

Analyse des humanen NKG2A Promotors

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Britta Eisermann
aus Neumünster

Düsseldorf, 2005

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

Referent: Priv. Doz. Dr. M. Uhrberg

Koreferent: Prof. Dr. F. Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2005

花多ければ
実少なり

„Je mehr Blüten desto weniger Früchte“
(Japanisches Sprichwort)

**Die Wissenschaft, richtig verstanden,
heilt den Menschen von seinem Stolz;
denn sie zeigt ihm seine Grenzen.**

Albert Schweitzer (1875-1965)

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG

1.1 Natürliche Killerzellen.....	1
1.2 T-Zellen und MHC-Restriktion.....	1
1.3 Effektormechanismen.....	2
1.4 Rezeptoren auf NK-Zellen.....	3
1.5 MHC-Klasse-I-Moleküle.....	4
1.6 Die "Missing-Self"- Hypothese.....	4
1.7 KIR-Rezeptoren.....	4
1.8 C-Typ Lektin-artige Rezeptoren.....	6
1.9 Der NKG2A Rezeptor: Liganden – Funktion – Regulation.....	6
1.10 NK-Zell-Rezeptoren auf T-Zelle.....	9
1.11 Der NK-Zell-Cluster (NKC).....	9
1.12 Die NKG2-Gen-Familie.....	11
1.13 Das NKG2A Gen.....	12
1.14 Induktion von NKG2A.....	13
1.15 Klinische Relevanz.....	14
1.16 Ziel dieser Arbeit.....	16

2 MATERIAL

2.1 Chemikalien.....	17
2.2 Verbrauchsmaterial.....	18
2.3 Geräte.....	18
2.4 Puffer und Medien.....	18
2.4.1 Zellkultur.....	19
2.4.2 Molekularbiologie.....	21
2.5 Reagenzien für die Zellkultur.....	22
2.5.1 Stimuli.....	22
2.5.2 Zytokine.....	22
2.6 Antikörper.....	23
2.6.1 Analyse-Antikörper.....	23
2.6.2 Depletionsantikörper.....	23
2.6.3 Zellkultur-Antikörper.....	24
2.6.4 ChIP-Antikörper.....	24
2.7 Isolationskits.....	24
2.8 Zelllinien.....	25
2.9 Reagenzien für die Molekularbiologie.....	25
2.10 Oligos.....	27
2.10.1 Primer für die Promotoranalyse.....	27
2.10.2 Primer für die Konvertierung.....	28
2.10.3 Primer für die ChIP-Analyse.....	29
2.10.4 Primer für die NKG2A Transkriptanalyse.....	29
2.10.5 Primer für die NKG2 und CD94 Analyse.....	29
2.10.6 Primer für die Sequenzierung.....	30
2.11 Verwendete Software.....	30
2.12 Internet.....	30

3 METHODEN

3.1 Zellkultur Methoden

3.1.1 Herkunft der Blutproben.....	31
3.1.2 Allgemeine Zellkultur.....	31
3.1.3 Auftauen von Zellen.....	31
3.1.4 Einfrieren von Zellen.....	32
3.1.5 Splitten von adhärennten Zellen.....	32
3.1.6 Zellzählung.....	32
3.1.7 Ficoll Dichtegradientenzentrifugation.....	32
3.1.8 Erythrozytenlyse.....	33
3.1.9 MACS™-Isolation.....	33
3.1.10 Durchflusszytometrie.....	34
3.1.11 FACS-Färbung.....	35
3.1.12 Stimulation von primären NK-Zellen und T-Zellen.....	36
3.1.13 Zytokin-Stimulation.....	36
3.1.14 Klonierung von NK-Zellen.....	36
3.1.15 Stimulation mit AZA und TSA.....	37
3.1.16 <i>In vitro</i> Induktion von NKG2A (Mingari).....	37
3.1.17 <i>In vitro</i> Induktion von NKG2A (Romero).....	37
3.1.18 <i>In vitro</i> Induktion von NKG2A (Miller, Williams).....	38

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Promotoranalyse

3.2.1.1 PCR zur Fragmentgewinnung.....	39
3.2.1.2 Analyse der PCR-Produkte im Agarosegel.....	39
3.2.1.3 Phenol-Chloroform-Extraktion.....	41
3.2.1.4 DNA-Messung.....	42
3.2.1.5 Endonukleaseverdau.....	42
3.2.1.6 Dephosphorylierung.....	43
3.2.1.7 Der Vektor: pGL3-Basic.....	43
3.2.1.8 Ligation.....	43
3.2.1.9 Herstellung elektrokompeter Bakterien.....	45
3.2.1.10 Elektroporation in <i>E. coli</i> sure.....	46
3.2.1.11 Analytische Plasmidpräparation (Miniprep).....	46
3.2.1.12 Präparative Plasmidpräparation (Maxiprep).....	47
3.2.1.13 DNA-Sequenzierung.....	48
3.2.1.14 Nucleofection™.....	49
3.2.1.15 Luziferase Reporter Gene Assay.....	50
3.2.1.16 JetPEI™ Transfektion.....	52
3.2.1.17 Proteinbestimmung nach Lowry.....	53

3.2.2 Transkriptanalyse

3.2.2.1 Isolation von Gesamt-RNA (RNeasy Kit).....	54
3.2.2.2 RNA-Messung.....	54
3.2.2.3 Reverse Transkription (RT-PCR).....	55
3.2.2.4 Realtime-PCR (TaqMan™).....	56

3.3 Epigenetische Methoden

3.3.1 Methylierungsstatus Analyse	59
3.3.1.1 DNA-Isolation.....	60
3.3.1.2 Konvertierung (Intergen Cp Genom Kit).....	60
3.3.1.3 Modifikationen der Konvertierung.....	61
3.3.1.4 PCR-Produktaufreinigung.....	62
3.3.1.5 Der Vektor: pBluescript plus.....	63
3.3.2 Histonmodifikations-Analyse	
3.3.2.1 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP).....	65
3.3.2.2 DNA-Fixierung.....	65
3.3.2.3 DNA-Scherung.....	65
3.3.2.4 Histon-Präzipitation.....	66
3.3.2.5 Aufarbeitung und Realtime-PCR	67

4 ERGEBNISSE

4.1 Induktion des NKG2A Rezeptors	69
4.1.1 Induktion von NKG2A auf zytotoxischen CD8 ⁺ T-Zellen	71
4.1.2 Induktion von NKG2A auf CD4 ⁺ Helferzellen.....	75
4.1.3 Regulation von NKG2A auf primären NK-Zellen durch Zytokine.....	76
4.1.4 Isolation von NKG2A-positiven und –negativen NK-Zell-Klonen.....	78
4.1.5 <i>Zusammenfassung</i> : Teil Rezeptorexpression.....	79
4.2 Analyse der NKG2A Transkripte	80
4.2.1 Transkriptanalysen in Zelllinien.....	81
4.2.2 Transkriptanalysen in primären NK- und T-Zellen.....	82
4.2.3 Regulation von CD94/NKG2A durch Zytokine.....	83
4.2.3.1 Regulation der Transkripte in primären NK-Zellen durch Zytokine.....	85
4.2.3.2 Regulation der Transkripte in primären T-Zellen durch Zytokine.....	86
4.2.4 Induktion des NKG2A Gens im Rahmen der NK-Zell-Entwicklung.....	88
4.2.5 Induktion der NKG2 Spleissvarianten im Rahmen der NK-Zell-Entwicklung.....	89
4.2.6 Analyse des 5' UTR des langen Transkriptes.....	91
4.2.7 <i>Zusammenfassung</i> : Teil Transkriptanalyse.....	93
4.3 Regulation des NKG2A Promotors	95
4.3.1 Proximaler Promotor – Längenfragmente	96
4.3.1.1 Proximaler Promotor – Mutanten.....	98
4.3.1.2 Transkriptionsfaktor Analyse: proximaler Promotor.....	100
4.3.2 Distaler Promotorbereich – Längenfragmente	101
4.3.3 Stromaufwärts aktivierende Sequenz (SAS)	103
4.3.3.1 Transkriptionsfaktor Analyse: Stromaufwärts aktivierende Sequenz.....	104
4.3.3.2 Ist die SAS ein klassischer Enhancer?.....	105
4.3.4 Distaler Promotor – Längenfragmente	106
4.3.4.1 Distaler Promotor – Mutanten.....	106
4.3.4.2 Transkriptionsfaktor Analyse: distaler Promotor.....	109
4.3.5 Vergleich proximaler – distaler Promotor	111
4.3.5.1 Nucleofection – Jurkat.....	112
4.3.6 Vergleich NK3.3 primäre NK-Zellen	114
4.3.7 Vergleich NK-Zellen, nicht-NK-Zellen und murine Zellen	117

4.3.8 Vergleich Nucleofection – JetPEI	118
4.3.9 Unterschiede lymphozytäre Zelllinien – nicht lymphozytäre Zelllinien	119
4.3.10 <i>Zusammenfassung</i> : Teil Promotoranalyse.....	121
4.4 Sequenzvergleich	123
4.4.1 Sequenzvergleich: NKG2A, NKG2C und NKG2E.....	124
4.4.2 Sequenzvergleich: humanes NKG2A und murines Nkg2a.....	124
4.4.3 <i>Zusammenfassung</i> : Teil Sequenzvergleich.....	127
4.5 Epigenetik	
4.5.1 Einleitung	128
4.5.2 Stimulation der NK-Zelllinie YT mit AZA und TSA	129
4.5.2.1 Stimulation primärer NK-Zellen mit AZA und TSA.....	131
4.5.2.2 Stimulation primärer CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen mit AZA und TSA.....	133
4.5.2.3 Stimulation von NK3.3, Jurkat und HeLa mit AZA und TSA.....	134
4.5.2.4 Transkriptanalyse in NK3.3 nach AZA und TSA Stimulation.....	136
4.5.3 Methylierungsstatus Analyse der Alu-Sequenz in NK3.3 und Jurkat	137
4.5.4 ChIP-(Chromatin-Immunopräzipitation) Analyse	139
4.5.4.1 ChIP-Analyse des distalen Promotors.....	140
4.5.4.2 ChIP-Analyse des proximalen Promotors.....	140
4.5.5 <i>Zusammenfassung</i> : Teil Epigenetik.....	143
5 DISKUSSION	
5.1 Ein distaler, TATA-loser Promotor, der durch eine stromaufwärtsgelegene aktivierende Sequenz (SAS) reguliert wird.....	144
5.2 Identifikation eines zweiten, proximal gelegenen, TATA-abhängigen Promotors.....	148
5.3 Das NKG2A-Modell – ein duales Promotorsystem.....	149
5.4 Induktion der <i>de novo</i> Expression von NKG2A auf T-Zellen durch Zytokine ..	152
5.5 Modulation der NKG2A Expression auf NK-Zellen durch Zytokine.....	155
5.6 Keine klassische, epigenetische Regulation des NKG2A Gens.....	157
5.7 Zelltyp- und Speziespezifität der NKG2A Regulation.....	158
5.8 Spielt die Alu-Sequenz doch eine Rolle?.....	160
6 ZUSAMMENFASSUNG	162
7 LITERATURVERZEICHNIS	164
8 ANHANG	
8.1 Abkürzungen.....	175

1 EINLEITUNG

1.1 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK) sind eine heterogene Lymphozytenpopulation. Sie sind, neben den myeloiden Zellen wie Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, Teil des angeborenen Immunsystems, im Gegensatz zu den T- und B-Zellen, die dem adaptiven Immunsystem zugerechnet werden. Aufgrund ihrer Morphologie wurden sie zunächst als große granulierte Lymphozyten (large granular lymphocytes; LGL) bezeichnet (Timonen, 1981). Ihre Fähigkeit, Tumorzellen ohne vorherige antigene Aktivierung zu lysieren, brachte ihnen die Bezeichnung „natürliche Killerzellen“ ein (Takasugi, 1973; Kiessling, 1975). Phänotypisch werden NK-Zellen durch ihre Oberflächenproteine charakterisiert, die, der international gültigen Nomenklatur folgend, als Lymphozyten Differenzierungsmoleküle (cluster of differentiation; CD) bezeichnet werden. Es sind Rezeptoren und deren Liganden, die Signale bzw. spezifische Funktionen der Zelle vermitteln. Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern erlaubt es, Zellen nach ihren Oberflächenmolekülen zu unterscheiden und so CD3-positive T-Zellen von CD3-negativen NK-Zellen zu differenzieren. Typisch für NK-Zellen ist die Expression von CD56, dem Neuralen Zelladhäsionsmolekül (neural cell adhaesion molecule; N-CAM) und die Abwesenheit des T-Zell-Rezeptormoleküls CD3 (Lanier, 1991).

1.2 T-Zellen und MHC-Restriktion

T-Zellen lassen sich nach ihrer Expression der Korezeptoren CD4 und CD8 einteilen, wobei CD4-positive T-Zellen (Helferzellen) vor allem hormonähnliche Botenstoffe (Zytokine) produzieren, während CD8-positive T-Zellen (zytotoxische T-Zellen) Zielzellen töten. Dies geschieht aber nur nach vorheriger antigenspezifischer Stimulation durch professionell antigenpräsentierende Zellen (APC) bzw. die Zielzelle selbst. Unerlässlich für diese Aktivierung ist die Interaktion des T-Zell-Rezeptorkomplexes (TCR) und dessen Korezeptoren (CD4 oder CD8) mit den Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (major histocompatibility

complex; MHC), die auch als „Humanes Leukozyten Antigen-System“ (HLA) bezeichnet werden (Klein, 1990). Während MHC-Klasse-II-Moleküle CD4⁺ Helferzellen antigen-spezifische Peptide präsentieren, die extrazellulären Ursprungs sind, präsentieren MHC-Klasse-I-Moleküle CD8⁺ T-Zellen antigenspezifische Peptide, die intrazellulären Ursprungs sind und aus dem Zytosol stammen (Germain, 1994). Die MHC-Moleküle sind polymorph und polygen, und jeder Mensch trägt sein individuelles Repertoire dieser Moleküle (Parham, 1995). Werden von virusinfizierten Zellen oder transformierten Tumorzellen keine MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert, unterbleibt die Zerstörung durch die zytotoxischen T-Zellen. Sie können „selbst“ von „fremd“ nur anhand dieser MHC-Moleküle unterscheiden und sind MHC-restringiert (Ploeg, 1998; Algarra, 2000; Zinkernagel, 1974). Im Gegensatz dazu können NK-Zellen diese Zellen lysieren, da sie nicht MHC-restringiert sind (Storkus, 1987).

1.3 Effektormechanismen

NK-Zellen weisen die gleichen Effektormechanismen zur Tötung von Zielzellen (Target) auf wie zytotoxische T-Zellen (cytotoxic T lymphocyte; CTL; Moretta, 1997). NK-Zellen töten ihre Zielzellen, indem sie die in ihren Vesikeln enthaltene Granula in Richtung der gebundenen Zielzelle ausschütten. Das enthaltene Perforin sowie die Granzyme, ein Gemisch aus Serinproteasen, gelangen über einen noch unbekanntem Mechanismus in die Zielzelle, wo sie eine Enzymkaskade aktivieren, welche die Zellen einen programmierten Zelltod (Apoptose) sterben lässt (Uhrberg, 2005). Bei der antikörperabhängigen Zytotoxizität (antibody dependent cellular cytotoxicity; ADCC) wird die Spezifität von Antikörpern auf der Zielzelle mit Hilfe des Antikörperrezeptors (CD16) auf der NK-Zelle mit dem Effektormechanismus gekoppelt (Lanier, 1988). Neben diesen recht schnell wirkenden Mechanismen attackieren NK- und T-Zellen ihre Zielzellen auch durch Rezeptor-vermittelte Induktion von Apoptose. Zu erwähnen sind hier die Mitglieder der TNF-Familie (Tumor Nekrose Faktor) wie TNF- α , TRAIL und CD95Ligand (FAS-Ligand; Kashii, 1999; Zamai, 1998). Neben den zytotoxischen Funktionen können NK-Zellen aber auch eine Reihe von Botenstoffen, die Zytokine, produzieren. Vor allem NK-Zellen mit einer starken CD56 Expression (CD56^{bright}) produzieren sogenannte Interleukine

(IL; Cooper, 2001), wie IL-5 (Warren, 1995), IL-10 (Mehrotra, 1998) und IL-13 (Hoshino, 1999) sowie Interferone (IFN- γ ; Fehniger, 1999), Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF- α ; Jacobs, 2001) und Wachstumsfaktoren (GM-CSF; Cuturi, 1989).

1.4 Rezeptoren auf NK-Zellen

Die Aktivität der NK-Zellen wird durch verschiedene Rezeptoren, welche die Zellen sowohl positiv als auch negativ beeinflussen, reguliert. Nicht alle NK-Zellen tragen die gleichen Rezeptoren, es bilden sich Subpopulationen heraus, deren Rezeptorrepertoire ihre Funktionen bzw. ihr Aktivitätsspektrum widerspiegelt. Die Signaltransduktion der aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren integrieren in der NK-Zelle und passen so die Reaktion der Zelle auf die jeweilige Aufgabe an. Der bereits erwähnte CD56 Rezeptor macht hier eine Ausnahme, er ist zwar für NK-Zellen charakteristisch, doch ist bis heute seine Funktion unbekannt. Der niedrigaffine Rezeptor für den Fc-Teil des Immunglobulins G (CD16) ermöglicht die Bindung an mit Antikörper markierten Zielzellen und somit die bereits erwähnte ADCC. Adhäsionsrezeptoren wie CD11a (LFA-1)/CD18 und CD2 (LFA-2) ermöglichen die Bindung an die Zielzelle (Barao, 2003; Timonen, 1988; Robertson, 1990; Schmidt, 1985). Die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (natural cytotoxic receptors; NCR) umfassen eine Gruppe von drei aktivierenden Rezeptoren, bestehend aus NKp30, NKp44 und NKp46 (Moretta, 2000). Sie können an spezielle virale Oberflächenantigene, die Hämagglutinine, und tumorspezifische Antigene binden (Arnon, 2004). Neben diesen MHC-Klasse-I-unspezifischen Rezeptoren exprimieren NK-Zellen aber noch eine Gruppe von Rezeptoren, mit denen sie spezifische MHC-Klasse-I-Moleküle erkennen können. Diese Gruppe gliedert sich nach ihrer Rezeptorstruktur in zwei Familien: die durch ihre Immunglobulindomänen gekennzeichneten Immunglobulin-artigen Rezeptoren (killer cell immunoglobulin-like receptors; KIRs) und die durch ihre carbohydratebindende Domäne charakterisierten Lektin-artigen Rezeptoren (killer lectin-like receptor; KLRs; Lanier, 1998).

1.5 MHC-Klasse-I-Moleküle

Die MHC-Klasse-I-Moleküle des Menschen werden in HLA-A, -B, -C, -E, -F und -G unterschieden. Die HLA-A, -B und -C Moleküle, die auch als klassische Klasse-I-Moleküle bezeichnet werden, sind hochpolymorph. Dieser Polymorphismus gewährleistet ein weites Bindungsspektrum für antigene Peptide. HLA-E, HLA-F und HLA-G sind wenig polymorph, sie werden auch als nicht-klassische Klasse-I-Moleküle bezeichnet. Die Expression von HLA-E, für das bislang nur zwei Allele beschrieben sind (Ulbrecht, 1999), ist mit der Expression der klassischen HLA-Moleküle assoziiert - anstelle der antigenen Peptide bindet es die Signalsequenzen dieser Moleküle. Durch diesen Mechanismus kann indirekt die Klasse-I-Expression kontrolliert werden (Braud, 1998).

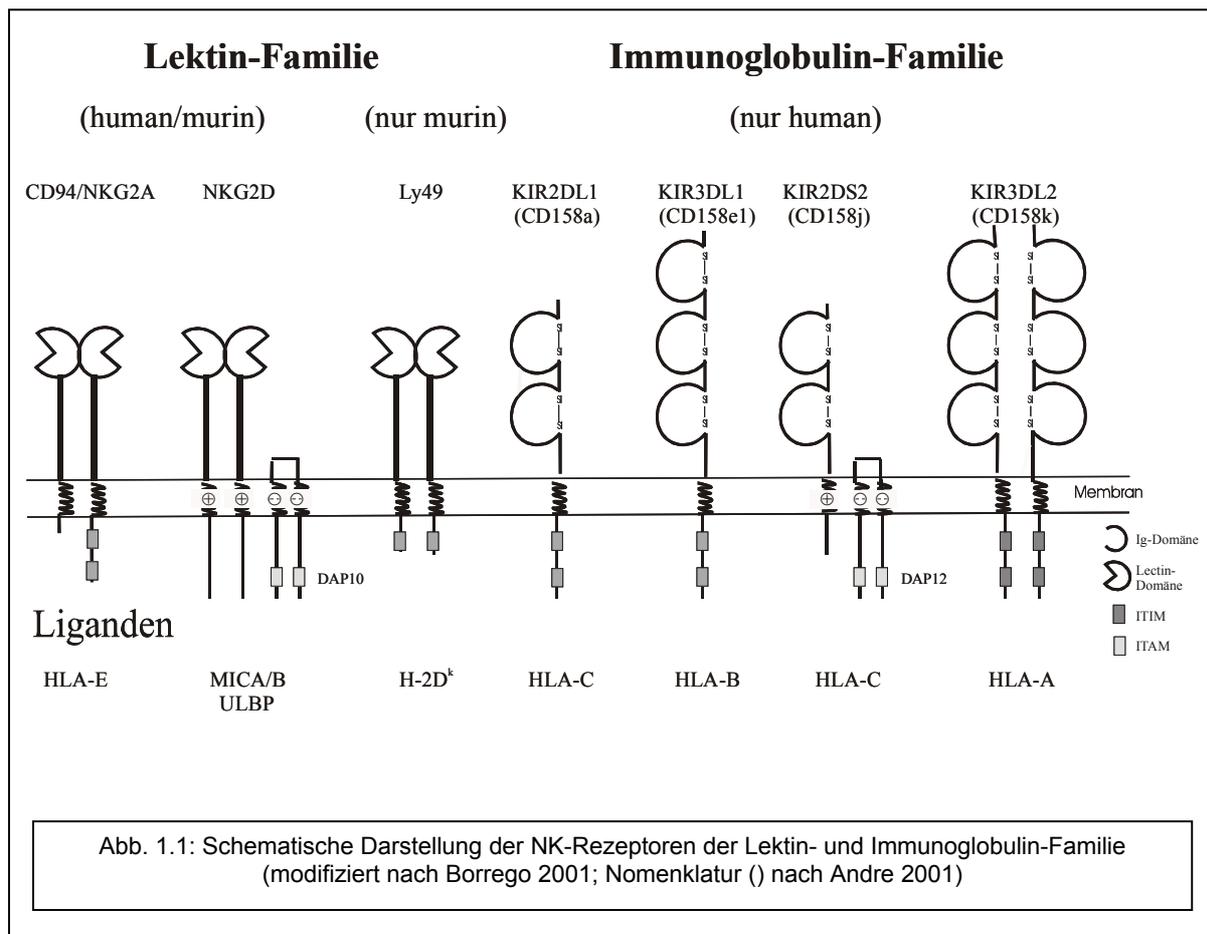
1.6 Die „Missing Self“ Hypothese

Der überwiegende Teil der MHC-Klasse-I-Rezeptoren vermittelt den an sie bindenden NK-Zellen ein inhibitorisches Signal. Nach der „Missing Self“-Hypothese wird eine NK-Zelle eine Targetzelle erst dann lysieren, wenn sie ihr kein „selbst“ MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren kann (Ljunggren, 1990). Die NK-Zellen eines Menschen tragen ein Repertoire an Rezeptoren, das jeweils für eigene MHC-Klasse-I-Moleküle spezifisch ist, d.h. es wird mindestens ein spezifischer Rezeptor für „selbst“ MHC-Klasse-I exprimiert („At Least One“-Theorie; Valiante, 1997; Uhrberg, 1997), zusätzlich dazu können auch fremde MHC-Klasse-I-Moleküle erkannt werden („Hybrid Resistance“; Seaman, 2000).

1.7 Die KIR-Rezeptoren

Die MHC-Klasse-I-spezifischen KIRs codieren, als Gruppe zusammengefasst, auf dem humanen Chromosom 19, im sogenannten Leukozyten-Rezeptor-Komplex (leukocyte receptor complex, LRC; Torkar, 1998). Sie unterscheiden sich in Immunglobulin-Domänenanzahl (D), in der Länge ihrer zytoplasmatischen Anteile,

die jeweils inhibitorisch (lang, long; L) oder aktivierend (kurz, short; S) wirken können. Es gibt Monomere wie auch Homodimere (KIR3DL2). Ihre Struktur schlägt sich in ihrer Nomenklatur nieder. Die zytoplasmatischen Anteile der inhibitorischen KIRs weisen sogenannte ITIMs (immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motifs) auf, welche über SH2-enhaltende Tyrosin-Phosphatasen eine Hemmung der NK-Zelle vermitteln können (Long, 1999; Vivier, 2004).



Die stimulatorischen KIRs mit den kurzen zytoplasmatischen Anteilen weisen eine positiv geladene Aminosäure (Arginin oder Lysin) in ihrer Transmembrandomäne auf, mit der sie über das negativ geladene Adaptormolekül DAP12 (killer cell activating receptor associated protein; KARAP) interagieren können (Lanier, 1998). Dieses Molekül enthält sogenannte ITAMs (immunoreceptor tyrosin-based activating motifs), die über die Protein-Tyrosin Kinase Syk und ZAP70 eine Aktivierung der Zellen vermitteln können (Tomasello, 1998). Die Liganden dieser KIRs gehören zu den klassischen MHC-Klasse-I-Molekülen. KIR2DL1 (CD158a) und KIR2DL2/3 (CD158b) binden an unterschiedliche allele Subgruppen von HLA-C, KIR3DL1 (NKB1) bindet

an HLA-B und KIR3DL2 (CD158k) bindet HLA-A. Bei gleicher Spezifität des Rezeptors weist der inhibierende Rezeptor jeweils eine höhere Affinität zum Liganden auf, sie kontrollieren so die stimulatorischen Isoformen (Vales-Gomez, 1998).

1.8 Die C-Typ Lektin-artigen Rezeptoren

Die C-Typ Lektin-artigen Rezeptoren codieren auf dem humanen Chromosom 12 im sogenannten NK-Zell-Cluster (NKC; Yabe, 1993). Charakteristisch für diese Rezeptoren ist ihre Carbohydrat-Erkennungsregion (carbohydrate recognition domain; CRD), die in Calcium-abhängiger Weise an Zielstrukturen der Liganden binden kann. Im humanen System ist vor allem die NKG2-Familie von Bedeutung, die mit Ausnahme des NKG2D jeweils Heterodimere mit CD94 bildet, welches selber keine zytoplasmatische Domäne besitzt. Je nach assoziiertem NKG2-Molekül kann die Bindung des Dimers an seinen Liganden inhibitorisch (NKG2A) oder stimulatorisch (NKG2 C, E, H; Houchins, 1997) auf die NK-Zelle wirken. Der zytoplasmatische Anteil von NKG2A trägt zwei ITIMs und vermittelt so eine Inhibition (Kabat, 2002). Die aktivierenden Isoformen NKG2C und NKG2E sind mit DAP12-Molekülen assoziiert und vermitteln über Tyrosin-Kinasen eine Aktivierung, wie bereits für stimulatorische KIRs dargestellt (Carretero, 1998; Wu, 1999). Unterschiede im Ligandenspektrum macht das homodimere NKG2D, welches durch Bindungen an das ITAMs tragende Adaptormolekül DAP10 eine Aktivierung bewirkt. Liganden sind nicht HLA-Moleküle, sondern die stressinduzierten Moleküle MICA und MICB (MHC class I chain-related; Steinle, 2001) und die virusinduzierten ULBPs (U16-binding proteins; Kubin, 2001; Cosman, 2001).

1.9 Der NKG2A Rezeptor: Liganden – Funktion – Regulation

NKG2A und NKG2C binden beide das nicht-klassische HLA-Molekül HLA-E (Braud, 1998; Wada, 2004), wobei NKG2A und NKG2C nie auf ein und der selben Zelle vorkommen (Jabri, 2002; Cantoni, 1998) und NKG2A eine höhere Affinität zu seinem

Liganden aufweist (Vales-Gomez, 2000). Die Bindung von Signalpeptiden der klassischen HLA-Moleküle HLA-A, -B und -C stabilisieren das HLA-E Molekül und ermöglichen ihm so die Oberflächenexpression. Ein funktionierender TAP-Proteinkomplex (transporter associated with antigen processing), ein mit der Antigenprozessierung assoziierter Komplex, transportiert die Peptide in das endoplasmatische Retikulum, wo sie mit HLA-E komplexiert werden können. Auf der Oberfläche exprimiert, kann HLA-E mit CD94/NKG2A auf der NK-Zelle interagieren und die Lyse der HLA-E-positiven Zielzellen inhibieren. Ist die HLA-A, -B oder -C Expression oder der TAP-Komplex in Folge von Virusinfektionen oder in Tumorzellen gestört, so kann HLA-E nicht die Zelloberfläche erreichen, und es kann keine NK-Zell-Inhibition über CD94/NKG2A erfolgen (Yokoyama, 1998; O'Callaghan, 2000). Besonders die Produkte des humanen Zytomegalie-Virus (humanen Cytomegalovirus; hCMV) können durch vielfache Mechanismen die Oberflächenexpression der HLA-Rezeptoren verhindern (Llano, 2003), um so der T-Zell-vermittelten Immunantwort zu entkommen oder HLA-E stabilisierende Surrogate exprimieren, um auch der NK-Zell-Lyse zu entgehen (Ulbrecht, 2000). Es konnte für das stimulatorische NKG2C gezeigt werden, dass eine erfolgte CMV-Infektion zu erhöhter Expression auf NK- und T-Zellen führt (Guma, 2004). Ein weiterer NKG2A-Ligand, das HLA-G, stellt einen Sonderfall dar, da es normalerweise nur auf HLA-A- und -B-negativen Trophoblasten in der Gebärmutter von Schwangeren vorkommt, wo es wahrscheinlich dem Fötus Schutz vor den maternalen NK- und T-Zellen bietet (Ponte, 1999; Biassioni, 1999; Khalil-Daher, Lopez-Botet, 1999).

Die CD94/NKG2A Expression scheint nicht nur inhibitorisch auf die Zytotoxizität zu wirken. Es konnte gezeigt werden, dass eine hohe CD94 Expression in humanen IL-2 aktivierten NK-Zellen mit erhöhter Apoptoseanfälligkeit korreliert (Ida, 1997). Dies steht im Kontrast zu einer Publikation, die zeigt, dass eine erhöhte CD94 Expression auf murinen NK- und CD8⁺ T-Zellen als Folge einer chronischen Infektion mit *Listeria monocytogenes* die Zellen vor der Apoptose schützen konnte (Gunturi, 2003) - somit könnte NKG2A eine ähnliche Rolle im murinen System spielen wie KIR im Menschen (Young, 2001). Erwähnt werden muss, dass im murinen System die CD94/NKG2A Expression auf CD8⁺ T-Zellen etwas anders zu bewerten ist, da hier die Expression als Aktivierungsmarker eingesetzt werden kann

(McMahon, 2002; Moser, 2002; Miller, 2002). Es gibt ebenfalls Publikationen, die eine Zytotoxizitätsinhibition durch CD94/NKG2A bei murinen Polyoma-Virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zeigen (Moser, 2002), während dies beim Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV; McMahon, 2002) und bei *Listeria monocytogenes* Bakterien (LM; Miller, 2002) nicht der Fall ist. Die NKG2A Expression kann auch die Zytokinproduktion betreffen. So konnte in CD4⁺ Helferzellen sowohl die IFN- γ als auch die TNF- α Produktion durch CD94/NKG2A Stimulation herunterreguliert werden (Romero, 2001). Aber die NKG2A Expression kann auch die Zytokinproduktion von NK-Zellen verändern und so eine spätere Immunantwort beeinflussen. Allgemein lassen sich Zytokine in zwei Gruppen unterteilen: Während Zytokine wie IL-2 und IL-12 zu den Th1-Zytokinen zählen, die durch eine zellvermittelte Immunantwort charakterisiert sind, gehören Zytokine wie IL-4 und IL-10 zu den Th2-Zytokinen. Sie führen zu einer humoralen, von Antikörperproduktion gekennzeichneten, Immunantwort. Es konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen von chronisch Hepatitis C Infizierten eine erhöhte NKG2A Expression aufwiesen, die nach Stimulation mit einer HLA-E-positiven Zielzelle vornehmlich IL-10 und TGF- β produzierten, was sich auf die Aktivierung von speziellen antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen) auswirkte. Diese wiederum wurden zur IL-10 Produktion angeregt, und die durch sie stimulierten CD4⁺ Helferzellen zu einer Th2-Antwort aktiviert, wobei bei Virusinfektionen eigentlich eine Th1-Antwort zu erwarten wäre (Jinushi, 2004). Im Umkehrschluss konnte eine erhöhte NKG2A Expression auf NK-Zellen, nach Kultur mit Th1-Zytokinen, nachgewiesen werden (Aktas, 2005), und auch für murine CD4⁺ Helferzellen ist eine vornehmliche NKG2A Expression auf Th1-Zellen bekannt (Hartt-Meyers, 2002).

Für die Oberflächenexpression bzw. Regulation von CD94/NKG2A wurde gezeigt, dass es unabhängig von der Rezeptorvernetzung internalisiert wird und eher einem Rezeptorrecycling unterworfen ist. Auch scheint der Transport des NKG2A, über Glykosylierung und Disulfidbrückenbindung mit CD94 im ER, und Transport zur Zelloberfläche ein anderer zu sein als z.B. der des NKG2C (endozytischer Transport, DAP-12 abhängige Oberflächenexpression; Borrego, 2002; LaBonte, 2004; Lanier, 1998). Während also eine Bindung von NKG2A an seinen Liganden zu keiner Änderung der Rezeptordichte führt, konnte eine erhöhte Expression von NKG2A in Patienten mit MHC-Klassen-I-Expressionsstörung (TAP-Mutation) nachgewiesen

werden (Matamoros, 2001; Cerboni, 2004). Es gibt sogar Zelltyp-spezifische Regulationsmechanismen. Für eine besondere Subpopulation von T-Zellen (invariante $\gamma\delta$ T-Zellen) ist eine stimulationsinduzierte Translokation von intrazellulär präformierten CD94/NKG2A-Molekülen beschrieben (Boullier, 1998).

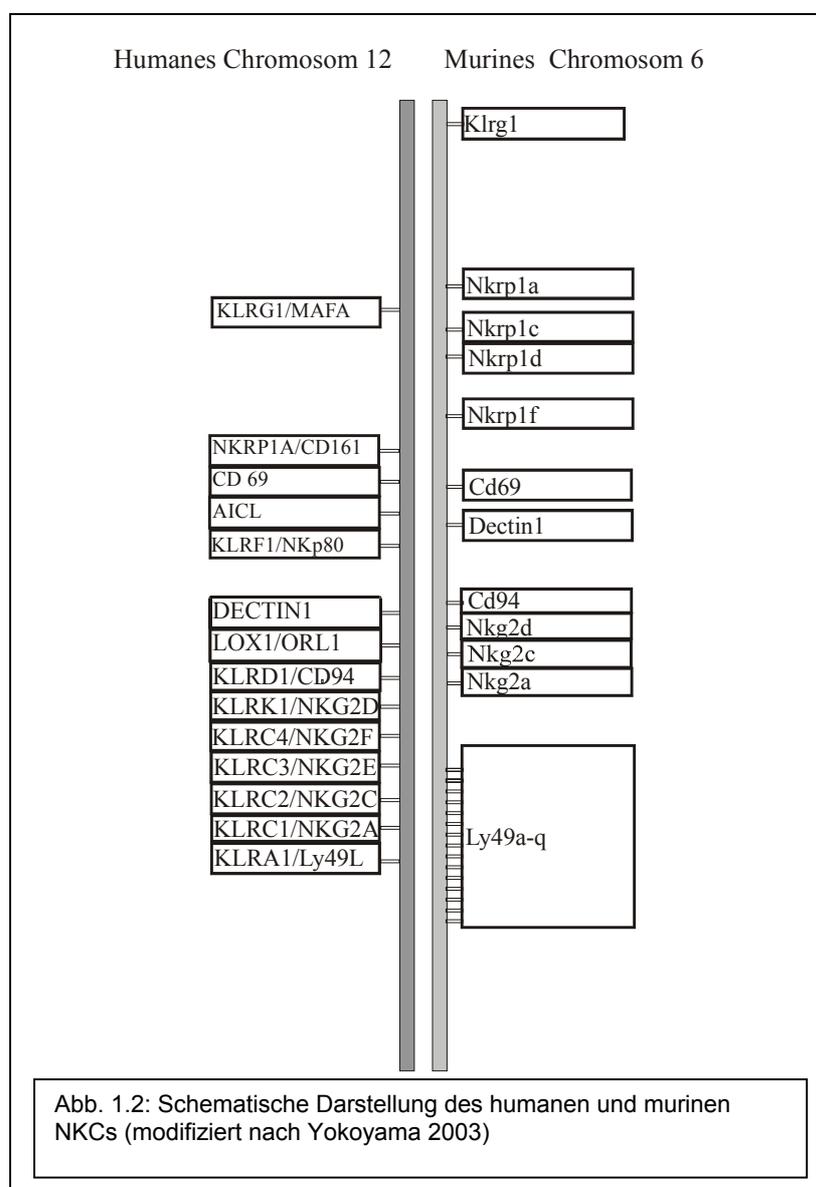
1.10 NK-Zell-Rezeptoren auf T-Zellen

Alle Rezeptoren, die auf NK-Zellen exprimiert werden, mit Ausnahme der NCRs, können auch auf Subpopulationen von CD8⁺ T-Zellen exprimiert werden: Effektorzellen können CD56 exprimieren (Pittet, 2000), und chronisch stimulierte bzw. Gedächtnis (Memory) T-Zellen weisen die Expression von KIRs auf, nur bei naiven T-Zellen findet man keine derartigen Moleküle (Huard, 2000; Young, 2001; Ugolini, 2001). Auch CD94, als Homodimer, und die mit ihm komplexierten Mitglieder der NKG2-Familie, sind auf Subpopulationen zu finden (Uhrberg, 1997; Becker, 2000; Baars, 2000). Während ein Großteil aller NK-Zellen KIR- oder Lektin-artige Rezeptoren exprimieren, weisen nur kleine T-Zell-Subpopulationen eine Expression auf (Uhrberg, 2001; Young, 2002; Ugolini, 2001).

1.11 Der NK-Gen-Cluster (NKC) im humanen und murinen System

Die Gene für *CD94* und die NKG2-Familie sind, wie bereits erwähnt, auf dem humanen Chromosom 12 im sogenannten „NK-Gen-Cluster“ (NKC) lokalisiert. Dieser Cluster enthält aber nicht nur für NK-Zellen charakteristische Gene, sondern umfasst weitere Mitglieder von Lektin-artiger Rezeptorstruktur. Das reicht von generellen Aktivierungsmarkern wie *CD69* (Lopez-Cabrera, 1993) und *AICL* (activation-induced C-type lectin; Hamann, 1997) über Rezeptoren wie *LOX-1* (oxidized low-density lipoprotein) oder *DECTIN* (dendritic-cell-associated C-type lectin; Hernanz-Falcon, 2001), die auf speziellen antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen) vorkommen oder *MAFA* (mast cell function associated antigen; Butcher, 1998), das als erstes auf Mastzellen beschrieben worden ist.

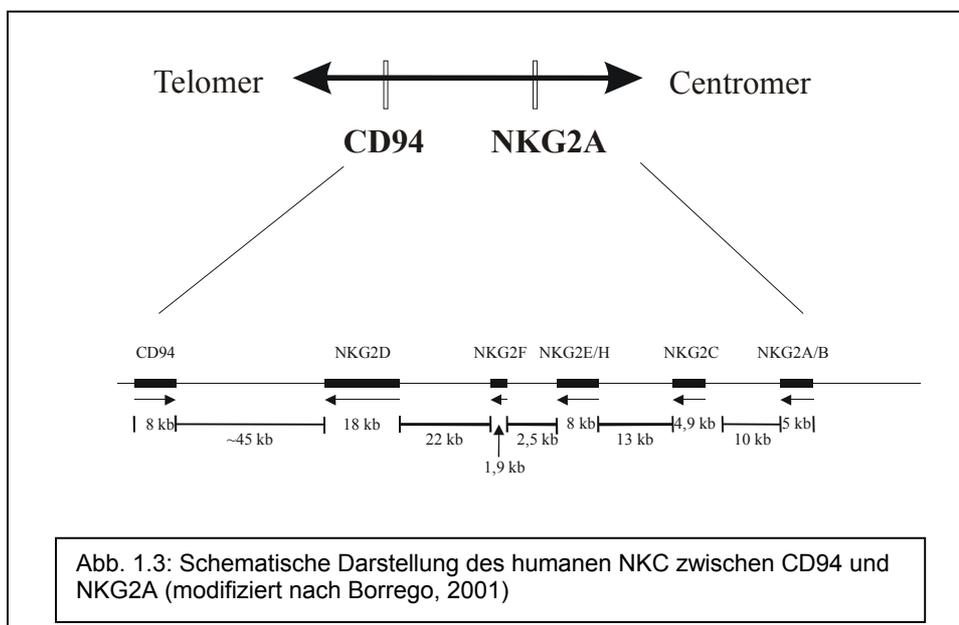
Als weitere Rezeptoren wären hier noch die NKRP-Familie (NK-cell-receptor protein; Lanier, 1994; Poggi, 1997) und die, vor allem im murinen System vorkommende, Ly49-Familie zu nennen (Takei, 1997). Bei Mäusen ist der NK-Gen-Cluster auf dem Chromosom 6 lokalisiert und ist im Aufbau dem humanen sehr ähnlich. Bei beiden Spezies werden CD94:NKG2 Rezeptoren exprimiert (Lohwasser, 1999), wohingegen viele Funktionen, die beim Menschen von den KIRs übernommen werden, im murinen System durch die Ly49-Familie ausgeführt werden.



Diese Familie besteht aus ca. 16 Genen und Pseudogenen (*Ly49a* bis *Ly49q*), die alle dem Lektin-Typ entsprechen und aktivierend oder inhibierend wirken können.

Ly49a war der erste MHC-Klasse-I-spezifische NK-Zell-Rezeptor, den man erforscht hat. Er wirkt inhibierend, wenn er an seinen Liganden, die murinen MHCs H-2D^d, H-2D^k oder H-2D^p bindet (Wilhelm, 2002; Karlhofer, 1992).

Im humanen NK-Gen-Cluster (NKC) existiert nur ein einziges Gen der Ly49 Familie – *Ly49I*, das zwar transkribiert, aber infolge eines Defektes nicht translatiert wird (Westgaard, 1998; Barten, 1999; Mager, 2001). Ebenso konnte kürzlich im murinen System ein KIR-artiges Gen (*Kir11*; Kir-like 1) identifiziert werden (Welch, 2003; Hoelsbrekken, 2203). Es scheint sich hier also um orthologe Gene zu handeln, wobei sich im Menschen die KIR Gene und in der Maus die Ly49 Gene durchgesetzt zu haben scheinen.



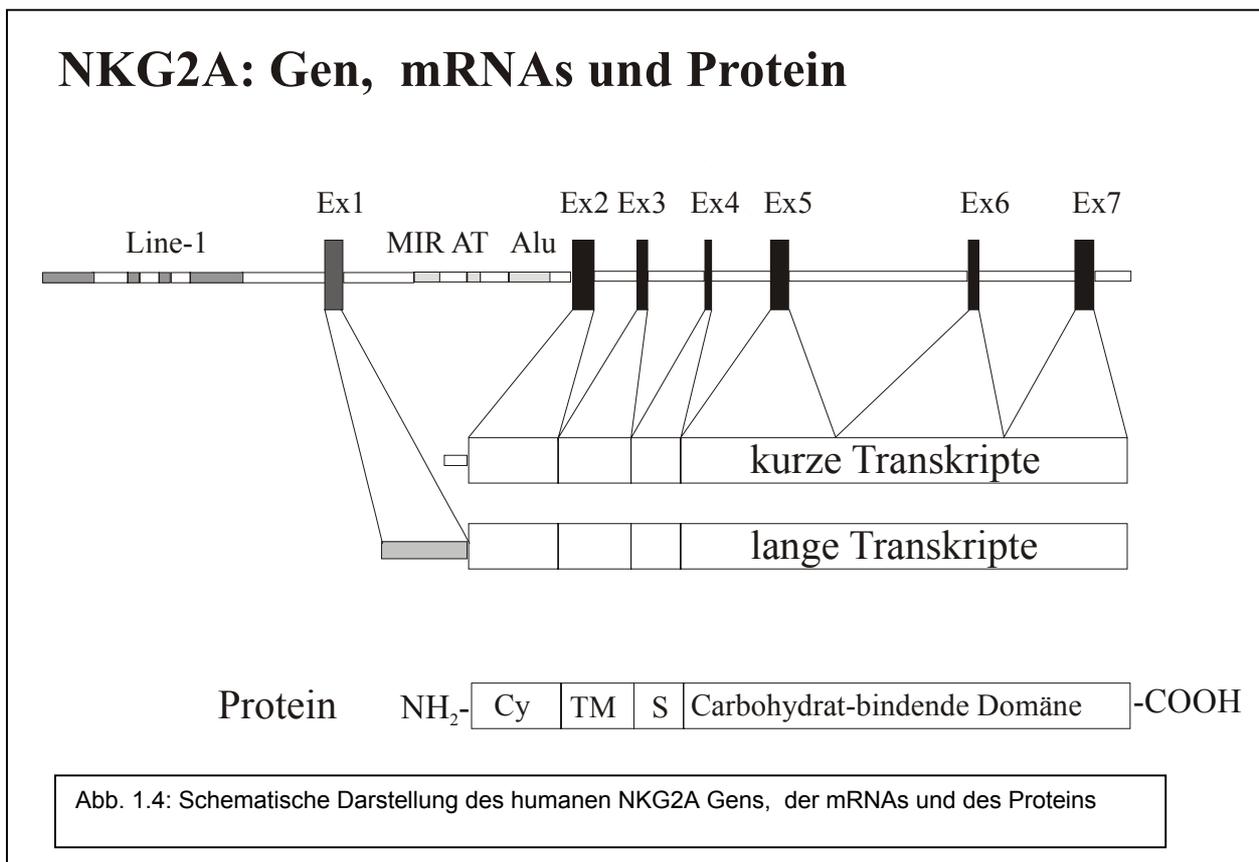
1.12 Die NKG2-Gen-Familie

Der Cluster für CD94 (Chang, 1995) und die NKG2-Familie (Houchins, 1991) umfasst einen Genabschnitt von ca. 150 kb. Die Abfolge der Gene verläuft in centromerer Richtung, angefangen bei *CD94*, gefolgt von *NKG2D*, *NKG2F*, *NKG2E/H*, *NKG2C* und *NKG2A/B*. *NKG2H* ist die Spleissvariante von *NKG2E* und *NKG2B* die Variante von *NKG2A*. Während die Transkriptionsrichtung von *CD94* centromerwärts verläuft, verlaufen alle NKG2-Mitglieder in die Gegenrichtung. Die *NKG2*-Mitglieder weisen 6 bis 7 Exons auf, Ausnahme bildet das *NKG2F* Gen mit 4 und *NKG2D* mit 9 Exons (Plougastel, 1998, 1996). Es wird aufgrund von DNA- und Proteinsequenz-

Homologien vermutet, dass der Cluster durch Genduplikation eines *NKG2A* Gens entstanden ist, der erst *NKG2F*, danach *NKG2C* und *NKG2E* entstehen ließ (Sobanov, 1999; Plougastel, 1998). *NKG2D* macht hier nicht nur durch seine Homodimerstruktur eine Ausnahme, sondern scheint auch sequenziell dem *CD94* ähnlicher zu sein (Lohwasser, 2000; Glienke, 1998).

1.13 Das NKG2A Gen

Das humane *NKG2A* Gen besteht aus 7 Exons, wobei Exon 2 den zytoplasmatischen (Cy), Exon 3 den transmembranen Teil (TM), Exon 4 den Schaftteil (Schaft, S) und die Exons 5 bis 7 die carbohydrate-bindende Domäne bilden. Das Exon 1 ist zwar in der mRNA enthalten, wird später jedoch nicht translatiert.



Der NKG2A Rezeptor ist ein Typ-II-Protein, da der aminoternale Anteil später, nachdem das Protein mit CD94 über eine Disulfidbrücke komplexiert wurde, im Zytoplasma lokalisiert ist (Lazetic, 1996). Geschieht dies nicht, erfolgt keine

Expression auf der Zellmembran (Brooks, 1997). Die Sequenz vor dem ersten translatierten Exon (Exon 2) ist durch repetitive Sequenzen gekennzeichnet. Sie weist eine Alu-Sequenz (Alu Y), eine MIR (mammalian-wide interspersed repeat), eine AT-reiche Sequenz und mehrere LINEs (long interspersed nucleotide sequence; L1M3) auf (Plougastel, 1998). Es wurden multiple Startpunkte für NKG2A Transkripte identifiziert, wobei lange und kurze Transkripte unterschieden werden können, von denen die langen Transkripte das Exon 1 beinhalten. Die Spleissvariante NKG2B ist durch das Fehlen des Exon 4 (Schaffregion) gekennzeichnet (Plougastel, 1996).

1.14 Induktion von NK-Zell- Rezeptoren während der NK-Zell-Reifung

Die im peripheren Blut vorkommenden humanen NK-Zell-Populationen haben ihren Ursprung im adulten Knochenmark, wo sie aus hämatopoetischen Stammzellen heranreifen (Colucci, 2003). Es wird vermutet, dass neben dem Knochenmark auch sekundäre Lymphorgane wie die Lymphknoten Orte der NK-Zell-Differenzierung und des Erwerbs von Selbsttoleranz sind (Ferlazzo, 2004). Welche Faktoren für ihre Reifung und insbesondere für die Induktion ihrer Rezeptoren bzw. die Feinregulation von Bedeutung sind, ist zur Zeit noch unklar. *In vitro* Differenzierungsversuche mit CD34-positiven Stammzellen haben gezeigt, dass sowohl lösliche Mediatoren wie Zytokine als auch die Zell-Zell-Interaktionen mit Stromazellen eine entscheidende Rolle bei der Induktion dieser Rezeptoren spielen könnten (Miller, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass frühe NK-Zell-Vorläufer die IL-2 β -Kette exprimieren, gefolgt von NKRP1 (CD161) und CD56 (Yu, 1998; Le, 2001). Auch CD94 und verschiedene Mitglieder der NKG2-Familie konnten im Zuge der *in vitro* Differenzierung durch Zytokinbehandlung induziert werden (Miller, 2002; Jaleco, 1997). Im Gegensatz dazu scheint die Induktion von KIRs auf NK-Zellen bis zum jetzigen Zeitpunkt nur durch spezielle Kokultur mit Stromazellen möglich zu sein.

In vitro konnte NKG2A sowohl auf zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen als auch auf CD4⁺ T-Helferzellen induziert werden, dies jedoch nur durch Stimulation in Verbindung mit Zytokinen wie IL-10, IL-15, IL-12 und TGF- β (Romero, 2001; Mingari, 1998; Derre, 2002; Bertone, 1999; Guerra, 1999). Die TCR-Stimulation von CD4⁺ Helferzellen

unter Zugabe von IL-10 ergab, dass nach der Expression von CD94 erst NKG2D und NKG2E, danach NKG2A und zum Schluss NKG2C induziert wurden (Romero, 2001). Bei murinen NK-Zellen, die aus embryonalen Stammzellen differenziert wurden, ergab sich die Reihenfolge Cd94 – Nkg2d, gefolgt von Nkg2a, Nkg2e und Nkg2c (Lian, 2002).

1.15 Klinische Relevanz

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl KIRs als auch die NKG2-Familie eine Rolle in der virus- und tumor-spezifischen Immunantwort spielen. Bei Patienten mit einer HIV-Infektion konnte eine Erhöhung der CD94 Expression mit fortschreitender Krankheit beobachtet werden (Andre, 1999). Während der Großteil inhibitorischer Rezeptoren, u.a. KIRs und NKG2A, anstieg, wurden die stimulatorischen Rezeptoren, mit Ausnahme des NKG2D herunterreguliert (Mavilio, 2003). Bei Tumorerkrankungen wie Melanomen konnten KIRs identifiziert werden, die eine effektive Zerstörung der Tumorzellen verhinderten (Ikeda, 1997; Bakker, 1998) bzw. durch die inhibitorische Wirkung von CD94/NKG2A sowohl Zytokinausschüttung als auch Zytotoxizität vermindern konnten (Le Drean, 1998). Während beim Nierenkarzinom hauptsächlich eine erhöhte CD94 Expression nachgewiesen werden konnte, war die KIR Expression hier unverändert (Stanley, 2001). Neben der klassischen Therapie mit Lymphokin-aktivierten NK-Zellen (LAK-Zellen; Fehniger, 2000) und der Serumtherapie mit tumorspezifischen Antikörpern, bei denen man sich die ADCC zunutze macht (Clynes, 2000; Gluck, 2004), könnten Immuntherapieansätze mit CD8⁺ T-Zellen zu besseren Ergebnissen führen, wenn man die Induktion inhibierender Rezeptoren unterdrücken könnte (Derre, 2002) bzw. Bedingungen wählen könnte, welche die Induktion aktivierender Rezeptoren favorisieren. Ein klassischer Tumor-Escape-Mechanismus ist die Produktion von TGF- β (Beck, 2001), welches zu einer Inhibition des aktivierenden NKG2D Rezeptor (Gastriconi, 2003) und gleichzeitig zu einer Induktion des inhibierenden Rezeptor NKG2A führt (Bertone, 1998). Weiterhin konnte bei der allogenen Knochenmark-Transplantation gezeigt werden, dass der Anteil an CD94/NKG2A-positiven PBMC in den Patienten höher war, die keine Immunreaktion des Transplantats aufwiesen

(GVHD; graft versus host disease; Tanaka, 2000). Allerdings kann dies auch einen negativen Effekt haben, wenn die NKG2A Expression den gewünschten Transplantat-gegen-Leukämie Effekt (GVL; graft versus leukemia effect) der NK-Zellen verhindert, bei dem durch partielle Inkompatibilität der HLA-Proteine die Zellen des Transplantates gegen die Leukämiezellen aktiv werden sollen (Nguyen, 2005). In wie weit sowohl KIRs als auch NKG2-Rezeptoren bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen (Rheumatoide Arthritis, Systemischer Lupus Erythematodes, Psoriasis), d.h. bei Reaktionen gegen körpereigenes Gewebe, beteiligt sind, ist zur Zeit noch Gegenstand der Forschung (Hikami, 2003; Suzuki, 2004; Seaman, 2000).

1.17 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es zu klären, wie das humane NKG2A Gen reguliert wird. Die Charakterisierung von zwei Transkriptpopulationen, die jeweils vor dem nichttranslatierten Exon 1 bzw. vor dem Exon 2 initiieren (Plougastel, 1998), legt die Vermutung nahe, dass es auch zwei entsprechende Promotoren gibt. Eine Quantifizierung der Transkriptpopulationen mit Hilfe der Realtime-PCR sollte die Frage klären, ob diese Transkripte regulatorische bzw. funktionelle Unterschiede aufweisen. Da NKG2A zwar auf allen NK-Zellen exprimiert wird, aber nur auf einer kleinen Subpopulation von T-Zellen, drängte sich die Frage nach einer Zelltyp-spezifischen Regulation auf. Die Identifizierung und Charakterisierung der Promotorstrukturen wurde mit der Analyse der Transkriptpopulationen verknüpft. Hierzu wurden Promotorkonstrukte mit Luziferase als Reporter gen mit Hilfe der neuen Nucleofector™ Technologie in verschiedenen NK-Zelllinien und Nicht-NK-Zelllinien, sowie erstmals auch in primären NK-Zellen, getestet. *In vivo* isolierte und *in vitro* induzierte NKG2A-positive NK- und T-Zell-Populationen sollten mittels Realtime-PCR auf ihre Transkriptzusammensetzung untersucht werden. Die Analyse der Regulation des NKG2A Gens besitzt erhebliche Bedeutung für das generelle Verständnis der NK-Zell-Funktion, da NKG2A eine entscheidende Rolle bei der Toleranzinduktion und der Kontrolle NK-Zell-spezifischer Immunantworten spielt.

2 MATERIAL

2.1 Chemikalien

Agarose	Invitrogen
Ammoniumchlorid-Lösung	lokale Produktion
Ampicillin	Sigma
Aqua injectabilia	Braun
Aqua HPLC	Merck
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Sigma
Broth Base (Lennox L Broth Base)	Gibco
Chloroform	Sigma
DMSO	Sigma
Ethanol	Roth
EDTA	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll (Biocoll)	Biochrom
Glycerin	Roth
IPTG	Sigma
Isopropanol	Roth
Kanamycin	Sigma
LB Broth Base (Bakterienmedium)	Gibco
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydroxid	Roth
PBS (Phosphatpuffer)	Serag Wiessner
Phenol	Sigma
Tetrazyklin	Sigma
Tris-Base	Roth
Trypanblau Lösung (0,4%)	Gibco
Select Agar	Gibco
Sephadex G50	Amersham
X-Gal	Sigma
Xylencyanol	Sigma

2.2 Verbrauchsmaterial

15 ml, 50 ml Röhren Falcon	Becton Dickinson
96-Well Rundbodenplatten Cellstar	Greiner
24-Well Zellkulturplatten	Corning
6-Well Zellkulturplatten	Greiner
25 cm ² , 175 cm ² Zellkulturflaschen	Nunc
75 cm ² Zellkulturflaschen	Greiner
5 ml Polypropylen Röhren	Becton Dickinson
Stabpipetten	Corning-Costar
Kryoröhren	Greiner
MACS TM -Säulen	Miltenyi Biotec
Zellsiebe (40 µm Nylon)	Becton Dickinson
Spritzenfilter Minisart (0,2 µm/0,4 µm)	Satorius
0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
0,2 PCR-Reaktionsgefäße	Robbins Scientific
Ultra Clean Cap Strips (opt. Platten)	Abgene
Centri Cap Säulen	Abgene
35 mm und 94 mm Petrischalen	Greiner
Elektroporationsküvetten 2 mm	Peqlab Biotechnologie

2.3 Geräte

Pipetten (Finn)	Labsystems
Pipettierhilfe Pipettus	Integra Bioscience
Brutschrank	Forma Scientific
Sterilbank	Gelair
Wärmehaube Certomat H	B. Braun
Schüttler Certomat M	B. Braun
Cäsiumquelle: Gammacell 1000 Elite	Nordion International INC.
Durchflußzytometer (FACScalibur)	Becton Dickinson
Zellsortiergerät (Coulter Epix)	Coulter
Power-Supply: Power Pak 300	BioRad
Gelelektrophoresekammer	BioRad
Thermomixer	Eppendorf

Thermocycler Gene Amp System 2700	AB Applied Biosystems
Exsikkator + Pumpe	HLC
Gene Quant Pro (DNA/RNA)	Pharmacia
Spectrometer DU 640	Beckmann
Mini- und Medi- MACS Magneten	Miltenyi Biotec
Zentrifuge: Rotina 46 R (Zellkultur)	Hettich
Tischzentrifuge: Mikro 20	Hettich
Zentrifuge (Molbiol) Sigma 2K5	Sigma
Gene Amp PCR System 2700	Applied Biosystems
Elektroporator Easyject	Peqlab Biotechnologie
Nucleofector™	Amaxa Biosystems
Mikroskop (Inversmikroskop)	Hund
Photodokumentationssystem (P91 Herolab)	Mitsubishi
MiniLumat LB9506	Berthold
Sorvall Zentrifuge RC5B Plus	Kendro
SLA1500 Festwinkelrotor, Hb6 Ausschwingrotor	
96 Kapillarsequenzierer ABI3700	ABI

2.4 Puffer und Medien

2.3.1 Zellkultur

RPMI 1640	25 mM HEPES, L-Glutamin	BioWhitaker
DMEM	1000 mg/l (low Glucose)	Gibco
DMEM	4500 mg/l (high Glucose)	Sigma
Hams/F12		Sigma
RPMI10	10 % FCS 1 % Penicillin-Streptomycin in RPMI 1640	
NKL-Medium	10 % FCS 1 % Penicillin-Streptomycin 200 U/ml rIL-2 in RPMI 1640	

NK3.3-Medium 10 % "Killer Cult"*
 10 % FCS
 1 % Penicillin-Streptomycin
 in RPMI 1640

* Kulturüberstand einer 48 h alten mit PHA-M und JY stimulierten allogenen MNC Kultur.

NK-Stimulationsmedium: 10 % FCS
 5 % humanes, hitzeinaktiviertes Serum
 1 % Penicillin-Streptomycin
 1000 U/ml rIL-2
 in RPMI 1640

NK-Differenzierungsmedium: 20 % humanes, hitzeinaktiviertes AB Serum
 24 µmol 2-Mercaptoethanol
 50 µmol Ethanolamin
 20 mg L-Ascorbinsäure
 5 µg Natriumselenit
 1 % Penicillin-Streptomycin
 in 2:1 DMEM/Ham's F12-Medium

OP-9 Medium: 10 % FCS
 1 % Penicillin-Streptomycin
 50 µmol 2-Mercaptoethanol
 in DMEM (1000 mg/l Glucose)

AFT024 Medium: 20 % FCS
 1 % Penicillin-Streptomycin
 50 µmol 2-Mercaptoethanol
 in DMEM (1000 mg/l Glucose)

Einfriermedium: RPMI1640
50 % FCS
1 % Penicillin-Streptomycin
10 % DMSO

Ammoniumchlorid Lösung: 8,3 g NH_4Cl
1,0 g KHCO_3
0,0375 g EDTA- Na_2
ad 1000 ml Aqua iniectionabilia

2.4.2 Molekularbiologie

TE-Puffer: 10 mM Tris HCL (pH 7,4)
1 mM EDTA (pH 8,0)

TBE-Puffer (10x): 107,8 g Tris-Base
55,0 g Borsäure
8,2 g EDTA
in 1000 ml Aqua dest.

LB-Medium: 20 g LB Broth Base
in 1000 ml Aqua dest.

LB-Agar: 6 g Selekt Agar
10 g LB Broth Base
in 500 ml Aqua dest.

Blaumarker: 35 ml Wasser
15 ml Glycerin
1 Spatelspitze Bromphenolblau
1 Spatelspitze Xylencyanol

2.5 Reagenzien für die Zellkultur

BSA	Roth
FCS	Biochrom
Penicillin/Streptomycin Lösung	Gibco
Trypsin/EDTA Lösung	Gibco

2.5.1 Stimuli

AZA (5-Aza-2'-deoxycytidin)	Sigma
PHA (Phytohämagglutinin M)	Sigma
SEB (Staphylokokken Enterotoxin B)	Sigma
TSA (Trichosatin A)	Sigma

2.5.1 Zytokine

IL-1 β	TeBu
IL-2	Chiron
IL-3	TeBu
IL-4	TeBu
IL-6	TeBu
IL-7	TeBu
IL-10	TeBu
IL-12	TeBu
IL-15	TeBu
IL-21	Freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Zymogenetics, Seattle, USA
Flt3-L	TeBu
SCF	TeBu
TGF- β	TeBu
TNF- α	TeBu

2.6 Antikörper

2.6.1 Analyse-Antikörper

Antikörper:	Zytochrom:	Isotyp:	Klon:	Firma:
CD3	PE-Cy5	IgG1	UCHT1	Coulter
CD4	PE	IgG1	13B8.2	Coulter
CD8	FITC	IgG1	B9.11	Coulter
CD16	FITC	IgG1	3G8	Coulter
CD19	PE	IgG1	J4.119	Immunotech
CD34	FITC	IgG1	581	Coulter
CD56	PE	IgG1	NKH-1	Coulter
CD56	Cy-Chrome	IgG1	B159	Pharmingen
CD56	PE-Cy5	IgG1	N901	Coulter
CD94	FITC	IgG1	HP-3D9	Pharmingen
NKG2A	PE	IgG2b	Z199	Coulter
NKG2C	PE	IgG1	134591	R&D
NKG2D	PE	IgG1	149810	R&D
CD158a	FITC	IgM	HP-3E4	Pharmingen
NKB1	FITC	IgG1	DX9	Pharmingen
KIR-NKAT2	FITC	IgG2a	DX27	Pharmingen
CD161	FITC	IgG1	DX12	Pharmingen
Isotyp-Kontrolle	PE	IgG2b		Coulter
	FITC	IgG1		

2.6.2 Depletionsantikörper

Antikörper:	Zytochrom:	Isotyp:	Klon:	Firma:
CD8	Unmarkiert	IgG1	7B22	Immunotech
CD14	Unmarkiert	IgG2a	RMO52	Immunotech
CD15	Unmarkiert	IgG1	17C1	Immunotech
CD16	Unmarkiert	IgG1	3G8	Immunotech
CD19	Unmarkiert	IgG1	J4.119	Immunotech
CD56	Unmarkiert	IgG1	C218	Coulter
CD94	Unmarkiert	IgG2a	HP-2B1	Coulter
CD66b	Unmarkiert	IgG1	80H3	Immunotech

2.6.3 Zellkultur-Antikörper

Antikörper:	Zytochrom:	Isotyp:	Klon:	Firma:
CD3	Unmarkiert	IgG1	UCHT1	Pharmingen

2.6.4 Chromatin-Immunopräzipitations- (ChIP)-Antikörper

Antikörper:	Isotyp:	Firma:
Isotypkontrolle	Rabbit /IgG1	Upstate # 07-028
Anti-acetyl-Histone H4 (Lys8)	Kanninchen, Antiserum	Upstate # 07-328
Anti-2b-dimethyl-Histon H3 (K9)	Kanninchen, Antiserum	*
Anti-dimethyl-Histon H3 (Lys4)	Kanninchen, Antiserum	Upstate # 07-030
Anti-acetyl-Histon H3 (Lys9)	Kanninchen, Antiserum	Upstate # 07-352
Anti-trimethyl Histon3 (Lys4)	Kanninchen, polyklonal	Abcam # 8580-50

* Freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Thomas Jenuwein, IMP Wien;

2.7 Miltenyi Isolationskits/Reagenzien

Untouched NK cell Kit I/II

CD34 Isolationskit (direkt)

CD56 Multisort Kit

CD8 Multisort Kit

α -CD3-Beads

α -FITC-Beads

α -PE-Beads

Goat- α -Mouse-Beads

2.8 Zelllinien

Namen	Herkunft	Referenz
Kontroll-Zelllinien		
Jurkat	CD3 ⁺ /CD4 ⁺ T Zelllinie	Gillis; 1980
RPMI8866	B-Zelllinie	Vanliante; 1992
JY	B-Zelllinie	Kahle; 1981
L88/5	Humane Stromazelllinie	Thalmeier; 1994
HeLa	Humanes Zervixkarzinom	Scherer; 1953
NK-Zelllinien		
YT	IL-2 unabhängige NK-Zelllinie	Yodoi; 1985
NKL	IL-2 abhängige NK-Zelllinie	Robertson; 1996
NK3.3	IL-2 abhängige NK-Zelllinie	Kornbluth; 1985
NK-92	IL-2 abhängige NK-Zelllinie	Gong; 1994
Targetzelllinien		
721.221	Epstein-Barr-Virus (EBV) transformierte lymphoblastoide B-Zelllinie, MHC-I negativ	Shimizu; 1989
Feederzelllinien		
OP-9	murine Knochenmarkstoma-zelllinien	Kodama; 1994
AFT024	Murine foetale Leberzelllinie	Moore; 1997

2.9 Reagenzien für die Molekularbiologie

Sawady Taq-DNA- Polymerase + Puffer	Peqlab Biotechnologie
Hotstar Taq	Qiagen
Desoxynucleosidtriphosphat	Peqlab Biotechnologie
PWO Polymerase	Roche Diagnostics
1 kb Marker	Gibco
100 bp Marker	Gibco
E. coli Stamm sure	Gibco
Vektor: pGL3-Basic	Promega
Vektor: pBluescript plus	Stratagene

Phosphatase (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)	Gibco
Restriktionsendonucleasen:	
Hind III	Invitrogen
Pst I	Invitrogen
Xho I	Invitrogen
EcoRI	Invitrogen
EcoRV	Invitrogen
BamHI	Invitrogen
MluI	Invitrogen
HpaI	Invitrogen
T4-Ligase + Puffer	Invitrogen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAprep Miniprep Kit	Qiagen
QIAprep Maxiprep Kit	Qiagen
QIAmp DNA Blood Mini Kit	Qiagen
QIAGEN RNeasy Kit	Qiagen
+ RNase-free DNase Set	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Nucleotide removal Kit	Qiagen
Reverse Transcriptase (M-MLV) + Puffer, DTT	Gibco
Oligo(dT)15 Primer	Promega
Recombinant RNasin	Promega
Oligonukleotide (Primer)	ThermoHybaid
Cell Line Nucleofector™ Kit R	Amaxa Biosystems
Luciferase Reporter Gene Assay Kit	Roche Diagnostics GmbH
DC Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories
JetPEI™ Reagenz	Biomol
CpGenome™ DNA Modification Kit	Intergen Company
Sequenzierungspolymer 3700 POP6	ABI
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit	ABI
Chromatin Immunoprecipitation Assay II	Upstate
EDTA-free PMSF	Boehringer
Leupeptin	Boehringer

Pepstatin

Boehringer

SYBR Green I (Mastermix plus pPCR™)

Eurogentec

2.10 Oligos

2.10.1 Primer für die Promotoranalyse

Für die Sense-Primer (s) wurde jeweils die Sequenz GATTGAC↓TCGAG gewählt, um sie mit XhoI wie angegeben zu schneiden, für die Antisens-Primer (as) wurde die Sequenz ATGGATA↓AGCTT gewählt und mit HindIII geschnitten. Die unterstrichenen Sequenzen (atgagacaatagc) weisen auf die jeweils erfolgte Deletion einer Teilsequenz hin.

Name	Sequenz
Proximaler Promotor	
1134s	caaccataaaatcattctataag
531s	gtcaaatgcagaaaatttacc
228s	cgcccggcctaaaaatc
163s	atcagagaaagaacttagattttaat
116s	ctcgttctccacctcaccctttaa
60s	tattaactcttaactactgttattatagagtacagtcacctgacatcacacactgcagag
32s	gagtacagtcacctgacatcacacactg
asproxProm	gtccctgacatcacacactgcagag
GAPDHs	tcgaggagaagttccccaacttc
GAPDHas	cgaagcggggaggctgcggggctca
INTRONS (MluI/HindIII)	GATTGA↓CGCGTA↓AGCTT gtaaagcatttaaagatcctcaatataacag
INTRONas (HindII/XhoI)	GTTATAA↓AGCTTCT↓CGAG tgcaggagagaaatgggaac
MUTEXs/Exon2 (PstI)	AACGGTGCTGCA↓GAGacggataaccaaggagtaactactcagacctgaatcgcccccacccaaa gaggcagcaacgaaaacctaaaggcaataaaaagctccatttagcaactgaacagg
MUTEXas/Exon2 (HindIII)	TATAACGA↓AGCTTctttgcagtgataggtttgtGattccctgaaaatcctgagaagAtttttgaaggtttaattc cgcGtaggtatttctgttcagttgctaa
163dTATA1as	ctctgcagtggtgatgtcagggactgtactccagtagttaag
163dTATA2as	ctctgcagtggtgatgtcagggactgtactccagtagttaag
60dTATA2s	tattaactcttaactactggagtacagtcacctgacatcacacactgcagag
dIK	atcagagaaagaacttagattttaat
Fusionsfragment (163 + Enhancer)	GATTGACTCGAGccaatttactgactttcctcctagatcagagaaagaacttagattttaat

Distaler Promotor	
1215s	gtaggacagaggtcagcaagcatg
972s	ggctgaaggcaagcacaggaggatg
767s	gctgtggggccatatgtgtg
534s (731s)	ccaattactgactttcctcctag
534as	gagtgcccttttagactaggttgctaaatc
740s	actattctgccaattactgactttcc
731s	ccaattactgactttcctcctag
715s	cctcctagtaagattttaaaattac
269s	tgacataataaaataatataaagaaaagaagtatgc
120s	ccaactaagtgacacactttcaaag
102s	ttcaaagtcaacctgtacttttaatag
73s	ccaagtacctatattttggagggtg
50s	tgtgtgatgagataaaactgatttc
dGATA2s	cctattttggagggtgtgtgatgaga
dLyf-1s	ccaagtacctatagggtgtgtgatgaga
dGATA1s	tgtgtgatgagacaatagcccattgttagaattt
26 s	cacaatagcccattgttagaatttcc
asdistProm	caatagcccattgttagaatttcc
45 s	ccactctgactcactctgagcc
45as	cacagggcagctcgcgaaga
Stromaufwärts aktivierende Sequenz (SAS)	
750s	gtgggggaccactattctgc
dAML-1s	gtgggggattctgccaatttacc
740s	actattctgccaattactgactttcc
dCdxas	tggcagcatgactttcctc
731s	ccaattactgactttcctcctag
dAP-1s	ccaattactttcctcctagtaagatttta
mCdxas	tggcagcatgactttcctc
mOct-1s	actatggggccaattactgac ccacta gattgactcgagactatggggccaattactgac
asEnhancer	caatagcccattgttagaatttcc

2.10.2 Primer für die Bisulfitkonvertierung

Name	Sequenz 5'-3'	Fragmentlänge
s1NKG2A/EcoRI	GG↓AATTCCGTAatttattgtttttattgttttag	2158 bp
as1NKG2A/BamHI	CGG↓GATCCCGCTttctctaattttctcaaacctaaac	
s2NKG2A/EcoRI	GG↓AATTCCGTTtagtaataatattttgttaaag	452 bp
as2NKG2A/BamHI	CGG↓GATCCCGCTctaattttctcaaacctaaacac	

2.10.3 Primer für die ChIP-Analyse

Name	Sequenz 5'-3'	Fragmentlänge
sNKG2A1stPrChIP	gcaatgtaagatttagcaacctagtc	339 bp
asNKG2A1stPrChIP	caaacaatgcctgcaatcttc	
sNKG2A2ndPrChIP	gctccaatactcgttctccacctcac	261 bp
asNKG2A2ndPrChIP	gaaggtttaattccgcataggtatttcc	

2.10.4 Primer für die NKG2A-Transkriptlängenanalyse

Name	Sequenz 5'-3'	Fragmentlänge
1sLineTranslong	cggatgaataaatgaagaatgtaatg	128 bp
2asLineTranslong	gtgccagctacaatcaattgag	
3sLineTransshort	gagggttgacaatgttcgtgac	121 bp
4asLineTransshort	gatgtgtgactttctggggac	
Primer für die Generierung der Standardkuve		
1sLineTranslong/EcoRI	GG↓AATTCCTGcggatgaataaatgaagaatgtaatg	128 bp
2asLineTranslong/BamHI	CGG↓GATCCGCTgtgccagctacaatcaattgag	
3sLineTransshort/EcoRI	GG↓AATTCCTGgagggttgacaatgttcgtgac	121 bp
4asLineTransshort/BamHI	CGG↓GATCCGCTgatgtgtgactttctggggac	

2.10.5 Primer für die NKG2-/CD94-PCR (RNA-Primer; Uhrberg et al., 1997)

Name	Sequenz 5'-3'	Fragmentlänge
NKG2A RNA 5'Primer	ccagagaagctcattgttg	325 bp
NKG2A RNA 3'Primer	caccatcctcatggattgg	
NKG2C RNA 5'Primer	tttctggccagcattttacct	619 bp
NKG2C RNA 3'Primer	atttgcgtttacagtgcacag	
NKG2D RNA 5'Primer	ctgggagatgagtgaaattcata	416 bp
NKG2D RNA 3'Primer	gatttacttaaactgggaagtc	
NKG2E RNA 5'Primer	ctgtgcttcaaagaactcttct	226 bp
NKG2E RNA 3'Primer	acgtggacttatatcagaccag	
CD94 RNA 5'Primer	gcagtgtttaagaccactct	572 bp
CD94 RNA 3'Primer	cgttatatctgtaagcaacag	
GAPDH 5'Primer	accacagtccatgccatcac	450 bp
GAPDH 3'Primer	tccaccacctgttgctgta	

2.10.6 Primer für die Sequenzierung aus pGL3Basic und pBluescript SKplus

Name	Sequenz 5'-3'
pGL3 forward Primer	tgcaggtgccagaacatttctc
PGL3 reverse Primer	ggcgtcttccatggtggctttacc
T7 Universal Primer	taatacgactcactatagg

2.11 Verwendete Software

Microsoft: Word 2000 und Exel 2000

CorelDraw 9

Gene Construction Kit™ 2

DNA Strider™ 1.2

Sequence Detector™ 1.6, Primer Express™ 1.0

Oligo DNA/RNA Primer Analyse Software 4.1

Cell Quest™, Winmdi 2.8

2.12 Internet

Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/html>)

TF-Search (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>)

UTRScan (<http://bighost.area.ba.cnr.it/BIG/UTRScan.html>)

Repetitive Sequenzen (<http://woody.embl-heidelberg.de/repeatmask/html>)

Sequenzvergleiche (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>)

3 METHODEN

3.1 Zellkultur Methoden

3.1.1 Herkunft der Blutproben

Blutzellkonzentrate wurden freundlicher Weise von Dr. Tonn, Blutspendezentrale der DRK Hessen Frankfurt, zur Verfügung gestellt. Die Nabelschnurblut-Proben (cord blood, CB) wurden von Frau Prof. Dr. Gesine Kögler, Nabelschnurblutbank, Heinrich Heine Universität Düsseldorf, bereit gestellt.

3.1.2 Allgemeine Zellkultur

Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigter Luftfeuchte kultiviert, einzige Ausnahme machte die murine AFT024 Zelllinie, die bei 33°C kultiviert wurde.

3.1.3 Auftauen von Zellen

Da das im Einfriermedium enthaltene DMSO beim Einfriervorgang Zellschäden durch Kristallbildung vermindert, aber bei Raumtemperatur zur Lyse der Zellen führen würde, muss es schnell entfernt werden. Das Auftauen der Zelllinien erfolgte durch schnelles Überführen der in flüssigem Stickstoff (ca. -176°C) gelagerten Kryoröhrchen in ein 37°C warmes Wasserbad. Der Inhalt des Röhrchens wurde in 10 ml 37°C warmes Kulturmedium überführt und bei 1500 rpm (300 xg) für 7 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in einem angemessenen Volumen Kulturmedium resuspendiert, um die Zellen zu zählen. Nach der Zellzählung wurde die Zelldichte mit Medium eingestellt und die Zellen wurden im Brutschrank kultiviert.

3.1.4 Einfrieren von Zellen

Durch Zentrifugation pelletierte Zellen wurden im Einfriermedium resuspendiert und schnellstmöglich bei -80°C gelagert und nach mindestens 24 h Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.1.5 Splitten von adhärennten Zellen

Adhärennt wachsende Zelllinien wurden, wenn sie konfluent gewachsen waren, wie folgt auf zwei neue Kulturflaschen verteilt: Das Medium wurde abpipettiert, die Kultur zweimal mit ca. 10 ml kaltem PBS in der Kulturflasche gespült und mit ca. 10 ml Trypsin/EDTA Mix (0,05%/1mM) versehen. Nach einer Inkubationsphase von 5 bis 15 min im Kulturschrank erfolgte eine Kontrolle der Ablösung der Zellen unter dem Mikroskop. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (siehe oben), der Überstand verworfen und das Zellpellet mit neuem Medium auf die gewünschte Dichte eingestellt und in die neuen Zellkulturflaschen überführt.

3.1.6 Zellzählung

20 μl Zellsuspension wurden mit dem gleichen Volumen Trypanblau-Lösung verdünnt und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Das Volumen eines großen Eckquadrates, bestehend aus 12 Quadraten, beträgt 0,1 μl . Es wurden 4 Eckquadrate ausgezählt, der Mittelwert errechnet und mit dem Verdünnungsfaktor ($\times 2$) und zur Ermittlung der Zellzahl pro Milliliter mit 10^3 multipliziert. Der Anteil der toten Zellen, die das Trypanblau eingelagert haben, wurde als Prozentsatz der Gesamtzellzahl errechnet.

3.1.7 Isolation von mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die Isolation von Lymphocyten erfolgte aus sogenannten „Buffy Coats“, einem Zellkonzentrat, dem das Serum entzogen worden ist. Es wurde eine Verdünnung mit dem gleichen Volumen PBS-Puffer angesetzt und auf 15 ml Ficoll-Hypaque

Trennlösung, Dichte 1,077, in 50 ml Röhrchen überschichtet. Nach 35 min Zentrifugation bei 2000 (1000 xg) und ohne Bremse, damit die Schichtung nicht zerstört wird, wurde der Serumüberstand abgesaugt, und der sogenannte „Interphasering“ mit mononukleären Zellen mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Die so isolierte Fraktion wurde anschließend zweimal in 50 ml PBS/EDTA-Puffer gewaschen, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 2 ml PBS/EDTA-Puffer resuspendiert.

3.1.8 Erythrozytenfernung mit Ammoniumchlorid

Die im Zellisolat verbliebenen Erythrozyten wurden durch Verdünnung der Zellsuspension mit Ammoniumchlorid-Lösung lysiert. Nach 7-minütiger Inkubation der Mischung bei Raumtemperatur wurden die intakten Zellen bei 1500 rpm (300 xg) für 7 min bei 7°C pelletiert. Verbleibende Zelltrümmer wurden durch erneutes Waschen mit PBS/EDTA Puffer und Zentrifugation entfernt.

3.1.9 Zellisolation mit Hilfe von paramagnetischen Microbeads (MACS™)

Das Prinzip der magnetbasierenden Zellisolation (MACS™, magnet activated cell sorting) beruht auf der Markierung der Zellen mit Antikörpern, die superparamagnetische Partikel (Microbeads, 50 nm Ø) tragen. Trägt man diese Zellen auf eine Säule auf, deren Matrix durch einen Magneten magnetisiert worden ist, so werden diese Zellen auf der Säule zurückgehalten, während unmarkierte Zellen die Säule passieren. Entfernt man den Magneten von der Säule, können die zurückgehaltenen Zellen eluiert werden.

Es gibt zwei Strategien, um die gewünschte Zellpopulation zu isolieren: Positive Selektion, d.h. die zu isolierende Zellpopulation wird markiert, und negative Selektion (Depletion) - nur die unerwünschten Zellen werden markiert, und die zu isolierenden Zellen bleiben unmarkiert. Erstere Strategie wird bei der Isolation von CD8-positiven zytotoxischen T- Zellen mit dem CD8 MultiSort Kit angewendet, letztere bei der Isolation von NK-Zellen mit Hilfe des NK Cell Isolation Kit. Bestandteil des Kits ist ein Antikörper Cocktail aus monoklonalen Antikörper gegen CD3, CD14, CD19, CD36

und IgE, um T-Zelle, B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Thrombozyten, basophile Granulozyten, dendritische Zellen und erythroide Zellen zu entfernen. Ein weiterer Vorteil ist, dass die zu isolierenden NK-Zellen nicht durch Bindung spezifischer Antikörper voraktiviert werden.

Die Isolation von CD8⁺ T-Zellen über das CD8 MultiSort Kit wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Bindung des Microbead-gekoppelten anti-humanen CD8 Antikörpers erfolgte bei 4-8°C für etwa 15 bis 30 min. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS-Puffer und nachfolgender Zentrifugation der Zellen entfernt. Je nach zu erwartender Zellausbeute wurde entweder eine Säule vom Typ MS+ (Maximalkapazität: 1 x 10⁷ Mio Zellen) gewählt oder eine vom Typ LS+ (Maximalkapazität: 1 x 10⁸ Mio Zellen). Um ein Verstopfen der Säule mit aneinander haftenden Zellen zu vermindern, war dem Puffer EDTA zugesetzt, und die Zellen wurden vor dem Auftragen auf die Säulen durch ein Nylonsieb (Maschenweite 70 µm) pipettiert.

Bei Bedarf konnte bei diesem Kit der Microbead vom Antikörper entfernt werden, so dass eine weitere Isolation auf ein anderes Oberflächenantigen möglich war, z. B. CD94 oder NKG2A. Für andere Isolationen war es nötig mit Microbead-gekoppelten Zweitantikörpern zu arbeiten, die gegen ein Fluorochrom wie FITC und PE gerichtet waren, da nur Fluorochrom-gekoppelte, aber keine Mikrobead-gekoppelten Primärantikörper zur Verfügung standen.

3.1.10 Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie werden Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen ein spezifisches Oberflächenantigen markiert. Diese Antikörper sind mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt wie Fluorescein-Isothiocyanat (FITC, grün), Phycoerythrin (PE, rot) und PE-CY5 (dunkelrot), einem Tandemkonjugat aus Phycoerythrin und Cyanin-5. Die Zellen werden durch eine Kapillare gedrückt, so dass ein Strom einzelner Zellen entsteht (hydrodynamische Focussierung), der von einem Argon-Laser (488 nm) erfasst wird. Photodetektoren messen die Lichtstreuung, die einen Rückschluss über Größe (Forward light Scatter, FSC) und Granularität (Side Scatter, SSC) einer Zelle zulassen. Die Messung der

Fluoreszenzen der verwendeten Fluorochrom-gekoppelten Antikörper ermöglichen eine Aussage über die Expression, d.h. Verteilung und Rezeptordichte, von verschiedenen Oberflächenantigenen. Da durchflusszytometrische Fluoreszenzsignale nicht Absolutwerte darstellen, benötigt man zur Auswertung Kontrollmarkierungen, um die Einstellung und die Verstärkung der Licht-Detektoren vornehmen zu können. Es wurden folgende Kontrollfärbungen verwendet: Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurde eine Isotypkontrolle angesetzt, d.h. Färbung mit einem Antikörper gleichen Typs, aber mit einer irrelevanten Spezifität. Für eine Positiv-Kontrolle und eine genaue Einstellung der Fluoreszenzen untereinander (Kompensation) wurden die Zellen auf stark exprimierende und häufig vorkommende Oberflächenantigene gefärbt. Die Messung erfolgte auf einem Durchflusszytometer FACScalibur™ der Firma Becton Dickinson, die Auswertung mit Hilfe der CellQuest™ Software.

3.1.11 Färben der Zellen für die Durchflusszytometrie

Das Färben der Zellen für die Durchflusszytometrie erfolgte nach Herstellerangaben. Isolierte Zellen wurden abzentrifugiert und in PBS aufgenommen. Die für die Färbung vorgesehene Kombination von Antikörpern wurde zu den in etwa 200 µl resuspendierten Zellen gegeben. Die an Antigene der Zellmembran gebundenen Antikörper können bei Raumtemperatur zusammenfließen, sich an einem Zellpol ansammeln und dann entweder internalisiert oder in Medium abgestoßen werden. Um dies zu verhindern wurde auf Eis gearbeitet bzw. im Kühlschrank inkubiert. Das Ausbleichen der Fluorochrome wurde durch Abdecken mit Alufolie verhindert. Nach Inkubation und einem Waschschrift mit 4 ml PBS wurde das Zellpellet in ca. 300 µl PBS resuspendiert und bis zur Analyse im Kühlschrank gelagert.

3.1.12 Stimulation von primären NK- und T-Zellen

Die Stimulation von MACSTM-isolierten NK-Zellen erfolgte mit der HLA-Klasse-I-negativen B-Zelllinie 721.221. Der Stimulationsmix, der zu je 1 ml in einer 24-Well-Platte verteilt wurde, bestand aus 0,5 Mio NK-Zellen mit 1×10^6 /ml autologer MNC und $0,1 \times 10^6$ /ml 721.221. Die autologen MNC und 721.221 wurden vorher mit 50 Gy einer Cäsiumquelle bestrahlt, um ein Überwachsen der NK-Zellen zu verhindern. Das Kulturmedium war RPMI1640 mit 10% FCS, 5% hitzeinaktiviertem humanem Serum, 1% Penicillin/Streptomycin und 1000 U/ml IL-2. Nach ca. 1 Woche Kultur wurde 1 ml Medium hinzu gegeben, danach der Kulturansatz alle 2 bis 3 Tage auf zwei Wells verteilt und mit 1 ml Medium versehen. Es wurde darauf geachtet, dass die Zelldichte nicht unter 1×10^6 NK-Zellen/ml sank. Die Stimulation von MACSTM-isolierten T-Zellen erfolgte mit α -CD3-Antikörper-beschichteten Zellkulturplatten (siehe unten) und Kulturmedium (wie oben; 500 U/ml IL-2).

3.1.13 Zytokin-Stimulation von primären NK- und T-Zellen

Für die Stimulation von primären NK- und T-Zellen mit Zytokinen wurden die expandierten Zellen (je 5 Mio) zentrifugiert und das Zellpellet in 5 ml frischem Kulturmedium aufgenommen. Nach Zugabe der jeweiligen Zytokinmischung wurden sie für 24 h in 6-Well Platten kultiviert. Danach erfolgte die Präparation der RNA mit dem RNeasy Kit. Die Zytokinkonzentrationen waren folgende: IL-2 (500 U/ml), IL-15 (10 ng/ml), IL-12 (10 ng/ml), IL-21 (10 ng/ml), TGF-beta (10 ng/ml), IL-4 (5 ng/ml), IL-10 (10 ng/ml), TNF- α (5 ng/ml), IL-1 β (5 ng/ml) und IL-6 (5 ng/ml).

3.1.14 Klonierung von NK-Zellen

Für die Klonierung von NK-Zellen wurde, basierend auf der Stimulation mit 721.221, in 96-Well-Platten gearbeitet. Es wurde für 10 zu beschickende Platten 100 ml Stimulationsmix erstellt, dem 333 NK-Zellen zugefügt wurden, so dass theoretisch jedes dritte Well eine NK-Zelle enthalten müsste. Jeweils 100 μ l dieser Mischung wurde mit einer 12-Kanal-Pipette auf den Platten verteilt. Nach ca. 4 Tagen

Inkubation im Brutschrank erhielt jedes Well 100 µl Medium, nach ca. 14 Tagen Inkubation waren Wells mit den gewachsenen Zell-Klonen erkennbar und wurden weiter kultiviert. Diese 200 µl Zellsuspension wurden in mit 1 ml Stimulationsmix versehene 24-Well-Platten pipettiert, deren autologe MNC-Fraktion am Tage der Klonierung eingefroren worden war. Die Klone wurden anfangs in 24-Well-Platten expandiert, bei Bedarf auf 25 cm² bzw. 75 cm² Zellkulturflaschen weiter kultiviert.

3.1.15 Stimulation mit 5-Aza-2'-Cytidin (AZA) und Trichostatin A (TSA)

Es war darauf zu achten, dass nur proliferierende Zellen stimuliert wurden, da nur bei ihnen AZA und TSA ihre Wirkung entfalten können. Es wurden mehr Zellen eingesetzt, da die Chemikalien sehr zytotoxisch wirken und so die Zellausbeute verringern. Die Stimulation mit AZA (1 µM) und TSA (25 nM) erfolgte durch Abzentrifugation der gewünschten Zellmenge und die Resuspendierung in Medium ohne Chemikalien als Kontrolle, nur mit AZA oder TSA oder einer Mischung beider. Nach 48 h erfolgte eine zweite Stimulation, indem die gleiche Menge Chemikalien dem Medium hinzugefügt wurde. Dies war notwendig, da die Chemikalien bei 37°C nicht sehr stabil sind. Die Zellen wurden weitere 72 h kultiviert und dann für FACS-Analyse oder RNA-Isolation abzentrifugiert.

3.1.16 *In vitro* Induktion von CD94/NKG2A auf zytotoxischen T-Zellen mit Hilfe von Staphylococcus Enterotoxin B (SEB; nach Mingari et al., 1998; Bertone et al., 1999)

Über Depletion aus Nabelschurblut-MNCs gewonnene CD8⁺ T-Zellen wurden 1:1 mit autologen, bestrahlten (50 Gy) MNC in 1 ml Medium in einem Well einer 24-Well Platte ausgesät. Es wurden 200 ng/ml SEB und 200 U/ml IL-2 bei Kulturstart hinzugegeben, am zweiten Kulturtag wurden 10 ng/ml IL-15 und 5 ng/ml TGF-β zugesetzt. Es erfolgte alle zwei Tage ½ Mediumswechsel mit einem Zytokinmix aus IL-2, IL-15 und TGF-β. Bei Bedarf wurde das Volumen eines Wells auf zwei verteilt und mit Medium auf 2 ml aufgefüllt.

3.1.17 *In vitro* Induktion von CD94/NKG2A auf T-Helferzellen mit α -CD3-Ak versehene Zellkulturplatten (nach Romero et al., 2001)

Für diesen Kulturaufbau wurden 24-Well Platten mit α -CD3-Antikörper wie folgt beschichtet: Eine Verdünnung von 10 ng/ml α -CD3-Antikörper wurde mit Tris-Puffer erstellt und jeweils 500 μ l je Well pipettiert. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37°C und dreimaligem Waschen mit 1 ml PBS wurde eine weiteren Inkubation von 1 h mit FCS-haltigem Kulturmedium angeschlossen.

Über Depletion gewonnene CD4⁺ Zellen wurden auf die so vorbehandelten Wells in 1 ml Medium mit 100 U/ml IL-2 und 2 ng/ml IL-10 ausgesät.

3.1.18 *In vitro* Induktion von CD94/NKG2A während der NK-Zell-Differenzierung von CD34⁺-Zellen in Cokultur mit AFT024 und OP-9 (nach Miller et al., 2001; Williams et al., 1999)

Für die Kokultur von CD34⁺-Zellen mit AFT024 bzw. OP-9 wurden eine 24-Well Platte mit einer 0,1%-igen Gelatinelösung beschichtet.

Das Differenzierungsmedium wurde zu Kulturbeginn mit 20 % hitzeinaktiviertem, humanem AB-Serum supplementiert, was später auf 10 % reduziert wurde. Der Zytokinmix bestand aus 1000 U/ml IL-2, 10 ng/ml Flt3-Ligand, 20 ng/ml SCF, 20 ng/ml IL-7 und 5 ng/ml IL-3 bei Kulturstart, das später durch 10 ng/ml IL-15 ersetzt wurde.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Promotoranalyse:

3.2.1.1 PCR zur Fragmentgewinnung

Mit der Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können einzelne, für spezifische Gene typische Nucleotid-Basen-Sequenzen aus einem Gemisch herausamplifiziert werden. Man benötigt dazu Ausgangs-DNA (template), zwei passende Oligonucleotidprimer, die jeweils 5' (sense) bzw. 3' (anti-sense) der gewünschten Sequenz binden, Nucleotide und eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq) mit Puffer, die die Nucleotide nach Vorgabe der Ausgangs-DNA einbaut. Es laufen verschiedene Reaktionsschritte bei unterschiedlichen Temperaturen ab – eine PCR-Maschine kann so programmiert werden, dass alle Schritte bei optimaler Temperatur ablaufen. Ist eine Reaktionsfolge abgeschlossen, so muss erneut mit einem neuen Reaktionszyklus begonnen werden. Ein typisches Programm besteht aus einem Denaturierungsschritt (94°C), bei dem die DNA sich in Einzelstränge trennt, einem Annealingschritt (55°C), bei dem sich die Primer an die Einzelstrang-DNA anlagern und einem Elongationsschritt (72°C), bei dem die Primer verlängert werden, bis wieder doppelsträngige DNA vorliegt. Im nächsten Reaktionszyklus steht die neusynthetisierte DNA als zusätzliches Template zur Verfügung – das PCR-Produkt wächst exponentiell, so dass auch aus geringen Mengen Ausgangsmaterial bei hoher Zyklenzahl ausreichend Material gewonnen werden kann. Die Temperatur und Dauer der einzelnen Schritte lässt sich variieren, um verschiedenen Ansprüchen gerecht zu werden. Es können Annealingtemperatur verändert werden, um, je nach Länge und GC-Gehalt des Primerpaares, die Bindung zu fördern. Die Annealingzeiten können verlängert werden, um vollständige Bindung der Primer zu erreichen. In der Regel werden zwischen 25 und 35 Zyklen durchgeführt. Die Taq-DNA-Polymerase hat ihr Reaktionsoptimum bei 72°C und ist sehr hitzestabil, da sie aus dem thermophilen Bakterium *Thermophiles aquaticus* stammt, so dass sie auch die Denaturierungsschritte ohne große Aktivitätseinbußen übersteht. Doch nach etwa 25 Zyklen nimmt die Anzahl unspezifischer Abbauprodukte zu und in der Folge können z.B. vermehrt fehlerhafte Nucleotide einbaut werden als auch illegitim rekombinierte Produkte entstehen. So muss die Zyklenzahl trotz geringerer

Endproduktmenge limitiert werden. Es besteht auch die Möglichkeit, die einzelnen Reaktionschritte mit zunehmender Zyklenzahl zu verlängern (ramping), um die nachlassende Aktivität der Polymerase zu kompensieren.

Standard-Protokoll: 25 Zyklen

Reaktionsschritt 1	(Denaturierung)	15 sec	94°C
Reaktionsschritt 2	(Primerannealing)	30 sec	55°C
Reaktionsschritt 3	(Polymerisation)	90 sec	72°C

Um unspezifische Syntheseprodukte während der Aufheizphase zu vermeiden, wurde ein manueller „Hot Start“ gemacht, d.h. die Polymerase wurde erst nach Erreichen der Denaturierungstemperatur hinzupipettiert.

Für die Polymerasekettenreaktion wurde ein Enzymgemisch aus Qiagen Taq – und PWO-DNA-Polymerase bzw. die SAWADY Taq-DNA-Polymerase mit verschiedenen Puffern gewählt. Erstere Kombination verbindet die hohe Prozessivität der Taq-Polymerase mit der hohen Spezifität der PWO-DNA-Polymerase, die in ihrer zusätzlichen 3'-5'-Exonuclease-Aktivität begründet ist. Bei der SAWADY-Taq-DNA-Polymerase werden durch Verwenden des Puffers „Y“ die hochprozessiven Eigenschaften unterstützt – die Amplifikation ist besonders effektiv, während Puffer „S“ die Replikationsgenauigkeit fördert.

Es wurde zur Amplifizierung spezifischer Fragmente jeweils 100 µl Reaktionsvolumen angesetzt. Die Primer-Stammlösung wurde nach Herstellerangaben mit TE-Puffer auf 100 pmol/µl verdünnt. Ein Reaktionsvolumen bestand aus:

- 1 µl Template (PAC Klon G16824 mit humaner NKG2A DNA),
- 1 µl Sense-Primer
- 1 µl Anti-Sense Primer
- 2 µl Nucleotidmix (2 mM)
- 10 µl 10x Puffer
- und Wasser ad 100 µl

0,5 µl Taq/Pwo Mischung (3:1) oder 0,5 µl SAWADY-Taq-Polymerase wurden dazupipettiert und der PCR unterzogen.

3.2.1.2 Analyse der PCR-Produkte im Agarosegel

Für die Analyse wurde ein Agarosegel mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Als Vergleichsmöglichkeit zur Abschätzung der PCR-Produktlänge wurden DNA-Längenstandards verwendet. Aliquots der PCR-Produkte wurden mit TE-Puffer verdünnt, mit Lade-Puffer vermischt und in die Taschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte auf Gelen in TBE-Puffer durch Anlegen einer Spannung. Die Konzentration der Gele wurde verändert, um eine optimale Auftrennung der Proben in Abhängigkeit ihrer Länge zu erreichen. Die Längenstandards haben eine definierte Menge an DNA im Verhältnis zu der aufgetragenen DNA Menge. Die Lumineszenz des durch UV-Licht angeregten Ethidiumbromids ist proportional zur DNA-Menge. Es war so eine Abschätzung der Konzentrations- als auch Fragmentlängen möglich.

3.2.1.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um Verunreinigungen, vor allem Proteine, von den Fragmenten zu trennen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion vorgenommen: Die DNA-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Phenol (pH 8)/Sewag (Sewag: Chloroform-Isoamylalkohol Gemisch 24:1) versehen und zentrifugiert (10 min bei 13.000 rpm). Die obere wässrige Phase enthält die DNA und wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, während die Interphase und die untere, organische Phase die Proteine enthält. Um die DNA zu fällen, wurden ein 20-stel NaCl (5 M) und das 3-fache Volumen an Ethanol hinzupipettiert und die Mischung ca. 5 min bei -20°C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation (10 min bei 13.000 rpm), ein Waschschrift mit dem 3-fachen Ursprungsvolumen mit 70%-igem Ethanol, ein Waschschrift mit 100%-igem Ethanol. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt und das verbleibende DNA-Pellet im Exsikkator getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in TE-Puffer aufgenommen, auf 68°C erhitzt, um die DNA bestmöglich zu lösen.

3.2.1.4 DNA-Messung

Die Konzentration von DNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Das hier verwendete Photometer Gene Quant Pro (Pharmacia) misst die Extinktion bei vier festen Wellenlängen: 230, 260, 280 und 320 nm. Eine Extinktion von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml. Zur Messung wurden UV-durchlässige Quarzküvetten von einem Mindestprobenvolumen 7 µl und 70 µl verwendet. Als Leerwert diente TE-Puffer. Von den Proben wurden verschiedene Verdünnungsstufen erstellt, um Werte aus einem optimalen Konzentrationsfenster zu erhalten. Zwischen den Messungen zweier DNA-Proben wurde die Küvette mit TE-Puffer gespült. Störende Kontaminationen (Proteine, Phenol) konnten durch den Quotienten von Extinktion bei 260 nm zu Extinktion bei 280 nm bestimmt werden, der im Bereich von 1,7 bis 1,8 liegen sollte.

3.2.1.5 Endonukleaseverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische Sequenzen in der DNA erkennen und diese spalten. Sie werden von Bakterien als Verteidigung gegen fremde DNAs, z.B. von Viren, gebildet. Der Abbau bakterieller DNA wird durch Methylierung einiger Basen in der Sequenz verhindert. Die Restriktionsschnittstellen können enzymspezifisch einerseits so durchgeschnitten werden, dass glatte Enden (blunt ends) entstehen oder andererseits versetzt. Letzteres führt zu sogenannten kohäsiven Enden (sticky ends), die, wenn sie vom gleichen Enzym stammen, nicht nur symmetrisch, sondern auch komplementär sind und miteinander basenpaaren können. Dies macht man sich bei der Klonierung in einen Vektor zu Nutze, bei der man sowohl Vektor als auch das zu klonierende Fragment mit den gleichen Enzymen behandelt. Ist dann noch eine Orientierung des Fragments im Vektor gewünscht, arbeitet man mit zwei Enzymen, jeweils für das 5'- bzw. das 3'-Ende des Fragments.

Der analytische Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen erfolgte in 10 µl Gesamtvolumen, das 0,5 bis 2 U einer Restriktionsendonuklease enthielt: Die Inkubation erfolgte in den entsprechenden Reaktionspuffern nach Angaben des

Herstellers für 2 bis 5 h bei 37°C im Brutschrank. Anschließend wurde der Verdau mit Hilfe eines analytischen Agarosegels überprüft.

Der präparative Verdau der DNA mittels Restriktionsendonukleasen erfolgte in 60 µl Gesamtvolumen, das 2 bis 8 U einer Restriktionsnuklease enthielt. Die Inkubation erfolgte in den entsprechenden Reaktionspuffern nach Angaben des Herstellers für 2 bis 5 h bei 37°C im Brutschrank. Anschließend wurde eine Probe der geschnittenen DNA auf einem analytischen Agarosegel aufgetrennt. Bei Verunreinigung der DNA mit unspezifischen PCR-Produkten wurde die Mischung auf einem präparativen Agarosegel aufgetrennt und die spezifische Bande herausgeschnitten und mittels Gel Elutionskit (Qiagen) nach Herstellerangaben präpariert.

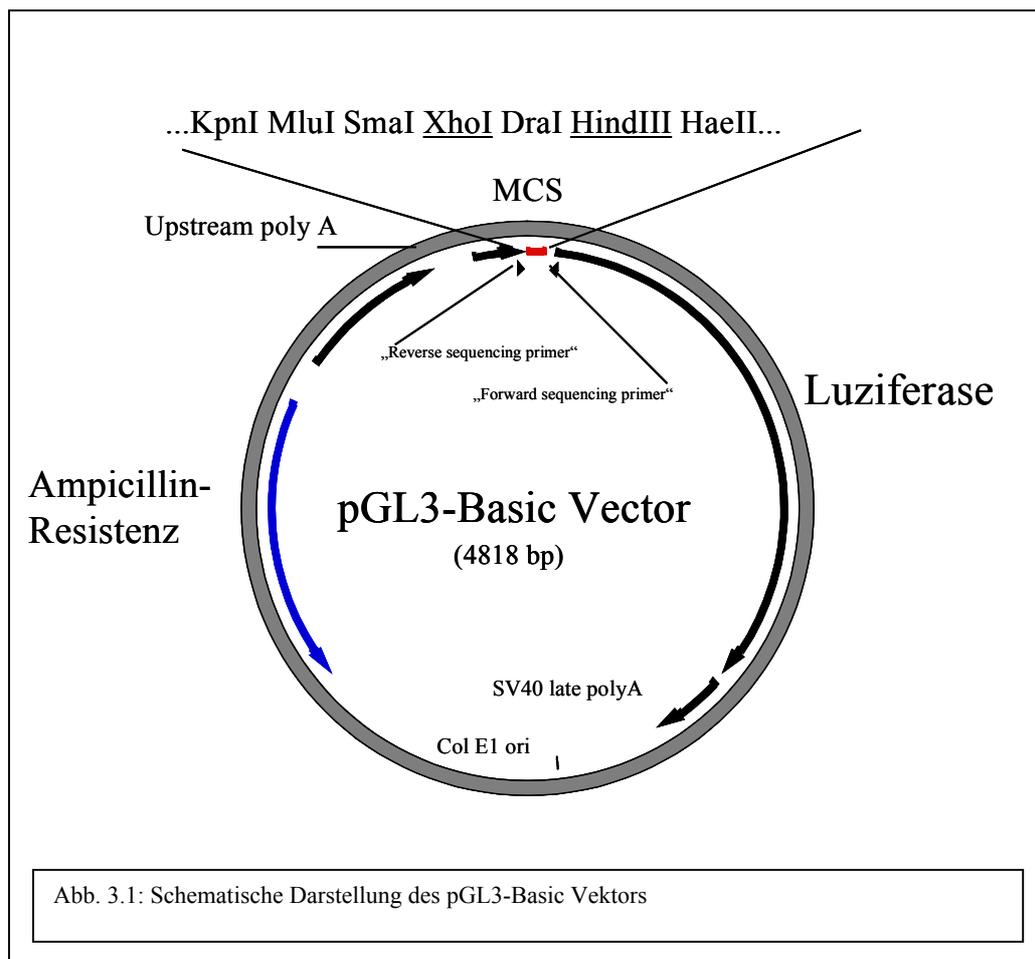
3.2.1.6 Dephosphorylierung

Um eine Religation des geschnittenen Vektors mit sich selbst bzw. der Insert-DNA zu verhindern, wurden die 5'-Enden der linearisierten Vektor-Insert-Fragmente zunächst durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase (Calf intestinal alkaline phosphatase, CIAP) dephosphoryliert. Dem Ansatz wurde 2 µl CIAP hinzu gegeben und 30 min bei 57°C inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 1 µl CIAP wurde weitere 30 min bei 37°C inkubiert.

3.2.1.7 Der Vektor: pGL3-Basic

Der pGL3-Basic Vektor wurde gewählt, da er für die Messung transkriptioneller Aktivität in transfizierten eukaryotischen Zellen optimiert worden ist. Er enthält eine Vielzahl von Restriktionsnucleaseschnittstellen in der Multiplen-Klonierungsregion (MCS), von denen XhoI und Hind III gewählt wurden, um die Promotorfragmente durch überhängende Schnittstellen in der richtigen Orientierung hineinzuklonieren. Als Reporter gen wurde ein modifizierter Teil der Feuerfliegen (*Photinus pyralis*) Luziferase (luc^+) gewählt, dem Bindungssequenzen von regulatorischen Proteinen entfernt und die Kozak Sequenz hinzugefügt wurde. Dies soll unspezifische Hintergrundtranskription verhindern bzw. eine optimale Translationseffizienz gewährleisten. Ein SV40-Late-Poly(A) Signal-Sequenz fördert die mRNA Stabilität.

Der „Origin of Replication“ (ori) ist für die Amplifizierung des Vektors in *E. coli* sure als Replikationsursprung wichtig. Durch das β -Lactamase Gen (Amp^r) wird allen vektorenhaltenden Bakterien ein Wachstum auf ampicillinhaltigen Agarplatten ermögliehe. Um die klonierten Promotorsequenzen auf ihre korrekte Orientierung und Sequenz im Vektor zu prüfen, wurde ein Primerpaar gewählt (reverse/forward), um die daraus resultierenden Fragmente der Sequenzierung unterziehen zu können.



Bei der Ligation von DNA-Fragmenten in einen zuvor mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnittenen Vektor katalysieren die Ligasen die Bildung von Phosphatdiesterbrücken zwischen freier 5'-Phosphatgruppe des Genfragments und freier 3'-Hydroxylgruppe der Vektor- und Insert-DNA.

Der Ligationsansatz bestand aus:

- 200 ng linearisierte, gereinigte Vektor-DNA
- 5-fach verdautes, gereinigtes Genfragment
- 1,2 µl 5x Ligationspuffer (enthält dATP)
- 1 µl T4-DNA-Ligase (10 U)
- mit H₂O ad 6 µl

Es wurde 5-fach mehr Genfragment eingesetzt als Vektor, um einen möglichst effizienten Einbau des Fragments in den Vektor zu gewährleisten. Der Ansatz wurde bei 16°C für mindestens 2 h inkubiert. Als Kontrolle dienten zwei weitere Ansätze - Ansatz nur mit Vektor und Ansatz nur mit Insert – die auf einem Agarosegel aufgetrennt wurden. Um die Konzentration von Salzen aus dem Ligationspuffer zu vermindern, welche die Elektroporation behindern könnten, wurde der Ligationsansatz über das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben entsalzt: Der Ligationsansatz wurde mit TE auf ein Volumen von 30 µl gebracht, 5 Volumen Bindungspuffer (PB) hinzu pipettiert, gemischt und auf eine QIAquick Säule aufgetragen. Nach einer Zentrifugation (1 min, 13.000 rpm), wurde die Säule mit 750 µl Waschpuffer (PE) gewaschen, trocken zentrifugiert und mit 30 µl Elutionspuffer (EB) unter Zentrifugation von der Säule eluiert.

3.2.1.9 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* sure wurde 1 l LB-Medium (Kanamycin 30 µg/ml und Tetracyclin 12,5 µg/ml) mit 10 ml frischer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert, bis eine optische Dichte von 0,4 bis 0,6 (bei 600 nm) erreicht wurde. Diese Bakteriensuspension wurde für 15 Min in Eiswasser heruntergekühlt. Es erfolgte eine Zentrifugation (6°C, 2500 xg für 10 min) und eine Aufnahme des Bakterienpellets in eine 10%-ige Glycerin-Lösung. Nach erneuter Zentrifugation und Aufnahme in ½ Ausgangsvolumen bzw. in 20 ml, um die Salzkonzentration zu reduzieren, wurde das Volumen auf 3 ml reduziert. Dieses Bakterienkonzentrat wurde zu je 40 µl aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.1.10 Elektroporation in E. coli sure

Zur Elektroporation wurde je Probe ein 40 µl Bakterienaliquot bei RT aufgetaut. 1 µl entsalzter Ligationsansatz wurde mit den Bakterien gemischt, in eine eisgekühlte 2 mm Elektroporationsküvette pipettiert und der Elektroporation (2500 Volt, 25 µF, 201 Ω, t = 5 ms) unterzogen. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium zum Küvetteninhalt wurde der Inhalt in ein Reaktionsgefäß überführt und für eine Erholungsphase von 30 min im Heizblöckchen (37°C) inkubiert. Danach wurden jeweils 500 µl bzw. 50 µl der Probe und 50 µl der mitgeführten Vektorkontrolle auf ampicillinhaltigen (100 µg/ml) Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2.1.11 Analytische Plasmidpräparation (Miniprep)

Die analytische Plasmidpräparation zur Identifizierung von inserthaltigen Bakterienklonen wurde unter Verwendung des QIASpin Plasmid Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden 35 mm Petrischälchen mit 3 ml ampicillinhaltigem (100 µg/ml) LB-Medium versehen, mit einer von der Agaplatte gepickten Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Die Präparation wurde anhand des mitgelieferten Handbuchs durchgeführt: 2 ml Bakteriensuspension wurde für 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Pellet in 250 µl Resuspensionspuffer (P1) resuspendiert. Nach der Zugabe des alkalischen Lysis-puffers (P2) und gründlicher Mischung erfolgte eine 5-minütige Fällungsphase, die durch Hinzupipettieren von 300 µl Neutralisationspuffer (N3) gestoppt wurde. Eine Zentrifugation von 10 min bei 13.000 rpm ermöglichte die Trennung von gefällttem Material und im Überstand befindlicher Vektor-DNA, die zur weiteren Reinigung auf eine Miniprep-Säule gegeben wurde. Nach Waschen der Säule mit dem Waschpuffer (PE), Trockenzentrifugation der Säule zur vollständigen Pufferentfernung, wurde die gereinigten Vektor-DNA von der Säule mit 50 µl TE von der Säule eluiert. Nach Beendigung der Präparation wurde 1 µl jeder Probe einem Nukleaseverdau unterzogen und zur Analyse eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

3.2.1.12 Präparative Plasmidpräparation (Maxiprep)

Die präparative Plasmidpräparation zur Amplifizierung der gewünschten fragmenthaltigen Vektoren zur NucleofectionTM wurde unter Verwendung des QiAprep Spin Plasmid Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Es wurde ein Erlenmeyerkolben mit ca. 200 ml ampicillinhaltigem (100 µg/ml) LB-Medium versehen und mit 0,1 ml Bakteriensuspension aus dem Ansatz für die analytische Plasmidpräparation angeimpft. Nach Inkubation im Schüttelinkubator bei 37°C über Nacht (ca. 16 h) wurde die Präparation anhand des mitgelieferten Handbuchs durchgeführt: Die Bakteriensuspension wurde in einen für Bakterienkultur vorgesehenen Festwinkelrotor (SLA-1500) einer Sorvall-Zentrifuge 5 min bei 8000 rpm (9000 xg) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet in 10 ml Resuspensionspuffer (P1) resuspendiert. Nach der Zugabe des alkalischen Lysispuffers (P2, 10 ml) und gründlicher Mischung erfolgte eine 5-minütige Fällungsphase, die durch Hinzupipettieren von 10 ml Neutralisationspuffer (N3) gestoppt wurde. Die Trennung des Fällungsmaterials erfolgte über Filtereinheiten, deren Filtrat auf die zuvor mit 10 ml Equilibrierungspuffer (QBT) versehenen Maxiprep-Säulen gegeben wurde. Nach zwei Waschschritten mit jeweils 30 ml Waschpuffer (QC) erfolgte die Elution in Corex-Röhrchen mit 15 ml Puffer (QF). Das Eluat wurde mit 12,5 ml Isopropanol versehen, mit Parafilm versiegelt und gestürzt. Das Zentrifugieren der Corex-Röhrchen erfolgte in einem speziellen Ausschwingrotor (HB6) in der Sorvall-Zentrifuge bei 5000 rpm (16.000 xg) für 10 min. Der Überstand wurde abgekippt und die an der Wandung befindliche Vektor-DNA mit 70%-igem Ethanol heruntergewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Entfernung des Alkohols wurde das so entstandene Pellet getrocknet, in 500 µl TE resuspendiert und zur vollständigen Lösung für einige Minuten (~ 5 min) bei 68°C inkubiert.

Nach Beendigung der Präparation wurde eine qualitative und quantitative DNA-Bestimmung durchgeführt. Eine Probe wurde einem Endonukleaseverdau mit anschließender Gelelektrophorese unterzogen, um eventuell während der Präparation der Vektoren entstandene Schäden zu identifizieren.

3.2.1.13 DNA-Sequenzierung (cycle Sequencing)

Das Prinzip der enzymatischen DNA-Sequenzierung basiert auf der Didesoxy- oder Kettenabbruch-Methode nach Sanger. Es ist eine PCR mit Einzelstrang-DNA als Template und einer speziellen Nucleotidmischung. Neben den unmodifizierten Nucleotiden beinhaltet diese Mischung auch Didesoxy-Nucleotide, die eine Weitersynthese des neuen Stranges unterbinden, da ihnen die OH-Gruppe fehlt. Es entstehen bei der Reaktion Fragmente unterschiedlicher Länge, die sich jeweils um ein Nucleotid unterscheiden. Werden diese Fragmente durch eine Matrix der Länge nach aufgetrennt, kann durch Fluorochrommarkierung der vier unterschiedlichen Didesoxy-Nucleotide und Messung mit einem Photodetektor die Art des letzten Nucleotids bestimmt und so die ursprüngliche Template-Sequenz ermittelt werden. Es wurde folgendem Mix ca. 50 ng des inserthaltigen Vektors hinzupipettiert und der PCR unterzogen:

ABI Prism®BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit
2 µl DNA (50 – 500ng)
1 µl Primer (10 pmol/µl; T4 oder T7 Primer-Mix)
2 µl Sequenzierungsmix
5 µl Merck H₂O

Das PCR-Programm bestand aus folgenden Temperaturschritten: 96°C (1 min), 96°C (10 sec), 60°C (4 min) und 10°C (∞); Es wurden 25 Zyklen gefahren.

Die Aufarbeitung der Proben für die eigentliche Sequenzanalyse, d.h. die Entfernung von Primer, Nucleotiden, Polymerase und Salzen, erfolgte über Centri-Sep Säulen wie folgt: Eine 96er Platte wurde mit Sephadex G-50 beschichtet, mit je 750 µl Merck H₂O versehen und über Nacht zum Quellen bei RT stehen gelassen. Danach erfolgte eine Trocknung durch Abzentrifugieren (2 min bei 3000 rpm). Zu jeder Sequenzreaktion wurde 10 µl Merck H₂O pipettiert und mittig auf die Sephadex Schicht gegeben. Eine optische 96-Well Platte fing bei der Zentrifugation (2 min bei 3000 rpm) die aufgereinigten Proben auf. Die eigentliche Sequenzierungsreaktion mit dem ABI 3700 96 Kapillar-Sequenziergerät und anschließender Datenkonvertierung von Fluoreszenzsignalen (Elektrophorogramm) in Nucleotidsequenzen (Textdatei)

erfolgte mit Hilfe der geräteeigenen Analysesoftware. Die so erhaltenen Sequenzen wurden mit den Originalsequenzen mit Hilfe des Programms „Clustal W“ verglichen.

Um Faktoren, welche die Reporteranalyse möglicherweise beeinflussen könnten, auszuschließen, wurden von jedem Promotorfragment mindestens zwei unabhängige Maxi-Präparationen erstellt und in der Nucleofection™ (siehe unten) miteinander verglichen.

3.2.1.14 Nucleofection™

Die klassische Elektroporation ist eine Möglichkeit, mit Hilfe von hohen elektrischen Feldern kleine Löcher sowohl in der Zellwand von Bakterien als auch in der Membran von Zellen zu generieren, um Flüssigkeiten oder andere Substanzen wie z.B. Vektoren in das Cytoplasma zu bringen. Die Nucleofection™ ist eine Weiterentwicklung dieser Methode - optimiert für den Gentransfer in Säugetierzellen. Basierend auf der Elektroporation verwendet die Nucleofection™ eine Kombination aus elektrischen Parametern und Zelltyp-spezifischen Nucleofector™ Puffern. Die Nucleofector™ Technologie ist durch ihre Fähigkeit charakterisiert, DNA direkt in den Nukleus einer Zelle zu transferieren. So können potentiell auch Zellen mit eingeschränkter Proliferationsfähigkeit, wie Primärzellen und andere schwer zu transfizierende Zellen, effizient transfiziert werden. Da bisher angewandte Methoden nur sehr geringe Transfektionseffizienzen erbrachten, bzw. der Umweg über retrovirale Methoden gegangen werden musste, wurde in unserem Labor ein auf der Nucleofection™ basierendes Protokoll entwickelt (Trompeter, 2002).

Es wurden 5 Mio NK3.3 Zellen pro Ansatz einer zwei Tage nicht mit frischem Medium versehenen Kultur entnommen. Die Zellen wurden zentrifugiert (7 min mit 1500 rpm bei 20°C) in PBS gewaschen. Dem Cell Line Nucleofector™ Kit R beigelegte Nucleofector™ Lösung (2,25 ml) wurde mit dem Supplement (0,5 ml) gemischt und auf Raumtemperatur gebracht. Das Zellpellet wurde in 10 µl PBS und 90 µl Nucleofector™ –Mix resuspendiert, dieser Zellsuspension wurde 5 µg DNA (Vektor mit Insert) hinzugefügt. Bei Fragmenten, die größer als 500 bp waren, wurde proportional mehr DNA eingesetzt, um die Promotorstärke von langen und kurzen

Fragmenten vergleichbar zu halten. Innerhalb von 10 min wurde diese Mischung der Nucleofection unterzogen: Das Nucleofector™-Gerät wurde auf das Programm „U1“ eingestellt, die Zellsuspension in gerätespezifische Küvetten überführt, die Nucleofection durch Tastendruck ausgeführt. Der Küvetteninhalt wurde mit 0,5 ml Medium versehen und mit einer Pasteurpipette in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Dieses wurde bei 37°C für 20 min im Heizblock inkubiert. Die so behandelte Zellsuspension wurde danach in vorgewärmte, mit 1,5 ml Medium versehene, 6-Well Kulturschalen ausgesät und 4 h im Brutschrank inkubiert.

3.2.1.15 Luziferase Reporter Gene Assay

Gen-Expression in transfizierten eukaryotischen oder prokaryotischen Zellen wird allgemein dadurch nachgewiesen, dass man eine putative Promotorsequenz vor ein leicht zu quantifizierendes „Reporter-Gen“ hängt. Solch ein Gen ist die 550 Basenpaar umfassende Luziferase der Nordamerikanischen Feuerfliege *Photinus pyralis*. Das Gen codiert ein Enzym, das aus einer monomeren Polypeptidkette (62 kD) besteht. Die Luziferase ist durch hohe Sensitivität gekennzeichnet, sie katalysiert die ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luziferin zu Oxyluziferin:



Die Kinetik der Luziferase katalysierten Lichtemission ist charakterisiert durch ein schnelles vorübergehendes Aufleuchten, das schon nach 20 sec beendet ist. Es ist also notwendig bei der Messung zügig zu arbeiten, um diese Hauptphase nicht zu verfehlen. Die Aufarbeitung der Zellen für die Luziferase-Aktivitätsmessung erfolgte nach 4 h Inkubation. Die Zellen wurden aus den 6-Well Kulturschalen in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (7 min mit 2000 rpm bei 4°C). Der Überstand wurde verworfen, die Zellpellets mit 850 µl PBS resuspendiert, in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 70 µl Lysis-Puffer resuspendiert, wobei Schaumbildung vermieden wurde. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 20°C im Heizblock wurden die Zelltrümmer herunterzentrifugiert (2 min mit 13.000 rpm bei RT) und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt. Für die

Proteinbestimmung wurde 1 µl Überstand abgenommen. Die Luziferase-Aktivitätsmessung wurde mit Hilfe eines Biolumeters der Firma Berthold (Biolumat) durchgeführt. Es wurden 20 µl Lysatüberstand in die dazugehörigen Küvetten pipettiert und 100 µl Luziferin-Lösung gemischt und sofort im Gerät gemessen.

Die so erhaltenen Daten wurden später auf ihren Proteingehalt (siehe unten) normiert. Das Mitführen einer Negativkontrolle (Nucleofection mit Wasser) und einer Positivkontrolle (GAPDH-Promotorfragment) ermöglichte die Abschätzung des Hintergrundrauschens als auch der Nucleofectionseffizienz.

Aufgrund der starken Hintergrundaktivität des pGL3-Basic Vektors und der schwachen Promotoraktivität der Fragmente wurde kein zweiter Vektor als Referenz verwendet, sondern die Aktivitäten der Proben über ihren Proteingehalt normiert (siehe unten) und auf eine Negativkontrolle ohne Vektor bezogen (Trompeter, 2002). Bei der NK-Zelllinie NK3.3 ergaben sich Probleme bezüglich der zum Teil sehr stark schwankenden Nucleofectionseffizienzen, so dass Fragmente mit stark unterschiedlichen Nucleofectionseffizienzen nicht miteinander verglichen werden konnten. Deshalb wurde auf eine Standardabweichungsauswertung verzichtet und ein repräsentatives Experiment, meist mit der höchsten Nucleofectionseffizienz, als Graph dargestellt. Wobei sich im Vergleich zu den anderen Fragmenten des gleichen Experiments herausstellte, ob ein Fragment zu einer erhöhten oder niedrigeren Luziferaseaktivität zu rechnen war.

Für die Nucleofection/Luziferasemessung von kultivierten NK-Zellen wurden folgende Modifikationen gemacht: Anstelle von 5 µg Vektor-DNA wurde mit 10 µg nucleofectiert, die Zellpellets wurden nicht in 70 µl Lysispuffer aufgenommen, sondern in 30 µl. Die Proteinbestimmung (siehe unten) erfolgte mit 2 µl statt 1 µl Lysat.

Für die Nucleofection/Luziferasemessung von adhärenenten HeLa Zellen wurden folgende Modifikationen gemacht: Die drei Tage zuvor gesplittete HeLa Kultur wurde zweimal mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA Lösung für 5 min bei 37°C inkubiert. Diese Einzelzellsuspension/Trypsin/EDTA Gemisch wurde zur Zugabe von serumhaltigen Kulturmedium inaktiviert, die Zellen gezählt. Pro Ansatz wurden 1 Mio

Zellen präpariert, die nochmals mit PBS gewaschen wurden. Es wurde das Cell Line Nucleofector™ Kit R mit dem Programm "A-28" nach Herstellerangaben verwendet. Nach 10-minütiger Inkubationszeit im Heizblock wurde die Zellsuspension in die vorgewärmten, mit 1,5 ml Medium versehenen, 6-Well Kulturschalen ausgesät und 4 h im Brutschrank inkubiert. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte durch Abpipettieren des Kulturmediums, einmaliges Spülen mit 1 ml PBS und anschließender Zugabe und gründlicher Verteilung von 100 µl Lysis-Puffer. Das in den Kulturschalen enthaltene Zell-Lysat wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert, bei 20°C in Heizblock für 15 min inkubiert und bei 13.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Der Lysatüberstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt, 2 µl für die Proteinbestimmung (siehe unten) abgenommen und aus jeweils 20 µl die Luziferaseaktivität über 20 sec bestimmt.

3.3.2.16 JetPEI Transfektion (Boussif et al., 1995; Ogris et al., 2001)

Die JetPEI Transfektionstechnik basiert auf einem wasserlöslichen Polymer (Polyethylenimin, PEI), das mit DNA Komplexe bilden kann, die ähnlich der Lipofektion von der zu transfizierenden Zellen endosomal aufgenommen werden können. Es wirkt wie ein Protonenfänger und führt in den zu transfizierenden DNA-enhaltenen Endosomen durch Aufschwemmen zum raschen Entlassen in das Cytosol. Weiter fördert es den Transport der DNA in den Zellkern - es ist somit einer der Nucleofection™ ähnliche Technik.

Für die Transfektion mit dem JetPEI Reagenz wurden die Zellen mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen/0,5 ml Kulturmedium 24 h vor Transfektion in ein Well einer 24-Well-Platte ausgesät. Die Präparation der Reagenzien wurde wie folgt durchgeführt: Je Well wurde 1 µg Vektor-DNA in einem Reaktionsgefäß mit 50 µl einer sterilen NaCl-Lösung (150 mM) in einem Reaktionsgefäß gemischt, parallel dazu wurden jeweils ein Reaktionsgefäß mit 50 µl NaCl-Lösung und 2 µl JetPEI Reagenz gemischt. Nach kurzem vortexen wurde das JetPEI-Gemisch in die Vektor-DNA Mischung pipettiert, nochmals gevortext, kurz herunterzentrifugiert und 30 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden 100 µl tröpfchenweise über das Well verteilt. Nach weiteren 24 h Kultur wurden die behandelten Zellen, wie bei der Nucleofection™ adhärenter Zellen, aufgearbeitet.

3.2.1.17 Proteinbestimmung nach Lowry

Das „Bio-Rad DC Protein Assay“ ist eine colorimetrische Bestimmung für Proteine nach Detergenzbehandlung. Die Bestimmung beruht auf einer Reaktion der Proteine, vor allem der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan mit Kupfer im alkalischen Medium und der darauffolgenden Reduktion von Folin. Folin verliert bei der Reaktion ein, zwei oder drei Sauerstoffatome, die resultierenden Folin-Abkömmlinge weisen eine charakteristischen Blaufärbung auf.

Je 1 μ l des Zelllysats-Überstandes wurde in 96-er Rundwellplatten pipettiert. Als Leerwert wurde 1 μ l Lysis-Puffer verwendet. Es wurde 1 ml Lösung „A“ (alkalische Kupfer-Tatrat Lösung) mit 20 μ l Reagenz „S“ (Aktivierungsreagenz) versehen. 25 μ l dieser Lösung A' wurde zu jeder Probe pipettiert. Nach Zugabe von 200 μ l Reagenz B (Folin-Lösung) inkubierte diese Mischung bei Raumtemperatur für 15 min. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei 750 nm in einem Beckmann Photometer bestimmt.

3.2.2 Transkriptanalyse

3.2.2.1 Isolation von Gesamt-RNA (RNeasy Kit)

Die Gesamt-RNA Isolation wurde mit Hilfe des RNeasy Kits (Qiagen) und den QIAshredder-Säulen (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Durch einen zusätzlichen DNase-1 Verdau (RNase-free DNase Set, Qiagen) auf der Säule wurden Reste von kontaminierender DNA abgebaut. 5 bis 10 Mio Zellen wurden zentrifugiert (7°C, 1500 rpm für 7 min) und das Zellpellet in 600 µl RLT-Puffer (nach Zugabe von 6 µl β-Mercaptoethanol) lysiert. Das so präparierte Zelllysate kann bei –80°C gelagert werden. Die Präparation wurde nach Herstellerangaben anhand des mitgelieferten Handbuchs durchgeführt: Die Proben wurden aufgetaut und im 37°C warmen Wasserbad für 20 min inkubiert, bis keine Ausfällungen mehr sichtbar waren. Jedes Lysat wurde auf eine QIAshredder-Säule aufgetragen und für 25 sec bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde mit 600 µl 70%-igem Ethanol versehen, gut gemischt und auf eine RNeasy-Säule pipettiert. Es folgten eine erneute Zentrifugation und ein Waschschriff mit 350 µl Waschpuffer (RW1). Für den RNase-Verdau wurde für jede Säule 10 µl Enzym mit 70 µl Puffer (RDD) versehen und mittig auf die Säulenmembran pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei RT. Nach einem erneuten Waschschriff mit 350 µl RW1-Puffer und Zentrifugation wurde ein neues Auffanggefäß verwendet und zweimal mit Waschpuffer RPE gewaschen. Die Elution erfolgte in 30 µl RNase-freiem Wasser.

3.2.2.2 RNA-Messung

Die Konzentration von RNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt (siehe DNA-Messung). Eine Extinktion von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml. Störende Kontaminationen konnten durch den Quotienten von Extinktion bei 260 nm zu Extinktion bei 280 nm bestimmt werden, der im Bereich von 1,7 bis 1,8 liegen sollte.

3.2.2.3 Reverse Transkription (RT-PCR):

Die RNA einer Zelle besitzt, durch interne Regulationsmechanismen gesteuert, eine sehr geringe Halbwertszeit und steht für die Analyse nur in geringen Ausgangskonzentrationen zur Verfügung. Um die Analyse methodisch zu vereinfachen und das Template für die PCR in ausreichender Menge zur Verfügung zu haben, wurde die isolierte Gesamt-RNA mit der Methode der Reversen Transkriptase-Reaktion (RT) in cDNA übersetzt. Die Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA wurde mit der Reversen Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) durchgeführt. Als Primer diente ein Oligo-dT-Primer, der an den poly-A-Schwanz der meisten mRNAs binden kann. Durch Zugabe von Dithiothreitol wurde die RNA stabilisiert sowie durch RNasin mögliche Ribonukleasen inhibiert. Für eine Reaktion wurde folgende Mischung pipettiert:

- 2 µg RNA
- 2 µl oligo-dT-Primer (1 µg)
- 5 µl Nucleotide (10 mM)

Diese Mischung wurde 5 min bei 65°C inkubiert, um die vorhandenen Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen und eine effektive Bindung des oligo-dT Primers zu gewährleisten. Danach wurde die Probe auf Eis heruntergekühlt und folgende Reagenzienmischung hinzugefügt:

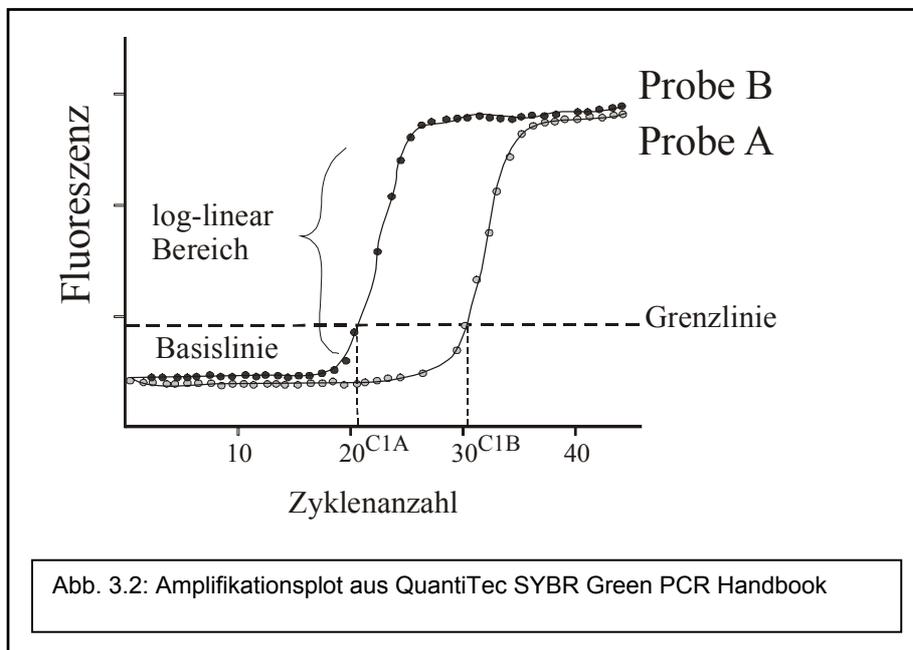
- 10 µl Erststrang-Puffer (5x)
- 5 µl DTT (0,1 mM)
- 1 µl RNasin (40 U/µl)
- 3 µl Reverse Transkriptase (M-MLV ; 200 U/µl)
- H₂O ad 50 µl

Die eigentliche reverse Transkription erfolgte im Thermocycler bei 42°C für 1 h und anschließendem Kühlungsschritt bei 4°C. Die Reverse Transkriptase wurde durch 8-minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert.

3.2.2.4 Realtime-PCR (TaqMan™)

Die Technik der Realtime-PCR kombiniert Polymeraseketten-Reaktion mit der Möglichkeit, das entstehende Amplikon im Moment der Synthese (in Echtzeit; real time) durch interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe zu detektieren. Der Anstieg der emittierten Fluoreszenz ist proportional dem Anstieg der Konzentration des doppelsträngigen Amplifikationsproduktes. Mit Hilfe einer Konzentrationsreihe eines bekannten Standards kann nicht nur auf Amplikonkonzentration, sondern auch auf die Konzentration der Ausgangsprobe geschlossen werden. Der meistverwendete Farbstoff ist SYBR Green™, er besitzt eine Anregungswellenlänge von 497 nm und eine Emissionswellenlänge von 520 nm, die erst detektiert wird, wenn er in doppelsträngige DNA eingebaut wird. Dieses unspezifische Verhalten ist allerdings auch ein Nachteil, da nicht zwischen korrektem Produkt und Artefakten wie Primerdimeren unterschieden werden kann. Jede Realtime-PCR mit SYBR Green™ muss deshalb einer Schmelzpunktanalyse unterzogen werden. Diese Analyse wird am Ende der eigentlichen PCR durchgeführt, indem das Reaktionsgemisch in 1°C Schritten von 50°C auf 95°C erhitzt und kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen wird. Der Punkt, an dem das DNA Produkt schmilzt, ist durch einen Abfall der Fluoreszenz gekennzeichnet, da der interkalierende Farbstoff von der nun einzelsträngig vorliegenden DNA dissoziiert. Liegen mehrere Produkte mit unterschiedlicher Länge vor, gibt es auch mehrere Fluoreszenzabfälle im Verlauf der Analyse. Um weitere Unsicherheit zu vermeiden, wurden alle Produkte nochmal einer Gelelektrophorese unterzogen, um so die korrekten Produkte zu visualisieren. Die Auswertung erfolgt über einen sogenannten Amplifikationsplot, einer Auftragung der Fluoreszenz nach der Zyklenzahl. Die Phase vor dem Übergang zur linearen bzw. logarithmischen Fluoreszenzunahme ist die Basislinie (Baseline), sie stellt das Hintergrundrauschen dar und wird von der eigentlichen Produktfluoreszenz abgezogen. Für die Errechnung der Probenkonzentration wird der sogenannte Grenzyklus (threshold cycle; C_T) herangezogen. Das ist die Zyklanzahl, bei der die Fluoreszenz einer Probe die erste größere Steigung erfährt und das erste Mal klar zu detektieren ist, dies entspricht laut Definition dem 10-fachen Wert der Standardabweichungen der Fluoreszenzsignale der ersten 15 Zyklen. Man vergleicht zwei Proben, indem man ihre C_T -Werte vergleicht, d.h. eine Probe mit geringem C_T -

Wert (geringer Zyklenzahl bis zur Grenze) lag in höherer Konzentration vor als eine Probe mit höherem C_T -Wert.



Es wurde ein externer Standard erstellt, indem die in der Realtime-PCR verwendeten Primer, mit Restriktionsendonukleaseschnittstellen versehen, in den Vektor pBluescript plus kloniert wurden. Das daraus resultierende quantifizierbare Template wurde in einer absteigenden Verdünnungsreihe als Standard bei jeder Realtime-PCR in Triplikaten angesetzt. Die Berechnung der Ausgangsmenge wurde mit der Auswertungssoftware vorgenommen. Es wurde eine Standardkurve erstellt, nach der das Programm die Ausgangskonzentrationen ermittelt konnte. Es wurden folgende Komponenten pipettiert und der Realtime-PCR unterzogen:

- 1 μ l cDNA
- 1 μ l 5'-Primer
- 1 μ l 3'-Primer
- 12,5 μ l SYBR Green I (ohne UNG)
- 9,5 μ l Merck Wasser

Realtime-PCR Protokoll: 40 Zyklen

Reaktionsschritt 1	(Enzymaktivierung)	10 min	95°C
Reaktionsschritt 2	(Denaturierung)	3 min	95°C
Reaktionsschritt 3	(Primerannealing)	30 sec	55°C
Reaktionsschritt 4	(Polymerisation)	30 sec	72°C

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

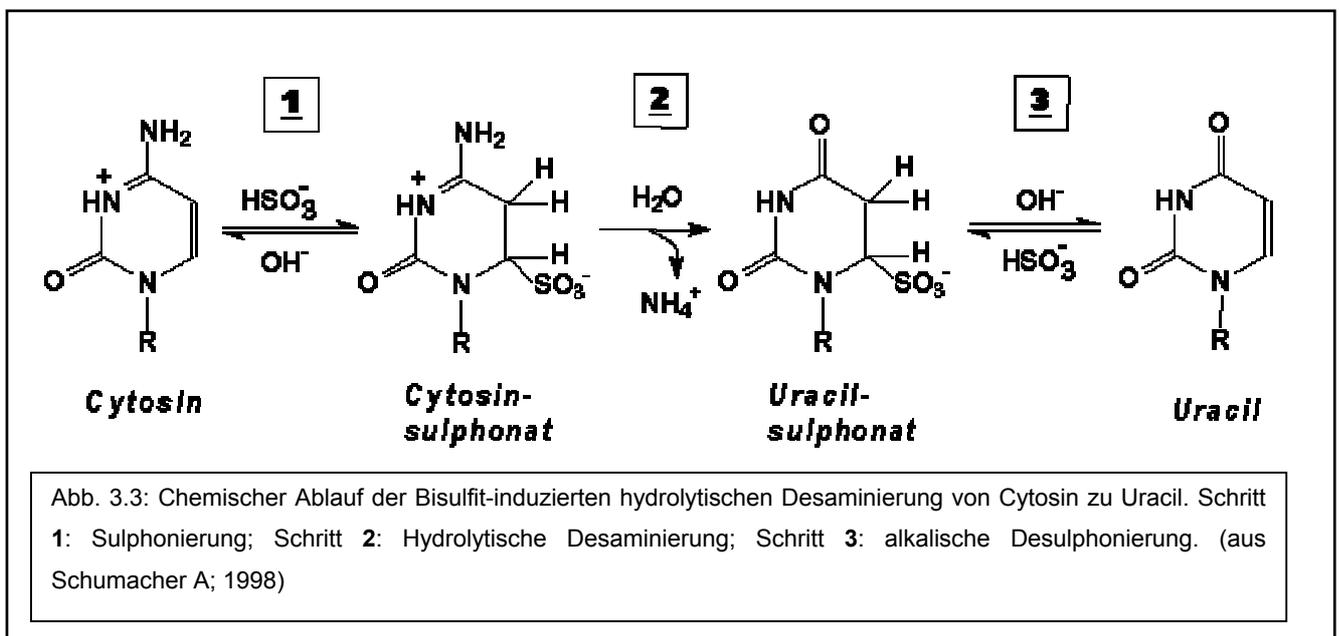
Nach Zuweisung der Standardverdünnung ermittelte das Programm eine Konzentrationskurve, mit deren Hilfe die Ausgangskonzentrationen der Proben errechnet werden konnten. Die Errechnung der Ausgangskonzentrationen der Standardkurve erfolgte nach folgender Formel:

$$(Xg/\mu l \text{ DNA} / [\text{Plasmidlänge in bp} \times 660]) \times 6.922 \times 10^{23} = Y \text{ Moleküle}/\mu l$$

3.3 Epigenetische Analyse:

3.3.1 Analyse des Methylierungsstatus

Basis dieser Methode zur Unterscheidung von methylierten und unmethylierten Cytosinen ist die Eigenschaft von Bisulfit, unmethylierte Cytosine in Uracil umzuwandeln, während sich methylierte Cytosine chemisch inert verhalten. Bei anschließender Sequenzierung werden alle umgewandelten (unmethylierten) Cytosine als Thymin gelesen, während die methylierten als Cytosine verbleiben. Ein Vergleich der ursprünglichen DNA-Sequenz mit der konvertierten offenbart also, welche Cytosine methyliert vorlagen. Die Konvertierungsreaktion besteht aus mehreren Teilschritten, da eine hydrolytische Desaminierung von Cytosin zu Uracil nicht ohne weiteres abläuft: 1. Die Sulphonierung bei niedrigem pH führt das Bisulfit-Ion in das Cytosin ein. Es folgt 2. eine hydrolytische Abspaltung von Ammoniak (Desaminierung) und die Stabilisierung durch 3. Alkalische Desulphonierung.



3.3.1.1 DNA-Isolation (QIAamp DNA Blood Mini Kit)

Es wurden jeweils 2 Mio Zellen in PBS gewaschen und das Zellpellet in 200 µl PBS resuspendiert, die so präparierten Zellen konnten bei –20°C eingefroren und die DNA später isoliert werden. Bei sofortiger Aufarbeitung wurde der Probe 24 µl Protease hinzugefügt. Nach Zugabe von 200 µl Lysispuffer wurde 15 sec pulsartig gevortext. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 56°C, wobei nach 15 min nochmals 5 µl Protease dazupipettiert wurden. Nach einer Zentrifugation von einer Minute bei 13.000 rpm wurde der Überstand abgenommen, auf die QIAamp Säule aufgetragen und gewartet bis die Probe Raumtemperatur erreicht hatte. Die Probe wurde 1 min bei 8.000 rpm durchzentrifugiert, der Durchfluss verworfen. Nach Waschen der Säule durch 500 µl Lösung AW1 (Waschpuffer) und Zugabe von 500 µl Lösung AW2 (3 min bei 12.300 rpm) wurde ein neues Reaktionsgefäß verwendet und mit 60 µl Elutionspuffer von der Säule durch Zentrifugation (3 min, 12.300 rpm) eluiert. Nach einer einminütigen Inkubation im Schüttler folgte eine erneute Zentrifugation (3 min bei 12.300 rpm).

3.3.1.2 Konvertierung (Intergen Cp Genom Kit)

Das Kit beinhaltet alle Reagenzien und Trägersubstanzen für eine Konvertierung, es wurde nach Herstellerangaben wie folgt gearbeitet: Die Sulphonierung erfolgt mit DNA-modifizierender Reagenz I, wobei die Natronlauge sowohl für den niedrigen pH Wert sorgt als auch die DNA denaturiert. Es musste eine 3 M NaOH Lösung vorbereitet werden, von der 20 µl zu 571 µl DNA modifizierenden Reagenz I pipettiert wurde. 1 µg DNA wurde mit Wasser auf ein Volumen von 100 µl gebracht, 7 µl NaOH Lösung hinzugefügt und 10 min bei 37°C im Heizblock inkubiert. Nach Zugabe von 550 µl Reagenz RI (Bisulfit Quelle) wurde die Mischung bei 50°C für mindestens 20 Stunden inkubiert. Es musste eine NaOH + 90% ETOH Lösung vorbereitet werden. Das DNA-modifizierende Reagenz III (Silica Trägersubstanz) wird kräftig gevortext und 5 µl zur Probe pipettiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine Zentrifugation (10 sec bei 5.000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet dreimal in 1 ml 70%-iges ETOH gewaschen und

zentrifugiert (10 sec bei 5.000 rpm). Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand vollständig entfernt, das Pellet in 50 µl TE-Puffer gelöst und zur vollständigen Lösung 15 min bei 60°C im Heizblock inkubiert.

3.2.1.3 Modifikationen zur vollständigen Konvertierung der Alu-Sequenz (nach Tomatsu et al., 2002; Kuzmin et al., 1999)

Es erfolgte initial ein Verdau mit HpaI und PstI, um den Bereich um die Alu-Sequenz für die Konvertierung zugänglicher zu machen. Nach dem Verdau folgte eine 1-minütige Erhitzung des Ansatzes auf 95°C, um die Sekundärstrukturen zu lösen. Nach Zugabe von 7 µl NaOH und 2 µl Reagenz IV wurde die Probe erneut für 1 min auf 95 °C erhitzt, und anstelle von 10 min bei 37°C wurde die Probe 30 min bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von Reagenz RI ließ man die Probe bei 95°C im Heizblock und ließ diesen auf 55°C runterkühlen. Bei 55°C wurde insgesamt für 6 h inkubiert, danach wurde gemäß Protokoll (siehe oben) verfahren.

Es folgt die erste Runde der nested-PCR – ein Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

- 25,0 µl für 20 - 30 ng DNA
- 12,5 µl Puffer
- 5,0 µl dNTPs
- 10,0 µl 5'-Primer
- 10,0 µl 3'-Primer
- 1,5 µl HotstartTaq
- 80,0 µl H₂O

Das PCR-Standardprogramm wurde geändert: Für die Aktivierung der Hotstart Taq wurde die Denaturierungsphase auf 8 min verlängert, die spezifische Annealingtemperatur lag bei 47°C. Es wurden 35 Zyklen gefahren. Die zweite Runde der nested PCR wurde mit unverdünnter bzw. 1:10 bis 1:20 verdünntem PCR-Produkt der ersten PCR durchgeführt, mit neuen Primern, aber gleichbleibender Komponentenzusammensetzung, PCR-Programm und Zyklenzahl. Das Ergebnis dieser PCR wurde wieder auf einem Agarosegel (2%) kontrolliert.

Die Primerpaare der beiden Nested-PCR Reaktionen wurden so gewählt, dass sie nicht direkt in der zu analysierenden Sequenz liegen. Und es muss beachtet werden, dass die Cytosine, die außerhalb der CpGs liegen, nach erfolgreicher Konvertierung in Thymidine ungewandelt worden sind (Li, 2002). Die Primer sind mit Sequenzen versehen worden, die von den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI erkannt und geschnitten werden können, damit sie später effizient in den Klonierungsvektor ligiert werden konnten.

3.3.1.4 PCR-Produkt Aufreinigung

Die amplifizierte DNA-Bande wurde mit Hilfe des QIAquick PCR Purifikation Kits nach Herstellerangaben isoliert: Es wurde zu 1 Volumen PCR-Ansatz 5 Volumen Bindungspuffer (PB) gegeben, gemischt und auf eine QIAquick-Säule pipettiert. Die Zentrifugation erfolgte bei 13.000 rpm (~ 17,900 xg) für 30 sec. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 750 µl Waschpuffer (PE) gewaschen. Nach einer Zentrifugation zur Entfernung von Pufferresten wurde die DNA nach Zugabe von 30 µl Elutionspuffer (EB) auf die Säulenmembran eluiert.

Die so erhaltene DNA wurde mit dem Photometer quantifiziert und einem Endonukleaseverdau mit EcoRI und BamHI unterzogen. Um zu verhindern, dass die kleinen DNA-Fragmente, die bei dem Verdau der Restriktionsschnittstellen der Primer entstanden sind, die Ligation der gewünschten Amplifikat-DNA behindern, wurde der Verdau einer Auftrennung auf einem präparativen Agarosegel unterzogen. Die spezifische Amplifikat-Bande wurde ausgeschnitten und aus dem Gelstück mittels Qiaquick Gel Elution Kit isoliert:

Zu einem Gramm Gel wurde das dreifache Volumen (300 mg = 900 µl) eines chaotrophen Bindungspuffer (QG) gegeben und im Heizblock bei 50°C für 10 min unter gelegentlichem Vortexen inkubiert, bis keine Gelreste mehr erkennbar waren. Zu einem Ausgangsgelvolumen wurde ein Volumen Isopropanol gegeben, gut gemischt und auf eine QIAquick-Säule gegeben. Nach einer Zentrifugation (1 min, 13.000 rpm/17.900 xg) wurde die Säule mit 750 µl Waschpuffer (PE) gewaschen, trocken zentrifugiert und mit 30 µl Elutionspuffer (EB) unter Zentrifugation von der Säule eluiert.

Das halbe Elutionsvolumen wurde in die Ligation mit dem Vektor pBluescript Plus eingesetzt:

- 1 μ l (200 ng) pBluescript Plus
- 15 μ l Insert DNA
- 1 μ l T4-DNA-Ligase
- 2 μ l 5x Ligationspuffer
- mit H₂O ad 20 μ l

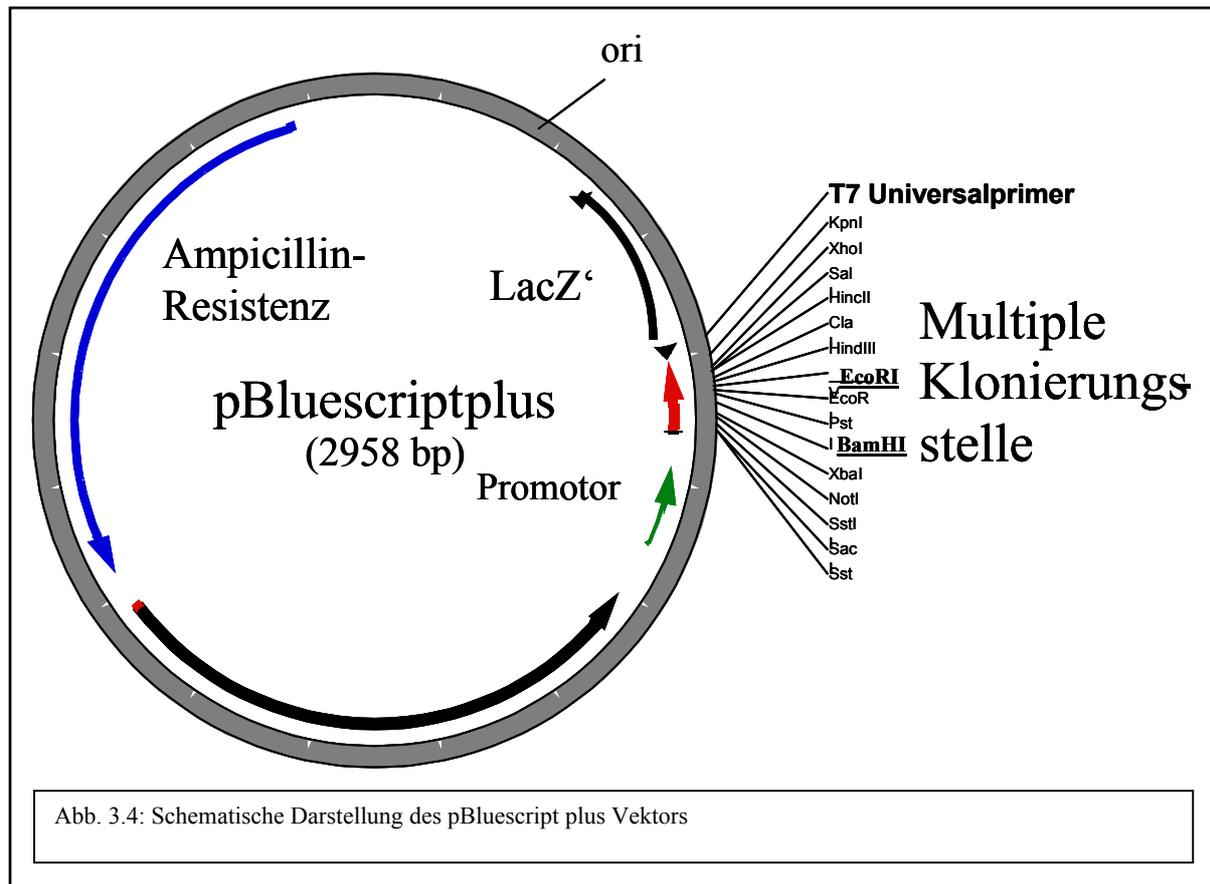
Die Ligation erfolgte bei 16°C für mindestens 2 h.

3.3.1.5 Der Vektor: pBluescript Plus

Die Wahl dieses Vektors begründet sich aus der Nutzung der Blau-Weiß-Selektion, die auf einer Unterbrechung des lacZ-Gens beruht. LacZ' kodiert für das N-terminale α -Fragment der β -Galactosidase, das alleine keine β -Galactosidase-Aktivität besitzt. Bakterienstämme, die das ebenfalls inaktive c-terminale ω -Fragment im Genom tragen, komplettieren bei Vektoraufnahme die Galactosidaseteilstücke, ein Vorgang, der als α -Komplementation bezeichnet wird. Diese Bakterien bilden auf mit X-Gal (80 μ g/ml) und IPTG (20 mM) behandelten Agarböden blaue Kolonien aus, da das IPTG (Isopropyl-thiogalactosid) den Lac Promotor induziert und die daraus resultierende Galactosidase das X-Gal [(5-Brom-4chlor-3-indolyl)- β -D-galactosid] in den blauen Farbstoff 5-Brom-4-chlor-indigo spaltet. Da sich die multiple Klonierungsstelle im LacZ'-Gen befindet, führt jede Insertion zu einer Unterbrechung des Gens, es bilden sich weiße Kolonien, da das X-Gal nicht mehr umgesetzt werden kann. In der Praxis hat es sich allerdings bei Verwendung kleinerer Inserts (< 1kb) bewährt, weiße Kolonien mit blauem Zentrum zu picken.

Die multiple Klonierungsstelle beinhaltet mehrere Restriktionsendonuklease-schnittstellen, von denen EcoRV und BamHI für die Klonierung ausgewählt worden sind. Neben dem Replikationsursprung (pUC ori) befindet sich noch ein β -Lactamase Gen (Amp^r), was den vektorhaltigen Bakterien eine Resistenz gegen Ampicillin (50 μ g/ml) verleiht. Die Amplifizierung des Inserts in der Multiple-Klonierungsstelle erfolgte mit Hilfe eines T7-Universalprimers.

Um die Konzentration von Salzen aus dem Ligationspuffer zu vermindern, welche die Elektroporation behindern könnten, wurde der Ligationsansatz über das QiAquick Gel Extractor Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben entsalzt. Das Eluat wurde in 30 µl TE-Buffer aufgenommen.



Es erfolgte eine Transformation mittels elektrokompeter E. coli sure mit 5 bis 10 µl entsalztem Ligationsansatz. Nach 30-minütiger Erholungsphase in LB-Medium wurden die elektroporierten Bakterien auf, mit kurz zuvor mit X-Gal/IPTG beschichteten, ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen. Nach Inkubation der Agarplatten über Nacht wurden diejenigen Kolonien gepickt und für eine Minipräparation angeimpft, die weiß waren und ein blaues Zentrum aufwiesen. Es wurden von diesen Proben Minipräparationen erstellt und zur Kontrolle einem Restriktionsendonucleaseverdau mit EcoRI und BamHI unterzogen. Mit inserthaltigen Proben wurden eine Sequenzierung mit dem T7-Universalprimer durchgeführt. Die so erhaltenen Sequenzen wurden mit der Ursprungssequenz verglichen.

3.3.2 Histonmodifikationsanalyse

3.3.2.1 Chromatin Immunopräzipitations Assay (CHIP)

Die Chromatin-Struktur in eukaryontischen Zellen kann in einer kompakten Form, dem Heterochromatin, und einer aufgelockerten Form, dem Euchromatin, vorkommen. Letztere Form ist charakteristisch für aktive, transkribierte Gene. Die Nucleosomen spielen für den „Verpackungsgrad“ der DNA eine entscheidende Rolle. Sind ihre Untereinheiten, die Histone, durch Histonacetyltransferase (HATs) acetyliert worden, liegt die DNA in einer aufgelockerten Struktur um das Nucleosom, das Gen kann transkribiert werden. Werden die Acetylgruppen von Histonedecetylasen (HDACs) entfernt, wobei diese teilweise durch Methylgruppen mit Hilfe von Methyltransferasen (HMTs) ersetzt werden, so liegt eine dichtere Chromatinstruktur vor, die den Zugang von Transkriptionsfaktoren bzw. die Transkription erschwert. Anhand der Acetylierungsmuster, vor allem der Histone H3 und H4, ist es möglich Aussagen darüber zu treffen, ob ein Gen transkribiert wird oder nicht (Histon-Code-Hypothese; Jenuwein, 2001). Bei der Chromatin Immunopräzipitation macht man sich die Möglichkeit zu Nutze, die Histone an die sie umgebende DNA zu fixieren. Durch Ultraschallbehandlung werden jeweils kurze Histon-DNA Bruchstücke geschaffen. Mit Antikörpern, die spezifisch acetylierte Histone erkennen, werden jeweils nur die Histon-DNA-Fragmente zurückgehalten, die acetyliert vorliegen, während die anderen durch Waschen entfernt werden. Entfernt man nun die Histone von der DNA, kann man mit Hilfe einer quantitativen PCR mit genspezifischen Primern das ursprüngliche Vorhandensein bzw. die Abwesenheit von acetylierten Histonen in der Probe nachweisen.

3.3.2.2 DNA-Fixierung

Es wurden 1×10^6 Zellen je nach Bedingung in einem Well einer 6-Well Zellkulturschale ausgesät und durch Zugabe von Formaldehyd (Endkonzentration 1%) fixiert. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Es wurde eine Waschlösung mit PBS erstellt, der man die Proteaseinhibitoren Phenylmentyl-

sulfonyl-Fluorid (PMSF, 1mM), Aprotinin (1 µg/ml) und Pepstatin A (1 µg/ml) hinzugefügt hat. In diesem eisgekühlten Puffer wurden die Zellen aufgenommen und bei 4°C mit 2000 rpm für 5 min in 15 ml Falcon Röhrchen zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde nochmals durchgeführt, der Überstand verworfen und das Zellpellet in SDS Lyse-Puffer (37°C) bei Raumtemperatur resuspendiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation erfolgte die DNA-Scherung.

3.3.2.3 DNA-Scherung

Die Zelllysate wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, gut gemischt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Ultraschallbehandlung wurde mit einer 2 mm Mikrosonde des Ultraschall Desintegrator 130W mit in Eiswasser schwimmenden Proben durchgeführt. Es wurde mit 30% maximaler Amplitude 6 mal jeweils 10 Sekunden sonifiziert.

3.3.2.4 Histon-Präzipitation

Die ultraschallbehandelten Zelllysate wurden bei 13.000 rpm bei 4°C für 10 min zentrifugiert und jeweils 200 µl Überstand in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Verdünnung mit dem ChIP Dilutionspuffer (10x) und Hinzugabe von Protease-Inhibitoren wurde eine Kontrollprobe von 120 µl abgenommen. Es wurden je Probe 70 µl „Salmon Sperm DNA/ProteinA Agarose“ (50%) Mischung hinzugefügt und auf einem Schüttler für 30 min bei 4°C inkubiert, danach abzentrifugiert (1,5 min bei 1800 rpm; RT) und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Es wurden die folgenden Immunopräzipitationsantikörper hinzugefügt:

Kontrolle: kein Antikörper	
Isotypkontrolle: Kanninchen IgG	2,5 µl
Anti-acetyl-Histone H4 (Lys8)	5,0 µl
Anti-2b-dimethyl-Histon H3 (K9)	5,0 µl
Anti-dimethyl-Histon H3 (Lys4)	5,0 µl
Anti-acetyl-Histon H3 (Lys9)	5,0 µl
Anti-trimethyl Histon3 (Lys4)	2,0 µl

Es erfolgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht unter Rotation, danach wurde nochmals 60 µl „Salmon Sperm DNA/ProteinA Agarose“ Mischung hinzugefügt und 1 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 4°C mit 1800 rpm für ca. 1,5 min konnte die unspezifische DNA mit dem Überstand entfernt werden, während das Pellet den Agarose/Antikörper/Histon-Komplex enthielt. Der Komplex wurde in 1 ml des jeweiligen Waschpuffers für 3 bis 5 min unter Rotation gewaschen und bei 1800 rpm für 1,5 min bei RT zentrifugiert:

Low Salt Immune Complex Wash Buffer (1x)

High Salt Immune Complex Wash Buffer (1x)

LiCl Immune Complex Wash Buffer (1x)

TE-Buffer (2x)

3.3.2.5 Entfernung der Histone und Aufarbeitung für die Realtime-PCR

Es wurde der Elutionspuffer frisch erstellt (1 % SDS, 0,1 M NaHCO₃ in Aqua dest.). Dem Komplex wurden je 250 µl Elutionspuffer hinzugefügt und 15 min bei Raumtemperatur unter Rotation inkubiert. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt (1,5 min bei 1800 rpm, RT), der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die Histone von der DNA zu entfernen, wurde je Probe 20 µl 5 M NaCl hinzugefügt und für 4 h bei 65 °C inkubiert. Nach einer Abkühlphase erfolgte die Zugabe von 10 µl EDTA (0,5 M), 20 µl Tris HCL (1 M, pH 6,5) und 2 µl Proteinase K (10 mg/ml), danach eine erneute Inkubation (1 h bei 45 °C).

Die Aufreinigung der Proben erfolgte mittels QIAquick PCR Purification Kit wie folgt: Es wurden pro Ansatz 60 µl Puffer PB (5x) zugegeben, gut gemischt und auf eine QIAquick Säule aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgte bei 13.000 rpm für 1 min. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule mit 750 µl Puffer PE gewaschen und erneut zentrifugiert. Es folgte noch eine Trockenzentrifugation. Danach wurde die Säule mit einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß versehen und die DNA mit 50 µl TE-Puffer unter Zentrifugieren eluiert.

Die Realtime-PCR erfolgte unter Zugabe von SYBR Green als Markersubstanz (siehe Realtime-PCR; S. 56). Je Probe wurde ein Ansatz wie folgt pipettiert, der Probenansatz erfolgte in Triplikaten:

2,0 µl DNA
1,0 µl 5'-Primer (10 pmol/µl)
1,0 µl 3'-Primer (10 pmol/µl)
12,5 µl SYBR Green (Qiagen)
8,5 µl Merck Wasser

Das Realtime-PCR Protokoll bestand aus 40 Zyklen folgender Reaktionsrittfolge:

Reaktionsschritt 1	(Enzymaktivierung)	12 min	95°C
Reaktionsschritt 2	(Denaturierung)	55 sec	95°C
Reaktionsschritt 3	(Primerannealing)	35 sec	60°C
Reaktionsschritt 4	(Polymerisation)	25 sec	72°C

Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung des Analyseprogramms „**Sequence Detection System**“. Die CT-Werte der einzelnen Proben, die als Triplikate gemessen worden sind, wurden gemittelt, ggf. Ausreißerwerte herausgenommen. Von der Differenz der gemittelten CT-Werte wurde der Outputwert vom Inputwert abgezogen, um die, durch den Reaktionsablauf verursachte (Waschschritte etc.), unspezifische Reduktion des Templates zu ermitteln. Nach der sogenannten „Delta Delta Methode ($\Delta\Delta$ CT) wurde der Differenzwert Δ CT (Output – Input) nochmals vom Kalibrierungswert „ Δ CT ohne Antikörper“ abgezogen. Der resultierende $\Delta\Delta$ CT Wert wurde in die Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ eingesetzt.

4 ERGEBNISSE

4.1. Induktion des NKG2A Rezeptors

Die Stimulation von T-Zellen im Rahmen der CD94/NKG2A Induktion kann über Superantigene wie das toxische Schocksyndrom-Toxin (toxic shock syndrome-toxin-1, TSST-1) oder verschiedene andere Staphylokokkus Enterotoxinen (SEA, SEB, SEC, SEE) erfolgen. Superantigene sind Moleküle, die, durch Bindung an MHC-Klasse-II-Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen und an die variable-Beta-Domäne (V_β) von T-Zell-Rezeptore, eine Untergruppe von T-Zellen aktivieren. Sie können sowohl $CD4^+$ Helferzellen als auch zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen stimulieren, wenn sie bestimmte V_β -Gensegmente exprimieren. Staphylokokken-Enterotoxine verursachen Lebensmittelvergiftungen, sie gehören zu den bakteriellen Superantigenen (Proft, 2003; Mingari, 1996). Weitere Möglichkeiten, um T-Zellen zu stimulieren, ist die Quervernetzung des TCR durch immobilisierte α -CD3-(TCR)-Antikörper (Romero, 2001) sowie die Stimulation mit alloantigenen MNCs als gemischte Lymphozytenreaktion (MLR; mixed lymphocyte reaktion; Mingari, 1998) oder mit Stimulatorzelllinien, meist B-Zelllinien (Guerra, 1999).

Mit Hilfe von IL-15 konnte CD94/NKG2A in superantigen-und alloantigenaktivierten T-Zellen als auch in sich differenzierenden NK-Zellen (Mingari, 1997) induziert werden (Mingari, 1998). Eine anschließende Arbeit konnte die Induktion von CD94/NKG2A auf humanen T-Zellen ($CD4^+$ und $CD8^+$) durch Stimulation mit TSST oder verschiedenen Staphylokokkus Enterotoxinen und TGF- β zeigen. Obwohl CD94 in beiden T-Zell-Populationen induziert werden konnte, dominierte die NKG2A Expression in $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen. Erstaunlicherweise konnten diese Experimente nicht mit T-Zell-Klonen reproduziert werden (Bertone, 1999).

Eine andere Gruppe konnte mit ihrer Arbeit die Wichtigkeit von IL-15 bei der CD94/NKG2A Induktion während der NK-Zell-Differenzierung aus $CD34^+$ Stammzellen unterstreichen (Carayol, 1998). Doch zeigte sich, dass TGF- β bei der CD94/NKG2A Hochregulation in allostimulierten $CD8^+$ T-Zellen zwar eine Rolle spielt, doch wurde die Induktion von CD94/NKG2A schon durch die Stimulation *per se*

erreicht. In dieser Publikation konnte kein Effekt von IL-15 auf die CD94/NKG2A Induktion auf CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (Guerra, 1999).

Bei der Induktion von CD94/NKG2A auf CD8⁺ T-Zellen aus G-CSF (Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor)-mobilisierten MNCs mit α -CD3-Antikörper konnte der induzierende Effekt von IL-15 reproduziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von CD14⁺ Monozyten, im Speziellen der direkte Kontakt mit diesen, zu einer erhöhten CD94/NKG2A Expression auf den CD8⁺ T-Zellen führte (Tanaka, 2004).

Während die CD94/NKG2A Induktion auf CD4⁺ Helferzellen in oben genannten Publikationen äußerst schwach ausfiel, konnte anhand der in HIV-Patienten beobachteten CD94/NKG2A Hochregulation gezeigt werden, dass ursächlich IL-10 für diesen Effekt verantwortlich ist (Galiani, 1999). Dies führte zur Etablierung einer Stimulationsmethode mit immobilisierten α -CD3-Antikörpern und IL-10, mit deren Hilfe die sukzessive Induktion der CD94/NKG2-Familie auf CD4⁺ T-Zellen analysiert werden konnte: Angefangen mit CD94, dann NKG2D und NKG2E, danach NKG2A und zum Schluss NKG2C (Romero, 2001).

Zur Gewinnung von NKG2A-positiven T-Zellen (*in vivo*) als Ausgangsmaterial und für die Analyse der NKG2A Transkriptpopulationen wurden T-Zellen isoliert und in Kultur weiterexpandiert. Es wurden zwei Stimulationsprotokolle gewählt, für die eine möglichst starke Induktion von NKG2A, sowohl auf CD4⁺ Helferzellen (Romero, 2001) als auch CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (Mingari, 1998; Bertone, 1999), gezeigt worden war.

4.1.1 Induktion von NKG2A auf zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen

Die Stimulation von CD8⁺ T-Zellen mit Staphylokokkus Enterotoxin B (SEB) und TGF- β ist eine Methode, um NKG2A Expression zu induzieren (Bertone, 1999). Von entscheidender Bedeutung ist hier, dass die Zellen über Depletion gewonnen werden, d.h. die Zellen dürfen nicht über einen α -CD8-Antikörper vorstimuliert werden (Daten nicht gezeigt). Es wurde Nabelschurblut (CB, cord blood) als MNC Quelle gewählt (Macardle, 1999), abweichend vom Originalprotokoll, da es keine NKG2A-positiven T-Zellen enthält und so eine Depletion positiver T-Zellen unnötig macht. Voraussetzung für die Stimulierbarkeit sowohl der Helfer (CD4⁺) - als auch der zytotoxischen (CD8⁺) T-Zellen ist eine spezifische variable Region in der TCR- β -Kette. Im Zuge der SEB Stimulation können auch ungewöhnliche doppelt-positive T-Zellen (CD4⁺/CD8⁺) auftreten (Sullivan, 2001).

Die FACS-Analyse wurde jeweils auf das Lymphozytengate bezogen, in dem sich der Hauptanteil lebender Lymphozyten befindet, wobei unspezifische Färbung mit Hilfe von Kontrollen vermindert wurde.

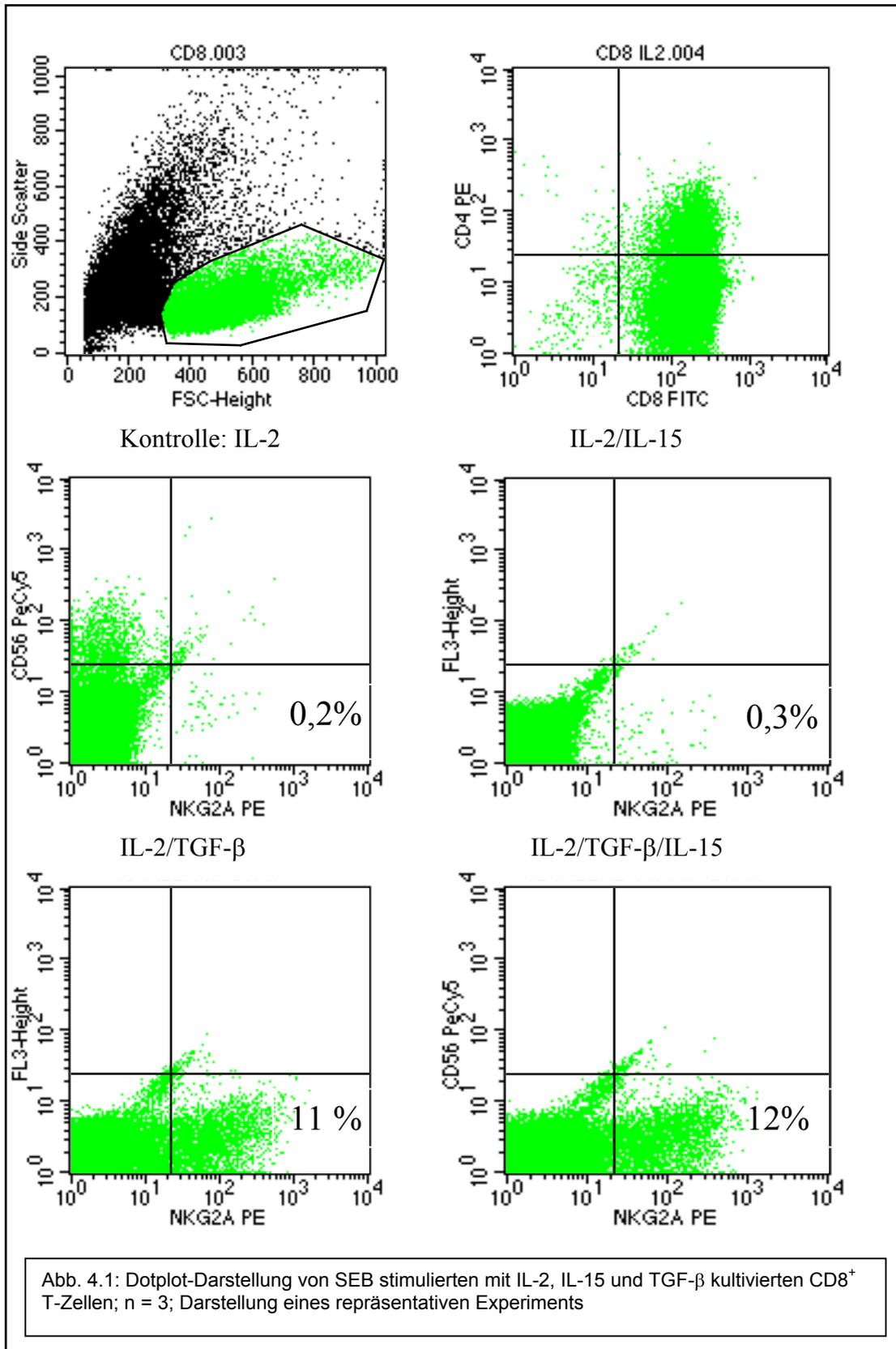
Wie Abbildung 4.1 zeigt, weist eine mit IL-2 kultivierte Kontrolle (0,2 %) sowie eine zusätzlich mit IL-15 versehene Probe (0,3 %) nach 15 Tagen Kultur keine Induktion von NKG2A auf CD8⁺ T-Zellen auf. Die Stimulation mit TGF- β erbrachte in 11 % der kultivierten T-Zellen eine NKG2A Induktion, während die zusätzliche Gabe von IL-15 keine nennenswerte Erhöhung (von 11 % auf 12 %) der NKG2A Expression zur Folge hatte.

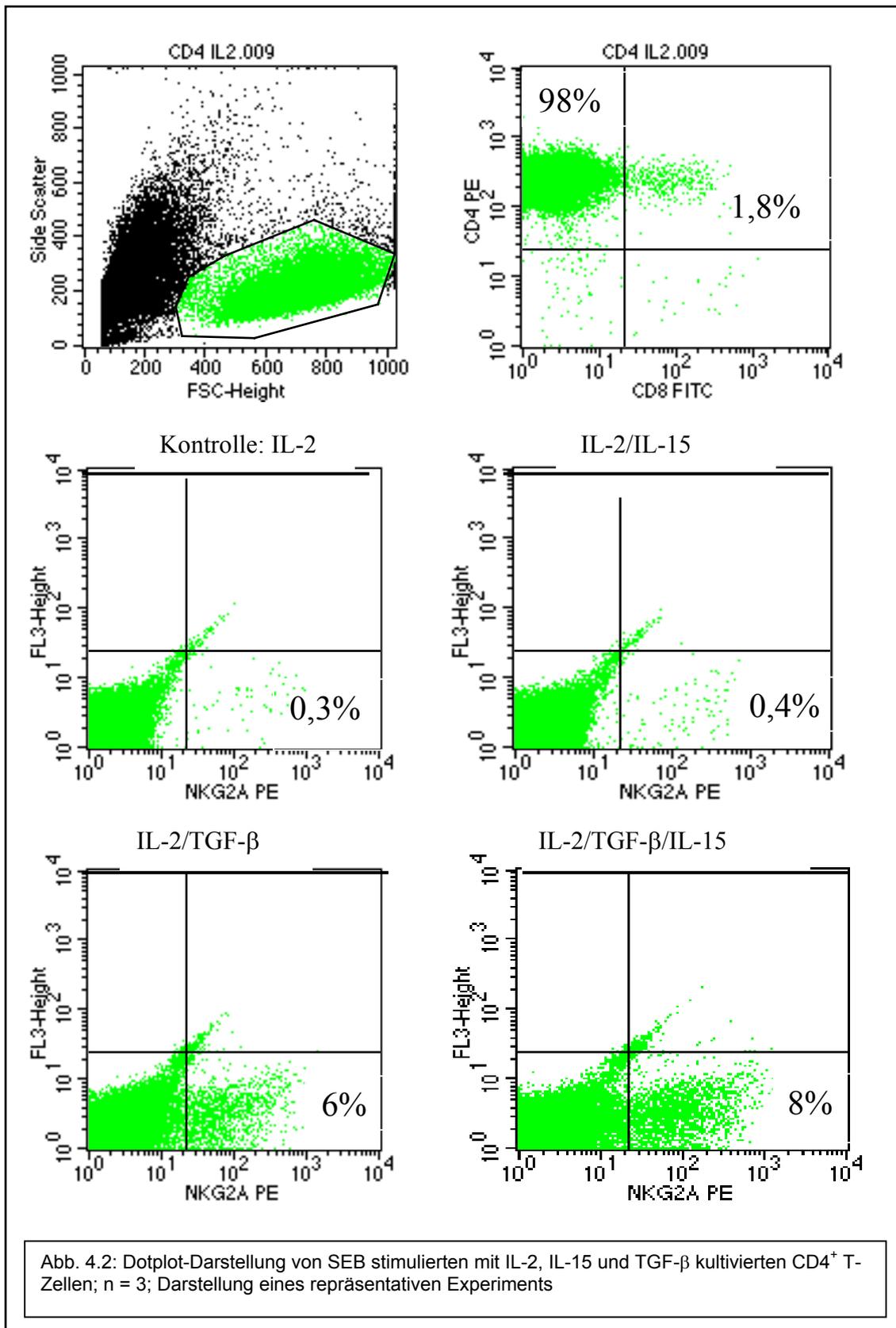
In der Originalpublikation (Mingari, 1998) betrug die Induktion von NKG2A auf CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen 0,7 % in der Kontrolle zu 8,5 % nach IL-15 Kultur. Die Stimulation mit TGF- β (Bertone, 1999) ergab 4 % NKG2A-positiv CD8⁺ T-Zellen in der Kontrolle zu 17 % nach TGF- β Kultur.

Parallel zu den Experimenten mit den zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen wurden die gleichen Versuche mit CD4⁺ T-Zellen angesetzt. Die FACS-Analysen sind in Abbildung 4.2 dargestellt: Während die Kontrolle mit IL-2 (0,2 %) bzw. die zusätzliche

Gabe von IL-15 (0,3 %) auch hier keine Induktion zur Folge hatte, konnte eine Induktion mit TGF- β (6 %) gemessen werden. Auch hier hatte die zusätzliche Gabe von IL-15 zu dem IL-2/TGF- β Gemisch nur eine geringe Auswirkung auf die NKG2A Induktion (von 6 % auf 8 %).

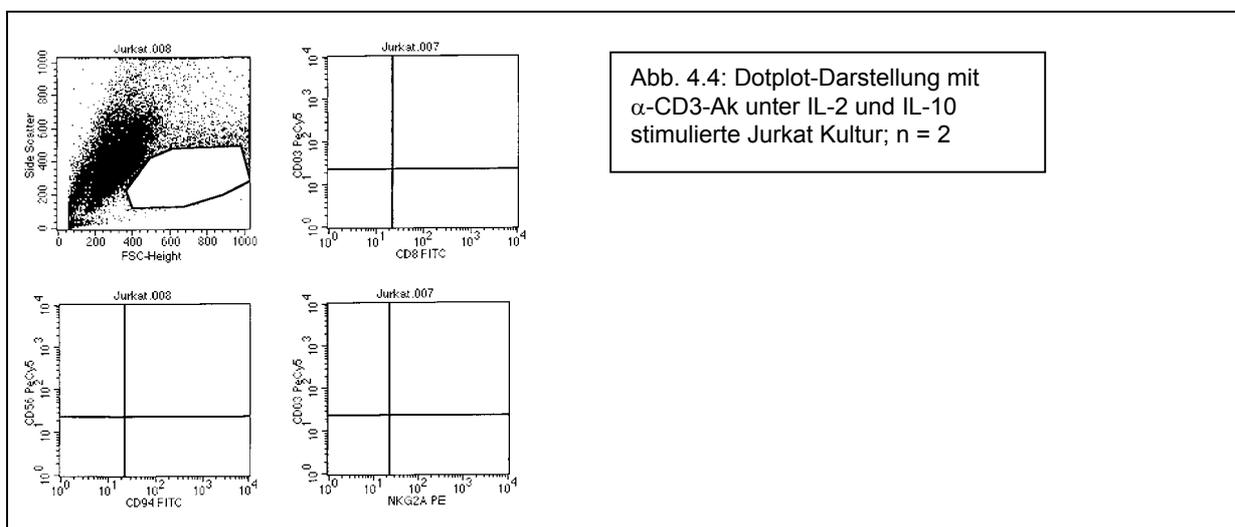
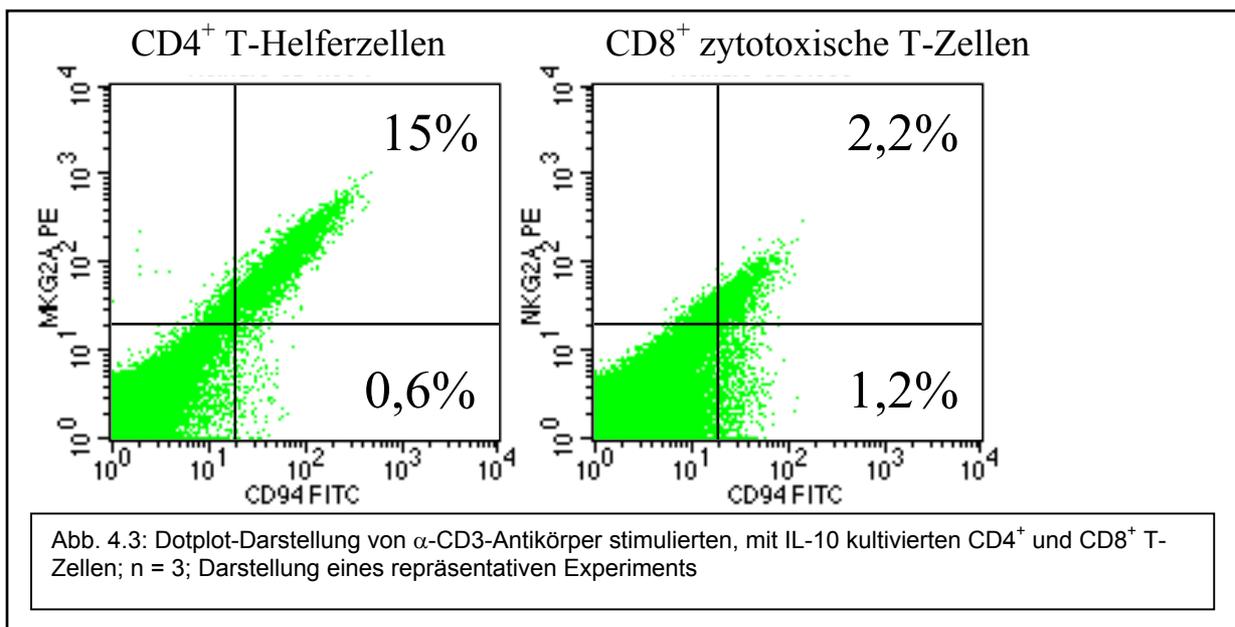
In der Originalpublikation (Bertone, 1999) ergab die Stimulation mit TGF- β 2 % NKG2A-positive CD4⁺ T-Zellen in der Kontrolle zu 6 % nach TGF- β Kultur.





4.1.2 Induktion von NKG2A auf CD4⁺ Helferzellen

Für die Generierung von NKG2A-positiven CD4⁺ Helferzellen wurden, dem Protokoll nach Romero et. al. (2001) folgend, die T-Helferzellen auf mit α -CD3 Antikörper beschichteten Kulturplatten unter Zugabe von IL-2 und IL-10 kultiviert. Alle 5 Tage erfolgte eine Restimulation mit α -CD3-Antikörper beschichteten Kulturplatten. Nach 25 Tagen erfolgte die Datenanalyse. Wie Abbildung 4.3 zeigt, weist eine derart behandelte Kultur von CD4⁺ T-Zellen eine NKG2A Induktion von 15 % auf, während die parallel dazu kultivierten zytotoxischen T-Zellen nur einen Anteil von 2 % aufweisen. Versuche, NKG2A unter den gegebenen Bedingungen auf der NKG2A-negativen T-Zelllinie Jurkat zu induzieren, um ein zuverlässiges Induktionsmodell zu etablieren, schlugen fehl (Abb. 4.4).

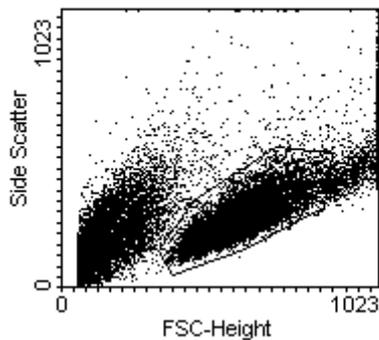


4.1.3 Regulation von NKG2A auf primären NK-Zellen durch Zytokine

Um zu testen, in wie weit die Zytokine nicht nur bei der Induktion auf T-Zellen, sondern auch bei der Regulation von NKG2A auf NK-Zellen beteiligt sind, wurden primäre NK-Zellen über 13 Tage mit entsprechenden Zytokinen kultiviert.

Die FACS-Analyse wurde auch hier auf das Lymphozytengate bezogen, die unspezifische Färbung mit Kontrollen vermindert und die spezifische Bindung mit dem Gate „M1“ markiert. Die in IL-2 kultivierten Zellen wurde als Kontrolle (grau) im selben Histogramm dargestellt wie die spezifischen Proben (schwarz).

Es ergab die Analyse (Abb. 4.5) der Kulturen mit TGF- β , IL-10 und IL-15 zwar keine Änderung der Anzahl der NKG2A-positiven NK-Zellen (A; KO 86 % ; TGF- β 84 %, IL-10 88 % und IL-15 87 %), doch verringerte sich die Rezeptordichte (MFI; mean fluorescence intensity) mit TGF- β bzw. stieg mit IL-10 und IL-15 (D; KO 553; TGF- β 392, IL-10 620 und IL-15 770). Es konnten keine Effekte für die Regulation von NKG2C sowohl in der Expressionsstärke (in %) als auch in der Rezeptordichte (MFI) nachgewiesen werden (B). IL-10 und IL-15 Stimulation zeigten auch keinen Effekt bei der NKG2D Expression und Rezeptordichte, aber TGF- β führte sowohl in Expressionsstärke (87 % zu 63 %) als auch in Rezeptordichte (MFI 102 zu 52) zu einer erheblichen Reduktion, ein Effekt, der bereits für NKG2D beschrieben ist und hier lediglich als Kontrolle mitgeführt wurde (Gastriconi, 2003).



D)

MFI	KO	IL2/TGF- β	IL-2/IL-10	IL-2/IL-15
NKG2A	553	392	620	770
NKG2C	94	94	83	98
NKG2D	102	52	73	97

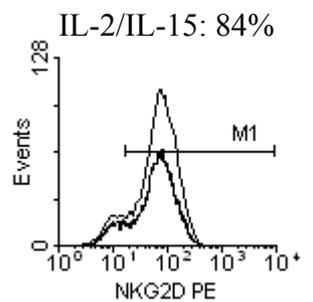
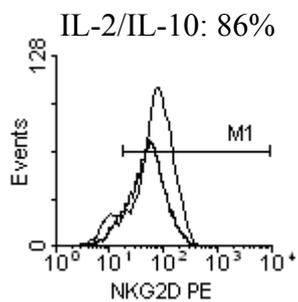
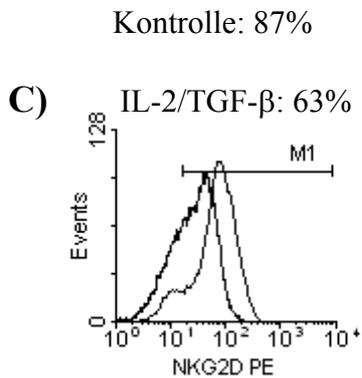
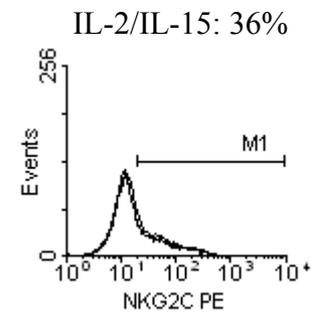
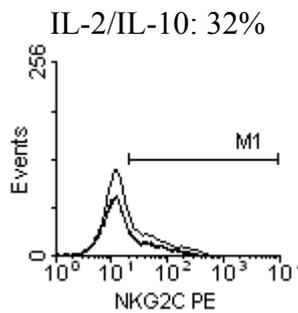
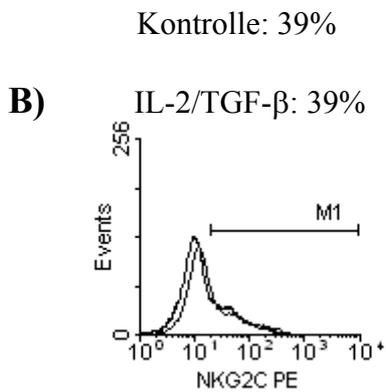
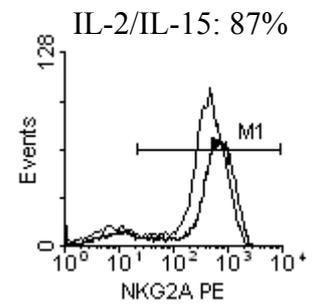
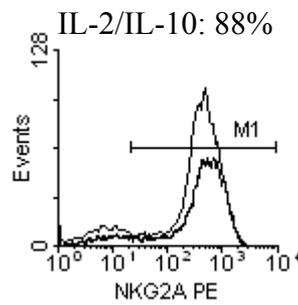
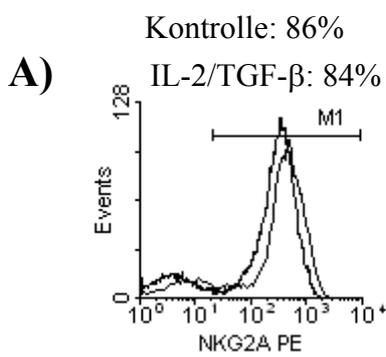


Abb. 4.5: Histogramm von Zytokin-stimulierten (13 d), primären NK-Zellen; Analyse der Rezeptorexpression von NKG2A, NKG2C und NKG2D; n = 2; Darstellung eines repräsentativen Experiments

4.1.4 Isolation von NKG2A-positive und –negative NK-Zell-Klonen

Für weitergehende Experimente wurden neben den induzierten CD4⁺ Helferzellen und CD8⁺ T-Zellen noch zwei NK-Zell-Klone ausgewählt, von denen der eine NKG2A-positive (Klon 9) und der andere NKG2A–negativ (Klon 10) war. Vor allem für die später folgende Transkriptanalyse ist es wichtig, nicht nur Mischpopulationen zu analysieren, sondern auch eine Probe, die aus einer hochreinen Population stammt. Wie aus Abbildung 4.6 deutlich wird, korrelieren hier mRNA Expression und Oberflächenexpression miteinander. Es zeigt weiter, dass NK-Zellen, die KIR-Rezeptoren exprimieren, auch NKG2A-negativ sein können.

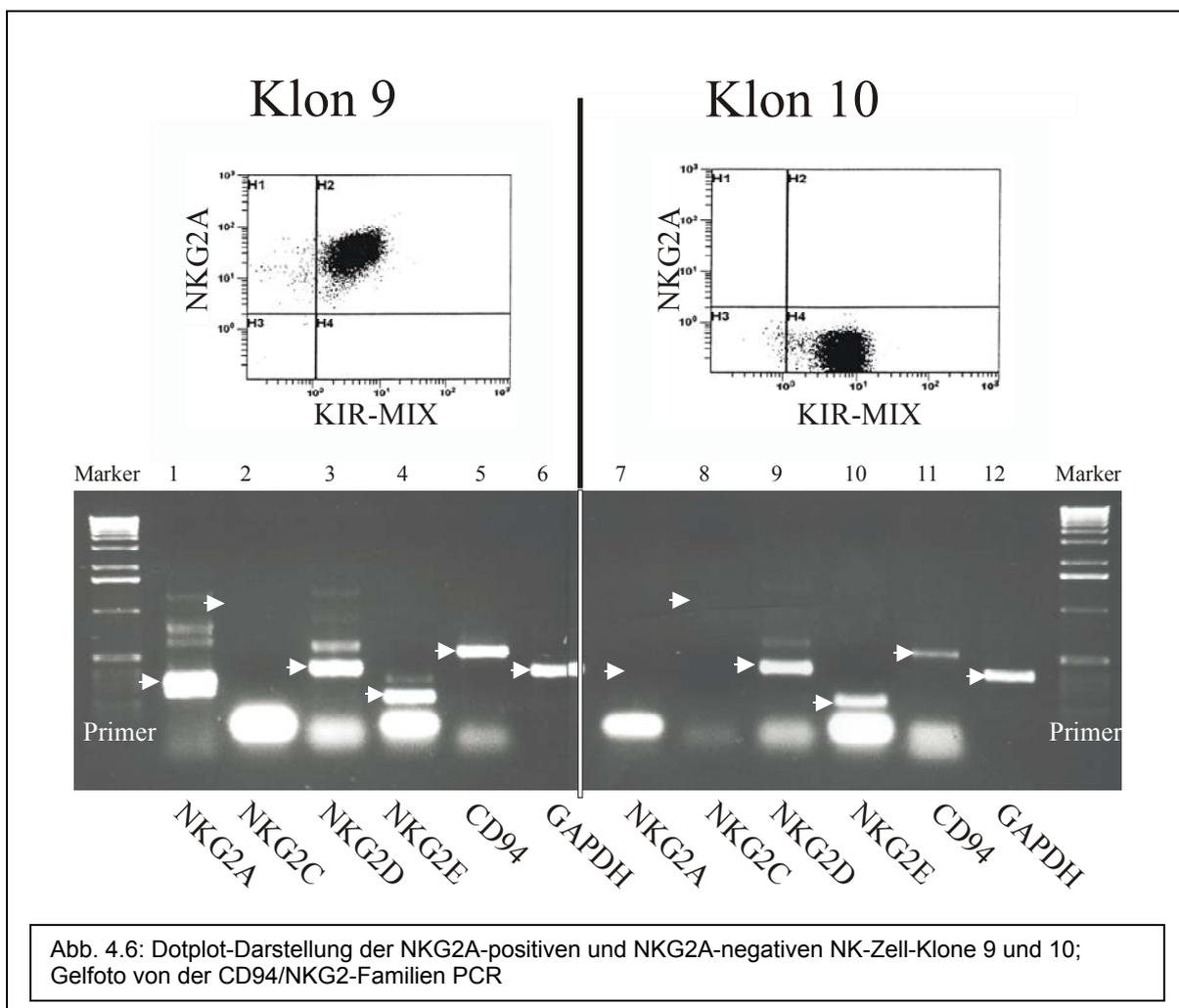


Abb. 4.6: Dotplot-Darstellung der NKG2A-positiven und NKG2A-negativen NK-Zell-Klone 9 und 10; Gelfoto von der CD94/NKG2-Familien PCR

4.1.5 Zusammenfassung: Teil Regulation

- NKG2A konnte auf zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ Helferzellen durch SEB mit Hilfe von TGF- β , jedoch nicht mit IL-2 oder IL-15 induziert werden. CD8⁺ >CD4⁺;
- Durch Stimulation mit α -CD3-Ak und IL-10 konnte NKG2A auf CD4⁺ Helferzellen, jedoch nicht auf zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen induziert werden. CD4⁺ >> CD8⁺;
- Das Stimulationsprotokoll konnte nicht auf die T-Zelllinie Jurkat übertragen werden.
- Stimulationsversuche mit primären NK-Zellen führten nur mit TGF- β zu einer Reduzierung der Expressionsstärke beim NKG2D, nicht jedoch bei NKG2A oder NKG2C. Auch IL-10 und IL-15 hatten keine Auswirkung auf die Expressionsstärke.
- Die Rezeptordichte (MFI) für NKG2A auf primären NK-Zellen wurde durch TGF- β vermindert, durch IL-10 und IL-15 erhöht. Die Expressionsdichte für NKG2C änderte sich kaum. TGF- β regulierte die Expressionsdichte von NKG2D herunter, schwächer war die Wirkung von IL-10.
- Es konnte ein NKG2A-positiver (Klon 9) und ein –negativer (Klon 10) NK-Zell-Klon isoliert und expandiert werden.

4.2 Analyse der NKG2A Transkripte

Im vorangegangenen Teil konnte gezeigt werden, dass der NKG2A Rezeptor sowohl auf NK-Zellen als auch auf CD4⁺ Helferzellen und zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen durch verschiedene Stimuli reguliert bzw. induziert werden kann. In wie weit die Oberflächenexpression mit der Transkriptexpression korreliert und ob eventuelle Zelltyp-spezifische Transkriptionsmuster vorherrschen, soll in diesem Kapitel geklärt werden.

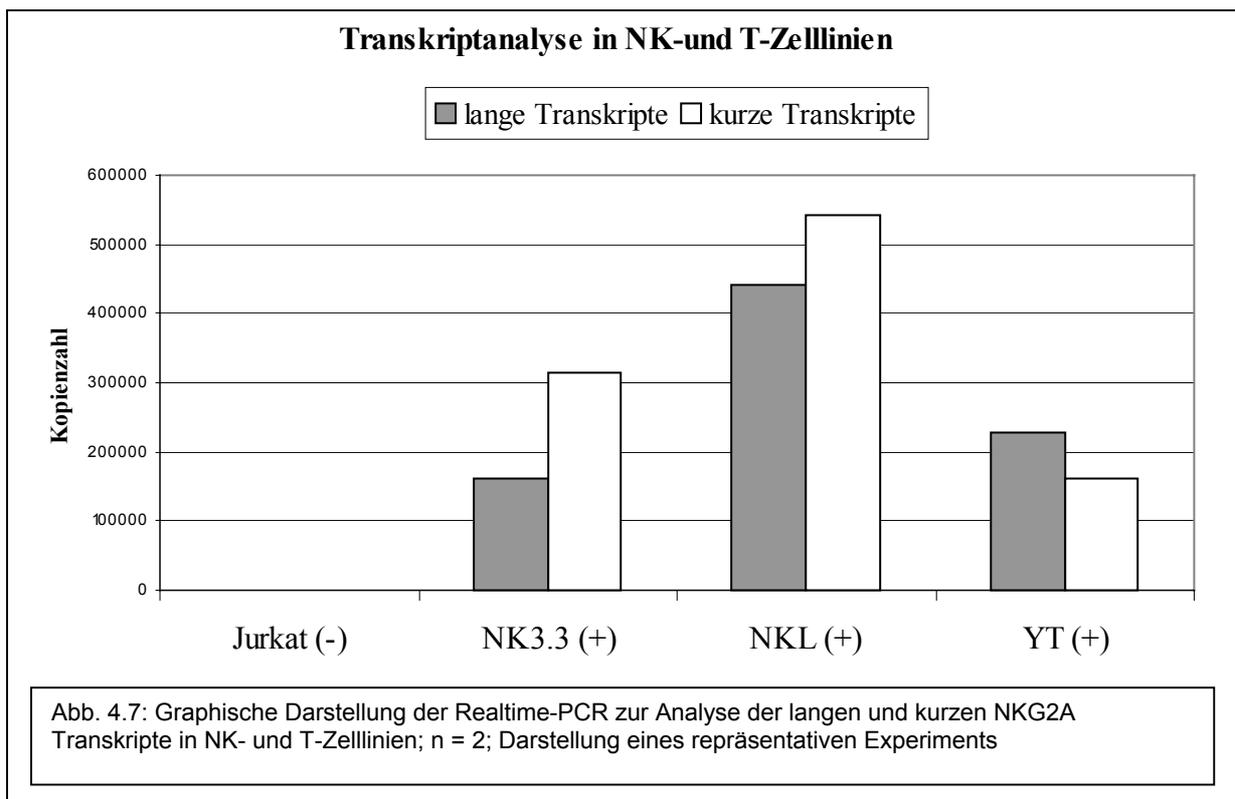
Für den mit NKG2A komplexierten Rezeptor CD94 ist gezeigt worden, dass er sowohl im humanen als auch im murinen System über zwei Promotoren reguliert wird (Lietao, 2003; Wilhelm, 2003). Es konnte für das humane CD94 Gen ein proximaler und ein distaler Promotor charakterisiert werden, von denen jeweils lange bzw. kurze Transkripte initiierten. In allen NK-Zellen und zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen wurden kurze Transkripte vom proximalen Promotor identifiziert, während eine kurzfristige Kultur mit IL-2 oder IL-15 das Erscheinen von langen Transkripten zur Folge hatte, die vom distalen Promotor initiierten. Während also die kurzen Transkripte konstitutiv in CD94-positiven Zellen exprimiert wurden, wurden die langen Transkripte, die wie NKG2A ein nichttranslatiertes Exon beinhalten, durch Zytokine induziert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Oberflächenexpression von CD94 in zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen nicht immer mit der Transkriptexpression korreliert (Lietao, 2003).

Für das humane *NKG2A* Gen sind zwei Populationen von Transkripten identifiziert worden: Die eine Population von kurzen Transkripten hat zwei, kurz aufeinanderfolgende, Startpunkte direkt vor dem Exon 2, während die andere Population lange Transkripte aufweist, die an multiplen Startpunkten vor dem untranslatierten Exon 1 beginnen (Plougastel, 1998). Um zu überprüfen, ob dieses Transkriptmuster eine funktionelle Bedeutung für die NKG2A Expression haben könnte, wurden es mit Hilfe der Realtime-PCR analysiert. Hierzu wurden Primer erstellt, die jeweils im Exon 1 oder Exon 2 binden. Über eine Standardverdünnungsreihe wurden jeweils die Ausgangskonzentrationen der Transkriptkopien errechnet. Die Kopienzahl der Transkripte aus Exon 1 wurde von den Transkripten aus Exon 2 subtrahiert, da der Primer für Exon 2 nicht spezifisch nur an die kurzen Transkripte bindet. Aus der Differenz ergibt sich somit rechnerisch die Anzahl der kurzen Transkripte.

4.2.1 Transkriptanalysen in Zelllinien

Um zu überprüfen, ob die beiden aus einer Lymphozytenmischpopulation charakterisierten NKG2A Transkriptpopulationen ein Muster aufweisen oder beide Transkripte in allen Zelltypen exprimiert werden, wurden sowohl *in vivo* isolierte als auch *in vitro* induzierte Zellpopulationen (siehe vorangegangenes Kapitel) analysiert.

Aus Abbildung 4.7, welche die Transkriptverteilung für einige Zelllinien zeigt, wird deutlich, dass die NKG2A-negative T-Zelllinie Jurkat auch keine nennenswerte Transkriptexpression aufweist. Die NK-Zelllinien NK3.3 und NKL weisen Transkripte auf, dies korreliert mit der Analyse der Oberflächenexpression des Rezeptors (Daten nicht gezeigt). Hier dominieren kurze Transkripte über die langen, während dieses Verhältnis in der YT NK-Zelllinie umgekehrt ist.

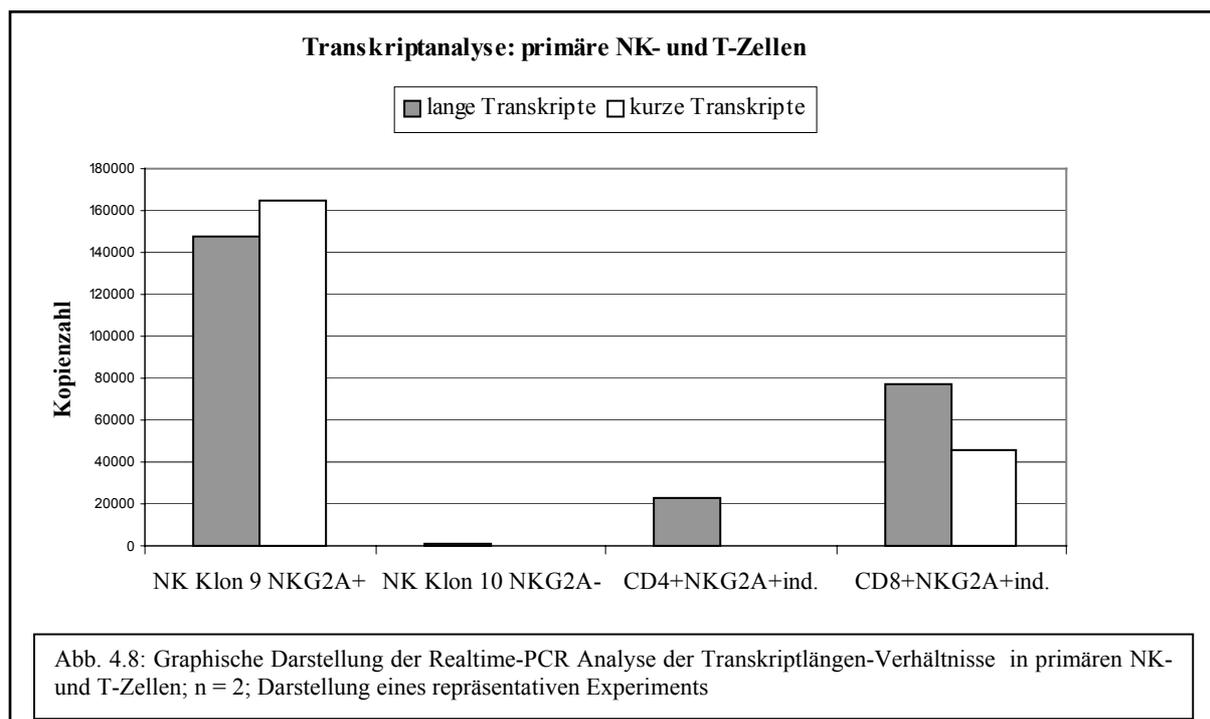


4.2.2 Transkriptanalysen in primären NK- und T-Zellen

Da die Ergebnisse, die man mit Zelllinien erhält, nicht immer die Situation in primären Zellen widerspiegelt - wie oben dargestellt, unterschied sich die Expression schon zwischen den NK-Zelllinien - wurden die Analysen auf primäre Zellen ausgeweitet.

Es geht aus einer Publikation hervor, welche die NKG2A Kopienzahl von NK-Zell-Klonen analysiert hat, dass sich die Anzahl der Kopien von Klon zu Klon bzw. von Klon zu NK-Zelllinie sehr stark unterscheiden kann (Brostjan, 2002).

Die Analyse des NKG2A-negativen Klons 10 erbrachte keine nennenswerte Transkriptexpression, wohingegen der NKG2A-positive Klon 9 Transkripte mit einer leichten Dominanz der kurzen aufwies (Abb. 4.8). Dies untermauert das Transkriptverhältnis, was schon für die NK-Zelllinien NK3.3 und NKL beobachtet worden ist. Die Analyse der Transkriptpopulationen der NKG2A-induzierten CD4⁺ Helferzellen (mit α -CD3-Ak und IL-10) bzw. CD8⁺ zytotoxischen Zellen (mit SEB und TGF- β) weist eine Dominanz der langen Transkripte auf. Die deutliche Differenz zwischen primärem NK-Zell-Klon und den T-Zellen könnte sich auch aus der Zellzahl ergeben, die für NKG2A positiv war: Während alle Zellen des Klons 9 NKG2A exprimiert haben, taten dies nur 15 % der CD4⁺ T-Zellen bzw. 12 % der CD8⁺ T-Zellen (siehe FACS-Daten S. 75 und 73). Während also in NK-Zellen die kurzen Transkripte dominieren, ist das Verhältnis in T-Zellen umgekehrt.



4.2.3 Regulation von CD94/NKG2A durch Zytokine

Allgemein lassen sich Zytokine in zwei Gruppen einteilen: Während Zytokine wie IL-2 und IL-12 zu den Th1-Zytokinen zählen, die durch eine zellvermittelte Immunantwort charakterisiert sind, gehören Zytokine wie IL-4 und IL-10 zu den Th2-Zytokinen, für die eine humorale, von Antikörperproduktion gekennzeichnete, Immunantwort typisch ist. TGF- β stellt einen Sonderfall dar, weil die Immunantwort je nach Konzentration und Zellen variieren kann. Im Rahmen der CD94/NKG2A Induktion konnte es seine Fähigkeit bei der Stimulation von CD8⁺ T-Zellen unter Beweis stellen (Guerra, 1999), und auch in dieser Arbeit kann diese Fähigkeit bestätigt werden (siehe vorangegangenes Kapitel, S. 73).

IL-1 β , IL-6 und TNF- α gehören zu den proinflammatorischen Zytokinen, die im Vorfeld einer Infektion zur Zellaktivierung sowohl von Immunzellen als auch Endothelzellen führen (Immunantwort der akuten Phase). IL-1 β erhöht speziell die IFN- γ Produktion von NK-Zellen (Cooper, 2001), IL-6 erhöht die LAK-Zytotoxizität von NK-Zellen (lymphokine activated killer cells) und kann als Antagonist von TGF- β diese LAK-Aktivität wiederherstellen (Hsiao, 2004). TNF- α kann von NK-Zellen selbst produziert werden (Jacobs, 2001) und autokrin die Zytotoxizität steigern (Ostensen, 1987).

IL-2 ist der klassische Wachstumsfaktor für NK- und T-Zellen, er erhöht die Zytotoxizität und wirkt anti-apoptotisch. In höheren Dosen lassen sich mit ihm Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK) stimulieren. IL-2, IL-15 und IL-21 ist gemein, dass sie über die gleiche Rezeptorkette (IL-2R γ) verfügen, wobei ihre Wirkung auf NK-Zellen über ein breites Spektrum recht ähnlich ist. IL-15 ist ein wichtiger NK-Zell-Reifungsfaktor (Mingari, 1997), er erhöht die Zytotoxizität (Gosselin, 1999), wirkt anti-apoptotisch und kann den humanen CD161 Rezeptor hochregulieren (Azoni, 1998). In Superantigen-stimulierten T-Zellen konnte es CD94/NKG2A induzieren (Mingari, 1997), in dieser Arbeit konnte lediglich eine Rezeptorerhöhung auf stimulierten NK-Zellen nachgewiesen werden (siehe Seite 77).

IL-21 kann bei der NK-Zell-Reifung aus CD34⁺ Stammzellen (Sivori, 2003), bei der Expansion (Parrish-Novak, 2001) und Effektorfunktion von NK-Zellen beteiligt sein (IFN- γ , Strengell 2002). Es limitiert aber auch die NK-Zell-Antwort und fördert die Antigen-spezifische T-Zell-Aktivierung (Kasaian, 2002).

Ein weiteres Zytokin, das für eine Th1-Antwort charakteristisch ist, ist das IL-12, auch „NK-Zellen stimulierender Faktor“ genannt (Valiante, 1992). Es erhöht in NK-Zellen die Zytokinproduktion, Proliferation und Zytotoxizität (Trinchieri, 1996). Eine Stimulation mit IL-12 kann die Induktion von CD94/NKG2A auf α -CD3-Ak-stimulierten CD8⁺ T-Zellen zur Folge haben (Derre, 2002).

IL-4 und IL-10 gehören zu den Th2-Zytokinen, sie sind klassische Antagonisten der Th1-Zytokine. IL-10, auch „Zytokinsynthese inhibierender Faktor“ genannt, kann in Kombination mit IL-18 die NK-Zellproliferation, Zytotoxizität und IFN- γ Produktion induzieren (Cai, 1999; Moore, 2001). Für IL-10 ist seine Wirkung auf die CD94/NKG2A Induktion auf CD4⁺ Helferzellen beschrieben (Romero, 2001), was in dieser Arbeit ebenfalls reproduziert werden konnte (siehe S.75).

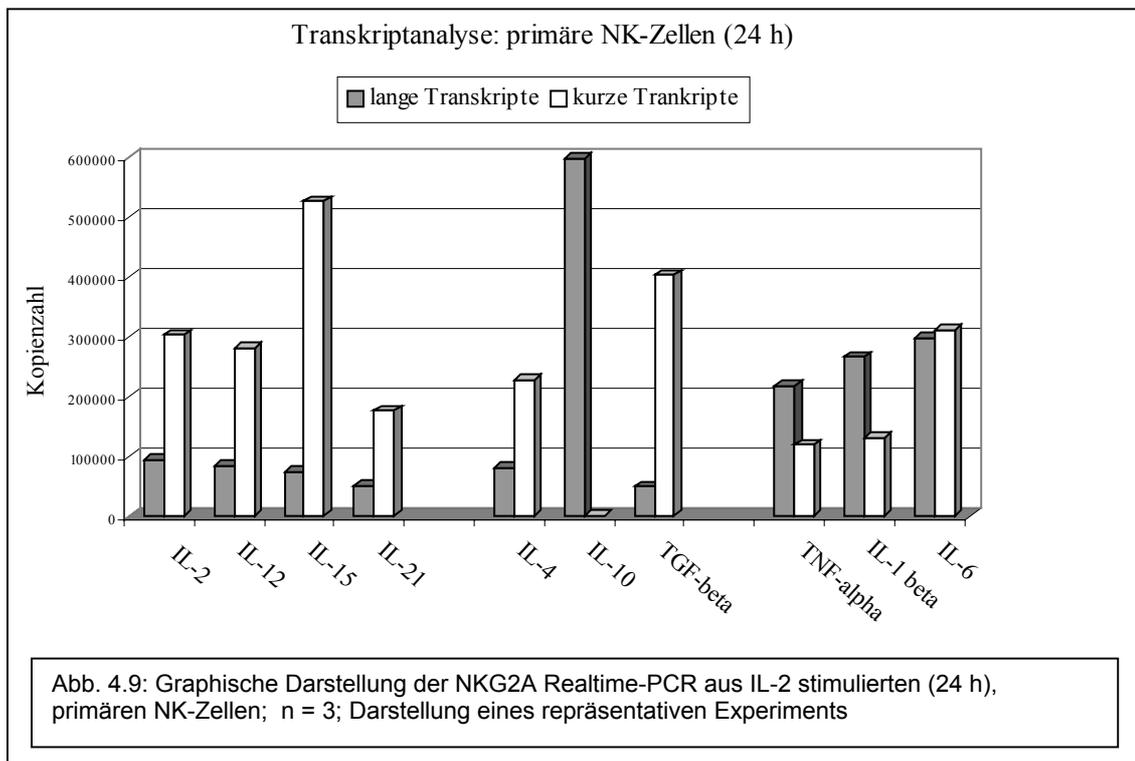
Für IL-4 ist im murinen System gezeigt, dass es sowohl in reifen als auch sich differenzierenden NK-Zellen den CD94/NKG2A Rezeptorkomplex herunterregulieren bzw. die Induktion inhibieren kann (Fraser, 2002). Und auch beim Menschen dominiert die CD94/NKG2A Expression auf NK-Zellen, die mit Th1-Zytokinen stimuliert worden sind (Aktas, 2005).

In einer früheren Publikation wurde eine Zytokin-induzierte Veränderung der NKG2A Expression auf den NK-Zelllinien NKL und NK92 mit Hilfe von Northern Blotting und quantitativer PCR untersucht, es konnten jedoch keine Veränderungen nachgewiesen werden (Brostjan, 2000).

4.2.3.1 Regulation der Transkripte in primären NK-Zellen durch Zytokine

Um zu prüfen, ob sich durch Zytokinstimulation das Verhältnis der langen und kurzen Transkripte ändern kann, ähnlich wie IL-2 und IL-15 die langen Transkripte vom distalen Promotor des CD94 induzieren, wurden expandierte primäre NK-Zellen für 24 Stunden mit den jeweiligen Zytokinen inkubiert, die RNA isoliert und revers transkribiert.

Aus der nachfolgenden Realtime-Analyse auf lange und kurze Transkripte ergab sich folgendes Bild (Abb. 4.9): Eine mit IL-2 inkubierte Kontrolle zeigte das für NK-Zellen gewohnte Verhältnis mit der Dominanz der kurzen Transkripte.



Die Stimulation mit IL-12 zeigt keine großen Abweichungen von der Kontrolle.

Mit IL-15 und TGF- β kultivierte NK-Zellen weisen ein leichte Erhöhung der kurzen Transkripte auf.

Eine Kultivierung mit IL-21 ergab keine Änderung des Verhältnisses zwischen langen und kurzen Transkripten.

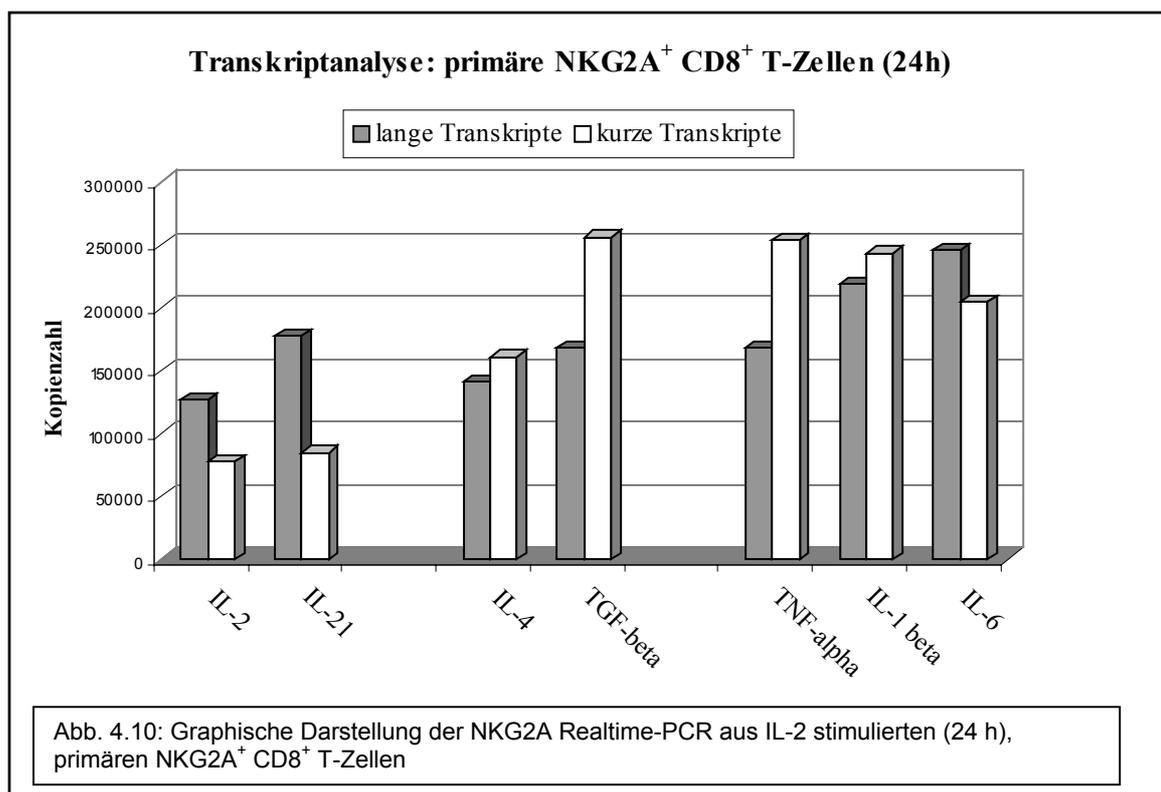
Eine Inkubation mit IL-4 führt zu keiner großen Änderung dieses Verhältnisses, obwohl im murinen System eine inhibierende Wirkung auf die NKG2A Oberflächenexpression publiziert worden ist (Fraser, 2002).

Eine Stimulation mit IL-10, das NKG2A auf CD4⁺ T-Zellen induzieren konnte, beweist auch in NK-Zellen seine Wirkung – es reguliert die langen Transkripte hoch.

Die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1- β und IL-6 scheinen, mit Ausnahme des IL-6, zwar die langen Transkripte zu erhöhen, dafür aber die kurzen zu verringern.

4.2.3.2 Regulation der Transkripte in primären T-Zellen durch Zytokine

Da das Transkript-Profil in NK-Zellen anders ist als in T-Zellen, wurden auch mit primären T-Zellen Versuche unternommen. Es wurden *in vitro* induzierte NKG2A-positive CD8⁺ T-Zellen isoliert, stimuliert (α -CD3-Ak) bzw. expandiert und für 24 Stunden mit den jeweiligen Zytokinen kultiviert. Eine mit IL-2 inkubierte Kontrolle zeigt das für T-Zellen bekannte Verhältnis mit der Dominanz der langen Transkripte (Abb. 4.10).



Mit IL-21 konnten, ähnlich wie bei den NK-Zellen, nur sehr geringe Effekte nachgewiesen werden, es konnte eine leichte Erhöhung der langen Transkripte verzeichnet werden.

Die Stimulation mit IL-4 ergab eine leichte Änderung des Transkriptverhältnisses, es kam zu einer leichten Erhöhung der kurzen Transkripte.

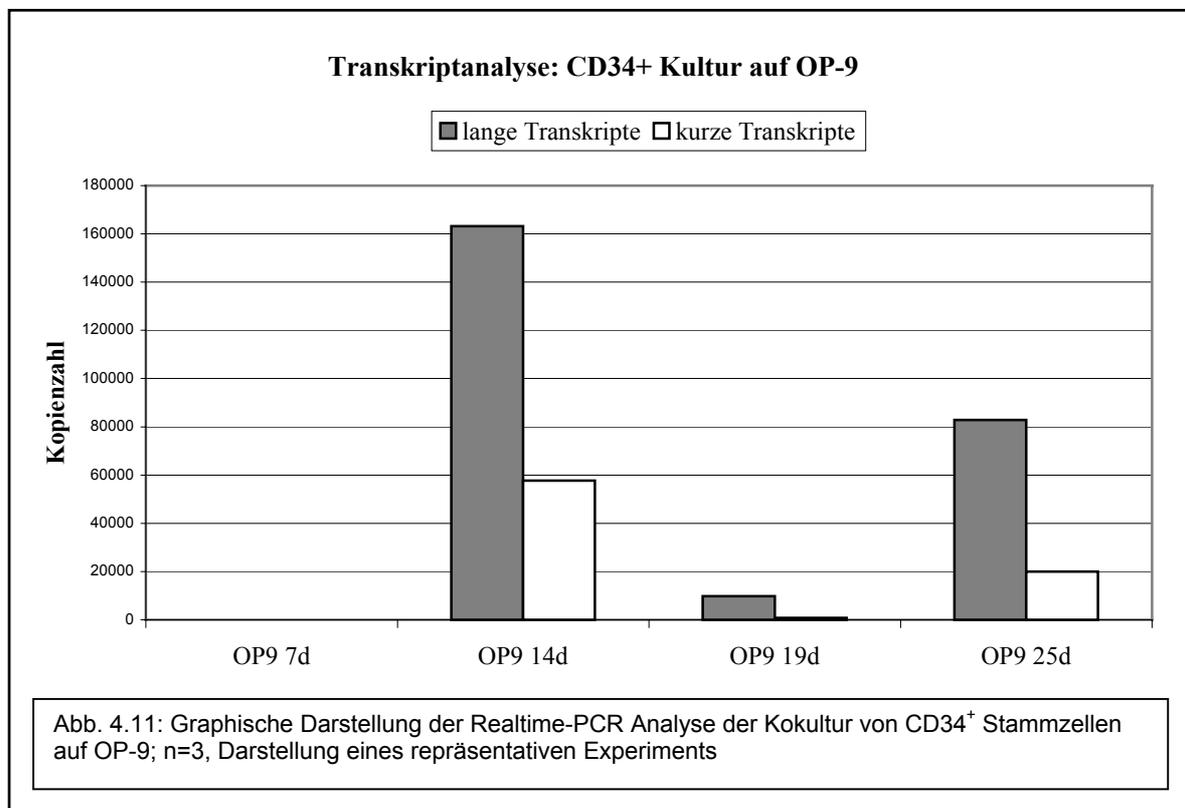
TGF- β führte zu einer, wie schon bei den NK-Zellen beobachteten, Erhöhung der kurzen Transkripte.

Die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 zeigten für beide Transkriptlängen eine Erhöhung, wobei hier jedoch die kurzen Transkripte dominierten.

4.2.4 Induktion des NKG2A Gens im Rahmen der NK-Zell-Entwicklung

Um zu überprüfen, ob die Dominanz der langen Transkripte mit der Induzierbarkeit von NKG2A korreliert oder T-Zell-spezifisch ist, wurden Versuche unternommen, NK-Zellen aus CD34-positiven Nabelschnurblutzellen zu differenzieren.

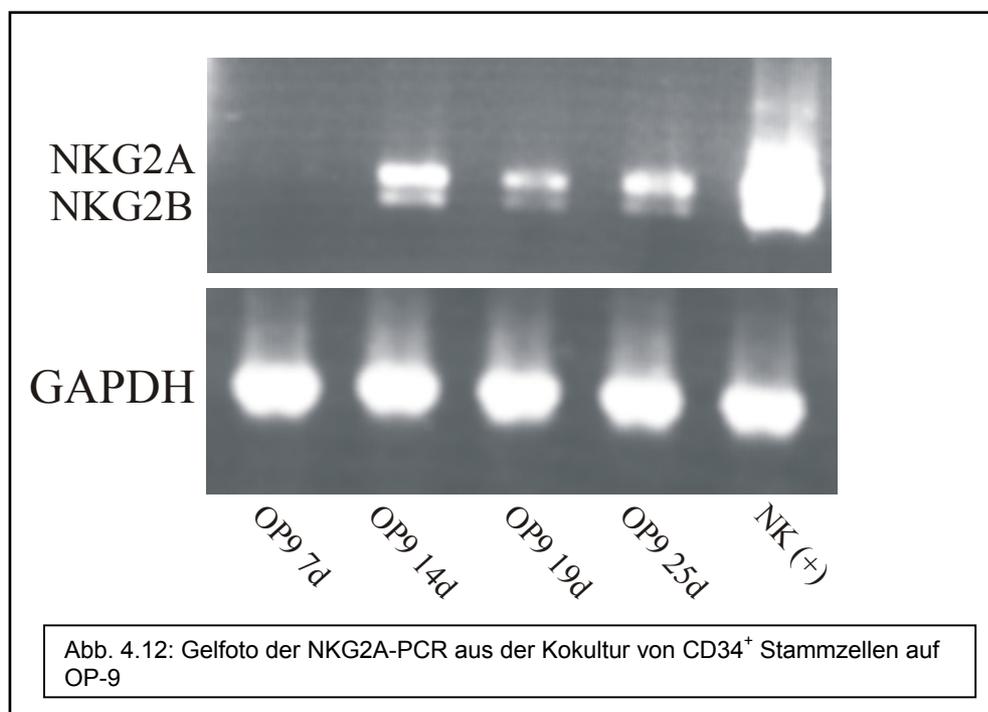
Hierzu wurden CD34⁺ Zellen mit einer murinen Knochenmarkstromazelllinie (OP-9) oder einer fötalen Leberzelllinie (AFT024) nach Differenzierungsprotokollen nach Williams et al. (1999) bzw. Miller et. al. (1999, 2001) kokultiviert. Mit der Kokultur mit AFT024 kann, neben der NKG2A Expression, auch die KIR Expression induziert werden, während letzteres mit der OP-9 Zelllinie unterbleibt (Poster Eisermann, 2002). Da die NKG2A Expression der KIR Expression vorausgeht und die CD34⁺ Zellen in frühen Phasen besser auf OP-9 expandieren, ist in Abbildung 4.11 die Transkriptanalyse für eine OP-9 Kokultur gezeigt. Während nach 7 Tagen noch keine NKG2A Transkripte nachweisbar sind, ist dies nach 14 Tagen Kokultur möglich, wobei hier mehr lange als kurze Transkripte vorliegen.



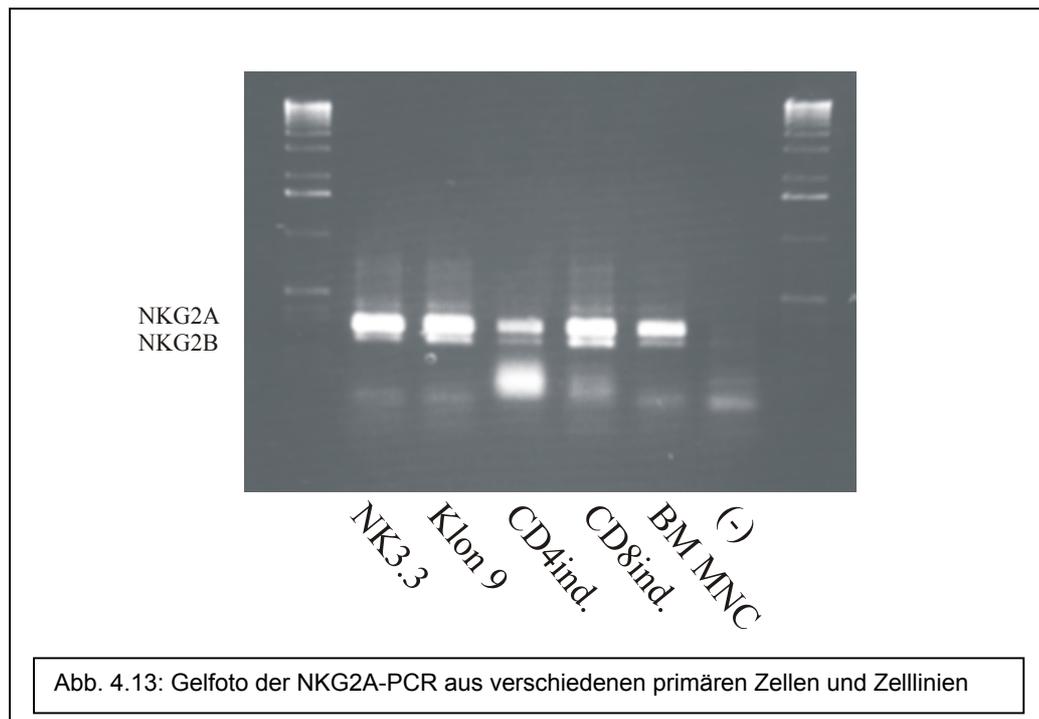
4.2.5 Induktion der NKG2-Spleissvarianten im Rahmen der NK-Zell-Entwicklung

Neben der Regulation der beiden Transkriptpopulationen gibt es noch einen Mechanismus, der die CD94/NKG2A Expression beeinflussen könnte: das Spleissverhalten von NKG2A, das sowohl im humanen (Plougastel, 1996) als auch im murinen System (Lohwasser, 1999) nachgewiesen werden konnte. Auch NKG2B kann mit CD94 komplexiert auf der Zelloberfläche exprimiert werden (Lazetic, 1996). In reifen, CD94/NKG2A exprimierenden NK- und T-Zellen scheint das Verhältnis von NKG2A und NKG2B immer konstant zu sein (Brostjan, 2002), wobei immer NKG2A über NKG2B dominiert. Doch spielt die Spleissvariante für die Regulation von langen und kurzen Transkripten bzw. während der NK-Zell-Entwicklung eine Rolle?

Aus dem Gelfoto 4.12, welches die Proben aus der vorangegangenen Transkriptanalyse der auf OP-9 differenzierten NK-Zellen zeigt, wird deutlich, dass schon in frühen Phasen der NK-Zell-Differenzierung die Spleissvariante NKG2B auftritt, somit keine Korrelation zwischen Spleissvariante und Transkriptlänge bestehen kann.



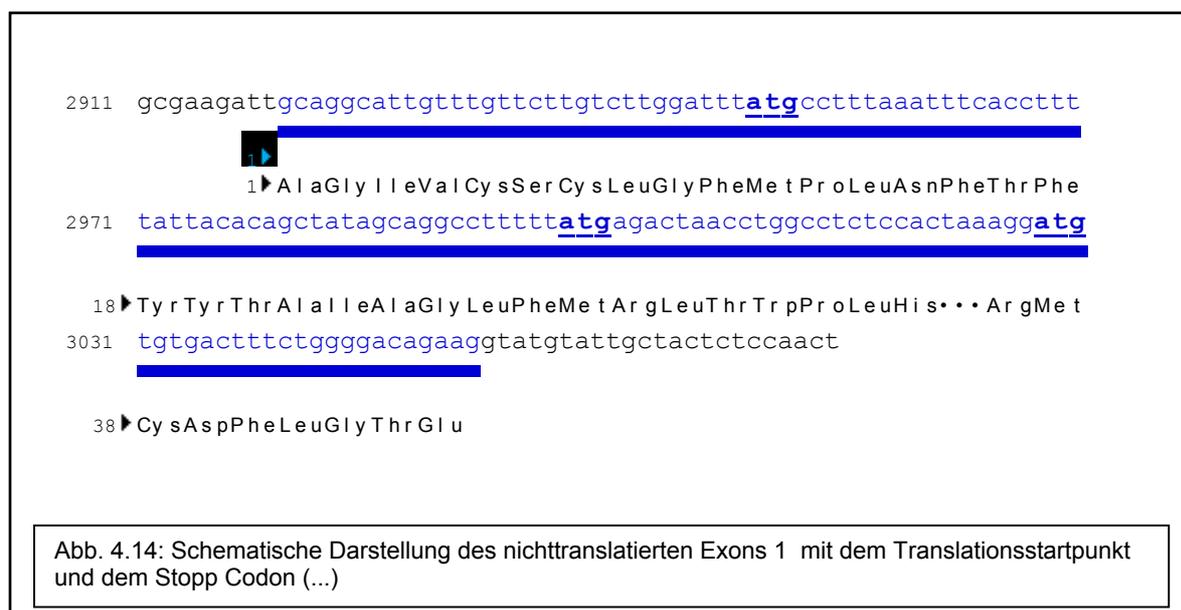
Dies wird durch das Gelfoto 4.13 noch untermauert, welches zeigt, dass in allen NKG2A exprimierenden Zellen und Zelllinien neben NKG2A auch NKG2B Transkript vorliegt. Somit ist die Spleissvariante weder differenzierungs- noch zelltypspezifisch und korreliert auch nicht mit einer der beiden Transkriptpopulationen.



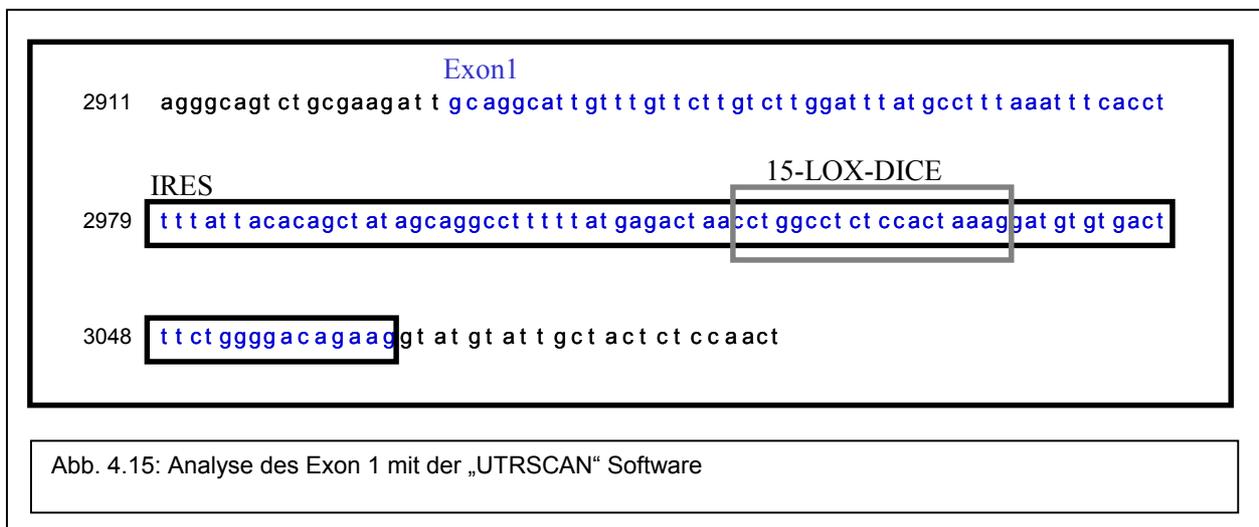
4.2.6 Analyse des 5' UTR des langen Transkriptes

Es konnte für die beiden NKG2A Transkriptpopulationen eine unterschiedliche Regulation durch Zytokine nachgewiesen werden (siehe S. 85). Mögliche Angriffspunkte für die Wirkung der Zytokine kann sowohl die Translation (mRNA) als auch die Transkription (DNA) sein. Während die Frage nach der transkriptionellen Regulation im nächsten Kapitel (4.3 Regulation des NKG2A Promotors) geklärt werden soll, werden hier die Unterschiede der beiden Transkriptpopulationen analysiert werden.

Die Population der langen Transkripte weist, im Gegensatz zu den kurzen Transkripten, in ihrer gespleissten, reifen RNA Form das später nichttranslatierte Exon 1 auf. Die Sequenz kann Ziel weiterer regulatorischer Faktoren sein. Die Analyse des nichttranslatierten Exon 1 mit Hilfe der „Gene Construction Kit“ Software ergab, dass, wenn man den publizierten Startpunkt des Exons 1 als Ausgangspunkt nimmt (Plougastel; 1996), kurz vor dem Exonende ein Stopp Codon die proteincodierende Sequenz unterbrechen würde, wenn diese translatiert werden würde. Der Startpunkt entspricht nicht der Kozak-Sequenz „(A/G)XXATG“ (Kozak, 1999), sondern lautet „AGATTG“, auch die drei darauffolgenden ATGs entsprechen nicht der Konsensussequenz (Abb. 4.14).



Eine Analyse des Exon 1 mit „UTRScan“ weist eine Interne Ribosombindungssequenz (Internal Ribosome Entry Site; IRES) auf sowie eine 15-LOX DICE Sequenz (15-Lipoxygenase Differentiation Control Element; Abb. 4.15). Erstere ermöglicht eine Umgehung konventioneller Transkriptionsinitiation am Ribosom, z.B. in Folge einer Virusinfektion, und ist durch eine Y-förmige, von einer AUG-Sequenz gefolgte, Struktur gekennzeichnet (Le, 1997). Eine 15-LOX DICE Sequenz ist eher für 3' Enden charakteristisch, wo sie in 3 tandemartigen Wiederholungen auftritt und von Proteinen erkannt wird, welche die Translation der mRNA inhibieren (Ostareck-Lederer, 1994).



4.2.7 Zusammenfassung Teil Transkriptanalyse

- Die Transkriptanalysen in Zelllinien ergaben eine Dominanz der kurzen Transkripte in den NK-Zelllinien NKL und NK3.3, während YT eine Dominanz der langen aufwies. Die NKG2A-negative T-Zelllinie Jurkat wies keine Transkripte auf.
- Die Transkriptanalysen in primären NK- und T-Zellen ergaben eine Dominanz der kurzen Transkripte im NKG2A-positiven NK-Zell-Klon 9 und eine Dominanz der langen Transkripte in NKG2A-induzierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.
- Die Regulation der Transkripte in primären NK-Zellen durch Zytokine ergab eine Hochregulation der langen Transkripte durch IL-10. Sowohl IL-15 als auch TGF- β konnte die kurzen Transkripte hochregulieren. Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α zeigten die Tendenz, die langen Transkripte hochzuregulieren, während die kurzen, mit Ausnahme von IL-6, herunterreguliert wurden.
- Die Regulation der Transkripte in primären T-Zellen durch Zytokine zeigte eine Hochregulation der kurzen Transkripte durch TGF- β und die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α , wobei auch die langen Transkripte mit IL-6 und TNF- α tendenziell hochreguliert wurden.
- Die Induktion des NKG2A Gens im Rahmen der NK-Zell-Entwicklung wies eine frühzeitige Dominanz der langen Transkripte auf.
- Für die Induktion der NKG2A Spleissvariante NKG2B im Rahmen der NK-Zell-Entwicklung konnte gezeigt werden, dass NKG2B nicht mit einer der Transkriptpopulationen korreliert und immer zusammen mit NKG2A exprimiert wird.

- Die Analyse des 5' UTR des langen Transkriptes konnte 3 Stopp Codons identifizieren, die zum Translationsabbruch geführt hätten, wenn Exon 1 mittranslatiert worden wäre. Es konnte eine Interne Ribosombindungssequenz (IRES) identifiziert werden, eine 15-LOX DICE Sequenz liegt nur artifiziell vor.

4.3 Regulation des NKG2A Promotors

In einer Publikation, in welcher der clusterartige Aufbau von CD94 und der NKG2-Gene auf dem humanen Chromosom 12 geklärt wurde, wurden mit Hilfe der RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) die 5'-Enden der NKG2A Transkripte charakterisiert. Es wurden zwei Initiationspunkte vor dem Exon 2 und mehrere Punkte, verteilt auf einen Bereich vor dem nichttranslatierten Exon 1, gefunden. Dies lässt vermuten, dass es zwei Promotoren gibt, von denen jeweils die langen Transkripte (5' vor Exon 1) und die kurzen Transkripte (5' vor Exon 2) initiiert werden. Eine anschließende Transkriptionsfaktor Analyse zeigte sowohl für den distalen als auch den proximalen Promotorbereich mögliche Bindungssequenzen für TCF-1, GATA-1 und NF-IL6 an, während eine TATA-Box nur im proximalen Bereich zu finden war (Plougastel, 1998). In einer späteren Publikation wurden die Promotorbereiche der NKG2-Familienmitglieder NKG2A, NKG2C/E und NKG2F miteinander verglichen. Vor allem in dieser Familie vorhandene Alu-Sequenzen wiesen unter anderem Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen für AP-1, C/EBP, GATA-1, LyF-1, Sp-1, TCF-1 und Retinsäure-Rezeptorelemente (retinoic acid receptor respose element, RARE) auf. Hier wird bereits die Wichtigkeit der Alu-Sequenz für mögliche Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen und ein möglicher Einfluss auf die Position von Nucleosomen in diesem Bereich (5' vor Exon 2) deutlich (Brostjan, 2000).

Für den mit NKG2A-assoziierten Rezeptor CD94 konnten Promotorstudien zeigen, dass hier ein duales Promotorsystem vorliegt, wobei der proximale Promotor konstitutiver Art ist, und der distale Promotor durch Zytokine wie IL-2 und IL-15 aktiviert werden kann. Während frische NK- und T-Zellen vom proximalen Promotor CD94 mRNA transkribieren, führt eine Kultivierung mit diesen Zytokinen zur Produktion von CD94C mRNA, die ähnlich dem NKG2A Gen ein nichttranslatiertes Exon beinhaltet. Es konnte eine Zelltyp-Spezifität gezeigt werden, wobei die Promotorfragmente zwar in den NK-Zelllinien YT-Indy und NKL Aktivität aufweisen konnten, nicht jedoch in der T-Zelllinie Jurkat. Als möglicher Regulator wurde ein Element (GAS/EBS) identifiziert, welches aus einer IFN- γ -aktivierten- (gamma inferferon activated sequence) und einer ETS-Bindungssequenz besteht und ein konserviertes Element im humanen und murinen CD94 zu sein scheint (Lieto, 2003).

4.3.1 Proximaler Promotor – Längenfragmente

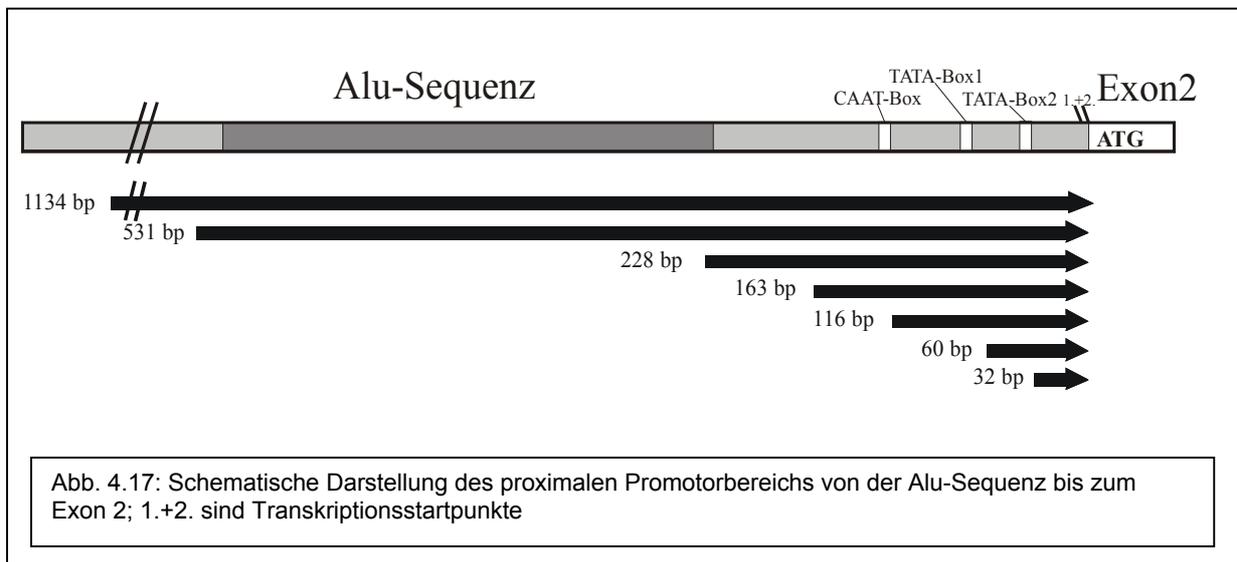
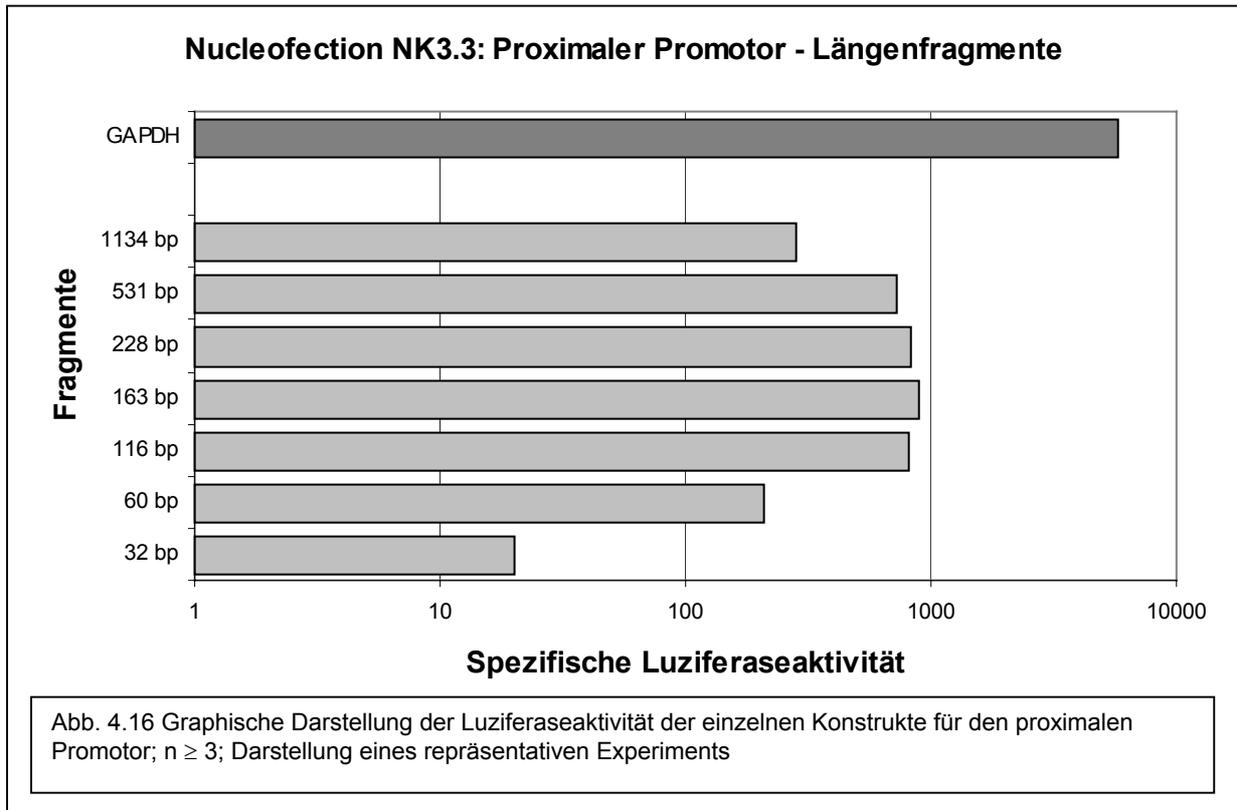
Für die Promotoranalysen wurden lange Promotorkonstrukte erstellt und diejenigen, die im Vergleich zu anderen Fragmenten erhöhte Luziferaseaktivität aufwiesen, wurden sukzessiv verkürzt, um die Minimalpromotoren zu identifizieren. Hatte man die für die Aktivität verantwortlichen Sequenzen so eingegrenzt, wurden anhand von Transkriptionsfaktor Analysen Fragmente erstellt, in denen die Konsensussequenzen der Faktoren deletiert bzw. mutiert worden sind.

Zur Analyse des proximalen Promotors wurden Fragmente erstellt, die über den unmittelbaren Bereich vor dem Exon 1 hinaus, die Alu-Sequenz einschließend, bis 1134 bp stromaufwärts reichen.

Eine Transkriptionsfaktor Analyse des proximalen Promotors weist Elemente eines klassischen Promotors wie CAAT- und TATA-Boxen auf (Plougastel, 1998; Abb. 4.17). Eine sukzessive Verkürzung der Fragmente, angefangen bei dem 1134 bp Fragment, das über die Alu-Sequenz hinaus ging, ergab eine erhöhte Luziferaseaktivität für die Fragmente bis zu 116 bp (Abb. 4.16), während eine Verkürzung auf 60 bp eine erhebliche Aktivitätsminderung zur Folge hatte, die sich durch abermalige Verkürzung auf 32 bp fortsetzte.

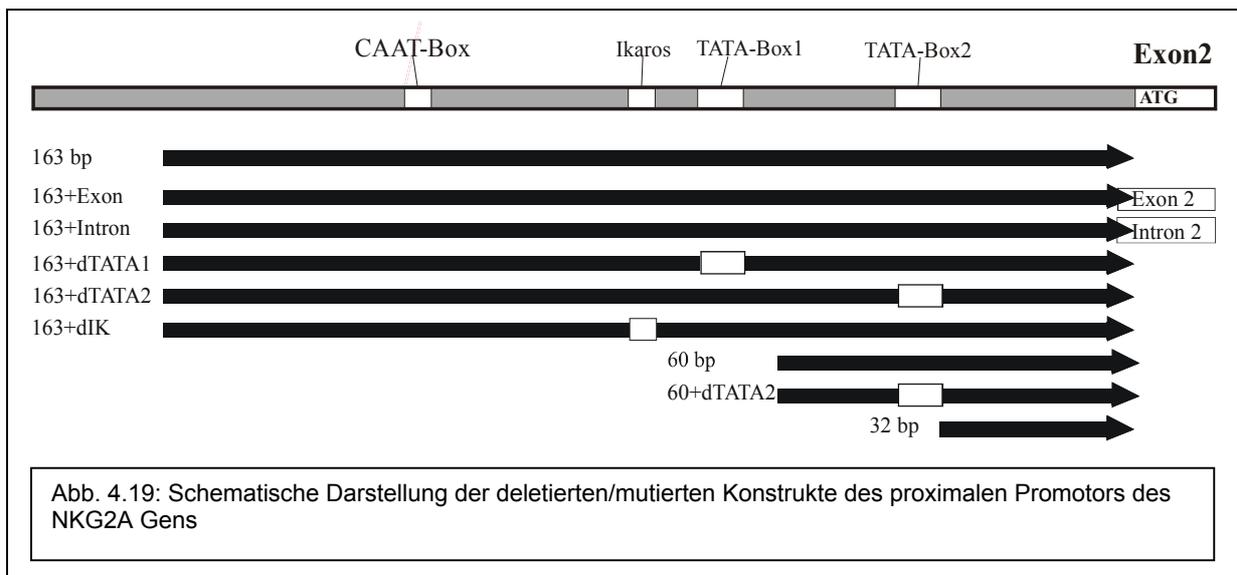
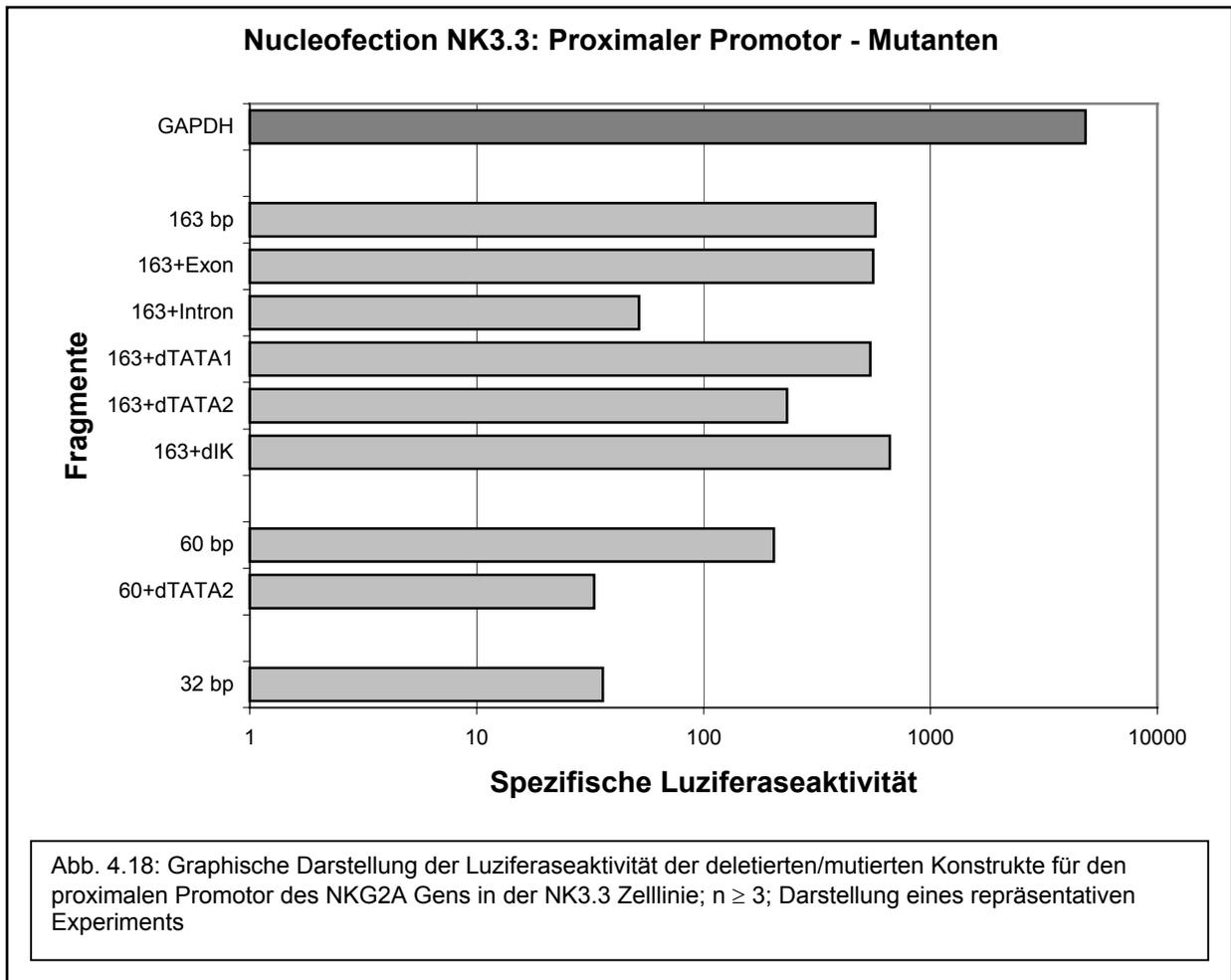
Der Vergleich zwischen dem 531 bp und 228 bp Fragment zeigt, dass die Anwesenheit der Alu-Sequenz keinen direkten Einfluss auf die Luziferaseaktivität dieser Basisfragmente hat.

Obwohl eine CAAT-Box vorhanden ist, hat sie keine Auswirkungen auf die Promotoraktivität, da das 163 bp vergleichbar mit dem 116 bp Fragment läuft, welches erst nach der CAAT-Box beginnt.



4.3.1.1 Proximaler Promotor – Mutanten

Da das 163 bp Fragment maximale Luziferaseaktivität aufwies, wurde es als Basis für Mutationen verwendet, um spezifische Sequenzmotive auszuschalten (Abb. 4.19). Eine Verlängerung des 163 bp Fragmentes bis zum Ende des zweiten Exons, wobei das ATG des Exons mutiert wurde (Exon2), um ein Hybrid-Protein aus Promotorsequenz und Luziferaseprotein zu verhindern, führte zu keiner nennenswerten Aktivitätsänderung. Wurde jedoch die Sequenz aus dem nachfolgenden Intron (Intron 2) an das 163 bp Fragment gehängt, führte dies zu einem dramatischen Aktivitätsverlust (Abb. 4.18). Für den proximalen Promotor wurde eine TATA-Box beschrieben (Plougastel; 1998; TATA-Box 1, Abb. 4.19), die der Konsensussequenz „TATAAAA“ entsprach, aber bei der Luziferasemessung des mutierten Fragmentes (dTATA-Box 1) keine Aktivitätsreduktion zeigte. Eine andere Sequenz, die nicht der Konsensussequenz entsprach (TATA-Box 2), wurde ebenfalls mutiert und zeigte sowohl im 163 bp Fragment als auch auf Basis des 60 bp Fragments eine Verringerung der Luziferaseaktivität. Eine Mutation einer Ikaros-Sequenz (dlk) führte zu keiner nennenswerten Aktivitätsreduktion (Abb. 4.18).



4.3.1.2 Transkriptionsfaktor Analyse: proximaler Promotor

Eine Transkriptionsfaktor Analyse dieses Genabschnitts mit Hilfe der „TF-Search Version 1.3“ ergab für diesen Sequenzabschnitt ab dem 163 bp Fragment folgendes Bild (Abb. 4.20; modifiziert): Der für die Promotoraktivität essentielle Bereich zwischen dem 116 bp Fragment und dem 60 bp Fragment, welches schon eine deutliche Reduktion der Aktivität aufweist, zeigt von der Wahrscheinlichkeit (score) und den zu erwartenden Transkriptionsfaktoren keine Kandidaten, die für dieses Promotorverhalten verantwortlich gemacht werden könnten.

Transkriptionsfaktor Analyse:

Proximaler Promotor

```
** TFSEARCH ver.1.3 **      (c)1995 Yutaka Akiyama (Kyoto Univ.)
This simple routine searches highly correlated sequence fragments
versus TFMATRIX transcription factor binding site profile database
by E.Wingender, R.Knueppel, P.Dietze, H.Karas (GBF-Braunschweig).
```

```
Database: TRANSFAC MATRIX TABLE, Rel.3.3 06-01-1998
Query:    163 bp proximaler Promoter NKG2A (163 bases)
Taxonomy: Vertebrate
```

TFMATRIX entries with High-scoring:

163 bp		CAAT-Box*116 bp		entry	score
1	<u>ATCAGAGAAA</u> GAACTTTAGA TTATTTAATG CAAAATGAGC <u>TCCAATACTC</u>			<u>M00095</u> CDP	85.2
	STAT	Ikaros	TATA-Box1*		
51	<u>GTTCTCCACC</u> TCACCCTTTT AATTGCACTA <u>GGGAATCCTG</u> <u>TATATAAACC</u>			entry	score
	<-----			<u>M00271</u> AML-1a	88.7
		----->		<u>M00241</u> Nkx-2.	88.2
			<-----	<u>M00101</u> CdxA	87.9
			----->	<u>M00087</u> Ik-2	87.3
	----->			<u>M00073</u> deltaE	86.4
			-----	<u>M00252</u> TATA	86.2
			<-----	<u>M00129</u> HFH-1	86.2
				<u>M00133</u> Tst-1	85.4
				<u>M00099</u> S8	85.3
	-->			<u>M00095</u> CDP	85.2
	60 bp STAT TATA#	TATA-Box2	32 bp		
101	ATTTATTAAC <u>TTCTTAACTA</u> CTGTTATTAT <u>AGAGTACAGT</u> CCCTGACATC			entry	score
	----->			<u>M00101</u> CdxA	91.4
				<u>M00101</u> CdxA	90.0
			-----	<u>M00041</u> CRE-BP	87.8
	---->			<u>M00252</u> TATA	86.2
	---			<u>M00129</u> HFH-1	86.2
			-----	<u>M00039</u> CREB	86.1
			<-----	<u>M00003</u> v-Myb	85.3

```
* Plougastel 1998
# Brostjan 2000
Konsensussequenzen (Lewin B., 2002)
TATA-Box : TATAAAA
CAAT-Box : GGCCAATCT
STAT: TTCT
```

Abb. 4.20: Transkriptionsfaktor Analyse (modifiziert) – proximaler Promotor

Durch Deletionsmutanten wurden sowohl die Ikaros Bindungssequenz als auch die TATA-Box 1 ausgeschaltet und mit ihnen mögliche andere Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen (CdxA, HFH-1). Potentiell könnten hier AML-1a und die STAT-Proteine, die in Gegenrichtung bzw. auf dem 3' Strang binden, ihre Wirkung entfalten. Einzige, hier experimentell nachgewiesen, wichtige Sequenz ist die TATA-Box 2, die sowohl als Deletion im 163 bp als auch im 60 bp Fragment eine Aktivitätsreduktion zur Folge hatte. Dies lässt den Schluss zu, dass der proximale Promotor TATA-Box-abhängig arbeitet.

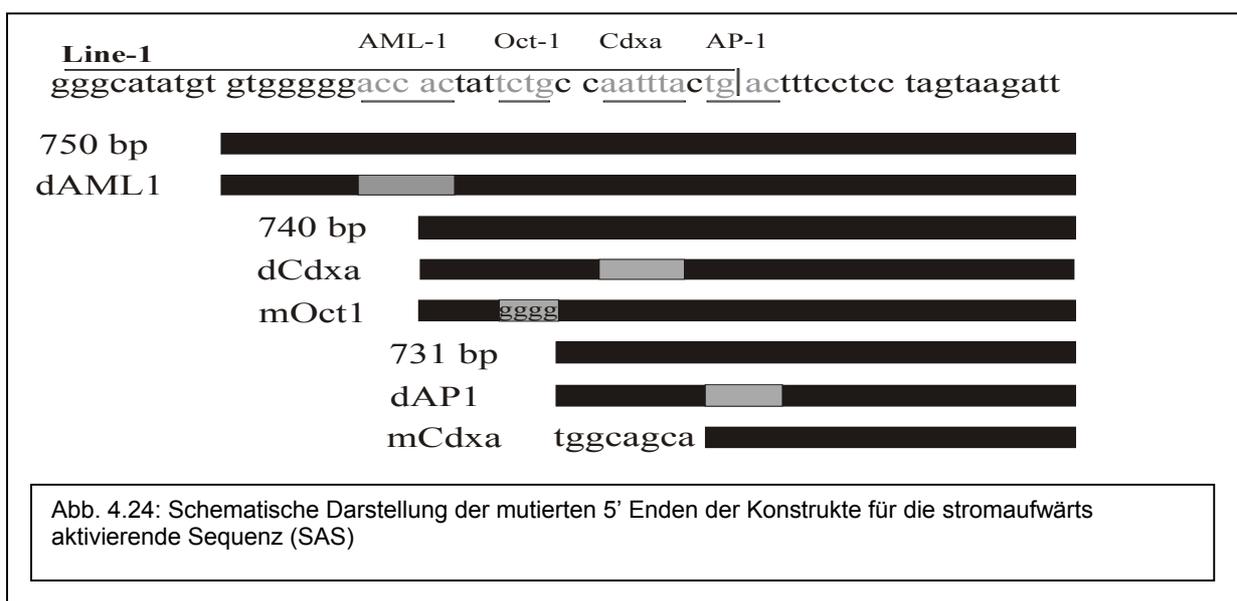
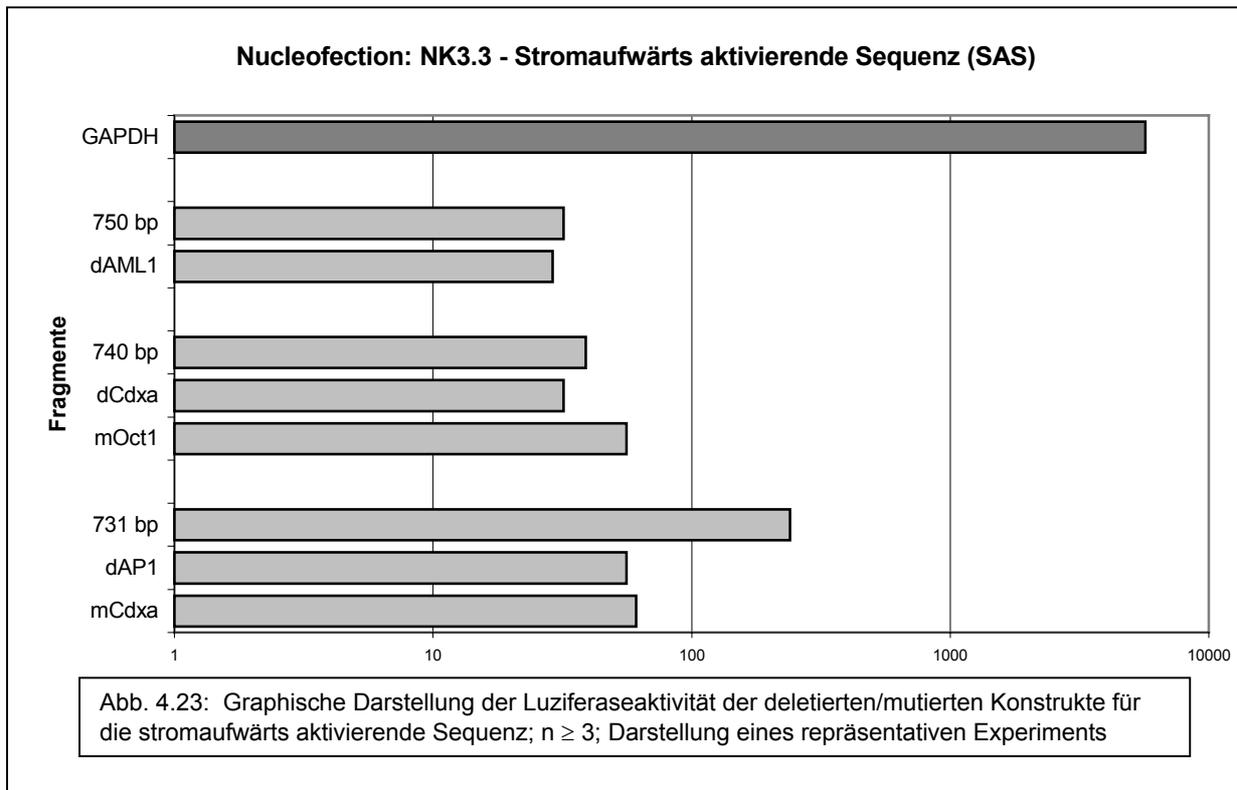
4.3.2 Distaler Promotorbereich – Längenfragmente

Aufgrund der Transkriptanalyse, die zwei Transkriptpopulationen charakterisieren konnte, wurde vermutet, dass ein zweiter Promotor sich im Bereich vor dem Exon 1 erstrecken muss (Plougastel, 1998). Folglich wurden also ebenfalls längere Fragmente für diesen Bereich erstellt, um durch fortgesetzte Verkürzungen den Promotorbereich zu identifizieren.

Der distale Promotor ist kein scharf abgegrenzter Promotor im klassischen Sinn, sondern ein Bereich mit unterschiedlicher Promotoraktivität. Sukzessive Verkürzungen eines 1215 bp Fragments, das nur geringe Luziferaseaktivität aufwies (Abb. 4.21), führte zur Identifizierung von zwei Teilbereichen: Einem 731 bp Fragment, das als stromaufwärts aktivierende Sequenz (SAS; Abb. 4.22) angesprochen werden kann, und dem Promotorbereich (269 bp) im engeren Sinne. Das 731 bp Fragment verliert seine Fähigkeit, sobald es nicht den distalen Promoterbereich miteinschließt (534 bp). Sowohl eine Verlängerung (740 bp) als auch eine Verkürzung (715 bp) haben eine Reduktion der Luziferaseaktivität zur Folge.

4.3.3 Stromaufwärts aktivierende Sequenz (SAS)

Eine genauere Analyse der stromaufwärts aktivierenden Sequenz (SAS) des 731 bp Fragments ergab, dass eine Verlängerung auf 750 bp bzw. 740 bp einen Verlust der Luziferaseaktivität zur Folge hatte (Abb. 4.23). Für das 750 bp Fragment wurde eine AML-1 Sequenz deletiert (dAML1), die aber keine Aktivitätsänderung brachte. Auch eine Deletion einer Cdxα Sequenz (dCdxα) sowie eine Mutation einer Oct-1 Sequenz im 740 bp Fragment konnte diese Inhibition nicht verhindern.



Für das 731 bp Fragment ergab sich die Kernsequenz „TGAC“ als essentiell für die aktivierende Funktion des Fragments. Eine Deletion (dAP1) sowie ein Austausch (mCdxA) des 5' Bereichs bis zu dieser Kernsequenz durch eine beliebige Sequenz vor einem „TGAC“ dieses Genabschnitts führte zu einer erheblichen Aktivitätsreduktion des 731 bp Fragments (Abb.4.24).

4.3.3.1 Transkriptionsfaktor Analyse: Stromaufwärts aktivierende Sequenz (SAS)

Eine Transkriptionsfaktor Analyse der stromaufwärts aktivierenden Sequenz (SAS) (Abb. 4.25) ergab als mögliche aktivatorisch wirkende Faktoren c-Rel, NF-kappaB, CdxA, S8 und AP-1 sie alle umschließen mehr oder weniger die zentrale „TGAC“ Sequenz. Als mögliche Inhibitoren wurden eine GATA-3 Sequenz und eine C/EBPA-Bindungssequenz aufgelistet.

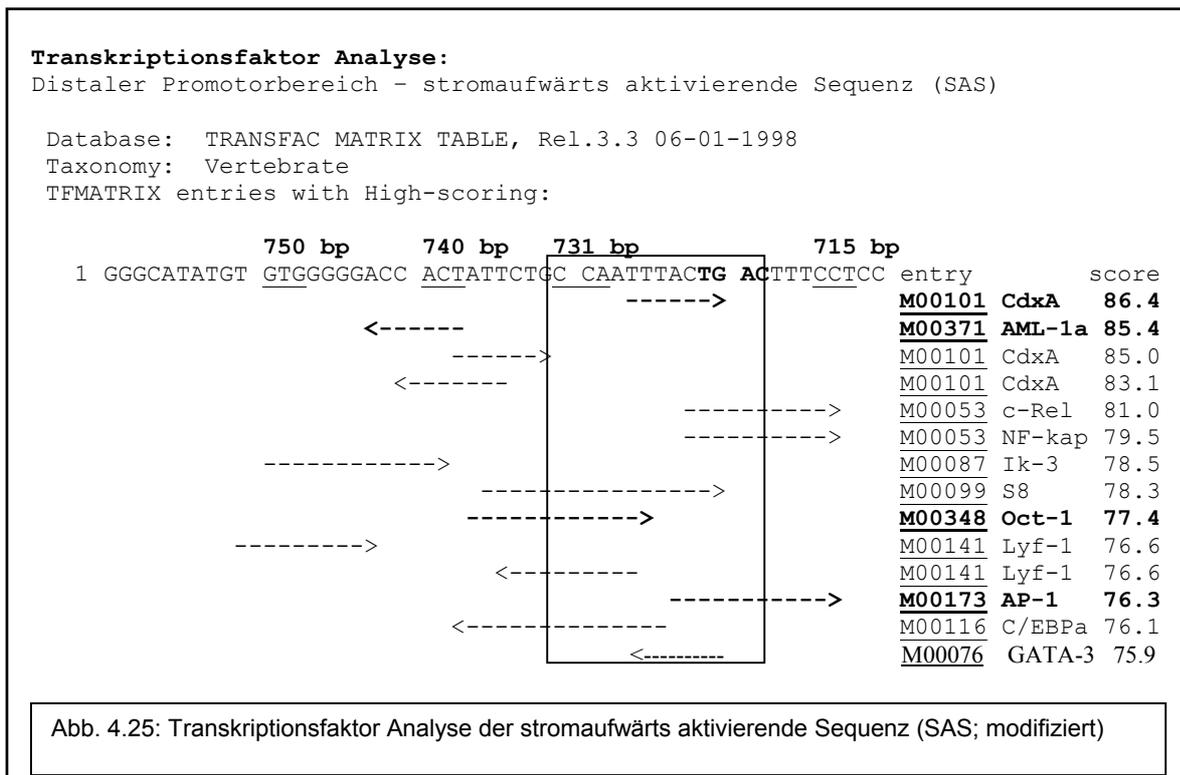
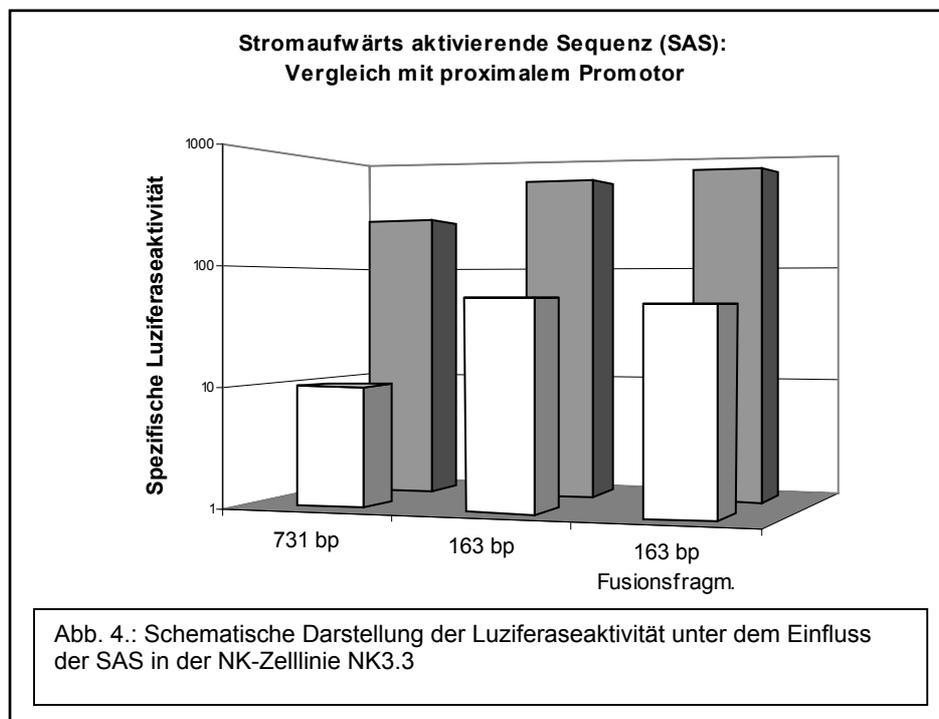


Abb. 4.25: Transkriptionsfaktor Analyse der stromaufwärts aktivierende Sequenz (SAS; modifiziert)

4.3.3.2 Ist die stromaufwärts aktivierende Sequenz (SAS) ein klassischer Enhancer?

Ob es sich bei der stromaufwärts aktivierenden Sequenz (SAS) um einen echten Enhancer handelt, und welche möglichen Auswirkungen dies auf den proximalen Promotor haben könnte, wurde durch ein Fusionsfragment geklärt, das die 5' Primersequenz des 731 bp Fragments (23 bp) mit der 5' Sequenz des 164 bp Fragments kombinierte. Abbildung 3.26 zeigt, dass das Vorhandensein der stromaufwärts aktivierenden Sequenz (SAS) im 163 bp Fragment gar keine bis minimale Änderung der Luziferaseaktivität zur Folge hatte.



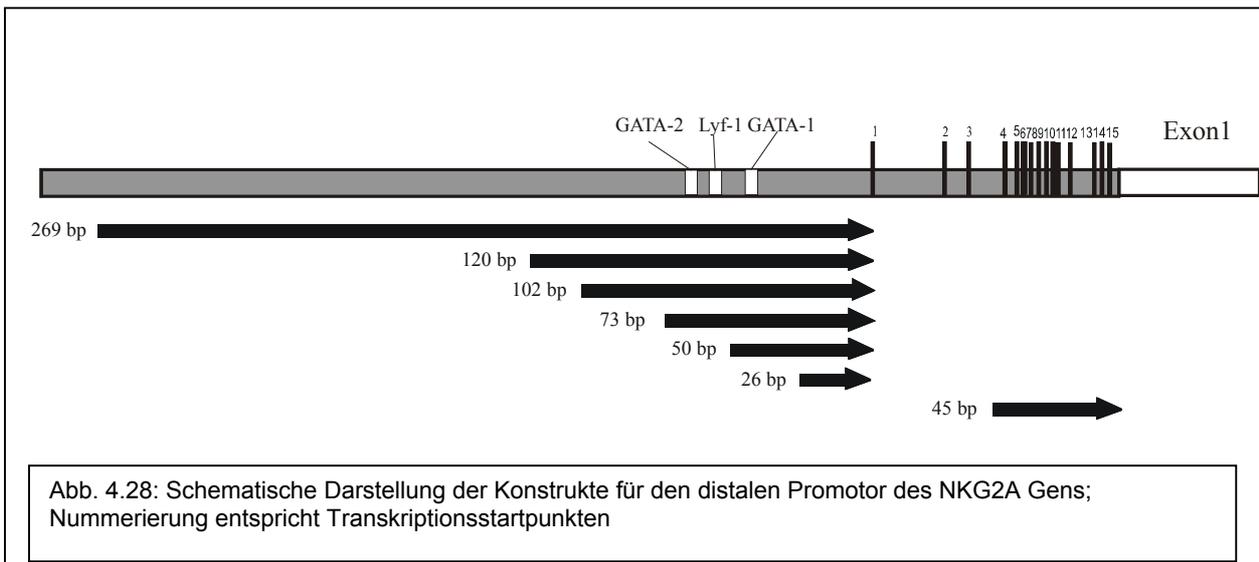
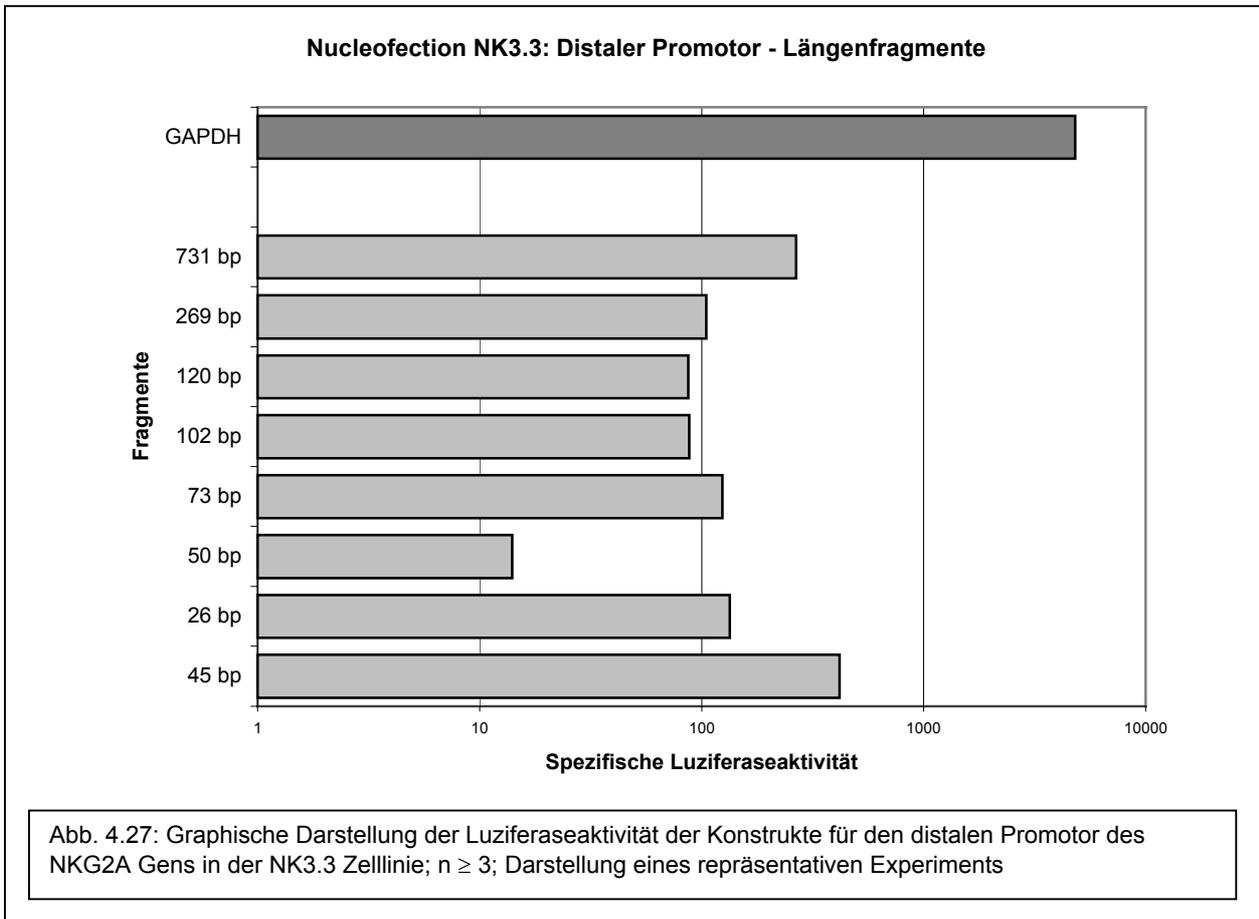
4.3.4 Distaler Promotor - Längenfragmente

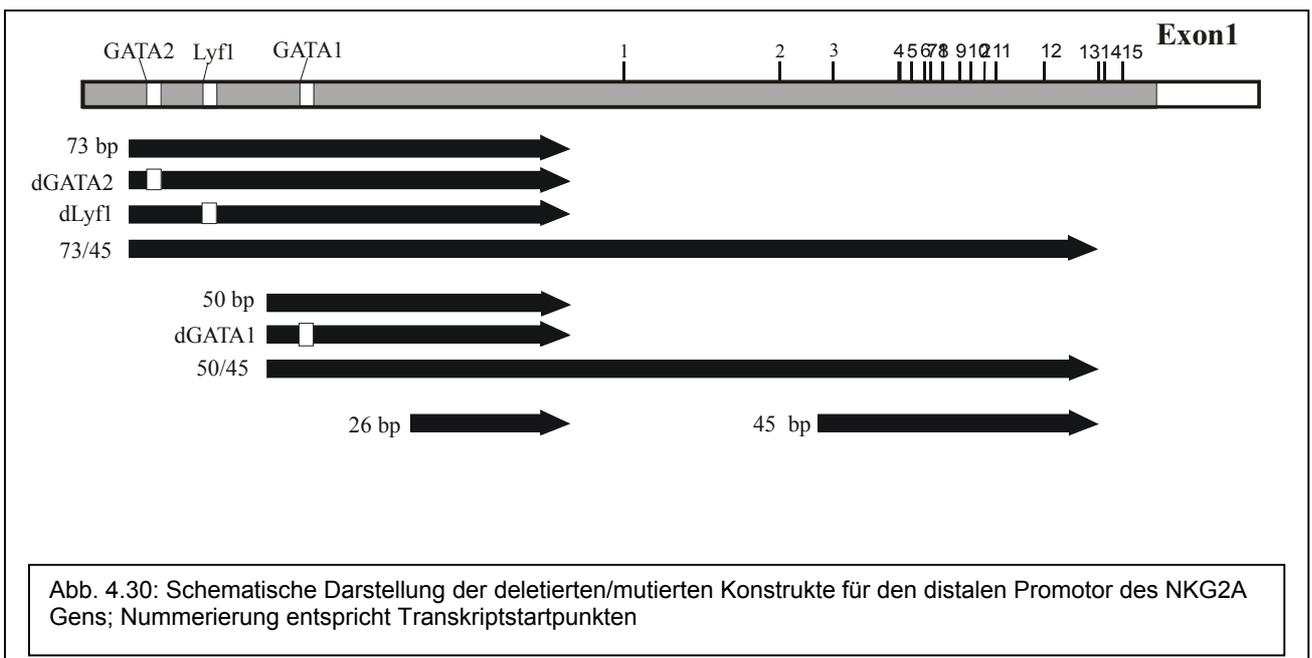
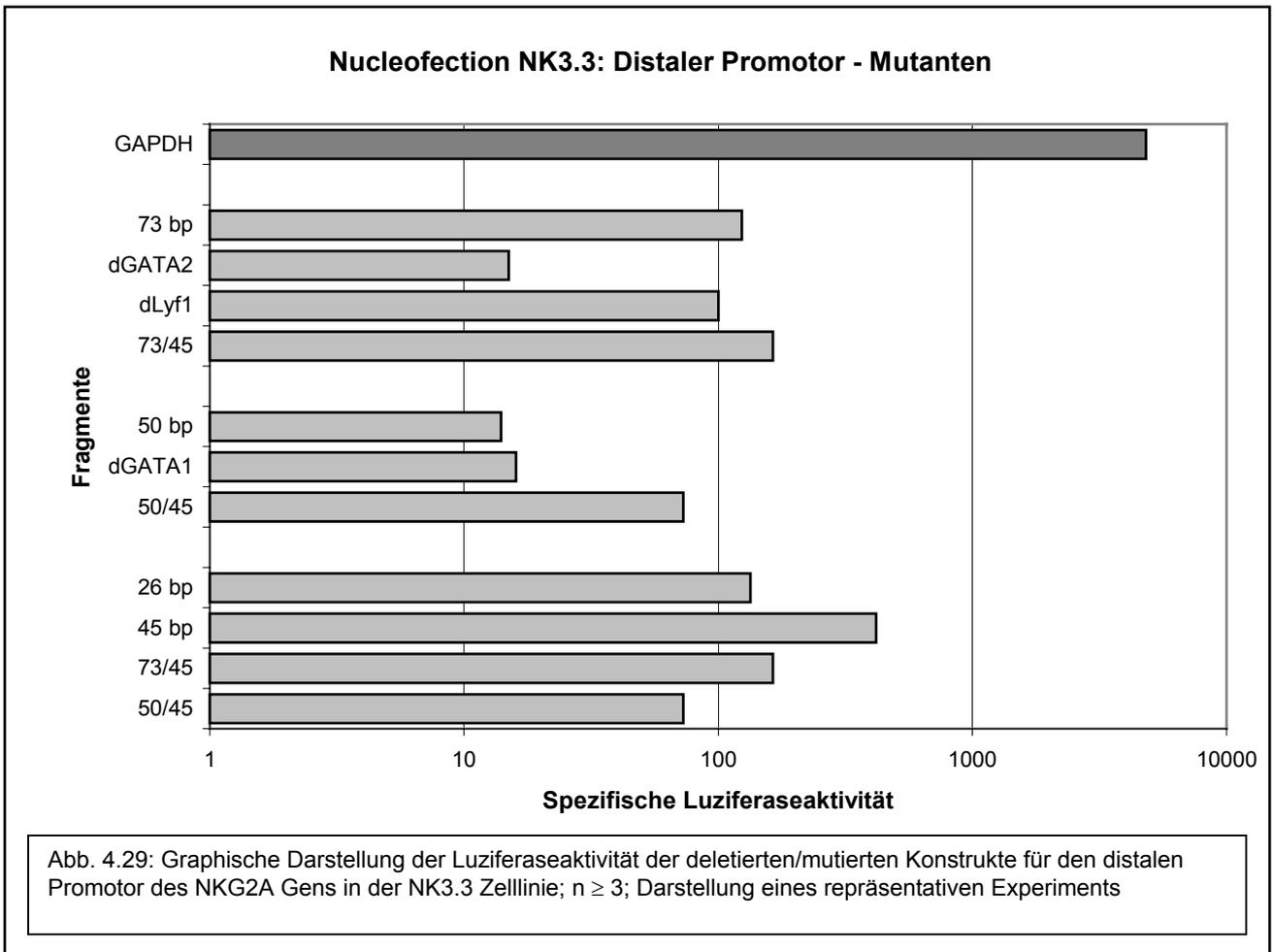
Basierend auf den Daten für das 731 bp Fragment wurden Fragmentverkürzungen durchgeführt, die zur Charakterisierung des distalen Promoters führten, der keine klassischen Promotorelemente wie CAAT-Box oder TATA-Box aufweist (Abb. 4.28). Das 269 bp Fragment zeigte relativ schwache Aktivität (Abb. 4.27). Eine weitere Fragmentverkürzung führte zu geringfügigem Aktivitätsverlust (130 bp und 103 bp), während ein 73 bp eine Erhöhung aufwies. Das 50 bp Fragment zeigte eine erhebliche Reduktion der Luziferaseaktivität, während eine weitere Verkürzung auf 26 bp die Promotoraktivität wiederherstellte. Es wurde noch ein weiteres Fragment getestet, das weiter stromabwärts liegt und direkt vor der codierenden Sequenz des Exon 1 beginnt, um zu testen, ob sich der Bereich mit Promotoraktivität bis zum Exon 1 erstreckt. In diesem Bereich liegen viele Transkriptionsinitiationsstellen. Dieses 45 bp lange Fragment weist maximale Luziferaseaktivität auf - sogar höher als das, die stromaufwärts aktivierende Sequenz beinhaltende, 731 bp Fragment.

4.3.4.1 Distaler Promotor – Mutanten

Wie Abbildung 4.30 zeigt, konnte für das 73 bp Fragment eine GATA2 Sequenz identifiziert werden, deren Deletion (dGATA2) einen erheblichen Aktivitätsverlust zur Folge hatte, während die Deletion einer Lyf-1/Ikaros Sequenz (dLyf1) nur geringe Auswirkungen hatte (Abb. 4.29). Eine Deletion im Bereich einer GATA1 Sequenz (dGATA1) konnte die Inhibition der Luziferaseaktivität im 50 bp Fragment nicht aufheben. Verlängerte man aber sowohl das 73 bp als auch das 50 bp Fragment über das 26 bp Fragment hinaus bis zum 3' Ende des 45 bp Fragments, welches die Transkriptionsinitiationsstellen vor Exon 1 beinhaltet und maximale Luziferaseaktivität zeigte, so hatte dies nur eine leichte Luziferaseerhöhung beim 73 bp, aber eine erhebliche Aktivitätserhöhung des 50 bp Fragments zur Folge. Diese Aktivitäten bleiben aber immer noch hinter dem eigentlichen 45 bp Fragment zurück.

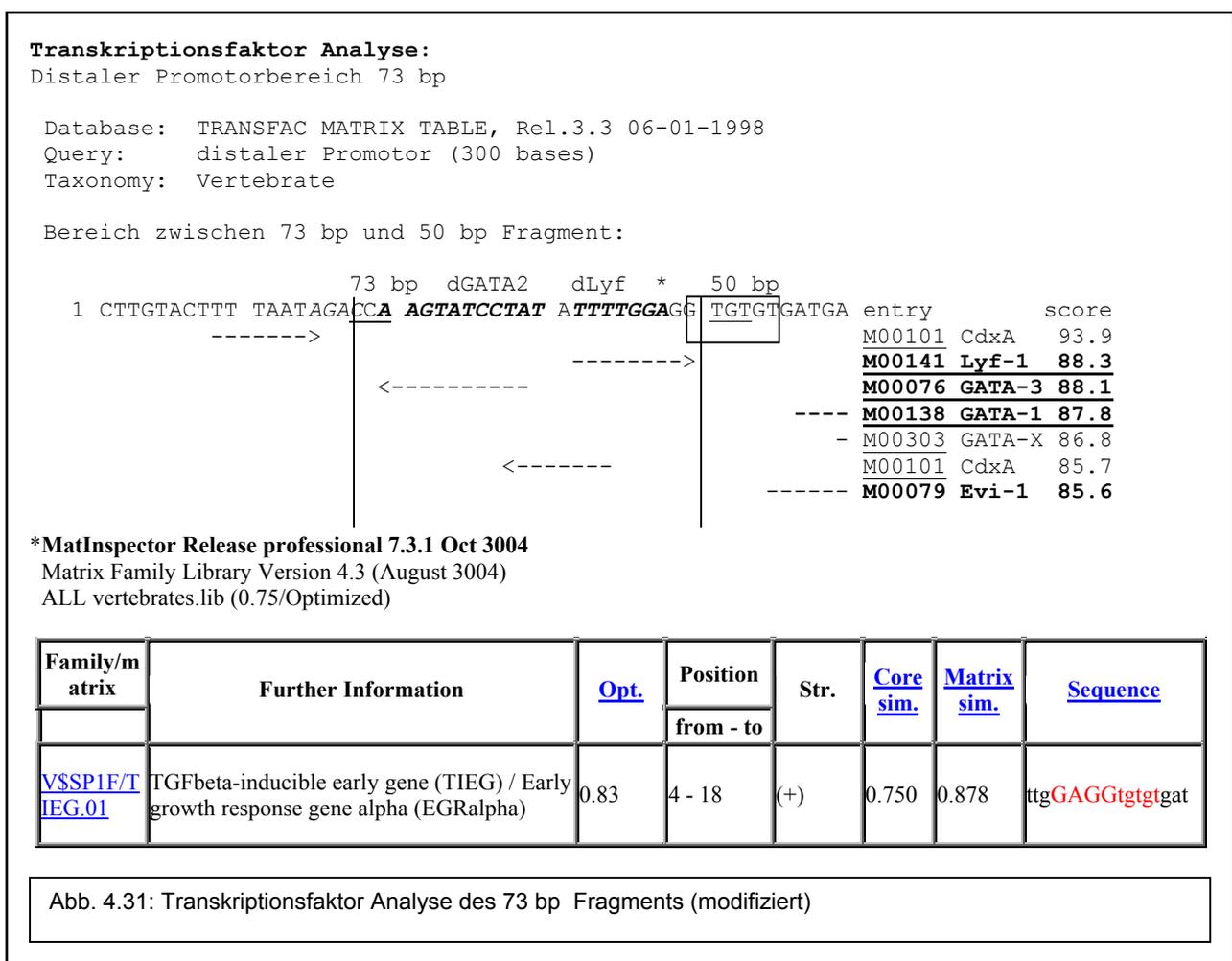
Da die Verlängerung des 26 bp Fragments auf 50 bp zum Aktivitätsverlust führt, scheint hier ein Silencer lokalisiert zu sein. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass das 73 bp Fragment über eine GATA2 Bindungsstelle den Aktivitätsverlust kompensieren kann.





4.3.4.2 Transkriptionsfaktor Analyse: distaler Promotor

Eine Transkriptionsfaktor Analyse dieses Genabschnitts ergab für den Sequenzabschnitt zwischen 50 bp und 26 bp Fragment als mögliche Inhibitoren AML-1a, C/EBP („caat-bindenes Protein“) und den Faktor Evi-1 („evi“) sowie als Aktivator eine Ansammlung ineinanderübergehender möglicher GATA-Faktor-Bindungsstellen. Es konnte mit Hilfe des „MatInspector“ Programms (Release professional 7.3.1) im Bereich der Lyf-1 Sequenz ein Regulationselement identifiziert werden, welches auf Stimulation mit TGF-β reagieren könnte. Für das 26 bp Fragment ergaben sich mögliche Bindungsstellen für die Faktoren CdxA, USF, NF-kappaB, N-Myc und c-Rel. Die Sequenz des 45 bp Fragments weist eine Bindungsstelle für AP-1 auf (Abb. 4.31; 4.32).



Transkriptionsfaktor Analyse:

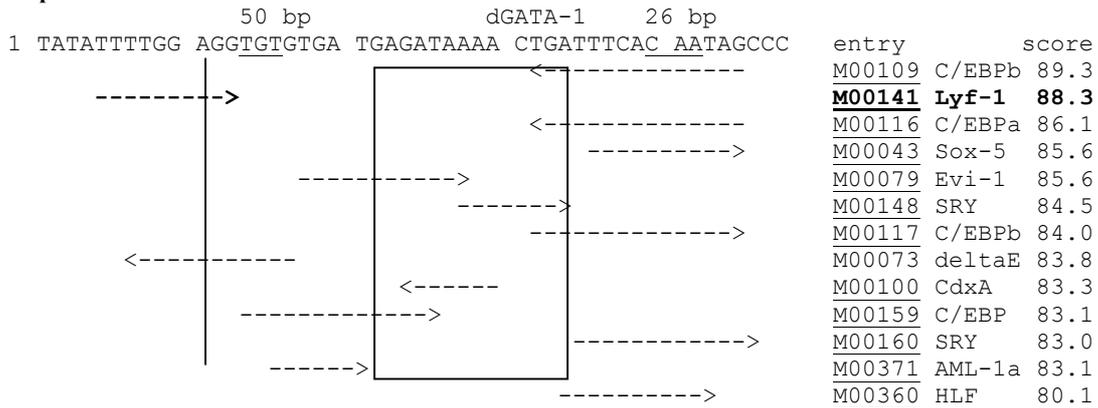
Distaler Promotor-Bereich: 50 bp bis 26 bp, 26 bp und 45 bp Fragment

Database: TRANSFAC MATRIX TABLE, Rel.3.3 06-01-1998

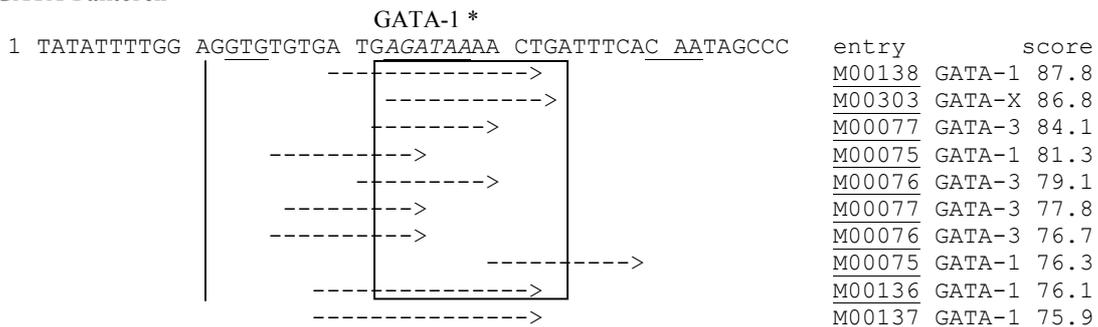
Taxonomy: Vertebrate

TFMATRIX entries with High-scoring:

A) 50 bp - Inhibitor



B) GATA-Faktoren



* Plougastel 1998

C) 26 bp Fragment



D) 45 bp Fragment

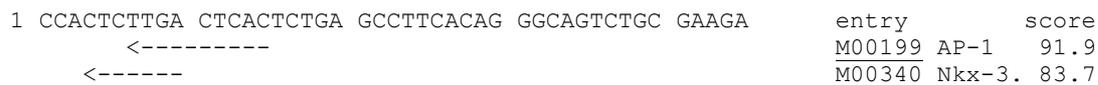
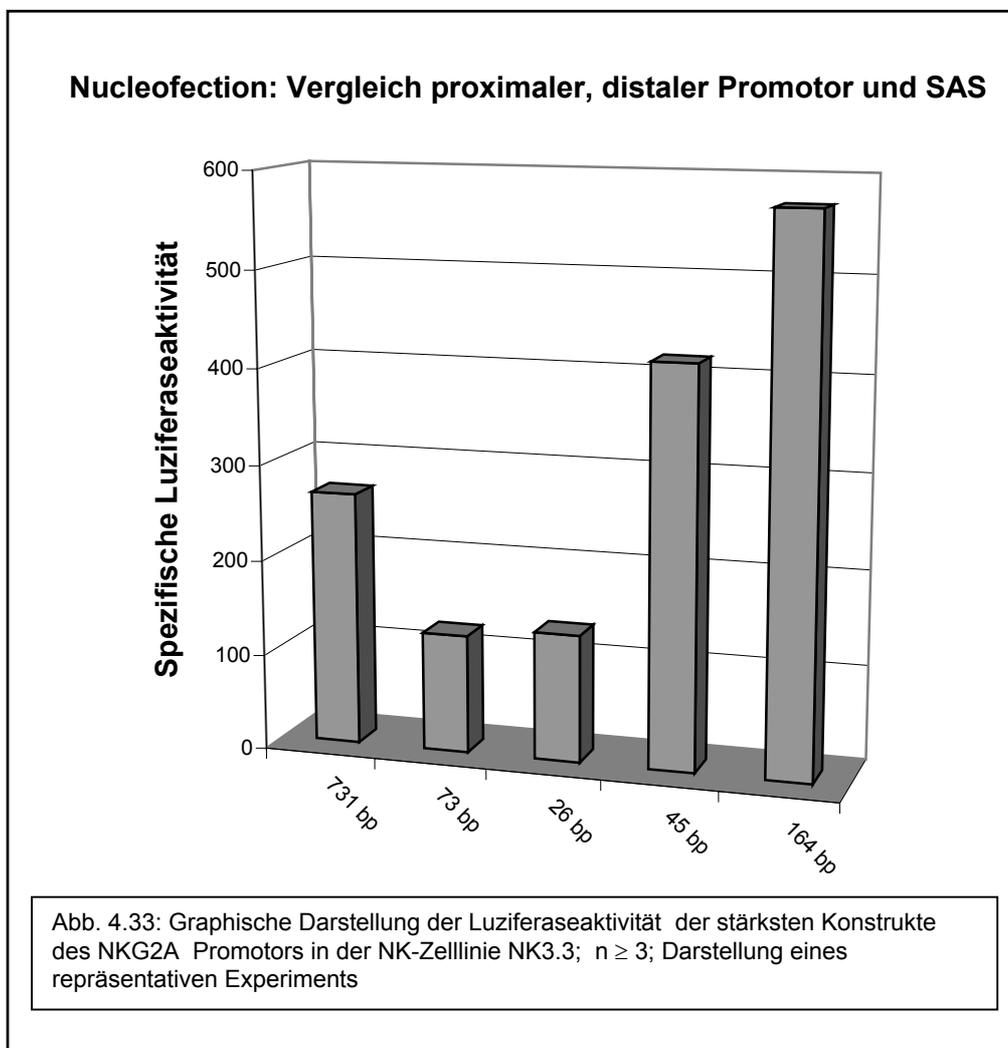


Abb. 4.32: Transkriptionsfaktor Analyse: 5' Ende 50 bp Fragment, 26 bp und 45 bp Fragment (modifiziert)

4.3.5 Vergleich proximaler – distaler Promotor

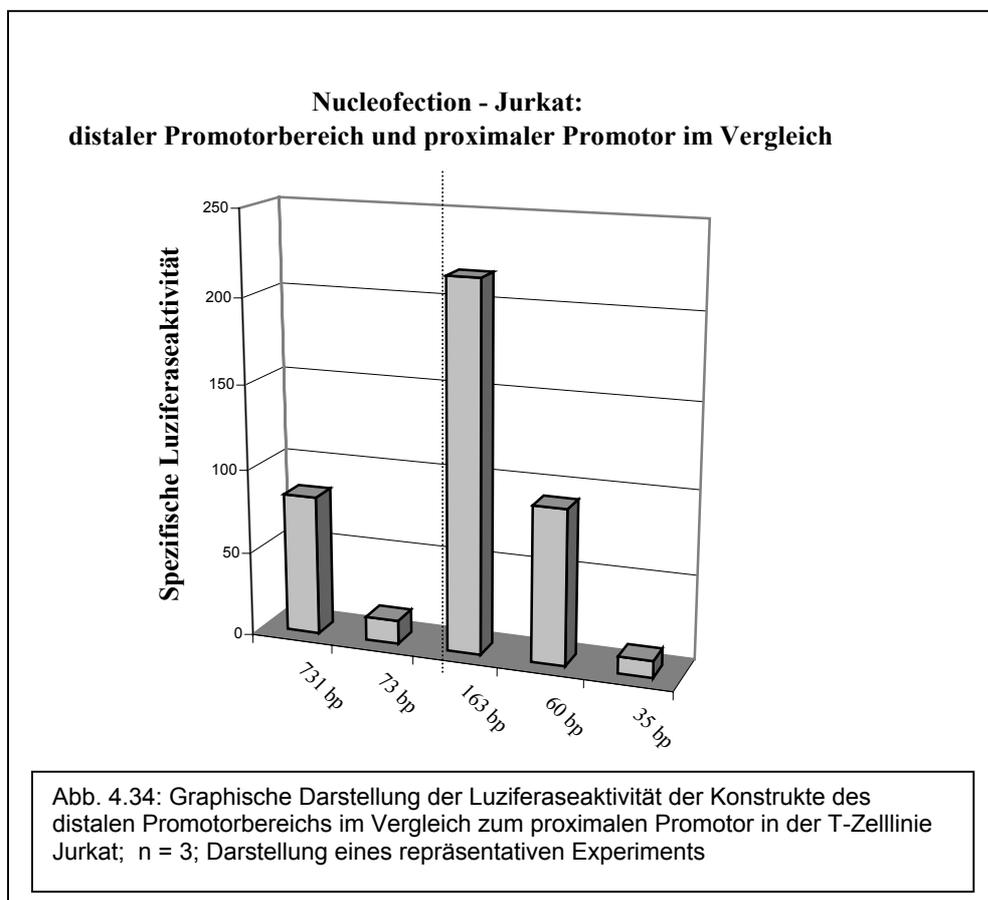
Ein Vergleich der Promotorstärken des distalen Promotorbereichs mit dem proximalen Promotor (Abb. 4.33) zeigt, dass der proximale Promotor die höchste Luziferaseaktivität aufweist. Verhältnismäßig stark ist auch noch das 45 bp Fragment des distalen Promotorbereichs, wohingegen das 73 bp und 26 bp Fragment zwar schwache, aber nennenswerte Aktivitäten hatten, die durch die stromaufwärts aktivierende Sequenz (SAS) des 731 bp Fragmentes noch gesteigert werden konnten. Der proximale Promotor hat somit eine höhere Aktivitätsstärke als der distale Promotor, auch die SAS im 731 bp Fragment kann diesen Unterschied nicht kompensieren.

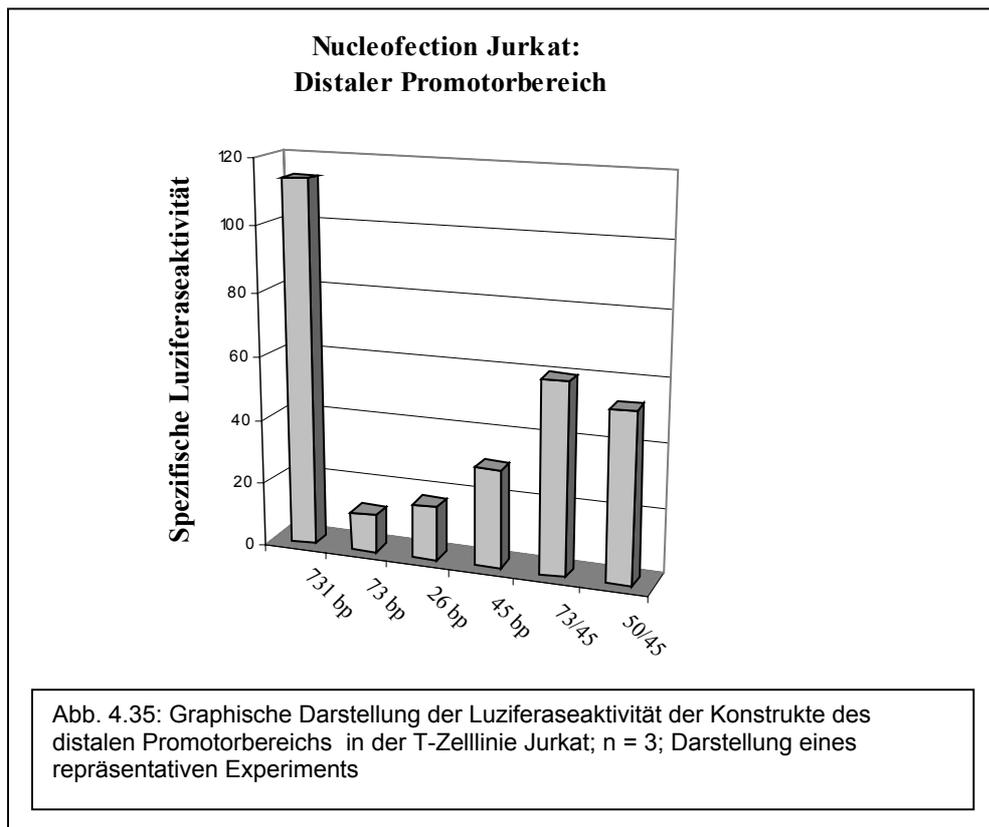


4.3.5.1 Nucleofection - Jurkat

Da die Transkriptanalyse gezeigt hat, dass in T-Zellen die langen Transkripte dominieren, wurden ausgewählte Konstrukte in der NKG2A-negativen T-Zelllinie Jurkat (siehe Transkriptanalyse, S. 81) getestet. Wie aus Abbildung 4.34 deutlich wird, zeigt sich das von NK3.3 bekannte Aktivitätsmuster. Während das 163 bp Fragment die höchste Luziferaseaktivität zeigte, ist diese im 731 bp Fragment schon schwächer, auch für das 73 bp Fragment ist die Luziferaseaktivität nochmals deutlich verringert.

Die Luziferaseauswertung für die Fragmente des distalen Promotorbereichs zeigt (Abb. 4.35) das gleiche Aktivitätsmuster, aber mit anderen Verhältnissen der Fragmente untereinander: Das 731 bp Fragment ist hier stärker als das 45 bp Fragment. Das 73 bp Fragment ist das schwächste, mit dem 26 bp Fragment erhöht sich die Luziferaseaktivität, gefolgt vom 45 bp Fragment. Kombiniert man das 73 bp bzw. das 50 bp Fragment mit dem 3' Ende des 45 bp Fragments, so steigt die Luziferaseaktivität wieder an, beim 73/45 Konstrukt mehr als beim 50/45 Fragment.



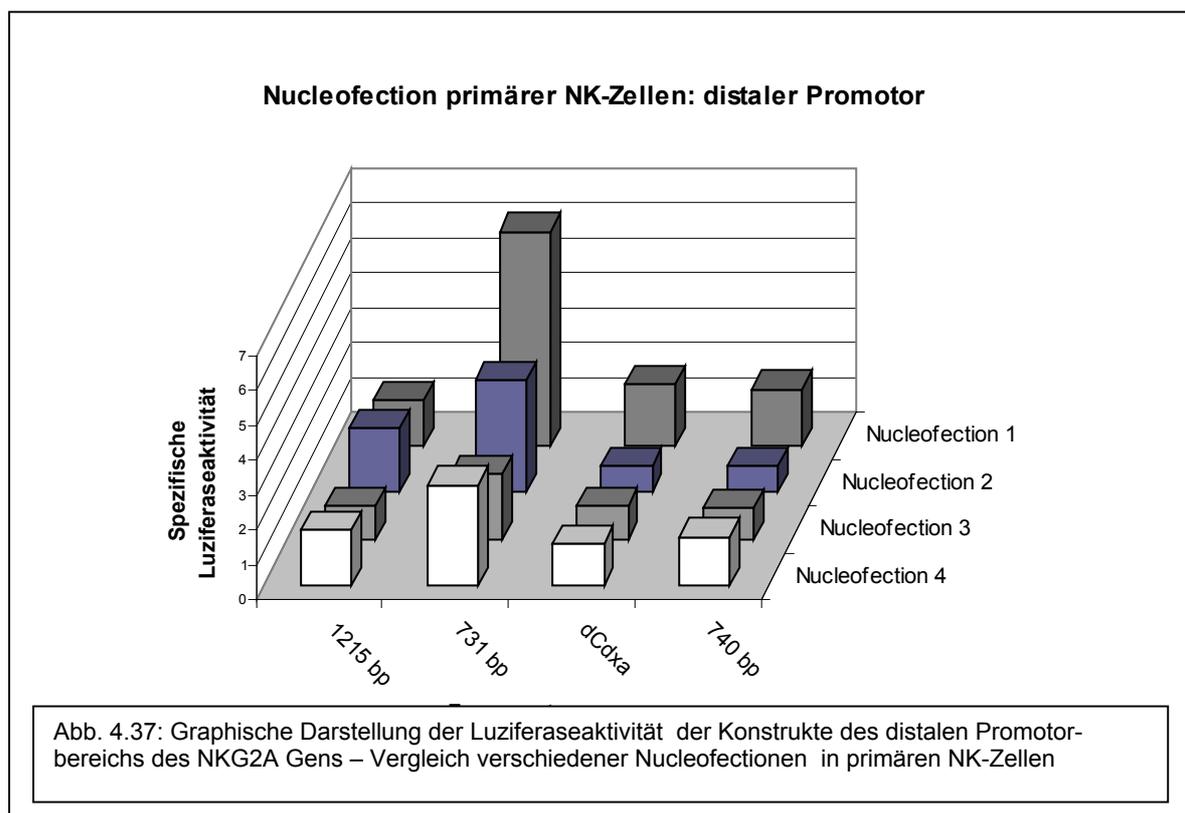
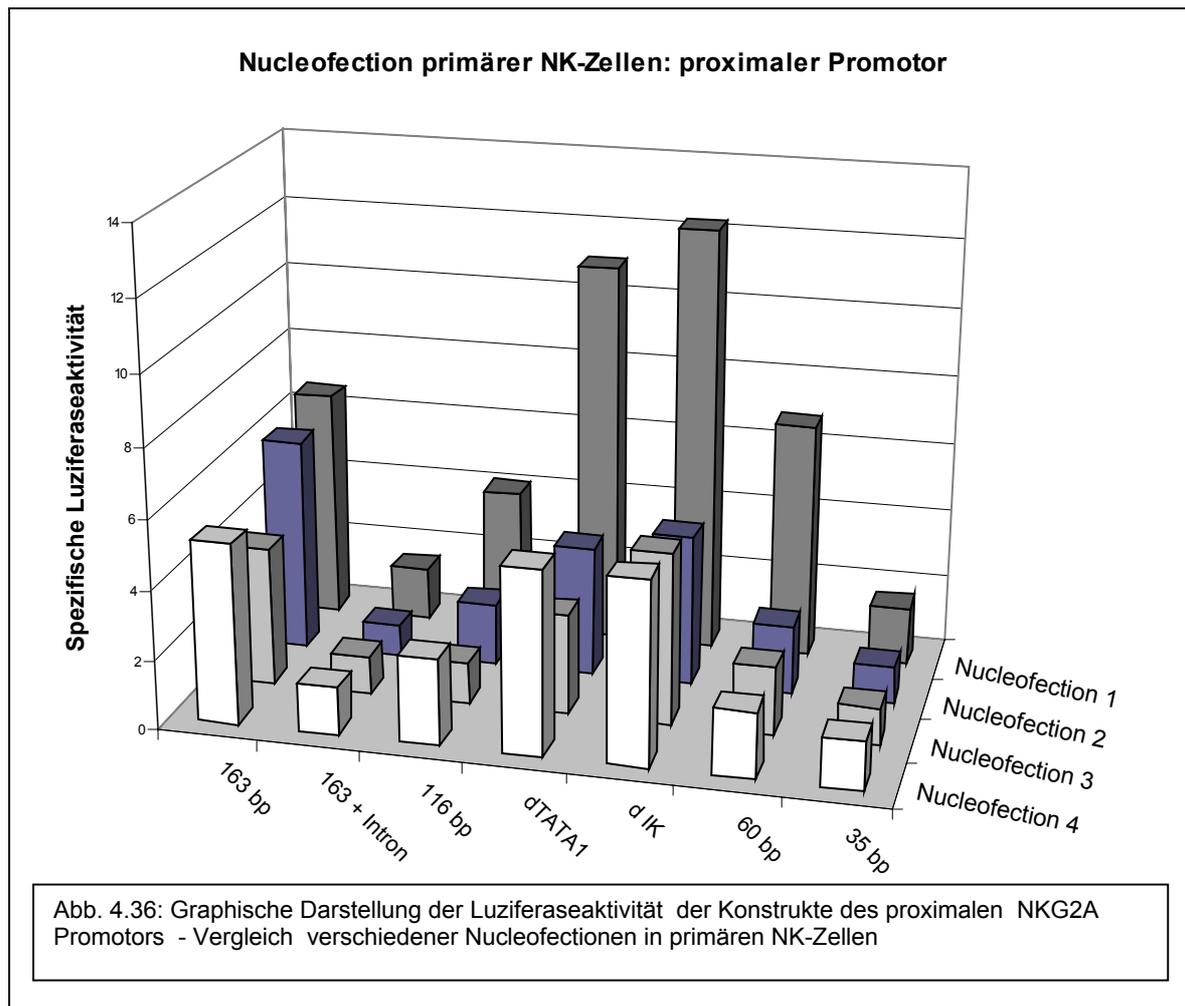


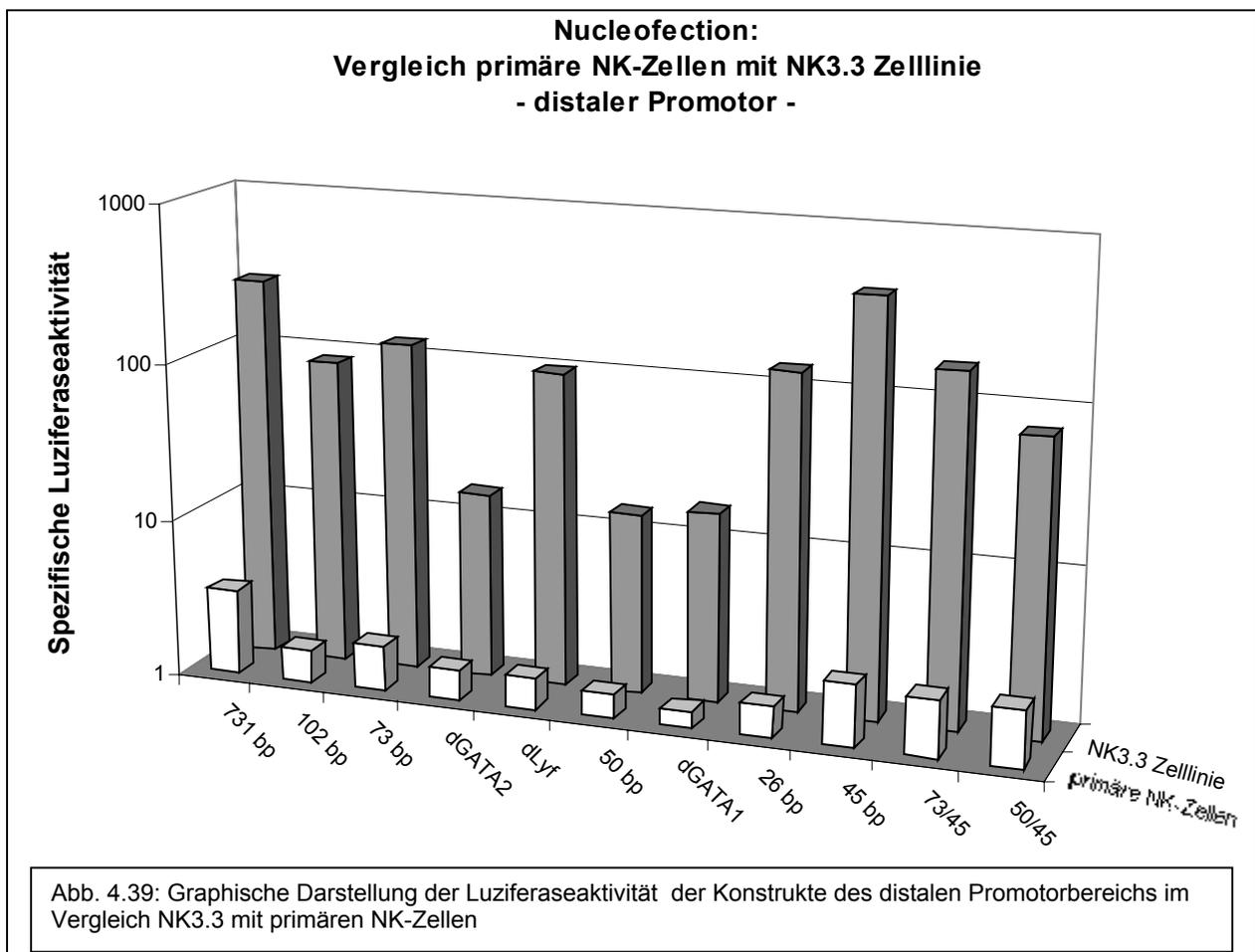
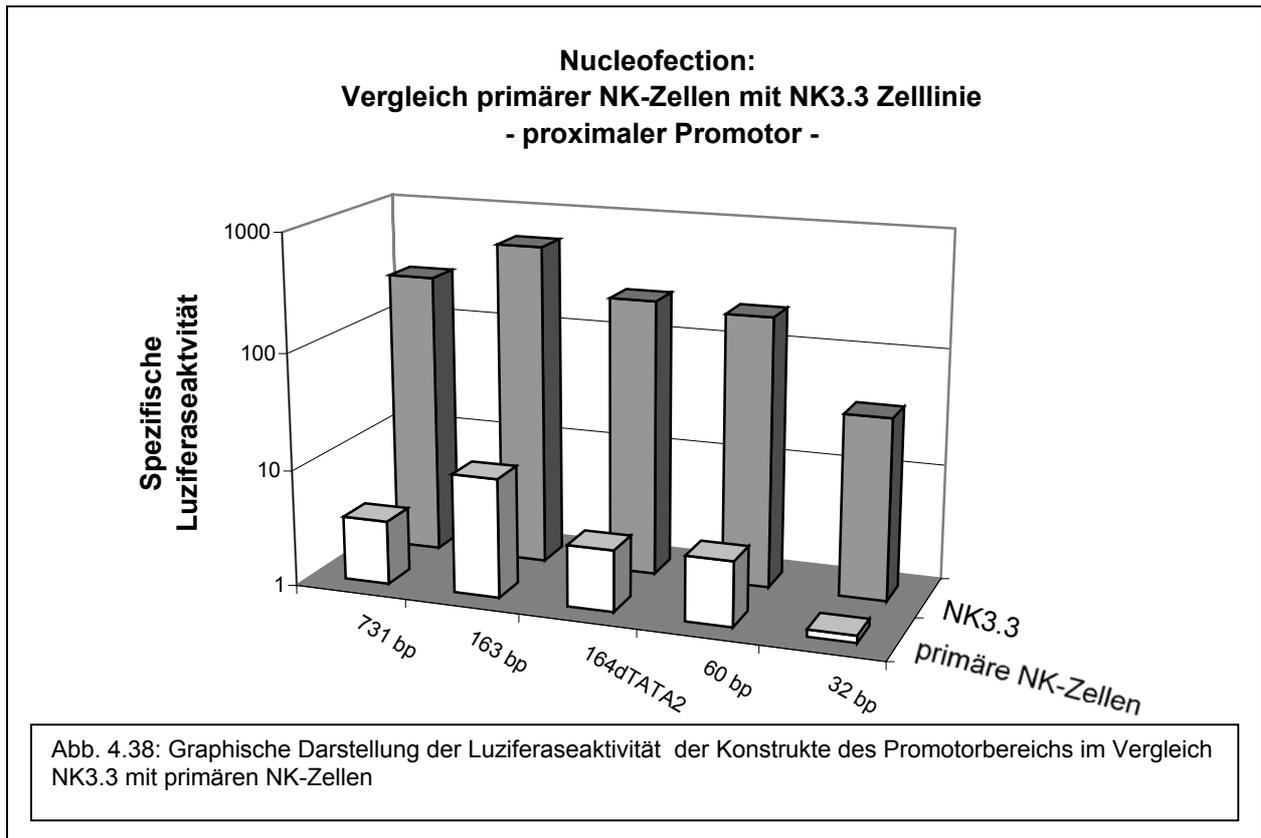
4.3.6 Vergleich NK3.3 primäre NK-Zellen

Da die Nucleofector-Technologie es nicht nur ermöglicht, NK-Zelllinien, sondern auch primäre NK-Zellen zu transfizieren, wurden Experimente unternommen, um zu klären, ob die NK3.3 Daten im Einklang mit primären NK-Zellen stehen. Die Nucleofection von primären, in Kultur expandierten NK-Zellen, wurde mit ausgewählten Fragmenten unternommen.

Für den proximalen Promotor (Abb. 4.36) ergaben sich, in Abhängigkeit von der Nucleofectionseffizienz, zwar unterschiedliche absolute Luziferaseaktivitäten (Vergleich Nucleofection 4 zu 1), aber das Muster bzw. die relative Aktivität der Fragmente zueinander blieb erhalten. Es ist somit eine Aussage, ob ein Fragment Promotoraktivität aufweist oder nicht, möglich, wohingegen eine quantitative Aussage über das Verhältnis der aktiven Promotorfragmente nicht möglich ist. Auch für den distalen Promotorbereich (Abb. 4.37), hier Fragmente der stromaufwärts aktivierenden Sequenz (SAS), konnte gezeigt werden, dass trotz niedriger Nucleofectionseffizienzen eine Aussage über eine Aktivität der Fragmente getroffen werden kann.

Die Daten über aktive und nicht aktive Fragmente, die aus den Nucleofectionen der NK-Zelllinie NK3.3 stammen, sind somit auch in primären NK-Zellen zu reproduzieren und stellen keine Zelllinien-spezifischen Artefakte dar. Dies wird im direkten Vergleich von starken Promotorfragmenten in NK3.3 und primären NK-Zellen (Abb. 4.38) noch untermauert, wohingegen bei den recht schwachen Promotorfragmenten der distalen Promotorregion (Abb. 4.39) die Auswertung an ihre Grenzen stößt und Fragmente wie dGATA2, dLylf, 50 bp und dGATA1 nicht mehr genügend aufgelöst werden können, um eine Aussage zu machen.

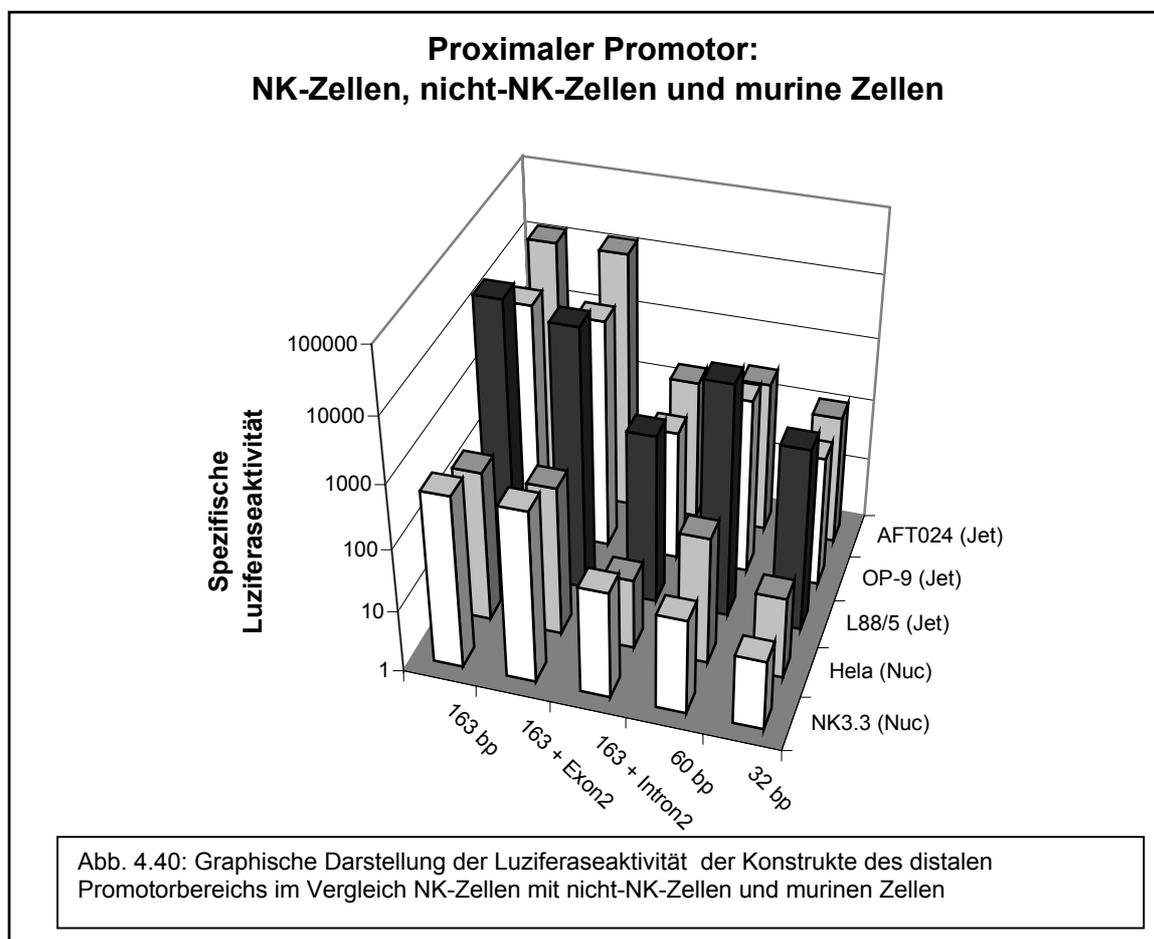


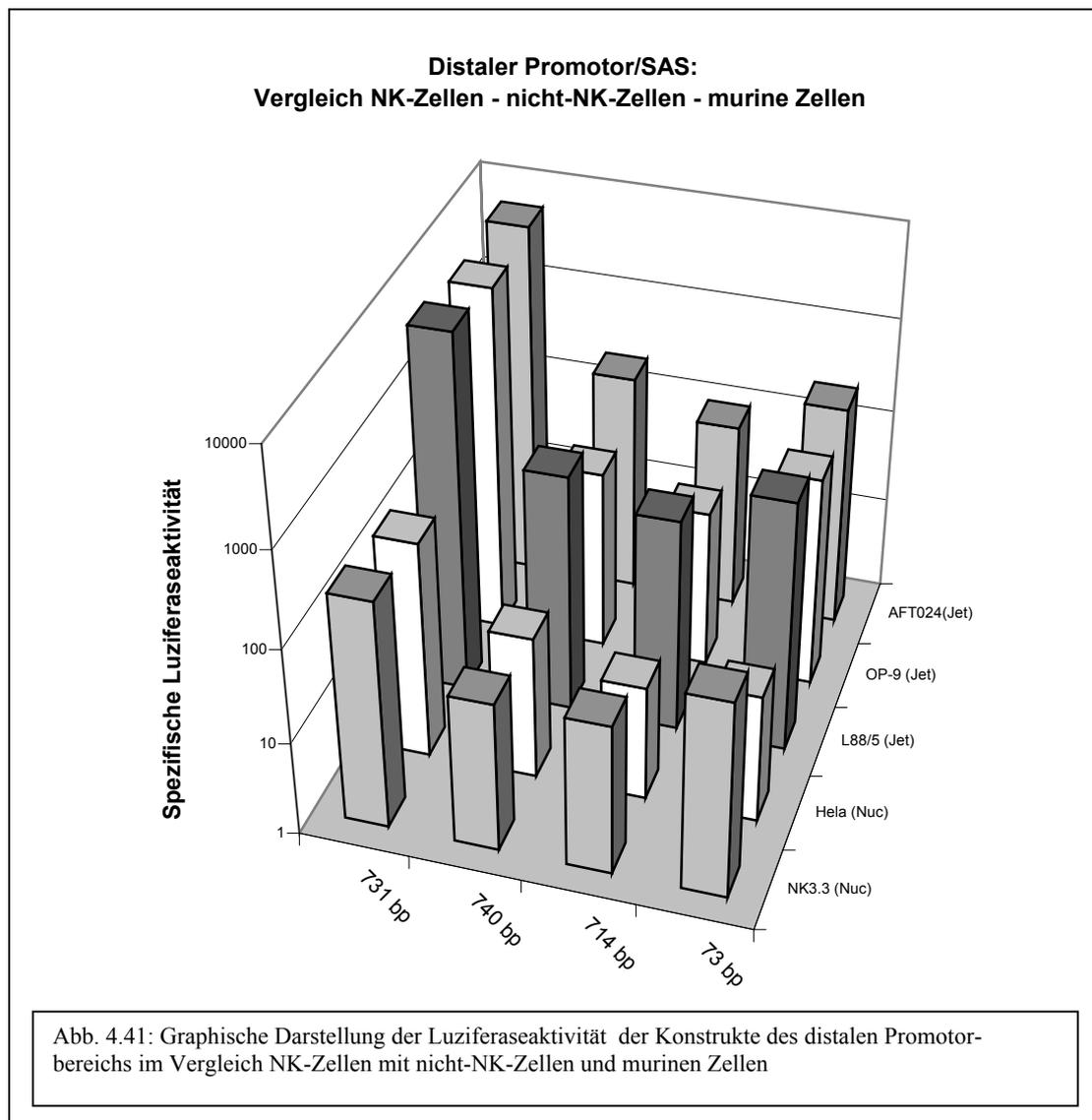


4.3.7 Vergleich NK-Zellen, nicht-NK-Zellen und murine Zellen

Um zu ermitteln, ob die Fragmente über NK-Zell-spezifische Faktoren gesteuert werden, wurden ausgewählte Fragmente, sowohl des proximalen als auch des distalen Promotorbereichs, in nicht-NK-Zelllinien getestet (Abb. 4.40).

Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur humane nicht-NK-Zelllinien, wie die Zervixkarzinomzelllinie HeLa oder die humane Knochenmarkstromazelllinie L88/5, das gleiche Expressionsmuster aufweisen wie NK3.3, sondern dass auch die murine Knochenmarkstromazelllinie OP-9 und die murine, foetale Leberzelllinie AFT024 die gleichen Aktivitätsmuster aufwiesen. Die Datengewinnung erfolgte neben der Nucleofektion (Nuc), die für die HeLa Zellen angewendet wurde, auch mit der JetPEI Methode (Jet), die ähnlich der Lipofektion die zu transfizierende Vektor-DNA durch die Membran schleust. Diese Methode ist vor allem für adhärente Zellen geeignet. Die Datenauswertung erfolgte mit weniger Zellen und, anstelle von 4 Stunden, nach 24 Stunden Inkubationszeit (siehe Methoden Seite 52).

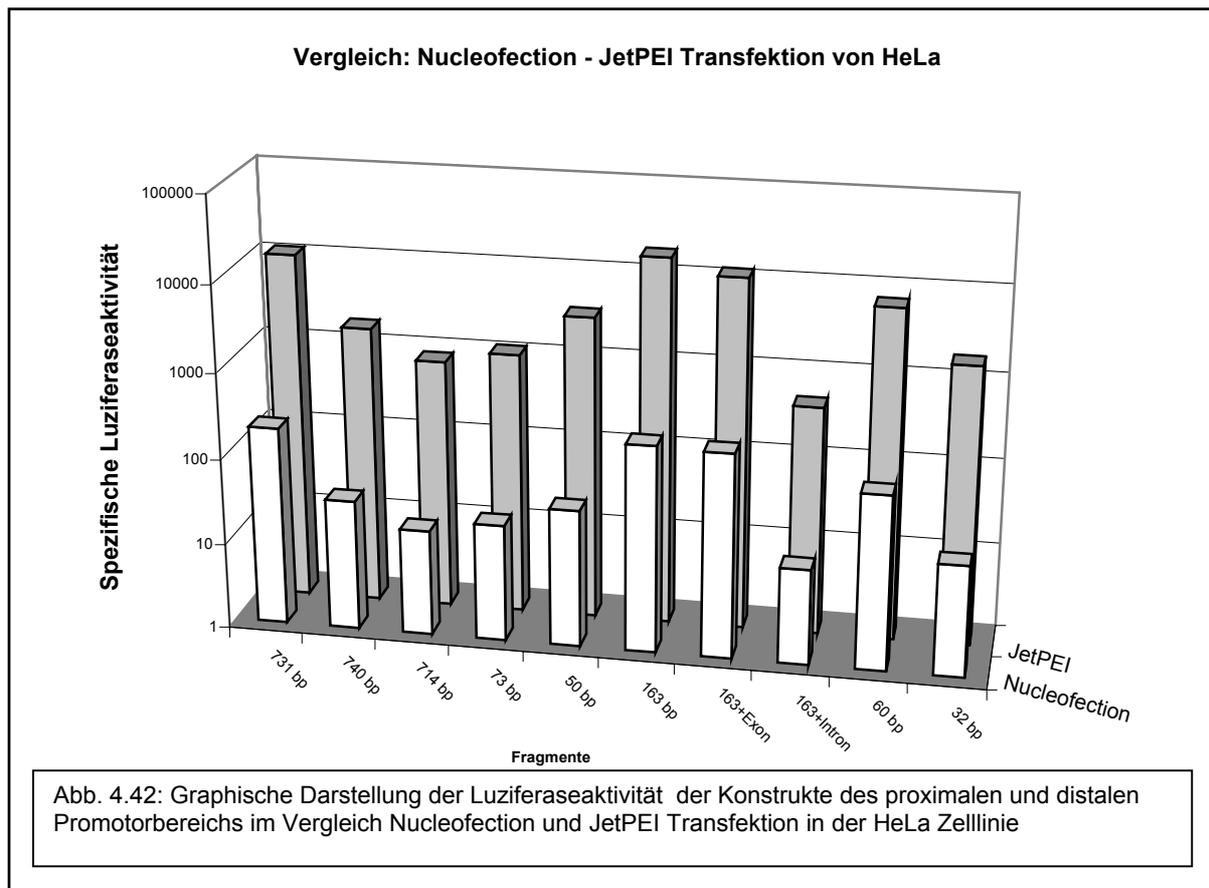




4.3.8 Vergleich Nucleofection – JetPEI

Um auszuschließen, dass die Nucleofektor-Technik hier artifizielle Daten liefert, wurden in einem Experiment die Daten der Nucleofection der HeLa Zelllinie mit denen der JetPEI Transfektion verglichen. Bei der Nucleofection wird die Vektor-DNA direkt in den Zellkern befördert und könnte so zytoplasmatische Faktoren in den Zellkern mitreißen oder nukleäre Faktoren könnten ins Zytoplasma übergehen.

Wie Abbildung 4.42 zeigt, ist zwar die absolute Luziferaseaktivität bei der JetPEI Transfektion höher, aber das von NK3.3 bekannte Aktivitätsmuster ist auch hier reproduzierbar.

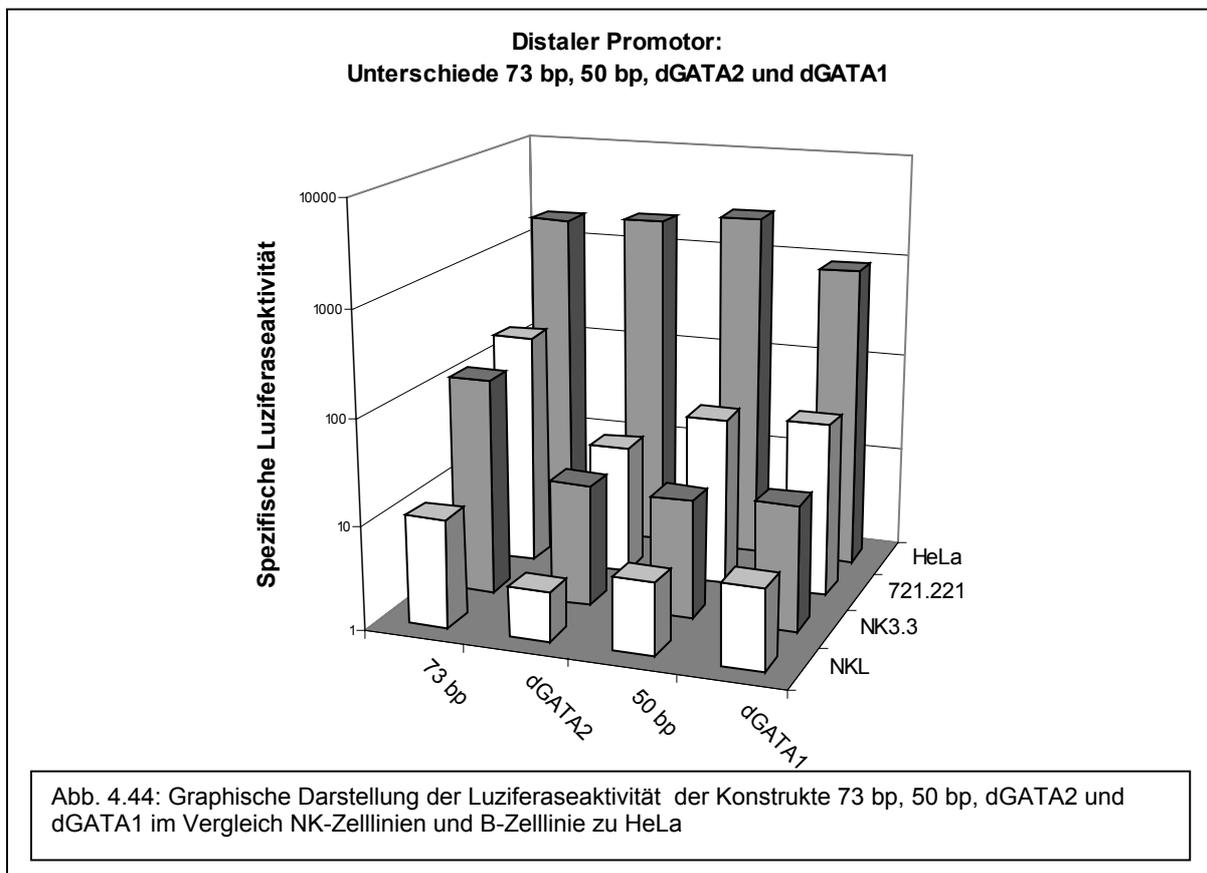
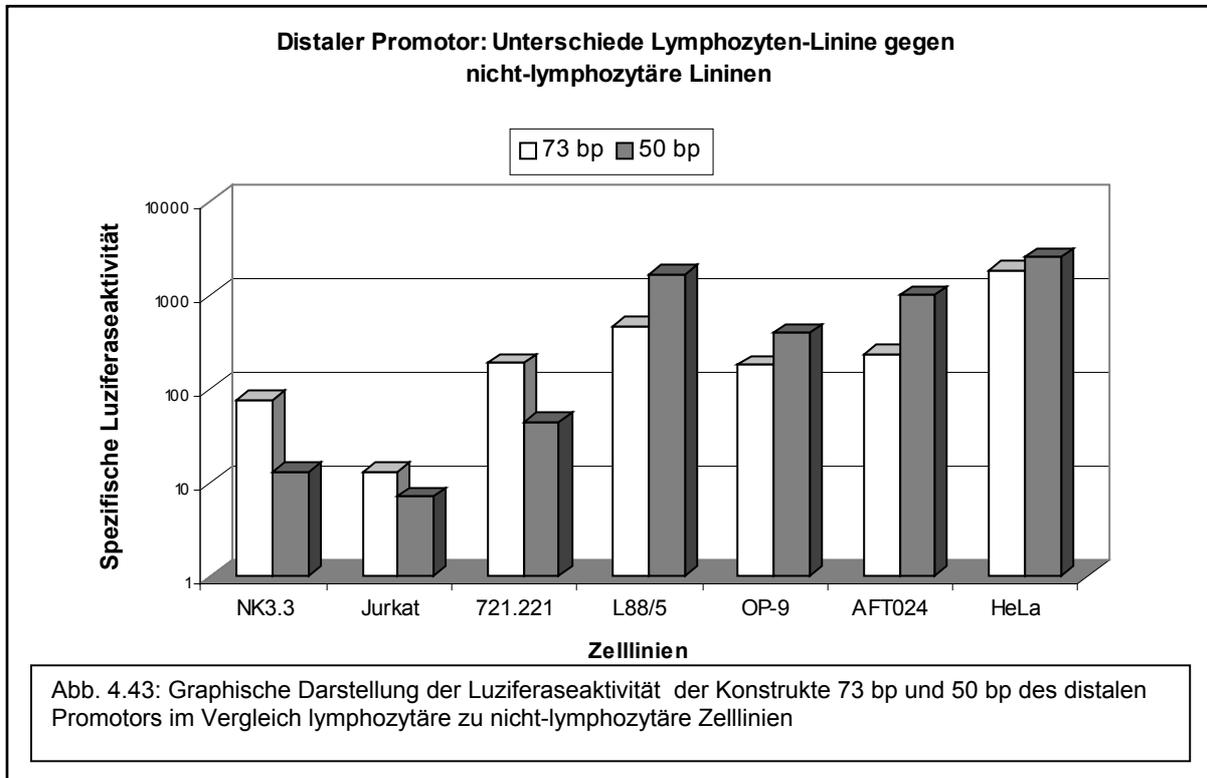


4.3.9 Unterschiede lymphozytäre Zelllinien – nicht lymphozytäre Zelllinien

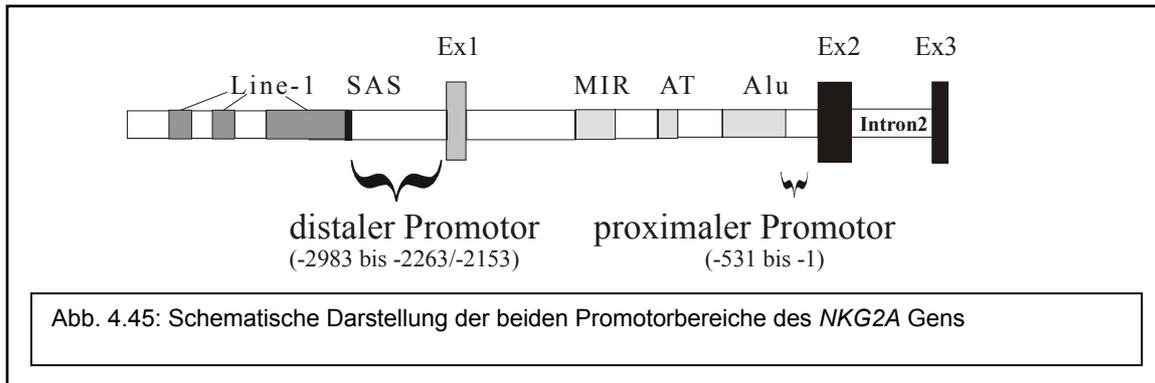
Erwähnt werden sollte noch, dass HeLa eine Ausnahme im Bezug auf die Aktivität des 50 bp Fragments macht (Abb. 4.42). Dieses Fragment, das in NK3.3 und primären NK-Zellen einen deutlichen Aktivitätsverlust, im Vergleich zum 73 bp Fragment, aufwies, scheint hier sogar noch stärkere Luziferaseaktivität zu haben.

Ein Vergleich von lymphozytären Zelllinien mit nicht-lymphozytären Zelllinien macht den Effekt deutlich (Abb. 4.43): Während lymphozytäre Zelllinien wie die NK-Zelllinie NK3.3, die T-Zelllinie Jurkat und die B-Zelllinie 721.221 eine deutliche Luziferasereduktion des 50 bp Fragments aufweisen, ist ihre Aktivität in den nicht-lymphozytären Zellen L88/5 und HeLa sowie den murinen OP-9 und AFT024 sogar leicht höher als die des 73 bp Fragments. Weiter fällt auf, dass neben dieser nicht mehr vorhandenen Aktivitätsreduktion auch die Deletionsmutante der GATA2 Sequenz vom 73 bp Fragment (dGATA2) ähnliche Luziferaseaktivität aufweist wie das Referenzfragment. Dieser Effekt wird in Abbildung 4.44 noch deutlicher, welche die beiden NK-Zelllinien NK3.3 und NKL sowie die B-Zelllinie 721.221 im Vergleich

zu HeLa zeigt. Diese Abbildung zeigt auch die leichte Aktivitätsreduktion des dGATA1 Fragmentes gegenüber dem 50 bp Fragmentes bei HeLa, jedoch nicht bei NKL, NK3.3 und 721.221.



4.3.10 Zusammenfassung Teil Promotoranalyse



- Der humane *NKG2A* Promotor ist durch zwei Promotoren charakterisiert - einen stärkeren proximalen Promotor direkt vor dem Exon 2 und einen schwächeren distalen Promotorbereich, der sich vor dem nichttranslatierten Exon 1 erstreckt (Abb. 4.45).
- Die Analyse des proximalen *NKG2A* Promotors ergab ein Minimalpromotorfragment von 116 bp. Eine Fragmentverkürzung führte sukzessiv zum Aktivitätsverlust (vom 60 bp bis 32 bp Fragment).
- Für die Alu-Sequenz konnte kein Einfluss auf die Basisaktivität des proximalen Promotors ermittelt werden.
- Es konnte eine essentielle TATA-Box (TATA-Box2) für den proximalen Promotor identifiziert werden.
- Die Anwesenheit des Intron 2 reduzierte die Aktivität des vorgelagerten, proximalen Promotors.
- Die Transkriptionsfaktor Analyse des proximalen Promotors ergab keinen essentiellen Kandidaten für die Regulation des Promotors.
- Der distale Promotorbereich erstreckt sich vor Exon 1 und kann durch eine stromaufwärts aktivierende Sequenz (SAS) verstärkt werden.

- Der Distale Promotorbereich ist kein scharf abgegrenzter Promotor, sondern durch zwei aktive Bereiche charakterisiert (26 bp und 45 bp). Er wird anscheinend von einer GATA-Sequenz reguliert.
- Die stromaufwärts aktivierende Sequenz (SAS) besteht aus einer CdxA und Ap-1 Bindungssequenz, die bei Verlängerung oder Verkürzung des Fragments zum Aktivitätsverlust führt und nur mit einem spezifischen 3' Ende (26 bp) aktiv ist. Sie stellt keinen universellen Enhancer dar.
- Die Fragmente scheinen nicht Zelltyp-spezifisch reguliert zu werden, da sie sowohl in der NK3.3, in Jurkat als auch in der Lymphozytenzelllinie 721.221 und in den nicht-Lymphozytenzelllinien L88/5 und HeLa aktiv sind. Einziger Unterschied ergab sich in den nicht-lymphozytären Zelllinien im distalen Promotorbereich, wo das dGATA2 und das 50 bp Fragment keine Aktivitätsreduktion aufweisen.
- Die Transkriptionsfaktor Analyse des distalen Promotors ergab als Aktivator eine mögliche GATA-Faktor-Bindungsstelle und als mögliche Inhibitoren AML-1a, C/EBP und den Faktor Evi-1. Es konnte ein, potentiell auf Stimulation mit TGF- β reagierendes, Regulationselement identifiziert werden. Für das 26 bp Fragment ergaben sich Faktoren wie CdxA, USF, NF-kappaB, N-Myc und c-Rel als mögliche Kandidaten. Die Sequenz des 45 bp Fragments wies eine Bindungsstelle für AP-1 auf.
- Die Fragmente scheinen nicht Spezies-spezifisch reguliert zu werden, da sie sowohl in den humanen Zelllinien NK3.3 und HeLa wie auch in den murinen Zelllinien OP-9 und AFT024 aktiv sind.
- Eine methodische Ursache für dieses Verhalten wurde durch den Vergleich der Nucleofektor-Methode mit der JetPEI Transfektion sowie einen Vergleich von NK3.3 NK-Zelllinie mit primären NK-Zellen ausgeschlossen.

4.4 Sequenzvergleich:

Für CD94 und die NKG2-Familie wurden die unterschiedlichsten Sequenzvergleiche untereinander, aber auch in verschiedenen Spezies durchgeführt (Maus, Ratte, Mensch), um sowohl auf DNA- (Houchins, 1991; Glienke, 1998) als auch auf Protein-Ebene (Lohwasser, 2000; Kim, 2004) Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede zu finden, die Schlüsse auf die evolutionäre Entwicklung zulassen (Lohwasser, 2000). Aufgrund dieser Daten wird heute vermutet, dass der humane NKG2-Gen-Cluster durch Genduplikation eines ursprünglichen NKG2A Gens entstanden ist, und dann erst NKG2F, danach NKG2C und NKG2E entstanden sind (Sobanov, 1999; Plougastel, 1998). NKG2D scheint dem CD94 ähnlicher zu sein, als seine Zuordnung zur NKG2-Familie vermuten lässt (Lohwasser, 2000). Weiter könnten diese Daten auch Hinweise auf gemeinsame Regulationsmechanismen der Gene bzw. auf das Ligandenspektrum sein. So konnte für das humane CD94 Gen nicht nur seine, aus zwei Promotoren bestehende Regulationseinheit, sondern auch die Aktivität bestimmende GAS/EBS Sequenz im murinen System identifiziert werden (Lieto, 2003; Wilhelm, 2003; Lohwasser, 2000).

Eine Analyse der Promotorsequenzen der NKG2-Familie, speziell der Vergleich der 3 kb vor der proteincodierenden Sequenz von NKG2A, NKG2C/E und NKG2F, ergab viele gemeinsame Transkriptionsfaktor Bindungsstellen in verschiedenen Alu-Sequenzelementen (Brostjan, 2000).

Mit den aus dem vorangegangenen Kapitel (Promotoranalyse) gewonnenen Erkenntnissen um die essentiellen Sequenzen der möglichen Transkriptionsfaktoren wurde ein DNA-Sequenzvergleich gemacht, um zu überprüfen, ob die anderen NKG2-Familienmitglieder einer ähnlichen Regulation unterliegen bzw. ob auch im murinen System diese Sequenzen eine Rolle spielen könnten.

4.4.1 Sequenzvergleich: NKG2A, NKG2C und NKG2E

Um zu überprüfen, wie ähnlich sich die Promotorstrukturen, die sich vom ursprünglichen NKG2A Gen ableiten, noch heute sind, wurden die Sequenzen miteinander verglichen.

Ein Vergleich der proximalen Promotorsequenz des NKG2A Gens mit den NKG2C- und NKG2E-Genen zeigt (Abb. 4.46), dass die Bereiche durchaus ähnlich sind, doch sind die Sequenzen von NKG2C und NKG2E untereinander ähnlicher als die Sequenz des NKG2A. Dies fällt besonders im Bereich ab der TATA-Box 2 bis zum ATG auf.

Aus Abbildung 4.47, die den Sequenzvergleich des distalen Promotorbereichs zeigt, wird deutlich, auch hier weisen NKG2C und NKG2E eine höhere Sequenzähnlichkeit zueinander als zum NKG2A auf. Auch die für NKG2A ermittelten GATA2 und GATA1 Sequenzen sind hier vorhanden, ohne jedoch der präzisen Sequenz im NKG2A zu entsprechen.

4.4.1 Sequenzvergleich: humanes NKG2A und murines Nkg2a

Ein Vergleich der humanen NKG2A Promotorsequenz des proximalen (Abb. 4.48) und des distalen Promotors (Abb. 4.49) zeigen nur geringe Ähnlichkeit mit den murinen Sequenzen, wobei bis jetzt für das murine Nkg2a Gen weder ein nichttranslatiertes Exon noch eine Alu-Sequenz nachgewiesen worden ist.

Sequenzvergleich: Proximaler Promotor - NKG2A, NKG2C und NKG2E

```

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

                                163bp
NKG2c      TAAAAAATGC-----CAATTATATCGTGTGATTTTGTGTTAAAGCTTTAGGAAATT 52
NKG2e      TAAAAAATGC-----CAATTATATCGTGTGATTTTGTGTTAAAGCTTTAGGAAATT 52
NKG2a      TAAAAATCTTTTTTAAACAATAAT-TCATAAGAAACGTGTTTAGGCTTGAAGAAAATC 59
          ***** *
                                CAAT-Box 116bp
NKG2c      AGTAGCAGAATTTTACATTGGTTAACAGCAAAGTAAACATTATTAATCAGCCCAACACA 112
NKG2e      AGTAGCAGAATTTTACATTGGTTAACAGCAAAGTAAACATTATTAATCAGCCCAACACA 112
NKG2a      AGAGAAAGAACTTTAGATTATTTAAT-GCAAAATGAGCTCCAATACTCGTTCTCCACCTC 118
          **
                                TATA-Box1 60bp
NKG2c      TGCACATTGCCTATACCAGGGA-TCCTGTCAAAATATACACCATTAT-AGCTTCTTAAG 170
NKG2e      TGCACATTGCCTATACCAGGGA-TCCTGTCAAAATATACACCATTAT-AGCTTCTTAAG 170
NKG2a      ACCCTTTTAATTGCACTAGGGAATCCTGT----ATATAAACCATTTATTAACCTTCTAAC 174
          *
                                TATA-Box2 32bp
NKG2c      TGCAGTTATCATAGAGCACAGTCCCTCACATCACACAGCTGCAGAGATG 219
NKG2e      TGCAGTTATCATAGAGCACAGTCCCTCACATCACACAGCTGCAGAGATG 219
NKG2a      TACTGTTATTATAGAGTACAGTCCCTGACATCACACA-CTGCAGAGATG 222
          * * * * *
    
```

Abb. 4.46: Sequenzvergleich NKG2A, NKG2C und NKG2E im proximalen Promotor

Sequenzvergleich: Distaler Promotor - NKG2A, NKG2C und NKG2E

```

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

                                GATA-2          GATA-1
NKG2c      -TGACACACTAGCCACCCAAAGTCTCCCTATATTCTAAAG-TGTGTGATGAGACAAA-CTG 57
NKG2e      -TGACACACTAGCCACCCAAAGTCTCCCTATATTCTAAAG-TGTGTGATGAGACAAA-CTG 57
NKG2a      CTTGTACTTTTAATAGACCAAGTATCCCTATATTTTGGAGGTGTGTGATGAGATAAAACTG 60
          *
                                26bp
NKG2c      ATT-CAAAATAGCCCTAGGGTGAGAAATTCCCTGTTCAAATCTGCAGTGACACATTGGTGA 116
NKG2e      ATT-CAAAATAGCCCTAGGGTGAGAAATTCCCTGTTCAAATCTGCAGTGACACATTGGTGA 116
NKG2a      ATTTCACAATAGCCCATGTGT-AGAAATTCCCTGTTCAAACCT-TAGTAACACGTTGATGA 118
          * * * * *
                                45bp
NKG2c      GGAATCTACTTTTTCCACTCTTGCCCTCACTCTGACCCTTCAAAGGGCAGTCTGTGAAGAT 176
NKG2e      GGAATCTACTTTTTCCACTCTTGCCCTCACTCTGACCCTTCAAAGGGCAGTCTGTGAAGAT 176
NKG2a      GAAATCTACTTTTTCCACTCTTGACTCACTCTGACCCTTCAAGGGCAGTCTGCGAAGAT 178
          * * * * *

NKG2c      CACAGATAACGTTTGTGTCTTTTCAGAGGTAACCTGA 212
NKG2e      CACAGATAACGTTTGTGTCTTTTCAGAGGTAACC--- 209
NKG2a      TGCAGGCATTGTTTGTCTTTGATTGATTTA---- 210
          * * * * *
    
```

Abb. 4.47: Sequenzvergleich NKG2A, NKG2C und NKG2E im distalen Promotor

Sequenzvergleich: Proximaler Promotor des humanen und murinen NKG2A

```

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

          163bp
human     -----TAAAAATCTTTTAAAAACAAATATTCATAAGAAACGTGTTAGGCT-TGAAG 53
mouse     TCCCCATTAAGTTGTTGCCTTATCAAAAATATTTGCCAAAAGTTGTTGTTGCTGTTGTT 60
          * * * * *
          CAAT-Box 116 bp
human     AAAATCAGAGAAAGAACTTTAGATTATTTAATGCAAAATGAGCTCCAATACTCGTTCTCC 113
mouse     GTTGTGTTACCACAGCACTCGTATTCATTGTCCAAGGGAAG---AAAAATAGATTA-- 114
          * * * * *
          TATA-Box1 60bp
human     ACCTCACCCCTTTTAATGCACTAGGGAATCCTGTATATAAACCATTTATTAACCTCTTAA 173
mouse     GGTTTAAATTTCCAAGTCAAAATGAGTGCCATTGTTCCAA--ACTCCTCCTCTTGGC 172
          * * * * *
          TATA-Box2 32bp
human     CTACTGTTATTATAGAGTACAGTCCCTG-ACATCACACACTGCAGAGATG 222
mouse     CTCATCAGATTGTTGACCTTTGCCTCAGCACATCACTAGCTGCAGACATG 222
          * * * * *
  
```

Abb. 4.48: Sequenzvergleich des proximalen, humanen NKG2A Promotors mit dem murinen

Sequenzvergleich: Distaler Promotor des humanen und murinen NKG2A

```

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

          GATA-2          GATA-1
human     CTGTACTTTTAAATAGACCAAGTATCCTATATTTTGGAGGTGTGTGATGAGATAAACTG 60
mouse     -----CCACAAGAACCCAAAGCATTCTCTGCTGTAAGGTGTGTGATGAA--AAAAGT 52
          * * * * *
          26bp
human     ATTTTCAAAAT-AGCCCATGTGT-----AGAATTTCCCTGTTCAAACCTTAGTAACACGTTG 114
mouse     ATTTTCAAAATCAGCTTCTCTGAGTATGAGAATTTCCCTGTTCAAACCTTCAATGACACATTA 112
          * * * * *
          45bp
human     ATGAGAAATCTACTTTTCCACTCTTGACTCACTCTGAGCCTTCACAGGGCAGTCTGCGA 174
mouse     GTGAGAAATCT-CCTTCTCCACACTTGACTCACTCTGAGGCT-CATGGGGCAACCTTCAA 170
          * * * * *
human     AGATTGCAGGCATTGTTTGTCTTGTCTTGGATTTATGCCTTTAAATTTACACCTTTTATT 234
mouse     AGTTCACAGTCACTGCT-----GCCCTAGATTTCTGCCAC--AGACAAACCCCTTGGT 221
          * * * * *
human     ACACAGCTAT 244
mouse     GCTTGGC--- 228
          * *
  
```

Abb. 4.49: Sequenzvergleich des distalen, humanen NKG2A Promotors mit dem murinen

4.4.3 Zusammenfassung Teil Sequenzvergleich

- Der Sequenzvergleich des proximalen und distalen Promotorbereichs von NKG2A mit NKG2C und NKG2E zeigt durchaus Ähnlichkeiten, wobei jedoch größere Unterschiede zwischen NKG2A und NKG2C bzw. NKG2E als zwischen NKG2C und NKG2E auffallen.
- Die für NKG2A ermittelten GATA2 und GATA1 Sequenzen sind bei NKG2C und NKG2E vorhanden, ohne jedoch präzise der Sequenz aus NKG2A zu entsprechen.
- Der Sequenzvergleich des proximalen und distalen Promotors vom humanen NKG2A mit dem murinen Nkg2a weist nur sehr geringe Ähnlichkeiten auf.

4.5.1 Epigenetik

Die Epigenetik betrifft alle Vorgänge, die sich „epi“- d.h. neben/über der DNA-Sequenz abspielen, ohne diese zu verändern, und dazu führen, dass die codierte Information in einem Gen aktiv wird. Im weitesten Sinne gehören alle Mechanismen der Genregulation und Genexpression dazu, im engeren Sinne vor allem die Frage, wie diese Mechanismen aufrechterhalten bzw. von Zelle zu Zelle weitergegeben werden. Die Methylierung von Cytosinen in CpG-Nucleotiden von Genpromotoren ist eine häufige epigenetische Modifikation, die meistens mit der Repression der Transkription einher geht (Attwood, 2002). Gerade im Immunsystem ist es ein bekannter Mechanismus, der bei der T-Zell-Rezeptor Rekombination und bei der Expression von Zytokinen auftritt (Agarwal, 1998; Muegge, 2003). Kürzlich konnte für die KIR-Gene gezeigt werden, dass sie im Zuge der Feinregulation durch Methylierung von CpGs in ihren Promotorbereichen abgeschaltet werden können (Santourlidis, 2002; Chan, 2003). Eine weitere Möglichkeit, um epigenetisch Einfluss auf die Genexpression zu nehmen, ist die Veränderung der Chromatindichte. Während abgeschaltete Genbereiche ein dichtes Heterochromatin aufweisen, befindet sich das Chromatin transkriptionell aktiver Gene in einem aufgelockerten euchromatischen Zustand, der durch Acetylierung der Histonproteine gekennzeichnet ist. Beide Modifikationsmöglichkeiten werden jeweils durch spezielle Enzyme hervorgerufen, die Methylgruppen an CpG bzw. Acetylgruppen an Histonproteinen verändern können (Felsenfeld, 2003).

Es konnte die Wichtigkeit der DNA Methylierung in den Promotorsequenzen der KIR Gene für deren Expressionsmuster gezeigt werden (Santourlidis, 2002). Während exprimierte KIR-Gene demethylierte Promotorsequenzen aufweisen, sind die der nicht-exprimierten KIRs methyliert. Durch Stimulation mit dem demethylierenden Agenz 5-AZA-2'-Cytidin, das die Methylierung der CpG-Sequenzen verhindert, konnten nicht-exprimierte KIRs induziert werden. Ein weiteres epigenetisch wirkendes Agenz ist Trichostatin A (TSA), es ist ein Deacetylaseinhibitor, der verhindert, dass die Acetylgruppen an Histonproteinen entfernt werden und das Chromatin in diesen Bereichen verdichtet wird. Eine Stimulation mit diesem Agenz kann bei sensitiven Genen ebenfalls zur Induktion bzw. Aktivierung des Promotors führen (CD21 - Komplementrezeptor II; Schwab, 2001). Die epigenetische Regulation

scheint ein Mechanismus zu sein, der auch in Anwesenheit spezifischer Transkriptionsfaktoren einen Zielpromotor regulieren kann, indem die Bindung der Faktoren an die Sequenzen durch Methylierung der CpGs in den Bindungssequenzen bzw. durch Verdichtung des Chromatin in den Promotorbereichen verhindert wird. Es scheint also durchaus denkbar, dass das humane NKG2A Gen, dessen Promotorkonstrukte in lymphoiden als auch nicht-lymphoiden Zellen Aktivität aufweist, epigenetisch reguliert sein könnte. Die in der Alu-Sequenz vorhandenen CpGs und die für Alus beschriebenen chromatinregulierenden Fähigkeiten könnten ein Hinweis darauf sein (Englander, 1995).

4.5.2 Stimulation der NK-Zelllinie YT mit AZA und TSA

Das humane NKG2A-Gen weist in seinem potentiellen Promotorbereich vor dem Exon 2 eine sogenannte Alu-Sequenz auf, die 17 CpGs beinhaltet und als CpG-Insel angesprochen werden kann. Diese CpGs könnten Ziel von modifizierenden Enzymen sein, wobei eine Demethylierung eine Geninduktion zur Folge haben könnte. Auch der Beitrag der Chromatindichte für die Genaktivität lässt sich durch einfache Kultur mit dem Deacetylaseinhibitor Trichostatin A (TSA) klären.

Es wurden Zellen mit dem demethylierenden Agenz AZA bzw. mit dem Deacetylaseinhibitor Trichostatin A (TSA) stimuliert. Für die Induktion einer Hypomethylierung in CpG-Zielstrukturen müssen die Zellen proliferieren, da die Chemikalie 5-AZA-2'-Cytidin (AZA) nicht aktiv die Methylgruppen von den Cytosinen entfernt, sondern das Enzym, welches bei der Replikation Methylgruppen überträgt (DNA-Methyltransferase; DNMT-1), inhibiert (Jüttermann, 1995). Innerhalb der Inkubationszeit von ca. 5 Tagen sollten die Zellen mindestens zwei Replikationszyklen durchlaufen haben, damit beide DNA Stränge gemäß dem semikonservativen Mechanismus methylgruppenfrei vorliegen. Trichostatin A (TSA) wirkt ebenfalls als Inhibitor, es verhindert, dass spezifische Enzyme (Histondeacetylasen; HDACs) die Acetylgruppen von den Nucleosomen entfernen und hält so einen offenen Chromatinstatus aufrecht (Mishra, 2001).

Für die initialen Versuche wurde die humane NK-Zelllinie YT gewählt, da sie nur geringe Mengen des NKG2A Rezeptors auf der Zelloberfläche trägt, während andere NK-Zelllinien meist eine hohe Expression aufweisen, und Änderungen nur schlecht zu analysieren sind. Die Dotplot-Analyse (Abb. 4.50) der NK-Zelllinie YT bezieht sich auf das Lymphozytengate und ergab, dass sich NKG2A während der Stimulation mit AZA induzieren lässt (von 4,1 % auf 24 %). Auch eine Inkubation mit TSA zog eine sehr starke NKG2A Expression (40 %) auf der Zelloberfläche nach sich. Eine Verwendung beider Reagenzien zeigte einen synergistischen Effekt (24 % AZA, 40 % TSA und 72 % AZA/TSA). Diese Effekte werden in der Überlagerungsdarstellung im Histogramm noch deutlicher.

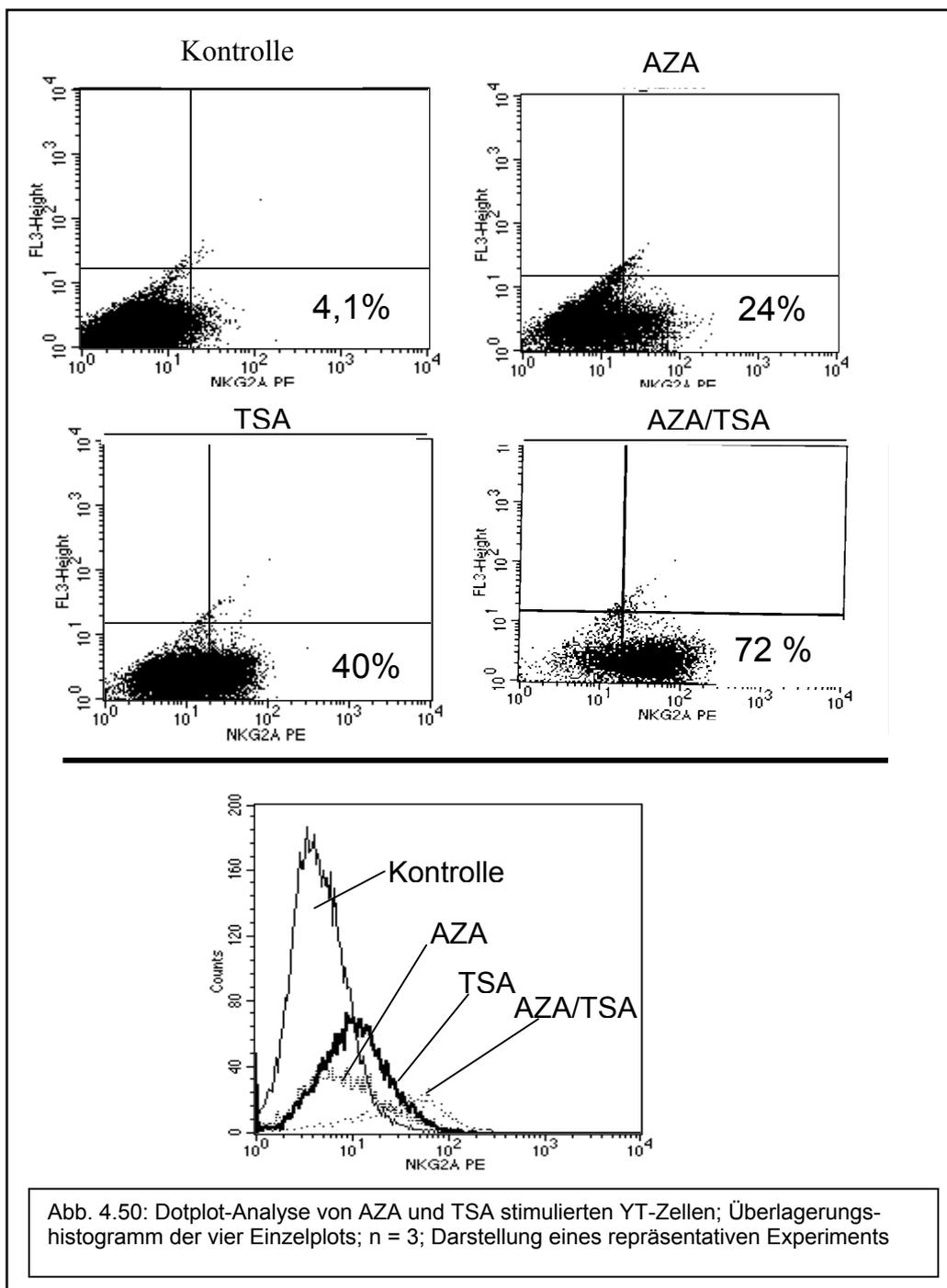
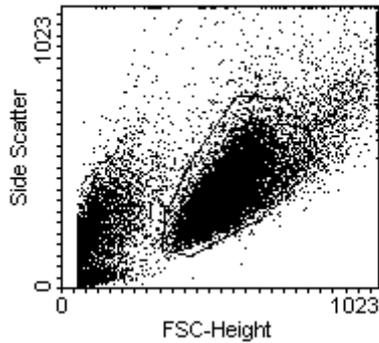


Abb. 4.50: Dotplot-Analyse von AZA und TSA stimulierten YT-Zellen; Überlagerungshistogramm der vier Einzelplots; n = 3; Darstellung eines repräsentativen Experiments

4.5.2.2 Stimulation von primären NK-Zellen mit AZA und TSA

Um zu überprüfen, ob es sich tatsächlich um einen allgemeinen, auch andere NK-Zellen betreffenden, Effekt handelt, wurden Versuche mit weiteren Zelllinien unternommen. In Ermangelung von NKG2A-negativen NK-Zelllinien wurde die Induktion mit einer primären NK-Zelllinie durchgeführt, die nur eine geringe NKG2A Expression (43 %) aufwies. Die Analyse umfasst die Zellen aus dem in Abbildung 4.51 dargestellten Lymphozytengate. Es wird eine Überlagerung der Histogrammkurven von Kontrolle und induzierter Probe (AZA, TSA oder AZA/TSA) dargestellt, wobei die Markierung M1 die spezifische Antikörperfärbung darstellt, die sich aus den Daten der Isotypkontrolle (unspezifische Antikörperfärbung) ergab. Es wird deutlich, dass die Stimulation mit AZA keine weitere NKG2A Induktion (A; KO 43 % zu 35 %) verursachte, auch die Werte für die Stimulation mit TSA waren vernachlässigbar gering (47 %), lediglich die Rezeptordichte (D) erfuhr mit AZA, TSA und AZA/TSA eine leichte Erhöhung (KO 316, AZA 333, TSA 426, AZA/TSA 359). Die Analyse des ebenfalls mit CD94 assoziierten NKG2C Rezeptors ergab sogar eine deutliche Reduktion von NKG2C exprimierenden Zellen nach der TSA Inkubation (B; KO 77 %, TSA 37 %), während die verbliebenen Zellen eine leicht erhöhte Rezeptordichte aufwiesen (KO 56, TSA 95). Auch das, als Homodimer exprimierte, NKG2D wurde durch Inkubation, diesmal mit AZA, erheblich inhibiert (C; KO 86 %, AZA 65 %).

Es wurden weitere Stimulationsversuche mit den Zelllinien Jurkat (humane T-Zelllinie) und RPMI 8866 (humane B-Zelllinie) unternommen, es konnte aber keine NKG2A Expression auf der Zelloberfläche induziert werden (Daten nicht gezeigt).



D)

MFI	Kontrolle	AZA	TSA	AZA/TSA
NKG2A	316	333	426	359
NKG2C	56	52	05	65
NKG2D	94	51	95	56

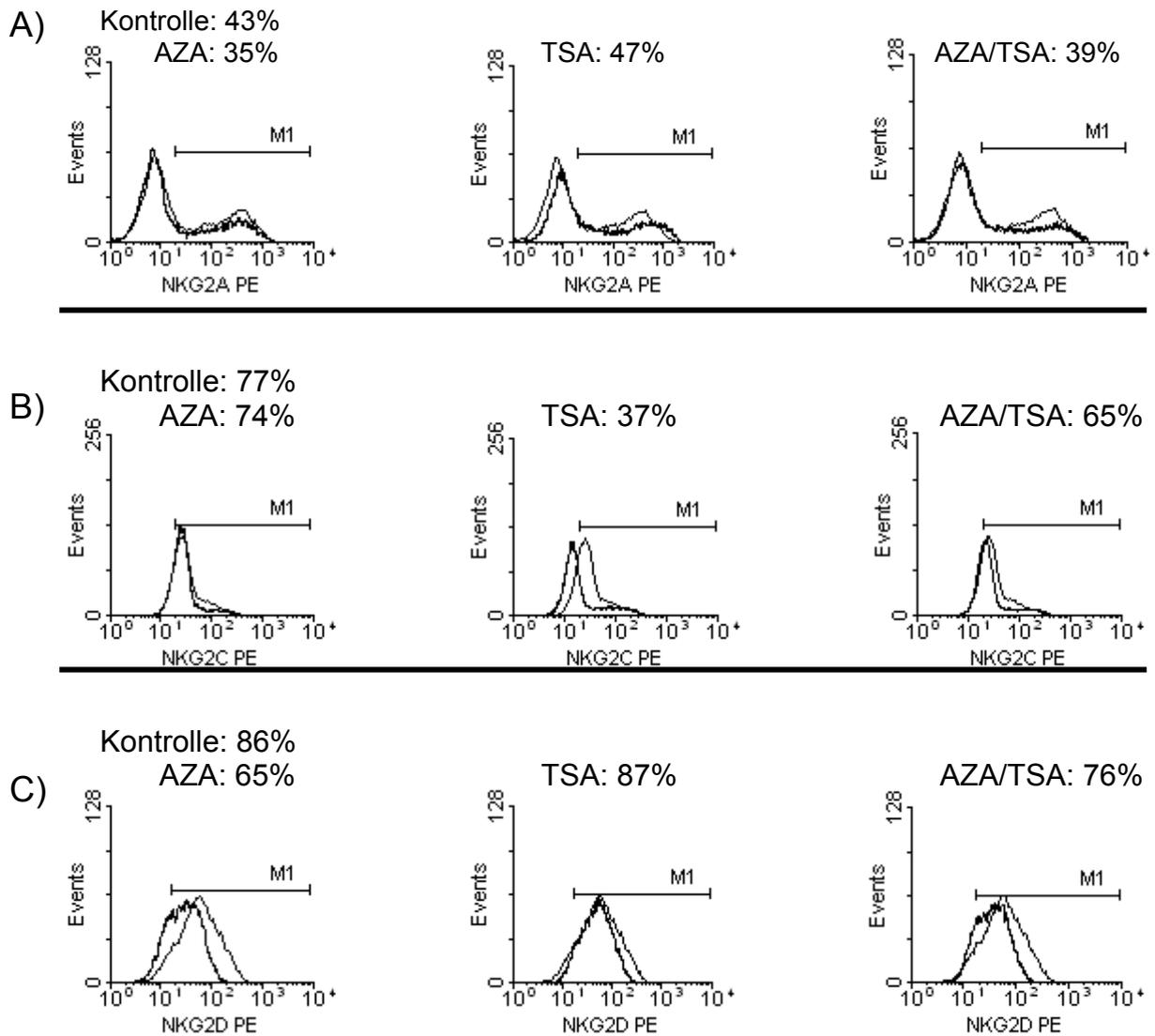


Abb. 4.51: Histogramme des mit AZA und TSA stimulierten NK-Mischklons. Analysen auf NKG2A, NKG2C und NKG2D; n = 2; Darstellung eines repräsentativen Experiments

4.5.2.2 Stimulation von primären CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mit AZA und TSA

Die NKG2A Expression ist nicht nur auf NK-Zellen beschränkt, sondern wie bei den Induktionsversuchen schon dargestellt, auch auf Subpopulationen von CD4⁺ Helferzellen und CD8⁺ T-Zellen zu finden. Bei unterschiedlichen NKG2A Expressionsmustern zwischen diesen Populationen könnte auch die Regulation unterschiedlich sein.

Es wurden Versuche unternommen, um CD8⁺ zytotoxische T-Zellen und CD4⁺ T-Helferzellen mit AZA und TSA zu stimulieren. Hier ergab die Analyse der primären CD4⁺ Zellen (Abb. 4.52 linke Spalte) und CD8⁺ Zellen (Abb. 4.52 rechte Spalte) aus den Lymphozytengates keine Induzierbarkeit von NKG2A mit AZA, TSA oder deren Mischung. Als Kontrolle für die Wirksamkeit der Reagenzien wurde hier eine Analyse der KIR-Rezeptoren miteinbezogen, für die eine Induzierbarkeit mit AZA beschrieben worden ist (Santourlidis, 2002).

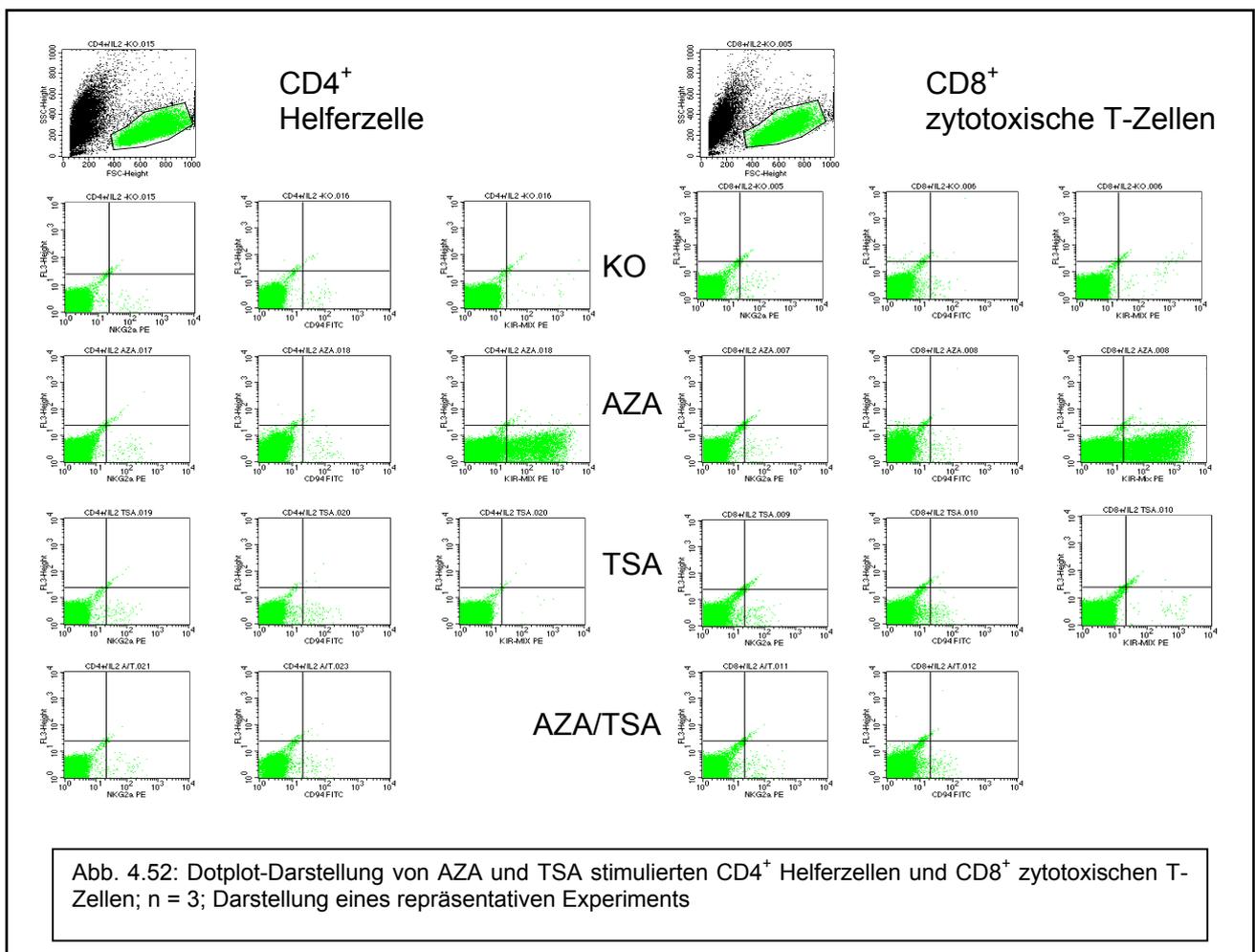


Abb. 4.52: Dotplot-Darstellung von AZA und TSA stimulierten CD4⁺ Helferzellen und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen; n = 3; Darstellung eines repräsentativen Experiments

4.5.2.3 Stimulation von NK3.3, Jurkat und HeLa mit AZA und TSA

Während man mit AZA bzw. TSA Stimulation NKG2A Expression auf der Oberfläche von YT induzieren konnte, schlugen alle Induktionsversuche auf anderen Zelllinien bzw. primären Zellen fehl (siehe FACS-Daten; Abb. 4.50; Abb. 4.52). Ob sich NKG2A tatsächlich mit den Reagenzien nicht induzieren lässt, oder ob dieser Effekt auf die Nichtinduzierbarkeit von CD94 zurückzuführen ist, ohne dessen Expression NKG2A nicht auf der Zelloberfläche exprimiert werden kann, wird aus Abbildung 4.4 deutlich: Es wurde die NKG2A exprimierende NK-Zelllinie NK3.3, die NKG2A-negative T-Zelllinie Jurkat und die Zervixkarzinomzelllinie HeLa jeweils mit AZA, TSA und einer Mischung beider inkubiert. Aus den so stimulierten Zellen wurde RNA isoliert, einer RT-PCR unterzogen und eine PCR mit spezifischen Primern durchgeführt. Aus der ersten Reihe der Abbildung 5.53 wird deutlich, dass NKG2A Transkripte zwar in allen NK3.3 Proben vorlagen, jedoch weder in den stimulierten Jurkat noch in den HeLa Zellen induziert werden konnte. Und auch CD94 Transkripte (2. Reihe), die in allen NK3.3 Proben nachgewiesen werden konnten, fehlten in den stimulierten Proben von Jurkat und HeLa. Es wurde ebenfalls eine PCR mit dem Primerpaar für das lange Transkript (Exon 1) durchgeführt, doch auch in diesem Fall war keine nennenswerte Induzierbarkeit nachweisbar (3. Reihe). Die 4. Reihe zeigt die Kontroll-PCR mit GAPDH-spezifischen Primern. Es sind also weder NKG2A noch CD94 Transkripte durch Stimulation mit AZA oder TSA induzierbar.

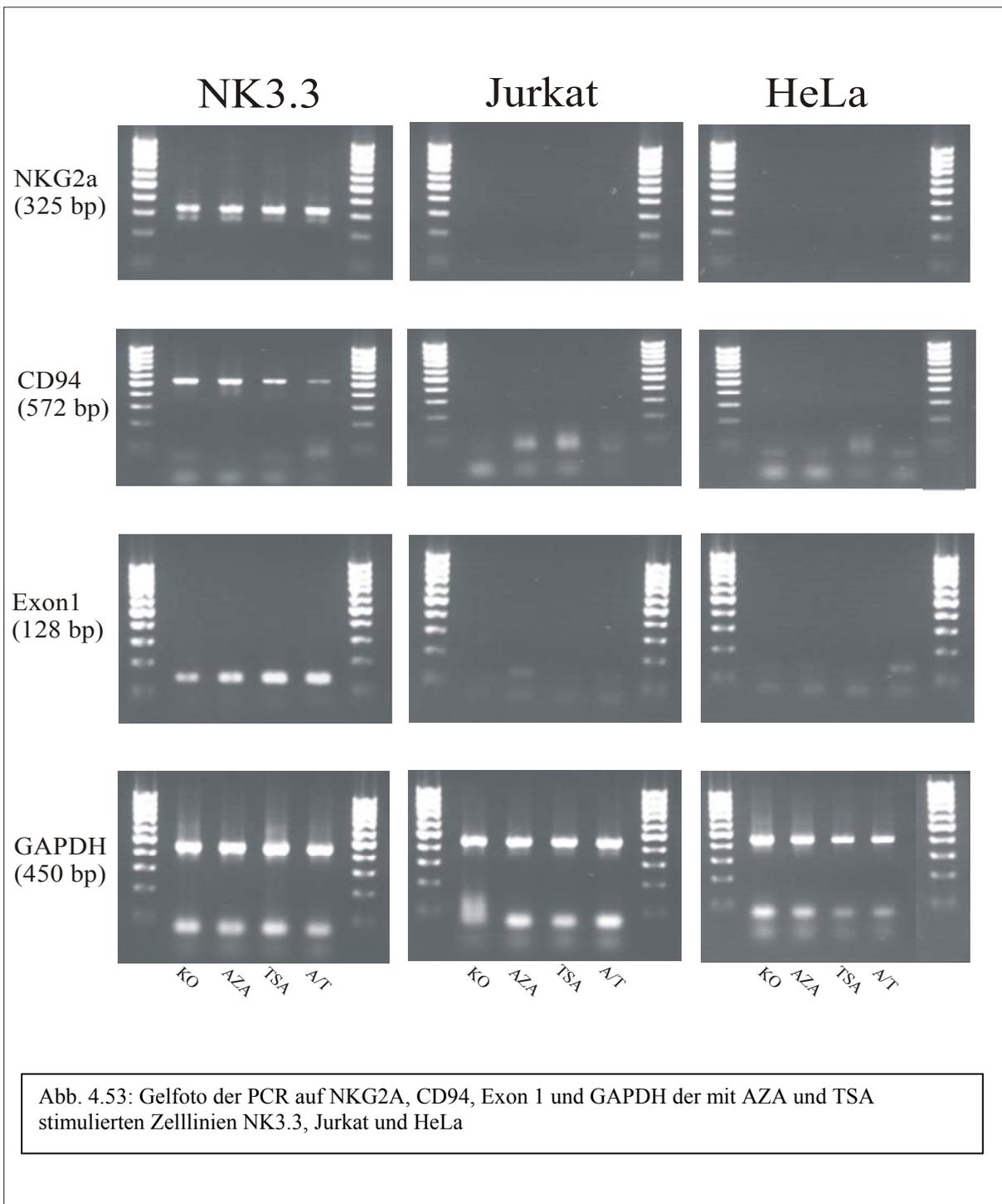
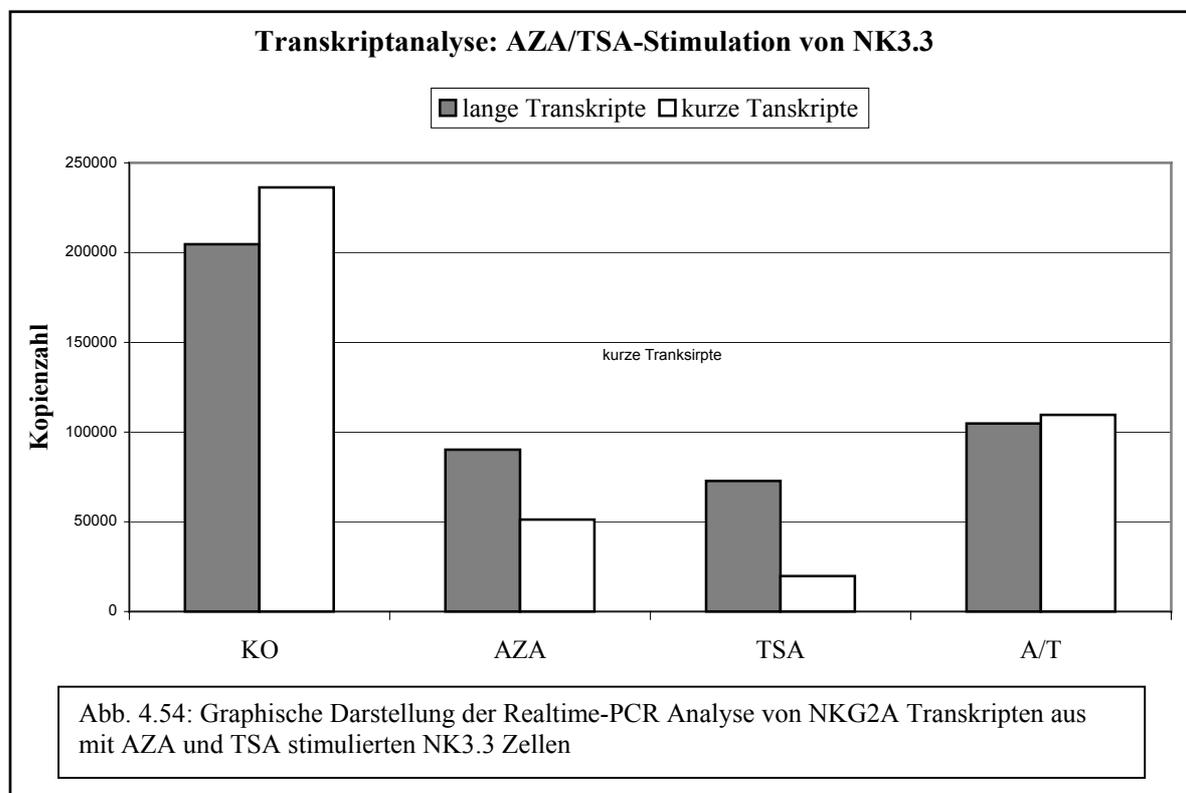


Abb. 4.53: Gelfoto der PCR auf NKG2A, CD94, Exon 1 und GAPDH der mit AZA und TSA stimulierten Zelllinien NK3.3, Jurkat und HeLa

4.5.2.4 Transkriptanalyse in NK3.3 nach AZA und TSA Stimulation

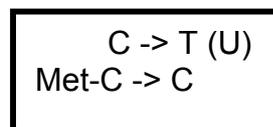
Es konnten sowohl NKG2A als auch CD94 weder durch AZA noch durch TSA Stimulation induziert werden. Das Gegenteil ist der Fall. Wie aus Realtime-PCR Analyse der Transkriptpopulationen in Abbildung 4.54 deutlich wird, hat eine Inkubation mit beiden Reagenzien sogar einen suppressierenden Effekt auf die Transkripte. Die Inkubation mit AZA als auch TSA führt zu einer Reduktion von NKG2A Transkripten in der so behandelten NK3.3 Zelllinie, den gleichen Effekt zeigte die Stimulation primärer NK-Zellen (Daten nicht gezeigt).



4.5.3 Methylierungsstatus-Analyse

Die Basis für die Anwendung dieser Methode ist die Beobachtung, dass die Methylierung von CpGs in Promotorbereichen von Genen mit deren transkriptioneller Inaktivierung einhergehen. Die Hypermethylierung bzw. die Hypomethylierung von Promotorstrukturen ist eine Möglichkeit, regulatorischen Einfluss auf die Genexpression zu nehmen. Die Alu-Sequenz des NKG2A Promotors weist gleich mehrere solcher CpGs auf.

Zur Unterscheidung von methylierten und unmethylierten Cytosinen macht man sich die Eigenschaft von Bisulfit zu Nutze, unmethylierte Cytosine in Uracil umzuwandeln, während sich methylierte Cytosine chemisch inert verhalten. Bei anschließender Sequenzierung werden alle umgewandelten (unmethylierten) Cytosine als Uracile bzw. Thyminde gelesen, während die methylierten als Cytosine verbleiben. Ein Vergleich der ursprünglichen DNA-Sequenz mit der konvertierten offenbart also, welche Cytosine methyliert vorliegen.



Da die, dem Konvertierungskit beiliegende, Gebrauchsanweisung nicht den gewünschten Erfolg erbrachte, d.h. es verblieben auch nichtmethylierbare Cytosine als solche, wurden Modifikationen vorgenommen. Aufgrund der repetitiven Struktur der Alu-Sequenz, die vermutlich sehr stabile Sekundärstrukturen bilden kann, wurden die Randbereiche des Alus initial mit Restriktionsenzymen verdaut. Kurzzeitige Erhitzungen auf 95 °C sollten ebenfalls die Strukturen für die Konvertierung zugänglich machen (siehe Konvertierung, S.60).

Wie aus Abbildung 4.55 ersichtlich ist, weist die NKG2A exprimierende NK-Zelllinie NK3.3 eine nahezu unmethylierte Alu-Sequenz auf. Residual verbleibende Methylgruppen könnten noch methodisch bedingt sein. Die NKG2A-negative T-Zelllinie Jurkat (Abb. 4.56) hat eine fast komplett methylierte Alu-Sequenz, was mit der Nichtexpression von NKG2A als mRNA bzw. als Rezeptor auf der Zelloberfläche korreliert (siehe FACS-Daten S.75; Transkriptanalyse S. 81).

Alu-Sequenz: NK3.3 (NKG2A⁺)

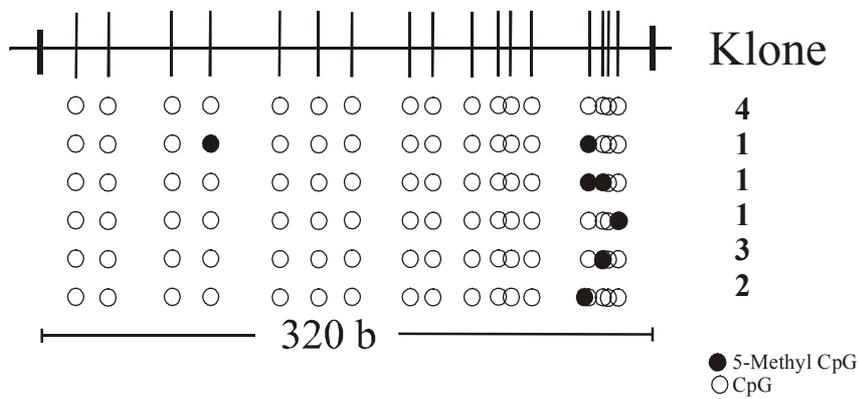


Abb. 4.55: Schematische Darstellung des Methylierungsstatus der CpGs in der Alu-Sequenz in der NK3.3 NK-Zelllinie

Alu-Sequenz: Jurkat (NKG2A⁻)

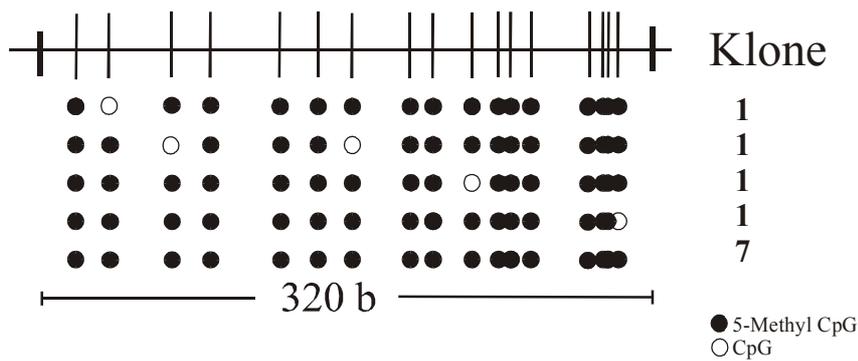


Abb. 4.56: Schematische Darstellung des Methylierungsstatus der CpGs in der Alu-Sequenz in der Jurkat T-Zelllinie

4.5.4 ChIP (Chromatin-Immunopräzipitation):

In eukaryotischen Zellen ist die DNA mit Histonproteinen und Nichthistonproteinen assoziiert und bildet das Chromatin. Die innere Kernstruktur eines solchen Nucleosoms besteht aus dem Histonoktamer, gebildet von jeweils 2 Molekülen H2A, H2B, H3 und H4, um die sich in $1\frac{3}{4}$ Windungen 146 bp DNA windet. Die Struktur des Chromatins verhindert normalerweise den Zugang von Transkriptionsfaktoren zu ihren Bindungsstellen, deshalb ist es notwendig, die Chromatinstruktur zu verändern, damit diese Faktoren binden können. Es gibt zwei Mechanismen, welche die Chromatinstruktur verändern und so einen Zugang ermöglichen: Die ATP-abhängige Repositionierung der Nucleosomen bzw. die posttranslationelle Modifikation der Lysingruppen der N-terminalen Enden der Kernhistone H3 und H4 durch acetylgruppenübertragende Enzyme (Histonacetyltransferasen, HAT). Diese Modifikation führt dazu, dass die positiv geladenen Histonenden neutralisiert werden, und die negativ geladene DNA in einem weniger dichten Zustand um das Histon liegt. Im Gegensatz zu diesem Mechanismus gibt es auch Histondeacetylasen (HDAC), die eine, durch Verdichtung nach sich ziehende, Repression der Transkription verursachen. Das Gleichgewicht zwischen Acetylierung und Deacetylierung kann die Genexpression bestimmen (Chang, 2000). Es wurde vermutet, dass diese Modifikationen bzw. deren Kombination einen Code darstellt, der den jeweiligen oder möglichen transkriptionellen Status eines Gens widerspiegelt (Jenuwein, 2001). Und in der Tat konnte eine Lesbarkeit der Modifikationen durch obengenannte Enzyme bzw. Enzymkomplexe nachgewiesen werden, doch schein dies nicht universell zu gelten, sondern vielmehr auf dem Genkontext zu beruhen (Turner, 2002). So ist die Acetylierung der beiden Lysine K4 und K9 im Histon 3 mit transkriptionell aktiven Genen bzw. bei letzterer Modifikation auch mit potentieller Aktivierbarkeit korreliert, da Mitglieder des basalen Transkriptionskomplexes an diese Modifikation binden können (Turner, 2002; Agaloti, 2000).

Neben der Lysin-Acetylierung können auch Methylierungen die Lysine modifizieren: Sie können eine, zwei oder drei Methylgruppen tragen, wobei jede Modifikationsstufe einen anderen funktionellen Effekt haben kann. Eine Dimethylierung des Lysins 9 im

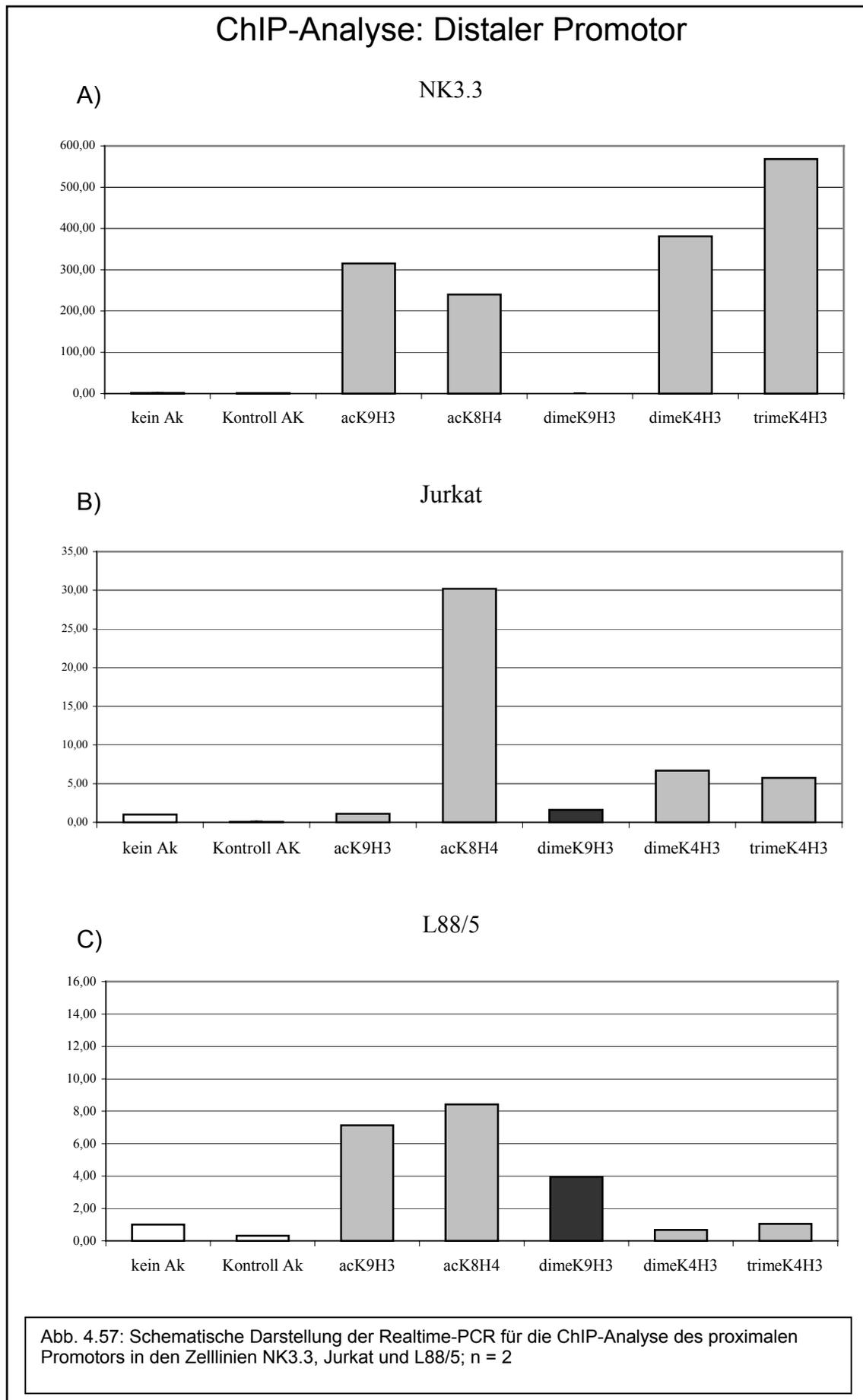
Histon 3 (dimK9H3) geht meist mit einer transkriptionellen Repression einher (Jiang, 2004). Die Dimethylierung des Lysins 4 im Histon 3 (dimK4H3) kommt sowohl in aktiven als auch inaktiven Promotoren sowie in deren codierenden Sequenzen vor, während die Trimethylierung des Lysins 4 im Histon 3 (triK9H3) im Zusammenhang mit Transkriptionsvorgängen steht (Santos-Rosa, 2002). Dies zeigt wiederum, dass die Modifikationen immer im Genkontext gelesen werden müssen und keine allgemeingültige Aussage zulassen.

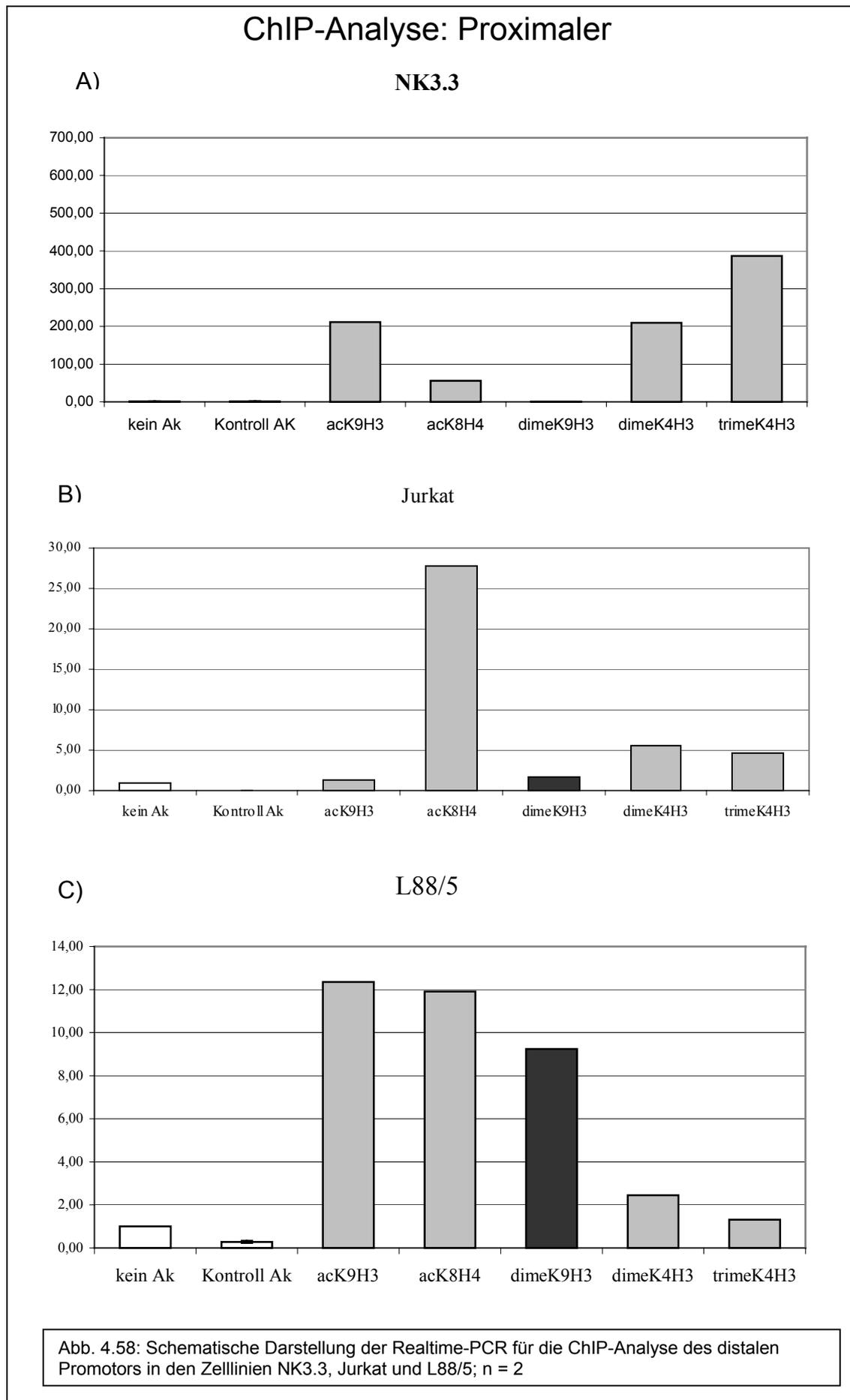
4.5.4.1 ChIP-Analyse des distalen Promotors

Aus der Abbildung 4.57 wird deutlich, dass in der NKG2A exprimierenden NK-Zelllinie NK3.3 (A) im distalen Promotorbereich ein hoher Acetylierungsgrad der Histone H3 und H4 vorliegt, während der Marker für inaktive Gene (dimeK9H3) kaum zu detektieren war. Auch der hohe Anteil an di- und trimethylierten Lysin 4 im Histon 3 sprechen für die Transkription des NKG2A Gens. Im Gegensatz dazu weist die Analyse der NKG2A-negativen T-Zelllinie Jurkat (B) eine recht geringe Acetylierung der Histone H3 und H4 auf - man beachte die y-Achse, was mit einer Geninaktivität einhergeht. In der Knochenmarkstromazelllinie L88/5 (C), die als Negativkontrolle verwendet wurde, liegt der geringste Acetylierungsgrad von Histon H3 und H4 vor. Hier ist auch ein Anstieg der Dimethylierung des Lysins 9 im Histon 3 erkennbar, ein Indiz dafür, dass der Promotor in einem inaktiven, verdichteten Chromatinzustand vorliegt.

4.5.4.2 ChIP-Analyse des proximalen Promotors

Ein ähnliches Bild (Abb. 4.58) zeigt die Analyse des proximalen Promotorbereichs von NKG2A. Während in der NKG2A-positiven NK3.3 Zelllinie (A) ein hoher Anteil von Markern für aktive Gene (acK9H4 und trimeK4H3) detektiert werden kann, und der Marker für Geninaktivität (dimeK9H3) nahezu undetektierbar gering vorliegt, weisen die Zelllinie Jurkat (B) und L88/5 (C) eine geringe Histonacetylierung und eine höhere Dimethylierung am Lysin 9 des Histons 3 auf.





4.5.5 Zusammenfassung Teil Epigenetik

- Die Stimulation mit AZA und TSA konnte zwar in der NK-Zelllinie YT eine NKG2A Induktion sowohl mit AZA als auch mit TSA erzielen, eine Mischung beider zeigte einen synergistischen Effekt, doch konnte dieser Effekt weder mit anderen Zelllinien noch primären NK- oder T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺) reproduziert werden.
- Auch die Transkriptanalyse nach AZA und TSA Stimulation konnte zeigen, dass weder NKG2A noch das mit ihm assoziierte CD94 induziert werden konnten.
- Die Methylierungsstatus Analyse der vor dem Exon 2 befindlichen Alu-Sequenz ergab eine unmethylierte Alu-Sequenz in der NKG2A exprimierenden NK-Zelllinie NK3.3 und eine methylierte Alu-Sequenz in der NKG2A-negativen T-Zelllinie Jurkat.
- Die Chromatin-Immunopräzipitation zeigt, dass die NKG2A exprimierende NK-Zelllinie NK3.3 sowohl im distalen als auch proximalen Promotor eine offene Chromatinstruktur aufweist. Die NKG2A-negative T-Zelllinie Jurkat und Knochenmarkstromazelllinie L88/5 weisen in beiden Promotoren eine geschlossene Chromatinstruktur auf.

5 DISKUSSION

Absicht dieser Arbeit war es zu klären, wie das humane *NKG2A* Gen reguliert wird. Die Charakterisierung von zwei Transkriptpopulationen, die jeweils vor dem nichttranslatierten Exon 1 bzw. vor dem Exon 2 initiieren (Plougastel, 1998), legt die Vermutung nahe, dass es auch zwei Promotoren gibt. Während eine kürzlich publizierte Arbeit nur einen distalen Promotorbereich identifizieren konnte, der GATA-3 abhängig reguliert zu sein scheint (Marusina, 2005), war es hier möglich, sowohl vor dem Exon 1 einen distalen Promotorbereich als auch einen proximalen Promotor vor dem Exon 2 zu identifizieren. Es konnte im distalen Promotorbereich eine stromaufwärts aktivierende Sequenz (SAS) sowie der eigentliche sehr kurze Minimalpromotor identifiziert werden, der komplex reguliert zu sein scheint. Im Gegensatz dazu arbeitet der stärkere proximale Promotor TATA-Box-abhängig und verliert mit zunehmender Verkürzung an Aktivität. Durch die Transkriptanalyse konnte gezeigt werden, dass in NK-Zellen, im Unterschied zu T-Zellen, die kurzen Transkripte dominieren, wobei dies nicht statisch ist, sondern durch Stimulation mit Zytokinen verändert werden kann. Es konnte auch gezeigt werden, dass in NK-Vorläuferzellen, anders als bei reifen NK-Zellen, die langen Transkripte dominieren. Obwohl die Daten zum Methylierungsstatus der Alu-Sequenz vor dem Exon 2 im *NKG2A* Gen und die Analyse der Histonmodifikationen in den beiden Promotorbereichen Hinweise auf eine epigenetische Regulation gaben, konnte keine Induktion der Expression von *NKG2A* und *CD94* durch Hemmer der DNA-Methyltransferase oder Deacetylasehemmer hervorgerufen werden.

5.1 Ein distaler, TATA-loser Promotor, der durch eine stromaufwärtsgelegene aktivierende Sequenz (SAS) reguliert wird

Der distale Promotorbereich weist keine klassische TATA-Box auf, die Transkriptionsstartpunkte sind dementsprechend vor dem untranslatierten Exon 1 verteilt (Plougastel, 1998). Die Promotoranalysen in der NK-Zelllinie NK3.3 ergaben, dass die Promotoraktivität nicht scharf abgegrenzt, sondern auf einen Bereich verteilt ist. Sowohl ein 26 bp Fragment als auch ein weiter stromabwärts gelegenes 45 bp Fragment zeigten Aktivität. Das 26 bp Fragment kann durch eine weiter

stromaufwärts gelegene aktivierende Sequenz (SAS) in seiner Aktivität gesteigert werden, ohne jedoch die des 45 bp Fragments zu erreichen. Der Aktivitätsverlauf ist umgekehrt – je länger das Fragment wird, desto geringer wird seine Aktivität, was auf nicht identifizierte, inhibitorische Sequenzbereiche schließen lässt. Es konnte gezeigt werden, dass das 73 bp Fragment als aktivierende Sequenz eine GATA Bindungsstelle aufweist, welche die inhibitorische Wirkung im 50 bp Fragment in lymphozytären Zellen kompensieren konnte. Eine Verlängerung der Fragmente bis zum 45 bp Fragment erbrachte eine weitere Aktivitätssteigerung, proportional zu den Ausgangsaktivitäten. Es ist also durchaus denkbar, dass die DNA-Sequenz in diesem Bereich die Grundaktivität bestimmt, während die weiter 5' gelegenen Bereiche modulatorisch bzw. auch Zelltyp-spezifisch diese Grundaktivität verändern könnten. In der Publikation von Marusina et al. (2005) wurde anhand eines DNase-I-Verdau ein DNase-I-sensitiver Bereich (DNase hypersensitiv site; DHS1) im distalen Promotor identifiziert, der Anhaltspunkt dafür ist, dass in der Nucleosomstruktur einer NKG2A exprimierenden NK-Zelllinie (NKL) eine Veränderung stattgefunden hat, die es dem Enzym ermöglicht, in diesem Bereich die DNA zu schneiden. Weiter wurden zwei GATA-Bindungsstellen identifiziert (GATA-Bindungsstelle I und II). Diese Bindungsstellen sind nahezu mit den in dieser Arbeit charakterisierten GATA2 und GATA1 Bereichen identisch, wobei GATA2 der Bindungsstelle I und GATA1 der Bindungsstelle II entspricht. Ferner wurde in der Publikation eine Bindung von GATA-3 an der GATA-Bindungsstelle II *in vitro* (Pull-down-Assay) und *in vivo* (ChIP-Assay) nachgewiesen, eine Kotransfektion eines GATA-3 Expressionsvektors und eine Inhibition der GATA-3 mRNA über siRNA (small interference RNA) untermauern die Wichtigkeit dieses Faktors in der NKG2A Regulation des distalen Promotors. Unterschiede ergeben sich aber im Bezug auf die durchgeführten Promotoranalysen, welche die Bindungsstelle II als essentielle definieren und nicht Bindungsstelle I (GATA2 in dieser Arbeit). Mögliche Erklärung hierfür sind die recht langen Konstrukte (3900 bis 2300 bp), die verwendet wurden, d.h. es wurden Fragmente erzeugt, die in 5' Richtung weit über die, in dieser Arbeit definierte, stromaufwärts gelegene Aktivatorsequenz (SAS) hinaus, das nichttranslatierte Exon 1 und Intron 1 umfassend, bis ins Exon 2 hineinragen (+15). Sukzessive Verkürzungen vom 5' Ende bis zum Exon 1 und *in vitro* Mutationen der GATA Bindungsstellen I und II führten zu deren Identifizierung. Es war nur die Aktivität des distalen Promotors messbar,

obwohl der proximale Promotor in den Fragmenten enthalten war. Dieser Effekt spricht dafür, dass zwischen dem distalen und proximalen Promotor eine Art Puffer existiert, der verhindert, dass die Aktivität des distalen Promotors Auswirkungen auf den proximalen hat (Interferenz; Proudfoot, 1986). Es wurde in der Publikation berichtet, dass zwar Versuche unternommen wurden, das Intron 1 aus den Fragmenten zu deletieren, aber da die Fragmente erst 40 bp vor dem Exon 2 beginnen, hätte auch hier keine Änderung der Aktivität gemessen werden können, da die Promotoraktivität, wie die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, erst ab ca. 60 bp messbare Werte liefert. Es sind zwar hier auch längere Fragmente, 1215 bp für den distalen und 1134 bp für den proximalen Promotor, erstellt worden, die aber nur geringe Aktivität zeigten. Es wurde kein Fragment erstellt, welches beide Promotorbereiche in einem Konstrukt vereint. Die langen Fragmente scheinen nicht identifizierte, regulatorische Sequenzen zu beinhalten, die auch die in der Publikation dargestellte Zelltyp-spezifische Promotoraktivität (NK-Zelllinie YT-Indy gegen Jurkat bzw. K562) erklären könnten (Ljusic; NKRP1C, 2003). Grundsätzlich sind lange Fragmente in der Promotoranalyse vorzuziehen, da sie der *in vitro* Situation der DNA eher entsprechen. Es kann aber eine Regulation über Nucleosomen, die Teilbereiche wie Enhancer oder Silencer blockieren bzw. aktivieren könnten, für das humane *NKG2A* Gen nicht ausgeschlossen werden (Brostjan, 2000; Gunturi, 2005), deshalb müssen diese Daten mit Vorsicht interpretiert werden. Außerdem erfolgte nur die Promotoranalyse und nicht die anderen Experimente in der Zelllinie YT-Indy, einer Sublinie der YT-Zelllinie, die schon in dieser Arbeit bei den Stimulationsversuchen mit AZA und TSA artifizielle Daten lieferte. Für die Mutterzelllinie ist bekannt, dass sie konstitutiv IL-10 produziert (Mehrotra, 1998) und so vielleicht die Promotordaten der Publikation mit YT-Indy die Promotoraktivität nach IL-10 Stimulation widerspiegelt. Wie der Vergleich der Transkriptpopulationen gezeigt hat, entspricht die YT-Zelllinie eher dem T-Zell-Profil mit der Dominanz der langen Transkripte. Es könnte sich bei der YT-Indy Zelllinie auch um einen NK-Zell-Vorläufer handeln, bei dem, wie für die differenzierenden NK-Zellen gezeigt, die langen Transkripte dominieren. GATA-3 Expression kann schon in humanen CD34-positiven Stammzellen aus Nabelschnurblut und adultem Knochenmark nachgewiesen werden (Toor, 2001), so dass es in frühen NK-Zell-Vorläufern den distalen Promotor aktiveren könnte. Es ist auch bei der Analyse der KIR-Promotoren ein unterschiedliches Verhalten der YT-

Indy Zelllinie im Vergleich zu NK3.3 bzw. primären NK-Zellen bekannt (Trompeter, 2005).

Die in der vorliegenden Arbeit identifizierte stromaufwärts aktivierende Sequenz (SAS) ist kein eigenständiger Promotorbereich, sondern kann ihre Aktivität nur in Verbindung mit einem Promotorbereich des distalen Promotors, speziell des getesteten 3' Endes vom 26 bp Fragment, entfalten. Aber die SAS ist kein Enhancer im eigentlichen Sinne, da er nicht richtungsneutral auf jeden benachbarten Promotor wirkt (Mueller, 1988) und im Fusionsfragment mit dem 163 bp Konstrukt des proximalen Promotors zu keiner Aktivitätserhöhung führte. Es stellt sich die Frage nach dem eigentlichen Transkriptionsfaktor, der hier seine Wirkung entfaltet bzw. nach dem Inhibitor, der 10 bp stromaufwärts diese Aktivität schon wieder unterdrückt. Die SAS liegt direkt am 3' Ende einer LINE-Sequenz, einem Transposon, das sowohl in Promotorbereichen als auch proteincodierenden Sequenzen von Genen gefunden werden kann. Durch seine mobile Fähigkeit kann es sowohl die befallenen Gene ausschalten (Han, 2004), als auch Teilsequenzen des alten Integrationsort mit in den neuen einfügen (Esnault, 2000). Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Bereich im NKG2A Gen, ähnlich wie für die TATA-Box beschrieben (Sewack, 2001), durch Verschiebung des Nucleosoms reguliert werden könnte.

Der Sequenzvergleich für den distalen Promotor mit den wichtigen GATA-Bindungsstellen (GATA2 und GATA1) zeigt im Vergleich von humanen NKG2A mit NKG2C bzw. NKG2E, dass zwar die Sequenzbereiche sehr homolog sind, sich die GATA-Bindungsstellen jedoch durch einen Basenaustausch unterscheiden. Hier sind NKG2C und NKG2E sich ähnlicher. Das gleiche Bild zeigt sich auch für das 26 bp und 45 bp Fragment, die eigenständige Promotoraktivität aufwiesen. In wie weit diese Sequenzen Einfluss auf die jeweiligen Gene haben könnten sei dahingestellt, da es zur Zeit keine detaillierte Promotoranalyse für NKG2C und NKG2E gibt. Der Vergleich des distalen Promotors vom humanen NKG2A mit dem murinen Sequenzbereich zeigte, dass sie nur geringe Homologien aufweisen. Es ist zu vermuten, dass trotz sehr ähnlichem Expressionsmuster des Rezeptors (Vance, 2002), eine Aminosäuresequenz Homologie von 45 % und der Spleissvariante (NKG2B), welche die Schaftregion betrifft (Lohwasser, 1999), die Regulation der

Gene durch ähnliche, aber doch unterschiedliche Faktoren bestimmt wird. Allgemein scheint das humane CD94 Gen (Lieto, 2003) dem murinen (Wilhelm, 2003) ähnlicher zu sein als das NKG2A Gen, was sich in der Promotorstruktur mit zwei Promotoren, die CAAT- und TATA-Box unabhängig arbeiten, widerspiegelt (Lieto, 2003).

5.2 Identifikation eines zweiten, proximal gelegenen, TATA-abhängigen Promotors

Der in dieser Arbeit erstmals identifizierte proximale Promotor zeigte stärkere Aktivität als der distale Promotor und steht damit in Korrelation mit den Auswertungen der Transkriptanalyse, die zeigen, dass grundsätzlich in diesen Zellen mehr kurze Transkripte vom proximalen Promotor als lange vom distalen Promotor vorliegen. Der proximale Promotor ist ein klassischer TATA-Box-abhängiger Promotor, der die Transkription nur an zwei Stellen erlaubt (Plougastel; 1998), was auf die startpunktpositionierende Wirkung der TATA-Box zurückzuführen ist (Martinez, 1994). Eine Analyse von zwei TATA-Boxen, von denen TATA-Box 1 schon als putative TATA-Box publiziert wurde (Plougastel, 1998), zeigte, dass nur die hier in dieser Arbeit identifizierte TATA-Box 2 einen Einfluss auf die Promotoraktivität hatte. Eine sukzessive Fragmentverkürzung zog eine allmähliche Verringerung der Luziferaseaktivität nach sich, es konnte keine Transkriptionsfaktor Bindungsstelle identifiziert werden, die einen totalen Aktivitätsverlust zur Folge hatten. Die einzige auf den proximalen Promotor regulatorisch wirkende Sequenz konnte im Intron 2 gefunden werden, welche die Promotoraktivität erheblich reduzieren konnte, im Gegensatz zum Exon 2, welches keinen Einfluss auf den proximalen Promotor zu haben scheint. Es sind sowohl für Exons als auch Introns sowohl Aktivatoren als auch Silencer beschrieben, die, auch richtungsspezifisch, den vorgelagerten Promotor beeinflussen können (LeHir, 2003; Youn, 2001). Während das Exon 2 keinerlei Wirkung auf die Promotoraktivität ausübte, kann die inhibierende Wirkung des Intron 2 durch einen potentiell vorhandenen intronischen Silencer begründet sein. Für das humane CD21 Gen ist im ersten Intron ein Zelltyp-spezifischer Silencer/Enhancer Bereich beschrieben, der Chromatinstruktur-abhängig und

spezifisch den Promotor regulieren kann (Komplement Rezeptor Typ 2; Zabel, 2000).

Der Sequenzvergleich für den proximalen Promotor mit der wichtigen TATA-Box zeigt im Vergleich von NKG2A mit NKG2C bzw. NKG2E, dass zwar die Sequenzbereiche für die ersten 70 bp recht homolog sind, doch in NKG2C und NKG2E erfolgte eine Schwächung der TATA-Box durch einen Basenaustausch. Der übrige Sequenzbereich weist schon geringere Homologie auf. Der Vergleich der Sequenzen des proximalen Promotors vom humanen NKG2A Gen mit dem murinen Gen zeigt, dass hier sehr große Sequenzunterschiede vorliegen.

5.3 Das NKG2A-Modell – ein duales Promotorsystem

Es stellt sich die Frage, warum das humane *NKG2A Gen* über zwei Promotoren verfügt. Aus den Promotordaten geht hervor, dass die Fragmente des proximalen Promotors in allen getesteten Zelllinien und primären Zellen, trotz unterschiedlicher absoluter Luziferasehöhen, doch gleiche Aktivitätsmuster aufweisen, wobei beide Promotoren jeweils auch gleichzeitig Aktivität zeigen. Es liegt also weder Gewebespezifität noch Differenzierungsspezifität vor, bei der jeweils ausschließlich einer der Promotoren aktiv ist. Bei gleichzeitiger Aktivität scheint aber der distale Promotor einer komplexeren Regulation zu unterliegen, der proximale nicht oder nur unter bestimmten Bedingungen (Intron 2; Zytokinstimulation). Stellt man die Promotordaten den Transkriptanalysen gegenüber, so fällt auf, dass zwar die langen Transkripte in den T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺) dominieren, die Aktivitätsmuster der Promotoranalyse in NK3.3 und Jurkat aber ähnlich sind. Wenn es also gewebsspezifische, regulatorische Sequenzen gäbe, müssten sie im distalen Promotorbereich zu finden sein.

Die NKG2A Expression scheint ein fester Bestandteil des NK-Zell-Differenzierungsprogramms zu sein, da es verhindert, dass reife NK-Zellen normale Zellen töten. Es löst wahrscheinlich das 2B4 (CD244) ab, das schon früh während der Entwicklung auf CD34⁺ Stammzellen exprimiert wird und mit

zunehmender NK-Zell-Differenzierung einen Funktionswechsel vom inhibierenden zum aktivierenden Rezeptor vollzieht (Speiser, 2001; Chuang, 2001). In CD4⁺ Helferzellen und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen ist die NKG2A Expression nur zu einem bestimmten Zeitpunkt (naive T-Zellen) induzierbar und auf eine kleine Subpopulation beschränkt. Hier scheint die Expression komplexer reguliert zu sein als in NK-Zellen, wenn sie nicht sogar durch andere Faktoren reguliert wird.

Ein duales Promotorsystem mit nichttranslatierten Exons ist für die Gene im NK-Zell-Cluster nicht selten. Neben dem humanen und murinen CD94 Promotor (Lietao, 2003; Wilhelm, 2003) weisen auch das murine *NKRP1C* Gen (Ljutic, 2003) und die Ly49 Familie mindestens zwei, meist Zelltyp-spezifisch regulierte Promotoren auf. Für letzteres Gen bzw. Genfamilie ist sogar ein dritter Promotor beschrieben, der ausschließlich in fetalen NK-Zellen oder Thymozyten und auch im Knochenmark aktiv ist (Ljutic, 2003; Saleh, 2002). Es scheint also, dass ein „Initiatorpromotor“ seine Aktivität, differenzierungsabhängig, auf die stromabwärts gelegenen Promotoren überträgt. Die NKG2A Transkriptanalyse von, auf OP-9 kokultivierten, CD34⁺ Stammzellen zeigt ebenfalls eine Dominanz der Transkripte, die vom distalen Promotor stammen. In reifen NK-Zellen liegt aber die Hauptaktivität im proximalen Promotor, was sowohl durch die Transkriptanalyse als auch die Promotoranalyse untermauert wird. Auch die in T-Zellen, sowohl bei CD4⁺ Helferzellen als auch CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen, induzierte NKG2A Expression wird präferenziell vom distalen Promotor initiiert, ein Hinweis darauf, dass die Induktion am distalen Promotor beginnt, aber die Hauptaktivität langfristig (in NK-Zellen) vom proximalen Promotor übernommen wird. Da die Transkripte vom proximalen Promotor kürzer sind, könnten sie zwar schneller produziert, aber auch wieder abgebaut werden. Dies würde den NK-Zellen ermöglichen, relativ schneller und feiner die NKG2A Expression zu regulieren als die T-Zellen. Es wäre aber auch denkbar, dass die Transkriptaktivität des distalen Promotors die Aktivität des proximalen Promotors erst ermöglicht, da er initial die Nucleosomen nach der Transkription verschiebt und so eine offene Chromatinstruktur verursacht. Es ist auch denkbar, dass der distale Promotor den Genabschnitt durch seine Aktivität kontinuierlich offenhält, damit der proximale Promotor arbeiten kann. Dies wird durch die Publikation von Marusina et al. (2005) unterstützt, die zeigt, dass vor dem Exon 1 ein DNase-I-sensitiver Bereich (DHSI) in

der NKG2A exprimierenden NKL Zelllinie zu finden ist, die den distalen Promotor beinhaltet. Es ist für den murinen Th2 Genlocus (IL-4/IL-13) gezeigt worden, dass GATA-3 hier einen DNase-I-sensitiven Bereich durch seine Chromatin-struktur verändernde Aktivität schafft (Takemoto, 2002). Im humanen CD8 Genkomplex fallen sogar GATA-3 Bindungsstelle, DHSI und eine Matrix-Anheftungsregion (matrix association region, MAR) in einem Sequenzbereich zusammen. Eine Matrix Anheftungsregion verankert die Chromatinschleifen der Kernmatrix und ist Ausgangspunkt für Änderungen in der Chromatindichte (Kieffer, 2002). Auch der bereits erwähnte NKR-P1C Locus zeichnet sich durch eine DHSI vor dem differenzierungsspezifischen dritten Promotor (fetal) aus (Ljusic, 2003).

Der distale NKG2A Promotor sorgt in der frühen Entwicklungsphase der NK-Zelle dafür, dass frühzeitig und ausreichend NKG2A Transkript produziert wird, damit die NK-Zelle inhibitorische Signale empfangen kann. Langfristig übernimmt der proximale Promotor die Hauptaktivität, doch durch Zytokininduktion können sowohl der distale als auch der proximale Promotor hochreguliert werden. Die unterschiedliche Sensitivität der Promotoren für unterschiedliche Zytokine könnte Ausdruck der Fähigkeit sein, auf unterschiedliche Zytokingemische mit abgestufter NKG2A Expressionsstärke zu reagieren. Doch bleibt die Frage offen, ob die Zytokine direkt die Promotoren beeinflussen oder vielleicht doch indirekt die unterschiedlich langen Transkripte Ziel der Regulation sein könnten. Wird die Transkriptmenge vielleicht nicht durch die Promotorstärke, sondern auf Transkriptebene reguliert? Die längeren Transkripte, die vor dem Exon 1 initiieren, könnten Angriffspunkt regulatorischer Faktoren sein, welche die mRNA stabilisieren (Chen, 2000), oder einfach durch ihre Länge stabiler sein als die kurzen. Eine Studie, die NKG2 Expressionsmuster von NK-Zell-Klonen miteinander verglichen hat, zeigt, dass die mRNA mit der Oberflächenexpression klar korreliert, aber die absolute Transkriptmenge von NKG2A von Zellklon zu Zellklon stark variieren kann. Es konnte lediglich ein konstantes Verhältnis zwischen NKG2A und der Spleissvariante NKG2B nachgewiesen werden (Brostjan, 2002).

Das untranslatierte Exon 1 weist eine interne Ribosom Erkennungssequenz (internal ribosome entry site; IRES) auf, die es den langen NKG2A Transkripten ermöglicht

über Cap-unabhängige Mechanismen translatiert zu werden, wenn die Cap-abhängige Translation z.B. infolge von Virusinfektionen oder Hitzeschock-Induktion blockiert sein sollte (Pozner, 2000). Die Aktivität des distalen Promotors könnte also die NKG2A Expression im Falle einer Virusinfektion sichern, so dass die NK-Zelle, trotz Infektion, inhibitorische Signale empfangen kann.

Die Analysen von NKG2A und seiner wichtigsten Spleissvariante NKG2B zeigen, dass dieses Verhältnis nicht mit dem der Transkriptpopulationen korreliert. Sobald NKG2A Transkript produziert wird, ist auch NKG2B vorhanden, dies könnte ein weiterer Sicherungsmechanismus sein. Für das murine Ly49A ist ein Regulationsmechanismus beschrieben worden, nach dem Ly49A Rezeptoren nicht nur mit den Liganden auf einer Targetzelle („trans“) interagieren können, sondern auch mit den Liganden auf der eigenen Zelle („cis“), es wird als Regulationsmechanismus diskutiert, der die Aktivierungsempfindlichkeit betrifft (Doucey, 2004). Da im NKG2B die Schaftregion (Exon 4) fehlt, sollte dementsprechend der Rezeptor kürzer sein als das NKG2A-Molekül. Während NKG2A sowohl als Trans-Rezeptor als auch als Cis-Rezeptor fungieren könnte, hätte NKG2B nur eingeschränkte Bindungsfreiheit und könnte nur als Trans-Rezeptor arbeiten. Es stünde somit auch bei eigener Hochregulation des NKG2A-Liganden (HLA-E) immer noch der NKG2B Rezeptor für die Inhibition durch die targetzelleigenen HLA-E Moleküle zur Verfügung. Alternativ könnte das Fehlen der Schaftregion, die Ziel von Glykosylierungen (Moody, 2001; Mason, 2003) ist, ein anderes Ligandenspektrum abdecken (HLA-E gegen HLA-G; Perez-Villar, 1997).

5.4 Induktion der *de novo* Expression von NKG2A auf T-Zellen durch Zytokine

In dieser Arbeit konnte nach modifizierten Protokollen von Romero et al. (2001) und Mingari et al. (1998) jeweils NKG2A auf CD4⁺ Helferzellen und zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen induziert werden, wobei sich TGF- β für beide Populationen als am besten erwies und IL-10 vornehmlich eine Induktion auf CD4⁺ Helferzellen induzierte. Die Induktionsstärken entsprachen den zu erwarteten Größen. Eine Wirkung von IL-15 auf CD4⁺ Helferzellen oder zytotoxische CD8⁺ T-Zellen allein konnte nicht beobachtet

werden, jedoch ein leichter Synergie-Effekt zusammen mit TGF- β . Der Versuch, eine erfolgreiche NKG2A Induktionsmethode von primären CD4 T-Zellen auf die Jurkat T-Zelllinie zu übertragen, um ggf. ein Modell für die NKG2A Induktion zu haben, schlug fehl. Dies spricht dafür, dass NKG2A nur auf speziellen T-Zellsubtypen zu einem bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung induziert werden kann. Es hat sich gezeigt, dass NKG2A vornehmlich auf murinen Th1-Zellen exprimiert wird (Hartt- Meyers, 2002), auch Th1-polarisierte humane NK-Zellen weisen eine höhere NKG2A Expression auf (Aktas, 2005). Dies kann normale regulatorische Gründe haben, um eine bei einer Immunantwort aktivierte Zelle durch NKG2A Induktion wieder herunter zu regulieren (Romero 2001) bzw. eine andere Immunantwort zu provozieren (von Th1 zu Th2; Jinushi, 2004) oder, im Falle einer Tumorzelle, ein Unterwandern des Immunsystems ermöglichen, um der Zerstörung durch NKG2A exprimierende Zellen zu entkommen (Zhang, 2005).

Die bei der NKG2A Induktion erzielten Ergebnisse werden durch die Publikation von Guerra (1999) unterstützt, die zeigen konnte, dass NKG2A auf allogenen stimulierten CD8⁺ T-Zellen durch TGF- β , nicht jedoch durch IL-15 induziert werden konnte. Und beide Zytokine konnten kein NKG2A auf CD4⁺ Helferzellen induzieren. Diese Diskrepanz wird maßgeblich durch unterschiedliche Zellauswahl begründet, wobei indirekte Effekte, z.B. durch die Zytokinproduktion von Stimulatorzellen, nicht ausgeschlossen werden. Allgemein scheint die Induktion von NKG2A auf T-Zellen ein sehr spezifischer Mechanismus zu sein, der maßgeblich von der Zellauswahl - gesamt MNC Population (Guerra, 1999; Mingari, 1998), intraepitheliale Lymphozyten (Jabri, 2000), GCS-F mobilisierte T-Zellen (Tanka, 2000) und der definierten Stimulationsweise (SEB, α -CD3-Ak, allogene MNC, CD14⁺ Monozyten) abhängt. Es scheint aber, dass ein TCR-Stimulus die NKG2A Expression induziert, während die Zytokinzugabe lediglich den Rezeptor hochzuregulieren vermag (Ortega, 2004; Guerra, 1999). Es gibt die Theorie (Jabri, 2002), nach der CD94 in T-Zellen in TCR-unabhängiger Weise durch IL-15 induziert werden kann, und nur die NKG2A Expression TCR-abhängig verläuft. Die Induktion beginnt mit CD94 als Homodimer mit geringer Oberflächenexpression (CD94^{low}/NKG2A⁻) und geht nach NKG2A-Induktion als Heterodimer mit hoher Oberflächenexpression (CD94^{bright}/NKG2A⁺) hervor. Die Regulation von NKG2A läuft also als negative Feedback-Schleife mit der TCR-Stimulation einher. Das Gegenteil wird in einer Publikation von Derre (2002)

behauptet, die zeigen kann, dass allein IL-12 NKG2A induzieren kann, wohingegen die TCR-Stimulation diesen Effekt potenziert, da sie die Expression des IL-12 Rezeptors fördert. Experimentell wurden indirekte Effekte durch α -IFN- γ und α -IL-15 Antikörper ausgeschlossen. In dieser Publikation wird aber mit der positiven Selektion der CD8 T-Zellen gearbeitet, deren stimulatorischer Effekt nicht zu unterschätzen ist. Es darf auch nicht außer Acht gelassen werden, dass gerade im Bezug auf durchflusszytometrische Analysen der Effekt nicht unbedingt direkt NKG2A betreffen muss, sondern auch CD94, ohne das NKG2A nicht auf der Oberfläche erscheinen kann. Im Speziellen ist für die Oberflächenexpression bzw. Regulation von CD94/NKG2A auf NK-Zellen beschrieben, dass es unabhängig von der Rezeptorvernetzung internalisiert wird, und eher einem Rezeptorrecycling unterworfen ist. Auch scheint der Transport des NKG2A, über Glykosylierung und Disulfidbrückenbindung mit CD94 im ER, und Transport zur Zelloberfläche ein anderer zu sein als z.B. der des NKG2C (endozytischer Transport, DAP-12 abhängige Oberflächenexpression; Borrego, 2002; LaBonte, 2004; Lanier, 1998). Es gibt Zelltyp-spezifische Regulationsmechanismen, so weisen zwar alle NK-Zellen Oberflächenexpression von NKG2A auf (Brostjan, 2002), wohingegen dies nur bei wenigen T-Zellen der Fall ist. Für eine besondere Subpopulation von T-Zellen (invariante $\gamma\delta$ T-Zellen) ist sogar eine stimulationsinduzierte Translokation von intrazellulär präformierten CD94/NKG2A Molekülen beschrieben (Boullier, 1998).

Interessanterweise ist für das humane CD94 Gen gezeigt, dass es ebenfalls über ein duales Promotorsystem arbeitet, bei dem ein konstitutiver, proximaler Promotor durch einen IL-2 und IL-15 induzierbaren Promotor unterstützt wird (Lieto, 2003). In beiden Promotoren konnte eine verschachtelte Interferon- γ -aktivierte Sequenz und eine Ets-Bindungssequenz identifiziert werden. Das Expressionsverhalten von CD94 auf T-Zellen, wie oben beschrieben, drängt die Frage nach einer möglichen koordinierten Induktion bzw. Regulation der beiden Rezeptoren auf. Es konnte aber weder im distalen noch im proximalen NKG2A Promotor eine GAS/EBS (gamma interferon activated sequence/ets binding site) Sequenz identifiziert werden. Eine kürzlich erschiene Publikation zeigt, dass NKG2A auf NK-Zelllinien sowie primären NK-Zellen durch IFN- γ Stimulation hochreguliert werden kann, wobei IFN- α das Gegenteil bewirkt (Zhang, 2005). Es könnten dadurch im NKG2A Promotorsystem

Sequenzmotive vorhanden sein, die bei einer IFN- γ Stimulation neben der Expressionserhöhung von CD94 auch die NKG2A Erhöhung ermöglichen.

5.5 Modulation der NKG2A Expression auf NK-Zellen durch Zytokine

Bei den Stimulationsversuchen von primären NK-Zellen wurde eine IL-2 stimulierte Kontrolle mitgeführt. Wie aus den Transkriptanalysen primärer, expandierter NK-Zellen deutlich wird, scheint vor allem eine Stimulation mit IL-10, IL-15 und TGF- β eine Erhöhung der Transkriptmenge zur Folge zu haben. Während IL-10 die Menge der langen Transkripte erhöhte, waren es bei IL-15 und TGF- β die kurzen Transkripte. Es ist erstaunlich, dass die Inkubation mit IL-12 zu keiner Änderung der Transkriptmenge bzw. der Transkriptzusammensetzung geführt hat, da doch seine NKG2A-induzierende Wirkung auf NK-Zellen beschrieben worden ist (Draghi, 2004). Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Induktion der *de novo* Expression von NKG2A (z.B. auf T-Zellen) auf andere Weise reguliert wird als die Modulation der NKG2A Expression auf NKG2A-positiven Zellen (z.B. auf NK-Zellen). Die Experimente mit T-Zellen könnten ein Hinweis dafür sein, dass eine Induktion durch die TCR-Stimulation induziert werden kann, eine Hochregulation allerdings erst durch Zytokinstimulation (Ortega, 2004; Romero, 2001; Tanaka, 2000; Guerra, 1999). Dies würde die nicht erfolgte Transkripthochregulation durch IL-12 erklären. Vergleicht man diese kurzfristigen Änderungen in primären NK-Zellen (Transkriptanalyse) mit den langfristigen Änderungen (FACS-Analyse), nach 13-tägiger Inkubation, so fällt auf, dass die Zytokine weniger eine induzierende Wirkung, bezogen auf den prozentual Anteil NKG2A-positiver Zellen (in %) hatten, als viel mehr die Rezeptordichte (in MFI) erhöhten. Dabei zeigte sich, dass die IL-15 Stimulation die höchste Rezeptordichte zur Folge hatte, während IL-10 eine Erhöhung und TGF- β eine Verringerung der Rezeptordichte verursachten. Letzteres spricht wieder für eine Unterscheidung in kurzfristige und langfristige zytokininduzierte Effekte. In T-Zellen dominieren, im Gegensatz zu NK-Zellen, die langen NKG2A Transkripte, auch bei der Regulation durch Zytokinstimulation scheint es ähnliche Mechanismen, z.B. mit TGF- β , aber auch Unterschiede, z.B. mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α , IL-1 β und IL-6, zu geben.

Bisher konnte keine Veränderung der NKG2A Expression in den NK-Zelllinien NKL und NK92 festgestellt werden (Brostjan, 2000). Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Inkubationszeit von 5 h mit den getesteten Zytokinen zu kurz gewesen sein könnte. Es wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit expandierte, primäre NK-Zellen verwendet, die über 24 h mit den jeweiligen Zytokinen kultiviert worden sind.

In einer erst kürzlich publizierten Arbeit konnten die gegensätzlichen Effekte von IFN- γ und IFN- α auf die Regulation von NKG2D und NKG2A analysiert werden. IFN- γ inhibierte die NK-Zell-Aktivität, indem es die NKG2A Expression hoch- und NKG2D Expression herunterregulierte. Funktionelle Analysen mit Liganden exprimierenden Tumorzellen (HLA-E für NKG2A bzw. MICA für NKG2D) zeigten, dass diese Zytokine so die Balance zwischen inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren verändern konnten (Zhang, 2005). Eine frühere Arbeit zeigt aber, dass IFN- α die NKG2A Expression nicht herunter, sondern heraufreguliert (Mori, 1998), mögliche Erklärung für diesen Effekt wären die unterschiedlich langen Stimulationszeiten (5 h zu 48 h). Während aber keine verschachtelte GAS/EBS Sequenz, wie für die beiden CD94 Promotoren publiziert, in den Promotorbereichen des NKG2A Gens gefunden werden konnte, sind im proximalen Promotor Sequenzmotive zu finden, die für IFN- γ und IFN- α Bindungselemente typisch sind. Die Signaltransduktion von IFN- γ verläuft über STAT-1 und bindet an ein GAS (gamma interferon activated sequence) Element mit der Konsensussequenz „TTNCNNAA“, die Signaltransduktion von IFN- α verläuft ebenfalls über STAT-1, bindet jedoch an eine ISRE (IFN stimulated response element) mit der Konsensussequenz „GAAAN(N)GAAA“ (Goodbourn, 2000). Im proximalen Promotor liegt ein GAS im 5' Bereich des 164 bp Fragments, wobei die erste „GAAA“ nicht mehr im Fragment und die zweite „GAAA“ Sequenz 6 bp stromabwärts liegt. Die 5' gelegene „GAAA“ Sequenz schließt als die vorangegangene ISRE Sequenz ab, anstelle eines C steht hier allerdings ein A. Im distalen Promotorbereich findet sich weder eine GAS noch eine ISRE, aber im Bereich hinter dem nichttranslatierten Exon 1 gibt es eine, exakt der Konsensussequenz entsprechende, ISRE gefolgt von einer GAS, weiter stromabwärts finden sich noch zwei ca. 50 bp auseinanderliegende GAS. Dies könnten Anhaltspunkte dafür sein, dass NKG2A doch zusammen mit dem CD94 Gen reguliert werden könnte, da eine GAS/EBS zwar in beiden CD94 Promotoren, nicht

jedoch im NKG2A Gen gefunden werden konnte. Außerdem ermöglicht die Identifizierung dieser Sequenzmotive eine detaillierte Untersuchung der NKG2A Regulation, da man jetzt Agonist (IFN- α) und Antagonist (IFN- γ) kennt, und die funktionelle Bedeutung, nämlich die Verschiebung der Balance zwischen aktivierenden (NKG2D) und inhibierenden (NKG2A) Rezeptoren, klar wird (Zhang, 2005).

5.6 Keine klassisch epigenetische Regulation des NKG2A Gens

Während Gene wie CD21 oder auch murine Mitglieder der NKRP-Familie (Gays, 2000) sowohl durch AZA (Demethylierung) als auch TSA Behandlung (Histonacetylierung) induziert werden können, beschränkte sich die KIR-Induktion auf die Demethylierung mit AZA (Santourlidis, 2002). Die initialen NKG2A Induktionsexperimente mit der NK-Zelllinie YT schienen erfolgversprechend zu sein, stellten sich im Hinblick auf spätere Experimente mit primären NK- und T-Zellen jedoch als Zelllinien-spezifischer Effekt heraus. Dieser Effekt scheint die Expressionsfähigkeit von NKG2A auf der Zelloberfläche zu beeinflussen, da sowohl CD94 als auch NKG2A mRNA in YT vorhanden sind, und NKG2A als unreifes Molekül im Golgi-Apparat vorliegt (Brooks, 1997). Es konnte für eine YT-Sublinie (YT-Indy), die keine CD94 mRNA aufweist, gezeigt werden, dass eine Transfektion mit CD94 zwar eine Oberflächenexpression von NKG2A induziert, ohne jedoch funktionell eine Wirkung zu haben, d.h. die Targetzellen wurden nach wie vor lysiert (Chua, 2002). Da eine AZA und TSA Stimulation auch keine CD94 mRNA Expression induzieren konnte, wie in einer Publikation über den humanen CD94 Promotor vermutet (Lieto, 2003), scheiden direkte Effekte aus.

AZA als auch TSA Stimulation hatten ebenfalls keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression der anderen Familienmitglieder von NKG2A: Weder für NKG2C noch für NKG2D konnte eine Induktion beobachtet werden, das Gegenteil war der Fall, sie wurden eher vermindert. Auch die Erhöhung der Rezeptordichte von NKG2A, NKG2C und NKG2D scheint weniger auf direkte Effekte als auf unspezifische Regulation zurückzuführen sein. Wie auch die Transkriptanalyse der stimulierten NK-Zelllinie NK3.3 zeigt, führt die Stimulation eher zur Reduktion der

NKG2A Transkripte. Eine Erklärung hierfür könnten indirekte Effekte sein. So könnten inhibitorische Faktoren wie Transkriptionsfaktoren induziert bzw. aktivierende Faktoren reduziert worden sein. Ähnliche Effekte konnten vor allem mit TSA-Stimulation beobachtet werden. So kann TSA die CD154 und IL-10 Expression herunter und die IFN- γ Produktion hoch regulieren (Mishra, 2001) oder die Expression von Transkriptionsfaktoren wie c-Myc (Rascle, 2003) und PU.1 (Laribee, 2001) verringern.

5.7 Zelltyp- und Speziesspezifität der NKG2A Regulation

Erstaunlicherweise wiesen alle Fragmente des distalen und proximalen Promotors nicht nur in NK-Zellen, sondern auch in nicht-lymphoiden Zellen bzw. sogar in murinen Zellen Aktivität auf. Es konnte durch den Vergleich der Nucleofektion mit der JetPEI-Transfektion bzw. der Nucleofektion von NK-Zelllinien und primären NK-Zellen eine methodische Ursache hierfür ausgeschlossen werden. Dies lässt vermuten, dass für die Promotoraktivität keine Zell- bzw. Spezies-spezifischen Transkriptionsfaktoren benötigt werden. Es wäre möglich, dass in murinen Zellen Faktoren die Aktivität bestimmen, die konserviert im murinen wie auch im humanen System vorkommen. Es könnte sich aber auch um eine unspezifische Aktivität handeln, die hier artifizielle Daten liefert. Wenn also für die Aktivität der NKG2A Promotoren keine spezifischen Faktoren benötigt werden, werden sie von ubiquitär vorkommenden Faktoren reguliert. Eine Möglichkeit hier regulatorisch aktiv zu werden, ist über epigenetische Modifikationen, welche die Chromatindichte bzw. den Zugang zu den Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen beeinflussen. Unter den hier gewählten Bedingungen ist ein Einfluss von Histonproteinen auf den pGL3-Vektor ausgeschlossen, es könnten sich zwar Histonproteine einlagern, aber deren Struktur und Möglichkeiten sind nicht mit der *in vitro* Nucleosomstruktur vergleichbar (Reeves, 1985). Aus den ChIP-Daten geht hervor, dass die NKG2A exprimierende NK-Zelllinie NK3.3 einen offenen, mit einem hohen Acetylierungsgrad versehenen, Promotorbereich aufweist, während die NKG2A-negative T-Zelllinie Jurkat eine reduzierte Histonacetylierung und L88/5 einen nahezu geschlossenen Promotorbereich aufweisen. Da sowohl die Behandlung mit dem demethylierenden

Agenz AZA als auch mit dem Histondeacetylaseinhibitor Trichostatin A keine NKG2A Expression induzieren konnte, könnten andere Modifikationen hierfür verantwortlich sein. Man muss bedenken, dass nur AZA- bzw. TSA-sensitive Gene direkt auf die Stimulation reagieren, aber in anderen Fällen kann die Regulation auch komplexer sein. Aber es gibt weitere Möglichkeiten, um epigenetischen Einfluss auf die Nucleosomstruktur zu nehmen (Brostjan, 2000). So können bestimmte Transkriptionsfaktoren wie Fos/Jun (AP-1) sich ihren Zugang zur ihrer spezifischen Sequenz erzwingen, indem sie das betreffende Nucleosom verdrängen (Ng, 1997). Meist reicht aber schon ein Gleiten des Nucleosoms um einige Basenpaare, um entweder die Sequenz in den nicht blockierten Bereich zweier Nucleosomen zu bringen (Nucleosomenshift) bzw. mit einer halben Drehung der DNA die Sequenz von der geschützten Innenlage des Nucleosoms zur exponierten Außenlage zu bringen („Rotationspositionierung“; Goriely, 2004). Für Hefen wurde gezeigt, dass eine Veränderung von 2-3 bp reicht, um einem TATA-Box-bindenden Protein den Zugang zu ermöglichen (Martinez-Campa, 2004), ähnliche Effekte wurden auch im humanen System bei einem hormonregulierten Promotor nachgewiesen (Sewack, 2001).

Für den murinen IFN- γ Promotor konnte gezeigt werden, dass er in NK-Zellen, im Unterschied zu T-Zellen, nicht epigenetisch, in diesem Falle über Methylierung, reguliert wird (Tato, 2004). Aufgrund ihres „offenen“ Chromatinstatus (Demethylierung, Histonacetylierung) können NK-Zellen nicht nur schneller IFN- γ produzieren, sondern dies auch proliferations- und AZA/TSA-unabhängig tun. Ein ähnliches Bild zeigt die Induzierbarkeit von CD94/NKG2A auf NK- bzw. T-Zell-Subpopulationen. Während NKG2A auf NK-Zellen mit IL-12 innerhalb von wenigen Stunden induziert werden kann (Draghi, 2004), benötigt die T-Zell-Stimulation mit IL-12 (Derre, 2002) allein wie auch mit anderen Zytokinen (IL-10, TGF- β) und der Stimulation über den TCR (SEB, α -CD3-Ak), einige Tage bis Wochen, bis man eine effektive Induktion nachweisen zu kann (Romero, 2001; Bertone, 1999). Aber wie könnte dies bei NKG2A funktionieren, wo sowohl durch Inkubation mit AZA als auch durch Behandlung mit TSA weder CD94 noch NKG2A induziert werden konnte? Für den Humanen Immundefizienz Virus Typ I (HIV-I) Promotor konnte gezeigt werden, dass er nicht über Histonacetylierung, sondern über die Positionsverlagerung der

acetylierten Histone induziert wird (Nucleosomeshift; Kiefer, 2004). Es sind also Histonacetylierung und Transkriptionsinduktion nicht zwangsweise miteinander verknüpft (Kiefer, 2004; Goriely, 2004). Für den humanen IFN- β Promotor konnte eine kaskadenartige Rekrutierung von chromatinmodifizierenden und generellen Transkriptionsfaktoren beschrieben werden, wobei die Histonacetylierung des einen Komplexes die Anlagerung des Nucleosomen-verschiebenden-Komplexes ermöglicht bzw. dessen Bindung stabilisiert und so dem Präinitiationskomplex den Zugang zur TATA-Box ermöglicht (Agalioti, 2000). Eine solche chromatin-strukturverändernde Aktivität (Chromatinremodeling) konnte auch für die Zytokine IL-2 (IFN- γ ; Bream, 2004), IL-12 (CD25; O'Sullivan, 2004), IL-15 (IL-12R β 1; Musikacharoen, 2005) und TGF-beta (Ten Dijke, 2000) gezeigt werden.

5.8 Spielt die Alu-Sequenz doch eine Rolle?

Alu-Sequenzen ähneln durch ihre Tandemdoppelstruktur den Transposons und enthalten alle die Erkennungssequenz des Alu-Restriktionsenzym - daher der Name. Für die Alu-Sequenz konnte kein Einfluss auf die Promotoraktivität bzw. -stärke ermittelt werden. Aber bei der Methylierungsstatus Analyse wies die NKG2A-positive NK3.3 Zelllinie eine unmethylierte Alu-Sequenz auf, während sie in der NKG2A-negativen T-Zelllinie Jurkat komplett methyliert war. Die Versuche mit dem demethylierenden Agens AZA haben gezeigt, dass die Demethylierung keinen Einfluss auf die NKG2A Expression hat, aber vielleicht bei der Abschaltung des NKG2A Promotors. NK-Zellen, die KIR exprimieren, können auch NKG2A-negativ sein (Draghi, 2004), und in T-Zellen kann mit zunehmender Reifung kein NKG2A mehr induziert werden (Arlettaz, 2004). Eine weitere Möglichkeit wäre die Abschaltung in NKG2C-positiven NK-Zellen (Cantoni, 1998), wobei eine mögliche Induzierbarkeit inhibiert wird bzw. exprimiertes NKG2A herunterreguliert wird. Die Methylierungsstatus Analysen sowie die ChIP-Daten der NKG2A exprimierenden NK3.3 und der NKG2A-negativen Jurkat Zelllinie könnten hierfür ein Hinweis sein. Im humanen CD8 α Gen ist im T-Zell-spezifischen Enhancer des letzten Introns eine Alu-Sequenz identifiziert worden (Hambor, 1993). Es wäre ein Einfluss der Alu-Sequenz denkbar, die zwar keinen Beitrag zur Basisaktivität des Minimalpromotors

lieferte, aber durch eine Smad-Bindungsstelle und weitere Bindungsstellen für Faktoren wie ETS („GGAT“), SMAD („AGAG“), STAT („TTAA“), IRF („TAAA“), AP-1 („TGACA) und GATA-Bindungssequenzen („GATA“) an der Zytokin-induzierten Regulation des proximalen Promotors beteiligt sein könnte. Es wäre auch möglich, dass die Alu-Sequenz hier die erwähnte Pufferfunktion zwischen den distalen und proximalen Promotoren erfüllt, wie es für eine Alu-Sequenz beschrieben wurde (Willoughby, 2000).

6 ZUSAMMENFASSUNG

Aufgabe dieser Arbeit war es, die Regulation des humanen NKG2A Gens zu untersuchen, welches zusammen mit CD94 einen wichtigen, MHC-Klasse-I-spezifischen, inhibitorischen Rezeptor auf NK-Zellen darstellt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei Promotoren für das NKG2A Gen identifiziert werden: Einen, in dieser Arbeit erstmals beschriebenen, stärkeren proximalen Promotor (5' von Exon 2) und einen schwächeren distalen Promotor (5' von Exon 1), der durch eine stromaufwärts gelegene aktivierende Sequenz (SAS) verstärkt werden kann. Der proximale Promotor arbeitet TATA-Box-abhängig, der distale weist keine klassischen Promotorelemente auf, sondern besteht aus mehreren Bereichen sowohl inhibitorischer als auch aktivierender Sequenzen. Es ergaben sich Hinweise, dass hierbei der Transkriptionsfaktor GATA und/oder die SAS eine regulatorische Rolle spielen. Die Minimalpromotoren waren sowohl in nicht-lymphozytären als auch murinen Zellen aktiv. Im Gegensatz dazu spielte die GATA-abhängige Regulation des distalen Promotors nur in lymphozytären Zellen (NK-, T- und B-Zelllinien) eine Rolle, nicht aber in nicht-lymphozytären Zellen (HeLa). Diese Ergebnisse waren unabhängig von der gewählten Transfektionsmethode (NucleofectionTM und JetPEITM) und konnten auch in primären NK-Zellen reproduziert werden. Die Analyse der Transkripte, die von den beiden Promotoren initiiert werden, ergab eine Dominanz der kurzen Transkripte (proximaler Promotor) in reifen NK-Zellen, während lange Transkripte (distaler Promotor) sowohl in frühen Differenzierungsstadien von NK-Zellen als auch in reifen T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺) dominieren. Das Verhältnis der Transkripte war dabei auch abhängig von der Anwesenheit bestimmter Zytokine wie z.B. IL-10 (Dominanz der langen Transkripte) und IL-15 (Dominanz der kurzen Transkripte). Eine Analyse der epigenetischen Regulation ergab eine Korrelation des Methylierungsmusters im 5' Bereich des NKG2A Gens mit der Expression: Die NKG2A-positive NK3.3 NK-Zelllinie zeigte einen demethylierten, die NKG2A-negative T-Zelllinie Jurkat einen methylierten Promotor. In gleicher Weise zeigte die Analyse der Chromatinstruktur (Analyse der Histonmodifikationen) eine offenen Promotor in der NK-Zelllinie und einen geschlossenen Promotor in Jurkat T-Zellen. Interessanterweise konnte die Expression von NKG2A weder durch das demethylierende Agens AZA noch durch den Histondeacetylasehemmer TSA,

induziert werden. Die hier erzielten Ergebnisse zeigen, dass die Expression des NKG2A Gens durch zwei Promotoren gesteuert wird, die sowohl im Verlauf der NK-Zellentwicklung als auch durch Zytokinstimulation differentiell reguliert werden. Die hier gezeigte erstmalige Beschreibung des dynamischen Wechselspiels dieser beiden Promotoren legt die Basis für ein besseres Verständnis der NKG2A Regulation im Rahmen der NK-Zelltoleranzentwicklung und der NK-Zell-spezifischen Immunantwort.

7 LITERATURVERZEICHNIS

[1-92]

- Agalioti, T., G. Chen, and D. Thanos, Deciphering the Transcriptional Histone Acetylation Code for a Human Gene. *Cell*, 2002. 111: p. 381-392.
- Agalioti, T., et al., Ordered Recruitment of Chromatin Modifying and General Transcription Factors to the IFN-beta Promoter. *Cell*, 2000. 103: p. 667-678.
- Agarwal, S. and A. Rao, Modulation of Chromatin Structure Regulates Cytokine Gene Expression during T Cell Differentiation. *Immunity*, 1998. 9: p. 765-775.
- Aktas, E., et al., Different natural killer (NK) receptor expression and immunoglobulin E (IgE) regulation by NK1 and NK2 cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 2005. 140: p. 301-309.
- Algarra, I., T. Cabrera, and F. Garrido, The HLA crossroad in tumor immunology. *Hum. Immunol.*, 2000. 61(1): p. 65-73.
- Andre, P., et al., Differential regulation of killer Ig-like receptors and CD94 lectin-like dimers on NK and T lymphocytes from HIV-1-infected individuals. *Eur. J. Immunol.*, 1999. 29: p. 1076-1085.
- Ansel, K., D. Lee, and A. Rao, An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat. Immunol.*, 2003. 4(7): p. 616-623.
- Arlettaz, L., et al., Activating CD94:NKG2C and inhibitory CD94:NKG2A receptors are expressed by distinct subsets of committed CD8 TCR alpha/beta lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 2004. 34.
- Arnon, T., et al., The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus infected cells by NKp46. *Blood*, 2004. 103(2): p. 664-672.
- Attwood, J., R. Yung, and B. Richardson, DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2002. 59: p. 241-257.
- Azzoni, L., et al., Differential Transcriptional Regulation of CD161 and a Novel Gene, 197/15a, by IL-2, IL-15, and IL-12 in NK and T Cells. *J. Immunol.*, 1998. 161: p. 3493-3500.
- Baars, P., et al., Cytolytic Mechanisms and Expression of Activation-Regulating Receptors on Effector-Type CD8+CD45Ra+CD27- Human T cells. *J. Immunol.*, 2000. 165: p. 1910-1917.
- Bagot, M., et al., Functional inhibitory receptors expressed by a cutaneous T cell lymphoma-specific cytolytic T cell population. *J. Invest. Dermatol.*, 2000. 115(6): p. 994-999.
- Bakker, B., et al., Killer cell inhibitory receptors for MHC class I molecules regulate lysis of melanoma cells mediated by NK cells, gamma delta T cells, and antigen-specific CTL. *J. Immunol.*, 1998. 160: p. 5239-5245.
- Barao, I., D. Hudig, and J. Ascensao, IL-15-Mediated Induction of LFA-1 Is a Late Step Required for Cytotoxic Differentiation of Human NK Cells from CD34+Lin- Bone Marrow Cells. *J. Immunol.*, 2003. 171: p. 683-690.
- Barten, R. and J. Trowsdale, The human Ly-49L-gene. *Immunogenetics*, 1999. 49: p. 731-734.
- Beck, C., H. Schreiber, and D. Rowley, Role of TGF-beta in Immune-Evasion of Cancer. *Microsc. Res. Tech.*, 2001. 52: p. 387-395.
- Becker, J., et al., Differential expression of CD28 and CD94/NKG2 on T cells with identical TCR beta variable regions in primary melanoma and sentinel lymph node. *Eur. J. Immunol.*, 2000. 30: p. 3699-3706.
- Bertone, S., et al., Transforming growth factor-beta-induced expression of CD94/NKG2A inhibitory receptor in human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 1999. 29: p. 23-29.
- Biassoni, R., et al., Natural killer cell-mediated recognition of human trophoblast. *Sem. Cancer Biol.*, 1999. 9(1): p. 13-18.
- Borrego, F., et al., Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol. Immunol.*, 2001. 38: p. 637-660.
- Borrego, F., et al., NK Cell CD94/NKG2A Inhibitory Receptors Are Internalized and Recycle Independently of Inhibitory Signaling Processes. *J. Immunol.*, 2002. 169: p. 6102-6111.

- Boullier, S., et al., Phosphoantigen activation induces surface translocation of intracellular CD94/NKG2A class I receptor on CD94⁻ peripheral Vgamma 9 Vdelta2 T cells but not on CD94⁻ thymic or mature gamma/delta T cell clones. *Eur. J. Immunol.*, 1998. 28: p. 3399-3410.
- Boussif, O., et al., A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995. 92: p. 8297-7301.
- Braud, V., et al., HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*, 1998. 391(19): p. 795-799.
- Bream, J., et al., A Distal Region in the Interferon-gamma Gene Is a Site of Epigenetic Remodeling and Transcriptional Regulation by Interleukin-2. *J. Biol. Chem.*, 2004. 279(39): p. 41249-41257.
- Brooks, A., et al., NKG2A Complexed with CD94 Defines a Novel Inhibitory Natural Killer Cell Receptor. *J. Exp. Med.*, 1997. 185(4): p. 795-800.
- Brostjan, C., et al., The NKG2 natural killer cell receptor family: comparative analysis of promoter sequences. *Genes and Immunity*, 2000. 1: p. 504-508.
- Butcher, S., K. Arney, and G. Cook, MAFA-L, an ITIM-containing receptor encoded by the human NK cell gene complex and expressed by basophils and NK cells. *Eur. J. Immunol.*, 1998. 28: p. 3755-3762.
- Cai, G., R. Kastelein, and C. Hunter, IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18. *Eur. J. Immunol.*, 1999. 29: p. 2658-2665.
- Cantoni, C., et al., The activating form of CD94 receptor complex: CD94 covalently associates with the Kp39 protein that represents the product of the NKG2-C gene. *Eur. J. Immunol.*, 1998. 28: p. 327-338.
- Carayol, G., et al., NK cells differentiated from bone marrow, cord blood and peripheral blood stem cells exhibit similar phenotype and functions. *Eur. J. Immunol.*, 1998. 28: p. 1991-2002.
- Carretero, M., et al., Specific engagement of the CD94/NKG2-A killer inhibitory receptor by the HLA-E class Ib molecule induces SHP-1 phosphatase recruitment to tyrosine-phosphorylated NKG2A: evidence for receptor function in heterologous transfectants. *Eur. J. Immunol.*, 1998. 28: p. 1280-1291.
- Cerboni, C., et al., Proliferative and Cytotoxic Response of Human Natural Killer Cells Exposed to Transporter Associated with Antigen-Processing-Deficient Cells. *Scan. J. Immunol.*, 2004. 59: p. 159-167.
- Chai, J.-G., et al., Critical Role of Costimulation in the Activation of Naive Antigen-Specific TCR Transgenic CD8⁺ T Cells in Vitro. *J. Immunol.*, 1999. 163: p. 1208_1305.
- Chan, H.-W., et al., DNA Methylation Maintains Allel-specific KIR Gene Expression in Human Natural Killer Cells. *J. Exp. Med.*, 2003. 197(2): p. 245-255.
- Chang, C., et al., Molecular characterization of human CD94: a type II membran glycoprotein related to the C-type lectin superfamily. *Eur. J. Immunol.*, 1995. 25(9): p. 2433-2437.
- Chang, L.-K. and S.-T. Liu, Activation of the BRLF1 promoter and lytic cycle of Epstein-Barr virus by histone acetylation. *Nucleic Acids Res.*, 2000. 28(20): p. 3918-2925.
- Chen, C.-Y., et al., Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. *Genes and Dev.*, 2000. 14: p. 1236-1248.
- Chua, H. and Z. Brahmi, Expression of p58.2 or CD94/NKG2A inhibitory receptors in an NK-like cell line, YTINDY, leads to HLA Class I-mediated inhibition of cytotoxicity in the p58.2- but not the CD94/NKG2A-expressing transfectant. *Cell. Immunol.*, 2002. 219: p. 57-70.
- Chuang, S., et al., A Prominent Role for Activator Protein-1 in the Transcription of the Human 2B4 (CD244) Gene in NK Cells. *J. Immunol.*, 2001. 166: p. 6188-6195.
- Clynes, R., et al., Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.*, 2000. 6(4): p. 443-446.
- Colucci, F., M. Caligiuri, and J. Di Santo, What does it take to make a natural killer? *Nature Rev. Immunol.*, 2003. 3: p. 413-425.
- Cooper, M., T. Fehniger, and M. Caligiuri, The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*, 2001. 22(11): p. 633-640.
- Cosman, D., et al., ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cell cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*, 2001. 14(2): p. 123-133.

- Cuturi, M., et al., Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. *J. Exp. Med.*, 1989. 169(2): p. 569-583.
- Derre, L., et al., Expression of CD94/NKG2A on Human T Lymphocytes Is Induced by IL-12: Implications for Adoptive Immunotherapy. *J. Immunol.*, 2002. 168: p. 4864-4870.
- Doucey, M.-A., et al., Cis association of Ly49A with MHC class I restricts natural killer cell inhibition. *Nat. Immunol.*, 2004. 5(3): p. 328-336.
- Draghi, M., et al., Single cell analysis of the human NK cell response to missing self and its inhibition by HLA class I. *Blood*, 2004.
- Eisermann, B., et al., Differentiation of CD34+ human cord blood stem cells into mature lectin- and KIR-expressing NK cells. *Immunobiology*, 2000. 203(1-3): p. 7-8; A10.
- Englander, E. and B. Howard, Nucleosome Positioning by Human Alu Elements in Chromatin. *J. Biol. Chem.*, 1995. 270(17): p. 10091-10096.
- Esnault, C., J. Maestre, and T. Heidmann, Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nat. Genet.*, 2000. 24: p. 363-367.
- Fehniger, T., et al., Potential mechanisms of human natural killer cell expansion in vivo during low-dose IL-2 therapy. *J. Clin. Invest.*, 2000. 106(1): p. 117-124.
- Felsenfeld, G. and M. Groudine, Controlling the double helix. *Nature*, 2003. 421: p. 448-453.
- Ferlazzo, G., et al., The Abundant NK Cells in Human Secondary Lymphoid Tissues Require Activation to Express Killer Cell Ig-Like Receptors and Become Cytolytic. *J. Immunol.*, 2004. 172: p. 1455-1462.
- Fraser, K., et al., NK cells developing in vitro from fetal mouse progenitors express at least one member of the Ly49 family that is acquired in a time-dependent and stochastic manner independently of CD94 and NKG2. *Eur. J. Immunol.*, 2002. 32: p. 868-878.
- Galiani, M., et al., Expression of killer inhibitory receptors on cytotoxic cells from HIV-1-infected individuals. *Clin. Exp. Immunol.*, 1999. 115: p. 472-476.
- Gastriconi, R., et al., Transforming growth factor beta1 inhibits expression of Nkp30 and NKG2D receptors: Consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003. 100(7): p. 4120-4125.
- Gays, F., et al., The Mouse Tumor Cell Lines EL4 and RMA Display Mosaic Expression of NK-Related and Certain Other Surface Molecules and Appear to Have a Common Origin. *J. Immunol.*, 2000. 164: p. 5094-5102.
- Germain, R., MHC-dependent antigen processing and peptide presentation providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*, 1994. 76(2): p. 287-299.
- Gillis, S. and J. Watson, Biochemical and Biological Characterization of Lymphocyte Regulatory Molecules. *J. Exp. Med.*, 1980. 152: p. 1709-1719.
- Glienke, J., et al., The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex. *Immunogenetics*, 1998. 48: p. 163-173.
- Gluck, W., et al., Phase I Studies of Interleukin (IL)-2 and Rituximab in B-cell non-Hodgkin's Lymphoma: IL-2 mediated natural killer cell expansion correlation with clinical response. *Clin. Cancer Res.*, 2004. 10: p. 2253-2264.
- Gong, J., G. Maki, and K. HG, Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotype and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia*, 1994. 8(4): p. 652-658.
- Goodbourn, S., L. Didcock, and R. Randall, Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.*, 2000. 81: p. 2341-2364.
- Goriely, S., et al., A Defect in Nucleosome Remodeling Prevents IL-12(p35) Gene Transcription in Neonatal Dendritic Cells. *J. Exp. Med.*, 2005. 199(7): p. 1011-1016.
- Gosselin, J., et al., Interleukin-15 as an activator of natural killer cell mediated antiviral response. *Blood*, 1999. 94(12): p. 4210-4219.
- Guerra, N., et al., Effect of tumor growth factor-beta on NK receptor expression by allostimulated CD8+ T lymphocytes. *Eur. Cytokine Netw.*, 1999. 10: p. 357-363.
- Guma, M., et al., Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood*, 2004. 104: p. 3664-3671.

- Gunturi, A., et al., The role of TCR stimulation and TGF-beta in controlling the expression of CD94/NKG2A receptors on CD8 T cells. *Eur. J. Immunol.*, 2005. 35: p. 1-10.
- Gunturi, A., R. Berg, and J. Forman, Preferential Survival of CD8 T and NK Cells Expressing High Levels of CD94. *J. Immunol.*, 2003. 170: p. 1737-1745.
- Hamann, J., et al., AICL: a new activation-induced antigen encoded by the human NK gene complex. *Immunogenetics*, 1997. 45: p. 295-300.
- Hambor, J., et al., Identification and Characterization of an Alu-Containing, T-Cell-Specific Enhancer Located in the Last Intron of the Human CD8alpha Gene. *Mol. Cell. Biol.*, 1993. 13(11): p. 7056-7070.
- Han, J., S. Szak, and J. Boeke, Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcription. *Nature*, 2004. 429: p. 268-274.
- Hartt-Meyers, J., et al., Cutting Edge: CD94/NKG2 Is Expressed on Th1 But Not Th2 Cells and Costimulates Th1 Effector Functions. *J. Immunol.*, 2002. 169: p. 5382-5386.
- Hernanz-Falcon, P., et al., Cloning of human DECTIN-1, a novel C-type lectin-like receptor gene expressed on dendritic cells. *Immunogenetics*, 2001. 53: p. 288-295.
- Hikami, K., et al., Variations of human killer cell lectin-like receptors: common occurrence of NKG2-C deletion in the general population. *Genes and Immunity*, 2003(4): p. 160-167.
- Hoelsbrekken, S., et al., Cutting Edge: Molecular Cloning of a Killer Cell Ig-like Receptor in the Mouse and Rat. *J. Immunol.*, 2003. 170: p. 2259-2263.
- Hoshino, T., et al., IL-13 Production by NK Cells: IL-13 Producing NK and T Cells Are Present in Vivo in the Absence of IFN-gamma. *J. Immunol.*, 1999. 162: p. 51-59.
- Houchins, J., et al., Natural Killer Cell Cytolytic Activity Is Inhibited by NKG2-A and Activated by NKG2-C. *J. Immunol.*, 1997. 158: p. 3603-3609.
- Houchins, J., et al., DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J. Exp. Med.*, 1991. 173(4): p. 1017-1020.
- Hsiao, Tumor-infiltrating lymphocyte secretion of IL-6 antagonizes tumor-derived TGF-beta 1 and restores the lymphokine-activated killing activity. *J. Immunol.*, 2004. 172(3): p. 1508-1514.
- Huard, B. and L. Karlson, A subpopulation of CD8+ T cells specific for melanocyte differentiation antigens expresses killer inhibitory receptor (KIR) in healthy donors: evidence for a role of KIR in the control of peripheral tolerance. *Eur. J. Immunol.*, 2000. 30: p. 1665-1675.
- Ida, H., et al., CD94 Ligation Induces Apoptosis in a Subset of IL-2-Stimulated NK Cells. *J. Immunol.*, 1997. 159: p. 2154-2160.
- Ignatowicz, L., J. Kappler, and P. Marrack, The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell*, 1996. 84(4): p. 521-529.
- Ikeda, H., et al., Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity*, 1997. 6(2): p. 199-208.
- Jabri, B., et al., Selective Expansion of Intraepithelial Lymphocyte Expressing the HLA-E-Specific Natural Killer Receptor CD94 in Celiac Disease. *Gastroenterology*, 2000. 118: p. 867-879.
- Jabri, B., et al., TCR Specificity Dictates CD94/NKG2A Expression by Human CTL. *Immunity*, 2002. 17: p. 487-499.
- Jacobs, R., et al., CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur. J. Immunol.*, 2001. 31: p. 3121-3126.
- Jaleco, A., et al., Fetal Liver Contains Committed NK Progenitors, but Is Not a Site for Development of CD34+ Cells into T Cells. *J. Immunol.*, 1997. 159: p. 694-702.
- Jenuwein, T. and C. Allis, Translating the Histone Code. *Science*, 2001. 293: p. 1074-1080.
- Jiang, G., et al., Histone Modification in Constitutive Heterochromatin Versus Unexpressed Euchromatin in Human Cells. *J. Cell. Biochem.*, 2004. 93: p. 286-300.
- Jinushi, M., et al., Negative Regulation of NK Cell Activities by Inhibitory Receptor CD94/NKG2A Leads to Altered NK Cell-Induced Modulation of Dendritic Cell Functions in Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J. Immunol.*, 2004. 173: p. 6072-6081.

- Jüttermann, R., E. Li, and R. Jaenisch, Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995. 81: p. 11797-11801.
- Kabat, J., et al., Role That Each NKG2A Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif Plays in Mediating the Human CD94/NKG2A Inhibitory Signal. *J. Immunol.*, 2002. 169: p. 1948-1948.
- Kahle, P., et al., Cloning of functional human T lymphocytes by limiting dilution: impact of filler cells and interleukin 2 sources on cloning efficiencies. *Scand. J. Immunol.*, 1981. 14(5): p. 493-502.
- Karlhofer, F., R. Ribaldo, and W. Yokoyama, The interaction of Ly-49 with H-2Dd globally inactivates natural killer cell cytolytic activity. *Trans. Assoc. Am. Physicians*, 1992. 105: p. 72-85.
- Kasaian, IL-21 Limits NK Cell Responses and Promotes Antigen-Specific T cell Activation: A Mediator of the Transition from Innate to Adaptive Immunity. *Immunity*, 2002. 16: p. 559-569.
- Kashii, Y., et al., Constitutive Expression and Role of the TNF Family Ligands in Apoptotic Killing of Tumor Cells by Human NK Cells. *J. Immunol.*, 1999. 163: p. 5358-5366.
- Khalil-Daher, I., et al., Role of HLA-G versus HLA-E on NK function: HLA-G is able to inhibit NK cytotoxicity by itself. *J. Reprod. Immunol.*, 1999. 43(2): p. 175-182.
- Kiefer, H., et al., Retinoic Acid Inhibition of Chromatin Remodeling at the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Promoter. *J. Biol. Chem.*, 2004. 279(42): p. 43604-43613.
- Kieffer, L., et al., Identification of a Candidate Regulatory Region in the Human CD8 Gene Complex by Colocalization of DNase I Hypersensitivity Sites and Matrix Attachment Regions Which Bind SATB1 and GATA-3. *J. Immunol.*, 2002. 168: p. 3915-3922.
- Kiesling, R., E. Klein, and H. Wigzell, "Natural" killer cells in the mouse: I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.*, 1975. 5(2): p. 112-117.
- Kim, D.-K., et al., Human NKG2F is expressed and can associate with DAP12. *Mol. Immunol.*, 2004. 41: p. 53-62.
- Klein, E., et al., Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species: a proposal. *Immunogenetics*, 1990. 31(4): p. 217-219.
- Kodama, H., et al., Involvement of the c-kit receptor in the adhesion of hematopoietic stem cells to stromal cells. *Exp. Hematol.*, 1994. 22: p. 979-984.
- Kornbluth, J., et al., Evidence for the Role of Class I and Class II HLA Antigens in the Lytic Function of a cloned Line of Human Natural Killer Cells. *J. Immunol.*, 1985. 134(2): p. 728-735.
- Kozak, M., Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, 1999. 234(2): p. 187-208.
- Kubin, M., et al., ULBP1, 2, 3: novel MHC class I-related molecules that bind to human cytomegalovirus glycoprotein UL16, activate NK cells. *Eur. J. Immunol.*, 2001. 31: p. 1428-1437.
- Kuzmin, I., et al., Analysis of aberrant methylation of the VHL gene by transgene, monochromosome transfer, and cell fusion. *Oncogene*, 1999. 18: p. 5672-5679.
- LaBonte, M., E. Choi, and N. Letvin, Molecular Determinants Regulating the Pairing of NKG2 Molecules with CD94 for Cell Surface Heterodimer Expression. *J. Immunol.*, 2004. 172: p. 6902-6912.
- Lanier, L., NK cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 1998. 16: p. 359-393.
- Lanier, L., et al., Molecular and Functional Analysis of Human Natural Killer Cell-associated Neural Cell Adhesion Molecule (N-CAM/CD56). *J. Immunol.*, 1991. 146(12): p. 4421-4426.
- Lanier, L., C. Chang, and J. Phillips, Human NKR-P1A: A Disulfide-Linked Homodimer of the C-type Lectin Superfamily Expressed by a Subset of NK and T Lymphocytes. *J. Immunol.*, 1994. 153: p. 2417-2428.
- Lanier, L., et al., Association of DAP12 with Activating CD94/NKG2C NK Cell Receptors. *Immunity*, 1998. 8: p. 693-701.
- Lanier, L., J. Ruitenberg, and J. Phillips, Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *J. Immunol.*, 1988. 141(10): p. 3478-3485.
- Larabee, R. and M. Klemsz, Loss of PU.1 Expression Following Inhibition of Histone Deacetylase. *J. Immunol.*, 2001. 167: p. 5160-5166.
- Lazetic, S., et al., Human Natural Killer Cell Receptors Involved in MHC Class I Recognition Are Disulfide-Linked Heterodimers of CD94 and NKG2 Subunits. *J. Immunol.*, 1996. 157: p. 4741-4745.

- Le Drian, E., et al., Inhibitory of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases. *Eur. J. Immunol.*, 1998. 28: p. 264-276.
- Le Hir, H., A. Nott, and M. Moore, How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends in Biochem. Sci.*, 2003. 28(4): p. 215-220.
- Le, P., et al., Human Thymic Epithelial Cells Inhibit IL-15 and IL-2-Driven Differentiation of NK cells from the Early Human Thymic Progenitors. *J. Immunol.*, 2001. 166: p. 2194-2201.
- Lee, J.-C., et al., Elevated TGF-beta1 Secretion and Down-Modulation of NKG2D Underlies Impaired NK Cytotoxicity in Cancer Patients. *J. Immunol.*, 2004. 172: p. 7335-7340.
- Li, L. and R. Dahiya, MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*, 2002. 18(11): p. 1427-1431.
- Lian, R., et al., Orderly and Nonstochastic Acquisition of CD94/NKG2 Receptors by Developing NK Cells Derived from Embryonic Stem Cells In Vitro. *J. Immunol.*, 2002. 168: p. 4980-4987.
- Lieto, L., et al., Human CD94 Gene Expression: Dual Promoters Differing in Responsiveness to IL-2 or IL-15. *J. Immunol.*, 2003. 171: p. 5277-5286.
- Ljunggren, H. and K. Karre, In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today*, 1990. 12(2): p. 237-244.
- Ljutic, B., J. Carlyle, and J. Zuniga-Pflucker, Identification of Upstream cis-Acting Regulatory Elements Controlling Lineage-specific Expression of the Mouse NK Cell Activation Receptor, NKR-P1C. *J. Biol. Chem.*, 2003. 278(34): p. 31909-31917.
- Llano, M., et al., Differential effects of US2, US6 and US11 human cytomegalovirus proteins on HLA class Ia and HLA-E expression: impact on target susceptibility to NK cell subsets. *Eur. J. Immunol.*, 2003. 33: p. 2744-2754.
- Lohwasser, S., et al., Cloning of murine NKG2A, B and C: second family of C-type lectin receptors on murine NK cells. *Eur. J. Immunol.*, 1999. 29: p. 755-761.
- Lohwasser, S., et al., The genomic organisation of the mouse CD94 C-type lectin gene. *Eur. J. Immunol.*, 2000. 27: p. 149-151.
- Long, E., Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 1999. 17: p. 875-904.
- Lopez-Botet, M. and T. Bellon, Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I. *Curr. Opin. Immunol.*, 1999. 11(3): p. 301-307.
- Lopez-Botet, M., F. Navarro, and M. Llano, How do NK cells sense the expression of HLA-G class Ib molecules? *Sem. Cancer Biol.*, 1999. 9(1): p. 19-26.
- Lopez-Cabrera, M., et al., Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69 new member of the C-type animal lectin superfamily of signal transmitting receptors. *J. Exp. Med.*, 1993. 178(2): p. 537-547.
- Macardle, P., L. Wheatland, and H. Zola, Analysis of the Cord Blood T Lymphocyte Response to Superantigen. *Hum. Immunol.*, 1999. 60: p. 127-139.
- Mager, D., et al., Evolution of natural killer cell receptors: coexistence of functional Ly49 and KIR genes in baboons. *Curr. Biol.*, 2001. 11(8): p. 626-30.
- Martinez, E., et al., TATA-Binding Protein-Associated Factor(s) in TFIID Function Through the Initiator to Direct Basal Transcription from TATA-Less Class II Promotor. *EMBO J.*, 1994. 13(13): p. 3115-3126.
- Martinez-Campa, C., et al., Precise nucleosome positioning and the TATA box dictate requirements for the histone H4 tail and the bromodomain factor Bdf1. *Mol. Cell.*, 2004. 15(1): p. 69-81.
- Marusina, A., et al., GATA-3 Is an Important Transcription Factor for Regulating Human NKG2A Gene Expression. *J. Immunol.*, 2005. 174: p. 2152-2159.
- Mason, L., et al., Receptor glycosylation regulates Ly-49 binding to MHC class I. *J. Immunol.*, 2003. 171(8): p. 4235-4242.
- Matamoros, N., et al., Molecular studies and NK cell function of a new case of TAP2 homozygous human deficiency. *Clin. Exp. Immunol.*, 2001. 125: p. 274-282.

- Mavilio, D., et al., Natural killer cells in HIV-1 infection: Dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003. 100(25): p. 15011-15016.
- McMahon, C., et al., Viral and Bacterial Infections Induce Expression of Multiple NK Cell Receptors in Responding CD8+ T Cells. *J. Immunol.*, 2002. 169: p. 1444-1452.
- Mehrotra, P., et al., Production of IL-10 by Human Natural Killer Cells Stimulated with IL-2 and/or IL-12. *J. Immunol.*, 1998. 160: p. 2637-2644.
- Merika, M. and S. Orkin, DNA-Binding Specificity of GATA Family Transcription Factors. *Mol. Cell. Biol.*, 1993. 13(7): p. 3999-4010.
- Miller, J.D., et al., CD94/NKG2 Expression Does Not Inhibit Cytotoxic Function of Lymphocytic Choriomenigits Virus-Specific CD8+ T Cells. *J. Immunol.*, 2002. 169: p. 693-701.
- Miller, J.S., et al., Singel Adult Human CD34+/Lin-/CD38- Progenitors Give Rise to Natural Killer Cells, B-Lineage Cells, Dendritic Cells, and Myeloid Cells. *Blood*, 1999. 93(1): p. 96-106.
- Mingari, M., et al., HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: Interleukin 15-induced expression of CD94/NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998. 95: p. 1172-1177.
- Mingari, M., et al., HLA-class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: molecular characterization, distribution in lymphoid tissues and co-expression by individual T cells. *Int. Immunol.*, 1997. 9(4): p. 485-491.
- Mingari, M., et al., Human CD8+ T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996. 93: p. 12433-12438.
- Mishra, N., et al., Trichostatin A reverses skewed expression of CD154, interleukin-10, and interferon-gamma gene and protein expression in lupus T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001. 98(5): p. 2628-2633.
- Moody, A., et al., Developmentally Regulated Glycosylation of the CD8 alphabeta Coreceptor Stalk Modulates Ligand Binding. *Cell*, 2001. 107: p. 501-512.
- Moore, K., et al., Interleukin-10 and Interleukin-10 Receptor. *Annu. Rev. Immunol.*, 2001. 19: p. 683-765.
- Moore, K., et al., Hematopoietic activity of a stromal cell transmembran protein containing epidermal growth factor-like repeat motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997. 94: p. 4011-4016.
- Moretta, A., Molecular Mechanisms in Cell-Mediated Cytotoxicity. *Cell*, 1997. 90: p. 13-18.
- Moretta, A., et al., Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol. Today*, 2000. 21(5): p. 228-234.
- Mori, S., et al., Differential regulation of human NK cell-associated gene expression following activation by IL-2, IFN-alpha and PMA/ionomycin. *Int. J. Oncol.*, 1998. 12: p. 1165-1170.
- Moser, J., et al., CD94-NKG2A receptors regulate antiviral CD8+ T cell responses. *Nat. Immunol.*, 2002. 3(2): p. 189-195.
- Muegge, K., et al., Epigenetic Control during Lymphoid Development and Immune Responses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2003. 983: p. 55-70.
- Mueller, M., T. Gerster, and W. Schaffner, Enhancer Sequences and the Regulation of Gene Transcription. *Eur. J. Biochem.*, 1988. 176: p. 485-495.
- Musikacharoen, T., et al., Interleukin-15 induces IL-12 receptor beta1 gene expression through PU.1 and IRF 3 by targeting chromatin remodeling. *Blood*, 2005. 105(2): p. 711-720.
- Ng, K., et al., The binding of a Fos/Jun heterodimer can completely disrupt the structure of a nucleosome. *EMBO J.*, 1997. 16(8): p. 2072-2085.
- Nguyen, S., et al., NK cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stemm cell transplants: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood*, 2005. 105(10): p. 4135-4142.
- O'Callaghan, C., Molecular basis of human natural killer cell recognition of HLA-E (human leucocyte antigen-E) and its relevance to clearance of pathogen-infected and tumour cells. *Clini. Sci.*, 2000. 99: p. 9-17.
- Ogris, M., et al., DNA/polyethylenimine transfection particles: Influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression. *AAPS PharmSci*, 2001. 3(3): p. 1-11.

- Ortega, C., et al., Role of NKG2-A and NKG2C surface receptors in chronic CD4+ T-cell responses. *Immunol. Cell Biol.*, 2004. 82: p. 587-595.
- Ostareck-Lederer, Translation of 15-lipoxygenase mRNA is inhibited by a protein that binds to a repeated sequence in the 3' untranslated region. *EMBO J.*, 1994. 13(6): p. 1476-1481.
- Ostensen, M., D. Thiele, and P. Lipsky, Tumor Necrosis Factor-Alpha Enhances Cytolytic Activity of Human Natural Killer Cells. *J. Immunol.*, 1987. 138(12): p. 4185-4191.
- O'Sullivan, A., et al., STAT4 Is Required for Interleukin-12-induced Chromatin Remodeling of the CD25 Locus. *J. Biol. Chem.*, 2004. 279(8): p. 7339-7345.
- Parham, P., E. Adams, and K. Arnett, The origins of HLA-A,B,C polymorphism. *Immunol. Rev.*, 1995. 143: p. 141-180.
- Parrish-Novak, Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature*, 2000. 408: p. 57-63.
- Perez-Villar, J., et al., The CD94/NKG2-A Inhibitory Receptor Complex is Involved in Natural Killer Cell-Mediated Recognition of Cells Expressing HLA-G1. *J. Immunol.*, 1997. 158: p. 5736-5743.
- Pittet, M., et al., Cutting Edge: Cytolytic Effector Function in Human Circulating CD8+ T Cells Closely Correlates with CD56 Surface Expression. *J. Immunol.*, 2000. 164: p. 1148-1152.
- Ploegh, H., Viral Strategies of Immune Evasion. *Science*, 1998. 280: p. 248-253.
- Plougastel, B., T. Jones, and J. Trowsdale, Genomic structure, chromosome location, and alternative splicing of the human NKG2A gene. *Immunogenetics*, 1996. 44: p. 286-291.
- Plougastel, B. and J. Trowsdale, Sequence Analysis of a 62-kb Region Overlapping the Human KLRC Cluster of Genes. *Genomics*, 1998. 49: p. 193-199.
- Poggi, A., E. Tomasello, and P. Costa, NKR1A and p40 molecules are involved in regulation of activation and maturation of human NK cells. *Res. Immunol.*, 1997. 148(3): p. 179-184.
- Ponte, M., et al., Inhibitory Receptor sensing HLA-G molecules in pregnancy: Decidua associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p45, an HLA-G-specific receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999. 96: p. 5674-5679.
- Pozner, A., et al., Transcription-Coupled Translation Control of AML1/RUNX1 Is Mediated by Cap- and Internal Ribosome Entry Site-Dependent Mechanisms. *Mol. Cell. Biol.*, 2000. 20(7): p. 2297-2307.
- Proft, T. and J. Fraser, Bacterial superantigens. *Clin. Exp. Immunol.*, 2003. 133: p. 299-306.
- Proudfoot, N., Transcriptional interference and termination between duplicated alpha-globin gene constructs suggests a novel mechanism for regulation. *Nature*, 1986. 322(6079): p. 562-565.
- Rasclé, A., J. Johnston, and B. Amati, Deacetylase Activity Is Required for Recruitment of the Basal Transcription Machinery and Transactivation by STAT5. *Mol. Cell. Biol.*, 2003. 23(12): p. 4162-4173.
- Reeves, R., C. Gorman, and B. Howard, Minichromosome assembly of non-integrated plasmid DNA transfected into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, 1985. 13(10): p. 3599-3615.
- Robertson, M., et al., Human Natural Killer Cell Adhesion Molecules: Differential Expression After Activation and Participation in Cytolysis. *J. Immunol.*, 1990. 145(10): p. 3194-3201.
- Robertson, M., et al., Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. *Exp. Hematol.*, 1996. 24(3): p. 406-413.
- Romero, P., et al., Expression of CD94 and NKG2 molecules on human CD4+ T cells in response to CD3-mediated stimulation. *J. Leukoc. Biol.*, 2001. 70: p. 219-224.
- Saleh, A., et al., Identification of a Novel Ly49 Promoter That Is Active in Bone Marrow and Fetal Thymus. *J. Immunol.*, 2002. 168: p. 5163-5169.
- Santos-Rosa, H., et al., Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*, 2002. 419: p. 407-411.
- Santourlidis, S., et al., Crucial Role of DNA Methylation in Determination of Clonally Distributed Killer Cell Ig-like Receptor Expression Patterns in NK Cells. *J. Clin. Invest.*, 2002. 169: p. 4253-4261.
- Scherer, W., J. Syverton, and G. Gey, Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.*, 1953. 97(5): p. 695-710.

- Schmidt, R., et al., Functional Characterization of LFA-1 Antigens in the Interaction of Human NK Clones and Target Cells. *J. Immunol.*, 1985. 135(2): p. 1020-1025.
- Schumacher, A., Zur Funktion der DNA-Methylierung: Genetic Imprinting und Stabilität von de novo Methylierungsmustern. Diplomarbeit; Köln, 1998.
- Schwab, J. and H. Illges, Regulation of CD21 expression by DNA methylation and histone deacetylation. *Int. Immunol.*, 2001. 13(5): p. 705-711.
- Seaman, W., Natural Killer Cells And Natural Killer T Cells. *Arthritis & Rheumat.*, 2000. 43(6): p. 1204-1217.
- Sewack, G., T. Ellis, and U. Hansen, Binding of TATA Binding Protein to a Naturally Positioned Nucleosome Is Facilitated by Histone Acetylation. *Mol. Cell. Biol.*, 2001. 21(4): p. 1404-1415.
- Shimizu, Y. and R. DeMars, Production of human cells expressing individual transferred HLA-A, -B, -C genes using an HLA-A, -B, -C null human cell line. *J. Immunol.*, 1989. 142(8): p. 3320-3328.
- Sivori, S., et al., IL-21 induces both rapid maturation of human CD34+ cell precursors towards NK cells and acquisition of surface killer Ig-like receptors. *Eur. J. Immunol.*, 2003. 33: p. 3439-3447.
- Sobanov, Y., et al., Linkage of the NKG2 and CD94 receptor genes to D12S77 in the human natural killer gene complex. *Immunogenetics*, 1999. 49: p. 99-105.
- Speiser, D., et al., The Activatory Receptor 2B4 Is Expressed In Vivo by Human CD8+ Effector alpha-beta T Cells. *J. Immunol.*, 2001. 167: p. 6165-6170.
- Stanley, A.J., et al., Renal carcinoma cell lines inhibit natural killer cells activity via the CD94 receptor molecule. *Cancer Immunol. and Immunoth.*, 2001. 50: p. 260-268.
- Steinle, A., et al., Interaction of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics*, 2001. 53(4): p. 279-287.
- Storkus, W., et al., NK susceptibility varies inversely with target cell class I HLA antigen expression. *J. Immunol.*, 1987. 138(6): p. 1657-1659.
- Sullivan, Y., et al., Upregulation of CD4 on CD8+ T cells: CD4dimCD8bright T cells constitute an activated phenotype of CD8+ T cells. *Immunology*, 2001. 103(3): p. 270-280.
- Suzuki, Y., et al., Genetic Polymorphisms of Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors Are Associated with Susceptibility to Psoriasis Vulgaris. *J. Invest. Dermatol.*, 2004. 122: p. 1133-1136.
- Takasugi, M., M. Mickey, and P. Terasaki, Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells. *Cancer Res.*, 1973. 33(11): p. 2898-902.
- Takei, F., J. Brennan, and D. Mager, The Ly-49 family: genes, proteins and recognition of class I MHC. *Immunol. Rev.*, 1997. 155: p. 67-77.
- Takei, F., et al., Ly49 and CD94/NKG2: developmentally regulated expression and evolution. *Immunol. Rev.*, 2001. 181: p. 90-103.
- Takemoto, N., K. Arai, and S. Miyatake, Cutting Edge: The Differential Involvement of the N-Finger of GATA-3 in Chromatin Remodeling and Transactivation During Th2 Development. *J. Immunol.*, 2002. 169: p. 4103-3107.
- Tanaka, J., et al., Cytolytic activity and regulatory functions of inhibitory NK cell receptor-expressing T cells expanded from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells. *Blood*, 2004. 104(3): p. 768-774.
- Tanaka, J., et al., Increased proportion of HLA-class-I-specific natural killer cell receptors (CD94) on peripheral blood mononuclear cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Acta Haematol.*, 2000. 105: p. 89-91.
- Tato, C., et al., Cutting Edge: Innate Production of IFN-gamma by NK Cells Is Independent of Epigenetic Modification of the IFN-gamma Promotor. *J. Immunol.*, 2004. 173: p. 1514-1517.
- Ten Dijke, P., K. Miyazono, and C.-H. Heldin, Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling. *TIBS*, 2000. 25: p. 64-70.
- Thalmeier, K., et al., Establishment of Two Permanent Human Bone Marrow Stroma Cell Lines With Long-term Post Irradiation Feeder Capacity. *Blood*, 1994. 83(7): p. 1799-1807.
- Timonen, T., M. Patarroyo, and C. Gahmberg, CD11a-c/CD18 and GP84 (LB-2) Adhesion molecules on human large granular lymphocytes and their participation in natural killing. *J. Immunol.*, 1988. 141(2): p. 1041-1046.

- Tomasello, E., et al., Gene Structure, Expression Pattern, and Biological Activity of Mouse Killer Cell Activating Receptor-associated Protein (KARAP)/DAP-12. *J. Biol. Chem.*, 1998. 273(51): p. 34115-34119.
- Tomatsu, S., et al., Methylation patterns of the human beta-glucuronidase gene locus: boundaries of methylation and general implications for frequent point mutations at CpG dinucleotides. *Genomics*, 2002. 79(3): p. 363-373.
- Toor, A., T. Lund, and J. Miller, T-cell factor-1 expression during human natural killer cell development and in circulating CD56(+) bright natural killer cells. *Exp. Hemat.*, 2001. 29(4): p. 499-506.
- Torkar, M., et al., Isotypic variation of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex. *Eur. J. Immunol.*, 1998. 28(12): p. 3959-3967.
- Trinchieri, G. and F. Gerosa, Immunoregulation by interleukin-12. *J. Leukoc. Biol.*, 1996. 59: p. 505-511.
- Trompeter, H., et al., 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. 174(7): p. 4135-443.
- Trompeter, H., et al., Rapid and highly efficient gene transfer into natural killer cells by nucleofection. *J. Immunol. Methods*, 2002. 274: p. 245-256.
- Turner, B., Cellular Memory and the Histone Code. *Cell*, 2002. 111: p. 285-291.
- Ugolini, S., et al., Involvement of inhibitory NKRs in the survival of a subset of memory-phenotype CD8+ T cells. *Nat. Immunol.*, 2001. 2(5): p. 430-435.
- Uhrberg, M., The CD107 mobilization assay: viable isolation and immunotherapeutic potential of tumor-cytolytic NK cells. *Leukemia*, 2005: p. 1-3.
- Uhrberg, M., et al., Human Diversity in Killer Cell Inhibitory Receptor Genes. *Immunity*, 1997. 7: p. 753-763.
- Ulbrecht, M., et al., Cell surface expression of HLA-E: interaction with human beta2-microglobulin and allelic differences. *Eur. J. Immunol.*, 1999. 29: p. 537-547.
- Ulbrecht, M., et al., Cutting Edge: The Human Cytomegalovirus UL40 Gene Product Contains a Ligand for HLA-E and Prevents NK Cell-Mediated Lysis. *J. Immunol.*, 2000. 164: p. 5019-5022.
- Vales-Gomez, M., et al., Differential binding to HLA-C of p50-activating and p58-inhibitory natural killer cells receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998. 95: p. 14326-14331.
- Vales-Gomez, M., H. Reyburn, and J. Strominger, Molecular analysis of the interactions between human NK receptors and their HLA ligands. *Hum. Immunol.*, 2000. 61(1): p. 28-38.
- Valiante, N., M. Rengaraju, and G. Trinchieri, Role of the Production of Natural Killer Cell Stimulatory Factor (NKSF/IL-12) in the Ability of B Cell Lines to Stimulate T and NK Cell Proliferation. *Cell. Immunol.*, 1992. 145: p. 187-198.
- Valiante, N., et al., Functionally and Structurally Distinct NK Cell Receptor Repertoires in the Peripheral Blood of Two Human Donors. *Immunity*, 1997. 7: p. 739-751.
- Vance, R., et al., Implications of CD94 deficiency and monoallelic NKG2A expression for natural killer cell development and repertoire formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002. 99(2): p. 868-873.
- Vivier, E., J. Nunes, and F. Vely, Natural Killer Cell Signaling Pathways. *Science*, 2004. 306: p. 1517-1519.
- Wada, H., et al., The inhibitory NK cell receptor CD94/NKG2A and the activating receptor CD94/NKG2C bind the top of HLA-E through mostly shared but partly distinct sets of HLA-E residues. *Eur. J. Immunol.*, 2004. 34: p. 81-90.
- Warren, H., et al., Production of IL-5 by Human NK Cells and Regulation of IL-5 Secretion by IL-4, IL-10 and IL-12. *J. Immunol.*, 1995. 154: p. 5144-5152.
- Welch, A., M. Kasahara, and L. Spain, Identification of the mouse killer immunoglobulin-like receptor-like (Kirl) gene family mapping to Chromosome X. *Immunogenetics*, 2003. 54: p. 782-790.
- Westgaard, I., et al., Identification of a human member of the Ly-49 multigen family. *Eur. J. Immunol.*, 1998. 28: p. 1839-1846.
- Wilhelm, B., L. Gagnier, and D. Mager, Sequence analysis of the ly49 cluster in C57BL/6 mice: a rapidly evolving multigene family in the immune system. *Genomics*, 2002. 80(6): p. 646-661.
- Wilhelm, B., et al., Transcriptional Control of Murine CD94 Gene: Differential Usage of Dual Promoters by Lymphoid Cell Types. *J. Immunol.*, 2003. 171: p. 4219-4226.
- Williams, N., et al., Differentiation of NK1.1+, Ly49+ NK Cells from flt3+ Multipotent Marrow Progenitor Cells. *J. Immunol.*, 1999. 163: p. 2648-2656.

- Willoughby, D., A. Vilalta, and R. Oshima, An Alu Element from the K18 Gene Confers Position-independent Expression in Transgenic Mice. *J. Biol. Chem.*, 2000. 275(2): p. 756-768.
- Wu, J., et al., An Activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*, 1999. 285: p. 730-732.
- Xu, J., et al., Distinct transcriptional control mechanism of killer immunoglobulin-like receptors in NK cells and T cells. *J. Biol. Chem.*, 2005.
- Yabe, T., et al., A multigene family on human chromosome 12 encodes natural killer-cell lectins. *Immunogenetics*, 1993. 37: p. 455-460.
- Yodoi, J., et al., TCGF (IL 2)-Receptor Inducing Factor(s): I. Regulation of IL 2 Receptor on a Natural Killer-like Cell Line (YT Cells). *J. Immunol.*, 1985. 134(3): p. 1623-1630.
- Yokoyama, W., HLA class I specificity for natural killer cell receptor CD94/NKG2A: Two for one in more ways than one. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998. 95: p. 4791-4794.
- Yokoyama, W. and B. Plougastel, Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nature Rev. Immunol.*, 2003. 3: p. 304-315.
- Youn, B.-S., et al., An Intronic Silencer of the Mouse Perforin Gene. *Mol. Cells*, 2001. 13(1): p. 61-68.
- Young, N., et al., Differential Expression of Leukocyte Receptor Complex-encoded Ig-like Receptors Correlates with the Transition from Effector to Memory CTL. *J. Immunol.*, 2001. 166: p. 3933-3941.
- Yu, X., et al., Flt3 Ligand Promotes the Generation of a Distinct CD34+ Human Natural Killer Cell Progenitor That Responds to Interleukin-15. *Blood*, 1998. 92(10): p. 3647-3657.
- Zabel, M., et al., Cell-Specific Expression of the Murine CD21 Gene Depends on Accessibility of Promoter and Intronic Elements. *J. Immunol.*, 2000. 165: p. 4437-4445.
- Zamai, L., et al., Natural Killer (NK) Cell-mediated Cytotoxicity: Differential Use of TRAIL and Fas Ligand by Immature and Mature Primary Human NK cells. *J. Exp. Med.*, 1998. 188(12): p. 2375-2380.
- Zhang, C., et al., Opposing effect of IFN-gamma and IFN-alpha on expression of NKG2 receptors: Negative regulation of IFN-gamma on NK cells. *Int. Immunopharmacol.*, 2005. 5: p. 1057-1067.
- Zingernagel, R. and P. Doherty, Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocyte choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, 1974. 248(450): p. 701-702.
- [93-264]

8 ANHANG

8.1 Abkürzungen:

ADCC	antikörperabhängige Zytotoxizität (antibody-dependent cellular cytotoxicity)
APC	antigenpräsentierende Zellen (antigen presenting cells)
AZA	5'-Aza-2'deoxyctidin
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Differenzierungscluster (cluster of differentiation)
CIAP	Alkalische Phosphatase (calf intestinal alkaline phosphatase)
CT	Grenzyklus (threshold cycle)
CTL	zelluläre Zytotoxizität (cellular cytotoxicity)
DHS	DNase-I-empfindliche Sequenz (DNase-I-hypersensitive site)
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonucleosintriphosphat
DECTIN	Dendritische Zellen assoziiertes C-Typ Lektin (dendritic-cell-associated C-type lectin)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EBS	Ets-Bindungssequenz
FACS	Fluoreszenz-vermittelte Zellsortierung (Fluorescence-activated cell sorting)
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fuorescein-Isothiocyanat
FSC	vorwärts gerichtetes Streulicht (forward scatter)
GAS	Gamma Interferon aktivierte Sequenz
G-CSF	Granulozyten koloniestimulierender Faktor (granulocyte colony-stimulating factor)
GVHD	Spender gegen Empfänger Krankheit (graft-versus-host-disease)
GVL	Spender gegen Leukämie (graft-versus-leukemia)
HAT	Histonacetyl-Transferase
HCMV	humanes Cytomegalievirus
HDAC	Histondeacetylase
HLA	humanes Leukozytenantigen (human leukocyte antigen)
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-beta-D1-thiogalactopyranosid
IRES	Interne Ribosombindungssequenz (internal ribosome entry site)
ISRE	IFN stimulated response element
ITAM	immunoreceptor tyrosin-based activating motif
ITIM	immunoreceptor tyrosin-based inhibiting motif
Jet	JetPEI Transfektion
KIR	killer cell immunoglobulin-like receptor
LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzellen
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
LGL	große granulierten Lymphozyten (large granular lymphocytes)

Line	lange gestreute Nukleotidsequenzen (long interspersed nucleotide sequence)
min	Minuten
MAR	Matrix Anheftungsregion (matrix attachment region)
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
LM	Listeria monocytogenes
LOX	Lipoprotein mit geringer Dichte (low density lipoprotein)
MACS	Magnet-vermittelte Zellisolation (magnet activated cell sorting)
MAFA	Mastzellen-assoziiertes Funktionsantigen
MLR	Gemischte Lymphozytenreaktion (mixed lymphocyte reaction)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MIR	Mammalia-spezifische, gestreute Wiederholungen (mammalian-wide interspersed repeat)
N-CAM	Neurales Zelladhäsionsmoleküle (neural cell-adhesion molecule)
NCR	natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren (natural cytotoxicity receptors)
NKRP	NK-Zell-Rezeptorprotein
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Nuc	Nucleofektion
MICA	MHC-Klasse-1-verwandtes Molekül A (MHC-class-I-chain-related)
KLR	Lektin-artige Rezeptoren (killer lectin-like receptor)
PBMC	periphere mononukleäre Zellen (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphat-buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
PHA	Phytohämagglutinin
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
RACE	schnelle Amplifizierung von cDNA Enden (rapid amplification of cDNA ends)
RARE	Retinsäurerezeptor-Bindungselement (retinoic acid receptor element)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
SAS	stromaufwärts aktivierende Sequenz
SCF	Stammzellfaktor (stem cell factor)
SEB	Staphylokokkus Enterotoxin B
sec	Sekunden
SSC	seitwärts gerichtetes Streulicht (side scatter)
TBE	Tris-Borat-Puffer
TCR	T-Zell Rezeptor (T cell receptor)
TE	Tris-EDTA-Puffer
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (transforming growth factor)
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TSA	Trichostatin A
TSST	toxisches Schocksyndrom Toxin (toxic shock syndrome-toxin)
U	Einheit (unit)
ULBPs	U16-bindende Proteine (U16-binding proteins)
UTR	Nichttranslatierte Sequenz (nontranslated region)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Ich erkläre gleichzeitig, dass ich die vorgelegte Dissertation in dieser oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht habe. Weiterhin erkläre ich hiermit, dass vorher noch keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen wurden.

Britta Eisermann

Düsseldorf, Juli 2005