati G, Friedli B et al. In vivo persistence of expanded clones specific for bacterial antigens within the human T cell receptor alpha/beta CD4⁺ 8⁺ subset. *J Exp Med* 1993;177:1763–71.
- [2] Porcelli S, Yockey CE, Brenner MB, Balk SP. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4⁺ 8⁺ alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J Exp Med* 1993;178:1–16.
- [3] Dellabona P, Padovan E, Casorati G, Brockhaus M, Lanzavecchia A. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4⁺ 8⁺ T cells. *J Exp Med* 1994;180:1171–6.
- [4] Kobayashi E, Motoki K, Uchida T, Fukushima H, Koezuka Y. KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities. *Oncol Res* 1995;7:529–534.
- [5] Matsuda JL, Mallevaey T, Scott-Browne J, Gapin L. CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. *Curr Opin Immunol* 2008;20(3):358-68.
- [6] Bendelac A, Rivera MN, Park HS, Roark JH. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity and function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:535–62.
- [7] Kawano T, Cui J, Koezuka Y et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of alpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997;278:1626–9.

- [8] Brigl M, Brenner MB. CD1d antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* 2004;22:817–90.
- [9] Miyake S, Yamamura T. NKT cells and autoimmune diseases: unraveling the complexity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2007;314:251-67.
- [10] Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007;25:297-336.
- [11] Song L, Ara T, Wu HW et al. Oncogene MYCN regulates localization of NKT cells to the site of disease in neuroblastoma. *J Clin Invest* 2007;117(9):2702-12.
- [12] Latour S. Natural killer T cells and X-linked lymphoproliferative syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7:510–514.
- [13] Huck K, Feyen O, Niehues T, et al. Girls homozygous for an IL-2-inducible T cell kinase mutation that leads to protein deficiency develop fatal EBV-associated lymphoproliferation. *J Clin Invest* 2009;119(5):1350-8.
- [14] Kawano T, Nakayama T, Kamada N et al. Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human V alpha24 NKT cells. *Cancer Res* 1999;59:5102–5.
- [15] Lee PT, Putnam A, Benlagha K, Teyton L, Gottlieb PA, Bendelac A. Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis. *J Clin Invest* 2002;110:793–800.

[16] Lucas M, Gadola S, Meier U et al. Frequency and phenotype of circulating Valpha24/Vbeta11 double-positive natural killer T cells during hepatitis C virus infection. *J Virol* 2003;77:2251–7.

[17] Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB: Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by tetramer staining. *J Exp Med* 2002;195:625–36.

[18] Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L et al. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med* 2000;192:741–54.

[19] Sidobre S, Kronenberg M. CD1 tetramers - a powerful tool for the analysis of glycolipid-reactive T cells. *J Immunol Meth* 2002;268:107–21

[20] Montoya CJ, Pollard D, Martinson J et al. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology* 2007;122(1):1-14

[21] Fereidouni M, Farid Hosseini R, Jabbari Azad F, Schenkel J, Varasteh A, Mahmoudi M. Frequency of circulating iNKT cells among Iranian healthy adults. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78 (1):65-9

[22] Exley MA, Hou R, Shaulov A et al. Selective activation, expansion, and monitoring of human iNKT cells with a monoclonal antibody specific for the TCR alpha-chain CDR3 loop. *Eur J Immunol* 2008;38(6):1756-66

[23] Marsh RA, Villanueva J, Kim MO et al. Patients with X-linked lymphoproliferative disease due to BIRC4 mutation have normal invariant natural killer T-cell populations. Clin Immunol 2009;132(1):116-23

[24] Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS et al. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. J Allergy Clin Immunol 2003;112(5):973-80

[25] Jentsch-Ullrich K, Koenigsmann M, Mohren M, Franke A. Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults--a monocentric German study. Clin Immunol 2005;116(2):192-7

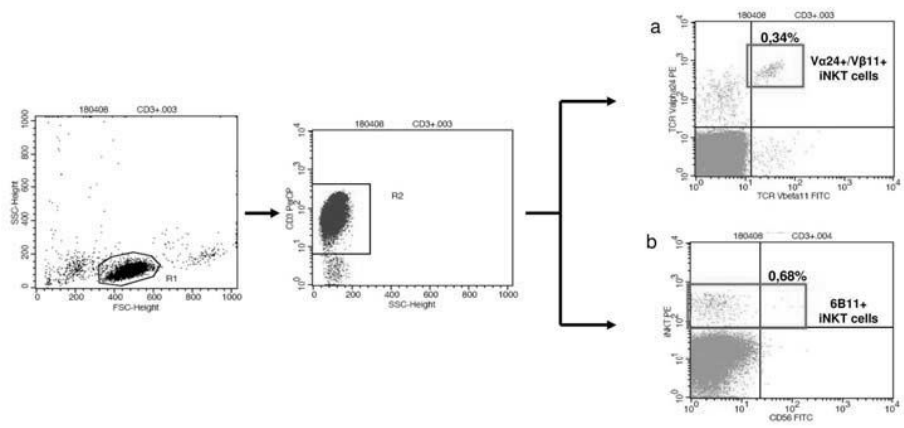


Figure 1. Sample scatter plots illustrating the identification of whole blood iNKT cell populations. After gating on the lymphocyte population (identified by forward and side light scatter) and CD3+ lymphocytes (T cells), iNKT cells were identified and quantified by co-expression of TCRV α 24 and TCRV β 11 (a) and by the expression of 6B11 (b).
254x190mm (200 x 200 DPI)

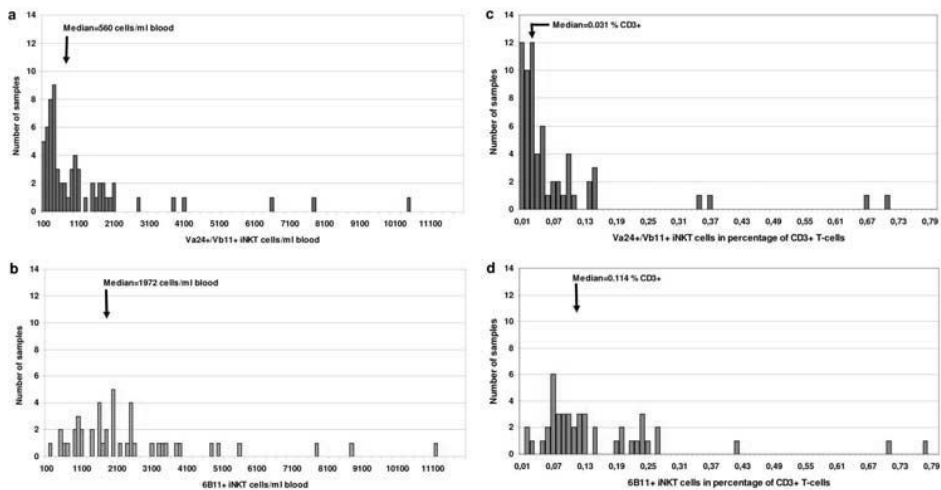


Figure 2. iNKT cell populations were identified and quantified in 64 (a,c) and 45 (b,d) healthy children based on co-expression of TCRV α 24 and TCRV β 11 (a,c) and expression of 6B11 (b,d) on CD3+ T cells. The frequency of results is shown. (a, b) absolute iNKT cell numbers /ml blood rounded to 2 decimal places. (c,d) iNKT cells in percentage of CD3+ T-cells.
254x190mm (200 x 200 DPI)

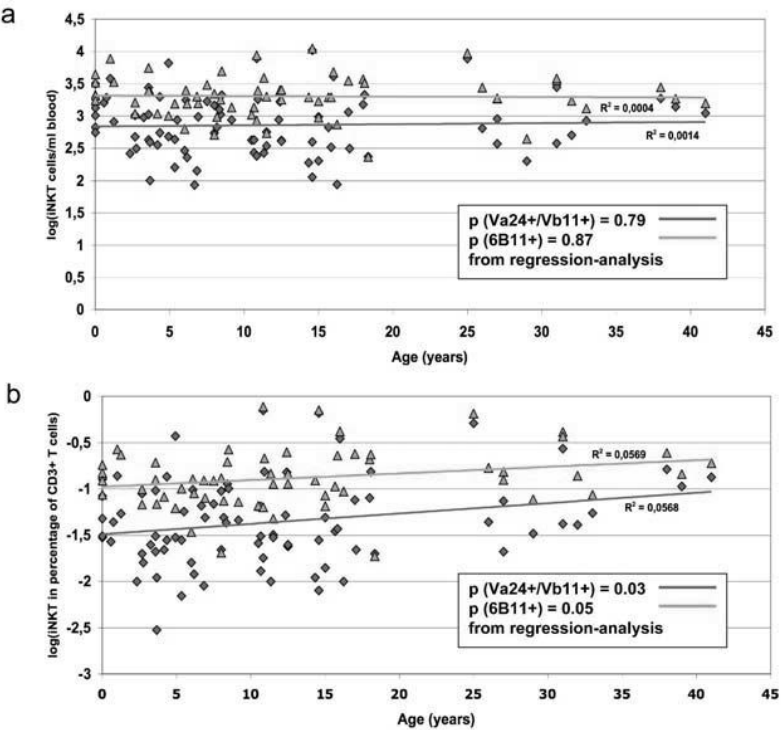


Figure 3. Results of iNKT cell analysis in children plotted in relation to age shown after log transformation along with the results of the cord blood samples and the adult control group. (a) iNKT cells/ml blood and (b) iNKT cells in percentage of CD3+ T-cells. (♦) Va24+/Vb11+ iNKT cells,(Δ) 6B11+ iNKT cells.

254x190mm (400 x 400 DPI)

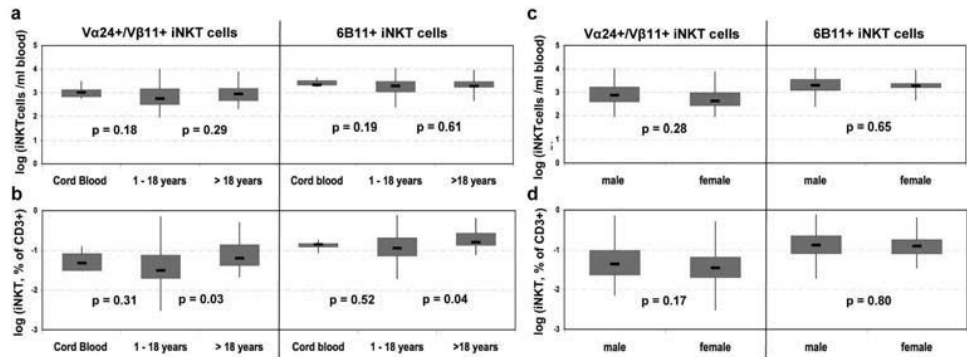


Figure 4. Comparison of iNKTcell numbers between cord blood , pediatric (age 1-18 years) and adult (age >19 years) samples (a,b) and between male and female samples (c,d). Absolute numbers of iNKT cells/ml blood (a,c) and iNKT cells in percentage of CD3+ T cells (b,d).

254x190mm (200 x 200 DPI)

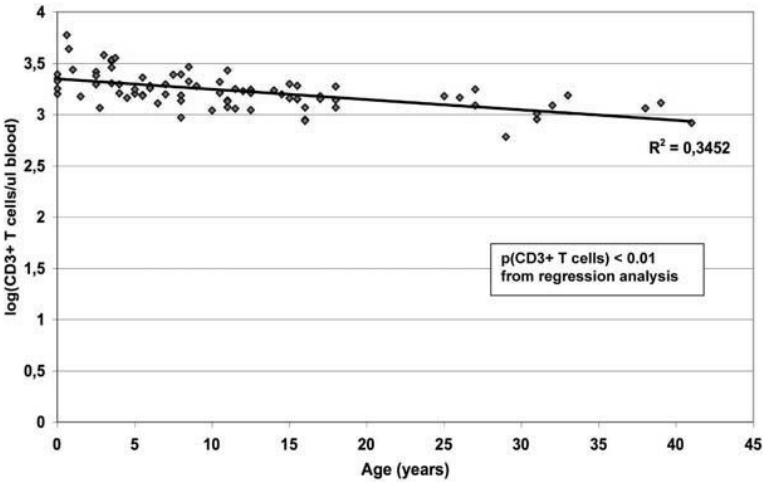


Figure 5. Results of CD3+ T cell analysis plotted in relation to age shown after log transformation.
254x190mm (200 x 200 DPI)

Table 1a. iNKT cell reference values in children

Staining	CD3+/Va24+/Vβ11+	CD3+/6B11+
N	64	46
in % CD3	0.031	0.114
	0.076	0.160
	0.008 – 0.374	0.021 – 0.712
	0.004 – 0.340	0.026 – 0.548
/cm3	560	1972
	1237	2562
	100 - 6624	515 – 8762
	76 - 5764	411 - 9003

Reference values for iNKT cells were generated for children with two different staining methods. Values are presented as median, mean, normal range after exclusion of outliers and normal range calculated after log-transformation (top down).

Table 1b. Reference values for iNKT cells in the adult control group

Staining	CD3+/Va24+/Vβ11+	CD3+/6B11+
N	12	12
in % CD3	0.065	0.161
	0.125	0.230
	0.010 – 0.527	0.052 – 0.676
/cm3	879	1892
	1572	2770
	127 - 6898	506 – 9331

Values are presented as median, mean and normal range calculated after log-transfoirmation (top down).

2.7 Ausblick

Bei der Betrachtung des NK-Zellrepertoires von PB und CB konnten im Rahmen dieser Arbeit Unterschiede herausgearbeitet werden. Dabei ist das adulte NK-Zellrepertoire in Funktion und Struktur spezifisch an das eigene HLA-Klasse I angepasst, wohingegen das neonatale Repertoire diese strukturelle Anpassung vermissen lässt. Doch welche Faktoren führen zu der Adaption? Eine Vermutung ist, dass virale Infektionen, denen wir im Laufe der Kindheit ausgesetzt sind, sowie die individuelle immunologische Erfahrung, eine Rolle spielen. So wurde kürzlich bekannt, dass virale Infektionen zu einer langanhaltenden Expansion spezifischer Klone führen können.

Eine spezifische Expansion der funktional adaptierten Zellen, also der Zellen, die während einer Infektion tätig geworden sind, könnte demnach zur Ausbildung eines spezifischen Repertoires führen? Um diese Vermutung zu bestätigen, wäre es sinnvoll den immunologischen Status an einer Kohorte zu überprüfen, z.B. hinsichtlich einer CMV-Infektion. Sollte es sich bestätigen, dass die Zahl oder Art der viralen Infektionen eine Rolle bei der Ausbildung des Repertoires spielen, sollten solche Individuen mit vielen Infektionen ein stärker angepasstes Repertoire haben als die Menschen, die beispielsweise CMV-negativ sind oder nur wenigen Infektionen ausgesetzt waren.

Am besten lässt sich diese Entwicklung bei Kindern nachvollziehen. Wann fängt die Adaption an, wann expandieren die spezifischen NK-Zellen und wie entwickelt sich das Repertoire im Laufe der Kindheit und Pubertät? Des Weiteren wäre es interessant zu beobachten, ob diese Entwicklung eines sich optimierenden Repertoires bis ins hohe Alter anhält.

Durch die Entwicklung neuer Antikörper oder der Analyse auf Transkriptebeine sollte der Frage nachgegangen werden, welche Rolle die stimulatorischen KIR in der Regulation des KIR-Repertoires spielen. Es ist durchaus möglich, dass die Spezifität und Aktivierung von NK-Zellen vielleicht durch die Koexpression stimulatorischer KIR reguliert wird. Auch der Einfluss anderer Faktoren auf das KIR-Repertoire, wie Alter oder Geschlecht der Spender, sollten an einer höheren Probenanzahl analysiert werden. Schlussendlich sind noch viele Fragen offen, die die Expression und Regulation der KIR-Rezeptoren betreffen.

3 Literatur

- Andersson, S., Fauriat, C., Malmberg, J. A., Ljunggren, H. G., and Malmberg, K. J.: KIR acquisition probabilities are independent of self-HLA class I ligands and increase with cellular KIR expression. *Blood*. 114: 95-104. Epub 2009 Mar 20., 2009
- Anfossi, N., Andre, P., Guia, S., Falk, C. S., Roetynck, S., Stewart, C. A., Bresó, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., Romagne, F., Ugolini, S., and Vivier, E.: Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*. 25: 331-42., 2006
- Biassoni, R., Cantoni, C., Pende, D., Sivori, S., Parolini, S., Vitale, M., Bottino, C., and Moretta, A.: Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol Rev* 181: 203-14, 2001
- Blom, B. and Spits, H.: Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol*. 24: 287-320., 2006
- Boyton, R. J. and Altmann, D. M.: Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease. *Clin Exp Immunol*. 149: 1-8., 2007
- Carrington, M. and Martin, M. P.: The impact of variation at the KIR gene cluster on human disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 298: 225-57., 2006
- Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chavez, R., and Lascurain, R.: Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol*. 6: 15-25., 2009
- Colonna, M., Borsellino, B., Falco, M., Ferrara, B., and Strominger, J.: HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90: 12000-12004, 1993
- Colonna, M. and Samaridis, J.: Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science* 268: 405-408, 1995
- Cooley, S., Trachtenberg, E., Bergemann, T. L., Saeteurn, K., Klein, J., Le, C. T., Marsh, S. G., Guethlein, L. A., Parham, P., Miller, J. S., and Weisdorf, D. J.: Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*. 113: 726-32., 2009
- Cooley, S., Xiao, F., Pitt, M., Gleason, M., McCullar, V., Bergemann, T. L., McQueen, K. L., Guethlein, L. A., Parham, P., and Miller, J. S.: A subpopulation of human peripheral blood NK cells that lacks inhibitory receptors for self-MHC is developmentally immature. *Blood*. 110: 578-86., 2007
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., and Caligiuri, M. A.: The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 22: 633-40., 2001
- Cullen, S. P. and Martin, S. J.: Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ*. 15: 251-62., 2008
- D'Andrea, A., Chang, C., Franz-Bacon, K., McClanahan, T., Phillips, J., and Lanier, L.: Molecular cloning of NKB1. A natural killer cell receptor for HLA-B allotypes. *J Immunol*. 155: 2306-2310, 1995
- Dalle, J. H., Menezes, J., Wagner, E., Blagdon, M., Champagne, J., Champagne, M. A., and Duval, M.: Characterization of cord blood natural killer cells: implications for transplantation and neonatal infections. *Pediatr Res*. 57: 649-55., 2005
- Denis, L., Sivula, J., Gourraud, P. A., Kerdudou, N., Chout, R., Ricard, C., Moisan, J. P., Gagne, K., Partanen, J., and Bignon, J. D.: Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Reunion. *Tissue Antigens*. 66: 267-76., 2005

- Dohring, C., Scheidegger, D., Samaridis, J., Cella, M., and Colonna, M.: A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J Immunol.* 156: 3098-101., 1996
- Elliott, J. M., Wahle, J. A., and Yokoyama, W. M.: MHC class I-deficient natural killer cells acquire a licensed phenotype after transfer into an MHC class I-sufficient environment. *J* 207: 2073-9., 2010
- Fan, Y. Y., Yang, B. Y., and Wu, C. Y.: Phenotypic and functional heterogeneity of natural killer cells from umbilical cord blood mononuclear cells. *Immunol Invest.* 37: 79-96., 2008
- Faure, M. a. L., EO: KIR2DL4 (CD158d), an NK Cell-Activating Receptor with Inhibitory Potential. *J Immunol.* 168: 6208-6214, 2002
- Fauriat, C., Long, E. O., Ljunggren, H. G., and Bryceson, Y. T.: Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 115: 2167-76, 2009
- Fernandez, N. C., Treiner, E., Vance, R. E., Jamieson, A. M., Lemieux, S., and Raulet, D. H.: A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood.* 105: 4416-23., 2005
- 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.: 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., 2007
- Frohn, C., Schlenke, P., and Kirchner, H.: The repertoire of HLA-Cw-specific NK cell receptors CD158 a/b (EB6 and GL183) in individuals with different HLA phenotypes. *Immunology.* 92: 567-70., 1997
- Gaddy, J. and Broxmeyer, H. E.: Cord blood CD16+56- cells with low lytic activity are possible precursors of mature natural killer cells. *Cell Immunol.* 180: 132-42., 1997
- Gaddy, J., Risdon, G., and Broxmeyer, H. E.: Cord blood natural killer cells are functionally and phenotypically immature but readily respond to interleukin-2 and interleukin-12. *J Interferon Cytokine Res.* 15: 527-36., 1995
- Gardiner, C., Guethlein, L., Shilling, H., Pando, M., Carr, W., Rajalingam, R., Vilches, C., and Parham, P.: Different NK Cell Surface Phenotypes Defined by the DX9 Antibody Are Due to KIR3DL1 Gene Polymorphism. *J Immunol.* 166: 2992-3001, 2001
- Giebel, S., Locatelli, F., Lamparelli, T., Velardi, A., Davies, S., Frumento, G., Maccario, R., Bonetti, F., Wojnar, J., Martinetti, M., Frassoni, F., Giorgiani, G., Bacigalupo, A., and Holowiecki, J.: Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood.* 102: 814-9, 2003
- Gomez-Lozano, N., Trompeter, H. I., de Pablo, R., Estefania, E., Uhrberg, M., and Vilches, C.: Epigenetic silencing of potentially functional KIR2DL5 alleles: Implications for the acquisition of KIR repertoires by NK cells. *Eur J Immunol.* 37: 1954-65., 2007
- Graef, T., Moesta, A. K., Norman, P. J., Abi-Rached, L., Vago, L., Older Aguilar, A. M., Gleimer, M., Hammond, J. A., Guethlein, L. A., Bushnell, D. A., Robinson, P. J., and Parham, P.: KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced specificity for HLA-A*11 while diminishing avidity for HLA-C. *J Exp Med.* 206: 2557-72., 2009
- Grzywacz, B., Kataria, N., Blazar, B. R., Miller, J. S., and Verneris, M. R.: Natural killer cell differentiation by myeloid progenitors. *Blood* 2010: 20, 2010
- Gumperz, J., Litwin, V., Phillips, J., Lanier, L., and Parham, P.: The Bw4 Public Epitope of HLA-B Molecules Confers Reactivity with Natural Killer Cell Clones that Express NKB1, A Putative HLA Receptor. *J Exp Med.* 181: 1133-1144, 1995

- Gumperz, J. E., Valiante, N. M., Parham, P., Lanier, L. L., and Tyan, D.: 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., 1996
- Hansasuta, P., Dong, T., Thananchai, H., Weekes, M., Willberg, C., Aldemir, H., Rowland-Jones, S., and Braud, V. M.: Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur J Immunol.* 34: 1673-9., 2004
- Harrison, R. J., Ettorre, A., Little, A. M., and Khakoo, S. I.: Association of NKG2A with treatment for chronic hepatitis C virus infection. *Clin* 161: 306-14., 2010
- Held, W., Dorfman, J. R., Wu, M. F., and Raulet, D. H.: Major histocompatibility complex class I-dependent skewing of the natural killer cell Ly49 receptor repertoire. *Eur J Immunol.* 26: 2286-92., 1996
- Herberman, R. B., Nunn, M. E., Holden, H. T., and Lavrin, D. H.: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer.* 16: 230-9., 1975
- Hiby, S. E., Walker, J. J., O'Shaughnessy K, M., Redman, C. W., Carrington, M., Trowsdale, J., and Moffett, A.: Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med.* 200: 957-65., 2004
- Hoshina, T., Kida, K., and Ito, M.: Difference in response of NK cell activity in newborns and adult to IL-2, IL-12 and IL-15. *Microbiol Immunol* 43: 161-6, 1999
- Hsu, K., Liu, X., Selvakumar, A., Mickelson, E., O'Reilly, R., and Dupont, B.: Killer Ig-Like Receptor Haplotype Analysis by Gene Content: Evidence for Genomic Diversity with a Minimum of Six Basic Framework Haplotypes, Each with Multiple Subsets. *J Immunol.* 169: 5118-5129, 2002
- Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., Sykora, K., and Schmidt, R.: CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol.* 31: 3121-3126, 2001
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. J.: Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin, 2002
- Jiang, K., Zhu, F. M., Lv, Q. F., and Yan, L. X.: Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the Chinese Han population. *Tissue Antigens.* 65: 556-63., 2005
- Joncker, N. T., Shifrin, N., Delebecque, F., and Raulet, D. H.: Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment. *J* 207: 2065-72, 2010
- Karre, K.: How to recognize a foreign submarine. *Immunol Rev.* 155: 5-9, 1997
- Khakoo, S. I., Thio, C. L., Martin, M. P., Brooks, C. R., Gao, X., Astemborski, J., Cheng, J., Goedert, J. J., Vlahov, D., Hilgartner, M., Cox, S., Little, A. M., Alexander, G. J., Cramp, M. E., O'Brien, S. J., Rosenberg, W. M., Thomas, D. L., and Carrington, M.: HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science.* 305: 872-4., 2004
- Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., and Wigzell, H.: "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol.* 5: 117-21., 1975
- 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.: Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature.* 436: 709-13., 2005

- Lanier, L., Chang, C., Azuma, M., Ruitenberg, J., Hemperly, J., and Phillips, J.: Molecular and Functional Analysis of Human Natural Killer Cell-associated Neural Cell Adhesion Molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol.* 146: 4421-4426, 1991
- Le Garff-Tavernier, M., Beziat, V., Decocq, J., Siguret, V., Gandjbakhch, F., Pautas, E., Debre, P., Merle-Beral, H., and Vieillard, V.: Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging* 9: 527-35., 2010
- Lepin, E. J., Bastin, J. M., Allan, D. S., Roncador, G., Braud, V. M., Mason, D. Y., van der Merwe, P. A., McMichael, A. J., Bell, J. I., Powis, S. H., and O'Callaghan, C. A.: Functional characterization of HLA-F and binding of HLA-F tetramers to ILT2 and ILT4 receptors. *Eur J Immunol.* 30: 3552-61., 2000
- Lieberman, J.: The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol.* 3: 361-70., 2003
- Ljunggren, H. and Karre, K.: In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 12: 237-244, 1990
- Long, E.: Regulation of Immune Responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol.* 17: 875-904, 1999
- Lord, S. J., Rajotte, R. V., Korbitt, G. S., and Bleackley, R. C.: Granzyme B: a natural born killer. *Immunol Rev.* 193: 31-8., 2003
- Lutz, C. T., Moore, M. B., Bradley, S., Shelton, B. J., and Lutgendorf, S. K.: Reciprocal age related change in natural killer cell receptors for MHC class I. *Mech Ageing Dev.* 126: 722-31., 2005
- Male, V., Hughes, T., McClory, S., Colucci, F., Caligiuri, M. A., and Moffett, A.: Immature NK Cells, Capable of Producing IL-22, Are Present in Human Uterine Mucosa. *J Immunol* 2010: 27, 2010
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T. I., Bushkin, Y., Davis, D. M., Strominger, J. L., Yewdell, J. W., and Porgador, A.: Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409: 1055-60, 2001
- Marsh, S., Parham, P., Dupont, B., Geraghty, D., Trowsdale, J., Middleton, D., Vilches, C., Carrington, M., Witt, C., Guethlein, L., Shilling, H., Garcia, C., Hsu, K., and Wain, H.: Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Immunogenetics* 55: 220-226, 2003
- Martin, M. P., Gao, X., Lee, J. H., Nelson, G. W., Detels, R., Goedert, J. J., Buchbinder, S., Hoots, K., Vlahov, D., Trowsdale, J., Wilson, M., O'Brien, S. J., and Carrington, M.: Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet.* 31: 429-34, 2002
- Miller, J. S., Cooley, S., Parham, P., Farag, S. S., Verneris, M. R., McQueen, K. L., Guethlein, L. A., Trachtenberg, E. A., Haagensohn, M., Horowitz, M. M., Klein, J. P., and Weisdorf, D. J.: Missing KIR ligands are associated with less relapse and increased graft-versus-host disease (GVHD) following unrelated donor allogeneic HCT. *Blood.* 109: 5058-61., 2007
- Miller, J. S. and McCullar, V.: Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2. *Blood.* 98: 705-13., 2001
- Moesta, A. K., Graef, T., Abi-Rached, L., Older Aguilar, A. M., Guethlein, L. A., and Parham, P.: Humans differ from other hominids in lacking an activating NK cell receptor that recognizes the C1 epitope of MHC class I. *J* 185: 4233-7., 2010
- Moesta, A. K., Norman, P. J., Yawata, M., Yawata, N., Gleimer, M., and Parham, P.: Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J Immunol.* 180: 3969-79., 2008

- Moffett, A. and Hiby, S. E.: How Does the maternal immune system contribute to the development of pre-eclampsia? *Placenta*. 28: S51-6., 2007
- Moretta, L., Ferlazzo, G., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Mingari, M. C., and Moretta, A.: Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol Rev* 214: 219-28, 2006
- Nelson, G. W., Martin, M. P., Gladman, D., Wade, J., Trowsdale, J., and Carrington, M.: Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. *J Immunol*. 173: 4273-6., 2004
- Norman, P., Carrington, C., Byng, M., Maxwell, L., Curran, M., Stephens, H., Chandanayingyong, D., Verity, D., Hameed, K., Ramdath, D., and Vaughan, R.: Natural killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) locus profiles in African and South Asian populations. *Genes Immun*. 3: 86-95, 2002
- Orr, M. T., Murphy, W. J., and Lanier, L. L.: 'Unlicensed' natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection. *Nat Immunol*: 28, 2010
- Pende, D., Biassoni, R., Cantoni, C., Verdiani, S., Falco, M., di Donato, C., Accame, L., Bottino, C., Moretta, A., and Moretta, L.: The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J Exp Med*. 184: 505-18., 1996
- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A.: Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med*. 190: 1505-1516, 1999
- Pogge von Strandmann, E., Simhadri, V. R., von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K. S., Hansen, H. P., Rothe, A., Boll, B., Simhadri, V. L., Borchmann, P., McKinnon, P. J., Hallek, M., and Engert, A.: Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity*. 27: 965-74., 2007
- Rajagopalan, S. a. L., EO: A Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-G-specific Receptor Expressed on All Natural Killer Cells. *J Exp Med*. 189: 1093-1099, 1999
- Rajalingam, R., Krausa, P., Shilling, H., Stein, J., Balamurugan, A., McGinnis, M., Cheng, N., Mehra, N., and Parham, P.: Distinctive KIR and HLA diversity in a panel of north Indian Hindus. *Immunogenetics* 53: 1009-1019, 2002
- Raulet, D. H. and Vance, R. E.: Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol*. 6: 520-31., 2006
- Ruggeri, L., Mancusi, A., Capanni, M., Urbani, E., Carotti, A., Aloisi, T., Stern, M., Pende, D., Perruccio, K., Burchielli, E., Topini, F., Bianchi, E., Aversa, F., Martelli, M. F., and Velardi, A.: Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood*. 110: 433-40., 2007
- Ruggeri, L., Mancusi, A., Perruccio, K., Burchielli, E., Martelli, M. F., and Velardi, A.: Natural killer cell alloreactivity for leukemia therapy. 1997). 28: 175-82., 2005
- Santourlidis, S., Graffmann, N., Christ, J., and Uhrberg, M.: Lineage-specific transition of histone signatures in the killer cell Ig-like receptor locus from hematopoietic progenitor to NK cells. *J Immunol*. 180: 418-25., 2008
- Santourlidis, S., Trompeter, H. I., Weinhold, S., Eisermann, B., Meyer, K. L., Wernet, P., and Uhrberg, M.: 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., 2002

- Schellekens, J., Rozemuller, E. H., Petersen, E. J., van den Tweel, J. G., Verdonck, L. F., and Tilanus, M. G.: Patients benefit from the addition of KIR repertoire data to the donor selection procedure for unrelated haematopoietic stem cell transplantation. *Mol Immunol.* 45: 981-9., 2008
- Schönberg, K., Sribar, M., Enczmann, J., Fischer, J. C., and Uhrberg, M.: Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood.* 117: 98-107., 2011
- Selvakumar, A., Steffens, U., and Dupont, B.: NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains. *Tissue Antigens* 48: 285-294, 1996
- Shilling, H., Guethlein, L., Cheng, N., Gardiner, C., Rodriguez, R., Tyan, D., and Parham, P.: Allelic Polymorphism Synergizes with Variable Gene Content to Individualize Human KIR Genotype. *J Immunol.* 168: 2307-2315, 2002a
- Shilling, H., Young, N., Guethlein, L., Cheng, N., Gardiner, C., Tyan, D., and Parham, P.: Genetic Control of Human NK Cell Repertoire. *J Immunol.* 169: 239-247, 2002b
- Shilling, H. G., McQueen, K. L., Cheng, N. W., Shizuru, J. A., Negrin, R. S., and Parham, P.: Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 101: 3730-40. , 2003
- Sivori, S., Carlomagno, S., Falco, M., Romeo, E., Moretta, L., and Moretta, A.: Natural killer cells expressing the KIR2DS1 activating receptor efficiently kill T cell blasts and dendritic cells: implications in haploidentical HSCT. *Blood* 2011: 25, 2011
- Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A.: p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med.* 186: 1129-1136, 1997
- Sobecks, R. M., Ball, E. J., Maciejewski, J. P., Rybicki, L. A., Brown, S., Kalaycio, M., Pohlman, B., Andresen, S., Theil, K. S., Dean, R., and Bolwell, B. J.: Survival of AML patients receiving HLA-matched sibling donor allogeneic bone marrow transplantation correlates with HLA-Cw ligand groups for killer immunoglobulin-like receptors. *Bone Marrow Transplant.* 39: 417-24., 2007
- Stern, M., de Angelis, C., Urbani, E., Mancusi, A., Aversa, F., Velardi, A., and Ruggeri, L.: Natural killer-cell KIR repertoire reconstitution after haploidentical SCT. *Bone Marrow Transplant:* 22, 2010
- Stewart, C., Laugier-Anfossi, F., Vely, F., Saulquin, X., Riedmuller, J., Tisserant, A., Gauthier, L., Romagne, F., Ferracci, G., Arosa, F., Moretta, A., Sun, P., Ugolini, S., and Vivier, E.: Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 13224-13229, 2005
- Sundstrom, Y., Nilsson, C., Lilja, G., Karre, K., Troye-Blomberg, M., and Berg, L.: The expression of human natural killer cell receptors in early life. *Scand J Immunol.* 66: 335-44., 2007
- Sutherland, C. L., Chalupny, N. J., and Cosman, D.: The UL16-binding proteins, a novel family of MHC class I-related ligands for NKG2D, activate natural killer cell functions. *Immunol Rev.* 181: 185-92., 2001
- Szabo, E., Rampalli, S., Risueno, R. M., Schnerch, A., Mitchell, R., Fiebig-Comyn, A., Levadoux-Martin, M., and Bhatia, M.: Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature.* 468: 521-6., 2010
- Tanaka, H., Kai, S., Yamaguchi, M., Misawa, M., Fujimori, Y., Yamamoto, M., and Hara, H.: Analysis of natural killer (NK) cell activity and adhesion molecules on NK cells from umbilical cord blood. *Eur J Haematol.* 71: 29-38., 2003

- Toneva, M., Lepage, V., Lafay, G., Dulphy, N., Busson, M., Lester, S., Vu-Trien, A., Michaylova, A., Naumova, E., McCluskey, J., and Charron, D.: Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. *Tissue Antigens* 57: 358-362, 2001
- Trompeter, H. I., Gomez-Lozano, N., Santourlidis, S., Eisermann, B., Wernet, P., Vilches, C., and Uhrberg, M.: 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., 2005
- Trowsdale, J.: Genetic and Functional Relationships between MHC and NK Receptor Genes. *Immunity* 15: 363-374, 2001
- Trowsdale, J. and Moffett, A.: NK receptor interactions with MHC class I molecules in pregnancy. *Semin Immunol.* 20: 317-20., 2008
- Uhrberg, M.: The KIR gene family: life in the fast lane of evolution. *Eur J Immunol.* 35: 10-15, 2005
- Uhrberg, M., Parham, P., and Wernet, P.: Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics* 54(4): 221 -229, 2002
- Uhrberg, M., Valiante, N. M., Shum, B. P., Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyan, D., Lanier, L. L., and Parham, P.: Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity.* 7: 753-63., 1997
- Vales-Gomez, M., Reyburn, H., and Strominger, J.: Molecular analyses of the interactions between human NK receptors and their HLA ligands. *Hum Immunol.* 61: 28-38, 2000
- 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.: Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity.* 7: 739-51., 1997
- Verneris, M. R. and Miller, J. S.: The phenotypic and functional characteristics of umbilical cord blood and peripheral blood natural killer cells. *Br J Haematol.* 147: 185-91., 2009
- Vilches, C. and Parham, P.: KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 20: 217-51, 2002
- Vilches, C., Rajalingam, R., Uhrberg, M., Gardiner, C., Young, N., and Parham, P.: KIR2DL5, a Novel Killer-Cell Receptor with a D0-D2 Configuration of Ig-Like Domains. *J Immunol.* 164: 5797-5804, 2000
- Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L., and Moretta, A.: NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med.* 187: 2065-2072, 1998
- Vitale, M., Castriconi, R., Parolini, S., Pende, D., Hsu, M. L., Moretta, L., Cosman, D., and Moretta, A.: The leukocyte Ig-like receptor (LIR)-1 for the cytomegalovirus UL18 protein displays a broad specificity for different HLA class I alleles: analysis of LIR-1 + NK cell clones. *Int Immunol.* 11: 29-35., 1999
- Voskoboinik, I., Dunstone, M. A., Baran, K., Whisstock, J. C., and Trapani, J. A.: Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol* 235: 35-54., 2010
- Wang, Y. Y., Xu, H., Zheng, X. D., Wei, H. M., Sun, R., and Tian, Z. G.: High Expression of NKG2A/CD94 and Low Expression of Granzyme B Are Associated with Reduced Cord Blood NK Cell Activity. *Cell Mol Immunol.* 4: 377-82., 2007

-
- Wilson, M., Torkar, M., Haude, A., Milne, S., Jones, T., Sheer, D., Beck, S., and Trowsdale, J.: Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 4778-4783, 2000
- Winter, C. C., Gumperz, J. E., Parham, P., Long, E. O., and Wagtmann, N.: Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol.* 161: 571-7., 1998
- Wu, M. F. and Raulet, D. H.: Class I-deficient hemopoietic cells and nonhemopoietic cells dominantly induce unresponsiveness of natural killer cells to class I-deficient bone marrow cell grafts. *J Immunol.* 158: 1628-33., 1997
- Yawata, M., Yawata, N., Draghi, M., Little, A. M., Partheniou, F., and Parham, P.: Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med.* 203: 633-45., 2006
- Yawata, M., Yawata, N., Draghi, M., Partheniou, F., Little, A. M., and Parham, P.: MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response. *Blood.* 112: 2369-80., 2008
- Yawata, M., Yawata, N., McQueen, K., Cheng, N., Guethlein, L., Rajalingam, R., Shilling, H., and Parham, P.: Predominance of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression. *Immunogenetics* 54: 543-550, 2002
- Yokoyama, W. M. and Kim, S.: How do natural killer cells find self to achieve tolerance? *Immunity.* 24: 249-57., 2006
- Young, N. T. and Uhrberg, M.: KIR expression shapes cytotoxic repertoires: a developmental program of survival. *Trends Immunol.* 23: 71-5., 2002

4 Lebenslauf

Dipl.-Biol. Kathrin Schönberg

Persönliche Angaben

Geburtsdatum und -ort: 01.08.1982 in Düsseldorf
Familienstand: ledig

Hochschulstudium

01/2007-06/2011 Promotionsstudium am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Thema: "Expression und Regulation der KIR-Rezeptoren auf humanen Natürlichen Killerzellen"

10/2001 – 12/2006 Studium der Biologie (Diplom) an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
Thema der Diplomarbeit: „Analyse des KIR Repertoires auf NK-Zellen zur Untersuchung der Mechanismen zur Toleranzinduktion“
Abschluss: Diplom-Biologin (Note 1,8)

Schulausbildung

08/1992 – 07/2001 Humboldt-Gymnasium, Düsseldorf
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note 1,6)

08/1988– 07/1992 Joachim-Neander-Gemeinschaftsgrundschule, Düsseldorf

5 Publikationen im Rahmen der Doktorarbeit

5.1 Veröffentlichungen

Uhrberg, M., **Schönberg, K.**, Weinhold, S., and Trompeter, H. I.: Non-viral gene delivery into primary natural killer lymphocytes. *Faseb J.* 20: 2660., 2006

Schönberg, K., Trompeter, H. I., and Uhrberg, M.: Delivery of DNA into natural killer cells for immunotherapy. *Methods Mol Biol.* 423: 165-72., 2008

Rathmann, S., Glatzel, S., **Schönberg, K.**, Uhrberg, M., Follo, M., Schulz-Huotari, C., Kaymer, M., Veelken, H., Finke, J., and Fisch, P.: Expansion of NKG2A-LIR1- natural killer cells in HLA-matched, killer cell immunoglobulin-like receptors/HLA-ligand mismatched patients following hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 16: 469-81., 2010

Schönberg, K., Sribar, M., Enczmann, J., Fischer, J. C., and Uhrberg, M.: Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood.* 117: 98-107., 2011

Schönberg, K., Hejazi, M., and Uhrberg, M.: Clonal analysis of NK cell effector functions by multi-parameter flow cytometry. *Methods Mol Biol.* in press, 2011

Schönberg, K., Fischer, J. C., Kögler, G., and Uhrberg, M.: Neonatal NK cell repertoires are functionally but not structurally biased towards recognition of self HLA class I. *Blood* 2011

Bisher noch nicht veröffentlichte Publikationen:

Bienemann, K., Iouannidou, K., **Schönberg, K.**, Reuther, S., Feyen, O., Huck, K., Schuster, F., Uhrberg, M., Laws, H., and Borkhardt, A.: iNKT cell reference values in healthy children and adolescents, *submitted*

Poertner, L., **Schönberg, K.**, Uhrberg, M., Bruennert, D., Reusch, U., Littel, M., Haas, R., and Neumann, F.: T and NK cells of patients with B cell NHL exert cytotoxic function against lymphoma cells following binding of the respective bispecific tetravalent antibody CD19 X CD3 or CD19 X CD16, *Manuskript*

5.2 Kongressbeiträge, Poster und Vorträge

Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses 2007

22.06.2007 Düsseldorf

Vortrag: „Entwicklung und Diversität der Natürlichen Killerzellen im neonatalen und adulten Immunsystem“

37th Annual Meeting of the German Society for Immunology

05.-08-09.2007 Heidelberg

Vortrag und Poster: “Correlation of KIR expression and presence of HLA-C ligands in adult but not neonatal NK cells: transition from a naive to an adult NK cell repertoire”

Regenerative medicine Era Stem conference 2007

08.-10.11.2007 Timisoara (Rumänien)

Workshop: “Nucleofection of NK cells”

Zum Vortrag eingeladen: “NK cells and their receptors”

Natural Killer Cell Symposium 2008

21.-23-05.2008 Bad Herrenalb

Poster: “Correlation of KIR expression and presence of HLA-C ligands in adult but not neonatal NK cells”

Reisestipendium erhalten

2nd European Congress of Immunology (ECI)

13.-16.09.2009 Berlin

Poster: “Functional maturation and structural adaption of NK cell repertoires in response to HLA class I ligands during human development”

Vortrag: “KIR Repertoire of NK cells from neonatal, pediatric and adult blood”

Reisestipendium erhalten

Natural Killer Cell Symposium 2009

04.11.-06.11.2009 Freiburg

Poster: “Differential influence of group A and group B KIR haplotypes on HLA-C-specific NK cell repertoires”

6 Danksagung

Mein allererster und großer Dank gilt Prof. Dr. Markus Uhrberg, der meine Arbeit betreut hat und mir die Möglichkeit gegeben hat an diesem interessanten Thema und in seiner tollen Gruppe zu arbeiten, und der mich stets gefördert und gefordert hat. Die (oft nicht kurzen) Diskussionen mit ihm haben meine Arbeit bereichert.

Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei Prof. Dr. D. Willbold aus der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät für die Übernahme des Korreferats.

Danke an Johannes Fischer für die Möglichkeit am ITZ unter seiner kommissarischen Leitung meine Doktorarbeit anfertigen zu können. Vielen Dank für die Einweisung in die große Welt der Durchflusszytometrie und der Hilfe bei der Statistik. Ich danke den Mitarbeitern des HLA-Labors unter der Leitung von Jürgen Enczmann für das Benutzen der PCR-Maschinen, die Überlassung von Blutproben, Typisierungen und die vielen kleinen Gefälligkeiten. Desweiteren bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Gesine Kögler für die vielen Nabelschnurblute, die sie mir überlassen hat.

Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Borkhardt und Kasiani Ioannidou für die Möglichkeit bei einem gemeinsamen Projekt auch das Blut von Kindern untersuchen zu können. In Frankfurt bedanke ich mich bei Torsten Tonn & Gabi Spohn für das Schicken von unzähligen Buffy Coats.

Mein Dank gilt auch Katharina Raba für diverse Antworten, was die Durchflusszytometrie angeht. Danke, dass Du durch deine Anwesenheit den Canto am Laufen gehalten hast ;-)

Meine Arbeit hätte mir nicht so viel Spaß gemacht, wären nicht zahlreiche nette Kollegen zu Freunden geworden.

Liebe Angie, danke für die gemeinsamen Tage (und auch die Nächte) im Büro und Labor, die das Arbeiten angenehm gemacht haben. Danke auch für die nachmittägliche Schokoladenration und das unermüdliche Finden von doppelten Leerzeichen und Fehlern in dieser Arbeit. Ich wünsche Dir viel Glück mit deinen microRNAs.

Maryam ☺ ein großes Dankeschön geht an Dich. Für mich warst du die beste Diplomandin, die man sich vorstellen kann, die auch eine sehr gute Doktorandin (und Mama) sein wird ☺ viel Erfolg bei Deinen Arbeiten!

Danke, dass ihr beiden immer auf meiner Seite standet, meine gute Laune geteilt habt und das Arbeiten mit euch so einfach und gut war.

Julia ☺ die beste TA der Welt, die uns leider verlassen hat, bevor ich fertig wurde, aber mir vorher alles gezeigt hat, was ich wo in den Laboren finde.

Sandra, Nina, Jens (Kekschen?), Xiaoyi, Rui, danke für die vielen nette Stunden im Labor, die gute Laune und die gemeinsame Zeit, sowie die Nikolaus-Waffelessen mit Glühwein auf dem Gang, Cocktail-Abende und, und, und☺.

Ein ganz besonderer Dank an ein paar Ex-Doktoranden des ITZ:

Martina (Frau Nachbarin), Jin (die Apothekerin meines Vertrauens), Sabine (Wir müssen am Wochenende zu Spaceburger). Ihr hattet Recht: Alles wird gut!

Glückwunsch, dass ihr vor mir erwachsen geworden seid und Danke für so viele Dinge: Schön, dass ihr da wart, als ich angefangen habe und ihr immer noch da seid. Für Vitamine während der Arbeit, dafür dass lange Abende im Labor nicht immer alleine verbracht werden mussten. Für die Lebenshilfe am Telefon oder einfach nur Quatschen beim Kochen und Essen oder gemeinsames Feiern (auch mal als Hasen oder Bienchen)!

Ein großer Dank geht auch an Danielle, die für Abwechslung vom Laboralltag gesorgt hat. Danke für gemeinsame Shoppingtouren auf dem Bücherbummel und in der Stadt, fürs Englisch lernen, und so vieles mehr.

Ich danke meiner Familie, meinem Vater, meiner Mutter, meinem Bruder Peter, Sarah, Tante Ulla, Onkel Heinz und Alex, sowie meinem Opa Erich und Inge: Für die Fragen, wann ich denn endlich fertig bin (jetzt!!!) und immerwährende Unterstützung, laute Familienfeiern und vieles mehr! Ihr habt an mich geglaubt, Danke!

Ein Riesendankeschön an Torsten: Danke für die schönen letzten zwei Jahre, fürs Bekochen, für die gute Laune, fürs in Ruhe lassen, wenn ich Ruhe brauchte, immerwährende Unterstützung, für Deine Geduld und Verständnis, wenn es auch mal wieder länger im Labor gedauert hat, und Dein Vertrauen in mich! Danke für alles!

Aber das größte Dankeschön geht an meine Mutter, ohne die dich die letzten 10 Jahre an der Uni nicht überstanden hätte: Danke, dass du mich immer unterstützt hast, wenn der Monat wieder zulange dauerte, für leckeres Essen am Sonntag, den Friseur und die Unterstützung während Studium und Promotion. Danke für einfach alles!

☐Ich bin immer noch verwirrt, aber auf einem höheren Niveau.☐
Enrico Fermi (1901-1954)

☐So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären, wenn man nach der Zeit und den Umständen das Möglichste getan hat.☐

Johann Wolfgang von Goethe, (1749-1832)

7 Erklärung

Hiermit erkläre ich 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 Institution eingereicht habe. Weiterhin erkläre ich, dass vorher noch keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen wurden.

Düsseldorf, den 14.04.2011

Kathrin Schönberg

**Expression und Regulation des
KIR-Repertoires von humanen Natürlichen
Killerzellen**

Kumulative

Inaugural  Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Kathrin Schönberg

aus Düsseldorf

Düsseldorf 2011

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: Prof. Dr. Markus Uhrberg

Koreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 14.04.2011

„Das Leben ist wert, gelebt zu werden, sagt die Kunst, die schönste Verführerin; das Leben ist wert, erkannt zu werden, sagt die Wissenschaft.“

Friedrich Nietzsche (1844-1900)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Zusammenfassung	V
Summary	VI
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.2 Die Natürliche Killer-Zelle.....	4
1.2.1 Phänotyp und Funktion von NK-Zellen	4
1.2.2 Effektormechanismen der NK-Zellen.....	6
1.3 NK-Zellrezeptoren	7
1.3.1 NCR und LIR.....	7
1.3.2 NKG2 Familie.....	8
1.4 KIR.....	9
1.4.1 KIR-Nomenklatur	9
1.4.2 KIR-Genetik	11
1.4.3 KIR-Liganden	13
1.4.3.1 HLA (Aufbau, Funktion und Struktur)	13
1.4.3.2 KIR-Rezeptoren und ihre Liganden	15
1.4.4 KIR-Expression und Regulation.....	16
1.4.4.1 Endogene und exogene Faktoren.....	17
1.4.4.2 Toleranz	18
1.4.4.3 Einfluss von HLA-Klasse I-Liganden auf das Repertoire	18
1.4.4.4 Einfluss von HLA-Klasse I-Liganden auf die Funktion	19
1.5 NK-Zellen im Nabelschnurblut	21
1.6 NK-Zellen in der Klinik	23
1.6.1 NK-Zellen und Schwangerschaft	23
1.6.2 NK-Zellen und Stammzelltransplantationen	24
1.6.3 NK-Zellen und Krankheiten.....	26
1.7 Ziel dieser Arbeit	27

2	Ergebnisse und Diskussion	29
2.1	Überblick	29
2.2	Clonal analysis of NK cell effector functions by multi-parameter flow cytometry..	30
2.2.1	Zusammenfassung	31
2.2.2	Publikation	33
2.3	Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition.....	52
2.3.1	Zusammenfassung	53
2.3.2	Publikation	56
2.4	Neonatal NK cell repertoires are functionally but not structurally biased towards recognition of self HLA class I	72
2.4.1	Zusammenfassung	73
2.4.2	Publikation	75
2.5	Expansion of NKG2A ⁺ LIR1 ⁺ NK cells in HLA-Matched, KIR/HLA-Ligand Mismatched Patients following Hematopoietic Cell Transplantation	88
2.5.1	Zusammenfassung	89
2.5.2	Publikation	91
2.6	iNKT cell reference values in children: The absolute iNKT cell count is stable from birth to adulthood	105
2.6.1	Zusammenfassung	106
2.6.2	Publikation	107
2.7	Ausblick	129
3	Literatur	130
4	Lebenslauf.....	138
5	Publikationen im Rahmen der Doktorarbeit	139
5.1	Veröffentlichungen	139
5.2	Kongressbeiträge, Poster und Vorträge	140
6	Danksagung.....	141
7	Erklärung.....	143

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität)
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigenpräsentierende Zelle
CB	Cordblood (Nabelschnurblut)
CD	Cluster of differentiation (Unterscheidungsgruppen)
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CLP	Common lymphoid progenitor (gemeinsamer lymphoider Vorläufer)
CMV	Zytomegalie-Virus
et al.	et alias, lateinisch: und andere
GvHD	Graft-versus-host-disease
GvL	Graft-versus-Leukemia
HCT	Hematopoietic cell transplantation (Hämatopoietische Zelltransplantation)
HCV	Hepatitis C-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Human leukocyte antigen (Humanes Leukozyten Antigen)
HLA-C1,2	HLA-C Gruppe 1,2
HSC	Hematopoietic stem cell (Hämatopoietische Stammzelle)
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation (Hämatopoietische Stammzelltransplantation)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNKT	Invariante NKT-Zellen
ITAM	Immunoreceptor tyrosin-based activating motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
KIR	Killer cell immunoglobulin-like receptor
LAMP-1,2	Lysosomal-associated membrane protein 1,2
LIR	Leukocyte Ig-like receptor
LRC	Leukocyte receptor complex (Leukozyten Rezeptor Komplex)
MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NCR	Natural cytotoxicity receptors (Natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren)
NKC	NK cell cluster
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PB	Peripheres Blut

PBMC	Peripheral blood mononuclear cells (Periphere mononukleäre Zellen)
PI	Propidium Iodid
TCR	T cell receptor (T-Zellrezeptor)
TNF	Tumornekrosefaktor

Zusammenfassung

Natürliche Killer (NK)-Zellen detektieren Veränderungen in der Expression von HLA-Klasse I-Molekülen (MHC-Klasse I-Moleküle des Menschen) auf Körperzellen mit Hilfe bestimmter inhibitorischer Rezeptoren, insbesondere der KIR- (*killer cell Ig-like receptors*) und NKG2-Rezeptorfamilien. Während KIR-Rezeptoren hochspezifisch für bestimmte HLA-Klasse I-Epitope sind, handelt es sich bei NKG2A um einen Pan-HLA-Klasse I-Rezeptor. Diese Rezeptoren werden klonal verteilt exprimiert, d.h. von NK-Zelle zu NK-Zelle unterschiedlich, und bilden zusammen das sogenannte NK-Zellrepertoire. Bisher war unklar, ob und wie das humane NK-Zellrepertoire durch die Interaktion dieser Rezeptoren mit ihren spezifischen HLA-Klasse I-Liganden geformt wird. Um die Prinzipien dieser Interaktion besser zu verstehen, wurden NKG2A und KIR-Rezeptoren sowie ihrer HLA-Klasse I Liganden in peripherem Blut und Nabelschnurblut analysiert. Um die gleichzeitige Detektion der klonalen Expression und Funktion aller wichtigen inhibitorischen Rezeptoren auf NK-Zellen zu ermöglichen, wurde hierfür ein durchflusszytometrisches Verfahren etabliert, bei dem die KIR- und NKG2A-Expression zusammen mit funktionalen Markern wie CD107 und Interferon- γ bestimmt werden kann.

Die präsentierten Ergebnisse zeigen, dass sich KIR und NKG2A-Rezeptoren gegenläufig zueinander verhalten, und zwar sinkt die Frequenz von NKG2A-exprimierenden NK-Zellen von der Geburt bis zum Erwachsenenalter um 50%, während sich reziprok dazu die KIR-Expression fast verdoppelt. Diese Ergebnisse deuten auf eine Transition von einem unspezifischen neonatalen zu einem hochspezifischen adulten NK-Zellrepertoire hin. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass in adulten NK-Zellen eine signifikante Adaption der KIR-Expressionsfrequenzen zum entsprechenden HLA-Klasse I-Liganden auftritt, während dieser Effekt im neonatalen Blut nicht nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise zeigen sowohl neonatale als auch adulte NK-Zellen eine funktionale Adaption an HLA-Klasse I in Bezug auf Zytotoxizität und Zytokinproduktion, ein Prozess der auch als Lizenzierung bezeichnet wird. Insgesamt konnte damit in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Lizenzierung der strukturellen Adaptation des NK-Zellrepertoires vorausgeht und beide Prozesse wahrscheinlich nicht direkt miteinander verknüpft sind.

Summary

Natural killer (NK) cells sense changes in the expression of HLA class I molecules (human MHC class I molecules) to target cells using specific inhibitory receptors, especially the KIR (killer cell Ig-like receptors) and NKG2 receptor families. While KIR receptors are highly specific for certain HLA class I epitopes, NKG2A is a Pan-HLA class I receptor. These receptors are clonally expressed, i.e. different from NK cell to NK cell, and form together the so-called NK cell repertoire. However, it was unclear whether and how the human NK cell repertoire is shaped by the interaction of these receptors with their specific HLA class I ligands. To understand the principles of this interaction better, NKG2A and KIR receptors and their HLA class I ligands were analyzed in peripheral blood and cord blood. To enable the simultaneous detection of clonal expression and function of all major inhibitory receptors on NK cells, a flow cytometric protocol was established, in which the KIR and NKG2A expression can be determined together with functional markers such as CD107 and Interferon- γ .

The results show that KIR and NKG2A receptors act in opposite directions. The frequency of NKG2A-expressing NK cells decreases from birth to adulthood by 50% while reciprocally the KIR expression almost doubled. These results suggest a transition from a non-specific neonatal to a highly specific adult NK cell repertoire. This hypothesis is supported by the observation that in adult NK cells a significant adaptation of KIR expression frequencies for the HLA class I ligands occurs while this effect in neonatal blood was not detectable. Interestingly, both neonatal and adult NK cells show a functional adaptation to HLA class I in terms of cytotoxicity and cytokine production, a process which is also referred to as licensing. Furthermore, the study suggests that functional education of cognate KIR by self-HLA class I precede structural adaptation of KIR repertoires and that both processes are not directly linked to each other.

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist das biologische Abwehrsystem des Körpers gegen Krankheitserreger wie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten und besteht aus vielen zellulären und humoralen Bestandteilen, die ein komplex miteinander verflochtenes System bilden, um pathogene und körperfremde Strukturen zu erkennen und zu vernichten. Das Immunsystem lässt sich in eine angeborene und eine adaptive Immunantwort unterteilen.

Das angeborene Immunsystem bekämpft Krankheitserreger ohne vorherige Stimulation oder zuvor Kontakt mit dem Erreger gehabt zu haben. Neben anatomischen und physiologischen Barrieren und dem Komplementsystem ist ein Teil des angeborenen Immunsystems auch zellvermittelt. Dem gehören Granulozyten, Monozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) an. Diese Zellen sind in der Lage, körperfremde von körpereigenen Zellen und Strukturen zu unterscheiden. Entweder sie erkennen das Fehlen von körpereigenen Strukturen oder das Vorhandensein konservierter Pathogenstrukturen als körperfremd und vernichten die Erreger entweder durch Phagozytose- oder Lysemechanismen. Zudem produzieren viele dieser Zellen chemische Stoffe wie Interleukine (IL) und Interferone (IFN), die andere Immunzellen aktivieren und die Immunantwort verstärken.

Das adaptive Immunsystem besteht aus humoralen und zellulären Komponenten, die mit Hilfe von Rezeptoren in der Lage sind, spezifische Strukturen der Angreifer als körperfremd zu erkennen und zu vernichten. Es zeichnet sich durch seine Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Erregern aus und vermittelt Immunität durch gezielte Zellabwehrmechanismen und Antikörper. Eine weitere Eigenschaft des adaptiven Immunsystems ist die Ausbildung so genannter „Memory-Zellen“. Dies sind Gedächtniszellen, die es ermöglichen, bei einer erneuten Ansteckung schneller und effizienter zu reagieren.

Die Besonderheit des adaptiven Immunsystems besteht in der Diversität und Spezifität der Rezeptoren von B- und T-Zellen. Durch verschiedene genetische Mechanismen wird eine Vielzahl von verschiedenen Rezeptoren erzeugt, die alle eine unterschiedliche Spezifität

aufweisen. Die humorale Immunantwort wird hauptsächlich durch B-Zellen vermittelt. B-Zellen erkennen mittels ihrer Rezeptoren sowohl gebundene als auch freie Antigene und können nach Aktivierung proliferieren und zu Plasmazellen differenzieren. Diese produzieren dann Antikörper, die an die fremden Strukturen binden und diese markieren. Sowohl Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems sind mittels Rezeptoren in der Lage die Immunglobuline zu erkennen und die Lyse oder Phagozytose einzuleiten.

Die zelluläre Immunantwort wird durch T-Zellen vermittelt. T-Zellen sind Lymphozyten, die sich nicht wie die übrigen Lymphozyten im Knochenmark entwickeln, sondern ihre Reifung im Thymus vollziehen. Sie tragen den T-Zellrezeptor (*T-Cell Receptor*, TCR), mit dem jede Zelle ein anderes, spezifisches Antigen erkennen kann. Es gibt verschiedene T-Zellpopulationen, die sich in ihren Oberflächenrezeptoren und Funktionen unterscheiden. Durch so genannte Differenzierungscluster (*Cluster of differentiation*, CD) lassen sich alle Zellen charakterisieren. CD3 ist ein T-Zellmarker, der auf T-Zellen mit dem TCR assoziiert exprimiert wird. CD3 dient dabei der Signalweiterleitung.

CD4-positive T-Zellen sind T-Helferzellen. Sie erkennen Antigene, die mit Hilfe von MHC-Klasse II-Molekülen (*Major histocompatibility complex*, MHC) auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen, B-Zellen und Monozyten, präsentiert werden. Dadurch werden diese T-Zellen aktiviert und setzen Interleukine frei, die wiederum andere Immunzellen, wie B-Zellen oder auch zytotoxische T-Zellen aktivieren.

CD8-positive T-Zellen sind zytotoxische T-Zellen, die Antigene erkennen, die an MHC-Klasse I-Moleküle gebunden sind. MHC-Klasse I-Moleküle werden auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Bei Erkennung der Antigene durch den TCR und seinen Co-Rezeptor CD8 wird die Lyse der Zielzelle eingeleitet (Janeway et al., 2002).

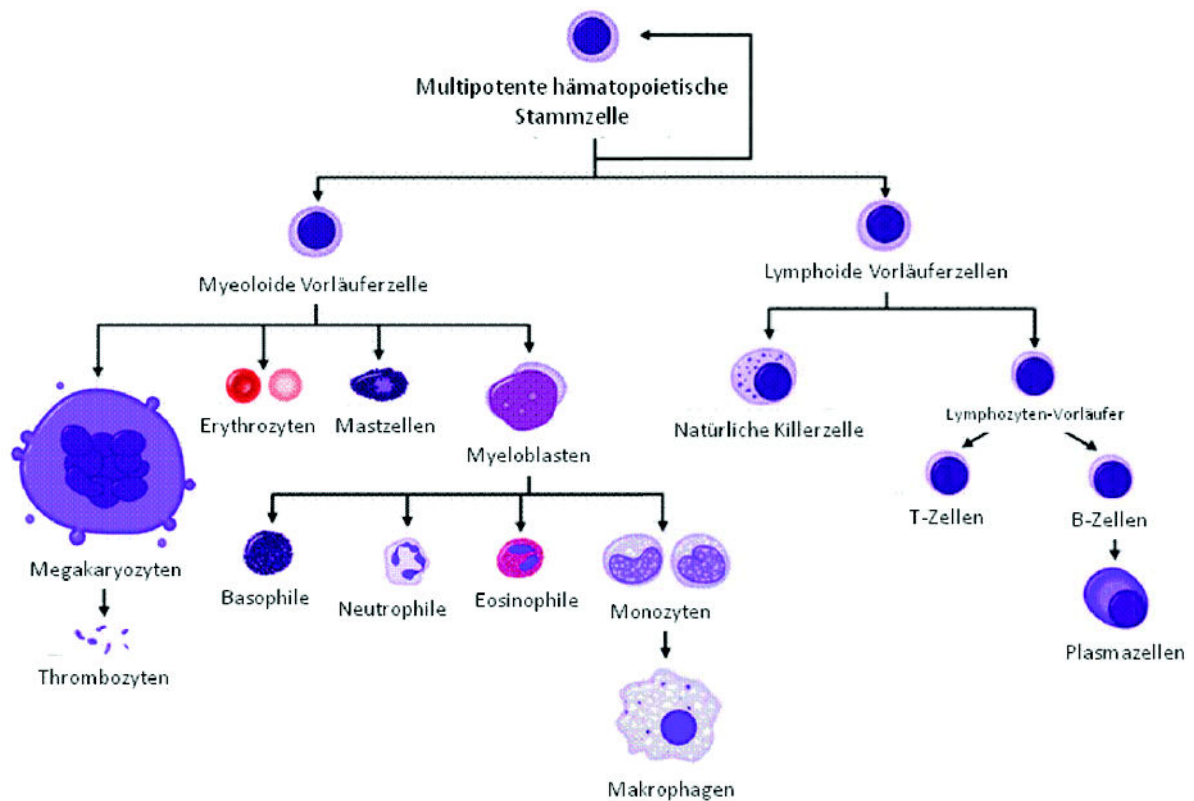


Abbildung 1-1: Darstellung der Hämatopoiese. Geändert nach www.allthingsstemcell.co

Der Hauptteil der Immunzellen zirkuliert im peripheren Blut des Menschen, das sich aus verschiedenen Bestandteilen zusammensetzt. Zunächst lässt sich das Blut in Blutplasma und zelluläre Bestandteile unterteilen. Im Plasma sind Proteine, Salze, Zucker und Nährstoffe gelöst. Die zellulären Bestandteile lassen sich noch einmal in Gruppen unterteilen. Erythrozyten (rote Blutkörperchen) sind für den Sauerstofftransport im Blut verantwortlich, Thrombozyten (Blutplättchen) für die Blutgerinnung, und Leukozyten (weiße Blutkörperchen) enthalten die Zellen des Immunsystems: Granulozyten (Eosinophile, Neutrophile, Basophile), Monozyten und Lymphozyten (T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen).

Alle hämatopoietischen Zellen stammen von einer Vorläuferzelle, der sogenannten hämatopoietischen Stammzelle (hematopoietic stem cell, HSC) ab. Diese Zellen erneuern sich zum einen selbst und differenzieren zum anderen in reife hämatopoietische Zellen über verschiedene Zwischenstufen, die über ihre Oberflächenmarker definiert werden.

Alle hämatopoietischen Zellen sind positiv für CD34, die gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle (common lymphoid progenitor, CLP) ist weiterhin positiv für CD45RA und CD7 (Blom and Spits, 2006).

Im ersten Schritt der Differenzierung bilden sich myeloide oder lymphoide Vorläuferzellen. Aus den myeloiden Vorläuferzellen entstehen Erythrozyten, Megakaryozyten, Granulozyten und Monozyten, während die lymphoiden Vorläufer zu NK-, T- oder B-Zellen differenzieren (Abbildung 1-1). Für die weiteren Differenzierungsschritte sind zum einen Transkriptionsfaktoren verantwortlich, zum anderen Zytokine sehr entscheidend. Beispielsweise benötigen T-Zellen für ihre Entwicklung IL-7, während NK-Zellen u.a. IL-15 brauchen. Es konnten noch nicht alle Schritte der lymphoiden Entwicklung geklärt werden. Besonders die Zellstadien der frühen Vorläufer sind in vielen Fällen noch weitestgehend unbekannt.

Des Weiteren zeigen neueste Studien zur Transdifferenzierung, dass auch aus myeloiden Vorläufern *in vitro* NK-Zellen generiert werden können (Grzywacz et al., 2010) was belegt, dass ein bestimmter hämatopoietischer Differenzierungsweg nicht endgültig determiniert sein muss. Weiterhin zeigt die Möglichkeit, aus Fibroblasten hämatopoietische Zellen zu generieren (Szabo et al., 2010), dass vermeintlich enddifferenzierte nicht-hämatopoietische Zellen durch Überexpression wichtiger Transkriptionsfaktoren, sogenannter Masterregulatoren, in ein hämatopoietisches Differenzierungsschicksal überführt werden können.

1.2 Die Natürliche Killer-Zelle

1.2.1 Phänotyp und Funktion von NK-Zellen

NK-Zellen sind eine Subpopulation der Lymphozyten, die als Teil der angeborenen Immunantwort für die Bekämpfung von virusinfizierten und tumorösen Zellen verantwortlich sind. Sie sind große, granuläre Lymphozyten, deren Anteil an Lymphozyten im Blut durchschnittlich 10-15 % beträgt.

NK-Zellen können im Gegensatz zu T- und B-Zellen virusinfizierte Zellen und Tumorzellen ohne vorherige Antigenerkennung töten. Damit bilden sie ein wichtiges Bindeglied zwischen

angeborener und adaptiver Immunantwort. Sie sind als eine der ersten Zellen am Infektionsort und bekämpfen diese zu einem sehr frühen Zeitpunkt. Dabei dämpfen sie die Infektion ein, bis die T-Zellantwort startet und rekrutieren durch Zytokinausschüttung weitere Immunzellen.

NK-Zellen zeichnen sich durch die Anwesenheit der Oberflächenmarker CD56 sowie die Abwesenheit von CD3 aus (Lanier et al., 1991). CD56 gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und ist ein neurales Zelladhäsionsmolekül (*Neural Cell Adhesion Molecule*, NCAM), dessen Bedeutung auf NK-Zellen noch nicht vollständig geklärt ist. Basierend auf der Dichte von CD56 auf der Oberfläche der NK-Zellen lassen sich NK-Zellen in zwei Populationen unterteilen, die sich phänotypisch und funktionell voneinander unterscheiden (Cooper et al., 2001; Jacobs et al., 2001). Die Zellen, die viel CD56 auf ihrer Oberfläche tragen, nennt man CD56^{bright}-Zellen, sie machen bis zu 10% der NK-Zellpopulation aus. CD56^{dim}-Zellen dagegen sind Zellen mit einer geringeren Zahl an CD56-Molekülen auf der Oberfläche und bilden mit ca. 90% den Großteil der NK-Zellen. Funktionell unterscheiden sich diese beiden NK-Zellpopulationen darin, dass die CD56^{bright}-Zellen in ihrer Immunantwort vorwiegend Zytokine produzieren, während CD56^{dim}-Zellen vorwiegend zytotoxische Aufgaben erfüllen. Weiteres Unterscheidungsmerkmal ist die Expression des Fc-Rezeptors CD16, auf CD56^{bright} ist er kaum oder gar nicht vorhanden, während die CD56^{dim} ihn in hoher Dichte exprimieren.

CD16, ein niedrigaffiner Rezeptor für den Fc-Teil des Immunglobulin G (IgG) vermittelt die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC). Dabei erkennt und bindet CD16 antikörpermarkierte Zellen und leitet daraufhin einen Lysemechanismus ein.

Es gibt eine kleine Population von T-Zellen, die neben ihren T-Zellmarkern wie CD3 oder TCR auch Merkmale von NK-Zellen aufweisen. Diese so genannten NK-ähnlichen T-Zellen tragen CD56 sowie NK-Zellrezeptoren auf ihrer Oberfläche. Ihre Aufgabe im Immunsystem ist noch nicht vollständig geklärt. Man weiß nur, dass es insbesondere CD8⁺-Memory-T-Zellen sind, die diese Merkmale aufweisen (Young and Uhrberg, 2002).

1.2.2 Effektormechanismen der NK-Zellen

Der NK-Zelle stehen verschiedene Mechanismen zu Verfügung eine Zielzelle zu töten. Der erste Weg führt über zytotoxische Granula, die durch Degranulation in Richtung der Zielzelle ausgeschüttet werden. Es sind spezialisierte Lysosomen, die Granzym B und Perforin enthalten. Der saure pH der Granula hält die Enzyme inaktiv, bis sie in das Zytosol der Zielzelle gelangen. Ein Molekül namens Serglycin bindet im sauren Milieu stärker an Granzym B und inhibiert es bis es im neutralen Zytoplasma ankommt und die Bindung sich löst. Perforin wird ebenfalls inhibiert, und zwar durch Calreticulin (Lieberman, 2003). Die Membran wird durch lysosomale Proteine, wie z.B. CD107a und b (*lysosomal-membran associated proteins*, LAMP1 und 2) stabilisiert, welche die Selbstzerstörung der NK-Zellen durch die Effektormoleküle verhindern (Chavez-Galan et al., 2009).

Gegenstand der Diskussion ist immer noch, auf welchem Weg Granzym B dabei in die Zelle gelangt. Sicher ist lediglich, dass Perforin dazu benötigt wird. Möglich sind zwei Szenarien: Perforin ist in der Lage, die Zellmembran der Zielzelle zu perforieren und die Granzyme gelangen durch die entstandenen Poren in die Zelle. (Cullen and Martin, 2008; Voskoboinik et al., 2010). Der zweite mögliche Mechanismus ist, dass Granzym B über Rezeptoren der Zelle endozytotisch aufgenommen und Perforin dazu benötigt wird die Endosomen zu perforieren, damit die Granzyme in das Zytosol gelangen (Lieberman, 2003; Lord et al., 2003). Dort angekommen, können sie zur Tat schreiten: Es gibt fünf verschiedene Granzyme im humanen System: A, B, H, K und M. Die genaue Funktion der Granzyme H, K und M ist nicht bekannt, aber sie haben wohl nicht die starke zytotoxische Funktion wie A und B. Granzym B ist wie alle Granzyme eine Serin-Protease und ist zudem das wichtigste Granzym der NK-Zellen. Es initiiert den Caspase-Signalweg, der letztendlich zur Apoptose der Zielzelle führt, indem es direkt die Caspase-3 schneidet oder indirekt über die Mitochondrien die Freisetzung apoptotischer Faktoren aktiviert. Granzym A ist in der Lage auf einem langsameren und Caspase-unabhängigen Weg Apoptose einzuleiten (Lieberman, 2003). Die Konsequenz beider Wege ist der Zelltod.

Die Induktion der Apoptose kann jedoch auch über Rezeptoren vermittelt werden. Der Fas-Rezeptor der Zielzelle bindet an den Fas-Liganden der NK-Zelle und löst damit ebenfalls den Caspase-Signalweg aus, der über eine Kette von Enzymreaktionen zur Apoptose führt (Chavez-Galan et al., 2009).

Ein weiterer wichtiger Effektormechanismus der NK-Zellen ist die Ausschüttung von Zytokinen. Es werden sowohl Interleukine wie IL-3, IL-10 und IL-13 sowie Interferon- γ (IFN- γ) ausgeschüttet, um andere Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems zu aktivieren. Ein Beispiel ist die Bekämpfung virusinfizierter Zellen. Die infizierten Zellen produzieren bei Auftreten von viraler doppelsträngiger RNA IFN- α und IFN- β , welche wiederum die NK-Zelle aktivieren. Durch diese Aktivierung schüttet sie IFN- γ aus, das Makrophagen aktiviert und die Expression der MHC-Klasse I-Moleküle und somit die Antigenpräsentation erhöht. Dadurch sind wiederum T- und B-Zellen in der Lage, diese Zellen als fremd zu erkennen und ihre Lysemechanismen in Gang zu setzen.

Ist man zunächst davon ausgegangen, dass lediglich die CD56^{bright} NK-Zellen Zytokine ausschütten, ist nun bekannt, dass auch die CD56^{dim} dazu in der Lage sind (Fauriat et al., 2009).

1.3 NK-Zellrezeptoren

Neben den *Killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIR), die in Kapitel 1.4 ausführlich behandelt werden, gibt es noch weitere Rezeptoren auf NK-Zellen, die durch eine Balance aus inhibitorischen und stimulatorischen Signalen Lyse der Zielzelle auslösen oder verhindern. Die meisten dieser Rezeptoren werden in einem Komplex, dem NK-Zellcluster (*NK cell cluster*, NKC) auf Chromosom 12p13.1, kodiert.

1.3.1 NCR und LIR

Die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (*natural cytotoxic receptor*, NCR) NKp30, NKp44 und NKp46 sind aktivierende Rezeptoren und werden auf NK-Zellen exprimiert. Dabei werden NKp30 und NKp46 auf ruhenden sowie aktivierten NK-Zellen exprimiert, wogegen NKp44 erst nach IL-2 Aktivierung exprimiert wird. (Pende et al., 1999; Sivori et al., 1997; Vitale et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass NKp46 und NKp44 an verschiedene virale Hämagglutinine binden können und dadurch aktiviert werden (Mandelboim et al., 2001). NKp30 induziert Zelllyse und ist in die Interaktion mit dendritischen Zellen involviert. Außerdem bindet NKp30 an BAT3, einen von Tumorzellen bei Stress ausgeschütteten Faktor

und ist damit notwendig für die Tumorbekämpfung (Moretta et al., 2006; Pogge von Strandmann et al., 2007). Die NCR sind die einzigen Rezeptoren, deren Expression auf die NK-Zelle beschränkt ist (Bianchini et al., 2001).

Die inhibitorischen LIR (*leukocyte Ig-like receptor*) LIR-1 und LIR-2 sind inhibitorische Rezeptoren mit vier extrazellulären Domänen und ebenfalls einer ITIM-Domäne im Zytoplasma. LIR-1 erkennt HLA-G (*human leucocyte antigen*, HLA), hat eine breite HLA-Klasse I-Spezifität und erkennt das virale Homolog UL18, wogegen LIR-2 HLA-F als Liganden hat (Vitale et al., 1999; Lepin et al., 2000).

1.3.2 NKG2 Familie

Eine Gruppe von MHC-abhängigen Rezeptoren ist die NKG2-Familie, die zu den C-Typ-Lektin-ähnlichen Rezeptoren gehört. Sie besteht aus fünf Mitgliedern: NKG2A, NKG2C, NKG2D, NKG2E und NKG2F. Während alle anderen Mitglieder der NKG2-Familie Heterodimere mit CD94 bilden, kommt NKG2D nur als Homodimer vor.

NKG2A ist der einzige inhibitorische Rezeptor dieser Familie. Sein Ligand ist HLA-E. HLA-E ist ein nicht-klassisches HLA-Molekül, das ubiquitär exprimiert wird und die Signalpeptide der HLA-Moleküle A, B und C (anstelle von antigenen Peptiden) bindet. Somit erkennt CD94:NKG2A lediglich, ob HLA-Klasse I in seiner Gesamtheit herunter reguliert wird, da er nicht zwischen HLA-A, -B und -C unterscheiden kann. Auch NKG2C, ein stimulatorischer Rezeptor, kann an HLA-E binden, jedoch ist die Affinität des Liganden zum inhibitorischen Rezeptor (NKG2A) höher (Vales-Gomez et al., 2000).

Ein weiteres Mitglied ist der stimulatorische Rezeptor NKG2D, der eine wichtige Funktion bei der Erkennung von stressinduzierten Liganden wie MIC-A und MIC-B (*MHC class I chain-related gene A/B*) sowie ULB-P erfüllt (Sutherland et al., 2001). Die Liganden der stimulatorischen Rezeptoren NKG2E und NKG2F sind bisher unbekannt.

1.4 KIR

KIR steht für *Killer cell immunoglobulin-like receptor*. Sie sind die charakteristischen Rezeptoren reifer NK-Zellen und nehmen im Rahmen dieser Doktorarbeit auch den wichtigsten Part ein. Die Gene sind Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie und werden auf Chromosom 19q13.4 im Leukozyten-Rezeptorkomplex (*leukocyte receptor complex*, LRC) kodiert (Trowsdale, 2001; Wilson et al., 2000). Sie werden nur von NK-Zellen und einer kleinen Subpopulation von T-Zellen, den NK-ähnlichen T-Zellen, exprimiert.

1.4.1 KIR-Nomenklatur

Es gibt 15 verschiedene *KIR*-Gene, die alle einer einheitlichen Nomenklatur unterliegen und sich anhand ihrer extra- und intrazellulären Struktur in Gruppen einteilen lassen (Marsh et al., 2003).

Die erste Gruppe der KIRs wirkt inhibitorisch und hat einen langen (*Long* = L) zytoplasmatischen Teil, in dem sich ITIM-Domänen (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) befinden. Diese ITIMs sind essentiell für die Transduktion der inhibitorischen Signale, die durch den Rezeptor in das Innere der NK-Zelle vermittelt werden (Long, 1999).

Die zweite Gruppe der KIRs wirkt stimulatorisch und besitzt im Gegensatz zu den inhibitorischen Rezeptoren nur eine kurze (*Short* = S) zytoplasmatische Domäne, sowie eine basische Aminosäure in der Transmembran-Region. Die stimulatorischen Signale werden nicht über zytoplasmatische Domänen, sondern über das Adaptermolekül DAP12 weitergeleitet (Abbildung 1-2).

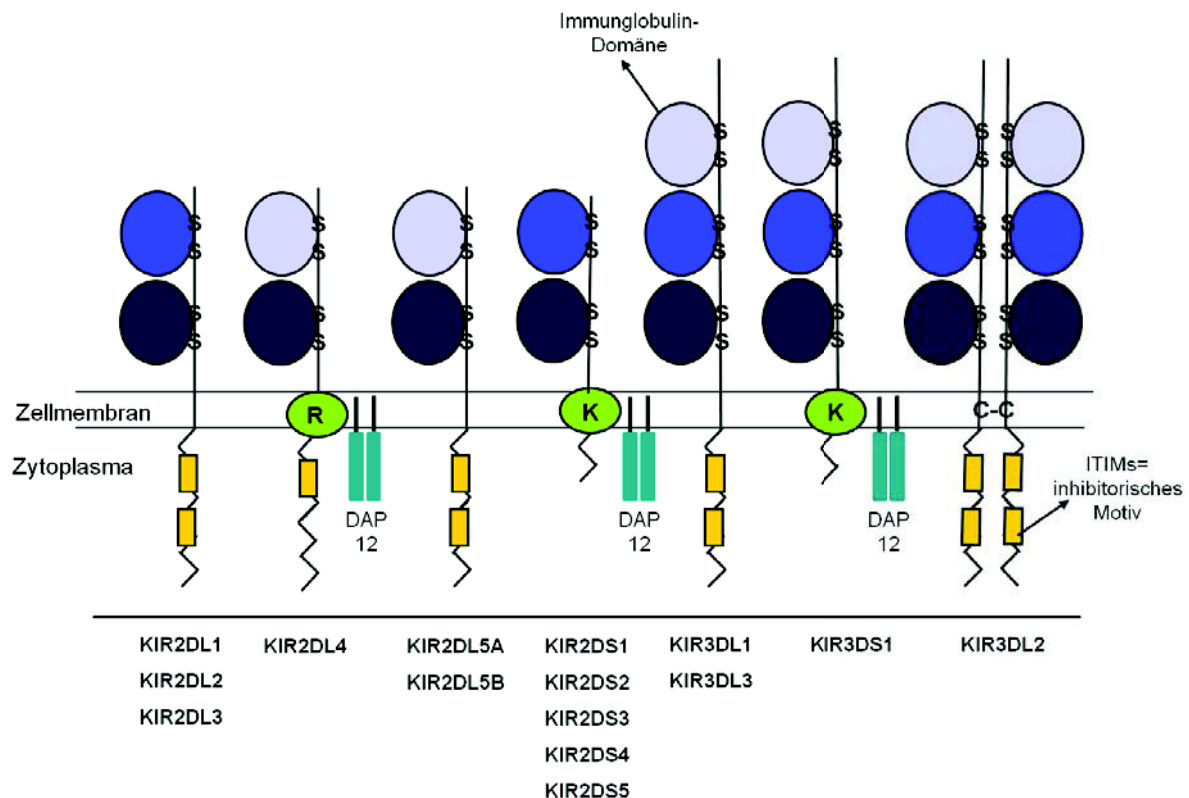


Abbildung 1-2: Aufbau der KIRs. Die blauen Domänen sind die Immunglobulin-Domänen, von denen die KIRs entweder zwei oder drei besitzen. Die gelben Domänen innerhalb des Zytoplasmas sind die ITIMs, an denen die inhibitorischen Signale weitergeleitet werden. Die Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R) in der Zellmembran sind Kennzeichen der stimulatorischen KIRs (dunkelblau=D2, mittelblau= D1 und hellblau = D0 Domäne).

Der Rezeptor KIR2DL4 besitzt sowohl eine lange zytoplasmatische Domäne als auch eine basische Aminosäure in der transmembranen Region und hat damit sowohl Merkmale der inhibitorischen als auch der stimulatorischen KIRs (Selvakumar et al., 1996). Das KIR2DL4-Gen ist als einziger KIR in allen NK-Zellen konstitutiv exprimiert.

KIR besitzen entweder zwei (2D) oder drei (3D) extrazelluläre Domänen. Dabei lassen sich drei konservierte Domänen definieren, die als D0, D1 und D2 Domänen bezeichnet werden (Vilches and Parham, 2002). Alle KIR mit drei Domänen haben die D0-D1-D2 Konfiguration, während es bei den KIR mit zwei Domänen zwei unterschiedliche Konfigurationen gibt: D0-D2 und D1-D2 (Abbildung 1-2).

Neben den 15 funktionalen *KIR*-Genen, existieren noch zwei Pseudogene: *KIR2DP1* und *KIR3DP1*, die jeweils durch eine Mutation ein vorzeitiges Stopcodon und damit lediglich ein *nonsense*-Transkript erzeugen. KIR3DL2 ist der einzige KIR, der als Homodimer vorliegt. *KIR2DL5A* und *KIR2DL5B* sind zwei strukturell ähnliche Varianten und werden auf zwei

unterschiedlichen Loci an unterschiedlichen Regionen im Cluster kodiert (Gomez-Lozano et al., 2007).

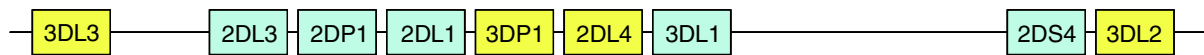
1.4.2 KIR-Genetik

Die KIR-Genfamilie ist ebenso wie ihre Liganden, die HLA-Klasse I-Moleküle, hochpolymorph (Uhrberg, 2005; Uhrberg et al., 1997). Der genetische Polymorphismus spielt sich sowohl auf der Ebene der Zahl und Art der Gene als auch der Allele ab. So lassen sich aufgrund der An- bzw. Abwesenheit eines *KIR*-Gens viele verschiedene KIR-Haplotypen definieren. Dabei haben alle Individuen vier *KIR*-Gene gemeinsam: *KIR3DL3*, ein Gen mit bisher unbekannter Funktion am zentromernahen Ende des *KIR*-Genclusters, *KIR3DL2* am telomeren Ende und *KIR2DL4* sowie *KIR3DP1* in der Mitte des Clusters (Wilson et al., 2000). Diese so genannten „*Framework*“-Gene bilden den nicht-variablen Rahmen für die übrigen polygenen *KIR*-Gene. Als Polygenie bezeichnet man dabei das Vorkommen mehrerer verschiedener, miteinander verwandter Gene mit ähnlicher Funktion.

Die *KIR*-Gene sind nicht nur polygen, sondern auch hochgradig polymorph auf allelischer Ebene. Insbesondere von *KIR3DL1* und *KIR3DL2* existieren viele verschiedene Allele in der Bevölkerung (Carrington and Martin, 2006). Dabei unterscheiden sich die Allele in ihrer Frequenz, mit der sie in der Bevölkerung vorkommen und auch in ihrer Expression (Gardiner et al., 2001). Wichtig zu erwähnen ist in diesem Kontext auch, dass *KIR2DL2* und *KIR2DL3* bzw. *KIR3DL1* und *KIR3DS1* jeweils Allele desselben Genlokus darstellen. In diesen beiden Fällen ist die bestehende Nomenklatur also etwas irreführend, da unterschiedliche Gen-Namen verwendet werden, was historische Gründe hat.

Die verschiedenen Haplotypen, die sich in Art und Anzahl der Gene unterscheiden, lassen sich in zwei Gruppen einteilen (Abbildung 1-3): Gruppe A Haplotypen und Gruppe B Haplotypen (Uhrberg et al., 1997).

Haplotyp A



Haplotyp B

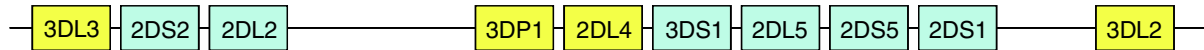


Abbildung 1-3: Haplotypgruppen A und B. Die gelb gekennzeichneten *KIR*-Gene sind die „Framework“-Gene, die allen Haplotypen gemeinsam sind. Die Gene *KIR2DP1* und *KIR3DP1* sind Pseudogene, die ein unvollständiges Transkript produzieren. *KIR2DL2* und *KIR2DL3* sowie *KIR3DL1* und *KIR3DS1* sind Allele des gleichen Gens. Alle Haplotypen der Gruppe A haben nur eine bestimmte, hier dargestellte, Genkonfiguration. Die Haplotypgruppe B ist so definiert, dass dort alle Genkonfigurationen zusammengefasst sind, die anders als die der Haplotypgruppe A aufgebaut sind. Hier ist daher nur eine beispielhafte Genkonfiguration der Haplotypgruppe B skizziert.

Die Haplotypgruppe A besitzt eine fixe Zahl von sechs exprimierten Genen: *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2* und *KIR2DS4*. Mit Ausnahme von *KIR2DS4* haben alle KIRs inhibitorisches Potential. Die Genkonfiguration der Haplotypgruppe A findet sich in unterschiedlicher Frequenz in allen Bevölkerungsgruppen und weist eine sehr hohe Zahl unterschiedlicher alleler Varianten auf. In den Gruppe B Haplotypen wurden alle anderen Genkonfigurationen zusammengefasst, wodurch sich diese Gruppe wesentlich komplexer darstellt und eine sehr variable Anzahl an Genen aufweist. Hier können bis zu zwölf KIR-Gene vorhanden sein, von denen mehrere stimulatorische KIR sind.

Zwei Haplotypen werden jeweils in diploiden Organismen zu einem Genotyp kombiniert und können daher homozygot (*AA*, *BB*) oder heterozygot (*AB*) vorkommen. Ein Genotyp der homozygot für *AA* ist, setzt sich aus folgenden Genen zusammen: *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2* und *KIR2DS4*. Ein Genotyp, der heterozygot für Haplotyp A und B ist, besitzt alle Gene des Gruppe A Haplotyps plus mindestens ein zusätzliches Gen. KIR-Genotypen, die homozygot für Gruppe B sind, fehlt mindestens ein Gruppe A Gen.

Die Komplexität der Gruppe B Haplotypen erschwert ihre Expressions-Analyse, insbesondere serologisch, da zum einen nicht für alle Rezeptoren Antikörper existieren und zum anderen sich die stimulatorischen Rezeptoren extrazellulär kaum von ihren inhibitorischen Gegenspielern unterscheiden. Das bedeutet, dass ein für *KIR2DL1* verwendeter Antikörper nicht zwischen *KIR2DL1* und *KIR2DS1* unterscheiden kann.

Zusammenfassend lässt sich für die beiden Haplotypgruppen sagen, dass Gruppe A Haplotypen aus wenigen Genen besteht, die jedoch hochgradig allelisch polymorph sind, während Gruppe B Haplotypen eine Vielzahl an verschiedenen Genkonfigurationen aufweisen. Damit entsteht eine große Vielfalt an *KIR*-Genotypen in der Bevölkerung (Shilling et al., 2002a).

Unterschiedliche Bevölkerungsgruppen unterscheiden sich auch in der Zusammensetzung der *KIR*-Genotypen innerhalb der Population. Es gibt zum einen sehr homogene Kohorten, in denen Gruppe A Haplotypen dominieren, wie die Japaner, wo mehr als 50% der Bevölkerung homozygot für Haplotyp A sind und das Verhältnis von Gruppe A zu Gruppe B Haplotypen 3:1 beträgt (Yawata et al., 2002). Zum anderen gibt es im Gegensatz dazu Bevölkerungsgruppen, wie die australischen Aborigines, in denen die Frequenz der Gruppe A Haplotypen sehr gering ist. Nur eines von 67 untersuchten Individuen war in einer Studie homozygot für Haplotyp A (Toneva et al., 2001). Die kaukasoide Bevölkerung ist sehr heterogen, doch auch hier ist der Genotyp, der homozygot für Haplotyp Gruppe A ist, der am häufigsten vertretene Genotyp. Ca. 1/3 der Bevölkerung ist homozygot für Haplotyp A (Hsu et al., 2002; Uhrberg et al., 2002). Diese sind nur wenige Beispiele für die Verteilung von *KIR* in der Bevölkerung. Mittlerweile gibt es zahlreiche Publikationen über die Verteilung der *KIR*-Genotypen in den verschiedensten Bevölkerungsgruppen, welche die Basis für nachfolgende Studien zur klinischen Relevanz im Rahmen von Krankheitsassoziationen der *KIR*-Gene bilden (Denis et al., 2005; Jiang et al., 2005; Norman et al., 2002; Rajalingam et al., 2002).

1.4.3 *KIR*-Liganden

Die Effektorfunktion der NK-Zelle wird durch das Verhältnis komplexer Signale der stimulatorischen und inhibitorischen Rezeptoren bestimmt, welche MHC-Klasse I auf der Oberfläche erkennen. Die verschiedenen *KIRs* haben unterschiedliche MHC-Liganden. Allerdings sind nicht für alle *KIRs* die entsprechenden Liganden bekannt.

1.4.3.1 HLA (Aufbau, Funktion und Struktur)

Der Haupthistokompatibilitätskomplex ist eine Gruppe von Genen, die Proteine kodieren, die für die Antigenpräsentation auf Zellen essentiell sind. Im menschlichen Genom liegt

dieser Komplex auf Chromosom 6p21.3. Beim Menschen nennt man die MHC-Moleküle auch HLA-Moleküle. Sie lassen sich in zwei Klassen unterteilen (Abbildung 1-4).

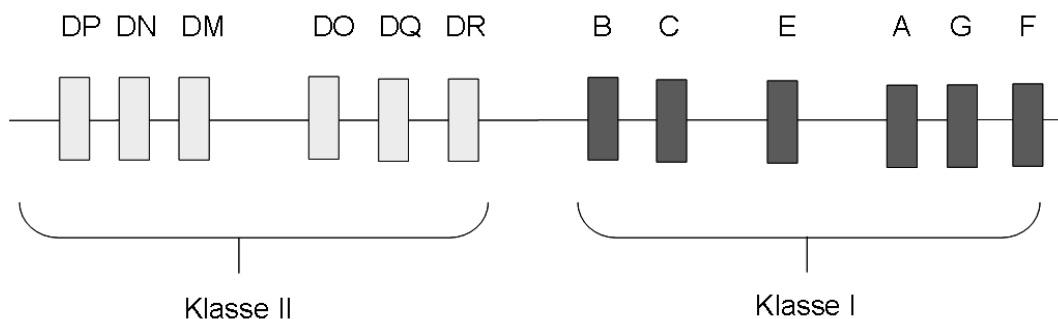


Abbildung 1-4: Anordnung der HLA-Gene auf Chromosom 6

HLA-Klasse II-Moleküle werden von antigenpräsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen, Monozyten und B-Zellen exprimiert. Sie binden Proteine extrazellulären Ursprungs mit einer Länge von ≥ 13 Aminosäuren.

Moleküle der HLA-Klasse I binden Peptide zytosolischen Ursprungs mit einer Länge von 8-9 Aminosäuren und werden mit wenigen Ausnahmen auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. HLA-Klasse I-Moleküle zeigen den immunologischen Status jeder Körperzelle an. Bei der Präsentation von körpereigenen Peptiden sind die T-Zellen gegenüber den präsentierenden Zellen tolerant, präsentieren diese jedoch virale oder andere körperfremde Antigene, werden zytotoxische T-Zellen aktiviert, die die Zielzelle lysieren. Einige virusinfizierte oder entartete Zellen sind ihrerseits in der Lage, die Expression der HLA-Klasse I-Moleküle zu vermindern, um so der zytotoxischen Immunantwort durch T-Zellen zu entgehen. Diesem Mechanismus zur Umgehung des Immunsystems kann durch NK-Zellen mithilfe von HLA-Klasse I-spezifischen Rezeptoren entgegen gewirkt werden.

Die HLA-Klasse I Gene zeichnen sich, ebenso wie die *KIR*-Gene, durch einen hohen Polymorphismus aus, der sich aber nur auf der Ebene der allelischen Vielfalt abspielt. Diese allelische Vielfalt macht sie zu der Region mit der bisher höchsten bekannten Polymorphismus-Rate im menschlichen Genom. Beispielsweise sind für *HLA-A* über 450 Allele, für *HLA-B* mehr als 780 Allele und für *HLA-C* über 230 verschiedene Allele bekannt.

1.4.3.2 KIR-Rezeptoren und ihre Liganden

Unterschiedliche KIR erkennen unterschiedliche HLA-Klasse I-Moleküle. Es sind jedoch nicht für alle KIR die entsprechenden Liganden bekannt (Tabelle 1-1).

Tabelle 1-1: Zusammenfassung der KIR-Rezeptoren und ihrer Liganden

KIR	Funktion	Ligand
KIR2DL1	Inhibitorisch	HLA-C Gruppe 2
KIR2DL2	Inhibitorisch	HLA-C Gruppe 1 und 2
KIR2DL3	Inhibitorisch	HLA-C Gruppe 1
KIR2DL4	Inhibitorisch und Stimulatorisch	HLA-G
KIR2DL5A	Inhibitorisch	Unbekannt
KIR2DL5B	Inhibitorisch	Unbekannt
KIR3DL1	Inhibitorisch	HLA-Bw4
KIR3DL2	Inhibitorisch	HLA-A*03,A*11
KIR3DL3	Unbekannt	Unbekannt
KIR2DS1	Stimulatorisch	HLA-C Gruppe 2
KIR2DS2	Stimulatorisch	Unbekannt
KIR2DS3	Stimulatorisch	Unbekannt
KIR2DS4	Stimulatorisch	HLA-A*11
KIR2DS5	Stimulatorisch	Unbekannt
KIR3DS1	Stimulatorisch	Unbekannt
KIR2DP1	Pseudogen	-
KIR3DP1	Pseudogen	-

Die NK-Zellen, die KIR2DL2 oder KIR2DL3 auf ihrer Oberfläche tragen, werden durch HLA-C Gruppe 1 (HLA-C1), NK-Zellen mit KIR2DL1 auf der Oberfläche durch HLA-C Gruppe 2 (HLA-C2) inhibiert (Colonna et al., 1993; Colonna and Samaridis, 1995). Die Epitope der Liganden HLA-C1 und HLA-C2 unterscheiden sich in zwei Aminosäuren: an Position 77, wo bei HLA-C1 Serin und bei HLA-C2 Asparagin vorhanden ist, sowie an Position 80, wo sich Asparagin bei HLA-C1 und Lysin bei HLA-C2 an dieser Stelle befindet. Neue Studien haben gezeigt, dass KIR2DL2 eine Sonderstellung einnimmt. Er ist in der Lage sowohl HLA-C1 als auch HLA-C2 zu erkennen und durch beide inhibiert zu werden (Moesta et al., 2008; Winter et al., 1998).

KIR3DL1-exprimierende Zellen werden durch HLA-Bw4 auf den Oberflächen ihrer Zielzellen inhibiert (D'Andrea et al., 1995; Gumperz et al., 1995). HLA-B Allele, die das Bw4-Epitop besitzen, unterscheiden sich in den Aminosäuren 77-83 von den übrigen Allelen, die als HLA-Bw6 bezeichnet werden.

Die Bindung von KIR3DL2 an die HLA-A Allele -A3 und -A11 ist schwach und die Inhibition durch diese Liganden ist abhängig von den präsentierten Peptiden (Dohring et al., 1996; Hansasuta et al., 2004; Pende et al., 1996; Valiante et al., 1997).

Für KIR2DL4 wurde HLA-G als Ligand identifiziert, wobei die physiologische Relevanz dieser Ligand-Rezeptor-Beziehung noch nicht endgültig geklärt ist. HLA-G wird vor allem auf den Trophoblasten in der Gebärmutter während der Schwangerschaft exprimiert. NK-Zellen mit KIR2DL4 auf ihrer Oberfläche könnten somit eine Rolle bei der Akzeptanz des Fetus durch das Immunsystem der Mutter spielen (Faure, 2002; Rajagopalan, 1999).

KIR2DL5 ist der einzige inhibitorische Rezeptor, für den kein Ligand bekannt ist (Vilches et al., 2000).

Für KIR2DS1 steht HLA-C2 als Ligand fest (Moesta et al., 2010), jedoch ist bekannt, dass bei gleichem Liganden und gleicher Spezifität der inhibitorische Rezeptor eine höhere Affinität zum Liganden besitzt als der stimulatorische Rezeptor (Stewart et al., 2005). Bekommt die Zelle sowohl ein inhibitorisches als auch ein stimulatorisches Signal überwiegt also stets das inhibitorische Signal, so dass die Lyse körpereigener Zellen verhindert wird. KIR2DS4 ist ein Produkt einer Genkonversion mit KIR3DL2 und hat den gleichen Liganden wie der inhibitorische Rezeptor, nämlich HLA-A11 (Graef et al., 2009). Für die anderen stimulatorischen KIR sind die Liganden nicht sicher oder nicht bekannt.

1.4.4 KIR-Expression und Regulation

Die KIR-Rezeptoren werden klonal exprimiert, das bedeutet, NK-Zellen exprimieren unterschiedliche Kombinationen der genomisch vorhandenen KIRs. Alle theoretisch möglichen Kombinationen konnten *ex vivo* mittels durchflusszytometrischer Analysen in Menschen mit Gruppe A Haplotypen nachgewiesen werden (Yawata et al., 2008). Im Gegensatz zu Gruppe B Haplotypen ist die Anzahl der exprimierten Rezeptoren auf 5

begrenzt. In Spendern mit Haplotypgruppe B werden zusätzlich stimulatorische Rezeptoren exprimiert, die durch ihre Ähnlichkeit zu ihrer inhibitorischen Entsprechung nicht von diesen zu unterscheiden sind. Damit ist die Analyse der NK-Zellen auf klonaler Ebene nicht möglich.

Das KIR-Repertoire bezeichnet die Gesamtheit der NK-Zellen mit unterschiedlichen Rezeptorkombinationen. Es bleibt im Erwachsenenalter weitgehend stabil. Nicht nur von Zelle zu Zelle können unterschiedliche Kombinationen der KIRs festgestellt werden, auch von Mensch zu Mensch sind die Frequenzen und die Expressionsintensität sehr variabel (Shilling et al., 2002b). Durch verschiedene Regulationsmechanismen entwickeln sich je nach genetischem Hintergrund und anderen Faktoren unterschiedliche Repertoires.

1.4.4.1 Endogene und exogene Faktoren

Wie bereits in 1.4.2 erwähnt, unterliegen die *KIR*-Gene einem starken Polymorphismus. Diese genetische Vielfalt beeinflusst auch die Rezeptor-Expression. Anhand von KIR3DL1 konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Allele auch unterschiedlich stark exprimiert werden, was anhand von Antikörpern nachgewiesen werden konnte (Gardiner et al., 2001; Gumperz et al., 1996).

Die *KIR*-Gene unterliegen darüber hinaus weiteren Regulationsmechanismen. Trotz dieser unterschiedlichen Expressionsdichte und –frequenz fällt zunächst einmal auf, dass die Promotoren der verschiedenen *KIR*-Gene zu über 90% homolog sind. Lediglich KIR2DL4, der Rezeptor, der in allen NK-Zellen konstitutiv exprimiert wird, und KIR3DL3, der niedrig bis gar nicht exprimiert wird, zeigen eine andere Struktur (Trompeter et al., 2005). Die Promotorregionen weisen darüber hinaus eine hohe Dichte an so genannten CpG–Inseln auf, CpG-Dinukleotiden, die die Erkennungssequenz für die DNA-Methylierung darstellen. Santourlidis et al. konnten nachweisen, dass exprimierte *KIR*-Gene unmethyliert sind und nicht exprimierte *KIR*-Gene einen methylierten Promotor besitzen (Santourlidis et al., 2008; Santourlidis et al., 2002). Durch 5-Aza-Desoxy-Cytidin, einem Methyltransferase-Inhibitor konnte die Expression vorher aufgrund von Methylierung nicht exprimierter *KIR*-Gene induziert werden. Damit steht die Epigenetik als weiterer Regulationsmechanismus für NK-Zellen fest. Dabei spielen neben der DNA-Methylierung auch Veränderungen der Chromatinstruktur durch Histonmodifikationen eine Rolle (Santourlidis et al., 2008).

1.4.4.2 Toleranz

Aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften von NK-Zellen ist es wichtig zu wissen, wie sie zu ihrer Toleranz gegenüber körpereigenen Zellen gelangen. Obwohl NK-Zellen bereits 1975 identifiziert wurden (Herberman et al., 1975; Kiessling et al., 1975), dauerte es weitere 15 Jahre bis veröffentlicht wurde, mit welchem Mechanismus NK-Zellen ihre Zielzellen erkennen. Dieser Frage sind Ljunggren und Kärre bereits in den 1980er Jahren nachgegangen und haben schließlich das Prinzip des „*missing self*“ postuliert (Karre, 1997; Ljunggren and Karre, 1990). Das besagt, dass NK-Zellen ihre Zielzellen an ihrem „fehlenden Selbst“ identifizieren, d.h. sie erkennen ihre Zielzellen daran, dass bestimmte Moleküle auf der Oberfläche fehlen. Kärre konnte zeigen, dass diese „*missing self*“-Strukturen MHC-Klasse I-Moleküle sind. Die intakte Expression von HLA-Klasse I-Molekülen auf den eigenen Körperzellen wird von NK-Zellen mithilfe von inhibitorischen Rezeptoren, die dann ein inhibitorisches Signal an das Zellinnere leiten, erkannt. Dadurch wird die Lyse verhindert. Können die inhibitorischen Rezeptoren nicht an eine Zelle binden, weil diese kein oder sehr wenig HLA-Klasse I exprimiert, gibt es kein inhibitorisches Signal und Lyse findet statt. Die Lyse wird somit erst eingeleitet, wenn die Zielzelle der NK-Zelle kein „Selbst“ präsentiert.

Das bedeutet im Gegenzug, dass jede NK-Zelle mindestens einen Rezeptor für körpereigenes MHC exprimieren muss („*At least One*“-Theorie) (Uhrberg et al., 1997; Valiante et al., 1997). Diese Regel trifft aber möglicherweise nur auf funktional reife NK-Zellen zu. Neuere Studien zeigen, dass es eine Population von NK-Zellen gibt, die keine inhibitorischen Rezeptoren, also weder NKG2A noch KIR, exprimieren, und theoretisch autoreaktiv sein müssten (Anfossi et al., 2006; Fernandez et al., 2005). Zudem sind auch Zellen entdeckt worden, die KIR⁺ sind, jedoch keinen KIR für körpereigenes HLA tragen und somit nicht tolerant gegenüber „Selbst“ sein dürften. In funktionellen Tests wurde jedoch gezeigt, dass beide Arten von NK-Zellen eine verringerte Zytotoxizität besitzen und damit vermindert reaktionsfähig im Vergleich zu solchen Zellen sind, die KIR oder NKG2A exprimieren (Anfossi et al., 2006; Cooley et al., 2007).

1.4.4.3 Einfluss von HLA-Klasse I-Liganden auf das Repertoire

Das Repertoire setzt sich aus NK-Zellen mit unterschiedlichen Rezeptor-Kombinationen zusammen. Bei der Ausbildung des KIR-Repertoires wird die NK-Zelle vor folgendes Problem gestellt: Zum einen liegen der KIR- und der HLA-Lokus auf zwei unterschiedlichen

Chromosomen, zum anderen sind die KIR-HLA-Interaktionen einem hohen genetischen Polymorphismus unterworfen. Trotz dieser Schwierigkeiten in der gemeinsamen Regulation muss gewährleistet werden, dass die NK-Zellen gegenüber körpereigenen Zellen tolerant sind. So liegt die Vermutung nahe, dass das KIR-Repertoire durch HLA beeinflusst wird.

Ein Einfluss der HLA-Klasse I-Moleküle, welche ja die Liganden der KIR-Rezeptoren darstellen, auf die KIR-Expression konnte lange nicht gezeigt werden (Frohn et al., 1997; Gumperz et al., 1996). Da KIR und HLA auf unterschiedlichen Chromosomen liegen, werden sie unabhängig voneinander vererbt und stehen in keinem unmittelbaren genetischen Zusammenhang. In Mäusen, die anstelle von KIR, lektin-ähnliche Rezeptoren, genannt Ly-49, haben, wurde eine Verschiebung des Repertoires zu NK-Zellen hin, die spezifisch für Selbst-MHC- Klasse I bereits Mitte der 1990er beobachtet (Held et al., 1996). Im Menschen konnte zunächst lediglich gezeigt werden, dass sich Geschwister mit identischem genetischen Hintergrund bezüglich ihrer HLA-Klasse I und KIR-Gene weniger stark im Repertoire unterscheiden als Geschwister mit unterschiedlichem HLA-Klasse I (Shilling et al., 2002b). In Japanern, einer Bevölkerungsgruppe mit begrenztem genetischen Polymorphismus, konnte 2006 zum ersten Mal deutlich gezeigt werden, dass es eine strukturelle Adaption des Repertoires gibt. Die Anwesenheit eines HLA-Klasse I-Liganden erhöhte die Frequenz der NK-Zellen, die den passenden KIR exprimieren (Yawata et al., 2006). Die Diskussion wurde wieder neu entfacht, als Andersson et al. eine Studie veröffentlichten, in der wiederum kein Zusammenhang des KIR-Repertoires mit dem HLA-Klasse I-Typ gefunden werden konnte (Andersson et al., 2009).

1.4.4.4 Einfluss von HLA-Klasse I-Liganden auf die Funktion

Neben der strukturellen Adaption wurde ebenfalls vor kurzem erkannt, dass auch eine funktionale Erziehung („*Education*“) der NK-Zellen abhängig vom körpereigenen HLA-Klasse I vorhanden ist. Dabei konnte der Beweis erbracht werden, dass NK-Zellen mit einem inhibitorischen Rezeptor für Selbst eine höhere funktionale Aktivität haben als NK-Zellen ohne inhibitorischen Rezeptor für „Selbst“ (Anfossi et al., 2006; Fernandez et al., 2005; Kim et al., 2005).

Um die Anwesenheit von NK-Zellen ohne inhibitorischen Rezeptor für körpereigene HLA-Moleküle zu erklären, wird zurzeit postuliert, dass NK-Zellen erst über einen Prozess der Erziehung („*Education*“), auch Lizenzierung („*Licensing*“) genannt, ihre funktionelle Kompetenz erlangen. In diesem Prozess gelangt die NK-Zelle zu funktionaler Reife und

exprimiert die dafür notwendigen Rezeptoren auf der Oberfläche (Kim et al., 2005; Yokoyama and Kim, 2006). Demnach gibt es im Immunsystem zwei Arten von NK-Zellen: lizenzierte NK-Zellen, die funktional aktiv (aber auch tolerant) sind, weil sie einen inhibitorischen Rezeptor für „Selbst“ besitzen, sowie unlizenzierte NK-Zellen, die keinen inhibitorischen Rezeptor für „Selbst“ besitzen und hyporeaktiv sind. Man geht also 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 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). Doch auch für diesen Mechanismus wurden bereits Ausnahmen beschrieben. So belegen neueste Studien, dass auch sogenannte „unlizenzierte“ Zellen in der Lage sind, Virusinfektionen zu regulieren (Orr et al., 2010). In diesem Fall kann also die Hyporeaktivität dieser unlizenzierten NK-Zellen durch entsprechende Stimulation im Rahmen einer Immunantwort überwunden werden.

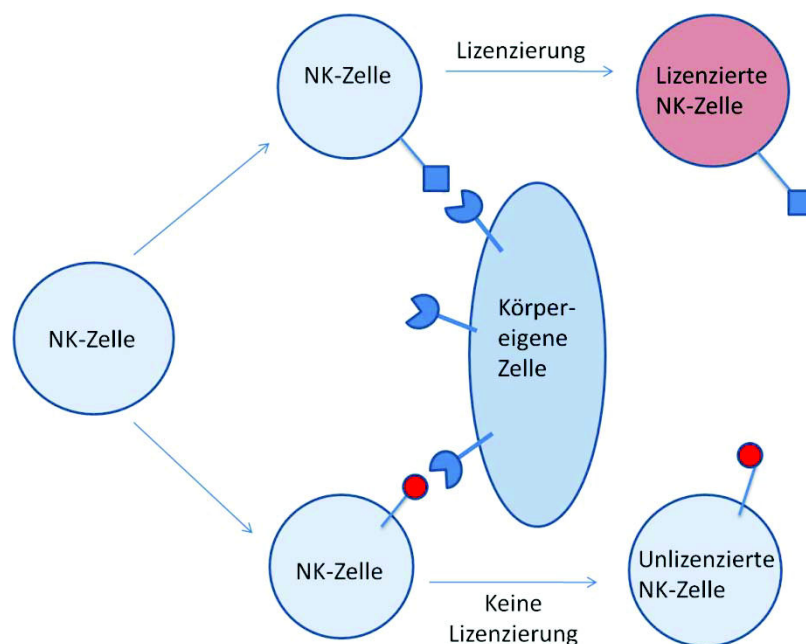


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der Lizenzierung von NK-Zellen. Eine NK-Zelle exprimiert Rezeptoren, die entweder, die körpereigenen HLA-Moleküle erkennt (Blau) oder Rezeptoren, die das nicht tun (Rot). Besitzt sie solche Rezeptoren wird sie lizenziert und wird funktional kompetent.

Die Mechanismen, mit denen die NK-Zellen lizenziert werden, sind weitestgehend unbekannt. Zurzeit werden vor allem zwei Szenarien diskutiert, die mit den klangvollen Namen „*Arming*“ und „*Disarming*“ belegt wurden. Beim „*Arming*“ (Raulet and Vance, 2006; Wu and Raulet, 1997), sind die NK-Zellen ursprünglich nicht reaktiv und werden mit der Akquisition des richtigen Rezeptors funktional. Sie werden sozusagen bewaffnet. Diejenigen, die nicht den passenden Rezeptor besitzen, bleiben hyporeaktiv. Beim „*Disarming*“ passiert genau das Gegenteil. Die Zellen sind reaktiv und nur diejenigen, die durch Fehlen eines inhibitorischen Rezeptors ständig stimuliert werden, werden anergisch und damit entwaffnet.

In der Maus konnte außerdem gezeigt werden, dass hyporeaktive (also unlizenzierte) NK-Zellen ihr funktionales Potential wieder herstellen können, wenn sie in ein passendes MHC-Klasse I-Umfeld transferiert werden (Elliott et al., 2010; Joncker et al., 2010). Dies gilt im speziellen nur für die Zellen, die einen passenden Rezeptor für „Selbst“ exprimieren. Auch das Umgekehrte ist der Fall. Wenn Zellen, die lizenziert waren in ein Umfeld kommen, in das sie nicht hineinpassen, verlieren sie ihre funktionale Kompetenz (Joncker et al., 2010). Damit scheint es zumindest in der Maus wahrscheinlich zu sein, dass die eigenen MHC-Klasse I-Produkte absolut notwendig für die funktionale Erziehung von NK-Zellen sind und dieser Prozess nicht unumkehrbar ist.

1.5 NK-Zellen im Nabelschnurblut

Natürliche Killerzellen aus Nabelschnurblut (*Cordblood*, CB) spielen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Infektionen in Neugeborenen, da das adaptive Immunsystem, im speziellen die T-Zellantwort, noch nicht vollständig ausgebildet ist. Des Weiteren nimmt ihre Bedeutung weiter zu, da Nabelschnurblute in den letzten 20 Jahren zu einer wichtigen Quelle für allogene Stammzelltransplantationen geworden sind.

Trotz dieser Wichtigkeit ist das Wissen über NK-Zellen aus dem Nabelschnurblut begrenzt und nicht konsistent. Es besteht Uneinigkeit darüber, ob die NK-Zellen denen im adulten Organismus ähneln oder nicht. Es gibt Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen peripherem Blut (PB) und CB in der Rezeptorexpression, der Zytokinproduktion und der Zytotoxizität (Verneris and Miller, 2009).

NK-Zellen aus Nabelschnurblut und adultem peripheren Blut (PB) unterscheiden sich zunächst in ihrer spezifischen Zusammensetzung der NK-Zellsubpopulationen. Im CB gibt es eine Population von NK-Zellen, die im adulten Blut nicht vorkommen. Sie exprimieren CD16 auf der Oberfläche, sind jedoch negativ für den NK-Zellmarker CD56 sind (CD16⁺CD56⁻). Es besteht die Vermutung, dass es sich hierbei um einen Vorläufer von NK-Zellen handelt (Fan et al., 2008; Gaddy and Broxmeyer, 1997; Gaddy et al., 1995).

Ein Hinweis auf die mögliche Unreife der NK-Zellen im CB ist die eindeutig festgestellte verminderte Zytotoxizität (Hoshina et al., 1999; Tanaka et al., 2003; Wang et al., 2007). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Zytotoxizität durch den Einsatz von Zytokinen (IL-15, IL-12) auf ein ähnliches Niveau wie im peripheren Blut stimuliert werden kann (Dalle et al., 2005; Fan et al., 2008).

Andererseits ergab eine detailliertere Analyse der NK-Zellen auf ihren Perforin und Granzym B-Gehalt keine eindeutigen Hinweise auf funktionale Defizienzen. Hierzu gibt es zwei Veröffentlichungen und beide zeigen entgegengesetzte Ergebnisse. In der Studie von Dalle et al. wurden mehr Granzym B- und Perforin-positive Zellen gemessen als im peripheren Blut (Dalle et al., 2005), in der zweiten Studie von 2007 wurden gar keine positiven Zellen für Granzym B und Perforin im CB gefunden (Wang et al., 2007).

Die Rezeptor-Expression im CB ist weniger genau erforscht ebenso wie die Frage auf welche Weise sich das NK-Zellrepertoire während der Entwicklung bzw. im Alter verändert. Bekannt ist, dass sich die Verteilung von T-, NK- und NK-ähnlichen T-Zellen ändert, sowie eine reziprokes Verhältnis zwischen NKG2A und KIR besteht, wobei ersteres im Alter abnimmt und letzteres im Gegenzug ansteigt (Lutz et al., 2005). Sundström et al zeigten, dass diese Veränderungen im Wesentlichen in den ersten 5 Jahren stattfindet (Sundstrom et al., 2007). Hier wurden Blutproben von Kindern im Alter von 2-5 Jahren mit ihrem eigenen Nabelschnurblut verglichen und herausgefunden, dass die Zahl der NK-Zellen mit dem Alter abnimmt und das Level der NCR-Expression ebenso reduziert ist. Hier fehlt jedoch die Analyse der wichtigsten inhibitorischen Rezeptoren auf NK-Zellen, KIR und NKG2A.

Le Garff Tavernier et al. zeigten im vergangenen Jahr zum ersten Mal eine systematische Analyse der wichtigsten NK-Zellrezeptoren als Vergleich im CB, in einer Kontrollgruppe mittleren Alters, sowie alten (60-80 Jahre) und sehr alten (>80 Jahre) Erwachsenen. Dabei

wurde ersichtlich, dass die inhibitorischen Rezeptoren, die HLA-Klasse I erkennen, in den verschiedenen Altersgruppen unterschiedlich exprimiert werden. Während im Nabelschnurblut mehr als 75% der Zellen NKG2A exprimieren, sinkt diese Frequenz in den Erwachsenen auf ca. 50%. Im Gegensatz dazu stehen die KIR-exprimierenden NK-Zellen. Ihre Frequenz steigt signifikant in den Erwachsenen an. In einigen Fällen sogar noch weiter bis ins hohe Alter. (Le Garff-Tavernier et al., 2010).

Die Frage nach dem Einfluss der Liganden auf die Rezeptorexpression als auch auf die Funktion der NK-Zellen ist im Nabelschnurblut unbeantwortet. Wie bereits erwähnt, zeigen NK-Zellen im adulten peripheren Blut eine Anpassung des Rezeptorrepertoires in Abhängigkeit zum passenden Liganden (Schönberg et al., 2011; Yawata et al., 2006) und auch der Prozess der Lizenzierung ist für das periphere Blut ausreichend beschrieben. Zu beiden Prozessen liegen bisher keine Daten aus dem Nabelschnurblut vor.

1.6 NK-Zellen in der Klinik

1.6.1 NK-Zellen und Schwangerschaft

Deciduale NK-Zellen sind die größte Gruppe unter den maternalen Leukozyten im Uterus während einer Schwangerschaft (Trowsdale and Moffett, 2008). Sie exprimieren neben HLA-C-spezifischen KIR auch KIR2DL4 (Male et al., 2010). KIR2DL4 ist der KIR, der in jeder NK-Zelle exprimiert wird. Er erkennt HLA-G, das nur in wenigen Geweben exprimiert wird, unter anderem den Trophoblasten. Trophoblasten bilden die äußere Zellschicht einer Blastozyste und verbindet diese mit der Gebärmutterwand. Somit können NK-Zellen beitragen, dass eine Immunreaktion der NK-Zellen gegen das Kind verhindert wird.

Eine schwerwiegende Schwangerschaftskomplikation ist Präeklampsie, bei der es durch einen Fehler in der Invasion der Trophoblasten in die Gebärmutter zu verengten Blutgefäßen in der Plazenta kommt, wodurch zum einen eine Unterernährung des Babys entsteht und zum anderen Bluthochdruck und Proteinurie bei der Mutter auftreten, beides Zeichen einer gestörten Adaptation des mütterlichen Organismus an die Schwangerschaft. Es konnte gezeigt werden, dass das Risiko ansteigt, wenn die Mutter homozygot für KIR-Haplotyp A ist. Dies ist jedoch nur ein Problem, wenn der Fötus positiv für HLA-C2 Allele ist. (Hiby et al.,

2004; Moffett and Hiby, 2007). Eine Begründung für das Ansteigen eines Präeklampsie-Risikos in Schwangerschaften mit HLA-C2 positiven Föten könnte sein, dass deciduale NK-Zellen von HLA-C2 stärker inhibiert werden als von HLA-C1 (Die Bindung von KIR2DL1 an HLA-C2 ist stärker als die von KIR2DL3 an HLA-C1) (Winter et al., 1998). Ein weiterer Grund könnte ebenso das Fehlen des aktivierenden KIR2DS1 sein, der ebenfalls HLA-C2 erkennt und in der Lage ist, inhibitorische Signale zu übertönen (Sivori et al., 2011). Offenbar fördern aktivierende Signale die Trophoblasten-Invasion. In Müttern mit Gruppe A Haplotypen fehlt dieses aktivierende Signal (Moffett and Hiby, 2007).

1.6.2 NK-Zellen und Stammzelltransplantationen

NK-Zellen spielen in vielerlei Hinsicht eine wichtige Rolle bei Stammzelltransplantationen (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT). Zum Ersten macht man sich die NK-Alloreaktivität zu Nutze. Die NK-Alloreaktivität leitet sich aus einem „*Mismatch*“ zwischen Spender NK-Zellklonen, die einen spezifischen KIR für HLA-Klasse I-Moleküle exprimieren, und den HLA-Klasse I-Molekülen des Empfängers her. Hier kommt dann das bereits erwähnte „*missing-self*“-Konzept zum Tragen (Vgl. Kapitel 1.4.4.2). Fehlt dem Empfänger beispielsweise ein HLA-C Gruppe 1 Molekül, sind alle NK-Zellen, des Spenders, die KIR2DL3 tragen, alloreaktiv. In jüngster Zeit gewinnt die KIR-Typisierung zur Bestimmung von potentiellen alloreaktiven NK-Zellen der Spender immer mehr an Bedeutung (Schellekens et al., 2008). Alloreaktive NK-Zellen haben folgende Vorteile: Sie töten die T-Zellen des Empfängers und fördern die Rekonstitution und das Anwachsen des Transplantats. Desweiteren werden auch antigenpräsentierende Zellen des Empfängers getötet. Diese können nun keine Antigene präsentieren und es werden mögliche „*Graft-versus-Host*“-Reaktionen verhindert (Giebel et al., 2003). Die wichtigste Eigenschaft dieser alloreaktiven NK-Zellen ist aber wohl der „*Graft-versus-Leukemia*“(GvL)-Effekt, den sie auslösen, indem sie die leukämischen Zellen töten (Ruggeri et al., 2007; Ruggeri et al., 2005). Das Fehlen passender HLA-Antigene als Liganden für KIRs in einem Transplantationsansatz wird auch „*KIR/Ligand mismatch*“ genannt. Mehrere Studien zeigen einen positiven Einfluss, wenn mindestens ein „*KIR/Ligand-mismatch*“ besteht. In dieser Konfiguration steigt die Überlebensrate und die Rückfallrate wird gesenkt (Giebel et al., 2003; Miller et al., 2007). Grundsätzlich lässt sich sagen, dass sich so ein „*mismatch*“ positiv auf die Alloreaktivität der

NK-Zellen auswirkt, und damit die NK-Aktivität gegen leukämische Zellen, gegen T-Zellen sowie dendritische Zellen des Empfängers erhöht. Aber auch hier gibt es Unterschiede: Patienten mit einem „*KIR/Ligand mismatch*“ für HLA-C1, was bedeutet, dass der Empfänger kein Epitop für KIR2DL3 besitzt, zeigen eine höhere Überlebensrate als Patienten mit einem „*HLA-C2 mismatch*“ (Stern et al., 2010).

Auch der *KIR*-Genotyp scheint eine Rolle bei der Überlebensrate nach HSCT zu spielen. Patienten, die ein Transplantat mit mindestens einem Gruppe *B* Haplotypen bekommen haben, hatten eine signifikant höhere Überlebensrate als Patienten mit zwei Gruppe *A* Haplotypen (Cooley et al., 2009). Hier könnten die zusätzlichen stimulatorischen KIR eine positive Wirkung haben. KIR2DS1-positive NK-Zellen beispielsweise, sind in der Lage, T-Zell-Blasten und Dendritische Zellen zu töten und begrenzen damit den GvHD Effekt (Sivori et al., 2011).

Bei Stammzelltransplantationen können sich nicht nur *KIR*- sondern auch *HLA*-Typ des Spenders und Empfängers positiv oder negativ auf die Genesung auswirken. Besonders die HLA-C-Epitope in Spender und Empfänger haben einen großen Einfluss auf das klinische Resultat. So wurde beobachtet, dass *HLA-C1/C2* heterozygote Patienten aufgrund der geringeren „*mismatch*“-Rate eine geringere Überlebensrate haben als homozygote Patienten (Sobecks et al., 2007).

Durch die Dokumentation der Rezeptorakquisition nach HSCT konnte in mehreren Studien ebenfalls Hinweise darauf gefunden werden, dass es zum einen eine sequentielle Expression der KIR gibt und diese zum anderen eine Rolle beim Erfolg der Therapie der Patienten spielt. Somit hat die NK-Zellrekonstitution großen Einfluss auf den Erfolg einer Stammzelltransplantation. Hierbei spielt sicherlich auch eine Rolle, dass NK-Zellen die ersten Lymphozyten sind, die nach einer Stammzelltransplantation im peripheren Blut zu finden sind. Dabei entwickeln sie ihr Repertoire offenbar in einer bestimmten Reihenfolge. Es konnte gezeigt werden, dass nach einer geraumen Zeit, dass Repertoire im Empfänger dem des Spenders gleicht (Shilling et al., 2003). *In vitro* Experimente sowohl in unserer als auch in anderen Arbeitsgruppen, in denen NK-Zellen aus hämatopoietischen Stammzellen generiert wurden, konnten zeigen, dass KIR2DL3 als erster KIR auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Ebenso gibt es eine präferentielle Expression von KIR2DL3 in den generierten NK-Zellen (Fischer et al., 2007; Miller and McCullar, 2001). Durch die frühere Akquisition von KIR2DL3

gelangen HLA-C1 homozygote Patienten früher zu einem funktionalem NK-Zellrepertoire, das in der Lage ist die HLA-C Expression leukämischer oder virusinfizierter Zellen zu überwachen und falls notwendig aktiv zu werden. In Patienten mit HLA-C2 fehlen durch das spätere Aufkommen KIR2DL1 positiver NK-Zellen diese überwachenden Zellen und es kommt zu einer erhöhten Frequenz von Virusinfektionen sowie Rezidiven (Fischer et al., 2007).

Wichtig in diesem Zusammenhang zu erwähnen ist, dass in neueren Konzepten neben der HLA-Typisierung auch der *KIR*-Genotyp und das Rezeptorrepertoire des Spenders bestimmt werden, um die Zahl der alloreaktiven Zellen zu bestimmen, die einen positiven Effekt auf die Wirksamkeit der Stammzelltransplantation des Patienten haben.

1.6.3 NK-Zellen und Krankheiten

NK-Zellen und ihre Rezeptoren spielen auch bei einer Vielzahl von Krankheiten eine Rolle. Vor allem die Polymorphismen der *KIRs* und ihrer Liganden sind mit verschiedenen Krankheiten assoziiert. Bestimmte Kombinationen aus *KIR* und *HLA* wurden vermehrt bei bestimmten Infektionen und Autoimmunkrankheiten beobachtet, wo Genotypen mit aktivierenden *KIRs* entweder schützend wirken oder aber im Gegenteil die Anfälligkeit erhöhen. Ein Beispiel hierfür ist die zervikale Neoplasie, bei der bestimmte Kombinationen aus *KIR* und *HLA* vermindert vorkommen, wogegen die Anwesenheit von KIR3DS1 das Risiko einer Erkrankung erhöht (Carrington and Martin, 2006). Weiterhin fördern verschiedene aktivierende Rezeptoren (KIR2DS1, KIR2DS2) das Auftreten von Arthritis in Psoriasis-Patienten. Dieser Effekt verstärkt sich in Patienten, in denen ein inhibitorischer KIR keinen Liganden besitzt (Nelson et al., 2004).

Besonders bei Virusinfektionen gibt es viele Hinweise darauf, dass KIR- und HLA-Genetik sowohl begünstigend oder als auch nachteilig wirken können. KIR2DL3 in Kombination mit seinem Liganden HLA-C1 hat einen direkten Einfluss auf den Rückgang einer Infektion mit Hepatitis C-Viren (HCV). In verhältnismäßig schwachen Infektionen verschlechtert die Kombination aus KIR2DL3 und HLA-C1 die Heilung (Khakoo et al., 2004). Bei chronischen HCV-Infektionen konnte gezeigt werden, dass die NKG2A-Expressionslevel erhöht waren. Das Ansprechen auf eine Therapie mit Interferon oder einem antiviralen Polymerase-Hemmer ist in diesen Fällen mit einer hohen Zahl an NKG2A-positiven NK-Zellen assoziiert

(Harrison et al., 2010). Bei Infektionen mit dem Zytomegalie-Virus (CMV) reduziert sich das Risiko einer Erkrankung nach Knochenmarktransplantation, wenn mehr als ein aktivierender KIR vorhanden ist (Boyton and Altmann, 2007). Der humane Immundefizienz-Virus (HIV) ist ebenfalls ein Virus, bei dessen Erkrankung KIR eine Rolle zu spielen scheint, sowohl in der Anfälligkeit als auch in der Progression (Boyton and Altmann, 2007). HLA-Bw4 als Ligand für KIR3DL1/S1 scheint einen beschützenden Effekt auf die Progression der Infektion zu haben. Dieser Effekt ist begrenzt auf diejenigen, die die Aminosäure Isoleucin an Position 80 des HLA-Bw4-Moleküls haben. Allele mit Isoleucin an dieser Stelle binden besser an KIR3DL1 und vielleicht auch an KIR3DS1. Diese starke Bindung scheint die Progression der HIV-Erkrankung zu verlangsamen (Martin et al., 2002).

Zusammenfassend scheinen in vielen Fällen die Assoziationen bestimmter KIR- und KIR-Liganden-Konfigurationen mit einer bestimmten Erkrankung ein Ungleichgewicht von Inhibition und Aktivierung widerzuspiegeln. Hierbei gilt es jedoch zu bedenken, dass dieser Hypothese bisher nur genetische Assoziationen zugrunde liegen, bei denen die biologische und medizinische Bedeutung weiter erforscht werden muss.

1.7 Ziel dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das KIR-Repertoire von humanen NK-Zellen untersucht werden. Dabei sollten Faktoren identifiziert werden, welche die Regulation und Ausbildung des individuellen Repertoires beeinflussen. Ziel war es zum Einen, dass KIR-Repertoire auf struktureller Ebene zu charakterisieren. Zum anderen galt es, die Charakterisierung um funktionale Aspekte zu ergänzen. Dabei sollte ein besonderes Augenmerk auf die Unterschiede zwischen den verschiedenen KIR-Haplotypgruppen gelegt werden.

Um festzustellen wie sich das KIR-Repertoire entwickelt und zu welchem Zeitpunkt eine mögliche Adaption an die HLA-Klasse I-kodierten KIR-Liganden stattfindet, wurden sowohl Proben aus adultem peripherem Blut sowie aus Nabelschnurblut untersucht. Hierbei war es vor allem von Interesse festzustellen, ob es Unterschiede in der Ausbildung und Zusammensetzung des KIR-Repertoires zwischen neonatalen und adulten NK-Zellen gibt. Diese Frage ist zum einen von grundlegender biologischer Relevanz um zu verstehen, ob und inwieweit sich das NK-Zellrepertoire von einer naiven Konfiguration im neonatalen

Repertoire zu einer durch verschiedene Infektionen geprägte Historie im adulten Immunsystem verändert. Zum anderen ist die Frage von großer klinischer Relevanz, da sowohl Nabelschnurblut als auch peripheres Blut im Rahmen der klinischen Stammzelltransplantation eingesetzt werden und die Rolle der NK-Zellen für den Ausgang der Transplantation als hochrelevant einzuschätzen ist.

Um festzustellen, inwiefern die Anwesenheit der Liganden das KIR-Repertoire in Struktur und Funktion beeinflusst, ob eine entsprechende Adaption an die Liganden ein intrinsischer Teil der NK-Zellentwicklung ist oder erst später stattfindet und ob es überhaupt eine Transition von einem neonatalen zu einem adulten NK-Zellrepertoire gibt, werden im Rahmen dieser Arbeit eine ausreichende Zahl an adulten Spendern sowie Nabelschnurblut-Proben hinsichtlich der polymorphen *KIR* und *HLA-Klasse I* Loci genotypisch untersucht und anschließend mit der phänotypischen KIR-Expression sowie NK-Zellfunktion verglichen. Dabei werden Mehrfarben-Protokolle für die Durchflusszytometrie entwickelt, die es ermöglichen alle wichtigen inhibitorischen HLA-spezifischen NK-Rezeptoren zusammen mit verschiedenen funktionalen Parametern in einer Messung zu analysieren. Die Multifarben-Durchflusszytometrie ermöglicht hierbei die gleichzeitige Analyse aller Parameter auf klonaler Ebene. Die klonale Information über NK-Zell-Funktion und Phänotyp wurde dann mit dem genetischen KIR und HLA-Klasse I-Hintergrund korreliert. Dieser Versuchsansatz sollte es ermöglichen, erstmals die Beziehungen zwischen KIR-Expression, ihrer Regulation und den passenden Liganden detailliert zu beleuchten.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Überblick

Die grundlegende Idee dieser Arbeit war es, das KIR-Repertoire von NK-Zellen auf klonaler Ebene zu untersuchen und damit dessen Regulation und funktionale Bedeutung besser zu verstehen. Die Basis für den Großteil der hier präsentierten Daten bildete eine von mir etablierte durchflusszytometrische Methode zur gleichzeitigen Analyse der fünf wichtigsten inhibitorischen NK-Zellrezeptoren, nämlich KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2 sowie dem ebenfalls HLA-Klasse I-spezifischen Rezeptor NKG2A. In Kombination mit funktionalen Assays auf ebenfalls durchflusszytometrischer Ebene ermöglichte dieser Ansatz erstmals, Daten über die NK-Zellfunktion auf Einzelzellniveau zu erheben.

Die Kombination der Analyse des NK-Zellrepertoires mit der funktionalen Analyse wurde für adultes peripheres Blut (Kapitel 2.3) sowie Nabelschnurblut (Kapitel 2.4) angewendet. Desweiteren wurden alle Proben sowohl hinsichtlich ihrer *KIR*- als auch *HLA*-Genetik charakterisiert. Bei der Analyse der Daten konnte neben gravierenden Unterschieden in der Funktionalität ein eindeutiger Unterschied in der Adaption des KIR-Repertoires an die polymorphen HLA-Klasse I-Liganden gefunden werden. Während adulte NK-Zellen einen Frequenzanstieg solcher Klone zeigten, die einen „passenden“ Rezeptor für Selbst-HLA-Klasse I-Liganden aufwiesen, war diese Adaption an autologe KIR-Liganden im Nabelschnurblut nicht vorhanden.

Der oben dargestellte methodische Ansatz wurde ebenfalls auf die Analyse von NK-Zellen in Transplantationspatienten (Kapitel 2.5) und die Charakterisierung von sogenannten iNKT-Zellen angewendet (Kapitel 2.6), d.h. einer Population von T-Zellen, die einen nichtvariablen T-Zellrezeptor besitzen und sich durch die Expression bestimmter NK-Rezeptoren auszeichnen. Hierbei wurde deutlich, dass die *KIR*-Typisierung sowie die Analyse des NK-Zellrepertoires aus klinischer Sicht immer mehr Bedeutung erlangt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der Rezeptorexpression und der Entwicklung des Rezeptorrepertoires gewonnen werden, die uns helfen die Bedeutung der NK-Zellen für das natürliche, aber auch das adaptive Immunsystem, besser zu verstehen.

2.2 Clonal analysis of NK cell effector functions by multi-parameter flow cytometry

Status: im Druck

Methods in Molecular Biology, Impact Factor: 1,2

Eigener Anteil an der Publikation:

- Planung und Durchführung der Experimente
- Schreiben des Manuskriptes (mit Markus Uhrberg)

2.2.1 Zusammenfassung

NK-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der frühen Bekämpfung von viralen Infektionen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die HLA-Klasse I-spezifischen Rezeptoren der NK-Zellen, KIR, einen großen Anteil an der NK-zellvermittelten Antwort gegen HCV und HIV haben (Vgl. Kapitel 1.6). Um die NK-Zellfunktion von Patienten mit viralen Infektionen zu untersuchen, ist es sinnvoll funktionale Marker und die Expression der KIR-Rezeptoren parallel zu analysieren.

Um die Funktion und die Rezeptorexpression von NK-Zellen zusammenhängend zu untersuchen, mussten im Rahmen dieser Arbeit mehrere durchflusszytometrische Protokolle etabliert werden.

Für die Bestimmung der NK-Zellfunktion gab es lange Zeit nur einen klassischen *Target-Killing-Assay*, den *Chrom-Release-Assay*. Dabei werden NK-Zellen mit Chrom-markierten Targetzellen kokultiviert. Wenn die Targets getötet werden, setzen sie das radioaktive Chrom in den Überstand frei, welches im Strahlungsmessgerät detektiert werden kann. In neuester Zeit wurden CFSE-markierte Zellen für diesen Assay bevorzugt, da sie den Vorteil haben, im Durchflusszytometer gemessen werden zu können. CFSE-markierte Zellen werden nach der Kokultur mit NK-Zellen, in Kombination mit Propidiumiodid (PI), einem Marker für Apoptose, gemessen, um so den Anteil der CFSE-positiven Zellen zu bestimmen, die durch NK-Zellen getötet wurden. Beide Assays haben aber einen entscheidenden Nachteil: Sie messen lediglich die getöteten Targets und können nicht identifizieren, welche Klone einer gemischten NK-Zellpopulation aktiv geworden sind. Dieses Problem konnte mit einem Assay gelöst werden, der ursprünglich für T-Zellen entwickelt worden war, aber auch auf NK-Zellen angewendet werden konnte. Bei diesem Assay misst man die Degranulation der Effektorzellen mit Hilfe eines CD107-spezifischen Antikörpers.

CD107 (LAMP-1, *lysosomal-associated membrane protein-1*) ist ein Molekül, das auf der Innenseite der in den NK-Zellen befindlichen Granula lokalisiert ist. Wenn diese Granula bei Aktivierung an die Oberfläche gebracht werden, um Perforin und Granzym B in Richtung Zielzelle zu entlassen, erscheint dieser Marker auf der Zelloberfläche und kann mit einem Antikörper detektiert werden. Erst im aktivierten Stadium, wenn die Granula an die

Oberfläche gelangen, haben die CD107-spezifischen Antikörper die Möglichkeit an CD107 zu binden, im ruhenden Stadium ist es nicht auf der Oberfläche zu detektieren. Dieser Marker wurde zunächst bei der Degranulation von CD8⁺-T-Zellen beobachtet, wird aber auch bei NK-Zellen nach Stimulation mit MHC-defizienten Zielzellen hochreguliert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde CD107 in Kombination mit den vier wichtigsten inhibitorischen Rezeptoren (KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR3DL1 und NKG2A) gemessen, um darstellen zu können, welcher NK-Zellklon beim Aufeinandertreffen mit den Targets aktiviert wird und CD107 mobilisiert. Dies erlaubte eine präzise Bestimmung der zytolytischen NK-Zellen mit spezifischen Rezeptoren für HLA-Klasse I.

Hierbei gilt es zu beachten, dass der CD107-Assay nur dann eine zuverlässige Aussage über die Zytotoxizität zulässt, wenn die zytotoxischen Granula der NK-Zellen mit den entsprechenden Effektormolekülen Granzym und Perforin gefüllt sind. Tatsächlich konnte bei der parallelen Untersuchung von CD107 und CFSE bei unreifen NK-Zellen aus dem Nabelschnurblut oder Patienten mit bestimmtem pathologischen Hintergrund nicht immer eine Korrelation festgestellt werden. Mit dem Hinzunehmen der intrazellulären Marker Perforin und Granzym B stellten wir dann fest, dass die lytischen Granula in diesen Fällen oft nicht beladen waren.

In der Veröffentlichung *„Clonal analysis of NK cell effector functions by multi-parameter flow cytometry“* (Vgl. Kapitel 2.2.2) haben wir ein Protokoll entwickelt, in dem Schritt für Schritt erklärt wird, wie solche funktionale Analysen durchzuführen sind. Dabei präsentieren wir einen durchflusszytometrischen Assay, bei dem die Zelloberflächen-Mobilisierung von CD107 in Kombination mit den intrazellulären Markern Perforin und Granzym B gemessen wird. Diese funktionalen Parameter werden parallel zu drei verschiedenen KIR gemessen, die eine hochauflösende Analyse des NK-Zellrepertoires auf klonaler Ebene ermöglichen.

CHAPTER X

Clonal analysis of NK cell effector functions by multi-parameter flow cytometry

Kathrin Schönberg, Maryam Hejazi, and Markus Uhrberg

Institute for Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics, University Clinic, Heinrich-Heine University Düsseldorf, Germany

Abstract

Natural killer (NK) cells provide a first line of defense against viral infections and prepare the ground for subsequent action of virus-specific T cells in a concerted way. Human NK cells use a sophisticated system of inhibitory and stimulatory receptors of the KIR gene family, which are expressed in a clonally-distributed manner. Several studies suggest that KIR play a critical role in NK cell-mediated protection against HCV and HIV infection. As each NK cell expresses an individual set of KIR receptors that enables them to sense differences in HLA class I expression, classical measurement of NK cell function by analysis of target cell killing does not enable to define and isolate the clinically relevant NK cell effector subsets. Here, we have developed a flow-cytometry-based protocol to measure cytolytic activity together with KIR expression in a clonal level. Combined analysis of KIR expression in conjunction with cell surface mobilization of CD107 enables precise enumeration of cytolytic NK cells with defined specificity for HLA class I. Moreover, via inclusion of intracellular perforin or alternatively granzyme B, NK cells with deficient loading of cytotoxic granula can be identified. The present protocol enables identification and isolation of cytotoxic NK cells on a clonal level and enables reliable measurement in healthy as well as pathological settings such as virus infection and hematological disease.

Key words

NK cells, NK cell function, cytotoxicity, CD107, granzyme B, perforin, flow cytometry

1. Introduction

Natural Killer (NK) cells are lymphocytes that play a vital role in the early immune defense against tumor cells and viral infections. In this regard, it is long known that patients with NK cell deficiencies suffer from recurrent viral infections such as herpes viruses *(1)*. Moreover, genetic and functional evidence is now accumulating that the course of HIV infection is significantly influenced by NK cells on the levels of resistance to infection, protection from maternal-infant transmission, and the delay in disease progression *(2-4)*. Similarly, a protective role of NK cells was suggested in hepatitis C by a study showing linkage between NK cell receptor genes and resolution of infection *(5)*.

In contrast to lymphocytes of the B and T cell lineage, NK do not express an antigen-specific and somatically-rearranged receptor. Instead, NK cells express a variety of MHC class I-specific inhibitory and stimulatory receptors, either encoded by the killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) family in primates and humans or the Ly-49 family in rodents *(6)*. In humans, 12 functional KIR genes are known that can be expressed in a clonally-distributed fashion, i.e. a single NK cell can express all possible combinations of KIR starting from one receptor up to all receptors encoded in the genome of that individual. The system is complemented by the more conserved CD94:NKG2A heterodimer that is specific for HLA-E and is expressed in a clonally-distributed manner as well *(7)*. Restrictions to the repertoire of expressed receptors on each NK cell are set by the HLA class I ligands, which introduce a bias towards expression of cognate inhibitory receptors for self class I

molecules (8, 9). Nonetheless, NK cells lacking receptors for self and NK cells not expressing any HLA class I-specific NK receptors are commonly found in the repertoire of most individuals(10). As these NK cells are potentially autoreactive, mechanisms should be in place to inhibit their inappropriate activation. Indeed, in recent years it was shown that only NK cells expressing an inhibitory receptor for self are fully activated by MHC class I-negative target cells whereas NK cells that lack cognate NK cell receptors are hyporesponsive with regard to cytokine production and target cell killing (10, 11).

The classical method to determine cytotoxicity of NK cells is the Chromium release assay (12). In this assay, a bulk population of NK cells is co-cultivated with ⁵¹Cr labeled target cells. When target cells are killed, chromium is released to the supernatant, which can be analyzed for radioactivity in a gamma counter. In recent years, non-radioactive cytotoxicity assays are becoming more popular. In particular, carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-labeling of target cells in combination with propidium iodide (PI) staining of dead cells is now a reliable alternative to measure target cell killing by flow cytometry (13).

Although the lysis of target cells provides a good estimation of the cytotoxicity of lymphocytes, it does not enable direct identification and enumeration of cytotoxic NK cells. To this end, the recently developed CD107 mobilization assay fills exactly this gap. Originally developed for the identification of cytotoxic T cells (14), it was quickly adapted for measuring cytotoxic NK cells (15). Recent studies have integrated the CD107 assay in multicolor flow cytometric protocols thereby enabling identification and isolation of cytolytic NK cells that express defined NK cell receptors (9).

The CD107a and b molecules, also known as lysosome-associated membrane proteins (LAMP1 and 2) line the inner membrane of lytic granules. In the course of the degranulation

process the granules fuse with the outer cell membrane and the CD107 molecules become accessible to the cell surface. Consequently, whereas resting NK cells are negative for CD107 cell surface expression, activated cytolytic NK cells mobilize CD107 to the cell surface and expression can be measured by flow cytometry. Importantly, CD107 is not a direct marker for killing but a suitable marker for degranulation. Thus, only if the granules are filled with the necessary lytic components, the CD107 assay constitutes a suitable correlate of cytotoxic function. Lytic granules contain granzyme B, a serinprotease, and perforin, a membrane disrupting protein (*16*). Both proteins cooperatively induce cell death by apoptosis in the target cell (*17*). Importantly, NK cells do not always express the same amount of lytic substances: under certain circumstances, for example when analyzing immature NK cells or in certain pathological settings, lytic granules might not be properly loaded with perforin or granzyme B and in these cases the lytic exocytosis will not be effective (data not shown).

Here, a flow cytometry-based protocol is presented, in which cell surface mobilization of CD107 is analyzed in combination with intracellular perforin and granzyme B staining. These functional parameters are measured together with three different inhibitory KIR receptors, which enables a high-resolution analysis of NK cell receptor repertoires on a clonal level. Moreover, clonal analysis of NK cell function is then compared with flow cytometric analysis of target cell killing using a CFSE/PI assay.

2. Materials

2.1. Cell culture

1. K562 cells, HLA-class I-deficient erythroleukemic cell line.
2. 10 ml peripheral blood from patients and healthy controls.
3. Rosette Sep NK cell enrichment cocktail (Stemcell Technologies).
4. PBS/EDTA: PBS, 2mM EDTA.
5. Ficoll separating solution.
6. K562 medium: DMEM, 4.5g/L Glucose, 2mM L-glutamine, 10% (v/v) fetal calf serum (FCS), 100U/mL penicillin, 0.1mg/mL streptomycin.
7. NK medium: RPMI 1640, 25mM HEPES, 2mM L-glutamine, 10% (v/v) FCS, 5% (v/v) human AB-serum, 100 U/mL penicillin, 0.1mg/mL streptomycin, 1000U/mL rh interleukin-2 (IL-2).

2.2. Degranulation assay

1. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) - Prepare a dilution of 50 µg/mL in distilled water.
2. Ionomycine - Prepare a dilution of 10 µg/mL in distilled water.
3. 96well plate (u bottom).
4. NK-Medium: RPMI 1640, 25mM HEPES, 2mM L-glutamine, 10% (v/v) FCS, 5% (v/v) human AB-serum, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, 1000 U/mL rh IL-2.
5. Golgistop containing monensin (BD Biosciences).
6. Monoclonal antibodies against CD107, CD56, CD3, KIR, NKG2A, granzyme B and perforin (see Table 1 for details of specificity, labeling, and clones).
7. Cytofix/Cytoperm Fixation/ Permeabilization Solution Kit (BD Biosciences).

8. PBS/EDTA: PBS, 2mM EDTA.
9. FACSCanto II with FACS Diva Software 6.0.
10. FlowJo Software v8.7.

2.3. CFSE killing Assay

1. Vybrant® CFDA SE Tracer Kit (Invitrogen) - Prepare a dilution of 0.5mM CFDA-SE in DMSO.
2. PBS.
3. PBS/FCS: PBS, 20% (v/v) FCS.
4. PBS/EDTA: PBS, 2mM EDTA.
5. 96well plate (u-bottom).
6. Propidium Iodide Staining Solution (PI).
7. FACSCanto II with FACS Diva Software 6.0.
8. FlowJo Software v8.7.

3. Methods

3.1. Cell isolation and culture conditions

1. K562 cells were cultured in K562 medium at 37 °C and 5 % CO₂.
2. To isolate NK cells from peripheral blood, use the NK cell enrichment cocktail (*see Note 1 and 2*).
3. Add 50 µL of the NK cell enrichment cocktail per mL blood (*see Note 3*) and incubate for 20 min. at room temperature (RT).
4. Dilute the blood 1:1 with PBS and add it slowly to a 50 mL tube, prefilled with 15 mL Ficoll. Centrifuge the sample for 35 min. at 440xg and RT without brake. Carefully harvest the interphase (*see Note 4*).
5. Wash the cells with PBS/EDTA (7 min., 440xg, RT).
6. To isolate mononuclear cells (MNCs) from peripheral blood, add 15 mL Ficoll to a 50 mL tube and slowly add 30 mL of blood, diluted 1:1 with PBS. Centrifuge the sample for 35 min. at 440xg and RT without brake. Carefully harvest the interphase and wash the cells with PBS/EDTA (7 min., 440xg, RT).
7. Primary NK cells or MNC's are cultured overnight in NK medium at a concentration of 0.5-1x10⁶/mL at 37 °C and 5 % CO₂.

3.2. CD107 degranulation assay

1. Count and harvest the required number of NK cells or MNCs. The cells are pre-incubated with IL-2 for at least 16h (*see Note 5*). For the optimal 1:1 ratio, you need at least 1x10⁵ NK cells or 1x10⁶ MNCs. For controls, 0.5-1x10⁵ NK cells or MNCs are sufficient (Table 2).

2. Count and harvest the appropriate number of K562 cells to reach a 1:1 ratio with NK cells during co-cultivation (*see Note 6 and 7*). Although a 1:1 ratio is usually best, it is recommended to perform titration of effector/target ratios when setting up the method for the first time (Table 2).
3. Centrifuge the cells (7 min., 440xg, RT).
4. Prepare a 96-well plate with 5 μ L of CD107 antibody in each well including negative and positive controls.
5. Prepare the positive control: 10 μ L of PMA (final concentration: 2.5 μ g/mL) and 10 μ L of ionomycin (final concentration: 0.5 μ g/mL).
6. Resuspend cell pellets in NK medium at a concentration of 1×10^7 cells/mL.
 - 6.1. Add 10 μ L of K562 (1×10^5) and 10 μ L of NK (1×10^5) cells to the sample well (*see Note 8*).
 - 6.2. Add 10-50 μ L of NK cells (0.5 - 1×10^5) to the negative, positive, and unstained control wells.
 - 6.3. Fill up the wells to 200 μ L with NK-Medium (*see Note 9*).
7. Incubate for a total of 6 hours at 37°C and 5 % CO₂ (*see Note 10*).
8. After 1 hour, add 2 μ L monensin to the wells (*see Note 11*).
9. Harvest the cells in 4 ml round bottom tubes ('FACS tubes').
10. Wash the cells with PBS/EDTA (7 min., 440xg, RT) and resuspend the pellet in 100 μ L PBS/EDTA.
11. Stain the cells with the following monoclonal antibodies (different protocols for staining with NKG2A (11.1) or perforin and granzyme B (11.2):
 - 11.1. CD56, CD3, KIR, and NKG2A-specific mAbs according to Table 1. Put 5 μ L of each antibody (in case of CD56 and CD3, signals are usually strong and 2,5 μ L might also be sufficient) to the cells and mix briefly (*see Note 12*).

- 11.2. CD56, CD3, and KIR-specific mAbs. Put 5 μ L of each antibody (in case of CD56 and CD3, see step 11.1) to the cells and mix briefly.
12. Incubate for 20 min. at 4°C.
13. Wash the cells with PBS/EDTA (7 min., 440xg, RT). For NKG2A-stained samples continue directly with flow cytometrical analysis (step 21). For additional analysis of granzyme B and/or perforin continue with step 14.
14. Start with the intracellular staining protocol using the Cytotfix/Cytoperm kit. Resuspend the cell pellet in 250 μ L Permwash Solution and incubate for 20 min. at 4°C.
15. Prepare Permwash Buffer by diluting 5x Buffer 5:1 with distilled water.
16. Wash 2x with Permwash Buffer and centrifuge the cells (7 min., 440xg, RT). Resuspend in 100 μ L Perwash Buffer.
17. Add 20 μ L of antibody against granzyme B or perforin and mix well.
18. Incubate for 30 min at 4°C.
19. Wash with Permwash Buffer and centrifuge 2x (7 min., 440xg, RT).
20. Wash the cells with PBS/EDTA (7 min., 440xg, RT), resuspend the pellet in 300 μ L PBS.
21. To start flow cytometrical analysis, set a gate on the lymphocyte population in a FSC vs. SSC dot plot (Fig. 1) (*see Note 13, 14*).
22. Create a dot plot of CD56-PC5 vs. CD3-Pacific blue and determine the percentage of NK cells by gating on CD56⁺CD3⁻ lymphocytes. (*see Note 15*).
23. Analyze these NK cells in a CD107 histogram and gate on CD107-positive cells in comparison to the negative control (Fig. 1).
24. Do the same for perforin and/or granzyme B to determine the frequency of NK cells stained for these intracellular markers. Calculate the frequency of the respective marker as percentage of NK cells (*see Note 16 and 17*).

3.3. CFSE killing assay

1. Harvest the required number of K562 cells and wash with PBS (7 min., 440xg, RT). For every well, at least 1×10^5 K562 are required. For the calculation of the required number of cells, see Table 3.
2. Incubate the required number of NK cells (*see* Table 3) overnight in NK medium (at least for 16h, **Note 5**).
3. Centrifuge the NK cells (7 min., 440xg, RT).
4. Resuspend K562 cells in PBS in a concentration of 1×10^7 cells/mL and put 2 μ L of CFDA-SE (0.5 mM) per mL into the tube.
5. Incubate for 10 min. at 37°C, invert 2x during the incubation.
6. Wash K562 cells 2x with PBS/FCS (7 min., 440xg, RT).
7. Resuspend both NK cells and K562 pellets to a final concentration of 1×10^7 cells/mL in NK medium.
8. The following controls have to be prepared (Table 3):
 - 8.1. 10-50 μ L unlabelled K562 ($0.1-0.5 \times 10^6$).
 - 8.2. 10-50 μ L CFSE-labeled K562 cells as control for the CFSE staining ($0.1-0.5 \times 10^6$).
 - 8.3. 10-50 μ L CFSE-labeled K562 as a negative control ($0.1-0.5 \times 10^6$) (*see* **Note 18**).
9. Add 100 μ L NK cells (1×10^6) and 10 μ L K562 (1×10^5) in one well for an optimal E:T ratio of 10:1 (*see* **Note 19**).
10. Add NK medium to all wells to a final volume of 200 μ L.
11. Incubate the 96-well plate for 6 hours at 37 °C and 5 % CO₂.
12. Harvest the wells in 4 mL round bottom tubes ('FACS tubes') for flow cytometry.
13. Wash the cells with PBS/EDTA (7 min., 440xg, RT) and resuspend the pellet in 300 μ L PBS.
14. Stain the cells with PI shortly before analysis (except unstained and CFSE controls).
15. Start flow cytometrical analysis and create FSC vs. SSC dot plot (*see* **Note 20 and 21**).

16. Determine the CFSE-positive cells in a histogram by setting a gate (*see Note 22*).
17. Show the CFSE-positive cells in a new dot plot.
18. Determine the frequency of CFSE⁺PI⁺ cells as percentage of CFSE-positive K562 in a dot plot or histogram.
19. Calculate the number of killed target cells (Fig. 2) (*see Note 23*).

4. Notes

1. Flow cytometrical analysis of enriched NK cells is in some cases superior to direct analysis of MNCs due to higher and more discriminative signals for CD107, granzyme B, and perforin. Nonetheless, analysis can also be done directly from MNCs.
2. Depending on the blood source and frequency of lymphocytes one usually obtains 5 to 10x10⁶ NK cells from 10 mL blood.
3. It is possible to use less kit, i.e. up to 1/3 of the recommended volume. In this case the purity of NK cells will go down to about 70 % but the recovery rate will considerably increase.
4. Sometimes it is difficult to locate the cells in the interphase. It is then advisable to remove some of the Serum or Ficoll along with the enriched cells in order to ensure their complete recovery.
5. Stimulation with IL-2 is recommended for the CD107 assay as well as the CFSE killing assay to increase the frequency of responding NK cells in order to ensure reliable statistical analysis.
6. We have observed that K562 is very well suited for CD107 analysis, whereas 721.221 gave the best results for stimulation of IFN- γ production.
7. Typically, a 1:1 effector/target ratio is optimal for K562, but may have to be adjusted for other target cells.
8. Whenever possible, increase the number of analyzed cells. A high number of recorded NK cells leads to a better identification of small populations.
9. Optimal volume in each well is 200 μ L medium but smaller medium volumes might be used if the number of cells is limited.
10. Shorter incubation periods (4h) lead to weaker CD107 signal, longer incubation periods (12-16h) are possible but do not necessarily increase CD107 signal or frequency.

11. Addition of monensin is recommended to avoid internalization of CD107. Of note, in pilot experiments without monensin CD107 signals were somewhat weaker but could still be evaluated.
12. Inclusion of KIR antibodies into the flow cytometry panel enables functional analysis of NK cells at the clonal level. Calculate percentage of desired KIR-positive NK cells that have mobilized CD107.
13. Lymphocytes are small in comparison to K562. Additionally, intracellular staining leads to even smaller cell volumes. Carefully adjust FSC and SSC channels to enable exact enumeration of lymphocytes.
14. Depending on the number of killed K562, many dead cells will be present in FSC and SSC dotplots. Be sure to exclude the dead cells when gating on lymphocytes.
15. Compensation between the strong signals of PE-Cy5 and ECD is critical. Generally, do not use CD56 and CD3 in fluorochromes that are analyzed in neighbouring channels.
16. To calculate the frequency of degranulated NK cells, subtract the percentage of CD107⁺ NK cells present in the negative control from the percentage of CD107⁺ NK cells present in co-culture with K562.
17. Not only the frequency but also the mean fluorescence intensity (MFI), i.e. the expression levels per cell, of perforin, granzyme B, and CD107 can vary between samples and should be analyzed when evaluating effector function of NK cells.
18. A CFSE-labeled negative control is necessary to determine the number of K562, which lyse spontaneously.
19. A typical suitable effector/target ratio for CFSE with K562 is 10:1, but has to be adjusted for every given cell line separately. For every new set up, prepare a killing curve with different E:T ratios (i.e. 10:1, 5:1, 1:1, 1:5 and 1:10) and determine the optimal ratio with the best killing efficiency and discriminative power in flow cytometry.
20. In a CFSE/PI assay also the dead target cells have to be measured. Take care to keep the FSC threshold low, otherwise dead cells might be excluded from analysis.
21. PI is measured best in ECD or PE-Cy5 channel. Care has to be taken to enable good compensation between the strong signals of CFSE and PI.
22. The CFSE signal can be very strong. In this case, adjust the voltage of the CFSE channel accordingly.
23. To calculate the frequency of lysed target cells, subtract the percentage of spontaneous lysis of K562 from the percentage of K562 in co-culture with NK cells.

5. Literature

1. Orange JS. Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes Infect* 2002;4:1545-58.
2. Tiemessen CT, Shalekoff S, Meddows-Taylor S, et al. Cutting Edge: Unusual NK cell responses to HIV-1 peptides are associated with protection against maternal-infant transmission of HIV-1. *J Immunol* 2009;182:5914-8.
3. Martin MP, Gao X, Lee JH, et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 2002;31:429-34.
4. Jennes W, Verheyden S, Demanet C, et al. Cutting edge: resistance to HIV-1 infection among African female sex workers is associated with inhibitory KIR in the absence of their HLA ligands. *J Immunol* 2006;177:6588-92.
5. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004;305:872-4.
6. Trowsdale J, Barten R, Haude A, Stewart CA, Beck S, Wilson MJ. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunol Rev* 2001;181:20-38.
7. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 1997;7:739-51.
8. Schonberg K, Srihar M, Enczmann J, Fischer JC, Uhrberg M. Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood*.
9. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med* 2006;203:633-45.
10. Anfossi N, Andre P, Guia S, et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 2006;25:331-42.
11. Yokoyama WM, Kim S. Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol Rev* 2006;214:143-54.
12. Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC, Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 1968;14:181-96.
13. Jedema I, van der Werff NM, Barge RM, Willemze R, Falkenburg JH. New CFSE-based assay to determine susceptibility to lysis by cytotoxic T cells of leukemic precursor cells within a heterogeneous target cell population. *Blood* 2004;103:2677-82.
14. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 2003;281:65-78.
15. Penack O, Gentilini C, Fischer L, et al. CD56^{dim}CD16^{neg} cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets. *Leukemia* 2005;this issue.
16. Peters PJ, Borst J, Oorschot V, et al. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med* 1991;173:1099-109.
17. Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003;3:361-70.

6. Figure legends

Fig. 1. Analysis of CD107 mobilization and intracellular expression of perforin and granzyme B in neonatal and adult NK cells. Mononuclear cells (MNCs) from umbilical cord blood and adult peripheral blood were each co-cultured with K562 target cells for 6h and subsequently surface-stained with mAbs against CD56, CD3, KIR, and CD107. Surface staining was followed by intracellular staining for either granzyme B or perforin. (A) For flow cytometrical analyses, lymphocytes are displayed in a FSC vs. SSC dot plot, as shown here for an MNC sample. (B) NK cells were defined as CD56⁺CD3⁻ fraction of lymphocytes and analysis is restricted to NK cells as shown here for an MNC sample. The results of the CD107, granzyme B, and perforin analysis are presented as histogram overlays (blue graphs) together with the respective negative control samples (red graphs) from a healthy adult (C) and a neonatal sample (D). Maximum cell counts are set to 100%. The frequency of NK cells expressing CD107 after degranulation is comparable in both samples (left panel). Notably, the percentage of cells expressing granzyme B (middle panel) and perforin (right panel) among NK cell differs substantially. In the adult sample (upper panel), most NK cells contain granzyme B and perforin, whereas in the neonatal sample (lower panel) only a minority of cells contain both effector molecules.

Fig. 2: Analysis of NK cell function with the CFSE/PI assay. Mononuclear cells from the same donors shown in Fig. 1 were co-cultured with CFSE-labeled K562 for 6h in a 10:1 ratio and after co-culture stained with PI. Double-positive cells (CFSE⁺PI⁺, light grey bars) were compared to a negative control (CFSE-labeled K562 without effector cells, dark grey bars). Consistent with the results shown in Fig. 1 for granzyme B and perforin, the adult sample showed a substantially higher killing frequency compared to the neonatal sample.

Table 1: Antibody staining panel for CD107 assay.

Antibody¹	Clone	Conjugate²	Company	Excitation/ Emission (nm)
CD107	H4A3	FITC	BD Biosciences	488/518
NKG2A or Perforin or Granzyme B	Z199 δG9 GB11	PE	Beckman Coulter BD Biosciences BD Biosciences	488/575
KIR3DL1	Z27.3.7	ECD	Beckman Coulter (custom conjugate)	488/620
CD56	N901	PE-Cy5	BD Biosciences	488/670
KIR2DL1/S1	EB6	APC	Beckman Coulter	633/660
KIR2DL2/3/S2	GL183	APC-Cy7	Beckman Coulter (custom conjugate)	633/775
CD3	UCHT1	Pacific Blue	Beckmann Coulter	405/455

¹ Instead of surface staining for NKG2A, intracellular staining for either granzyme B or perforin can be performed.

²FITC=Fluorescein isothiocyanate); PE=R-Phycoerythrin; ECD=PE-Texas Red; APC=Allophycocyanin; Cy5= Cyanine Dye 5, Cy7= Cyanine Dye 7.

Table 2. CD107 degranulation assay: exemplified sample set up

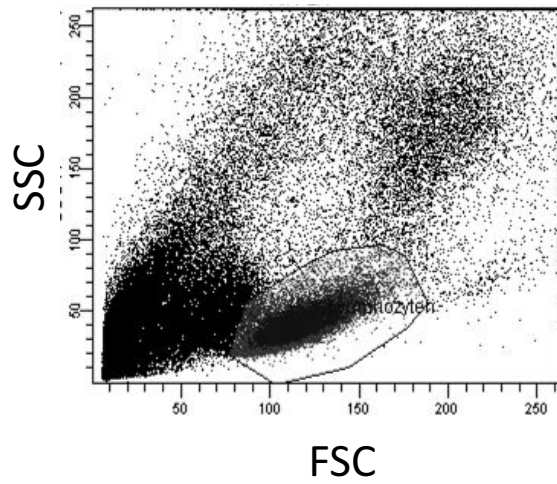
Sample	NK cells¹	K562	PMA/Ionomycin	CD107-antibody
Unstained control	0.5-1x10 ⁵	-	-	
Negative control	0.5-1x10 ⁵	-	-	+
Positive control	0.5-1x10 ⁵	-	+	+
10:1	1x10 ⁶	1x10 ⁵	-	+
5:1	5x10 ⁵	1x10 ⁵	-	+
1:1	1x10 ⁵	1x10 ⁵	-	+
1:5	1x10 ⁵	5x10 ⁵	-	+
1:10	1x10 ⁵	1x10 ⁶	-	+

¹Calculate a 10x higher cell number when using MNCs instead of NK cells

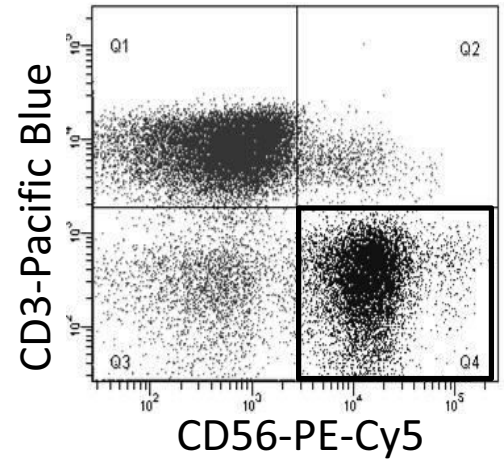
Table 3. CFSE assay: exemplified sample set up

Sample	NK cells	K562	PI
Unlabelled control	-	$0.5-1 \times 10^5$	-
CFSE-labelled control	-	$0.5-1 \times 10^5$	-
CFSE-labelled negative control	-	$0.5-1 \times 10^5$	+
10:1	1×10^6	1×10^5	+
5:1	5×10^5	1×10^5	+
1:1	1×10^5	1×10^5	+
1:5	1×10^5	5×10^5	+
1:10	1×10^5	1×10^6	+

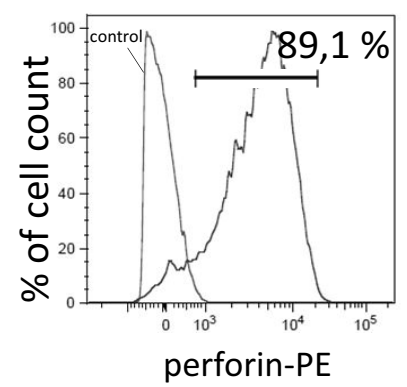
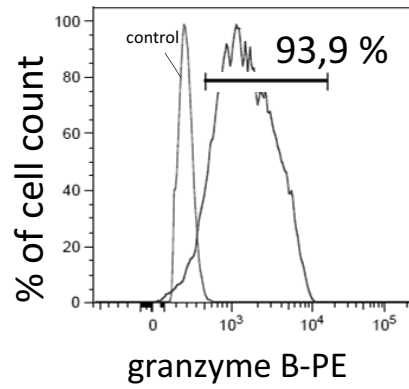
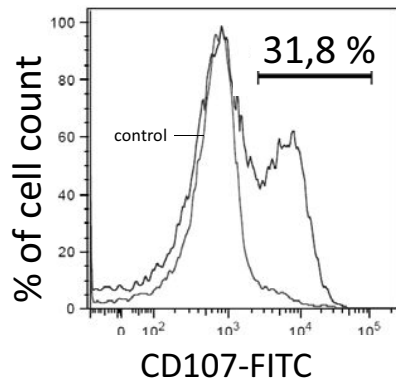
A



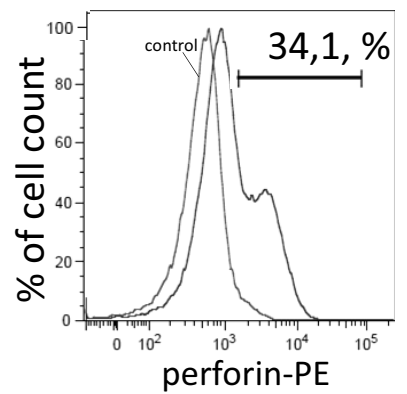
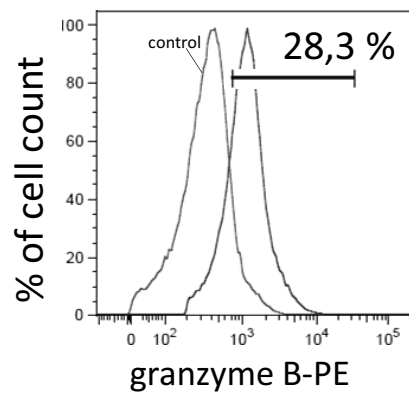
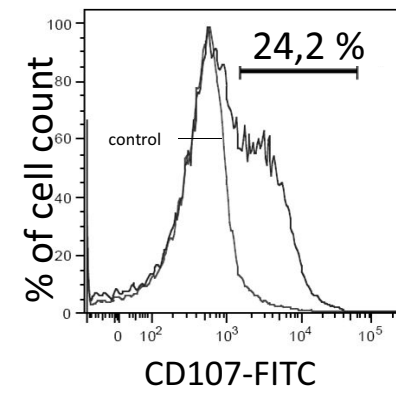
B



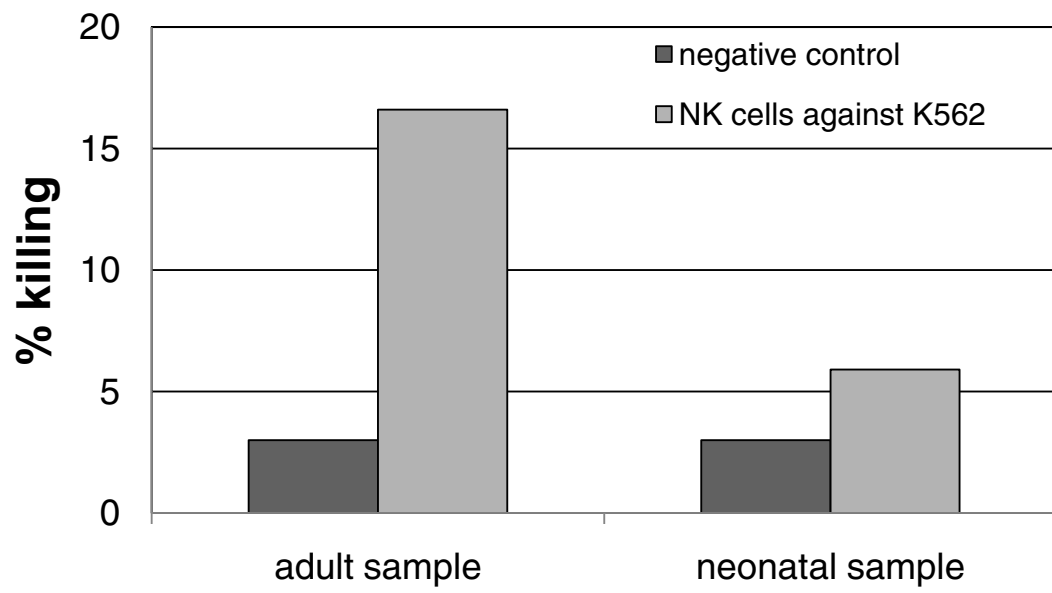
C



D



CFSE



2.3 Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group *A* and *B* haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition

Status: publiziert

Blood, Impact Factor: 10,555

Eigener Anteil an der Publikation:

- Planung und Durchführung der Experimente
- Schreiben des Manuskriptes (mit Markus Uhrberg)

2.3.1 Zusammenfassung

Wie bereits in der Einleitung dargelegt, exprimieren NK-Zellen HLA-Klasse I spezifische Rezeptoren (Vgl. Kapitel 1.4.3.2). Durch klonale Expression, *KIR*- und *HLA*-Genetik ergibt sich für jeden Menschen ein spenderspezifisches Repertoire. Über die Frage, wie sich dieses Repertoire im Menschen formiert, herrschte lange Unklarheit, bis 2006 veröffentlicht wurde, dass in Japanern, einer Bevölkerungsgruppe mit geringer genetischer Variation der *KIR*-Gene, eine strukturelle Adaption des Repertoires an HLA stattfindet (Vgl. Kapitel 1.4.4.3).

Um der Fragestellung nachzugehen, von welchen Faktoren das KIR-Repertoire von NK-Zellen beeinflusst wird und dies sowohl für Gruppe A als auch Gruppe B KIR-Haplotypen eingehend zu beleuchten, wurde eine vergleichende Analyse mit 150 Spendern durchgeführt. Dazu wurden alle Spender für ihre *KIR*- und *HLA-C*-Gene typisiert sowie eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt, in der mithilfe der Durchflusszytometrie alle inhibitorischen HLA-spezifischen Rezeptoren gemessen werden konnten. Anschließend wurden die Proben anhand der durchgeführten Typisierungen in Gruppe A und B Haplotypen sowie in ihre *HLA-C* Subgruppen unterteilt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten drei bestimmende Faktoren identifiziert werden, die die Struktur und auch die Funktion des KIR-Repertoires auf NK-Zellen beeinflussen, um ein Repertoire zu erschaffen, das darauf ausgerichtet ist, spezifisch Selbst-HLA-Klasse I zu erkennen. Diese drei Faktoren sind:

1. Passender HLA-Klasse I-Ligand

In Spendern mit Gruppe A Haplotyp konnte eine starke Adaption der Frequenzen des passenden KIR an HLA festgestellt werden. So stieg die Frequenz von KIR2DL1 exprimierenden Zellen, insbesondere die Frequenz der Zellen, die nur KIR2DL1 auf der Oberfläche trugen, in Spendern mit HLA-C2 signifikant an, während umgekehrt die Frequenz der Zellen die KIR2DL3 tragen, in Spendern mit HLA-C1 höher war als in Spendern mit HLA-C2. Sehr aussagekräftig war in diesem Zusammenhang auch das Verhältnis der KIR2DL1⁺- und KIR2DL3⁺-Zellen zueinander. Während in HLA-C1 immer mehr KIR2DL3 als KIR2DL1 Zellen vorhanden sind, dreht sich dieses Verhältnis komplett

ins Gegenteil wenn man sich HLA-C2 Spender ansieht, hier sieht man mehr KIR2DL1 als KIR2DL3-positive Zellen.

2. KIR-Haplotyp-Diversität

Wir konnten weiterhin zeigen, dass sich die Regeln für Gruppe A nicht einfach auf Gruppe B Haplotypen übertragen lassen. Der KIR-Haplotyp scheint ebenfalls eine Rolle bei der Anpassung des Repertoires zu spielen, denn die beobachtete Expansion der KIR2DL1⁺-Zellen in Spendern mit HLA-C2, die in Gruppe A Haplotypen so deutlich war, war in Gruppe B Haplotypen nicht zu sehen. Bei der genauen Betrachtung der verschiedenen *KIR*-Genotypen mit Gruppe B Haplotypen konnten wir *KIR2DL2/KIR2DS2* als die Faktoren identifizieren, die einen unerwarteten und starken Einfluss auf die Expression von KIR2DL1 ausüben. In Gruppe B Haplotypen ohne *KIR2DL2/S2* konnte nämlich erneut der Einfluss der Liganden auf die Frequenz der passenden Rezeptoren beobachtet werden. Dieser dominant repressive Einfluss beschränkt sich nicht nur auf die strukturelle Adaption, sondern betrifft auch die Funktion. So sind die KIR2DL1⁺ Zellen in Spendern mit *KIR2DL2* weniger funktional als die gleichen Zellen in Spendern ohne *KIR2DL2*. Ein Grund hierfür mag sein, dass KIR2DL2 anders als KIR2DL3, wie von uns erneut nachgewiesen werden konnte, sowohl HLA-C1 als auch HLA-C2 erkennt.

3. Sequentielle Rezeptorexpression während der NK-Zellentwicklung

Doch warum inhibiert *KIR2DL2* die Expression von KIR2DL1, wenn das Repertoire rein stochastisch exprimiert wird? Die Antwort liegt in der NK-Zellentwicklung. Sowohl in *in vitro* Assays unserer Arbeitsgruppe als auch nach Stammzelltransplantationen konnte gezeigt werden, dass KIR2DL2 und KIR2DL3 wesentlich früher exprimiert werden als KIR2DL1, es scheint ein festgelegtes Programm für die sequentielle Expression der KIR zu geben (Vgl. Kapitel 1.6.2).

Insgesamt muss festgestellt werden, dass sich die Regeln für Spender mit HLA-C1 und HLA-C2 unterscheiden. Durch die sequentielle Expression wird KIR2DL3 sehr früh während der NK-Zellentwicklung exprimiert. In Spendern mit HLA-C1 ist das sehr vorteilhaft und das Repertoire ist bereit richtig ausgerichtet. In Spendern mit HLA-C2 muss es daher eine wesentlich stärkere Anpassung, geben, da KIR2DL2 erst spät exprimiert wird. Somit ist es

nicht verwunderlich, dass die Signifikanz der Anpassung in HLA-C2 Spendern für KIR2DL1 wesentlich stärker ist, als für KIR2DL3 in HLA-C1.

Letztendlich spricht vieles für ein *Ligand-instructed* Modell der Rezeptorakquisition, bei dem ein ursprünglich stochastisches KIR-Repertoire durch passende HLA-Klasse I-Liganden modifiziert wird, abhängig vom genetischen Hintergrund des KIR-Polymorphismus. Das Programm der sequentiellen Expression wird solange ausgeführt bis ein passender KIR für Selbst auf der Oberfläche der NK-Zelle erscheint.

Analyses of HLA-C–specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition

Kathrin Schönberg,¹ Martina Sribar,¹ Jürgen Enczmann,¹ Johannes C. Fischer,¹ and Markus Uhrberg¹

¹Institute for Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics, University of Düsseldorf Medical School, Düsseldorf, Germany

To determine the influence of *KIR* and *HLA* class I polymorphism on human NK cell repertoires, 32 different clonotypes representing all possible combinations of 4 inhibitory KIR and NKG2A were analyzed by multicolor flow cytometry. In donors homozygous for the common group A *KIR* haplotype, a significant influence of HLA-C ligands was seen: KIR repertoires were dominated by clonotypes expressing a single KIR for the respective cognate ligand, either the C1-specific KIR2DL3 or

C2-specific KIR2DL1. In contrast, in donors possessing the polymorphic group B haplotypes, a similar adaptation to cognate HLA-C was lacking. We suggest that this discrepancy is largely the result of a suppressive effect of the group B-specific KIR2DL2 on the frequency of KIR2DL1⁺ NK cells. In functional assays, KIR2DL2 not only recognized C1 but also C2 ligands, showing overlapping specificity with KIR2DL1. Moreover, using an NK cell differentiation assay we show sequential acquisition of KIR2DL2 before KIR2DL1 on developing NK cells. Together, these observations are compatible with a ligand-instructed model of NK cell education, in which recognition of HLA class I by an inhibitory receptor (KIR2DL2) suppresses subsequent expression of a second receptor (KIR2DL1) of related specificity. Importantly, the ligand-instructed model fits to the observed KIR repertoires in both broad KIR haplotype groups. (*Blood*. 2011;117(1):98-107)

tion of KIR2DL2 before KIR2DL1 on developing NK cells. Together, these observations are compatible with a ligand-instructed model of NK cell education, in which recognition of HLA class I by an inhibitory receptor (KIR2DL2) suppresses subsequent expression of a second receptor (KIR2DL1) of related specificity. Importantly, the ligand-instructed model fits to the observed KIR repertoires in both broad KIR haplotype groups. (*Blood*. 2011;117(1):98-107)

Introduction

A hallmark of natural killer (NK) cells is the expression of major histocompatibility complex (MHC) class I–specific inhibitory receptors, either encoded by the Ly-49 family in rodents¹ or the killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) family in humans.² According to the missing self-model, lack of MHC class I expression leads to elimination of target cells by NK cells expressing a cognate inhibitory receptor for the respective MHC class I molecule.³ The concept implicates an educational system that shapes the repertoire of inhibitory receptors to ensure NK cell self-tolerance. In this regard, it was shown that expression of MHC class I leads to specific adjustment of NK cell frequency expressing cognate Ly-49 in the mouse.^{4,5}

In human subjects, analysis of NK cell clones demonstrated that functional NK cell repertoires have a high propensity to express at least 1 inhibitory receptor for self-MHC class I.⁶ However, the influence of the polymorphic human histocompatibility leukocyte antigen (HLA) class I genes on NK cell education is not obvious: firstly, NK cells express inhibitory KIR in the absence of cognate HLA class I ligands at a considerable frequency; secondly, self-tolerant NK cells without any HLA class I–specific inhibitory receptor exist in the periphery.⁷ Moreover, several studies failed to correlate the frequency of any particular KIR to the presence of cognate HLA class I ligands.^{8,9} Clear evidence for a direct influence of HLA class I on the KIR repertoire of NK cells came from studies of a Japanese cohort, characterized by very limited *KIR* gene polymorphism.¹⁰ The influence of HLA class I was again challenged by a recent study in which KIR expression frequencies were found to be independent of class I ligands.¹¹

The influence of MHC class I ligands on NK cell function is another actual matter of debate. In this regard, it was shown in mice

and humans that those NK cells that express inhibitory receptors for host-encoded MHC class I ligands exhibit an increased responsiveness against MHC-deficient target cells.^{7,12,13} The model implicates that NK cells lacking inhibitory receptors for self-MHC class I are hyporesponsive or anergic. However, it was recently shown that these so-called ‘unlicensed’ NK cells are readily able to control viral infection.¹⁴

Human NK cell repertoires are also influenced by the extensive polymorphism of *KIR* genes.¹⁵ *KIR* genes are organized in different haplotypes: an abundant group of haplotypes that generally consist of a defined set of 7 functional *KIR* genes was designated group A haplotypes. Group B haplotypes are more variable and are characterized by presence/absence polymorphisms of 5 additional different stimulatory *KIR* and the inhibitory *KIR2DL5*.^{16,17} Because of the higher complexity of group B haplotypes, detailed information on KIR repertoire formation is so far mostly restricted to donors of the A/A haplotype group as these can be unambiguously monitored by multicolor flow cytometry.¹⁰ However, in many ethnic groups, except East Asian populations, group A/B or B/B configurations dominate, and it is so far not known if the rules found in cohorts with A/A haplotypes do similarly apply to other populations and ethnic groups with much higher frequencies of group B haplotypes.

Although the rules governing the formation of NK cell repertoires are a matter of debate, it is already evident that the underlying *KIR* and KIR ligand genetic polymorphisms are of predictive value in different clinical settings such as chronic hepatitis C infection,¹⁸ control of HIV infection,¹⁹ resistance to cervical neoplasia,²⁰ and hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) for leukemia.^{21,22} Moreover, during pregnancy, certain

Submitted March 23, 2010; accepted September 29, 2010. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, October 8, 2010; DOI 10.1182/blood-2010-03-273656.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked “advertisement” in accordance with 18 USC section 1734.

© 2011 by The American Society of Hematology

combinations of maternal *KIR* genes and fetal *KIR* ligands are associated with pre-eclampsia, a condition characterized by a placental defect that is hazardous for mother and baby.²³

In an attempt to shed light on the formation of *KIR* repertoires across the full range of *KIR* haplotype diversity, a comparative analysis of donors with group *A* and group *B* haplotypes was performed in a genetically diverse cohort of white subjects. We demonstrate that the rules applying to formation of HLA-C–specific *KIR* repertoires found in group *A* haplotypes cannot simply be conferred to group *B* haplotypes. Some of the most evident functional and structural differences could be linked to presence of *KIR2DL2* and *KIR2DS2* on group *B* haplotypes, which has an unexpected and strong epistatic influence on the expression of *KIR2DL1*. The observations are compatible with a ligand-instructed model of receptor acquisition in which initially stochastic *KIR* repertoires are modified by cognate HLA class I ligands in ways that depend on the genetic background of *KIR* gene polymorphism.

Methods

KIR and HLA-C genotyping

Blood was obtained from healthy white donors after giving informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The study was approved by the University of Düsseldorf ethics committee. Genomic DNA was isolated from whole blood via QiaAmp DNA Blood Mini kit (QIAGEN). *KIR* genotyping was performed by polymerase chain reaction–sequence specific primer (PCR-SSP) as reported previously.²⁴ As quality control, several samples were independently *KIR*-genotyped with a different PCR-SSP protocol.²⁵ Group *A* and *B* haplotypes were defined as previously described leading to the following genotype classification: genotype *A/A*: *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR2DS4*; genotype *A/B*: all group *A* genes plus at least 1 additional *KIR* gene; genotype *B/B*: at least 1 group *A* gene missing. Notably, some of the donors with genotype *A/B* might in fact be *B/B* donors that coincidentally possess all group *A* genes on a group *B* background.

HLA-C group 1 (C1) and HLA-C group 2 (C2) genotyping was performed by PCR-SSP as described.⁹ HLA-C subtyping was performed using Luminex technology according to the manufacturers instructions (One Lambda).

Flow cytometry

For flow cytometric analyses, the following mouse anti-human monoclonal antibodies (mAbs) were used: PC5-conjugated CD56 (clone N901), phycoerythrin (PE)-conjugated CD159a (NKG2A, clone Z199), allophycocyanin (APC)-conjugated CD158a,h (KIR2DL1/S1, clone EB6), ECD-conjugated CD3 (clone UCHT1), PE- or ECD-conjugated CD158e (KIR3DL1/S1, clone Z27.3.7), PE- or APC-cyanin 7- (Cy7) or APC-Alexa Fluor 750-conjugated CD158b,j (KIR2DL2/3/S2, clone GL183) all from Beckman Coulter. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated KIR2DL1 (clone 143211; R&D Systems), and Pacific Blue-conjugated CD3 (clone UCHT1; BD Biosciences) were also used. The CD158k-specific mAb Q66 (KIR3DL2), kindly provided by A. Moretta (Università di Genova, Genova, Italy), was used in combination with anti-mouse immunoglobulin M-FITC (Beckman Coulter). A 7-color flow cytometric analyses was performed on FACSCanto II (BD Biosciences) using FACS-Diva 5.0.1 software.

Cell isolation and cell culture

NK cells were isolated from fresh peripheral blood using the RosetteSep method (NK cell enrichment kit; StemCell Technologies). The HLA class I-deficient target cell line K562 and 721.221 as well as the transfected 721.221 (Cw04, Cw07) were cultured in RPMI 1640 (Lonza) with

1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) and 10% FCS (Biocrom). Cell line 721.221 and the HLA class I-transfected sublines were kindly provided by Salim Khakoo (Imperial College London, London, United Kingdom).

Interferon-γ production and degranulation assay

Freshly isolated NK cells were cultured overnight in the presence of 1000 U/mL recombinant interleukin-2 (Chiron). The following day, NK cells were cocultured with HLA class I-deficient K562 or 721.221 cells or with HLA-C-transfected 721.221 at a 1:1 ratio. Negative controls were performed with NK cells alone. In the positive control, phorbol myristate acetate and ionomycin (both Sigma-Aldrich) were added to NK cell cultures. To measure degranulation, CD107a-FITC (clone H4A3; BD Biosciences) was added. After 1 hour of incubation, monensin (GolgiStop; BD Biosciences) or alternatively brefeldin A (Sigma-Aldrich) was added. The cells were incubated for another 5 hours. The cells were washed and stained with antibodies against CD56, KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR3DL1, and NKG2A. For the interferon-γ (IFN-γ) assay, cells were fixed and permeabilized with Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences) and intracellular IFN-γ production was measured using anti-IFN-γ FITC mAb (clone B27; Invitrogen). HLA class I-mediated inhibition of NK cells was assessed by comparison of transfected versus untransfected 721.221 target cells.

Differentiation of NK cells from hematopoietic progenitors

Human CD34⁺CD38[−]Lin[−] hematopoietic progenitor cells were enriched from cord blood using the CD34 Progenitor Cell Isolation kit (Miltenyi Biotec) and subsequent flow cytometric cell sorting. CD34⁺CD38[−]Lin[−] cells were plated in 24-well plates in direct contact with irradiated AFT024 stromal cells and differentiated into mature NK cells as described.²⁶ *KIR* expression was analyzed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and real-time polymerase chain reaction (PCR) as described.^{16,22,27}

Statistics

Statistical analyses were performed with SPSS 15 software. Significance was determined with ANOVA or 2-tailed *t* test. Values for *P* less than .05 were significant.

Results

Differential influence of cognate HLA-C ligands on *KIR* repertoires in donors with group *A* and *B* haplotypes

Repertoires of HLA class I-specific inhibitory receptors were determined in CD56⁺ NK cells in a cohort of 150 white donors (Table 1) by multicolor flow cytometry, simultaneously using antibodies with specificity for all 4 HLA class I-specific inhibitory *KIR* (including cross-reactive stimulatory *KIR*), namely KIR2DL1/KIR2DS1 (C2 group), KIR2DL2/KIR2DL3/KIR2DS2 (C1 group), KIR3DL1/KIR3DS1 (Bw4), and KIR3DL2 (HLA-A3/A11), as well as the HLA-E-specific NKG2A. To simplify designation of the 32 different receptor combinations (clonotypes) that can be distinguished by this approach, an abbreviated nomenclature is used omitting cross-reactive stimulatory *KIR*, such as clonotype KIR2DL1_2DL2/3 refers to a combination of the antibody specificities KIR2DL1/KIR2DS1 and KIR2DL2/KIR2DL3/KIR2DS2. In concordance with previous studies,^{11,28} major deviations from the product rule were noted (supplemental Figure 1, available on the Blood Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). Firstly, NKG2A in combination with 1 or more *KIR* was less frequently observed than expected (*P* < .05 in 9 of 15 possible combinations) and clonotypes with 2 or more *KIR* in the absence of NKG2A were more frequently observed (*P* < .05 in 7 of 11 possible combinations).

Table 1. Distribution of KIR genotypes in the cohort*

Haplotype	Genotype	KIR Group													Repertoire analysis	
		2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	3DL1	3DL2	3DL3	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5		3DS1
AA	1	■		■	■		■	■	■				■			68
AB	2	■	■	■	■		■	■	■		■		■			23
AB	3	■	■	■	■	■	■	■	■		■	■	■			4
AB	4	■		■	■	■	■	■	■	■			■	■	■	6
BB	5	■	■		■	■	■	■	■		■	■	■			2
AB	7	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■	■		■	10
AB	8	■	■	■	■	■	■	■	■		■		■			2
BB	9	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1
BB	10		■		■		■	■	■		■		■			3
AB	11	■		■	■	■	■	■	■	■		■	■		■	1
AB	12	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■	■	■	6
AB	13	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■		■	1
AB	14	■		■	■	■	■	■	■	■			■		■	7
AB	15	■	■	■	■		■	■	■				■			1
AB	16		■	■	■		■	■	■		■		■			1
BB	17	■	■		■	■	■	■	■	■	■		■	■	■	1
BB	18	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■		■	1
AB	19	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			1
AB	22	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■			3
BB	23		■		■	■	■	■	■	■	■		■	■	■	1
BB	25	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■		■	■	1
BB	28	■	■		■	■	■	■	■		■		■			1
BB	30	■	■	■	■	■		■	■	■	■	■		■	■	2
BB	35	■	■	■	■	■		■	■	■	■	■			■	1
BB	42	■		■	■	■		■	■	■	■			■	■	1
BB	44	■		■	■	■		■	■	■				■	■	1
Total																150

*Nomenclature of KIR genotypes according to Uhrberg et al²⁴ except genotype 42 and 44, which represent novel genotypes. Presence of a KIR gene is represented by a shaded box.

We next subdivided the cohort on the basis of *KIR* haplotype groups and HLA-C ligands (Table 2). In the *A/A* haplotype subgroup (Figure 1A), the repertoires of C1 and C2 donors were largely similar except for 3 clonotypes: firstly, a pronounced increase of single-positive KIR2DL1 (single-KIR2DL1⁺) NK cells was observed in presence of cognate C2/C2 ligands; secondly, single-KIR2DL3⁺ cells were more prevalent in donors with cognate C1/C1 ligands; in both cases the respective self-specific clonotype represented the most frequent KIR-expressing clonotype in that cohort; thirdly, the KIR2DL1_2DL2/3 clonotype was more abundant in C2 donors. In contrast, no such increase of single-KIR⁺ clonotypes for cognate HLA-C ligands was seen in the *B/B* haplotype subgroup (Figure 1B). A minor increase in presence of cognate C2 was seen for 3 clonotypes involving KIR2DL1 (KIR2DL1_3DL2, KIR2DL1_NKG2A, and KIR2DL1_2DL2/3_NKG2A). It should be mentioned that in group *B* donors, it was not possible to differentiate between KIR2DL2, KIR2DL3, and KIR2DS2 because of cross-reactivity of the GL183 antibody.

Separate analysis for the 3 subgroups of HLA-C ligands revealed that in donors homozygous for group *A* haplotypes (*A/A*), the overall frequency of NK cells expressing KIR2DL1 (sum

of all 16 clonotypes expressing KIR2DL1) as well as single-KIR2DL1⁺ NK cells increased in presence of cognate ligands in a gene dose-dependent way (Figure 2A). A similar, but less pronounced increase in response to cognate ligand was seen for the frequency of KIR2DL3-expressing NK cells. Remarkably, in group *A/A* donors the ratio of single-KIR2DL1⁺/single-KIR2DL3⁺ frequencies is reversed from 0.6 in C1/C1 donors to 4.3 in the presence of cognate C2/C2 ligands (Table 3). Increased NK cell frequency went along with decreased cell surface expression levels for KIR2DL1 but not KIR2DL3 (supplemental Figure 2), as previously described.¹⁰ In contrast to the group *A* haplotype cohort, no significant changes in this ratio and no bias of KIR2DL1 expression toward cognate ligands were seen for group *B* haplotypes (*A/B* and *B/B*; Table 3 and Figure 2B).

The KIR2DL2/3 allelic pair affects frequency and function of the KIR2DL1⁺ NK cell subpopulation

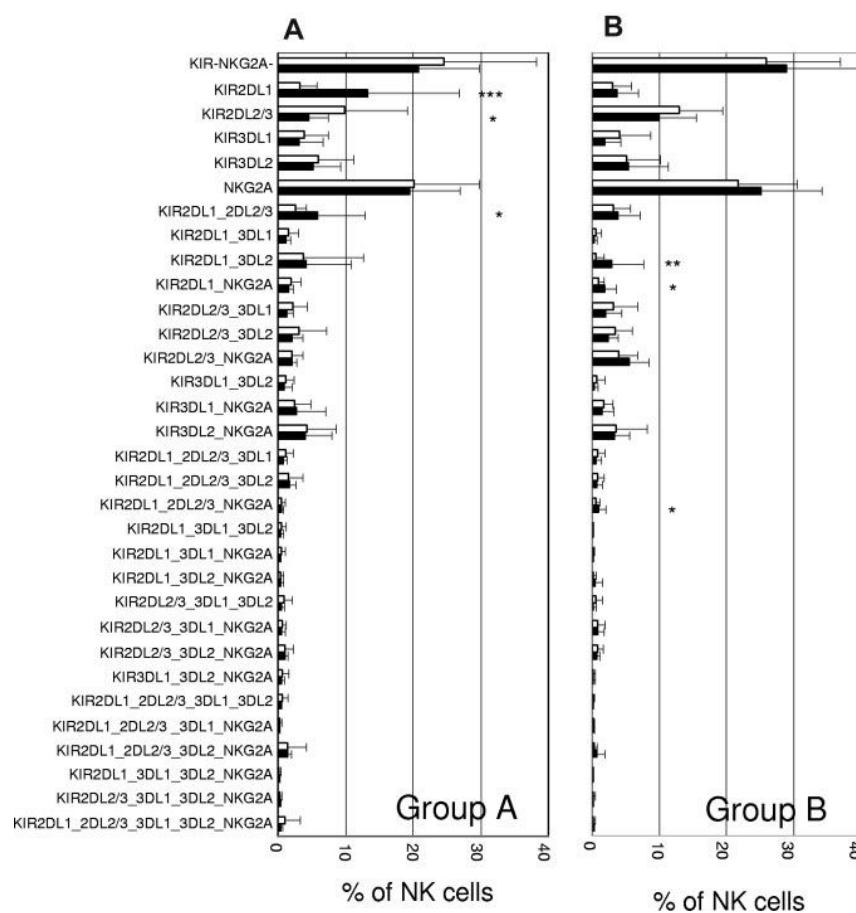
The next aim was to find out which features of the genetically heterogeneous group *B* haplotypes might explain the apparent differences in HLA-C-specific NK cell repertoires. When analysis was restricted to the most frequent group *B* genotype (genotype 2),²⁴ possessing all KIR genes of group *A* haplotypes plus *KIR2DL2* and *KIR2DS2*, the frequency of KIR2DL1⁺ NK cells again did not increase in the presence of cognate ligands (Figure 2C). This suggested that the observed difference in the frequency of KIR2DL1⁺ NK cells between group *A* and *B* haplotypes was associated with *KIR2DL2* and *KIR2DS2*. To cross-check this association, we next restricted the analysis to those group *B* genotypes lacking *KIR2DL2* and *KIR2DS2* (Figure 2D). This cohort indeed showed changes similar to the *A/A* haplotype group,

Table 2. Distribution of KIR haplotypes*

HLA-C group	Haplotype group			Total
	A/A	A/B	B/B	
C1/C1	28	30	6	65
C1/C2	30	22	7	58
C2/C2	10	13	4	27
Total	68	65	17	150

*Distribution depends on the subgroups of HLA-C ligands.

Figure 1. KIR repertoires are shaped by HLA class I-dependent mechanisms. The repertoire of donors with group A/A haplotypes (A) and group B/B haplotypes (B) is shown for C1/C1 (□) versus C2/C2 (■) donors. HLA class I ligand and haplotype group distribution of samples is shown in Table 2. Designation of clonotypes does not include cross-reactive stimulatory KIR. KIR⁺ NKG2A⁺ refers to NK cells expressing no inhibitory receptors. Statistical significance was determined by 2-tailed *t* test at **P* < .05, ***P* < .01, ****P* < .001. SD is indicated by error bar.



such as frequency of KIR2DL1 and KIR2DL3 was increased in the presence of the respective cognate ligand. In the remaining group B genotypes (*KIR2DL2*^{+/2DS2} but not genotype 2) again no significant influence of HLA-C ligands was observed (data not shown). Remarkably, the KIR2DL1/KIR2DL3 frequency ratio was strongly affected by the presence of the *KIR2DL2* gene: in group B donors lacking *KIR2DL2*, ratios were highly responsive to the presence of cognate ligands similar to what was seen in donors with group A/A haplotypes (Table 3). In contrast, in group B donors having *KIR2DL2*, the ratio remained unaffected.

These study observations already suggested that the frequency of KIR2DL1⁺ NK cells is influenced by the allelic state of the *KIR2DL2/3* gene. Indeed, the frequency of KIR2DL1⁺ NK cells decreased significantly and in a gene-dose dependent way in presence of 0, 1, or 2 *KIR2DL2* alleles (Figure 3A). Consequently, the frequency of cytotoxic KIR2DL1⁺ NK cells is influenced by the allelic state of the *KIR2DL2/3* gene, (Figure 3B): flow cytometric analysis of CD107 expression revealed a significantly reduced fraction of degranulating KIR2DL1-expressing NK cells in *KIR2DL2*⁺ donors. In contrast, the frequency of degranulating

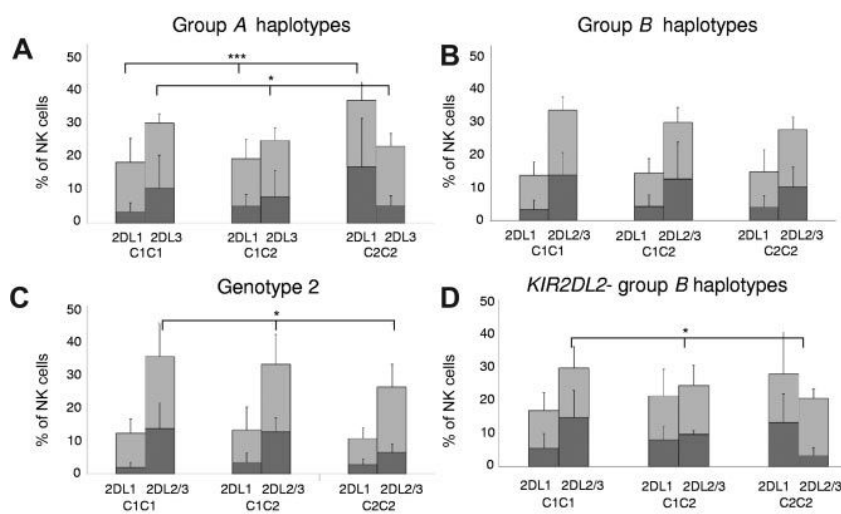


Figure 2. HLA-C ligands differentially affect frequencies but not expression levels of cognate KIR in donors with group A and group B haplotypes. (A) The cohort was divided into 4 genetic subgroups: donors with group A (A/A) haplotypes (*n* = 68), donors with group B (A/B and B/B) haplotypes (*n* = 82), donors with genotype 2 (*KIR2DL2*⁺; *n* = 23), and donors with group B haplotypes lacking *KIR2DL2* (*n* = 13). In panels A through D, the frequency of NK cells expressing KIR2DL1 or KIR2DL2/3 is separately shown for the 3 subgroups of HLA-C ligands. Results are shown as stacked bars with overall frequency of NK cells expressing a given KIR (□) and frequency of single-positive NK cells, that is NK cells expressing a given KIR without coexpression of any other detectable KIR or NKG2A (■). Results represent mean and an error bar represents SD. Statistical significance was determined by ANOVA at **P* < .05, ***P* < .01, ****P* < .001 and is shown for single-positive KIR frequencies.

Table 3. Ratio of KIR2DL1- to KIR2DL2/3-expressing NK cells

KIR Haplotype group	HLA-C ligand	Ratio KIR2DL1/KIR2DL2/3 (single/single KIR)*	P†
Group A	C1/C1	0.69 (0.55)	< .001 (< .001)
	C1/C2	0.87 (1.04)	
	C2/C2	1.51 (4.39)	
Group B	C1/C1	0.40 (0.28)	.330 (.356)
	C1/C2	0.67 (0.81)	
	C2/C2	0.58 (0.59)	
Group B KIR2DL2 ⁺	C1/C1	0.40 (0.27)	.748 (.660)
	C1/C2	0.62 (0.80)	
	C2/C2	0.42 (0.36)	
Group B KIR2DL2 ⁻	C1/C1	0.61 (0.49)	.011 (.005)
	C1/C2	0.84 (0.84)	
	C2/C2	1.42 (1.79)	

*Expression frequency of KIR2DL1 divided by expression frequency of KIR2DL2/3. Parentheses are ratio of single-KIR2DL1⁺/single-KIR2DL2/3.

†P values were calculated by ANOVA. Values for P less than .05 are significant.

KIR2DL2/3-expressing NK cells remained unchanged (Figure 3C). Thus, KIR2DL2⁺ donors possess less NK cells that are exclusively specific for C2 ligands than KIR2DL2⁻ donors.

The correlation of KIR2DL1 expression with the allelic state of KIR2DL2/3 was observed across all combinations of HLA-C ligands (Figure 4A). We further concentrated our analysis on the subgroup of C2/C2 donors, as their NK cell repertoire is functionally most strongly affected by the observed changes in KIR2DL1 frequency. Among the 8 KIR2DL1⁺ clonotypes that were most abundant (frequency > 1%) in donors lacking KIR2DL2, all but 1 clonotype exhibited strongly decreased levels in donors possessing the KIR2DL2 gene (Figure 4B). The correlation was gene dose-dependent and most strongly seen in donors with 2 copies of KIR2DL2. Interestingly, no dependency on the presence of KIR2DL2 was seen in case of the KIR2DL1_3DL2 clonotype, suggesting that KIR2DL1 expression is not affected by the presence of the HLA-A3- and HLA-A11-specific inhibitory receptor KIR3DL2.

KIR2DL1 but not KIR2DS1 expression is affected by the presence of KIR2DL2

As a result of serologic cross-reactivity of the EB6 antibody with KIR2DL1 and KIR2DS1, it was unclear in how far both receptors were affected by the presence of KIR2DL2. Generally, single-KIR2DS1⁺ NK cells should be rare in the presence of C2 ligands as these cells are potentially autoreactive. Indeed, when we analyzed the NK cell repertoire of a donor possessing KIR2DS1 but not KIR2DL1 (genotype 23),²⁴ single-KIR2DS1⁺ NK cells were rare (< 0.3% of 6% overall KIR2DS1 frequency; supplemental Figure 3), an observation that is in line with previous studies of NK cell clones.^{6,29,30} To exactly determine how the KIR2DS1⁺ subset of NK cells is influenced by KIR2DL2, the subset of KIR2DL1⁺/KIR2DS1⁺ donors (n = 29) were analyzed with 2 different KIR2DL1-specific antibodies, 1 cross-reacting (mAb EB6) and 1 not cross-reacting (mAb 143211) with KIR2DS1.³¹ Whereas the frequency of single-KIR2DL1⁺ as well as double-positive NK cells significantly decreased in the presence of KIR2DL2, the frequency of single-KIR2DS1⁺ NK cells was not influenced (Figure 4C). These data demonstrate that expression of the inhibitory KIR2DL1, but not the closely related stimulatory KIR2DS1, is affected by KIR2DL2.

KIR2DL2 can functionally replace KIR2DL1 as C2-specific inhibitory receptor

These study data demonstrate that KIR2DL1 expression is suppressed by KIR2DL2 in NK cell repertoires of most donors with

group B/B haplotypes. One key question was whether the lack of KIR2DL1-expressing NK cells leads to a general lack of NK cells that are able to recognize C2 ligands in these donors. In this regard, it was recently shown that KIR2DL2 and to a lesser extent KIR2DL3 are not solely specific for HLA-C alleles with C1 epitopes, as originally reported, but can also bind to C2 ligands.^{32,33} To this end, we compared the effector functions of NK cells from donors lacking KIR2DL2 with those having 1 or 2 copies of KIR2DL2 (Figure 5A). Single-KIR2DL3⁺ NK cells (KIR2DL2⁻ donors) were strongly inhibited by 721.221 transfectants expressing the cognate C1 group ligand Cw*0701 but not by cells expressing the C2 group ligand Cw*0401. Significant differences in effector functions were seen on the level of CD107 mobilization (Figure 5B) as well as production of interferon- γ (data not shown). In contrast, single-KIR2DL2/3⁺ NK cells from KIR2DL2⁺ donors were inhibited by C1 as well as C2 transfectants without showing significant differences in the degree of inhibition (Figure 5B). In control experiments, single-KIR2DL1⁺ cells were strongly inhibited by C2 but not C1 ligands, as expected (data not shown). These

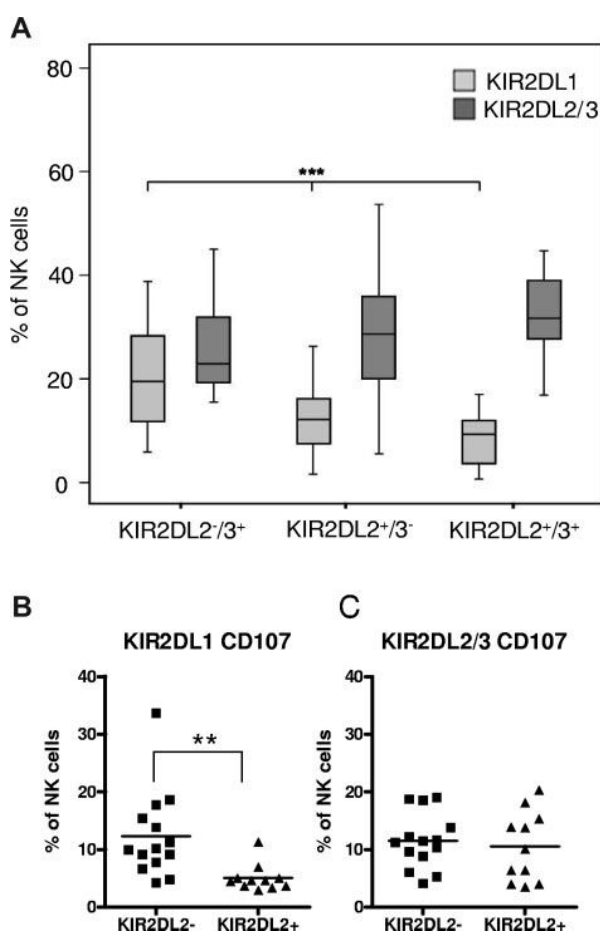
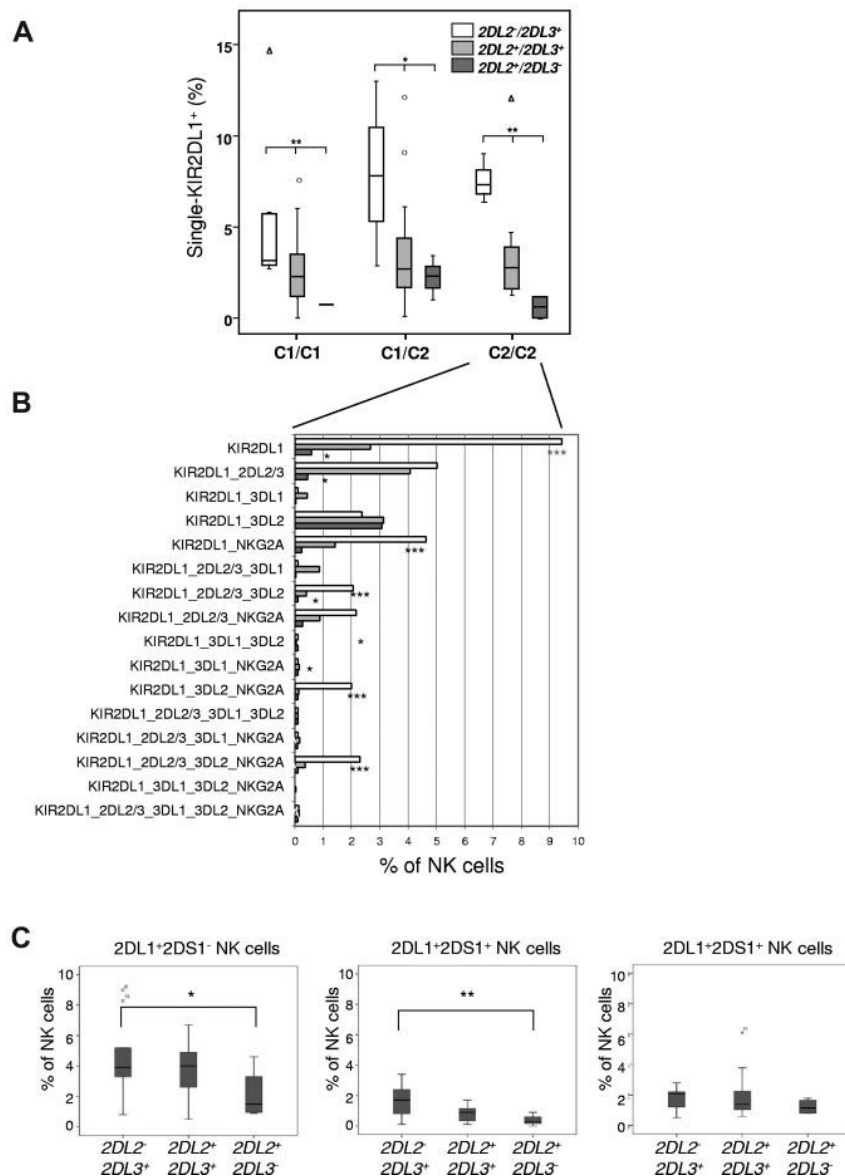


Figure 3. The KIR2DL1⁺ NK cell compartment is influenced by the allelic state of KIR2DL2/3. (A) The frequency of NK cells expressing KIR2DL1 and KIR2DL2/3 is shown for donors with group B haplotypes (A/B and B/B) who were divided into 3 groups according to the allelic state of the KIR2DL2/3 gene. Data are represented as box plots: that represent the median and 25/75 percentiles, whiskers the lowest and largest non-outlier data points (at most 1.5 times the box width). Statistical significance was determined by ANOVA at ***P < .001. (B-C) Frequency of NK cells expressing KIR2DL1 (B) or KIR2DL2/3 (C) in a CD107 mobilization assay against K562 target cells. Samples from donors without (n = 14) and with (n = 11) KIR2DL2 genes are presented in scatter plots with each dot representing 1 sample. Results are expressed as fraction of all CD56⁺ NK cells. Statistical significance was calculated by 2-tailed t test as **P < .01.

Figure 4. *KIR2DL2*-associated changes in *KIR2DL1* expression are independent of the presence of cognate HLA-C ligands and expression of *KIR2DS1*.

(A) Frequency of single-*KIR2DL1*⁺ NK cells is shown for donors with group B haplotypes (A/B and B/B) who were divided into 9 groups according to the allelic state of the *KIR2DL2/3* gene and the HLA-C ligands C1 and C2. (B) All 16 different clonotypes that express *KIR2DL1* are shown for C2/C2 donors with zero (□), 1 (▨), or 2 (■) copies of the *KIR2DL2* gene. (C) Frequency of single-*KIR2DL1*⁺, *KIR2DL1*⁺*KIR2DS1*⁺, and single-*KIR2DS1*⁺ NK cells was measured with multi-color flow cytometric analysis with the following antibody combinations: *KIR2DL1*(143211)-FITC, CD158a,h(EB6)-APC, *KIR3DL1*/*KIR2DL2/3*/NKG2A-PE, CD56-PC5 and CD3-ECD. Donors had a *KIR2DL1*⁺/*KIR2DS1*⁺ genotype (n = 29) and were divided into *KIR2DL2*[−]*KIR2DL3*⁺, *KIR2DL2*⁺*KIR2DL3*⁺, and *KIR2DL2*⁺*KIR2DL3*[−] as indicated on the x-axis. Statistical significance was determined by ANOVA as **P* < .05, ***P* < .01, ****P* < .001).



data demonstrate that the decreased frequency of *KIR2DL1*-expressing NK cells in donors having the *KIR2DL2* gene does not lead to a general lack of NK cells that are able to recognize C2 ligands. Instead, it suggests that *KIR2DL2*⁺ NK cells can take over the function as C2-specific receptor but without the ability to discriminate between C1 and C2 ligands.

Sequential acquisition of HLA-C-specific KIR during NK cell differentiation in vitro

These study data suggest that *KIR2DL3* is mainly C1-specific, whereas *KIR2DL1* as well as *KIR2DL2* both can serve as C2-specific receptors. The question remained as to why *KIR2DL1* is largely replaced by *KIR2DL2* in C2/C2 donors: if both KIR types can serve a similar function as C2-specific receptor they should be selected at comparable frequencies as self-specific receptors. Notably, we have previously shown that in the course of NK cell differentiation, *KIR2DL3* is expressed before and at a higher frequency than *KIR2DL1*.²² Here, the same in vitro NK cell

differentiation assay, with a hepatic stroma cell line as support, was used to analyze if the nonrandom sequential acquisition of KIR similarly applies to *KIR2DL2*. To this end, CD34⁺CD38[−]Lin[−] hematopoietic progenitors from cord blood were differentiated into mature NK cells. To distinguish between *KIR2DL2* and *KIR2DS2*, analyses were performed on the mRNA expression level. In a *KIR2DL2*⁺*KIR2DL3*[−] donor, *KIR2DL2* mRNA was detected on day 15 of in vitro culture together with several other KIR (Figure 6A). Remarkably, no signal for *KIR2DL1* was detectable until the last time point of analysis (day 28). In a *KIR2DL2*[−]*KIR2DL3*⁺ donor (group A/A), a similar sequential expression mode (albeit with a somewhat slower kinetics) with detection of *KIR2DL3* mRNA (day 22) before *KIR2DL1* (day 28) as well as other KIR was seen, (Figure 6B). Finally, in a *KIR2DL2*⁺*KIR2DL3*⁺ donor, a semi-quantitative evaluation of expression was done by real-time PCR. Again, *KIR2DL2* was earlier and stronger expressed than *KIR2DL1*. Notably, *KIR2DL3* was strongest expressed at later time points (Figure 6C). Thus,

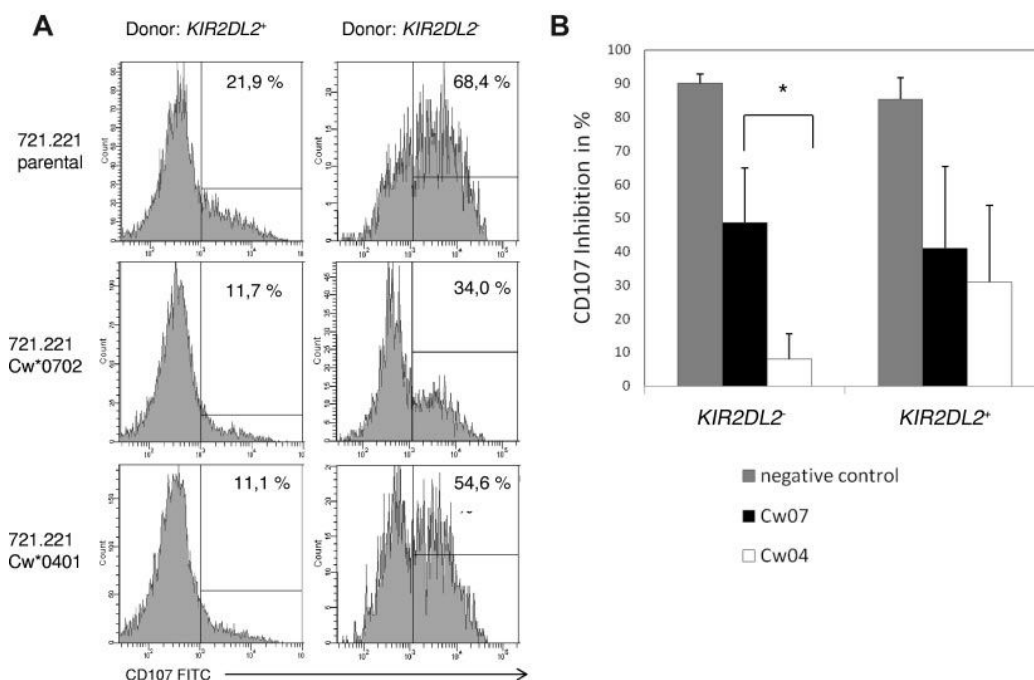


Figure 5. *KIR2DL2*-expressing NK cells are inhibited by C1 as well as C2 ligands. Flow cytometric analysis of CD107 mobilization and intracellular IFN- γ on NK cells using 721.221 and HLA-transfected sublines Cw*0702 and Cw*0401 as target cell lines. (A) Histograms show CD107 expression of *KIR2DL2*⁺ cells from a donor with *KIR2DL2* (genotype 12) and 1 donor without *KIR2DL2* (genotype 1). (B) Functional inhibition was calculated by measuring reduction of CD107 mobilization NK cells in response to Cw*0401 (C2), Cw*0702 (C1)-transfected 721.221, and no targets (negative control). Values are calculated relative to NK cells cultured with untransfected 721.221. Analysis was gated on single-*KIR2DL2*⁺ NK cells in donors with (n = 6) or without (n = 5) *KIR2DL2*. Statistical analysis was performed by 2-tailed *t* test for **P* < .05.

KIR2DL1 was consistently expressed subsequent to *KIR2DL2* (or *KIR2DL3*).

Discussion

The intrinsic and extrinsic factors that shape human NK cell repertoires are incompletely defined, in particular the contribution of stochastic versus ligand-instructed mechanisms.^{8,10,11} The 3 major determinants that influence the structure and function of KIR repertoires could be distinguished, namely cognate HLA class I ligands, *KIR* haplotype diversity, and a hardwired program of sequential receptor acquisition during NK cell development. Together, these factors seem to efficiently adjust a basically stochastic repertoire toward specific recognition of self-HLA class I.

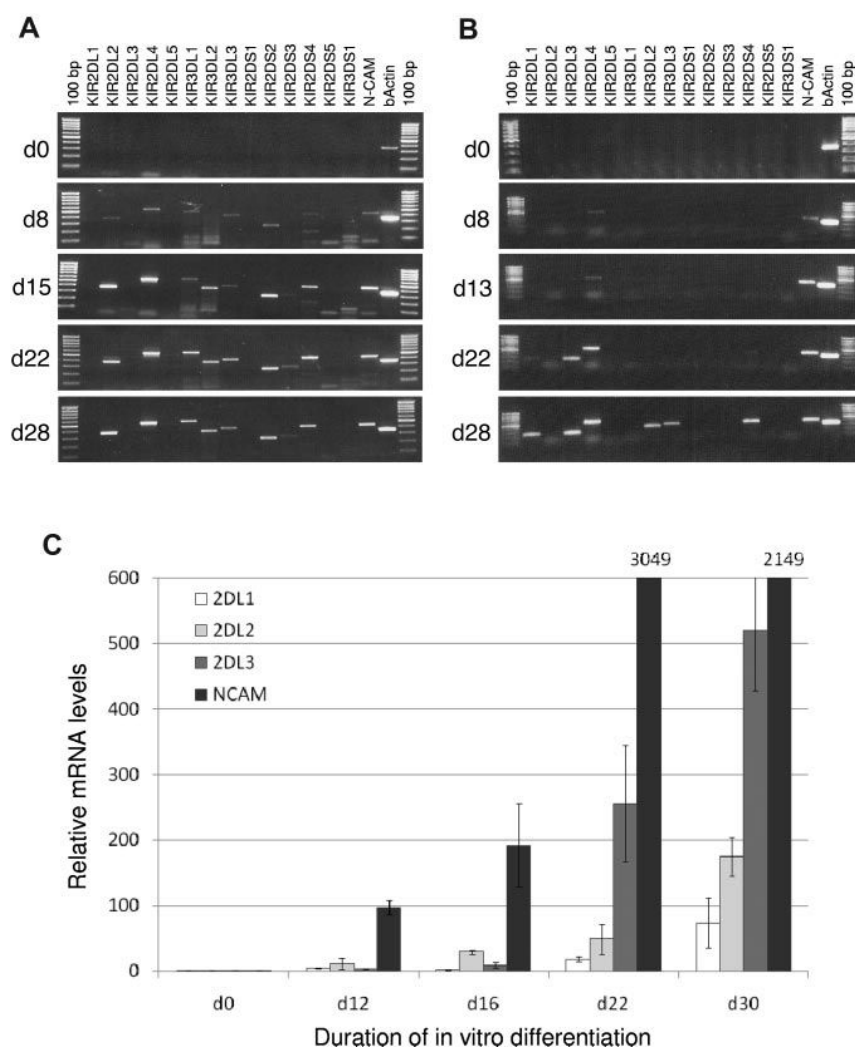
The influence of HLA class I was clearly evident in group A/A haplotype donors. Analysis of individual clonotypes revealed highly specific changes in response to HLA class I ligands: in C1/C1 as well as C2/C2 donors the specific single-KIR⁺ clonotype that recognizes cognate HLA in a mono-specific way was found at frequencies exceeding any other KIR-expressing clonotype. Moreover, the ratio of *KIR2DL1*⁺/*KIR2DL3*⁺ NK cells was significantly different between C1/C1 and C2/C2 donors. Especially the ratio of single-*KIR2DL1*⁺/single-*KIR2DL3*⁺ frequencies provided a highly reliable parameter that was consistently well below 1 in C1/C1 and well above 1 in C2/C2 donors. It thus appears that the relative proportions of C1- and C2-specific NK cells are a parameter that is tightly controlled in the process of HLA class I-dependent KIR repertoire development. It should be noted that also the frequency of *KIR3DL1*-expressing NK cells significantly increases with the presence of the respective Bw4 ligand (data not shown). Our results are thus in agreement with a previous study in

the Japanese population showing adjustment of KIR expression frequency by cognate HLA class I.¹⁰

The second major component shaping HLA-C-specific NK cell repertoires is the genetic diversity of KIR, which is characterized by extensive variation in KIR haplotypes. Comparative analysis of clonotype profiles in group A and group B donors revealed pronounced differences: the expansion of single-KIR⁺ NK cells for cognate HLA-C, a highly significant and consistent finding in group A/A donors, was not detectable in donors with group B haplotypes. Subsequent analyses demonstrate that this difference is not a general property of all group B haplotypes but segregates with the presence of *KIR2DL2*. Not only the frequency but also the function of *KIR2DL1*⁺ NK cells was influenced by the presence of *KIR2DL2*. There were less *KIR2DL1*⁺ NK cells that degranulated in the presence of HLA-deficient target in donors with *KIR2DL2* compared with donors with homozygous *KIR2DL3* (Figure 3B). Moreover, *KIR2DL2* exhibited specific inhibition of IFN- γ production not only by C1 but also by C2 ligands. In fact, inhibition of *KIR2DL2* by the C2 allele Cw*0401 was slightly lower but not significantly different to the inhibition of *KIR2DL1*. Because Cw*0401 does represent a ligand of intermediate affinity in binding assays,³² it is likely that many other C2 alleles will similarly serve as inhibitory ligands for *KIR2DL2*. Notably, HLA-C subtyping of C2/C2 donors (supplemental Table 2) did not reveal any HLA-C alleles not supporting the *KIR2DL2*-specific effect on HLA-C-specific KIR repertoires. These findings together with previous studies suggest that the specificity of *KIR2DL2* transcends the distinction of HLA-C ligands in C1 and C2.^{32,34}

The presence of *KIR2DL2* had a dominant suppressive effect on expression of *KIR2DL1*. We hypothesize that the impact of *KIR2DL2* on the formation of HLA-C-specific KIR repertoires is not only based on its broad specificity but also on the mode of

Figure 6. Sequential acquisition of KIR during NK cell differentiation. In vitro differentiation of NK cells from hematopoietic stem cells was performed as described in "Methods." RT-PCR results from a donor with KIR genotype 5 (*KIR2DL2*⁺*KIR2DL3*⁻; A) and a donor with KIR genotype 1 (*KIR2DL2*⁻*KIR2DL3*⁺; B). Neural cell adhesion molecule (NCAM, CD56) intensity was used as correlate for NK cell development, β -actin as positive control for PCR. (C) Expression levels of *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, and NCAM normalized against β -actin from a donor with KIR genotype 7 (*KIR2DL2*⁻*KIR2DL3*⁺) were measured with real-time PCR. NCAM levels greater than 600 are indicated.



receptor acquisition during NK cell differentiation. In an in vitro NK cell differentiation model it could be shown that *KIR2DL2* and *KIR2DL3* expression preceded expression of *KIR2DL1*, both on mRNA and, as shown by us and others, cell surface expression levels.^{22,26} Similar observations were made during NK cell reconstitution in clinical stem cell transplantation.^{35,36} The molecular basis for the observed sequential KIR acquisition mode is unclear. Although KIR regulatory regions are highly homologous, distinct differences exist between promoters of *KIR2DL1* and *KIR2DL2/3* in terms of transcription factor binding sites.³⁷ It is thus possible, that small differences in promoter strength or the recently described antisense activity of KIR promoters³⁸ might be involved in the control of sequential KIR acquisition.

We suggest that the presence of *KIR2DL2* on developing NK cells does not favor subsequent expression of *KIR2DL1* on the same clones. Because single-*KIR2DL2*⁺ NK cells are already self-specific in C1/C1 as well as C2/C2 donors, further acquisition of *KIR2DL1* is not required for induction of tolerance in any circumstance. In contrast, single-*KIR2DL3*⁺ NK cells are largely specific for C1 ligands and would thus not be selected for in C2/C2 donors. Thus, in these donors *KIR2DL1* is required for induction of tolerance to C2 ligands. These considerations readily explain why in C2/C2 donors that possess the *KIR2DL2* allele, single-*KIR2DL1*⁺ NK cells are exceedingly rare, whereas C2/C2 donors

possessing 2 *KIR2DL3* alleles exhibit a substantial expansion of single-*KIR2DL1*⁺ NK cells. In this context, we could exclude a major role for *KIR2DS1*, as the presence of *KIR2DL2* did not affect expression level or frequency of *KIR2DS1*. Notably, it was recently shown that *KIR2DS1* expression is not influenced by HLA-C either.^{39,40} In contrast, we could not differentiate between expression of *KIR2DL2* and *KIR2DS2* by flow cytometry. Because *KIR2DL2* and *KIR2DS2* are in strong linkage disequilibrium and we did not have any donors lacking 1 but not the other gene in our cohort, we cannot exclude the *KIR2DS2* gene as a confounding factor. Nonetheless, as *KIR2DS2* has no detectable affinity for HLA-C ligands, *KIR2DL2* is likely to be the main factor leading to the shift in HLA-C2-specific NK cell frequencies. Another ambiguity that remains to be resolved as a result of the lack of discriminating antibodies is the effect of *KIR2DL2* on *KIR2DL3*. In fact it is likely that *KIR2DL3* frequencies are lower in *KIR2DL2/3* heterozygotes than in *KIR2DL3* homozygotes as a result of a gene dose effect.

The study strongly suggests that the order in which NK cell receptors are acquired during NK cell development is a crucial factor that shapes HLA class I-specific NK cell repertoires, a notion that pertains to KIR as well as NKG2A. During NK cell development, NKG2A expression is initiated at an earlier stage than KIR expression (K.S., unpublished observations, November

2009).²⁶ Those NK cells that express NKG2A as their only inhibitory receptor, are already self-specific and thus do not require further acquisition of cognate inhibitory KIR. Indeed, the NKG2A⁺KIR⁻ clonotype is significantly more frequent than expected by the product rule, an effect that is independent of KIR haplotype groups. Vice versa, combinations of NKG2A with cognate KIR are less frequently found than statistically expected, an effect previously described for NK cell clones.⁶

The observed bias toward single-KIR⁺ NK cells for cognate ligands, the repression of KIR2DL1 expression in the presence of *KIR2DL2* in C2/C2 donors, as well as the preponderance of single-NKG2A⁺ NK cells all point toward a system that favors NK cells with restricted specificity for 1 major HLA class I ligand (HLA class I or HLA-E, respectively). In line with this observation, human NK cell repertoires are dominated by clonotypes with few HLA class I-specific inhibitory receptors: among the 32 different clonotypes, NK cells expressing combinations of 0 to 2 receptors (representing 16 different clonotypes) comprised more than 90% of the repertoire (Figure 1 and supplemental Figure 1). These observations are compatible with a ligand-instructed model: upon interaction of an inhibitory receptor with a self-ligand, up-regulation of additional receptors ceases or at least becomes less likely. Only in the absence of a cognate ligand, more inhibitory receptors are up-regulated until self-specificity is ensured. Of note, the functional significance of the KIR⁻NKG2A⁻ population, which is the largest clonotype in all analyzed cohorts, is still unclear. It could be speculated that it provides a reservoir of still immature NK cells that is shaped in the periphery toward expression of cognate HLA class I. This notion is compatible with the observation that the overall frequency of KIR⁻NKG2A⁻ cells is inversely correlated to the frequency of KIR⁺NKG2A⁻ NK cells.²⁸ In this context, it has to be noted that we have not assessed expression of LILRB1, an inhibitory receptor with ubiquitous specificity for HLA class I.⁴¹ Given the comparably low affinity for HLA class I and the fact that LILRB1 in contrast to KIR and NKG2A does not confer enhanced self responses,²⁸ the impact of LILRB1 expression on KIR repertoire acquisition is likely to be limited.

The present results appear to contradict a recent study claiming that KIR repertoires are generated through a sequential but random acquisition mode without any selection.¹¹ The model is based on the observation that combinations of 2 or more KIR are more abundant than expected by the product rule and independent of selection by cognate HLA class I. Indeed, we also observe that NK cells expressing 3 to 5 KIR receptors in the absence of NKG2A are more frequent than expected by the product rule. Although these clonotypes are rare and add up to a cumulative frequency of 2% to 3% of NK cells, the effect is highly significant (supplemental Figure 4). However, this observation does not exclude an influence of HLA class I on the formation of KIR repertoires. The failure of Andersson et al¹¹ to detect HLA class I-mediated adaptation could rather be because the authors did not break down the analysis to single clonotypes and did not consider the major class I ligands separately. In fact, if our data are calculated similarly, that is cumulative consideration of KIR ligands and KIR receptors, the influence of HLA class I ligands is no longer detectable: donors with 1 major HLA class I ligand do not express significantly more inhibitory receptors than donors with 2 or more HLA class I ligands (supplemental Figure 4).

It is important to note that the rules governing formation of KIR repertoires in group A/A donors are different for C1/C1 and C2/C2 subgroups. Because of the early acquisition of KIR2DL2/3,

the repertoire of a C1/C1 donor is inherently biased toward expression of self-specific KIR. In contrast, the repertoire of a C2/C2 donor is dependent on selection of KIR2DL1⁺ NK cells, which are per se less frequent in an unbiased KIR repertoire because of their late appearance. This asymmetry, caused by the nonrandom sequential acquisition mode, has various consequences for the formation of KIR repertoires that are clearly visible in the present study, such as single-KIR2DL1⁺ NK cells show much stronger adaptation toward cognate class I than single-KIR2DL3⁺ NK cells. Moreover, the KIR2DL1_2DL3 clonotype is significantly more frequent in C2 than in C1 donors (Figure 1A). Together, these observations clearly indicate that it is generally crucial to perform the analysis of individual KIR clonotypes in the context of individual HLA class I ligands to provide the necessary resolution to detect the influence of HLA class I on the KIR repertoire.

In the clinical setting of allogeneic HSCT, the observed differences in expression of HLA-C-specific KIR between group A and group B donors might have important consequences for the composition of alloreactive NK cell repertoires. As shown in this study, a gradual depletion of KIR2DL1⁺ NK cells is seen in donors having 1 and an even greater depletion in donors with 2 copies of *KIR2DL2*. Notably, only NK cells expressing the C2-specific KIR2DL1⁺ have the potential to recognize a C2/C1 mismatch in graft-versus-host direction, whereas KIR2DL2⁺ NK cells would not discriminate between the 2 ligands. Thus, even if 2 donors share the same HLA class I type they still might provide qualitatively and quantitatively divergent alloreactive NK cell repertoires just on the basis of the KIR2DL2/3 polymorphism. It is likely that specificity and activation threshold of NK cells is further modified by coexpression of stimulatory KIR. Interestingly, Pende et al³³ have recently shown that after haploidentical HSCT, donor-derived KIR2DL2/3⁺ NK cells poorly recognize C2 leukemic blasts unless KIR2DS1 was coexpressed. This as well as observations showing that donors with group B haplotypes are associated with less bacterial infections and improved outcome in HSCT suggest that inhibitory KIR repertoires indeed are modified by coexpression of stimulatory KIR.^{42,43}

In summary, the present study shows how HLA-C-specific NK cell repertoires are structurally and functionally affected by both *HLA class I* and *KIR* genotype. We suggest that the assessment of KIR and HLA class I type in conjunction with high-dimensional flow cytometry provides a promising approach to predict NK cell function in the clinical setting such as haploidentical HSCT or novel adoptive immunotherapy protocols.^{21,44}

Acknowledgments

We thank all donors that volunteered for blood donation. We also thank Dr A. Moretta for the CD158k-specific antibody (Q66, KIR3DL2) and Dr S. Khakoo for the HLA-deficient 721.221 and the HLA class I-transfected sublines.

This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft grants UH 91/2-1 and UH91/5-1 (M.U.).

Authorship

Contribution: K.S. designed the project, performed the experiments, and wrote the manuscript; M.S. performed the NK cell differentiation assays; J.E. performed the HLA-C typing; J.C.F.

designed the project and performed statistical analysis; and M.U. designed the project and wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Markus Uhrberg, PhD, University Clinic of Düsseldorf, Institute for Transplantation Diagnostics, and Cell Therapeutics, Bldg 14.80, Moorenstrasse 5, D-40225 Düsseldorf, Germany; e-mail: uhrberg@itz.uni-duesseldorf.de.

References

- Raulet DH, Held W, Correa I, Dorfman JR, Wu MF, Corral L. Specificity, tolerance and developmental regulation of natural killer cells defined by expression of class I-specific Ly49 receptors. *Immunol Rev*. 1997;155:41-52.
- Moretta L, Moretta A. Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(5):626-633.
- Ljunggren H, Karre K. In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. 1990;12(2):237-244.
- Held W, Dorfman JR, Wu MF, Raulet DH. Major histocompatibility complex class I-dependent skewing of the natural killer cell Ly49 receptor repertoire. *Eur J Immunol*. 1996;26(10):2286-2292.
- Johansson S, Johansson M, Rosmaraki E, et al. Natural killer cell education in mice with single or multiple major histocompatibility complex class I molecules. *J Exp Med*. 2005;201(7):1145-1155.
- Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity*. 1997;7(6):739-751.
- Anfossi N, Andre P, Guia S, et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*. 2006;25(2):331-342.
- Gumperz JE, Valiante NM, Parham P, Lanier LL, Tyán D. 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*. 1996;183(4):1817-1827.
- Frohn C, Schlenke P, Kirchner H. The repertoire of HLA-Cw-specific NK cell receptors CD158 a/b (EB6 and GL183) in individuals with different HLA phenotypes. *Immunology*. 1997;92(4):567-570.
- Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med*. 2006;203(3):633-645.
- Andersson S, Fauriat C, Malmberg JA, Ljunggren HG, Malmberg KJ. KIR acquisition probabilities are independent of self-HLA class I ligands and increase with cellular KIR expression. *Blood*. 2009;114(1):95-104.
- Fernandez NC, Treiner E, Vance RE, Jamieson AM, Lemieux S, Raulet DH. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood*. 2005;105(11):4416-4423.
- Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*. 2005;436(7051):709-713.
- Orr MT, Murphy WJ, Lanier LL. 'Unlicensed' natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection. *Nat Immunol*. 2010;11(4):321-327.
- Carrington M, Martin MP. The impact of variation at the KIR gene cluster on human disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;298:225-257.
- Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*. 1997;7(6):753-763.
- Vilches C, Parham P. KIR: Diverse, Rapidly evolving receptors of innate and adoptive immunity. *Annu Rev Immunol*. 2001;20:217-251.
- Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science*. 2004;305(5685):872-874.
- Martin MP, Gao X, Lee JH, et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet*. 2002;31(4):429-434.
- Carrington M, Wang S, Martin MP, et al. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J Exp Med*. 2005;201(7):1069-1075.
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002;295(5562):2097-2100.
- Fischer JC, Ottinger H, Ferencik S, et al. Relevance of C1 and C2 epitopes for hematopoietic stem cell transplantation: role for sequential acquisition of HLA-C-specific inhibitory killer Ig-like receptor. *J Immunol*. 2007;178(6):3918-3923.
- Hiby SE, Walker JJ, O'Shaughnessy KM, et al. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med*. 2004;200(8):957-965.
- Uhrberg M, Parham P, Wernet P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics*. 2002;54(4):221-229.
- Vilches C, Castano J, Gomez-Lozano N, Estefania E. Facilitation of KIR genotyping by a PCR-SSP method that amplifies short DNA fragments. *Tissue Antigens*. 2007;70(5):415-422.
- Miller JS, McCullar V. Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2. *Blood*. 2001;98(3):705-713.
- Trundley AE, Hiby SE, Chang C, et al. Molecular characterization of KIR3DL3. *Immunogenetics*. 2006;57(12):904-916.
- Yawata M, Yawata N, Draghi M, Partheniou F, Little AM, Parham P. MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response. *Blood*. 2008;112(6):2369-2380.
- Foley B, De Santis D, Lathbury L, Christiansen F, Witt C. KIR2DS1-mediated activation overrides NKG2A-mediated inhibition in HLA-C C2-negative individuals. *Int Immunol*. 2008;20(4):555-563.
- Chewning JH, Gudme CN, Hsu KC, Selvakumar A, Dupont B. KIR2DS1-positive NK cells mediate alloresponse against the C2 HLA-KIR ligand group in vitro. *J Immunol*. 2007;179(2):854-868.
- Morvan M, David G, Sebille V, et al. Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions. *Eur J Immunol*. 2008;38(12):3474-3486.
- Moesta AK, Norman PJ, Yawata M, Yawata N, Gleimer M, Parham P. Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J Immunol*. 2008;180(6):3969-3979.
- Pende D, Marcenaro S, Falco M, et al. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood*. 2009;113(13):3119-3129.
- Winter CC, Long EO. A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. *J Immunol*. 1997;158(9):4026-4028.
- Shilling HG, McQueen KL, Cheng NW, Shizuru JA, Negrin RS, Parham P. Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2003;101(9):3730-3740.
- Stern M, de Angelis C, Urbani E, et al. Natural killer-cell KIR repertoire reconstitution after haploidentical SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45(11):1607-1610.
- van Bergen J, Stewart CA, van den Elsen PJ, Trowsdale J. Structural and functional differences between the promoters of independently expressed killer cell Ig-like receptors. *Eur J Immunol*. 2005;35(7):2191-2199.
- Li H, Pascal V, Martin MP, Carrington M, Anderson SK. Genetic control of variegated KIR gene expression: polymorphisms of the bidirectional KIR3DL1 promoter are associated with distinct frequencies of gene expression. *PLoS Genet*. 2008;4(11):e1000254.
- Fauriat C, Ivarsson MA, Ljunggren HG, Malmberg KJ, Michaelsson J. Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors. *Blood*. 2010;115(6):1166-1174.
- Cognet C, Farnier C, Gauthier L, et al. Expression of the HLA-C2-specific activating killer-cell Ig-like receptor KIR2DS1 on NK and T cells. *Clin Immunol*. 2010;135(1):26-32.
- Chapman TL, Heikeman AP, Bjorkman PJ. The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity*. 1999;11(5):603-613.
- Tomblyn M, Jo-Anne HY, Haagenson MD, et al. Decreased infections in recipients of unrelated donor hematopoietic cell transplantation from donors with an activating KIR genotype. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16:1155-1161.
- Cooley S, Trachtenberg E, Bergemann TL, et al. Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2009;113(3):726-732.
- Miller JS, Soignier Y, Panoskaltis-Mortari A, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*. 2005;105(8):3051-3057.

Table S1. Distribution of HLA-C subtypes in donors with C2/C2 ligands

	<i>KIR</i> genotype	<i>KIR</i> haplotype	<i>KIR2DL2</i>	HLA-C epitope	HLA-C allele	HLA-C allele	Ratio: Single- KIR2DL1 ⁺ / Single- KIR2DL2/3 ⁺
1	1	AA	-	C2/C2	0202	0501	2.456
2	1	AA	-	C2/C2	0401	1701	0.970
3	1	AA	-	C2/C2	0501	0602	3.438
4	1	AA	-	C2/C2	0202	1701	1.122
5	1	AA	-	C2/C2	0202	0401	1.222
6	1	AA	-	C2/C2	1502	1502	10.124
7	1	AA	-	C2/C2	0202	0202	9.214
8	1	AA	-	C2/C2	0401	1502	0.771
9	1	AA	-	C2/C2	0602	07xx *	1.321
10	4	AB	-	C2/C2	0202	0401	1.875
11	4	AB	-	C2/C2	0202	0602	1.698
12	4	AB	-	C2/C2	0202	0501	1.316
13	2	AB	+	C2/C2	0401	0602	0.371
14	2	AB	+	C2/C2	0401	0602	0.676
15	3	AB	+	C2/C2	0202	0602	0.241
16	3	AB	+	C2/C2	0602	1502	0.099
17	7	AB	+	C2/C2	0602	0602	0.412
18	7	AB	+	C2/C2	0202	0401	0.545
19	12	AB	+	C2/C2	0202	0501	0.303
20	12	AB	+	C2/C2	0501	0602	0.116
21	17	BB	+	C2/C2	0202	0501	0.000
22	18	BB	+	C2/C2	0501	0501	0.076
23	44	BB	+	C2/C2	0602	1502	0.788

*Luminex method was not able to discriminate between different Cw07 alleles, but HLA-C PCR-SSP confirmed this allele as C2.

Figure S1. KIR repertoire is shaped by different mechanisms. Observed (white bars) vs. expected (black bars) frequencies of NK cells expressing 32 different combinations (clonotypes) of NKG2A and KIR inhibitory receptors are shown in a cohort of 150 mostly Caucasian donors. Expected frequencies were calculated by the product rule as defined the following way: The expected frequency of each clonotype was calculated by the “product rule” according to Yawata et al.¹⁰ For example, the expected frequency of single-KIR2DL1⁺-NK cells is given by the following equation: $a \cdot (1-b) \cdot (1-c) \cdot (1-d) \cdot (1-e)$ with $a = \%KIR2DL1$, $b = \%KIR2DL2/3$, $c = \%KIR3DL1$, $d = \%KIR3DL2$, and $e = \%NKG2A$. Statistical analyses were performed with SPSS 15 software. Significance was determined with Anova or two-tailed t-test. P-values below 0.05 were significant (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Figure S2. HLA-C ligands did not affect expression levels of cognate KIR in donors with group A and B haplotypes. In each of the four plots the mean fluorescence intensity (MFI) of KIR2DL1 and KIR2DL2/3 is shown separately for the three subgroups of HLA-C ligands in donors with *A/A* haplotypes (upper panel, $n=63$) and in donors with *A/B* and *B/B* haplotypes (lower panel, $n=68$). Data are presented as scatter plots with each dot representing one sample. Statistical significance was determined by Anova (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) and is shown for MFI of all NK cells expressing the respective receptor in (B).

Figure S2. Analysis of the NK cell repertoire of a donor possessing *KIR2DS1* but not *KIR2DL1*. The NK cell repertoire of a donor with *KIR* genotype 23 (see Table 1) and C1/C2 ligands was determined by multicolor flow cytometry analysis as described in Materials and Methods. The bars represent NK cell frequencies for each of the possible 32 different receptor combinations resulting from variegated expression of *KIR2DS1*, *KIR2DL2* (including *KIR2DS2*), *KIR3DL1*, *KIR3DL2* and NKG2A on CD56⁺ NK cells.

Figure S4. The cumulative number of cognate KIR receptors does not reveal any association with the number of KIR ligands. Frequencies of NKG2A⁺ NK cells expressing 0 to 4 KIRs in donors with 1 ($n=9$), 2 ($n=19$), 3 ($n=44$), or 4 ($n=8$) ligands are shown in box plots representing the median and 25/75 percentiles, whiskers the lowest and largest non-outlier data points (at most 1.5 times the box width).

Figure S1

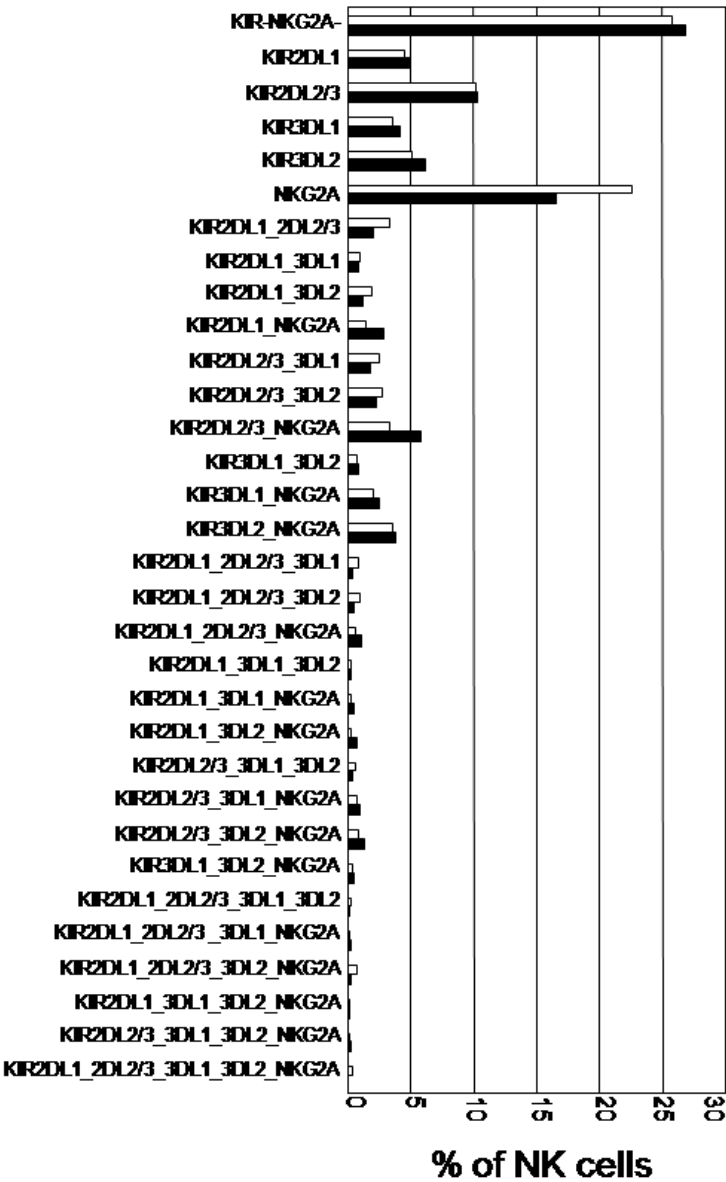


Figure S2

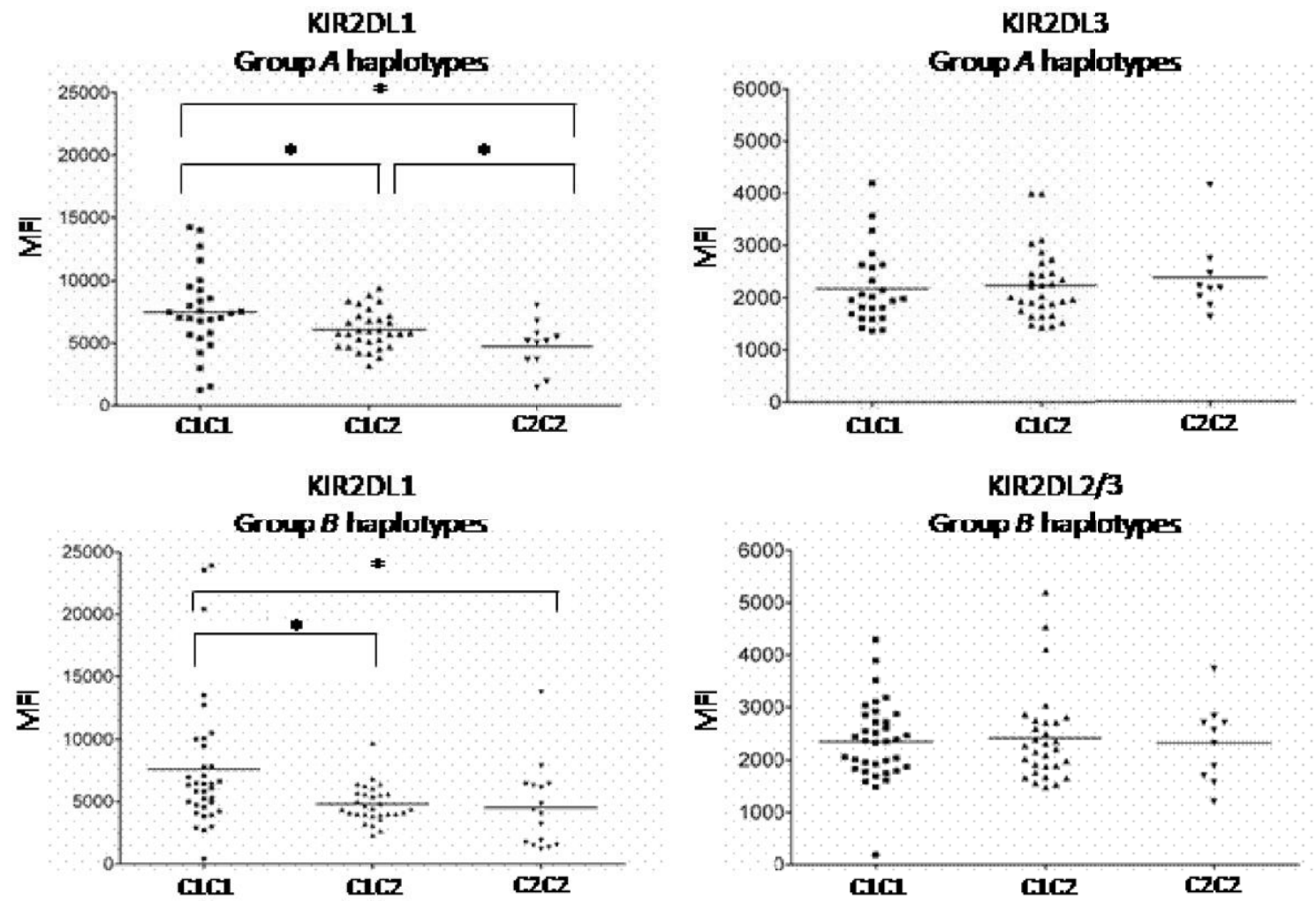


Figure S3

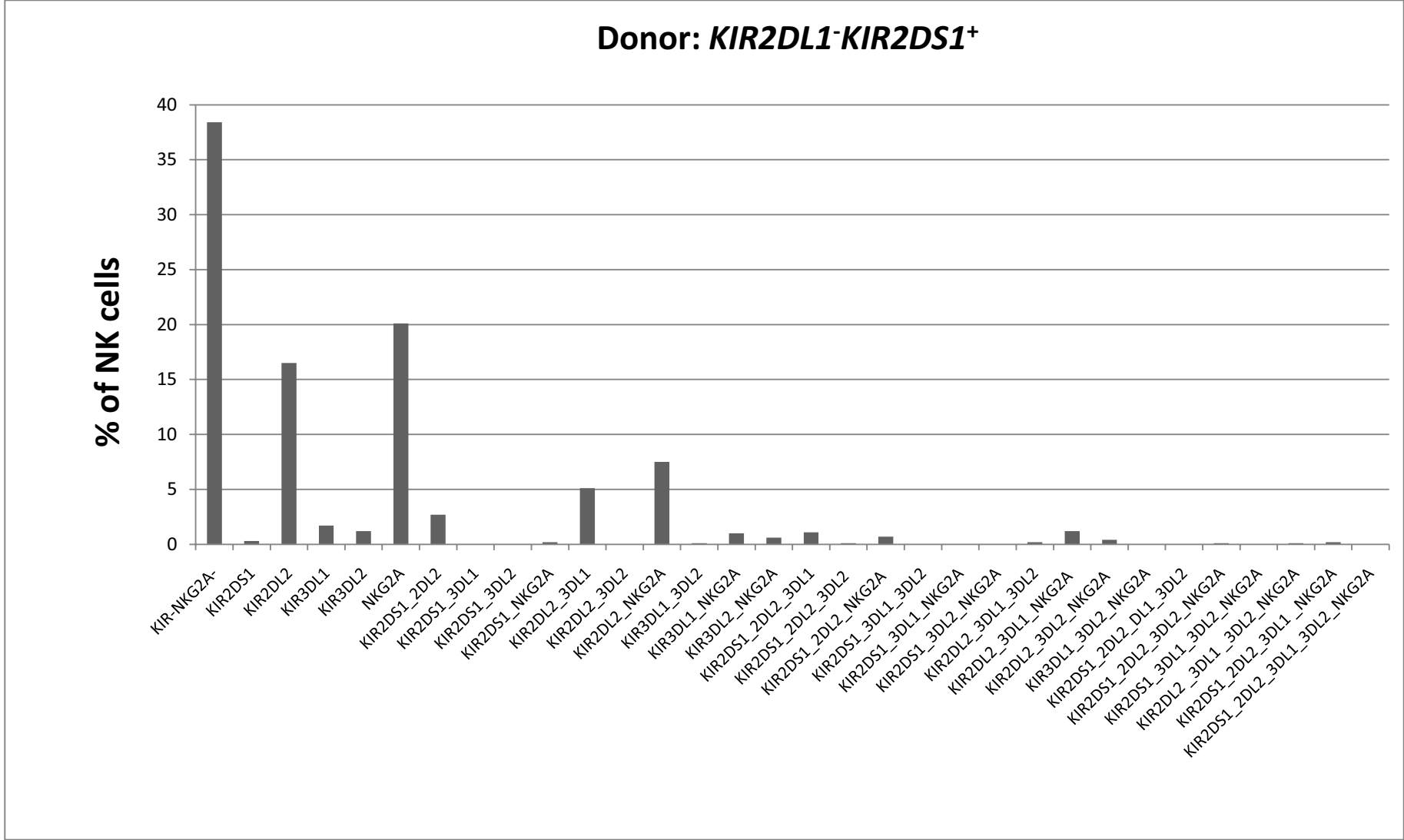
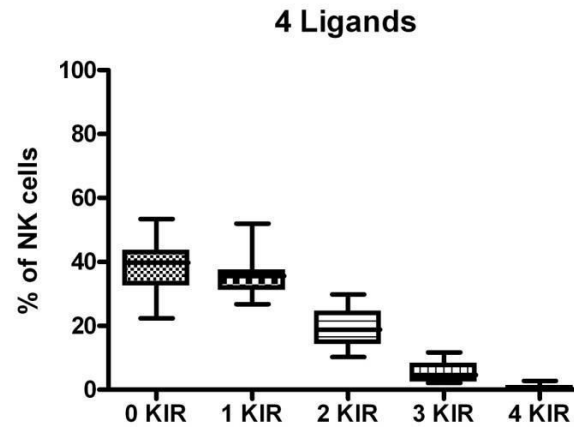
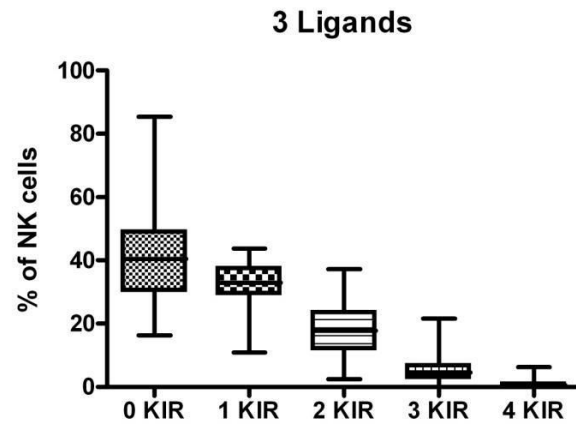
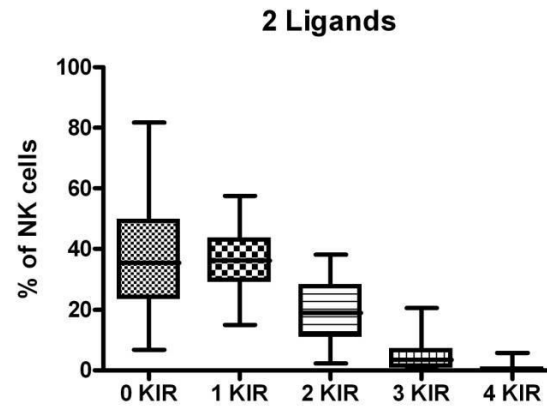
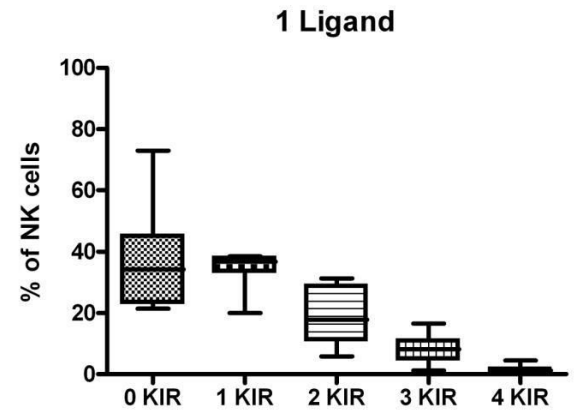


Figure S4



2.4 Neonatal NK cell repertoires are functionally but not structurally biased towards recognition of self HLA class I

Status: akzeptiert (März 2011)

Blood, Impact Factor: 10,555

Eigener Anteil an der Publikation:

- Planung und Durchführung der Experimente
- Schreiben des Manuskriptes (mit Markus Uhrberg)

2.4.1 Zusammenfassung

Nachdem wir im adulten Blut feststellen konnten, dass es eine Adaption des Repertoires an das eigene HLA-Klasse I gibt und diese durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird, stellte sich die Frage, wann in der Entwicklung diese Adaption stattfindet. Aus diesem Grund untersuchten wir mehr als 100 CBs mit der bereits erwähnten Methode der Durchflusszytometrie. Da die strukturelle Adaption ein raffinierter Prozess ist, der der gemeinsamen Betrachtung aller relevanten inhibitorischen Rezeptoren auf klonaler Ebene bedarf, wurde zunächst das Repertoire der 32 möglichen Populationen bestimmt und mit PB verglichen.

Dabei konnten zunächst folgende Erkenntnisse gewonnen werden. In Einklang mit der Literatur konnte gezeigt werden, dass NKG2A exprimierende Zellen sind häufiger in CB als in PB sind. Dies gilt sowohl für die Zellen, die nur NKG2A (*single*-NKG2A⁺) als auch für Zellen, die NKG2A mit einem oder mehr KIR koexprimieren. Alle diese Populationen sind signifikant häufiger vorhanden in CB. Das Umgekehrte gilt für KIR exprimierende Zellen. Die Zellen, die nur KIR auf ihrer Oberfläche tragen, werden im adulten Organismus in wesentlich höherer Frequenz exprimiert als in CB.

Wie schon im PB wurde auch die Kohorte der Nabelschnurblutproben für Gruppe A und B Haplotypen typisiert, sowie die Subgruppen für *HLA-C* unterschieden, um den Einfluss der HLA-Liganden auf die Rezeptorexpression zu begutachten. Diese Unterteilung ist wichtig, denn zuvor konnte von uns gezeigt werden, dass der KIR-Haplotyp eine wesentliche Rolle bei der Formation des Repertoires im PB einnimmt. Überraschenderweise gab es keinen Einfluss der Liganden auf die Frequenz, weder in Gruppe A noch Gruppe B Haplotypen konnte eine Anpassung der Frequenz des passenden KIR an seinen Liganden gezeigt werden. KIR2DL1 ist nicht in Spendern mit HLA-C2 erhöht und KIR2DL3 ist nicht in Spendern mit HLA-C1 erhöht. Auch HLA-Bw4 als Ligand für KIR3DL1 wurde getestet, doch auch hier war ebenfalls kein Einfluss auf die Frequenz zu sehen.

Die nächste Frage, die beantwortet werden sollte, war folgende: Hat das Fehlen einer strukturellen Adaptionen auch ein Fehlen einer funktionalen Erziehung zur Folge? Dazu wurde die Degranulation von HLA-C1 und HLA-C2 spezifischen NK-Zellen in HLA-C1 und HLA-

C2 Spendern verglichen. Hier gab es keinen Unterschied zwischen PB und CB. Der Effekt des „*Licensing*“ oder „*Education*“ war sowohl in neonatalen als auch in adulten NK-Zellen zu sehen und miteinander vergleichbar. In HLA-C1 homozygoten Spendern funktionieren KIR2DL3-positiv NK-Zellen besser als KIR2DL1-positiv NK-Zellen, d.h. die Frequenz an degranulierenden Zellen mit KIR2DL3 ist höher die Frequenz von degranulierenden KIR2DL1-positiven Zellen. In HLA-C2 ist es umgekehrt, die Frequenz an degranulierenden KIR2DL1-positiven Zellen ist höher als die Frequenz der KIR2DL3-positiven degranulierenden Zellen. Besonders deutlich wurde in der Auftragung, dass diese Tendenz in jedem einzelnen Spender zu erkennen war. Auch hier ermittelten wir eine Ratio zwischen den KIR2DL1- und den KIR2DL2/3-Zellen, die degranulieren und, erneut war hier die stärkste Unterscheidung sichtbar. Wie erwartet gab es In HLA-C1/C2 Spendern keinen Unterschied in der Frequenz von KIR2DL2 zu KIR2DL3 Zellen, die CD107 exprimieren. Weiterhin konnten wir zeigen, dass diese funktionale Erziehung nicht nur mit CD107 sondern auch mit IFN- γ nachzuweisen war.

Die Tatsache, dass CB NK-Zellen strukturell nicht an HLA adaptiert sind, spricht dafür, dass diese Adaption kein integraler Part der NK-Zellentwicklung ist. Im Gegensatz dazu ist die funktionale Adaption des Repertoires von Anfang an vorhanden. Es ist wahrscheinlich, dass diese beiden Anpassungen voneinander unabhängige Prozesse sind. Die Reduktion von NKG2A ist Teil dieser strukturellen Adaption. Somit gelangt der Spender von einem allgemein inhibitorischen Repertoire mit breiter Spezifität zu einem spezifischen Repertoire, das von KIR dominiert wird. Ziel dieser Prozesse ist es letztendlich ein für Selbst-HLA-Klasse I-spezifisches und funktionales Repertoire auszubilden.

**Neonatal NK cell repertoires are functionally but not structurally biased
towards recognition of self HLA class I**

Short title: Neonatal KIR repertoires

Scientific category: Immunobiology

Kathrin Schönberg, Johannes C. Fischer, Gesine Kögler, and Markus Uhrberg¹

¹Institute for Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics, Heinrich-Heine
University Düsseldorf, Germany

Abstract word count: 152

Total text word count: 1482

Figure/Table count: 2

Reference count: 19

Corresponding Author: Markus Uhrberg, PhD
University Clinic of Düsseldorf
Institute for Transplantation Diagnostics
and Cell Therapeutics,
Building 14.80
Moorenstrasse 5
D-40225 Düsseldorf
Phone: +49-211-81-19529
Fax: +49-211-81-19429
e-mail: uhrberg@itz.uni-duesseldorf.de

Abstract

Human NK cell repertoires are biased towards more frequent expression of inhibitory KIR receptors for self-HLA class I. Moreover, only those NK cells that express cognate receptors for self are fully functional in terms of cytotoxicity and cytokine production. It is so far unknown if functional education and structural adaptation to HLA class I are implemented during NK cell development and if both processes are mechanistically connected. Here, we show that NK cell repertoires in cord blood are not yet shaped towards increased clonal frequencies of KIR for self-HLA class I as determined for the three major KIR ligands C1, C2, and Bw4. Nonetheless, neonatal NK cells expressing cognate KIR exhibited enhanced effector function on the level of degranulation and cytokine production. The study suggests that functional education of cognate KIR by self-HLA class I precede structural adaptation of KIR repertoires and that both processes are not directly linked to each other.

Introduction

Human natural killer (NK) cells express inhibitory receptors with specificity for MHC class I, encoded by the *killer cell Ig-like receptor (KIR)* family.¹ A characteristic feature of KIR, similar to the functionally-related Ly-49 family in rodents, is the clonally-distributed expression mode, which creates a functionally diverse repertoire of NK cells that differ in the kind and number of receptors expressed on each given NK cell.^{2, 3} The factors that govern formation of these NK cell repertoires are incompletely understood but involve a strong stochastic component.^{4, 5} In addition, the extensive polymorphisms of *MHC class I* and *KIR* genes represent additional parameters that influence repertoire and function of NK cells.⁶ In humans, analogous to mice, structural adaptation of NK cell repertoires to the highly polymorphic *HLA class I* genes involves increase in frequency of NK cells expressing cognate inhibitory receptors.⁷⁻⁹ Moreover, the presence of MHC class I-encoded ligands also influences NK cell function: NK cells expressing an inhibitory receptor for self-MHC class I exhibit increased effector functions compared to NK cells lacking a cognate inhibitory receptor.¹⁰⁻¹² Together, functional education and structural adaptation increase the frequency of self-specific, functionally competent NK cells, which constitutes an efficient strategy to deal with the polymorphic nature of *KIR* and *HLA class I* genes.

It is so far unknown, how and when functional and structural adaptation of NK cells to autologous MHC class I molecules occurs and if this process is an integral part of NK cell development or if it rather acts on the stage of mature NK cells. In the latter case, differences in cognate receptor expression would be expected between naïve and experienced NK cell repertoires. In this regard, umbilical cord blood (CB) constitutes a source of neonatal NK cells that typically were not yet exposed to a broad range of pathogens including viral infections and thus provides a correlate of naïve NK cells. In this study, a thorough analysis of KIR and NKG2A repertoires was performed in NK cells from CB to better understand how naïve NK cells are educated by self-HLA class I.

Materials and Methods

Cell isolation, *KIR* and *HLA class I* genotyping

CB samples were kindly provided by the José Carreras Stem Cell Bank, Düsseldorf. Data of PB samples were extracted from Schönberg et al.⁹ HLA-C frequencies were similar between the CB and PB cohorts. The *KIR* haplotype distribution was slightly different with haplotype group A/A = 45.3%, A/B = 44.0%, and BB = 10.7% in PB vs. haplotype group A/A = 34.5%, A/B = 52.2%, and B/B = 13.3% in CB. NK cells were isolated using the RosetteSep method (Stemcell Technologies). *KIR* and *HLA class I* genotyping were performed by PCR-SSP as reported previously.^{9, 13}

Flow Cytometry

The following mouse anti-human mAbs were used as previously described: CD56-PC5, CD159a-PE (NKG2A), CD158a-APC (KIR2DL1/S1), CD158e-ECD (KIR3DL1), CD158b-APC-Cy7 (KIR2DL2/3/S2) (Beckman Coulter), and CD3-Pacific Blue (BD Biosciences). The CD158k-specific mAb Q66 (KIR3DL2, kindly provided by A. Moretta) was used in combination with anti-mouse-IgM-FITC (Beckman Coulter).

The CD107 degranulation assay was done as previously described using CD107a-FITC (BD Biosciences).⁹ NK cells were co-cultured with K562 cells at 1:1 ratio for 6 hours. For measurement of intracellular IFN- γ , cells were fixed and permeabilized with Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences) and intracellular IFN- γ production was measured using anti-IFN- γ FITC mAb (Invitrogen).

Results and Discussion

We have previously shown that adaptation to self-HLA class I is a subtle process that requires conjoint consideration of all relevant inhibitory receptors on the clonal level.⁹ A similar approach was taken here for the analyses of neonatal NK cell repertoires: KIR2DL1, KIR2DL2/3, and KIR3DL1, specific for the three major HLA class I-encoded ligands C2, C1, and Bw4, respectively, were measured together with the A3/A11-specific KIR3DL2 and the HLA-E-specific NKG2A by multicolor flow cytometry on CD56⁺CD3⁻ NK cells.

In the absence of published data on clonal NK cell repertoires in CB, we first analyzed the distribution of the 32 clonal populations (i.e. clonotypes) of inhibitory receptors in comparison to NK cells from adult peripheral blood (PB). Similar to PB,

all 32 receptor combinations were expressed in the NK cell repertoires from CB (Figure 1A).¹⁴ Also in concordance with previous studies, NKG2A-expressing NK cells were much more abundant in CB than in PB (overall frequency: 67,9% vs. 37,4%).^{15, 16} Clonal analysis revealed that single-NKG2A⁺ as well as clonotypes co-expressing NKG2A together with one or more KIR were significantly more abundant in CB (Figure 1A). On the other hand, a significant decrease was seen in clonotypes expressing single KIR or multiple KIR without NKG2A. Finally, NKG2A⁻KIR⁻ NK cells, which were previously shown to be hyporesponsive in peripheral blood, were significantly less abundant in CB.¹⁰

To explore the influence of HLA class I-encoded ligands on shaping of inhibitory KIR repertoires, the cohort was stratified according to the presence of C1 and C2 epitopes. Since previous analyses of NK cells from PB have shown that the dependence on HLA class I ligands was most easily detected in donors that were homozygous for the *KIR* haplotype group A, which encodes for a defined set of six *KIR* genes, the CB cohort was accordingly broken down.^{9,17} Surprisingly, no bias towards recognition of self-HLA class I could be detected in donors with group A/A or group B/B haplotypes (Figure 1B-C): in C2/C2 donors, clonotypes with cognate KIR2DL1 were not found at higher frequencies than in C1/C1 donors and similarly, KIR2DL3 frequencies were not increased in C1/C1 donors. Moreover, neither the frequency of single-KIR nor the cumulative frequency of all NK cells expressing a given cognate KIR was biased towards self-ligands (Figure 1D). Whereas in PB we had previously observed a 4-fold difference in single-KIR2DL1⁺ NK cells between C1/C1 and C2/C2 donors, not even a tendency towards a similar bias was detected in CB.⁹ Analysis of statistical power revealed a high probability that the lack of bias was not due to insufficient sampling ($\beta = 0,92$ calculated with GPower 3.1). Similar results were obtained for KIR3DL1, which did not show a frequency bias towards the Bw4 epitope (Figure 1D). Finally, there was also no correlation found for KIR3DL2 and the presence of A3 and A11 epitopes (data not shown).

We next asked if the lack of structural adaptation of KIR repertoires in CB was accompanied by a lack of functional education. To this end, we compared the degranulation responses of C1- and C2-specific NK cells against the class I-negative target cell line K562. The overall effector responses were generally lower in CB (Figure 2A,C) than in PB (Figure 2B,D), which is in agreement with previous

literature.¹⁸ However, the educational impact of cognate ligands was comparable and highly significant in both sources. In C1/C1 donors, single-KIR2DL2/3⁺ NK cells exhibited higher effector responses than single-KIR2DL1⁺ NK cells (Figure 2A-B). Vice versa, single-KIR2DL1⁺ NK cells from C2/C2 donors exhibited higher effector responses than single-KIR2DL2/3⁺ NK cells from the same donors (Figure 2C-D). Direct comparison of donors according to presence or absence of HLA-C ligands shows a dose-dependent and highly significant increase of CD107-producing single-KIR2DL1⁺ NK cells in presence of cognate ligands (Figure 2E). As expected, no difference in CD107 mobilization was seen between the two clonotypes in C1/C2 donors (Figure 2E). Finally, an educational impact was also seen on IFN- γ production. As shown in Figure 2F, the ratio of single-KIR2DL1⁺ to single-KIR2DL2/3⁺ IFN- γ -producing cells did significantly increase in presence of cognate C2 ligands in a dose-dependent manner, again in concordance with previous observations in PB¹⁰.

This is the first study to address the influence of HLA class I on KIR expression in CB. The present data suggest that HLA class I has no effect on initial KIR repertoire formation. The fact that NK cell repertoires from CB are not biased towards expression of cognate inhibitory KIR suggests that adaptation of KIR expression towards self-HLA class I ligands is not an integral part of NK cell development. In contrast, functional education, also referred to as licensing, is already in place in neonatal NK cells.¹² Thus, the structural adaptation of adult KIR repertoires towards self-ligands is mechanistically uncoupled from the 'tuning' of cognate receptors towards increased effector function. Importantly, in the light of the present data in neonatal blood, the original model of a ligand-instructed KIR repertoire development has to be modified.⁹ In fact, our data suggest that the 'instruction' process is somehow ineffective at the neonatal stage and is initiated only postnatally and in an antigen-experienced environment. An important question arising from this work is what triggers the change from an unbiased neonatal to a biased adult KIR repertoire. A plausible explanation would be, that the frequency of NK cells expressing cognate KIR for self-HLA class I is affected by the individual immunological experience that donors accumulate throughout life. In this regard, it was recently shown that viral infection can lead to specific and long-lasting expansion of NK cell clones that express single cognate KIR.¹⁹ We thus consider the possibility that specific expansion of functionally educated NK cells in response to certain pathogens successively shapes naïve NK cell repertoires towards recognition of self-HLA class

I. The accompanied substantial decrease in NKG2A frequency from birth to adulthood would be part of this structural transition from a more generic NK cell repertoire that is able to accommodate a broad range of KIR and HLA class I polymorphisms *ab initio* to a more specific, KIR-dominated repertoire. The present work suggests that NK cell repertoires go through major structural changes from birth to adulthood and raises the question how this process influences clinical susceptibility to infection and disease. In this regard, it remains to be determined how unbiased neonatal NK cell repertoires change during childhood and which role the individual infection history plays in this process.

Acknowledgments

We thank all donors that volunteered for blood donation. We also thank Dr A. Moretta for the CD158k-specific antibody (Q66, KIR3DL2). This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft grant UH91/5-1 (M.U.).

Authorship

Contribution: K.S. designed the project, performed the experiments, and wrote the manuscript; J.C.F. designed the project and performed statistical analysis; G.K. organized the cord blood sampling workflow; and M.U. designed the project and wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

References

1. Moretta A, Locatelli F, Moretta L. Human NK cells: from HLA class I-specific killer Ig-like receptors to the therapy of acute leukemias. *Immunol Rev.* Aug 2008;224:58-69.
2. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity.* Dec 1997;7(6):739-751.
3. Raulet DH, Vance RE, McMahon CW. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:291-330.
4. Uhrberg M. Shaping the human NK cell repertoire: an epigenetic glance at KIR gene regulation. *Mol Immunol.* Feb 2005;42(4):471-475.
5. Andersson S, Fauriat C, Malmberg JA, Ljunggren HG, Malmberg KJ. KIR acquisition probabilities are independent of self-HLA class I ligands and increase with cellular KIR expression. *Blood.* Jul 2 2009;114(1):95-104.
6. Vilches C, Parham P. KIR: Diverse, Rapidly Evolving Receptors of Innate and Adaptive Immunity. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:217-251.
7. Johansson S, Salmon-Divon M, Johansson MH, et al. Probing natural killer cell education by Ly49 receptor expression analysis and computational modelling in single MHC class I mice. *PLoS One.* 2009;4(6):e6046.
8. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med.* Mar 20 2006;203(3):633-645.
9. Schonberg K, Srihar M, Enczmann J, Fischer JC, Uhrberg M. Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood.* Jan 6;117(1):98-107.
10. Anfossi N, Andre P, Guia S, et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity.* Aug 2006;25(2):331-342.
11. Kim S, Sunwoo JB, Yang L, et al. HLA alleles determine differences in human natural killer cell responsiveness and potency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 26 2008;105(8):3053-3058.

12. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*. Aug 4 2005;436(7051):709-713.
13. Uhrberg M, Parham P, Wernet P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics*. Jul 2002;54(4):221-229.
14. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Partheniou F, Little AM, Parham P. MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK cell repertoires towards a balance of missing-self response. *Blood*. Jun 26 2008.
15. Sundstrom Y, Nilsson C, Lilja G, Karre K, Troye-Blomberg M, Berg L. The expression of human natural killer cell receptors in early life. *Scand J Immunol*. Aug-Sep 2007;66(2-3):335-344.
16. Le Garff-Tavernier M, Beziat V, Decocq J, et al. Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell*. Aug;9(4):527-535.
17. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*. Dec 1997;7(6):753-763.
18. Verneris MR, Miller JS. The phenotypic and functional characteristics of umbilical cord blood and peripheral blood natural killer cells. *Br J Haematol*. Oct 2009;147(2):185-191.
19. Bjorkstrom NK, Lindgren T, Stoltz M, et al. Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. *J Exp Med*. Dec 20.

Figure Legends

Figure 1. The KIR repertoires of neonatal NK cells are diverse but not biased towards recognition of cognate HLA class I

(A) The frequencies of all 32 KIR and NKG2A receptor combinations (clonotypes) that can be distinguished by the present flow cytometry approach are shown for CB (black bars, n=90) and PB (white bars, n=150) as mean with error bars representing SD. Clonotypes are ordered according to the number of expressed receptors starting with no receptor (KIR⁻NKG2A⁻), one receptor (either a single KIR or NKG2A), two receptors (i.e. KIR2DL1_3DL1 refers to a clone expressing KIR2DL1 and KIR3DL1 and no other KIR or NKG2A), and so forth. Designation of clonotypes does not include cross-reactivity with stimulatory KIR. (B) Inhibitory receptor repertoires of CB donors with group *A/A* KIR haplotypes. The order of clonotypes was similar to (A) but without consideration of KIR3DL2. Donors were divided into subgroups possessing C1/C1 (white bars, n=19) and C2/C2 (black bars, n=11) ligands. (C) Inhibitory receptor repertoires of CB donors with group *A/B* and *B/B* KIR haplotypes. Donors were divided into subgroups possessing C1/C1 (white bars, n=31) and C2/C2 (black bars, n=22) ligands. (D) Frequency of CB and PB-derived NK cells expressing KIR2DL1, KIR2DL3, or KIR3DL1 in donors with group *A/A* KIR haplotypes. For each given KIR, donors were stratified according to the indicated HLA class I ligands. Results are shown as stapled bars with overall frequency of NK cells expressing a given KIR (light grey) and the corresponding fraction of single-KIR⁺ NK cells (dark grey). Sample distribution was: C1/C1 (n=19/38 for CB/PB), C1/C2 (n=20/30), and C2/C2 (n=11/10) as well as Bw4/Bw4 (n=5 for CB), Bw4/Bw6 (n=16), and Bw6/Bw6 (n=9). Results are shown as mean with error bars representing SD. Data for PB were calculated from the cohort analyzed in Schönberg et al.⁹ Statistical significance was determined by two-tailed t-test (*p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001).

Figure 2. Neonatal NK cells are functionally educated by autologous HLA class I ligands

CD107 mobilization against K562 was measured in single-KIR2DL1⁺ and single-KIR2DL2/3⁺ NK cells from CB of C1/C1 (A) and C2/C2 (C) donors and similarly in PB of C1/C1 (B) and C2/C2 (D) donors. In each case, data are depicted as individual frequencies with statistical significance calculated for the ratio of KIR2DL1 to KIR2DL2/3 (left side) and as box plots (right side). Boxes represent the median and 25/75 percentiles, whiskers the lowest and highest data points without outliers.

Statistical significance was determined by two-tailed t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). The sample distribution was C1/C1 ($n=10$) and C2/C2 ($n=15$) for CB and C1/C1 ($n=14$) and C2/C2 ($n=6$) for PB. (E) Changes in frequency of CD107-mobilizing single-KIR2DL1⁺ (light grey) and single-KIR2DL2/3⁺ (dark grey) NK cells of CB donors. Donors were the same as in (A, C) but including C1/C2 ($n=25$) donors. Throughout the figure, functional analysis was done without further subdivision into KIR haplotype groups. Values represent the mean, error bars represent the SD. (F) Production of IFN- γ in NK cells from CB after 6h co-culture with K562. Donors were divided into C1/C1 ($n=8$), C1/C2 ($n=25$) and C2/C2 ($n=11$) subgroups. Box plots represent the ratio between IFN- γ -producing single-KIR2DL1⁺ and single-KIR2DL2/3⁺ NK cells. P values were calculated by ANOVA (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Figure 1

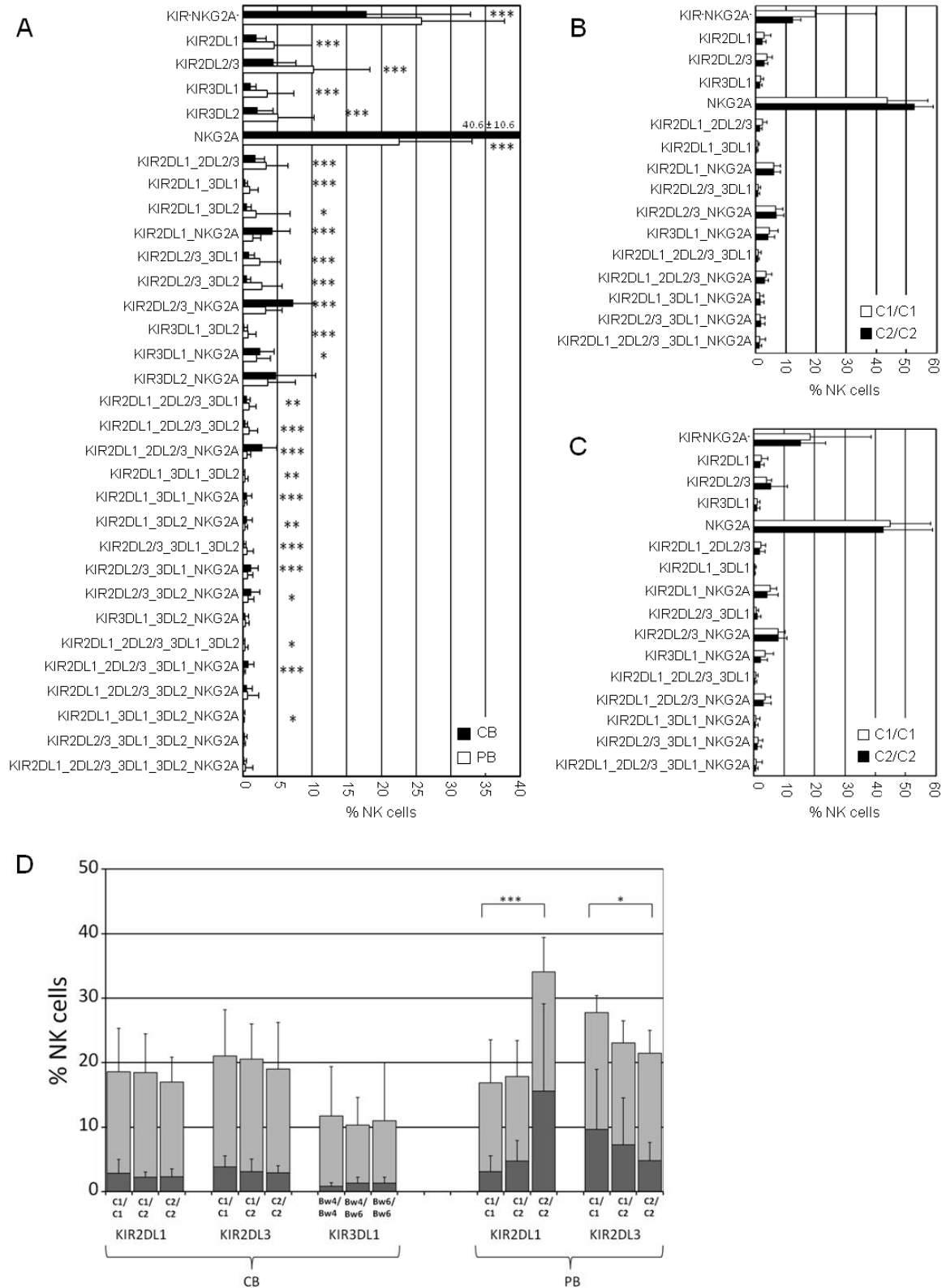
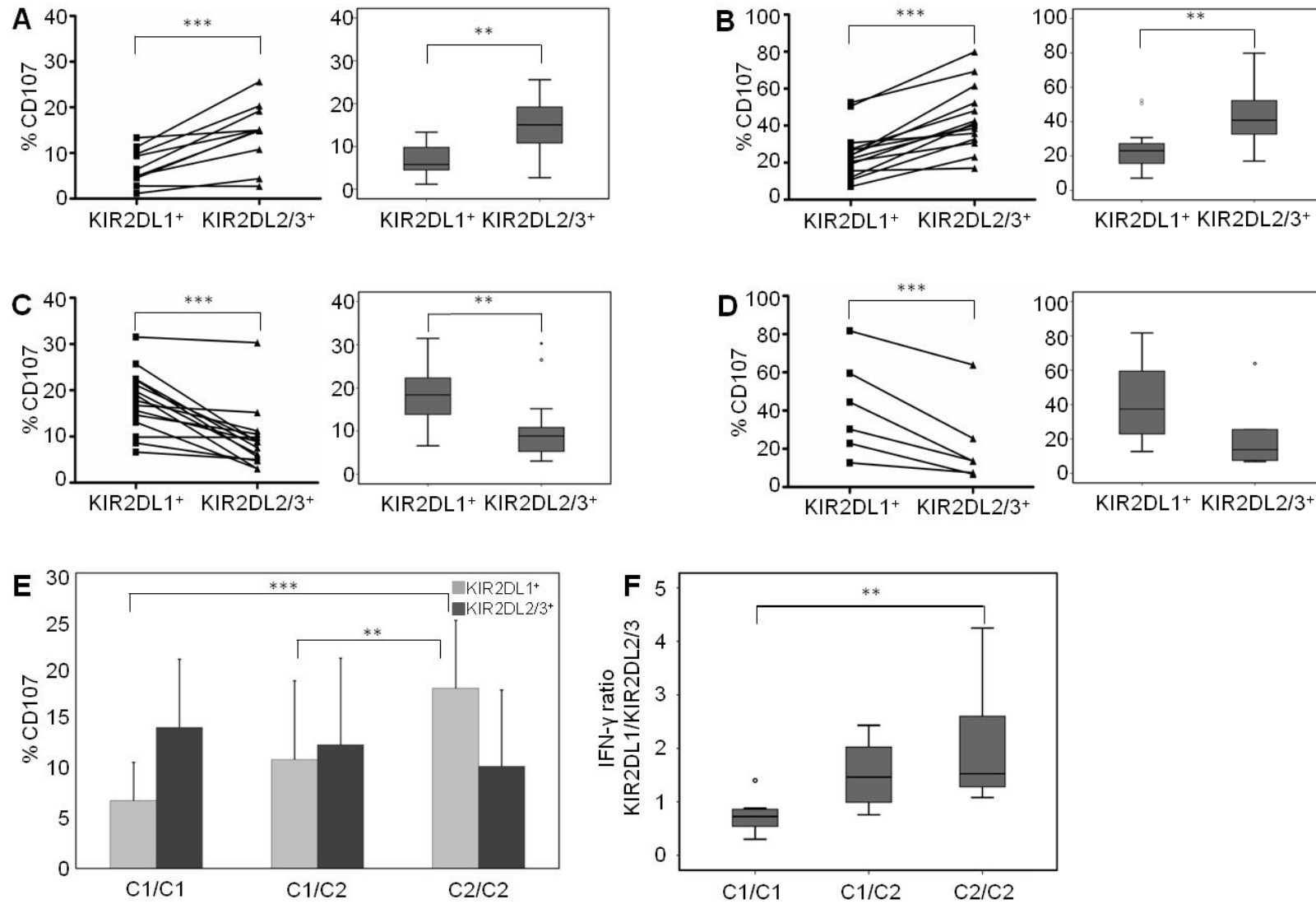


Figure 2



2.5 Expansion of NKG2A⁺LIR1⁺ NK cells in HLA-Matched, KIR/HLA-Ligand Mismatched Patients following Hematopoietic Cell Transplantation

Status: publiziert

Biology of Blood and Marrow Transplantation, Impact Factor: 3,149

Eigener Anteil an der Publikation:

- Durchführung und Auswertung der KIR-Typisierungen

2.5.1 Zusammenfassung

Bei Stammzelltransplantationen („*hematopoietic cell transplantation*“, HCT) als kurative Behandlung von Leukämien oder Lymphomen wird die Prognose stark durch die NK-Zellen des Spenders beeinflusst. Der Empfänger profitiert hierbei von alloreaktiven NK-Zellen, die einen KIR exprimieren, für den der Empfänger keinen Liganden besitzt (Vgl. Kapitel 1.6.2).

Aufgrund ihrer wichtigen Rolle im Ergebnis nach HCT wurde im Rahmen dieser Publikation das NK-Zellrepertoire mit Hilfe von Mehrfarben-Durchflusszytometrie bei 22 Patienten mit „*KIR/Liganden Mismatch*“ und 14 Patienten mit „*KIR/Liganden Match*“ vor und nach der Transplantation analysiert. Dabei wurden die NK-Zellen mit breiter Spezifität (NKG2A⁺ und LIR1⁺) identifiziert und von der Analyse ausgeschlossen. Die Entwicklung der NKG2A⁻LIR1⁻-NK-Zellen wurde in den Spender/Empfänger-Paaren analysiert. Dabei konnte eine Expansion dieser Zellen in folgenden Gruppen ermittelt werden:

- In Patienten in Remission im Vergleich zu Patienten mit Rezidiv
- In gesunden Spendern im Vergleich zu Patienten vor HCT
- In „*KIR/Liganden Mismatch*“ Patienten im Vergleich zu Patienten mit „*KIR/Liganden Match*“

Damit wurde deutlich gezeigt, dass NKG2A⁻LIR1⁻-NK-Zellen einen positiven Einfluss auf die Prognose des Patienten nach HCT haben. Die Frequenz dieser Zellen steigt nach HCT stark an. NKG2A⁻LIR1⁻-NK-Zellen senken das Risiko eines Rezidivs. Umgekehrt gilt auch, dass sinkende Frequenzen dieser Zellen Rezidiven vorausgehen. Bei der Analyse der Patienten über einen längeren Zeitraum nach HCT konnte ermittelt werden, dass es wichtig ist, dass auch lange nach der HCT die Zahl dieser Zellen erhöht bleibt, um in Remission zu bleiben.

Die meisten dieser NKG2A⁻LIR1⁻-Zellen sind reife NK-Zellen, die positiv für KIR sind. Diese NK-Zellen tragen einen spezifischen KIR gegen den Liganden, bei dem ein „*Mismatch*“ vorliegt. So vermitteln sie den GvL-Effekt und töten leukämische Zellen ab, und die Patienten bleiben in Remission.

Bei einer weiteren Beobachtung spielt der *KIR*-Genotyp eine entscheidende Rolle: In Patienten, die heterozygot für Gruppe A/B *KIR-Haplotypen* sind, expandieren die NKG2A⁻

LIR1⁻-Zellen stärker als in Patienten, in denen das Transplantat homozygot für Gruppe A KIR-Haplotypen ist. Durch die größere Diversität im Repertoire der Spender mit Gruppe B Haplotypen entstehen mehr KIR-positive Zellen. Des Weiteren verstärken aktivierende Rezeptoren den GvL-Effekt.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Patienten mit einem „*KIR/Liganden Mismatch*“ stärker vom GvL-Effekt profitieren als Patienten ohne „*Mismatch*“. Damit steigt die Bedeutung der KIR-Typisierung bei Stammzelltransplantation stark an.

Expansion of NKG2A⁺LIRI⁺ Natural Killer Cells in HLA-Matched, Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors/HLA-Ligand Mismatched Patients following Hematopoietic Cell Transplantation

Silvia Rathmann,^{1,2} Sabine Glatzel,^{1,2} Kathrin Schönberg,³ Markus Uhrberg,³ Marie Follo,¹ Christian Schulz-Huotari,⁴ Markus Kaymer,⁵ Hendrik Veelken,¹ Jürgen Finke,¹ Paul Fisch²

The prognosis after hematopoietic cell transplantation (HCT) for the treatment of leukemia or lymphoma in humans is influenced by donor-derived natural killer (NK) cells, which enhance the graft-versus-leukemia (GVL) effect. Such alloreactive killer cells can be generated in vivo after HCT if the donor expresses killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs), such as KIR2DL1, KIR2DL2/3, or KIR3DL1, for which the recipient lacks HLA class I ligands. We studied effector cells from 22 KIR/HLA-ligand mismatched and 14 KIR/HLA-ligand matched, primarily HLA-matched patient-donor pairs after allogeneic HCT. A novel 8-color flow cytometry panel allowed us to characterize effector-cell populations without "broadly reactive" inhibitory receptors such as CD94/NKG2A or LIRI. The numbers of such NKG2A⁺LIRI⁺ NK cells increased following HCT in patients transplanted by KIR/HLA-ligand mismatched grafts, compared to KIR/HLA-ligand matched grafts, and in patients transplanted from donors of the A/B, compared to A/A, KIR haplotypes. NKG2A⁺LIRI⁺ NK cells expressing only those inhibitory KIRs for which the patient had no HLA class I ligands could be stimulated by HLA class I-deficient cells to express CD107a. Thus, NKG2A⁺LIRI⁺ NK cells may be important GVL effector cells following HCT, even in patients transplanted from HLA-matched donors.

Biol Blood Marrow Transplant 16: 469-481 (2010) © 2010 American Society for Blood and Marrow Transplantation

KEY WORDS: Allogeneic hematopoietic cell transplantation, NK cells, HLA-matched, KIR/HLA-ligand mismatch

INTRODUCTION

Allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT) is often the only possibility to cure acute myelogenous leukemias, myelodysplastic syndromes, and aggressive leukemias/lymphomas. A key to survival in this situation is the graft-versus-leukemia (GVL) effect, mediated by effectors from the donor that destroy residual leukemia cells in the patient. These include do-

nor-derived natural killer (NK) cells, which have been shown to play an important role in the outcome of allogeneic HCT [1,2]. The function of NK cells is regulated by the balance of signals from clonally distributed inhibitory and activating cell surface receptors [3]. The same receptors can be expressed on resting or activated $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T cells [4]. The most important ones are the inhibitory NK receptors, which induce tolerance against self. These include the lectin-like receptor CD94/NKG2A, which is specific for the nonclassical class I molecule HLA-E, and is stabilized by leader peptides from most classical HLA-A, -B, and -C allotypes [5]. The Ig-like receptors, encoded in the leukocyte receptor complex of chromosome 19, can be divided into the killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) and the leukocyte Ig-like receptors [6]. The leukocyte Ig-like receptors (CD85), previously called immunoglobulin-like transcripts or leukocyte immunoglobulin-like receptors (LIR), are broadly reactive inhibitory receptors against the HLA-A, -B, and -C allotypes. Similar to CD94/NKG2A, they enable NK cells to survey for overall class I expression [7]. In contrast, 3 different KIRs can distinguish between groups

From the ¹Department of Hematology/Oncology, Freiburg University Hospital, Freiburg, Germany; ²Department of Pathology, Freiburg University Hospital, Freiburg, Germany; ³Institute for Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany; ⁴Center for Transfusion Medicine, Freiburg University Hospital, Freiburg, Germany; and ⁵Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Germany.

Financial disclosure: See Acknowledgments on page 480.

Correspondence and reprint requests: Paul Fisch, MD, Professor of Molecular Pathology, Immunology and Genetics, Department of Pathology, Breisacher Str. 115A, 79106 Freiburg, Germany (e-mail: paul.fisch@uniklinik-freiburg.de).

Received September 18, 2008; accepted December 23, 2009

© 2010 American Society for Blood and Marrow Transplantation

1083-8791/10/164-0002\$36.00/0

doi:10.1016/j.bbmt.2009.12.008

of HLA-A, -B, and -C allotypes [8-10]. KIR2DL1 recognize HLA-C allotypes with a lysine at position 80 (C2 ligands such as Cw02, 0307, 0310, 04, 05, or 06). KIR2DL2 and KIR2DL3 recognize HLA-C allotypes with an asparagine at position 80 (C1 ligands, such as Cw01, 03, 07, or 08). KIR3DL1 molecules recognize HLA-B-allotypes with a polymorphic sequence motif at position 77-83 (Bw4 epitope), whereas KIR3DL2 interacts with the HLA-A3 and A11 allotypes.

Besides inhibition, NK cells require activation by virus-infected or leukemic cells to mediate their protective functions [11,12]. Stimulatory receptors on NK cells include lectin-like receptors such as CD94/NKG2C and the KIRDS molecules. The HLA class I specificities and antibody reactivities of activating KIRs overlap with those of the corresponding inhibitory KIRs. Other activating receptors on NK cells are the NKG2D homodimers whose ligands include MHC class-I-related chain A/B (MICA/B) [13]. A third class of activating receptors on NK cells, as well as some T cells, are the natural cytotoxic receptors (NCR), NCR1 (NKp46), NCR2 (NKp44), and NCR3 (NKp30) [9]. Although the ligands for these receptors have not been fully elucidated, they may be important in the recognition of leukemic cells [9,11,12]. Inhibitory NK receptor signals generally overrule signaling through stimulatory receptors [10,14]. Several clinical studies demonstrated improved survival post allogeneic HCT, along with a strong GVL effect against myelogenous leukemias when the patient was lacking 1 of the 3 major KIR/HLA-ligands present in the donor, the Bw4 epitope in HLA-B, or the C1 or C2 ligands in HLA-C [1,15-20]. The likely mechanism for this is that NK cells derived from the graft express a "leukemia-reactive" profile of inhibitory receptors. These inhibitory KIR do not find an HLA class I ligand on the recipient's cells, including residual leukemia cells. Because all KIRs are encoded on chromosome 19, they are segregated independently of the HLA alleles on chromosome 6. Thus, transplants from HLA identical family donors may be KIR-mismatched [21], whereas only transplants from identical twins are HLA- and KIR-matched. We studied regenerating NK and T cells following allogeneic HCT in adult patients, most of which were HLA-matched. According to the expression of KIRs in the donor's blood, the patients were divided into KIR/HLA-ligand matched and mismatched groups. In an effort to better understand the GVL effect we focused our analysis on the regenerating NK cells without expression of broadly reactive inhibitory NK receptors (CD94/NKG2A and LIR1 [CD85j]) and monitored their regeneration in KIR/HLA-ligand matched as well as mismatched patients post-HCT. In addition, we monitored NK receptor expression on other innate effector cell populations that may be relevant for the GVL effect postallogeneic HCT, such as NKT cells, NKT-like cells, and $\gamma\delta$ T cells.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The study included 36 consecutive adult patients treated by allogeneic HCT in the Division of Allogeneic Stem Cell Transplantation, Department of Hematology/Oncology, Freiburg University Hospital. The details of their transplant history are given in Tables 1, S1, and S2. This study was approved by the University of Freiburg Hospital Ethics Committee; all clinical investigations were conducted according to the Declaration of Helsinki Ethical Principles. The patients provided informed written consent prior to inclusion in this study. All patients received granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilized peripheral blood progenitor cells from HLA A-, B-, and C-locus matched donors (32 patients) or HLA A-, B-locus matched, but C-locus mismatched donors (4 patients). The patients were only considered C-locus mismatched if the donor and recipient were assigned to different HLA-C allele groups (C1 or C2). For the purpose of this study we assigned the patients to the groups "KIR/HLA-ligand match" and "KIR/HLA-ligand mismatch," as defined shortly.

Sample Collection and Preparation

Blood samples were drawn from donors and recipients before and after transplantation. The blood samples post-HCT were collected on days 14 (n = 36), 28 (n = 35), 56 (n = 35), 84 (n = 33), 112 (n = 30), 140 (n = 29), 168 (n = 31), 252 (n = 16), and 336 (n = 1). All blood samples were drawn within 1 week of the specified day. In the case of missed collections, samples were obtained at interim time points whenever

Table 1. Characteristics of the KIR-Ligand Mismatched and KIR-Ligand Matched HCT Patients

	KIR-Ligand Mismatch	KIR-Ligand Match
N	22	14
Age	62.5 $\pm$ 8	56.5 $\pm$ 15
Sex (male / female)	18 / 4	6 / 8
Diagnosis (n)	AML/MDS = 16 B-NHL = 6	AML/MDS = 9 B-NHL = 5
HLA class I mismatch in GVHD direction (n)		
A	0	0
B	0	0
C	3	1
KIR haplotype (n)		
A/B	14	5
A/A	7	4
B/B	1	5
Transplantation (n)		
Related	5 (23%)	9 (64%)
Unrelated	17 (77%)	5 (36%)

AML indicates acute myelogenous leukemia; MDS, myelodysplastic syndrome; NHL, non-Hodgkin lymphoma; GVHD, graft-versus-host disease; KIR, killer cell immunoglobulin-like receptor.

possible. Three relapsed patients were excluded from further analysis when they had to undergo a second transplantation. All blood samples were freshly processed by isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) on Ficoll gradients (LSM 1077, PAA, Pasching, Austria), followed by staining for flow cytometry analysis.

KIR-Polymerase Chain Reaction (PCR) Genotyping

Donor DNA samples were extracted using QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). KIR genotyping was performed according to published protocols with minor modifications [20,22] to differentiate inhibitory KIRs from activating KIRs (KIR2DL1/S1, KIR2DL2/S2, KIR2DL3/S3, KIR2DL5, KIR3DL1/S1, KIR3DL2) and determine the KIR haplotypes.

Antibodies and Flow Cytometry

The following mouse antihuman monoclonal antibodies (mAbs) were used: CD3-FITC (UCHT1), TCR $\gamma\delta$ -FITC (IMMU 510), NKG2A-PE (Z199), CD85j-PE (HP-F1), TCR V α 24-FITC (C15), NKG2D-PE (ON72), NKp30-PE (Z25), NKp44-PE (Z231), NKp46-PE (BAB281), CD3-ECD (UCHT1), CD244-PE-Cy5 (C1.7.1), CD56-PE-Cy7 [N901(NKH-1)], CD158a,h-APC (EB6.B) (all from Beckman Coulter, Krefeld, Germany), and TCR $\alpha\beta$ -FITC (BMA031) (Serotec, Oxford, UK). The mAb TCR V β 11-PE-Cy7 (C21), CD158e-ECD (Z27), and CD158b,j-APC-Cy7 (GL183) were purchased as custom-conjugates (Beckman Coulter, Custom Design Service). For surface staining, PBMC were incubated with different mAb panels, as shown in Table S3. Following 15 minutes of incubation, 50 μ L of OptiLyse B solution (Beckman Coulter) were added for red cell lysis. After 15 minutes 500 μ L of double-distilled water (Braun, Melsungen, Germany) were added and the tubes were incubated for a further 20 minutes. The samples were washed (PBS + 1% human serum), fixed in 250 μ L 1% paraformaldehyde (IOTest 3 Fixative Solution; Beckman Coulter), and events were acquired on a CyAnTM ADP Flow Cytometer (Beckman Coulter). Voltage of the CyAn FlowCytometer was first adjusted using appropriate isotype controls for each color. Then, compensation beads for each color (antimouse Ig CompBeads, BD) were run on the instrument. Upon analysis of the surface markers automatic compensation was preformed using the FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA) program.

CD107a and Interferon (IFN)- γ Assay

PBMC were incubated in complete medium (IMDM, supplemented with L-Arginine, L-Asparagine, L-Glutamine, penicillin, streptomycin [all

from Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Germany] and heat-inactivated 10% male human serum [PAN-Biotech, Aidenbach, Germany]) for 4 hours at 37°C in the presence of monensin (GolgiStop; BD) the CD107a-PE-Cy5.5 mAb (H4A3) (Beckman Coulter, Custom Design Service) [23-25] and K562 cells (50.000 K562/150.000 PBMC). Then, the cells were washed (phosphate-buffered saline [PBS] + 1% human serum), stained for surface markers (30 minutes), fixed, and permeabilized by IntraPrep Permeabilization Reagent (Beckman Coulter). For intracellular staining we used the IFN- γ -Pacific Blue mAb (4S.B3) (eBioscience, Frankfurt, Germany). Following 30 minutes of incubation, the cells were washed, resuspended in 250 μ L IOTest 3 Fixative solution (Beckman Coulter) and analyzed (8 colors) on an LSR II cytometer using automatic compensation and the Diva software (BD Biosciences).

Definition of KIR/HLA-Ligand Match and KIR/HLA-Ligand Mismatch

Donor-recipient pairs were divided into the categories "KIR/HLA-ligand match" and "KIR/HLA-ligand mismatch" according to the receptor (KIR)-ligand (HLA) model [17,18]. Using high-resolution HLA typing all patients were assigned to C1, C2, or C1/C2 groups (HLA-C) and to the Bw4 group (HLA-B). In addition, donors' PBMC were examined by multicolor flow cytometry for NK cells expressing KIR2DL1/S1 (C2-specific), KIR2DL2/DL3/S2 (C1-specific), or KIR3DL1/S1 (Bw4-specific) (Table S4). A patient was assigned to the group "KIR/HLA-ligand match" if the KIR expressed by the donor's NK cells matched the patient's HLA-C or -Bw4 ligands. Thus, most patients in the KIR-ligand matched group expressed all 3 KIR ligands C1, C2, and Bw4. In contrast, a patient was assigned to the group "KIR/HLA-ligand mismatch" if the donor had NK cells expressing KIR for which the patient had no HLA-C or Bw4 ligand. This would mean that there was a KIR-mismatch in the graft-versus-host (GVH) direction. Although patients #14 and #18 were missing HLA C2 KIR ligands, they were assigned to the KIR/HLA-ligand match group because phenotypic analysis of their donors' effector cells failed to demonstrate KIR2DL1 expression [26].

Statistical Analyses

For a statistical comparison of the study groups 20,000 viable lymphocytes were collected per sample. All data were analyzed using SPSS software (Version 14.0 SPSS, Munich, Germany). The significance of the differences in cell counts between donor and recipient pairs following HCT were tested using the non-parametric Mann-Whitney *U*-test.

RESULTS

A New 6-Color Flow Cytometry Panel Differentiating NK and T Cell Subpopulations

We used special mAb panels to characterize inhibitory receptors on NK and T cells (Table S3, panels 1-4). To identify MHC unrestricted effector cells, we first gated on the NKG2A⁻ LIR1⁻ effector cells and, alternatively, on effector cells that expressed either NKG2A or LIR1. Then, we identified the NK (CD3⁻ CD56⁺) (panel 1), NKT-like (TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD56⁺) (panel 2), $\gamma\delta$ T cell (TCR $\gamma\delta$ ⁺) (panel 3), and NKT (V α 24⁺ V β 11⁺) (panel 4) cell subsets within this population. Because both NKG2A/CD94 and LIR1 (CD85j) represent inhibitory receptors with broad reactivity against different HLA class I alleles, we designated NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells as "potentially alloreactive." The NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cell subset was further gated on cells which were single-, double-, or triple-positive for KIR2DL1/S1 (CD158a,h), KIR2DL2/L3/S2, (CD158b,j), and KIR3DL1/S1 (CD158e). In addition, we used 4- or 5-color flow cytometry to investigate the expression of activating receptors NKG2D, CD244 (2B4), NKp30, NKp44, and NKp46 on each of these effector cell subsets (Table S3, panels 5-8).

NKG2A⁻ LIR1⁻ NK Cells in the Course of HCT

Initially, we compared patients before HCT and their healthy donors for the presence of MHC unrestricted killer cells without broadly reactive NK-inhibitory receptors, designated here the NKG2A⁻ LIR1⁻ phenotype (Figure 1A). Only NK cells of the NKG2A⁻ LIR1⁻ phenotype, but not NKG2A⁻ LIR1⁻ NKT-like T cells or $\gamma\delta$ T cells, were decreased in the patients before HCT, when compared to the healthy donors ($P < .001$). In contrast, donors and patients had similar levels of NK cells expressing 1 or both of the broadly reactive NK inhibitory receptors NKG2A and LIR1 (Figure 1B). NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells were already detectable in the donors and became a prominent NK cell subpopulation in the late time course following HCT in some of the patients (Figure 2). There was a relatively sharp rise of NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells between days 28 and 84 post-HCT. Although NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells were, overall, a relatively small population, compared to NK cells expressing NKG2A and/or LIR1, this population continued to rise until approximately day 112 post-HCT, when the levels of the other NK cells were decreasing (Figure 3). As determined by donor KIR genotyping, increased levels of NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells post-HCT were more prominent in patients of the A/B than A/A haplotypes, but there was no apparent difference in the levels of NKG2A⁺ and/or LIR1⁺ NK cells (Figure 3). Interestingly, patients re-

maining in complete remission (CR) had significantly more NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells, but not NKG2A⁺ and/or LIR1⁺ NK cells, compared to relapsed patients as observed at 3 independent time points following HCT (Figure 4).

Increased NKG2A⁻ LIR1⁻ NK Cells in KIR/HLA-Ligand Mismatched Patients following HCT

We monitored NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells from day 14, up to day 168 post-HCT (Figure 5). Assignment of the patients to the "KIR/HLA-ligand match" and "mismatch" groups was performed according to the "KIR/HLA-ligand model" (see the Methods section) [18,26]. We noticed significantly increased levels of NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells in the blood of the KIR/HLA-ligand mismatched patients compared to the matched patients (Figure 5). This difference was mainly caused by an increase in the amount of NKG2A⁻ LIR1⁻ CD56-dim NK cells (Figure S1a). Nevertheless, the KIR/HLA-ligand mismatched patients also had a tendency toward higher levels of NKG2A⁻ LIR1⁻ CD56-bright NK cells after HCT than the matched patients (Figure S1b). These statistically significant differences were present at several independent time points following HCT, suggesting that these were biologically relevant.

Next, we analyzed the NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells in more detail with regard to expression of the relevant KIR, as well as functional capacity using 8-color flow cytometry. NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells expressing KIR for which the patient had no HLA class I ligand (designated KIR-mismatched NK cells) were detectable at relatively low levels before HCT. Following HCT these KIR mismatched NK cells increased in most patients to higher levels than observed in the particular donors with the 2 representative patients shown in Figure 6. Patient #21 had 2 KIR/HLA-ligand mismatches in the presence of an HLA-C group mismatch (donor C1/C2 and patient C2/C2), whereas patient #28 was HLA identical to his donor but still had a KIR3DL1-Bw4 mismatch (Tables 2 and S1). Because the donors for patients #21 and #28 did not carry KIR3DS1, all NK cells expressing KIR3DL1/S1 in these patients following HCT expressed the inhibitory form KIR3DL1. However, patient #21 carried the KIR2DL2/3 and KIR2DS2/3 genes; therefore, both forms of this receptor could be expressed by the single KIR2DL2/L3/S2⁺ cells in this patient. We examined the functional activity of these potentially alloreactive NK cells by measuring their surface CD107a expression and IFN- γ secretion following stimulation by K562 cells [23-25]. NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells expressing the mismatched KIRs, as well as other inhibitory KIRs (marked by an arrow in Figure 6A) could clearly be stimulated by K562 cells, revealing their alloreactive potential against target cells that did not express

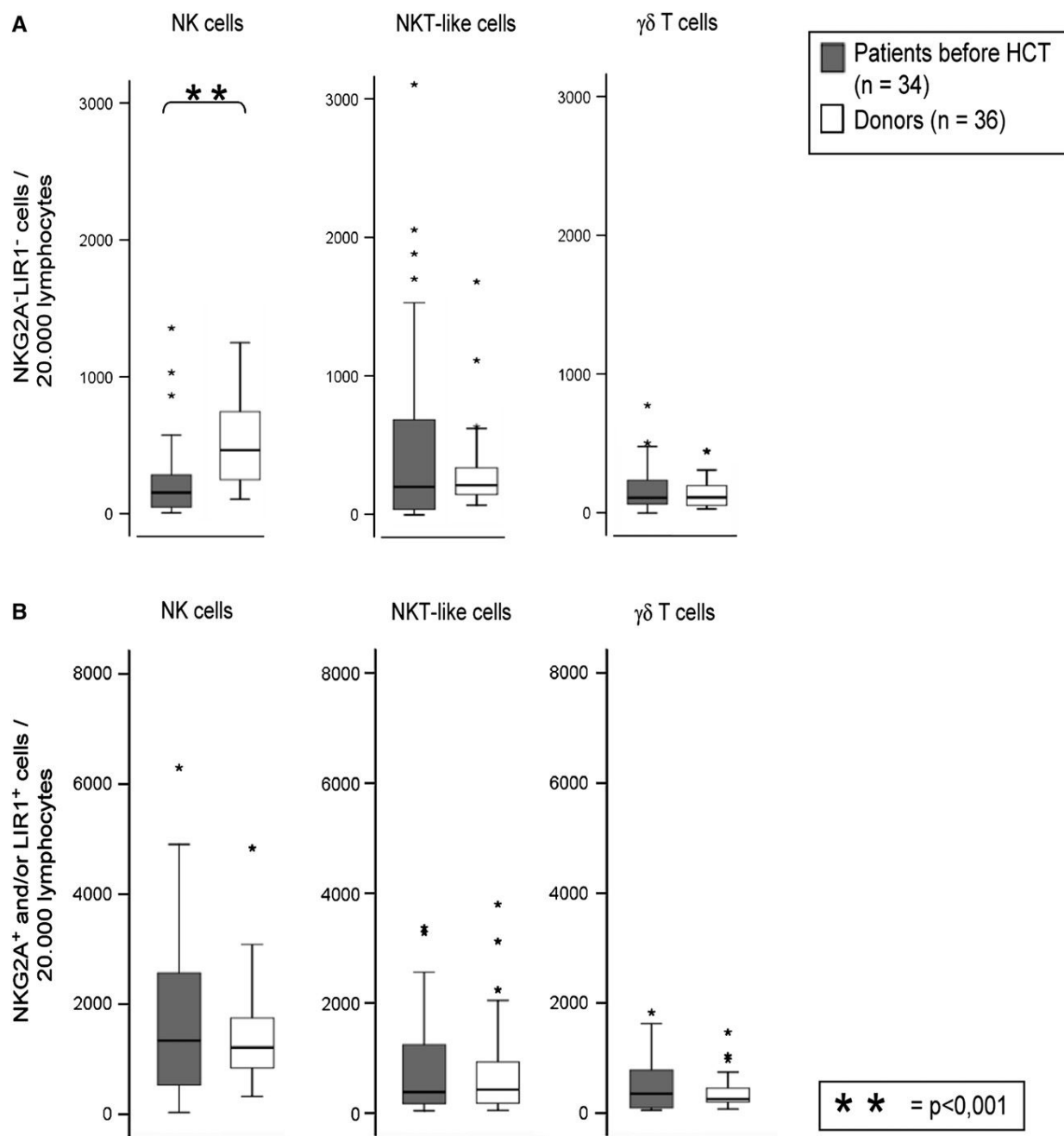


Figure 1. Characterization of effector cells positive or negative for NKG2A/LIR1 inhibitory receptors in patients before HCT and their donors. The numbers of NK cells, NKT-like cells (TCR $\alpha\beta^+$, CD56⁺) and $\gamma\delta$ T cells were gated on (A) all NKG2A⁺LIR1⁺, as well as on (B) NKG2A⁺ and/or LIR1⁺ effector cells. "NKG2A⁺ and/or LIR1⁺ effector cells" include the NKG2A⁺LIR1⁺, the LIR1⁺NKG2A⁺, and the LIR1⁺NKG2A⁺ cell populations. Cell numbers were determined by flow cytometry from a total of 20,000 cells in patients before HCT and their donors. Highly statistical significant differences (Mann-Whitney U-Test) ($P < .001$) are indicated by **.

a corresponding inhibitory HLA class I ligand (Figure 6B). In addition, we gated on NKG2A⁺LIR1⁺ NK cells that expressed only the mismatched KIR but none of the KIR/HLA-ligand matched inhibitory or activating receptors because such NK cells should find no inhibitory HLA class I ligands on the patient's leukemia cells. Remarkably, even these single mismatched KIR⁺ NK cells appeared to be functional

effector cells showing a 2- to 4-fold increase in CD107a expression while there was some, albeit lower, induction of INF- γ secretion.

Activating Receptors on NK Cells Post-HCT

Besides analysis of the diverse KIR, NKG2A, and LIR1, we studied expression of the activating receptors NKG2D, 2B4, NKp30, NKp44, and NKp46 on

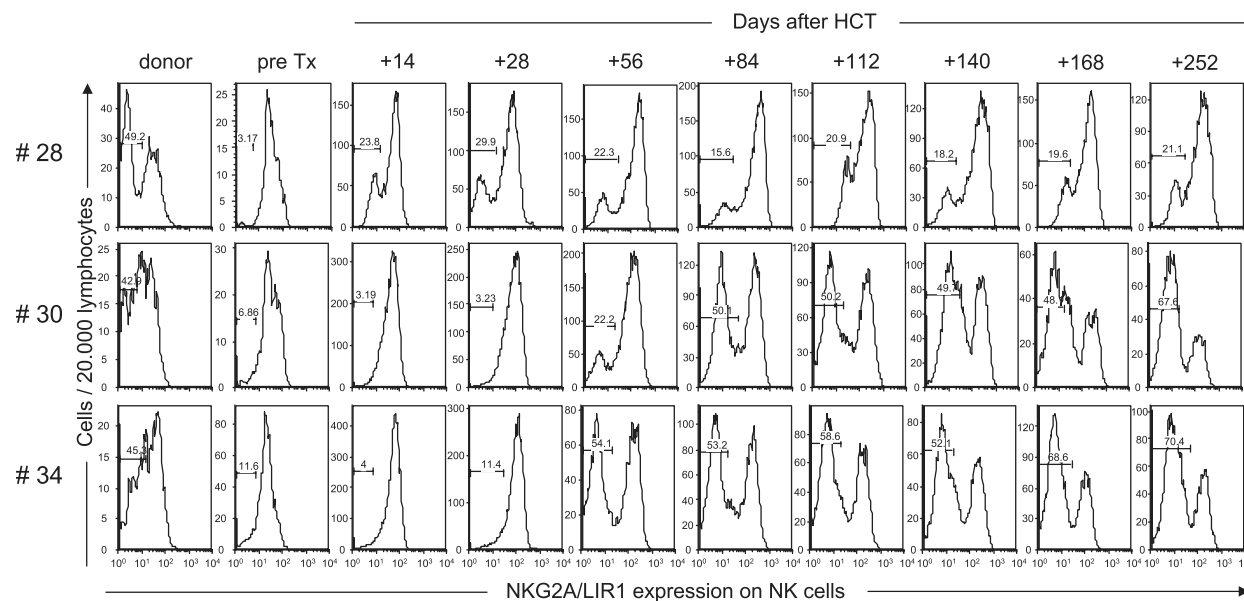


Figure 2. NKG2A/LIR1 expression on NK cells of representative KIR/HLA-ligand mismatched donor/patient pairs. The NK cells of particular donors and representative patients #28, #30, and #34 were analyzed for NKG2A/LIR1 expression by gating on CD3⁺ CD56⁺ lymphocytes before HCT (pre Tx) and at different time points following HCT.

patients' NK cells using separate mAb panels (Figure 7, Table S3, panels 5-8). The mean-fluorescence index (MFI) was more informative than percentages of positive cells because most NK cells expressed NKG2D, 2B4, and NKp46, whereas NKp44 was only expressed by the CD56-bright NK cells (Figure 7, and data not shown). During the observation period (168 days) there was a remarkable increase in the expression levels of NKG2D in both KIR/HLA-ligand matched as well as mismatched patients, although it appears that the KIR/HLA-ligand mismatched patients might have transiently higher expression levels of NKG2D than KIR/HLA-ligand matched patients. Similarly, the expression levels of NKp30, NKp44, and NKp46 increased following HCT, and this phenomenon was observed in both the KIR/HLA-ligand mismatched and matched patients. These expression levels were measured on all NK cells because gating on the NKG2A⁺ LIR1⁺ NK cell subpopulation would have involved additional customized mAb that were unavailable at the time of our study.

NK Receptor Expression on T Cells Post-HCT

Besides typical NK cells we also measured the blood percentages of the other effector cell subsets (NKT-like, $\gamma\delta$ T cells, $\alpha\beta$ T cells) and their differential expression of KIR (Table S3). The percentages of NKT cells and $\gamma\delta$ T cells in our patients were rather low compared to NK cells (data not shown). KIR expression on these subsets increased posttransplant in only a few of the patients. Typical NKT cells (V α 24⁺ V β 11⁺) were extremely rare in the patients' and donors' blood. Therefore, the amount of blood

obtained and the samples stained did not allow detailed analysis of the NKT cells. However, when staining more lymphocytes we found that most V α 24⁺ V β 11⁺ NKT cells expressed KIRs, whereas T cells that were single positive for V α 24 or V β 11 did not (data not shown). Naturally, conventional $\alpha\beta$ T cells of donor origin increased in these patients post-HCT, but KIR expression on these $\alpha\beta$ T cells was only noticed in exceptional patients.

DISCUSSION

In normal donors 20% to 50% of NK cells belong to the NKG2A⁺ LIR1⁺ subset, whereas approximately 40% to 50% of NK cells express NKG2A and 15% to 50% LIR1, representing nonoverlapping NK cell subsets (our unpublished results). To our knowledge, NKG2A⁺ LIR1⁺ NK cells have not been specifically examined to date [19,27]. This subset was increased in healthy donors compared to the patients before HCT, in patients that remained in remission compared to relapsed patients, and in KIR-ligand mismatched patients compared to KIR/HLA-ligand matched patients. Interestingly, there was no difference between patients in remission and relapsed patients in the percentages of NKG2A⁺ NK cells. The most straightforward interpretation of our observations is that NKG2A⁺ LIR1⁺ NK cells play a protective role in the GVL effect. The tendency toward significance of different NKG2A⁺ LIR1⁺ NK cell numbers in KIR/HLA-ligand mismatched and matched patients was already present by days 56 and 84 post-HCT (Figure 5). Because at these time points most

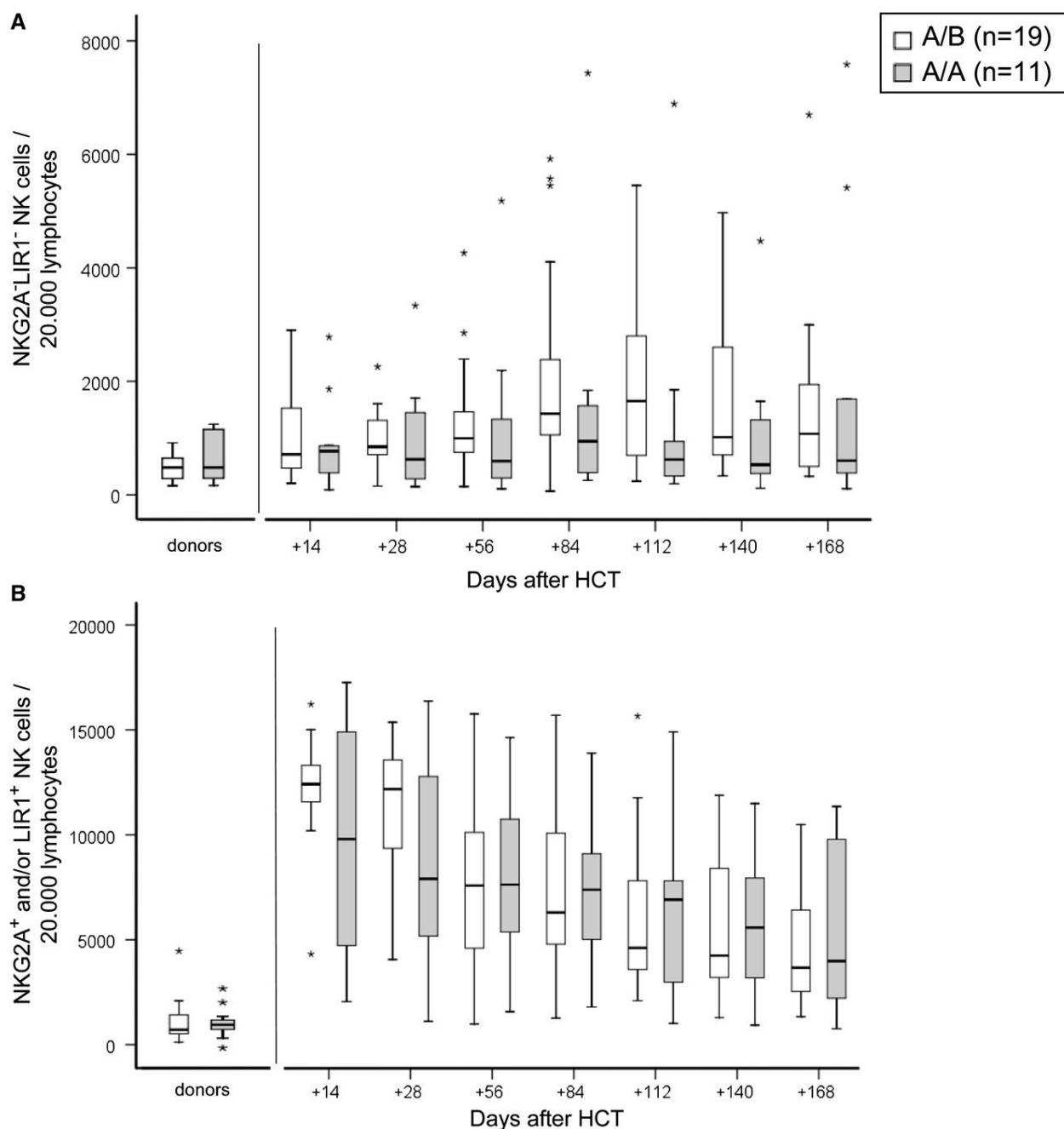


Figure 3. NK cell levels following HCT analyzed by the donor KIR haplotype. The numbers of (A) NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells and (B) NKG2A⁺ and/or LIR1⁺ NK cells, determined from a total of 20,000 effector cells by flow cytometry at different time points following HCT, were analyzed in the donors and their recipients according to the A/B and A/A KIR haplotypes. Patients of the B/B haplotype were not included in this analysis because 5 of 6 B/B patients were KIR-ligand matched.

patients were still in clinical remission, this suggests that decreasing percentages of NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells preceded leukemic relapses and not vice versa. Thus, higher numbers of antileukemic NK cells may be important for maintaining remission in the time period after day 112. Extrapolating from these data we propose that the adoptive transfer of donor NK cells [28] at some point during the time period between 1 and 3 months after HCT may protect against leukemia

relapse, and that prophylactic infusions of enriched NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells may be particularly protective. Furthermore, we observed that expansion of NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells was more evident in patients with the A/B haplotype than in patients with the A/A haplotype. However, there was no apparent difference in the post-HCT rise of the NKG2A⁺ and/or LIR1⁺ NK cells associated with the different KIR haplotypes (Figure 3). Patients with A/B KIR haplotypes carry

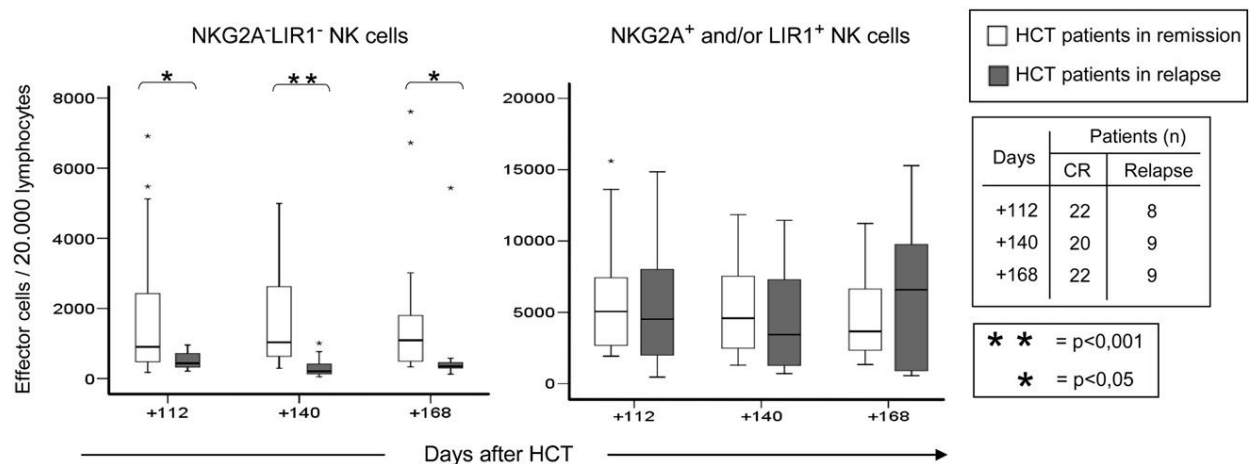


Figure 4. Effector cells positive or negative for NKG2A/LIR1 inhibitory receptors in the posttransplant course. The numbers of NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells as well as NKG2A⁺ and/or LIR1⁺ NK cells in patients in CR and in relapse were measured by flow cytometry on days 112, 140, and 168 following HCT. "NKG2A⁺ and/or LIR1⁺ NK cells" include the NKG2A⁺ LIR1⁻, the LIR1⁻ NKG2A⁺, and the LIR1⁺ NKG2A⁺ subpopulations. The number of patients (n) in both groups at each of these time points is shown on the right. Statistically significant differences (Mann-Whitney U-test) ($P < .05$) are indicated by * and highly significant differences ($P < .001$) are indicated by **.

a greater diversity of HLA allele-specific inhibitory and activating receptors than A/A or B/B patients. The presence of the A-haplotype with allele-specific inhibitory KIRs may be required for education of NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells because these cells express less inhibitory receptors than NKG2A⁺ and/or LIR1⁺ NK cells. In addition, the presence of activating KIR-genes in the B-haplotypes may enhance NK cell proliferation and the GVL effect [29,30].

Most of the NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells that were increased in the KIR/HLA-ligand mismatched patients were of the CD56-dim phenotype (Figure S1). CD56-dim NK cells are the more cytotoxic NK cell subset, naturally expressing lower levels of NKG2A than CD56-bright NK cells that produce cytokines [31]. The NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells could be considered developmentally immature, but this probably only applies to NKG2A⁻ LIR1⁻ KIR⁻ NK cells that produce less IFN- γ and lack cytotoxic potential [32].

However, the vast majority of the NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells are mature NK cells because they express various KIRs and are functional effector cells against HLA deficient target cells (Figure 6). The engrafted NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells expressing KIRs for which the patient had no HLA class I ligand also increased post-HCT and remained at these levels for at least 6 to 9 months, suggesting that their GVL effect is maintained for a long period of time [33,34]. The potential for alloreactivity by single KIR⁺ NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells was documented for several patients using the CD107a assay following stimulation by K562 cells [23] (Figure 6). These experiments confirmed that, regardless of potential expression of an activating KIR, these were functional alloreactive NK cells. In a recent related study [35], single KIR⁺ NK clones from transplanted pediatric patients were tested for lysis of autologous leukemia cells using conventional 51-Cr release cytotoxicity assays. Our CD107a flow cytometry assay

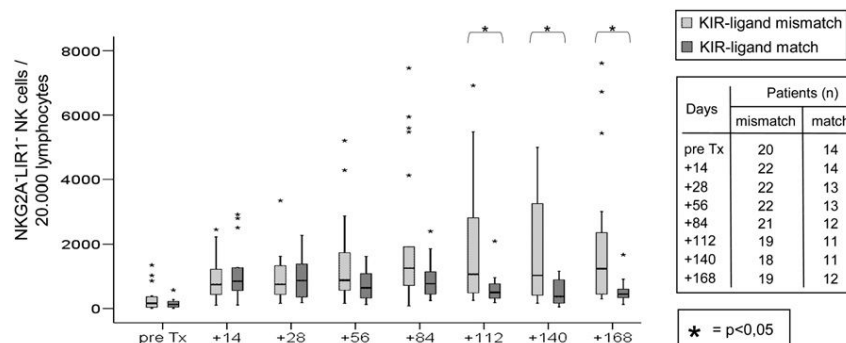
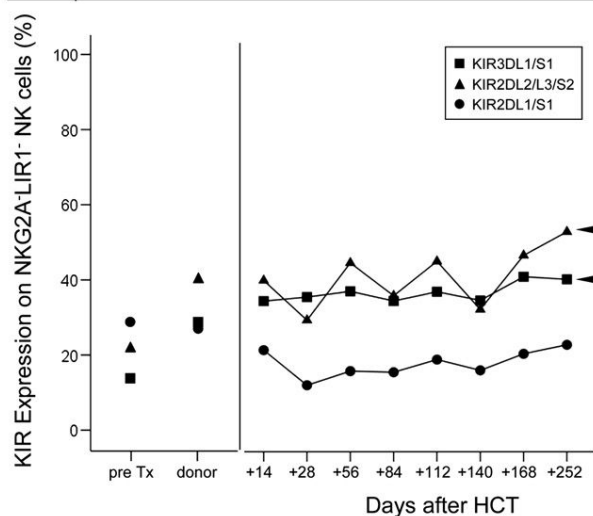
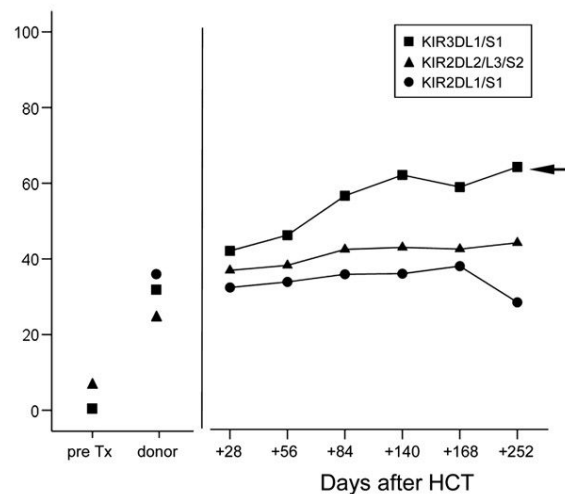


Figure 5. Comparison of NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cell subpopulations in KIR/HLA-ligand mismatched and KIR/HLA-ligand matched patients. NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells were measured in KIR/HLA-ligand mismatched and KIR/HLA-ligand matched transplanted patients before HCT (pre Tx) and at different time points following HCT until day 168. The numbers of all NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells from a total of 20,000 lymphocytes for each patient are compared. For each time point, the numbers of patients (n) analyzed in the KIR/HLA-ligand mismatched and matched groups are given. Statistically significant differences between the groups are indicated by * (Mann-Whitney U-test).

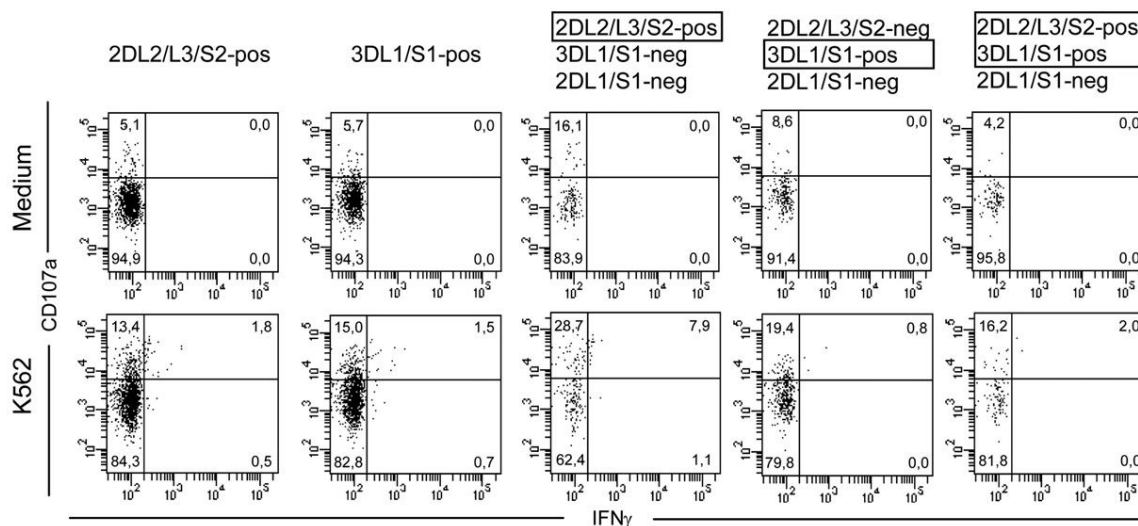
A # 21 (KIR2DL2/3 - C1 and KIR3DL1 - Bw4 mismatch)



28 (KIR3DL1 - Bw4 mismatch)



B # 21 (KIR2DL2/3 - C1 and KIR3DL1 - Bw4 mismatch)



28 (KIR3DL1 - Bw4 mismatch)

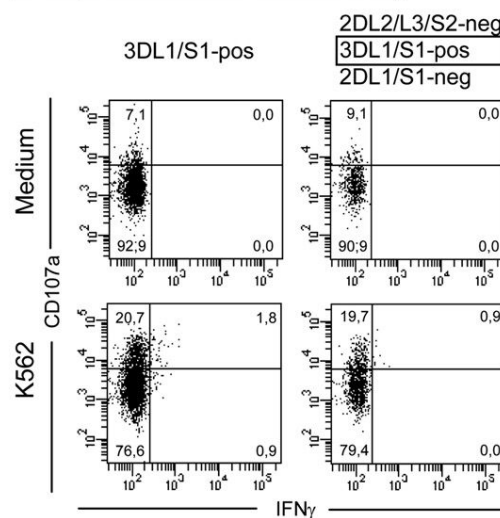


Table 2. Clinical Details of KIR-Ligand Mismatched Transplanted Patients #21 and #28 Who Were Examined in Detail in Figure 6

	# 21	# 28
Age/sex	57/f	52/m
Diagnosis	MDS	MDS
Disease status at HCT	untreated	untreated
Donor type	unrelated	unrelated
KIR ligand (donor)	C1,C2	C1,C2
KIR ligand (patient)	C2	C1,C2
KIR haplotype (donor)	A/B	A/A
Inhibitory KIR (donor)	2DL1,2DL2/3,3DL1	2DL1,2DL3,3DL1
Activating KIR (donor)	2DS2/3	No
KIR-ligand mismatch	KIR2DL2/3 - HLA-C1 KIR3DL1 - HLA-Bw4	KIR3DL1 - HLA-Bw4
GVHD (acute)	Grade 1 (skin)	Grade 4 (skin, gut)
GVHD (chronic)	mild day +192 (skin)	severe day +179 (gut) until day +195
Donor chimerism	Yes	Yes
Outcome	CR (+32 months) Alive	CR (+30 months) Alive

MDS indicates myelodysplastic syndrome; f, female; m, male; CR, complete remission; KIR, killer cell immunoglobulin-like receptor; HCT, hematopoietic cell transplant; GVHD, graft-versus-host disease.

offers the advantage of analyzing very rare NK cell subpopulations that have not been activated by IL-2 *in vitro* directly upon isolation from the patients' blood. Expression of CD107a on the surface of NK cells correlates with degranulation following stimulation and represents a sensitive marker of NK cell activity [23,36]. Testing autologous leukemia cells for "the lack of inhibition" of NK cell lysis by a missing HLA class I ligand offers, in our opinion, no definitive advantage to K562 cells. Nevertheless, K562 cells differ from autologous leukemia cells in the spectrum of ligands for NK activating receptors, most of which are yet uncharacterized [11,12]. Autologous leukemia cells were only available in a few patients, and are frequently contaminated by normal bone marrow cells. These facts and the condition of the leukemia cells following thawing prevented meaningful functional experiments in our system. This may be why other studies used fresh allogeneic leukemia cells as well as the HLA class I A, B, and C negative Epstein-Barr virus transformed B cell line .221 as target cells [34].

The GVL effect by NK cells implies that leukemia cells express ligands for activating NK receptors. Because ligands for these receptors on leukemia cells remain poorly characterized [9,11,12], it is still impossible to predict which patients' leukemia cells will be GVL targets. Although the expression of activating receptors on leukemia cells cannot be influenced, it is possible to select donors expressing an inhibitory KIR without a corresponding HLA class I ligand on

the recipient's leukemia cells [37]. This can occur in both the HLA-mismatched or HLA-matched setting of HCT. Nevertheless, most studies on the protective role of potentially alloreactive NK cells were conducted in the haploidentical setting of HCT [15,17,33-35,38-40] or investigated both HLA-matched and mismatched patients [19,20]. Only a few groups have focused their analysis on HLA-matched patients or HLA-identical siblings [18,21,30,41,42]. However, there is clearly a lower incidence of treatment related complications following HLA matched allogeneic HCT [37], whereas a mismatch at a single or multiple loci is associated with higher treatment-related mortality and graft-versus-host disease, regardless of other factors such as patient age, disease status, or use of T cell depletion [43]. For fully HLA-matched patients, haplotype matching seems to further decrease the likelihood of severe graft-versus-host disease [44]. Thus, practically all patients in our institution were HLA-matched because our donors were HLA-identical siblings or unrelated donors, primarily selected based on a match in HLA A, B and -DRB1.

One may question if functional alloreactive NK cells exist post-HCT in the situation of an HLA-match. We found at least 9 donors in our relatively small study that expressed KIR for which they themselves lacked an HLA class I ligand ("aberrant" KIR). Most aberrant KIRs were expressed by NK cells that coexpressed additional inhibitory receptors. Although

Figure 6. Subpopulations of NKG2A⁺ LIR1⁺ NK cells expressing individual KIR and their alloreactive potential. (A) The numbers of NKG2A⁺ LIR1⁺ NK cells, expressing different KIR, from KIR/HLA-ligand mismatched patients #21 and #28 before (pre Tx) and at several time points following HCT, compared to their donors. NK cell subsets expressing the KIR for which the patients had no HLA class I ligand (marked by an arrow). (B) CD107a expression and intracellular IFN- γ secretion following stimulation by medium or K562 cells were measured by flow cytometry in subpopulations of the NKG2A⁺ LIR1⁺ NK cells from patients #21 (days 331 post-HCT) and #28 (day 357) (subsets indicated above the dot plots), expressing KIR for which the patients had no HLA class I ligands (outlined by a frame). The percentages of positive cells are indicated in the quadrants. KIR2DL2/L3/S2⁺ or KIR3DL1/S1⁺ gated dot plots included NKG2A⁺ LIR1⁺ NK cells expressing their only inhibitory KIR. Analysis of dot plots gated on multiple KIR was restricted to NK cells expressing the mismatched KIR as their only inhibitory receptors (for patient #21 KIR2DL2/L3/S2⁺ and/or KIR3DL1/S1⁺ and for #28 KIR3DL1/S1⁺) (for the KIR genotype see Tables 2/S1).

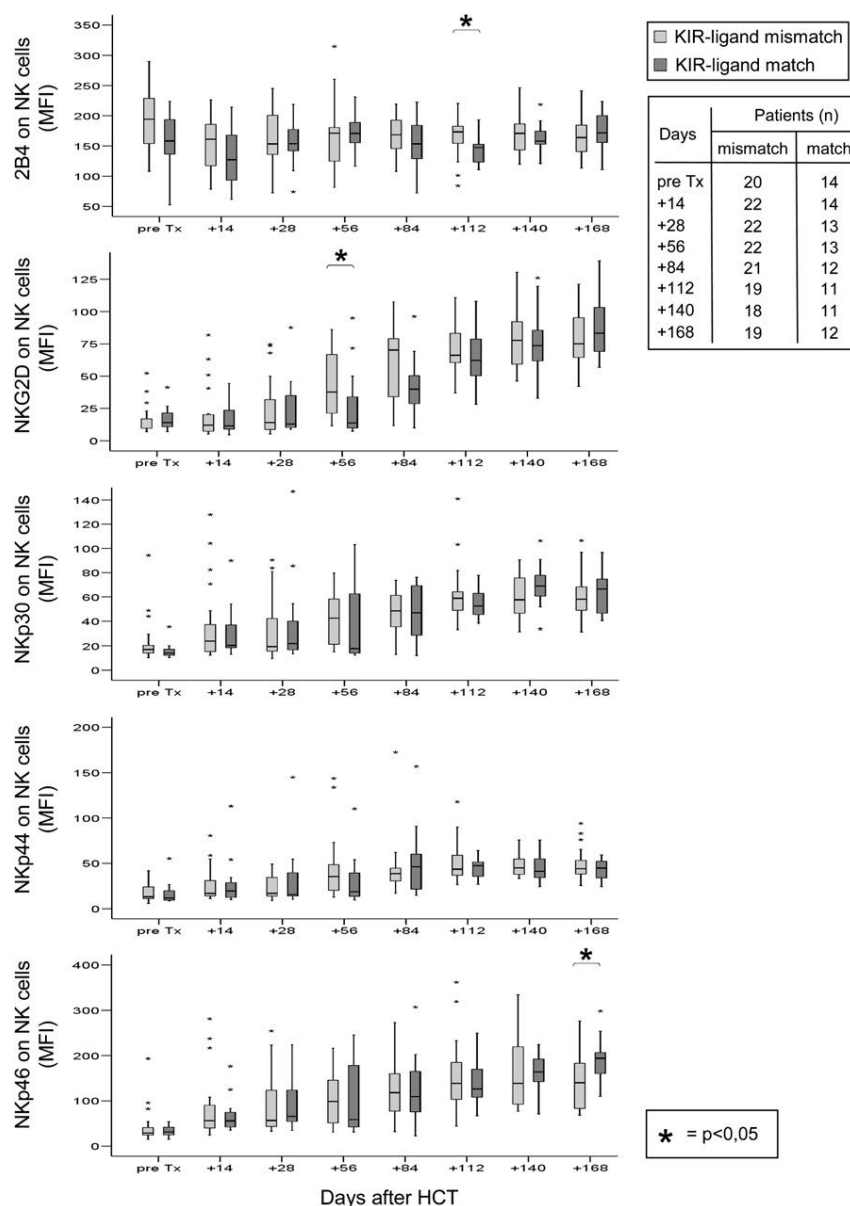


Figure 7. Activating receptors on NK cells following KIR/HLA-ligand matched and mismatched HCT. The mean fluorescence index (MFI) was determined by flow cytometry for the activating receptors 2B4, NKG2D, NKP30, NKP44, and NKP46 expressed by NK cells from KIR/HLA-ligand mismatched and KIR/HLA-ligand matched transplanted patients before HCT (pre Tx) and at different time points following HCT. The numbers of patients (n) in the KIR/HLA-ligand mismatched and matched groups for each time point are indicated on the right. Statistically significant differences between the KIR/HLA-ligand mismatched and matched patients are indicated (*).

this would prevent most autoreactivity against normal cells, such NK cells may still mediate a significant GVL effect because leukemia cells may express ligands for activating NK receptors so that the total activating signals may prevail over the inhibitory signals [9,11]. In addition, leukemia cells may lose single HLA class I alleles that would make them sensitive for GVL effects by rare NK cell subsets [45]. We show that such NK cells expressing aberrant KIR increase post-HCT (eg, KIR3DL1⁺ cells in patients #21 and #28; Figure 6). Although NK cells lacking self-HLA class I receptors are normally considered to be developmen-

tally and functionally immature [24,46], the present data and a study published recently [42] suggest that NK cells expressing the HLA-mismatched KIRs, and no other inhibitory receptors, may actually be functional following HCT (Figure 6B). Nevertheless, we cannot exclude that they are somewhat functionally impaired, as has been suggested by another study in a haploidentical setting [34]. Such single KIR⁺ NK cells with alloreactive potential may be present in all HLA-matched HCT-patients who are not positive for all 3 KIR/HLA ligands (C1, C2, and Bw4). An intriguing hypothesis is that, even in the healthy donors,

such NK cells might have a "leukemia-protective" effect. Further experiments are needed to investigate how NK education following stem cell transplantation might differ from the physiological development of NK cells.

Expression levels of the activating receptors NKG2D, NKp30, NKp44, and NKp46 on NK cells increased in both patient groups during the observation period following HCT (until day 168) (Figure 7). Most remarkable was the rise in NKG2D-expression on NK cells that could be observed in KIR/HLA-ligand mismatched patients around day +56 and in the KIR/HLA-ligand matched patients around day +112. Increased expression levels of NK activating receptors at later time points following HCT may represent a mechanism in maintaining remission following HLA mismatched, as well as matched transplants.

In addition to NK cells, we also investigated the expression of NK receptors on other effector cell populations such as NKT cells, NKT-like cells, as well as other $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells. It appears that NKG2A⁻ LIR1⁻ NKT-like cells and NKG2A⁻ LIR1⁻ $\gamma\delta$ T cells expressing KIRs transiently increased following HCT compared to the levels in the patient pre-HCT or those seen in the donor. The vast majority of cytotoxic $\gamma\delta$ T cells expressed CD94/NKG2A [4,47] and the NKG2A⁻ LIR1⁻ phenotype on T cells is rather infrequent. Expression of broadly reactive inhibitory receptors is restricted to T cells with a potential for autoreactivity. These receptors downmodulate the activating signals from the TCR and protect from the autoimmune capacity of these effector cells. In other words, T cells expressing broadly reactive inhibitory receptors need additional signals from the TCR to play a role in GVH and GVL responses, and the antigenic specificities of these cells depend on the T cell repertoire of the particular donor. Our data showing relatively few KIR-expressing T cells after HCT suggest that such MHC unrestricted and potentially autoreactive T cells are less important for the GVL effect than NK cells.

In summary, our data suggest that NKG2A⁻ LIR1⁻ NK cells are important effector cells in GVL. NK cells, expressing only 1 inhibitory KIR for which the patient has no ligand, may mediate GVL effects in haploidentical, KIR/HLA-ligand mismatched, as well as in HLA-matched, KIR/HLA-ligand mismatched HCT patients. The function of such NK cells following HCT needs to be compared to similar NK cells present in normal donors, as well as to regular NKG2A⁺ NK cells.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the staff of the bone marrow transplantation clinics, laboratories, and Station

Löhr for their assistance and support, Irmgard Matt for organizing the clinical and HLA typing data, and Roland Mertelsmann and Martin Werner for support and encouragement.

Financial disclosure: This work was supported by grant DJCLS R 05/01 from the Deutsche José Carreras Leukämie Stiftung to J.F. and P.F. and SFB 620 Z2 to P.F. Markus Kaymer is employed by Beckman Coulter, Krefeld, Germany, a company acting in health care. The other authors declare no competing financial interests.

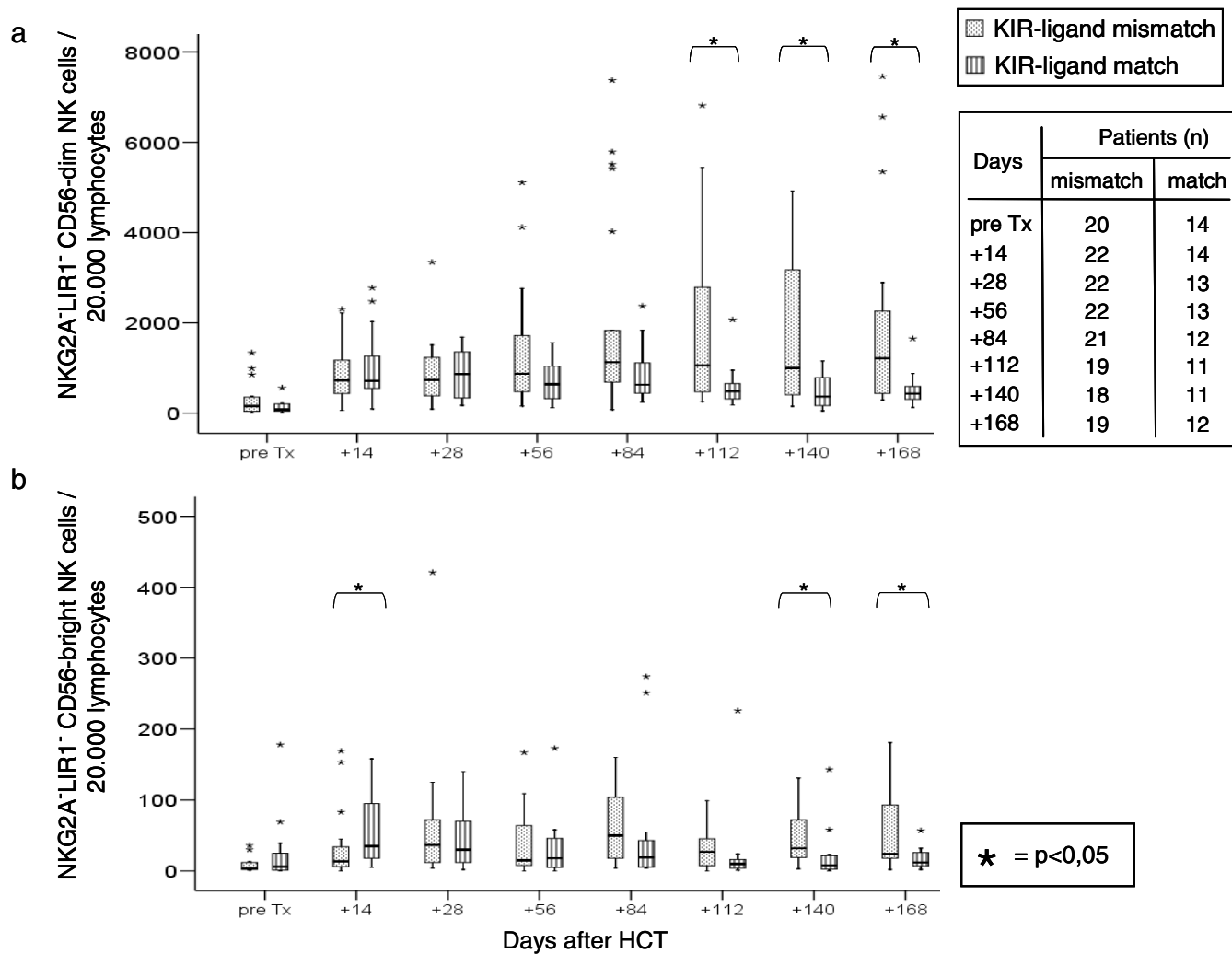
SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbmt.2009.12.008.

REFERENCES

1. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002;295:2097-2100.
2. Velardi A. Role of KIRs and KIR ligands in hematopoietic transplantation. *Curr Opin Immunol*. 2008;20:581-587.
3. Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:201-214.
4. Mingari MC, Vitale C, Cambiaggi A, et al. Cytolytic T lymphocytes displaying natural killer (NK)-like activity: expression of NK-related functional receptors for HLA class I molecules (p58 and CD94) and inhibitory effect on the TCR-mediated target cell lysis or lymphokine production. *Int Immunol*. 1995;7:697-703.
5. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*. 1998;391:795-799.
6. Trowsdale J. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. *Immunity*. 2001;15:363-374.
7. Cosman D, Fanger N, Borges L, et al. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity*. 1997;7:273-282.
8. Hansasuta P, Dong T, Thananchai H, et al. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur J Immunol*. 2004;34:1673-1679.
9. Moretta A, Bottino C, Vitale M, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:197-223.
10. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity*. 1997;7:739-751.
11. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol*. 2008;9:495-502.
12. Lanier LL. Evolutionary struggles between NK cells and viruses. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:259-268.
13. Bahram S. MIC genes: from genetics to biology. *Adv Immunol*. 2000;76:1-60.
14. Pende D, Cantoni C, Rivera P, et al. Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur J Immunol*. 2001;31:1076-1086.
15. Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood*. 2003;102:814-819.

16. Beelen DW, Ottinger HD, Ferencik S, et al. Genotypic inhibitory killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility enhances the long-term antileukemic effect of unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias. *Blood*. 2005;105:2594-2600.
17. Leung W, Iyengar R, Turner V, et al. Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. *J Immunol*. 2004;172:644-650.
18. Hsu KC, Keever-Taylor CA, Wilton A, et al. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood*. 2005;105:4878-4884.
19. Miller JS, Cooley S, Parham P, et al. Missing KIR ligands are associated with less relapse and increased graft-versus-host disease (GVHD) following unrelated donor allogeneic HCT. *Blood*. 2007;109:5058-5061.
20. Fischer JC, Ottinger H, Ferencik S, et al. Relevance of C1 and C2 epitopes for hematopoietic stem cell transplantation: role for sequential acquisition of HLA-C-specific inhibitory killer Ig-like receptor. *J Immunol*. 2007;178:3918-3923.
21. Shilling HG, McQueen KL, Cheng NW, Shizuru JA, Negrin RS, Parham P. Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2003;101:3730-3740.
22. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*. 1997;7:753-763.
23. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*. 2004;294:15-22.
24. Anfossi N, Andre P, Guia S, et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*. 2006;25:331-342.
25. Uhrberg M. The CD107 mobilization assay: viable isolation and immunotherapeutic potential of tumor-cytolytic NK cells. *Leukemia*. 2005;19:707-709.
26. Leung W, Iyengar R, Triplett B, et al. Comparison of killer Ig-like receptor genotyping and phenotyping for selection of allogeneic blood stem cell donors. *J Immunol*. 2005;174:6540-6545.
27. Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Natural killer cell alloreactivity in allogeneic hematopoietic transplantation. *Curr Opin Oncol*. 2007;19:142-147.
28. Passweg JR, Tichelli A, Meyer-Monard S, et al. Purified donor NK-lymphocyte infusion to consolidate engraftment after haploidentical stem cell transplantation. *Leukemia*. 2004;18:1835-1838.
29. Cooley S, Trachtenberg E, Bergemann TL, et al. Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2009;113:726-732.
30. Verheyden S, Schots R, Duquet W, Demanet C. A defined donor activating natural killer cell receptor genotype protects against leukemic relapse after related HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2005;19:1446-1451.
31. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001;22:633-640.
32. Cooley S, Xiao F, Pitt M, et al. A subpopulation of human peripheral blood NK cells that lacks inhibitory receptors for self-MHC is developmentally immature. *Blood*. 2007;110:578-586.
33. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 1999;94:333-339.
34. Vago L, Forno B, Sormani MP, et al. Temporal, quantitative, and functional characteristics of single-KIR-positive alloreactive natural killer cell recovery account for impaired graft-versus-leukemia activity after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2008;112:3488-3499.
35. Pende D, Marcenaro S, Falco M, et al. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and re-definition of inhibitory KIR specificity. *Blood*. 2008.
36. Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G, Deniz G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol*. 2009;254:149-154.
37. Appelbaum FR. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia when a matched related donor is not available. *Hematology (Educ Program Am Soc Hematol)*. 2008;2008:412-417.
38. Davies SM, Ruggieri L, DeFor T, et al. Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor. *Blood*. 2002;100:3825-3827.
39. Nguyen S, Dhedin N, Vernant JP, et al. NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood*. 2005;105:4135-4142.
40. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, et al. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood*. 2007;110:433-440.
41. Cook MA, Milligan DW, Fegan CD, et al. The impact of donor KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia. *Blood*. 2004;103:1521-1526.
42. Yu J, Venstrom JM, Liu XR, et al. Breaking tolerance to self, circulating natural killer cells expressing inhibitory KIR for non-self HLA exhibit effector function after T cell-depleted allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2009;113:3875-3884.
43. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood*. 2007;110:4576-4583.
44. Petersdorf EW, Malkki M, Gooley TA, Martin PJ, Guo Z. MHC haplotype matching for unrelated hematopoietic cell transplantation. *PLoS Med*. 2007;4:e8.
45. Demanet C, Mulder A, Deney V, et al. Down-regulation of HLA-A and HLA-Bw6, but not HLA-Bw4, allospecificities in leukemic cells: an escape mechanism from CTL and NK attack? *Blood*. 2004;103:3122-3130.
46. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*. 2005;436:709-713.
47. Fisch P, Meuer E, Pende D, et al. Control of B cell lymphoma recognition via natural killer inhibitory receptors implies a role for human Vgamma9/Vdelta2 T cells in tumor immunity. *Eur J Immunol*. 1997;27:3368-3379.



2.6 iNKT cell reference values in children: The absolute iNKT cell count is stable from birth to adulthood

Status: eingereicht (Februar 2011)

Scandinavian Journal of Immunology, Impact Factor: 2,108

Eigener Anteil an der Publikation:

- Entwicklung der durchflusszytometrischen Protokolle
- Hilfe bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

2.6.1 Zusammenfassung

Invariante NKT (iNKT)–Zellen sind eine Subpopulation der T-Zellen, deren TCR aus einer invarianten α -Kette (V α 24) in Kombination mit einer β -Kette (V β 11) besteht. Dieser TCR bindet an ein MHC-ähnliches Molekül, CD1d, das nicht Peptide sondern Glycolipide präsentiert. Erkennen iNKT-Zellen diese Lipide kommt es zu einer Ausschüttung der Zytokine IL-4, IFN- γ und IL-10. Dies führt zu einer Aktivierung weiterer Immunzellen. Die Fähigkeit, schnell große Mengen an Zytokine zu sekretieren, macht sie zu einer Brücke zwischen angeborenen und adaptiven Immunsystem.

Die Frequenz dieser iNKT-Zellen ist in adulten Proben sehr gering. Im Rahmen dieser Veröffentlichung wurden 64 Proben von Kindern im Alter zwischen 7 Monate bis 18 Jahren analysiert. Mit zwei verschiedenen durchflusszytometrischen Färbungen wurden iNKT-Zellen identifiziert und quantifiziert. In der ersten Färbung wurden CD3 positive T-Zellen gefärbt, die TCRV α 24 und TCRV β 11 exprimieren, in der zweiten Färbung wurde mit dem monoklonalen Antikörper 6B11 gefärbt. Die absoluten Zahlen liegen mit der ersten Färbung bei 100-6624 und 515-8762 bei der zweiten Färbung pro ml Blut. Es konnte kein Unterschied in der absoluten Zahl der iNKT-Zellen zwischen Kindern und Erwachsenen, zwischen den Geschlechtern und auch ebenso kein Unterschied zwischen Kindern und Nabelschnurblut festgestellt werden. Die Frequenz bewegte sich von 0.008-0.374 bzw. 0.021-0.712 in der zweiten Färbung. Es konnte ein moderater, jedoch signifikanter Anstieg in der Frequenz im Alter festgestellt werden. Dieser Anstieg lässt sich mit dem bekannten Rückgang der absoluten Zahl an T-Zellen im Alter erklären.

Diese Werte sind die ersten dieser Art, die Referenzwerte für iNKT-Zellen zeigen. Bei der Durchführung dieses Projektes wurden zum einen die Referenzwerte für iNKT-Zellen in Kindern erstellt, zum anderen auch das KIR-Repertoire dieser Kinder analysiert. Es wurden auch hier durchflusszytometrische Analysen in Kombinationen mit der Bestimmung des genetischen Hintergrunds durchgeführt, die Aufschluss über die Verteilung der Rezeptoren in Kindern und Jugendlichen geben sollen. Diese Studie muss durch weitere Proben vervollständigt werden (Manuskript in Vorbereitung).



iNKT cell reference values in children: The absolute iNKT cell count is stable from birth to adulthood

Journal:	<i>Scandinavian Journal of Immunology</i>
Manuscript ID:	SJI-11-031
mstype:	Regular Manuscript
Date Submitted by the Author:	28-Jan-2011
Complete List of Authors:	Bienemann, Klaus; Heinrich Heine University, Department of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology Iouannidou, Kasiani; Klinikum Dortmund gGmbH, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Schoenberg, Kathrin; Heinrich Heine University, Institute for Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics Feyen, Oliver; Tavarlin AG Reuther, Susanne; Heinrich Heine University, Department of Pediatric Hematology, Oncology and Clinical Immunology Bienemann, Kirsten; Heinrich Heine University, Department of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology Schuster, Friedhelm; Heinrich Heine University, Department of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology Uhrberg, Markus; Heinrich Heine University, Institute for Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics Laws, Hans-Jürgen; Heinrich Heine University, Department of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology Borkhardt, Arndt; Heinrich Heine University, Department of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology
Keywords:	Natural Killer T Cells < Cells, T Cell Receptors < Molecules, Human < Subject, Blood < Tissues

SCHOLARONE™
Manuscripts

iNKT cell reference values in children: The absolute iNKT cell count is stable from birth to adulthood

Short Title: iNKT cell reference values in children

Klaus Bienemann¹, Kasiani Iouannidou², Kathrin Schoenberg³, Susanne Reuther¹, Oliver Feyen⁴, Kirsten Bienemann¹, Friedhelm Schuster¹, Markus Uhrberg³, Hans-Jürgen Laws¹, Arndt Borkhardt¹

1) Department of Pediatric Hematology, Oncology and Clinical Immunology, Heinrich Heine University, Duesseldorf, Germany

2) Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Klinikum Dortmund gGmbH, Germany

3) Institute for Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany

4) Tavarlin AG, Darmstadt, Germany

Address:

Corresponding author

Prof. Dr. Arndt Borkhardt

Department of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology

Center for Child and Adolescent Health

Heinrich Heine University

Moorenstr. 5

40225 Duesseldorf, Germany

Phone: +49-211/8117680

Fax: +49-211/8116206

Mail to: arndt.borkhardt@med.uni-duesseldorf.de

Word counts:

Whole manuscript: 2850 words

Abstract: 151 words

Introduction, results and discussion: 1876 words

Clinical Immunology

Abstract

Human invariant natural killer T cells (iNKT cells) are a unique population of T-cells that express a semi-invariantly rearranged T cell receptor (TCR) and are involved in a variety of immunoregulatory processes. We established reference values for iNKT cells in 64 healthy children from 7 months to 18 years of age and 5 cord blood samples by flow cytometry. iNKT cells were measured as CD3+ cells co-expressing TCRV α 24 and TCRV β 11, and by using the monoclonal antibody 6B11, which recognizes specifically their invariant TCR rearrangement. The absolute number of iNKT cells ranged from 86 to 10499 (CD3+/ TCRV α 24+/ TCRV β 11+) and 233 to 11167 (CD3+/6B11+) iNKT cells per milliliter of blood. This range is stable from birth to adulthood. The relative iNKT cell count was found to be 0.003 to 0,71 % (CD3+/ TCRV α 24/TCRV β 11) and 0.019 to 0.776 % (CD3/6B11) of peripheral blood T cells and shows only a slight increase with age.

Key word

iNKT cells, reference values, children, anti-TCRV α 24, anti-TCRV β 11, monoclonal antibody 6B11

Introduction

Invariant natural killer T cells (iNKT cells) are a unique subset of innate immune cells that have features of both T cells and natural killer (NK) cells. They express a semi-invariant T cell receptor, characterized in mice by V α 14-J α 18 and V β 8.2, V β 7, or V β 2, and in humans by V α 24-J α 18 and V β 11, although the β chain can be somewhat variable [1-3]. This TCR recognizes lipid-based antigens in the context of CD1d molecules, an MHC Class I-like molecule expressed on antigen presenting cells (APCs) and other cell types. iNKT cells were initially discovered based on the finding that a novel glycolipid compound, α -galactosyl ceramide (α -GalCer), had anti-tumor activity [4]. It could be shown that α -GalCer binds CD1d and then α -GalCer-CD1d complex activates NKT cells through their TCR. Their ability to rapidly secrete large amounts of pre-formed cytokines upon activation allows them to bridge the innate and adaptive immune responses by downstream recruitment and activation of dendritic cells (DCs), NK cells and CD4⁺ and CD8⁺ T cells [5]. Therefore iNKT cells are thought to play crucial roles in modulating antitumour, autoimmune and antimicrobial responses [6–8]. While the function of iNKT cells has been studied extensively in mouse models, less is known about human iNKT cells. Absence or low numbers of peripheral blood iNKT cells have been associated with diverse autoimmune diseases in humans [9]. Their role in infectious and malignant diseases still has to be determined [10]. Data on children are sparse. iNKT cells are thought to play a role in the immune escape of neuroblastoma cells [11] and have been found to be reduced in children with EBV-associated lymphoproliferative diseases due to SAP- and XIAP- deficiency [12] as well as ITK-deficiency [13]. However, the contribution of these cells to human diseases remains controversial [10, 14-16]. Moreover, there are no generally accepted reference values, especially with respect to the lower normal limit.

1
2
3 The evaluation of human iNKT cells in peripheral blood is particularly complicated by
4
5 different factors. First, their frequency in the peripheral blood is extremely low.
6

7
8 Second, different detection methods may limitate the comparability of the results.
9

10 Basically, three different staining methods have become widely accepted to evaluate
11
12 human iNKT cells by flow cytometry:
13

14
15 Classically, they have been identified using CD1d tetramers loaded with α -GalCer
16
17 [17-19].
18

19
20 Recently, it has been shown that iNKT cells can be easily identified by co-expression
21
22 of TCRV α 24 and TCRV β 11 or by using the monoclonal antibody (mAb) 6B11, which
23
24 recognizes the invariant CDR3 loop of their TCR α -chain, with good correlation to the
25
26 classical method [20,21].
27

28
29 In this study we established reference values for iNKT cells in healthy children using
30
31 the latter staining methods.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Patients and methods

Reference values for iNKT cells and NKT like cells

Age related reference values for iNKT cells were generated from 64 FACS analyses in a healthy paediatric population. The group consisted of children undergoing elective surgery and children presenting to our outpatient hemostasiology clinic prior to surgery.

In this group a bleeding disorder was ruled out if the past medical history and family history did not suggest a bleeding disorder and there were normal results of standard hemostasiologic tests. Children with acute infections, underlying illness or on any medication were excluded. Adult control samples were obtained from 12 healthy adult volunteers associated with our children's hospital. Five cord blood samples of healthy newborns were obtained from the Jose-Carreras cord blood bank Dusseldorf. Ethical approval was obtained from the Ethics committee from the Heinrich-Heine University Dusseldorf

Immunophenotyping of iNKT cells

Whole blood was anticoagulated with EDTA and processed within 24 h. A differential white blood cell count was done automatically. Three colour FACS analysis was performed with a FACS Canto (Becton Dickinson (BD), Heidelberg, Germany) flow cytometer. iNKT and NKT like cells were analysed by FACS staining using fluorescein isothiocyanate, phycoerythrin and peridinin-chlorophyll-protein labelled monoclonal antibodies (Becton Dickinson (BD), Heidelberg, Germany or Immunotech (IM), Marseille, France) following the manufacturer's instructions. Antibodies (clone) against the following epitopes were used: CD3 (SK7,BD), V α 24 (C15,IM), V β 11

(C21,IM), anti human iNKT (6B11, BD); mouse-IgG1 (MOPC-21/X40,BD) mouse-IgG2a (X39,BD) (negative control). After gating on CD3+ T-lymphocytes the percentages of iNKT cells (CD3+ V α 24+ V β 11+ and CD3+6B11+) were determined. For all staining experiments, appropriate isotypematched controls were included. Because of the low frequency of iNKT cells in PB, 1–5 x 10⁵ lymphocyte gated cells were analysed.

Statistical analysis

The statistical analysis of control results was performed using Student's t-test after log-transformation of the data to account for the skewed data distribution.

Correlations were calculated using Spearman (r_s) correlation coefficients, depending on the result of Shapiro-Wilk W tests of normality. Statistical significance was considered for $p = 0.05$.

Results

After gating on the lymphocyte population the iNKT cell population could easily be identified and quantified based on CD3/TCRV α 24/TCRV β 11 as well as on CD3/6B11 expression (Fig.1).

The CD3/TCRV α 24/TCRV β 11 co-expression was analyzed in all 64 children. In 46 out of these 64 children we measured the CD3/6B11 co-expression in parallel. The age ranges for the two groups were 7 months to 18 years with a median age of 8.25 years (TCRV α 24/TCRV β 11) and 1 year to 18 years with a median age of 10.5 years (CD3/6B11). 34% (TCRV α 24/TCRV β 11) and 33% (CD3/6B11) of the children were female. Additionally, the iNKT cell population was analysed in 5 cord blood samples and 12 adults (age range 25 to 41 years, median age 31 years, 50% female) with both methods. In the pediatric group (cord blood samples excluded) we found absolute iNKT cell counts ranging from 86 to 10,499 iNKT cells/ml blood using the CD3/TCRV α 24/TCRV β 11 staining and from 233 to 11,167 /ml using the CD3/6B11 staining, respectively (Fig. 2a/b). Given such a wide range, simple determination of a normal range by calculation of the mean $\pm$ 2 standard deviations was not possible. Therefore, outliers constituting approximately 2,5 % of the samples at both the lower and upper ranges were excluded, creating a normal range of 100 – 6624/ml (CD3/TCRV α 24/TCRV β 11) and 515 – 8762/ml (CD3/6B11). The median value was 560 cells/ml and 1972 cells/ml, respectively. (Fig 2a/b).

The data was next log-transformed for further analysis (Fig. 3a). Using the mean $\pm$ 2 standard deviations of the log transformed data we calculate a normal iNKT range of 76 – 5764/ml (CD3/TCRV α 24/TCRV β 11) and 411 – 9003/ml (CD3/6B11), verifying our accepted range above.

The absolute iNKT cell count was not found to be linearly associated with age (Fig 3a) (p -value=0.79 from regression analysis $R^2=0.0014$ and p -value=0.87 from regression analysis $R^2=0.0004$). There was no statistically significant difference between children and adults (Fig. 4a) ($p=0.29$ and $p=0.61$), between children and cord blood (Fig.4a) ($p=0.18$ and $p=0.19$) or between genders (Fig. 4c) ($p=0.28$ and $p=0.65$). The relative count of iNKT cells among total peripheral blood T cells (iNKT in % CD3) ranged from 0.003% to 0.71% (CD3/TCRV α 24/TCRV β 11) and 0.019 to 0.776% (CD3/6B11), respectively (Fig. 2c/d). After exclusion of outliers we accepted a range of 0.008% – 0.374% (CD3/TCRV α 24/TCRV β 11) and 0.021% – 0.712% (CD3/6B11). This range was verified after a log transformation of the data and the calculation of a normal iNKT range of 0.004% – 0.340% (CD3/TCRV α 24/TCRV β 11) and 0.026% - 0.548% (CD3/6B11) as described above. In contrast to the absolute iNKT cell count, the regression analysis of the log transformed data show a moderate but significant increase of the relative iNKT cell count (iNKT in % CD3) with age (Fig 3b)(p -value=0.03 from regression analysis $R^2=0,0568$ and p -value=0.05 from regression analysis $R^2=0,0569$). Accordingly, we found significantly higher iNKT cell percentages in the adult control group (Fig. 4b) ($p=0.03$ and $p=0.04$). Analysing the CD3+ T cell population in our control groups we found a decrease with age (Fig. 5) (p -value<0.01 from regression analysis $R^2=0.3452$). According to the absolute iNKT cell numbers we did not find a statistically significant difference in the relative iNKT cell count between children and cord blood (Fig. 4b) ($p = 0.31$ and $p=0.52$) or gender (Fig. 4d) ($p=0.17$ and $p=0.8$). iNKT reference values are summarized in the tables 1a/b. Comparing both staining methods we measured 2 to 3 fold higher absolute and relative iNKT cell counts using the CD3+/6B11+ staining. We calculated a positive correlation between both methods ($r_{p\text{ rel}}= 0.73$ and $r_{p\text{ abs}}=0.71$).

Discussion

We used two antibody combinations (CD3+/V α 24+/V β 11+ and CD3+/6B11+) to detect the iNKT cell population by flow cytometry. To our knowledge our study is the first one using the 6B11 antibody in children. Both methods show a strong positive correlation, but in contrast to a single study in adults [20] which showed no significant difference between the frequency of total iNKT cells measured by CD3+/6B11+ and CD3+/V α 24+/V β 11+ staining, we found a higher iNKT cell count using the CD3+/6B11+ staining. Similar results were obtained by the study of Fereidouni et al [21]. This observation may be explained by the fact, that the 6B11 monoclonal antibody recognizes all T-cell receptors with the invariant V α 24-J α 18 CDR3 loop [22]. The invariant alpha chain occasionally pairs with other β -chains than V β 11 [10]. This variable pairing may contribute in some degree to a lower iNKT cell count using the CD3+/V α 24+/V β 11+ staining. Further analyses will be necessary to clarify the reasons for the differing results obtained by the different staining methods. Nevertheless, our data show that with respect to the used detection method different reference values should be applied.

Our study had the objective to create iNKT cell normal values for children. We measured the iNKT cell population in a large cohort of healthy children, cord blood samples and adults and found a broad iNKT cell range in all age groups. The absolute iNKT cell count was not age dependent but was stable from birth to adulthood, which is in contrast to almost all other routinely determined lymphocyte subpopulations. In contrast to the work of Marsh et al. [23] we found a moderate increase of the relative iNKT cell count (iNKT in % of CD3+ T cells) with age with both staining methods. This might easily be explained by the known constant decrease of the absolute CD3+ T cell count during ageing [24,25]. We therefore conclude that for the interpretation of iNKT cells in children the absolute iNKT cell

count should be favoured. Especially in young children with high T cell numbers the relative iNKT cell count may be falsely low.

A major problem in the interpretation of human peripheral blood iNKT cell counts is the very low frequency and the wide variability. We found values as low as 80 iNKT cells and values as high as 11.000 iNKT cells/ml of blood in healthy children. The lower reference range is in a region where flow cytometry reaches its methodological limits, what makes it difficult to decide if an iNKT cell number below this lower limit is of pathological significance. This implies that measuring iNKT cells in an individual person may be validated by repeated measurements at various time points. Consistently low numbers of iNKT cells, as it has e. g. been shown in patients with XLP due to SAP deficiency, may then allow to establish a link between NKT cell number and disease [12,13]. The endogenous factors that contribute to the inter-individual variability still have to be elucidated. Furthermore, longitudinal studies in single individuals are necessary to examine intra-individual changes in response to exogenous factors, that may account in part for the observed variability.

References

- [1] Dellabona P, Casorati G, Friedli B et al. In vivo persistence of expanded clones specific for bacterial antigens within the human T cell receptor alpha/beta CD4⁺ 8⁺ subset. *J Exp Med* 1993;177:1763–71.
- [2] Porcelli S, Yockey CE, Brenner MB, Balk SP. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4⁺ 8⁺ alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J Exp Med* 1993;178:1–16.
- [3] Dellabona P, Padovan E, Casorati G, Brockhaus M, Lanzavecchia A. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4⁺ 8⁺ T cells. *J Exp Med* 1994;180:1171–6.
- [4] Kobayashi E, Motoki K, Uchida T, Fukushima H, Koezuka Y. KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities. *Oncol Res* 1995;7:529–534.
- [5] Matsuda JL, Mallevaey T, Scott-Browne J, Gapin L. CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. *Curr Opin Immunol* 2008;20(3):358-68.
- [6] Bendelac A, Rivera MN, Park HS, Roark JH. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity and function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:535–62.
- [7] Kawano T, Cui J, Koezuka Y et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of alpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997;278:1626–9.

- [8] Brigl M, Brenner MB. CD1d antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* 2004;22:817–90.
- [9] Miyake S, Yamamura T. NKT cells and autoimmune diseases: unraveling the complexity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2007;314:251-67.
- [10] Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007;25:297-336.
- [11] Song L, Ara T, Wu HW et al. Oncogene MYCN regulates localization of NKT cells to the site of disease in neuroblastoma. *J Clin Invest* 2007;117(9):2702-12.
- [12] Latour S. Natural killer T cells and X-linked lymphoproliferative syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7:510–514.
- [13] Huck K, Feyen O, Niehues T, et al. Girls homozygous for an IL-2-inducible T cell kinase mutation that leads to protein deficiency develop fatal EBV-associated lymphoproliferation. *J Clin Invest* 2009;119(5):1350-8.
- [14] Kawano T, Nakayama T, Kamada N et al. Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human V alpha24 NKT cells. *Cancer Res* 1999;59:5102–5.
- [15] Lee PT, Putnam A, Benlagha K, Teyton L, Gottlieb PA, Bendelac A. Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis. *J Clin Invest* 2002;110:793–800.

[16] Lucas M, Gadola S, Meier U et al. Frequency and phenotype of circulating Valpha24/Vbeta11 double-positive natural killer T cells during hepatitis C virus infection. *J Virol* 2003;77:2251–7.

[17] Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB: Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by tetramer staining. *J Exp Med* 2002;195:625–36.

[18] Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L et al. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med* 2000;192:741–54.

[19] Sidobre S, Kronenberg M. CD1 tetramers - a powerful tool for the analysis of glycolipid-reactive T cells. *J Immunol Meth* 2002;268:107–21

[20] Montoya CJ, Pollard D, Martinson J et al. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology* 2007;122(1):1-14

[21] Fereidouni M, Farid Hosseini R, Jabbari Azad F, Schenkel J, Varasteh A, Mahmoudi M. Frequency of circulating iNKT cells among Iranian healthy adults. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78 (1):65-9

[22] Exley MA, Hou R, Shaulov A et al. Selective activation, expansion, and monitoring of human iNKT cells with a monoclonal antibody specific for the TCR alpha-chain CDR3 loop. *Eur J Immunol* 2008;38(6):1756-66

[23] Marsh RA, Villanueva J, Kim MO et al. Patients with X-linked lymphoproliferative disease due to BIRC4 mutation have normal invariant natural killer T-cell populations. Clin Immunol 2009;132(1):116-23

[24] Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS et al. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. J Allergy Clin Immunol 2003;112(5):973-80

[25] Jentsch-Ullrich K, Koenigsmann M, Mohren M, Franke A. Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults--a monocentric German study. Clin Immunol 2005;116(2):192-7

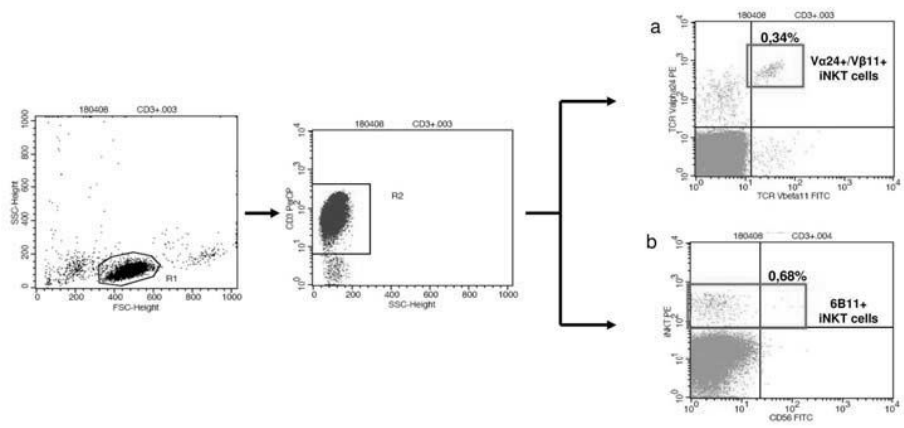


Figure 1. Sample scatter plots illustrating the identification of whole blood iNKT cell populations. After gating on the lymphocyte population (identified by forward and side light scatter) and CD3+ lymphocytes (T cells), iNKT cells were identified and quantified by co-expression of TCRV α 24 and TCRV β 11 (a) and by the expression of 6B11 (b).
254x190mm (200 x 200 DPI)

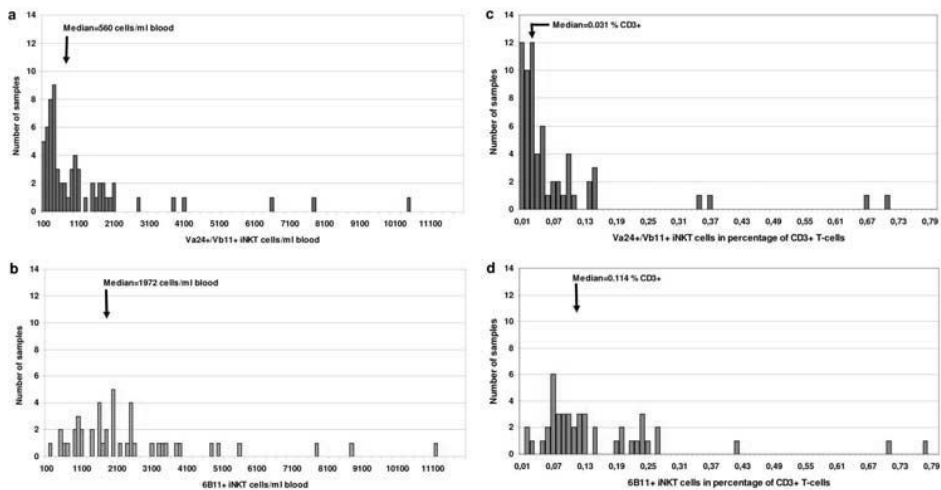


Figure 2. iNKT cell populations were identified and quantified in 64 (a,c) and 45 (b,d) healthy children based on co-expression of TCRV α 24 and TCRV β 11 (a,c) and expression of 6B11 (b,d) on CD3+ T cells. The frequency of results is shown. (a, b) absolute iNKT cell numbers /ml blood rounded to 2 decimal places. (c,d) iNKT cells in percentage of CD3+ T-cells.
254x190mm (200 x 200 DPI)

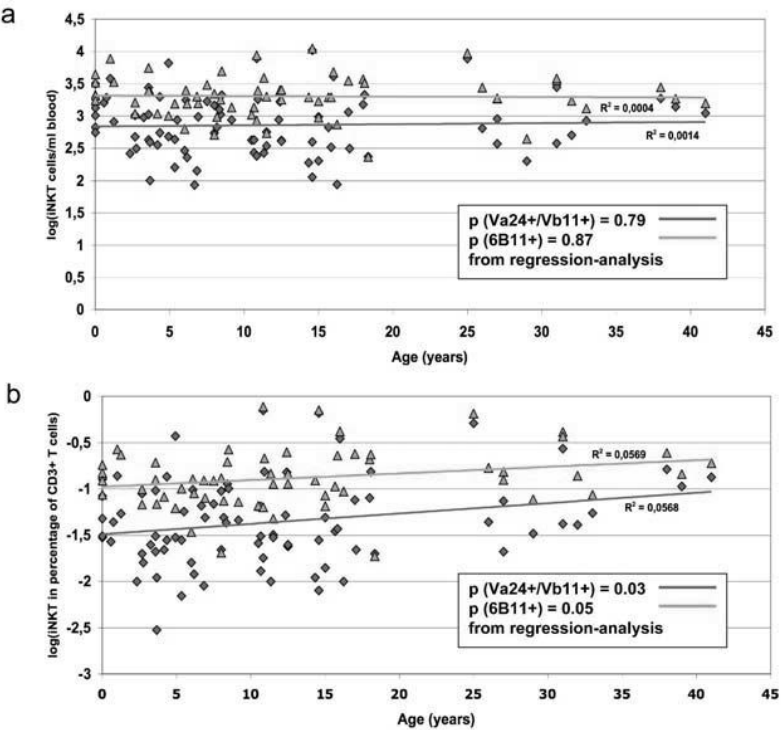


Figure 3. Results of iNKT cell analysis in children plotted in relation to age shown after log transformation along with the results of the cord blood samples and the adult control group. (a) iNKT cells/ml blood and (b) iNKT cells in percentage of CD3+ T-cells. (♦) Va24+/Vb11+ iNKT cells,(Δ) 6B11+ iNKT cells.

254x190mm (400 x 400 DPI)

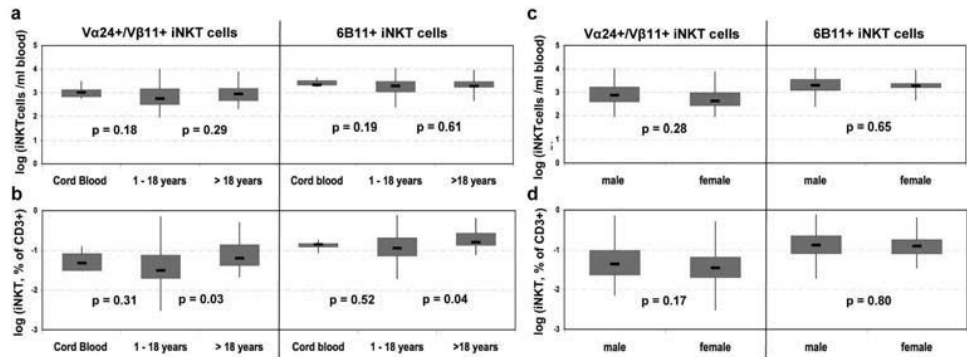


Figure 4. Comparison of iNKTcell numbers between cord blood , pediatric (age 1-18 years) and adult (age >19 years) samples (a,b) and between male and female samples (c,d). Absolute numbers of iNKT cells/ml blood (a,c) and iNKT cells in percentage of CD3+ T cells (b,d).

254x190mm (200 x 200 DPI)

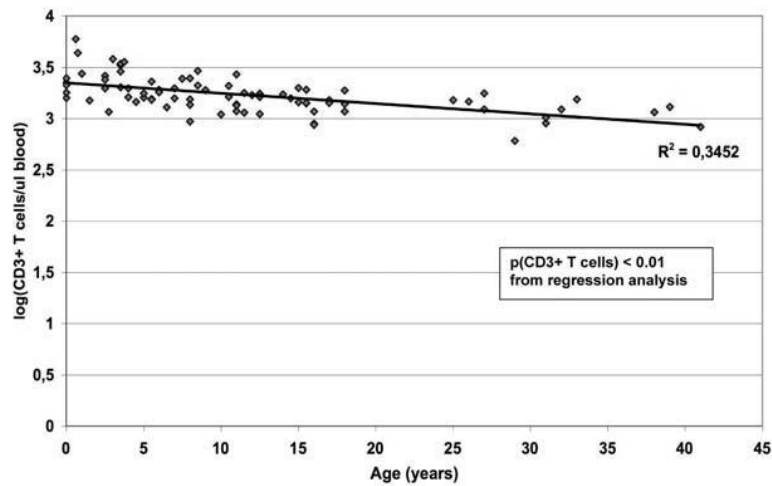


Figure 5. Results of CD3+ T cell analysis plotted in relation to age shown after log transformation.
254x190mm (200 x 200 DPI)

Table 1a. iNKT cell reference values in children

Staining	CD3+/Va24+/Vβ11+	CD3+/6B11+
N	64	46
in % CD3	0.031	0.114
	0.076	0.160
	0.008 – 0.374	0.021 – 0.712
	0.004 – 0.340	0.026 – 0.548
/cm3	560	1972
	1237	2562
	100 - 6624	515 – 8762
	76 - 5764	411 - 9003

Reference values for iNKT cells were generated for children with two different staining methods. Values are presented as median, mean, normal range after exclusion of outliers and normal range calculated after log-transformation (top down).

Table 1b. Reference values for iNKT cells in the adult control group

Staining	CD3+/Va24+/Vβ11+	CD3+/6B11+
N	12	12
in % CD3	0.065	0.161
	0.125	0.230
	0.010 – 0.527	0.052 – 0.676
/cm3	879	1892
	1572	2770
	127 - 6898	506 – 9331

Values are presented as median, mean and normal range calculated after log-transfoirmation (top down).

2.7 Ausblick

Bei der Betrachtung des NK-Zellrepertoires von PB und CB konnten im Rahmen dieser Arbeit Unterschiede herausgearbeitet werden. Dabei ist das adulte NK-Zellrepertoire in Funktion und Struktur spezifisch an das eigene HLA-Klasse I angepasst, wohingegen das neonatale Repertoire diese strukturelle Anpassung vermissen lässt. Doch welche Faktoren führen zu der Adaption? Eine Vermutung ist, dass virale Infektionen, denen wir im Laufe der Kindheit ausgesetzt sind, sowie die individuelle immunologische Erfahrung, eine Rolle spielen. So wurde kürzlich bekannt, dass virale Infektionen zu einer langanhaltenden Expansion spezifischer Klone führen können.

Eine spezifische Expansion der funktional adaptierten Zellen, also der Zellen, die während einer Infektion tätig geworden sind, könnte demnach zur Ausbildung eines spezifischen Repertoires führen? Um diese Vermutung zu bestätigen, wäre es sinnvoll den immunologischen Status an einer Kohorte zu überprüfen, z.B. hinsichtlich einer CMV-Infektion. Sollte es sich bestätigen, dass die Zahl oder Art der viralen Infektionen eine Rolle bei der Ausbildung des Repertoires spielen, sollten solche Individuen mit vielen Infektionen ein stärker angepasstes Repertoire haben als die Menschen, die beispielsweise CMV-negativ sind oder nur wenigen Infektionen ausgesetzt waren.

Am besten lässt sich diese Entwicklung bei Kindern nachvollziehen. Wann fängt die Adaption an, wann expandieren die spezifischen NK-Zellen und wie entwickelt sich das Repertoire im Laufe der Kindheit und Pubertät? Des Weiteren wäre es interessant zu beobachten, ob diese Entwicklung eines sich optimierenden Repertoires bis ins hohe Alter anhält.

Durch die Entwicklung neuer Antikörper oder der Analyse auf Transkriptebeine sollte der Frage nachgegangen werden, welche Rolle die stimulatorischen KIR in der Regulation des KIR-Repertoires spielen. Es ist durchaus möglich, dass die Spezifität und Aktivierung von NK-Zellen vielleicht durch die Koexpression stimulatorischer KIR reguliert wird. Auch der Einfluss anderer Faktoren auf das KIR-Repertoire, wie Alter oder Geschlecht der Spender, sollten an einer höheren Probenanzahl analysiert werden. Schlussendlich sind noch viele Fragen offen, die die Expression und Regulation der KIR-Rezeptoren betreffen.

3 Literatur

- Andersson, S., Fauriat, C., Malmberg, J. A., Ljunggren, H. G., and Malmberg, K. J.: KIR acquisition probabilities are independent of self-HLA class I ligands and increase with cellular KIR expression. *Blood*. 114: 95-104. Epub 2009 Mar 20., 2009
- Anfossi, N., Andre, P., Guia, S., Falk, C. S., Roetynck, S., Stewart, C. A., Bresó, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., Romagne, F., Ugolini, S., and Vivier, E.: Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*. 25: 331-42., 2006
- Biassoni, R., Cantoni, C., Pende, D., Sivori, S., Parolini, S., Vitale, M., Bottino, C., and Moretta, A.: Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol Rev* 181: 203-14, 2001
- Blom, B. and Spits, H.: Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol*. 24: 287-320., 2006
- Boyton, R. J. and Altmann, D. M.: Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease. *Clin Exp Immunol*. 149: 1-8., 2007
- Carrington, M. and Martin, M. P.: The impact of variation at the KIR gene cluster on human disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 298: 225-57., 2006
- Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chavez, R., and Lascurain, R.: Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol*. 6: 15-25., 2009
- Colonna, M., Borsellino, B., Falco, M., Ferrara, B., and Strominger, J.: HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90: 12000-12004, 1993
- Colonna, M. and Samaridis, J.: Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science* 268: 405-408, 1995
- Cooley, S., Trachtenberg, E., Bergemann, T. L., Saeteurn, K., Klein, J., Le, C. T., Marsh, S. G., Guethlein, L. A., Parham, P., Miller, J. S., and Weisdorf, D. J.: Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*. 113: 726-32., 2009
- Cooley, S., Xiao, F., Pitt, M., Gleason, M., McCullar, V., Bergemann, T. L., McQueen, K. L., Guethlein, L. A., Parham, P., and Miller, J. S.: A subpopulation of human peripheral blood NK cells that lacks inhibitory receptors for self-MHC is developmentally immature. *Blood*. 110: 578-86., 2007
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., and Caligiuri, M. A.: The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 22: 633-40., 2001
- Cullen, S. P. and Martin, S. J.: Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ*. 15: 251-62., 2008
- D'Andrea, A., Chang, C., Franz-Bacon, K., McClanahan, T., Phillips, J., and Lanier, L.: Molecular cloning of NKB1. A natural killer cell receptor for HLA-B allotypes. *J Immunol*. 155: 2306-2310, 1995
- Dalle, J. H., Menezes, J., Wagner, E., Blagdon, M., Champagne, J., Champagne, M. A., and Duval, M.: Characterization of cord blood natural killer cells: implications for transplantation and neonatal infections. *Pediatr Res*. 57: 649-55., 2005
- Denis, L., Sivula, J., Gourraud, P. A., Kerdudou, N., Chout, R., Ricard, C., Moisan, J. P., Gagne, K., Partanen, J., and Bignon, J. D.: Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Reunion. *Tissue Antigens*. 66: 267-76., 2005

- Dohring, C., Scheidegger, D., Samaridis, J., Cella, M., and Colonna, M.: A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J Immunol.* 156: 3098-101., 1996
- Elliott, J. M., Wahle, J. A., and Yokoyama, W. M.: MHC class I-deficient natural killer cells acquire a licensed phenotype after transfer into an MHC class I-sufficient environment. *J* 207: 2073-9., 2010
- Fan, Y. Y., Yang, B. Y., and Wu, C. Y.: Phenotypic and functional heterogeneity of natural killer cells from umbilical cord blood mononuclear cells. *Immunol Invest.* 37: 79-96., 2008
- Faure, M. a. L., EO: KIR2DL4 (CD158d), an NK Cell-Activating Receptor with Inhibitory Potential. *J Immunol.* 168: 6208-6214, 2002
- Fauriat, C., Long, E. O., Ljunggren, H. G., and Bryceson, Y. T.: Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 115: 2167-76, 2009
- Fernandez, N. C., Treiner, E., Vance, R. E., Jamieson, A. M., Lemieux, S., and Raulet, D. H.: A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood.* 105: 4416-23., 2005
- 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.: 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., 2007
- Frohn, C., Schlenke, P., and Kirchner, H.: The repertoire of HLA-Cw-specific NK cell receptors CD158 a/b (EB6 and GL183) in individuals with different HLA phenotypes. *Immunology.* 92: 567-70., 1997
- Gaddy, J. and Broxmeyer, H. E.: Cord blood CD16+56- cells with low lytic activity are possible precursors of mature natural killer cells. *Cell Immunol.* 180: 132-42., 1997
- Gaddy, J., Risdon, G., and Broxmeyer, H. E.: Cord blood natural killer cells are functionally and phenotypically immature but readily respond to interleukin-2 and interleukin-12. *J Interferon Cytokine Res.* 15: 527-36., 1995
- Gardiner, C., Guethlein, L., Shilling, H., Pando, M., Carr, W., Rajalingam, R., Vilches, C., and Parham, P.: Different NK Cell Surface Phenotypes Defined by the DX9 Antibody Are Due to KIR3DL1 Gene Polymorphism. *J Immunol.* 166: 2992-3001, 2001
- Giebel, S., Locatelli, F., Lamparelli, T., Velardi, A., Davies, S., Frumento, G., Maccario, R., Bonetti, F., Wojnar, J., Martinetti, M., Frassoni, F., Giorgiani, G., Bacigalupo, A., and Holowiecki, J.: Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood.* 102: 814-9, 2003
- Gomez-Lozano, N., Trompeter, H. I., de Pablo, R., Estefania, E., Uhrberg, M., and Vilches, C.: Epigenetic silencing of potentially functional KIR2DL5 alleles: Implications for the acquisition of KIR repertoires by NK cells. *Eur J Immunol.* 37: 1954-65., 2007
- Graef, T., Moesta, A. K., Norman, P. J., Abi-Rached, L., Vago, L., Older Aguilar, A. M., Gleimer, M., Hammond, J. A., Guethlein, L. A., Bushnell, D. A., Robinson, P. J., and Parham, P.: KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced specificity for HLA-A*11 while diminishing avidity for HLA-C. *J Exp Med.* 206: 2557-72., 2009
- Grzywacz, B., Kataria, N., Blazar, B. R., Miller, J. S., and Verneris, M. R.: Natural killer cell differentiation by myeloid progenitors. *Blood* 2010: 20, 2010
- Gumperz, J., Litwin, V., Phillips, J., Lanier, L., and Parham, P.: The Bw4 Public Epitope of HLA-B Molecules Confers Reactivity with Natural Killer Cell Clones that Express NKB1, A Putative HLA Receptor. *J Exp Med.* 181: 1133-1144, 1995

- Gumperz, J. E., Valiante, N. M., Parham, P., Lanier, L. L., and Tyan, D.: 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., 1996
- Hansasuta, P., Dong, T., Thananchai, H., Weekes, M., Willberg, C., Aldemir, H., Rowland-Jones, S., and Braud, V. M.: Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur J Immunol.* 34: 1673-9., 2004
- Harrison, R. J., Ettorre, A., Little, A. M., and Khakoo, S. I.: Association of NKG2A with treatment for chronic hepatitis C virus infection. *Clin* 161: 306-14., 2010
- Held, W., Dorfman, J. R., Wu, M. F., and Raulet, D. H.: Major histocompatibility complex class I-dependent skewing of the natural killer cell Ly49 receptor repertoire. *Eur J Immunol.* 26: 2286-92., 1996
- Herberman, R. B., Nunn, M. E., Holden, H. T., and Lavrin, D. H.: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer.* 16: 230-9., 1975
- Hiby, S. E., Walker, J. J., O'Shaughnessy K, M., Redman, C. W., Carrington, M., Trowsdale, J., and Moffett, A.: Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med.* 200: 957-65., 2004
- Hoshina, T., Kida, K., and Ito, M.: Difference in response of NK cell activity in newborns and adult to IL-2, IL-12 and IL-15. *Microbiol Immunol* 43: 161-6, 1999
- Hsu, K., Liu, X., Selvakumar, A., Mickelson, E., O'Reilly, R., and Dupont, B.: Killer Ig-Like Receptor Haplotype Analysis by Gene Content: Evidence for Genomic Diversity with a Minimum of Six Basic Framework Haplotypes, Each with Multiple Subsets. *J Immunol.* 169: 5118-5129, 2002
- Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., Sykora, K., and Schmidt, R.: CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol.* 31: 3121-3126, 2001
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. J.: Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin, 2002
- Jiang, K., Zhu, F. M., Lv, Q. F., and Yan, L. X.: Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the Chinese Han population. *Tissue Antigens.* 65: 556-63., 2005
- Joncker, N. T., Shifrin, N., Delebecque, F., and Raulet, D. H.: Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment. *J* 207: 2065-72, 2010
- Karre, K.: How to recognize a foreign submarine. *Immunol Rev.* 155: 5-9, 1997
- Khakoo, S. I., Thio, C. L., Martin, M. P., Brooks, C. R., Gao, X., Astemborski, J., Cheng, J., Goedert, J. J., Vlahov, D., Hilgartner, M., Cox, S., Little, A. M., Alexander, G. J., Cramp, M. E., O'Brien, S. J., Rosenberg, W. M., Thomas, D. L., and Carrington, M.: HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science.* 305: 872-4., 2004
- Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., and Wigzell, H.: "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol.* 5: 117-21., 1975
- 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.: Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature.* 436: 709-13., 2005

- Lanier, L., Chang, C., Azuma, M., Ruitenberg, J., Hemperly, J., and Phillips, J.: Molecular and Functional Analysis of Human Natural Killer Cell-associated Neural Cell Adhesion Molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol.* 146: 4421-4426, 1991
- Le Garff-Tavernier, M., Beziat, V., Decocq, J., Siguret, V., Gandjbakhch, F., Pautas, E., Debre, P., Merle-Beral, H., and Vieillard, V.: Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging* 9: 527-35., 2010
- Lepin, E. J., Bastin, J. M., Allan, D. S., Roncador, G., Braud, V. M., Mason, D. Y., van der Merwe, P. A., McMichael, A. J., Bell, J. I., Powis, S. H., and O'Callaghan, C. A.: Functional characterization of HLA-F and binding of HLA-F tetramers to ILT2 and ILT4 receptors. *Eur J Immunol.* 30: 3552-61., 2000
- Lieberman, J.: The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol.* 3: 361-70., 2003
- Ljunggren, H. and Karre, K.: In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 12: 237-244, 1990
- Long, E.: Regulation of Immune Responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol.* 17: 875-904, 1999
- Lord, S. J., Rajotte, R. V., Korbitt, G. S., and Bleackley, R. C.: Granzyme B: a natural born killer. *Immunol Rev.* 193: 31-8., 2003
- Lutz, C. T., Moore, M. B., Bradley, S., Shelton, B. J., and Lutgendorf, S. K.: Reciprocal age related change in natural killer cell receptors for MHC class I. *Mech Ageing Dev.* 126: 722-31., 2005
- Male, V., Hughes, T., McClory, S., Colucci, F., Caligiuri, M. A., and Moffett, A.: Immature NK Cells, Capable of Producing IL-22, Are Present in Human Uterine Mucosa. *J Immunol* 2010: 27, 2010
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T. I., Bushkin, Y., Davis, D. M., Strominger, J. L., Yewdell, J. W., and Porgador, A.: Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409: 1055-60, 2001
- Marsh, S., Parham, P., Dupont, B., Geraghty, D., Trowsdale, J., Middleton, D., Vilches, C., Carrington, M., Witt, C., Guethlein, L., Shilling, H., Garcia, C., Hsu, K., and Wain, H.: Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Immunogenetics* 55: 220-226, 2003
- Martin, M. P., Gao, X., Lee, J. H., Nelson, G. W., Detels, R., Goedert, J. J., Buchbinder, S., Hoots, K., Vlahov, D., Trowsdale, J., Wilson, M., O'Brien, S. J., and Carrington, M.: Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet.* 31: 429-34, 2002
- Miller, J. S., Cooley, S., Parham, P., Farag, S. S., Verneris, M. R., McQueen, K. L., Guethlein, L. A., Trachtenberg, E. A., Haagensohn, M., Horowitz, M. M., Klein, J. P., and Weisdorf, D. J.: Missing KIR ligands are associated with less relapse and increased graft-versus-host disease (GVHD) following unrelated donor allogeneic HCT. *Blood.* 109: 5058-61., 2007
- Miller, J. S. and McCullar, V.: Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2. *Blood.* 98: 705-13., 2001
- Moesta, A. K., Graef, T., Abi-Rached, L., Older Aguilar, A. M., Guethlein, L. A., and Parham, P.: Humans differ from other hominids in lacking an activating NK cell receptor that recognizes the C1 epitope of MHC class I. *J* 185: 4233-7., 2010
- Moesta, A. K., Norman, P. J., Yawata, M., Yawata, N., Gleimer, M., and Parham, P.: Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J Immunol.* 180: 3969-79., 2008

- Moffett, A. and Hiby, S. E.: How Does the maternal immune system contribute to the development of pre-eclampsia? *Placenta*. 28: S51-6., 2007
- Moretta, L., Ferlazzo, G., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Mingari, M. C., and Moretta, A.: Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol Rev* 214: 219-28, 2006
- Nelson, G. W., Martin, M. P., Gladman, D., Wade, J., Trowsdale, J., and Carrington, M.: Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. *J Immunol*. 173: 4273-6., 2004
- Norman, P., Carrington, C., Byng, M., Maxwell, L., Curran, M., Stephens, H., Chandanayingyong, D., Verity, D., Hameed, K., Ramdath, D., and Vaughan, R.: Natural killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) locus profiles in African and South Asian populations. *Genes Immun*. 3: 86-95, 2002
- Orr, M. T., Murphy, W. J., and Lanier, L. L.: 'Unlicensed' natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection. *Nat Immunol*: 28, 2010
- Pende, D., Biassoni, R., Cantoni, C., Verdiani, S., Falco, M., di Donato, C., Accame, L., Bottino, C., Moretta, A., and Moretta, L.: The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J Exp Med*. 184: 505-18., 1996
- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A.: Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med*. 190: 1505-1516, 1999
- Pogge von Strandmann, E., Simhadri, V. R., von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K. S., Hansen, H. P., Rothe, A., Boll, B., Simhadri, V. L., Borchmann, P., McKinnon, P. J., Hallek, M., and Engert, A.: Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity*. 27: 965-74., 2007
- Rajagopalan, S. a. L., EO: A Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-G-specific Receptor Expressed on All Natural Killer Cells. *J Exp Med*. 189: 1093-1099, 1999
- Rajalingam, R., Krausa, P., Shilling, H., Stein, J., Balamurugan, A., McGinnis, M., Cheng, N., Mehra, N., and Parham, P.: Distinctive KIR and HLA diversity in a panel of north Indian Hindus. *Immunogenetics* 53: 1009-1019, 2002
- Raulet, D. H. and Vance, R. E.: Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol*. 6: 520-31., 2006
- Ruggeri, L., Mancusi, A., Capanni, M., Urbani, E., Carotti, A., Aloisi, T., Stern, M., Pende, D., Perruccio, K., Burchielli, E., Topini, F., Bianchi, E., Aversa, F., Martelli, M. F., and Velardi, A.: Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood*. 110: 433-40., 2007
- Ruggeri, L., Mancusi, A., Perruccio, K., Burchielli, E., Martelli, M. F., and Velardi, A.: Natural killer cell alloreactivity for leukemia therapy. 1997). 28: 175-82., 2005
- Santourlidis, S., Graffmann, N., Christ, J., and Uhrberg, M.: Lineage-specific transition of histone signatures in the killer cell Ig-like receptor locus from hematopoietic progenitor to NK cells. *J Immunol*. 180: 418-25., 2008
- Santourlidis, S., Trompeter, H. I., Weinhold, S., Eisermann, B., Meyer, K. L., Wernet, P., and Uhrberg, M.: 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., 2002

- Schellekens, J., Rozemuller, E. H., Petersen, E. J., van den Tweel, J. G., Verdonck, L. F., and Tilanus, M. G.: Patients benefit from the addition of KIR repertoire data to the donor selection procedure for unrelated haematopoietic stem cell transplantation. *Mol Immunol.* 45: 981-9., 2008
- Schönberg, K., Sribar, M., Enczmann, J., Fischer, J. C., and Uhrberg, M.: Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood.* 117: 98-107., 2011
- Selvakumar, A., Steffens, U., and Dupont, B.: NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains. *Tissue Antigens* 48: 285-294, 1996
- Shilling, H., Guethlein, L., Cheng, N., Gardiner, C., Rodriguez, R., Tyan, D., and Parham, P.: Allelic Polymorphism Synergizes with Variable Gene Content to Individualize Human KIR Genotype. *J Immunol.* 168: 2307-2315, 2002a
- Shilling, H., Young, N., Guethlein, L., Cheng, N., Gardiner, C., Tyan, D., and Parham, P.: Genetic Control of Human NK Cell Repertoire. *J Immunol.* 169: 239-247, 2002b
- Shilling, H. G., McQueen, K. L., Cheng, N. W., Shizuru, J. A., Negrin, R. S., and Parham, P.: Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 101: 3730-40. , 2003
- Sivori, S., Carlomagno, S., Falco, M., Romeo, E., Moretta, L., and Moretta, A.: Natural killer cells expressing the KIR2DS1 activating receptor efficiently kill T cell blasts and dendritic cells: implications in haploidentical HSCT. *Blood* 2011: 25, 2011
- Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A.: p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med.* 186: 1129-1136, 1997
- Sobecks, R. M., Ball, E. J., Maciejewski, J. P., Rybicki, L. A., Brown, S., Kalaycio, M., Pohlman, B., Andresen, S., Theil, K. S., Dean, R., and Bolwell, B. J.: Survival of AML patients receiving HLA-matched sibling donor allogeneic bone marrow transplantation correlates with HLA-Cw ligand groups for killer immunoglobulin-like receptors. *Bone Marrow Transplant.* 39: 417-24., 2007
- Stern, M., de Angelis, C., Urbani, E., Mancusi, A., Aversa, F., Velardi, A., and Ruggeri, L.: Natural killer-cell KIR repertoire reconstitution after haploidentical SCT. *Bone Marrow Transplant:* 22, 2010
- Stewart, C., Laugier-Anfossi, F., Vely, F., Saulquin, X., Riedmuller, J., Tisserant, A., Gauthier, L., Romagne, F., Ferracci, G., Arosa, F., Moretta, A., Sun, P., Ugolini, S., and Vivier, E.: Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 13224-13229, 2005
- Sundstrom, Y., Nilsson, C., Lilja, G., Karre, K., Troye-Blomberg, M., and Berg, L.: The expression of human natural killer cell receptors in early life. *Scand J Immunol.* 66: 335-44., 2007
- Sutherland, C. L., Chalupny, N. J., and Cosman, D.: The UL16-binding proteins, a novel family of MHC class I-related ligands for NKG2D, activate natural killer cell functions. *Immunol Rev.* 181: 185-92., 2001
- Szabo, E., Rampalli, S., Risueno, R. M., Schnerch, A., Mitchell, R., Fiebig-Comyn, A., Levadoux-Martin, M., and Bhatia, M.: Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature.* 468: 521-6., 2010
- Tanaka, H., Kai, S., Yamaguchi, M., Misawa, M., Fujimori, Y., Yamamoto, M., and Hara, H.: Analysis of natural killer (NK) cell activity and adhesion molecules on NK cells from umbilical cord blood. *Eur J Haematol.* 71: 29-38., 2003

- Toneva, M., Lepage, V., Lafay, G., Dulphy, N., Busson, M., Lester, S., Vu-Trien, A., Michaylova, A., Naumova, E., McCluskey, J., and Charron, D.: Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. *Tissue Antigens* 57: 358-362, 2001
- Trompeter, H. I., Gomez-Lozano, N., Santourlidis, S., Eisermann, B., Wernet, P., Vilches, C., and Uhrberg, M.: 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., 2005
- Trowsdale, J.: Genetic and Functional Relationships between MHC and NK Receptor Genes. *Immunity* 15: 363-374, 2001
- Trowsdale, J. and Moffett, A.: NK receptor interactions with MHC class I molecules in pregnancy. *Semin Immunol.* 20: 317-20., 2008
- Uhrberg, M.: The KIR gene family: life in the fast lane of evolution. *Eur J Immunol.* 35: 10-15, 2005
- Uhrberg, M., Parham, P., and Wernet, P.: Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics* 54(4): 221 -229, 2002
- Uhrberg, M., Valiante, N. M., Shum, B. P., Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyan, D., Lanier, L. L., and Parham, P.: Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity.* 7: 753-63., 1997
- Vales-Gomez, M., Reyburn, H., and Strominger, J.: Molecular analyses of the interactions between human NK receptors and their HLA ligands. *Hum Immunol.* 61: 28-38, 2000
- 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.: Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity.* 7: 739-51., 1997
- Verneris, M. R. and Miller, J. S.: The phenotypic and functional characteristics of umbilical cord blood and peripheral blood natural killer cells. *Br J Haematol.* 147: 185-91., 2009
- Vilches, C. and Parham, P.: KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 20: 217-51, 2002
- Vilches, C., Rajalingam, R., Uhrberg, M., Gardiner, C., Young, N., and Parham, P.: KIR2DL5, a Novel Killer-Cell Receptor with a D0-D2 Configuration of Ig-Like Domains. *J Immunol.* 164: 5797-5804, 2000
- Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L., and Moretta, A.: NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med.* 187: 2065-2072, 1998
- Vitale, M., Castriconi, R., Parolini, S., Pende, D., Hsu, M. L., Moretta, L., Cosman, D., and Moretta, A.: The leukocyte Ig-like receptor (LIR)-1 for the cytomegalovirus UL18 protein displays a broad specificity for different HLA class I alleles: analysis of LIR-1 + NK cell clones. *Int Immunol.* 11: 29-35., 1999
- Voskoboinik, I., Dunstone, M. A., Baran, K., Whisstock, J. C., and Trapani, J. A.: Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol* 235: 35-54., 2010
- Wang, Y. Y., Xu, H., Zheng, X. D., Wei, H. M., Sun, R., and Tian, Z. G.: High Expression of NKG2A/CD94 and Low Expression of Granzyme B Are Associated with Reduced Cord Blood NK Cell Activity. *Cell Mol Immunol.* 4: 377-82., 2007

- Wilson, M., Torkar, M., Haude, A., Milne, S., Jones, T., Sheer, D., Beck, S., and Trowsdale, J.: Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 4778-4783, 2000
- Winter, C. C., Gumperz, J. E., Parham, P., Long, E. O., and Wagtmann, N.: Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol.* 161: 571-7., 1998
- Wu, M. F. and Raulet, D. H.: Class I-deficient hemopoietic cells and nonhemopoietic cells dominantly induce unresponsiveness of natural killer cells to class I-deficient bone marrow cell grafts. *J Immunol.* 158: 1628-33., 1997
- Yawata, M., Yawata, N., Draghi, M., Little, A. M., Partheniou, F., and Parham, P.: Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med.* 203: 633-45., 2006
- Yawata, M., Yawata, N., Draghi, M., Partheniou, F., Little, A. M., and Parham, P.: MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response. *Blood.* 112: 2369-80., 2008
- Yawata, M., Yawata, N., McQueen, K., Cheng, N., Guethlein, L., Rajalingam, R., Shilling, H., and Parham, P.: Predominance of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression. *Immunogenetics* 54: 543-550, 2002
- Yokoyama, W. M. and Kim, S.: How do natural killer cells find self to achieve tolerance? *Immunity.* 24: 249-57., 2006
- Young, N. T. and Uhrberg, M.: KIR expression shapes cytotoxic repertoires: a developmental program of survival. *Trends Immunol.* 23: 71-5., 2002

4 Lebenslauf

Dipl.-Biol. Kathrin Schönberg

Persönliche Angaben

Geburtsdatum und -ort: 01.08.1982 in Düsseldorf
Familienstand: ledig

Hochschulstudium

01/2007-06/2011 Promotionsstudium am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Thema: "Expression und Regulation der KIR-Rezeptoren auf humanen Natürlichen Killerzellen"

10/2001 – 12/2006 Studium der Biologie (Diplom) an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
Thema der Diplomarbeit: „Analyse des KIR Repertoires auf NK-Zellen zur Untersuchung der Mechanismen zur Toleranzinduktion“
Abschluss: Diplom-Biologin (Note 1,8)

Schulausbildung

08/1992 – 07/2001 Humboldt-Gymnasium, Düsseldorf
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note 1,6)

08/1988– 07/1992 Joachim-Neander-Gemeinschaftsgrundschule, Düsseldorf

5 Publikationen im Rahmen der Doktorarbeit

5.1 Veröffentlichungen

Uhrberg, M., **Schönberg, K.**, Weinhold, S., and Trompeter, H. I.: Non-viral gene delivery into primary natural killer lymphocytes. *Faseb J.* 20: 2660., 2006

Schönberg, K., Trompeter, H. I., and Uhrberg, M.: Delivery of DNA into natural killer cells for immunotherapy. *Methods Mol Biol.* 423: 165-72., 2008

Rathmann, S., Glatzel, S., **Schönberg, K.**, Uhrberg, M., Follo, M., Schulz-Huotari, C., Kaymer, M., Veelken, H., Finke, J., and Fisch, P.: Expansion of NKG2A-LIR1- natural killer cells in HLA-matched, killer cell immunoglobulin-like receptors/HLA-ligand mismatched patients following hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 16: 469-81., 2010

Schönberg, K., Sribar, M., Enczmann, J., Fischer, J. C., and Uhrberg, M.: Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood.* 117: 98-107., 2011

Schönberg, K., Hejazi, M., and Uhrberg, M.: Clonal analysis of NK cell effector functions by multi-parameter flow cytometry. *Methods Mol Biol.* in press, 2011

Schönberg, K., Fischer, J. C., Kögler, G., and Uhrberg, M.: Neonatal NK cell repertoires are functionally but not structurally biased towards recognition of self HLA class I. *Blood* 2011

Bisher noch nicht veröffentlichte Publikationen:

Bienemann, K., Iouannidou, K., **Schönberg, K.**, Reuther, S., Feyen, O., Huck, K., Schuster, F., Uhrberg, M., Laws, H., and Borkhardt, A.: iNKT cell reference values in healthy children and adolescents, *submitted*

Poertner, L., **Schönberg, K.**, Uhrberg, M., Bruennert, D., Reusch, U., Littel, M., Haas, R., and Neumann, F.: T and NK cells of patients with B cell NHL exert cytotoxic function against lymphoma cells following binding of the respective bispecific tetravalent antibody CD19 X CD3 or CD19 X CD16, *Manuskript*

5.2 Kongressbeiträge, Poster und Vorträge

Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses 2007

22.06.2007 Düsseldorf

Vortrag: „Entwicklung und Diversität der Natürlichen Killerzellen im neonatalen und adulten Immunsystem“

37th Annual Meeting of the German Society for Immunology

05.-08-09.2007 Heidelberg

Vortrag und Poster: “Correlation of KIR expression and presence of HLA-C ligands in adult but not neonatal NK cells: transition from a naive to an adult NK cell repertoire”

Regenerative medicine Era Stem conference 2007

08.-10.11.2007 Timisoara (Rumänien)

Workshop: “Nucleofection of NK cells”

Zum Vortrag eingeladen: “NK cells and their receptors”

Natural Killer Cell Symposium 2008

21.-23-05.2008 Bad Herrenalb

Poster: “Correlation of KIR expression and presence of HLA-C ligands in adult but not neonatal NK cells”

Reisestipendium erhalten

2nd European Congress of Immunology (ECI)

13.-16.09.2009 Berlin

Poster: “Functional maturation and structural adaption of NK cell repertoires in response to HLA class I ligands during human development”

Vortrag: “KIR Repertoire of NK cells from neonatal, pediatric and adult blood”

Reisestipendium erhalten

Natural Killer Cell Symposium 2009

04.11.-06.11.2009 Freiburg

Poster: “Differential influence of group A and group B KIR haplotypes on HLA-C-specific NK cell repertoires”

6 Danksagung

Mein allererster und großer Dank gilt Prof. Dr. Markus Uhrberg, der meine Arbeit betreut hat und mir die Möglichkeit gegeben hat an diesem interessanten Thema und in seiner tollen Gruppe zu arbeiten, und der mich stets gefördert und gefordert hat. Die (oft nicht kurzen) Diskussionen mit ihm haben meine Arbeit bereichert.

Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei Prof. Dr. D. Willbold aus der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät für die Übernahme des Korreferats.

Danke an Johannes Fischer für die Möglichkeit am ITZ unter seiner kommissarischen Leitung meine Doktorarbeit anfertigen zu können. Vielen Dank für die Einweisung in die große Welt der Durchflusszytometrie und der Hilfe bei der Statistik. Ich danke den Mitarbeitern des HLA-Labors unter der Leitung von Jürgen Enczmann für das Benutzen der PCR-Maschinen, die Überlassung von Blutproben, Typisierungen und die vielen kleinen Gefälligkeiten. Desweiteren bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Gesine Kögler für die vielen Nabelschnurblute, die sie mir überlassen hat.

Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Borkhardt und Kasiani Ioannidou für die Möglichkeit bei einem gemeinsamen Projekt auch das Blut von Kindern untersuchen zu können. In Frankfurt bedanke ich mich bei Torsten Tonn & Gabi Spohn für das Schicken von unzähligen Buffy Coats.

Mein Dank gilt auch Katharina Raba für diverse Antworten, was die Durchflusszytometrie angeht. Danke, dass Du durch deine Anwesenheit den Canto am Laufen gehalten hast ;-)

Meine Arbeit hätte mir nicht so viel Spaß gemacht, wären nicht zahlreiche nette Kollegen zu Freunden geworden.

Liebe Angie, danke für die gemeinsamen Tage (und auch die Nächte) im Büro und Labor, die das Arbeiten angenehm gemacht haben. Danke auch für die nachmittägliche Schokoladenration und das unermüdliche Finden von doppelten Leerzeichen und Fehlern in dieser Arbeit. Ich wünsche Dir viel Glück mit deinen microRNAs.

Maryam ☺ ein großes Dankeschön geht an Dich. Für mich warst du die beste Diplomandin, die man sich vorstellen kann, die auch eine sehr gute Doktorandin (und Mama) sein wird ☺ viel Erfolg bei Deinen Arbeiten!

Danke, dass ihr beiden immer auf meiner Seite standet, meine gute Laune geteilt habt und das Arbeiten mit euch so einfach und gut war.

Julia ☺ die beste TA der Welt, die uns leider verlassen hat, bevor ich fertig wurde, aber mir vorher alles gezeigt hat, was ich wo in den Laboren finde.

Sandra, Nina, Jens (Kekschen?), Xiaoyi, Rui, danke für die vielen nette Stunden im Labor, die gute Laune und die gemeinsame Zeit, sowie die Nikolaus-Waffelessen mit Glühwein auf dem Gang, Cocktail-Abende und, und, und☺.

Ein ganz besonderer Dank an ein paar Ex-Doktoranden des ITZ:

Martina (Frau Nachbarin), Jin (die Apothekerin meines Vertrauens), Sabine (Wir müssen am Wochenende zu Spaceburger). Ihr hattet Recht: Alles wird gut!

Glückwunsch, dass ihr vor mir erwachsen geworden seid und Danke für so viele Dinge: Schön, dass ihr da wart, als ich angefangen habe und ihr immer noch da seid. Für Vitamine während der Arbeit, dafür dass lange Abende im Labor nicht immer alleine verbracht werden mussten. Für die Lebenshilfe am Telefon oder einfach nur Quatschen beim Kochen und Essen oder gemeinsames Feiern (auch mal als Hasen oder Bienchen)!

Ein großer Dank geht auch an Danielle, die für Abwechslung vom Laboralltag gesorgt hat. Danke für gemeinsame Shoppingtouren auf dem Bücherbummel und in der Stadt, fürs Englisch lernen, und so vieles mehr.

Ich danke meiner Familie, meinem Vater, meiner Mutter, meinem Bruder Peter, Sarah, Tante Ulla, Onkel Heinz und Alex, sowie meinem Opa Erich und Inge: Für die Fragen, wann ich denn endlich fertig bin (jetzt!!!) und immerwährende Unterstützung, laute Familienfeiern und vieles mehr! Ihr habt an mich geglaubt, Danke!

Ein Riesendankeschön an Torsten: Danke für die schönen letzten zwei Jahre, fürs Bekochen, für die gute Laune, fürs in Ruhe lassen, wenn ich Ruhe brauchte, immerwährende Unterstützung, für Deine Geduld und Verständnis, wenn es auch mal wieder länger im Labor gedauert hat, und Dein Vertrauen in mich! Danke für alles!

Aber das größte Dankeschön geht an meine Mutter, ohne die dich die letzten 10 Jahre an der Uni nicht überstanden hätte: Danke, dass du mich immer unterstützt hast, wenn der Monat wieder zulange dauerte, für leckeres Essen am Sonntag, den Friseur und die Unterstützung während Studium und Promotion. Danke für einfach alles!

☐Ich bin immer noch verwirrt, aber auf einem höheren Niveau.☐
Enrico Fermi (1901-1954)

☐So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären, wenn man nach der Zeit und den Umständen das Möglichste getan hat.☐

Johann Wolfgang von Goethe, (1749-1832)

7 Erklärung

Hiermit erkläre ich 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 Institution eingereicht habe. Weiterhin erkläre ich, dass vorher noch keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen wurden.

Düsseldorf, den 14.04.2011

Kathrin Schönberg