

**Epigenetische Regulation
der Killerzell-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (KIR)
in Natürlichen Killerzellen und hämatopoietischen Stammzellen**

Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach molekulare Medizin des Fachbereiches Humanmedizin
der Heinrich Heine Universität Düsseldorf

2010

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Simeon Santourlidis

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung

1.1 NK-Zellen und *KIR*-Gene

1.2 Epigenetische Regulation der Genexpression

2. Eigene Untersuchungen

2.1 Die Funktion der DNA-Methylierung für die Regulation der *KIR*-Gene

2.1.1 Charakterisierung des DNA-Methylierungsstatus der *KIR*-Genpromotoren in NK-, B-, und T-Zellen sowie in hämatopoietischen Stammzellen

2.1.2 Charakterisierung der Auswirkungen der DNA-Demethylierung auf die Transkription der *KIR*-Gene und die Expression der KIR Rezeptoren in NK-Zellen.

2.2 Die Rolle der Chromatinstruktur für die *KIR*-Genaktivität

2.2.1 Entwicklung des MIRECAL (Micrococcus nuclease/real-time PCR chromatin accessibility assay with locus specificity) Nachweises.

2.2.2 Höherer Verpackungsgrad des Chromatins der inaktiven *KIR*-Genpromotoren.

2.3 Zelltypspezifische *histone code* Signaturen der *KIR*-Gene in Lymphozyten und hämatopoietischen Progenitoren.

2.4. Entwicklung eines Modells und von Hypothesen, welche die epigenetische Kontrolle der *KIR*-Gene während der NK-Zelldifferenzierung erklären.

3. Schlussfolgerungen

4. Literaturverzeichnis

5. Anlagen

1. Einleitung

1.1 NK-Zellen und *KIR*-Gene

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind eine wichtige Säule der natürlichen Immunität und spielen eine zentrale Rolle in der frühzeitigen Bekämpfung von viralen Infektionen und entarteten Zellen [1,2]. Hierbei agieren sie entsprechend der „*missing-self*“ Hypothese [3]. D.h. während sie gegenüber körpereigenen, gesunden Zellen mit einem intakten „Selbst“-MHC-Klasse I-Rezeptor-Repertoire keine zytolytische Wirkung entfalten können, sind sie in der Lage pathogene Zielzellen anhand einer reduzierten oder komplett verloren gegangenen Expression der „Selbst“-MHC-Klasse I-Rezeptoren zu erkennen, um diese anschließend vernichten zu können [4]. Beim Menschen erfolgt die Erkennung mit Hilfe von HLA-Klasse I (humane Variante der MHC Antigene)-spezifischen Rezeptoren der Genfamilie *KIR* (killer cell immunoglobulin-like receptors). Die NK-Zelle kontaktiert die Zielzelle und bei aberranter HLA-Klasse I Rezeptorkonstellation auf deren Oberfläche führt die Summe der durch die *KIR* Rezeptoren vermittelten Signale zur Auslösung der Zytolyseaktivität.

Die *KIR*-Gene befinden sich dicht aufeinanderfolgend gruppiert, innerhalb eines ca. 150 kb langen genomischen Abschnittes im 1 Mb großen Leukozyten-Repressor-Komplex (LRC) auf dem Chromosom 19q13.4 [5]. Sie bilden eine polygene und polyallelische Familie mit höchst homologen Genen, die nur in NK-Zellen und einer Subpopulation der T-Zellen zur Ausprägung kommt und dann sowohl inhibitorische als auch stimulatorische Oberflächenrezeptoren hervorbringt [6,7]. Eine Besonderheit ist, dass es dutzende verschiedene Haplotypen mit unterschiedlichem Gengehalt gibt. Nach einhelliger Hypothese trägt diese Haplotypenvielfalt zur Erweiterung des Wirkspektrums der natürlichen Immunität bei.

Wichtige strukturelle Merkmale der *KIR* Rezeptoren sind in der verwendeten Nomenklatur berücksichtigt. So gibt es Vertreter mit zwei oder drei extrazellulären Immunglobulin-Domänen, die den Namensteil 2D bzw. 3D tragen und entweder lange

zytoplasmatische Proteindomänen (L) mit inhibierend wirkenden ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) Motiven besitzen, oder aber kurze intrazelluläre Proteinabschnitte beherbergen (S), die aktivierende Signale übertragen können. Lediglich KIR2DL4 besitzt strukturelle Merkmale sowohl inhibitorischer, als auch stimulatorischer KIR. Abhängig vom Haplotyp können genomisch zwischen 6 und 13 exprimierbare *KIR*-Gene vorliegen, die untereinander, mit Ausnahme von *KIR2DL4*, eine Sequenzhomologie der Promotorregionen von über 91% aufweisen. Dies deutet darauf hin, dass ihre Expression gemeinsamen Regulationsmechanismen unterworfen sein könnte [8].

Die Expression der *KIR*-Gene in NK-Zellen unterliegt einem einzigartigen Expressionsmodus. Nicht jede NK-Zelle exprimiert alle genomisch vorhandenen *KIR*-Gene, sondern es erfolgt in der frühen Phase der Zelldifferenzierung jeder einzelnen NK-Zelle eine kombinatorische Auswahl der zu aktivierenden *KIR*-Gene in einer weitgehend stochastischen Art und Weise [9]. Das Ergebnis sind hunderte verschiedene NK-Zellklone im peripheren Blut mit unterschiedlichen KIR Rezeptor Kombinationen auf ihrer Oberfläche. Das entstandene NK-Zellklon-Repertoire besitzt ein breites Spektrum an funktioneller Spezifität, welches auch während klonaler Expansionsphasen unverändert fortbesteht. Eine Ausnahme stellt der KIR2DL4 Rezeptor dar, der dieser klonotypischen Expression nicht unterworfen ist und sich auf jeder NK-Zelle befindet.

Aktuelle Studien unterstreichen die Bedeutung der KIR Rezeptoren für das Immunsystem in der Konfrontation mit viralen Infektionen, hinsichtlich des Autoimmunstatus und in der Transplantationssituation. So ist beispielsweise gezeigt worden, dass die Anwesenheit des aktivierenden KIR3DS1 Rezeptors in Wechselwirkung mit einem bestimmten HLA-B Allel zu einer Verzögerung des Ausbruchs der AIDS Symptomatik nach einer HIV Infektion führt [10]. Der aktivierende KIR2DS2 Rezeptor scheint ursächlich in den Autoimmunerkrankungen Rheumatoide Arthritis, der häufigsten entzündliche Erkrankung der Gelenke, sowie Psoriasis-Arthritis involviert zu sein [11-13]. Des Weiteren sind Stammzelltransplantationen mit Spendern, die aktivierende *KIR*-Gene besitzen für die der Leukämiepatient keine korrespondierenden HLA-Klasse I

Liganden aufweist, mit einem reduzierten Rückfallrisiko assoziiert. Vermutlich werden hier residuale Leukämiezellen durch die im Transplantat vorhandenen NK-Zellen vernichtet. In dieser speziellen „*mismatch*“ Situation kann es aber auch zu einer überhöhten *graft versus host* Reaktion kommen, wie erst kürzlich gezeigt werden konnte [14-16].

Diese Studien führten die Fachwelt zu der Hypothese, dass eine gerichtete Modulation des KIR Rezeptorprofils mit therapeutischen Auswirkungen auf die genannten Krankheitsbilder verknüpft sein könnte. Um dies zu erreichen ist aber eine genaue Kenntnis der Mechanismen erforderlich, welche die *KIR*-Genregulation steuern. Zentrale Zielsetzung dieser Arbeit war es diese Mechanismen verstehen zu lernen. Ein erster Ansatzpunkt zur Aufklärung war der eigentümlich hohe Grad der Sequenzhomologie der *KIR*-Genpromotoren.

1.2 Epigenetische Regulation der Genexpression

In unserem Körper befinden sich ca. 200 verschiedene Zelltypen mit z.T. voneinander sehr verschiedenartiger funktioneller Spezialisierung. Jeder von ihnen besitzt dieselben ca. 25000 Gene, von denen jeweils ein kleiner, für den jeweiligen Zelltyp charakteristischer Teil zur Ausprägung kommt und den zellulären Phänotyp bestimmt. Damit die konservierte und konsistente genetische Information in so differenzierter Art und Weise zur Ausprägung gelangen kann, dass hochspezialisierte Zellen wie z.B. Neuronen, insulinproduzierende Beta-Zellen oder Lymphozyten entstehen können, sind verschiedene epigenetische Mechanismen erforderlich. Ihnen liegt definitionsgemäß Information zu Grunde, die nicht von der DNA selbst kodiert wird, sondern sich auf dieser befindet und die Genexpression maßgeblich, in vererbbarer Weise, bestimmt. Man spricht von einem zelltypspezifischen Epigenom, das zu einem zellulären Gedächtnis beiträgt und somit dafür sorgt, dass mitotisch entstehende Tochterzellen der Ursprungszelle gleichen [17].

Die Methylierung der DNA ist einer dieser Mechanismen.

Unsere DNA besitzt in ungefähr 70% aller CpG Dinukleotiden (CpGs) an Stelle des Cytosins ein 5'-Methylcytosin [18]. Größere Anhäufungen an CpGs findet man vorzugsweise im 5'-Bereich von schätzungsweise 60% aller unserer Gene. Diese sogenannten CpG-Inseln sind in aktiven Genen, so z.B. *housekeeping* Genen, stets unmethyliert, während sie in inaktiven, gewebespezifisch exprimierten Genen in den meisten Fällen methyliert sind. Da die Methylgruppen sterisch in die große und kleine Furche der Doppelhelix hineinragen postuliert man, dass sie Auswirkungen auf die Gentranskription, vorrangig über die Wechselwirkung mit Proteinfaktoren, haben können.

Spezielle Enzyme sind für den Transfer der Methylgruppe auf das Cytosin verantwortlich. Der am besten untersuchte Vertreter, die Erhaltungsmethyltransferase DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1), sitzt während der DNA-Replikationsphase an den Replikationsgabeln, erkennt die Methylierungsmuster der parentalen DNA-Stränge und überträgt sie unverändert auf die naszierenden DNA-Tochterstränge. In dieser konservativen Weise übersteht die epigenetische Information unverändert die einzelnen Zellteilungen [19]. Die *de novo* Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B übertragen die Methylgruppen ohne Vorlage auf unmethylierte DNA. Wie sie ihre Zielsequenzen auswählen ist unbekannt. Es ist gezeigt worden, dass sie *in vivo* mit der DNMT1 komplexiert vorliegen können und in redundanter Weise die zelluläre Methyltransferaseaktivität zu komplettieren vermögen [20]. Abgesehen von ihrer Hauptrolle für die Etablierung maternaler Prägung (*genomic imprinting*) [21] und der Repression von Retrotransposons in der frühen Gametogenese [22] scheint der DNMT3L eine wichtige Regulatorfunktion der zellulären *de novo* Methyltransferaseaktivität zuzukommen. So führt die Blockade ihrer Interaktion mit der DNMT3A zum Verlust der *de novo* methyltransferierenden Enzymaktivität [23].

Als Mediatoren der transkriptionellen Inaktivierung durch DNA-Methylierung fungieren diverse Faktoren, die selektiv an methylierte DNA binden können. Erste Evidenzen hierfür lieferten Boyes und Bird 1991, als sie zeigten, dass mit einer ausreichenden Menge an methylierter Kompetitor-DNA endogene Loci trotz Methylierung reaktiviert

werden können, was bedeutet, dass durch die Kompetitor-DNA, ein damals noch unbekannter Repressor abgefangen werden kann, der bevorzugt an methylierte DNA bindet [24]. Der erste Proteinkomplex mit Spezifität für methylierte DNA wurde 1989 von Meehan et al. beschrieben und *methyl-CpG binding protein 1* (MeCP1) genannt [25]. In späteren Studien wurde herausgefunden, dass dieser Repressor methylierte Zielsequenzen über die Unterkomponente *Methyl-CpG Binding Domain Protein* (MBD2), die hochaffin für mCpG ist, ansteuert und bindet. MBD2 ist außerdem mit dem Chromatin Remodeling Komplex NuRD, der auch Histondeazetylaseaktivität besitzt, assoziiert [26]. Daher wird postuliert, dass die Repressorfunktion von MeCP1 über Chromatinstrukturierung und Histondeazetylierung bewerkstelligt wird. Weitere Faktoren, die über die Bindung an methylierter DNA Gentranskription blockieren können, sind MBD1 und MeCP2 [27]. Letzterer ist mit Histondeazetylase- und Histonmethyltransferaseaktivität assoziiert und übt seine reprimierende Wirkung über die Modifikation der Histone und die darüber vermittelte Chromatinumgestaltung aus [28, 29]. Diese Faktoren stellen somit ein Bindeglied zwischen der DNA-Methylierung und der Chromatinstruktur dar.

Die Chromatinarchitektur fungiert auch als eine weitere wichtige epigenetische Ebene der Genregulation. Aktive Gene und häufig auch inaktive, die noch das Potential besitzen aktiviert zu werden, residieren im dekondensierten Chromatin, das man als Euchromatin bezeichnet. Im konstitutiven Heterochromatin, in dem die Nukleosomen unveränderbar dicht verpackt zusammenliegen, findet man Gene die permanent stillgelegt worden sind. Gene, die nur temporär, beispielsweise während eines bestimmten Differenzierungsstadiums ausgeschaltet sind, können hingegen in solchen heterochromatischen Regionen liegen, die man als fakultativ bezeichnet, weil es ihnen möglich ist ihren Zustand bei Bedarf zu ändern und euchromatisch zu werden. Diese Zustände sind durch charakteristische molekulare Modifikationen an bestimmten Lysin-Resten der Histone gekennzeichnet. So tragen aktive Gene, aber in einigen Fällen auch solche, die zwar noch inaktiv sind, aber zu einer späteren Entwicklungsphase der Zelle benötigt werden, insbesondere Acetylgruppen am Lysin 9 des Histon 3 und am Lysin 8 des Histon 4 und sind di-, bzw. trimethyliert am Lysin 4 des Histon 3 [30].

Dagegen findet man inaktive Gene in kompakt strukturiertem Chromatin gelegen und mit Histonen assoziiert, die u.a. di- und trimethyliert an Lysin 9 und 27 des Histon 3 sind [31]. Die Histone sind nicht nur eine Strukturkomponente des Chromatins, sondern dienen auch als Matrix für die Erstellung eines „Zugangscodes“ zur DNA. Häufig spricht man in diesem Zusammenhang von dem „*histone code*“, der von bestimmten Proteindomänen erkannt und interpretiert wird [30]. Histonazetyltransferasen (HATs) binden über ihre Bromodomäne an azetylierte Histone. Oft sind diese HATs Teil eines chromatinumstrukturierenden Multiproteinkomplexes der, wenn er einmal gebunden hat, anfängt die umliegende Chromatinregion so zu verändern, dass sie für die Transkription kompetent wird [32]. In ähnlicher Weise erkennen Histonmethyltransferasen über Ihre Chromodomäne repressiv methylierte Histone und modulieren dann auch die benachbarten Histone [33]. Der Repressor HP1 bindet über seine Chromodomäne an methyliertes H3K9 und fördert die Ausbreitung der heterochromatischen Chromatinkonformation in die umgebende genomische Region.

Einige Repressoren der Polycomb Gruppe, die eine zentrale Rolle für die Zellerhaltung, Stammzellplastizität und embryonale Differenzierung spielen, können über ihre Chromodomäne an trimethyliertes H3K27, eine Modifikation, die fakultatives Heterochromatin kennzeichnet, binden. Sie sind Teil eines Multiproteinrepressor-komplexes (PRC1) der, einmal gebunden, das Andocken von Aktivatoren der Transkription blockiert und eine Kondensierung des umliegenden genomischen Bereiches bewirkt [34].

Aus Untersuchungen an Pflanzen ist schon seit langem ein epigenetisches Phänomen bekannt, welches eine mechanistische Kopplung kleiner RNA Moleküle mit der DNA-Methylierung nahe legt. Aus längeren RNA-Abschnitten, die in ihrer Sekundärstruktur stabile doppelsträngige Abschnitte aufweisen, können kleine RNA Spezies (*small interfering RNA*) prozessiert werden, die mit der endogenen Transkription des korrespondierenden Gens nachhaltig interferieren, indem sie die Methylierung von regulatorisch wichtiger DNA bewirken [35]. Wie dies funktioniert ist ungeklärt. Mehrere Arbeiten belegen, dass auch in Säugetierzellen mittels siRNA Molekülen mit Sequenz-

identität zu diversen Genabschnitten genreprimierende DNA-Methylierung an diesen Genen induziert werden kann [36, 37, 38]. Dieser Effekt kann offenbar auch die Chromatinstruktur erfassen. Zwei Studien zeigen konkret, dass sich neben der DNA-Methylierung auch repressive Histonmodifikationen in der 5'-Region von Genen ausbreiten, wenn siRNAs mit Sequenzkomplementarität zu diesen Promotorbereichen, anwesend sind [39, 40]. Die Arbeit von Fukagawa et al. zeigt, dass das Ausknocken von Dicer, einer der Kernkomponenten der siRNA Prozessierungsmaschinerie, eine Reduktion der Methylierung an H3K9 und der Bindung von HP1 im perizentromerischen Heterochromatin nach sich zieht [41]. Dies liefert Evidenz dafür, dass die Heterochromatinbildung an die RNAi Maschinerie gekoppelt ist.

Die meisten siRNA Moleküle einer Zelle stammen aus repetitiven, genetischen Elementen. Daher nimmt man an, dass die siRNA Maschinerie, ähnlich wie die DNA-Methylierung, ursprünglich evolviert ist, um die Transkription repetitiver und invasiver genetischer Elemente zu verhindern und somit die genomische Stabilität und die Integrität des Transkriptom zu gewährleisten. Insbesondere in Pflanzen und in höheren Vertebraten scheint es so zu sein, dass diese Mechanismen auch für die differenzielle Genregulation in Beschlag genommen worden sind.

Die repetitiv im Genom vorliegenden SINE (*short intersperced nuclear elements*) Elemente jedenfalls, deren Transkripte stabile *stem loop* Strukturen hervorbringen, können besonders effektiv *de novo* DNA-Methylierung anziehen, die sich von dort aus auf benachbarte Regionen ausbreiten kann [42, 43]. Interessanterweise ist unmittelbar stromaufwärts eines jeden klonotypisch exprimierten *KIR*-Genpromotors ein Vertreter der SINE, ein Alu Element, positioniert. Der konstitutiv aktive *KIR2DL4* Promotor hingegen hat kein Alu Element im entsprechenden 5'-Bereich.

Ein konkretes Beispiel, das einer epigenetischen Genregulation unterliegt, sind die in Tandem (Kopf an Schwanz) organisierten ribosomalen RNA (rRNA) Gene. Humane Zellen enthalten mehrere hundert rRNA Gene, von denen ein Teil durch epigenetische Mechanismen stillgelegt ist. Hierbei sind sowohl die DNA-Methylierung, als auch die

Histonmodifikationen und die Chromatinstruktur beteiligt. Es wird angenommen, dass diese Form der Genregulation es der Zelle ermöglicht, weitere rRNA Gene bei Bedarf zu aktivieren, so z.B. wenn zusätzliche Ribosomenbiosynthese in einer hochproliferativen Entwicklungsphase erforderlich wird [44, 45]. In Analogie zu der *KIR*-Gensituation bergen die intergenische Bereiche der rRNA Gene diverse Transposons, darunter auch Alu Elemente, die unmittelbar stromaufwärts der rRNA Genpromotoren liegen [46]. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass in der Maus, die an denselben Stellen Alu-Homologe B1 Elemente besitzt [47], 150-300 nt lange Transkripte in den intergenischen Sequenzabschnitten unmittelbar stromaufwärts der rRNA Gene synthetisiert werden. Diese sind komplementär zur rRNA Genpromotorsequenz und interferieren mit ihr, so dass es zu Heterochromatisierung und DNA-Methylierung kommt [48].

2. Eigene Untersuchungen

Das Wissen darüber in welcher Weise die klonotypische *KIR*-Genexpression in einer NK-Zelle reguliert wird, könnte die Möglichkeit eröffnen die *KIR*-Genexpression gezielt zu verändern, um die NK-Zellaggressivität beispielsweise gegenüber Malignitäten des Blutes, oder aber auch gegenüber den gesunden Zellen eines Transplantatempfängers, zu Gunsten des Patienten zu modulieren. Unser vorrangiges Ziel war es herauszufinden, wie die NK-Zellen es fertig bringen in ein und derselben nukleären Umgebung differentielle Expression der *KIR*-Gene, die höchst homolog auf der Ebene der Primärsequenz sind, zu realisieren.

Zu diesem Zweck wurde zu Beginn eine detaillierte Analyse der DNA Sequenzen der *KIR*-Gene durchgeführt. Diese ergab, dass in den *KIR*-Genpromotorregionen eine auffällige Anhäufung an CpG Dinukleotiden vorkommt und lieferte damit einen ersten Hinweis darauf, dass die DNA-Methylierung eine Rolle in der Regulation dieser Gene spielen könnte. Die Demethylierung der DNA in NK-Zellen führte, anders als in CD34 positiven hämatopoietischen Stammzellen, zu einer Expression der stillgelegten KIR Rezeptoren [49]. Die *KIR*-Genpromotoren lassen sich folglich effektiv durch DNA-Methylierung ausschalten. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die DNA-Methylierung ein entscheidender Baustein des Mechanismus ist, der für die Regulation der *KIR*-Gene verantwortlich ist, wurde die Frage gestellt, welchen Beitrag die zweite Ebene der epigenetischen Genregulation, die Chromatinstruktur, beisteuert. Hierzu wurde ein neuer Test, der den Namen MIRECAL (Micrococcus nuclease/real-time PCR chromatin accessibility assay with locus specificity) erhielt, entwickelt [50]. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnte gezeigt werden, dass sich transkriptionell inaktive *KIR*-Genpromotoren innerhalb eines dichter verpackten Chromatins befinden.

Die Anwendung einer neuen Methode, die „Schnappschüsse“ von DNA-Proteinwechselwirkungen aus der *in vivo* Situation möglich macht, die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP), ermöglichte es uns schließlich nachzuweisen, dass zelltyp-spezifische Histonmodifikationssignaturen existieren, die anzeigen, ob ein *KIR*-Genpromotor transkriptionelle Kompetenz besitzt, oder nicht [51].

Zusammenfassend führten diese Arbeiten zu zwei wichtige Hypothesen. Die erste postuliert, dass im Zuge der NK-Zellmaturierung aus hämatopoietischen Vorläufern, ein in limitierten Mengen vorkommender Faktor mit einer zufällig zu Stande kommenden Auswahl der vorhandenen *KIR*-Genpromotoren wechselwirkt, um deren Ausschaltung beizubehalten. Zur experimentellen Überprüfung dieser Theorie wird ein geeignetes Modell benötigt. Dessen Etablierung ist jedoch sehr schwierig, denn die zu untersuchende Zellpopulation entsteht während eines kurzen Zeitfensters, in niedriger Frequenz, aus hämatopoietischen Stammzellen des Nabelschnurblutes. Die Präparation gestaltet sich daher sehr aufwendig, mit Nachteilen hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und der Kosten.

Die zweite Hypothese betrifft die medizinische Anwendung. Die Aktivierung von KIR durch Demethylierung könnte eine Änderung des NK-Zellverhaltens gegenüber zellulären Pathogenen zur Folge haben. Des Weiteren könnte eine RNAi vermittelte Modulation der *KIR*-Genexpression zu einer nachhaltigen Beeinflussung der *KIR*-Genaktivierung, über DNA-Methylierung der Genpromotoren, und damit zu einer gerichteten Beeinflussung der NK-Zellaggressivität führen. Beide Ansätze könnten für die Krankheitsbilder in denen KIR involviert ist, aber auch für die Stammzelltransplantation, zu neuen Therapiekonzepten führen. Dies ist Gegenstand eines aktuell beantragten Projektes. Des Weiteren trugen diese Arbeiten in der Praxis zur Entscheidungsfindung bei, AML-Patienten 5'-Azacytidine zu verabreichen, mit dem Ergebnis einer positiven *Response* [52, 53, 54], die anteilig der Immunmodulation durch das DNA-demethylierende Agens zugesprochen wird.

2.1 Die Funktion der DNA-Methylierung für die Regulation der *KIR*-Gene

2.1.1 Charakterisierung des DNA-Methylierungsstatus der *KIR*-Genpromotoren in NK-, B-, T-Zellen sowie in hämatopoietischen Stammzellen

Zu Beginn der Studien stand die Frage, wie die NK-Zellklone zu einer differentiellen *KIR*-Genexpression gelangen. Die molekularen Vorgänge, die zur Expression von KIR führen, waren völlig unbekannt.

Ausgehend von der häufig anzutreffenden Situation, dass Gene über Transkriptionsfaktoren (TF) zur einer zelltypspezifischen Expression finden, wurden zuerst die Promotorregionen mit Hilfe diverser Datenbanken nach selektiven TF-Bindungsstellen untersucht. Nicht zuletzt aufgrund der geringen Variabilität der *KIR*-Genpromotoren konnten keine Bindungsstellen identifiziert werden, die eine TF-vermittelte klonotypische Expression stützen würden.

Aufgrund der eigenen Erfahrung mit Genen, deren Regulation in entscheidender Weise auf epigenetischer Ebene erfolgt, wurde erwogen, dass die *KIR*-Gene epigenetisch reguliert werden. Daher erfolgte eine genauere Analyse der Primärsequenz der *KIR*-Genpromotoren, die dann einen ersten Hinweis auf die mögliche Involvierung der DNA-Methylierung lieferte. Die Promotorregionen weisen einen ca. 300-400 Basenpaar langen Sequenzbereich mit einer signifikanten Anhäufung von CpG Dinukleotiden um den Transkriptionsstart herum auf. Diese CpG Konstellation ist mit Ausnahme des *KIR2DL4* und des *KIR3DL3*, die beide ihr eigenes CpG Profil mit verminderter CpG Anzahl besitzen, in allen *KIR*-Genpromotoren sehr ähnlich. Vier CpG Positionen unmittelbar stromaufwärts vom Transkriptionsstart sind sogar völlig konserviert. Es stellte sich die Frage, ob Genregulation der *KIR*-Genpromotoren über die DNA-Methylierung erfolgt.

Um dies zu beantworten wurde aus der NK-Zelllinie NK3.3, die nur den *KIR2DL3* Rezeptor exprimiert, DNA präpariert und das Methylierungsmuster des *KIR2DL3* Promotors mit dem des nicht exprimierten *KIR3DL2* Gens verglichen. Es stellte sich heraus, dass der Letztere vollständig methyliert war, wohingegen der *KIR2DL3* Promotor partiell unmethyliert war. Dies war ein erster Hinweis auf die Relevanz der DNA-Methylierung hinsichtlich der *KIR*-Genexpression.

Im weiteren Vorgehen wurden NK-Zellen aus peripherem Blut isoliert, um mittels Durchflusszytometrie mit *KIR* spezifischen Antikörpern Subpopulationen anzureichern, die für den *KIR* Rezeptor 2DL3 bzw. 3DL1 zu 99,8% positiv waren, wobei auch die entsprechenden Negativpopulationen gewonnen wurden.

Anschließend erfolgte eine chemische Modifikation mit Bisulfit, der aus diesen Subpopulationen gewonnenen DNA, damit das Methylierungsprofil der entsprechenden *KIR*-Gene ermittelt werden konnte. Es zeigte sich, dass *KIR2DL3* exprimierende NK-Zellen ausschließlich vollständig unmethylierte *KIR2DL3* Genpromotoren haben. Wohingegen alle *KIR2DL3* Genpromotoren in nichtexprimierenden NK-Zellen komplett methyliert sind. Die differentiell methylierte Region umfasst neben dem Promotor auch das Exon 1. Analog stellte es sich für das *KIR3DL1* Gen dar. Später wurde gezeigt, dass die Korrelation zwischen Expression und Nichtmethylierung auch für das nicht klonotypisch exprimierte *KIR2DL4* Gen gilt. Des Weiteren wurde in nichtsortierten NK-Zellen die Promotorregion des bis damals als inaktiv beschriebenen *KIR3DL3* [55] untersucht. Es zeigte sich, dass einige wenige Promotorsequenzen komplett unmethyliert waren. Später konnte nachgewiesen werden, dass sowohl in *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC), als auch in dezidualen NK-Zellen, das *KIR*-Gen *3DL3* im Vergleich zu den anderen *KIR*-Genen sehr schwach exprimiert ist [56]. Es wird spekuliert, dass dieser KIR Rezeptor in bestimmten Krankheitssituationen hochreguliert wird und eine Rolle in der Schwangerschaft spielt. Die Korrelation war also in primären NK-Zellen hinsichtlich der klonotypisch exprimierten *KIR*-Gene strikt und die Methylierungsmuster entweder einheitlich methyliert oder ausnahmslos unmethyliert, im Gegensatz zu der inhomogenen Methylierung des *KIR2DL3* Promotors in NK3.3. Dies ist womöglich eine Folge der jahrelangen Zellkultivierung dieser NK Zelllinie, denn wie bereits 1990 von Antequera et al. gezeigt wurde, führt die Haltung von Zellen in der Kultur zur Anreicherung von DNA-Methylierung und zu Änderungen des Chromatins, die beide mit dem Verlust der zelltypischen Funktionen einhergehen [57].

Die Analyse des unmittelbar stromaufwärts von den *KIR* Promotoren gelegenen Alu Elementes und des Exons 4 zeigte, dass beide Regionen sowohl in exprimierenden, als auch in nichtexprimierenden NK-Zellen methyliert sind. Die differentielle DNA-Methylierung ist also auf die Promotorregion und das Exon 1 begrenzt. Dieselben Experimente in anderen Lymphozyten zeigten, dass auch in, aus Nabelschnurblut gewonnenen, nichtexprimierenden T- und B-Zellen die *KIR*-Genpromotoren lückenlos methyliert sind. Um die Frage zu beantworten, ob im Zuge der NK-Zell Differenzierung

aus hämatopoietischen Progenitoren die Methylierung der *KIR* Promotoren *de novo* entsteht, oder aber Demethylierung erfolgt, wurden CD34 positive Stammzellen aus Nabelschnurblut, sowie aus peripherem Blut untersucht. Es stellte sich heraus, dass alle *KIR*-Genpromotoren methyliert sind. Zusammengefasst belegen diese Untersuchungen eindeutig, dass eine strikte Korrelation zwischen der DNA-Methylierung im *KIR* Promotorbereich und der *KIR*-Geninaktivität in primären humanen Lymphozyten existiert, und dass Demethylierung der *KIR*-Genpromotoren während der NK-Zellmaturierung erfolgen muss.

2.1.2 Charakterisierung der Auswirkungen der DNA-Demethylierung auf die Transkription der *KIR*-Gene und die Expression der *KIR* Rezeptoren in NK-Zellen

Aufgrund dieser Befunde wurde die Hypothese aufgestellt, dass die DNA-Methylierung die Inaktivität des *KIR*-Genpromotors bedingt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden NK-Zellen mit dem Nukleotid-Analogon 5'-Aza-2-Deoxycytidine (5-Aza-dC) behandelt, welches durch Einbau in die DNA und kovalente Bindung an die Methyltransferasen diese blockiert und somit zu einer genomischen Demethylierung führt [58]. Die Zelllinie NK3.3, die nur ein einziges aktives *KIR*-Gen besitzt, konnte nach dieser Behandlung alle anderen vorhandenen *KIR*-Gene auch transkribieren. Analog konnten auch in den NK-Zelllinien NKL und NK-92 die inaktivierten *KIR*-Gene mit 5-Aza-dC induziert werden (Abb.1A). Bei der B-Zelllinie RPMI 8866 gelang dies nicht. Bei der T Zelllinie Jurkat konnte Transkription in geringem Umfang erzielt werden. Hier wurde nur die Transkription von *KIR3DL2* eingeschaltet.

Später wurde auch gezeigt, dass primäre NK-Zellen aus peripherem Blut, die kurzzeitig (7 Tage) in Kultur angereichert wurden, nach der Inkubation mit 5-Aza-dC über 48 Stunden den klonotypisch Transkriptionsmodus aufgeben, so dass jede NK-Zelle das vollständige genomische *KIR*-Genrepertoire transkribiert. Detaillierte kinetische Untersuchungen belegten, dass die ersten *KIR* Transkripte schon nach 8 h in Kultur mit 5-Aza-dC nachweisbar sind.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte dann gezeigt werden, dass die mit 5-Aza-dC behandelten NK-Zellen alle genomisch vorhandenen und inaktiven *KIR*-Gene einschalteten, und sämtliche KIR Rezeptoren auf der Oberfläche präsentierten (Abb.1B). Mit hämatopoietischen CD34+ Zellen funktioniert dies nicht. Die Demethylierung ist also, anders als in den NK-Zellen, nicht hinreichend um die *KIR*-Gene zu aktivieren.

Ergänzend wurden in mehreren Versuchen *KIR* Promotorfragmente *in vitro* methyliert und kamen in Luziferase Assays in NK-Zellen zum Einsatz, um den Einfluss der DNA-Methylierung auf die Promotorstärke zu untersuchen. Diese Versuchsreihe belegte, dass eine vollständige Methylierung der gewählten Promotorfragmente zu einem vollständigen Verlust der Promotoraktivität führt.

Trichostatin A ist ein potenter Inhibitor von Histondeazetylasen und kann in manchen Fällen über eine Chromatindekondensation zur Genaktivierung beisteuern. Die Einwirkung dieses Mittels auf NK-Zellen alleine, sowie auch in Kombination mit 5-Aza-dC, hat keinen Effekt, bzw. keinen zusätzlichen Effekt auf die *KIR*-Genexpression. Dies liefert Evidenz dafür, dass in den NK-Zellen eine zusätzliche Azetylierung der Histone keine Rolle hinsichtlich der Genaktivität spielt.

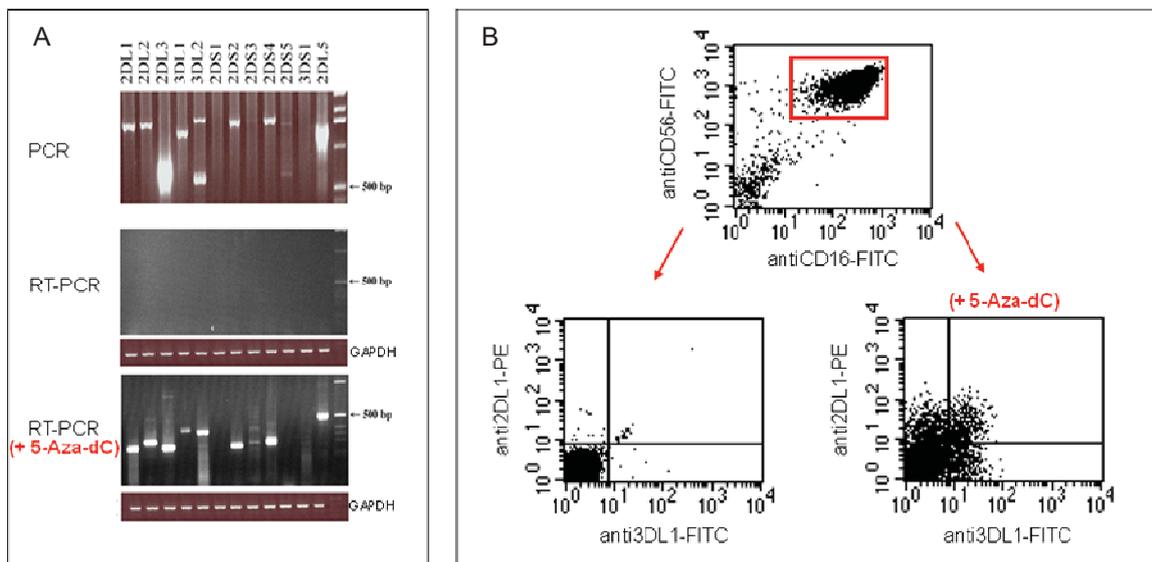


Abb. 1. In A sind die *KIR* Genotypisierung (PCR) und der Nachweis von *KIR* Transkripten der NK-Zelllinie NKL vor (RT-PCR) und nach der Behandlung mit 5-Aza-dC (RT-PCR, (+ 5-Aza-dC)) gezeigt. In B ist links unten die durchflusszytometrische FACS Analyse von 2DL1 und 3DL1 negativen NK-Zellen zu sehen. Rechts daneben ist die Auswirkung von 5-Aza-dC auf die Expression dieser beiden KIR Rezeptoren dokumentiert.

2.2 Die Rolle der Chromatinstruktur für die *KIR*-Genaktivität

2.2.1 Entwicklung des MIRECAL (Micrococcus nuclease/real-time PCR chromatin accessibility assay with locus specificity) Nachweises

Da sich die Demethylierung in den CD34 positiven Stammzellen nicht als hinreichend für eine Induktion der *KIR*-Gene erwies, wurde die Hypothese aufgeworfen, dass womöglich die Chromatinstruktur die *KIR*-Genaktivität in diesen Zellen beeinflusst. So könnte ein höherer Grad der Chromatinkondensation eine *KIR* Induktion in CD34+ Zellen, nach erfolgter DNA-Demethylierung, verhindern. Um dies experimentell anzugehen fehlte zu dem damaligen Zeitpunkt die entsprechende Methode. Die Methoden, die zur Verfügung standen, entbehrten einer Normalisierung, sodass sie nicht zu einem reproduzierbaren Ergebnis führten.

Insbesondere wenn zwei Proben unterschiedlicher zellulärer Herkunft miteinander verglichen wurden, war die Reproduzierbarkeit der ermittelten Unterschiede nicht zufriedenstellend. Aus dieser Notwendigkeit heraus wurde ein bereits bekannter Ansatz, der die Zugänglichkeit des Chromatins über die Effizienz eines *Micrococcus* Nuklease Verdaus ermittelte, mit einer Normierung über einen höchst sensitiven real-time PCR Ansatz, der den konsistenten Chromatinzugänglichkeitsstatus eines *housekeeping* Gens berücksichtigt, kombiniert. Das Ergebnis war der MIRECAL Assay, ein Verfahren zur verlässlichen Bestimmung des relativen Kondensationsunterschieds einer gewählten Chromatinregion zwischen zwei Proben, die auch aus unterschiedlichen Zellsorten stammen können. Die Ergebnisse, die damit erzielt worden sind, bestätigten unsere Vermutung.

2.2.2 Höherer Verpackungsgrad des Chromatins der inaktiven *KIR*-Genpromotoren.

Der *KIR2DL3* Genpromotor war in L88/5, einer Knochenmarkstromazelle, in dichteres Chromatin verpackt, als in der exprimierenden NK3.3. Später wurden aus Patienten isolierte primäre NK-Zellen mittels Durchflusszytometrie in *KIR2DL3* bzw. *KIR3DL1* exprimierende und nicht exprimierende Fraktionen aufgeteilt. Diese wurden mittels MIRECAL untersucht, und es stellte sich heraus, dass die inaktiven *KIR*-Genpromotoren

in dichterem Chromatin liegen. Im direkten Vergleich zwischen NK Zellen und den CD34+ Stammzellen bestätigte sich die Vermutung, dass die Chromatinkondensation der *KIR*-Genpromotoren in den Stammzellen höher ist. Dies könnte also mit ein Grund sein, warum es trotz Demethylierung zu keiner Expression in den CD34+ Zellen kommt. Dennoch gibt es einen Zugänglichkeitsunterschied zwischen exprimierenden und nicht exprimierenden NK-Zellen und in letzteren erfolgt die *KIR*-Genaktivierung nach Demethylierung, im Gegensatz zu den CD34+ Zellen. Die Vermutung lag nahe, dass weitere Unterschiede in der Chromatinstruktur zwischen NK-Zellen und ihren Vorläufern bestehen könnten. Da bekannt war, dass molekulare Mediatoren über die Histonmodifikationen Einfluss auf die Chromatinorganisation und somit auf die Genexpression haben können, wurde nach einer Methode gesucht, mit der man die molekularen Markierungen an den Histonen nachweisen kann.

Zu dieser Zeit wurde eine neue Methode publiziert, die Chromatin Immunopräzipitation, die es ermöglicht Proteinbindungen auf einem gewählten DNA Segment *in vivo* nachzuweisen. Voraussetzung hierfür ist, dass ein spezifischer Antikörper für das gewählte Protein verfügbar ist.

2.3 Zelltypspezifische *histone code* Signaturen der *KIR*-Gene in Lymphozyten und hämatopoietischen Progenitoren.

Es wurden Antikörper eingesetzt, die spezifisch die Histonmodifikationen erkennen, die aktive und inaktive Gene markieren. Dies waren Antikörper (AK) gegen H4K8ac, H3K9ac und H3K4dime für aktive Gene, und für den Nachweis von Heterochromatin ein AK gegen H3K9dime, der zur damaligen Zeit kommerziell nicht verfügbar war, und freundlicher Weise von Prof. T. Jenuwein (Wien) zur Verfügung gestellt worden ist. Die ersten Experimente mit der NK-Zelllinie NK3.3 und der Stromazelllinie L88/5 zeigten, dass die aktiven *KIR*-Gene in den NK-Zellen azetylierte Histone aufweisen und dimethyliert am Lysin 4 des H3 sind. In den Stromazellen fehlen diese Markierungen und stattdessen findet man dimethyliertes H3K9, eine Modifikation, die konstitutives Heterochromatin anzeigt. Wieder wurden in mehreren Experimenten KIR2DL3 bzw. KIR3DL1 exprimierende und nicht exprimierende NK-Zellfraktionen aus primären NK

Zellen gewonnen und in der Chromatin-Immunopräzipitation eingesetzt. Das Ergebnis war verblüffend. Sowohl aktive, als auch inaktive *KIR*-Gene der NK-Zellen weisen dieselbe Histonmodifikationssignatur auf. Sie sind hyperazetyliert und dimethyliert an H3K4. Die Interpretation ist, dass die inaktiven *KIR*-Gene der NK-Zellen lediglich durch die DNA-Methylierung reprimiert sind. Wenn diese aufgehoben wird, werden sie exprimiert. Die molekularen Markierungen an den Histonen sind charakteristisch für aktive Gene. An ihnen können molekulare Mediatoren binden, die für eine permanente relative Relaxierung des Chromatins sorgen. Der mit MIRECAL nachgewiesene höhere Grad der Chromatindekondensation der transkriptionell aktiven *KIR*-Gene im Vergleich zu den Inaktiven, rührt womöglich daher, dass der *KIR* Promotor im Zuge der Transkription durch den RNA Pol II Holoenzymkomplex aufgeschlossen wird. Das stärker kondensierte Chromatin der inaktiven *KIR*-Genpromotoren ist jedenfalls ein plastischer und revertierbarer Zustand und stellt kein unüberwindliches Hindernis für die Expression dar, da nach der Demethylierung der DNA die Transkription sofort einsetzt.

Mit der ChIP Methode wurden auch die Histonmarkierungen der *KIR*-Genpromotoren in CD34+ Zellen, B-Zellen und T-Zellen analysiert. Die CD34+ Progenitoren weisen keine Modifikationen die aktive Gene kennzeichnen auf. Stattdessen findet man eine Dimethylierung an H3K9, die konstitutives Heterochromatin anzeigt. Dasselbe Muster findet man in B-Zellen, die zu keinem Zeitpunkt ihrer Entwicklung *KIR* exprimieren. Diese Modifikation dient sowohl als Andockstation für Chromodomäne tragende Repressoren, als auch für chromatinkondensierende Multiproteinkomplexe, die für eine permanente Unzugänglichkeit des Chromatins für den RNA Pol II Komplex sorgen. Dies erklärt, warum eine Demethylierung der DNA in diesem Falle nicht ausreicht, um die *KIR*-Gene zu aktivieren. Versuche methylierte DNA bindende Repressoren nachzuweisen, lieferten Evidenz dafür, dass MBD2 hierbei eine Rolle spielt (unpublizierte Daten). Die Situation in T-Zellen ist etwas differenzierter. Es wurden T-Zellen mittels Zellsortierung in CD4 positive und CD8 positive Zellfraktionen aufgeteilt. Es zeigte sich, dass CD8+ T-Zellen keine Dimethylierung an H3K9 tragen und azetyliert sind, also ein ähnliches Muster wie NK-Zellen aufweisen. CD4+ Zellen dagegen weisen Dimethylierung an H3K9 auf. Diese ist jedoch weniger stark ausgeprägt, als in CD34+

und B-Zellen. In den CD4+ Zellen ist Azetylierung vorhanden, jedoch geringer als in den CD8+ Zellen. In Übereinstimmung damit ist KIR Expression in Subpopulationen der CD8+ und CD4+ T-Zellen beschrieben [59, 60]. Hierbei findet man aber zehnmal weniger KIR exprimierende CD4+ Zellen als CD8+ Zellen.

Doch wie ist es erklärbar, dass der heterochromatische Zustand aufgehoben wird, wenn die CD34+ Zelle in Richtung NK Zelle differenziert? Zwei Möglichkeiten sind denkbar. Entweder es liegt trotz der Anwesenheit des dimethylierten H3K9 kein konstitutives Heterochromatin vor, so dass, im Zuge des sich entwickelnden KIR kompetenten Lymphozyten, ein Chromatinremodeling möglich ist, oder aber es existieren hinsichtlich des Chromatinstatus der *KIR*-Gene diverse Unterfraktionen an CD34+ Zellen, die unterschiedliche Entwicklungsrichtungen einschlagen. Aus den konstitutiv heterochromatischen entstehen KIR nichtexprimierende Lymphozyten und aus den fakultativ heterochromatischen, entstehen die KIR exprimierenden Lymphozyten.

Diese zelltypspezifischen Unterschiede in den Histonmodifikationen zwischen humane NK-Zellen, B-, T-Zellen und CD34+ Stammzellen sind, anders als die DNA-Methylierung, nicht auf die Promotorregion beschränkt, sondern scheinen den gesamten Genbereich zu umfassen, wie repräsentativ an den *KIR* Exons 3, 4 und 8 des *KIR2DL3* gezeigt werden konnte.

2.4. Entwicklung eines Modells und von Hypothesen, welche die epigenetische Kontrolle der *KIR*-Gene während der NK-Zelldifferenzierung erklären.

Aus den oben beschriebenen Studienergebnissen lässt sich folgendes Modell der epigenetischen Kontrolle der KIR Expression ableiten. In der nichtexprimierenden CD34+ Zelle ist der gesamte *KIR*-Gen Komplex heterochromatisch, durch einen hohen Grad der Chromatinkondensation gekennzeichnet und die DNA ist lückenlos methyliert. Wahrscheinlich sorgen epigenetische Mediatoren über die Bindung am dimethylierten H3K9 für die permanente Blockade von Faktoren eines transkriptionskompetenten Chromatinzustandes. Dies verhindert effizient eine unerwünschte, aberrante KIR Expression.

In einem ersten Differenzierungsschritt dürften diese Mediatoren schwinden, wahrscheinlich nicht in jeder CD34 positiven Stammzelle in gleichem Ausmaß, mit der Konsequenz, dass die Zugänglichkeit für Chromatinremodeler erhöht wird. Dies führt sukzessive zu einer Relaxierung des Chromatins, den Austausch der Dimethylierung an H3K9 durch Acetylgruppen und die Einführung der aktiven Histonmodifikationssignatur auf dem gesamten *KIR-Gen* Komplex. In diesem Stadium sind alle *KIR-Gen* promotoren methyliert und werden daher immer noch nicht transkribiert. Im zweiten Schritt der NK-Zelldifferenzierung erfolgt dann, beginnend mit dem *KIR-Gen 2DL4*, die Demethylierung. Hierbei werden die später im klonotypischen Modus exprimierten Kandidaten vermutlich zufällig für die Demethylierung ausgewählt.

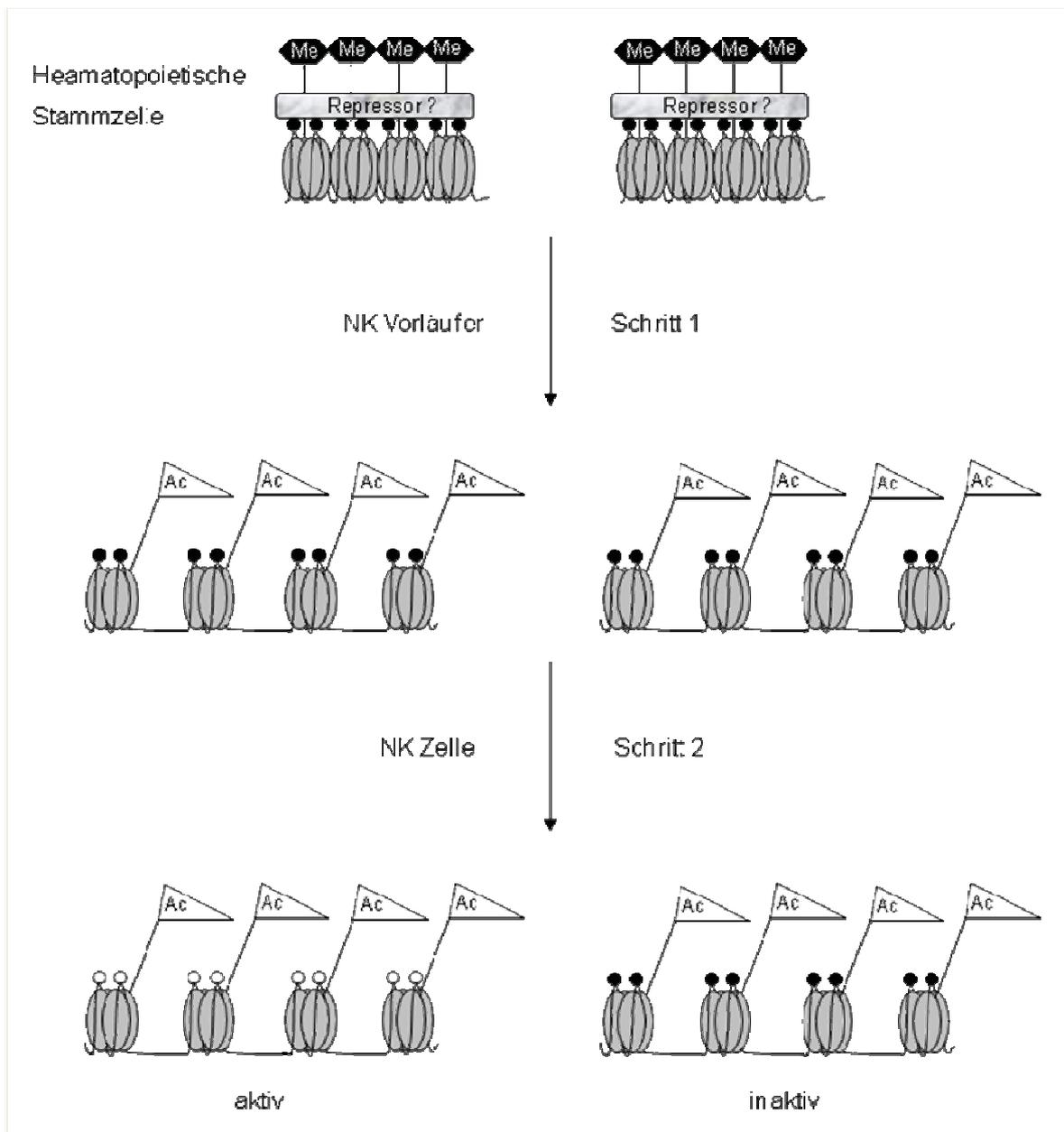
Dass nicht immer alle *KIR-Gen* promotoren demethyliert werden spricht dafür, dass hierbei ein limitiert vorliegender Faktor ausschlaggebend ist. Mehrere Möglichkeiten sind denkbar: So könnte z. B. ein, an den methylierten *KIR-Gen* promotoren bindender Repressor in diesem Differenzierungsstadium in so geringen Mengen vorliegen, dass er nicht mehr alle *KIR-Gen* promotoren abdecken kann. Die nichtabgedeckten sind dann aus unbekanntem Gründen susceptibler gegenüber der DNA-Demethylierung. Versuche einen solchen Repressor nachzuweisen blieben bisher erfolglos. Womöglich weil die vorhandene Menge außerhalb der ChIP-Nachweisgrenze liegt. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die DNA-Methyltransferaseaktivität in dem finalen Differenzierungsstadium der NK Zelle so gering wird, dass sie eine stochastisch auftretende passive Demethylierung nicht mehr kompensieren kann.

Gegen beide Hypothesen spricht ein von Valiante et al. im Jahre 1997 veröffentlichtes Versuchsergebnis. Hierbei wurden die numerischen Verhältnisse der NK-Zellklone mit unterschiedlichen Kombinationen an KIR Rezeptoren eines Haplotyp A homozygoten Probanden, der 5 klonotypisch exprimierbare *KIR-Gene* besitzt, mit denen eines Haplotyp B Homozygoten, der deutlich mehr *KIR-Gene* aufweist, verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die NK-Zellen des Haplotyp A Probanden dazu tendieren mehr KIR Rezeptoren zu exprimieren als die des zweiten Spenders [9]. Als Folge einer limitierten Repression, wie oben vorgeschlagen, bzw. einer limitierten DNA-

Methyltransferaseaktivität wäre das Gegenteil zu fordern, nämlich, dass die NK Zellen eines Individuums mit einer hohen Anzahl an *KIR*-Genen dazu neigen sollten mehr *KIR*-Gene zu exprimieren. Allerdings sei an dieser Stelle angemerkt, dass der Valiante-Versuch lediglich an zwei Individuen durchgeführt worden ist und er damit nicht die Situation in einer Population repräsentieren kann.

Dieser Versuch steht, wenn auch nur unter einer bestimmten Annahme, durchaus im Einklang mit der nächsten hier vorgestellten Hypothese. Diese dritte Möglichkeit spekuliert über eine mögliche Involvierung der im 5'-Bereich der klonotypisch exprimierten *KIR*-Gene vorhandenen *Alu repeats*. Stromaufwärts des *KIR2DL4* Promotors, der als erster aktiviert wird, findet man kein solches genetisches Element. Die Relaxierung des Chromatins im ersten Stadium der NK-Zelldifferenzierung könnte trotz DNA-Methylierung eine geringe Hintergrundtranskription der *KIR*-Gene, sowie der *Alu* Elemente zur Folge haben, mit der Konsequenz, dass *Alu*-Antisensetranskripte mit Teilkomplementarität zu den 5'-Enden der *KIR* Transkripte gebildet werden. Diese blockieren, wenn sie denn in ausreichender Zahl vorliegen, alle initiierten Transkripte eines *KIR*-Gens und sorgen, möglicherweise über einen siRNA vermittelten Effekt, für die Erhaltung der DNA-Methylierung des korrespondierenden *KIR* Promotors. Diese Hintergrundtranskription der *Alu* Elemente fällt dabei so gering aus, dass sie nicht alle initiierten *KIR* Transkripte eines jeden *KIR* Locus abfangen kann. In den Fällen in denen mehr *KIR* Transkripte erzeugt als abgefangen werden, gewinnt die *KIR* Transkription Überhand und in Folge dessen wird der *KIR*-Genpromotor demethyliert und die volle Transkriptionsstärke erreicht.

Die zu Beginn angesprochene Annahme ist die, dass die *Alu*-Antisensetranskripte auf Grund der hohen *KIR* Sequenzhomologie und der räumlichen Nähe der *KIR* Loci durchaus auch zur Querkompetition befähigt sind. D. h., dass ein *Alu*-Antisensetranskript außer den unmittelbar benachbarten *KIR*-Genpromotor auch weitere, in nächster Nähe liegende, beeinträchtigen kann. Dann würde nämlich eine höhere *KIR*-Genanzahl im Vergleich zu einer kleineren *KIR*-Genaustattung dazu führen, dass NK Zellen im Mittel weniger *KIR*-Gene exprimieren, genauso wie es von Valiante et al. beobachtet worden ist.



Epigenetische Konformation der *KIR* Genpromotoren während der NK Zelldifferenzierung

- meCpG
- CpG
- Me meH3K9
- Ac acH3K9 und acH4K8

3. Schlussfolgerungen

Obwohl es wahrscheinlich erscheint, nicht zuletzt aufgrund des günstigeren biosynthetischen Verlaufs, dass die *KIR*-Genpromotoren während der NK-Zell-differenzierung selektiv demethyliert werden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es in einem ersten Schritt zu einer Demethylierung aller *KIR* Promotoren kommt und erst dann eine zufällige Remethylierung eintritt.

In der Summe weisen die vorgestellten Ergebnisse auf eine zusätzliche, bedeutende Ebene der epigenetischen Regulation der *KIR*-Gene, die sich molekulare Markierungen der Histone zu Nutze macht. Die zelltypspezifischen Histonmodifikationssignaturen sind nicht an die DNA-Methylierung und die Chromatinzugänglichkeit gekoppelt. Daher muss angenommen werden, dass die DNA-Demethylierung keine notwendige Voraussetzung dafür ist, damit aktive oder repressive molekulare Modifikationen an den Histonen eingeführt, bzw. entfernt werden können.

Die CD8⁺ und die NK-Zellen demonstrieren durch die methylierten *KIR*-Genpromotoren und die aktiven Histonmodifikationen einen Zustand der Kompetenz bzw. des Bereitstehens für eine sofortige Aktivierung der *KIR*-Gene nach Aufhebung der DNA-Methylierung. Dieser Zustand steht im Einklang mit einem immer deutlicher werdenden Prinzip in der Epigenetik. Demnach stellt die epigenetischen Genregulation eine Brücke zwischen den Genen und der Umwelt dar, die eine angemessene Flexibilität der Genregulation, als Antwort auf sich ändernde Umweltreize, ermöglicht. Eine Spekulation die sich hieraus ergibt ist, dass ein flexibles KIR Rezeptorrepertoire vorliegt, welches sich während der Konfrontation mit bestimmten Krankheiten, für deren Verlauf KIR von Bedeutung ist, ändern kann.

Evidenz hierfür gibt es nicht. Hinsichtlich einer altersassoziierten Plastizität des KIR Rezeptorrepertoires jedoch, gibt es zwei Arbeiten, die deutlich demonstrieren, dass KIR Rezeptoren im Alter durch Demethylierung stärker in T-Zellen exprimiert sein können [61, 62]. In unserer Arbeitsgruppe werden im Moment NK-Zellen diesbezüglich untersucht.

Eine weitere interessante Schlussfolgerung betrifft den hier erstmalig eingeführten Begriff des EPIGENS. Dieser soll heißen, die Summe aus dem DNA-Methylierungsmuster, der molekularen Histonmodifikationen und des Chromatinverpackungsstatus eines Gens, wobei in der Gendefinition alle regulatorischen Elemente, also der Promotor, die *enhancer* und auch *silencer* Berücksichtigung finden. Die Entwicklung der komplexen KIR-Genetik findet man in vergleichbarer Form auch in anderen Primaten [63], aber nicht in anderen Säugetierspezies [64, 65]. Im evolutionären Maßstab betrachtet ist sie eine neuere Errungenschaft. Es ist möglich, dass auch beispielsweise im Schimpansen die *KIR*-Gene durch epigenetische Mechanismen reguliert sind. Der direkte Vergleich des *KIR* Epigens im Menschenaffen mit der Situation beim Menschen, würde einen Einblick in die Unterschiede ermöglichen. Dieser würde Rückschlüsse hinsichtlich der evolutionären Konservierung und der funktionellen Relevanz der betreffenden epigenetischen Mechanismen, aber auch bezüglich des evolutionären Tempos mit dem sie sich manifestieren, erlauben.

Abschließend sei erwähnt, dass die in dieser Arbeit erstmalig ermittelten Mechanismen der *KIR*-Genregulation von erheblicher Relevanz für die Klinik sind. An diesen kann angeknüpft werden um *KIR*-Gene ein und auszuschalten und somit die NK-Zellaggressivität, aber auch das T-Zellverhalten gegenüber zellulären Pathogenen, oder im Rahmen der Autoimmunität, zu Gunsten eines Patienten zu verändern.

Danksagung

Wie bereits für meine Diplomarbeit und meine Doktorarbeit gilt auch bezüglich meiner Studien zu dieser Habilitationsschrift mein Dank meiner lieben Ehefrau Janettina Mariadou. Sie hat mich vorbehaltlos, immer und in entscheidender Weise unterstützt.

Mein Dank gilt meinen Lehrern:

Herrn Prof. Wolfgang Schulz, der mich in die Welt der Epigenetik eingeführt hat und mir den, zum damaligen Zeitpunkt für einen Studenten sehr abstrakt und schwierig erscheinenden Stoff, in der Weise gelehrt hat, dass ich heute immer noch Begeisterung dafür empfinde.

Herrn Prof. Markus Uhrberg möchte ich danken. Er hat mich in die komplizierte *KIR*-Genetik eingewiesen und hat stets und uneingeschränkt meine Ideen unterstützt und Ihre Umsetzung ermöglicht.

Herrn Prof. Peter Wernet gilt mein Dank. Er hat maßgeblich meine Forschungsprojekte unterstützt und ich habe vieles von ihm lernen dürfen.

Meinen früheren Lehrern möchte ich danken:

Herrn Dr. H.-P. Schmitt Wrede, der mir die ersten wichtigen Schritte in der Molekularbiologie beibrachte und Herrn Prof. Wunderlich, der mir eine gute Diplomarbeit ermöglichte.

Herrn Prof. Rolf Ackermann bin ich sehr dankbar dafür, dass er in seiner Urologischen Klinik meine Doktorarbeit über Molekularbiologie und Epigenetik möglich gemacht hat. Meinen Dank auch an meine zahlreichen Kolleginnen und Kollegen, die mich mit ihrem kollegialen Verhalten unterstützt haben.

Herrn Prof. Guido Reifenberger danke ich für die Übernahme des Referates.

Ὅσα οὐκ εἶδώς

4. Literaturverzeichnis

1. Hoglund P, Sundback J, Olsson-Alheim MY, *et al.* **Host MHC class I gene control of NK-cell specificity in the mouse.** *Immunol Rev* 1997, 155:11-28.
2. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. **Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines.** *Annu Rev Immunol* 1999, 17:189-220.
3. Ljunggren HG, Karre K. **In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition.** *Immunol Today* 1990, 11:237.
4. Algarra I, Collado A, Garrido F. **Altered MHC class I antigens in tumors.** *Int J Clin Lab Res* 1997, 27:95-102.
5. Uhrberg M. **The KIR gene family: life in the fast lane of evolution.** *Eur J Immunol* 2005, 35:10-15.
6. Vilches C, Parham P. **KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity.** *Annu Rev Immunol* 2002, 20:217-51.
7. Moretta L, Moretta A. **Killer immunoglobulin-like receptors.** *Curr Opin Immuno* 2004, 16:626-33.
8. Carrington M, Norman P. **The KIR Gene Cluster.** *National Library of Medicine (US), Bethesda (MD)*, 2003.
9. 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.
10. Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, Trowsdale J, *et al.* **Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS.** *Nat Genet* 2002, 31:429.
11. Martin MP, Nelson G, Lee JH, Pellett F, Gao X, Wade J, Wilson MJ, Trowsdale J, Gladman D, Carrington M. **Cutting Edge: Susceptibility to Psoriatic Arthritis: Influence of Activating Killer Ig-Like Receptor Genes in the Absence of Specific HLA- C Alleles.** *J Immunol* 2002, 169:2818.
12. Yen JH, Moore BE, Nakajima T, Scholl D, Schaid DJ, Weyand CM, Goronzy JJ. **Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis.** *J Exp Med* 2001, 193:1159.

13. Namekawa T, Snyder MR, Yen JH, Goehring BE, Leibson PJ, Weyand CM, Goronzy JJ. **Killer cell activating receptors function as costimulatory molecules on CD4+CD28null T cells clonally expanded in rheumatoid arthritis.** *J Immunol* 2000, 165:1138.
14. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi , Tosti A, Perruccio K, Urbani E, Negrin RS, Martelli MF, Velardi A. **Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation.** *Blood* 1999, 94:333.
15. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, et al. **Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants.** *Science* 2002, 295:2097.
16. Giebel S, Nowak I, Dziaczkowska J, Czerw T, Wojnar J, Krawczyk-Kulis M, Holowiecki J, Holowiecka-Goral A, Markiewicz M, Kopera M, Karolczyk A, Kyrz-Krzemien S, Kusnierczyk P. **Activating killer immunoglobulin-like receptor incompatibilities enhance graft-versus host disease and affect survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.** *Eur J Haematol* 2009, [Epub ahead of print]
17. David Allis, Thomas Jenuwein, und Danny Reinberg. **Epigenetics.** *Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.* 2007.
18. Ehrlich M, et al. **Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells.** *Nucleic Acids Res* 1982, 8:2709-21.
19. Jeltsch A. **On the enzymatic properties of Dnmt1: specificity, processivity, mechanism of linear diffusion and allosteric regulation of the enzyme.** *Epigenetics* 2006, 2:63-6.
20. Kim GD, Ni J, Kelesoglu N, Roberts RJ, Pradhan S. **Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases.** *EMBO J* 2002, 15:4183-95.
21. Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH. **Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints.** *Science* 2001, 5551:2536-9.
22. Bourc'his D, Bestor TH. **Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L.** *Nature* 2004, 7004:96-9.
23. Jia D, Jurkowska RZ, Zhang X, Jeltsch A, Cheng X. **Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation.** *Nature* 2007, 7159:248-51.

24. Boyes J, Bird A. **Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein.** *EMBO J* 1992, 11:327-33.
25. Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL, Bird AP. **Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs.** *Cell* 1989, 58(3):499-507.
26. Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. **Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation.** *Nat Genet* 1999, 23(1):62-6.
27. Bird AP, Wolffe AP. **Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin.** *Cell* 1999, 99(5):451-4.
28. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. **Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription.** *Nat Genet* 1998, 19(2):187-91.
29. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. **Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex.** *Nature* 1998, 393(6683):386-9.
30. Turner BM. **Cellular memory and the histone code.** *Cell* 2002, 111(3):285-91.
31. Kouzarides T. **Chromatin modifications and their function.** *Cell* 2007, 128:693-705.
32. Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM. **Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain.** *Nature* 1999, 399(6735):491-6.
33. Nakayama J, Rice JC, Strahl BD, Allis CD, Grewal SI. **Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly.** *Science* 2001, 292(5514):110-3.
34. Francis NJ, Kingston RE, Woodcock CL. **Chromatin compaction by a polycomb group protein complex.** *Science* 2004, 306(5701):1574-7.
35. Matzke MA, Matzke AJ. **Planting the seeds of a new paradigm.** *PLoS Biol* 2004, 2:E133.
36. Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ. **Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells.** *Science* 2004, 305:1289-92.

37. Castanotto D, Tommasi S, Li M, Li H, Yanow S, Pfeifer GP, Rossi JJ. **Short hairpin RNA-directed cytosine (CpG) methylation of the RASSF1A gene promoter in HeLa cells.** *Mol Ther* 2005, 12:179-83.
38. Suzuki, K. et al. **Prolonged transcriptional silencing and CpG methylation induced by siRNAs targeted to the HIV-1 promoter region.** *J. RNAi Gene Silencing* 2005, 2:66-78.
39. Kawasaki H, Taira K. **Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells.** *Nature* 2004, 431:211-7.
40. Kawasaki H, Taira K, Morris KV. **siRNA induced transcriptional gene silencing in mammalian cells.** *Cell Cycle* 2005, 4:442-8.
41. Fukagawa T, Nogami M, Yoshikawa M, Ikeno M, Okazaki T, Takami Y, Nakayama T, Oshimura M. **Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells.** *Nat Cell Biol* 2004, 784-91.
42. Turker MS. **Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation.** *Oncogene* 2002, 21:5388-93.
43. Hasse A, Schulz WA. **Enhancement of reporter gene de novo methylation by DNA fragments from the alpha-fetoprotein control region.** *J Biol Chem* 1994, 269(3):1821-6.
44. McStay B, Grummt I. **The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008, 24:131-57.
45. Grummt I. **Different epigenetic layers engage in complex crosstalk to define the epigenetic state of mammalian rRNA genes.** *Hum Mol Genet* 2007, 15;16 Spec No 1:R21-7.
46. Gonzalez IL, Tugendreich S, Hieter P, Sylvester JE. **Fixation times of retroposons in the ribosomal DNA spacer of human and other primates.** *Genomics* 1993, 18(1):29-36.
47. Sylvester JE, Gonzales IL, Mougey EB. **Structur and organisation of vertebrate ribosomal DNA.** *The Nucleolus* 2004, ed. MO Olson, pp 58-72. New York: Kluwer Acad./Plenum
48. Mayer C, Schmitz KM, Li J, Grummt I, Santoro R. **Intergenic transcripts regulate the epigenetic state of rRNA genes.** *Mol Cell* 2006, 5(3):351-61.
49. Santourlidis S, Trompeter HI, Weinhold S, Eisermann B, Meyer KL, Wernet P, Uhrberg M. **Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells.** *J Immunol* 2002, 169(8): 4253-61.

50. Graffmann N, Santourlidis S, Christ J, Wernet P, Uhrberg M. **Direct and quantitative analysis of chromatin accessibility by MIRECAL--a Micrococcus nuclease/real-time PCR chromatin accessibility assay with locus specificity.** *Anal Biochem* 2006, 354(2): 308-10.
51. Santourlidis S, Graffmann N, Christ J, Uhrberg M. **Lineage-specific transition of histone signatures in the killer cell Ig-like receptor locus from hematopoietic progenitor to NK cells.** *J Immunol* 2008, 180(1):418-25.
52. Kuendgen A, Gräf T, Zohren F, Hildebrandt B, Hünerlitürkoglu A, Gattermann N, Haas R, Kobbe G. **Induction of complete remission in a patient with acute myeloid leukemia refractory to high-dose chemotherapy through treatment with 5-azacytidine.** *Leuk Res* 2007, 31(3):407-9.
53. Graef T, Kuendgen A, Fenk R, Zohren F, Haas R, Kobbe G. **Successful treatment of relapsed AML after allogeneic stem cell transplantation with azacitidine.** *Leuk Res* 2007, 31(2):257-9.
54. Möller I, Blum S, Gattermann N, Haas R, Habersang K, Germing U, Kuendgen A. **Repeated responses of an elderly patient with high-risk myelodysplastic syndrome to sequential therapy with tipifarnib, 5-azacitidine, and decitabine.** *Ann Hematol* 2009.
55. Torkar M, Norgate Z, Colonna M, Trowsdale J, Wilson MJ. **Isotypic variation of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex.** *Eur J Immunol* 1998, 3959-67.
56. Trundley AE, Hiby SE, Chang C, Sharkey AM, Santourlidis S, Uhrberg M, Trowsdale J, Moffett A. **Molecular characterization of KIR3DL3.** *Immunogenetics* 2006, 57(12):904-16.
57. Antequera F, Boyes J, Bird A. **High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines.** *Cell* 1990, 62(3):503-14.
58. Jones PA, Taylor SM. **Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation.** *Cell* 1980, 20(1):85-93.
59. Mingari MC, Schiavetti F, Ponte M, Vitale C, Maggi E, Romagnani S, Demarest J, Pantaleo G, Fauci AS, Moretta L. **Human CD8+ T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations.** *Proc Natl Acad Sci* 1996, 93(22):12433-8.
60. van Bergen J, Thompson A, van der Slik A, Ottenhoff TH, Gussekloo J, Koning F. **Phenotypic and functional characterization of CD4 T cells expressing killer Ig-like receptors.** *J Immunol* 2004, 173(11):6719-26.

61. Liu Y, Chen Y, Richardson B. **Decreased DNA methyltransferase levels contribute to abnormal gene expression in "senescent" CD4(+)CD28(-) T cells.** *Clin Immunol* 2009, 132(2):257-65.
62. Li G, Weyand CM, Goronzy JJ. **Epigenetic mechanisms of age-dependent KIR2DL4 expression in T cells.** *J Leukoc Biol* 2008, 84(3):824-34.
63. Moesta AK, Abi-Rached L, Norman PJ, Parham P. **Chimpanzees use more varied receptors and ligands than humans for inhibitory killer cell Ig-like receptor recognition of the MHC-C1 and MHC-C2 epitopes.** *J Immunol* 2009, 182(6):3628-37.
64. Hammond JA, Guethlein LA, Abi-Rached L, Moesta AK, Parham P. **Evolution and survival of marine carnivores did not require a diversity of killer cell Ig-like receptors or Ly49 NK cell receptors.** *J Immunol* 2009, 182(6):3618-27.
65. Parham P. **The genetic and evolutionary balances in human NK cell receptor diversity.** *Semin Immunol* 2008, 20(6):311-6.

5. Anlagen

1. Santourlidis S, Trompeter HI, Weinhold S, Eisermann B, Meyer KL, Wernet P, Uhrberg M. **Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells.** *J Immunol* 2002, 169(8): 4253-61.
2. Graffmann N, Santourlidis S, Christ J, Wernet P, Uhrberg M. **Direct and quantitative analysis of chromatin accessibility by MIRECAL--a Micrococcus nuclease/real-time PCR chromatin accessibility assay with locus specificity.** *Anal Biochem* 2006, 354(2): 308-10.
3. Trundley AE, Hiby SE, Chang C, Sharkey AM, Santourlidis S, Uhrberg M, Trowsdale J, Moffett A. **Molecular characterization of KIR3DL3.** *Immunogenetics* 2006, 57(12):904-16.
4. Trompeter HI, Gómez-Lozano N, Santourlidis S, Eisermann B, Wernet P, Vilches C, 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* 2005, Apr 1;174(7):4135-43.
5. Santourlidis S, Graffmann N, Christ J, Uhrberg M. **Lineage-specific transition of histone signatures in the killer cell Ig-like receptor locus from hematopoietic progenitor to NK cells.** *J Immunol* 2008, 180(1):418-25.