Untersuchungen zur epigenetischen Regulation der *KIR*-Gene während der Entwicklung von natürlichen Killerzellen

Inaugural Dissertation

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

vorgelegt von

Jens Brands
aus Wesel

Düsseldorf,
im Juni 2014

aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ) der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Markus Uhrberg
Korreferent: Prof. Dr. Martin Beye

Tag der mündlichen Prüfung: 15.09.2014

Der Weg ist das Ziel

Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis .....
II Zusammenfassung .....
III Summary .....
IV Abkürzungsverzeichnis .....
1 Einleitung 1
1.1 Das hämatopoetische System des Menschen 1
1.2 Das menschliche Immunsystem 2
1.3 NK-Zellen: ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems 6
1.3.1 Funktionelle Unterschiede innerhalb der CD56-exprimiereden NK-Zellen 7
1.3.2 Die Entwicklung der hämatopoetischen Stammzelle zur NK-Zelle 8
1.3.3 Aktivierende und inhibierende Rezeptoren der NK-Zelle 11
1.4 Regulationsmöglichkeiten der Genexpression 16
1.4.1 Die Epigenetik 16
1.4.2 Modulation der Genexpression durch Methylierung des Cytosin 17
1.4.3 Einfluss der Chromatinstruktur auf die Genexpression 20
1.4.4 Modifikation von Histonen und ihr Einfluss auf die Genexpression 21
1.4.5 DNA-Methylierung und Histonmodifikationen beeinflussen die Chromatinstruktur 23
1.4.6 Beeinflussen der Gentranskription durch kleine nicht-codierende RNAs 25
1.4.7 *Ribosomale*-Gene als Beispiel epigenetischer Genregulation 27
1.5 Krebs, eine Erkrankung rückt in den Fokus der Wissenschaft 28
1.6 Zielsetzung 29

2 Material und Methoden 30
2.1 Material 30
2.1.1 Chemikalien 30

2.1.2 Medien und Puffer ... 31
2.1.3 Zytokine ... 35
2.1.4 Zelllinien ... 35
2.1.5 Blutproben ... 35
2.1.6. Verwendete Antikörper ... 36
2.1.7 Nukleinsäure ... 36
2.1.8 Oligonukleotide/Primer ... 36
2.1.9 shRNA ... 38
2.1.10 Nukleotide ... 39
2.1.11 Vektoren ... 39
2.1.12 Verwendete KITs ... 40
2.1.13 Laborbedarf ... 41
2.1.14 Geräte ... 41
2.1.15 Software ... 42
2.2 Zellkultur ... 43
2.2.1 Zellkulturarbeiten ... 43
2.2.2 Auftauen von Zellen ... 43
2.2.3 Einfrieren von Zellen ... 43
2.2.4 Ernten und Umsetzen von Zellen ... 44
2.2.5 Bestimmung der Zellzahl ... 44
2.2.5.1 Zellzahlbestimmung mittels der Neubauerzählkammer ... 44
2.2.5.2 Durchflusszytometrische Zellzahlbestimmung ... 45
2.3 Kultivierung von Zelllinien ... 45
2.3.1 Kultivierung von Suspensionskulturen ... 45
2.3.1.2 Jurkat ... 45
2.3.1.3 NK.3.3 ... 45
2.3.1.4 NKL ... 46
2.3.1.5 NK-92 ... 46
2.3.2 Kultivierung von adhärenten Zelllinien ... 46
2.3.2.1 Kultivierung muriner Nährzelllinien ... 46
2.3.2.2 Kultivierung humaner Nährzellen ... 47
2.3.2.3 Humane IPS-Kultur ... 47
2.3.2.4 293T-Nierenepithelzellen ... 47
2.4. Zellisolation und Differenzierung von Primärzellen ... 48

2.4.1 Isolation von monoukleären Zellen durch Dichtegradientententrifugation 48
2.4.2 Isolation hämatopoetischer Stammzellen durch Anreicherung mit paramagnetischen *MicroBeads* 48
2.4.3 Präparation und Kultivierung humaner NK-Zellen 49
2.4.4 Vorbereitungen der NK-Generierung 50
2.4.5 NK-Zellgenerierung 50
2.4.6 Differenzierung von HSCs zu NK-Zellen ohne Nährzellen 51
2.4.7 Kultivierung unterschiedlicher NK-Zellstadien aus dem Blut 51
2.4.8 Umplattieren von NK-Zellen 51
2.4.9 Expansion hämatopoetischer Stammzellen 52
2.5 Durchflusszytometrie 52
2.5.1 Theoretischer Hintergrund 52
2.5.2 Zellisolation mittels Zellsortierung 52
2.5.3 Durchflusszytometrische Färbung von Zellen 53
2.5.4 Intrazelluläre Färbung von Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern 53
2.5.5 Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektionseffizienz 54
2.5.6 Funktionale Analyse von NK-Zellen 54
2.5.6.1 Nachweis von Degranulation: die CD107a-Färbung 54
2.5.6.2 Vermögen der NK-Zelle ihre Zielzellen abzutöten 55
2.5.6.3 Nachweis von Granzym und Perforin in NK-Zellen 55
2.5.6.4 Nachweis von IFN-γ 55
2.6 Mikrobiologische Arbeiten 56
2.6.1 Grundlagen 56
2.6.2 Erstellung von elektrokompetenten E.Coli Sure 56
2.6.2.1 Transformation von elektrokompetenten Bakterien 57
2.6.2.2 Transformation kompetenter Bakterien 57
2.6.2.3 Blau Weiß Selektion 58
2.6.2.4 Anzucht von Übernachtkulturen 59
2.6.3 Lentivirale Arbeiten 59
2.6.3.1 Virusproduktion 59
2.6.3.2 Transfektion von 293T-Zellen 59

2.6.3.3 Ernte des Virusüberstandes 60
2.6.3.4 Infektion von Zellen 61
2.7 Molekularbiologische Methoden 62
2.7.1 Messung der RNA- und DNA-Konzentration mit Hilfe Von *UV-Vis*-Spektrophomometer 62
2.7.2 Präparation von RNA mittles Qiagen *RNeasy Kit* 62
2.7.3 Reinheitsbestimmung der RNA-Proben 62
2.7.4 Isolation von DNA mittels Qiagen *DNA blood mini kit* 63
2.7.5 Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem *Qia Quick PCR Purification kit* 63
2.7.6 Hybritisierung von shRNA und Liagation in lentivirale Vektoren 63
2.7.7 Synthese von cDNA 64
2.7.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 64
2.7.9 Real-Time PCR 65
2.7.10 DNA-Sequenzierung 66
2.7.11 *Deep Sequenzing* 67
2.7.12 Nachweis von DNA-Methylierung 67
2.7.12.1 Analyse von DNA-Methylierung im Promotorbereich von *KIR*-Genen 68
2.7.13 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese 68
2.7.14 Isolation von PCR-Produkten aus Agarosegelen mittels Qiagen *Gel Extraction Kit* 69
2.7.15 Restriktionsverdau 70
2.7.16 Minipräparation 70
2.7.17 Gewinnung von Plasmid-DNA 70
2.7.17.1 Alkoholische Fällung von DNA 71
2.7.18 *TA cloning Kit* 71
2.8 Zellbiologische Arbeiten 72
2.8.1 Behandlung der Zellen mit AZA/TSA 72
2.8.2 Behandlung der Zellen mit BIX 72
2.8.3 Verminderung der Gentranskription 72
2.9 Proteinbiocheme Methoden 73

2.9.1 ChIP-Assay 73
2.10 Statistische Auswertung 74
2.10.1 Auswertung Real-Time PCR 74

3 Ergebnisse 76
3.1 Expansion humaner hämatopoetischer Stammzellen zur *in vitro* Generierung von humanen natürlichen Killerzellen 76
3.1.1 Einfluss einer sauerstoffarmen Umgebung auf das Expansionsverhalten von HSCs 79
3.2 Etablierung eines murinen *in vitro* NK-Zelldifferenzierungssystems 82
3.2.1 Einfluss von humanen Nährzellen auf die *in vitro* NK-Zelldifferenzierung 85
3.2.2 MSC-Nährzellen induzieren eine stärkere KIR-Expression auf *in vitro* Generierten NK-Zellen als EL08 89
3.2.2.1 Nachweis der Funktionalität der *in vitro* generierten NK-Zellen 91
3.2.3 Einfluss der Stammzellquelle auf das NK-Entwicklungssystem 92
3.2.3.1 Nachweis der Funktionalität von NK-Zellen, welche aus GCSF-mobilisierten HSCs differenziert wurden 95
3.2.4 Steigerung der KIR-Expression durch vorherige Expansion der HSCs 96
3.2.4.1 Nachweis der Funktionalität von *in vitro* generierten NK-Zellen aus einer HSC-Expansionskultur 97
3.3 $CD56^{bright}$ NK-Zellen als Übergangsstadium der NK-Zellentwicklung 98
3.3.1 Identifikation von klonotypischen *KIR*-Transkripten in $CD56^{bright}$ NK-Zellen 99
3.3.2 Identifikation einer KIR+ Subpopulation von $CD56^{bright}$ NK-Zellen 100
3.3.3 Funktionale Unterschiede zwischen $CD16^{+}$ oder $CD16^{-}$ $CD56^{bright}$ NK-Zellen 103
3.4 Einfluss der Nährzelle auf die KIR-Expression 104

3.4.1 Verminderte Zellproliferation von NK-Populationen auf MSC 105
3.4.2 KIR$^-$ NK-Populationen haben bereits ein Signal erhalten, das sie zu KIR-expremierenden NK-Zellen differenzieren lässt 106
3.4.3 Einfluss von Nährzellen auf die KIR-Induktion von *in vitro* generierten NK-Zellen 107
3.4.4 Die KIR-Induktion erfolgt früh im Verlauf der NK-Zellentwicklung 108
3.5 Einfluss des Notch-Signals auf die KIR-Induktion 112
3.6 Nachweis der mRNA-Transkription von *NKG2A* und *KIR* während der in vitro NK-Zellentwicklung 113
3.6.1 Identifikation von *KIR* mRNA-Transkripten in CD16$^+$ CD16$^-$ oder CD56^{bright} NK-Zellen 116
3.6.2 Veränderung der DNA-Methylierung der *KIR*-Promotoren im Verlauf der natürlichen Killerzellentwicklung im *in vitro* Modell 117
3.6.3 Abnahme der DNA-Methylierung des *KIR2DL3*-Promotors in CD56^{bright} NK-Zellen 120
3.6.4 Im Verlauf der NK-Zellentwicklung kommt es zu einer Reduktion der H3K9me2 im *KIR*-Promotor 121
3.6.5 Transkription von *KIR*-Promotortranskripten und NKTs während der Reifung der NK-Zelle 123
3.6.6 Nachweis von *KIR*-Promotortrankripten und NKTs in CD56^{brigh} NK-Zellen 124
3.6.7 Nachweis eines NKT für KIR3DL1 in einfach KIR$^+$ NK-Zellen 125
3.6.8 Identifikation eines putativen *KIR*-Promotors im Intron zwischen Exon4 und Exon5 des *KIR2DL3*-Gens 126
3.7 Identifikation epigenetisch wirkender Proteine im Verlauf der NK-Zellentwicklung 127
3.8 Etablierung eines lentiviralen Systems zur effizienten Infektion von HSCs, und NK-Zellen 131
3.9 Beeinflussung der KIR-Expression mittels RNAi 136

3.9.1 Nachweis der Funktionalität der verwendeten shRNAs gegen *DNMT* 137
3.9.2 Reprimierung der *DNMT*-Transkription während der NK-Zellentwicklung führt zu einem Anstieg an KIR$^+$ NK-Zellen 138
3.9.3 ShRNA vermittelte Modulation der KIR-Expression in NK3.3 140
3.9.4 Beeinflussung der *KIR*-Transkription durch RNAi 142
3.9.5 Einfluss der verminderten *KIR*-Transkription auf die Transkription von NKTs und Promotortranskripten .. 143
3.9.6 Verminderung der *KIR*-Transkription im Verlauf der NK-Zellentwicklung 145
3.9.7 Verminderung der *NKG2A*-Transkription führt zu einer verminderten KIR-Expression 147
3.10 Eingriff in die epigenetische Regulation der *KIR*-Gene 149
3.10.1 Modulation der KIR-Expression in NK-Zelllinien, durch Verwendung epigenetisch wirkender Substanzen 150
3.10.2 Versuchte Induktion der *KIR*-Transkription in HSCs und IPS-Zellen durch Entfernen der DNA-Methylierung im KIR-Promotor 151
3.10.3 Anstieg der KIR-Expression durch Applikation von AZA im in vitro NK-Zellentwicklungsmodell 152
3.10.4 Verminderung der H3K9me2 in verschiedenen NK-Populationen führte nicht bei allen NK-Zellen zu einer gesteigerten KIR-Expression 153
3.10.5 Inhibition der G9a im Verlauf der NK-Zellentwicklung und ihr Einfluss auf die KIR-Expression 154
3.10.6 Inhibition der G9a bewirkt verminderte Methylierung im *KIR2DL3*-Promotor 157
3.10.7 Untersuchungen des *KIR2DL3*-Promotortranskriptes und des zugehörigen NKTs nach BIX-Zugabe 158
3.10.8 Gesteigerte KIR-Expression im Verlauf einer NK-Generierung 159

3.10.9 Steigerung der KIR-Expression im *in vitro* Modell durch Applikation von epigenetisch wirkenden Substanzen zu Beginn einer NK-Zellentwicklung 160

3.10.10 Induktion von KIR im Verlauf einer *in vitro* NK-Generierung ohne Nährzellen 161

4 Diskussion 164

4.1 Etablierung eines humanen NK-Zellentwicklungssystems zur Erzeugung von therapeutisch einsetzbaren NK-Zellen 164

4.2 NK-Zellen aus expandierten HSCs weisen eine erhöhte Aggressivität gegen leukämische Zellen auf 166

4.3 Ein KIR-induzierendes Signal erfolgt früh im Verlauf der NK-Zellentwicklung 167

4.4 Framework *KIR*s werden im Verlauf der NK-Zellentwicklung vor den klonotypischen *KIR*s demethyliert und transkribiert 169

4.5 Klonotypische *KIR*s werden im Verlauf der CD56 ^{bright} NK-Zellentwicklung demethyliert 170

4.6 *rRNA*-Gene als Modell für die *KIR*-Regulation 173

4.7 RNAi-vermittelte Reprimierung der *NKG2A*-Transkription führt zu einer verminderten KIR-Expression 176

4.8 H3K9me2 hat eine reprimierende Wirkung auf die *KIR*-Gene in der frühen Phase der NK-Zellentwicklung 176

4.9 Einfluss der RNA-Interferenz auf den *KIR*-Promotor 179

4.10 Nicht nur epigenetische Faktoren sind für die Transkription von *KIR* verantwortlich 180

4.11 Veränderung der Genexpression von epigenetischen Schlüsselfaktoren 181

4.12 Steigerung der KIR-Expression durch AZA oder BIX 182

4.13 Möglicher medizinischer Anwendungsbereich der Versuchsergebnisse 183

5 Literaturverzeichnis 185

6 Anhang 203

6.1 Lage von Promotortranskripten und NKTs im KIR-Promotor 203

6.2 Analyse des putativen KIR-Promotors zwischen Exon4 und Exon5 von *KIR2DL3* 204

6.3 Danksagung 207

6.4 Eidesstattliche Erklärung 208

Zusammenfassung

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Ihre Aufgabe ist es, virusinfizierte oder entartete Zellen durch spezielle Rezeptoren, den *Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors* (KIR-Rezeptoren), zu erkennen und anschließend abzutöten. *KIR*-Gene werden in finaldifferenzierten NK-Zellen durch Methylierung reguliert, weitere Regulationsmechanismen sind unbekannt.

Da die *KIR*s nur bei höheren Primaten und dem Menschen vertreten sind, kam keines der immunologisch üblichen murinen Versuchstiermodelle in Frage. In diesen Modellen fehlen somit auch kompatible Liganden für die KIRs.

Daher wurde in dieser Arbeit ein *in vitro* NK-Generierungssystem entwickelt, bei dem erstmalig humane *Mesenchymale Stem Cells* (MSCs) als Nährzellen verwendet wurden. Auf den MSCs wurden humane *Haematopoetic Stem Cells* (HSCs) zu NK-Zellen differenziert, da sich ohne Nährzellunterstützung keine KIR^+ NK-Zellen aus HSCs entwickeln. Ein solches System hat gegenüber einem murinen NK-Zellentwicklungssystem den Vorteil, dass die *in vitro* generierten NK-Zellen auch für eine Applikation am Menschen geeignet sind. Mit Hilfe des *in vitro* Modells konnte nachgewiesen werden, dass ein KIR-induzierendes Signal von den Nährzellen im Verlauf der ersten von insgesamt sechs Entwicklungswochen auf die NK-Vorläuferzellen einwirkt. Dieses ermöglicht ihnen zu KIR-exprimierenden NK-Zellen auszudifferenzieren.

Ferner konnte im Rahmen der NK-Zellentwicklung nachgewiesen werden, dass der erste transkribierte KIR *KIR2DL4* ist. Die übrigen *framework KIRs* werden im Verlauf der NK-Zellentwicklung vor den klonotypischen *KIRs* transkribiert. Diese *KIR*-Transkription korreliert invers mit der *KIR*-Promotormethylierung. Außerdem erfolgte die Demethylierung der *KIR*-Promotoren nicht für den gesamten *KIR*-Lokus in einem einzigen Zellstadium, sondern in verschiedenen NK-Zellstadien. So wird der Promotor des KIRs *KIR2DL4* vor dem Promotor des KIRs *KIR2DL3* demethyliert. Weiter konnte gezeigt werden, dass es durch Verminderung der *KIR*-Transkription zu einem leichten Anstieg der Promotormethylierung kommt. Durch Reprimierung der *NKG2A*-Transkription wurde außerdem eine Verminderung der KIR-Expression erreicht. Eine Reprimierung der Transkription von *DNMT*s führte zu einem Anstieg an KIR^+ NK-Zellen. Neben der DNA-Methylierung haben die Histonmodifikationen H3K9me2 (reprimierend) und H3K4me3 (aktivierend) einen Einfluss auf die KIR-Expression. So kommt es im Verlauf der NK-Zellentwicklung zu einer kontinuierlichen Reduktion der mit transkriptionell inaktivem Chromatin assoziierten

Modifikation H3K9me2 im KIR-Promotor während die mit aktivem Chromatin assoziierte Modifikation H3K4me3 erst nachweisbar war, nachdem der entsprechende KIR transkribiert wurde. Durch Reduktion der H3K9me2 während der NK-Zellentwicklung exprimierten die behandelten NK-Zellen mehr KIRs. Ferner konnte gezeigt werden, dass H3K9me2 in den ersten zwei Wochen an der Regulation der *KIR*-Gene beteiligt ist. Mit der Behandlung von HSCs mit epigenetisch wirkenden Substanzen wurde erreicht, dass sich KIR^+ NK-Zellen auch ohne Nährzellunterstützung aus HSCs entwickeln.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können für eine neue Form der Krebstherapie genutzt werden, da mit der Modifikation des KIR-Repertoires die Aggressivität der NK-Zellen gegenüber Tumorzellen gesteigert werden kann.

Summary

Natural killer cells (NK cells) are part of the innate immune system. They recognize virus-infected or transformed cells by specific killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR receptors) and kill them. *KIR* genes are regulated in final differentiated NK cells by methylation, further regulatory mechanism are unknown.

Since KIRs are represented only in higher primates and humans, none of the immunologically normal murine experimental animal models could be used. Also compatible ligands for KIRs were absenced in these models.

In this thesis, an in vitro NK-generation system was developed in witch human mesenchymal stem cells (MSCs) were used as feeder cells for the first time. On human MSCs haematopoetic stem cells (HSCs) differentiated into NK cells. Without feeder cell support developing NK cells acquire no KIR expression on the cell surface. In comparison to a murine NK cell development system the advantage of a human *in vitro* NK cell development system is that it generated NK cells also suitable for application to humans. Using the in vitro model it could be demonstrated that a KIR induced signal acts on NK precursor cells from the feeder cells during the first of a six week development. Only a one week feeder contact enables the NK cells to acquire KIR. Furthermore, it was shown that the first transcribed KIR is *KIR2DL4*. During NK cell development framework *KIR*s were transcribed before clonotypic *KIR*s. This *KIR* transcription inversely correlated with the *KIR* promoter methylation. In addition, the demethylation of all *KIR* promoters could not be observed in a single cell stage but in multiple stages. First demethylation took place on the framework *KIR* promoter *KIR2DL4* and secondly on the clonotypical *KIR2DL3* promoter. After reducing the transcription level of *KIR* an slight increase of promoter methylation was detected. Also a reduction of KIR expression was achieved through repression of *NKG2A* transcription. Down regulation of *DNMT* transcription leads to an increase of KIR^+ NK cells. Histone H3K9me2 (repressive) and H3K4me3 (active) have an influence on the KIR expression. Therefore a reduction of H3K9me2 was detected during NK cell development for the *KIR* promoter. H3K4me3 was detectable only after the corresponding *KIR* was transcribed. Repressing H3K9me2 during NK cell development the treated NK cells exposes more KIRs. This clearly shows that H3K9me2 plays a role in *KIR* regulation during early NK cell development. HSCs treated with epigenetic drugs leads to KIR^+ NK cells without feeder cell support.

As modifying the NK cell repertoire leads to more aggressive NK cells which can therefor kill tumour cells more effectively. This aspect could be used for a new form of cancer therapy.

Abkürzungsverzeichnis

-	negativ
+	positiv
α	alpha oder anti
A	Adenin
A_{260}	Absorption bei 260nm
A_{280}	Absorption bei 280nm
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AID	activation induced cytidin deaminase
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
Ak	Antikörper
AMP	Ampicllicin
ATP	Adenosintriphosphat
A-Überhang	Adenin-Überhang
AZA	2′-Deoxy-5-azacytidine,
BBS	BES-buffered saline
Bp	Basenpaar
BIX	Bix 01294 trihydrochloride hydratebp
BSA	bovines Serumalbumin; Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CCR	cystein cystein chemokin receptor
ca.	Circa
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
CLP	*common lymphid progenitor*
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzentimeter
cMYC	cellular Myelocytomatose
CMP	*common myeloid progenitor*
CpG	Cytosin--Guanin Dinukleotid
CT	threshold Cycle
cNOS	konstitutive NO-Synthase
cpm	counts per minute

CsCl-Lösung	Cäsiumchlorid-Lösung
cy2	Carbocyanin
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylindol- Dihydrochloridhydrat
DC	Dendritische Zelle
dCTP	Deoxycytidine 5’-triphosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Deoxyguanosine 5’-triphosphate
dH_2O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid: Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyriobnuklease
dNTP	Desoxynukleotide
DNMT	DNA-Methyltransferase
dTTP	Deoxythymidine 5’-triphosphate
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum: Fötales Kälberserum
FITC	fluorescein isothiocyanate
G	Guanin
g	Gramm
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GFP	green fluorescent protein
Gln	Glutamin
GTP	Guanosintetraphosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd 3 phosphat Dehydrogenase
h	Stunde(n)
HLA	humanes Leukozyten Antigen
HSA	Humanes Serum Albumin
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGTP	induzierbares GTP-bindendes Protein
IL	Interleukin
IMDM	Iscoves Modified Dulbecco´s Medium
kb	Kilo-Basen
KIR	Killer cell Immunoglobulin like receptor

L	Liter
LB	lysogeny broth
LB-AMP	lysogeny broth mit Ampicillin
LINE	long interspersed element
LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli (10^{-3})
M	Molar
mA	Milliampere
MACS	magnetic cell sorting
MBq	Mega-Becquerel
MEF	murine embrionale fibroblasten
Mg	Milligramm
MHC	*Major Histocompatibility Complex*
Min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MNC	Mononukleäre Zellen
mRNA	messenger-RNA
MW	molecular weight: Molekulargewicht
µ	Mikro (10^{-6})
µM	Mikromol
µm	Mikrometer
n	Anzahl der durchgeführten Versuche
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NFkB	nuclear factor-kappa B
NK	Natürliche Killerzellen
NKC	*natural killer cluster*
NLK	nemo-like kinase
NS	Nukleinsäure
OD_X	Optische Dichte x nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
Pe	Phycoerythrin
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
RNA	ribonucleic acid: Ribonukleinsäure

RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde(n)
S1	Sicherheitsstufe 1
S2	Sicherheitsstufe 2
SAM	S-Adenosylmethionin
SCF	Stem Cell Factor
SD	Standardabweichung
SH-Gruppe	Sulfhydryl-Gruppe; Thiol-Gruppe
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
T	Thymidin
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TGF	transforming growth factor
TLR	toll-like receptor
Tm	Schmelztemperatur
TNF	tumor necrosis factor; Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethyl Rhodamin Isothiocyanat
TSA	Trichostatin A
T-Überhang	Thymidin-Überhang
U	Uracil
U	unit (Enzymeinheit)
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
WHO	*world healthy organization*
X-Gal	5 bromo 4 chloro 3 indolyl D galactosid
YFP	yellow fluorescent protein
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Das hämatopoetische System des Menschen

Das blutbildende System ist das sich am schnellsten regenerierende Organ im menschlichen Körper. An jedem Tag gehen eine Vielzahl von Zellen zu Grunde und müssen ständig durch neue Zellen ersetzt werden. Die Zelle, die für die Bildung der Blutzellen verantwortlich ist, ist die hämatopoetische Stammzelle (HSC) und weist charakteristische Oberflächenmarker auf. Sie sind unter anderem $CD34^+$ Zellen. Aufgrund der geringen Größe ihrer Zellpopulation, wurden in dieser Arbeit $CD34^+/CD38^+$/differenzierungsmarkernegative Zellen und $CD34^+/CD38^-$/differenzierungsmarkernegative Zellen für die Versuche verwendet (Baum et al., 1992, Bhatia et al., 1997, Egeland et al., 1998, Kiel et al., 2008, Ding et al., 2012).
HSCs sorgen während des gesamten Lebens für die Neubildung von Blutzellen. Die HSCs befinden sich beim erwachsenen Menschen im Knochenmark, in der sogenannten Knochenmarknische (Wolf et al., 1997, Tavian and Peault 2005). Die Knochenmarknische bildet einen speziellen Raum für die HSCs, der dafür sorgt, dass sie sich nicht unkontrolliert teilen und differenzieren. Die Idee der Knochenmarknische geht auf Schofield zurück (Schofield 1978). Die Knochenmarknische setzt sich unter anderem aus mesenchymalen Stammzellen (MSCs), Endothelzellen, Adipocyten, und Osteoblasten zusammen (Frenette et al. 2013). Damit die Stammzelle ihren Stammzellcharakter aufrechterhalten kann, ist sie auf Zytokine wie z.B. *Stem Cell Factor* (SCF) und Thrombopoitin angewiesen. Diese Zytokine werden von Zellen, welche in der Knochenmarknische vorherrschen, gebildet (Cumano et al., 2007; Shestopalov et al., 2012; Frenette et al. 2013; Méndez-Ferrer et al., 2010)
Die Zahl an HSCs ist beschränkt. Teilt sich eine Stammzelle und die Nische ist noch nicht mit Blutstammzellen gefüllt, entsteht durch Zellteilung eine zweite HSC. Sind jedoch alle Plätze in der Nische belegt, entstehen durch Zellteilung zwei unterschiedliche Zellen. Eine Zelle behält den Stammzellcharakter bei, wohingegen die andere Zelle zu einer Blutzelle ausdifferenziert. Während dieser Differenzierung nimmt das Differenzierungspotential von jeder Entwicklungsstufe zur nächsten hin ab. Somit weisen frühe Entwicklungsstadien ein deutlich größeres Entwicklungspotenzial auf als spätere (Stem Cells Scientific Progress and Future Research Directions 2004; Passegue et al., 2003).
Aus den langlebigen HSCs entwickelt sich zunächst eine *Common Lymphid Progenitor* (CLP), oder aber eine *Common Myeloid Progenitor* (CMP) (Kondo et al., 1997, Akashi et al., 2000, Stem Cells Scientific Progress and Future Research Directions 2004, Immunology

Janeway 2004). Die CMP bringt über mehrere Zwischenstadien Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen hervor. Aus der CLP entwickeln sich T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen (Abb. 1) (Stem Cells Scientific Progress and Future Research Directions 2004; Immunology Janeway 2004).

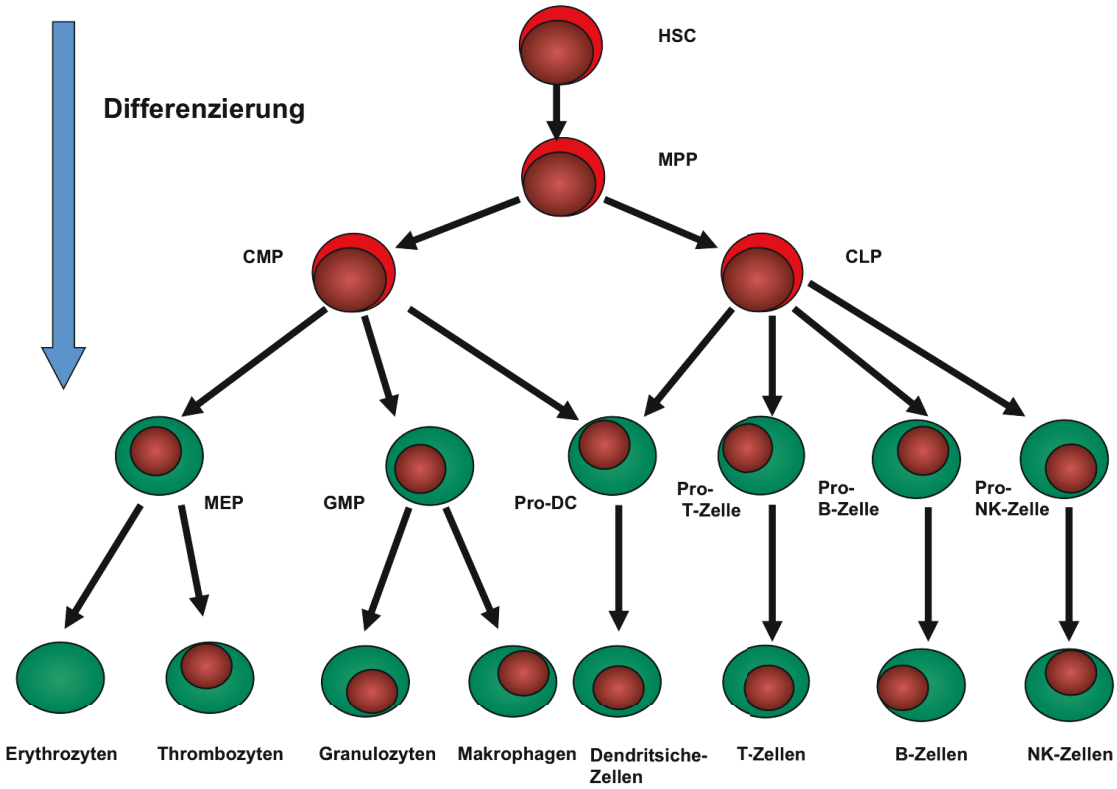


Abb. 1: Schematische Darstellung der Hämatopoese.

1.2 Das menschliche Immunsystem

Die Aufgabe des Immunsystems ist es, den Organismus vor der Besiedlung durch Krankheitserreger wie Bakterien, Viren, Pilze oder Würmer zu schützen. Die Abwehr von Krankheitserregern beginnt jedoch schon viel früher: durch Bildung von Barrieren. So bildet die Haut eine natürliche Barriere, wodurch das Eindringen der Krankheitserreger erschwert wird. Des Weiteren ist die Haut von Bakterien besiedelt, die den „unerwünschten“ Bakterien die Nahrung und den Lebensraum verknappen.

Die vorderste Front des Immunsystems bildet das angeborene Immunsystem zu dem Makrophagen, Granulozyten, Dendritische-Zellen (DCs) und NK-Zellen gehören. Ihre Rezeptoren sind in der Keimbahn codiert. Die meisten von ihnen erkennen konservierte Pathogenstrukturen, wodurch die Zellen des angeborenen Immunsystems auch ohne vorherige Aktivierung den Erreger abtöten können. Zu den Rezeptoren des angeborenen Immunsystems

zählen u.a. Lipopolysaccharid (LPS)-Rezeptoren, welche gramnegative Bakterien erkennen. Einige bakterielle Proteine werden durch den N-formyl-methionyl-Rezeptor erkannt. Eine weitere Rezeptorfamilie des angeborenen Immunsystems bilden die *toll-like* Rezeptoren. Diese Rezeptorfamilie erkennt konservierte Pathogenstrukturen, zu denen unter anderem doppelsträngige RNA zählt, welche bei der Vermehrung von einigen Viren auftritt.

Ein Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem stellen DCs dar. Sie nehmen über rezeptorvermittelte Phagozytose oder Makropinozytose Krankheitserreger auf. Diese werden nach der Aufnahme lysiert. Die dabei entstehenden Peptidbruchstücke des Erregers werden dem adaptiven Immunsystem über *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Klasse-II-Moleküle präsentiert. MHC-Klasse-II-Moleküle werden u.a. auf einigen Immunzellen, den antigenpräsentierenden Zellen, zu denen Makrophagen und DCs gehören, exprimiert. Über MHC-Klasse-II-Moleküle werden adaptive Immunzellen von antigenpräsentierenden Zellen aktiviert.

Damit das Immunsystem intrazelluläre Pathogene erkennen kann, binden Bruchstücke von intrazellulären Peptiden an MHC-Klasse-I-Moleküle, welche zu diesem Zweck extrazellulär präsentiert werden. MHC-Klasse-I-Moleküle werden von beinahe jeder kernhaltigen Zelle exprimiert. Zwei getrennte Mechanismen erschweren den Pathogenen sich einer Immunreaktion, unterstützt durch MHC-I-Moleküle, zu entziehen. Erstens sind die MHC-Klasse-I-Moleküle polygen. Es gibt verschiedene MHC-Klasse-I-Gene, die *Human Leukocyte Anigen* (HLA) HLA-A HLA-B und HLA-C genannt werden, mit unterschiedlichen Bindungspräferenzen von Peptidbruchstücken. Dies führt dazu, dass jede Zelle über eine Gruppe von MHC-Klasse-I-Molekülen verfügt, die wiederum eine unterschiedliche Präferenz für Peptidbruchstücke aufweisen. Um den Pathogenen eine Anpassung noch weiter zu erschweren, ist MHC-Klasse-I nicht nur polygen sondern zweitens auch sehr polymorph. Dies hat zur Folge, dass es von jedem *MHC-Klasse-I*-Gen (*HLA-A, HLA-B, HLA-C*) viele allelische Varianten gibt. So gibt es von *HLA-C* die allelischen Varianten *HLA-C1* und *HLA-C2*. Für *HLA-B* werden die allelischen Varianten *HLA-BwX* z.B. *HLA-Bw4* genannt. Durch diese beiden Mechanismen wird es den Pathogenen erschwert, sich einer Erkennung durch das Immunsystem zu entziehen.

Täglich werden in einer Zelle neue Peptide auf- und abgebaut. Dabei werden die Peptide vom Proteasom zerschnitten und es entstehen Peptidbruchstücke. Diese werden in das endoplasmatische Retikulum transportiert. Dort werden die MHC-Klasse-I-Moleküle mit den Peptidbruchstücken beladen, anschließend zur Zelloberfläche transportiert und dort exprimiert. Nachdem eine Zelle mit intrazellulären Erregern infiziert wurde, werden auch

Proteine der Erreger abgebaut und über MHC-Klasse-I präsentiert. NK-Zellen überprüfen, ob die Zielzellen MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren und T-Zellen kontrollieren, welche Peptidbruchstücke von den MHC-Klasse-I-Molekülen gebunden wurden.

Zu den Zellen des adaptiven Immunsystems gehören B-Zellen und T-Zellen. Zwar beginnt die B- und T-Zellentwicklung im Knochenmark, aber nur die B-Zellentwicklung findet dort vollständig statt. T-Zellen dagegen verlassen früh das Knochenmark und besiedeln für ihre weitere Entwicklung den Thymus. Die Rezeptoren des adaptiven Immunsystems sind nicht fest in der Keimbahn codiert. Ihre Rezeptoren liegen segmentiert vor. Während ihrer Entwicklung lagern B-Zellen und T-Zellen ihre Rezeptorgensegmente zufällig um, wodurch es zu einem Verlust an genetischer Information kommt. Die Gensegmente, welche zwischen den zusammengeführten Gensegmenten liegen, werden aus der DNA entfernt. Dieser Mechanismus hat einen entscheidenden Vorteil. Die Rezeptoren liegen nicht fest codiert in der DNA vor und jede T-Zelle oder B-Zelle hat einen einzigartigen Rezeptor, wodurch es den Krankheitserregern deutlich erschwert wird, sich dem Immunsystem anzupassen.

T-Zellen können in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Zu den bisher sehr gut untersuchten T-Zellen gehören die zytotoxischen T-Zellen, die das Oberflächenmolekül CD8 exprimieren. Sie sind für die zellvermittelte Immunreaktion verantwortlich, werden durch DCs aktiviert und patrouillieren im Organismus. Sie können mit ihrem T-Zellrezeptor an ein MHC-Klasse-I-Molekül binden, welches ein Peptid in seiner Bindungsfurche trägt. Während der Reifung der T-Zellen findet ein Selektionsprozess statt. Es werden T-Zellen abtötet, die an MHC-Klasse-1-Moleküle binden können, welche körpereigene Peptidbruchstücke in ihrer Bindungsfurche gebunden haben. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass nur T-Zellen überleben, die an einer Kombination aus MHC-Klasse-I mit gebundenem körperfremden Peptidbruchstück binden können.

Trifft eine zytotoxische T-Zelle nach Aktivierung auf eine Körperzelle, an deren MHC-I-Moleküle sie mit ihrem T-Zellrezeptor binden kann, wird die Zielzelle lysiert. Durch diesen Umstand werden intrazelluläre Pathogene abgetötet und die Vermehrung von Viren unterbunden. An uninfizierte Zellen kann die T-Zelle nicht binden und daher werden diese Zellen nicht abgetötet.

Für die T-Helferzellen ist das Oberflächenmolekül CD4 charakteristisch. Sie modulieren eine Immunantwort und töten nicht direkt Krankheitserreger ab. Die CD4-T-Helferzelle wird nach Interaktion ihres T-Zellrezeptors mit MHC-II-Molekülen auf einer Antigenpräsentierendenzelle aktiviert und sezerniert Zytokine. Je nachdem, welche Signale

sie von der Antigenpräsentierendenzelle erhalten hat, entwickelt sich eine T_H1- oder T_H2-Immunantwort.

Bei einer T_H1-Antwort werden von den CD4-T-Zellen IFN-γ, Tumornekrosefaktor (TNF)-α und Leukotriene sezerniert, welche z.B. für eine Aktivierung von Makrophagen sorgen. Weiter werden B-Zellen angeregt, opsonisierende Antikörper frei zusetzen. Eine T_H1-Antwort leitet eine durch Phagozytose dominierte Antwort ein.

Bei einer T_H2-Antwort werden Interleukin (IL)-4 und IL-5 von den CD4-T-Helferzellen sezerniert. Dadurch kommt es bei B-Zellen zu einer Sezernierung von IgE-Antikörpern so wie zu einer Aktivierung von Mastzellen, Basophilen und Neutrophilen. Diese Antwort wird z.B. gegen Würmer eingesetzt.

Wie T-Zellen gehören auch die B-Zellen zum adaptiven Immunsystem und patrouillieren u.a. im Blut. Wenn eine B-Zelle durch ihren membrangebundenen Rezeptor ein Antigen bindet und aktiviert wird, wandert die Zelle in den nächsten Lymphknoten und interagiert mit DCs und CD4-T-Helferzellen. Diese aktivieren die B-Zelle und sorgen dafür, dass sie Antikörper freisetzt. Die B-Zelle proliferiert und entwickelt sich zu einer sogenannten Plasmazelle. Früh gebildete Antikörper sind IgM-Antikörper und für das Antigen nicht hoch spezifisch. Einige B-Zellen durchlaufen daraufhin im Keimzentrum eines Lymphknotens eine sogenannte somatische Hypermutation, bei der in der Bindestelle des Antikörpers für das Antigen zufällig Mutationen eingefügt werden. Durch diese Mutationen kann die Spezifität des Antikörpers unverändert bleiben oder aber abnehmen. Es kann aber auch vorkommen, dass der Antikörper spezifischer für das Antigen wird. Daher wird die Spezifität ständig überprüft. Der B-Zellklon, welcher am Besten das Antigen binden kann, setzt sich im Verlauf des Selektionsprozesses durch.

Nicht nur die Antigenbindestelle wird während der Affinitätsreifung der B-Zelle verändert, sondern auch der konstante Teil des Antikörpers. Es gibt fünf verschiedene Antikörperklassen IgM, IgD, IgG, IgA und IgE. Nach Stimulation sezernieren B-Zellen immer IgM-Antikörper. Nachdem der Antiköper sein passendes Antigen gefunden und an ihm gebunden hat, hängt es von der Antikörperklasse ab, welche Effektorfunktion vom gebundenen Antikörper ausgelöst wird. Zytokine, welche von der T-Helferzelle an die B-Zelle sezernieren wurden, bestimmen, welche Antikörperklasse von den B-Zellen gebildet wird. Aus B-Zellen, die eine besonders hohe Affinität gegenüber dem Antigen aufweisen, bilden sich Gedächtniszellen. Diese Zellen sind sehr langlebig und können bei einer erneuten Infektion sofort hoch spezifische Antikörper freisetzen und so den Eindringling bekämpfen (Immunsystem und Infektiologie 1999; *Celluar and Molecular Immunobiology 2002*; *Immunology* Janeway 2004).

1.3 NK-Zellen: ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems

NK-Zellen sind Lymphozyten und gehören zum angeborenen Immunsystem. 10-20% der Zellen des peripheren Blutes sind NK-Zellen. Sie sind jedoch nicht nur im Blut nachweisbar, sondern reife NK-Zellen sind auch in den sekundären lymphatischen Organen zu finden (Gre´goire et al., 2007).

Sie wurden 1975 von Kiessling zum ersten Mal beschrieben und sind kleine sehr granuläre Zellen (Kiessling et al., 1975a, Kiessling et al., 1975b, Herberman et al., 1975). Das Wissen über die NK-Zellen war zu Beginn sehr begrenzt. Man wusste, dass sie entartete Zellen abtöten können und dies ohne vorherige Aktivierung (Kissling et al., 1975a, Kissling et al., 1975b, Herberman et al., 1975). Darauf beruht auch ihre Bezeichnung als natürliche Killerzelle.

Heute weiß man, dass NK-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von Viren und bei der Bekämpfung von entarteten Zellen spielen (Hoglund et al., 1997, Brion et al., 1999). Sie töten Zellen ohne vorherige Aktivierung ab, welche von Viren infiziert wurden. Dadurch wird die Vermehrung des Virus verlangsamt, und dem adaptiven Immunsystem wird die Zeit verschafft, die es benötigt, um die Virusinfektion erfolgreich abzuwehren (Kissling et al., 1975a; Herberman et al., 1975; Trinchieri 1989). Des Weiteren sezernieren sie auch Zytokine und modulieren auf diese Weise, vergleichbar mit CD4-T-Helferzellen, die Immunantwort und bilden ein Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Durch die Freisetzung von Chemokinen rekrutieren sie weitere Immunzellen zum Infektionsort (Cooper et al., 2001, Martin-Fontecha et al., 2004, Walzer et al., 2005, Degli-Esposti et al., 2005; Moretta et al., 2006, Morandi et al., 2006)

NK-Zellen sind nicht nur an der Abwehr von Krankheitserregern und der Vernichtung von Tumorzellen beteiligt, sondern sie haben auch eine wichtige Rolle im Verlauf einer Schwangerschaft. So sorgen sie z.B. dafür, dass sich die Gewebestruktur im Uterus verändert und der Fötus sich in den Uterus „einnisten“ kann (Moffett-King 2006, Lee et al., 2014).

Die Rezeptoren der NK-Zelle sind fest in der Keimbahn codiert, vergleichbar mit denen der Makrophagen und Granulozyten. Von den T- und B-Zellen unterscheiden sich die NK-Zellen deutlich. Ihre Rezeptoren sind nicht so variabel wie die aus Gensegmenten zusammengesetzten Rezeptoren der T-Zellen und B-Zellen (Moretta et al., 2002a; Moretta et al., 2002b), denn sie erkennen keine körperfremden, sondern nur körpereigene Strukturen. Ljunggren und Kärre entdeckten, wie NK-Zellen ihre Zielzellen identifizieren und abtöten. Zellen, die nicht in der Lage sind, selbst-MHC-Klasse-I-Moleküle zu exprimieren, werden

von den NK-Zellen abgetötet. Diese Entdeckung nannten sie „*missing self*“ Hypothese (Ljunggren und Kärre, 1990).
Gesunde Körperzellen weisen eine intakte Expression an MHC-Klasse-I-Molekülen auf. Die Expression von MHC-Klasse-I schützt sie vor Abtötung durch die NK-Zelle. Manche Viren unterbinden jedoch die MHC-Klasse-I-Expression einer infizierten Körperzelle, um sich vor der Entdeckung durch CD8-T-Zellen zu schützten. Ebenfalls weisen entartete Zellen häufig eine reduzierte Expression oder ein komplettes Fehlen von MHC-Klasse-I-Molekülen auf. Diese veränderte Expression von MHCs führt dazu, dass die NK-Zelle aktiviert wird (Ljunggren und Kärre 1990; Cerwenka und Lanier 2001; Trowsdale 2001).
Durch diese Aktivierung kommt es in der NK-Zelle zu einer Polarisierung und perforin- und granzymtragende Granula werden in Richtung der Zielzelle entleert. Perforin öffnet die Zellmembran der Zielzelle, sodass Granzym in diese eindringen kann. Dort löst Granzym die Apoptose aus, indem es die proapoptotischen Enzyme Caspase 3 und Caspase 7 aktiviert (Eischen et al., 1997; Cullen und Martin, 2008).

1.3.1 Funktionelle Unterschiede innerhalb der CD56-exprimierenden NK-Zellen

NK-Zellen können aufgrund der An- und Abwesenheit von Oberflächenrezeptoren charakterisiert werden. Sie exprimieren CD56 und sind für das Antigen CD3-negativ (Lanier et al., 1991; Farag et al., 2002; Papamichail et al., 2004). Anhand der Expressionsstärke von CD56 können die NK-Zellen weiter in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Maximal 90% der $CD56^{+}$ NK-Zellen exprimieren das CD56-Molekül schwach. Sie werden wegen dieses Umstandes $CD56^{\mathbf{dim}}$ NK-Zellen genannt. Gleichzeitig exprimiert die größte Gruppe der $CD56^{\mathbf{dim}}$ NK-Zellen den FC-Rezeptor CD16 stark. Sie sind sehr granulär, da sie große Mengen an granzym- und perforintragende Granula intrazellulär aufweisen. Diese Gruppe der NK-Zellen wird zu den zytotoxischen NK-Zellen gezählt, deren Funktion es ist, Zielzellen abzutöten (Jacobs et al., 2001; Campbell et al., 2001; Cooper et al., 2001; Ferlazzo G., 2004).
Im Vergleich zu den $CD56^{\mathbf{dim}}$ NK-Zellen bilden die $CD56^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen eine sehr viel kleinere Gruppe. Sie wurden 1989 von Nagler erstmalig beschrieben (Nagler et al., 1989). Diese Zellen weisen eine weitaus höhere Oberflächenexpression von CD56 auf, als die $CD56^{\mathbf{dim}}$ NK-Zellen, daher ihr Name. Sie exprimieren kein CD16. $CD56^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen sind für den Oberflächenrezeptor NKG2A positiv. Sie exprimieren wie alle NK-Zellen den *framework* KIR *KIR2DL4*, jedoch keine klonotypischen KIRs (Freud und Caligiuri 2006; Caligiuri 2008). Dieser Population von NK-Zellen fehlt die Fähigkeit Zielzellen abzutöten.

Sie sezernieren nach ihrer Aktivierung Zytokine und Chemokine, welche andere Zellen des Immunsystems zum Infektionsort führen und aktivieren. Durch die CD56^{bright} NK-Zellen werden folgende Zytokine sezerniert, IL-3, IL-10, IL-13, INF-γ und TNF-β (Cooper et al., 2001; Fehniger et al., 1999). Es wird vermutet, dass die CD56^{bright} NK-Zellen eine Vorstufe der CD56^{dim} NK-Zellen darstellen (Chan et al., 2007; Romagnani et al., 2008; Ouyang et al., 2007). Eine kleine Subpopulation der CD56^{bright} NK-Zellen weist eine Oberflächenexpression von CD16 auf. Die Expression von klonotypischen KIRs ist in dieser Population schwach ausgeprägt (Béziat et al., 2011).

Eine sehr kleine Population der NK-Zellen ist charakterisiert durch die Abwesenheit von CD56 auf ihrer Zelloberfläche und sie exprimieren CD16^{bright} (Mavillio et al., 2005).

Tabelle 1: Unterschiede zwischen CD56^{dim} und CD56^{bright} NK-Zellen (modifiziert nach Cooper et al., 2001).

	CD56^{bright}	**CD56^{dim}**
Prozentuale Verteilung der NK-Zellen	Maximal 10	Maximal 90
Oberflächenmarker		
CD16	Nur auf einer kleinen Subpopulation exprimiert	Auf allen exprimiert
CD56	Starke Expression auf allen Zellen	Exprimiert auf allen Zellen
KIR	Keine Expression	Exprimiert
NKG2A	Auf allen NK-Zellen exprimiert	Auf einigen NK-Zellen exprimiert
Produktion von Zytokinen	Stark sezernierend	Sehr schwach sezernierend
Zytotoxizität	Sehr schwach	Sehr stark

1.3.2 Die Entwicklung der hämatopoetischen Stammzelle zur NK-Zelle

NK-Zellen entwickeln sich, wie alle anderen Blutzellen auch, aus den CD34^{+} HSCs (Abb. 2). Sie haben eine beschränkte Lebensspanne und müssen fortlaufend ersetzt werden (Yokoyama et al., 2004). Ihre Entwicklung findet im Knochenmark statt (Caligiuri 2008; Di Santo et al., 2006; Briercheck et al., 2010; Yu et al., 2013). Im Verlauf ihrer späteren Entwicklung kommt es zur funktionellen Reifung. Unter funktioneller Reifung versteht man, dass die NK-Zelle beginnt, Rezeptoren zu exprimieren, die für ihre Funktion essentiell sind (Freud et al., 2006; Freud et al., 2006b; Di Santo et al., 2006; Caligiuri 2008). Die meisten Erkenntnisse über die NK-Zellentwicklung wurden durch Analysen der murinen NK-Zellentwicklung gewonnen. Ebenfalls wurde die NK-Zellentwicklung im Menschen durch Untersuchungen von peripheren Lymphorganen verfolgt.

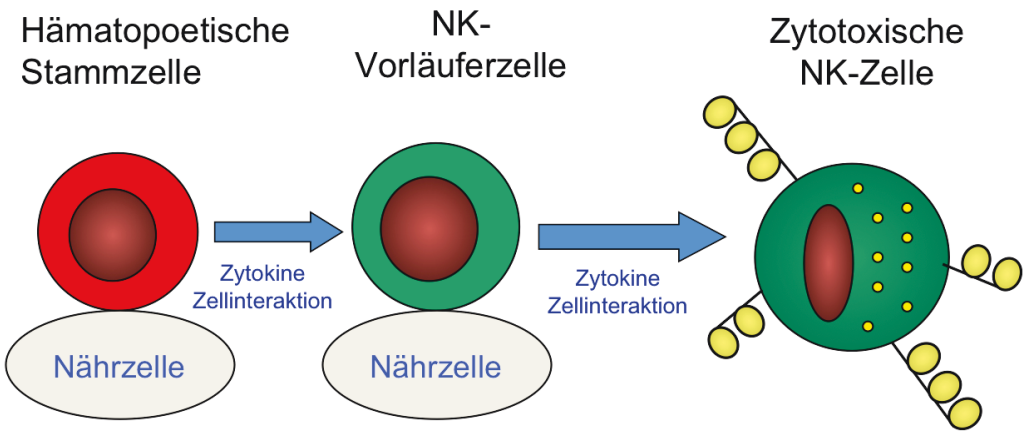


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der NK-Zellentwicklung. HSC differenzieren durch Nährzellkontakt und Zytokine zu NK-Zellen.

Über die NK-Zellentwicklung im Menschen ist nur wenig bekannt. Jedoch konnten fünf Stadien der NK-Zellentwicklung identifiziert werden (Freud et al., 2006) Miller etablierte bereits 1999 ein NK-Entwicklungssystem, bei dem HSCs zusammen mit adhärenten murinen AFT-Zellen, welche die NK-Zellentwicklung unterstützen, co-kultiviert werden (Miller et al., 1999).

Für die Entwicklung der Blutstammzelle zur NK-Zelle sind Zytokine und Zellkontakt mit den Nährzellen notwendig (Abb. 2, Dezell et al., 2012). Die NK-Zellentwicklung beginnt im Knochenmark des menschlichen Körpers. Dort interagieren Blutstammzellen mit Endothelzellen, von denen Zytokine freigesetzt werden, die auf die HSCs einwirken. Durch das *in vitro* Generierungssystem soll die Knochenmarknische nachgebildet werden. Nährzellen unterstützen nicht nur die Entwicklung der HSC zur NK-Zelle, sondern sorgen auch für eine Proliferation der Stammzellen (Punzel et al., 2002). Das NK-Zellentwicklungssystem wurde durch die Verwendung der murine embryonale Leberzelllinie EL08 noch weiter verbessert. Durch die Verwendung dieser Nährzelle können mehr HSCs zu KIR^+ NK-Zellen differenziert werden (McCullar et al., 2008). Für eine erfolgreiche NK-Zellgenerierungskultur müssen jedoch weiterhin Zytokine (IL-2, IL-3, IL-7, IL-15, SCF, Flt3-Ligand) zugegeben werden, um KIR^+ NK-Zellen zu erhalten (Miller et al., 1999; Punzel et al., 2002; McCullar et al., 2008). Abbildung 3 illustriert, wie sich die Entwicklung von NK-Zellen über die Expression von Oberflächenmarkern in fünf Stadien einteilen lässt.

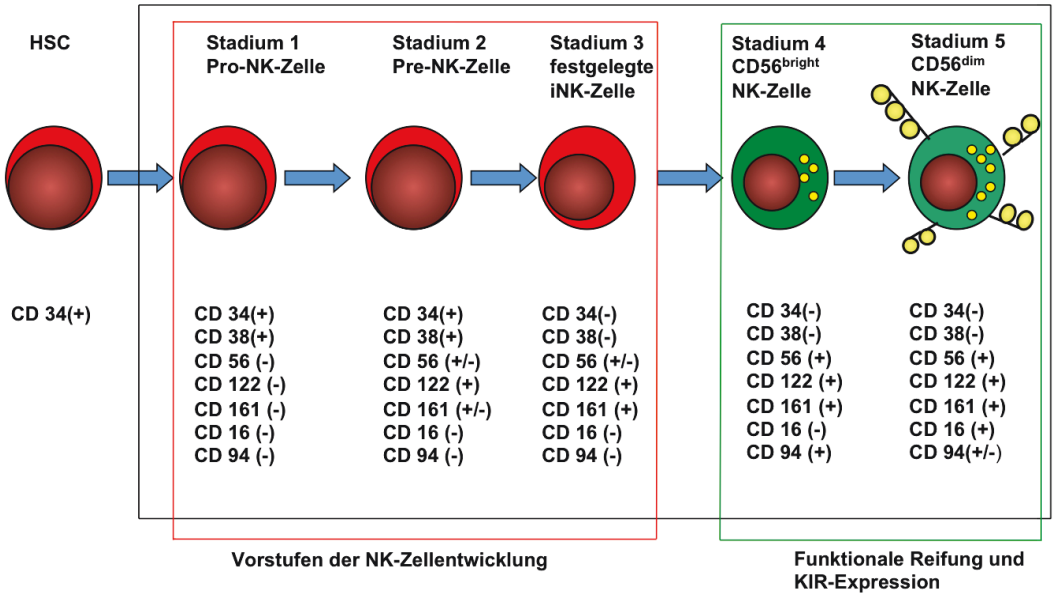


Abb. 3: Entwicklung der natürlichen Killerzelle, ausgehend von der HSCs, mit einigen ausgewählten Oberflächenmarkern, durch deren Expression die unterschiedlichen Stadien charakterisiert werden. Die Daten basieren auf Untersuchungen von sekundären Lymphorganen und Beobachtungen aus einem *in vitro* Modell (Modifiziert nach Freud et al., 2006; Caligiuri 2008).

Nachdem sich die HSCs zu einer CLP entwickelt hat, kommt es zur Bildung des ersten NK-Zellvorläuferstadiums, der sogenannten Pro-NK-Zelle. An das Stadium der Pro-NK-Zelle schließt sich das Pre-NK-Zellstadium an, welches phänotpyisch durch einen Anstieg der CD117-Expression und der Expression von CD122 (IL15R-β-Kette) identifizierbar ist. Dieses Stadium besitzt als erstes Stadium der NK-Zellentwicklung die Fähigkeit, auf IL-15 zu reagieren. Sowohl Pro- als auch Pre-NK-Zellen sind noch nicht fest auf die Entwicklung von NK-Zellen determiniert und können sich auch noch zu anderen Zellen des Blutsystems entwickeln (Freud et al., 2006; Freud et al., 2006b; Di Santo et al., 2006; Caligiuri 2008).

Das IL-15 Signal ist für die Entwicklung der NK-Zelle sehr wichtig, denn dieses Signal sorgt dafür, dass die Vorläuferzelle weiter zu einer reifen NK-Zelle entwickelt (Becknell et al., 2005).

Erst die auf die Pre-NK-Zelle folgende unreife iNK-Zelle ist fest auf die Entwicklung einer NK-Zelle determiniert. Sie exprimiert kein NKG2A auf ihrer Zelloberfläche und ihr fehlt die Expression von CD34. Im Stadium der iNK-Zelle beginnt auch die Expression von CD56 einem Adhäsionsmolekül. Im Verlauf der NK-Zellentwicklung kommt es zu einem starken Anstieg der CD56-Expression und der NKG2A-Rezeptor wird auf der Zelloberfläche exprimiert. Dieses Stadium wird CD56^{bright} NK-Zelle genannt. In CD56^{bright} NK-Zellen wird der *framework* KIR *KIR2DL4* exprimiert. Für das CD56^{dim} NK-Zellstadium ist die schwächere Oberflächenexpression von CD56 charakteristisch. Nicht jede CD56^{dim} NK-Zelle

exprimiert NKG2A. Die meisten CD56^{dim} NK-Zellen weisen eine Oberflächenexpression von CD16 auf. Neben dem *framework* KIR *KIR2DL4*, welcher von jeder CD56^{dim} NK-Zelle exprimiert wird, werden von einigen CD56^{dim} NK-Zellen klonotypische KIRs exprimiert (Freud et al., 2006; Caligiuri 2008; Briercheck et al., 2010; Huntinhgton et al., 2007). Das Peptidhormon IL-15 ist ausschlaggebend für die Induktion von KIR^{+} NK-Zellen und wirkt dabei antiapoptotisch auf die NK-Zelle (Becknell et al., 2005).

1.3.3 Aktivierende und inhibierende Rezeptoren der NK-Zelle

NK-Zellen können ohne vorherige Aktivierung Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen abtöten (Kiessling et al., 1975a; Kiessling et al. 1975b). Die Identifikation von Zielzellen erfolgt über einige ihrer Oberflächenrezeptoren, die entweder aktivierend oder inhibierend wirken (Yokoyama et al., 2003; Kelly et al., 2005).

NK-Rezeptoren erkennen keine konservierten Pathogenstrukturen oder körperfremde Strukturen, sondern körpereigene Strukturen. Eine Gruppe der NK-Rezeptoren bindet an MHC-Klasse-I oder MHC-Klasse-I-ähnliche Moleküle (Ljunggren et al., 1990).

Es gibt drei NK-Rezeptorfamilien die mit der NK-Zellfunktionalität assoziiert sind. Die erste Familie ist die der natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren zu denen NKp30, NKp44 und NKp46 gehören (Pende et al., 1999; Moretta et al., 2000; Biassoni et al., 2001). Ihre Expression ist auf NK-Zellen beschränkt; sie sorgen bei Stimulation für die Aktivierung der NK-Zelle. Es gibt keine inhibitorischen NKps. NK-Zellen können durch diese Moleküle virale Oberflächenantigene oder aber Antigene, welche für einen Tumor spezifisch sind, erkennen (Arnon et al., 2004; Vitale et al., 1998; Sivori et al., 1997; Mandelboim et al., 2001; Carlsten et al., 2008). Hierdurch wird die NK-Zelle aktiviert und tötet die Zielzelle ab

Zur zweiten Gruppe werden die *C-Typ-Lektin-ähnlichen-Rezeptoren* gezählt, zu deren Mitgliedern die NKG2-Familie gehört. Einige Familienmitglieder wirken aktivierend andere inhibierend. Sie liegen auf Chromosom 12 im *natural killer cluster* (NKC). Zu dieser Rezeptorfamilie gehören NKG2A, NKG2C, NKG2D, NKG2E und NKG2F. Bis auf NKG2D binden alle anderen Familienmitglieder an CD94 und liegen mit ihm gekoppelt auf der Zelloberfläche vor (Glienke et al., 1998; Houchins et al., 1991; Lazetic et al., 1996; Plougastel et al., 1996; Martin et al., 2002).

Mit Ausnahme von NKG2D binden die Mitglieder der NKG2-Familie an HLA-E (Braud et al., 1998; Borrego et al., 1998). HLA-E gehört zur Familie der MHC-Klasse-I-ähnlichen-Moleküle und ist nicht sehr polymorph. Damit HLA-E stabil auf der Oberfläche exprimiert

werden kann, muss in der Bindungsfurche ein Peptidbruchstück einer Signalsequenz von HLA-A, HLA-B oder HLA-C gebunden vorliegen (Braud et al., 1997). HLA-A, HLA-B und HLA-C gehören zur MHC-Klasse-I-Genfamilie. HLA-E signalisiert somit, dass von der Zelle MHC-Klasse-I exprimiert wird. Bindet NKG2A an HLA-E verhindert dies, dass die Zielzelle von der NK-Zelle abgetötet wird. NKG2A ist ein inhibitorischer Rezeptor. Somit dient HLA-E als Sicherungsmechanismus, welcher der NK-Zelle anzeigt, dass die Zielzelle MHC-I-Moleküle exprimiert (Braud et al., 1998; Borrego et al., 1998; Lanier et al., 2005).

Wenn es zu einer Störung in der MHC-I-Expression kommt, kommt es ebenfalls zu einer Störung der HLA-E-Expression, da die HLA-A-, HLA-B- und HLA-C-Signalpeptidbruchstücke fehlen. Folglich bleibt die Peptidbindefurche von HLA-E unbesetzt und das HLA-E Molekül kann keine stabile Konformation einnehmen. Dies führt dazu, dass HLA-E nicht auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Störungen in der MHC-I-Expression können durch Virusinfektionen auftreten oder aber eine Folge einer karzinogenen Entartung der Zelle sein**.** Zellen, die kein MHC-I exprimieren, weisen ebenfalls keine HLA-E Expression auf und können kein inhibitorisches Signal über NKG2A an die NK-Zelle senden. Dies hat zur Folge, dass die NK-Zelle aktiviert wird und die Zielzelle lysiert.

NKG2D, welches als einziges NKG2-Familienmitglied nicht an CD94 bindet, ist ein aktivierender Rezeptor, welcher auf allen NK-Zellen vertreten ist. Gemäß der genetischen Struktur, hat NKG2D nur eine geringe Ähnlichkeit mit den übrigen Familienmitgliedern (Houchins et al., 1991; Wu et al., 1999). Im Gegensatz zu ihnen bindet er nicht an MHC-I-ähnlichen-Molekülen. Durch Zellstress, einer viralen Infektion oder karzinogene Entartung, werden stressinduzierte Moleküle auf der Zelloberfläche verstärkt exprimiert. Zu den Molekülen, welche als Folge von Zellstress exprimiert werden, gehören MICA und MICB. Die Anwesenheit dieser Moleküle wird von NKG2D erkannt. Eine Stimulation des NKG2D-Rezeptors führt zu einer Aktivierung der NK-Zelle (Bauer et al., 1999; Jamieson et al., 2002; Raulet et al., 2013). Auch wenn inhibitorische Signale vorliegen, wird die NK-Zelle durch NKG2D aktiviert und lysiert die Zielzelle. Dieser Vorgang wird *inhibition override* genannt.

Die dritte Familie von NK-Rezeptoren bilden die KIR-Rezeptoren, welche an Oberflächenrezeptoren der Zielzelle binden. KIR-Rezeptoren kommen auf ausdifferenzierten, reifen NK-Zellen und auf Subpopulationen von T-Zellen vor (Shilling et al., 2002**;** Moretta et al., 2004). Sie sind nur im Menschen und bei höheren Primaten auf NK-Zellen vorhanden und gehören zu den wichtigsten Rezeptoren der NK-Zelle (Khakoo et al., 2000; Carrington et al., 2003; Parham et al., 2012). Die *KIR*-Gene sind, als Mitglieder der Immunoglobulin-

Superfamilie, auf Chromosom 19q13.4 codiert (Carrington et al., 2003). Es gibt 15 *KIR*-Gene und 2 KIR-Pseudogene (Uhrberg et al., 1997). Sie liegen im *Leucoyte Receptor Complex* (LCR), in dem sie einen ca. 150 kb großen genomischen Abschnitt einnehmen. Bei den *KIR*-Genen handelt es sich neben einer stark homologen auch um eine sehr polygene und polymorphe Familie (Carrington et al., 2003; Uhrberg 2005; Wagtmann et al., 1995). Es gibt sowohl aktivierende als auch inhibierende KIR-Rezeptoren, welche von unterschiedlichen Genen codiert werden und nicht unterschiedliche Splicevarianten eines Gens sind. *KIR*-Gene unterliegen einer einheitlichen Nomenklatur, die sowohl auf ihrer extra- als auch intrazellulärer Struktur, beruht. Die KIRs bestehen entweder aus zwei oder drei extrazellulären immunoglobolin ähnlichen Domänen. Auf der intrazellulären Struktur beruht die Funktion der KIRs. KIRs, die eine lange zytoplasmatische Proteindomäne aufweisen, wirken inhibitorisch. Der lange zytoplasmatische Teil weist ein *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif (*ITIM)-Motiv auf, über welches inhibitorische Signale vom Rezeptor zum Zellkern der NK-Zelle übermittelt werden (Colonna et al., 1995; Ravetch et al., 2000; Long et al., 1999; Lanier, 1998).

Aktivierende Rezeptoren besitzen nur eine kurze intrazelluläre Proteindomäne und ihnen fehlt daher das ITIM-Motiv. In der Transmembrandomäne von jedem aktivierenden Rezeptor ist eine positiv geladene Aminosäure, entweder Lysin oder Arginin, zu finden. An dem kurzen zytoplasmatischen Teil der aktivierenden Rezeptoren binden Adapterproteine u.a. DAP12. Diese Proteine weisen ein sogenanntes *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif* (ITAM) auf über das aktivierende Signale vom Rezeptor zum Zellkern der NK-Zelle übermittelt werden (Valiante et al., 1996; Binstadt et al., 1996; Lanier 1998; Olcese et al., 1997).

Der KIR2DL4-Rezeptor nimmt eine Sonderstellung im Rahmen der KIR-Rezeptoren ein. Bei *KIR2DL4* handelt es sich um einen KIR, welcher von jeder NK-Zelle exprimiert wird (Valiante et al., 1997). Er weist eine lange zytoplasmatische Domäne auf, welche ein ITIM-Motiv aufweist. In der Transmembrandomäne befindet sich jedoch eine positiv geladene Aminosäure. Dieser Umstand ist typisch für aktivierende Rezeptoren. Somit weist KIR2DL4 sowohl aktivierende als auch inhibierende Strukturen auf. Durch Stimulation kann er die NK-Zelle entweder aktivieren oder inhibieren (Carrington et al., 2003; Kikuchi-Maki et al., 2005).

Charakteristisch für die *KIR*-Gene ist ihre hohe Variabilität (Yawata et al., 2002; Vilches et al., 2002; Moretta et al., 2004; Carrington et al., 2003). Untersuchungen konnten zeigen, dass es sogenannte *framework KIRs* gibt, die in allen Haplotypen vorkommen. Es sind *KIR3DL3*, das Pseudogen *KIR3DP1, KIR2DL4* und *KIR3DL2*. Interessanterweise liegt *KIR3DL3* am

Anfang des Lokus (centromerisch). In der Mitte des Lokus befindet sich *KIR2DL4.* Und am Ende (telomerisch) des *KIR*-Lokus liegt *KIR3DL2* (Hsu *et al*., 2002; Martin et al., 2004; Goodridge et al., 2003). Aufgrund der genetischen Struktur des KIR-Lokus kann man ihn in zwei Gruppen aufteilen. Der Haplotyp A besteht aus neun *KIR*-Genen und weist nur einen stimulatorischen KIR, nämlich *KIR2DS4,* auf. Von den neun *KIR*-Genen werden sechs exprimiert. Der Haplotyp B ist deutlich polymorpher als der Haplotyp A. Die Anzahl an *KIR*-Genen ist in ihm deutlich höher und es können mehrere stimulatorische *KIRs* vorkommen. (Uhrberg et al., 1997; Hsu et al., 2002).

Liganden der KIRs sind die MHC-Klasse-I-Moleküle (Colonna et al., 1995). Es konnten jedoch noch nicht alle Liganden der unterschiedlichen KIRs nachgewiesen werden. MHC-Klasse-I-Moleküle sind, wie auch die *KIR*-Gene hochpolymorph und -polygen. Die Liganden der unterschiedlichen KIRs sind der Tabelle 2 zu entnehmen. So bindet z.B. KIR2DL3 an HLA-C1, wohingegen KIR2DL2 sowohl an HLA-C1 als auch an HLA-C2 binden kann (Colonna et al., 1993; Colonna et al. 1995). KIR3DL1 bindet an HLA-BW4 und inhibiert die NK-Zelle durch die Bindung an diesen Liganden (Gumperz et al., 1995)

Für KIR2DL4 wurde nachgewiesen, dass er an das nicht klassische MHC-Klasse-I-Molekül HLA-G bindet, welches auf der Oberfläche von fetalen Plazentazellen exprimiert wird. Seine Funktion ist noch nicht vollständig verstanden, jedoch wird vermutet, dass er bei der Immuntoleranz gegenüber dem Embryo eine Rolle spielt (Rajagopalan et al., 1999; Iams et al., 2004). In einer kürzlich erschienenen Publikation wurde beobachtet, dass KIR2DL4 nicht an HLA-G binden kann. Es wurde nachgewiesen, das NK-Zellen kein nicht membranständiges HLA-G binden können (Le Page et al., 2014). KIR2DL4 kann auch an Heparine binden, wodurch die NK-Zelle aktiviert wird (Brusilovsky et al., 2013).

Tabelle 2: Aufzählung von KIRs mit ihrer Funktion und bekannten Liganden.

Bezeichnung des KIR-Rezeptors	**Funktion des Rezeptors**	**Liganden**
KIR2DL1	Inhibierend	HLA-C Gruppe 2
KIR2DL2	Inhibierend	HLA-C Gruppe 1 und 2
KIR2DL3	Inhibierend	HLA-C Gruppe 1
KIR2DL4	Aktivierend / Inhibierend	HLA-G / Heparin
KIR2DL5A	Inhibierend	Unbekannt
KIR2DL5B	Inhibierend	Unbekannt
KIR3DL1	Inhibierend	HLA-BW4
KIR3DL2	Inhibierend	HLA-A*03,A*11
KIR3DL3	Inhibierend	Unbekannt
KIR2DS1	Aktivierend	HLA-C Gruppe 2
KIR2DS2	Aktivierend	Unbekannt
KIR2DS3	Aktivierend	Unbekannt
KIR2DS4	Aktivierend	HLA-A*11
KIR2DS5	Aktivierend	Unbekannt
KIR3DS1	Aktivierend	Unbekannt
KIR2DP1	Pseudogen	Keinen da Pseudogen
KIR3DP1	Pseudogen	Keinen da Pseudogen

Die Expression der *KIR*-Gene unterliegt einer besonderen Regulation. Eine NK-Zelle exprimiert nicht unbedingt alle KIR-Rezeptoren, die in ihrem Genom codiert sind (Valiante et al., 1997; Shilling et al., 2002; Carrington et al., 2003). Es kommt zur Ausbildung unterschiedlicher Kombinationen an KIR-Rezeptoren. Eine Folge davon ist, dass jede NK-Zelle eine individuelle Auswahl an im Genom codierten KIR-Rezeptoren exprimiert. Daraus resultiert, dass es eine sehr große Anzahl an NK-Zellklonen im peripheren Blut gibt, welche ein eigenständiges Rezeptorrepertoire aufweisen (Shilling et al. 2002; Valiante et al. 1997). Im Verlauf der NK-Zellentwicklung wird entschieden, ob die NK-Zelle einen, zwei, drei oder alle im Genom vorhandenen KIRs exprimiert. Die Expression erfolgt nach einem stochastischen Prinzip. Wenn einmal festgelegt wurde, welche KIRs in einer NK-Zelle exprimiert werden, wird dieses Muster bei jeder Zellteilung der NK-Zelle an die Tochterzelle weitergegeben.

Die Promotoren der *KIR*-Gene weisen eine Sequenzhomologie von bis zu 91% auf. Da die Promotoren der *KIR-Gene* sehr ähnlich sind, wird vermutend, dass für ihre Regulation ein vergleichbarer Mechanismus zugrunde liegt. Eine Ausnahme bildet *KIR2DL4,* dessen Promotor eine andere Organisation aufweist und der konstitutiv von allen NK-Zellen exprimiert wird (Carrington et al., 2003; Stewart et al., 2003). So konnte gezeigt werden, das die DNA-Methylierung an der Regulation der *KIR*-Gene beteiligt ist (Santourlidis et al., 2002).

Ein weiterer Oberflächenrezeptor, welcher nicht zu den drei vorgenannten Rezeptorfamilien gehört, ist CD16. CD16 wird von vielen Immunzellen exprimiert. Bei CD16 handelt es sich um einen niedrig-affinen IgG-Rezeptor, welcher IgG-Antikörper auf opsonisierten Zellen bindet. Wenn CD16 an IgG bindet, wird die NK-Zelle aktiviert und lysiert die Zielzelle, auch wenn die Zielzelle ansonsten eine normale MHC-I-Expression aufweist. Dieser Mechanismus wird *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity* (ADCC) genannt (Eischen et al. 1997).

Durch die zuvor beschriebenen Rezeptoren kann die NK-Zelle durch Zielzellen aktiviert werden. So wird die NK-Zelle durch NKG2D und CD16 sofort aktiviert und tötet ihre Zielzelle ab, auch wenn inhibitorisch wirkende Signale vorliegen.

Die NK-Zelle „bewertet“ die Zielzellen mit ihren Rezeptoren und erhält über die aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren Signale. Durch das Zusammenspiel dieser Signale wird die Reaktion der NK-Zelle beeinflusst. Wenn das inhibitorische Signal überwiegt, wird die Zielzelle nicht abgetötet; ist das aktivierende Signal stärker, kommt es zu einer Aktivierung der NK-Zelle und die Zielzelle wird abgetötet (Moretta *et al*., 2001; Farag *et al*., 2002).

1.4 Regulationsmöglichkeiten der Genexpression

1.4.1 Die Epigenetik

In einem Organismus befinden sich zum Teil sehr unterschiedliche Zelltypen, welche trotz Vorhandenseins identischer genetischer Information sehr unterschiedliche Genexpressionsmuster aufweisen. Jeder Zelltyp weist ein spezifisches Muster an Genexpression auf, die für seine Funktion notwendig ist (Allis et al., 2007; Herman und Baylin, 2003; Berger et al., 2009). Epigenetische Mechanismen sind verantwortlich für Differenzierung von Zellen und für die genomische Prägung, das sogenannte *Imprinting*. Unter *Imprinting* versteht man, dass es für die Expression eines Gens entscheidend ist, ob das

exprimierte Gen von der Mutter oder dem Vater vererbt wurde. Weiter verhindern epigenetische Mechanismen, dass Retroviren und Transposons im Genom der Zelle aktiv werden und von einer Stelle des Genoms zu einer anderen „springen“. Folglich hat die Epigenetik auch einen Einfluss auf die Integrität des Genoms der Zelle (Yoder et al., 1997; Howard et al., 2008). Definitionsgemäß versteht man unter Epigenetik, vererbbare Veränderungen der Genexpressionsmuster, die nicht auf Veränderungen der DNA-Sequenz beruhen (Allis et al., 2007; Berger et al., 2009). Es gibt unterschiedliche epigenetische Regulationsmechanismen. Zu ihnen zählen unter anderem die DNA-Methylierung, die Chromatinstruktur, die Histonmodifikationen und der siRNA-Mechanismus.

1.4.2 Modulation der Genexpression durch Methylierung von Cytosin

Die DNA setzt sich, abgesehen von ihrem Zuckerrückgrat, aus den vier unterschiedlichen Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin zusammen. Die DNA-Methylierung ist ein wichtiger Regulationsmechanismus der Genexpression. Sie findet in Säugerzellen hauptsächlich am Cytosin von CpG-Inseln statt (Razin und Riggs 1980; Bird et al., 2002). Durch die Methylierung wird Cytosin chemisch modifiziert, indem eine Methylgruppe an das C5-Atom des Cytosins gebunden wird (Bird 2002; Eckhardt et al., 2006). Unter einem CpG versteht man, dass ein Guanin auf ein Cytosin in der Basenfolge eines DNA-Einzelstranges folgt. Im Genom von Eukaryoten gibt es Regionen, in denen eine statistische Häufung von CpGs nachweisbar ist. Diese Bereiche werden CpG-Inseln genannt. CpG-Inseln liegen im Genom verstreut oder in Promotorbereichen vor (Bird et al., 1980; Ehrlich et al., 1982; Gardiner-Garden et al., 1987; Antequera et al., 1993a, Antequera et al., 1993b, Caiafa et al., 2005; Bird 2002). In bis zu 80% der Fälle liegen die CpG-Insel in methylierter Form vor (Bird 2002; Takai et al., 2002). Bis zu 60% unserer Gene weisen in ihrer Promotorregion CpG-Inseln auf und werden epigenetisch reguliert. Bei *Housekeeping*-Genen liegt dieser Promotorbereich unmethyliert und somit aktiv vor (Zhu et al., 2008), wohingegen gewebespezifische Gene nur in den entsprechenden Geweben exprimiert werden. In den übrigen Zellen liegen die Promotoren methyliert und somit inaktiv vor. Durch die Methylierung des Cytosins wird verhindert, dass Transkriptionsfaktoren an die Promotoren binden können und hierdurch wird eine Expression des Gens verhindert (Attwood et al., 2002; Bird 2002; Herman und Baylin, 2003; Larsen et al., 1992; Bird et al., 1985; Deaton et al., 2011). Ein weiterer Effekt der Methylierung ist, dass Methylbindendeproteine an methylierte CpGs binden, z.B. MBD1-4 oder MeCP1/2. Diese interagieren mit Histondeacetylasen und

sorgen dafür, dass sich die Chromatinstruktur ändert und das Gen reprimiert wird (Jones et al., 1998; Meehan et al., 1989; Bird et al., 1999; Young et al., 2005).

Ein Großteil der methylierten CpGs befinden sich in Retrotransposons, Satelittensequenzen und repetitiven Elementen wie *long interspersed transposable element* (Line) oder *short interspersed transposable element (*Sine*).* Methylierte CpGs sorgen für die Integrität des Genoms, da sie verhindern, dass Retrotransposons im Genom aktiv werden (Takai et al., 2002; Yoder et al., 1997, Bestor et al., 1998; Reik 2007; Edwards et al., 2007).

Untersuchungen zeigen, dass das Säugergenom einen CpG-Mangel aufweist (Bird et al., 2002). Eine Erklärung hierfür ist, dass Methylcytosin spontan zu Thymin desaminiert. Wenn Cytosin desaminiert wird entsteht Uracil. Normalerweise kommt Uracil in der DNA nicht vor und wird durch DNA-Reparaturmechanismen entfernt und durch Cytosin ersetzt. Dagegen ist Thymin ein Bestandteil der DNA und wird von den DNA-Reparaturmechanismen toleriert. Bei der Reparatur des Fehlers kann es vorkommen, dass nicht das entstandene Thymin, sondern das auf dem komplementären Strang befindliche Guanin, durch das passende Adenin ersetzt wird. Durch diesen Vorgang wird ein CpG durch Mutation im Genom entfernt (Jiricny 1996; Jones et al., 1992).

Weiterführende Analysen ergeben, dass die *KIR*-Gene epigenetisch reguliert werden. Bei Promotoranalysen fiel auf, dass in den Promotoren der *KIR*-Gene sogenannte CpG-Inseln vorkommen. Die CpG-Inseln im Promotor exprimierter *KIRs* liegen unmethyliert vor. Bei unexprimierten *KIR*-Genen sind die CpG-Inseln methyliert (Santourlidis et al., 2002).

Verantwortlich für die Methylierung sind DNA-Methyltransferasen (Herman und Baylin 2003). Bis heute sind fünf Methyltransferasen bekannt DNMT1, DNMT2 DNMT3A, DNMT3B und DNMT3L. Die Methyltransferasen nutzen S-Adenosylmethionin (SAM) als Substrat und übertragen eine Methylgruppe auf das C5-Atom des Cytosinrings, wodurch Methylcytosin entsteht (Cheng et al. 2008). Bei Säugetieren findet ausschließlich eine Methylierung am Cytosin statt (Herman und Baylin, 2003).

Bei DNMT1 handelt es sich um eine Erhaltungsmethyltransferase. Sie bindet während der DNA-Reparatur oder der Zellteilung an hemimethylierter-DNA und überträgt das Methylierungsmuster vom Mutter- auf den Tochterstrang, wodurch die Methylierungsinformationen an die Tochterzelle weitervererbt werden (Chuang et al., 1997; Fatemi et al., 2001; Goyal et al., 2006). Im Verlauf der DNA-Replikation während der S-Phase ist DNMT1 in der Replikationsgabel lokalisiert. Es gibt weitere Hinweise dafür, dass DNMT1 *de novo* Methylierung durchführen kann (Cheng et al., 2008).

Durch Zugabe von 5-Aza-2´-Desoxycytidin (AZA), einem DNMT1-Inhibitor, war es möglich, die Promotormethylierung von vorher unexprimierten *KIRs* zu entfernen und eine neue KIR-Expression auszulösen (Santourlidis et al., 2002). Über die Funktion der kleinsten Methyltransferase, DNMT2, ist nur sehr wenig im Menschen bekannt. Es gibt Hinweise dafür, dass sie in murinen embryonalen Stammzellen *de novo* Methylierungsaktivität besitzt (Okano et al., 1998). DNMT2 weist auch tRNA-Methyltransferaseaktivität aufweist. Sie methyliert tRNAs am 3´Ende (Goll et al., 2006). Es wird weiter vermutet, dass DNMT2 an der Erkennung von DNA-Schäden beteiligt ist (Okano et al., 1998; Hermann et al., 2004).

Neben DNMT1 und DNMT2 gibt es noch eine weitere große Familie an DNMTs. Zur DNMT3-Familie gehören DNMT3A, DNMT3B und DNMT3L. DNMT3A und DNMT3B sind *de novo* Methyltransferasen. Sie sind für die Etablierung des Methylierungsmusters während der frühen Säugetierentwicklung verantwortlich (Okano et al., 1998b; Gowher et al., 2001; Kim et al., 2009; Hata et al., 2002; Lin et al., 2002). Die CpG-Metylierung im Heterochromatin, in Retrotransposons und von Line-Elementen wird durch DNMT3A und DNMT3B aufrechterhalten. Wie sie ihre Zielsequenzen lokalisieren ist unbekannt (Liang et al., 2002; Jeong et al., 2009; Kim et al., 2002). Weiter zeigt Rhee, dass DNMT1 und DNMT3B in ihrer Funktion Gene durch Methylierung zu reprimieren kooperieren (Rhee et al., 2002) Kim zeigt, dass die DNMT1, DNMT3A und DNMT3B kooperieren, wenn Gene durch Methylierung stillgelegt werden (Kim et al., 2002).

Ein weiteres Mitglied der DNMT3-Familie ist die DNMT3L. Sie weist keine eigene katalytische Aktivität auf, sondern hat eine regulatorische Funktion. DNMT3L kann an unmethyliertes H3K4 binden und rekrutiert DNMT3A und DNMT3B zu diesen Stellen im Genom (Ooi et al., 2007; Jia et al., 2007).

Eine weitere Aufgabe der DNMT3L ist es, die maternale, jedoch nicht die paternale, Prägung zu etablieren und während der frühen Gametogenese Retrotransposons zu reprimieren (Bourc'his et al., 2001; Bourc'his et al., 2004).

Darüber hinaus scheint die DNMT3L auch an der Regulation der *de novo* Methylierung beteiligt zu sein, da es durch Blockierung der Interaktion von DNMT3A und DNMT3L zu einem Verlust der *de novo* Methylierungsaktivität von DNMT3A kommt (Bourc'his et al., 2004).

Enzyme, die für die Demethylierung der Cytosinmethylierung in der DNA verantwortlich sind, sind im Gegensatz zu den Pflanzen im Menschen nicht bekannt. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass durch die Inhibition der zur Apobec-Proteinfamilie gehörenden *Activation-Induced Cytosin Deaminase* (AID) die Reprogramierung von Zellen verhindert

wurde. Da für die Reprogrammierung Demethylierung notwendig ist, wurde vermutet, dass AID an der Demethylierung der DNA beteiligt ist (Bhutani et al., 2010). Ein weiteres Enzym, welches putativ an der DNA-Demethylierung beteiligt ist, ist *GADD45A* (Barreto *et al*., 2007).

1.4.3 Einfluss der Chromatinstruktur auf die Genexpression

Die Chromatinstruktur spielt neben der DNA-Methylierung eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression. Durch Veränderungen der Chromatinstruktur können Transkriptionsfaktoren, Aktivatoren und Polymerasen einfacher oder aber schwerer an die DNA binden (Luger et al., 1998; Kornberg et al., 1999).

Bei Chromatin handelt es sich um einen Komplex aus der DNA, die mit speziellen Proteinen assoziiert ist. Diese Proteine sind Histone oder Nicht-Histon-Proteine. Nicht-Histon-Proteine bilden das Gerüst der Chromosome und die Histone sind für die Verpackung der DNA verantwortlich.

Die niedrigste Verpackungseinheit bezeichnet man als Nukleosom. Nukleosome bestehen aus den vier Kernhistonproteinen H2A, H2B H3 und H4 (Luger *et al.,* 1997; Luger et al., 1998; Kornberg et al., 1999). Die Histon-Oktamere sind aus jeweils 2 Heterodimeren von H2A, H2B, H3 und H4 zusammengesetzt, um welche die DNA gewunden ist, wobei eine Windung 146 Basenpaare der Doppelhelix umfasst. Dadurch wird ein hoher Verpackungsgrad erwirkt (Espada et al., 2007; Luger et al., 1997). Durch Bindung des Histons H1 an diesen Komplex, kann die Chromatinkondensation noch weiter erhöht werden.

An jedem Histon befindet sich im N-terminalen Bereich eine lange Aminosäuresequenz aus Lysin oder anderen basischen Aminosäuren, welche aus dem Histonprotein wie eine Kette herausragen. Wegen der basischen Aminosäuren sind die Ketten positiv geladen. Die DNA weist hingegen eine negative Ladung auf, so dass sich die Histonketten und die DNA gegenseitig elektrostatisch anziehen. Diese N-terminalen Enden der Histone können durch Enzyme modifiziert werden. Diese Modifikationen haben einen Einfluss auf die Regulation von Genen (Kouzarides 2007; Fischle et al., 2003; Jenuwein und Allis, 2001; Wolffe et al., 1999).

Grundsätzlich gibt es zwei Arten von Chromatin: Euchromatin und Heterochromatin. Transkriptionell aktive Gene, wie auch Gene, die noch das Potential aufweisen, transkriptionell aktiviert zu werden, aber noch inaktiv sind, findet man im sogenannten Euchromatin. Das Euchromatin zeichnet sich durch seine dekondensierte Form aus und

repräsentiert den Bereich des Chromatins, aus dem genetische Informationen abgelesen werden.

Heterochromatin hingegen besteht hauptsächlich aus transkriptionell inaktiven Genen und repetetiven Sequenzen. Es kann in zwei Unterarten aufgeteilt werden. Sie werden konstitutives und fakultatives Heterochromatin genannt. Das konstitutive Heterochromatin findet man im Bereich des Centromers, einer Region bestehend aus repetetiven Sequenzen.

Neben dem konstitutiven Heterochromatin existiert auch noch das fakultative Heterochromatin. Im dicht gepackten fakultativen Heterochromatin befinden sich Gene, welche zu diesem Zeitpunkt nicht von der Zelle transkribiert werden. Wenn jedoch die Gene von der Zelle benötigt werden, kann durch Modifikation der Histonreste die Struktur des Chormatins verändert werden. Hierdurch werden die Gene für Transkriptionsfaktoren zugänglicher (Kouzarides 2007). Graffmann zeigt für den KIR-Lokus, dass er in HSCs kondensiert vorliegt. In NK-Zellen liegt der KIR-Lokus jedoch im relaxierten Euchromatin (Graffmann et al., 2006; Santourlidis et al., 2008).

1.4.4 Modifikationen von Histonen und ihr Einfluss auf die Genexpression

Durch chemische Veränderung der N-terminalen Enden der Histone kann die Struktur des Chromatins beeinflusst werden. Dies hat wiederum einen Einfluss auf die Transkription von Genen. Mögliche Modifikationen können u.a. Acetylierung, Methylierung oder Phosphorylierung sein.

Sogenannte Histonacetyltransferasen (HATs) acetylieren bestimmte Lysinreste an den Histonen H3 oder H4 (Kouzarides 2007). Histon-Acetylierung findet nur an Lysin statt. Eine Acetylierung von Lysin ist immer in aktiven Genen zu finden. Durch den Umstand, das Lysin positiv und die DNA negativ geladen ist, ziehen sich beide an, so das sich eine kompakte Chromatinstruktur ausbilden kann. Wenn nun aber das Lysin acetyliert wird, kommt es zur Neutralisierung der positiven Ladung des Lysins, wodurch es zu einer Verminderung der elektrostatischen Wechselwirkung kommt. Hieraus folgt eine Öffnung und Entspiralisierung der Chromatinstruktur. Transkriptionsfaktoren können nun mit der DNA interagieren und an ihr binden. Weiter können Proteine, die eine Bromodomäne aufweisen, an acetylierten Histonen binden und die Reaktion verstärken. Ein solches Muster findet man bei Transkriptionsfaktoren oder HATs. Anschließend kann ein Gen durch Transkriptionsfaktoren aktiviert und abgelesen werden (Jenuwein und Allis, 2001; Kornberg et al., 1999; Struhl et al., 1998).

Sogenannte Histondeacetylasen (HDAC) binden N-terminal an H3 oder H4 und entfernen die Acetylierung wieder vom Lysin, was die Neutralisierung der positiven Ladung des Lysins aufhebt. Dies führt dazu, dass Lysin wieder mit der negativ geladen DNA in elektrostatische Wechselwirkung treten kann, wodurch sich eine kompakte Chromatinstruktur ausbildet (Jenuwein und Allis 2001; Kornberg et al., 1999; Struhl et al., 1998).

Eine Methylierung von Lysin oder Arginin kann einen sehr unterschiedlichen Effekt auf die Chromatinstruktur und auch auf die Expression von Genen haben. Abhängig davon, welches Lysin oder Arginin modifiziert wird und wie viele Methylgruppen gebunden werden wirkt die Histonmethylierung aktivierend oder inhibierend. Im aktivierenden Fall bewirkt die Methylierung der Histone eine Dekondensierung der Chromatinstruktur. Dies bewirkt, dass der Bereich zugänglicher für Transkriptionsfaktoren wird. Im entgegengesetzten Fall kommt es zur Kondensierung der Chromatinstruktur (Bernstein et al., 2006; von Holt et al., 1989). Hierdurch wird die Genexpression inaktiviert. So findet man eine di- oder tri-Methylierung von Lysin4 am Histon H3 (H3K4me2/3) in transkriptionell aktiven Genen, wohingegen eine di- oder tri-Methylierung von Lysin9 am Histon3 (H3K9me2/3) bei inaktiven Genen nachgewiesen werden konnte (Kouzarides et al., 2007). Verantwortlich für die Histonmethylierung sind Histon-Methyltransferasen. Beispielsweise wird die H3K9me2 durch die G9a katalysiert (Quinn et al., 2010). Die Histonmethylierung wird durch Histon-Demethylasen entfernt (Shi and Whetstine 2007). Ein entscheidender Unterschied zur Histonacetylierung ist, dass die Histonmethylierung die Ladung von Lysin nicht verändert.

Eine weitere Modifikation ist die Phosphorylierung an Serin, Threonin und Tyrosin und kann sowohl aktivierend als auch inhibierend wirken.

Für die KIR-Promotoren in HSCs kann keine aktive Histonmodifikation nachgewiesen werden. Jedoch lässt eine hohe Konzentration der reprimierenden Modifikation H3K9me2 im *KIR*-Promotor nachweisen. In NK-Zellen konnte die aktive Modifikation H3K8ac in den *KIR*-Promotoren gefunden werden, wobei sowohl aktive als auch inaktive *KIR*-Gene die Modifikation H3K8ac tragen. Inaktive Gene weisen eine DNA-Methylierung im *KIR*-Promotor auf, welche für ihre Reprimierung verantwortlich ist (Santourlidis et al., 2002; Santourlidis et al., 2008).

Hydroxymethylierung (hme) am Cytosin wurde vor kurzem als eine weitere wichtige epigenetische Modifikation von Cytosin in Säugerzellen entdeckt. Durch die Hydroxymethylierung wird das C-5 Atom eines Cytosins mit einer Hydroxymethyl-Gruppe versehen. Es konnte gezeigt werden, dass Hydroxymethylierung an der Genregulation beteiligt ist. Die Hydroxymethylierung nimmt beim Erhalt der Stammzelleigenschaft eine

wichtige Rolle ein. Für die Hydroxymethylierung sind drei Enzyme verantwortlich. Sie werden *ten eleven translocation 1-3* (TET1-3) genannt (Williams et al., 2011; Wu et al., 2011; Pastor et al., 2011). TETs konvertieren methyliertes Cytosin in Hydroxymethylcytosin Es wird vermutet, dass diese Konvertierung den ersten Schritt während der Demethylierung darstellt (Tahiliani et al., 2009; Ito et al., 2010). Die weiteren Schritte der DNA-Demethylierung im Menschen sind nicht bekannt. Es wird vermutet, dass DNA-Reparaturmechanismen an der Demethylierung beteiligt sind (Guo et al., 2011).

1.4.5 DNA-Methylierung und Histonmodifikationen beeinflussen die Chromatinstruktur

In der Epigenetik reicht es nicht aus, sich nur die DNA-Methylierung oder die Modifikationen der Histone voneinander getrennt anzusehen. Vielmehr findet eine vielseitige gegenseitige Beeinflussung und Wechselwirkung dieser beiden Bereiche statt**.** Es kann einen Informationsfluss von der DNA-Methylierung zu den Histonen erfolgen oder aber umgekehrt von den Histonmodifikationen zur DNA. DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und Chromatinstruktur interagieren miteinander und beeinflussen so die Expression von Genen (Sasai et al., 2009; Jones et al., 1998; Jenuwein und Allies 2001).

Durch Methylierung von Cytosin in der DNA kann die Transkription von Genen beeinflusst werden, indem Proteine, die an methylierter DNA binden können zur DNA rekrutiert werden und die Transkription eines Gens unterbinden. In einem Experiment wurden methylierte Plasmide in Zellen eingebracht. Faktoren, die an methylierter DNA binden, wurden durch die methylierten Plasmide abgefangen. Dadurch lagen sie nicht mehr in ausreichender Menge vor, um die DNA-Methylierung aufrecht zu erhalten und zuvor reprimierte Gene wurden wieder aktiv (Boyes und Bird 1992).

Histondeacetylasen können durch Adapterproteine zu methylierter DNA rekrutiert werden. Dort gebunden, deacetylieren sie Histone. Hierdurch wird das reprimierende Signal von der DNA auf die Histone übertragen. Acetylierung der Histone sorgt für eine geöffnete Chromatinstruktur. Da nun die Acetylierung fehlt, verändert sich die Chromatinstruktur von einer geöffneten zu einer geschlossenen Form. Hieraus folgt, dass die DNA für Transkriptionsfaktoren schlechter zugänglich wird. Auf diese Weise wird ein reprimierendes Signal von der DNA auf die Chromatinstruktur übertragen (Cedar et al., 2009).

Zu den Proteinen, die an methylierter DNA binden können, zählen MeCP1 und MBD2. Sie haben ebenfalls einen Einfluss auf die Informationsweitergabe von der DNA zu den Histonen.

1989 wurde MeCP1 entdeckt. Für diesen Proteinkomplex wurde erstmalig nachgewiesen, dass er an methylierter DNA binden kann. Später wurde entdeckt, dass MBD2 zu diesem Komplex gehört und dass dieses Protein ebenfalls an der methylierten DNA binden kann. Ein weiteres Protein, welches an methylierter DNA binden kann ist MeCP2. Methylbindende-Proteine rekrutieren Histondeacetylasen zu den Regionen, wo methylierte DNA vorliegt (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998). Ein weiteres Mitglied dieses Komplexes ist G9a. Dieses Enzym weist Histon-Methyltransferaseaktivität auf und methyliert H3K9. Auf diese Weise wird ein inhibierendes Signal auf die Histone übertragen (Hashimshony et al., 2003).

Weiter besteht die Möglichkeit, dass Histon-Methyltransferasen DNA-Methyltransferasen zu einer spezifischen DNA-Sequenz rekrutieren. Die Histon-Methyltransferasen SUV39H1 und SUV39H2 sorgen für Methylierung an den Histonen in Satellitensequenzen (Lehnertz et al., 2003; Tachibana et al., 2008). Hier kommt es zu Methylierung an H3K9. Dies hat zur Folge, dass die DNA-Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B zu diesem Ort rekrutiert werden und die dortigen CpGs in der DNA-Sequenz methylieren.

MeCP2 bindet an methylierter DNA. Es rekrutiert Histon-Methyltransferasen zu seiner Bindestelle und bewirkt, dass H3K9 methyliert vorliegt und ein repressiver Chromatinstatus etabliert wird (Jones et al., 1998; Fuks et al., 2003).

Bisher wurde beschrieben, dass durch eine Veränderung der DNA-Methylierung eine Veränderung von Histone und der Chromatinstruktur ausgelöst werden kann. Es ist auch möglich, dass sich eine Veränderung der Chromatinstruktur auf die Methylierung der DNA auswirkt. DNMT3L kann an unmethyliertes H3K4 binden. DNMT3L interagiert mit DNMT3A oder DNMT3B und es kommt zu einer Methylierung der DNA. Wird jedoch H3K4 methyliert, kann die DNMT3L nicht mehr an H3K4 binden. So wird verhindert, dass es zu einer Methylierung der Cytosine in der DNA kommt (Ooi et al., 2007; Jia et al., 2007).

Es wird vermutet, dass H3K4me vor *de novo* DNA-Methylierung während der Embryonalentwicklung schützt. So werden CpG-Inseln während der Embyronalentwicklung nicht methyliert, wenn H3K4me vorliegt. CpG-Inseln, die keine H3K4me aufweisen, werden methyliert (Okitsu und Hsieh 2007; Mohn et al., 2008; Meisner et al., 2008).

Auch eine repressive Histonmodifikation kann eine Methylierung von CpGs in der DNA-Sequenz auslösen. Durch G9a wird H3K9 methyliert. An methyliertem H3K9 kann HP1 binden. Dieses Adapterprotein rekrutiert DNMT1, DNMT3A oder DNMT3B und bewirkt, dass die CpGs in der DNA methyliert werden und es dadurch zu einer Reprimierung eines Promotors kommt (Feldman et al., 2008; Lehnertz et al., 2003b)

Die Transkription von Genen und deren Expression sind, wie bereits beschrieben, mehreren Regulationsebenen unterworfen. Neben der Regulation der Transkription durch Transkriptionsfaktoren oder DNA-Methylierung erweitern die Modifikationen der Histone die Möglichkeiten der Genregulation beträchtlich. Es ist anzunehmen, dass auch im *KIR*-Promotor eine zuvor beschriebene Interaktion von Chromatinstruktur, Histonmodifikation und DNA-Methylierung stattfindet. Daher wäre von Interesse zu erfahren, wie sich die verschiedenen Regelmechanismen im Verlauf der NK-Zellentwicklung in Bezug zum *KIR*-Promotor verhalten. Für ausdifferenzierte NK-Zellen konnte gezeigt werden, dass die DNA-Methylierung für die Regulation der KIR-Transkription verantwortlich ist. Ob dies auch während der frühen Entwicklungsphase der NK-Zelle der Fall ist, ist unbekannt. Bisher sind Veränderungen der Histonmodifikationen für den *KIR*-Promotor im Verlauf der NK-Zellentwicklung unbekannt.

1.4.6 Beeinflussung der Gentranskription durch kleine nichtcodierende RNAs

Ein weiter gut untersuchter epigenetisch wirkender Regulationsmechanismus wurde erstmalig in Pflanzen beschrieben (Napoli et al., 1990; Mizuno et al., 1984). Dieser basiert auf kleinen RNA-Fragmenten, die eine Methylierung bei ihren Zielsequenzen auslösen. Die Entdeckung des siRNA-Mechanismus beruht auf einem Zufall. Jorgenson wollte ursprünglich die violette Färbung der Blüte von Petunien erhöhen. Dazu gab er die mRNA-Sequenz des für die Farbe zuständigen Proteins als Doppelstrang in die Zelle. Als Ergebnis erhielt er nicht stark violette Blüten, sondern die Blüten waren weiß (Nellen and Lichtenstein 1993). Jedoch bieten Fire und Mitarbeiter mit der Auffindung des RNA-Interferenz-Mechanismus am Nematoden *C.Elegans* eine Lösung für Jorgensons Phänomen (Timmons and Fire, 1998).

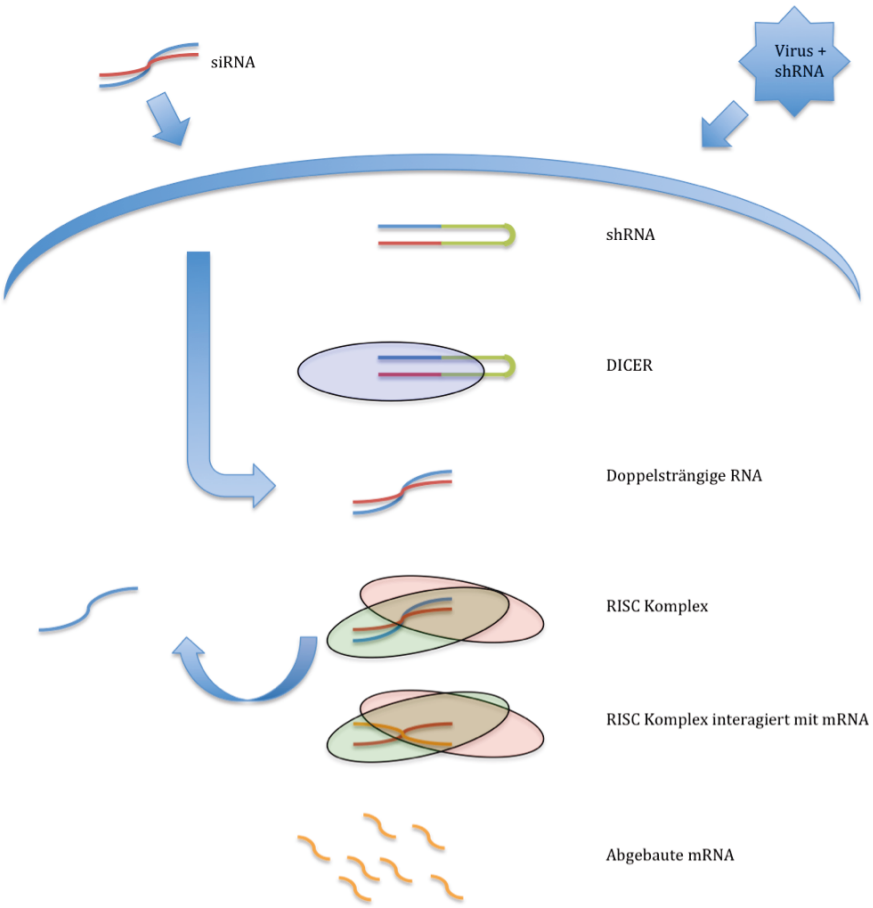


Abb. 3: Schematische Darstellung des siRNA/shRNA Mechanismus inklusive Abbau der Ziel mRNA.

Der RNAi-Mechanismus tritt in eukaryotischen Zellen auf (Abb. 3). Die Expression eines Zielgens wird durch eine sogenannte *small interfering* (si)RNA herabreguliert. Das *RNase III Enzym* DICER schneidet lange doppelsträngige RNAs, welche normalerweise nicht in eukaryotischen Zellen vorkommen, in kleine doppelsträngige RNA-Fragmente, die sogenannten siRNAs. Diese Fragmente weisen eine Länge von 21–23 bp auf (Elbashir *et al*., 2001; Bernstein et al. 2001; Ketting et al., 2001). Die siRNA-Fragmente werden zum *RNA-induced silencing complex* (RISC) durch das *transactivating response RNA binding protein* (TRBP) gebracht (Chendrimada et al., 2005; Haase et al., 2005). In den RISC-Komplex wird ein Einzelstrang eines siRNA-Fragmentes gebunden. Hierdurch wird der RISC-Komplex funktionsfähig (Hammond *et al*., 2000). Wenn der RISC-Komplex auf eine mRNA trifft, die eine 100%ige Übereinstimmung zum gebundenen siRNA-Strang aufweist, wird diese mRNA durch Argonaute2 gespalten und abgebaut. Falls die Zielsequenz nicht vollständig mit der im RISC-Komplex gebunden Sequenz übereinstimmt, wird die mRNA nicht abgebaut, aber auch nicht wieder freigelassen. In beiden Fällen wird die Transkription des Zielgens unterbunden (Hammond et al., 2000; Sijen et al., 2001a; Sijen et al., 2001b; Hannon 2002)

Weiter konnte gezeigt werden, dass es durch eine künstlich eingebrachte siRNA gegen die Promotorregion eines Gens, die den RNAi-Mechanismus aktiviert, zu einer Reprimierung des Gens kommt (Castanotto et al., 2005). Des Weiteren ist eine Promotor-Remethylierung nachweisbar, wenn die Transkription des Zielgens stark genug herabreguliert wird (Kawasaki et al., 2005). Diese reprimierende Signatur wird ebenfalls auf die Histone durch Histonmethylierung übertragen. Es ist daher möglich, dass der siRNA-Mechanismus eine Rolle bei der Etablierung von Heterochromatin spielt. (Morris 2005). Diese Vermutung kann durch weitere Versuche bestärkt werden. DICER ist eine wichtige Komponente des siRNA-Mechanismus. Durch das Ausschalten von DICER kommt es zu einer deutlichen Abnahme an H3K9-Methylierung. Hierdurch wird gezeigt, das der RNAi-Mechanismus an der Bildung von Heterochromatin beteiligt ist und dadurch eine Rolle beim Erhalt der Chromatinintegrität spielt (Fukagawa et al., 2004).

Die meisten siRNAs, die in einer Zelle gefunden werden, stammen aus repetetiven Sequenzen einer Zelle. Daher wird vermutet, dass der siRNA-Mechanismus, ebenso wie die DNA-Methylierung, eine entscheidende Rolle bei der Reprimierung von Retrotransposons hat (Tabara *et al*., 1999). Der RNAi-Mechanismus verhindert das unkontrollierte „Springen“ von mobilen genetischen Elementen.

Auch bei der Abwehr von RNA-Viren oder Viren, die einen RNA-Zwischenschritt in ihrem Reproduktionszyklus aufweisen, spielt der RNAi-Mechanismus eine wichtige Rolle. Im Lebenszyklus von RNA-Viren bilden sich dsRNA-Intermediate und werden durch den RNAi-Mechanismus als Ziele erkannt. Die integrierten Virusgene werden dadurch abgeschaltet. Grund für diese Annahme lieferten Untersuchungen, dass Mutationen von Genen, welche im RNAi-Mechanismus eine Rolle spielen für eine erhöhte Infektionsanfälligkeit sorgen (Mourrain *et al*., 2000). Diese Beobachtungen wurden an Arabidopsis gemacht. Kürzlich wurde auch in Säugerzellen eine weitere Abwehrstrategie gegen Viren entdeckt, jedoch konnte für sie bisher nicht gezeigt werden, dass der siRNA-Mechanismus gegen eine Virusinfektion eingesetzt wird. In murinen Stammzellen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass der RNAi-Mechanismus verwendet wird, um die Zelle vor einer Infektion durch Viren zu schützen (Maillard et al., 2013).

1.4.7 *Ribosomale*-Gene als Bespiel epigenetischer Genregulation

Die *ribosomalen RNA* (*rRNA*)-Gene werden, wie die *KIR*-Gene, epigenetisch reguliert. In einer humanen Zelle befinden sich viele Kopien der *rRNA*-Gene in dichter Reihenfolge.

Stromaufwärts eines jeden Gens befindet sich ein ALU-Element. Die *KIR*-Gene befinden sich in einer vergleichbaren genetischen Anordnung. Grummt und Majumder zeigen, dass die DNA-Methylierung und Histonmodifikationen einen Einfluss auf die Genexpression der *rRNA*-Gene haben (Grummt 2007; McStay et al., 2008; Majumder et al., 2006). Diese Beobachtung konnte auch für den KIR-Lokus gemacht werden (Santourlidis et al., 2002; Santourlidis et al., 2008).
Schmitz weist eine nichtcodierende-RNA im *rRNA*-Promotor nach, welche komplementär zur Promotorsequenz ist. Diese vermittelt DNMT3B bedingte *de novo* Methylierung von CpGs im *rRNA*-Promotor (Schmitz et al., 2010). Aufbauend auf diesen Befunden ist es Bierhoff möglich, für den *rRNA*-Lokus zu zeigen, dass sense-Transkripte und antisense-Transkripte einen Einfluss auf seine Funktion haben. So kommt es durch Transkription von antisense-RNA, die zum *rRNA*-Promotor komplementär ist, zunächst zur Inhibition der Transkription des *rRNA*-Gens und anschließend zur Heterochromatinbildung (Bierhoff et al., 2010).

1.5 Krebs, eine Erkrankung rückt in den Fokus der Wissenschaft

Bei Krebs handelt es sich um eine bösartige Gewebeneubildung. Krebserkrankungen beruhen entweder auf genetischen oder epigenetischen Störungen. Nach neuesten Zahlen der *world healthy organization* (WHO) steigt die Zahl, an Krebs erkrankter Menschen weltweit an. Von diesem Anstieg sind nicht nur, aber vor allem die Industrieländer betroffen. Gründe für die steigende Zahl an Krebserkrankungen sind vielfältig. Die voranschreitende und immer weniger kontrollierbare Exposition von chemischen Substanzen z.B. Weichmacher, Pestizide, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und Umwelthormone, der Klimawandel (erhöhte UV-Strahlung) und wachsender Stress in unserer globalisierten Gesellschaft (wachsender Konkurrenzdruck; höhere Anforderungen im Beruf) sind für einen Anstieg der Krebserkrankungen verantwortlich. Aufgrund der sich wandelnden demographischen Entwicklung in den Industrieländern ist eine weitere Steigerung der Krebsrate zu erwarten. Die Daten der WHO zeigen jetzt schon einen deutlichen Anstieg der Krebserkrankungen weltweit. Daher ist es notwendig neue und wirksamere Therapiemethoden zu entwickeln, um diesem neuen epidemiologischen Phänomen entgegenzuwirken (Krebs in Deutschland; Molekulare Onkologie; WHO).

1.6 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte der für die epigenetische Regulation der *KIR*-Gene verantwortliche Mechanismus untersucht werden. Dazu musste ein stabiles und reproduzierbares humanes *in vitro* NK-Zellentwicklungsmodell etabliert werden, um HSCs sicher zu NK-Zellen zu differenzieren. Durch Verwendung eines *in vitro* Systems wurde es möglich, verschiedene Aspekte der *KIR*-Regulation zu analysieren. So ließ sich beispielsweise hiermit klären, wann ein KIR-induzierendes Signal auf die differenzierende Zelle einwirkte. Bisherige epigenetische Analysen der NK-Zellentwicklung beschränkten sich auf Untersuchungen von HSCs und ausdifferenzierten NK-Zellen. Weitere Informationen über die Regulation der KIR-Expression ließen sich über Isolation definierter NK-Entwicklungsstadien aus der *in vitro* NK-Generierung gewinnen. Dazu wurden die *KIR*-Promotormethylierung, die *KIR*-Transkription und Histonmodifikation des *KIR*-Promotors bestimmt. Auch die Transkription von NKG2A und epigenetischen Schlüsselfaktoren wurden im Verlauf der NK-Zellentwicklung verfolgt.

Es war bereits möglich, durch Aktivierung des RNAi-Mechanismus in HeLa-Zellen gegen *RASSF1A,* den Promotor des *RASSF1A*-Gens zu remethylieren (Castanotto et al., 2005). Ob dies auch für die KIR-Gene galt, sollte in dieser Arbeit geklärt werden. Auch die Reprimierung von *KIR* und ihr Einfluss auf den Verlauf einer NK-Zelldifferenzierung sollte untersucht werden.

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war, ob alle *KIR*-Gene zeitgleich demethyliert werden. Die gewonnenen Methylierungsdaten konnten mit den erhaltenen Daten für Transkription und Histonmodifikation verglichen werden und helfen, den Mechanismus der *KIR*-Genregulation zu verstehen.

Mögliche weitere Einflüsse auf die KIR-Expression sollten durch Veränderung der DNA-Methylierung und der Chromatinstruktur im Verlauf der NK-Zellentwicklung durch Zugabe epigenetisch wirkender Substanzen beleuchtet werden.

Die KIR-Expression wurde in ausdifferenzierten NK-Zellen nur durch die DNA-Methylierung reguliert. Welche Rolle die Histonmodifikation H3K9me2, ob generell oder in einem bestimmten Entwicklungsstadium, für die KIR-Expression spielte, sollte durch Inhibition zu unterschiedlichen Zeitpunkten der NK-Zellentwicklung geklärt werden.

II Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, hatten den Reinheitsgrad pro Analyse, wenn nicht anders vermerkt. Um Lösungen zu erstellen, wurde hochreines Wasser (dH_2O) verwendet.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien und ihre Bezugsquellen

Chemikalien	**Hersteller**
Accutase	PPP-Laboratories
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich
Agarose	Invitrogen
Ampicillin	Sigma-Aldrich,
Aqua ad iniectabilia	DeltaSelect GmbH
2-Deoxy-5-azacytidine (AZA)	Sigma-Aldrich
Biocoll	BioRad
Bix 01294 trihydrochloride hydrate	Sigma-Aldrich
Caesiumchlorid	Renner GmbH
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
Chloroqueen Diphosphat	Sigma-Aldrich
Complete, Mini EDTA-Free	Rosch
DNA Leiter 100 bp (0,5 mg/yl)	Invitrogen
DNA Leiter 1kb (0,1yg/yl)	Invitrogen
DNAse	Qiagen
dNTPs (10mM)	PeqLab
4,6-Diamino-2-Phenylindol-Dihydrochloridhydrat (DAPI)	Roche Biochemicals
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Ethylendiaminotetraacetat (EDTA); Zellkultur getestet	Sigma-Aldrich
Ethanol 100%	Merck
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Ethanolamine	Sigma-Aldrich
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom,
Glutamin (200 mM)	BioWhittaker
Gelatine	Sigma-Aldrich
HotStar Taq (5U/yl)	Qiagen, Hilden
Hydrochortison	Stemcell Technologie
Humanes AB Serum	Lonza, Köln
Humanalbumin	Octapharm

Chemikalien	Hersteller
Isopropanol	Merck
β-Mercaptoethanol (50 mM)	Gibco
Mimima SYBER Green/ROX qPCR Master Mix (2x)	Fermentas
M-MLV Transkriptase (200U/yl)	Promega
Oligo dt	Promega
Natriumacetat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Proteinase K	Qiagen
Methanol	Merck
Paraformaldehyd	Merck
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Eigenproduktion der Universitätsapotheke Düsseldorf
Penecillin	Gibco
Pferdeserum	StemCell Technology
Poly D-Lysin homobromid	Sigma-Aldrich
Random Primer	Promega
Retronektin	Takara
RNAse A	Qiagen
RNasin+ RNAse inhibitor (40U/yl)	Promega
RNase free DNase Set (30 U/yl)	Qiagen
RNase freies Wasser	Qiagen
Rinderserumalbumin (BSA), Zellkultur getestet	Sigma-Aldrich
Sequencing RR-100 BigDye Terminator	Applied Biosystems
Sodium Selenit	Sigma-Aldrich
T4-DNA Ligase	Qiagen
Trichostatin A (TSA)	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA	Gibco Invitrogen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck
Triton-X-100	Merk
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	Sigma-Aldrich
X-Gal	Sigma-Aldrich

2.1.2 Medien und Puffer

Tabelle 4: verwendete Medien in der Zellkultur

Name des Mediums	Hersteller
Advanced Dulbecco´s modified Eagles´s medium (DMEM) mit Phenolrot, 5g LD-Glukose	Gibco Invitrogen
Dulbecco´s modified Eagles´s medium (DMEM) mit Phenolrot, 1g LD-Glukose	Gibco Invitrogen

Name des Mediums	Hersteller
Dulbecco´s modified Eagles´s medium (DMEM) mit Phenolrot, 5g LD-Glukose	Gibco Invitrogen
HAM´s F12	Biochrom AG
Iscove´s modified Dulbecco´s medium (IMDM) +35 mM HEPES, ohne Glutamin	Cambrex
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 mit Phenolrot	Lonza

Tabelle 5: selbsterstellte Medien

Name des Mediums	Zusammensetzung
2% Advanced MEF-Medium	Advanced DMEM 2 % FBS (Virus) 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % L-Glutamin
5% Advanced MEF-Medium	Advanced DMEM 5 % FBS (Virus) 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % L-Glutamin
AFT-Medium	DMEM (1000 mg/l Glucose) 20 % FCS 1 % Penicillin-Streptomycin 50 µmol 2-Mercaptoethanol
EL08-Medium	IMDM 15 % FBS 5 % Pferdeserum (Hitzeinaktiviert) 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % L-Glutamin
Einfriermedium	IMDM 20% FCS 1% Penicillin / Streptomycin 10% DMSO
Expansions-Medium	RPMI 20% FBS 50µmol 2-Mercaptoethanol 1% Penicillin/Streptomycin 1% L-Glutamin 20ng/ml TPO 20ng/ml IL-7 20ng/ml Flt3-Ligant 10ng/ml SCF
Fibroblasten-Medium	DMEM low Glucose 10 % FBS 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin
Hek293T	DMEM (4,5 g/l Glucose) 10 % FBS 1% Penicillin/Streptomycin
IPS-Fibroblasten (human)	mTeSER von StemCell Technology

Name des Mediums	Zusammensetzung
Jurkat-Medium	RPMI 1640 10 % FBS 1 % Penicillin/Streptomycin
MEF-Medium	RPMI 1640 10 % FBS 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % Nicht Essentielle Aminosäuren 1 % Natrium Pyruvat
MSC-Medium	Wurde von der Kinderklinik der Universitätsklink Düsseldorf erstellt.
NK1-Medium	27,5 ml DMEM (4,5 g/l Glucose) 12,5 ml Ham's F12 10 ml humanes AB-Serum 50 µmol/ml Ethanolamin 50 µg/ml Natriumselenit 24 µM ß Mercaptoethanol 500µl Penicillin/Streptomycin 1000 U/ml IL-2 5 ng/ml IL-3 20 ng/ml IL-7 10 ng/ml Flt3-Ligand 20 ng/ml SCF
NK2-Medium	30 ml DMEM (4,5 g/l Glucose) 15 ml Ham´s F12 5 ml humanes AB-Serum 24 µM ß Mercaptoethanol 1000 U/ml IL-2 20 ng/ml IL-7 10 ng/ml Flt3-Ligand 20 ng/ml SCF 10ng/ml IL-15
NK3.3-Medium	RPMI 1640 10% FBS 1 % Penicillin/Streptomycin 5-15% Kulturüberstand nach Kahle et al. 200 U/ml IL-2
NKL- und NK-92-Medium	RPMI 1640 10 % FBS 1 % Penicillin-Streptomycin 200 U/ml rhIL-2
OP9-Medium	DMEM (1000 mg/l Glucose) 10% FBS 1% Penicillin-Streptomycin 50 µmol 2-Mercaptoethanol

Name des Mediums	Zusammensetzung
UG261B6-Medium	DMEM (1000 mg/l Glucose) 10% FBS 1% L-Glutamin 1% Penicillin-Streptomycin
Virus-Medium	RPMI 5% FBS 1% Penicillin-Streptomycin
Zellkultur-Medium	IMDM 5% FBS 2 mM L-Glutamin 50 µmol 2-Mercaptoethanol
NK-Medium	RPMI 10% AB-Serum 1% Penicillin-Strptomycin 200U/ml IL-2 10ng/ml IL-15

Tabelle 6: gekaufte Medien und Komponenten

Mediumbezeichnung	Herstellerangabe
Lysogeny Broth (LB)-Medium	Invitrogen
LB-Agar	Invitrogen

Tabelle 8: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
5x DNA-Probenpuffer:	30 % (v/v) Glycerin 0,025 % (w/v) Bromphenolblau 0,025 % (w/v) Xylenxyanol in TAE-Puffer
DEPC-Wasser	Aqua dest. mit 0,1 % DEPC für 12 Stunden stehen lassen, anschließend autoklavieren
HBS-Puffer	Hepes 100 mM NaCl 280 mM Na_2HPO_4 1,5 mM
MACS-Puffer	PBS 0,5 % (w/v) BSA oder HSA 5 mM EDTA steril filtriert
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)	40 mM Tris 20 mM Natrium-Acetat 1 mM EDTA pH 8,5
Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer)	89 mM Tris 2,5 mM EDTA pH 7

2.1.3 Zytokine

Tabelle 7: Verwendete Zytokine

Name	Bezugsquelle
Rh IL-2	Chiron
Rh IL-3	Miltenyi
Rh IL-7	Miltenyi
Rh IL-15	Meltenyi
Rh Flt3-Lig	Miltenyi
Rh SCF	Miltenyi

2.1.4 Zelllinien

Tabelle 8: Verwendete Zelllinien

Name	Ursprung
AFT	Murine fötale Leberzelllinie
EL08	Murine embryonale Leberzelllinie
OP9	Murine Knochenmarkstromazelllinie
OP9-Delta	Murine Knochenmarkstromazelllinie mit *delta-like-ligant* transfiziert
UG26	Murine Linie
NKL	Human NK-Linie
NK-92	Human NK-Linie
NK3.3	Humane NK-Linie
Jurkat	Human T-Zelllinie
MSC	Pädiatrische mesenchymale Stammzelle
USSC	Humane *Unrestricted somatic stem cell*
STF5	Human Fibroblasten
HEK293T	Human Nierenzelllinie

2.1.5 Blutproben

Die in dieser Arbeit verwendeten Nabelschnurblute wurden alle von der José Carreras Nabelschnurblutbank, der Universitätsklinik Düsseldorf zu Verfügung gestellt. Die verwendeten Nabelschnurblute wurden wegen zu geringem Füllgewichts von der Blutbank verworfen und konnten somit für wissenschaftliche Arbeiten verwendet werden.

Aus der Apharesestation des Universitätsklinikums Düsseldorf wurden die Aphareseprodukte zu Verfügung gestellt.

Frische Blutproben wurden von Mitarbeitern des Institutes für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (Eigenblut) zur Verfügung gestellt.

2.1.6 Verwendete Antikörper

Tabelle 9: Liste der verwendeten ChIP-Assay Antikörper und ihre Bezugsquelle

Bezeichnung	**Isotyp**	**Firma**
Isotyp Kontrolle	Kaninchen IgG	Upstate
Anti trimethyl Histon H3 (Lysin 4)	Kaninchen IgG	Abcam
Anti diethyl Histon H3 (Lysin 9)	Kaninchen IgG	Upstate

Tabelle 10: Verwendete fluoreszenzgekoppelte Antikörper und ihre Bezugsquelle

Bezeichnung	**Farbstoff**	**Hersteller**
Lineage Antikörper Mix	Fitc	Becton Dicison,
CD3	Pe/PC5/PC7	Beckman Coulter
CD16	Fitc	Beckman Coulter
CD34	Pe	Beckman Coulter
CD38	PC5	Beckman Coulter
CD56	Pe/PC5/PC7/APC	Beckman Coulter
CD107a	Fitc	Beckman Coulter Deutschland
CD117	Pe/APC	Beckman Coulter
NKG2A	Pe	Beckman Coulter
KIR2DL1	Fitc	R&D Systems,
KIR2DL2/3	Fitc/Pe/PC7	Beckman Coulter
KIR3DL1	Fitc/Pe/PC7	Beckman Coulter
INF-y	Pe	Beckman Coulter
Granzym	Pe	Beckman Coulter
Perforin	Fitc	Beckman Coulter

2.1.7 Nukleinsäuren

Tabelle 11: Verwendete Standards und ihre Bezugsquellen

Bezeichnug	**Hersteller**
1 kb DNA-Leiter Plus	Invitrogen,
MassRuler Ladder MS0403 (80 bp – 10 kb)	Fermentas
peqGold DNA-Leiter Mix (100 bp – 10000 bp)	Peqlab

2.1.8 Oligonukleotide / Primer

Die Primer wurden von der Firma Thermo Scientific synthetisiert, auf 1-10 pmol/µl mit RNase-freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert. Primer, die nicht in der Arbeitsgruppe etabliert waren, wurden mit dem Programm Oligo 6 erstellt. Anschließend wurden die optimalen PCR-Bedingungen bestimmt.

Tabelle 12: Sequenz der verwendeten PCR-Primer

Bezeichnung	**Primersequenz Sequenz 5´nach 3**
5'G3PDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC
3'G3PDH	TCCACCACCCTGTTGCTGTA
KIR2DL3	CCA CTG AAC CAA GCT CCG
AS KIR2DL3	CAG GAG ACA ACT TTG GAT CA
5`KIR2DL4	CTG TCC CTG AGC TCT ACA A
3`KIR2DL4	CAC TGA GTA CCT AAT CAC AG
5´KIR3DL1	ACA TCG TGG TCA CAG GTC C
3´KIR3DL1	TGC GTA TGT CAC CTC CTC
5´KIR3DL2	CGG TCC CTT GAT GCC TGT
3’KIR3DL2	GAC CAC ACG CAG GGC AG
5’KIR3DL3	GGA CCT ACA GAT GTT GC
3’KIR3DL3	TAG TTG ACC TGG GAA CCC
5’NKG2A	CCA GAG AAG CTC ATT GTT GG
5´DNMT1	CCTAGCCCCAGGATTACAAGG
3´DNMT1	ACTCATCCGATTTGGCTCTTTC
5´DNMT3A	ATAGATCCCGGTGTTGAGCC
3´DNMT3A	ACCCAGCGCAGAAGCAG
5´DNMT3B	ACCTCGTGTGGGGAAAGATCA
3´DNMT3B	CCATCGCCAAACCACTGGA
5´DNMT3L	TACGACCGAGAGTCGGAGAAT
3´DNMT3L	GCCCAAACTCGTCAGCTCTTT
5´GADD45A	GAGAGCAGAAGACCGAAAGGA
3´GADD45A	CAGTGATCGTGCGCTGACT
5´GADD45B	TACGAGTCGGCCAAGTTGATG
3´GADD45B	GGATGAGCGTGAAGTGGATTT
Promotorprimer	
5´Prom KIR2DL3	TCATCTCGTGTATGAGAGGTTGGATC
3´Prom KIR2DL3	AGCGCACAGGATGTTATTTGGC
5´Prom2 KIR2DL3	AAACTCAAGCAGGAAAATTAGAATGG
3´Prom2 KIR2DL3	ACATGGCTTCCTGGAAATTGTT
5´Prom KIR2DL4	TCAAGGAGAGTTTGAATCTCAGGTAG
3´Prom KIR2DL4	CACATTGACCACAACATGTGAAG
5´Prom2 KIR2DL4	GTGAAAAAGTTCTTACAAACTCCAG
3´Prom2 KIR2DL4	ACAATATGTCAATTGAAGGTCT
5´Prom KIR3DL1	AGCGCACAGGATGTTATTTGGC
3´Prom KIR3DL1	CTAATGGTTTATTGTCACAATTGCTC
NKT-Primer	
5NKT KIR2DL3	CCAGGACTCACCAACACACAC
3´NKT KIR2DL3	TTGAGTCTGGTCGTAGTGAAGGA
5NKT KIR2DL4	GTGGCTCCTTCCCTTCCAG
3´NKT KIR2DL4	TCATTCCTCCCTTGACTGATTC
5NKT KIR3DL1	CTCCATCCCCGCACTCCCTC
3´NKT KIR3DL1	TTTTAGGCATCTCGTGTTCGGGA
5Meth KIR2DL3	GAGTTGGTTATAGTGAAGGACGC
3´Meth KIR2DL3	CCGATACAAACAACGACTACG
5Meth KIR2DL4	GTGTTTTGAGTTTGGTCGTTGC
3´Meth KIR2DL4	CAAAACGCAATAACTCGACTCG

Bezeichnung	Primersequenz Sequenz 5´nach 3
ChIP-Assay-Primer	
S2DL3PrChip	GTG TAT GAG AGG TTG GAT CTG AG
AS2DL3PrChip	GCC CTT CCA GGA CTC ACC
S2DL4PrChip	GTTGCGCATGATGTGAAGTGA
AS2DL4PrChip	TGACACATTGACCACAACATGT
SGADPDPrChip	CAGCACAGCCCACAGGTTTCC
ASGADPDPrChip	CCTGGCTCCTGGCATCTCTGG
SMYT1PR_Diastal	AGGCACCTTCTGTTGGCCGA
ASMYT1PR_Diasta	AGGCAGCTGCCTCCCGTACA

2.1.9 shRNAs

Die shRNAs wurden bei der Firma Thermo Scientific synthetisiert. Nach Erhalt wurden sie in RNase-freiem Wasser aufgenommen und in einer Arbeitskonzentration von 10 pmol/µl verwendet.

Tabelle 13: Sequenzen der verwendeten shRNAs

Bezeichnung	shRNA-Seqeunz
shDNMT1 1	CGCACCTACTCCAAGTTCAAA
	GTTGCTGCCTTTGATGTAGTCG
shDNMT1 2	CGACTACATCAAAGGCAGCAAC
	GTTGCTGCCTTTGATGTAGTCG
shDNMT1 3	GTATGAGTGGAAATTAAGA
	TCTTAATTTCCACTCATAC
shDNMT3A 1	CCAGATGTTCTTCGCTAATAA
	TTATTAGCGAAGAACATCTGG
shDNMT3A 2	CCAGATGTTCTTCGCTAATAAC
	GTTATTAGCGAAGAACATCTGG
shDNMT3A 3	GCCACCAGAAGAAGAGAAGAATC
	GATTCTTCTCTTCTTCTGGTGGC
shDNMT3B 1	GCCTCAAGACAAATTGCTATA
	TATAGCAATTTGTCTTGAGGC
shDNMT3B 2	CAGCTCTTACCTTACCATCGA
	TCGATGGTAAGGTAAGAGCTG
shDNMT3B 3	GCACTTTAATTTGGCCACCTT
	AAGGTGGCCAAATTAAAGTGC
KIR2DL3 sh1	GGGTTGCCAGCTCCAATGT
	ACATTGGAGCTGGCAACCC
KIR2DL3 sh2	GGAGGACUCUGAUGAACAA
	UUGUUCAUCAGAGUCCUCC
KIR2DL4sh	GAGCUCUACAACAGAAUAU
	AUAUUCUGUUGUAGAGCUC
shNKG2A	GTACACGACACTTCAATAA
	TTATTGAAGTGTCGTGTAC

2.1.10 Nukleotide

2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP) Peqlab
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat (dCTP) Peqlab
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat (dGTP) Peqlab
2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat (dTTP) Peqlab

Aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP wurde eine dNTP Stammlösung von je 10 mM hergestellt.

2.1.11 Vektoren

Für die Transkription von shRNAs in Wirtszellen wurde der Vektoren pCL2 verwendet. Für die Produktion von Lentiviren kamen die Vektoren pezHEFenvEM1400 und pCD/NL-BH zum Einsatz. Wie die verwendeten Viren produziert wurden, wird in Abschnitt 2.6.3.1 beschrieben.

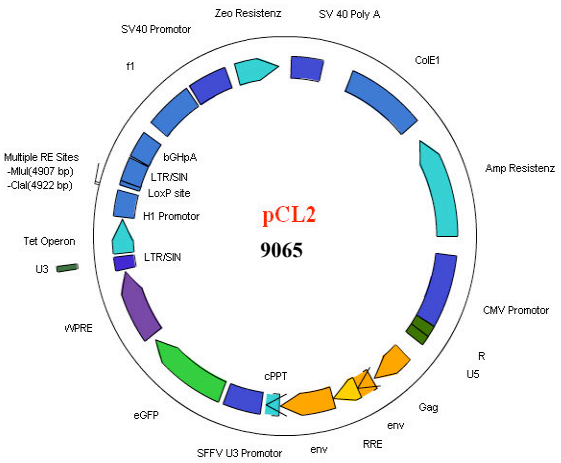


Abb. 4: Schematische Darstellung des verwendeten lentiviralen Vektors pCL2. Dieser Vektor wurde benutzt, um eine shRNA-vermittelte Reprimierung von Genen durchzuführen.

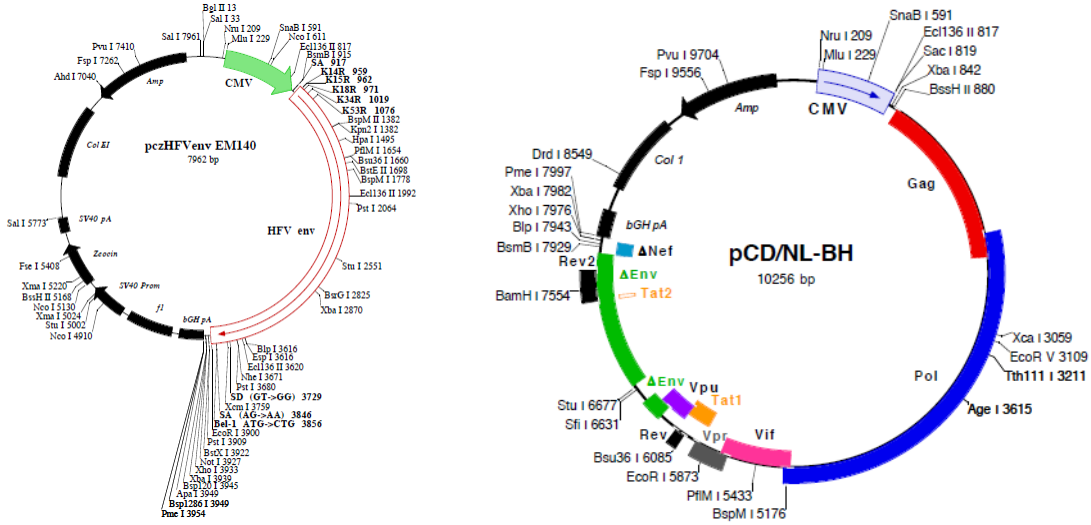


Abb. 5: Hier dargestellt sind lentivirale Vektoren für die Virusproduktion. Sie codieren für Hüllproteine (pezHFVenv EM140) oder für lentivirale Proteine (pCD/NL-BH). Diese sind für die Integration des Inserts in die Wirtszelle und das Zusammensetzten des Virus verantwortlich.

Tabelle 14: Verwendete bakterielle Vektoren

Vektorbezeichnung	**Bezugsquelle**
pCL2	Prof. Dr. Helmut Hanenberg, Kinderklinik, Universitätsklinikum Düsseldorf
pCD/NL-BH.mcpp	Prof. Dr. Helmut Hanenberg, Kinderklinik, Universitätsklinikum Düsseldorf
czHFVenv EMI 140	Prof. Dr. Helmut Hanenberg, Kinderklinik, Universitätsklinikum Düsseldorf
Topo TA Cloning Vektor	Sigma-Aldrich

2.1.12 Verwendete Kits

Tabelle 15: verwendete Kits und Bezugsquellen

Bezeichnung des Kits	**Hersteller**
Chromatin Immunopräzipitations (ChIP) Assay Kit	Millipore
EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen
Maxipräb	Macherey Nagel,
Minipräb	Macherey Nagel,
RNeasy Mini Kit	Qiagen
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAshredder Säulen	Qiagen
RNeasy Kit	Qiagen
CD34 Isolation Kit	Miltenyi
Linage Depleation Kit	Miltenyi

Bezeichnung des Kits	Hersteller
Rosette Easysep NK isolation KIT	Stemcell Technology
Topo TA Cloning Kit	Invitrogen

2.1.13 Laborbedarf

Tabelle 16: Plastikverbrauchsmaterial und Laborbedarf mit Bezugsquellen

Produktname	Hersteller
Cup-Filcon	BD Biosciences
Deckgläschen	Menzel
Eppendorf-Gefäße PCR-clean	Eppendorf
Kanülen	BD Pharma
Küvetten 2mm	Peglab
MACS-Säulen	Miltenyi Biotec
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
Objektträger	Engelbrecht
Parafilm M	P. Plastik Packaging
Transfektionsküvetten	Amaxa
Sample Bag	Wallac
Sterilfilter 0,45 μm oder 0,25 μm	Millipore
Sterilpipetten	Corning Inc.
Zellkulturflaschen	Corning Inc.
Zellkulturplatten	Corning Inc.
Zellsiebe (70 µm, 40 µm)	BD Falcon
Zellschaber	Greiner
Zentrifugenröhrchen	Greiner

2.1.14 Geräte

Tabelle 17: Verwendete Laborgeräte mit Bezugsquellen

Gerätebezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	Kern
Binokular-Mikroskop	Zeiss
Bestrahlungsgerät RS225	GULMAY Incorporated
Cell Dyn 3500R	Abbott Laboratories
CO_2-begaster Brutschrank	Binder
Durchflusszytometer Cytomics FC500	Beckman Coulter
Durchflusszytometer FACSCanto	BD Biosciences
Elektroporator Pulse Contoller Plus Capacitance Extender Plus Gene Pulser II	Bio RAD
Fluoreszenz-Mikroskop Axioplan 2 AxioCam HRC	Zeiss
Geldokumentationsgerät E.A.S.Y 429K	Herolab
Gefrierschrank (-20°C)	Bosch
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Scientific Forma
Heizblöcke	Neolab
Kühlschrank	Bosch

Gerätebezeichnung	Hersteller
Küvetten 2 mm	PeqLab
Mikroskop, Wilovert S	Hund
Nanodrop N-2000 Spectrometer	Peglab
Pipett-Boy	IBS
Sterile Werkbank	
Sorter MoFlo XDF	Beckman Coulter
Ultraschall Desintegrator (130 W),Vibra--Cell 75022	Bioblock Scientific
Thermo Cycler ABI Prism Sequence Detector 7700	Appliet Biosystems
Thermo Cycler ABI Prism 7900HT Sequence Detection System	Appliet Biosystems
Thermocycler (GeneAmpPCR System 2700 und 9700)	Appliet Biosystems
Trockenschrank	Binder
Zentrifuge RL 5B plus, Rotoren HB-6 und SLA1500	Sorvall
Zentrifuge Biofuge Stratos, Rotor #3335	Heraeus / Thermofischer
Zentrifuge Rotina 46R, Rotor #4624	Hettich
Vortexer	IKA
Waage (Precisa 600)	Oehmen Labortechnik
Zentrifuge (Rotanta 96 RC)	Hettich

2.1.15 Software

Tabelle 18: Verwendete Software und Internetseiten

Verwendete Software	Hersteller / Internetseite
Chromas Lite	Technelysium
Cytomics RXP	Beckman Coulter
DNA Duster	www.soe.ucsc.edu/~kent/dnaDust/dnadust.html
EZ Plasmid Map v1.9	www.infosake.com/plasmid/plasmidFrame.php
Ensample	www.ensembl.org/index.html
Genecards	www.genecards.org
Kaluza v1.0-1.2	Beckmann Coulter
Lalign	www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html
NCBI-Server	www.ncbi.nlm.nih.gov
Oligo 6	www.oligo.net
PubMed	www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
RepeatMasker	www.repeatmasker.org
Stepone Software	Applied Biosystems
Microsoft Office 2008	Microsoft Corporation
Prism 4.03	GraphPad Soft. Inc.
Promotor Prediction Server	www.cbs.dtu.dk/services/promotor
Gene Construction Kit 2.5	Textco
Photoshop CS6	Adobe Systems Incoporated
Adobe Acrobat Professional XI	Adobe Systems Incoporated
Endnote X7.1	Thomas Reuters Corporation

Verwendete Software	Hersteller / Internetseite
Axovision	Zeiss

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zellkulturarbeiten

Grundvoraussetzung für den Umgang mit Zellkulturen ist eine sterile Arbeitsweise. Die angesetzten Kulturen könnten ansonsten mit Bakterien, Pilzen, Hefen oder Mykoplasmen kontaminiert werden. Um solche Kontaminationen zu vermeiden, wurden im Umgang mit primären Zellen, Kulturen oder Zelllinien alle Arbeiten unter einer Sterilbank durchgeführt. Sie wurde vor und nach Verwendung 15 Minuten mit UV-Licht (315-400 nm) bestrahlt. Die Arbeitsfläche wurde vor und nach Gebrauch mit 80%igem Alkohol gereinigt. Alle nicht steril verpackten Arbeitsmaterialien wurden mit Alkohol desinfiziert, bevor sie unter der Sterilbank verwendet wurden. In den selbst angesetzten Medien waren Antibiotika eingesetzt worden. Alle Medien wurden mit einen 0,22 µm bzw. 0,45 µm Filter steril filtriert.

2.2.2 Auftauen von Zellen

Die im flüssigen Stickstoff gelagerten Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. 1 ml des vorgewärmten Mediums wurde zu den eingefrorenen Zellen gegeben, sofort wieder abgenommen und ins vorgewärmte Medium (37 °C) überführt. Dieses wurde solange wiederholt, bis das Eis vollständig geschmolzen war. Auf eine schnellstmögliche Verdünnung des Dimethylsulfoxid (DMSO) ist zu achten, da es sonst die Zellen abtötet. Zur anschließenden Entfernung des DMSOs aus der Kultur und Gewinnung des Pellets wurde bei 400xg, 7 Minuten RT zentrifugiert. Das Pellet wurde im vorgewärmten Medium aufgenommen, und die Zellen wurden in ein geeignetes Kulturgefäß in geeigneter Konzentration überführt.

2.2.3 Einfrieren von Zellen

Um die Kristallbildung während des Einfrierprozesses zu verhindern, wurde DMSO verwendet. Daher ist darauf zu achten, alle Arbeitsschritte mit kalten Reagenzien und vorgekühlten Eppendorfgefäßen auf Eis durchzuführen. Alle Arbeiten erfolgten zügig. Zuvor wurden die Zellen geerntet (2.2.4) und die Zellzahl wurde bestimmt (2.2.5). Anschließend

wurden maximal $5x10^6$ Zellen in 2 ml kaltem Einfriermedium aufgenommen und auf die Einfrierröhrchen verteilt, welche ebenfalls auf Eis standen. Anschließend wurden die Einfrierröhrchen für 2 Tage bei -80 °C gelagert. Anschließend erfolgerte die Lagerung im Stickstofftank bei -196 °C.

2.2.4 Ernten und Umsetzen von Zellen

Zellen wachsen in Kulturen entweder adhärent oder in Suspension. Sie können einfach geerntet und umgesetzt werden. Das Enten der Suspensionskulturen erfolgte indem man den Kulturüberstand abnahm, die Zellzahl bestimmte und anschließend mit 400xg, 7 Minuten bei RT zentrifugierte. Das gewonnene Pellet wurde dann in einer entsprechenden Mediummenge aufgenommen.

Für die weitere Kultivierung der Zellen wurden sie resuspendiert, ¾ der Mediumzellsuspension entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Auf diese Weise konnte die Anzahl an Zellen reduziert werden. Sie bekamen frisches Medium für die weitere Kultivierung. Der Mediumwechsel erfolgte in einem Interval von 2-3 Tagen.

Die adherentwachsenden Zellen wurden in speziell beschichteten Flaschen oder Platten kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage umgesetzt. Dazu wurde das Medium entfernt und die Flasche einmal mit *Phosphate Buffered Saline* (PBS) gewaschen. Mediumreste, die den Ablösevorgang stören würden, wurden dadurch entfernt. Um die Zellen vom Wellboden abzulösen, wurde eine 0,25% Trypsinlösung (greift die E-Cadherine der Zelle an) in die Kultur gegeben. Im Anschluss an die fünfminütige Inkubation mit Trypsin wurde zum Abstoppen der Reaktion mit 10 ml frischem Medium eluiert. Die Zellen wurden bei 400xg 7 Minuten bei RT abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml Medium aufgenommen und 250 µl der Zellsuspension in eine neue Flasche überführt.

2.2.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit der Neubauerzählkammer oder durchflusszytometrisch bestimmt.

2.2.5.1 Zellzahlbestimmung mittels der Neubauerzählkammer

Bei der Neubauerzählkammer-Methode wurde zu einer Probe im Verhältnis 1:2 Trypanblau zugegeben und auf ein Untersuchungsfeld nach Neubauer aufgetragen. Das Trypanblau färbt

tote Zellen an, lebende Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf. Von einer Neubauerzählkammer wurden die vier großen inneren Quadrate ausgezählt. Die Zellzahl wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$Zellzahl\ \ pro\ \ ml = \frac{Zellzahl\ von\ \ vier\ \ Quadraten}{4} \cdot Verdünnungsfaktor \cdot 10^4 \qquad (1)$$

2.2.5.2 Durchflusszytometrische Zellzahlbestimmung

Bei der durchflusszytometrischen Bestimmung der Zellzahl wird die Zellsuspension durch eine feine Kapillare an einem Laser vorgeleitet. Der Durchmesser der Kapillare ist so gewählt, das die Zellen nur einzeln durch den Lichtstrahl wandern können. Die Anzahl der Schattenwürfe gibt die Zahl untersuchter Zellen an. Über die Schattengröße und Streuverhalten lassen sich Größe und Granularität bestimmen. Bei dem hier verwendeten Cell-Dyn war ein Probenvolumen von mindestens 300 µl erforderlich.

2.3 Kultivierung von Zelllinien

2.3.1 Kultivierung von Suspensionskulturen

Die Kultivierung der unterschiedlichen lymphoiden Suspensionszelllinien erfolgte im jeweiligem Medium bei 37 °C und 5% CO_2. Die kultivierten Zellen wurden bei einer Konzentration von 0,5-0,8 Millionen Zellen pro ml Medium gehalten. Ein Mediumwechsel war an jedem zweiten bis dritten Tag notwendig.

2.3.1.2 Jurkat

Jurkat ist eine immortalisierte T-Zelllinie. Sie wurde 1977 durch Schneider aus dem Blut eines 14 jährigen afrikanischstämmigen Jungen, der an einer T-Zellleukämie litt, gewonnen (Schneider et al., 1977).

2.3.1.3 NK3.3

NK3.3 ist eine Interleukin-2 (IL-2) abhängige NK-Zelllinie, welche nicht immortalisiert ist. Sie wurde durch soft-Agarose-Klonierung von mit IL-2 aktivierten primären MLCs gewonnen

(Kornbluth et al., 1982).

2.3.1.4 NKL

Die IL-2 abhängige NK-Zelllinie NKL, wurde aus dem peripheren Blut eines Patienten gewonnen, der an einer $CD3^-/CD16^+/CD56^+$ großen Granulären Lymphozyten Leukämie (LGL) litt (Robertson et al., 1996).

2.3.1.5 NK-92

NK-92 ist eine weitere IL-2 abhängige NK-Zelllinie, die aus dem peripheren Blut eines 50 jährigen Kaukasiers mit schnell verlaufendem non-Hodgkin Lymphom hergestellt wurde (Gong et al., 1994).

2.3.2 Kultivierung von adhärenten Zelllinien

2.3.2.1 Kultivierung muriner Nährzelllinien

Für jede verwendete murinen Nährzelllinie wurde ein spezielles Kulturmedium benutzt. Die Zellen repräsentieren Gewebe, die während des Entnahmezeitpunktes der Ort der Hämatopoese waren. AFT sind murine, fetale Leberzellen. Bei EL08 handelt es sich um eine murine, embryonale Leberzelllinie. Diese murinen Linien wurden mit dem SV40 *large T-Antigen* transfiziert. Dieses Gen ist temperatursensitiv, wird bei 33°C aktiv und die Zellen wird immortal. Bei 37°C ist das *large T-Antigen* inaktiv. Für die Expansion der Zellen wurden sie deshalb bei 33 °C kultiviert. (Miller et al., 1999; Oostendorp et al., 2002A).
Die murine Knochenmarkstromazelle OP9/OP9-Delta wurde aus dem Knochenmark einer neugeborenen *black six* Maus isoliert. Zusätzlich wurde OP9-Delta mit *Delta Like Ligand* (DLL) transfiziert (Holmes et al., 2009; Kitajima et al., 2003; De Smedt et al., 2004).
UG26 repräsentieren die *Urogenital Ridges Region* (UG), eine Region der sehr frühen Blutbildung. Sie stammen von einem 11 Tage alten männlichen Mausembryo (Oostendorp et al., 2002B).
OP9-(Delta) und UG26 wurden bei 37 °C in einer 5% CO_2 gesättigten Atmosphäre expandiert. Zweimal pro Woche wurden die Zellen umgesetzt.

2.3.2.2 Kultivierung humaner Nährzellen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten humanen Nährzellen handelt es sich um humane Fibroblasten (STF5), die freundlicherweise von Herrn Dr. Sleiman *Laboratory of Immunogenetics and Allergology*, *Centre de Recherche Public de la Sante ́CRP-Sante ́,Luxembourg* zu Verfügung gestellt wurden. Die mesenchymalen Stammzellen (MSCs) sind pädiatrischen Ursprungs. Sie wurden von Prof. Meisel aus der Kinderklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf zu Verfügung gestellt. MSCs sind Bestandteil der Knochenmarknische und sezernieren verschiedene Zytokine. Die verwendeten humanen *Unrestriced Somatic Stem Cells* (USSC) wurden von Frau Prof. Kögler aus dem ITZ der Uniklinik Düsseldorf zu Verfügung gestellt. USSCs wurden aus Nabelschnurblut gewonnen.
Die Kultivierung der humanen Zellen geschah bei 37 °C in einer 5%igen CO_2 Atmosphäre. In einem Rhythmus von zwei bis drei Tagen wurden die Zellen umgesetzt.

2.3.2.3 Humane IPS-Kultur

Die *Induced Pluripotenet Stem Cells* (IPS)-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Brüstle (Rheinische Friedlich Wilhelms Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. In dieser Arbeit wurden humane Fibroblasten-IPS-Zellen verwendet. Die IPS-Zellen wurden bei 37 °C in einer 5%igen CO_2 Atmosphäre kultiviert. Um eine Differenzierung zu vermeiden, erfolgte der Mediumswechsel täglich. Dabei wurden sie sicherheitshalber auf Differenzierung überprüft. Zweimal pro Woche wurden die Zellen gesplittet, da bei einer zu hohen Zelldichte die Zellen ebenfalls anfangen zu differenzieren.
Das Ablösen der IPS-Zellen erfolgte mit 1% Accutase, bei einer Inkubationszeit von 5 Minuten. Dieser Vorgang wurde durch Zugabe von 10 ml frischem Medium gestoppt. Die Pelletierung der IPS-Zellen erfolgte bei 400xg, 7 Minuten RT. Abschließend wurde das Zellpellet in 1 ml Medium aufgenommen und davon 250 μl auf Matrigel überführt. Anschließend wurde mTeSR-Medium von StemCell Technology zu den Zellen gegeben.

2.3.2.4 293T-Nierenepithelzellen

Bei 293T-Zellen handelt es sich um eine humane Nierenepithelzelllinie, die seit Ende 1970 besteht (Graham et al., 1977). Sie gehören zu den adhärent wachsenden Zellen. Wenn der Boden einer Kulturschale fast vollständig bewachsen war (ca. 48 Stunden nach Passage),

wurde das Kulturmedium abgenommen. Die Zellen wurden mit 0,1%Trypsin abgelöst. Und sofort im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von Kulturmedium (37 °C) gestoppt. Die Zellen wurden bei 300xg für 7 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Davon wurden $1*10^6$ Zellen zu 25 ml Medium in eine 175 cm^2 Zellkulturflasche gegeben.

2.4 Zellisolation und Differenzierung von Primärzellen

2.4.1 Isolation von mononukleären Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation

Damit hämatopoetische Stammzellen und NK-Zellen aus dem Blut isoliert werden können, mussten zunächst mononukleäre Zellen (MNCs) angereichert werden. Als Quellen für HSCs wurde Nabelschnurblut bzw. GCSF-mobilisiertes Blut verwendet. NK-Zellen wurden aus Nabelschnurblut, peripherem Blut oder Knochenmark gewonnen. Die Isolation der MNCs erfolgte bei allen Proben nach identischem Muster. Bei GCSF-mobilisiertem Blut wurde auf eine Dichtegradientenzentrifugation verzichtet, da in dieser HSC-Quelle die MNCs bereits vorangereichert vorlagen.
Zunächst wurden die Proben im Verhältnis 1:2 mit PBS-EDTA verdünnt und mit Hilfe von FICOLL durch Zentrifugation (35 Minuten, 900xg, 25 °C ohne Bremse) separiert. Die oberste Phase besteht aus dem Blutplasma, gefolgt von einem weißen Interphasering, der aus den gewünschten MNCs besteht. Unter dem Interphasering befindet sich die FICOLL-Schicht (durchsichtig) und am Boden des Gefäßes sammeln sich Erytrozythen, Blutplättchen, Granulozyten und abgestorbene Zellen. Der Interphasering wurde vorsichtig abgenommen und einmal mit PBS-EDTA gewaschen.

2.4.2 Isolation hämatopoetischer Stammzellen durch Anreicherung mit paramagnetischen *MicroBeads*

Nachdem die MNCs isoliert wurden, werden differenzierungsmarkerpositive Zellen mit dem *Lineage Depletions Kit* von Miltenyi aus der Zellsuspension entfernt, um später HSCs reiner anreichern zu können. Mit diesem Kit wurden zunächst oberflächenmarkerpositive Zellen (CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123 und CD235a) mittels biotinylierten Antikörpern depletiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation mit dem biotinylierten Antikörpercocktail, wurde nicht gebundener Antikörper durch Zugabe von *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS)-Puffer abgewaschen. Die Zellen wurden daraufhin

pelletiert (7 min., 4 °C, 400xg). Dann wurde das Pellet resuspendiert und ein Zweitantikörper zugegeben. Dieser band an den biotinylierten Erstantikörper. Der Zweitantikörper war am FC-Teil mit einem magnetischer Partikel „gelabeld“ und wurde für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml MACS-Puffer wurden die Zellen bei 4 °C für 7 Minuten bei 400xg pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen.
Zur Separierung wurden die Zellen dann auf eine spezielle Trennsäule (MACS-Column) von Miltenyi gegeben, die einem magnetischem Feld (MACS-Magnet) ausgesetzt war. Durch die Koppelung eines magnetischen Partikels am FC-Teil des sekundären Antikörpers, konnten die markierten Zellen in diesem magnetischen Feld festgehalten werden. So das es zu einer Separierung von den unmarkierten Zellen, kam. Der Durchfluss wurde pelletiert und in 300 µl MACS-Puffer aufgenommen. Im nächsten Schritt wurden mit dem CD34-MicroBeads-Kit von Miltenyi, die $CD34^+$ HSCs angereichert. Zu den Zellen wurde nach der Depletion von differenzierungsmarkerpositiven Zellen 100 µl FC-Block und 100 µl CD34-Antikörper zugegeben. Der FC-Block blockierte die FC-Rezeptoren, die den CD34-Antikörper sonst unspezifisch binden würden.
Daraufhin wurden die Zellen 30 Minuten bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde wie zuvor beschrieben, mit MACS-Puffer abgewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert und im Magnetfeld separiert. $CD34^+$ Zellen wurden in der Trennsäule durch das Magnetfeld festgehalten. Die gebundenen $CD34^+$ Zellen wurden anschließend aus der Trennsäule eluiert, indem die Säule aus dem Magnetfeld (MACS-Magnet) entfernt und mit 1 ml MACS-Puffer gewaschen wurde.
Im nächsten Arbeitsschritt wurde die Reinheit der Probe durchflusszytometrisch bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit einem Lineage-Antikörpercocktail**,** CD34-Antikörper und CD38-Antikörper angefärbt. Die Probe wurde nur verwendet, wenn die Reinheit mindestens 95% betrug. Abschließend wurden die $CD34^+$ Zellen in eine NK-Generierungskultur eingesetzt.

2.4.3 Präparation und Kultivierung von humanen NK-Zellen

In der MNC-Population sind auch NK-Zellen enthalten. Diese NK-Zellen wurden mit einer Negativselektionsmethode aus der Gesamtpopulation isoliert. Dazu wurden die MNCs einmal mit PBS gewaschen und nach Herstellerangaben (EasySep™ Human NK Cell Enrichment Kit) wurde zu den Zellen ein Primärantikörper, der an alle Blutzellen außer NK-Zellen binden konnte, hinzugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation in einem FACS-Röhrchen wurde der nicht gebundene Antikörper abgewaschen und die Probe wurde mit einem

Anti-Biotin-Antikörper behandelt. Am konstanten Teil des Erstantikörpers war Biotin gekoppelt. An diesem Molekül konnte der Zweitentikörper binden. Der FC-Teil, des Zweitantikörpers, war an ein magnetisches Partikel gekoppelt. Nach einer 15minütigen Inkubation mit anschließendem Abwaschen des nicht gebundenen Antikörpers, wurden die Zellen für 5 Minuten einem Magnetfeld (StemCell Magnet) ausgesetzt. An den Rändern des Gefäßes sammelten sich alle markierten Zellen. Die frei in Lösung befindlichen NK-Zellen konnten durch einfaches Abkippen von den restlichen Zellen separiert werden. Dabei durfte das FACS-Röhrchen nicht aus dem Magnetfeld entfernt werden. Zum Schluss wurden die so angereicherten NK-Zellen gefärbt und die gewünschten Populationen mittels Zellsortierung gewonnen.

2.4.4 Vorbereitungen der NK-Generierung

Vor Beginn einer NK-Generierungskultur wurden 24-Well-Platten (für adhärente Zellen) mit 0,2%ige Gelatinewasserlösung beschichtet. Dazu wurde die Lösung in die inneren 8 Wells einer 24-Well-Platte gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Gelatinebehandlung konnten die Nährzellen besser am Boden des Wells binden. Nach Ablauf der 30minütigen Inkubation wurde die Gelatine abgenommen. Die Platten wurden für ca. eine Stunde mit offenem Deckel zum Trocknen unter der Sterilbank stehen gelassen. Dann wurden pro Well 50.000 Nährzellen zugegeben. Die äußeren Wells wurden mit PBS versehen, um Mediumverluste durch Verdunstung zu minimieren. Nach 48 Stunden waren die Platten konfluent bewachsen und konnten mit Röntgenstrahlung (15 Gry) am Gulmay RS225 bestrahlt werden.

2.4.5 NK-Zellgenerierungskultur

Nach der Isolation der $CD34^+$ Blutstammzellen aus dem Nabelschnurblut oder aus dem GCSF-mobilisierten Blut wurden 50.000 Zellen in NK1-Medium aufgenommen und auf die entsprechenden Nährzellen ausplattiert. Eine Woche später wurde das NK1-Medium abgenommen und durch NK2-Medium ersetzt. Der Mediumwechsel erfolgte im weiteren Verlauf der Generierungskultur wöchentlich. Dazu wurde 1 ml des Mediums vorsichtig aus dem Well entfernt und anschließend durch 1 ml vorgewärmtes Medium (37 °C) ersetzt. Gewöhnlich dauerte eine NK-Zellgenerierung 5-7 Wochen und war vom verwendeten Nabelschnurblut abhängig. Die ersten NK-Vorläufer (Stadium 1) konnten nach einer

einwöchigen Kultivierung nachgewiesen werden. Der NK-Marker CD56 war frühestens ab der zweiten, spätestens ab der dritten Woche nachweisbar. Einmal die Woche wurde der Verlauf der NK-Generierung durchflusszytometerisch verfolgt. Dazu wurden zwei bis drei Wells einer NK-Generierungskultur durch wiederholtes Spülen geerntet. Um die Zellausbeute durch die Ernte zu erhöhen, wurde jedes Well nach der Ernte zusätzlich mit PBS-EDTA gewaschen. Während des Ernteprozesses wurde darauf geachtet, dass kein Schaum, der die Zellen schädigen könnte, entstand. Die Zellen wurden abzentrifugiert (7 min., RT, 400xg), einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit Antikörpern gefärbt.
Wöchentlich wurde für DNA- und RNA-Analysen bzw. die Analyse der Histonmodifikationen ein bis drei Platten einer NK-Zellentwicklungskultur geerntet. Die einzelnen Entwicklungsstadien wurden aus der NK-Zellentwicklungskultur durchflusszytometrisch isoliert. Die gewonnen Zellen wurden dann mit PBS-EDTA gewaschen und bei -80°C eingefroren.

2.4.6 Differenzierung von HSCs zu NK-Zellen ohne Nährzellen

Bei dieser Form der NK-Generierung wurde, wie schon zuvor unter 2.4.5 beschrieben, vorgegangen. Der Unterschied zwischen diesen beiden Methoden war, das bei dieser Form der NK-Zellgenerierung die Nährzellen fehlen und es wurden Kulturplatten für Suspensionszellen genutzt. Alle verwendeten Medien und Vorgehensweisen waren mit den unter 2.4.5 beschriebenen identisch.

2.4.7 Kultivierung unterschiedlicher NK-Zellstadien aus dem Blut

NK-Zellstadien wurden aus dem Blut stets durchflusszytometrisch isoliert, weil diese Methode die höchste Reinheit gewährleistet. 30.000 NK-Zellen wurden in eine 24-Well-Platte gegeben, deren Wells konfluent mit Nährzellen bewachsen waren. In eine 48-Well-Platte, ohne Nährzellen, wurden 100.000 NK-Zellen geben. Das NK-Medium wurde wöchentlich gewechselt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5%iger CO_2 Atmosphäre.

2.4.8 Umplattieren von NK-Zellkulturen

Bei diesem Versuch wurde zunächst eine NK-Zellgenerierung auf Nährzellen gestartet. Eine Woche nach Kulturbeginn wurden die NK-Stadien von den Nährzellen abgewaschen und

abzentrifugiert (400xg, 7 min, RT). Das erhaltene Pellet wurde in NK2-Medium aufgenommen und die Zellen wurden in ein neues Well mit oder ohne Nährzellen überführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte weiter unter den bekannten Bedingungen.
Wenn jedoch $CD34^+$ NK-Vorläufer aus der NK-Entwicklungskultur isoliert werden sollten, wurde das Pellet in MACS-Puffer aufgenommen und eine CD34-Isolation durchgeführt. Von diesen Zellen wurde die Reinheit durchflusszytometrisch bestimmt. Anschließend wurden die Zellen auf eine 24-Well-Platte ohne Nährzellen aufgeteilt und mit NK2-Medium, unter den bekannten Bedingungen für NK-Generierungen, weiter differenziert.

2.4.9 Expansion hämatopoetischer Stammzellen

HSCs wurden aus dem Nabelschnurblut isoliert. 30.000 HSCs wurden im HSC-Expansionsmedium aufgenommen und auf die entsprechenden Nährzellen ausplattiert. Ein Mediumwechsel erfolgte wöchentlich. Die weitere Kultivierung fand unter Standardkulturbedingungen statt.

2.5 Durchflusszytometrie

2.5.1 Theoretischer Hintergrund

Neben Größe und Granularität können vom Durchflusszytometer zusätzlich auch Fluoreszenssiganle detektiert werden, so dass von Zellen, die mit fluoreszierenden Antiköpern behandelt wurden, Oberflächenmarker bzw. intrazelluläre Proteine (nach Permeabilisierung) nachgewiesen werden können.
Die durch einen Laser angeregte Emission der Fluochrome wurde mit weiteren Photodetektoren gemessen. Mit einem an das Durchflusszytometer angepassten Computerprogramm (Kaluza, Beckman Coulter) konnten die von den Photodetektoren gemessenen Ereignisse graphisch dargestellt werden. Die Messungen wurden am Cytomics FC-500, hergestellt von der Firma Beckman Coulter, durchgeführt.

2.5.2 Zellisolation mittels Zellsortierung

Die Durchflusszytometrie kann auch dazu verwendet werden Zellen zu isolieren. Die Sortierung der Zellen basiert auf der gleichen Technik wie die zuvor beschrieben Analyse von

Zellen, jedoch werden nun die Zellen nach der Messung nicht verworfen, sondern auf verschiedene Auffangröhrchen verteilt. Die durchflusszytometrisch gestützte Zellsortierung wird verwendet um kleinste Populationen oder möglichst reine Zellpopulationen zu isolieren. In einem ersten Schritt wurden die Zellen durch eine Nadel aufgenommen und die Zellen liegen in einem Flüssigkeitsstrom, wie an einer Perlenschnur aufgereiht vor. Vor dem Laser an der Düse wurde der Flüssigkeitsstrom durch Vibration des Trägerstroms abgerissen und es bildeten sich Tropfen, die mit einer Zelle beladen waren. Diese Tropfen fielen durch den Laserstrahl, und die darin enthaltene Zelle wurde wie in 2.5.1 beschrieben analysiert. Entsprach die Zelle den zuvor bestimmten Parametern wurde der analysierte Tropfen elektrostatisch abgelenkt und in ein spezielles Auffangröhrchen aufgefangen. Hierdurch wurden die Zellen, welche den Parametern entsprachen, von den übrigen Zellen isoliert. Die Zellen, die nicht den gewünschten Parametern entsprachen wurden verworfen. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden an einem MoFlo XPD *Sorter* der Firma Beckman sortiert, was in der Lage war bis zu vier Populationen gleichzeitig zu sortieren.

2.5.3 Durchflusszytometrische Färbung von Zellen

Um die Oberflächenpoteine von Zellen anzufärben wurden bis zu $1*10^6$ Zellen in 100 µl PBS aufgenommen und mit maximal 5 µl fluorezensmarkierten Antikörpern 15 Minuten im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Damit der Fluoreszenzfarbstoff keinen Schaden nahm, war es wichtig die Zellen während und nach der Färbung im Dunkeln zu lagern. Nach Ablauf der 15minütigen Inkubationszeit wurde nicht gebundener Antikörper abgewaschen. Dazu wurde 500 µl PBS zu den Zellen gegeben und die Zellen wurden mit 400xg, 7 min, RT zentrigfugiert. Das Zellpellet wurde mit 200 µl PBS aufgenommen und durchflusszytrometrisch gemessen.

2.5.4 Intrazelluläre Färbung von Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern

Vor einer intrazellulären Färbung, wurde wie oben beschrieben eine extrazelluläre Färbung durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit Permwash (BD) 20 Minuten inkubiert. Hierdurch wurden die Zellen permeabilisiert und intrazelluläre Bestandteile konnten angefärbt werden. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und sie wurden mit 5 µl einer Antikörperlösung 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Nun wurde nicht gebundener Antikörper mit Permwash und dann mit PBS abgewaschen. Somit waren sie für die

durchflusszytometrisch Messung bereit.

2.5.5 Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektionseffizienz

Zur Messung der Infektionseffizientz wurde eine Woche nach Infektion die eGFP-Expression der infizierten Zellen bestimmt. Die Zellen wurden vom Wellboden abgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurde das Röhrchen mit PBS aufgefüllt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl PBS aufgenommen, und die eGFP-Expression wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt.

2.5.6 Funktionale Analyse von NK-Zellen

Die Degranulation der erzeugten NK-Zellen wurde mittels CD107a-Färbung nachgewiesen. CD107a ist ein Molekül, welches auf der Innenseite von Granula lokalisiert ist, die sich in NK-Zellen befinden. Nach Aktivierung der NK-Zelle kommt es zu einer Degranulierung und die NK-Zelle sezerniert Granzym und Perforin in Richtung der Zielzelle um diese zu lysieren. Während der Degranulierung fusioniert das Granula mit der Zellmembran der NK-Zelle, und die in ihm befindlichen Stoffe werden freigesetzt. Durch die Fusionierung der Membranen gelangt das zuvor auf der Innenseite der Granula befindliche CD107a an die Oberfläche der NK-Zelle und kann dort mittels Antikörper nachgewiesen werden (Aktas et al., 2009). Der CD107a-Assay wurde zuerst bei der Degranulierung von CD8-T-Zellen angewandt, konnte jedoch für NK-Zellen adaptiert werden. Zielzellen der NK-Zellen waren die Tumorzellinie K562, welche MHC-I-negativ war und ein Modell für chronische myeloische Leukämie darstellte.

2.5.6.1 Nachweis von Degranulierung: die CD107a-Färbung

Das Verhältnis von Effektor zu Zielzellen lag bei 1:10 und als Negativkontrolle dienten NK-Zellen, zu denen keine Zielzellen gegeben wurden. Damit wurde die Auto Degranulierungsrate bestimmt, welche später von der zielzellenabhängigen Degranulierung abgezogen wurde.

Zunächst wurden NK-Zellen und K562-Zellen zusammen in einer 96-Well-Platte kultiviert. Auf die Platten wurde zuvor CD107a-Antikörper gegeben. Die Zellen wurden 6 Stunden bei 37 °C kultiviert. Eine Stunde nach Beginn des Versuches wurde Monensin zu den Zellen

gegeben, wodurch die Funktion des Golgi-Appartes inhibiert wurde. Hierdurch wurde die Verweildauer des CD107a auf der Oberfläche der NK-Zelle verlängert. Nach Ablauf der sechsstündigen Inkubationszeit wurden die NK-Zellen geerntet und standardmäßig abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Neben CD107a wurden auch NKG2A und KIR gefärbt.

2.5.6.2 Vermögen der NK-Zellen ihre Zielzellen abzutöten

Mit einem weiteren Assay ist man in der Lage zu bestimmen, wie effizient die generierten NK-Zellen ihre Zielzellen abtöten können. Zunächst wurden die Zielzellen K562 mit CFSE inkubiert. $2*10^7$ K562 wurden mit 2 µl einer 0,5 M CFSE-Lösung versetzt um lebende Zellen anzufärben. Die so behandelten Zellen wurden 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 400xg 7 Minuten bei RT zentrifugiert. Das Verhältnis von NK-Zellen zu Zielzellen K562 lag bei einem Verhältnis von 10:1. In ein Well wurden keine NK-Zellen zu den K562 gegeben. Nun wurden die Zellen 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und neben den gewünschten Antikörpern wurde auch Propidium-Iodid (PI) zugegeben um die abgetöteten Zellen anzufärben. Bei der Auswertung wurde die Anzahl von CFSE-positiven Zellen bestimmt, welche die K562-Zellen darstellen. Von diesen Zellen wurde dann mittels des PI-Signals die Anzahl an abgetöteten Zielzellen bestimmt und vom PI-Signal des unbehandelten K562-Wells abgezogen.

2.5.6.3 Nachweis von Granzym und Perforin in NK-Zellen

Bevor die Zellen intrazellulär gefärbt wurden, wurden zunächst die Oberflächenmarker der Zelle angefärbt wie z.B. CD16 oder CD56 (2.5.3). Erst danach wurden die Zellen, indem sie mit Permwash 20 Minuten behandelt wurden, permeabilisiert und es konnte durch Zugabe von Granzym- oder Perforin-Antikörper diese intrazellulären Bestandteile angefärbt werden. Nach einer 20minütigen Inkubationszeit wurde nicht gebundener Antikörper abgewaschen und die Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert.

2.5.6.4 Nachweis von INF-γ

Durch den Nachweis von INF-γ, konnte auf die Funktion der untersuchten NK-Zellen geschlossen werden. Die NK-Zellen wurden ohne bzw. mit ihren Zielzellen K562 in einer 96-

Well-Platte 6 Stunden lang kultiviert. Zur Stimulation der NK-Zelle wurde in ein Well 50 ng PMA und 10 µg Ionomycin gegeben. Dieses Well diente als Positivkontrolle. In diesem Versuch wurde das Verhältnis von NK-Zelle zu Zielzelle von 5:1 gewählt. Eine Stunde nach Beginn der Inkubation wurde Brefeldin A (10 µg/ml) zugegeben. Dieses ist unbedingt notwendig, da dadurch die Exocytose von INF-γ haltigen Vesikeln verhindert wurde und sie sich intrazellulär anhäuften. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und extrazellulär gefärbt. Anschließend wurde intrazellulär INF-γ angefärbt und zweimal mit PBS gewaschen, damit sie durchflusszytometrisch analysiert werden konnten.

2.6 Mikrobiologische Arbeiten

2.6.1 Grundlagen

Bei der Arbeit mit transformierten Bakterien (S1-Arbeiten) bzw. Lentiviren (S2-Arbeiten) ist unbedingt darauf zu achten, dass sie nicht in die Umwelt gelangen. Dazu wurden alle mikrobiologischen Abfälle vor Entsorgung autoklaviert.
Die Nährböden und Kulturmedien wurden angesetzt und dazu wurde LB-Medium und LB-Agar als Trockenpulver von Invitrogen verwendet. Bei Bedarf wurde dem LB-Medium Ampicillin (oder ein anderes Antibiotikum, abhängig von den verwendeten Bakterien), mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt (LB-AMP-Medium).

2.6.2 Erstellung von elektrokompetenten E.Coli Sure

Aus einem Glycerinstock wurden *E.Coli Sure* Bakterien auf einer Agarplatte mit 30 µg/ml Kanamycin und 12,5 µg/ml Tetracylin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am darauf folgenden Tag, wurde eine Einzelkolonie von der Agarplatte entfernt und in eine 25 ml Vorkultur überführt, welche bei 37 °C über Nacht inkubiert wurde. 1/100 Volumen dieser Übernachtkultur wurde am nächsten Morgen zu 1 Liter LB-Medium mit Kanamycin und Tetracylin gegeben und die Bakterien wuchsen weiter bei 37 °C im Schüttler. Sobald diese Kultur eine optische Dichte von 0,5 aufwies, konnten die Bakterien geerntet werden. Dazu wurden sie in einem Eisbad abgekühlt und bei 4000xg, 4 °C für 15 Minuten abzentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde verworfen und die Bakterien wurden mit 4 °C kalten 10%igem Glycerin resuspendiert und anschließend abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal

wiederholt. Das Pellet wurde nun in 2 ml 10%igem Glycerin aufgenommen und die Suspension auf 40µl-Aliqouts aufgeteilt. Anschließend wurden die Bakterien in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.6.2.1 Transformation von elektrokompetenten Bakterien

Zur Transformation von *E. coli Sure* wurden zuerst die Bakterien 15 Minuten auf Eis aufgetaut und dann 2 µl eines aufgereinigten Ligationsansatzes zugefügt. Während dieser Zeit lagerten sich die Plasmide an die Bakterienmembran an. Nach 20-minütiger Inkubationszeit wurde der gesamte Reaktionsansatz in eine auf 4 °C vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 2500 V, 200 Ohm und 25 µF, wodurch die Plasmide in die Bakterien geschossen wurden. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum in die Küvette gegeben und die Bakterien komplett in ein Reaktionsgefäß überführt und 30 Minuten bei 37 °C kultiviert. In dieser Zeit wurde die Antibiotikakassette abgelesen und die Bakterien wurden resistent gegen das verwendete Antibiotikum. Anschließend wurden die Bakterien auf ampicillin-haltige Agarplatten ausgestrichen. Auf diesen Platten wuchsen nur die Bakterien, welche den Vektor aufgenommen hatten. Die Platten wurden 12 Stunden bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden Einzelkolonien in eine Übernachtkultur überimpft.

2.6.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

Zur Transformation wurden kompetente *E. coli* (*Top10F´*) verwendet. Diese Bakterien wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 2-4 µl eines aufgereinigten Ligationsansatzes zu den Bakterien pipettiert und sie wurden 30 Minuten auf Eis inkubiert, damit sich der Vektor an die Bakterienmembran anlagern konnte. Daraufhin wurden die Bakterien 30 Sekunden auf 42 °C erwärmt, um die Permeabilität der Bakterienmembran zu erhöhen. In Folge dessen konnte der Vektor einfacher aufgenommen werden.
Im folgenden Schritt wurden die Bakterien für eine Minute auf Eis gestellt und anschließend mit 800 µl LB-Medium verdünnt. Der Transfektionsansatz wurde 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit wurde die Antibiotikakassette abgelesen, und die Bakterien wurden resistent gegen das verwendete Antibiotikum. Anschließend wurden die Bakterien auf ampicillin-haltigen Agarplatten ausgestrichen. Auf diesen Platten wuchsen nur die Bakterien,

welche den Vektor aufgenommen hatten. Die Platten wurden für 12 Stunden bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden Einzelkolonien in eine Übernachtkultur überimpft.

2.6.2.3 Blau Weiß Selektion

Bei der Blau Weiß Selektion handelt es sich um eine einfache Methode, Bakterien, die einen inserttragenden Vektor aufgenommen haben, zu identifizieren.
Das Enzym β-Galaktosidase hydrolysiert neben dem im LB-Agar vorhandenen Substart Laktose zusätzlich als Substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β--D-galactosid (X-Gal), welches zu einem nicht löslichen blauen Farbstoff abgebaut wurde. Bakterien, die für die blau weiß Selektion verwendet wurden, fehlt das 5´Ende des *lacZ*-Gens, wodurch die β-Galaktosidase nicht funktionsfähig war. Diese Bakterien synthetisieren nur das w-Fragment der β-Galaktosidase. Werden diese β-Galaktosidasenegativen-Bakterien mit einem Vektor transfiziert, welcher das aminoterminale α-Fragment codiert, produzierten diese Bakterien daraufhin beide Fragmente und konnten das vorhandene X-Gal umwandeln, und bildeten blaue Kolonien. Zusätzlich enthielt der Vektor noch eine Antibiotika Resistenz, welches es den Bakterien ermöglichte auf den Antibiotika haltigen Agarplatten zu wachsen.
In der kodierenden Sequenz des α-Fragments ist die *multiple cloning site* enthalten. Bei einer Relegierung des Vektors war die codierende Sequenz des α-Fragments funktional und die mit diesem Vektor transfizierten Bakterien wiesen eine blaue Färbung auf. Wurde jedoch ein Insert in die *multiple cloning site* ligiert, konnte das α-Fragment nicht mehr gebildet werden. Somit waren die transfizierten Bakterien nicht in der Lage das X-Gal umzuwandeln und die Bakterienkolonien waren weiß.
Die Agarplatten für die blau weiß Selektion wiesen eine Ampilicillinkonzentration von 100 µg/ml auf. Sie wurden mit X-Gal (80µg/ml) 3 Stunden vor dem ausplattieren der Bakterien bestrichen und in einen 37 °C Brutschrank überführt.
Anschließend wurden ca. 30-50 µl eines Transformationsansatzes auf die Platten ausgestrichen und 12 Stunden bei 37 °C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Platten 3 Stunden bei 4 °C inkubiert. Die weißen Kolonien wurden dann für eine Minipräparation in LB-AMP- Medium (37 °C, 12 Stunden) überführt.

2.6.2.4 Anzucht von Übernachtkulturen

Zur Anzucht von Übernachtkulturen wurden Einzelkolonien von einer LB-AMP-Platte in 5 ml LB-AMP-Medium überimpft und über Nacht auf einem Schüttler bei 37 °C inkubiert. Aus diesen Kulturen konnte dann Plasmid-DNA durch eine Mini-Plasmidpräparation gewonnen werden. Wenn eine Maxi-Plasmidpräparation durchgeführt werden sollte, wurde die 5ml-Übernachtkultur vollständig in 100 ml LB-AMP-Medium überführt. Die Bakterien wurden für weitere 12 bis 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnte eine Maxi-Plasmidpräparation durchgeführt werden.

2.6.3 Lentivirale Arbeiten

Alle Arbeiten mit Lentiviren, wie auch ihre Produktion, wurden im S2-Labor des ITZ durchgeführt.

2.6.3.1 Virusproduktion

Um in Zielzellen Gene herunterregulieren zu können, wurde ein lentivirales Sytem verwendet. Der verwendete Virus gehörte zur Gruppe der Foamy-Viren. Alle verwendeten Viren waren replikationsdefizient. Der Virus konnte die Zielzelle infizieren und Genmaterial einbringen, war aber nicht in der Lage sich zu vermehren und stellte somit nur ein geringes Risiko für die Umwelt dar. Die verwendeten Vektoren wurden von Prof. Hanenberg (Kinderklinik, Universitätsklinikum, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Das lentivirale System bestand aus drei Vektoren. Ein Vektor, der pczHFVeny EM140, codierte für die Hüllproteine des Virus, der Vektor pCD/NL-BH enthielt die viralen Enzyme, die für die Verpackung des Virus und für die Integration des pCL2-Vektors notwendig waren. Der pCL2-Vektor wurde verwendet, falls eine shRNA in eine Zelle eingebracht werden sollte, um die Expression eines Gens herabzuregulieren.

2.6.3.2 Transfektion von 293T-Zellen

Die calciumphosphatvermittelte Transfektion von Zellen ist eine weit verbreitete Methode zum Gentransfer (Graham und van der Eb., 1973). Die Transfektion von 293T-Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Chen und Okayama (Chen und Okayama 1987). HEK293T-Zellen

wurden auf gelatinebeschichteten Flaschen expandiert, wodurch die Vitalität der Zellen gesteigert wurde. Einen Tag vor Transfektion wurden proliferierende 293T-Zellen in 10cm-Kulturschalen ausgesät und für 12 Stunden bei 37 °C inkubiert. Vor Zugabe der Zellen wurden die Platten mit 10 µg/ml Poly-D-Lysin mindestens 30 Minuten bei 37 °C beschichtet. Die Produktion von Viren schwächte die Zellen und verminderte ihre Haftung am Wellboden. Dem konnte durch die Behandlung der Kulturschalen mit Poly-D-Lysin entgegengewirkt werden. Anschließend wurde die Kulturschale zweimal mit PBS gewaschen. Erst dann wurden $7x10^6$ HEK293T-Zellen pro Schale ausplattiert und 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Nach 12 Stunden wurde das Kulturmedium abgenommen und durch 9 ml 2%tigen Advanced-MEF-Medium ersetzt. In der einstündigen Inkubationszeit wurde die Calciumphosphat-Transfektion vorbereitet. Dazu wurden 18,5 µg Plasmid-DNA (pCL2) mit 61,5 µl 2,5M $CaCl_2$ vermischt. Nun wurde 9,25 µg pCD/NL-BH Vektor und die gleiche Menge pczHFVenv140 Vektor zugegeben. Mit sterilem Wasser wurde auf 600 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 600 µl 2xHBS-Puffer zugegeben. Der entsprechende pH-Wert wurde zuvor bestimmt. Nach Zugabe des HBS-Puffers wurde die Lösung noch einmal gut gemischt und 15 Minuten inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde 10 µl Chloroquine zu den HEK293T Platten gegeben, wodurch eine finale Chloroquine-Konzentration von 25 µM erreicht wurde. Hiermit wurde der lysosomale Abbau inhibiert, wodurch eine bessere Transfektionsrate erreicht wurde. Im Anschluss an die 15minütige Inkubation wurde der Transfektionsansatz noch einmal gemischt und unter Schwenken der Kulturschale tropfenweise zu den HEK293T-Zellen gegeben. 6 Stunden lang wurden die HEK293T-Zellen bei 37 °C mit 5% CO_2 Atmosphäre inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das gesamte Medium abgenommen und durch 13 ml 5% Advanced-MEF-Medium ersetzt. Nach mindestens 12 Stunden wurde das Medium erneut komplett entfernt, durch 13 ml 5% Advanced-MEF-Medium ersetzt und 30 Stunden im Brutschrank inkubiert.

2.6.3.3 Ernte des Virusüberstandes

Nach Ablauf der 30 Stunden wurde das Medium komplett von den Platten entfernt und durch 13 ml frisches 5% Advanced-MEF-Medium ersetzt und weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Im Überstand befanden sich Viruspartikel wie auch abgestorbene Zellen. Alle Plastikpipetten und Falkonröhrchen wurden gekühlt verwendet. Um abgestorbene Zellen zu entfernen wurde der Überstand mit 400xg, 7 Minuten bei 4 °C pelletiert. Die Viruspartikel

befinden sich weiterhin im Überstand. Um die restlichen abgestorbenen Zellen zu entfernen wurde der Überstand mit einem 0,45 µm-Filter filtriert und in Viruszentrifugationsröhrchen überführt. Nun konnten die von den HEK293T-Zellen produzierten Viruspartikel pelletiert werden, indem der Überstand mit 30.000xg bei 4 °C, 2 Stunden zentrifugiert wurde. Dieser wurde verworfen und das Pellet wurde in 5 ml Virusmedium aufgenommen und bei 4°C im Kühlschrank über Nacht gelagert.
Nach 16 Stunden wurde die zweite Ernte, wie oben beschrieben, durchgeführt. Das Pellet wurde jedoch in den 5 ml Virusmedium des Vortages aufgenommen und in 500 µl Aliqots bei -80 °C gelagert.

2.6.3.4 Infektion von Zellen

In dieser Arbeit wurden nur Suspensionszellen infiziert. Damit dieser Zelltyp effizient transduziert werden konnte, wurden die Platten mit Retronektin beschichtet. Pro Well einer 24-Well-Platte wurden 8 µg/cm^2 Retronektin zu gegeben. Retronektin diente dazu, eine räumliche Nähe zwischen den Viruspartikel und den Zellen zu ermöglichen. Retronektin ist ein humanes rekombinantes Fibronektin. Die Viruspartikel binden an der zentralen Heparindomäne. Die Heparindomäne ist umschlossen von zwei Domänen, die Zellen binden können. Durch diesen Umstand werden Zellen und Viruspartikel in eine enge räumliche Nähe gebracht, wodurch die Infektion von Zellen durch Viren verbessert wird.
Eine 24-Well-Platte wurde mit Retronektin mindestens 24 Stunden bei 4 °C beschichtet. Kurz vor Verwendung der Platte für eine Infektion wurde das Retronektin abgenommen, und die beschichteten Wells wurden bei Raumtemperatur getrocknet. Retronektin kann dreimal verwendet werden. Daher wurde das verwendete Retronektin in eine neue 24-Well-Platte überführt. 50.000 NK-Zellen bzw. CD34$^+$ HSCs wurden pro Wells in 500 µl geeignetem Medium ausplattiert. Zu den Zellen wurde dann ein Aliquot des Virusüberstands gegeben. Anschließend wurden die Zellen für 48 Stunden bei 37 °C und 5%igen CO_2 Atmosphäre kultiviert. Danach wurden die Zellen vom Retronektin entfernt und abzentrifugiert um Virusreste zu entfernen. Die Zellen wurden durch die gewählte Zentrifugation pelletiert, der Virus befand sich im Überstand, welcher verworfen wurde. Anschließend wurden die Zellen in geeignetem Medium aufgenommen und auf entsprechende Nährzellen ausplattiert. Die Infektion erfolgte im S2-Labor des ITZ. Infizierte Zellen wurden, nachdem der Virus abgewaschen wurde in ein S1-Labor überführt. Die Transduktionsrate wurde eine Woche nach Infektion durchflusszytometrisch bestimmt.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Messung der RNA- und DNA-Konzentration mit Hilfe *von UV-Vis Spektrophotometer*

Die Messung der RNA- bzw. DNA-Konzentration erfolgte am Nanodrop. Dazu wurde der Nanodrop mit dem verwendeten Elutionspuffer eingestellt. Anschließend konnte die DNA- oder RNA-Konzentration durch Entnahme von 2 µl und Auftragen auf den Messfühler des Geräts bestimmt werden. Nach jeder Messung wurde das Gerät mit destilliertem Wasser gereinigt.

2.7.2 Präparation von RNA mittels Qiagen *RNeasy Kit*

Zur Isolation von RNA aus den isolierten bzw. kultivierten Zellen wurde das *RNeasy Kit* von Qiagen verwendet. Zunächst wurden die Zellen im 350 µl RLT-Puffer lysiert und die Ribonukleasen wurde inhibiert. Anschließend wurde das Lysat mittels QiaShredder-Säulen homogenisiert. Dann wurde die freie-RNA im Lysat durch Überführung auf eine Säule mit Silicamembran durch Zentrifugation an der Membran gebunden. DNA-Reste wurden mittels DNase-Verdau abgebaut. Dazu wurden 80 µl DNAse auf die Membran gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Die weiteren Waschritte wurden nach Angabe des Herstellers Qiagen durchgeführt. Sie sorgen für eine Aufreinigung der RNA-Probe. Die RNA wurde durch Zugabe von 30 µl RNAse-freien Wassers von der Membran eluiert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.7.3 Reinheitsbestimmung der RNA-Proben

Vor der cDNA-Synthese mit den gewonnen RNA-Proben, wurde überprüft, ob Spuren von DNA in den Proben vorhanden waren, die nicht durch die DNAse verdaut wurden. Dazu wurde eine PCR durchgeführt mit Primer gegen den GAPDH-Promotor. Wenn diese PCR positiv war, wurde ein DNAse Verdau in Lösung mit der Qiagen *RNeasy KIT* durchgeführt. Wichtig war die Zugabe von β-2Me zur RNA, da dadurch verhindert wurde, dass die RNA bei erhöhten Temperaturen denaturiert. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten nach Angabe des Herstellers Qiagen.

2.7.4 Isolation von DNA mittels Qiagen *DNA blood mini kit*

Die DNA wurde mit dem Qiagen *Kit QIAamp DNA blood mini kit* durchgeführt. Die Zellen wurden lysiert. Anschließend wurde die DNA an der Membran einer Isolationssäule gebunden und durch wiederholtes Waschen aufgereinigt. Hierbei war darauf zu achten, die maximale Bindungskapazität der Säule nicht zu überschreiten, da ansonsten DNA verloren gehen könnte. Auch die Reinheit verschlechterte sich dadurch deutlich. Nachdem die gebundene DNA gewaschen wurde, wurde sie nur mit 50 µl Elutionspuffers des KITs von der Membran abgelöst, damit die DNA in einer höheren Konzentration vorlag.

2.7.5 Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem Qia *Quick PCR Purification kit*

Bei der PCR-Aufreinigung wurde die DNA auf einer Silicamembran einer Isolationssäule gebunden. Durch Verwendung verschiedener Puffer wurden störende Salze und Proteine von der Membran abgewaschen. Anschließend wurde die DNA in 30 µl Elutionspuffer von der Säulenmebran gelöst und bei -80°C gelagert.

2.7.6 Hybritisierung von shRNA und Liagation in lentiviralen Vektoren

Die shRNAs wurden als Einzelstränge bestellt und mussten vor Klonierung hybritisiert werden. Dazu wurden die shRNA-Stränge in RNAse-freiem Wasser auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt. Je 2 µl eines jeden Stranges wurden zusammen pipettiert und auf 95 °C, 5 Minuten im Heizblock erhitzt. Dies diente dazu, Sekundärstrukturen aufzuschließen und die Einzelstränge auf die Hybridtisierung vorzubereiten. Durch das langsame Abkühlen der Probe auf Raumtemperatur wurde erreicht, dass sich die Einzelstränge zu Doppelsträngen zusammenlagerten. Anschließend wurden die Doppelstränge in einen Vektor ligiert. Dazu wurden der geschnittene Vektor und das Insert in einem Verhältnis von 1:10 auf 65 °C, 5 Minuten erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde 2 µl Ligase zugegeben sowie Puffer und Wasser auf ein Volumen von maximal 20 µl aufgefüllt. Die Liagtion erfolgte für 12 Stunden bei 4 °C.

2.7.7 Synthese von cDNA

Vor der Amplifikation wurde die vorhandene mRNA in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde ausgehend von 1-2 µg Gesamt-RNA mit Hilfe der oligo-dT-Primer, die am PolyA-Schwanz der mRNA banden und der reversen Transkriptase des „molony murine leukemia virus“ (M-MLV) synthetisert. Alternativ wurden Random-Primer verwendet. Die Primersequenz bestand aus sechs zufällig aneinander gereihten Nukleotiden, die statistisch an der RNA binden konnten.

Tabelle 19: Mastermix für cDNA-Synthese

Verwendete Reagenzien	**Menge**
1-2 µg RNA	X
Oligo dT / Random Primer	2 µl
MMLV Puffer	10 µl
RNasin	1,2 µl
M-MLV (200 U/µl)	2 µl
dH2O (RNase frei)	Auf 50 µl auffüllen

Bei Verwendung des Oligo-dT-Primers fand die cDNA-Sythese wie folgt statt:

42°C 60 Minuten
72°C 15 Minuten

Bei Verwendung des Random-Primers wurde dieses Programm genutzt:

25°C 10 Minuten
37°C 90 Minuten
70°C 15 Minuten

2.7.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In dieser Promotionsarbeit wurde die Polymerase-Kettenreaktion PCR (Saiki et al., 1988) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendet. Die verwendeten Primer wurden mittels Oligo 6 erstellt, lagen bereits in der Arbeitsgruppe vor oder wurden aus der Datenbank *Primer*

Bank entnommen. Die Primer wurden bei Thermo Scientific bestellt, und auf eine Arbeitskonzentration von 10 oder 5 pmol/µl mit Wasser eingestellt. Die optimalen PCR-Bedingungen wurden für jedes Primerpaar ermittelt.
Für die in dieser Arbeit durchgeführten PCRs wurde folgender Master Mix verwendet:

Tabelle 20: PCR-Mastermix

Verwendete Reagenzien	**Menge**
Puffer (10x)	2,5 µl
dNTPs	0,5 µl
3´Primer	1 µl
5´Primer	1 µl
Hot Star Polymerase (5 U/µl)	0,5-1 µl
cDNA / DNA (30 – 40 ng)	-
dH20	Auf 25 µl auffüllen

Die PCR wurde im Thermocycler (PCR Express Gradient, Hybaid) wie folgt durchgeführt:

Tabelle 21: Verwendetes PCR-Programm

Schritte	**Dauer**	**Temperatur in °C**	**Zyklen**
Denaturierung	15 min	95	1
Denaturierung	30 s	95	
Annealing	30 s	Tm	35x
Elongation	30 s	72	
Elongation	7 min	72	1
	unendlich	4	-

2.7.9 Real-Time PCR

Durch Real-Time PCR wird, mittels eines Fluoreszenzsignals bestimmt, wie viele Transkripte in einer Probe vorliegen. Im verwendeten SYBR-Green-Mix waren bereits die dNTPs, die Polymerase und das SYBR-Green enthalten. Es musste noch das entsprechende Primerpaar und die zu untersuchende cDNA-Probe beigefügt werden.
Das SYBR-Green wurde mit einer Wellenlänge von 480 nm angeregt und sein Emissionsmaximum lag bei 520 nm. Seine Fluoreszenzeigenschaften waren in ungebundener Form deutlich geringer, als wenn SYBR-Green in der kleinen Furche der DNA gebunden

vorlag. In der gebundenen Form fluoreszierte es ungefähr 1000x stärker, als ungebunden. Hierdurch eignet es sich sehr gut, um den Anstieg der DNA-Menge zu verfolgen.
Im Verlauf der PCR wurde die DNA-Menge während jedes Zyklus durch die Bestimmung der Fluoreszenz der Probe gemessen. Da der Fluoreszenzfarbstoff aber auch an Primer-Dimere binden konnte, bestand die Möglichkeit von Artefakten. Daher war es notwendig, nach einer Messung die Proben auf ein Gel aufzutragen und die PCR auf Pimer-Dimere zu kontrollieren.
Die Real-Time Messungen wurden am Step One Plus (Applied Biosystems) durchgeführt und am Gerät ausgewertet.

Tabelle 22: Mastermix für real time PCR-Messungen

Verwendete Reagenzien	**Menge**
Syber Green	7 µl
3´Primer (10-1 pmol)	0,5 µl
5´Primer(10-1pmol)	0,5 µl
cDNA (20-40 ng)	2 µl
dH20	5 µl

Tabelle 23: PCR-Programm für die real time PCR

Schritte	**Dauer**	**Temperatur in °C**	**Zyklen**
Denaturierung	10 min	95	1
Denaturierung	30s	95	
Annealing	30s	Tm	40x
Elongation	30s	72	
	Unendlich	4	-

2.7.10 DNA-Sequenzierung

Alle verwendeten shRNAs und Plasmide wurden vor Gebrauch sequenziert. Die Seqeunzierung basierte auf der Sangermethode und wurde durch das HLA-Labor der Universitätsklinik Düsseldorf durchgeführt. Als Primer wurde der M13-Primer verwendet.

Tabelle 24: Mastermix für die Sequenzierungsreaktionen

Verwendete Reagenzien	**Menge**
BigDye-Puffer	1 µl
Sequenziermix	1 µl
M13-Primer	1 µl
DNA	1 µl
Wasser	11 µl

Tabelle 25: PCR-Programm für die Sequenzierungsreaktion

Schritte	**Dauer**	**Temperatur in °C**	**Zyklen**
Denaturierung	1 min	96	1
Denaturierung	10 s	96	
Annealing	5 s	Tm	25x
Elongation	3 min	60	
	Unendlich	4	-

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm „Chromas lite“ exportiert und mit der Ursprungssequenz verglichen.

2.7.11 *Deep Sequenzing*

Um mehr über die Transkription von unterschiedlichen NK-Zellvorläufern und NK-Zellen zu erfahren, wurden mindestens 100.000 Zellen isoliert und in 200 µl Trizol aufgenommen. Die so vorbereiteten Proben wurden zur weiteren Analyse zum Primatenzentrum nach Göttingen geschickt. Hier wurden die *deep sequenzing* Messung der verschickten Proben durchgeführt.

2.7.12 Nachweis von DNA-Methylierung

Die DNA wurde aus den gewünschten Zellen mit dem Qiagen *Blood Kit* isoliert. Anschließend wurde eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt. 100 ng DNA wurden zur Methylierungsanalyse in das *EpiTect Bisulfite Kit* eingesetzt.
In einem ersten Schritt wurden 100 ng DNA mit 85 µl Natrium-Bisulfit versetzt. Dazu wurde 15µl DNA-*Protection*-Buffer gegeben, der die DNA vor Fragmentierung schützte. Die Probe wurde mit RNase-freiem Wasser auf 140 µl aufgefüllt und in den Thermozykler gestellt (Temperaturverlauf wie vom Hersteller Qiagen empfohlen). Während dieser Zeit erfolgte die

Deaminierung von Cytosin zu Uracil bei unmethylierten Cytosinen. Die Methylierung von Cytosin schützt es vor der Konvertierungsreaktion und das Cytosin bleibt erhalten.
Am folgenden Tag erfolgte die Aufreinigung der Konvertierung um Reste des Natrium-Bisulfits zu entfernen, die ansonsten die folgenden Analysen mittels PCR stören würden. Ebenfalls wurde fragmentierte DNA aus der Probe entfernt.
Zunächst wurden die Proben mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde 560 µl Puffer-BL zugegeben. Dann wurde die Probe auf eine EpiTect-Säule gegeben und die Probe wurde 1 Minute mit 1000xg zentrifugiert. Die DNA wurde an die Membran des Reaktionsgefäßes gebunden. Anschließend wurde einmal mit 500 µl BW-Puffer gewaschen, gefolgt von einer 15-minütigen Inkubation mit Puffer-BD. Dann erfolgten zwei Waschritte mit Puffer-BW. Die Behandlung mit Puffer-BW bewirkte eine Entsalzung der Probe und Puffer-BD sorgt für eine Desulfonisierung der Probe. Nun wurde die Probe einmal leer mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert um Reste des BW-Puffers zu entfernen. Anschließend wurde die Probe 5 Minuten auf 56°C im Heizblock zum Trocknen erhitzt. Die an der Membran gebundene DNA wurde durch Zugabe von 30 µl EB-Puffer von der Membran abgelöst, und konnte nun für weitere Messungen oder Klonierungen eingesetzt werden.

2.7.12.1 Analyse von DNA-Methylierung im Promotorbereich von *KIR*-Genen

Es ist möglich einen PCR-Primer so zu erstellen, dass er an einem Cytosin eines CpGs beginnt oder auf ein Cytosin eines CpGs endet. Wenn kein Cytosin, sondern ein Thymin in der Sequenz vorkommt, verändert sich die PCR-Effizienz, da der Primer nicht mehr gut an seiner Zielsequenz binden kann. Diese Unterschiede in der PCR-Effizienz können in der Real-Time PCR bestimmt werden. Hierdurch können Rückschlüsse auf den Methylierungsstatus des CpGs gemacht werden.

2.7.13 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente für eine Analyse aufzutrennen, wurden 0,8-2%ige Agarosegele verwendet. Die Zusammensetzung des Gels hing von der Größe des zu untersuchenden PCR-Produktes ab (Maniatis et al. 1989). Anschließend wurde die Agarose in TBE-Puffer aufgekocht, um sie vollständig zu lösen. Danach wurde die Agaroselösung abgekühlt und 0,3 µg/ml Ethidiumbromid wurden zugegeben. Die Agaroselösung wurde zum Auspolimerisieren

in einen vorbereiteten Gelschlitten gegeben. Anschließend wurde es in eine mit 1xTBE-Puffer gefüllte Gelkammer gelegt. Die PCR-Proben wurden mit 5-fach Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese fand in einer Gelkammer bei bis zu 6 V/cm statt. Nach Abschluss der Gelelektrophorese, wurden die PCR-Produkte im Gel über die Fluoreszenz des interkallierten Ethidiumbromids lokalisiert. Das Gel und die PCR-Proben wurden im Geldokumentationsgerät mit UV-Licht (254-366nm) angeregt und das in der DNA der PCR-Proben interkalierte Ethidiumbromid emittiert Licht im sichtbaren Bereich von 590 nm. Mit Hilfe des Geldokumentationsgerätes wurde das Gel abgelichtet.

2.7.14 Isolation von PCR-Produkten aus Agarosegelen mittels Qiagen *Gel Extraction Kit*

Das PCR-Produkt wurde auf ein maximal 1%iges Gel aufgetragen und aufgetrennt. Anschließend wurde unter der Einstellung „schwaches UV-Licht“ die zu isolierende Bande lokalisiert. Die Bande wurde möglichst genau ausgeschnitten, um nur geringen Mengen an Agarose aufarbeiten zu müssen. Anschließend wurde das Agarosestück in QG-Puffer bei 37 °C gelöst. Nachdem es aufgelöst war wurde die DNA auf eine Isolationssäule überführt. Zuvor wurde die Farbe des QG-Puffers überprüft. Die DNA konnte nur an der Membran der Isolationssäule gebunden werden, wenn der pH-Wert entsprechend war. Nachdem die Lösung abzentrifugiert wurde (1 Minuten, Maximale rpm) und die DNA an der Membran gebunden wurde, wurden Agarosereste und Salze durch Waschen entfernt. Die DNA wurde in 30 µl Elutionspuffer aufgenommen und die Konzentration bestimmt. Bis zur Verwendung wurde die DNA bei -80 °C gelagert.

2.7.15 Restriktionsverdau

Die verwendeten Enzyme stammten von der Firma Invitrogen.

Tabelle 26: Verwendete Restriktionsenzyme mit ihren Schnittstellen und den verwendeten Reaktionspuffern

Restriktionsenzyme	Restriktionspuffer	Erkennungsstellen
DraI	Blau	5'-T T T^A A A-3' 3'-A A A^T T T-5'
PvuI	Orange	5'-C G A T^C G-3' 3'-G C^T A G C-5'
XbaI	Grün	5'-T^C T A G A-3' 3'-A G A T C^T-5'
NotI	Orange	5'-G C^G G C C G C-3' 3'-C G C C G G^C G-5'
NheI	Gelb	5'-G ^C T A G C-3' 3'-C G A T C^G-5'
XHOI	Gelb	5'-C^T C G A G-3' 3'-G A G C T^C-5'

Die Restriktionshydrolyse wurde in der Regel in einem 20 µl Ansatz durchgeführt. Dazu wurden 12 µl dH_2O mit 2 µl 10xPuffer, 1 µl des Enzyms (entspricht 10 U) und 5 µl DNA versetzt. Die Proben wurden 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der Erfolg des Verdaus wurde anschließend in einer Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

2.7.16 Minipräparation

Durch die blau weiß Selektion konnte man gezielt putativ positive Klone auswählen. Eine weiße Bakterienkolonie wurde von der Agaroberfläche einer Agarplatte entfernt und zu 2 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin gegeben. Die Inkubation erfolgte für 15 Stunden bei 37 °C bei 110 rpm. Am folgenden Tag wurde die Bakteriensuspension in ein Eppendorfgefäß überführt und 1 Minute bei 15.900xg abzentrifugiert. Die Bakterien wurden lysiert und das enthaltene Plasmid wurde mittels *Nucleo Spin Plasmid Mini Kit* nach Herstellerangaben isoliert.

2.7.17 Gewinnung von Plasmid-DNA

Die Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit dem *NucleoBond Xtra Maxi Kit* von Macherey Nagel nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für eine

Minipräparation wurde eine 3 ml Übernachtkultur verwendet. Für eine Maxipräparation wurde eine 150 ml Übernachtkultur angelegt.
Das Prinzip der Plasmidgewinnung ist bei beiden Verfahren identisch. Zunächst wurden die Bakterien in Gegenwart von RNase alkalisch lysiert und die Lysate durch Zentrifugation von Proteinen und genomischer-DNA befreit. Die klaren Lysate wurden daraufhin auf Säulen des KITs gegeben und die Plasmid-DNA wurde an die Silikamembran der Säulen gebunden. Weitere Verunreinigungen wurden durch Waschritte entfernt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA von der Silikamembran eluiert.

2.7.17.1 Alkoholische Fällung von DNA

Die bei der Maxipräparation eluierte Plasmid-DNA wurde aus wässriger Lösung gefällt. Dazu wurde die gelöste DNA mit dem 0,8-fachen Volumen Isopropanol versetzt und gemischt. Die Proben wurden 60 Minuten bei 3900xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet. Das DNA-Pellet wurde mit eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 400 µl TE-Puffer aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde bestimmt.

2.7.18 *TA cloning Kit*

Mit Hilfe des *TA cloning Kits* kann ein PCR-Produkt in einen Vektor ligiert werden, ohne dass Restriktionsenzyme oder Schnittstellen vorhanden sein müssen.
Zunächst wurde mittels PCR der entsprechende Promotorbereich amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt durch Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Die entsprechende Bande wurde unter der Einstellung „schwaches UV-Licht“ lokalisiert und aus dem Gel geschnitten und aufgereinigt. Das *TA-cloning*-Verfahren beruht auf der Fähigkeit der komplementären Basenpaarung von Adenin und Thymin. Dabei liegen Adenin und Thymin auf verschiedenen DNA-Fragmenten. Es wurden stets frische PCR-Produkte verwendet, da die verwendete Polymerase ein Adenin an das 3´ Ende einer jeden Amplifikation hängt. Diese überstehenden Enden gehen verloren, wenn das PCR-Produkt nicht frisch ist. Der verwendete *TA-cloning*-Vektor liegt geschnitten vor und weist einen 5´ Thymin-Überhang auf. Aufgrund der Adenin-Thymin-Wechselwirkung kann das aufgereinigte PCR-Produkt mit dem linearisierten Vektor durch eine Ligase verbunden werden. Die Ligation dauerte 12 Stunden bei 4 °C.

2.8 Zellbiologische Methoden

2.8.1 Behandlung der Zellen mit AZA/TSA

Die epigenetsich wirksame Substanz 5-Aza-2′-deoxycytidine (AZA) inhibierte die Funktion von DNMT1 und verhinderte, dass das Methylierungsmuster vollständig vom Mutter- auf den Tochter-Strang während der Zellteilung übertragen wird. AZA ist bei 37 °C nicht stabil und seine Wirksamkeit lies nach 24 Stunden nach. Daher wurde in diesem Versuch am folgenden Tag noch einmal die identische Konzentration AZA zu den Zellen gegeben, damit AZA 48 Stunden auf die Zellen wirkt und einige Zellteilungen von den Zellen durchgeführt wurden.
Bei Trichostatin A (TSA) handelt es sich um einen Histon-Deactylase Inhibitor und es sorgt dafür, dass das Chromatin in geöffneter Form vorlag.
Da beide Substanzen in hohen Konzentrationen toxisch für die Zellen sind, wurden sie, wenn nicht anders beschrieben, 1mal pro Woche zu den Zellen einer NK-Zellentwicklungskultur gegeben oder an zwei aufeinander folgenden Tagen zu Zelllinien. Die AZA Konzentration betrug 1 µM und TSA wurde mit einer Konzentration von 25 nM eingesetzt. Eine Platte blieb immer unbehandelt und diente als Kontrolle.

2.8.2 Behandlung der Zellen mit BIX

BIX 01294 trihydrochlorid hydrat (BIX) ist eine epigenetisch wirksame chemische Substanz, die bei einer Reihenuntersuchung aufgefallen war. Es ist ein selektiver Histon-Methyltransferase-Inhibitor. Durch die gezielte Inhibition von G9a kam es zu einer Reduktion der H3K9me2. Eine Konzentration ≥ 4,1 µM wirkt letal auf die verwendeten Zellen (Janzen et al., 2010). In dieser Arbeit wurde eine Konzentration von 2 µM verwendet. Die Behandlung mit Bix erfolgte einmal pro Woche (Kubicek et al., 2007).

2.8.3 Verminderung der Gentranskription

Für die Verminderung der Transkription von Genen wurde auf die RNA-Interferenzmethode zurückgegriffen. Im verwendeten Vektor (pCL2) befand sich eine dem Zielgen komplementäre 21 Nukleodie lange Sequenz. Durch die Verwendung des lentiviralen Systems wurde in den Zielzellen der pCL2-Vektor eingebracht. Durch die Eigenschaften der Lentiviren und der lentiviralen Vektoren kommt es auch in ruhenden Zellen zu einer stabilen

Integration des Vektors ins Genom der Zielzelle. Der eingebrachte Vektor war permanent aktiv und hierdurch konnte das Zielgen stabil herabregulieren werden.

2.9 Proteinchemische Methoden

2.9.1 *ChIP-Assay*

Der *ChIP-Assay*, der in dieser Arbeit durchgeführt wurde, diente zur genaueren Analyse von Histonmodifikationen am Promotor von ausgewählten *KIR*-Genen. Der *ChIP-Assay* wurde nach dem im Labor etablierten *ChIP-Assay*-Protokoll durchgeführt. Im ersten Schritt des *ChIP-Assays* wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen für die Immunopräzipitation eingesetzt. Die in diesem Versuch eingesetzten Zellen wurden zuvor mittels der Durchflusszytometrie sortiert. Anschließend wurden die Zellen bei -80 °C eingefroren. In einem ersten Arbeitsschritt wurden die Zellen fixiert. Dazu wurden die eingefrorenen Zellen zunächst aufgetaut und in 1 ml Kulturmedium pro $1 \cdot 10^6$ Zellen aufgenommen. Zu dieser Zellsuspension wurden 135 µl 37%iges Formaldehyd pro 5 ml gegeben. Anschließend wurden die Proben 10 Minuten bei 37°C im Heizblock inkubiert. Im darauffolgenden Arbeitsschritt wurden die Proben zu je $1 \cdot 10^6$ Zellen auf Eppendorfreaktionsgefäße aufgeteilt. Anschließend wurde Eppendorfreaktionsgefäße mit 400xg, 7 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das gebildete Zellpellet wurde anschließend zweimal mit kalter Proteaseinhibitorlösung gewaschen. Nachdem die Proben gewaschen wurden, werden die fixierten Zellen lysiert, indem sie mit 200 µl Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren resuspendiert wurden. Nun wurden die Proben 30 Minuten auf Eis liegend inkubiert. Durch die Lyse der Zellen wurde ihre DNA in der Lösung freigesetzt. Die Ultraschallbehandlung der Proben erfolgte im einem Eiswasserbad, wodurch die DNA während der Ultraschallbehandlung gekühlt wurde.

Die freie DNA wurde durch eine Behandlung der Proben mit einem Stabultraschallgerät fragmentiert. Die Einstellung des Ultraschallgerätes (130 W Ultraschall Desintegrator) lauteten: 10sekündige Pulse bei 30% der maximalen Amplitude über eine Dauer von 60 Sekunden. Die Proben wurden nach der Ultraschallbehandlung 10 Minuten bei 15.900xg, 10 °C abzentrifugiert und der Überstand wurde in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. 5 µl jeder Probe wurde als Ultraschallkontrolle abgenommen. Die Ultraschallkontrolle, wie auch die übrigen Proben, werden identisch aufgereinigt und auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen. Hierdurch wurde überprüft, ob die DNA-Fragmente zwischen 200 bp und 1000 bp liegen und die Proben ausreichend gut durch die Ultraschallbehandlung fragmentiert

wurden.

Zum restlichen Probevolumen wurden je 1,8 ml Dilution-Puffer inklusive Proteaseinhibitor gegeben. Von jeder Probe wurden nun 120 µl entnommen und bei -20 °C eingefroren. Dies diente als Inputkontrolle. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Proben mit 70 µl Protein-A Agarose-Kugeln 30 Minuten unter Rotation bei 4°C inkubiert, während die Proben rotierten. Nachdem die Proben abzentrifugiert wurden (1000xg, 2 Minuten 4 °C), wurde der Überstand in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Es wurden bis zu 5 µg Antikörper zu den Proben gegeben. Anschließend wurden die Proben unter Rotation für 12 Stunden im Kühlschrank inkubiert. Am Vormittag des folgenden Tages wurden zu den Proben 60 µg Protein-A Agarosekugeln gegeben und 70 Minuten im Kühlschrank inkubiert, gefolgt von einer 2minütigen Zentrifugation bei 1000xg bei 4 °C. Anschließend wurde der Überstand verworfen und nach den Empfehlungen des verwendeten Kits wurde das Präzipitat mit Puffern, die eine steigende Salzkonzentration aufwiesen, gewaschen. Zu jeder Probe wurde 250 µl Elutionspuffer gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und zentrifugiert. Das Präzipitat wurde erneut mit Elutionspuffer behandelt, jedoch wurden die Proben diesmal bei Raumtemperatur für 15 Minuten rotiert. Alle Kontrollen, wie auch Proben, wurden mit 20 µl einer 5 M NaCl-Lösung pro 500 µl versetzt. Die Proben wurden 4 Stunden lang bei 65 °C inkubiert. 2 µl Proteinase K, 10 µl EDTA und 20 µl Tris wurden pro 500µl Probe zugegeben und für eine Stunde bei 45 °C inkubiert. Die Proben wurden mit dem *PCR Purifcation Kit* von Qiagen aufgearbeitet. Zum Schluss der Probenaufreinigung wurden die Proben in 30 µl Elutionspuffer eluiert und bei -20 °C gelagert. 2 µl jeder Probe wurde zur Analyse der Histonmodifikation in einer Real-Time PCR eingesetzt. Um die Methylierung zu bestimmen wurden methylierungsspezifische Primer verwendet.

2.10 Statistische Auswertung

2.10.1 Auswertung Real Time

Bei der gewählten Methode steigt die gemessene Fluoreszenz mit der Menge der synthetisierten DNA an, da das bei der Messung verwendete SYBR-Green in die kleine Furche der DNA interkaliert. Hierdurch kann auf die Ausgangsmenge geschlossen werden, da die Amplifikation durch die PCR exponentiell ist. Wenn die Fluoreszenzintensität gegen die PCR-Zyklen aufgetragen wird, erhält man ein Kurvenmuster. Zu Beginn der PCR-Reaktion

findet kein exponentieller Anstieg der Fluoreszenz statt, aufgrund der zu geringen Menge an Ausgangsmaterial. Diese Phase wird Basislinie genannt und stellt das Hintergrundrauschen dar. Die Basislinie wird später von der Fluoreszenzmessung abgezogen. Mit steigender Zyklenzahl steigt auch die gemessene Fluoreszenz an. Um die Konzentration der Probe zu bestimmen wird der Schwellenwert (Threshold) bestimmt, beim dem das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal einen vorgewählten Wert übersteigt. Dieser vorgewählte Wert wird so gewählt, dass er die Zyklenzahl angibt (*threshold cycle*; CT), bei der das Fluoreszenzsignal erstmalig sicher zu detektieren ist.

Um die gemessenen Real-Time-PCR-Daten auszuwerten wurde die ddCT-Methode verwendet (Kubista et al. 2006). Vom gemessenen CT-Wert des untersuchten Gens, wurde der CT-Wert eines *Housekeepinggens,* in dieser Arbeit GAPDH oder GSTP, abgezogen. Der so ermittelte Wert wird dCT genannt. Für die Berechnung von ddCT wird vom dCT-Wert der dCT-Wert einer Ausgangssitutation z.B. Tag 0 Generierung, Leervektor usw. abgezogen. Die n-Fache Expression wird berechnet in dem man 2^{-ddCT} bildet. Um die Fehlerbalken der vielfachen Expression zu berechnen, wurde wie folgt vorgegangen. Zunächst wurde der Mittelwert der einzelnen dCT-Werte berechnet. Anschließend wurde aus diesen dCT-Werten ddCT berechnet und 2^{-ddCT} wurde gebildet. Nun wurde mit Hilfe der unten abgebildeten Formel das 95% Konfidenzintervall für die dCT-Werte berechnet, wodurch die Standardabweichung der vielfachen Expression berechnet wurde.

$$\sigma_{FC} = FC \cdot \ln(2)\sqrt{\frac{\sigma_x^2}{n_x} + \frac{\sigma_y^2}{n_y}} \qquad (2)$$

σ_x: Standardabweichung dCT Testgruppe

n_x: Probenzahl Testgruppe

σ_y: Standardabweichung dCT Referenzgruppe

n_y: Probenzahl Referenzgruppe

FC: *Fold change*

3 Ergebnisse

3.1 Expansion humaner hämatopoetischer Stammzellen zur *in vitro* Generierung von humanen natürlichen Killerzellen

Um die Mechanismen, die der epigenetischen Regulation der *KIR*-Gene unterliegen, genauer zu verstehen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Verfahren entwickelt, mit dem hämatopoetische Stammzellen expandiert wurden, um diese später in NK-Zellen zu differenzieren. Zunächst wurden aus dem Nabelschnurblut MNCs isoliert. Anschließend wurde eine Depletion von differenzierungsmarkerpositiven Zellen durchgeführt, gefolgt von einer Anreicherung von $CD34^+$ Zellen. Die so gewonnen Zellen (Abb. 6) wiesen keine Marker für Differenzierung auf und wurden in ein besonders zytokinarmes Expansionsmedium mit Nährzellen überführt, um die Blutstammzellen zu expandieren.

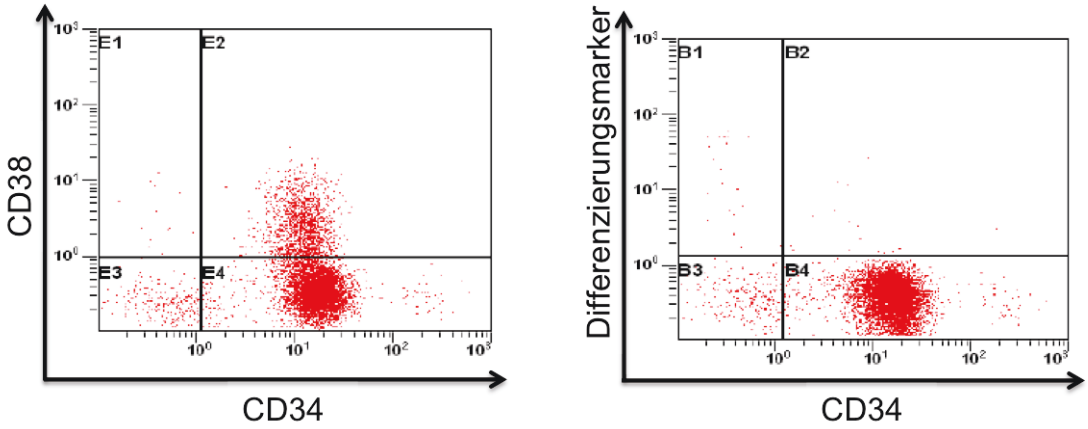


Abb. 6: HSC wurden aus dem Nabelschnurblut mit Hilfe des MACS-Verfahrens isoliert Die Anreicherung der $CD34^+$ Zellen erfolgte mit dem CD34-Isolationskit von Miltenyi. Zuvor wurden differenzierungsmarkerpositive Zellen depletiert. Anschließend wurde die Reinheit der isolierten HSCs durchflusszytometrisch bestimmt. Dazu wurde die Zahl an differenzierungsmarkerpositiven Zellen ermittelt. Die angereicherten HSCs wurden zum Nachweis mit den Antikörpern gegen Differenzierungsmarkern, CD34 und CD38 gefärbt.

In Abb. 6 sieht man das Ergebnis einer durchflusszytometrischen Analyse der angereicherten Stammzellen. Hier wurden die Oberflächenmarker CD34 und ein Cocktail von Differenzierungsmarkern verwendet, um die Reinheit der angereicherten Proben zu bestimmen. Ebenfalls wurde die Verteilung der Marker CD34 und CD38 bei den angereicherten HSCs aus dem Nabelschnurblut untersucht. Die HSCs wiesen keine Marker für eine Differenzierung auf ihrer Zelloberfläche auf. Die Größte Population war $CD34^+/CD38^-$. Ebenfalls konnten für beide Oberflächenmarker positive Zellen nachgewiesen werden.

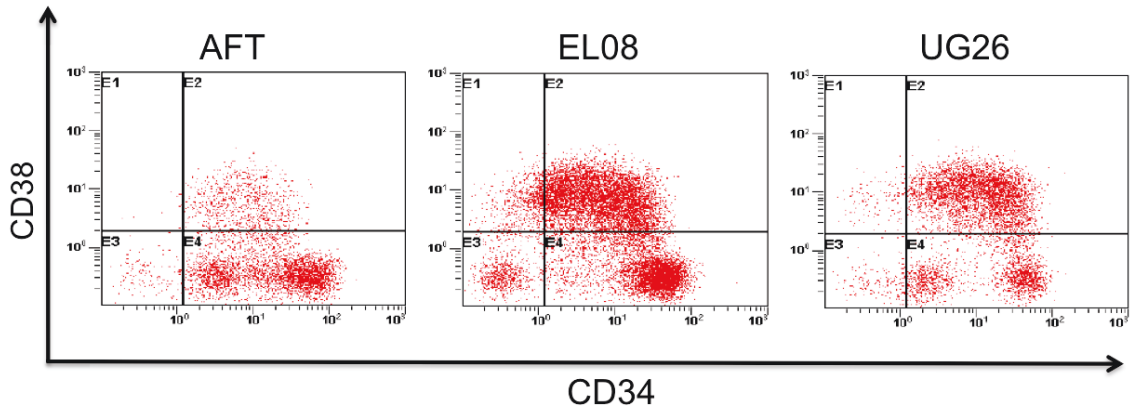


Abb. 7: HSC aus dem Nabelschnurblut wurden für eine Woche auf den Nährzelllinien AFT, EL08 oder UG26 kultiviert. Anschließend wurde von den kultivierten HSCs die Oberflächenexpression von CD34 und CD38 durchflusszytometrisch analysiert, um Veränderungen in der CD34- oder CD38-Expression nachzuweisen.

Die aus dem Nabelschnurblut isolierten HSCs (Abb. 6), wurden in ein Expansionsmedium gegeben, mit dem die Blutstammzellen expandiert wurden. Abb. 7 zeigt, dass die stärkste CD34-Expression auf HSCs nachzuweisen war, welche auf EL08 kultiviert wurden.

Es bildete sich eine prominente Population an $CD34^+/CD38^-$ Zellen. Ebenfalls kam es zur Expansion von $CD34^+/CD38^+$ Zellen. In dieser Kultur kam es nicht zu einer Bildung von Zellen die CD34 nur schwach exprimierten. Diese Population war nachweisbar in den Kulturen, die auf UG26 und AFT kultiviert wurden. Des Weiteren bildeten sich nur sehr wenige $CD34^+/CD38^-$ Zellen, wenn HSC auf AFT expandiert wurden. Die Zahl an $CD34^+/CD38^-$ Zellen war nur schwach ausgebildet, wenn die Expansion von HSCs auf UG26 stattfand. Unter diesen Kulturbedingungen kam es zur Bildung einer prominenten Zahl von $CD34^+/CD38^+$ Zellen.

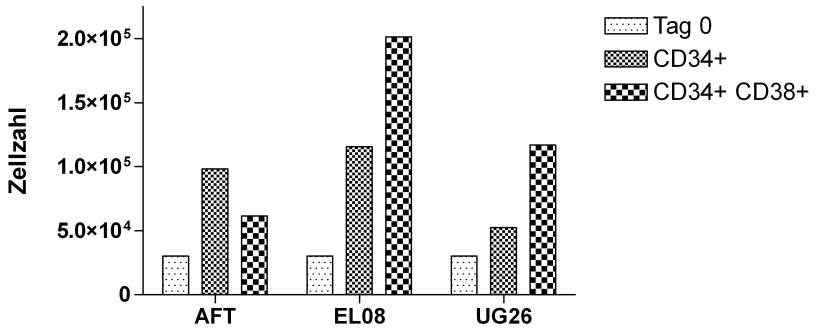


Abb. 8: HSCs wurden für eine Woche auf den Nährzelllinien AFT, EL08 oder UG26 expandiert. Die Zellzahl einfachpositiver $CD34^+$ HSCs und doppelt positiver $CD34^+/CD38^+$ HSCs wurde bestimmt und graphisch dargestellt. Die Ausgangsmenge an HSCs, welche am ersten Versuchstag auf die verschiedenen Nährzellen gegeben wurden, ist ebenfalls dargestellt. Die stärkste Expansion von HSCs war auf der Nährzelllinie EL08 festzustellen. Dargestellt ist ein exemplarisches Experiment von drei durchgeführten Versuchen.

Die Proliferation der CD34$^+$ Zellen wurde nach einer Woche ermittelt. Wie aus Abb. 8 hervorgeht, fand die stärkste Expansion der HSCs auf der Nährzelllinie EL08 statt. Die Ausgangsmenge an HSCs lag bei 30.000 Zellen und konnte auf 300.000 HSCs innerhalb einer Woche im Fall von EL08 erhöht werden. Auf den übrigen Linien fand ebenfalls eine Expansion von HSCs statt, jedoch viel sie auf der EL08-Linie am stärksten aus.

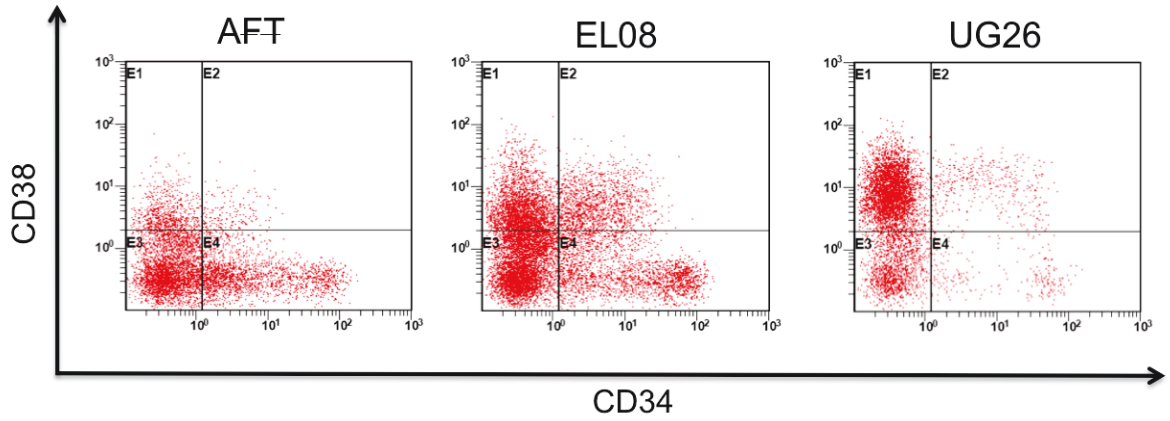


Abb. 9: In einem weiteren Versuch wurden HSCs für drei Wochen auf den Nährzelllinien AFT, EL08 oder UG26 expandiert. In der dritten Kulturwoche erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der HSCs. Sie wurden mit Antikörpern gegen CD34 bzw. CD38 angefärbt um nachzuweisen, dass sich noch HSCs in der Expansionskultur befanden.

Wenn die HSCs über einen Zeitraum von drei Wochen expandiert wurden (Abb. 9), kam es bei AFT und UG26 zur Rückbildung der CD34$^+$/CD38$^+$ Zell-Population. Diese Population war in der einwöchigen Expansionskultur noch deutlich nachweisbar (Abb. 7). Die einfachpositiven CD34-Zellen waren noch bei expandierten HSCs nachweisbar, welche auf AFT kultiviert wurden. Nach einer dreiwöchigen Expansion waren kaum noch CD34$^+$ Zellen auf der Linie UG26 vorhanden. Es kam aber zu einer deutlichen Expansion von CD38$^+$ Zellen, die nicht mehr für CD34$^+$ waren Weitere Analysen zeigten, das CD34$^+$, als auch CD34$^+$/CD38$^+$ Zellen auf der EL08-Nährzelllinie nachgewiesen werden konnten. Ein Vergleich von erster und dritter Kulturwoche ergab, dass die Expansionskultur am effizientesten auf der EL08-Nährzelllinie durchgeführt werden konnte. Es war aber ersichtlich, dass das CD34 Oberflächenprotein in der dritten Kulturwoche zurück ging und mehr Zellen CD34$^-$/CD38$^+$ waren

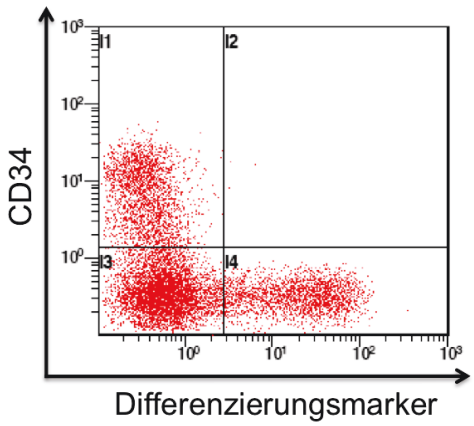


Abb. 10: Nach einer dreiwöchigen Expansion von HSCs auf EL08 wurde die Expression von CD34 und von Differenzierungsmarkern auf den expandierten HSC nachgewiesen. Es kam zu keiner Coexpression von Differenzierungsmarkern und CD34.

Weiter wurde bestimmt, ob HSCs, die für drei Wochen auf EL08 kultiviert wurden Differenzierungsmarker exprimierten. Wie aus Abb. 10 hervorgeht, waren in der Kultur differenzierungsmarkerpositive Zellen nachweisbar. Es kam aber nicht zu einer gemeinsamen Expression von Differenzerungsmarkern und CD34 auf der Zelloberfläche (Abb.10).
Durch das hier vorgestellte Verfahren war man nun in der Lage, auch kleine Nabelschnurblute, die nur sehr wenige Stammzellen aufwiesen, für eine NK-Generierung zu verwenden.

3.1.1 Einfluss einer sauerstoffarmen Umgebung auf das Expansionsverhalten von HSCs

Da in der Knochenmarknische ein sauerstoffarmes Milieu vorliegt, liegt die Frage nahe, ob es möglicherweise durch die Reduktion der Sauerstoffkonzentration zu einer verbesserten Expansion der HSCs kommt. Dies wurde im folgenden überprüft.

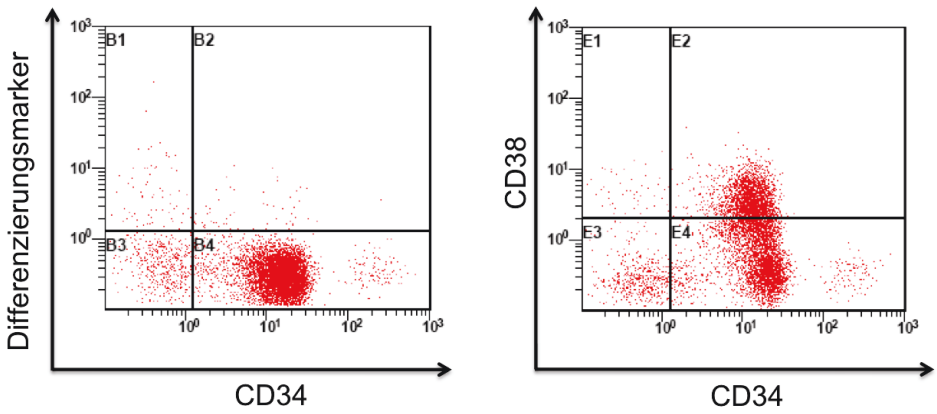


Abb. 11: Zu Beginn einer Expansionskultur wurden HSCs aus einem Nabelschnurblut isoliert und die Reinheit der Kultur bezüglich Kontamination der Probe mit differenzierungsmarkerpositiven Zellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Auch die Verteilung der Oberflächenmarker CD34 und CD38 wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

Zu Beginn der Kultivierung wurde ermittelt, ob die verwendeten Zellen frei von Differenzierungsmarker waren (Abb. 11). Diese Zellen wurden anschließend mit einem zytokinarmen Medium behandelt.

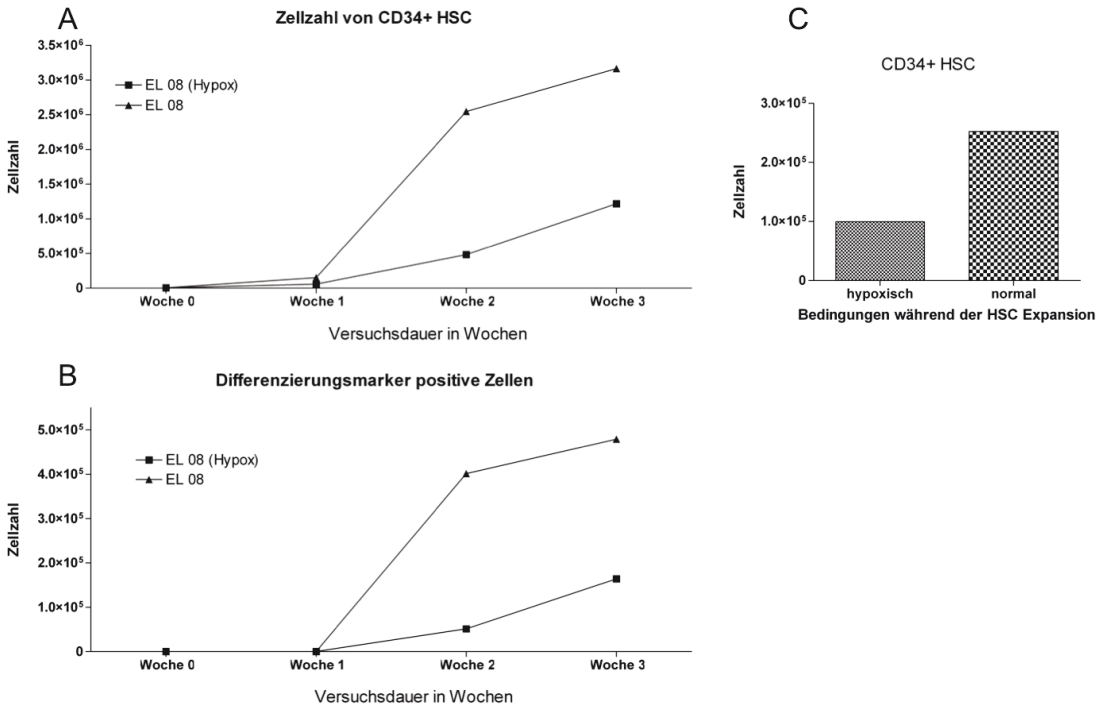


Abb. 12: Der Einfluss einer reduzierten Sauerstoffmenge auf die Expansion von HSC wurde bestimmt. Dazu wurden HSC aus dem Nabelschnurblut unter normalen Kulturbedingungen oder unter hypoxischen Bedingungen auf der Nährzelllinie EL08 expandiert. In (**A**) ist dargestellt, wie sich die Zellzahl an $CD34^+$ HSCs im Verlauf der dreiwöchigen Expansion unter normalen oder hypoxischen Bedingungen veränderte. In Abbildung (**B**) ist die Zellzahl von differenzierungsmarkerpositiven Zellen unter den beiden bewährten Bedingungen dargestellt. Abbildung (**C**) zeigt die Zahl an einfach $CD34^+$ HSC nach einer dreiwöchigen Expansion unter hypoxischen oder normalen Kulturbedingungen.

Das Ergebnis dieser sauerstoffabhängigen Untersuchung erbrachte, dass es durch die Kultivierung der HSCs unter hypoxischen Bedingungen zu einer deutlich reduzierten Zellproliferation im Vergleich zu den Zellen, die unter nicht hypoxischen Bedingungen expandiert wurden, kam (Abb.12 A, Abb.12 C). Eine weiterer Auswirkung der sauerstoffarmen Umgebung war, dass auch für differenzierungsmarkerpositive Zellen langsamer proliferierten (Abb. 12B).

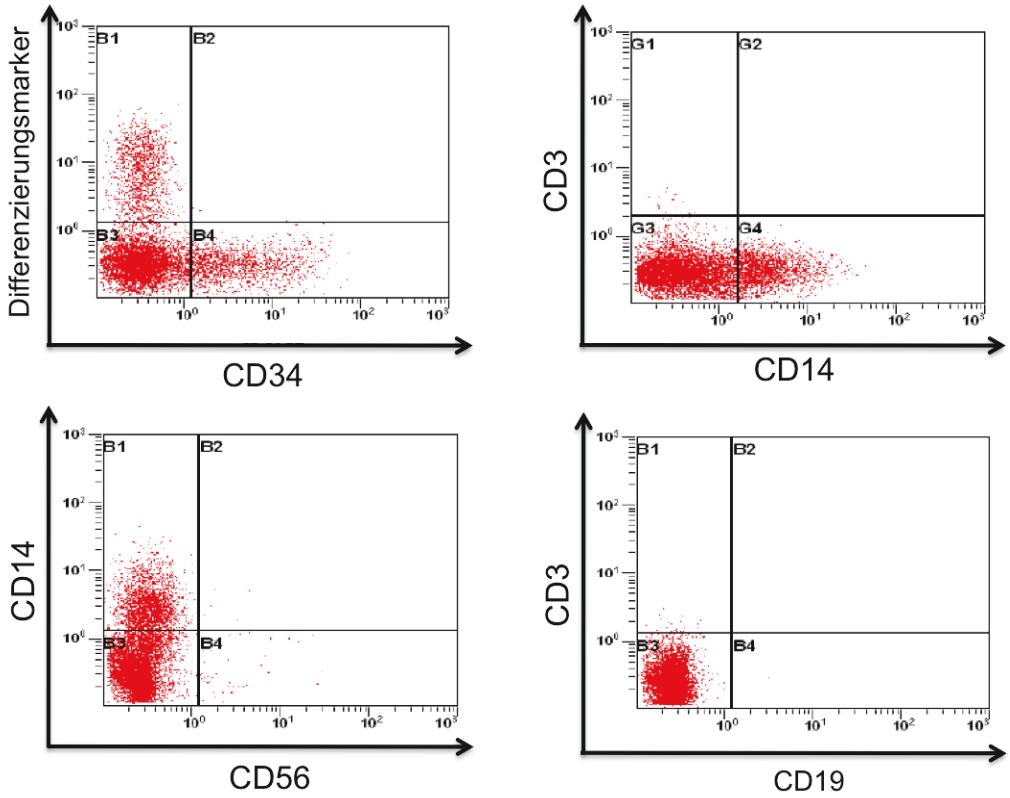


Abb. 13: Nach dreiwöchiger Expansion von HSCs auf Nährzellen konnten differenzierungsmarkerpositive Zellen in der Kultur nachgewiesen werden (siehe Abb. 9). Um herauszufinden, welche Differenzierungsmarker von diesen Zellen exprimiert wurden, wurden die Oberflächenexpression von CD3, CD14, CD19 und CD56 durchflusszytometrisch nachgewiesen. Das dargestellte Analyseergebniss ist exemplarisch für drei unternommene Untersuchungen.

Eine genauere Analyse der differenzierungsmarkerpositiven Zellen (Abb. 13) ergab, dass die sich entwickelnden Zellen für viele Differenzierungsmarker negativ waren. Es konnten weder CD19 (B-Zellen), CD3 (T-Zellen) noch CD56 (NK-Zellen) nachgewiesen werden. Die Zellen, welche für den Differenzierungsmarkercocktail positiv waren, waren $CD14^{+}$.

3.2 Etablierung eines murinen *in vitro* NK-Zelldifferenzierungssystems

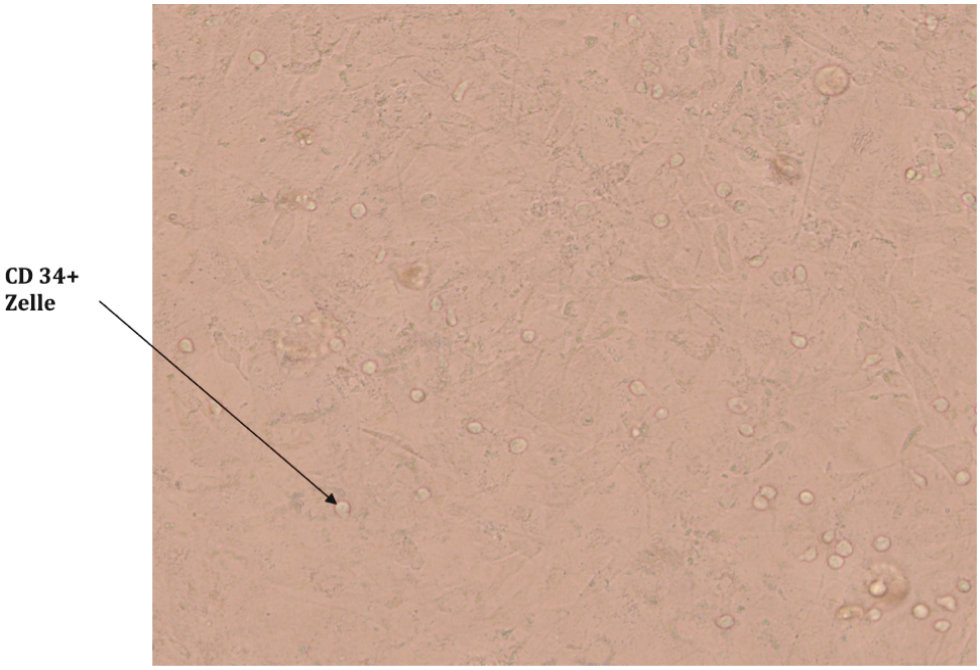


Abb. 14: Lichtmikroskopische Hellfeldaufnahme von aufgereinigten HSCs vier Stunden nach dem Beginn einer NK-Generierung. Die HSCs sind als runde Zellen zu erkennen (Pfeil) auf der konfluent gewachsenen Nährzelllinie EL08.

In dieser Arbeit wurde ein NK-Differenzierungssystem etabliert, mit dem humane HSCs auf murinen Nährzelllinien zu NK-Zellen differenziert wurden. So wurden unter Verwendung von drei murinen Nährzelllinien Blutstammzellen zu NK-Zellen differenziert. In Abb. 14 ist eine lichtmikroskopische Aufnahme zu sehen in der HSCs auf der Zelllinie EL08 ausplattiert wurden.

AFT war für eine lange Zeit die Standardnährzelllinie (Miller *et al*., 1999), wurde aber von EL08 abgelöst (McCullar et al., 2008). Es wurde untersucht, ob die murine Linie UG26 möglicherweise HSCs besser zu NK-Zellen differenzieren konnte als AFT oder EL08

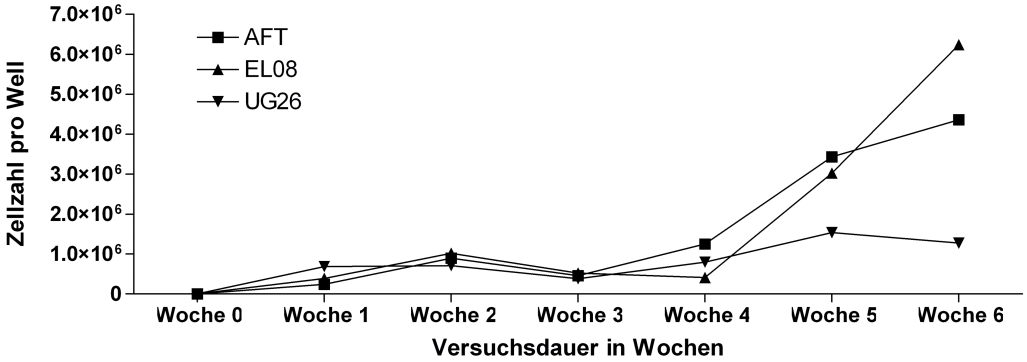


Abb. 15: Veränderung der Zellzahl im Verlauf einer *in vitro* NK-Zellgenerierung auf drei unterschiedlichen murinen Nährzelllinien (AFT, EL08 oder UG26) über den Verlauf von sechs Wochen. Zu Beginn des Versuches wurden HSCs aus dem Nabelschnurblut isoliert und auf den murinen Nährzelllinien wurde eine NK-Zellgenerierung durchgeführt. Wöchentlich wurde die Zellzahl bestimmt. Dargestellt ist ein exemplarisches Experiment.

Ein wichtiger und auch kritischer Aspekt war hierbei die Expression von KIR auf der Zelloberfläche der NK-Zellen.

Dazu wurde die Zellzahl im Verlauf einer NK-Entwicklungskultur auf den drei murinen Nährzelllinien verfolgt. Die meisten NK-Zellen konnten auf EL08, gefolgt von AFT nachgewiesen werden. UG26 dagegen unterstützte die NK-Zellgenerierung nur in sehr geringer Weise (Abb. 15).

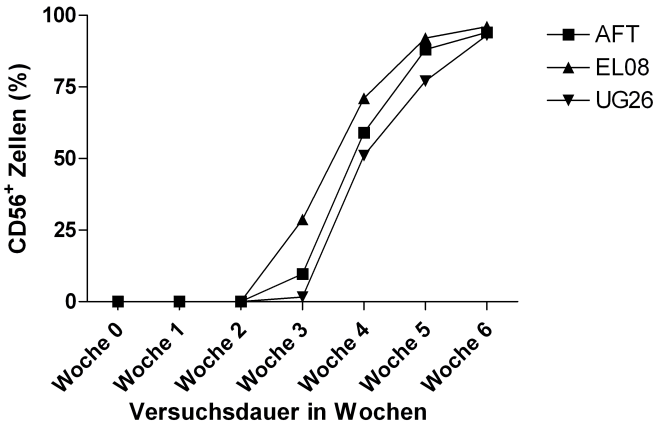


Abb. 16: Durchflusszytometrischer Nachweis der CD56-Expression im Verlauf einer NK-Zellgenerierung, die auf den murinen Nährzellen AFT, EL08 oder UG26 durchgeführt wurden. Dazu wurden HSC aus dem Nabelschnurblut isoliert und die NK-Generierung fand auf den drei zuvor genannten Nährzelllinien statt. Die Expression des Oberflächenantigens CD56 wurde sechs Wochen lang durchflusszytometrisch verfolgt. Die Messung der Oberflächenexpression erfolgte einmal pro Woche. Dargestellt ist ein exemplarisches Experiment von drei durchgeführten Experimenten.

Im Verlauf der dritten Kulturwoche einer NK-Zellgenerierung stieg der CD56-Marker unter allen Kulturbedingungen an und die Zahl an $CD56^+$ Zellen nahm zu. Zellen, die auf EL08

generiert wurden, akquirieren CD56 schneller, als Zellen, die auf AFT oder UG26 ausdifferenziert wurden. Hieraus resultierte, dass die Differenzierung der NK-Zellen schneller auf EL08 ablief, als auf den übrigen Linien. Am Schlechtesten verlief die NK-Zellentwicklung auf UG26. In der sechsten Woche einer NK-Zellentwicklungskultur sind unter den gewählten Kulturbedingungen nur noch $CD56^+$ NK-Zellen in den Kulturen nachweisbar, unabhängig von der verwendeten Nährzelllinie.

Auch bei der prozentualen Betrachtung der CD56-Expression kann man im unterschiedlichen Kurvenanstieg, der verschiedenen Linien deutlich die Geschwindigkeits- und Effizienzunterschiede zwischen den murinen Nährzelllinien erkennen (Abb. 16).

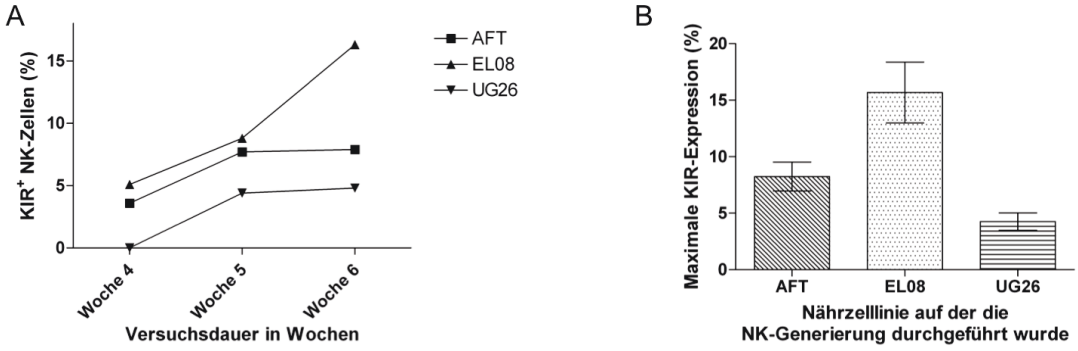


Abb. 17: NK-Zellen wurden in einem NK-Differenzierungssystem aus HSCs generiert. Es wird untersucht wie gut die drei murinen Nährzelllinien AFT, EL08 oder UG26 die *in vitro* Generierung von KIR^+ NK-Zellen ermöglichen. Dazu wurde die KIR-Oberflächenexpression im Verlauf einer NK-Generierung in den Wochen 4-6 durchflusszytometrisch verfolgt (**A**). Weiter wurde auch die maximale KIR-Expression der NK-Zellen unter den gewählten Kulturbedingungen ermittelt (**B**) Für B wurde aus drei Experimenten die Standardabweichung und der Mittelwert berechnet.

Abschließend ist zu diesem Versuch zu sagen, dass alle Nährzellen $CD56^+$ NK-Zellen hervorbringen konnten. Für diese Arbeit ist es jedoch wichtig NK-Zellen zu erzeugen, die KIR exprimieren. Alle drei vorhandenen Nährzelllinien wurden weiter daraufhin untersucht, ob und wie stark sie in der Lage waren, die Entwicklung von KIR^+ NK-Zellen zu ermöglichen. In den UG26-Kulturen war nur eine geringe KIR-Expression nachweisbar. Mehr KIR-exprimierende NK-Zellen wurden erzeugt, indem die NK-Generierung auf AFT durchgeführt wurde. NK-Zellen, die auf der EL08 Nährzelllinie erzeugt wurden, wiesen im Vergleich mit NK-Zellen, die auf AFT oder UG26 erzeugt wurden, die stärkste KIR-Expression auf (Abb. 17).

Wenn HSCs zu NK-Zellen ausdifferenziert wurden, kam es zur stärksten KIR-Expression im Verlauf einer NK-Zellgenerierung auf den EL08-Nährzellen. Momentan stellt sie die beste murine Nährzelllinie dar, um KIR^+ NK-Zellen aus HSCs zu differenzieren.

3.2.1 Einfluss von humanen Nährzellen auf die *in vitro* NK-Zelldifferenzierung

Die Entwicklung von NK-Zellen aus humanen HSCs mit murinen Nährzellen konnte erfolgreich etabliert werden, aber für die weitere Arbeit und putativen Applikationen am Menschen war es notwendig HSCs in einem geschlossenen humanen System zu NK-Zellen auszudifferenzieren. Hierzu wurden NK-Differenzierungsexperimente mit unterschiedlichen humanen Nährzellen durchgeführt, mit denen man in die Lage versetzt wurde, humane HSCs auf humanen Nährzelllinien zu NK-Zellen zu differenzieren. Nicht alle Moleküle wie z.B. HLA wurden von den murinen Zellen exprimiert und mit einem humanen Entwicklungssystem wäre man auch in der Lage, deren Einfluss genauer zu untersuchen.
Als Nährzellen wurden unterschiedliche Linien von pädiatrischen mesenchymalen Stammzellen (MSCs), *Unrestricted Somatic Stem Cell* (USSC) oder humane Fibroblaste (STF5) verwendet.
Eine NK-Zellgenerierung auf humanen Fibroblasten (STF5) war nicht möglich, da auf diesen Nährzellen die NK-Vorläuferzellen während der ersten zwei Wochen abstarben und es somit nicht zu einer Bildung von NK-Zellen kam (Abb. 16).

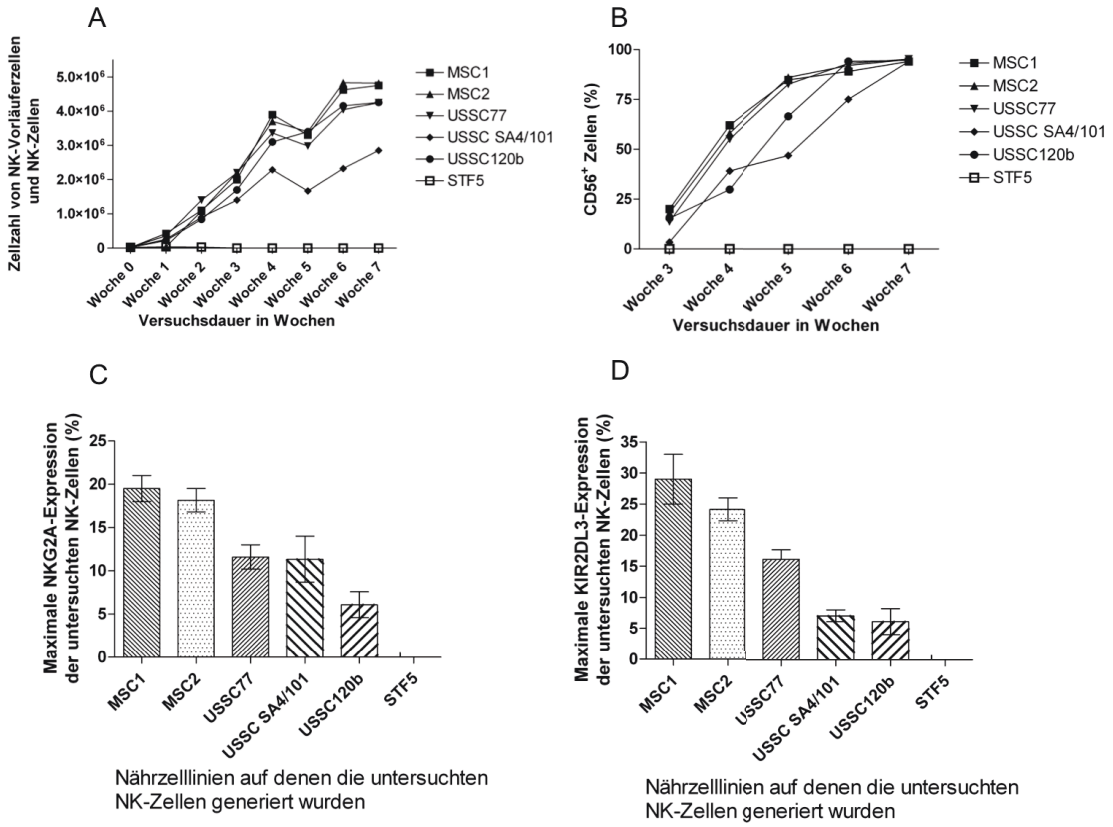


Abb. 18: Etablierung eines humanen NK-Zellentwicklungssystems bei dem MSC, USSC oder Fibroblasten (STF5) als Nährzelllinien verwendet wurden. Dazu wurden HSCs aus dem Nabelschnurblut isoliert und auf den unterschiedlichen Nährzelllinien zu NK-Zellen differenziert. (**A**) Im Verlauf einer NK-Zellgenerierung wurde über den Zeitraum von sechs Wochen die Zellzahl der expandierten NK-Vorläuferzellen und NK-Zellen beobachtet. Angegeben wurde die Nährzelllinie auf der die NK-Zellgenerierung stattgefunden hat. In (**B**) wurde die CD56-Oberflächenexpression der sich entwickelnden NK-Zellen über sechs Wochen verfolgt. Die Nährzelllinie, welche für die NK-Zelldifferenzierung verwendet wurde, ist aufgeführt. Weiter wurde die maximale NKG2A-Expression (**C**) und die maximale KIR-Expression (**D**) im Verlauf des Versuchs durchflusszytometrisch ermittelt und graphisch dargestellt. Die Nährzelllinie, welche für die NK-Zelldifferenzierung verwendet wurde, ist aufgeführt. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. Für C+D wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Die verbliebenen humanen Nährzelllinien waren alle in der Lage NK-Zellen aus HSCs zu differenzieren (Abb.18A).

Wenn man nun den Verlauf der CD56-Expression auf den NK-Zellen, während einer NK-Zellentwicklung verfolgt, fällt auf, dass die fünf verwendeten Nährzelllinien einen Einfluss auf die Akquirierung von CD56 hatten (Abb.18B).

Bei USSC77 kam es zu einer schnelleren Akquirierung von $CD56^+$ Zellen, als bei der USSC SA4/100 und der USSC120b. Nach einer siebenwöchigen Generierung konnte bei beinahe allen NK-Zellen, die auf den drei USSC-Nährzelllinien differenziert wurden, eine vergleichbare CD56-Expression nachgewiesen werden.

Weiter ergaben sich Unterschiede bei der Anzahl der *in vitro* erzeugten NK-Zellen. Die stärkste Proliferation der ausplattierten Zellen konnte auf der USSC77 und USSC120b nachgewiesen werden, wohingegen auf USSC SA4/101 deutlich schwächer proliferieren. Die Expression von NKG2A war auf den untersuchten NK-Zellen, die auf den USSC-Linien USSC77 und USSC SA/101 generiert wurden, vergleichbar. NK-Zellen, die auf der USSC 120b generiert wurden, wiesen eine schwächere NKG2A-Expression auf. Unterschiede sind auch bei der KIR-Expression nachweisbar. NK-Zellen, die auf der USSC77 erzeugt wurden, wiesen die stärkste KIR-Expression auf. Die KIR2DL3-Expression war um die Hälfte reduziert, wenn für eine NK-Zellgenerierung die USSC SA4/100 oder USSC120b, als Nährzelle, verwendet wurden (Abb. 18).

Neben den USSCs waren auch weitere humane Nährzellen in der Lage, eine NK-Zellentwicklung zu unterstützten. Hierbei handelte es sich um pädiatrische MSCs. Wenn eine NK-Zellgenerierung auf den MSC-Nährzellen durchgeführt wurde, konnten die Blutstammzellen auch zu $CD56^+$ NK-Zellen differenziert werden. Die Proliferation der Zellen im Verlauf einer NK-Zellentwicklung war auf allen untersuchten MSCs sehr ähnlich. Die beiden MSC-Nährzelllinien unterstützten vergleichbar gut die Induktion von NKG2A und KIR im Verlauf einer NK-Zellentwicklungskultur (Abb. 18).

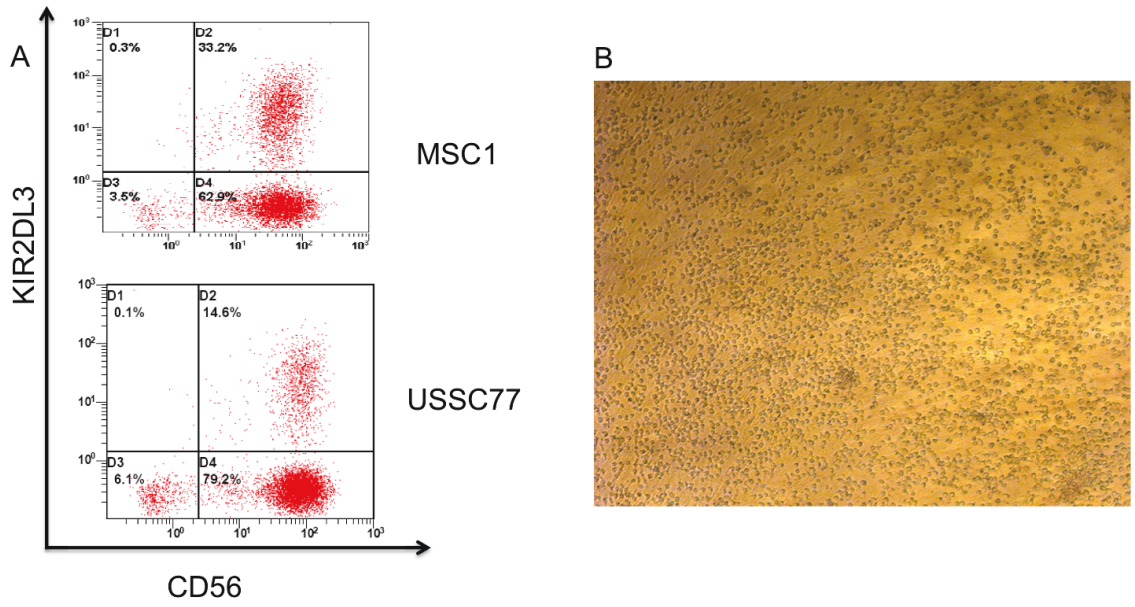


Abb.19: Ein NK-Differenzierungsversuch wurde auf den humanen Nährzellinien MSC1 oder USSC77 durchgeführt. Als Quelle für HSC diente Nabelschnurblut. Die KIR2DL3-Expression der generierten NK-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt (**A**). In (**B**) ist eine lichtmikroskopische Hellfeldaufnahme einer NK-Generierungskultur zu sehen, die in der vierten Kulturwoche auf MSC-Nährzellen aufgenommen wurde. Es ist zu sehen, dass die Nährzellen sich nicht vom Wellboden abgelöst hatten.

Nun stellte sich die Frage, welche der humanen Nährzellen die NK-Zellentwicklung besser unterstützte.

Zunächst verlief die NK-Zellgenerierung auf MSC-Nährzellen im Vergleich zu den USSC-Nährzellen stabiler und führte zu höheren Werten an $NKG2A^+$ und auch KIR^+ NK-Zellen. Auch konnten mehr $CD56^+$ NK-Zellen in der vierten Kulturwoche auf MSC-Nährzellen im Vergleich zu den USSC-Nährzellen (USSC120b und USSC SA4/101) nachgewiesen werden. Die Zellzahl, die im Verlauf einer NK-Zellgenerierung erreicht wurde, war auf MSCs höher als auf USSCs (Abb. 18). Bei einem Vergleich der stärksten KIR-Expression von auf USSC77 und MSC1 generierten NK-Zellen, erkennt man sehr deutliche Unterschiede (Abb. 18, Abb. 19). 33% der NK-Zellen, die auf MSCs generiert wurden, exprimieren KIR. Dagegen konnte nur eine 15%ige Oberflächenexpression von KIR nachgewiesen werden, wenn die NK-Zellgenerierung auf USSC77 durchgeführt wurde.

Auch kam es bei den verwendeten MSCs nicht zu einer so deutlichen Variabilität hinsichtlich der Zellzahl und Kir-Expression zwischen den verwenden Linien, wie sie bei den USSCs feststellbar war. Ein weiterer Vorteil der MSC-Nährzellen war, dass sie während der gesamten Generierung im Well nachweisbar waren. Zudem lösten sie sich nicht, wie USSC, während der NK-Generierung vom Wellboden ab.

3.2.2 MSC-Nährzellen induzieren eine stärkere KIR-Expression auf *in vitro* generierten NK-Zellen als EL08

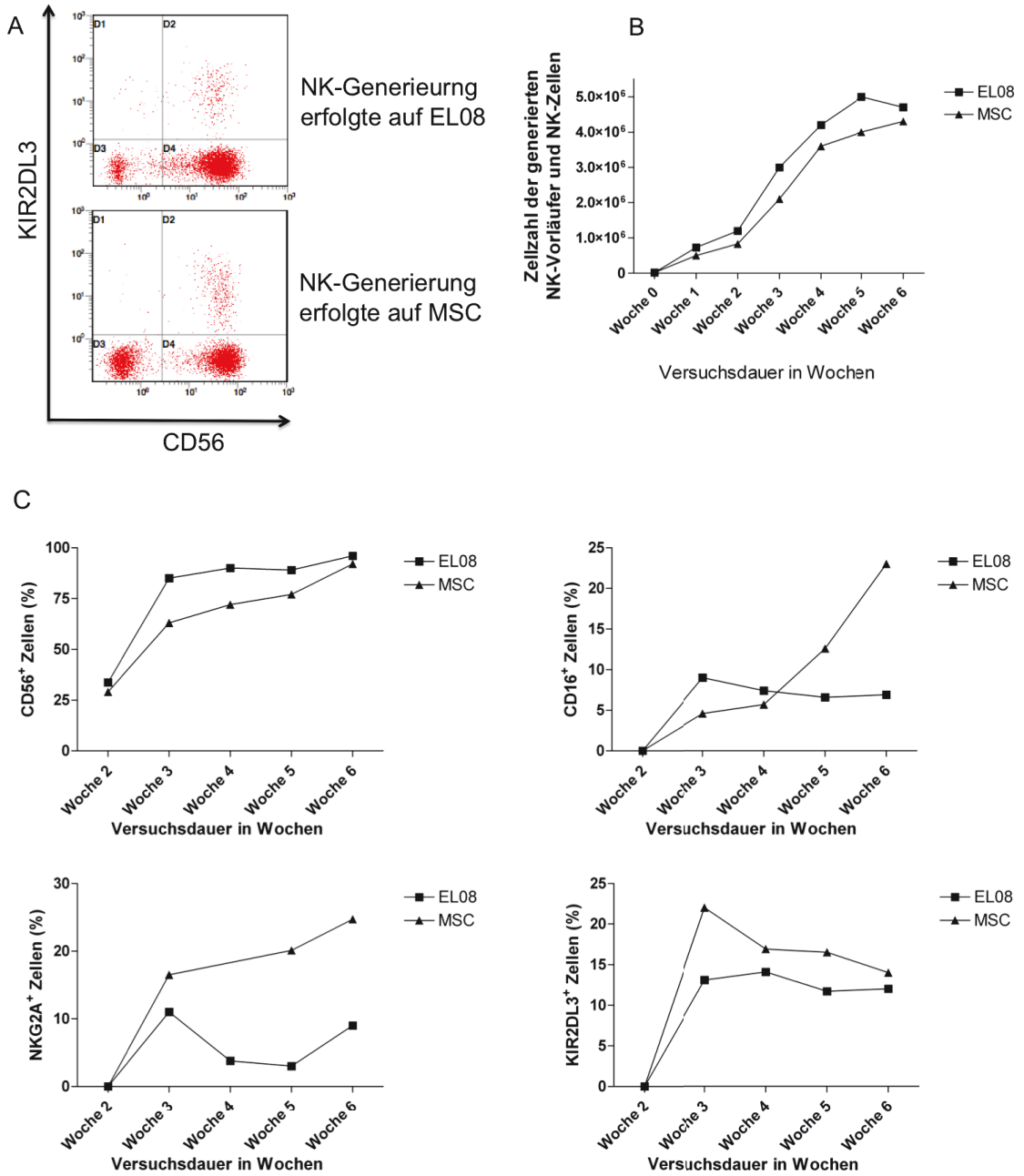


Abb.20: HSCs wurden auf der murinen Nährzelllinie EL08 oder der humanen Nährzelllinie MSC zu NK-Zellen differenziert. Es wurde untersucht, wie gut die beiden verwendeten Nährzelllinien HSCs zu KIR-positive NK-Zellen differenzieren konnten. In (**A**) wurde die maximale KIR2DL3-Expression der *in vitro* generierten NK-Zellen auf den beiden Nährzelllinien gezeigt. In (**B**) wurde die Zellzahl der NK-Zellen in Abhängigkeit der verwendeten Nährzelllinie über den Zeitraum von sechs Wochen verfolgt. In (**C**) wurde die Expression charakteristischer NK-Zellmarker im Verlauf der NK-Zellentwicklung auf den verwendeten Nährzelllinien durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist ein exemplarisches Experiment von drei.

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die humanen MSC-Nährzellen für eine bessere NK-Zellgenerierung sorgten, als ein Hybridsystem, welches aus murinen Nährzellen (EL08) und humanen HSCs bestand.

Zunächst wurde die Zellzahl verglichen, die auf MSC- und EL08-Nährzellen von den HSCs während der NK-Generierung, hervorgebracht wurde. Hierbei ist eine leicht höhere Zellzahl bei den Zellen, die auf den murinen EL08-Zellen kultiviert wurden, nachweisbar. Sie ist aber nicht deutlich höher ausgeprägt als bei HSCs, die zu NK-Zellen auf pädiatrischen MSC-Nährzellen ausdifferenziert wurden.

Auch die CD56-Expression wurde über die Zeit verglichen. Der erste Nachweis von $CD56^+$ NK-Zellen gelang in beiden Kulturen im Verlauf der zweiten Woche einer NK-Zellgenerierung. Die Anzahl an $CD56^+$ NK-Zellen war in Kulturen, bei denen EL08 als Nährzelle verwendet wurde, höher als bei Kulturen, die auf MSCs als Nährzelle durchgeführt wurden. Jedoch war der prozentuale Anteil an $CD56^+$ NK-Zellen in beiden Systemen in der sechsten Kulturwoche auf einem vergleichbaren Niveau.

Die Expression des Oberflächenmoleküls NKG2A verlief bei den beiden untersuchten NK-Zellgenerierungssystemen unterschiedlich. Zellen, die auf EL08 kultiviert wurden, wiesen eine maximale NKG2A-Expression von 10% auf, die nach dreiwöchiger Kultivierung erreicht wurde. Danach kam es zu einem Rückgang der NKG2A-Expression. In der NK-Zellgenerierungskultur, bei der MSCs als Nährzellen verwendet wurden, kam es zu einem permanenten Anstieg der NKG2A-Expression. Der höchste gemessene Wert lag bei 25% und war somit mehr als doppelt so hoch wie bei NK-Zellen, die auf EL08 generiert wurden. Die Messung erfolgte in der sechsten Kulturwoche.

Eine vergleichbare Beobachtung konnte auch für die Expression des Oberflächenmoleküls CD16 auf den NK-Zellen gemacht werden. Hier fand in der MSC-Kultur, wie schon zuvor bei NKG2A, ein permanenter Anstieg statt, wohingegen die CD16-Expression in der EL08-Kultur, ab der dritten Woche, stabil auf einem niedrigeren Niveau verharrte. Die maximale CD16-Expression lag bei NK-Zellen, die auf MSC differenzier wurden, bei 23% und bei nur 10%, wenn sie auf EL08 differenziert wurden.

Ebenfalls konnte durch die Verwendung von MSC, als Nährzelle, NK-Zellen erzeugt werden, bei denen es zu einem Anstieg an KIR^+ NK-Zellen kam. Unter diesen Kulturbedingungen waren fast 25% der NK-Zellen KIR^+. Wurden hingegen in einer NK-Zellgenerierung EL08 als Nährzelle verwendet, bildeten sich aus ein und derselben HSC-Population 10% weniger KIR^+ NK-Zellen aus, als bei Verwendung von MSC-Nährzellen (Abb.20).

3.2.2.1 Nachweis der Funktionalität der *in vitro* generierte NK-Zellen

In weiteren Experimenten sollte nachgewiesen werden, dass *in vitro* generierte NK-Zellen in der Lage waren, leukämische Zielzellen abzutöten. Weiter wurde untersucht, ob es zu Unterschieden in der NK-Zellfunktionalität kam, wenn humane Nährzellen für eine NK-Generierung verwendet wurden, statt murine.

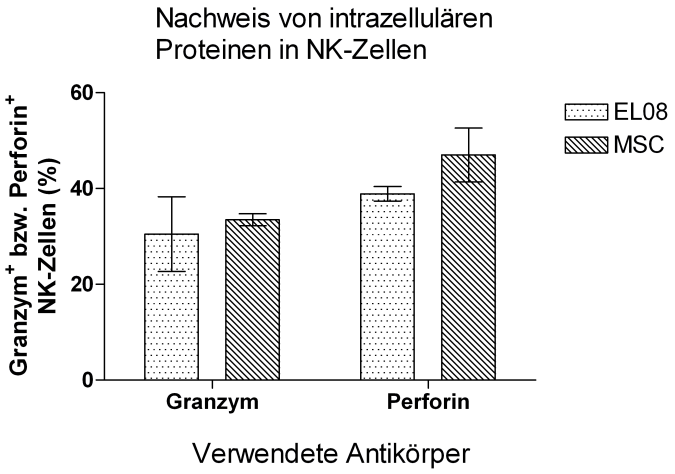


Abb.21: Zunächst wurden HSCs auf den Nährzelllinien EL08 oder MSC zu NK-Zellen differenziert. In der sechsten Kulturwoche wurde durchflusszytometrisch bestimmt, wie viele NK-Zellen für Granzym+ oder Perforin+ waren. Die Ergebnisse beruhen auf 6 durchgeführten Experimenten. Es wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Zunächst wurde bestimmt, ob die erzeugten NK-Zellen in der Lage waren, Granzym und Perforin zu bilden, was für ihre grundlegende Funktion, Zielzellen abzutöten notwendig war. Ein Teil der NK-Zellen, die auf den murinen oder humanen Nährzellen erzeugt wurden, exprimierten Granzym und Perforin (Abb. 21). Ein Unterschied zwischen humanem und murinem System war nicht erkennbar.

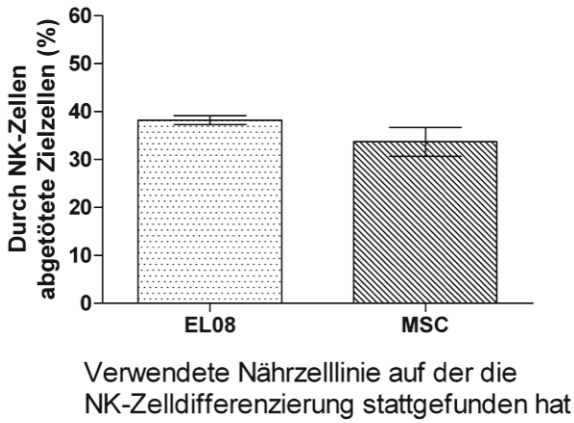


Abb. 22: Um nachzuweisen, dass die *in vitro* generierten NK-Zellen funktional waren und die Fähigkeit aufwiesen Zielzellen abzutöten, wurde ein sogenannter *killing assay* durchgeführt. Dazu wurden NK-Zellen, welche *in vitro* auf MSC- oder EL08-Nährzelllinien aus Nabelschnurblut-HSC differenziert wurden, zu der Leukämielinie K562 gegeben. Die K562-Zellen dienten den NK-Zellen als Zielzellen und wurden von den NK-Zellen abgetötet. Es wurde durchflusszytometrisch ermittelt wie groß der prozentuale Anteil an Zielzellen war, die von den NK-Zellen, abgetötet wurden. Die Ergebnisse beruhen auf 6 durchgeführten Experimenten. Es wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Die Fähigkeit Zielzellen abzutöten wurde anhand eines Leukämiemodells getestet, indem die generierten NK-Zellen mit ihren Zielzellen in Kontakt gebracht wurden. Wie aus Abb. 22 hervorgeht, wurden von den *in vitro* generierten NK-Zellen ca. 40% der Zielzellen abgetötet. Damit wurde gezeigt, dass die generierten NK-Zellen Zielzellen erfolgreich abtöteten konnten und somit funktional waren. NK-Zellen aus beiden Generierungsmodellen, töteten Leukämiezellen in vergleichbarem Maße ab.

Es konnte kein Unterschied zwischen NK-Zellen, welche auf murinen oder humanen Nährzellen generiert wurden, nachgewiesen werden. Jedoch verlief die NK-Generierung auf humanen Nährzellen stabiler, als auf den murinen Nährzellen. Weiter führte eine NK-Generierung auf den humanen Nährzellen zur Bildung von mehr KIR^+ NK-Zellen. Die humanen Nährzellen verblieben bis zum Schluss der NK-Zellgenerierung im Well und lösten sich nicht wie EL08 im Verlauf der NK-Zellgenerierung vom Wellboden ab. Diese eindeutigen Ergebnisse führten zu dem Entschluss die weiteren NK-Generierung aus Nabelschnurblut-HSCs auf MSC-Nährzellen durchzuführen.

3.2.3 Einfluss der Stammzellquelle auf das NK-Entwicklungssystem

In einem weiteren Experiment sollte geklärt werden, ob es möglich war auch HSCs aus GCSF-mobilisiertem Blut zu NK-Zellen auszudifferenzieren. Zunächst wurden

GCSF-mobilisierte HSCs auf AFT, EL08 und UG26 ausplattiert, und es wurde versucht eine NK-Zellgenerierung durchzuführen.

Nur auf EL08 konnten KIR$^+$ NK-Zellen erzeugt werden. Auf den anderen murinen Linien konnte keine NK-Zellgenerierung durchgeführt werden, die zu KIR$^+$ NK-Zellen führte (Abb. 23). Im Vergleich mit einer NK-Generierungskultur mit HSCs aus dem Nabelschnurblut kam es bei Verwendung von HSCs aus GCSF-mobilisiertem Blut zu einer verminderten Proliferationsrate und weniger KIR$^+$ NK-Zellen.

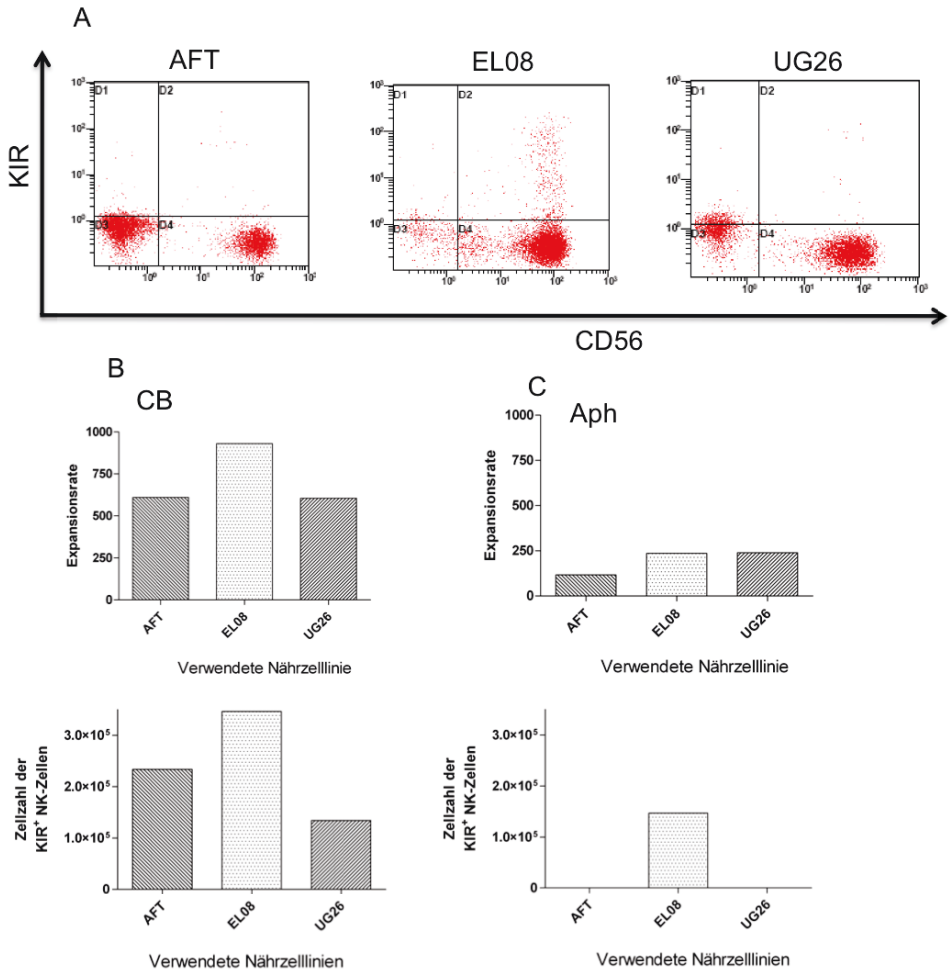


Abb. 23: Neben dem Nabelschnurblut wurde noch eine weitere Quelle für HSCs in dieser Arbeit verwendet. Aus GCSF-mobilisiertem Blut wurden HSCs isoliert und auf den murinen Nährzelllinien AFT, EL08 oder UG26 zu NK-Zellen ausdifferenziert. Die HSCs waren in der Lage zu CD56$^+$ NK-Zellen zu differenzieren. Nach sechs Wochen konnte nur auf der Nährzelllinie EL08 KIR$^+$ NK-Zellen nachgewiesen werden (**A**). In (**B**) wird dargestellt, wie hoch die Expansionsrate von HSC aus dem Nabelschnurblut war, wenn sie auf den Nährzelllinien AFT, EL08 oder UG26 kultiviert wurden. Auch die Zahl an KIR$^+$ NK-Zellen, die auf den unterschiedlichen Nährzelllinien hervorgebracht werden konnten, wurde ermittelt. In (**C**) wurden HSCs aus GCSF-mobilisiertem Blut isoliert und zu NK-Zellen differenziert. Die Expansionsrate und Zellzahl KIR$^+$ NK-Zellen, welche auf den unterschiedlichen Linien erreicht wurde, wurde ermittelt. Die Ergebnisse beruhen auf 3 durchgeführten Experimenten. Da die Generierung von NK-Zellen sehr labil war, wurde auf eine Angabe der Standardabweichung verzichtet.

Anschließend wurden GCSF-mobilisierte HSC auf humane MSCs und murinen EL08 ausplattiert. Ziel war es, die HSCs zu KIR^{+} NK-Zellen auszudifferenzieren, um zu vergleichen, welche Nährzelllinie die NK-Zellentwicklung besser unterstützt. Aus den vorherigen Versuchen ging hervor, dass MSC-Nährzellen in der Lage waren, HSCs aus dem Nabelschnurblut zu NK-Zellen auszudifferenzieren.

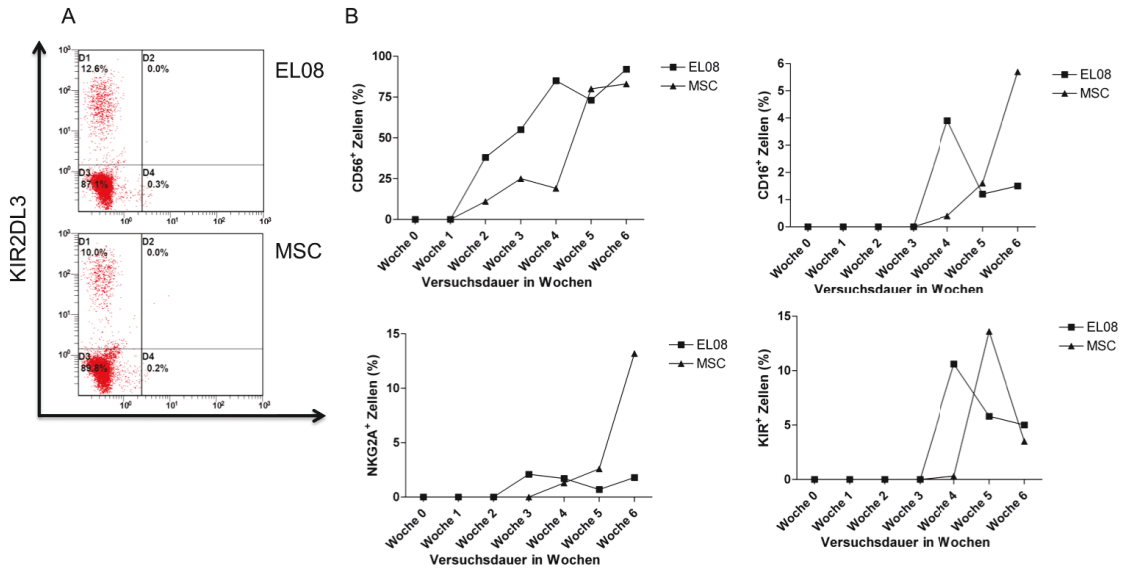


Abb. 24: Aus GCSF-mobilisiertem Blut wurden HSCs isoliert und auf der humanen Nährzelle MSC oder der murinen Nährzelllinie EL08 zu NK-Zellen differenziert. Die maximale KIR2DL3-Expression, die auf den beiden Linien von den *in vitro* generierten NK-Zellen erreicht wurde, ist in (**A**) dargestellt. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Oberflächenexpression von CD56, CD16, NKG2A oder KIR2DL3 über den Kulturzeitraum von sechs Wochen verfolgt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in (**B**) zu sehen. Dargestellt ist ein exemplarisches Experiment von 3 durchgeführten.

Wie schon beim Vergleich mit HSCs aus dem Nabelschnurblut beobachtet, kam es zu einer stärkeren Proliferation der Zellen auf EL08 als auf MSC. Der Unterschied zwischen den beiden Linien war jedoch nur sehr gering. In der zweiten Kulturwoche konnten CD56^{+} Zellen in beiden Differenzierungssystemen identifiziert werden. Mehr CD56^{+} Zellen bildeten sich, im Verlauf der zweiten Kulturwochen im EL08-Entwicklungssystem. Erst in der fünften und sechsten Woche der NK-Zellgenerierung stieg auch die Zahl an CD56-exprimierenden Zellen im MSC-Entwicklungssystem an und erreichte vergleichbare Werte, wie das EL08-Entwicklungssystem. Des Weiteren wurde NKG2A auf den NK-Zellen deutlich stärker exprimiert, welche auf MSCs erzeugt wurden. Es kam zu einer vergleichbaren KIR-Expression in beiden NK-Entwicklungssystemen.

So exprimierten 12,6% der auf MSC kultivierten NK-Zellen KIR und 10% auf EL08. Die NK-Zellgenerierung lief bei GCSF-mobilisierten HSCs in beiden Systemen vergleichbar ab,

erreichte jedoch nicht die Werte von HSCs, die aus dem Nabelschnurblut isoliert wurden (Abb. 24, Abb. 23).

3.2.3.1 Nachweis der Funktionalität von NK-Zellen, welche aus GCSF-mobilisierten HSCs differenziert wurden

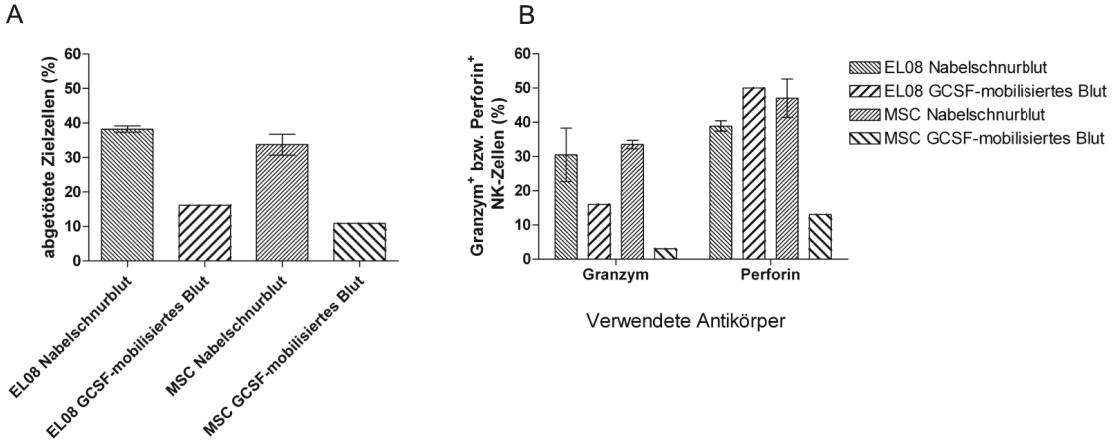


Abb. 25: Funktionsanalyse der generierten NK-Zellen. GCSF-mobilisierte HSCs wurden auf EL08- oder MSC-Nährzellen zu NK-Zellen differenziert. In (**A**) ist graphisch dargestellt, wie gut die erzeugten NK-Zellen die Leukämiezellen K562 abtöten konnten. Zum Vergleich dienten NK-Zellen, die aus HSCs aus dem Nabelschnurblut erzeugt wurden. In (**B**) ist zu sehen, wie viele Granzym- und Perforin-positive NK-Zellen aus GCSF-mobilisierten HSCs entstanden, wenn die NK-Generierung auf EL08 oder MSC-Nährzellen durchgeführt wurde. Zum Vergleich dienten NK-Zellen, die ebenfalls auf EL08 oder MSC-Nährzelllinien generiert wurden. Die HSCs des Vergleichsversuches wurden aus Nabelschnurblut isoliert. Für die Versuche mit Nabelschnurbluten wurden drei Experimente durchgeführt (Mittelwert und Standardabweichung wurde berechnet). Aufgrund der labilen NK-Generierung aus GCSF-mobilisierten HSCs konnte nur ein Experiment durchgeführt werden.

Im Anschluss an die erfolgreiche Generierung von NK-Zellen aus GCSF-mobilisierten HSCs wurde bestimmt, ob die *in vitro* entwickelten NK-Zellen funktional waren und Zielzellen abtöten konnten. Wie aus Abb. 25 hervorgeht, bildeten NK-Zellen, die aus GCSF-mobilisierten HSCs entstanden waren, weniger Granzym, als NK-Zellen, die aus Nabelschnurblut HSCs generiert wurden. Auch kam es zu einer schwachen Bildung von Perforin, wenn HSCs aus GCSF-mobilisiertem Blut auf MSC ausdifferenziert wurden. Wenn Nabelschnurblut-HSCs verwendet wurden, bildeten NK-Zellen mehr Granzym (Abb. 23). Schon hier zeichnet es sich ab, dass NK-Zellen, welche aus GCSF-mobilisiertem Blut differenziert wurden deutlich unreifer waren, als NK-Zellen, deren HSC-Quelle Nabenschnurblut war.

NK-Zellen, die aus GCSF-mobilisierten HSCs differenziert wurden, wiesen erwartungsgemäß im Vergleich zu NK-Zellen, die sich aus Nabelschnurblut HSCs entwickelt hatten, eine deutlich reduzierte Fähigkeit auf, im Leukämiemodell ihre Zielzellen abzutöten. 40% der Zielzellen wurden von *in vitro* generierten NK-Zellen abgetötet, wenn sie von HSCs aus dem

Nabelschnurblut differenziert wurden. War jedoch die Stammzellquelle GCSF-mobilisiertes Blut, töteten die differenzierten NK-Zellen nur noch 18% der Zielzellen ab. Die Fähigkeit Zielzellen abzutöten wurde halbiert (Abb.25).

3.2.4 Steigerung der KIR-Expression durch vorherige Expansion der HSCs

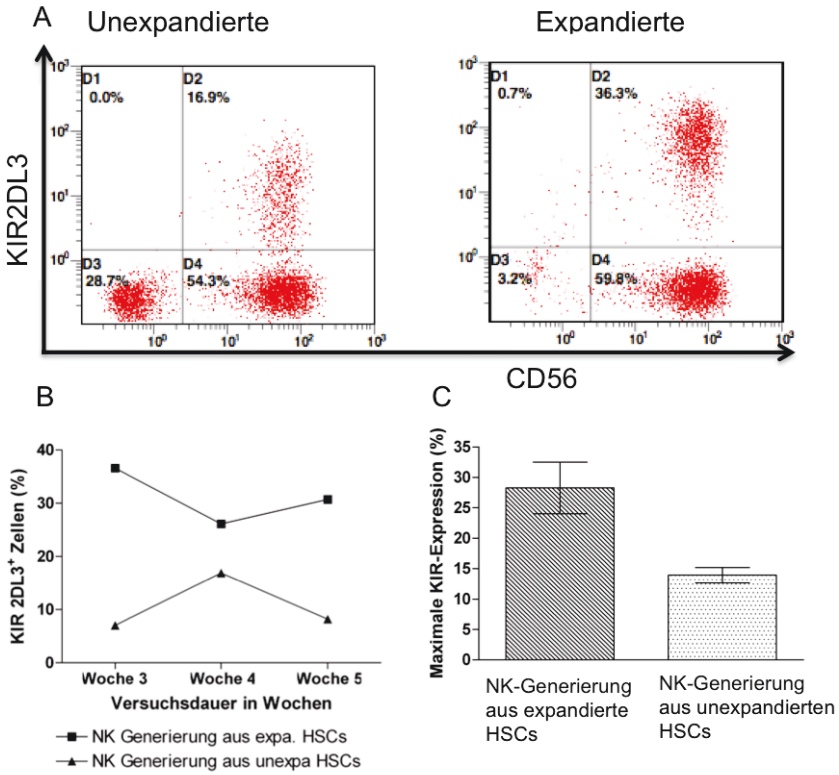


Abb.26: Zellen einer HSC-Expansionskultur wurden nach einwöchiger Expansion in eine NK-Zellgenerierung eingesetzt und anschließend zu NK-Zellen differenziert. Auch unexpandierte HSCs wurden zu NK-Zellen differenziert. Beide Ausgangspopulationen konnten erfolgreich zu KIR^+ NK-Zellen ausdifferenziert werden. In (**A**) ist die maximale KIR-Expression, die im Verlauf der NK-Zellentwicklungskulturen nachgewiesen werden konnte dargestellt. (**B**) zeigt die KIR2DL3-Expression der beiden NK-Zellentwicklungskulturen in der dritten bis fünften Kulturwoche. In (**C**) ist die maximale KIR-Expression dargestellt. Es wurden drei Entwicklungsexperimente unter den gewählten Kulturbedingungen durchgeführt. Für C sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei Exprimenten dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich ein humanes (3.2.1) und murines (3.2) NK-Zellentwicklungssystem etabliert werden. Zuvor konnte auch gezeigt werden, dass HSCs auf EL08 expandieren werden konnten (3.1). Nun stellt sich die Frage, ob die expandierten Stammzellen noch in der Lage waren zu NK-Zellen ausdifferenziert zu werden. Dazu wurden HSCs für eine Woche auf EL08 expandiert und anschließend, ebenfalls auf EL08, zu NK-Zellen ausdifferenziert. Als Kontrolle dienten HSCs, die nicht expandiert wurden. Diese

Zellen wurden sofort zu NK-Zellen differenziert. Bestimmt wurde die Zeit, ab der Zugabe des NK1-Mediums.

Nach dreiwöchiger Kultivierung der Zellen konnte unter beiden Kulturbedingungen KIR nachgewiesen werden. Unter normalen Kulturbedingungen exprimierten ca. 8% der NK-Zellen KIR. Während der Kultivierung kam es zu einer maximalen KIR-Expression von ca. 17%.

HSCs, welche zuerst expandiert und anschließend zu NK-Zellen ausdifferenziert wurden, wiesen eine deutlich stärkere KIR-Expression auf, als NK-Zellen, die sich aus unexpandierten HSCs entwickelt hatten. In der dritten Woche der NK-Generierung waren ca. 36% der erzeugten NK-Zellen für KIR^+, nachdem ihre Vorläufer expandiert wurden. In der Kontrolle waren zu diesem Zeitpunkt nur 8% der NK-Zellen positiv für KIR. Die Maximale KIR-Expression belief sich in der Kontrolle auf 17% (Abb. 26).

3.2.4.1 Nachweis der Funktionalität von *in vitro* generierter NK-Zellen aus einer HSC-Expansionskultur

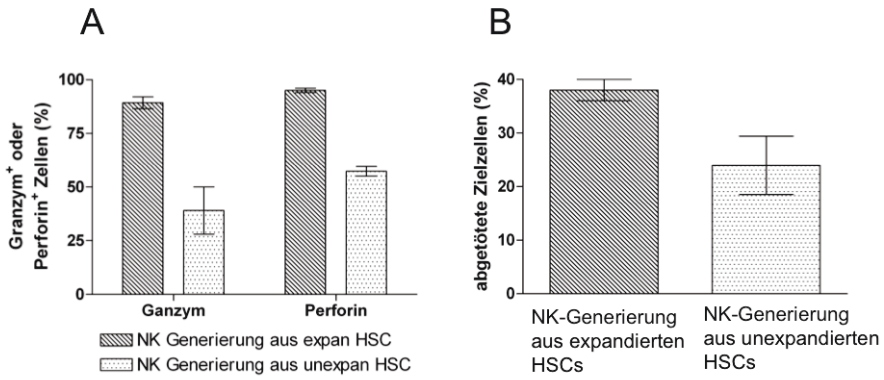


Abb. 27: In einem weiteren Experiment sollte geklärt werden, ob NK-Zellen, die aus expandierten HSC differenziert wurden, funktional waren. Dazu wurde in (**B**) der prozentuale Anteil der NK-Zellen bestimmt, die $Granzym^+$ oder $Perforin^+$ waren. Jeweils abhängig davon, ob sie aus expandierten oder nicht expandierten HSC differenziert wurden. (**A**)Weiter wurden die generierten NK-Zellen in einen *killing assay* eingesetzt um den prozentualen Anteil zu bestimmen wie gut die *in vitro* generierten NK-Zellen die Zielzellen abtöten konnten. Die Experimente wurden viermal durchgeführt und hiervon Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

Im vorangegangenen Versuch 3.2.4 wurde bereits gezeigt, dass es zu einer verstärkten Anzahl an KIR^+ NK-Zellen kam, wenn HSCs zuvor im Expansionsmedium kultiviert wurden. Nun sollte geklärt werden, ob NK-Zellen, welche aus expandierten HSCs hervorgegangen waren, mit NK-Zellen, die aus unexpandierten HSCs ausdifferenziert wurden, in ihrer Funktion vergleichbar waren. Wie aus Abb. 27 hervorgeht, wiesen die untersuchten NK-Zellen, die aus expandierten HSCs sich entwickelt hatten, im Vergleich zu den Kontrollzellen eine deutlich

erhöhte Menge an Granzym^{+} und Perforin^{+} NK-Zellen auf. Diese Unterschiede in der Granzym- und Perforinmenge schlugen sich auch in der Fähigkeit, im Leukämiemodell die leukämischen Zelllinien abzutöten nieder. Es wurden ca. 15% mehr leukämische Zellen durch die NK-Zellen abgetötet, die aus expandierten HSCs vorgegangen waren. Sie töteten fast 40% ihrer Zielzellen ab, herkömmlich generierte NK-Zellen dagegen nur 25%. NK-Zellen, die sich aus expandierten HSCs entwickelt hatten, wiesen eine gesteigerte Fähigkeit auf leukämische Zielzellen abzutöten.

3.3 CD56^{bright} NK-Zellen als Übergangsstadium der NK-Zellentwicklung

Mit dem in dieser Arbeit etabliertem NK-Zellgenerierungsmodell war man in der Lage, verschiedene Stadien der NK-Zellentwicklung zu erzeugen. Eine Subpopulation, die CD56^{bright} NK-Zellen, wurde jedoch nicht aus dem NK-Zellgenerierungsmodell entnommen, sondern wurde aus dem Nabelschnurblut isoliert.

CD56^{bright} NK-Zellen sind für KIR2DL4 positiv, weisen jedoch keine Expression von klonotypischen KIRs auf. Die Funktion der CD56^{bright} NK-Zelle ist nicht Zielzellen abzutöten, sondern Zytokine zu sezernieren. Erst die CD56^{dim} NK-Zellen können Zielzellen abtöten. Es wird vermutet das CD56^{bright} NK-Zellen Vorstufen der CD56^{dim} NK-Zellen sind (Poli et al., 2009; Caligiuri et al., 2008, Yu et al. 2013). Daher wurde in dieser Arbeit die CD56^{bright} Population genauer analysiert, um sie in Subpopulationen zu unterteilen. Möglicherweise findet in einer der definierten Subpopulationen die Akquirierung von klonotypischen KIRs statt.

3.3.1 Identifikation von klonotypischen *KIR*-Transkripten in CD56^{bright} NK-Zellen

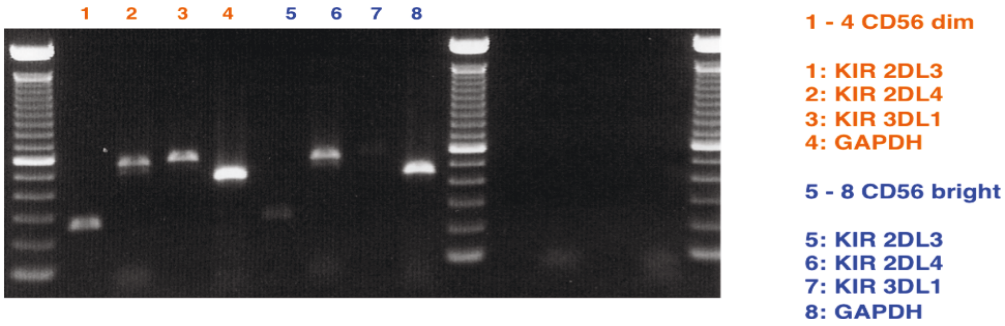


Abb. 28: Elektrophoretischer Nachweis von KIR mRNA-Transkripten in CD56^{dim} NK-Zellen oder CD56^{bright} NK-Zellen. Die untersuchten Zellen wurden aus einem Nabelschnurblut durchflusszytometrisch isoliert. In den CD56^{dim} NK-Zellen und CD56^{bright} NK-Zellen konnten mRNA-Transkripte für KIR nachgewiesen werden.

Aus dem Nabelschnurblut wurden CD56^{dim} NK-Zellen und CD56^{bright} NK-Zellen durchflusszytometrisch isoliert. Anschließend wurde die mRNA-Transkription von *KIR* in den beiden Populationen untersucht. Wie aus Abb. 28 hervorgeht, konnten sowohl in den CD56^{bright} als auch in den CD56^{dim} NK-Zellen *KIR* mRNA-Transkripte nachgewiesen werden. Es hat den Anschein, dass die Transkription von klonotypischen *KIR*s in den CD56^{bright} NK-Zellen schwächer ausgeprägt war, als in den CD56^{dim} NK-Zellen. Eine genauere Betrachtung der CD56^{bright} NK-Zellen war deswegen notwendig.

3.3.2 Identifikation einer KIR^{+} Subpopulationen von CD56^{bright} NK-Zellen

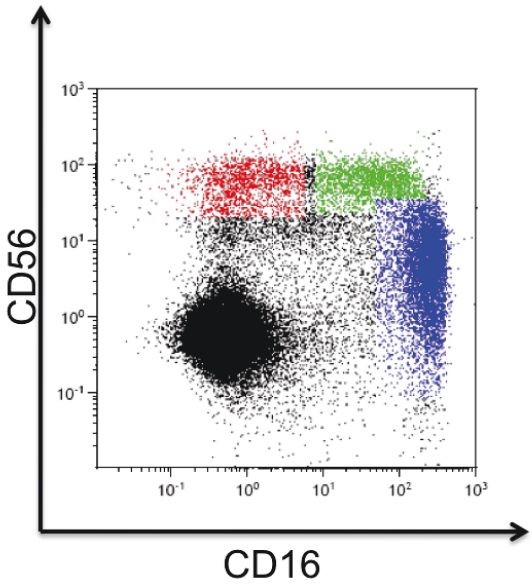


Abb. 29: NK-Zellen wurden aus dem Nabelschnurblut isoliert und die Oberflächenexpression von CD56 und CD16 wurde durchflusszytometrisch analysiert. NK-Zellen konnten in CD56^{dim} (blauer Bereich) und CD56^{bright} (roter und grüner Bereich) NK-Zellen aufgeteilt werden, die jeweils für den CD16-Rezeptor positiv (grüner Bereich) oder negativ (roter Bereich) waren. Dargestellt ist ein expemplarisches Experiment von 20.

Die CD56^{bright} Population konnte in zwei Unterpopulationen unterteilt werden, welche sich nur in der Expression von CD16 unterschieden. Es gab CD56^{bright} NK-Zellen, die stark CD16 exprimierten (grün), und die klassischen CD56^{bright} NK-Zellen, die für diesen Marker negativ waren (rot) (Abb. 29; Poli et al., 2009; Uciechowski et al., 1992; Béziat et al., 2011).

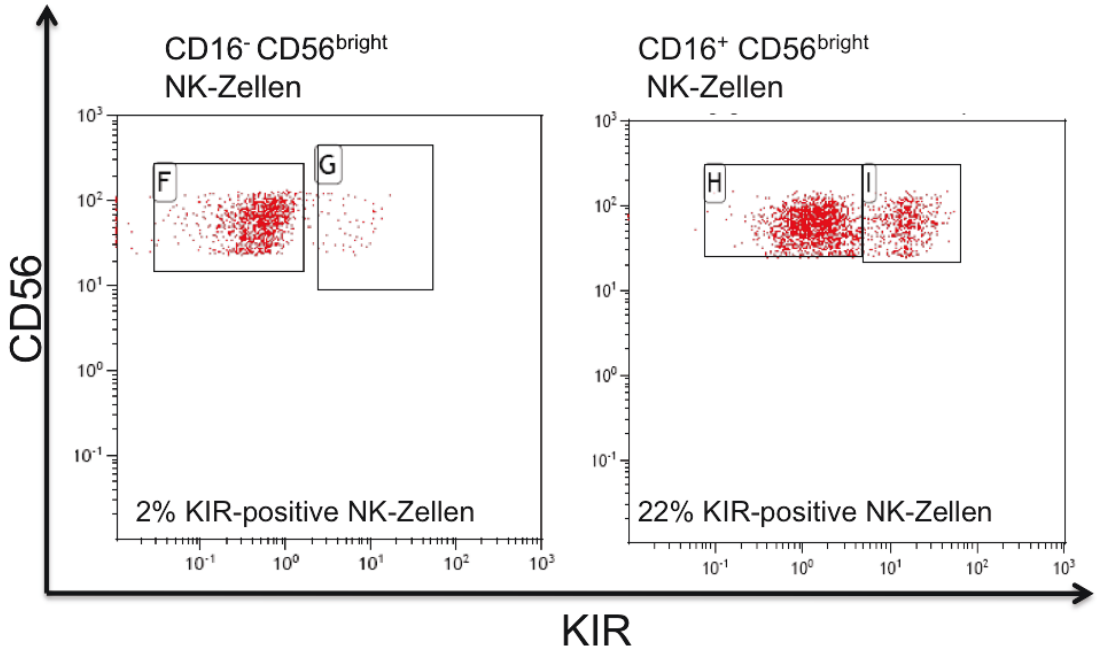


Abb. 30: NK-Zellen wurden aus dem Nabelschnurblut isoliert. Durchflusszytometrisch wurde die Oberflächenexpression von KIR in den $CD16^+$ bzw. $CD16^-$ $CD56^{bright}$ NK-Zellen analysiert. Die $CD16^-$ $CD56^{bright}$ NK-Zellen wiesen nur eine geringe Oberflächenexpression von KIR (2%) auf. Eine deutlich höhere KIR-Oberflächenexpression konnte auf den $CD16^+$ $CD56^{bright}$ NK-Zellen nachgewiesen werden. Hiervon expremierten 22% der NK-Zellen KIR. Dargestellt ist ein expemplarisches Expreminent von 10.

$CD16^-$ $CD56^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen, wiesen keine Expression von klonotypischen KIRs auf. Sie waren für diese KIRs größtenteils negativ. Die KIR^+ Zellfraktion ist in Abb.30 im Kästchen G zusehen. Dagegen konnte in den $CD16^+$ $CD56^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen, im Vergleich zu den $CD16^-$ $CD56^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen, eine deutliche Expression von klonotypischen KIRs nachgewiesen werden. Ca. 22% dieser NK-Zellen exprimierten KIR. Diese Fraktion ist in Abb. 30 im Kästchen I zu sehen.

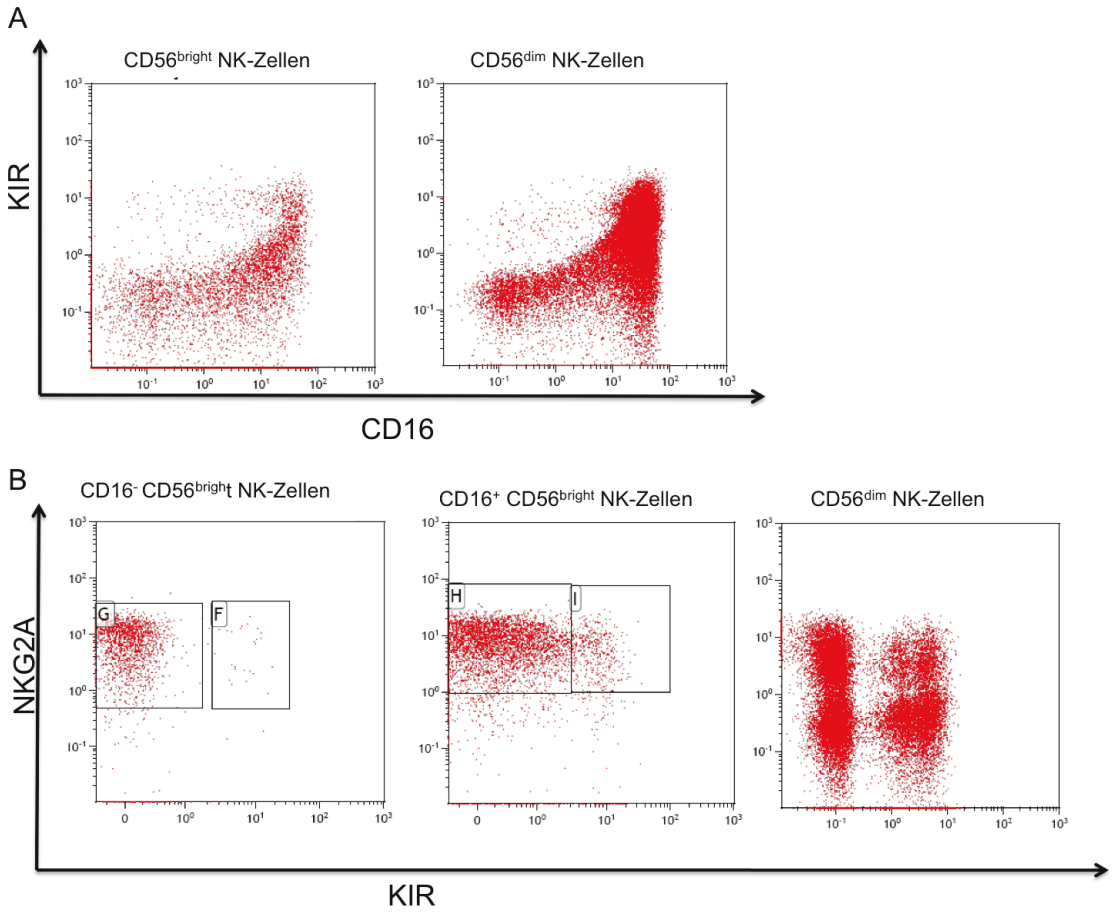


Abb. 31: NK-Zellen wurden aus einem Nabelschnurblut isoliert. Von ihnen wurde die Oberflächenexpression von CD16 und von klonotypischen KIRs, in den CD56^{bright} oder CD56^{dim} NK-Zellen, analysiert **(A)**. Die Expression von NKG2A und von KIR wurde durchflusszytometrisch in CD16^{-} bzw. CD16^{+} CD56^{bright} NK-Zellen und in CD56^{dim} NK-Zellen bestimmt **(B)**.

Je stärker die CD16-Expression auf den CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen war, desto stärker war auch die Expression von KIR. Eine ähnliche Beobachtung konnte auch für die CD56$^{\mathbf{dim}}$ NK-Zellen gemacht werden (Abb.31A). Bei der weitern Analyse der CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen konnte festgestellt werden, dass in CD16^{+} CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen die Expression von KIR und NKG2A gekoppelt war. Bei CD56$^{\mathbf{dim}}$ NK-Zellen konnten nicht nur KIR^{+}/NKG2A^{+} NK-Zellen nachgewiesen werden, sondern auch nur KIR^{+} NK-Zellen, die keinen NKG2A-Rezeptor exprimierten. (Abb. 31B).

Bei der Analyse der Oberflächenrezeptoren der CD56$^{\mathbf{dim}}$ oder CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Populationen wurden folgende Beobachtungen gemacht. Es waren zwei CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen Populationen erkennbar, welche sich in der Expression von CD16 unterschieden. Sie wiesen auch Unterschiede im Bezug auf die Expression klonotypischer KIRs auf. So war auf einem Teil der CD56^{bright} NK-Zellen, die stark CD16 exprimierten, auch klonotypische KIRs nachweisbar**.**

3.3.3 Funktionale Unterschiede zwischen CD16^{+} oder CD16^{-} CD56^{bright} NK-Zellen

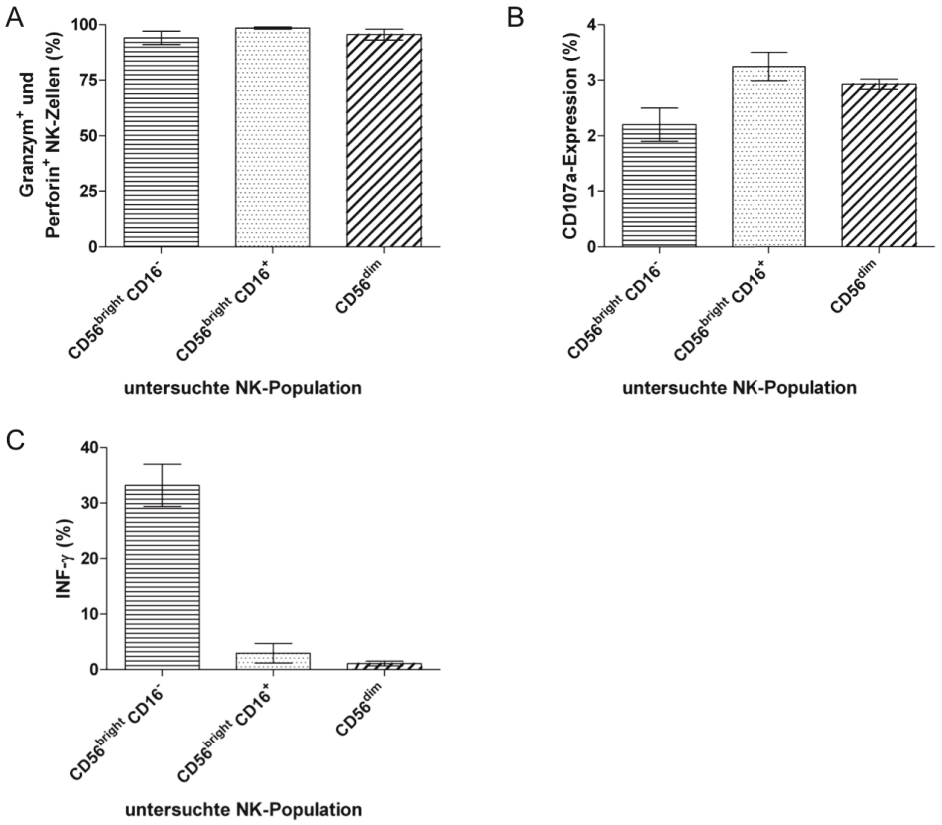


Abb. 32: CD56^{dim}, CD16^{+} CD56^{bright} und CD16^{-} CD56^{bright} NK-Zellen aus dem Nabelschnurblut wurden durchflusszytometrisch analysiert. In (**A**) wurde nachgewiesen, wie viele NK-Zellen für Granzym und Perforin positiv waren. Weiter wurde untersucht, ob die zuvor genannten NK-Populationen in der Lage waren zu degranulieren (**B**) und INF-γ zu sezernieren (**C**). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Zweifachbestimmungen.

Um mehr über die beiden zuvor beschriebenen CD56^{bright} NK-Populationen zu erfahren, wurde zunächst bestimmt, ob bzw. wie viel Granzym und Perforin von den CD56^{bright} NK-Zellen gebildet wurden. Es wurde durchflusszytometrisch bestimmt, wie viele der NK-Zellen positiv für diese intrazellulären Proteine waren. So konnte gezeigt werden, dass in allen Populationen eine vergleichbare Menge granzym- und perforinhaltige Versikel vorhanden waren (Abb. 32 A).

Anschließend wurde untersucht, ob die drei NK-Populationen INF-γ produzierten. INF-y konnte in den klassischen CD56^{bright} nachgewiesen werden. Dies war so auch zu erwarten, da bekannt ist, dass diese Population INF-γ sezernierend ist. In CD56^{bright} NK-Zellen, welche den CD16-Marker auf ihrer Zelloberfläche trugen und in CD56^{dim} NK-Zellen, konnten weniger mit IFN-γ beladene Vesikel nachgewiesen werden (Abb. 32 C).

Um mehr über die Funktion der NK-Populationen zu erfahren, wurde untersucht, ob diese in der Lage waren, bei Anwesenheit von Zielzellen, zu degranulieren.

Bei der CD107a Expression auf der Zelloberfläche nach Stimualtion von KIR2DL3 war auf den untersuchten Populationen nur ein geringfügiger Unterschied zu erkennen. In der Literatur ist hinterlegt, das klassische CD56^{bright} NK-Zellen nur schwach Zielzellen abtöteten. Hingegen töten CD16^{+} CD56b^{right} und CD56^{dim} NK-Zellen deutlich besser Zielzellen ab (Béziat et al. 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen in zwei Populationen aufgeteilt werden konnten, welche sich in der Expression von CD16 unterschieden. Sie wiesen auch Unterschiede im Bezug auf ihre klonotypischen KIR-Expression auf. Je stärker CD16 auf der Zelloberfläche exprimiert war, desto mehr klonotypische KIRs waren auf der Zelloberfläche nachweisbar. Aus funktionaler Sicht ähnelten die CD16^{+} CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen eher den CD56$^{\mathbf{dim}}$ NK-Zellen, als den klassischen CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen. CD16^{+} CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen waren nicht mehr in der Lage INF-γ in großen Mengen freizusetzen, wie es die klassischen CD56^{bright} NK-Zellen konnten. Sie ähnelten funktional eher den CD56$^{\mathbf{dim}}$ NK-Zellen, die in der Lage waren, Zielzellen abzutöten. Diese Ergebnisse ließen die Vermutung zu, dass in den CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen die Demethylierung der klonotypischen KIRs stattfand. Weitere epigenetische Untersuchungen in dieser Arbeit werden zeigen, ob dies auch der Fall ist.

In dieser Arbeit konnte erfolgreich ein Modellsystem etabliert werden, in dem HSCs auf humanen Nährzellen zu funktionalen NK-Zellen ausdifferenziert werden konnten. Weiter wurde gezeigt, das sowohl HSCs aus dem Nabelschnurblut, als auch GCSF-mobilisierte HSCs, bei der Wahl der richtigen Nährzelle, erfolgreich zu NK-Zellen ausdifferenziert werden konnten. Bei Verwendung von Nabelschnurblut HSCs kam es zu einer größeren Zahl an KIR^{+} NK-Zellen. HSCs konnten erfolgreich expandiert werden und zu NK-Zellen auszudifferenzieren, welche effizienter leukämische Zellen abtöteten als NK-Zellen, die aus unexpandierten HSCs differenziert wurden.

3.4 Einfluss der Nährzelle auf die KIR-Expression

Im anschließenden Versuchsteil soll geklärt werden, welchen Einfluss unterschiedliche Nährzellen auf die KIR-Expression haben und ob es möglich ist den Zeitpunkt zu bestimmen zu dem ein Signal induziert wird, welches für die KIR-Expression notwendig ist.

3.4.1 Verminderte Zellproliferation von NK-Populationen auf MSC

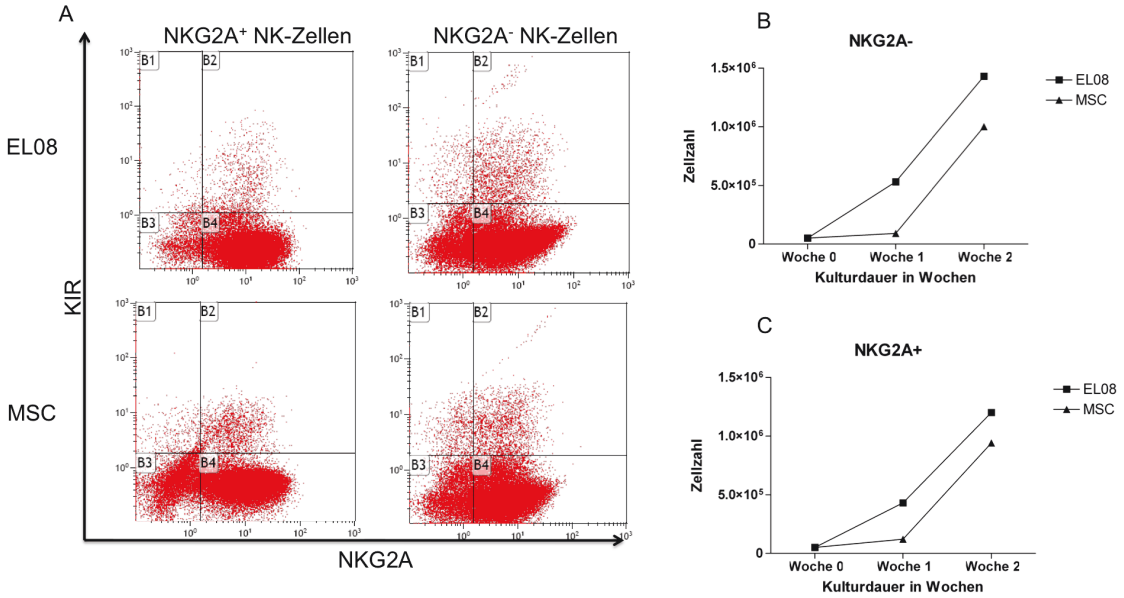


Abb. 33: NK-Stadien (NKG2A$^+$ KIR$^-$ CD56$^+$; NKG2A$^-$ KIR$^-$ CD56$^+$) wurden aus dem Nabelschnurblut isoliert und auf EL08 oder MSC-Nährzellen für zwei Wochen kultiviert. Es sollte untersucht werden, ob KIR$^-$ NK-Stadien sich auf MSC-Nährzellen zu KIR$^+$ NK-Zellen entwickeln konnten und wie stark die Proliferation der NK-Zellen auf den unterschiedlichen Nährzelllinien war. Die Oberflächenexpression von KIR und NKG2A beider NK-Stadien auf den unterschiedlichen Nährzelllinien wurde durchflusszytometrisch in der ersten Woche bestimmt (**A**). Die Proliferation der beiden NK-Stadien CD56$^+$ NKG2A$^-$ KIR$^-$ (**B**) und CD56$^+$ NKG2A$^+$ KIR$^-$ (**C**) auf den beiden Nährzelllinien wurde über den Zeitraum von zwei Wochen verfolgt. Dargestellt ist ein exemplarisches Experiment von drei.

CD56^{dim} NK-Zellen, welche weder NKG2A noch KIR exprimierten bzw. NKG2A$^+$ KIR$^-$ NK-Zellen aus dem Nabelschnurblut wurden auf humane Nährzellen (MSC) und murine EL08-Nährzellen ausplattiert. Anschließend wurde die Induktion von klonotypischen KIRs auf den differenzierenden NK-Zellen verfolgt. Im Vergleich zur EL08 fiel auf, das es während der ersten Woche nur zu einer sehr geringen Proliferation von NK-Zellstadien auf MSC kam. Erst in der zweiten Woche kam es auch in den MSC Kulturen zu einer Proliferation. Trotz der geringen Proliferation von NK-Zellstadien auf MSC kam es schon in der ersten Woche auf MSC-Nährzellen zu einer Akquirierung von KIR, wie es auch auf EL08-Nährzellen der Fall war (Abb. 33).

3.4.2 KIR⁻ NK-Populationen haben bereits ein Signal erhalten, das sie zu KIR-exprimierenden NK-Zellen differenzieren lässt

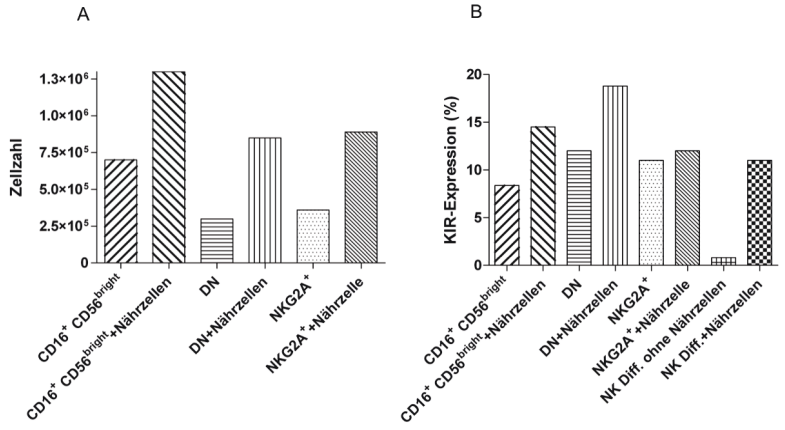


Abb.34: Die NK-Populationen CD16$^+$/KIR$^-$ CD56^{bright}, NKG2A$^-$ KIR$^-$ CD56^{dim} (DN) und NKG2A$^+$ KIR$^-$ CD56^{dim} wurden aus dem Nabelschnurblut isoliert. Die isolierten NK-Zellen wurden ohne oder mit Nährzellen kultiviert. In (**A**) ist die Zellzahl dargestellt, die unter den verschiedenen Kulturbedingungen erreicht wurde. Mittels Durchflusszytometrie wurde analysiert, ob die Zellen im Verlauf der Kultivierung in der Lage waren KIRs zu exprimieren (**B**).

NK-Populationen, die keine klonotypischen KIRs exprimierten, wurden mit und ohne Nährzellen (EL08) für zwei Wochen kultiviert. Hiervon wurde die Expression der klonotypische KIRs untersucht.

In beiden Fällen exprimierten die zuvor KIR$^-$ NK-Zellen während der Kultivierung KIRs. NK-Zellen, die ohne Nährzelllinien kultiviert wurden, proliferierten deutlich langsamer, als NK-Zellen, welche auf Nährzelllinien kultiviert wurden. CD16$^+$ CD56^{bright} NK-Zellen proliferierten am stärksten in Anwesenheit von Nährzellen, wobei sie auch gut proliferierten, wenn keine Nährzellen anwesend waren (Abb. 34). Die Unterstützungslinien hatten nur noch einen schwachen Einfluss auf die KIR-Expression, aber einen starken auf die Proliferation der Zellen. Aus dieser experimentellen Beobachtung folgt somit, dass das für die KIR-Induktion notwendige Signal früher während der NK-Entwicklung gesetzt werden muss. Es war nämlich nicht möglich KIR$^+$ NK-Zellen aus HSCs zu differenzieren ohne Cokultivierung mit Nährzellen (Abb. 38).

3.4.3 Einfluss von Nährzellen auf die KIR-Induktion von *in vitro* generierten NK-Zellen

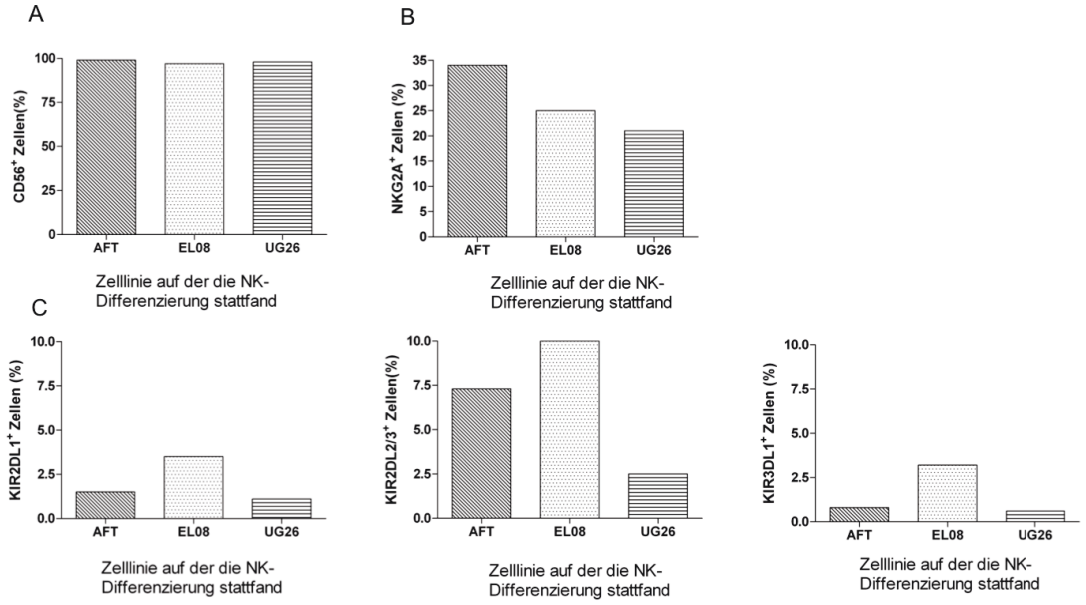


Abb. 35: HSCs wurden aus dem Nabelschnurblut isoliert und auf den murinen Nährzelllinien AFT, EL08 oder UG26 gegeben und es wurde eine NK-Generierung begonnen. Es sollte überprüft werden, ob die Nährzellen einen Einfluss auf Expression von KIR hatten. Nach zwei Wochen wurden die NK-Vorläuferzellen von den Nährzellen entfernt und die weitere NK-Generierung fand auf EL08 statt. Nach einer sechswöchigen Kultivierung wurde die Expression von CD56 (**A**), NKG2A (**B**) oder KIR (**C**) bestimmt. Auf der X-Achse ist aufgetragen auf welchen Nährzellen die untersuchten Zellen in der ersten Kulturwoche differenziert wurden.

Vorversuche (Abb. 17) haben gezeigt, dass die Nährzelllinie einen Einfluss auf die KIR-Expression der generierten NK-Zellen hatte. NK-Zellen, die auf UG26 generiert wurden, wiesen nur eine schwache KIR-Expression auf, wohingegen die Generierung von NK-Zellen auf EL08 eine starke KIR-Expression auslöste. Jetzt steht noch die Frage im Raum, ob ein eventueller Recoveryeffekt durch eine gut KIR-induzierende Nährzelllinie ausgelöst werden kann.

Zuerst wurden HSCs für zwei Wochen auf den murinen Nährzelllinien AFT, EL08 und UG26 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf die Nährzelllinie EL08 überführt und zu NK-Zellen weiter differenziert. Hierdurch sollte untersucht werden, ob die gut KIR-induzierende EL08 noch eine starke KIR-Expression in den sich entwickelnden NK-Zellen auslösen konnte. Anhand der gewonnen Ergebnisse sieht man deutliche Unterschiede in der KIR als auch bei der NKG2A-Expression der kultivierten HSCs (Abb. 35). HSCs, die auf EL08 bzw. UG26 kultiviert wurden und dann weiter auf EL08 zu NK-Zellen differenziert wurden, wiesen eine vergleichbar starke Expression von NKG2A auf. Dagegen war die Expression

von NKG2A auf den NK-Zellen am stärksten, wenn sie zu Beginn ihrer NK-Zellentwicklung als HSC auf AFT kultiviert wurde und ihre weitere Differenzierung auf EL08 stattfand.
Neben Unterschiede in der NKG2A-Expression, kam es auch bei den KIRs zu nachweisbaren Expressionsunterschieden. Die stärkste KIR-Expression konnte auf NK-Zellen nachgewiesen werden, die zuvor auf EL08 kultiviert wurden. Die Kultivierung von HSCs im Verlauf einer NK-Generierung auf AFT oder UG26 und anschließender Umplattierung auf EL08 führte zu einer verminderten Anzahl an KIR^+ NK-Zellen. Es zeigte sich, dass EL08 nicht in der Lage war durch eine Weiterführung der NK-Zellgenerierung ab der dritten Woche für eine vermehrte Zahl an KIR^+ NK-Zellen zu sorgen. In der CD56-Expression kam es zu keinen Unterschieden (Abb.35).
Die gewonnen Daten lassen den Schluss zu, dass im Verlauf der ersten zwei Wochen der Kultivierung ein Signal an die Zellen gegeben wurde, welches für die spätere KIR-Expression notwendig war und durch spätere Signale nicht kompensiert werden konnte.

3.4.4 Die KIR-Induktion erfolgt früh im Verlauf der NK-Zellentwicklung

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass es ein Signal geben muss, welches vor dem CD56-Stadium auf die NK-Zelle einwirkt und sie veranlasst später KIRs zu exprimieren. Um mehr über diesen Zeitpunkt zu erfahren, wurden HSCs mit und ohne Nährzellen zu NK-Zellen ausdifferenziert. Ebenfalls wurden HSCs eine Woche auf Nährzellen kultiviert. Anschließend wurde der gesamte Inhalt eines Wells, ohne Nährzellen mit zu überführen, in ein neues nährzellfreies Well überführt und weiter zu NK-Zellen differenziert. Die KIR-Expression wurde in der fünften Kulturwoche bestimmt.

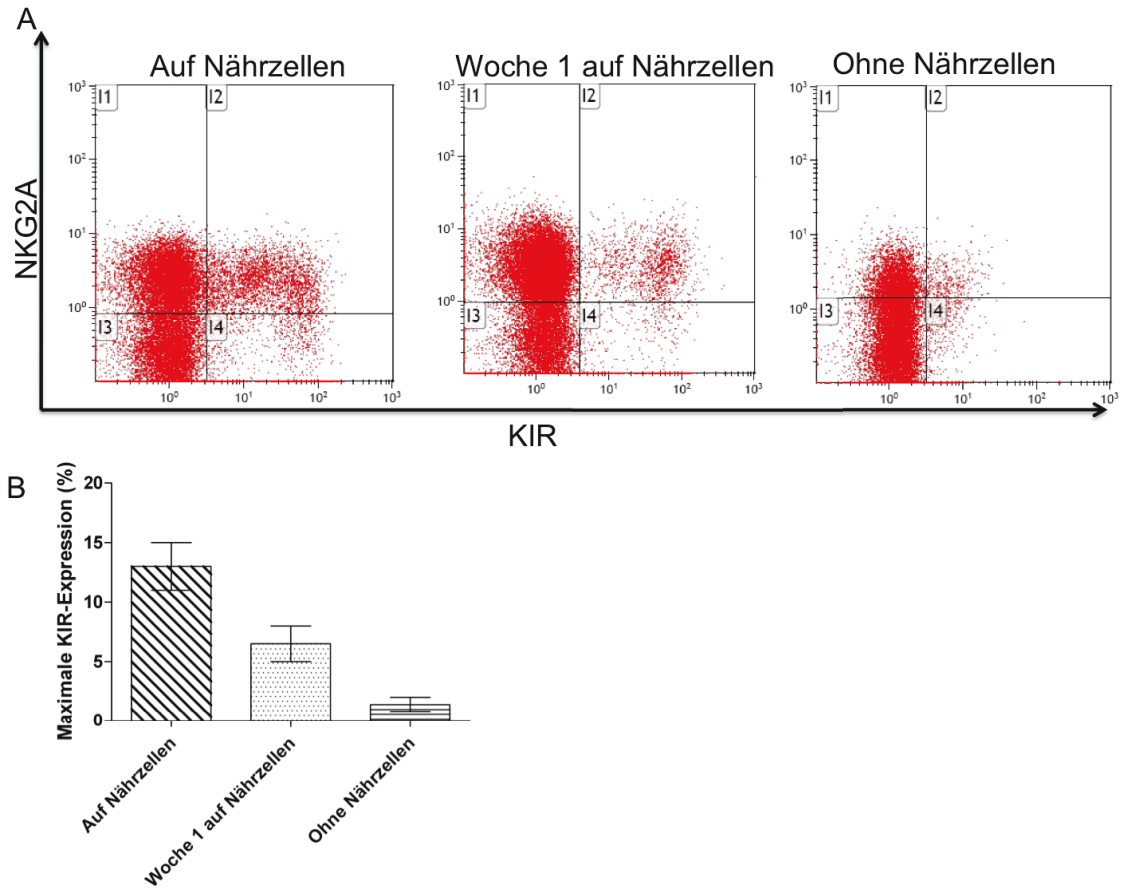


Abb.36: HSCs wurden aus einem Nabelschnurblut isoliert. Anschließend wurden die HSCs immer, nur in der ersten Woche oder gar nicht zusammen mit Nährzellen im Verlauf eines NK-Differenzierungsversuchs kultiviert. Die KIR- und NKG2A-Expression wurde in der fünften Woche durchflusszytometrisch bestimmt (**A**). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei Experiment (**B**).

Es war nicht möglich KIR^+ NK-Zellen aus HSCs, ohne Nährzellkontakt, zu erzeugen. Nur die NK-Zellen, deren Vorläufer Kontakt zu Nährzellen hatten, waren in der Lage KIR zu exprimieren. Des Weiteren exprimierten die NK-Zellen KIR, deren Vorläufer für eine Woche auf Nährzellen kultiviert wurden (Abb.36).

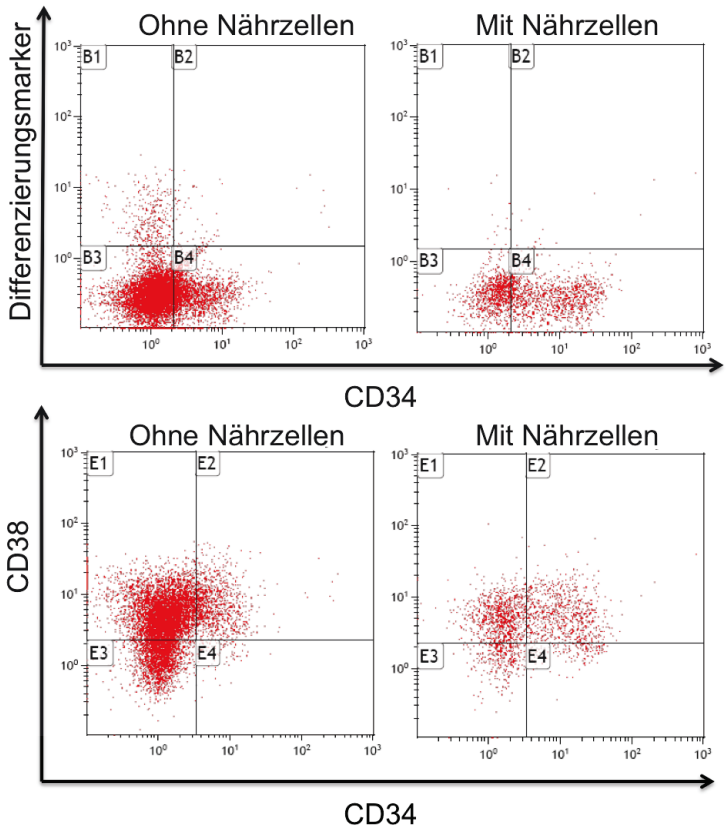


Abb. 37: HSCs wurden eine Woche zusammen mit oder ohne Nährzellen kultiviert. Nach Isolation der HSCs wurden sie in NK1-Medium aufgenommen und eine normale NK-Differenzierung wurde durchgeführt. Nach einer Woche wurde die Expression von CD34, CD38 und von Differenzierungsmarkern bestimmt.

Um zu klären, welche Vorläuferzelle nach einwöchiger Kultivierung für die KIR-exprimierenden NK-Zellen verantwortlich war, wurde in einem weiteren Experiment untersucht. Dazu wurden HSCs für eine Woche auf Nährzellen im NK-Differenzierungsmedium kultiviert. Dann wurden die Zellen, die eine Woche in Kontakt mit den Nährzellen waren, auf $CD34^+$ und $CD34^-$ Zellen aufgeteilt. Die $CD34^+$ Zellen waren auch für $CD38^+$, wiesen jedoch keine weiteren Differenzierungsmarker auf (Abb. 37).

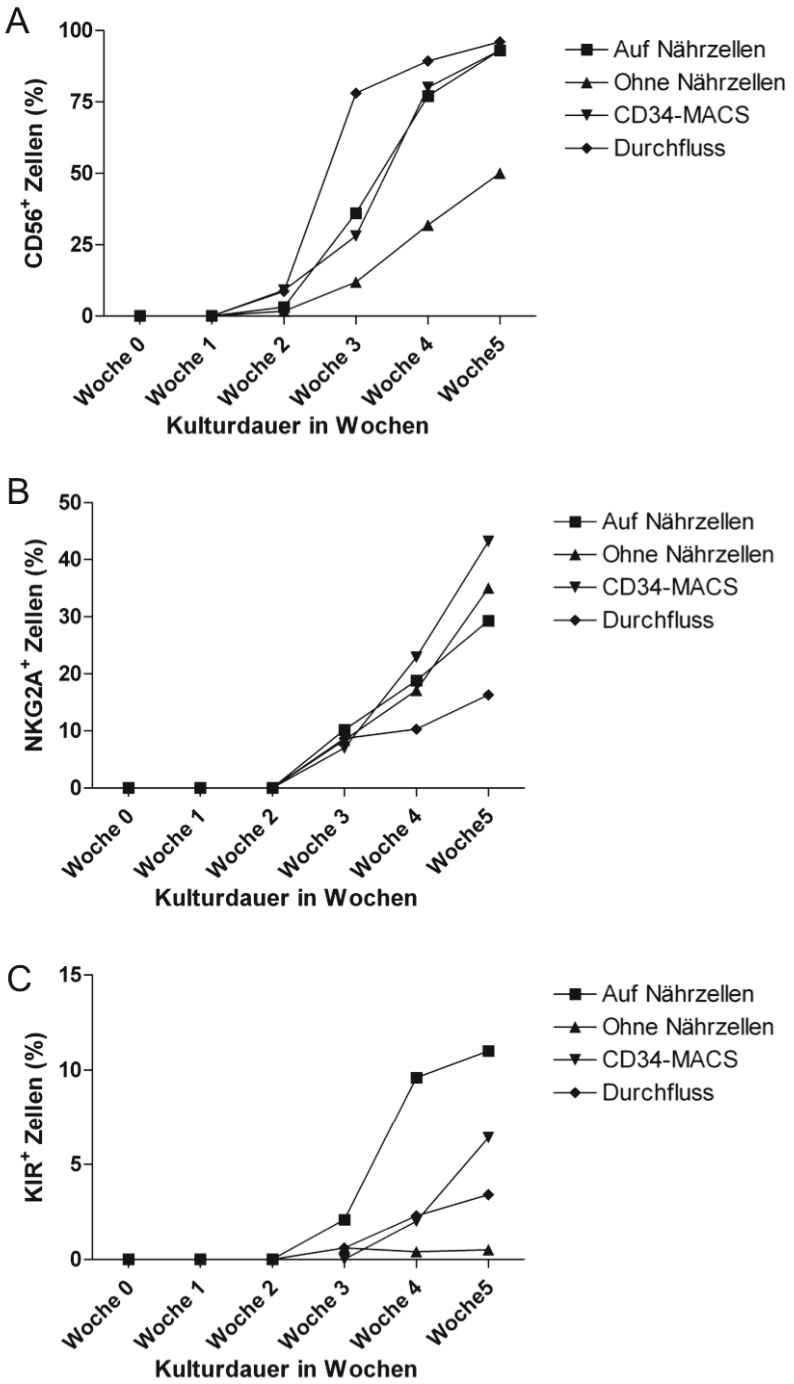


Abb. 38: HSCs wurden zu NK-Zellen differenziert. Dazu wurden HSCs im gesamten Verlauf einer NK-Generierung mit bzw. ohne Nährzellen kultiviert. Nach einer einwöchigen Kultivierung der Zellen auf Nährzellen wurde die Kultur in $CD34^+$ (MACS CD34) und $CD34^-$ Zellen (Durchfluss) aufgeteilt und ohne Nährzellunterstützung weiter zu NK-Zellen ausdifferenziert. Die Auftrennung erfolgte unter Verwendung des MACS-Verfahrens. Anschließend wurde während der gesamten NK-Entwicklung die Expression von CD56 (**A**), NKG2A (**B**) und KIR (**C**) unter den gewählten Kulturbedingungen bestimmt. Dargestellt ist ein exemplarisches Experiment von drei.

Wie aus Abb. 38 hervorgeht, konnten mit allen gewählten Kulturbedingungen $CD56^+$ NK-Zellen hervorgebracht werden. Auch $NKG2A^+$ NK-Zellen konnten in allen Kulturen nachgewiesen werden. Es war nicht möglich, ohne Nährzellen KIR^+ NK-Zellen zu generieren.

Vorläuferzellen, die keinen Nährzellkontakt hatten, waren nicht in der Lage eine KIR-Expression zu induzieren, wohingegen Vorläuferzellen mit Nährzellkontakt dazu in der Lage waren. Schon ein einwöchiger Kontakt mit Nährzellen reichte aus, um eine KIR-Expression auszulösen. Wenn man diese Mischpopulation in $CD34^+$ und $CD34^-$ Vorläuferzellen aufteilte, fiel auf, dass die $CD34^+$ Zellen zu einer stärkeren KIR-Induktion in der Lage waren, als die $CD34^-$ (Abb. 37 / Abb. 38).

Aus diesem Experiment lässt sich ableiten, dass es ein sehr frühes Signal geben muss, welches auf die $CD34^+$ Zellen einwirkt und sie während der NK-Zellentwicklung in die Lage versetzt zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt KIRs zu exprimieren. Die $CD34^+$ Stadien repräsentieren hierbei das erste Entwicklungsstadium der NK-Zellenentwicklung (Abb. 3).

3.5 Einfluss des Notch-Signals auf die KIR-Induktion

In diesem Versuchsteil wurden humane HSCs auf murinen Nährzellen, oder auf MSC zu NK-Zellen differenziert. OP9 ist eine murine Knochenmarkstromazelle, und in OP9-Delta wurde der Delta-Ligant eingebracht, den sie exprimieren.

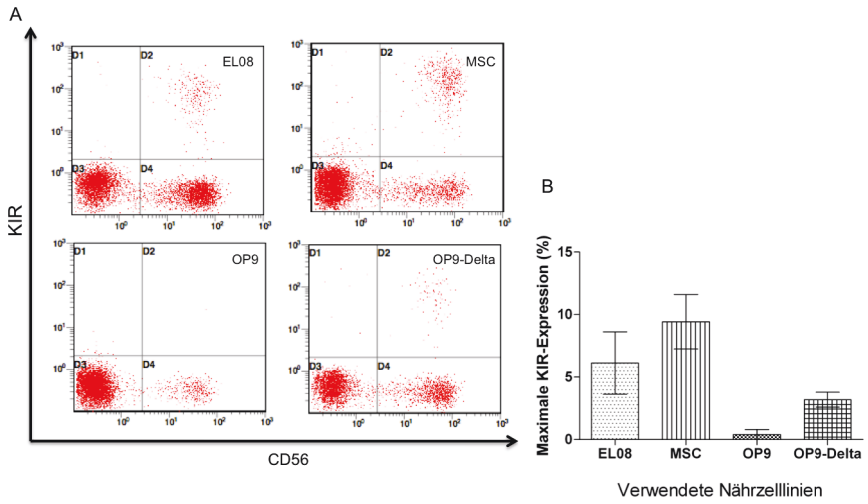


Abb.39: HSCs wurden aus dem Nabelschnurblut isoliert und auf den Nährzelllinien OP9, OP9-Delta, EL08 und MSC ausplattiert. Die KIR-Expression wurde am 25. Tag einer NK-Generierung ermittelt **(A).** Dargestellt ist ein exemplarisches Experiment. In **(B)** ist die maximale KIR-Expression, die im Verlauf der Experimente gemessen werden konnte dargestellt. Dieses Experiment wurde dreimal wiederholt und für B wurde hieraus der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

HSCs, die auf OP9 kultiviert wurden, differenzierten zu fast vollständig entwickelten NK-Zellen. Sie exprimierten aber so gut wie kein KIR, wohingegen HSCs, deren Entwicklung auf OP9-Delta stattgefunden hatte, waren in der Lage KIRs zu exprimieren. Auf EL08 und MSC differenzierten mehr Zellen zu KIR^+ NK-Zellen. Die Ergebnisse zeigen, dass für die KIR-Expression auf OP9 ein Signal über Notch Delta wichtig ist (Abb. 39).

In der hier vorliegenden Arbeit konnten der Zeitpunkt und das Zellstadium identifiziert werden, in dem ein Signal induziert wurde, welches der NK-Vorläuferzelle ermöglicht zum Ende ihrer Entwicklung KIR auf seiner Zelloberfläche zu exprimieren. Im Verlauf der ersten Woche wirkte ein bisher noch nicht genauer identifiziertes Signal auf NK-Vorläuferzellen ein, die sich im ersten Entwicklungsstadium befanden. Dieses Signal wurde von den Nährzellen an die NK-Zelle übermittelt. Ab diesem Zeitpunkt konnten NK-Vorläuferzellen ohne Nährzellen zu KIR^+ NK-Zellen ausdifferenziert werden. KIR^+ NK-Zellen entwickeln sich nicht aus HSCs, die keinen Kontakt zu Nährzellen hatten. Da ein KIR-induzierendes Signal im Verlauf der ersten Entwicklungswoche gesetzt wurde, hatte das Überführen der HSCs von Nährzellen, welche die KIR-Induktion schlecht unterstützten auf gut unterstützende Linien keinen positiven Effekt auf die KIR-Expression am Ende der NK-Zellentwicklung.

3.6 Nachweis der mRNA-Transkription von *NKG2A* und *KIR* während der *in vitro* NK-Zellentwicklung

Mit Hilfe der etablierten NK-Zellentwicklungskultur konnten verschiedene Stadien der NK-Zellentwicklung zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert werden.

In dieser Arbeit wurden $CD34^+$ Stammzellen aus dem Nabelschnurblut isoliert und dienten zur Analyse der Startpopulation. Anschließend wurden $CD34^+/CD38^+/CD117^-$ und $CD34^+/CD38^+/CD117^-$ Zellen aus der Differenzierungskultur isoliert, die sehr frühe Entwicklungsstadien repräsentierten. Weitere Stadien sind $CD56^+/NKG2A^-/KIR^-$ Zellen, die entweder für den Oberflächenrezeptor $CD117^+$ oder $CD117^-$ waren. Zu den weiteren isolierten NK-Zellen, die untersucht wurden, zählten NK-Zellen, die $NKG2A^+/KIR^-$ waren bzw. KIR^+ NK-Zellen. Die Reinheit der isolierten NK-Zellen betrug mindestens 98%. Ebenfalls wurden $CD16^+$ und $CD16^-$ $CD56^{bright}$ NK-Zellen aus dem Nabelschnurblut isoliert und im Bezug auf die mRNA-Transkription klonotypischer *KIRs* untersucht, da die bisherigen Ergebnisse es nahe legen, dass es sich bei den $CD56^{bright}$ NK-Zellen um ein Übergangsstadium handelt, in dem die Transkription der klonotypischen *KIRs* etabliert werden könnte.

Um herauszufinden, in welchem Stadium der NK-Zellentwicklung *NKG2A* und *KIR* transkribiert werden, und somit das Stadium zu identifizieren, in dem für die KIR-Induktion notwendige Faktoren wirken, wurden zunächst verschiedene NK-Entwicklungsstadien aus einer *in vitro* Kultur näher untersucht.

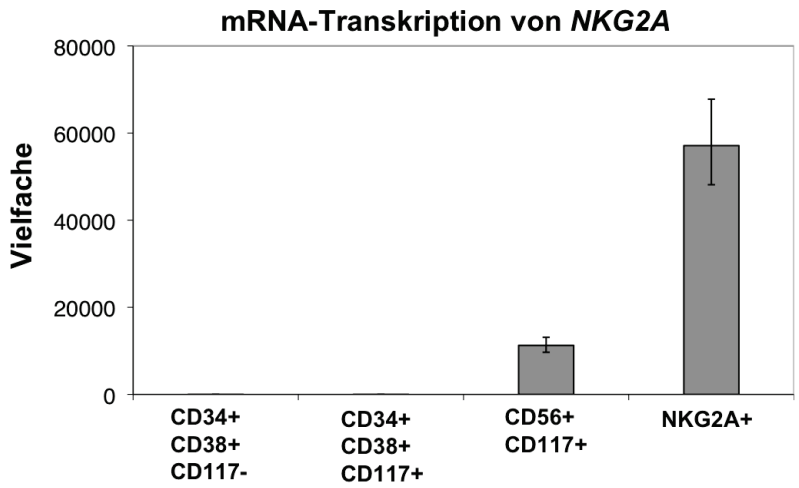


Abb. 40: Verschiedene NK-Stadien wurden aus einer *in vitro* NK-Generierungskultur isoliert und anschließend wird in ihnen die mRNA-Transkriptionstärke von *NKG2A* mittels Real-Time PCR nachgewiesen. Nachfolgend wurde auf GAPDH normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf mit $CD38^{+}/CD117^{-}$ Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall. Für die Real-Time PCR wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Aus den gewonnen Daten geht hervor, dass ab dem $CD56^{+}/CD117^{+}$ NK-Stadium mRNA-Transkripte für *NKG2A* nachweisbar waren (Abb. 40). Die untersuchten Zellen wiesen zu diesem Zeitpunkt noch keine NKG2A-Oberflächenexpression auf. Die Transkription von NKG2A war in den $NKG2A^{+}$ Zellen deutlich stärker ausgeprägt als in den $CD56^{+}/CD117^{+}$ NK-Stadien. Dass *NKG2A* mRNA-Transkripte im $NKG2A^{+}$ Stadium nachweisbar waren, war auch zu erwarten, da der NKG2A-Rezeptor auf der Zelloberfläche dieses Zellstadiums vertreten war.

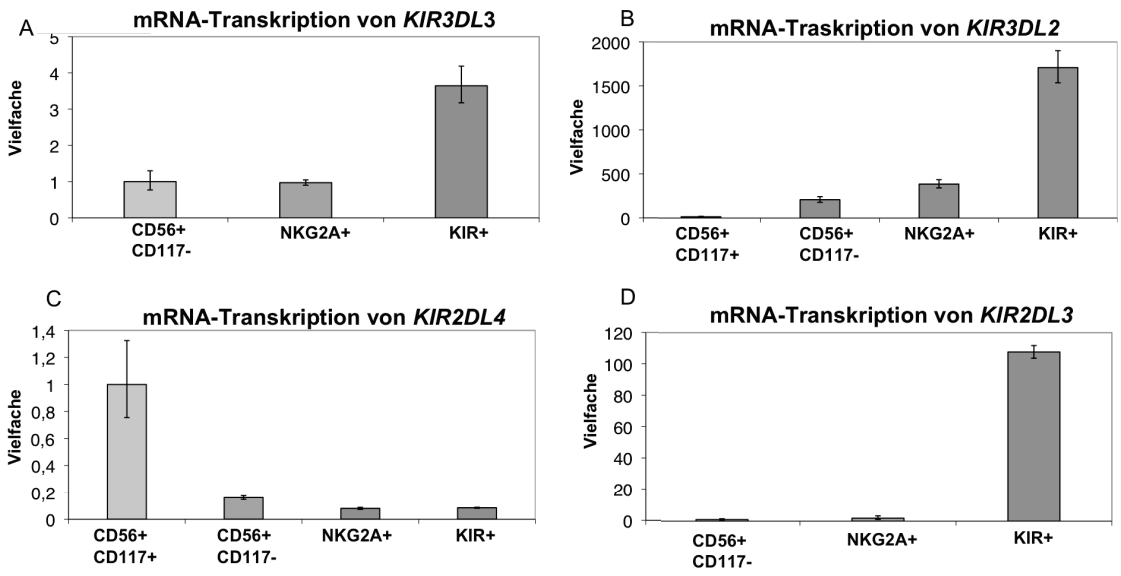


Abb. 41: In verschiedenen Stadien einer *in vitro* NK-Generierungskultur wurde mittels Real-Time PCR die mRNA-Transkriptionsstärke der *framework* KIRs (*KIR3DL2, KIR2DL4, KIR3DL3*) und des klonotypischen KIRs *KIR2DL3* bestimmt. Anschließend wurde auf GAPDH normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf $CD56^+/117^+$ (**B-C**) bzw. $CD56^+/CD117^-$ (**A+D**) bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert von drei Messungen und das 95% Konfidenzintervall. Die Real-Time PCR wurde in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Über die Transkription der *framework* und klonotypischen *KIRs* im Verlauf der NK-Zellentwicklung ist nur wenig bekannt. Daher wird in dieser Arbeit erstmalig der Verlauf der Transkription von klonotypischen und *framework KIRs* im Verlauf einer *in vitro* NK-Zellgenerierungskultur verfolgt.

Ein mRNA-Transkript für *KIR2DL4* konnte frühestens im $CD56^+/CD117^+$ NK-Stadium nachgewiesen werden. In diesem Stadium konnten weder mRNA-Transkripte für die übrigen *framework* noch für die klonotypischen *KIRs* identifiziert werden. Der erste auf mRNA-Ebene nachweisbare KIR war im NK-Zellgenerierungssystem *KIR2DL4*. Im darauf folgenden $CD56^+/CD117^-$ Stadium kam es zur mRNA-Transkription der beiden verbliebenen *framework* KIRs, *KIR3DL3* und *KIR3DL2*. In diesem Stadium kam es jedoch zu einer Reduktion der mRNA-Transkriptionsstärke von *KIR2DL4* im Vergleich zum vorangegangenen Stadium. Auch in den folgenden NK-Stadien wurde *KIR2DL4* nur schwach transkribiert.

KIR3DL3 wurde ab dem $CD56^+/CD117^-$ Stadium transkribiert. Eine Transkription dieses KIRs war im $CD56^+/CD117^-$ Stadium nicht möglich. Er war im $NKG2A^+/KIR^-$ und auch im $CD56^+/CD117^-$ Stadium mit einer vergleichbaren Transkriptionsstärke nachweisbar. Die Transkription stieg im KIR^+ Stadium im Vergleich zu den anderen Stadien deutlich an. *KIR3DL2* mRNA-Transkription begann im $CD56^+/CD117^-$ NK-Stadium und stieg im KIR^+ NK-Stadium deutlich an.

Die *framework* KIRs wurden vor den klonotypischen KIRs transkribiert und zwar zuerst *KIR2DL4* im CD56^{+}/CD117^{+} NK-Stadium. Im CD56^{+}/CD117^{-} NK-Stadium folgte die Transkription von *KIR3DL3* und *KIR3DL2*.

Die Transkription des klonotypischen KIRs *KIR2DL3* konnte erst in NK-Zellen nachgewiesen werden, wenn die KIR-Expression auch schon auf der Zelloberfläche nachweisbar war. Zu einem früheren Zeitpunkt der Entwicklung, konnte kein *KIR2DL3*-Transkript nachgewiesen werden. Die klonotypische KIR-Transkription folgte somit auf die Transkription der *framework* KIRs (Abb. 41).

3.6.1 Identifikation von *KIR* mRNA-Transkripten in CD16^{+} oder CD16^{-} CD56^{bright} NK-Zellen

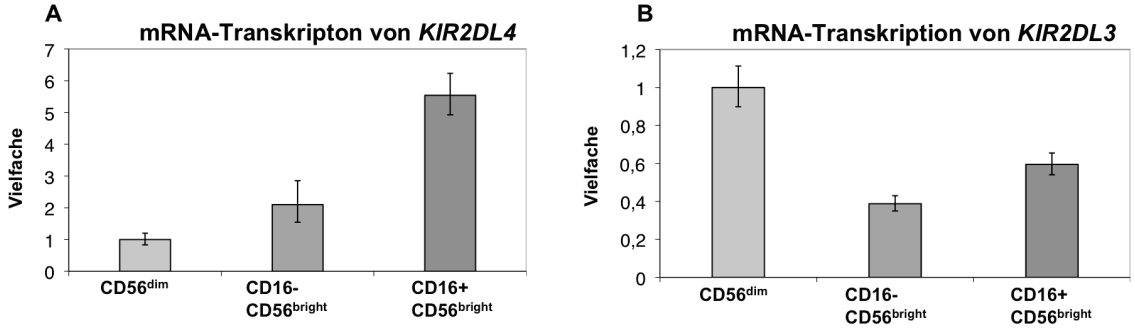


Abb. 42: CD16^{-} CD56^{bright}, CD16^{+} CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zellen wurden aus dem Nabelschnurblut isoliert. Die CD56^{bright} NK-Zellen wurden auf KIR^{-} Zellen gesortet. Die mRNA-Transkriptionstärke von *KIR2DL4* (**A**) und von KIR2DL3 (**B**) in diesen NK-Zellen wurde mittles Real-Time PCR analysiert. Anschließend wurde auf GAPDH normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf CD56^{dim} NK-Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall. Es wurden drei Messungen durchgeführt. Die Real-Time PCR wurde in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Da im NK-Zellgenerierungsmodell kein Übergangsstadium für die klonotypischen *KIRs* identifiziert werden konnte, wurde in den CD56^{bright} NK-Zellen nach einem Übergangsstadium für die klonotypische KIR-Transkription gesucht. Die untersuchten CD56^{bright} NK-Zellen wiesen keine Oberflächenexpression klonotypischer KIRs auf, da KIR^{-} CD56^{bright} NK-Zellen aus der gesamt CD56^{bright} NK-Population durchflusszytometrisch isoliert wurden.

Zunächst wurde die Transkription des *framework* KIRs *KIR2DL4* in den verschiedenen CD56^{bright} NK-Zellen untersucht und mit der Transkription in CD56^{dim} NK-Zellen verglichen. Hierbei fiel auf, dass *KIR2DL4* in den CD56^{dim} NK-Zellen nur schwach transkribiert wurde. Im Vergleich zu den CD56^{dim} NK-Zellen konnte in den klassischen CD56^{bright} NK-Zellen

eine stärkere Transkription von *KIR2DL4* nachgewiesen werden. Die stärkste *KIR2DL4* mRNA-Transkription wiesen die CD16^{+} CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen auf (Abb. 42).
Um genau zu ermitteln, in welchem Entwicklungsstadium *KIR2DL3* erstmalig transkribiert wurde, wurde in CD16^{+} und CD16^{-} CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen die *KIR2DL3* mRNA-Transkription untersucht. Die Transkription des klonotypischen KIRs *KIR2DL3* unterschied sich von der des *KIR2DL4* (Abb. 42A*)*. Die stärkste mRNA-Transkription von *KIR2DL3* konnte in den CD56$^{\mathbf{dim}}$ NK-Zellen nachgewiesen werden. Die untersuchten CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen wiesen keine Oberflächenexpression von KIR2DL3 auf. Für die klassischen CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen wie auch für die CD16^{+} CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen konnte ein *KIR2DL3* mRNA-Transkript nachgewiesen werden. Die Transkription von *KIR2DL3* fiel stärker in den CD16^{+} CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen aus als in den klassischen CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen (Abb. 42).
Mit Hilfe des *in vitro* Modells und Analysen an CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen konnte gezeigt werden, dass die *framework KIRs* vor den klonotypischen *KIRs* transkribiert werden. Im CD56^{+}/CD117^{-} NK-Stadium waren die ersten *KIR2DL4* mRNA-Transkripte nachweisbar. Im anschließenden CD56^{+}/CD117^{+} Stadium erfolgte die mRNA-Transkription der restlichen *framework* KIRs *KIR3DL3* und *KIR3DL2*. Erst nachdem es zu einer Transkription der *framework KIRs* gekommen war, und die NK-Zellentwicklung vorangeschritten war, konnten auch Transkripte vom klonotypischen KIR *KIR2DL3* nachgewiesen werden. In CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen, welche keine klonotypische KIR-Expression auf ihrer Zelloberfläche aufwiesen, konnte eine schwächere *KIR2DL3*-Transkription nachgewiesen werden als in KIR^{+} CD56$^{\mathbf{dim}}$ NK-Zellen.

3.6.2 Veränderung der DNA-Methylierung der *KIR*-Promotoren im Verlauf der natürlichen Killerzellentwicklung im *in vitro* Modell

Es wurden bereits in dieser Arbeit Untersuchungen durchgeführt, um den Zeitpunkt der NK-Zellentwicklung zu ermitteln, zu welchem die Transkription der *framework* und der klonotypsichen *KIRs* erfolgte. Jedoch war nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt der Entwicklung die Methylierung im Promotor eines exprimierten KIRs verloren geht und ob der gesamte Lokus bestehend aus *framework* und klonotypischen *KIRs* zeitgleich oder jedes *KIR* separat demethyliert wurde.

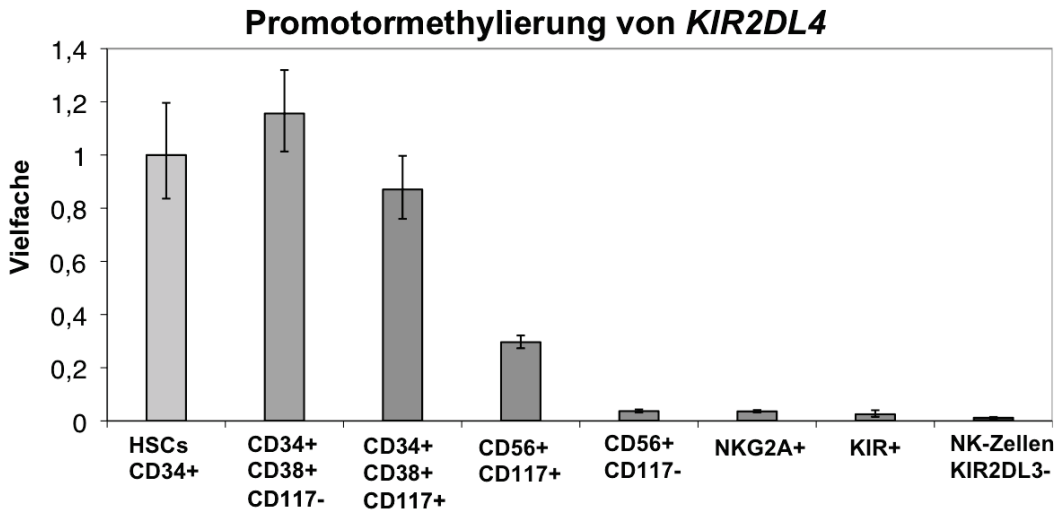


Abb. 43: Im Verlauf einer *in vitro* NK-Zellgenerierung wurden verschiedene NK-Stadien isoliert. Die DNA-Methylierung des *KIR2DL4*-Promotors wurde in den zuvor isolierten NK-Zellstadien mittels methylierungsspezifischer PCR bestimmt. Anschließend wurde auf GSTP normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf HSCs bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall. Es wurden drei Messungen durchgeführt. Die Real-Time PCR wurde in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Zunächst wurde die Methylierung des *KIR2DL4*-Promotors während der NK-Zellentwicklung analysiert. Aus den gewonnen Daten (Abb.43) geht hervor, dass in HSCs, wie auch in den frühen Entwicklungsstadien $CD34^+/CD38^+/CD117^-$ sowie $CD34^+/CD38^+/CD117^-$, der *KIR2DL4*-Promotor methyliert war. Erst in $CD56^+/CD117^+$ NK-Zellen kam es zu einer Demethylierung des Promotors, denn in diesen Zellen kam es zu einem Absinken der Methylierung im *KIR2DL4*-Promotor. In den $CD56^+/CD117^-$ NK-Zellen war der *KIR2DL4*-Promotor demethyliert. In den weiteren untersuchten NK-Zellen kam es nicht zu einem Anstieg der Methylierung im *KIR2DL4*-Promotor, sondern er blieb demethyliert.

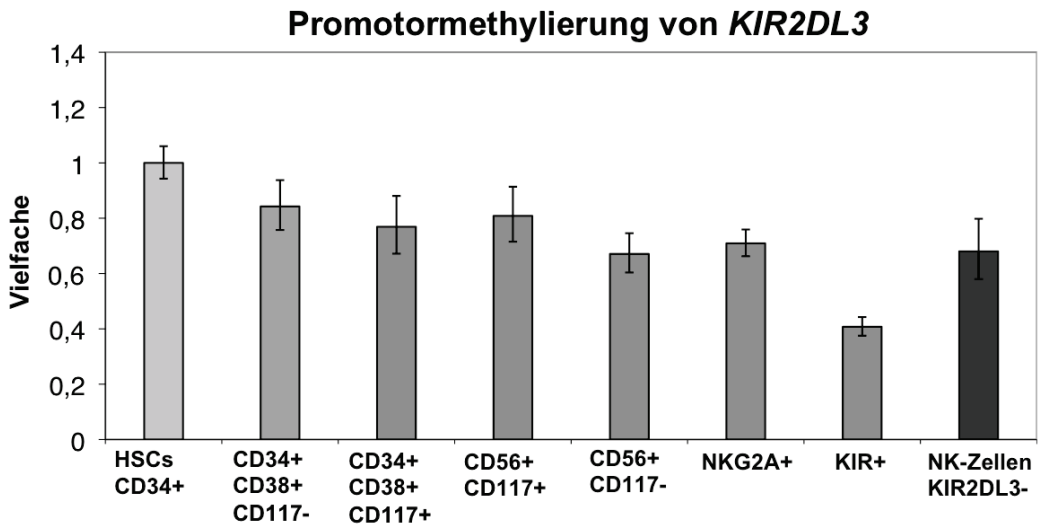


Abb. 44: Im Verlauf einer *in vitro* NK-Zellgenerierung wurden verschiedene NK-Stadien isoliert. Die DNA-Methylierung des *KIR2DL3*-Promotors wurde in den zuvor isolierten NK-Zellstadien mittels methylierungsspezifischer PCR bestimmt. Zusätzlich war die KIR2DL3-Promotormethylierung von KIR2DL3$^-$ NK-Zellen dargestellt, um einen Referenzwert zu erhalten für NK-Zellen, deren *KIR2DL3*-Promotor methyliert war. Anschließend wurde auf GSTP normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf HSCs bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall. Die Messung wurde dreimal wiederholt und die Real-Time PCR wurde in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Anschließend wurde die Methylierung des *KIR2DL3*-Promotors analysiert. Die Methylierung des Promotors war während der gesamten Entwicklung der NK-Zellen im Promotor nachweisbar. Erst in NK-Zellen, welche auch KIR2DL3 exprimierten, konnte eine Demethylierung des *KIR2DL3*-Promotors nachgewiesen werden. In NKG2A$^+$ Zellen war der *KIR2DL3*-Promotor noch methyliert. Dies erkennt man gut, wenn man die Methylierung dieser NK-Zellen mit der Metylierung des *KIR2DL3*-Promotors in KIR2DL3$^-$ NK-Zellen vergleicht. Erst wenn eine gemessene Methylierung unter diesem Niveau liegt, kann man von einer Demethylierung des Lokus ausgehen.

Die Ergebnisse zeigen, dass zuerst der *KIR2DL4*-Promotor gezielt demethyliert wurde und es nicht zu einer zeitgleichen Demethylierung zusammen mit dem *KIR2DL3*-Promotor kam. Dieser wurde erst in KIR-exprimierenden NK-Zellen demethyliert (Abb. 43, Abb. 44).

3.6.3 Abnahme der DNA-Methylierung des *KIR2DL3*-Promotors in CD56^{bright} NK-Zellen

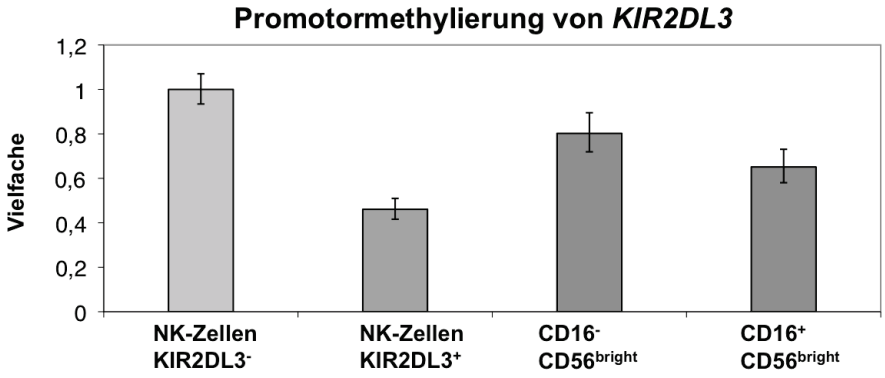


Abb.45: CD16^{+} CD56^{bright} und CD16^{-} CD56^{bright} NK-Zellen, die keine KIR-Oberflächenexpression aufwiesen wurden aus dem Nabelschnurblut isoliert. Weiter wurden KIR2DL3^{+} und KIR2DL3^{-} CD56^{dim} NK-Zellen ebenfalls aus dem Nabelschnurblut gewonnen. Anschließend wurde die DNA-Methylierung des *KIR2DL3*-Promotors in den isolierten NK-Zellen bestimmt. Die KIR^{+} CD56^{dim} NK-Zellen dienten als Referenzpunkte für NK-Zellen deren KIR2DL3-Promotor demethyliert waren. Der *KIR2DL3*-Promotor der KIR2DL3^{-} CD56^{dim} NK-Zellen war methyliert. Durch diese beiden Populationen konnte eingeschätzt werden, wie die DNA-Methylierung des *KIR2DL3*-Promotors in den untersuchten CD56^{bright} NK-Zellen vorlag. Anschließend wurde auf GSTP normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf KIR2DL3^{-} NK-Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall. Dieses Experiment wurde zweimal wiederholt und die Real-Time PCR wurde in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass CD16^{+} CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen ein Übergangsstadium darstellten. Es war ebenfalls möglich zu zeigen, dass sich die Transkription von *KIR2DL3* in den KIR^{-} CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen deutlich unterschied. So wurde *KIR2DL3* stärker in den CD16^{+} als in den CD16^{-} CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen transkribiert. Die Transkriptionsstärke des *KIR2DL3* lag in den CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen unter dem Transkriptionsniveau von CD56$^{\mathbf{dim}}$ NK-Zellen. Daher wurde nun das Methylierungsmuster des *KIR2DL3*-Promotors der beiden CD56$^{\mathbf{bright}}$ Populationen und der CD56$^{\mathbf{dim}}$ NK-Zellen bestimmt. Hierzu wurden jeweils CD16^{+} und CD16^{-} CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen isoliert, welche keine klonotypischen KIRs exprimierten. Die Methylierung des *KIR2DL3*-Promotors wurde anschließend in diesen Stadien analysiert. Wie aus Abb. 45 hervorgeht, ist der *KIR2DL3*-Promotor in CD16^{-} CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen schwächer methyliert als in KIR2DL3^{-} NK-Zellen. Die Methylierung des *KIR2DL3*-Promotors war in CD16^{+} CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen im Vergleich zu den CD16^{-} CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen nochmals schwächer ausgeprägt, erreichte aber nicht das Niveau der KIR2DL3 exprimierenden CD56$^{\mathbf{dim}}$ NK-Zellen.

Die Daten der Methylierungsanalysen des *KIR2DL3*-Promotors stimmten mit dem der Transkriptionsstärke des *KIR2DL3*-Gens überein. Es zeigte sich, dass der Promotor in den klassischen CD56^{bright} NK-Zellen leicht demethyliert war, und in dieser Population war auch ein schwaches *KIR2DL3*-Transkript nachweisbar. Der *KIR2DL3*-Promotor war in CD16^{+} CD56^{bright} NK-Zellen im Vergleich zu den klassischen CD56^{bright} NK-Zellen stärker demethyliert und man konnte in ihnen auch eine stärkere *KIR2DL3-T*ranskription nachweisen (Abb. 42; Abb. 45).

3.6.4 Im Verlauf der NK-Zellentwicklung kommt es zu einer Reduktion der H3K9me2 im *KIR*-Promotor

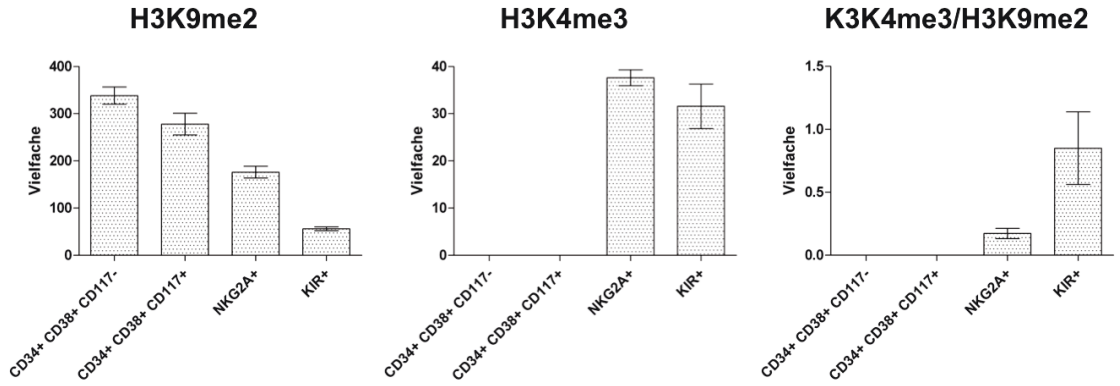


Abb. 46: Für den *KIR2DL4*-Promotor wurde die Anwesenheit der Histonmodifikationen H3K9me2 (inaktiv) und H3K4me3 (aktiv) in ausgewählten *in vitro* NK-Zellstadien nachgewiesen. Die Histonmodifikation H3K9me3 für den *KIR2DL4*-Promotor ist in (**A**) dargestellt und H3K4me3 in (**B**). Der Quotient aus H3K4me3 und H3K9me2 gibt an, ob der untersuchte *KIR2DL4*-Promotor eine aktive oder inaktive Histonsignatur im untersuchten NK-Entwicklungsstadium aufweist. Zur Normierung wurden die input-korrigierten Werte auf die entsprechenden Werte für Gesamt-H3 bezogen (2^{-ddCT}-Methode). Die Real-Time PCR wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt und der Mittelwert und die Fehlerbalken wurden mittels 2^{-ddCT}-Methode bestimmt und das 95% Konfidenzintervall wurde gebildet.

Neben der DNA-Methylierung, die sich während der NK-Entwicklung auf dem KIR-Lokus verändert, wird im folgenden die Veränderung der Histonmodifikation H3K9me2 und H3K4me3 im Verlauf einer NK-Zellentwicklung analysiert.

Zunächst wird die Veränderung dieser Modifikationen für den *KIR2DL4*-Promotor beschrieben. Während der NK-Zellentwicklung kam es zu einer konstanten Abnahme der H3K9me2 im *KIR2DL4*-Promotor. Vom CD34^{+}/CD38^{+} /CD117^{-} Stadium nahm sie fortlaufend ab. Sie war am geringsten im KIR^{+} NK-Zellen, in denen die klonotypischen *KIR*-Gene exprimiert wurden. Die H3K4me3 am *KIR2DL4*-Promotor war erst in NKG2A^{+} NK-Zellen und den KIR^{+} NK-Zellen nachweisbar. Sie war im CD34^{+}/CD38^{+}/CD117^{-} wie auch im

CD34$^+$/CD38$^+$/CD117$^+$ Stadium abwesend. Die aktive Modifikation fehlte in den Zellen, in denen es zu keiner *KIR2DL4*-Transkription kam. Anwesend war sie in den Zellen, in denen ein *KIR2DL4*-Transkript nachgewiesen werden konnte (Abb. 46; Abb. 41).
In NKG2A$^+$ und in KIR$^+$ NK-Zellen konnte eine geöffnete Chromatinstruktur für den *KIR2DL4*-Promotor nachgewiesen werden. In diesen Zellen konnten *KIR2DL4*-Transkripte nachgewiesen werden (Abb. 46; Abb. 41).

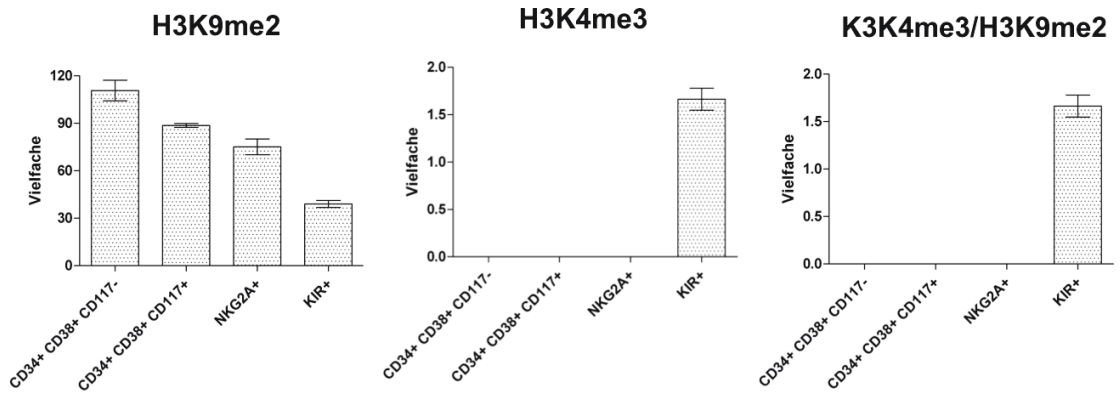


Abb.47: Für den *KIR2DL3*-Promotor wurde die Anwesenheit der Histonmodifikationen H3K9me2 (inaktiv) und H3K4me3 (aktiv) in ausgewählten *in vitro* NK-Zellstadien nachgewiesen. Die Histonmodifikation H3K9me3 für den *KIR2DL3*-Promotor ist in (**A**) dargestellt und H3K4me3 in (**B**). Der Quotient aus H3K4me3 und H3K9me2 gab an, ob der untersuchte *KIR2DL3*-Promotor eine aktive oder inaktive Histonsignatur im untersuchten NK-Entwicklungsstadium aufwies. Zur Normierung wurden die input-korrigierten Werte auf die entsprechenden Werte für Gesamt-H3 bezogen (2^{-ddCT}-Methode). Die Real-Time PCR wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt und der Mittelwert und die Fehlerbalken wurden mittels 2^{-ddCT}-Methode bestimmt und das 95% Konfidenzintervall wurde gebildet.

Die Untersuchungen der Histonmodifikationen des *KIR2DL3*-Promotors ergibt ein etwas anderes Bild als die Erkenntnisse, die vom *KIR2DL4*-Promotor ermitteln werden konnten.
Genau wie im *KIR2DL4*-Promotor kam es im *KIR2DL3*-Promotor im Verlauf der Entwicklung der NK-Zelle zu einer kontinuierlichen Abnahme der H3K9me2. Sie war im CD34$^+$/CD38$^+$/CD117$^-$ NK-Stadium stark ausgeprägt und sank bis zur KIR$^+$ NK-Zelle stetig.
Die H3K4me3 war am *KIR2DL3*-Promotor nicht schon im NKG2A$^+$ Stadium, sondern erst im KIR$^+$ Stadium nachweisbar. Die Analyse der Histonmodifikation ergab weiterhin, dass erst für das KIR$^+$ NK-Stadium eine geöffnete Chroamatinstruktur vorlag. In diesem Stadium konnte erstmalig ein demthylierter *KIR2DL3*-Promotor und ein *KIR2DL3*-Transkript im NK-Zellgenerierungsmodell nachgewiesen werden (Abb. 47; Abb. 44; Abb. 41).

3.6.5 Transkription von *KIR*-Promotortranskripten und NKTs während der Reifung der NK-Zelle

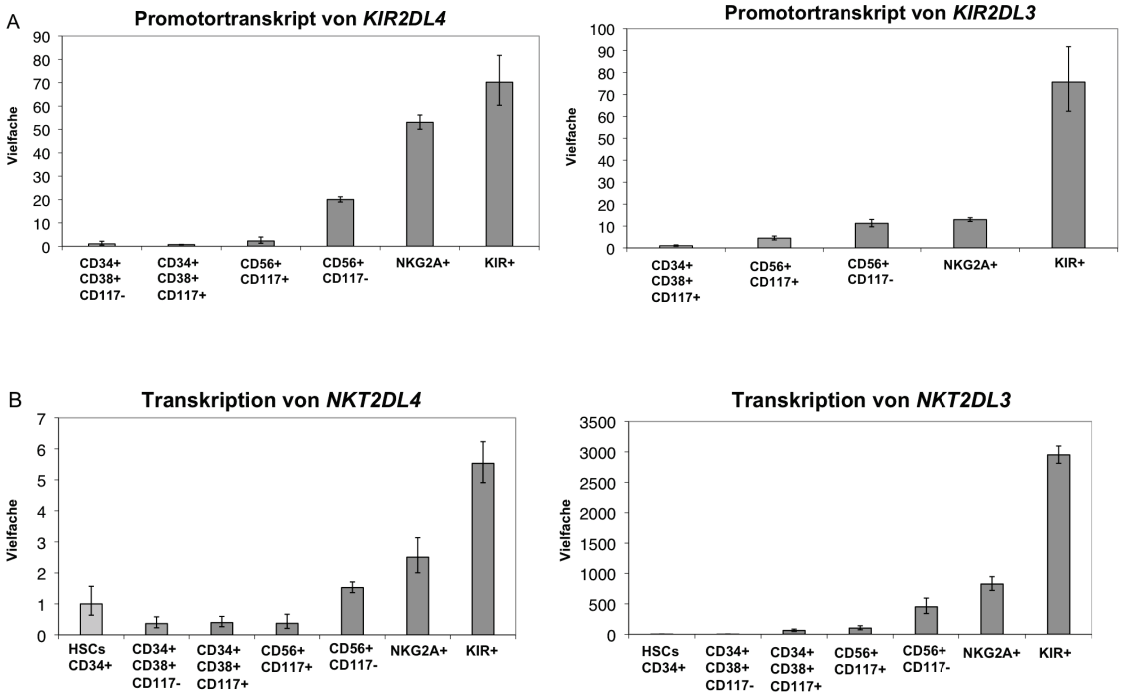


Abb. 48: Die Transkriptionsstärke von *KIR2DL4*-Promotortranskripten und K*IR2DL3*-Promotortranskripten wurde in verschiedenen *in vitro* NK-Stadien ermittelt (**A**). Ebenfalls wurde in diesen NK-Differenzierungsstadien die Transkriptionsstärke von *NKT2DL4* und *NKT2DL3* bestimmt (**B**). Die Transkriptionsstärke der untersuchten Transkripte wurde mit Hilfe der Real-Time PCR ermittelt. Anschließend wurde auf GAPDH normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf HSC bzw. $CD34^+$/CD38+/$CD117^+$, oder $CD117^-$ Zellen bzw. HSCs bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall. Die Messung erfolgte zweimal. Die Real-Time PCR wurde in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

In den vorangegangenen Untersuchungen zur mRNA-Transkription von KIR im Verlauf der NK-Zellentwicklung konnte nachgewiesen werden, dass die Transkription von *KIR2DL4* im $CD56^+$/$CD117^+$ NK-Stadium begann. Weiter konnte im *in vitro* Modell die *KIR2DL3*-Transkription erst im KIR^+ NK-Zellen nachgewiesen werden.

Um mehr über die Regulation der *KIR*-Gene zu erfahren, wurde die Transkription von *KIR2DL3*- und *KIR2DL4*-Promotortranskripten im Verlauf der NK-Zellentwicklung untersucht. Diese Transkripte lagen im betrachteten *KIR*-Promotor (siehe Anhang). *KIR2DL4*-Promotortranskripte konnten schwach in $CD34^+$/$CD38^+$/$CD117^-$ Zellen nachgewiesen werden. Im Verlauf der weiteren NK-Entwicklung kam es zu einer ansteigenden Transkription des Promotortranskriptes (Abb. 48).

Die bestimmten nichtcodierenden Transkripte (NKT) beginnen im KIR-Promotor des untersuchten *KIR*-Gens und reichten in den codierenden Bereich hinein. Genaueres ist dem

Anhang zu entnehmen. Ein *NKT2DL4* konnte bereits sehr früh während der NK-Differenzierung identifiziert werden (Abb. 48). Es ist bereits in CD34-Zellen nachweisbar und verharrt auf niedrigen Niveau. Erst in NK-Zelle die $CD56^+/CD117^-$ kam es zu einem Anstieg des Transkriptes im Vergleich zu den vorrangegangenen NK-Stadien. Die Transkription stieg in den anschließenden NK-Stadien weiter an und erreichte ihr Maximum im KIR^+ NK-Zellen.

Neben Unterschieden in der *KIR2DL4*-Transkription wurden auch Promotortranskripte und NKTs von *KIR2DL3* im Verlauf der NK-Zellentwicklung untersucht. Ein *KIR2DL3*-Promotortranskript konnte schwach im $CD34^+/CD38^+/CD117^+$ Stadium nachgewiesen werden. Es kam in $CD56^+/CD117^-$ NK-Zellen zu einem Anstieg des *KIR2DL3*-Promotortranskriptes. Das Transkript verblieb auf diesem Niveau bis einschließlich des $NKG2A^+$ Stadiums. Die stärkste *KIR2DL3*-Promotortranskription konnte im KIR^+ NK-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 48). Die Transkription des *NKT2DL3*-Transkriptes erfolgte sehr schwach im $CD34^+/CD38^+/CD117^+$ Stadium. Die Transkriptionsstärke änderte sich im Verlauf der Entwicklung bis zum $CD56^+/CD117^+$ Stadium nicht, stieg jedoch im $CD56^+/CD117^-$ Stadium an. Auch im $NKG2A^+$ NK-Zellen war wiederum ein leichter Anstieg der Transkriptionsrate zu identifizieren. Der stärkste Anstieg in der Transkription des *NKT2DL3* war in KIR^+ NK-Zellen nachweisbar.

3.6.6 Nachweis von *KIR*-Promotortranskripten und NKTs in $CD56^{brigh}$ NK-Zellen

Nichtcodierende Transkripte für *KIR2DL3* wie auch *KIR2DL3*-Promotortranskripte konnten nicht nur im Verlauf einer *in vitro* NK-Zellkultur nachgewiesen werden sondern auch in $CD56^{bright}$ NK-Zellen. Die untersuchten $CD56^{bright}$ NK-Zellen wiesen keine Oberflächenexpression von klonotypischen KIRs auf, da KIR^- $CD56^{bright}$ NK-Zellen aus dem Nabelschnurblut isoliert wurden.

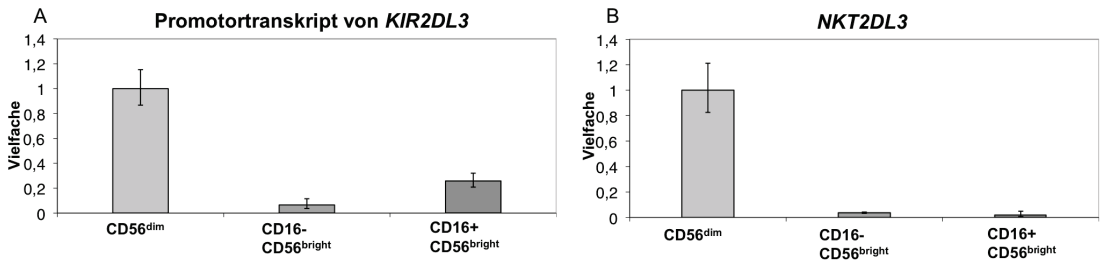


Abb. 49: Aus dem Nabelschnurblut wurden CD56^{dim}, CD16^{+} CD56^{bright} und CD16^{-} CD56^{bright} NK-Zellen isoliert. Die isolierten CD56^{bright} NK-Zellen wiesen keine Oberflächenexpression von KIR auf. Anschließend wurde die Transkription des *KIR2DL3*-Promotortranskripts (**A**) und des *NKT2DL3* (**B**) in den zuvor isolierten NK-Zellen mittels Real-Time PCR bestimmt. Für die Auswertung der Daten wurde auf GAPDH normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf CD56^{dim} NK-Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall. Die Real-Time PCR wurde in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die Promotor- und NKT-Transkripte für *KIR2DL3* waren in den CD56^{dim} NK-Zellen am stärksten ausgeprägt (Abb.49). CD16^{-} CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen wiesen nur eine sehr schwache Transkription vom *KIR2DL3*-Promotortranskript auf. Eine Transkription vom *NKT2DL3* konnte weder in CD16^{-} noch in CD16^{+} CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den CD16^{-} CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen konnte in CD16^{+} CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen ein Anstieg des *KIR2DL3*-Promotortranskripts beobachtet werden. Die Transkriptionsstärke lag jedoch unter dem Trankriptionsniveau von CD56$^{\mathbf{dim}}$ NK-Zellen. Weiter konnte nur in den CD56$^{\mathbf{dim}}$ NK-Zellen eine *NKT2DL3* Transkription nachgewiesen werden.

3.6.7 Nachweis eines NKT für *KIR3DL1* in einfach KIR^{+} NK-Zellen

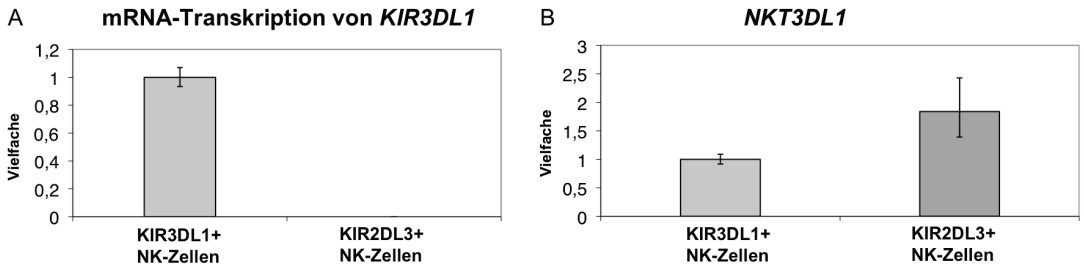


Abb. 50: Aus dem Nabelschnurblut wurden einfach KIR3DL1^{+} oder einfach KIR2DL3^{+} NK-Zellen isoliert. In diesen beiden NK-Zellpopulationen wurde die mRNA-Transkription von *KIR3DL1* nachgewiesen (**A**). Weiter wurde die Transkription des *NKT3DL1* (**B**) in den NK-Zellpopulationen untersucht. Die Messung erfolgte mittels Real-Time PCR. Anschließend wurde auf GAPDH normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf KIR3DL1^{+} NK-Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall. Die Real-Time PCR wurde in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Das Zusammenspiel der codierenden und nichtcodierenden Transkripte wurde in einfachpositiven KIR3DL1-exprimierenden NK-Zellen analysiert (Abb. 50). *KIR3DL1*-Transkripte konnten nur in einfach KIR3DL1^{+} NK-Zellen nachgewiesen werden

und sind abwesend in den einfach KIR2DL3^{+} NK-Zellen. Die Transkription des *NKT3DL1* ist in KIR3DL1-exprimierenden NK-Zellen schwächer ausgeprägt als in den KIR2DL3-exprimierenden NK-Zellen.

3.6.8 Identifikation eines putativen KIR-Promotors im Intron zwischen Exon4 und Exon5 des *KIR2DL3*-Gens

Bei der Analyse des *KIR2DL3*-Gens fällt eine signifikante Häufung an CpGs im Intron zwischen Exon4 und Exon5 auf. Dies könnte auf eine epigenetische Regulation dieser Region hinweisen. Daher wurde mittels Promotoranalyse-Software bestimmt, ob im Intron zwischen Exon4 und Exon5 ein Promotor liegen könnte. Die Untersuchung dieser Region ergab, dass der Verdacht begründet war. Des Weiteren waren im Intron4 unterschiedliche Repetetiveelemente nachweisbar. Möglicherweise war diese Region der Ursprung des zuvor beschriebenen *NKT2DL3*. Die Promotoranalyse ist aus dem Anhang zu entnehmen.

Im Verlauf einer NK-Zellentwicklung kam es zunächst zur Transkription des *framework* KIRs *KIR2DL4* im CD56^{+}/CD117^{+} NK-Stadium. In diesem Stadium kam es auch zur Demethylierung des *KIR2DL4*-Promotors. In NK-Zellen, die CD56^{+}/CD117^{-} waren konnte die Transkription weitere *framework* KIRs (*KIR3DL3* und *KIR3DL2*) nachgewiesen werden. Erst in späten NK-Zellstadien kam es zur Transkription der klonotypischen KIRs. Auch wurden die klonotypischen und die *framework* KIRs nicht zeitgleich demethyliert. Zuerst wurde der *KIR2DL4*-Promotor im CD56^{+}/CD117^{+} NK-Zellen demethyliert. Eine Demethylierung im *KIR2DL3*-Promotor erfolgte in den CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen. So nahm die Methylierung im *KIR*-Promotor von den klassischen auf die CD16^{+} CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen ab. Entgegengesetzt verhielt sich das *KIR2DL3*-Transkript. Es wurde in CD56$^{\mathbf{dim}}$ NK-Zellen stark transkribiert. In den klassischen CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen kam es zu einer schwachen *KIR2DL3*-Transkription. Sie fiel stärker aus in CD16^{+} CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen, erreicht jedoch nicht das Niveau von CD56$^{\mathbf{dim}}$ NK-Zellen.

Für die KIR-Gene *KIR2DL3* und *KIR2DL4* konnten NKTs und Promotortranskripte im Verlauf der *in vitro* NK-Zellentwicklung nachgewiesen werden.

In CD16^{+}, als auch in CD16^{-} CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen konnte keine Transkription von NKT2DL3 bestimmt werden. Die Transkription des *KIR2DL3*-Promotortranskriptes stiegt jedoch von den klassischen zu den CD16^{+} CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen an.

3.7 Identifikation epigenetisch wirkender Proteine im Verlauf der NK-Zellentwicklung

Bisherige Arbeiten weisen auf eine zentrale Rolle der DNA-Methylierung für die klonale *KIR*-Genausprägung in NK-Zellen hin (Santourlidis et al., 2002). Nun stellt sich die Frage, wie diese Methylierungsmuster etabliert werden. Wie wird die Auswahl getroffen, dass ein bestimmtes *KIR*-Gen methyliert und somit repremiert vorliegt und ein anders demethyliert und folglich exprimiert werden kann? Daher wird in den unterschiedlichen NK-Entwicklungsstadien die Transkription epigenetisch wirkender Faktoren analysiert, welche einen Einfluss auf die Methylierung (DNMTs) oder auf die Demethylierung (GADD45) haben.

Zunächst wird die Transkription der unterschiedlichen DNMTs im Verlauf einer NK-Zellentwicklung beschrieben.

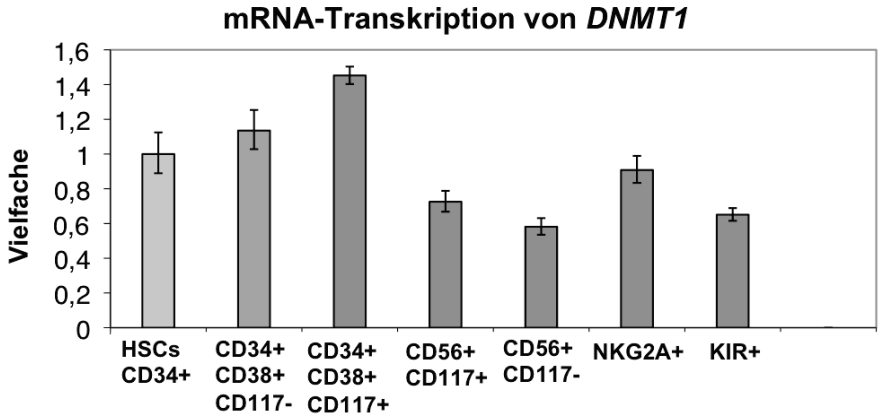


Abb. 51: Die mRNA-Transkriptionsstärke von *DNMT1* wurde in ausgewählten *in vitro* NK-Entwicklungsstadien bestimmt. Der Nachweis der Transkriptionsstärke erfolgte unter Verwendung der Real-Time PCR. Anschließend wurde auf GAPDH normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf HSCs bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall. Die Real-Time PCR wurde in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die *DNMT1*-Transkription stieg zunächst während der Entwicklung der NK-Zelle bis zum $CD34^+/CD38^+/CD117^+$ Stadium um ca. 40% an. Anschließend sank die Transkriptionsstärke von *DNMT1* auf ca 60% des ursprünglichen Niveaus in $CD56^+/CD117^-$ NK-Zellen ab. Es kam zu einem leichten Anstieg der DNMT1-Transkription in $NKG2A^+$ NK-Zellen auf ca. 80% der ursprünglichen Transkriptionsstärke und verringerte sich wieder auf 60% im KIR^+ NK-Zellen (Abb. 51).

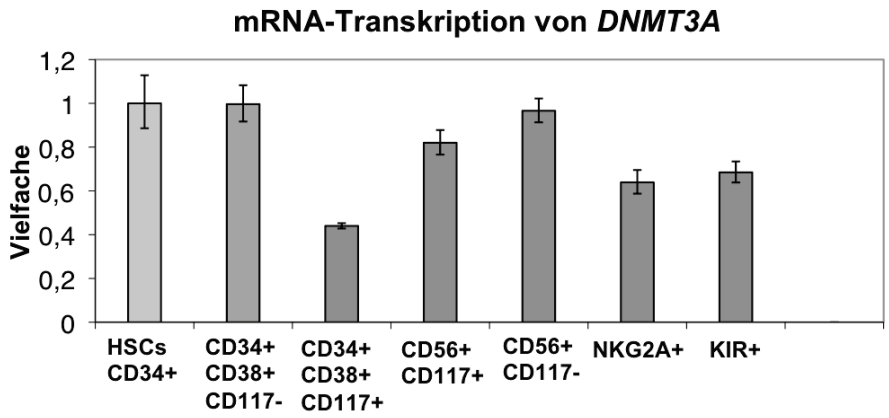


Abb. 52: Die mRNA-Transkriptionsstärke von *DNMT3A* wurde in ausgewählten *in vitro* NK-Entwicklungsstadien bestimmt. Der Nachweis der Transkriptionsstärke erfolgte unter Verwendung der Real-Time PCR. Anschließend wurde auf GAPDH normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf HSCs bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall. Die Real-Time PCR wurde in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Das Experiment wurde dreimal wiederholt.

Eine Transkription von *DNMT3A* war in HSC nachweisbar. Eine Verminderung auf 40% der ursprünglichen Transkriptionsstärke von *DNMT3A* war im $CD34^+/CD38^+$ /$CD117^+$ NK-Stadium feststellbar. Anschließend kam es zu einem Anstieg der *DNMT3A*-Trankription in $CD56^+/CD117^-$ NK-Zellen um in $NKG2A^+$ NK-Zellen wieder auf ca. 70% abzufallen (Abb. 52).

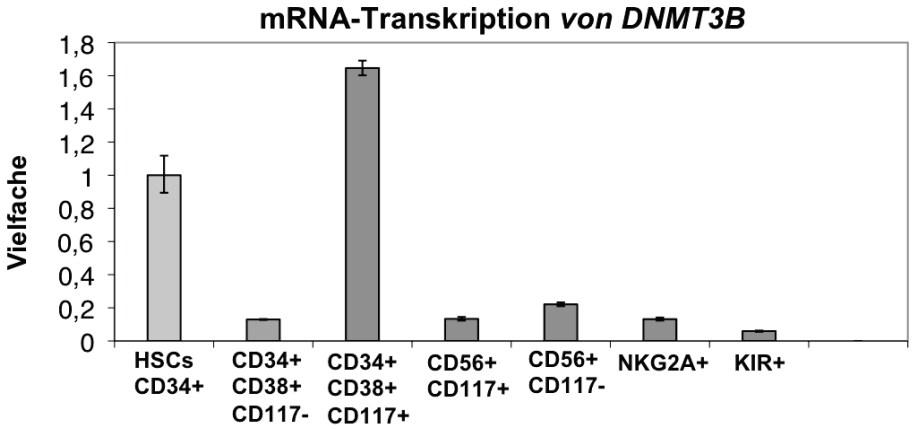


Abb. 53: Die mRNA-Transkriptionsstärke von *DNMT3B* wurde in ausgewählten *in vitro* NK-Entwicklungsstadien bestimmt. Der Nachweis der Transkriptionsstärke erfolgte unter Verwendung der Real-Time PCR. Anschließend wurde auf GAPDH normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf HSCs bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall. Es wurden zwei Experimente durchgeführt.

In HSC ist die Transkription von *DNMT3B* nachweisbar. Die Transkription fiel im $CD34^+/CD38^+/CD117^-$ NK-Stadium auf ca. 20% des Ursprungsniveaus ab. Im $CD34^+/CD38^+/CD117^+$ Stadium kam es zu einem Anstieg der *DNMT3B*-Transkription auf eine ca. 60% stärkere Transkription als im Vergleich zur HSC. Im anschließenden Stadium erfolgte ein deutliches Absinken der Transkriptionsstärke von *DNMT3B* und erreichte 20%

des ursprünglichen Niveaus in CD56$^+$/CD117$^-$ NK-Zellen. Diese Transkriptionsstärke blieb erhalten und sank in KIR$^+$ NK-Zellen noch einmal leicht (Abb. 53).

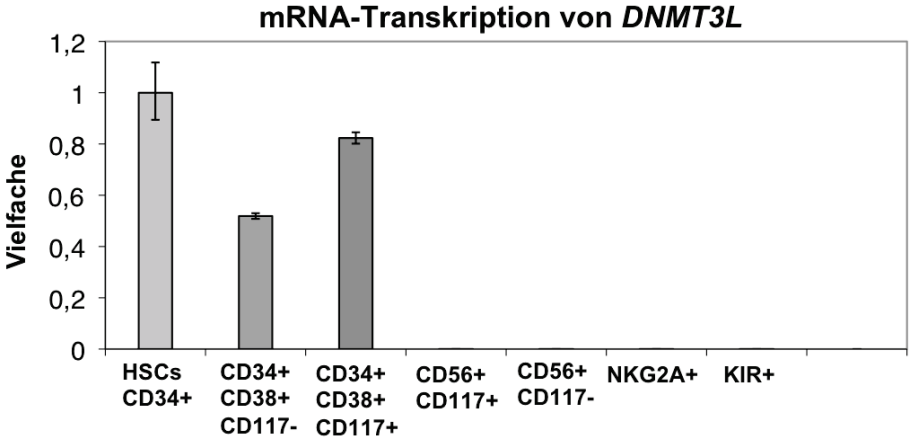


Abb. 54: Die mRNA-Transkriptionsstärke von *DNMT3L* wurde in ausgewählten *in vitro* NK-Entwicklungsstadien bestimmt. Der Nachweis der Transkriptionsstärke erfolgt unter Verwendung der Real-Time PCR. Anschließend wurde auf GAPDH normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf HSCs bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall. Die Messung wurde zweimal durchgeführt. Die Real-Time PCR wurde in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die Transkription von *DNMT3L* unterschied sich deutlich von der Transkription der anderen untersuchten DNMTs. Eine Transkription von *DNMT3L* konnte nur während der frühen Phase der NK-Entwicklung nachgewiesen werden. Wenn CD56-Expression nachweisbar war, endet die Transkription von DNMT3L (Abb. 54).

Zunächst wurde die mRNA-Transkription der epigenetischen Faktoren bestimmt, welche das DNA-Methylierungsmuster aufrechterhalten oder aber *de novo* Methylierung erzeugen können. Anschließend wurde die mRNA-Trankription von Mitgliedern der GADD45-Familie im Verlauf der NK-Zellentwicklung verfolgt. Es wird vermutet das GADD45 eine putative DNA Demethylase ist.

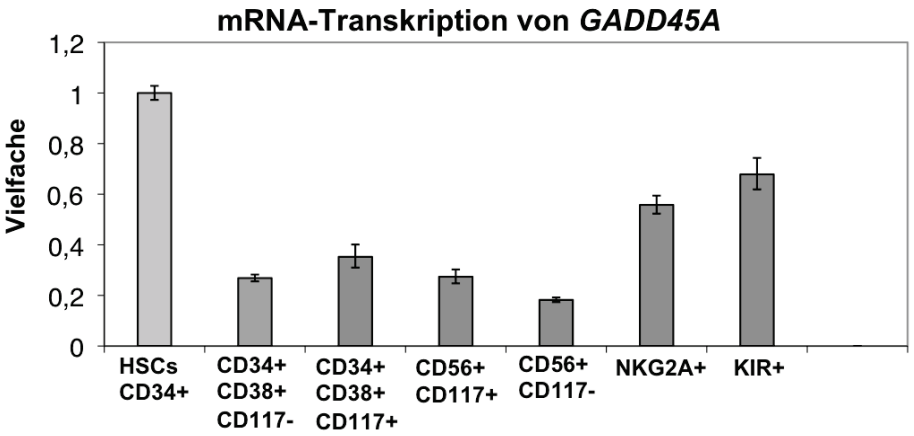


Abb. 55: Die mRNA-Transkriptionsstärke von *GADD45A* wurde in ausgewählten *in vitro* NK-Entwicklungsstadien bestimmt. Der Nachweis der Transkriptionsstärke erfolgte unter Verwendung der Real-Time PCR. Anschließend wurde auf GAPDH normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf HSCs bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall. Die Messung wurde zweimal wiederholt. Die Real-Time PCR wurde in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die stärkste Transkription von *GADD45A* konnte in HSCs nachgewiesen werden. Im anschließenden NK-Zellstadium kam es zu einer Verringerung der Transkription auf ca. 20% des ursprünglichen Niveaus. Auf diesem Niveau verharrte die Transkription. In NKG2A$^+$ NK-Zellen stieg das Transkriptionsniveau auf 60% des ursprünglichen Niveaus an. In KIR$^+$ NK-Zellen stieg die GADD45A-Transkription im Vergleich zu NKG2A$^+$ NK-Zellen weiter leicht an (Abb. 55).

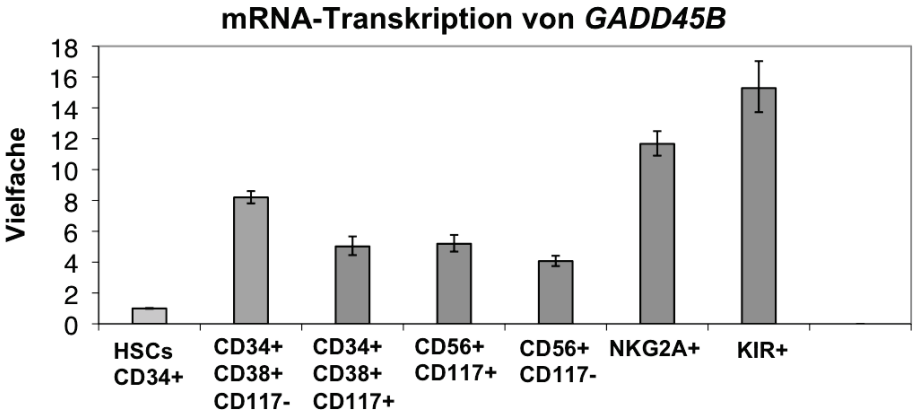


Abb. 56: Die mRNA-Transkriptionsstärke von *GADD45B* wurde in ausgewählten *in vitro* NK-Entwicklungsstadien bestimmt. Der Nachweis der Transkriptionsstärke erfolgt unter Verwendung der Real-Time PCR. Anschließend wurde auf GAPDH normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf HSCs bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall. Die Messung wurde zweimal durchgeführt. Die Real-Time PCR wurde in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die Transkription von *GADD45B* war in HSC schwach ausgeprägt. Es kam im $CD34^+/CD38^+/CD117^-$ Stadium zu einem Anstieg der *GADD45B*-Transkription auf das Neunfache des ursprünglichen Niveaus in HSCs. Die Transkription verringerte sich im $CD34^+/CD38^+/CD117^+$ Stadium leicht und verblieb auf diesem Transkriptionsniveau bis einschließlich des $CD56^+/CD117^-$ Stadiums. Wie schon bei *GADD45A* beobachtet, kam es auch bei *GADD45B* zu einem Anstieg der Transkription in $NKG2A^+$ NK-Zellen. Die Transkription stieg weiter in KIR^+ NK-Zellen im Vergleich zu $NKG2A^+$ NK-Zellen an. Die Transkription von *GADD45B* war in KIR^+ NK-Zellen ca. 16mal höher als in HSC (Abb. 56).

3.8 Etablierung eines lentiviralen Systems zur effizienten Infektion von HSCs und NK-Zellen

Mit Hilfe eines lentiviralen Infektionssystems können effizient und stabil Gene in einer Zielzelle shRNA-vermittelt ausgeschaltet werden. Da reife NK-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Abwehr gegen Viren spielen, sind sie nur sehr schwer zu infizieren. Daher muss ein hoch effizientes lentivirales System entwickelt werden, um reife NK-Zellen infizieren zu können.

Zuerst wurde der Einfluss des HBS-Puffers auf die Transfektionseffizienz des Systems und dadurch auf die Menge an produzierten Viren bestimmt. Auch die Zahl der Virusernten hat einen Einfluss auf die Zahl der lentiviralen Partikel.

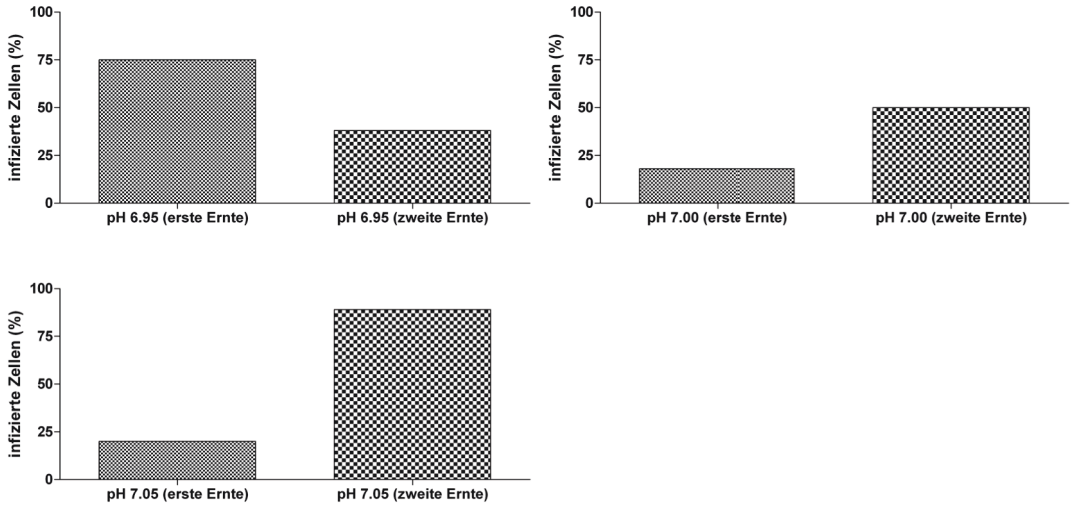


Abb. 57: Lentiviren wurden von transfizierten 293T-Zellen produziert. Zur Transfektion der 293T-Zellen wurden unterschiedliche pH-Werte des HBS-Puffers verwendet (pH6,95; pH7; pH7,05). Die 293T-Zellen wurden mit Vektoren transfiziert, welche für die Virusproduktion erforderlich waren. Daher war es für den Erfolg der Virusproduktion notwendig möglichst viele Zellen mit allen für die Virusproduktion benötigten Vektoren zu transfizieren. Deswegen war es wichtig für jede HBS-Charge die optimalen Virusproduktionsbedinungen zu testen. Die Ernte der Viren erfolgte für jeden HBS-Puffer am vierten Tag. Die zweite Virusernte erfolgte am fünften Tag. Für jede Charge des HPS-Puffers musste überprüft werden, ob man die erste Virusernte verwendet oder die erste und zweite Virusernte vereinigte. Um die Effizienz der Virusproduktion zu testen, wurden NK3.3 mit den produzierten Viren infiziert. Nach einer Woche wurde die Infektionsrate durchflusszytometrisch bestimmt. Dies war möglich, da infizierte Zellen das vom Virus übertragene Reportergen eGFP exprimieren.

Aus Abb. 57 geht hervor, dass der pH-Wert des HBS-Puffers einen großen Einfluss auf die Virusproduktion hatte. Für jede Puffer-Charge musste bestimmt werden, welche H_3O^+-Konzentration die Beste für die Virenproduktion war. Die Infektionsrate lies sich weiter verbessern, indem für jeden pH-Wert bestimmt wurde, ob ein oder zwei Virusernten durchgeführt werden mussten.

Abhängig vom pH-Wert war der Virusüberstand vom ersten oder zweiten Tag infektiöser. Durch Kombinieren der Überstände von beiden Tagen konnte die Infektiosität weiter gesteigert werden, da die Virenmenge anstieg, wenn am ersten und zweiten Tag viele Viren von den Zellen freigesetzt wurden. Um den HPS-Puffer zu testen wurden NK3.3 mit Viren, die einen eGFP-Vektor in sich trugen, aus den verschiedenen Produktions-Chargen infiziert und eine Woche nach Infektion wurde die Infektionsrate durchflusszytometrisch bestimmt.

Für das hier dargestellte Experiment ergab sich, dass mit pH6,95 die optimale Infektionsrate erreicht wurde, wenn man den Virus nur am ersten Tag erntete und ihn nicht mit der zweiten Ernte vereinte. Ein anderes Bild zeigte sich bei pH7. Hier kam es zu einer schwachen Infektion von NK3.3 mit der ersten Virusernte. Wenn man die erste und zweite Virusernte vereinte, stieg die Infektionsrate von 18% auf 50% an. Sie lag jedoch unter der des HBS-

Puffers mit einem pH-Wert von 6,95. Hier lag die höchste Infektionsrate bei 73%. Die stärkste Infektionsrate konnte mit dem HBS-Puffer pH7,05 und zwei Ernten erreicht werden. Hier wurden 93% der NK3.3 infiziert.

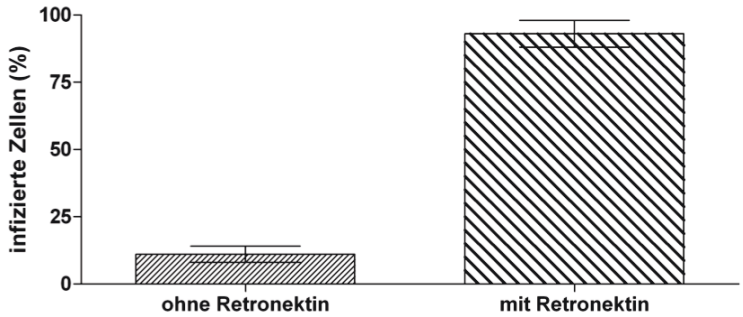


Abb. 58: NK3.3 wurden auf mit Retronektin beschichteten und auf unbehandelten Platten ausplattiert und anschließend mit einem eGFP-Virus infiziert. Die Infektionsrate wurde eine Woche nach Infektion durch die durchflusszytometrische Messung der eGFP-exprimierenden Zellen bestimmt. Die Messung wurde dreimal durchgeführt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung.

Um Suspensionszellen effizient transduzieren zu können, wurden Platten vor der Infektion mit Retronektin beschichtet (Abb. 58). Eine effiziente Infektion von Zielzellen war bei Suspensionszelle ohne Verwendung von Retronektin nicht möglich. Die Infektionsrate sank von 90% auf 10%.

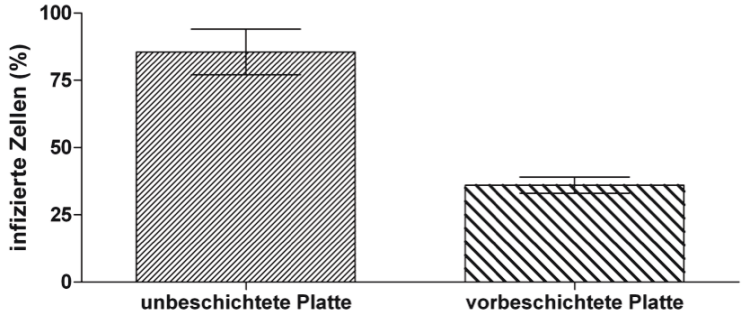


Abb. 59: Um den Einfluss der gewählten Zellkulturplatte auf die Infektionsrate zu bestimmen wurden Suspensionskulturplatten (unbeschichtet) bzw. Zellkulturplatten (vorbeschichtet) mit Retronektin behandelt. Anschließend wurden NK3.3 mit einem eGFP-Virus infiziert und eine Woche nach Infektion wurde die Zahl eGFP-exprimierender Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung.

Auch die Wahl der richtigen Platte, die mit Retronektin beschichtet worden war, war von entscheidender Bedeutung für die Infektionsrate (Abb. 59). Es war wichtig darauf zu achten, ob man unbeschichtete oder beschichtete Platten für die Infektion verwendete, denn bei Verwendung von beschichteten Platten konnte das Retronektin nicht optimal binden und als

Folge daraus wurden die Viruspartikel und die Zielzellen nicht optimal gebunden. Dadurch kam es zu einer Verminderung der Infektionsrate, da Viren und Zellen nicht optimal räumlich zusammengeführt werden konnten. Nur bei Gebrauch von unbeschichteten Platten war gewährleistet, dass das Retronektin optimal an den Plattenboden binden konnte. Daraus resultierte, dass die Zielzellen und Viren an das Retronektin binden konnten, wodurch sich die Infektionsrate deutlich verbesserte. Bei Verwendung von unbeschichteten Platten kam es zu einer Infektionsrate von 79%. Wurden jedoch beschichtete Platten verwendet, sank die Infektionsrate auf 40%.

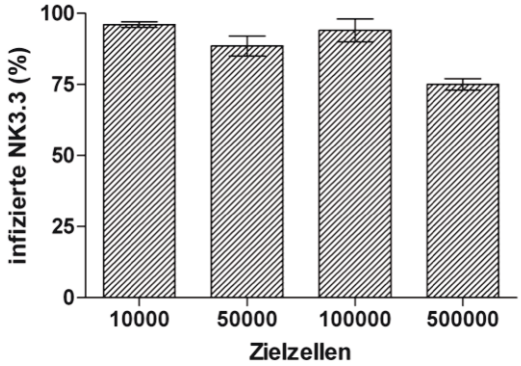


Abb. 60: Auf eine mit Retronektin beschichtete Platte wurden 10.000, 50.000, 100.000 und 500.000 NK3.3 auspalttiert. Nachdem die NK3.3 auf den Wellboden abgesunken waren, wurde zu den NK3.3 die gleiche Menge Virusüberstand zugegeben. Die Infektionsrate wurde eine Woche nach Infektion durchflusszytometrisch ermittelt, indem die eGFP-Expression der infizierten Zellen bestimmt wurde. Es wurden zwei Experimente durchgeführt (n=2). Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung.

Ein weiterer wichtiger Einfluss auf die Infektionsrate hatte das Verhältnis von Viruspartikeln und Zielzellzahl (Abb. 60). Dazu wurden unterschiedliche Mengen an Zielzellen auf Retronektin beschichteten Platten ausplattiert und anschließend mit der identischen Virusmenge behandelt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen 10.000 und 100.000 zu infizierenden Zielzellen nachgewiesen werden. Erst wenn die Zahl an Zielzellen auf 500.000 angehoben wurde, sank die Infektionsrate von 95% auf 75% ab.

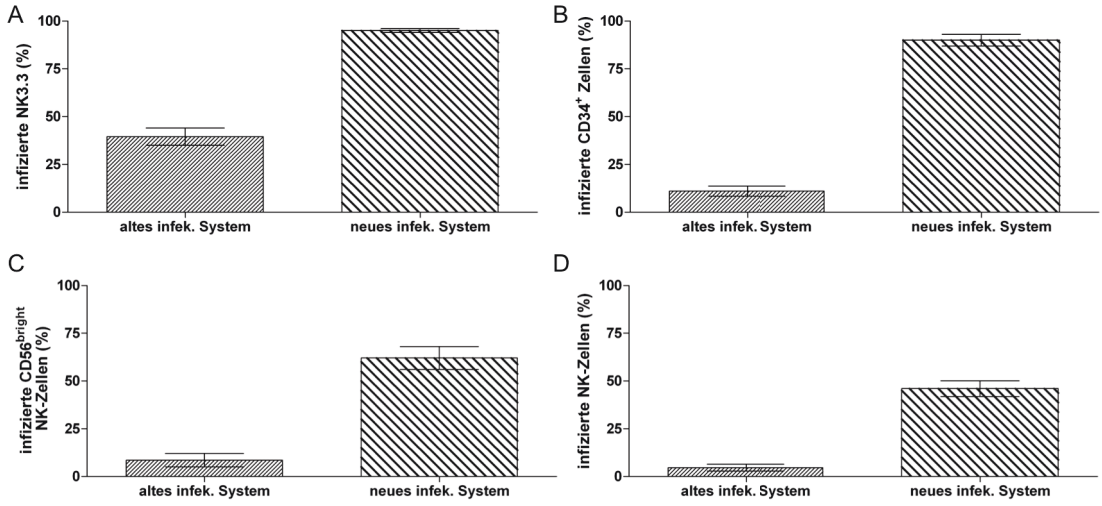


Abb. 61: Viren die mit dem alten und dem neuetablierten Virusproduktionsverfahren erzeugt wurden, wurden verwendet, um NK3.3, (**A**) CD34 (**B**), CD56^{bright} NK-Zellen (**C**) und NK-Zellen (**D**) zu infizieren. Die Zellen wurden zuvor auf retronektin-beschichteten Platten ausplattiert. Die Infektionsrate wurde eine Woche nach Infektion durch Messung der eGFP-Expression in den infizierten Zellen bestimmt (n=2). Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung.

Deutlich schwieriger als Zelllinien sind primäre Zellen zu infizieren (Abb. 61). Daher wurden nicht nur NK3.3 sondern auch primäre Zellen als Zielzellen einer Infektion verwendet. Neben HSCs wurden auch NK-Zellen infiziert. Das für diese Arbeit optimierte lentivirale System wurde mit dem in der Arbeitsgruppe vorhandene Virussystem verglichen. Im Virusproduktionssystem, das in der Arbeitsgruppe etabliert war, wurden die für die Virusproduktion benötigten Plasmide mittels Lipofektion in ihre Zielzelle eingebracht. Diese Methode wurde im neuen Infektionssystem, durch eine calciumphosphatvermittelte Tranfektion ersetzt.

Mit dem verbesserten lentiviralen System ließen sich effizient HSCs infizieren. Dies war für spätere Versuche erforderlich, um in HSCs Gene zu reprimieren. Diese HSCs wurden dann zu NK-Zellen auszudifferenzieren. Die Infektionsrate lag immer im Bereich von 80-90% mit dem neuen Lentiviralensystem.

Ebenfalls ließen sich auch gut CD56^{bright} NK-Zellen infizieren. Die Infektionsrate lag in diesen Zellen im Bereich von 60-70%. Etwas schlechter wurden NK-Zellen infiziert, die KIR-exprimieren. In diesen Zellen lag die Infektionsrate zwischen 40-50%. Die Infektionsrate reichte bei den ausgewählten primären Zellen aus, um das in dieser Arbeit neu etablierte lentivirale Infektionssystem für weitere Versuche zu verwenden. Verglichen mit dem Infektionssystem, welches ursprünglich vorhanden war, konnte bei jeder gewählten Zielzelle eine deutliche Steigerung der Infektionsrate beobachtet werden.

3.9 Beeinflussung der KIR-Expression mittels RNAi

Die DNA-Methylierung spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der *KIR*-Gene. Für die DNA-Methylierung sind die DNMTs verantwortlich. Da die Transkription von *DNMT3L* nur zu Beginn einer NK-Zellentwicklung nachweisbar war, wurde sie nicht inhibiert. Die verbliebenen DNMTs wurden mittels shRNA im Verlauf einer NK-Zellgenerierung in ihrer Transkription inhibiert. Dadurch sollte geklärt werden, welche Rolle die verschiedenen DNMTs im Verlauf einer NK-Entwicklung auf die KIR-Expression hatten.

Neben den DNMTs wurden auch *KIR2DL4* und *KIR2DL3* in ihrer Transkription inhibiert. Aus den vorherigen Versuchen ging hervor, dass *KIR2DL4* der erste KIR war, welcher transkribiert wurde, dicht gefolgt von den übrigen *framework* KIRs. *KIR2DL4* gehört zu den KIRs, die in allen bekannten Genotypen vertreten sind. Er wird von jeder final differenzierten NK-Zelle transkribiert. Daher stellt sich die Frage, welche Rolle *KIR2DL4* für die Etablierung der Expression von KIR spielt. Hat die Reprimierung seiner Transkription einen Einfluss auf die KIR-Expression?

3.9.1 Nachweis der Funktionalität der verwendeten shRNAs gegen *DNMT*

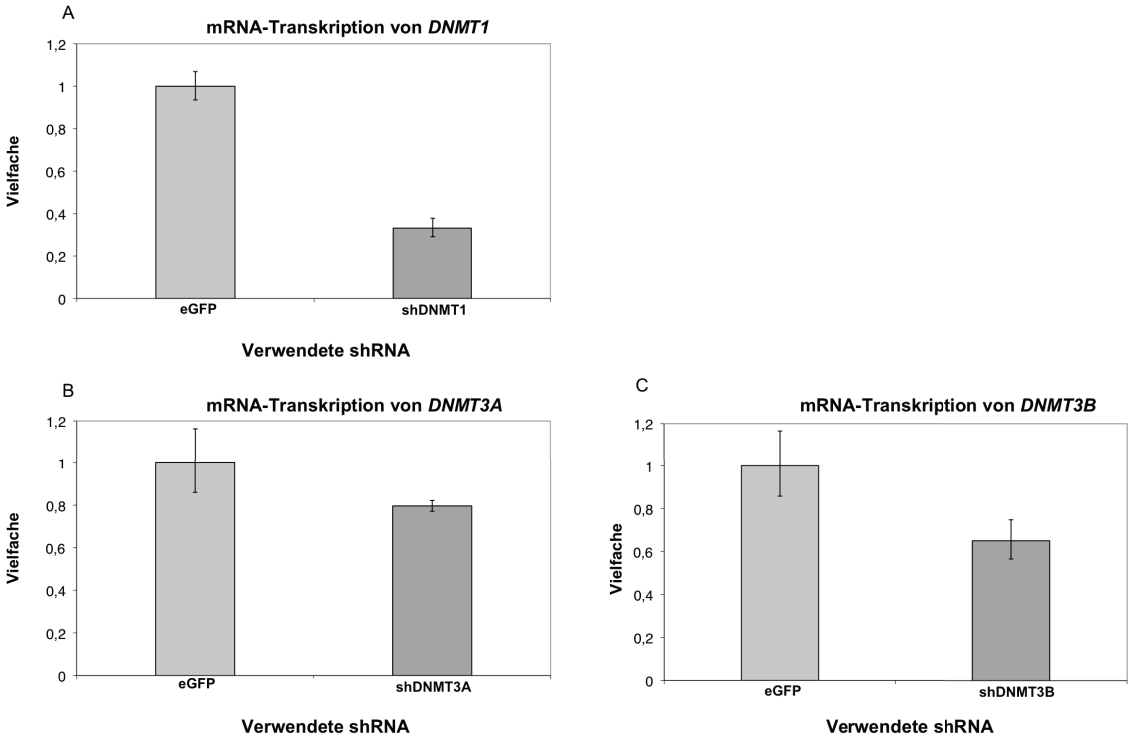


Abb. 62: NK3.3 wurden mit einem eGFP-Vektor bzw. mit einer shRNA gegen *DNMT1, DNMT3A* oder *DNMT3B* infiziert. Nach zwei Wochen wurde die mRNA-Transkription der DNMTs in den infizierten NK3.3 bestimmt. NK3.3 wurden mit einer shRNA gegen *DNMT1* (**A**) infiziert. Zur Kontrolle wurden NK3.3 Zellen mit einem eGFP-Leervektor transfiziert. Nach zwei Wochen wurde die *DNMT1* mRNA-Transkription in den infizierten Zellen gemessen. In (**B**) wurden NK3.3 mit einer shRNA gegen *DNMT3A* infiziert. Zur Kontrolle wurden NK3.3 Zellen mit einem eGFP-Leervektor transfiziert. Nach zwei Wochen wurde die *DNMT1* mRNA-Transkription in den infizierten Zellen gemessen. NK3.3 wurden in (**C**) mit einer shRNA gegen *DNMT3B* infiziert. Die *DNMT3B* mRNA-Transkription dieser Zellen wurden mit der *DNMT3B* mRNA-Transkription von NK3.3, die mit einem eGFP-Virus infiziert wurden, verglichen. Anschließend wurde auf GAPDH normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf eGFP infizierte Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall. Die Messung wurde dreimal wiederholt.

Die in dieser Arbeit verwendeten shRNAs wurden vor ihrer Verwendung auf Funktionalität in NK3.3 überprüft (Abb. 62). Dazu wurden NK3.3 mit einem Foamyvirus infiziert, der die entsprechende shRNA in sich trug, und die Transkription des zu interferierenden Gens wurde nach zwei Wochen bestimmt. Als Kontrolle dienten NK3.3, welche mit einem eGFP-Virus infiziert wurden. Dieser eGFP-Virus enthielt nur einen Leervektor.

Aus Abb. 62 geht hervor, das shDNMT1 und shDNMT3B im Vergleich zur eGFP-Kontrolle die Transkription des zu reprimierenden Gens verminderten.

NK3.3, welche mit einer shRNA gegen *DNMT1* infiziert wurden, wiesen eine um ca. 60% reduzierte *DNMT1*-Transkription auf. Die mRNA-Transkription von *DNMT3A* konnte, wenn überhaupt nur sehr schwach vermindert werden. Eine um 40% verminderte mRNA-

Transkription konnte in NK3.3 erzielt werden, die mit einer shRNA gegen *DNMT3B* infiziert wurden.

3.9.2 Reprimierung der *DNMT*-Transkription während der NK-Zellentwicklung führt zu einem Anstieg an KIR$^+$ NK-Zellen

HSCs wurden vor Beginn einer NK-Entwicklungskultur mit Lentiviren infiziert, welche die Transkription von *DNMT1* oder *DNMT3B* reduzierten. Es sollte untersucht werden, ob die DNMTs eine Rolle bei der Etablierung der KIRs spielen. Die Transduktion der HSCs mit shRNAs gegen DNMTs hatte keinen Einfluss auf die Entwicklungskultur in ihrer Fähigkeit HSCs zu NK-Zellen auszudifferenzieren.

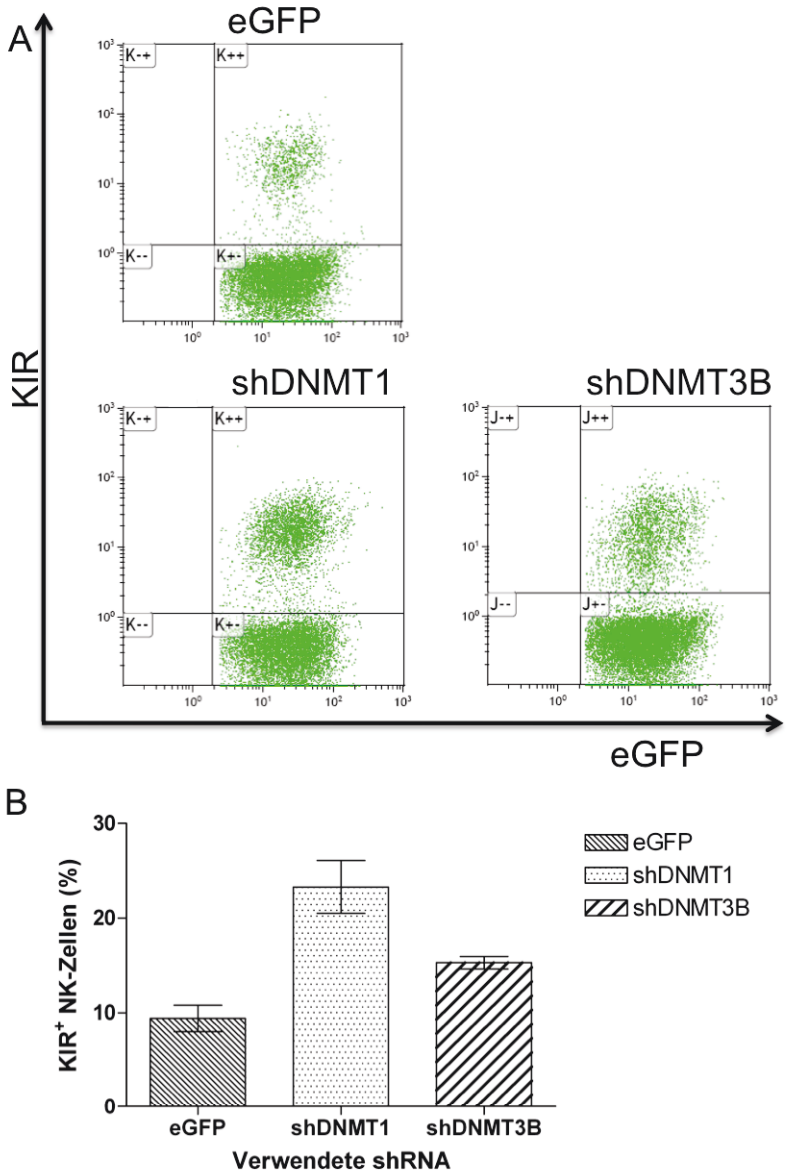


Abb. 63: Die Expression von KIR wurde in der fünften Woche einer *in vitro* NK-Entwicklungskultur analysiert. HSCs wurden zu Beginn der NK-Generierung lentiviral mit eGFP bzw. einer funktionalen shRNAs gegen *DNMT1* oder *DNMT3B* infiziert. Der Einfluss der verminderten Transkription der *DNMTs* auf die KIR-Expression sollte untersucht werden. Dazu wurde die KIR-Expression von NK-Zellen, die ein eGFP-Transkript (Kontrolle) tragen, mit der KIR-Expression von NK-Zellen verglichen, in denen die Transkription von *DNMT1* oder *DNMT3B* vermindert wurde. Die Expression der KIRs wird durchflusszytometrisch bestimmt, indem die KIR-Expression der eGFP$^+$ NK-Zellen ermittelt wurde (**A+B**). Das Experiment wurde dreimal durchgeführt n=3. In B ist der Mittelwert und die Standardabweichung dargestellt.

HSCs, in denen die Transkription von *DNMT1* vermindert wurde, wiesen eine deutlich gesteigerte KIR-Expression auf. NK-Zellen, die einen eGFP-Virus in sich trugen, exprimierten ca. 10% KIR auf ihrer Zelloberfläche. Wurde die *DNMT1* in ihrer Transkription vermindert, trugen ca. 25% KIR auf ihrer Zelloberfläche. Ein ähnliches Bild ergab sich ebenfalls in den HSCs, in denen die Transkription von *DNMT3B* vermindert wurde. Auch in diesen Zellen konnte eine gesteigerte KIR-Expression nachgewiesen werden. Eine

Reprimierung der *DNM3B*-Transkription bewirkte eine KIR-Expression von ca. 18%. Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass es durch die Reprimierung der *DNMT*-Transkription zu einem Anstieg an KIR^+ NK-Zellen im Vergleich zur Kontrollinfektion kam (Abb. 63).

3.9.3 ShRNA vermittelte Modulation der KIR-Expression in NK3.3

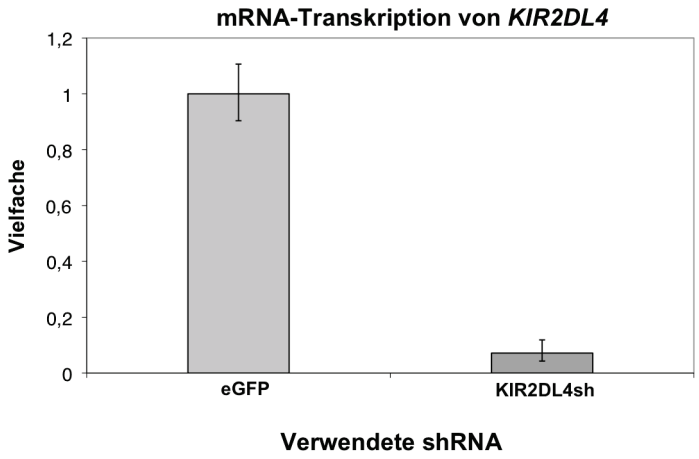


Abb. 64: NK3.3 wurden mit einer shRNA gegen *KIR2DL4* infiziert. Zur Kontrolle wurden NK3.3 Zellen mit einem eGFP-Leervektor transfiziert. Nach zwei Wochen wurde die *KIR2DL4* mRNA-Transkription in den infizierten Zellen gemessen. Für die Datenauswertung wurde auf GAPDH normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf eGFP infizierte Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall (n=3).

Die Funktionalität der verschiedenen shRNAs gegen KIR wurde zunächst an NK3.3 ausgetestet. Die Ergebnisse dazu sind in Abb. 64 zu sehen. NK3.3 wurde mit shRNA gegen KIR2DL4 transduziert und nach zwei Wochen wurde die Transkription von *KIR2DL4* bestimmt. Die shRNA gegen *KIR2DL4* bewirkte eine Reduktion der Transkriptionsstärke um 90%, im Vergleich zur Kontrolle.

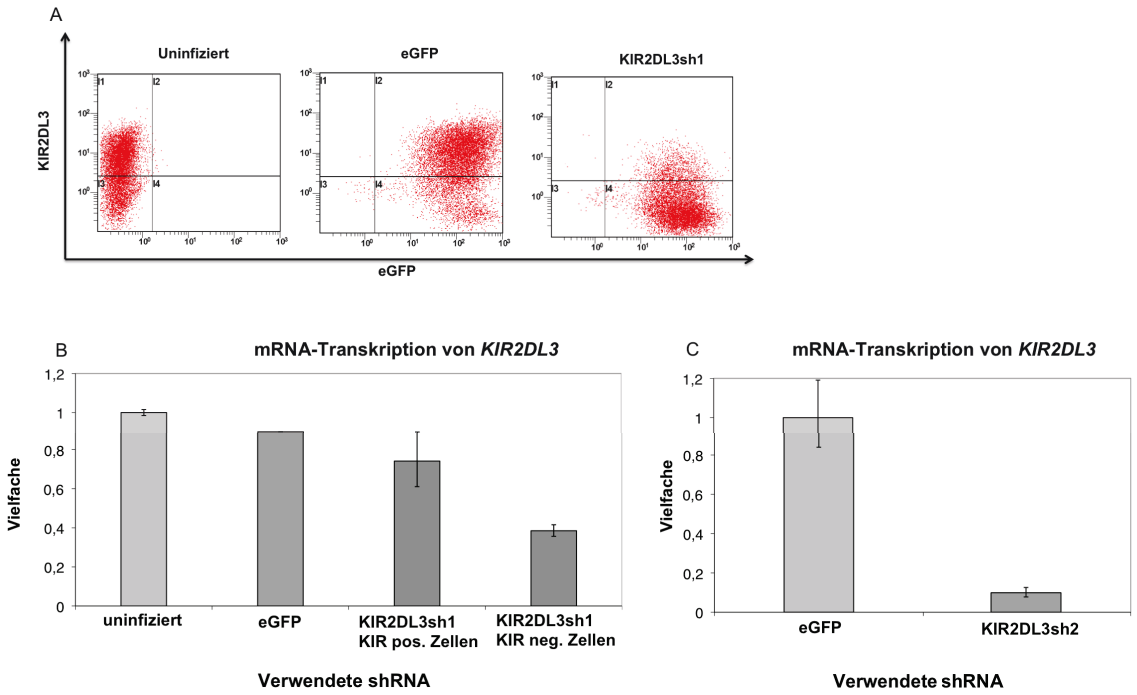


Abb. 65: Durchflusszytometrische Analyse der KIR2DL3-Expression von NK3.3 zwei Wochen nach Infektion mit einem Kontrollvirus bzw. einer shRNA gegen KIR2DL3 (**A**). In (**B**) ist die mRNA-Transkription von KIR2DL3 in den infizierten und uninfizierten NK3.3 zu sehen. Die analysierten Populationen wurden zuvor gesorted. (**C**) NK3.3 wurden mit einer alternativen shRNA gegen KIR2DL3 oder einem eGFP-Kontrollvirus infiziert. Die KIR2DL3 mRNA-Transkription wurde in beiden Proben zwei Wochen nach Infektion bestimmt. Die Messung der mRNA-Transkrition erfolgte mittels Real-Time PCR. Anschließend wurde auf GAPDH normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf uninfiziert (B) oder eGFP infizierte Zellen (C) bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall (n=3).

Die Funktionalität der KIR2DL3 shRNA wurde zunächst durchflusszytometrisch bestimmt. Im Vergleich zur Kontrollinfektion konnte eine Abnahme der KIR2DL3-Oberflächenexpression in den behandelten NK3.3 nachgewiesen werden.

Ein Vergleich der *KIR2DL3*-Transkription von Kontrollinfektionszellen und mit KIR2DL3sh behandelten Zellen sollte Aufschluss über den Grad der Inhibition des reprimierten Gens geben. NK3.3 wurden mit einer shRNA gegen *KIR2DL3* behandelt. Sowohl KIR^+ als auch KIR^- NK3.3 wurden aus dieser Kultur isoliert.

In den NK3.3 Zellen, die keine KIR-Expression auf der Zelloberfläche aufwiesen, wurde die *KIR2DL3*-Transkription auf ca. 40% der ursprünglichen Transkriptionsstärke reduziert. Dagegen war nur ein geringer Rückgang der *KIR2DL3*-Transkription nachweisbar, wenn KIRs auf der Zelloberfläche exprimiert wurden (Abb. 65). In NK3.3, welche mit einer KIR2DL3sh2 shRNA infiziert wurden, konnte die Transkription von *KIR2DL3* auf ca. 10% der ursprünglichen Transkriptionsstärke im Vergleich zur Kontrollinfektion reduziert werden (Abb. 65).

3.9.4 Beeinflussung der *KIR*-Transkription durch RNAi

Wie schon zuvor beschrieben, wurden unterschiedliche shRNAs verwendet, um die Transkription von *KIR2DL3* bzw. *KIR2DL4* zu reduzieren. Die Transkription von *KIR2DL3* und *KIR2DL4* konnte stark vermindert werden. Nun stellte sich die Frage, ob es durch eine deutliche Reduktion der KIR-Transkription im KIR-Modell zu einer Remethylierung des dazugehörigen *KIR*-Promotors kam. Daher wurde die Methylierung des *KIR*-Promotors nach vorheriger Reprimierung des zugehörigen KIRs bestimmt.

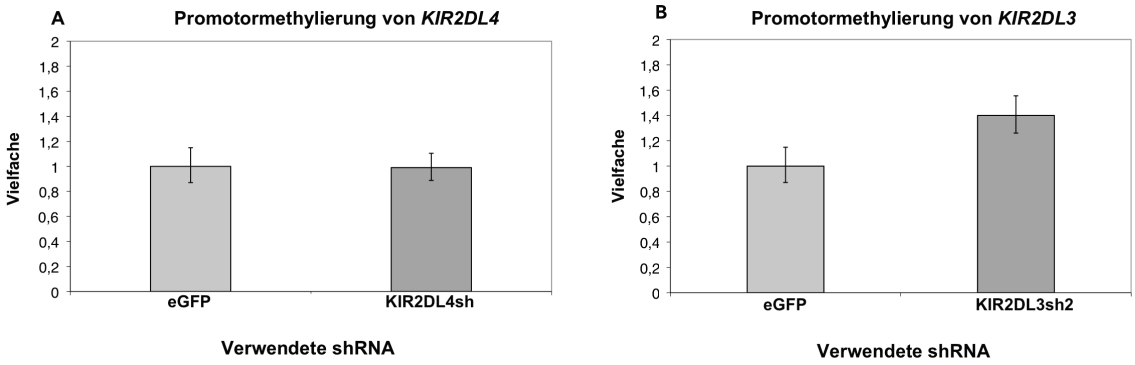


Abb. 66: NK3.3 wurden mit einem Kontrollvirus, einer shRNA gegen *KIR2DL4* oder einer shRNA gegen *KIR2DL3* infiziert. Durch die verwendeten shRNAs wurde die mRNA-Transkription der reprimierten KIRs vermindert. Von NK3.3, die mit einer shRNA gegen *KIR2DL4* transduziert wurden, wurde die Methylierung des *KIR2DL4*-Promotors bestimmt und mit der *KIR2DL4*-Promotormethylierung der Kontrollinfektion verglichen (**A**). Die *KIR2DL3*-Promotormethylierung wurde in NK3.3 analysiert, die mit einer shRNA gegen *KIR2DL3* transduziert wurden. Von NK3.3, die mit einer shRNA gegen *KIR2DL3* transduziert wurden, wurde die Methylierung des *KIR2DL3*-Promotors bestimmt und mit der *KIR2DL3*-Promotormethylierung der Kontrollinfektion verglichen (**B**). Anschließend wurde auf GSTP normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf mit eGFP infizierte Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall (n=2).

Die verwendete shRNA gegen *KIR2DL4*, welche eine Reduktion der *KIR2DL4*-Transkription zu Folge hatte, ist nicht in der Lage eine Remethylierung im des *KIR2DL4*-Promotors auszulösen (Abb. 66). Die Methylierung des *KIR2DL4*-Promotors in der Kontrolle lag auf einem vergleichbaren Niveau, wie die Methylierung des *KIR2DL4*-Promotors in den mit einer shRNAs gegen *KIR2DL4* behandelten NK 3.3.

In einem weiteren Versuch wurden NK3.3 mit der KIR2DL3sh2 shRNA gegen *KIR2DL3* behandelt, welche eine deutliche Reduktion der *KIR2DL3*-Transkription zur Folge hatte. Bei der Analyse des *KIR2DL3*-Promotors konnte ein Anstieg der Methylierung im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden, was auf eine Remethylierung des *KIR2DL3*-Promotors hindeutet kann (Abb. 66).

3.9.5 Einfluss der verminderten *KIR*-Transkription auf die Transkription von NKTs und Promotortranskripten

Durch die Transduktion von NK3.3 mit shRNAs gegen KIR und die dadurch erhaltene Reduktion der zugehörigen KIR-Expression stellt sich die Frage, welchen Effekt dies auf die Transkription des NKT und des *KIR*-Promotortranskriptes hat.

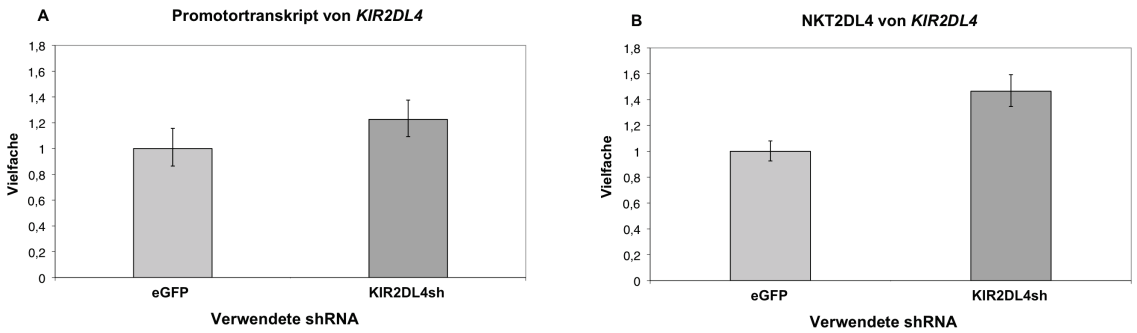


Abb. 67: Die *KIR2DL4* mRNA-Transkription wurde in NK33 durch eine shRNA gegen *KIR2DL4* vermindert. In diesen Zellen wurde die Transkription des *KIR2DL4*-Promotortranskriptes (**A**) und des NKT2DL4 (**B**) bestimmt und mit der Transkription dieser Transkripte in NK3.3 verglichen, die mit einem eGFP-Kontrollvirus infiziert wurden. Die Analyse wurde zwei Wochen nach Infektion durchgeführt. Die Messung der Transkripte erfolgte durch Real-Time PCR. Anschließend wurde auf GAPDH normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf mit eGFP infizierte Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall.

Zunächst wurden NK3.3 analysiert, welche mit einer shRNA gegen *KIR2DL4* behandelt wurden. Bei der Untersuchung der KIR2DL4-Promotortranskripte fiel auf, dass es zu einem Anstieg des Promotortranskriptes für *KIR2DL4* um ca. 20% kam, wenn die Zellen mit einer shRNA gegen *KIR2DL4* behandelt wurden. Ebenfalls stieg auch die Transkription des *NKT2DL4* um ca. 50% an, wenn die Transkription von *KIR2DL4* vermindert wurde (Abb. 67).

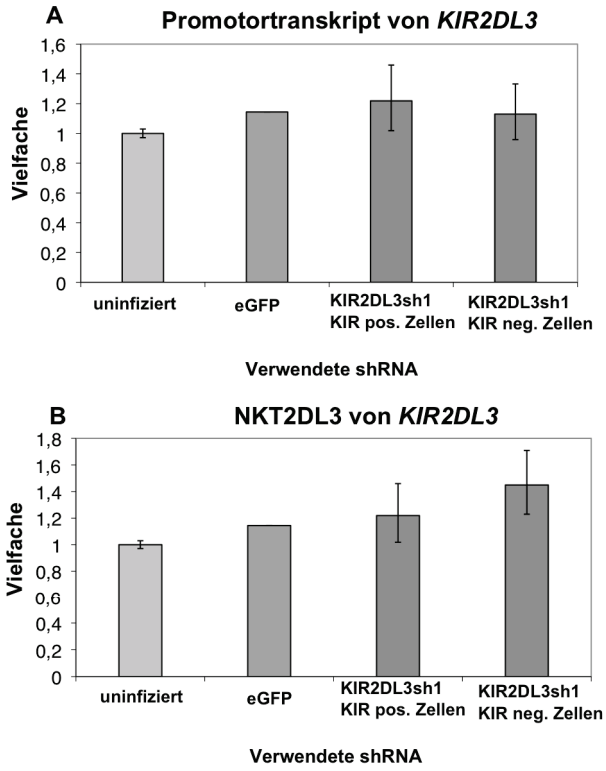


Abb. 68: NK3.3 wurden mit einem Kontrollvirus (eGFP) oder einer shRNA gegen *KIR2DL3* infiziert. Nach zwei Wochen wurde untersucht ob die Reprimierung des *KIR2DL3* mRNA-Transkriptes einen Einfluss auf die Transkription des *KIR2DL3*-Promotortranskriptes (**A**) und des *NKT2DL3* (**B**) hat. Die Messung der Transkripte erfolgte durch Real-Time PCR. Anschließend wurde auf GAPDH normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf uninfizierte Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall.

Von NK3.3, welche mit der KIR2DL3sh1 shRNA gegen *KIR2DL3* behandelt wurden, wurde der Einfluss der Reprimierung des *KIR2DL3*-Transkriptes auf das *KIR2DL3*-Promotortranskript analysiert. Die Analyse ergibt, dass kein Unterschied zwischen der Transkriptionsstärke des *KIR2DL3*-Promotortranskriptes in den infizierten NK3.3 nachgewiesen werden konnte. Die Stärke des *KIR2DL3*-Promotortranskriptes unterschied sich nicht zwischen Zellen, die mit eGFP infiziert wurden, und NK3.3, welche KIR auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, obwohl sie mit einer shRNA gegen *KIR2DL3* transduziert wurden. Die Transkriptionsstärke des Promotortranskriptes veränderte sich auch nicht bei NK3.3, die mit einer shRNA gegen *KIR2DL3* transduziert wurden und bei denen die KIR2DL3-Expression auf der Zelloberfläche verschwand. Wenn nun jedoch die Transkription des *NKT2DL3* in diesen NK3.3 untersucht wird, konnten Unterschiede in seiner Transkriptionsstärke nachgewiesen werden. NK3.3, die mit einem eGFP-Virus oder mit der shRNA KIR2DL3sh1 infiziert wurden, wiesen keinen Unterschied in der Transkirptionsstärke des *NKT2DL3* auf. Ein Anstieg des *NKT2DL3* konnte in KIR-exprimierenden NK3.3

nachgewiesen werden, die mit einer shRNA gegen *KIR2DL3* behandelt wurden und bei denen die Oberflächenexpression des KIRs unterdrückt wurde (Abb. 68).

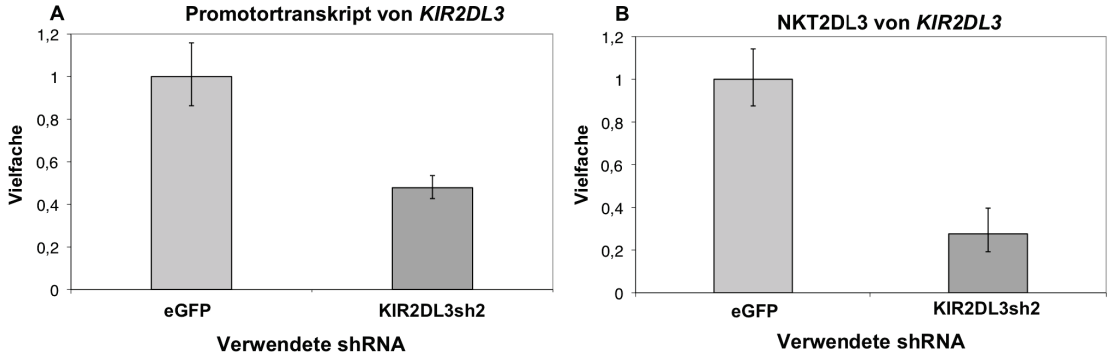


Abb. 69: NK3.3 wurden mit einem shRNA gegen *KIR2DL3* bzw. mit einem Kontrollvirus (eGFP) infiziert. Durch die verwendete shRNA wurde die *KIR2DL3* mRNA-Transkription vermindert. Ob die Verminderung der *KIR2DL3*-Transkription einen Einfluss auf die Transkription des *KIR2DL3*-Promotortranskriptes (**A**) und des *NKT2DL3* (**B**) hatte wurde untersucht. Dazu wurden zwei Wochen nach Infektion die Transkription des *KIR2DL3*-Promotortranskritpes und des *NKT2DL3* bestimmt und mit der Transkription in NK3.3 verglichen, die mit einem Kontrollvirus (eGFP) infiziert wurden. Die Messung der Transktripte erfolgte durch Real-Time PCR. Anschließend wurde auf GAPDH normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf mit eGFP infizierte Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall.

Im folgenden Versuch wurden NK3.3 mit der KIR2DL3sh2 shRNA gegen *KIR2DL3* behandelt, welche aber zu einer deutlich stärkeren Reprimierung des *KIR2DL3*-Transkriptes führten, als die in der vorherigen Analyse verwendete shRNA gegen *KIR2DL3*. Bei der Untersuchung des *KIR2DL3*-Promotortranskriptes fiel auf, dass in den NK3.3, welche mit der KIR2DL3sh2 shRNA gegen *KIR2DL3* behandelt wurden, die Stärke des Promotortranskriptes um ca. 60% im Vergleich zur Kontorolle sank. Die Transkriptionsstärke des *NKT2DL3* nahm im Vergleich zur Kontorolle um ca. 70% ab (Abb. 69).

3.9.6 Verminderung der *KIR*-Transkription im Verlauf der NK-Zellentwicklung

HSCs wurden zu Beginn der NK-Generierung mit einer shRNA gegen *KIR2DL4* infiziert und weiter zu vollständig ausgereiften NK-Zellen ausdifferenziert. Hierdurch sollte geklärt werden, ob die Expression und Transkription von *KIR2DL4* notwendig war, um in NK-Zellen KIR-Expression auszulösen.

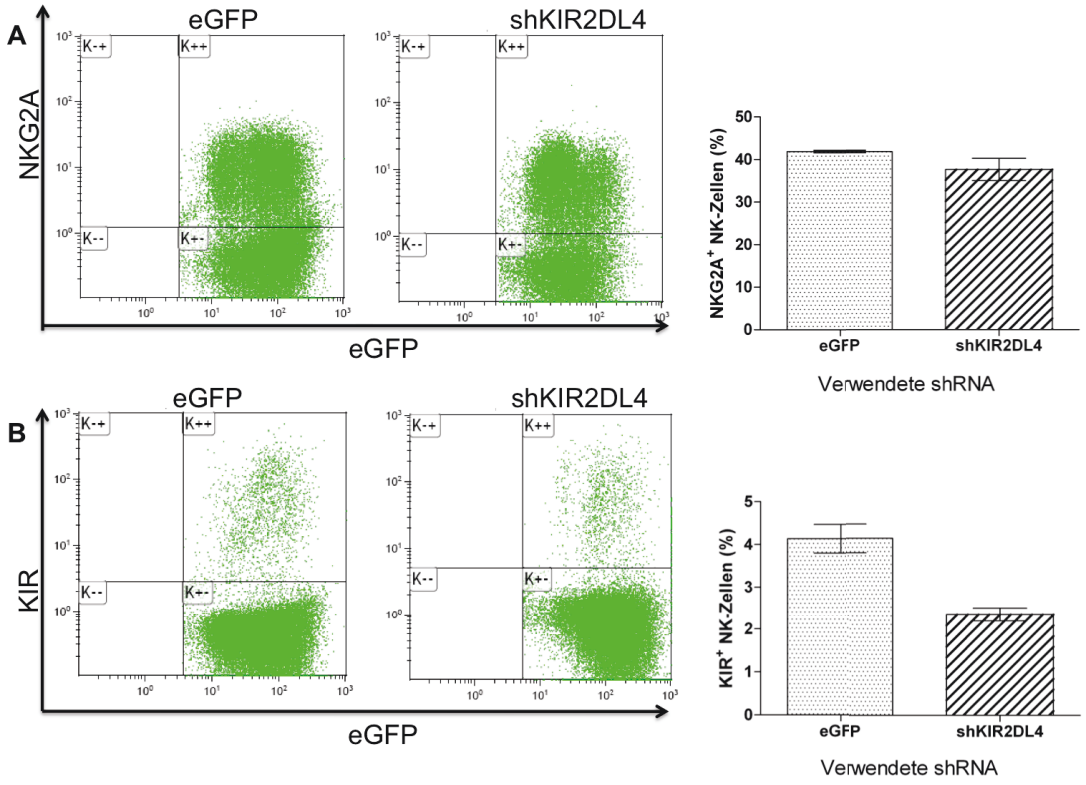


Abb. 70: HSCs wurden zu Beginn einer *in vitro* NK-Generierung mit einer shRNA gegen *KIR2DL4* bzw. mit einem eGFP-Kontrollvirus infiziert. In der fünften Kulturwoche wurde die NKG2A-Expression (**A**) und die KIR-Expression (**B**) der infizierten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Es wurde KIR2DL1, KIR2DL3 und KIR3DL1 angefärbt. Die KIR-Expression und NKG2A-Expression auf den eGFP-positiven Zellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt (n=3). Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung.

HSCs, die mit einer shRNA gegen *KIR2DL4* transduziert wurden und zu NK-Zellen ausdifferenziert wurden, waren in der Lage klonotypische KIRs zu exprimieren. Auch kam es zu einer vergleichbaren Expression von NKG2A. Der Verlust der Fähigkeit der Expression von KIR2DL4 führte nicht zu einem Verlust der Expressionsfähigkeit der klonotypischen KIRs. Jedoch konnte nachgewiesen werden, dass es in den behandelten NK-Zellen zu einer leichten Verminderung der Expression von klonotypischen KIRs kam (Abb. 70).

3.9.7 Verminderung der *NKG2A*-Transkription führt zu einer verminderten KIR-Expression

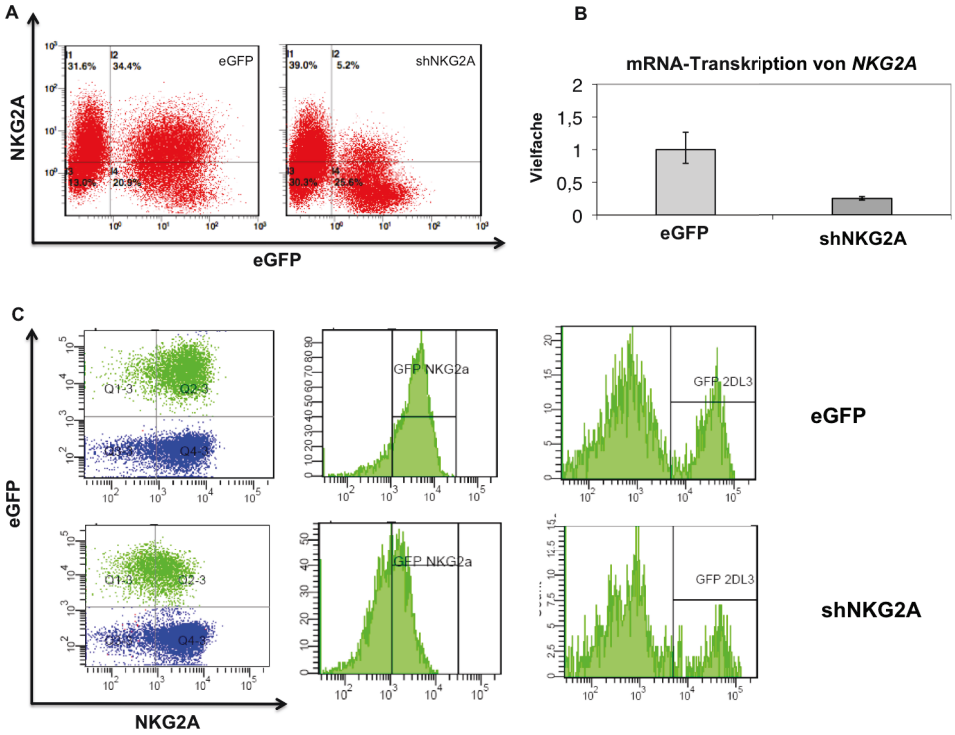


Abb. 71: NK3.3 wurden mit einer shRNA gegen *NKG2A* oder einem eGFP-Kontrollvirus infiziert. Zwei Wochen nach Infektion wurde durchflusszytometrisch die NKG2A-Oberflächenexpression bestimmt (**A**). In (**B**) wurde die mRNA-Transkription von *NKG2A* in NK3.3 bestimmt, die mit einem Kontrollvirus oder einer shRNA gegen *NKG2A* infiziert wurden. Die Transkriptmessung erfolgte durch Real-Time PCR. Anschließend wurde auf GAPDH normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf die eGFP infizierten Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall (n=3).
$CD56^{+}$ $NKG2A^{-}$ NK-Zellen wurden aus dem Nabelschnurblut isoliert und mit einer shRNA gegen *NKG2A* oder mit einem eGFP-Kontrollvirus infiziert. Zwei Wochen nach Infektion erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der NKG2A-Oberflächenexpression (**C**).

In einem weiteren Experiment sollte geklärt werden, ob die Expression von NKG2A einen Einfluss auf die Expression von KIR hat. Zunächst wurde die Funktionstüchtigkeit der shRNA gegen *NKG2A* in NK3.3 getestet. Anhand der durchflusszytometrischen Ergebnisse sah man eine deutliche Reduktion der NKG2A-Expression in den Zellen, die mit einer shRNA gegen *NKG2A* behandelt wurden (Abb. 71 A). Dieses Ergebnis wurde durch die Bestimmung der *NKG2A*-Transkriptionsstärke in den behandelten NK3.3 bestätigt. Die Transkription von *NKG2A* wurde auf 40% der ursprünglichen Transkriptionsstärke reduziert, wenn die Zellen mit einer shRNA gegen *NKG2A* behandelt wurden (Abb. 71 B).
Wurden jedoch NK-Zellen aus dem Nabelschnurblut, die nur CD56 auf ihrer Zelloberfläche exprimierten, mit einer shRNA gegen *NKG2A* transduziert, und in Kultur differenziert, kam es zu einem verminderten Expressionslevel von NKG2A auf der Zelloberfläche. Die Zahl an

positiven Zellen verminderte sich jedoch kaum. Auffällig war jedoch, dass NK-Zellen, welche die Anzahl an NKG2A-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche verminderten, auch das Expressionslevel von KIR reduzierten im Vergleich zur Kontrollinfektion (Abb. 71).

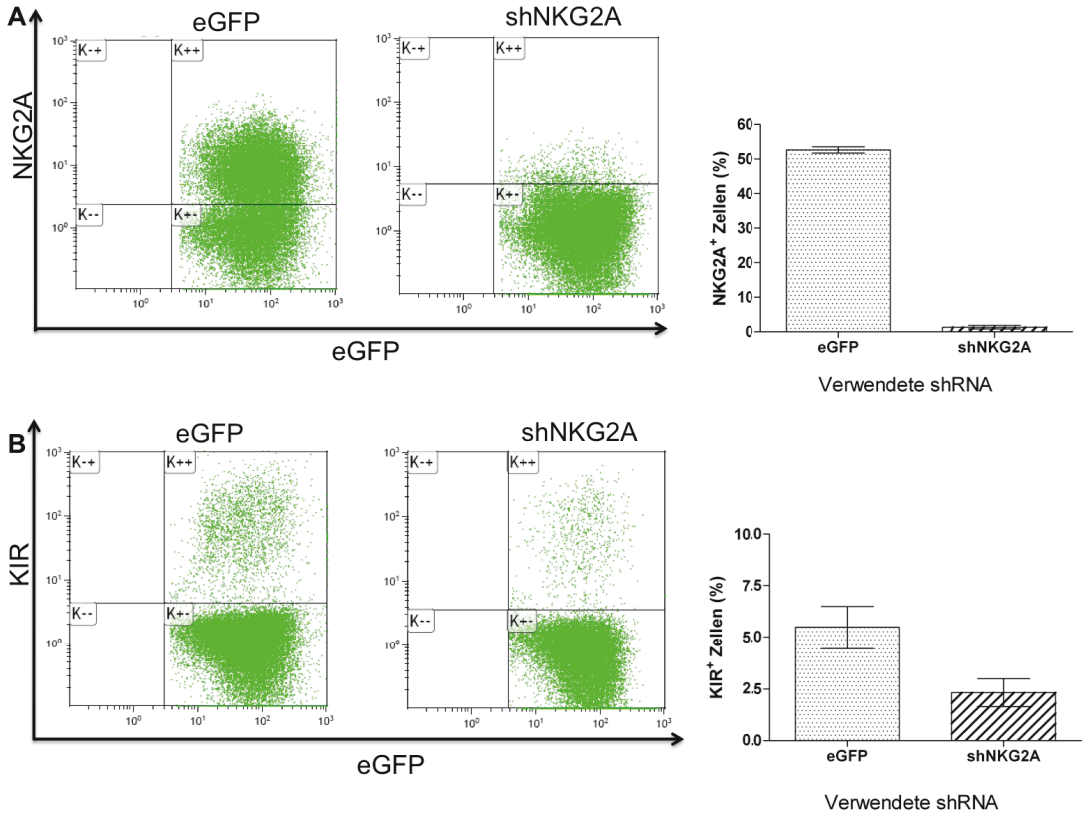


Abb. 72: Zu Beginn einer *in vitro* NK-Differenzierung wurden HSCs aus dem Nabelschnurblut mit einer shRNA gegen *NKG2A* oder einem eGFP-Kontrollvirus infiziert. Die Zellen wurden zu NK-Zellen ausdifferenziert. Die NKG2A-Expression (**A**) und KIR-Expression (**B**), der infizierten Zellen, wurde in der fünften Kulturwoche durchflusszytometrisch bestimmt (n=3). Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung.

Wurden HSCs mit einer shRNA gegen *NKG2A* infiziert und anschließend zu NK-Zellen differenziert, kam es zu einer normalen Entwicklung bis zum $CD56^+$ Stadium. Die Zellen konnten aufgrund der shRNA gegen *NKG2A* kein NKG2A auf der Zelloberfläche bilden. Der prozentuale Anteil an $NKG2A^+$ Zellen war deutlich vermindert. In Differenzierungskulturen, die mit einem eGFP-Virus infiziert wurden, exprimierten 50% der NK-Zellen NKG2A. Wurde die *in vitro* Kultur mit einer shRNA gegen *NKG2A* behandelt, exprimierten nur noch ca. 3% NKG2A auf ihrer Zelloberfläche. Im Vergleich zur Kontrolle kam es in diesen Generierungskulturen auch zu einer Reduktion der KIR-Expression (Abb. 79). Die Zahl an KIR^+ NK-Zellen halbiert sich.

Durch die Reprimierung der *DNMT*-Transkription im Verlauf der NK-Zellentwicklung konnte in den finaldifferenzierten NK-Zellen eine gesteigerte KIR-Expression nachgewiesen werden. Die Reprimierung von *NKG2A* hatte eine entgegengesetzte Wirkung. Die Zellen, in denen die *NKG2A*-Transkription unterbunden wurde, exprimierten weniger KIR auf ihrer Zelloberfläche als Zellen, die mit einem eGFP-Virus infiziert wurden.
Durch starke Inhibition der *KIR2DL3*-Transkription konnte in NK3.3 ein leichter Anstieg der Methylierung des zugehörigen *KIR*-Promotors erreicht werden. Für *KIR2DL4* konnte keine Remethylierung des Promotors nachgewiesen werden, obwohl die Transkription von *KIR2DL4* stark reprimiert wurde. Eine Reprimierung der *KIR2DL4*-Transkription im Verlauf der NK-Zellentwicklung bewirkte eine leichte Reduktion der klonotypischen KIR-Expression.

3.10 Eingriff in die epigenetische Regulation der *KIR*-Gene

Wenn die Methylierung in finaldifferenzierten NK-Zellen von den reprimierten KIR-Promotoren entfernt wird, kommt es zur Transkription und Expression zuvor nicht exprimierter KIRs. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass DNA-Methylierung einen Einfluss auf die KIR-Expression hat (Santourlidis et al., 2002).
Weiter wurde in der vorliegenden Arbeit bereits gezeigt, dass es im Verlauf der NK-Zellentwicklung zu einer Abnahme der Histonmodifikation H3K9me2 im KIR-Promotor kam. Es besteht die Möglichkeit, dass nicht nur die DNA-Methylierung, sondern auch Histonmodifikationen für die Regulation der *KIR*-Gene verantwortlich sind.
Daher sollte der Einfluss auf die KIR-Expression im Verlauf einer NK-Zellentwicklung durch den Einsatz epigenetisch wirkender Substanzen, welche auf die DNA-Methylierung (AZA), Chromatinstruktur (TSA) und die Histonmodifikation H3K9me2 (BIX) wirken, untersucht werden.

3.10.1 Modulation der KIR-Expression in NK-Zelllinien, durch Verwendung epigenetisch wirksamer Substanzen

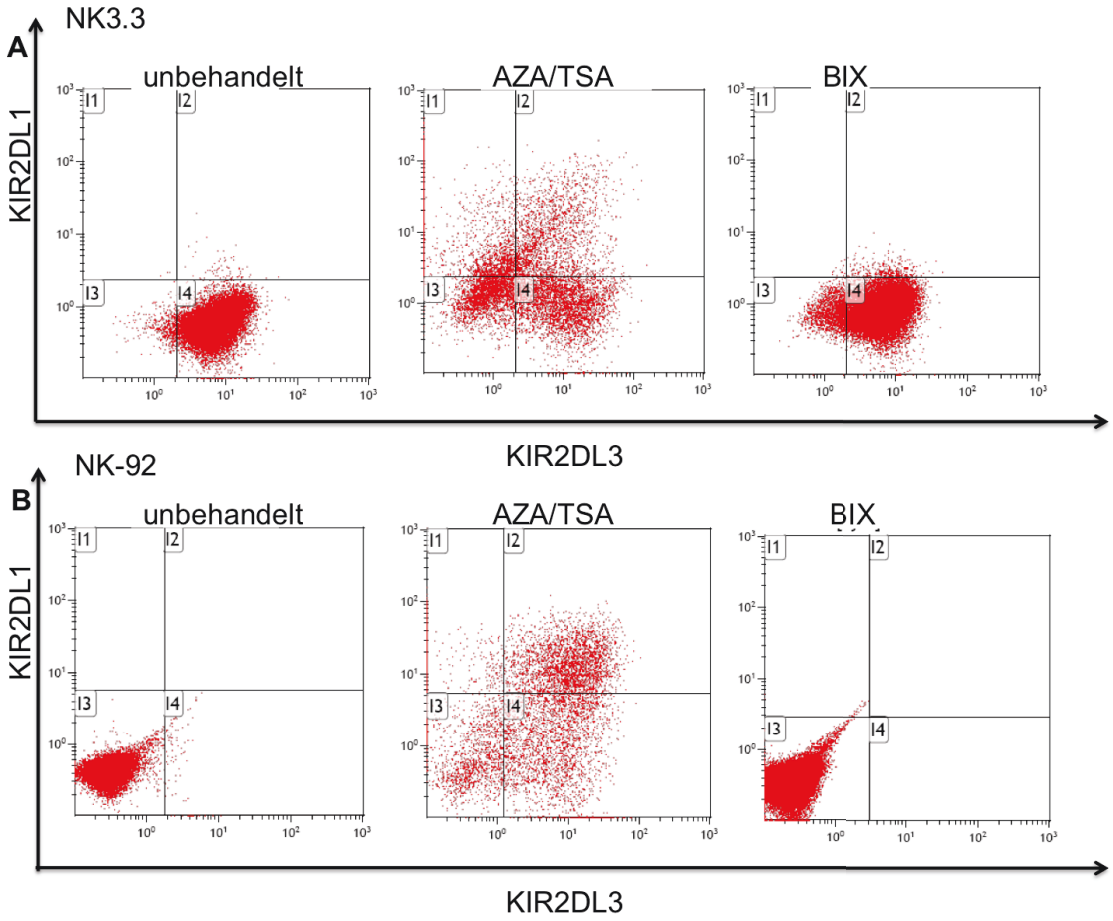


Abb. 73: Die NK-Linien NK3.3 und NK-92 wurden mit epigenetisch wirksamen Substanzen AZA/TSA oder BIX behandelt und die KIR-Expression wurde fünf Tage nach Behandlung der Zellen mit den Substanzen durchflusszytometrisch bestimmt.

NK-Linien wurden mit AZA/TSA oder BIX behandelt und die KIR-Expression wurde mit der von unbehandelten Zellen verglichen. In beiden Zelllinien konnte durch die Behandlung mit AZA/TSA eine Induktion von zuvor nicht exprimierten KIRs nachgewiesen werden (Abb. 73).

BIX, eine Substanz die auf die H3K9me2 wirkte, wurde zu den verschiedenen Zelllinien gegeben und die Expression von vorher nicht exprimierten KIRs wurde verfolgt. Wenn man die durchflusszytometrischen Ergebnisse von behandelten und unbehandelten Zellen vergleicht, hatte BIX keinen Einfluss auf die KIR-Expression (Abb. 73).

3.10.2 Versuchte Induktion der *KIR*-Transkription in HSCs und IPS-Zellen durch Entfernen der DNA-Methylierung im KIR-Promotor

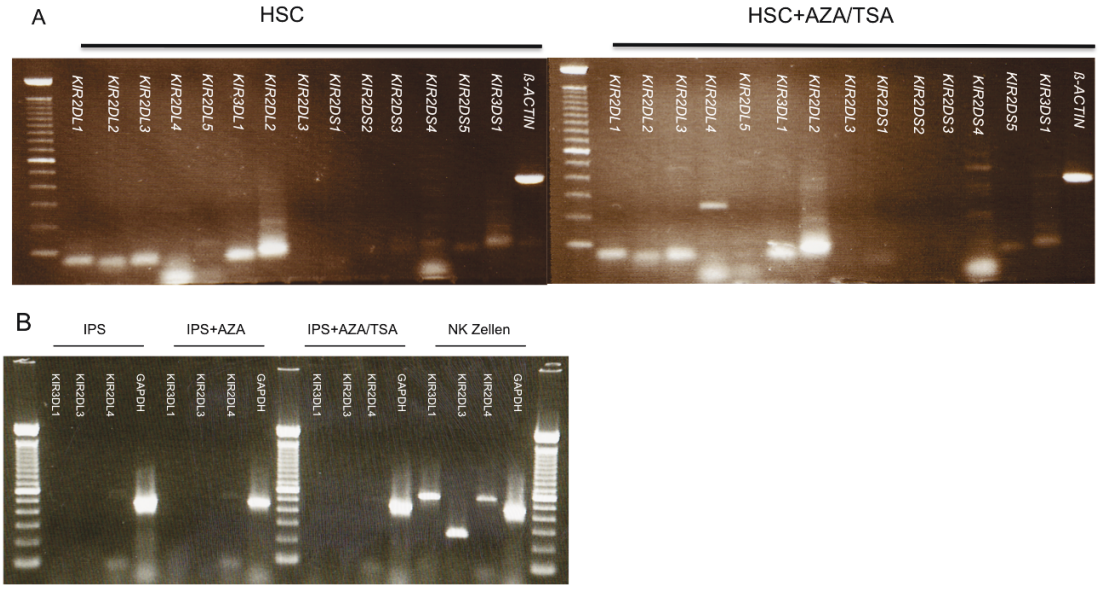


Abb. 74: Elektrophoretischer Nachweis der mRNA-Transkription von *KIR* in HSCs **(A)** bzw. IPS-Zellen **(B).** Die Zellen blieben unbehandelt oder wurden mit AZA/TSA behandelt. Die mRNA-Transkription von *KIR* wurden drei Tage nach der ersten Behandlung mit epigenetischen Substanzen untersucht. Die mRNA-Transkription der KIRs wird mit PCR nachgewiesen.

Zunächst wurden HSCs oder IPS-Zellen mit AZA/TSA behandelt und die mRNA-Tanskription von *KIR* wurde nach drei Tagen in den Zellen bestimmt. Durch Entfernen der DNA-Methylierung sollte untersucht werden, ob in diesen Zellen eine Transkription von *KIR* ausgelöst werden konnte. Wie aus Abb. 74 hervorgeht, konnte in den behandelten Zellen, trotz Exposition mit AZA/TSA keine Transkription von *KIR* in den HSCs oder IPS-Zellen nachgewiesen werden.

3.10.3 Anstieg der KIR-Expression durch Applikation von AZA im *in vitro* NK-Zellentwicklungsmodell

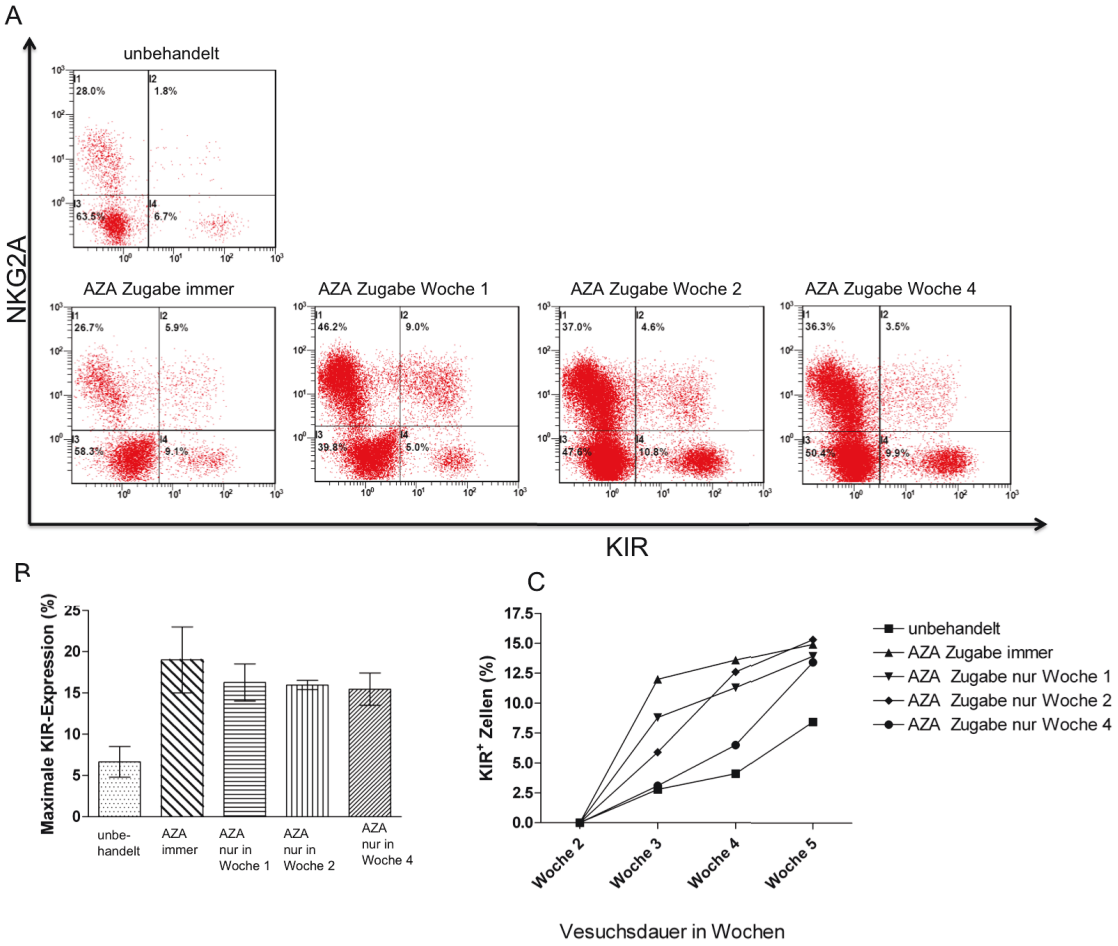


Abb. 75: Der Einfluss von AZA auf die KIR-Expression im Verlauf einer *in vitro* NK-Zellentwicklung wurde verfolgt. Dazu wurde die NK-Generierungskultur zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit AZA behandelt. Die KIR-Expression und NKG2A-Expression wurde durchflusszytometrisch wöchentlich bestimmt und graphisch dargestellt. Abbildung (**A**) zeigt die KIR und NKG2A-Expression in der fünften Kulturwoche. In (**B**) ist die KIR-Expression in der fünften Kulturwoche dargestellt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung. (**C**) zeigt die KIR-Expression der *in vitro* generierten NK-Zellen während des gesamten Versuchsverlaufes (n=3).

In diesem Versuchsteil sollte der Einfluss der DNA-Methylierung auf die KIR-Expression im Verlauf einer NK-Entwicklung durch Verwendung von AZA untersucht werden. Dazu wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer NK-Zellentwicklung AZA zu den Zellen gegeben, und ihr Einfluss auf die KIR-Expression wurde ermittelt.

Die Behandlung der Blutstammzellen mit AZA ergab folgendes Bild. Unter allen gewählten Kulturbedingungen kam es im Vergleich zur Kontrolle zu einer deutlich gesteigerten KIR-Expression. Eine permanente Zugabe der epigenetisch wirksamen Substanz sorgte für einen starken Anstiegt der KIR-Expression. In unbehandelten Entwicklungskulturen entwickelten sich 8% KIR^+ NK-Zellen. Wurde jedoch AZA zugegeben, trugen ca. 18% KIR auf ihrer

Zelloberfläche. Es kam jedoch nicht zu einer verfrühten KIR-Expression auf den behandelten Zellen. In allen Kulturen war die erste KIR-Expression erst in der dritten Kulturwoche nachweisbar. AZA hatte nicht nur einen Effekt auf frühe NK-Vorläufer. So führte die Behandlung einer NK-Generierungskultur in der vierten Woche, einem Zeitpunkt zu dem bereits KIR$^+$ NK-Zellen nachweisbar waren, auch noch zu einem Anstieg von KIR$^+$ NK-Zellen. Es exprimierten ca. 14% KIR, in der Kontrolle waren es nur 8% (Abb. 75).

3.10.4 Verminderung der H3K9me2 in verschiedenen NK-Populationen führt nicht bei allen NK-Zellen zu einer gesteigerten KIR-Expression

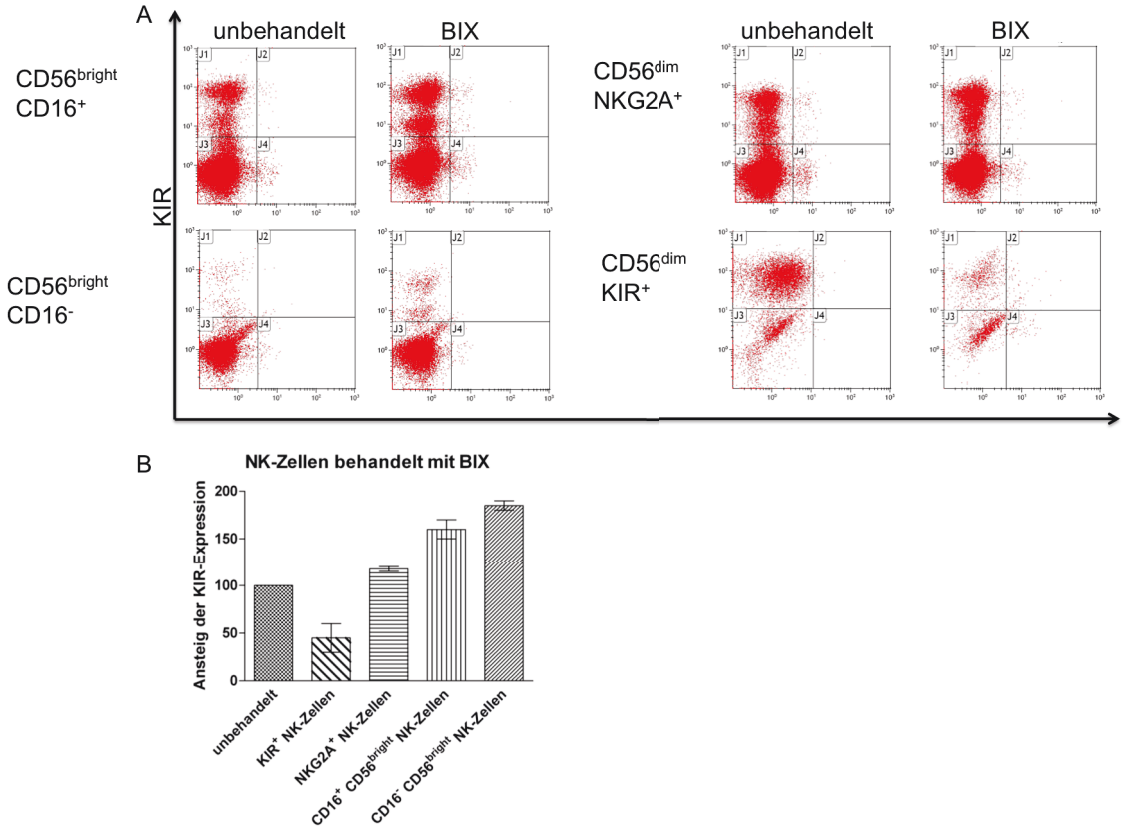


Abb. 76: Verschiedene NK-Zellen wurden aus dem Nabelschnurblut isoliert und auf EL08- Nährzellen kultiviert. Ein Teil der isolierten NK-Stadien blieb unbehandelt, die anderen wurden mit BIX behandelt. Die KIR-Expression (KIR2DL1/KIR2DL3/KIR3DL1) wurde in der zweiten Kulturwoche durchflusszytometrisch bestimmt (**A**) und mit der von unbehandelten NK-Zellen verglichen. Die KIR-Expression der unbehandelten NK-Zellen wurde auf 100% gesetzt (**B**) (n=3). Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung.

Nachdem der Einfluss der DNA-Methylierung auf die KIR-Expression im Verlauf der NK-Zellentwicklung untersucht worden war, wurde nun der Einfluss der Histonmodifikation H3K9me2 auf die KIR-Regulation bestimmt.

Zunächst wurden unterschiedliche NK-Zellpopulationen aus dem Nabelschnurblut isoliert und mit BIX behandelt. Bei NK-Zellen, die bereits KIR exprimierten, hatte die Behandlung mit BIX keinen positiven Einfluss auf die KIR-Expression. Die Zahl an KIR^+ NK-Zellen ging unter den gewählten Kulturbedingungen sogar zurück. In $NKG2A^+$ NK-Zellen kam es durch die Behandlung mit BIX im Vergleich zu den unbehandelten Proben zu einer sehr leichten Steigerung von KIR, wohingegen in den $CD16^+$ $CD56^{bright}$ NK-Zellen eine deutlich stärkere Expression von KIRs nachweisbar war. Die KIR-Expression war noch einmal etwas stärker in den klassischen $CD56^{bright}$ NK-Zellen im vergleich zu den unbehandelten klassischen $CD56^{bright}$ NK-Zellen (Abb. 76).

3.10.5 Inhibition der G9a im Verlauf der NK-Zellentwicklung und ihr Einfluss auf die KIR-Expression

Zuvor konnte gezeigt werden, dass durch Modulation der DNA-Methylierung im Verlauf einer NK-Generierungskultur die Zahl KIR^+ NK-Zellen gesteigert werden konnte. Nun sollte untersucht werden, welchen Einfluss der G9a-Inhibitor BIX und die dadurch einhergehende Hemmung der H3K9me2 auf die Expression der *KIR*-Gene und die Entwicklung der NK-Zelle hatte. Dazu wurden in einem ersten Experiment während der gesamten NK-Generierung BIX zu den Zellen gegeben.

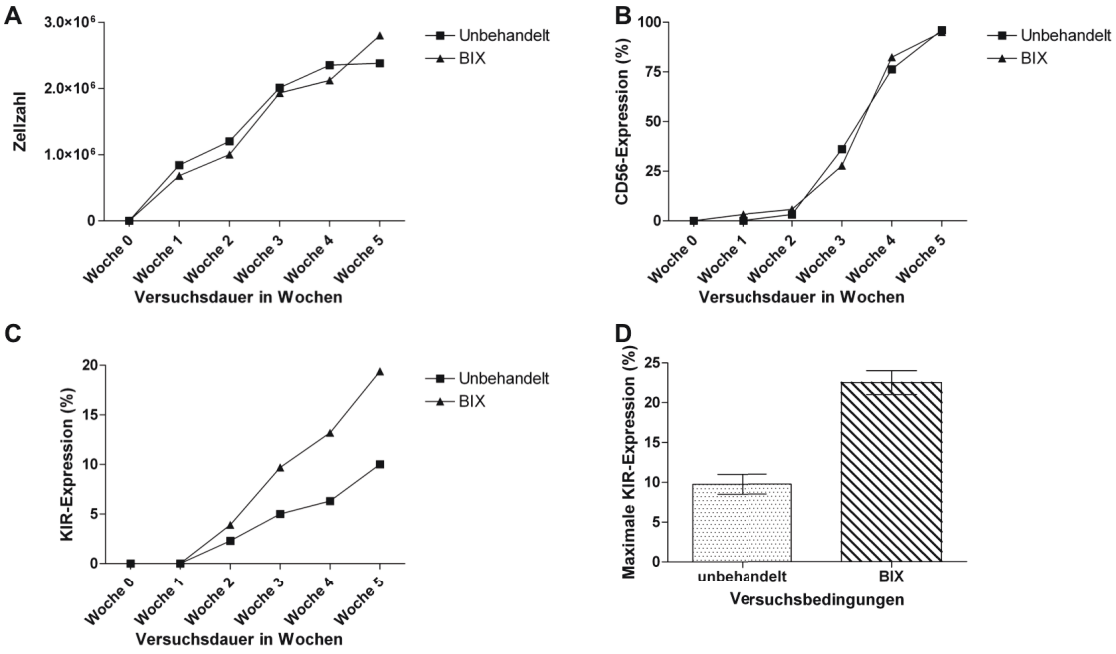


Abb. 77: Aus dem Nabelschnurblut wurden HSC isoliert und zu NK-Zellen differenziert. Zu den HSCs und auch im weiteren Verlauf der NK-Generierung wurde wöchentlich BIX zugegeben. Die Kontrolle blieb unbehandelt. Der Einfluss von BIX auf die NK-Zellentwicklung sollte untersucht werden. Dazu wurde die Zellzahl (**A**) im Verlauf der NK-Generierung verfolgt und die CD56-Expression durchflusszytometrisch analysiert (**B**). Auch die Expression der KIRs im Verlauf der NK-Zellentwicklung wurde beobachtet (**C**). Weiter wurde die maximale KIR-Expression im Verlauf der NK-Generierung bestimmt (D). Dargestellt ist ein exemplarisches Experiment (n=3). Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung (für D).

Aus Abb. 77 geht hervor, dass die Behandlung mit BIX keinen Einfluss auf die Proliferation der generierten NK-Zellen hatte, wenn man behandelte und unbehandelte Kulturzellen vergleicht. Die Zellzahl mit BIX behandelten Wells wich nicht stark von der Zellzahl von unbehandelten Wells ab. Die CD56-Expression konnte ab der zweiten Kulturwoche unter den gewählten Kulturbedingungen nachgewiesen werden und wies keine Auffälligkeiten auf. Sie begann durch eine Behandlung mit BIX nicht früher und verlief vergleichbar mit der von unbehandelten Zellen.

Im Verlauf der zweiten Woche konnte in beiden Kulturen eine schwache KIR-Expression nachgewiesen werden. Sie war bereits zu diesem frühen Zeitpunkt in der mit BIX-behandelten Kultur stärker ausgeprägt, als in der unbehandelten Kultur. Im Verlauf der Entwicklungskultur kam es zur Bildung von mehr KIR^+ NK-Zellen in der mit BIX behandelten Kultur. Nach fünf Wochen waren ca. 20% der behandelten Zellen KIR^+ und in den unbehandelten Kontrollzellen war eine 8%ige KIR-Expression nachweisbar (Abb. 77).

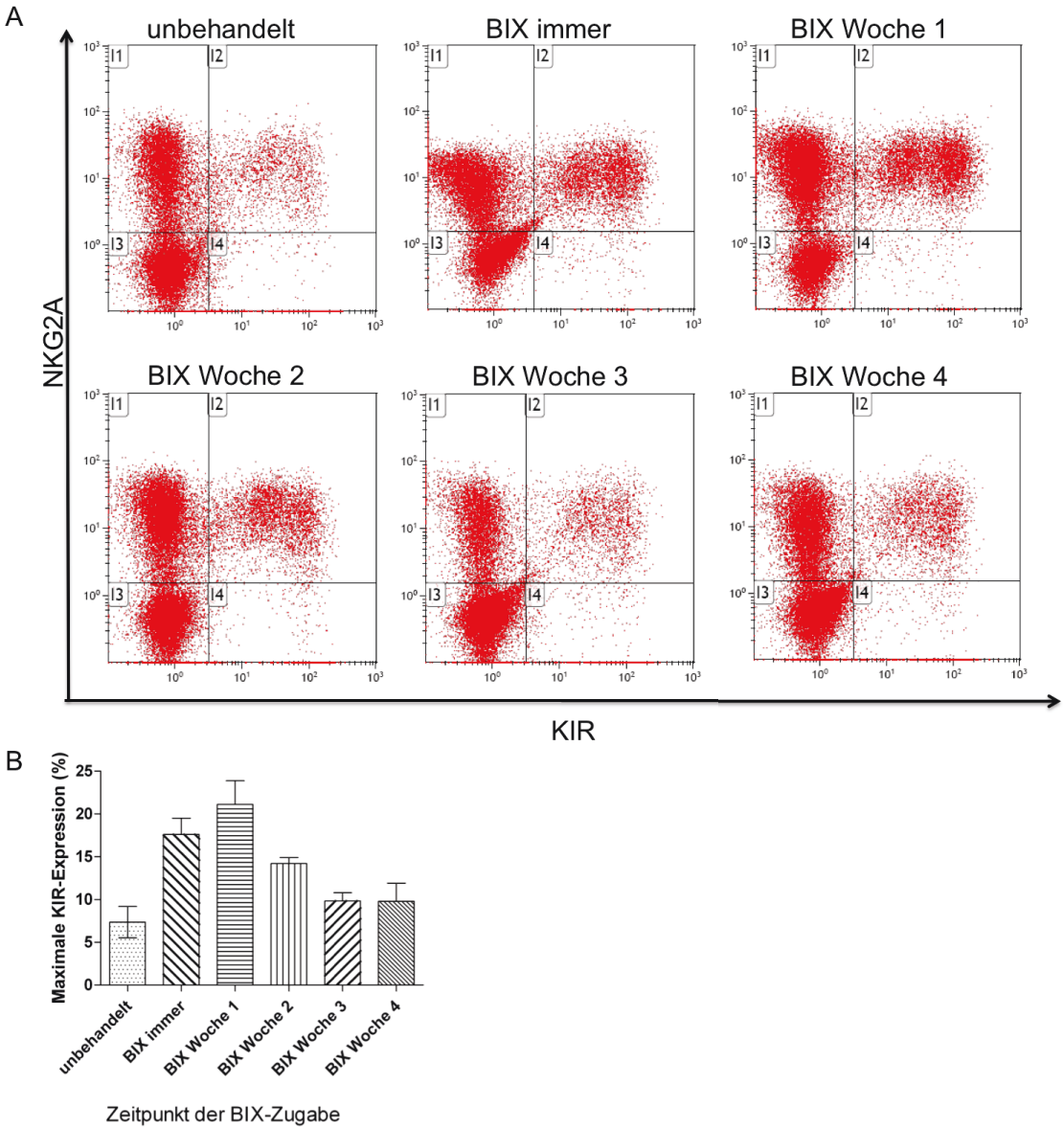


Abb.78: Zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer NK-Zellentwicklung wurde BIX zu den Zellen gegeben. Es wurde entweder immer, oder nur in der ersten, zweiten, dritten oder vierten Kulturwoche zu den Zellen gegeben. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt. Die KIR-Expression wurde in der fünften Kulturwoche durchflusszytometrisch bestimmt (**A**) und mit der KIR-Expression unbehandelter Zellen verglichen. Dargestellt ist ein exemplarisches Experiment (n=3). Die Maximale KIR-Expression ist in (**B**) zu sehen. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung.

Nun stellt sich die Frage, ob während der gesamten NK-Zellgenerierung BIX zugegeben werden musste, um mehr KIR^+ NK-Zellen zu erhalten. Dazu wurden Zellen einer NK-Zellgenerierung zu verschiedenen Zeitpunkten mit BIX behandelt, oder es wurde während der gesamten Kulturzeit BIX zu den Zellen gegeben. Bei unbehandelten Zellen kam es zu einer Expression von 7% KIR. NK-Kulturen, die in Woche drei und vier mit BIX behandelt wurden, wiesen eine vergleichbare KIR-Expression mit der unbehandelten Kontrolle auf und es kam nicht zu einem deutlichen Anstieg an KIR^+ NK-Zellen.

Eine Generierungskultur, die während der gesamten Zeit mit BIX behandelt wurde, wies jedoch einen Anstieg an KIR$^+$ NK-Zellen auf. In dieser Kultur waren 18% der NK-Zellen KIR$^+$, unbehandelte Zellen wiesen nur 7% KIR$^+$ NK-Zellen auf. Die Zugabe von BIX führte somit zu einer Steigerung der KIR-Expression. Ebenfalls kam es zu einem Anstieg in der KIR-Expression bei generierten NK-Zellen, die während der ersten bzw. zweiten Kulturwoche mit BIX behandelt wurden. Eine BIX-Behandlung während der ersten bzw. zweiten Woche und während der gesamten Kulturzeit führte zu einem Anstieg an KIR$^+$ NK-Zellen (Abb. 78). Eine Zugabe von Bix in der dritten oder vierten Kulturwoche führte zu keiner Steigerung der KIR-Expression der *in vitro* generierten NK-Zellen.

3.10.6 Inhibition der G9a bewirkt verminderte Methylierung im *KIR2DL3*-Promotor

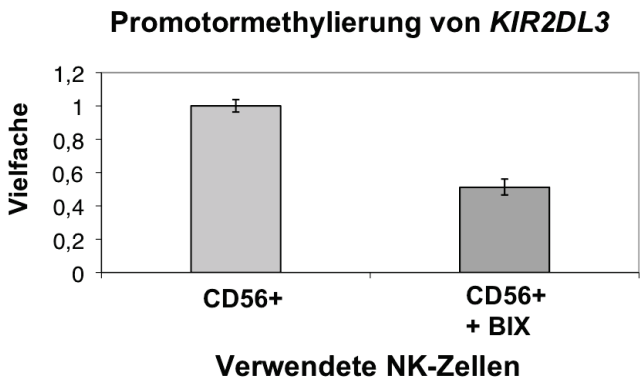


Abb.79: CD56$^+$/KIR$^-$ NK-Zellen wurden aus einer *in vitro* NK-Generierung isoliert. Diese Zellen wurden in der ersten Kulturwoche einer NK-Generierung mit BIX behandelt. Die Kontrollzellen, die ebenfalls aus einer NK-Generierungskultur stammten, wurden ohne BIX generiert. Die Methylierung des *KIR2DL3*-Promotors wurde von den unbehandelten und behandelten NK-Zellen analysiert. Anschließend wurde auf GSTP normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf CD56$^+$ NK-Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall.

In der ersten Woche einer NK-Generierung wurde zu einem Teil der NK-Generierungskultur BIX zugegeben. Die Methylierung des *KIR2DL3*-Promotors wurde im CD56-Stadium einer NK-Zellentwicklung untersucht. Die Methylierung des *KIR2DL3*-Promotors wurde in unbehandelten und mit BIX-behandelten Kulturen verglichen. Dadurch sollte geklärt werden, ob die Behandlung der Zellen mit BIX und die daraus resultierende Reduktion der H3K9me2 einen Einfluss auf die *KIR2DL3*-Promotormethylierung hatte.

Die Methylierungsanalyse des *KIR2DL3*-Promotors vom CD56$^+$/CD117$^+$ NK-Zellstadiums ergab folgendes Ergebnis. Die Zellen wiesen nach Behandlung mit BIX eine um ca. 50% reduzierte Methylierung ihres *KIR2DL3*-Promotors auf. Durch die Behandlung mit BIX kam

es zu einer Reduktion in der *KIR2DL3*-Promotormethylierung., die aber in diesem Stadium noch nicht zu einer Expression von KIR2DL3 führte (Abb. 79).

3.10.7 Untersuchung des *KIR2DL3*-Promotortrankriptes und des zugehörigen NKTs nach BIX-Zugabe

In der ersten Woche einer NK-Generierungskultur wurden die HSCs mit BIX behandelt und weiter zu NK-Zellen ausdifferenziert. NK-Zellen, die nur den Marker CD56 exprimierten bzw. die NKG2A$^+$ waren, wurden aus einer mit BIX behandelten und einer unbehandelten NK-Generierungskultur isoliert und die Transkription der Promotortranskripte für *KIR2DL3*, wie auch die zugehörigen NKTs, wurden bestimmt.

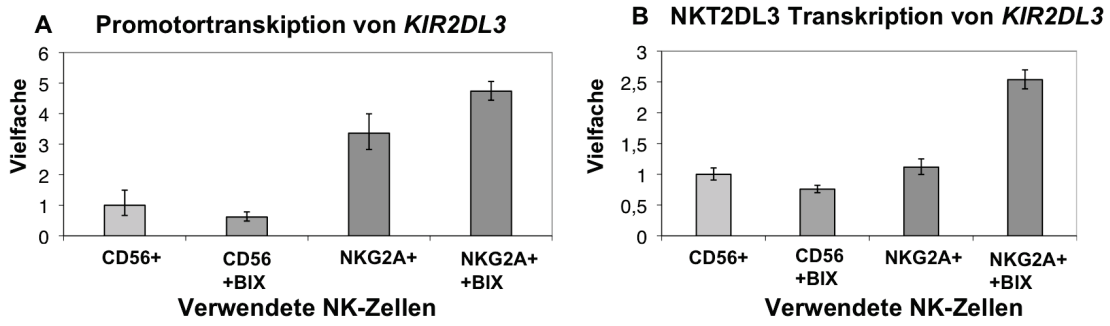


Abb. 80: HSCs wurden in der ersten Woche einer NK-Generierungskultur mit BIX behandelt. Die Kontrolle blieb unbehandelt. Die Transkription des *KIR2DL3*-Promotortranskriptes (**A**) und des *NKT2DL3* (**B**) wurde in NKG2A$^-$/ KIR$^-$ /CD56$^+$ NK-Zellen und NKG2A$^+$ NK-Zellen einer mit BIX behandelten und unbehandelten NK-Generierungskultur bestimmt. Die untersuchten NK-Zellen stammten aus einer *in vitro* NK-Generierungskultur. Anschließend wurde auf GAPDH normiert und mit der 2^{-ddCT}-Methode Vielfache in Bezug auf CD56$^+$ NK-Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall.

Die Transkription des *KIR2DL3*-Promotortranskriptes wie auch des NKTs war in CD56$^+$ NK-Zellen, welche mit BIX behandelt wurden, und in unbehandelten CD56$^+$ NK-Zellen vergleichbar. Ein Unterschied in der Transkription war nicht deutlich erkennbar. Dies änderte sich im NKG2A-Stadium. Wenn NKG2A$^+$ NK-Zellen, die aus einer mit BIX behandelten Kultur stammten, untersucht wurden, konnte eine Steigerung des Promotortranskriptes für *KIR2DL3* im Vergleich zu den unbehandelten NKG2A$^+$ NK-Zellen nachgewiesen werden. Die Transkriptionsstärke des *NKT2DL3* lag in den unbehandelten NKG2A$^+$ NK-Zellen auf einem mit den CD56$^+$ Zellen vergleichbaren Niveau. Durch die Behandlung mit BIX kam es in den NKG2A$^+$ NK-Zellen zu einem Anstieg in der Transkription des *NKT2DL3*. In dieser Zellpopulation konnte auch ein Anstieg des *KIR2DL3*-Promotortranskriptes nachgewiesen

werden. Trotz Behandlung der Zellen mit BIX konnte weder auf den CD56$^+$ noch in den NKG2A$^+$ NK-Zellen eine Expression von KIR2DL3 nachgewiesen werden (Abb. 80).

3.10.8 Gesteigerte KIR-Expression im Verlauf einer NK-Generierung

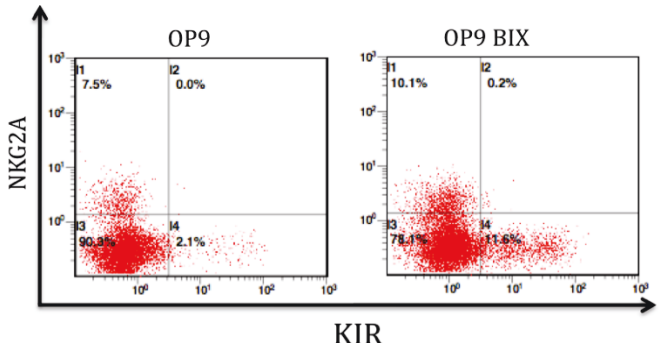


Abb. 81: HSCs aus dem Nabelschnurblut wurden auf der murinen Nährzelllinie OP9 ausplattiert und eine NK-Generierung wurde begonnen. Während der NK-Generierung wurde wöchentlich BIX zur Kultur gegeben. Die Kontrolle blieb unbehandelt. Die Messung der KIR-Expression wurde in der fünften Kulturwoche durchflusszytometrisch bestimmt.

Eine NK-Generierung wurde auf der murinen Nährzelllinie OP9 durchgeführt. Diese Linie unterstützte nur schwach die Induktion von KIR in den differenzierten NK-Zellen. Jedoch konnte die Anzahl an KIR$^+$ NK-Zellen durch eine Behandlung mit BIX im Verlauf der gesamten Zeit einer NK-Generierung gesteigert werden. In der unbehandelten Kultur waren 2% der NK-Zellen KIR$^+$. Durch die Behandlung mit BIX konnte die Zahl an KIR$^+$ NK-Zellen auf 12% gesteigert werden, trotz Verwendung einer murinen Nährzelllinie, die nur eine schlechte Induktion der KIR-Expression ermöglichte (Abb. 81).

3.10.9 Steigerung der KIR-Expression im *in vitro* Modell durch Applikation von epigenetisch wirkenden Substanzen zu Beginn einer NK-Zellentwicklung

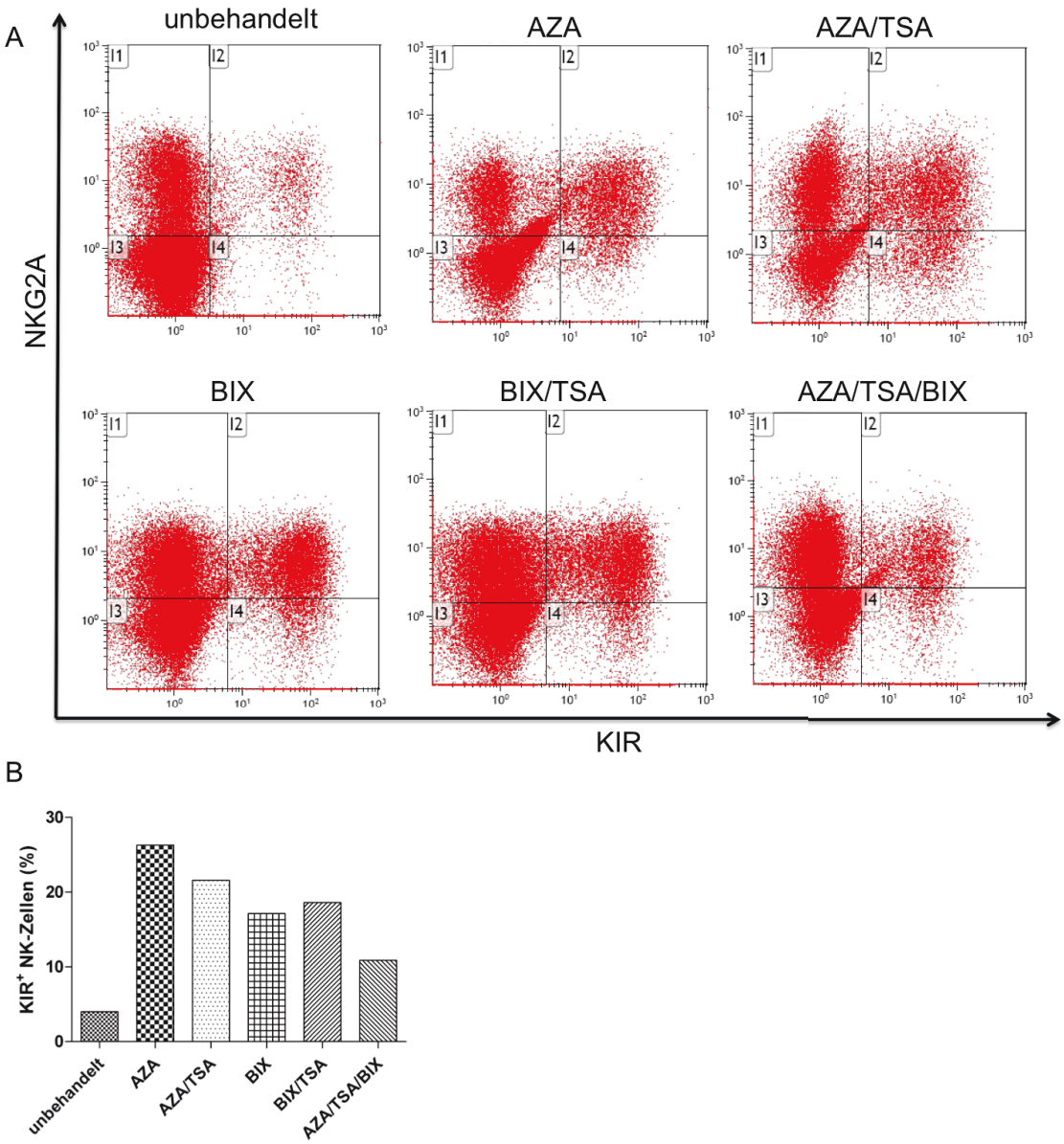


Abb.82: Aus dem Nabelschnurblut wurden HSCs isoliert und zu NK-Zellen differenziert. In der ersten Kulturwoche wurden die HSCs mit verschiedenen epigenetisch wirkenden Substanzen behandelt. Die Kontrolle blieb unbehandelt. Der Einfluss der epigenetisch wirkenden Substanzen auf die KIR-Expression der *in vitro* generierten NK-Zellen wurde in der fünften Kulturwoche durchflusszytometrisch analysiert (**A+B**).

In einem weiteren Experiment wurden HSCs mit AZA, AZA/TSA, AZA/TSA/BIX, BIX/TSA oder mit BIX behandelt. Dies erfolgte in der ersten Kultivierungswoche. Nun wurde neben der Methylierung und der Chromatinstruktur auch die Histonmodifikation H3K9me2 von Blutstammzellen gleichzeitig beeinflusst.

Die gleichzeitige Behandlung mit AZA/TSA/BIX hatte den schwächsten Einfluss auf die KIR-Expression. Die Kombination der epigenetisch wirksamen Substanzen oder die einzelne Zugabe der Substanzen bewirkte eine Steigerung der KIR-Expression, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Interessant war, dass eine Behandlung der HSCs im Verlauf der ersten Woche der Kultivierung einen Einfluss auf die Expression von KIR in der fünften Kulturwoche hatte (Abb.82).

3.10.10 Induktion von KIR im Verlauf einer *in vitro* NK-Generierung ohne Nährzellen

Aus den zuvor beschriebenen Versuchen ging hervor, dass die unterschiedlich wirksamen Subtanzen AZA, TSA und BIX einen Einfluss auf die KIR-Expression hatten. Weiter kam es zu einer gesteigerten KIR-Expression, wenn HSCs mit BIX behandelt wurden und die NK-Generierung auf einer Nährzelllinie durchgeführt wurde, die nur schlecht KIR-Expression induzierte. Nun stellte sich die Frage, ob es auch möglich war, KIRs während einer NK-Generierung zu induzieren, die komplett ohne Nährzellunterstützung durchgeführt wurde. In diese Arbeit wurde bereits gezeigt, dass es für die Expression klonotypischer KIRs auf NK-Zellen während einer *in vitro* Generierungskultur notwendig war, die HSCs eine Woche lang mit Nährzellen zusammen zu kultivieren.

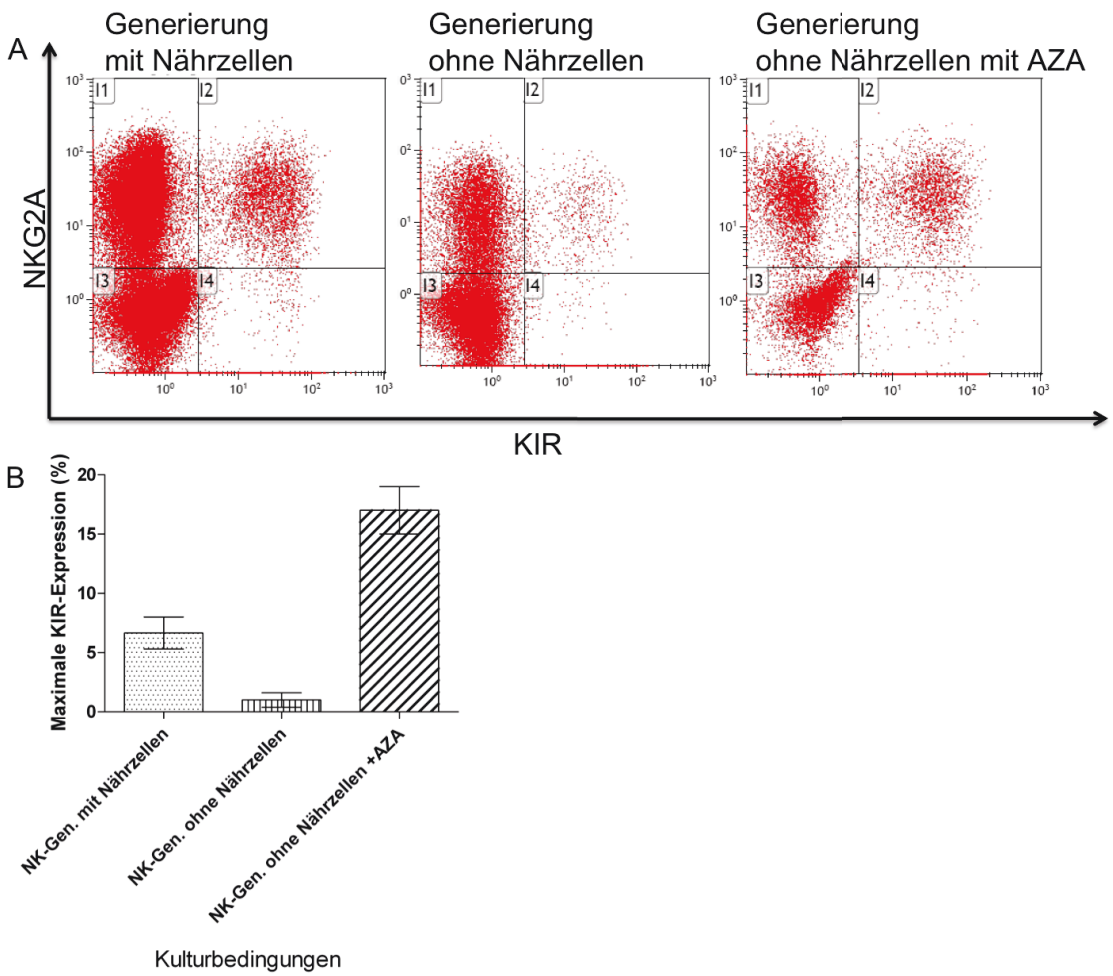


Abb. 83: HSCs wurden ohne Nährzellen zu NK-Zellen ausdifferenziert und wurden epigenetisch wirkenden Substanzen ausgesetzt. Als Kontrolle wurden HSCs auf Nährzellen ausplattiert und zu NK-Zellen differenziert. Die Applikation von AZA erfolgte nur in der ersten Kulturwoche. HSCs wurden auch mit BIX inkubiert, jedoch starben die behandelten HSCs durch die Behandlung ab. Die Expression klonotypischer *KIRs* wurde in der fünften Kulturwoche durchflusszytometrisch bestimmt (**A**+**B**). Dargestellt ist ein exemplarisches Experiment (n=3). In (**B**) sind der Mittelwert und die Standardabweichung dargestellt.

Blustammzellen, die ohne Nährzellen zu NK-Zellen differenziert wurden, exprimierten keine klonotypischen KIRs auf ihrer Zelloberflächen. Erst die Kultivierung von HSCs zusammen mit Nährzellen bewirkte eine Induktion von klonotyopischen KIRs auf den NK-Zellen.

Des Weiteren wurden auch HSCs mit epigenetisch wirkenden Substanzen behandelt und deren Einfluss auf die KIR-Expression wurde verfolgt. Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass mehr KIR^+ NK-Zellen entstanden, wenn vor Beginn einer NK-Zelldifferenzierung auf Nährzellen, die HSCs mit epigenetisch wirksamen Substanzen behandelt wurden.

Wenn jedoch HSCs ohne Nährzellunterstützung mit epigenetisch wirkenden Substanzen inkubiert wurden, zeigte sich ein anderes Bild. Die behandelten Zellen reagierten viel empfindlicher auf die Exposition mit den epigenetisch wirkenden Substanzen. HSCs, die zu Beginn der Generierung mit BIX behandelt wurden, starben ab. Eine solche Behandlung hatte

auf HSCs, die zusammen mit Nährzellen kultiviert wurden, nicht so einen negativen Effekt. Auch für AZA waren HSCs empfindlich und ein Großteil der Zellen starb ab. Jedoch konnte man am Ende der ersten Woche HSCs ohne Nährzellen mit AZA behandeln. Anschließend wurden diese Zellen nicht mehr mit AZA behandelt und es kam vier Wochen später bei den behandelten Zellen zu einer Expression von KIR auch ohne Kultivierung der Zellen mit Nährzellen. So konnte auf 15% der NK-Zellen klonotypische KIRs nachgewiesen werden, obwohl sie nicht zusammen mit Nährzellen kultiviert wurden. Zum Vergleich waren nur 7% der NK-Zellen, die auf Nährzellen ohne epigenetisch wirksame Substanzen erzeugt wurden, für KIR^+. Das Ergebnis zeigt, dass man auch ohne Unterstützung durch Nährzellen die Expression von klonotypische KIR in NK-Zellen induzieren kann. Aber die HSCs reagierten viel empfindlicher auf die epigenetische Behandlung als HSCs, die zusammen mit Nährzellen behandelt wurden (Abb. 83).

Durch Zugabe von AZA,TSA und BIX konnte eine gesteigerte KIR-Expression im *in vitro* Generierungsmodell nachgewiesen werden (Abb. 75, Abb. 78, Abb. 83). Die Zugabe einer epigenetisch wirkenden Substanz in der ersten Kulturwoche, hatte einen Einfluss auf die KIR-Expression in der vierten Kulturwoche. Eine Behandlung der Zellen mit BIX musste während einer frühen Phase der NK-Zellentwicklung geschehen, da eine Zugabe ab der dritten Kulturwoche keinen Effekt mehr auf die KIR-Expression hatte (Abb. 78). Eine Zugabe von Aza hatte zu jedem Zeitpunkt einer NK-Zellgenerierung einen steigernden Einfluss auf die KIR-Expression (Abb. 75). Eine Behandlung mit Bix führte zu einer verstärkten Demethylierung im KIR-Promotor (Abb. 79).
Nährzellen waren im NK-Generierungssystem notwendig, um KIR^+ NK-Zellen zu erhalten. Jedoch konnte durch Zugabe von AZA, zu Beginn einer NK-Generierungskultur, die ohne Nährzellen durchgeführt wurde, eine Expression von KIR auf den NK-Zellen in der fünften Kulturwoche, induziert werden (Abb. 83).

4 Diskussion

4.1 Etablierung eines humanen NK-Zellentwicklungssystems zur Erzeugung von therapeutisch einsetzbaren NK-Zellen

Ziel dieser Arbeit war es, die epigenetische Regulation der *KIR*-Gene zu untersuchen, um herauszufinden, wie die *KIR*-Gene reguliert werden. Da die NK-Zellentwicklung in mehreren Entwicklungsschritten abläuft, und es sehr schwierig und kostenaufwendig ist alle Entwicklungsstadien aus dem Blut und den peripheren Lymphorganen zu isolieren, wurde ein NK-Entwicklungssystem etabliert, mit dessen Hilfe die NK-Zellentwicklung analysiert werden kann. Neben den bereits bekannten Nährzelllinien EL08, AFT, OP9 und OP9-Delta (Miller et al., 1999; McCullar et al., 2008; Beck et al., 2009) wurde in dieser Arbeit auch mit einer weiteren murinen Linie gearbeit, der UG26 (Oostendorp et al., 2002), um herauszufinden, ob sie die NK-Zellentwicklung besser unterstützte als die etablierten murinen Nährzelllinien (Abb. 15; Abb. 16; Abb. 17). Diese Linie wies jedoch keine Eigenschaft auf, die sie den anderen Linien überlegen erscheinen lies. Aber auch sie unterstützt die Generierung von NK-Zellen aus HSCs. Alle NK-Zellentwicklungsmodelle beruhen bisher auf der Kombination von murinen Nährzellen mit humanen HSCs. Diese Kombination hat jedoch einen entscheidenden Nachteil: wenn man *in vitro* generierte NK-Zellen für eine Applikation am Menschen verwenden möchte, ist eine Verwendung von murinen Nährzellen nicht zulässig. Es ist nicht möglich KIR^+ NK-Zellen aus HSCs ohne Nährzellen zu differenzieren. Sie exprimieren zwar typische NK-Zellmarker wie z.B. CD16, CD56 und NKG2A, aber es kommt zu keiner Expression von KIRs auf der Zelloberfläche (Dezell et al., 2012). Anstrengugnen KIR^+ NK-Zellen ohne Nährzellunterstützung zu erzeugen waren bisher vergeblich. Hierbei wurde versucht die Nische mit Heparin nachzubilden (Dezell et al., 2012). In dieser Arbeit wurde erstmalig ein NK-Zellentwicklungssystem etabliert, in dem humane Nährzellen verwendet wurden, um HSCs zu NK-Zellen auszudifferenzieren (Abb. 18). Als Nährzellen wurden USSCs aus dem humanen Nabelschnurblut oder humane pädiatrische MSCs verwendet. Mit ihrer Hilfe konnten Blutstammzellen zu KIR^+ NK-Zellen ausdifferenziert werden. Jedoch zeigten sich größere Unterschiede innerhalb der verschiedenen USSC-Linien. Ihre Fähigkeit die NK-Zellentwicklung zu unterstützen war in den verschiedenen Linien unterschiedlich stark ausgeprägt (Abb. 18). Diese Variabilität wiesen die MSCs nicht auf (Abb. 18). Im direkten Vergleich konnten durch Verwendung der

MSCs als Nährzelle mehr KIR^+ NK-Zellen aus HSCs differentziert werden als durch Verwendung der USSCs. Somit stellen die MSCs eine sehr gut nutzbare Nährzelllinie für ein reproduzierbares NK-Zellentwicklungsmodell dar. Die MSC ist Bestandteil des humanen Knochenmarks und daher verwundert es nicht, dass diese Zellen die NK-Differenzierung unterstützten (Frenette et al., 2013; Méndez-Ferrer et al., 2010). Jedoch unterstützte nicht jede humane Nährzelle die Entwicklung von NK-Zellen. So konnte auf humanen Fibroblasten (STF5) keine NK-Zellentwicklung durchgeführt werden. Frühe Vorläuferzellen starben auf dieser Linie im Verlauf ihrer Entwicklung zur NK-Zelle ab (Abb. 18).

Ein NK-Entwicklungssystem konnte unter Verwendung humaner Nährzellen erfolgreich etabliert werden, mit dem humane HSCs zu KIR-exprimierenden NK-Zellen differenziert wurden. Im Vergleich zur murinen Nährzelllinie EL08 kam es bei den auf MSC generierten NK-Zellen zu einer höheren Anzahl KIR^+ NK-Zellen (Abb. 19; Abb. 20). Es war nicht nur wichtig KIR^+ NK-Zellen auf den humanen Nährzelllinien zu erhalten, sondern es war auch wichtig, dass die generierten NK-Zellen funktional waren. Dies konnte erfolgreich nachgewiesen werden, da die *in vitro* generierten NK-Zellen in der Lage waren, im Leukämiemodell ihre leukämischen Zielzellen abzutöten (Abb. 22).

Ein weiterer Vorteil des humanen Entwicklungssystems war, dass die NK-Zellgenerierung stabiler verlief als auf den murinen Linien. Die humanen Nährzellen blieben als Monolayer bis zum Ende der NK-Zellentwicklung im Well nachweisbar und starben nicht ab, wie es die murinen Nährzellen taten. Außerdem exprimieren nur humane Nährzellen soweit nach heutigem Stand der Forschnung bekannt die Liganden der KIRs, die HLA-Klasse-I-Proteine. Von den murinen Nährzelllinien werden diese nicht exprimiert. Durch diesen Umstand kann das MSC-basierte Modell zur Untersuchung des Einflusses des HLA-Klasse-I-Polymorphismuses auf das KIR-Repertoire der NK-Zellen herangezogen werden - spezielle dabei die Frage, ob eine Lizensierung im *in vitro* Modell stattfindet. Diese Versuche konnten bisher nicht durchgeführt werden, da nur murine Nährzellen zu Verfügung standen.

Vermutlich reicht eine reine Co-Kultivierung der sich entwickelnden NK-Zellen mit den Nährzellen nicht aus, um diesen Effekt auszulösen. Es wird vermutlich ein zusätzliches Signal benötigt, um in NK-Zellen Lizensierung zu iniziieren. Es ist bekannt, dass die Anpassung der KIRs an die HLA-Moleküle erst nach einer Virusinfektion stattfindet (Béziat et al., 2013; Béziat et al., 2012; Björkström et al., 2011). Eine logische Schlussfolgerung wäre, die NK-Zellentwickung auf MSC-Nährzellen durchzuführen und NK-Entwicklungsstadien oder direkt die HSCs mit CMV zu infizieren. Eine weitere Möglichkeit wäre die MSC-Nährzellen

direkt mit CMV zu infizieren und auf den infizierten Nährzellen eine NK-Zellgenerierung durchzuführen. Dadurch könnten dann neue Erkenntisse bezüglich der Lizensierung von NK-Zellen gewonnen werden.

Ebenfalls wäre es möglich, in den MSCs Proteine überzuexprimieren und deren Einfluss auf die NK-Zellentwickung zu verfolgen. Bekannt ist, dass IL-15 für die Expression von KIR auf den NK-Zellen notwendig ist (Mrózek et al., 1996; Mingari et al., 1997). Weiter kann der Einfluss, der unterschiedlichen Zytokine auf die NK-Entwicklung, analysiert werden. Zu beachten ist, dass es nur bei endogener Synthese von IL-15 in MSC zu sogenannten trans-Präsentation von IL-15 kommt, was die biologische Wirksamkeit verglichen mit einer exogenen Gabe von IL-15 stark erhöht und so zu einen Anstieg der KIR-Expression führen könnte (Huntington et al., 2009).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist der immunsuppressive Charakter der MSCs. So wurde bereits gezeigt, dass MSCs die Proliferation und die Funktionalität von T-Zellen vermindert (Tse et al., 2003). Daher verwundert es, dass funktionale NK-Zellen erfolgreich aus Blutstammzellen mit einer guten Proliferationsrate auf MSC-Nährzellen generiert werden konnten (Abb. 18). MSCs sind Teil der Knochenmarknische (Frenette et al., 2013) und können einen anderen Einfluss auf Blutstammzellen als auf ausdifferenzierte Immunzellen haben. Als Teil der Knochenmarknische unterstützen sie die Entwicklung der HSCs zur NK-Zelle. Möglicherweise waren die bestrahlten MSC-Nährzellen in der vierten bis sechsten Woche der NK-Entwicklungskultur nicht mehr in einem guten Zustand. In diesem Zeitraum bildeten sich reife KIR^+ NK-Zellen und die MSCs sind nicht mehr in der Lage sie in ihrer Funktion zu inhibieren. Dass die verwendeten MSCs diese Eigenschaft aufwiesen, konnte am Beispiel der NK-Entwicklung von unreife NK-Zellen ($CD56^+/NKG2A^-/KIR^-$) und $NKG2A^+/KIR^-$ NK-Zellen aus dem Nabelschnurblut gezeigt werden: NK-Zellen, die auf EL08 kultiviert wurden proliferierten schneller als NK-Zellen, deren Expansion auf MSCs durchgeführt wurde. Es kam zu einer Akquirierung von KIR unabhängig davon, ob die NK-Zellen auf EL08 oder MSCs kultiviert wurden (Abb. 33).

4.2 NK-Zellen aus expandierten HSCs weisen eine erhöhte Agressivität gegen Leukämiezellen auf

In dieser Arbeit wurde ein System vorgestellt, mit dem man HSCs expandieren kann (Abb.7; Abb.8). Takizwawa vergleicht ausführlich unterschiedliche Ansätze um HSCs zu expandieren (Takizwa et al., 2011). Es gibt Ansätze ohne oder mit Nährzellunterstützung. Auch die

verwendeten Medien variieren stark. Walasek zeigt, dass es sehr unterschiedliche Ansätze gibt, HSCs zu expandieren, und dass die Expansionsraten stark schwanken und unterschiedlich viel Zeit für die Expansion benötigt wird (Walasek et al., 2012). Durch das in dieser Arbeit verwendete System konnten innerhalb von einem kurzen Zeitraum von nur 5-6 Tagen HSCs um mindestens den Faktor 100 expandiert werden (Abb. 7; Abb. 8). Auf diese Weise ist es möglich z.B. Nabelschnurblute für eine Transplantation zu nutzen, die ansonsten verworfen werden müssen, da ihre Zahl an HSCs für eine Transplantation nicht ausreichen würde. Auch könnte man durch Expansion der HSCs, Nabelschnurblute verwenden, um einem Erwachsenen eine Stammzelltransplantation zu ermöglichen. Da bei einer Stammzelltransplantation pro KG Körpergewicht $2 \cdot 10^6$-$3 \cdot 10^6$ Stammzellen übertragen werden, reicht ein Nabelschnurblut nicht aus, um einem Erwachsenen transplantiert zu werden (Klaus et al., 2007).

Bisher konnte noch nicht nachgewiesen werden, dass die expandierten Stammzellen vergleichbare Genexpressionsmuster und Methylierungsmuster wie unexpandierte Stammzellen aufweisen. Dies müsste z.B. durch Expressionsarrays und MeDip-Analyse erfolgen. Ebenfalls erfolgten noch keine Transplantationsexperimente in NOD/SCID Mäusen bzw. Repopulationsanalysen. Aber in dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass expandierte HSCs erfolgreich zu NK-Zellen ausdifferenziert wurden, die eine stärkere Expression von KIR auf ihrer Zelloberfläche aufwiesen als NK-Zellen, die aus unexpandiert HSCs differenziert wurden (Abb. 26). Weiter wiesen sie eine erhöhte Fähigkeit auf leukämische Zielzellen abzutöten (Abb. 27). Durch dieses Verfahren konnten aggressivere NK-Zellen erzeugt werden, welche ebenfalls effizienter zu KIR^+ NK-Zellen ausdifferenziert werden konnten.

4.3 Ein KIR-induzierendes Signal erfolgt früh im Verlauf der NK-Zellentwicklung

Es ist nicht möglich KIR^+ NK-Zellen ohne Nährzellen aus HSCs zu generieren (Dezell et al., 2012). NK-Zellen, welche sich aus HSCs entwickeln und keinen Kontakt zu Nährzellen haben, durchlaufen eine vollständige NK-Zellentwicklung inklusive NKG2A-Expression. Jedoch fehlen diesen Zellen klonotypische KIRs auf ihrer Zelloberfläche. Weiter konnte gezeigt werden, dass Notch eine wichtige Rolle bei der Induktion von KIR und für die NK-Zellentwicklung hat (Cichocki et al., 2011; Rolink et al., 2006; Beck et al., 2009). Die Zelllinie OP9 unterstützt nur schlecht die KIR-Expression. Wird sie jedoch mit dem Notch-

Liganden Delta transduziert, ist die so modifizierte Nährzelle in der Lage die KIR-Expression auf Seiten der NK-Zellen deutlich zu steigern (Abb.39; Beck et al., 2009). NK-Zellstadien, die bereits CD56 auf der Oberfläche exprimierten, konnten auch ohne Nährzellunterstützung zu KIR-exprimierenden NK-Zellen differenziert werden (Abb. 34). Dies deutete darauf hin, dass ein Signal, welches für die KIR-Expression und Transkription notwendig ist, bereits auf diesen Zellen einwirkte. Wenn die NK-Entwicklungsstadien jedoch mit Nährzellen in Kontakt traten, kam es nur noch zu einer Verstärkung der KIR-Expression (Abb. 34). Ein von den Nährzellen abgegebenes Signal könnte wiederum von Notch vermittelt sein. Cichocki konnte bereits zeigen, dass Notch für die Entwicklung der NK-Zelle eine wichtige Rolle spielt. *Nemo-like* Kinasen (NLK) können das Notch-Signal inhibieren. Die Mikro-RNA miR181 inhibiert NLK. Im Verlauf der NK-Zellentwicklung wird die miR181 exprimiert und bewirkt, dass ein auf die Zelle einwirkendes Notch-Signal nicht inhibiert werden kann (Cichocki et al., 2011).

Aus den bisherigen Beobachtungen geht hervor, dass das Signal für die KIR-Induktion bereits früh während der NK-Zellentwicklung gesetzt werden mußte, da bereits $CD56^+$ NK-Zellen in der Lage waren auch ohne Nährzellunterstützung zu KIR^+ NK-Zellen zu differenzieren (Abb. 34). In einem weiteren Experiment dieser Arbeit wurden Blutstammzellen zwei Wochen lang im Verlauf einer *in vitro* NK-Differenzierung auf der Nährzelllinie UG26, die schlecht die Expression von KIR induziert, kultiviert. Zwei Wochen lang wurden auch HSCs auf AFT oder EL08 ausplattiert. Anschließend wurden die Zellen auf der gut KIR-induzierenden EL08 zu NK-Zellen ausdifferenziert. In Zellen, die zwei Wochen auf AFT oder UG26 kultiviert wurden, konnte keine starke KIR-Expression ausgelöst werden, wenn sie anschließend auf EL08 überführt wurden (Abb. 35). Vorläuferzellen, die von EL08 auf EL08 umplattiert wurden, exprimierten am Schluss der NK-Generierung deutlich mehr KIR auf ihrer Zelloberfläche, als NK-Zellen die zu Beginn ihrer NK-Zellentwicklung auf AFT oder UG26 kultiviert wurden (Abb. 37). Dies deutet darauf hin, dass in diesem Zeitraum ein KIR-induzierendes Signal auf die sich entwickelnde NK-Zellen einwirkte. Ein weiteres Experiment in der hier vorliegenden Arbeit zeigte, dass ein Signal, welches notwendig für die KIR-Expression war, bereits sehr früh in der NK-Entwicklung gesetzt wurde. Dazu wurden HSCs für nur eine Woche auf MSC-Nährzellen im NK-Zelldifferenzierungsmedium kultiviert. Wenn nun $CD34^+$ Zellen, die keine Differenzierungsmarker trugen (Abb. 37), aus dieser Kultur isoliert wurden und ohne Nährzellkontakt weiter zu NK-Zellen ausdifferenziert wurden, entwickeln sich aus diesen Zellen KIR^+ NK-Zellen (Abb. 36; Abb. 38). Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass in der ersten Woche ein Signal auf die Zelle

einwirkte, welches es ihr ermöglichte später KIR zu exprimieren. Die isolierten Zellen entsprachen dem ersten Enwticklungsstadium der NK-Zellentwicklung. Man könnte in der ersten Woche oder zu verschiedenen Zeitpunkten der ersten Woche einen Notch-Inhibitor zu den Zellen geben. Hierdurch könnte überprüft werden, ob es sich in der ersten Woche um ein Notch abhängiges Signal handelt, welches für die KIR-Induktion notwendig ist. Anschließend müssten die Zellen ohne Nährzellunterstützung zu NK-Zellen ausdifferenziert werden und die KIR-Expression bestimmt werden.

Eine weitere Frage ist, warum in einem frühen Stadium ein KIR-induzierendes Signal gesetzt wird. Denn zu diesem Zeitpunkt sind die Zellen noch nicht fest auf die NK-Entwicklung determiniert und können noch andere Zellen des Blutes hervorbringen. Welche Gene durch das Signal beeinflusst werden müsste auch noch analysiert werden. Dazu wurden bereits zwei Zellpopulationen zur *deep sequencing* Analyse ins Primatenzentrum nach Göttingen geschickt. Die $CD34^+$ Zellen wurden für eine Woche mit bzw. ohne Nährzellkontakt im NK-Differenzierungssystem kultiviert. Die Ergebnisse hierzu stehen noch aus.

4.4 *Framework KIRs* werden im Verlauf der NK-Zellentwicklung vor den klonotypischen *KIRs* demthyliert und transkribiert

Die *KIR*-Gene können in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Die *framework KIRs*, zu denen die *KIRs KIR3DL3, KIR2DL4* und *KIR3DL2* gehören, sind in allen Genotypen vertreten. Aber nicht alle klonotypischen *KIRs* sind in allen Genotypen vorhanden. Weiterführende Analysen der *KIR*-Promotoren ergeben, dass sie epigenetisch reguliert werden. So weisen die *KIR*-Promotoren eine 300–400 Basenpaar lange Sequenz auf, die reich an CpG-Nukleotiden ist. Mittels Methylierungsanalysen wurde gezeigt, dass die *KIR*-Promotoren methyliert sind, wenn sie nicht exprimiert werden und demethyliert, wenn sie exprimiert werden. Ebenfalls weisen sowohl HSCs, als auch B-Zellen und T-Zellen methylierte *KIR*-Promotoren auf. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Methylierung für die *KIR*-Regulation verantwortlich ist (Carringent et al., 2003; Santourlidis et al., 2002).

Bisher wurde nur der Beginn und das Ende der NK-Zellentwicklung untersucht und die oben beschriebenen Erkenntnisse gewonnen. Es wurden keine Zwischenstadien analysiert, die zeigen könnten, in welchem Stadium die Demethylierung der *KIR*-Gene stattfindet. Mit Hilfe, des in dieser Arbeit etablierten NK-Zellentwicklungssystems, konnten nun diese Zwischenstadien analysiert werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Transkription der framework *KIRs* im Verlauf der NK-Zellentwicklung vor der Transkription der

klonotypischen *KIRs* beginnt (Abb. 41). So konnten in den CD56$^+$/CD117$^+$ NK-Zellen erste *KIR2DL4*-Transkripte identifiziert werden. *KIR2DL4* ist der erste KIR, der im Verlauf der *in vitro* NK-Zellentwicklung nachgewiesen werden konnte. Im anschließenden Entwicklungsstadium kam es zur Transkription von *KIR3DL2* und *KIR3DL3*. Für den klonotypischen KIR *KIR2DL3* konnte im *in vitro* Modell eine Transkription erst in NK-Zellen, die auf ihrer Zelloberfläche KIR2DL3 exprimierten, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass erst die *framework KIRs* und anschließend die klonotypischen *KIRs* transkribiert werden (Abb. 41).

In der Literatur ist hinterlegt, dass die *KIR*-Gene durch Methylierung im *KIR*-Promotor repremiert werden (Santourlidis et al., 2002). Für den *KIR*-Lokus ist nicht bekannt, ob es im Verlauf der NK-Entwicklung zu einer gezielten Demethylierung der *KIR*-Promotoren kommt. Oder ob alle *KIR*-Promotoren in einem ersten Schritt demethyliert werden und erst später die nicht exprimierten *KIRs* remethyliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Methylierung der *KIR*-Promotoren invers mit der *KIR-Transkription* korreliert. So waren erst *KIR2DL3*-Transkripte in KIR$^+$ NK-Zellen nachweisbar, in dem auch die Methylierung auf dem *KIR2DL3*-Promotor entfernt wurde. Bis zu diesem Stadium blieb der *KIR2DL3*-Promotor methyliert (Abb. 41; Abb. 44). Für *KIR2DL4* konnte ein Verlust an Methylierung bereits im CD56$^+$/CD117$^+$ Stadium identifiziert werden. Im CD56$^+$/CD117$^-$ Stadium war der *KIR2DL4*-Promotor demethyliert und wurde im Verlauf der NK-Zellentwicklung auch nicht wieder remethyliert (Abb. 41; Abb. 43). Der *KIR2DL4*-Promotor wurde als erster *KIR*-Promotor demethyliert. Anhand der gewonnenen Ergebnisse wurde gezeigt, dass die Demethylierung während der Entwickliung in mehreren Schritten abläuft. Zunächst wird der *KIR2DL4*-Promotor demethyliert und der *KIR2DL3*-Promotor bleibt methyliert. Erst im letzten Entwicklungsstadium, in dem die klonotypischen KIRs exprimiert werden, liegt der *KIR2DL3*-Promotor auch demethyliert vor (Abb. 43; Abb. 44).

4.5 Klonotypische *KIRs* werden im Verlauf der CD56^{bright} NK-Zellentwicklung demethyliert

Mit Hilfe des *in vitro* NK-Entwicklungsmodells konnte erfolgreich der Verlauf der Demethylierung der *KIR*-Gene verfolgt werden und einige Fragen über den Ablauf der Demethylierung wurden geklärt (Abb. 43; Abb. 44). Leider wurde kein Übergangsstadium identifiziert, in dem die klonotypischen *KIR*-Gene demethyliert wurden. Es wird vermutet,

dass CD56^{bright} NK-Zellen eine Vorstufe der CD56^{dim} NK-Zellen bilden (Chan et al., 2007; Romagnani et al., 2008; Ouyang et al., 2007; Béziat et al., 2011). CD56^{bright} NK-Zellen exprimieren NKG2A und KIR2DL4, aber nur sehr schwach klonotypische KIRs. Daher stellen CD56^{bright} NK-Zellen ein ideales Zellstadium dar, um ein Übergangsstadium zu identifizieren, in dem die klonotypischen KIRs demethyliert werden (Freud et al. 2006; Caligiuri et al. 2008 Le Garff-Tavernier et al., 2010; Béziat et al., 2011).

In den CD56^{bright} NK-Zellen konnte eine Transkription von klonotypischen KIRs nachgewiesen werden (Abb. 28). Durch weitere Analyse des CD56^{bright} NK-Stadiums wurden die CD56^{bright} NK-Zellen in zwei Gruppen aufgeteilt. Ein Teil der CD56^{bright} NK-Zellen war CD16^{+}, die übrigen CD56^{bright} NK-Zellen, auch klassische CD56^{bright} NK-Zellen genannt, exprimierten CD16 nicht (Abb. 29; Abb.30). Durchflusszytometrische Analysen der CD56^{bright} Population bezüglich der KIR-Expression, die in dieser Arbeit und von Béziat und Uciochowski durchgeführt wurden, kamen zu folgenden übereinstimmenden Ergebnissen: Die KIR-Expression war nur sehr schwach auf den klassischen CD56^{bright} NK-Zellen nachweisbar. CD16^{+} CD56^{bright} NK-Zellen wiesen eine stärkere klonotypische KIR-Expression auf (Abb. 30; Caligiuri 2008; Béziat et al., 2011; Poli et al., 2009; Uciechowski et al., 1992). Für die KIR-Expression auf den NK-Zellen konnte in dieser Arbeit eine interessante Beobachtung gemacht werden: je mehr CD16 auf der Oberfläche von NK-Zellen nachweisbar war, desto höher war der prozentuale Anteil an KIR-exprimierenden NK-Zellen (Abb. 31). Auch kam es auf den CD16^{+} CD56^{bright} NK-Zellen zu einer gemeinsamen Expression von klonotypischen KIRs und NKG2A (Abb. 31). Bei den CD56^{dim} NK-Zellen schließen sich klonotypische KIRs und NKG2A eher aus und nur wenige Zellen exprimieren KIRs und NKG2A gemeinsam (Valiante et al., 1997 Björkström et al., 2010). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die CD16^{+} CD56^{bright} NK-Zellen ein Übergangsstadium zu den CD56^{dim} NK-Zellen sind. Durch funktionale Analysen der Zellpopulationen wurde diese Vermutung bestätigt. Die gewonnenen Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit sind mit den Versuchsergebnissen Béziats vergleichbar (Béziat et al., 2011). CD16^{+} CD56^{bright} NK-Zellen wiesen Marker von CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zellen auf. Sie produzierten weniger IFN-γ als klassische CD56^{bright} NK-Zellen (Abb. 32). CD16^{+} CD56^{bright} NK-Zellen töten Zielzellen besser aber als die klassischen CD56^{bright} Zellen (Béziat et al., 2011). Somit befinden sie sich auch aus funktioneller Sicht zwischen den klassischen CD56^{bright} und den CD56^{dim} NK-Zellen.

Es kann gezeigt werden, dass es sich bei den CD16^{+} CD56^{bright} NK-Zelle um ein Übergangsstadium von den klassischen CD56^{bright} NK-Zellen zu den CD56^{dim} NK-Zellen

handelt. Daher wurde die *KIR*-Transkription und Promotormethylierung in den CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zellen untersucht.

Einige in dieser Arbeit untersuchten klassischen und CD16^{+} CD56^{bright} NK-Zellen wiesen eine Oberflächenexpression von klonotypischen KIRs auf. Da aber für die weiteren Untersuchungen CD56^{bright} NK-Zellen benötigt wurden, welche keine KIR-Expression auf ihrer Zelloberfläche aufwiesen, wurden KIR^{-} CD56^{bright} aus der gesamten CD56^{bright} Population isoliert. Zunächst wurde die Transkription von *KIR2DL3* in CD56^{bright} NK-Stadien bestimmt und mit der von CD56^{dim} NK-Stadien verglichen. In den CD56^{dim} NK-Zellen kam es zu einer deutlich stärkeren Transkription von *KIR2DL3* als in den CD56^{bright} Stadien. Auch innerhalb der CD56^{bright} NK-Zellen konnte eine unterschiedliche Transkription von *KIR2DL3* festgestellt werden. *KIR2DL3* wurde in CD16^{+} CD56^{bright} NK-Zellen stärker transkribiert als in den klassischen CD56^{bright} NK-Zellen (Abb. 42). Bei der Analyse der Methylierung des *KIR2DL3*-Promotors konnte gezeigt werden, dass CD16^{+} CD56^{bright} NK-Zellen weniger *KIR2DL3*-Promotormethylierung aufwiesen, als die klassischen CD56^{bright} NK-Zellen. Die Methylierung des *KIR2DL3*-Promotors bewegte sich in beiden CD56^{bright} Stadien unter dem Niveau von KIR2DL3^{-} CD56^{dim} NK-Zellen, erreichte aber nicht das Niveau von KIR2DL3^{+} CD56^{dim} NK-Zellen (Abb. 45). Werden nun die Methylierungsergebnisse des *KIR2DL3*-Promotors mit den Transkriptionsdaten der CD56^{bright} NK-Zellen verglichen, korrelieren diese invers und stützen die in der Literatur hinterlegten Beobachtungen, dass die Transkription von *KIR* durch Methylierung reguliert wird (Abb. 42; Abb. 45, Santourlidis et al., 2002). Durch die durchgeführten Analysen wurde nachgewiesen, dass es im Verlauf der CD56^{bright} Zellentwicklung zu einer Demethylierung der klonotypischen *KIRs* kommt. Bei der Analyse des CD56^{+} NKG2A^{-} Stadiums im NK-Generierungsmodell konnte noch eine vollständige Methylierung des *KIR2DL3*-Promotors nachgewiesen werden (Abb. 44).

Auffällig war, dass die *framework* KIRs jeweils in allen Genotypen centromerisch in der Mitte und telomerisch im *KIR*-Lokus liegen (Carrington et al. 2003). Ob ihre Position im Lokus eine Rolle für die *KIR*-Transkription spielt, ist unbekannt. Im *in vitro* Differenzierungssystem konnte nachgewiesen werden, dass die *framework KIRs* vor den klonotypischen *KIRs* exprimiert wurden (Abb. 41). Auch ist die Transkription des *framework KIRs KIR2DL4* in den beiden CD56^{bright} Stadien stärker ausgeprägt als in den CD56^{dim} NK-Zellen (Abb.42). In CD16^{+} CD56^{bright} NK-Zellen wurde mehr *KIR2DL4* transkribiert als in den klassischen CD56^{bright} NK-Zellen. In diesem Stadium kam es auch zu einer stärkeren Transkription von *KIR2DL3* (Abb. 42). Vielleicht ist es notwendig, *KIR2DL4* stark zu transkribieren, um die Demethylierung der klonotypischen KIRs zu ermöglichen. Durch seine

Transkription werden weitere epigenetische Faktoren zum Lokus rekrutiert, welche für die Öffnung der klonotypischen *KIR*-Gene notwendig sind. Diese Vermutung wird durch Beobachtungen gestützt, die im Verlauf einer NK-Zellentwicklung gemacht wurden. Bei NK-Zellen, in denen die *KIR2DL4*-Transkription reprimiert wurde, kam es zu einer Verminderung der klonotypischen KIRs im Vergleich zu NK-Zellen, die eine normale *KIR2DL4*-Transkription aufwiesen (Abb. 70). Erstaunlicherweise kam es trotz der Verminderung der Transkription von *KIR2DL4* in den behandelten Zellen noch zu einer schwachen Expression von klonotypischen KIRs (Abb. 70). Dies kann verschiedene Gründe haben. So kann es sein, dass es nicht ausreicht nur *KIR2DL4* auszuschalten. Zudem kann es sein das Transkription der verbleibenden *framework KIRs* vollkommen ausreicht, um epigenetische Faktoren zum Lokus zu rekrutieren, die dann für die Aktivierung der klonotypischen KIRs sorgen.
Es könnte ebenfalls sein, dass es genügt, dass der *KIR2DL4*-Promotor demethyliert vorliegt. Die verwendete shRNA sorgt nicht für eine Remethylierung des Lokus (Abb. 66). Die CpG-Insel im *KIR2DL4*-Promotor bleibt unmethyliert. So konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Methylierung von CpG-Inseln in Promotoren weitere reprimierend wirkende Proteine zum Promotor rekrutiert werden. Diese sorgen für eine inhibitorische Histonsignatur (Jones et al., 1998; Bird et al., 1999). Da in diesem Versuch keine Remethylierung des *KIR2DL4*-Promotors ausgelöst werden konnte, hätte dies zur Folge, dass sich kein inhibitorisches Signal am *KIR2DL4*-Promotor bildet. Für die Zelle bleibt dieser Promotorbereich sowohl auf DNA als auch auf Chromatinebene aktiv. Dieser Umstand könnte dafür verantwortlich sein, dass die klonotypischen KIRs weiter, jedoch schwächer, exprimiert werden.

4.6 *rRNA*-Gene als Modell für die *KIR*-Regulation

Es wurde zunächst angenommen, dass nur die codierenden Bereiche des Genoms genetische und für die Zelle relevante Informationen enthalten. Dieses Bild veränderte sich mit der Zeit und es stellte sich heraus, dass auch die nichtcodierenden Bereiche eine Funktion aufweisen und nicht nur genetischer Abfall sind. In diesen nichtcodierenden Bereichen entstehen Transkripte, die eine wichtige Aufgabe bei der Regulation von Genen haben (Eddy et al., 2001; Carninci et al., 2005; Costa 2005). Diese Trankritpe werden Nichtcodierendetranskripte bzw. Antisensetranskripte genannt (Dolnick 1997).
Ein gut untersuchtes Beispiel für Gene, welche epigenetisch reguliert sind, sind die *rRNA*-Gene (Grummt 2007; McStay et al., 2008). Die *rRNA*-Gene weisen eine Tandemanordnung

auf, vergleichbar mit der Anordnung der *KIR*-Gene. Sie sind sozusagen hintereinander geschaltet (Carrington et al., 2003; Grummt 2007; McStay et al., 2008). In humanen Zellen befinden sich sehr viele Kopien der *rRNA*-Gene in dichter Folge. Einige sind aktiv, andere epigenetisch abgeschaltet, je nachdem wie viele Ribosome die Zelle benötigt. Durch die epigenetische Regulation dieser Gene durch Methylierung ist es sehr schnell möglich, dass die Zelle *rRNA*-Gene an- bzw. abschalten kann (Grummt 2007; McStay et al., 2008). Durch weitere Untersuchungen konnte erarbeitet werden, wie die Regulation der *rRNA*-Gene funktioniert. Majumder zeigt, dass die DNA-Methylierung und die DNMTs eine Rolle bei der Regulation der *rRNA*-Gene spielen (Majumder et al., 2006). Auch Histonmodifikationen und die Chromatinstruktur sind an der Regulation beteiligt (Grummt et al., 2010). Stromaufwärts eines jeden klonotypischen *KIR*-Gens befindet sich ein ALU-Element, vor dem *KIR2DL4*-Gen befindet sich ein LINE-Element. Auch in den intrinsischen Bereichen der *rRNA*-Gene findet man ebenfalls Alu-Elemente. So weist die genetische Struktur der *rRNA*-Gene Übereinstimmungen mit den *KIR*-Genen auf (Gonzalez et al., 1993; Carrington et al., 2003).

Im Genom humaner Zellen gibt es Bereiche, in denen repetetive Elemente verstärkt nachweisbar sind. Bereiche in denen repetetive Elemente verstärkt auftreten sind das Heterochromatin, die Telomerregion an den Enden der Chromosome und die Centromerregion. Die repetetiven Elemente könnten, wenn sie nicht durch epigenetische Mechanismen reprimiert wären, im Genom durch Rekombination hin und her springen. Diese repetetiven Elemente sind jedoch transkriptionel nicht inaktiv. Aber auch in den *rRNA*-Genen sind repetetive Elemente zu finden. In der Maus konnte Sylvester zeigen, dass vor den *rRNA*-Genen B1-Elemente liegen. Diese B1-Elemente sind homolog zu den in humanen Zellen vorkommenden Alu-Elementen (Sylvester et al., 2004). So konnte Mayer zeigen, dass aus den repetetiven Elemente eine nichtcodierende-RNA transkribiert wird, die komplementär zum *rRNA*-Gen ist. Sie weist eine Länge von 300 Nukleotiden auf (Mayer et al., 2006). Es konnte aufgrund dieser Befunde gezeigt werden, dass sense- und antisense-Transkripte für die Aktivierung und Inaktivierung der *rRNA*-Gene sorgen. So bewirkt die Trankription der *antisense*-RNA eine Remethylierung des *rRNA*-Promotors (Bierhoff et al., 2010). Durch die Methylierung des Promotors werden weitere Enzyme rekrutiert. Diese wiederum beeinflussen die Chromatinstruktur und sorgen für die Bildung einer repressiven Chromatinstruktur (Bierhoff et al., 2014).

Für *KIR* konnte Li antisense-RNAs in final differenzierten NK-Zellen nachweisen. Eine NK-Zelle exprimiert nur Antisensetranskripte von nicht exprimierten KIRs. Antisensetranskripte von exprimierten KIRs sind nicht nachweisbar. Er vermutet, dass antisense-RNAs in NK-

Zellen an der Regulation der *KIR*-Transkription beteiligt sind. Jedoch untersucht er keine Stadien der NK-Zellentwicklung (Li et al., 2010).

Li stellt die Hypothese auf, dass im bekannten *KIR*-Promotor ein zweiter Promotor existiert. Der distale Promotor ist für die Bildung eines sense-Promotortranskriptes und KIR-Transkriptes verantwortlich. Der proximale ist Initiator von antisense-Transkripten. Wenn mehr antisense-Trankript als distales Promotortranskript gebildet wird, kommt es zur Stilllegung des KIRs. Wenn jedoch die Menge an Sensetranskript überwiegt, wird das *KIR*-Gen abgelesen und exprimiert (Li et al. 2010). Weiter konnte gezeigt werden, dass eine antisense-RNA, die später als piwi-ähnliche RNA identifiziert wurde, einen Einfluss auf die Regulation der *KIR*-Gene hat (Cichocki et al., 2010). Durch Überexpression der antisense-RNA kann die gesamte KIR-Expression in allen NK-Zellen komplett unterbunden werden. Dieses Modell hat aber einen entscheidenden Nachteil, da durch die Überexpression die Transkription aller *KIRs* verhindert wird. Daher ist es nur schwer vorstellbar, dass die klonotypischen *KIRs* von dieser piwi-ähnlichen RNA reguliert werden, denn damit könnte die für die *KIR*-Gene charakteristische Verteilung nicht erklärt werden, da ja die piwi-ähnliche RNA die Transkription aller KIRs unterbindet (Li et al., 2010; Cichocki et al., 2010).

Für die *KIR*-Gene kam es bei der Untersuchung der Promotortranskripte zu einigen Auffälligkeiten. Für *KIR2DL4* konnte im *in vitro* Modell gezeigt werden, dass die stärkste *KIR2DL4*-Transkription im $CD56^+/CD117^+$ Stadium nachweisbar war (Abb. 41). In diesem Stadium kam es zu einer schwachen *NKT2DL4*-Transkription (Abb. 48). Im Verlauf der NK-Entwicklung stieg die *NKT2DL4*-Transkription an und gleichzeitig kam es zu einem Absinken der *KIR2DL4*-Transkription (Abb. 41).

In einfach KIR^+ NK-Zellen wurde auch die Transkription von NKT verfolgt (Abb. 50). So wurde das *NKT3DL1* stärker in $KIR3DL1^-$ NK-Zellen transkribiert als in $KIR3DL1^+$ NK-Zellen. Das NKT des nicht exprimierten KIRs wurden stärker exprimiert als von exprimierten.

Weiter konnte beobachtet werden, dass das NKT für *KIR2DL3* in den beiden untersuchten $CD56^{bright}$ NK-Zellen abwesend war, jedoch konnte es im Verlauf einer NK-Generierungskultur in $CD56^+/NKG2A^-/KIR^-$ wie auch in KIR^+ NK-Zellen nachgewiesen werden(Abb. 48; Abb. 49).

Diese Bebachtungen sollten weiter verfolgt werden, da die Möglichkeit besteht, dass die NKTs einen Einfluss auf die *KIR*-Regulation haben könnten. So könnten NKTs im Verlauf einer NK-Generierung oder in unterschiedlichen NK-Stadien überexprimiert werden. Wenn

das NKT an der Regulation der *KIR*-Gene beteiligt wäre, würde eine Überexpression zu einer verminderten KIR-Expression führen.

4.7 RNAi-vermittelte Reprimierung der *NKG2A*-Transkription führt zu einer verminderten KIR-Expression

Es scheint, dass die Expression von NKG2A auch einen Einfluss auf die KIR-Expression hat. Bei NKG2A handelt es sich um einen inhibitorischen Rezeptor, der vor der klonotypischen KIR-Expression auf den NK-Zellen zu finden ist. Eigene Analysen in der *in vitro* NK-Entwicklungskultur haben gezeigt, dass *NKG2A* zusammen mit *KIR2DL4* transkribiert wurde und damit deutlich vor den klonotypischen KIRs (Abb. 40). In CD56^{bright} NK-Zellen kam es auch zu einer gemeinsamen Expression von NKG2A und KIR2DL4. CD16^{+} CD56^{bright} NK-Zellen wiesen eine Kopplung von klonotypischen KIRs und NKG2A auf (Abb. 31). Im weiteren Verlauf der NK-Entwicklung war festzustellen, dass sich die Expression von NKG2A und KIR ausschließen. Für die CD56^{dim} NK-Zelle wurde dies bereits gezeigt (Valiante et al., 1997). Die meisten CD56^{dim} NK-Zellen exprimieren KIR ohne NKG2A (Valiante et al. 1997, Björkström et al., 2010). Dies deutet darauf hin, das die CD56^{bright} NK-Zelle eine Vorstufe der CD56^{dim} NK-Zelle ist (Nagler et al., 1989; Chan et al., 2007; Romagnani et al., 2008).

Wenn jedoch NKG2A in CD56^{+}/NKG2A^{-} NK-Zellen ausgeschaltet wurde, kam es zu einer Reduktion von KIR (Abb. 72).

Eine ähnliche Beobachtung konnte auch während einer *in vitro* NK-Entwicklungskultur, in der die Transkription von *NKG2A* vermindert wurde, gemacht werden. Es kam auch in ihnen zu einer verminderten Expression von KIR (Abb. 73). NKG2A stellt möglicherweise einen Schutzmechanismus dar, der den Körper vor autoreaktiven NK-Zellen schützt. Erst nachdem die NK-Zellen einen inhibitorischen KIR auf ihrer Oberfläche exprimieren, der an körpereigenem HLA binden kann, kommt es zu einer Reduktion der NKG2A-Expression. Wenn dieser Mechanismus gestört ist, erfolgt auch keine starke Induktion von KIR.

4.8 H3K9me2 hat eine reprimierende Wirkung auf die *KIR*-Gene in der frühen Phase der NK-Zellentwicklung

Für die *KIR*-Gene kann nachgewiesen werden, dass die DNA-Methylierung die Expression der *KIR*-Gene in ausdifferenzierten NK-Zellen reguliert. Dazu werden NK3.3 oder

finaldifferenzierte NK-Zellen mit AZA/TSA behandelt. Die DNA-Methylierung wird dadurch auf den *KIR*-Promotoren von reprimierten KIRs entfernt und es kommt zur KIR-Expression (Santourlidis et al., 2002). Weiter wird für *KIR* gezeigt werden, dass die *KIR*-Gene in HSCs eine stark gepackte Chromastinstruktur aufweisen (Graffmann et al. 2006). In NK-Zellen liegt der Lokus unabhängig davon, ob KIRs exprimiert werden, in relaxierter Chromatinform vor. Genauere Analysen der Chromatinmodifikationen zeigen, dass sowohl aktive als auch inaktive *KIR*-Gene dieselben aktiven Histonmodifikationen aufweisen. Sie sind H3K4me3 und hyperacetyliert. Somit werden die *KIRs* in ausdifferenzierten NK-Zellen nur noch durch die DNA-Methylierung reprimiert (Graffmann et al., 2006; Santourlidis et al., 2008).

Veränderungen der H3K9me2 wurden bereits für den *KIR*-Promotor beschrieben. Dabei wurden jedoch nur HSCs und ausdifferenzierten NK-Zellen beschrieben, Untersuchungen von Zwischenstadien fehlen. Die Beobachtungen, die in dieser Publikation gemacht wurden, stimmen mit den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen, überein. In HSCs war der *KIR*-Promotor reprimiert und in KIR exprimierenden NK-Zellen war er geöffnet (Abb. 46; Abb. 47).

Jedoch konnten weitere Erkenntnisse gewonnen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde für den *KIR*-Promotor ein Rückgang der H3K9me2 im Verlauf der NK-Zellentwicklung festgestellt. Erst wenn der entsprechende KIR exprimiert wurde, ist im *KIR*-Promotor H3K4me3 nachweisbar. Die Transkription von *KIR2DL4* startete in $CD56^{+}/CD117^{+}$ NK-Zellen (Abb. 41). Sie begann früher als die Trankription von *KIR2DL3*, die in $CD56^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen startete. Für den *KIR2DL4*-Promotor war deutlich früher H3K4me3 nachweisbar. In den NK-Zellen, in denen auch *KIR2DL4*-Transkription nachgewiesen werden konnte, wurde ebenfalls eine aktive Chromatinstruktur für den *KIR2DL4*-Promotor nachgewiesen. Hier hat der *KIR2DL3*-Promotor noch eine inaktive Chromatinstruktur (Abb. 41; Abb. 46; Abb. 47). Erst in KIR^{+} NK-Zellen, in dem die KIR-Expression im *in vitro* Generierungssystem nachweisbar war, wurde eine aktive Chromatinsignatur auch für den *KIR2DL3*-Promotor nachgewiesen (Abb. 41; Abb. 47). Der *KIR*-Promotor von *KIR2DL4* wies vor dem Promotor von *KIR2DL3* im *in vitro* Modell eine H3K4me3 Modifikation auf (Abb. 46; Abb. 47). Wie schon zuvor für die Promotormethylierung konnte auch für die Histonmodifikation H3K4me3 ein mehrstufiger Prozess beobachtet werden. In einem zukünftigen Experiment könnte die H3K9me2 und H3K4me3 in den beiden, in dieser Arbeit untersuchten $CD56^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellstadien untersucht werden. Shi zeigt, dass der Verlust von H3K9me durch JMJD2B Voraussetzung dafür ist, dass es zu einer Methylierung von H3K4 kommt (Shi et al., 2011). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass H3K9me2 im *KIR*-Promotor abnahm. Wenn die

H3K9me2 im *KIR*-Promotor nur noch sehr schwach vorhanden war, konnte ein H3K4me3 Signal im *KIR*-Promotor nachgewiesen werden (Abb. 46; Abb. 47).

Durch die Inhibition der G9a mit BIX wurde die behandelte Kultur daran gehindert weiter H3K9me2 im Genom zu setzten (Janzen et al., 2010; Kubicek et al., 2007). Wenn dies früh im Verlauf der NK-Zellentwicklung geschah, bewirkte die Inhibition der G9a einen Anstieg der KIR-Epxression im *in vitro* Modell (Abb.78). Auch in CD56$^{\mathbf{bright}}$ NK-Zellen konnte dieser Effekt nachgewiesen werden (Abb.76). Auf ausdifferenzierte KIR^{+} NK-Zellen und NK-Zelllinien hatte eine BIX-Behandlung keinen KIR-steigernden Effekt, da in ausdifferenzierten NK-Zellen die Menge an H3K9me2 im KIR-Promotor stark zurückgegangen war und diese Modifikation in diesen Stadien keine regulierende Wirkung auf den KIR-Lokus mehr hatte (Abb. 73; Abb. 76, Santourlidis et al., 2008). Im Verlauf der späten Phase der NK-Zellentwicklung werden die *KIR*-Gene nur noch durch die DNA-Methylierung reguliert. Eine BIX-Zugabe im Verlauf einer NK-Zellgenerierung und die damit einhergehende Verminderung der H3K9me2 im KIR-Lokus, bewirkte, dass im CD56-Stadium der *KIR*-Promotor eine deutlich verminderte DNA-Methylierung aufwies (Abb. 79). Ähnliche Beobachtungen konnten bei der Demethylierung von *primordial germ cells* (PGC) gemacht werden. Für PGCs konnte in der Maus gezeigt werden, dass sie innerhalb eines Tages fast vollständig demethyliert werden können. Sie regulieren die G9a herunter und eine Folge ist, dass die Menge an H3K9me2 vermindert wird (Seki et al., 2007).

Vermutlich können Repressoren, die zuvor an H3K9me2 gebunden waren, aufgrund der Abwesenheit der Modifikation am KIR-Lokus kein inhibierendes Signal aufrechterhalten. Eine Folge ist die Demetyhlierung des Promotors (Abb. 79). Stella, auch PGC7 genannt, bindet an H3K9me2 und schützt auf diese Weise vor Abbau von H3K9me2 (Nakamura et al., 2007; Nakamura et al., 2012). In Abwesenheit von Stella wird TET3 zur H3K9me2 rekrutiert und löst die Demethylierung der DNA aus (Gu et al., 2011; Nakamura et al., 2012). Wie die anschließende Demethylierung erfolgt, ist immer noch nicht vollständig verstanden. Es wird vermutet, dass es im Verlauf der Demethylierung zur Bildung von DNA-Einzelstrangbrüchen kommt. Diese werden vom DNA-Reparaturmechanismus beseitigt. Durch chemische Inhibition des DNA-Reparaturmechanismuses konnte in PGCs eine verlangsamte Demethylierung nachgewiesen werden (Hajkova et al., 2008; Hajkova et al., 2010; Wossidlo et al., 2010).

Für den *KIR*-Lokus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Histonmodifikation H3K9me2 einen Einfluss auf die KIR-Expression hatte. Durch das Absenken der H3K9me2 erfolgte in den Zellen eine stärkere Demethylierung im *KIR*-Promotor (Abb. 79). In einer NK-

Zellkultur, in der durch BIX Zugabe H3K9me2 vermindert wurde, entwickelten sich mehr KIR^+ NK-Zellen, als ohne diese Behandlung (Abb. 77; Abb. 78).

4.9 Einfluss der RNA-Interferenz auf den *KIR*-Promotor

Erstmalig in Planzen wurde entdeckt, dass die Expression von Genen durch Verwendung von komplementären Sequenzen vermindert wird (Napoli *et al*., 1990; Mizuno *et al*., 1984). Ebenfalls wurde breits gezeigt, dass eine sehr effizente Verminderung der Transkription für eine Remethylierung im Promotor des reprimierten Gens sorgt (Mette et al., 2000; Castanotto et al 2005).

Daher wurde versucht die Transkription der *KIR*-Gene *KIR2DL3* bzw. *KIR2DL4* sehr stark zu reprimieren um zu schauen, ob hierdurch aktive *KIR*-Genpromotoren remethyliert werden können (Abb. 64; Abb. 65). Erkenntnisse bezüglich der KIR-Genregulation sind sehr wichtig, denn wenn man die Expression von KIRs für medizinische Zwecke manipulieren will, ist es vorteilhaft, wenn die *KIR*-Gene durch Remethylierung ihres Promotors permanent ausgeschalten werden können. Dadurch entfällt die Notwendigkeit die Transkription eines KIRs ständig zu vermindern.

Mit einer spezifischen shRNA konnte die Transkription von *KIR2DL3* in NK3.3 reduziert werden (Abb. 65). Durch starkes Vermindern des mRNA-Transkriptes konnte ein Anstieg der Methylierung im *KIR2DL3*-Promotor beobachtet werden (Abb. 66). Wie stark diese ausgeprägt war, muss durch eine Sequenzierung des *KIR2DL3*-Promotors ermittelt werden.

Ebenfalls konnte die Transkription von *KIR2DL4* stark vermindert werden, jedoch kam es hier trotz einer starken Verminderung der Transkription nicht zu einer Remethylierung im *KIR2DL4*-Promotor (Abb. 64; Abb. 66). Hierfür kann es verschiedene Gründe geben. Einmal wäre es denkbar, dass sich *KIR2DL4* nicht remethylieren lässt, ohne dass es negative Auswirkung für die NK-Zelle hat. Es könnte auch sein, dass die RNA-Sequenz, die im RNAi-Mechanismus im RISC-Komplex gebunden ist, eine nicht 100%ige Sequenzhomologie zur Zielsequenz aufweist. Da die *KIR*-Gene polymorph sind, könnte es sein, dass die verwendete Sequenz nicht vollständig homolog zum hier vorliegenden Allel ist und nur die Transkription inhibiert wird und es nicht zu einer Remethylierung kommt.

4.10 Nicht nur epigenetische Faktoren sind für die Transkritpion von *KIR* verantwortlich

Wenn HSC- oder IPS-Zellen mit AZA/TSA behandelt wurden, führte dies nicht zu einer sofortigen Transkription von *KIR*. Drei Tage nach Exposition der Zellen mit AZA/TSA konnte in den behandelten Zellen keine *KIR*-Transkription nachgewiesen werden (Abb. 74), obwohl die Zellen mit demethylierenden und chromatinöffnenden Substanzen behandelt wurden. Eine ähnliche Beobachtung konnte gemacht werden, wenn AZA in der ersten Woche einer NK-Generierung zu den HSCs gegeben wurde und diese weiter zu NK-Zellen ausdifferenziert wurden. Auch in diesen Zellen kam es nicht zu einer verfrühten KIR-Expression. Die Behandlung der Zellen mit AZA führt zu einer höheren Anzahl an KIR-exprimierenden NK-Zellen. Die KIR-Expression begann in den behandelten Zellen nicht früher als in den unbehandleten Zellen im Verlauf des *in vitro* Generierungsmodells (Abb. 75).

Zu Beginn der NK-Zellentwicklung reprimieren zwei inhibitorische Signale den *KIR*-Promotor. Dabei handelt es sich um die DNA-Methylierung und die Histonmodifikation H3K9me2. Nachdem die reprimierende H3K9 Modifikation im Verlauf der NK-Zellentwicklung durch Zugabe von BIX entfernt wurde, kam es nicht zu einer verfrühten KIR-Expression (Abb. 77) Dies könnte daran liegen, dass in den NK-Zellen zu diesem Zeitpunkt keine Transkriptionsfaktoren vorhanden sind, welche die *KIR*-Transkription auslösen können (Presnell et al., 2006). Ein Faktor, der an der Transkription von KIR beteiligt ist, ist RUNX (Presnell et al., 2006). RUNX wirkt als transkriptioneller Regulator. Die RUNX-Familie besteht aus drei Familienmitglieder: RUNX1, RUNX2 und RUNX3 (Levanon et al., 2004). Sie spielen eine wichtige Rolle in der Hämatopoese und sind während der Differenzierung der Blutstammzelle in die verschiedenen Zelltypen des Blutes aktiv (De Bruijn et al., 2004). KIRs, wie zum Beispiel *KIR2DL5B,* welche in keinem Genotyp transkribiert werden, weisen eine Mutation in der RUNX-Bindestelle auf. Diese Mutation sorgt dafür, dass es nicht zu einer Transkription dieser *KIRs* kommt (Gómez-Lozano et al., 2007). Weiter konnte für den *KIR2DL4*-Promotor gezeigt werden, dass hauptsächlich durch Bindung von RUNX3 am *KIR2DL4*-Promotor die Transkription von *KIR2DL4* initiiert wird (Presnell et al., 2012). Presnell vermutet, dass RUNX mit weiteren Transkriptionsfaktoren interagiert. Dieser Komplex bindet am *KIR2DL4*-Promotor und verhindert, dass der Promotor erneut von DNMTs methyliert wird. Von RUNX ist auch bekannt, dass es Histonacetylasen rekrutieren kann, welche für eine geöffnete Chromatinstruktur sorgen. Dies wiederum erhöht

die Wahrscheinlichkeit, dass der Bereich demethyliert wird (Bistow et al., 2003, Kitabayashi et al., 2001, Kitabayashi et al., 1998). Daher kann vermutlich bei Ausbleiben der RUNX-Bindung an den *KIR*-Promotoren keine aktive Histonacetylierung etabliert werden. Wodurch das *KIR*-Gen nicht transkriptionell aktiv werden kann.

4.11 Veränderung der Genexpression von epigenetischen Schlüsselfaktoren

In dieser Arbeit wurde die Transkription von verschiedenen epigenetisch relevanten Genen während der NK-Zellentwicklung untersucht, um herauszufinden, welche Gene für die epigenetische Regulation der *KIR*-Gene eine Rolle spielen könnten.
Eine Proteinfamilie, die für die DNA-Methylierung verantwortlich ist, sind die DNMTs. Dass DNA-Methylierung eine entscheidende Rolle bei der differenziellen *KIR*-Genexpression in NK-Zellen spielt, wurde bereits nachgewiesen. Durch die Zugabe von AZA wird die DNMT1 in ihrer Funktion, das Methylierungsmuster im Verlauf der Zellteilung vom Mutter- auf den Tocherstrang zu übertragen, gehemmt. Hierdurch werden von final differenzierten NK-Zellen zuvor reprimierte KIRs exprimiert (Santourlidis et al., 2002).
Dass DNMTs einen Einfluss auf die Entwicklung von HSC zu final differenzierten Zellen haben, konnte bereits gezeigt werden (Hodges et al., 2011, Deaton et al., 2011, Bock et al., 2012). Durch Ausschalten der DNMT1 ist die Vermehrung der HSCs, wie auch ihre Fähigkeit in myeloide oder lymphoide Entwicklungslinien zu differenzieren gestört. Die Differenzierung in die myeloide Linie wird bevorzugt (Trowbridge et al., 2009; Broske et al., 2009). Die Rolle von DNMT3A und DNMT3B für die hämatopoetische Entwicklung ist unklar. Im Mausversuch bewirkt der Verlust von DNMT3A oder DNMT3B in HSCs nur eine minimale Störung in ihrer Proliferation (Tadokoro et al., 2007).
Auch für die *rRNA*-Gene konnte nachgewiesen werden, dass DNMT3B an der Remethylierung der *rRNA*-Gene, beteiligt ist (Schmitz et al., 2010). Daher wurde der Einfluss der verschiedenen DNMTs auf die Transkription von KIR untersucht. Durch die Verwendung von spezifischen shRNAs gegen *DNMT1* oder *DNMT3B* wurde im Verlauf der *in vitro* NK-Zellentwicklung die Transkription der entsprechenden DNMTs reprimiert. Die Reprimierung der Transkription der DNMTs hatte zur Folge, dass es zu einer höheren Zahl an KIR exprimierenden NK-Zellen innerhalb der infizierten Zellen kam (Abb. 63). Durch die schwächere Transkription der DNMTs könnte es zu einer passiven Demethylierung kommen. Es wäre denkbar, dass während der NK-Zellentwicklung die Aktivität der DNMT sinkt und es dadurch zu einer Demethylierung des KIR-Promotors kommt.

Dass sowohl die Reprimierung der DNMT1 und DNMT3B einen Einfluss auf die KIR-Expression hatte, kann damit erklärt werden, dass die DNMTs kooperierend wirken (Rhee et al., 2002; Kim et al., 2002).

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse aus den shRNA-Versuchen wurde auch die Transkription der DNMTs im Verlauf der NK-Zellentwicklung bestimmt. Die Untersuchung ergab jedoch, dass sich die Transkription der *DNMT*s in den Stadien, in denen die KIRs demethyliert wurden, nicht von der *DNMT*-Transkription in den übrigen Stadien unterschied (Abb. 51, Abb. 52, Abb. 53). Man könnte annehmen, dass die *DNMT*-Transkription in den Stadien, in denen die KIRs demethyliert werden, zurück geht. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis kann sein, dass die DNMTs postranskriptionell in ihrer Funktion inhibiert werden.

Die Gegenspieler der DNMTs sind die DNA-Demethylasen. Es gibt Hinweise, dass die GADD45-Familie an der Demethylierung beteiligt ist (Barreto et al., 2007, Niehrs et al., 2012, Schäfer 2013). Daher wurde die Transkription von *GADD45A* und *GADD45B* in der NK-Generierungskultur verfolgt. Es fiel dabei auf, dass im NKG2A$^+$ NK-Zellen und KIR$^+$ NK-Zellen die stärkste Transkription vorlag. Von der Transkription eines Gens in einem NK-Stadium kann jedoch nicht auf seine Funktion geschlossen werden (Abb. 55; Abb. 56). Für weitere Experimente sollte eine shRNA gegen GADD45 erstellt werden, um den Einfluss von GADD45 auf die NK-Entwicklung zu ermitteln.

4.12 Steigerung der KIR-Expression durch AZA oder BIX

Neben BIX wurde auch der Einfluss weiterer epigenetisch wirkender Substanzen (AZA und TSA) auf die KIR-Expression im Verlauf der NK-Zellentwicklung in dieser Arbeit untersucht. Jede dieser Substanzen wirkte auf einen anderen epigenetischen Mechanismus ein. AZA bewirkte den Verlust der DNA-Methylierung, durch BIX kam es zu einer Verminderung der H3K9me2 und TSA sorgte für eine geöffnete Chromatinstruktur. Diese Substanzen bewirkten, dass es zu einer gesteigerten KIR-Oberflächenexpression auf den *in vitro* generierten NK-Zellen kam (Abb. 75; Abb. 78; Abb. 82).

Versuche NK-Zellen, die klonotypische KIRs exprimieren, aus Blutstammzellen *in vitro*, ohne Nährzellunterstützung zu generieren waren bisher erfolglos (Dezell et al., 2011). Aufgrund der bisher erhaltenen Ergebnisse, dass die epigenetisch wirksamen Substanzen (AZA, TSA oder BIX) eine verstärkte KIR-Expression auslösten, wurde in weiteren Experimenten überprüft, ob durch Exposition von HSCs mit diesen Substanzen eine *in vitro* NK-Zelldifferenzierung möglich war. Die NK-Zellgenerierung wurde ohne

Nährzellunterstützung durchgeführt, welche zur Bildung von KIR-exprimierenden NK-Zellen notwendig war (Abb. 83).

Eine erfolgreiche Generierung von KIR^+ NK-Zellen ohne Nährzellunterstützung hätte Vorteile. Für eine spätere medizinische Anwendung am Menschen wäre dies wichtig, da in den Nährzellen Viren ruhen könnten, die im Verlauf der *in vitro* NK-Differenzierung die HSCs bzw. die differenzierenden NK-Zellen infizieren könnten. Wenn es möglich wäre, ohne Nährzellunterstützung KIR^+ NK-Zellen zu generieren, würde dieses Risiko entfallen.

Überraschenderweise starben HSCs, welche nicht auf Nährzellen kultiviert wurden, durch die Behandlung mit BIX ab. HSCs, die auf Nährzellen kultiviert wurden, wiesen eine solche Empfindlichkeit gegenüber BIX nicht auf (Abb. 77). Möglicherweise sind die HSCs ohne Nährzellunterstützung viel empfindlicher, da sie keine Signale von Nährzellen erhalten. Dies führt vielleicht zu einer verminderten Vitalität der Zelle.

Jedoch war es möglich HSCs, welche keinen Kontakt zu Nährzellen hatten, in der ersten Woche einer NK-Entwicklungskultur mit AZA zu behandeln und es entstanden ohne Nährzellunterstützung KIR^+ NK-Zellen (Abb. 83). Auch hier zeigte sich wieder das schon zuvor bekannte Muster. Erfolgte die Behandlung zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Zellentwicklung wirkte sich dies erst drei bis vier Wochen später auf die Expression von KIR aus. Dezell war nicht in der Lage, ohne Unterstützung durch Nährzellen, KIR^+ NK-Zellen aus HSCs zu erzeugen, obwohl er versuchte die Stammzellnische durch Heparin nachzubilden (Dezell et al., 2011).

4.13 Möglicher medizinischer Anwendungsbereich der Versuchsergebnisse

Die in dieser Arbeit erstmalig erforschten Mechanismen der *KIR*-Regulation und Modulation haben eine wesentliche Relevanz für die klinische Anwendung.

Das vorgestellte Verfahren zur Stammzellexpansion eröffnet die Möglichkeit, eine geringe Anzahl an hämatopoetischen Stammzellen, wie sie beispielsweise aus Nabelschnurblut gewonnen werden können, zu einer ausreichenden Anzahl zu expandieren, um sie für eine Transplantation zur Verfügung zu stellen.

Des Weiteren ermöglicht es, aus den *in vitro* angereicherten hämatopoetischen Stammzellen, mittels der Kultivierung unter den entwickelten Bedingungen, effizient NK-Zellen auszudifferenzieren, die *KIR* und/oder NKG2A auf ihrer Zelloberfläche tragen. Dies geschieht auf humanen Nährzellen, während in der Vergangenheit eine Differenzierung von HSCs zu NK-Zellen nur auf murinen Nährzellen möglich war. Eine Differenzierung von HSCs auf

humane Nährzellen, wurde in dieser Arbeit etabliert. Es hat den großen Vorteil, dass die NK-Entwicklung in einem geschlossenen humanen System verläuft. In den murinen Nährzellen können murine Viren enthalten sein, so dass eine Infektion von humanen HSCs im Verlauf einer NK-Differenzierung nicht ausgeschlossen werden kann. Es ist daher nicht erlaubt, NK-Zellen, die auf murinen Nährzellen differenziert wurden, für immuntherapeutische Zwecke am Menschen zu verwenden. Die eingesetzten humanen MSC-Nährzellen wurden bereits unter GMP-Bedingungen kultiviert.

Weiter kann durch die Applikation epigenetisch wirkender Substanzen zu einer Differenzierungskultur ein Anstieg in der Anzahl der KIR^+ NK-Zellen beobachtet werden. Ebenfalls ist es möglich durch Anwendung von AZA, einer epigenetisch wirksamen Substanz, HSCs zu KIR-exprimierenden NK-Zellen ohne Nährzellunterstützung auszudifferenzieren. Der große Vorteil hiervon ist, dass auf eine Co-Kultivierung mit Nährzellen vollständig verzichtet werden kann.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist, dass im Verlauf einer *in vitro* NK-Zellgenerierungskultur epigenetisch wirkende Substanzen zu den Zellen gegeben werden, welche die KIR-Expression in den differenzierenden NK-Zellen deutlich stärker induzieren. Die NK-Zellen werden angeregt, verschiedene KIRs zu exprimieren. Anschließend kann das KIR-Repertoire *in vitro* beeinflusst werden, indem einzelne KIRs durch starke Reprimierung in ihrer Transkription permanent abgeschaltet werden. Dies geschieht unter Anwendung eines RNAi-Verfahrens. Hierdurch ist dann sichergestellt, dass die NK-Zelle diesen reprimierten KIR nicht mehr expremieren kann. Durch die Manipulation ihrer KIR-Rezeptoren wird die Aggressivität und damit die Wirksamkeit gegen Tumore gesteigert. Nach einer *in vitro* RNAi-vermittelten Modulation der KIR-Effektoren können die antitumoral konditionierten NK-Zellen einem Krebspatienten zugeführt werden, um hämatologische Malignitäten oder solide Tumoren spezifisch zu therapieren. Die so manipulierten NK-Zellen patrouillieren im Blut und im Gewebe und können nicht nur den Primärtumor bekämpfen, sondern auch Metastasen, welche sich im Körper des Patienten ausgebreitet haben. Was sich günstig auf die Behandelbarkeit auch spät diagnostizierter Kerbserkrankungen auswirkt.

In der Gentherapie dagegen, werden Antikörper eingesetzt, die zwar auch hochspezifisch gegen einen Tumor sind, aber keine Metastasen angreifen können, die noch keinen Zugang zum Blutsystem haben. NK-Zellen jedoch könnten auch diese Metastasen erkennen und erfolgreich abtöten.

5 Literaturverzeichnis

Akashi K., Traver D., Miyamoto T., Weissman I.L. (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. Nature 404: 193-197.

Aktas E., Kucuksezer U.C., Bilgic S., Erten G., Deniz G. (2009) Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. Cell. Immunol. 254, 149–154.10.1016.

Allis, D., JenuweinT, und Reinberg D. (2007) Epigenetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.

Andre P., Biassoni R., Colonna M., Cosman D., Lanier L. L., Long E. O., Lopez-Botet M., Moretta A., Moretta L., Parham P., Trowsdale J., Vivier E., Wagtmann N. and Wilson M. J. (2001) New nomenclature for MHC receptors. *Nat Immunol* 2, 661.

Antequera F., Bird A. (1993a)Number of CpG islands and genes in human and mouse. Proc Natl Acad Sci USA 90:11995-9.

Antequera F., Bird A. (1993b) CpG islands EXS. 64: 169-85.

Aramburu J., Balboa M.A., Ramirez A., Silva A., Acevedo A., Sanchez-Madrid F., De Landazuri M. O. and Lopez-Botet M. (1990) A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor-gamma/delta+ T lymphocytes. I. Inhibition of the IL-2-dependent proliferation by anti-Kp43 monoclonal antibody. J Immunol 144, 3238-47.

Arnon T. I., Achdout H., Lieberman N., Gazit R., Gonen-Gross T., Katz G., Bar-Ilan A., Bloushtain N., Lev M., Joseph A., Kedar E., Porgador A. and Mandelboim O. (2004) The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46. *Blood* 103, 664-72.

Attwood, J.T., Yung, R.L. and Richardson, B.C. (2002) DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol. Life Sci*., 59, 241-25.

Ayyanathan, K. Lechner M.S., Bell P., Maul GG., Schultz DC., Yamada Y., Tanaka K., Torgoe K., Rauscher FJ. (2003) Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation. Genes Dev. 17, 1855–1869.

Barreto G., Schäfer A., Marhold J., Stach D., Swaminathan SK., Hada V., Döderlein G., Maltry N., Wu W., Lyko F., Niehrs C. (2007) Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. Nature. 8;445(7128):671-5.

Bashirova A. A., Martin M. P., McVicar D. W. and Carrington M. (2006) The Killer Immunoglobulin-Like Receptor Gene Cluster: Tuning the Genome for Defense. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7, 277- 300.

Bauer, S. Groh V., Wu J., Steinle A., Phillips JH., Lanier LL., Spies.T (1999) Activation of natural killer cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. Science 285, 727–730.

Baum CM., Weissman IL., Tsukamoto AS., Buckle AM., Peault B. (1992) Isolation of a candidate human hematopoietic stem--cell population. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 2804-2808.

Beck RC., Padival M., Yeh D., Ralston J., Cooke KR., Lowe JB. (2009) The Notch ligands Jagged2, Delta1, and Delta4 induce differentiation and expansion of functional human NK cells from CD34+ cord blood hematopoietic progenitor cells. Biol Blood Marrow Transplant. Sep;15(9):1026-37.

Beck RC. (2011) Production of cytotoxic, KIR-negative NK cells from CD34+ cord blood cells with the use of Notch signaling. Transfusion. Nov;51.

Becknell B., Caligiuri MA. (2005) Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. Adv Immunol.;86:209-39. Review.

Berger SL., Kouzarides T., Shiekhattar R. and Shilatifard A. (2009) An operational definition of epigenetics. Genes Dev *23*: 781-783.

Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., and Hannon, G. J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 409, 363–6.

Bernstein BE., Mikkelsen TS., Xie X., Kamal M., Huebert DJ., Cuff J. (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. Cell; 125(2):315-326.

Bestor, T.H. (1998). The host defence function of genomic methylation patterns. In: Novartis Foundation Symposium vo. 214 Epigenetics pp 187-199.

Bestor TH. (2008) The DNA methyltransferases of mammals. Hum Mol Genet *9*: 2395-2402, 2000.

Béziat V., Duffy D., Quoc SN., Le Garff-Tavernier M., Decocq J., Combadière B., Debré P., Vieillard V. (2011) CD56brightCD16+ NK cells: a functional intermediate stage of NK cell differentiation. J Immunol. Jun 15;186(12):6753-61.

Béziat V., Dalgard O., Asselah T., Halfon P., Bedossa P., Boudifa A., Hervier B., Theodorou I., Martinot M., Debré P., Björkström NK., Malmberg KJ., Marcellin P., Vieillard V. (2012) CMV drives clonal expansion of NKG2C+ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. Eur J Immunol. Feb;42(2):447-57.

Béziat V., Liu LL., Malmberg JA., Ivarsson MA., Sohlberg E., Björklund AT., Retière C., Sverremark-Ekström E., Traherne J., Ljungman P., Schaffer M., Price DA., Trowsdale J., Michaëlsson J., Ljunggren HG., Malmberg KJ. (2013) NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. Blood. Apr 4;121(14):2678-88.

Bhatia M., Wang JC., Kapp U., Bonnet D., Dick JE. (1997) Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune--deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 5320--5325.

Bhutani N., Brady JJ., Damain M., Sacco A., Corbel SY., Blau HM. (2010): Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. Nature 25;463(7284):1042-7.

Biassoni R., Cantoni C., Pende D., Sivori S., Parolini S., Vitale, M., Bottino C. and Moretta, A. (2001) Human natural killer cell receptors and co-receptors. Immunol Rev 181: 203-14.

Bierhoff H., Schmitz K., Maass F., Ye J., Grummt I (2010): Noncoding transcripts in sense and antisense orientation regulate the epigenetic state of ribosomal RNA genes. Cold Spring Harb Symp Quant Biol.;75:357-64.

Bierhoff H., Postepska-Igielska A., Grummt I. (2014) Noisy silence: Non-coding RNA and heterochromatin formation at repetitive elements. Epigenetics. Jan 1;9(1):53-61.

Bird A., DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. (1980) Nucleic Acids Res. 8 1499–1504.

Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O.J. and Macleod, D. (1985) A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. Cell 40, 91–99.

Bird A., Wolffe AP. (1999) Methylation induced repressionbelts, braces, and chromatin. *Cell*, 99(5):451-4.

Bird A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev; 16(1):6-21.

Biron CA., Nguyen KB., Pien GC., Cousens LP., Salazar-Mather TP. (1999) Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate Zytokines. *Annu Rev Immunol* 17:189-220.

Binstadt BA., Brumbaugh KM., Dick CJ., Scharenberg AM., Williams BL. (1996) Sequential involvement of Lck and SHP-1 with MHC-recognizing receptors on NK cells inhibits FcR-initiated tyro- sine kinase activation. *Immunity* 5:629–3.

Boos MD., Ramirez K., Kee BL. (2008) Extrinsic and intrinsic regulation of early natural killer cell development. Immunol Res.;40(3):193-207.

Braud, V., Jones, E. Y., McMichael, A. (1997) The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA- E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. Eur. J. Immunol. 27, 1164 – 1169.

Braud, V.M. Allan D.S., OCallaghan C.A., Söderstrom K., D Andrea A., Ogg G.S., McMichael A.J. (1998) HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. Nature 391, 795–799.

Bristow CA., Shore P. (2003) Transcriptional regulation of the human MIP-1alpha promoter by RUNX1 and MOZ. Nucleic Acids Res. Jun 1;31(11):2735-44.

Björkström NK., Riese P., Heuts F., Andersson S., Fauriat C., Ivarsson MA., Björklund AT., Flodström-Tullberg M., Michaëlsson J., Rottenberg ME., Guzmán CA., Ljunggren HG., Malmberg KJ. (2010) Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. Blood. Nov 11;116(19):3853-64.

Björkström NK., Svensson A., Malmberg KJ., Eriksson K., Ljunggren HG. (2011)Characterization of natural killer cell phenotype and function during recurrent human HSV-2 infection. PLoS One. ;6(11):e27664.

Bock, C., Beerman I., Lien WH., Smith ZD., Gu H., Boyle P., Gnirke A., Fuchs E., Rossi DJ., Meissner A. (2012) DNA methylation dynamics during in_vivo differentiation of blood and skin stem cells. Mol. Cell 47, 633–647.

Borrego, F., Ulbrecht, M., Weiss, E.H., Coligan, J.E. & Brooks, A.G. (1998) Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signalsequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. J. Exp. Med. 187, 813–818.

Bourc'his, D., Xu, G.L., Lin, C.S., Bollman, B and Bestor, T.H. (2001). Dnmt3l and the etablishment of maternal genomic imprints. *Science*, 294, 2536-2539.

Bourc'his D., Bestor TH. (2004) Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*, 7004:96-9.

Boyton RJ., Altmann DM. (2007) Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease. *Clin Exp Immunol.* 149 1-8.

Boyes J., Bird A. (1992) Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J*, 11:327-33.

Briercheck EL., Freud AG., Caligiuri MA. (2010) Human natural killer cell development Chapter Eight aus Natural Killer Cells Basic Science and Clinical Applications Elsevier ISBN: 978-0-12-370454-2.

Broske, A. M. et al. (2009) DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction. Nature Genet. 41, 1207–1215.

Brusilovsky M., Cordoba M., Rosental B., Hershkovitz O., Andrake MD., Pecherskays A., Einarson MB., Zhou Y., Brainman A., Campbell KS., Porgador A. (2013) Genome-wide siRNA screen reveals a new cellular partner of NK cell receptor KIR2DL4: heparan sulfate directly modulates KIR2DL4-mediated responses. J. Immunol. 15:191:5256-67.

Caiafa P. and Zampieri M. (2005) DNA methylation and chromatin structure: the puzzling CpG islands, *J. Cell. Biochem.*, 94, 257-265.

Castanotto D., Tommasi S., Li M., Li H., Yanow S., Pfeifer GP., Rossi JJ. (2005): Short hairpin RNA-directed cytosine (CpG) methylation of the RASSF1A gene promoter in HeLa cells. Mol. Ther. 12(1):179-83.

Caligiuri MA. (2008) Human natural killer cells. *Blood* 112 461-9

Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M. C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C., Kodzius, R., Shimokawa, K. et al. (2005) The transcrip- tional landscape of the mammalian genome. Science 309, 1559–1563.

Carlsten M., Malmberg KJ., Ljunggren HG. (2009) Natural killer cell-mediated lysis of freshly isolated human tumor cells. *Int J Cancer.* 124 757-62

Carrington M., Norman P. (2003) The KIR Gene Cluster. National Library of Medicin (US), Bethesda (MD).

Campbell J. J., Qin S., Unutmaz D., Soler D., Murphy K. E., Hodge M. R., Wu L. and Butcher E. C. (2001) Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J Immunol* 166, 6477-82.

Campbell, K. S. and Purdy, A. K. (2011) Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal struc- tures and mutations. Immunology 132, 315 – 325.

Cedar H., Bergman Y. (2009) Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. Nature Reviews Genetics 10, 295-304.

Celluar and Molecular Immunobiology 2002 Saunders ISBN 0-7216-0008-5

Cerwenka A. and Lanier L. L. (2001) Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol* 1, 41-9.

Challen, G. A. et al. (2012) DNMT3A is essential for hematopoietic stem cell differentiation. Nature Genet. 44, 23–31.

Chan HW., Kurago ZB., Stewart CA., Wilson MJ., Martin MP., (2003). DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. J. Exp. Med. 197:245–55.

Chan A., Hong DL., Atzberger A. (2007) CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. J Immunol; 179:89–94.

Chang C., Rodriguez A., Carretero M., Lopez-Botet M., Phillips JH., Lanier LL. (1995) Molecular characterization of human CD94: a type II membrane glyco- protein related to the C-type lectin super- family. *Eur. J. Immunol.* 25:2433–37.

Chendrimada, T.P. Gregory RI., Kumaraswamy E., Norman J., Cooch N., Nishikura K., Shiekhattar R. (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. Nature 436, 740-4.

Chen C. and Okayama H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. Mol. Cel. Biol. 7:2274-2252.

Chen T., Li E. (2006) Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. Curr Top Microbiol Immunol; 301:179-201.

Cheng X., Blumenthal RM. Mammalian DNA-Methyltransferases: a structural perspective. 2008) Structure 16(3):341-350.

Chuang, L.S., Ian, H.I., Koh, T.W., Ng, H.H., Xu, G. and Li, B.F. (1997). Human DNA-(cytosine-5)methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF 1. *Science*, 277, 1996-2000.

Cichocki F., Lenvik T., Sharma N., Yun G., Anderson SK, Miller JS. (2010) Cutting edge: KIR antisense transcripts are processed into a 28-base PIWI-like RNA in human NK cells J Immunol. Aug 15;185(4):2009-12.

Cichocki F., Felices M., McCullar V., Presnell SR., Al-Attar A., Lutz CT., Miller JS. (2011) Cutting edge: microRNA-181 promotes human NK cell development by regulating Notch signaling. J Immunol. Dec 15;187(12):6171-5.

Colonna M., Spies T., Strominger JL., Ciccone E., Moretta A., (1992) Alloantigen recognition by two human natural killer cell clones is associated with HLA-C or a closely linked gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7983–85

Colonna, M., Borsellino, B., Falco, M., Ferrara, B., and Strominger, J. (1993) HLA-C is the inhibitory ligand that determines domiannt resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 90: 12000-12004.

Colonna M., Samaridis J. (1995) Cloning of Ig-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human NK cells. *Science* 268:405–8.

Colucci, F., Di Santo, J.P. and Leibson, P.J. (2002) Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons? Nat. Immunol. 3, 807–813.

Cooper M.A., Fehniger T.A. and Caligiuri M. A. (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22, 633-40.

Costa, F.F. (2005) Non-coding RNAs: new players in eukary- otic biology. Gene 357, 83–94.

Cullen BR. (2005) RNAi the natural way. Nat Genet. Nov;37(11):1163-5.

Cullen BR. (2006) Induction of stable RNA interference in mammalian cells. Gene Ther. Mar;13(6):503-8.

Cullen SP., Martin SJ. (2008) Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ*. 15 251-62.

Cumano A. and Godin I. (2007) Ontogeny of the hematopoietic system. Annu. Rev. Immunol. 25, 745-785.

D'Andrea A., Chang C., Franz-Bacon K., McClanahan T., Phillips JH., Lanier LL. (1995) Cutting edge: molecular cloning of NKB1: a natural killer cell receptor for HLA-B allotypes. *J. Immunol.* 155:2306– 10.

Deaton, A.M. & Bird, (2011) A. CpG islands and the regulation of transcription. Genes Dev. 25, 1010–1022.

De Bruijn, M.F. and Speck, N.A., (2004) Core-binding factors in hematopoiesis and immune function. Oncogene. 23: 4238–4248.

Degli-Esposti, M.A. & Smyth, M.J. (2005) Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. Nat. Rev. Immunol. 5, 112–124 .

De Smedt, M., I. Hoebeke, J. Plum. (2004) Human bone marrow $CD34^+$ progenitor cells mature to T cells on OP9-DL1 stromal cell line without thymus microenvironment. Blood Cells Mol. *Dis. 33*: *227*-332.

Dezell SA., Ahn YO., Spanholtz J., Wang H., Weeres M., Jackson S., Cooley S., Dolstra H., Miller JS., Verneris MR. (2012) Natural killer cell differentiation from hematopoietic stem cells: a comparative analysis of heparin- and stromal cell-supported methods. Biol Blood Marrow Transplant: 4:536-45.

Ding L., Saunders TL., Enikolopov G., Morrison SJ. (2012) Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. Nature 481: 457-462.

Di Santo J.P. (2006) Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. Annu. Rev. Immunol. 24,257-286.

Dolnick B.J., (1997) Naturally occurring antisense RNA, Pharmacol. Ther. 75 179–184.

Domaica CI., Fuertes MB., Uriarte I., Girart MV., Sardañons J., Comas DI., Di Giovanni D., Gaillard MI., Bezrodnik L., Zwirner NW. (2012) Human natural killer cell maturation defect supports in vivo CD56(bright) to CD56(dim) lineage development. PLoS One.;7(12):e51677.

Eckhardt,F. (2006) DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. Nat. Genet. 38, 1378–1385.

Eddy SR. (2001) Non-coding RNA genes and the modern RNA world. Nat Rev Genet. Dec;2(12):919-29.

Edwards, C.A. and Ferguson-Smith, A.C. (2007) Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. Curr. Opin. Cell Biol. 19, 281–289.

Egeland T. (1998) The CD34 molecule and hematopoietic progenitor cell studies a challenge in clinical medicine. *Vox Sang* 74 Suppl 2, 467-8.

Ehrlich M., Gama-Sosa MA., Huang LH., Midgett RM., Kuo KC., McCune RA., Gehrke C. (1982) Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res*, 8:2709-21.

Eischen CM., Leibson PJ. (1997) Role for NK-cell-associated Fas ligand in cell-mediated cytotoxicity and apoptosis. Res. Immunol 148(3):164-9.

Elbashir SM., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 411:494-498.

Esteve PO., Chin HG., Benner J., Feehery GR., Samaranayake M., Horwitz GA. (2009) Regulation of DNMT1 stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A; 106(13):5076-5081.

Espada J., Esteller M. (2007) Epigenetic control of nuclear architecture. Cell Mol Life Sci 64: 449-457.

Fadda, L. Borhis G., Ahmed P., Cheent K., Pageon SV., Cazaly A., Stathopoulos S., Middleton D., Mulder A,. Claas FH., Elliott T., Davis DM., Purbhoo MA., Khakoo SI. (2010) Peptide antagonism as a mechanism for NK cell activation. Proc. Natl Acad. Sci. USA 107, 10 160 – 10 165.

Farag S.S., Fehniger T.A., Ruggeri L., Velardi A. and Caligiuri M.A. (2002) Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 100, 1935-47.

Farag SS., Caligiuri MA. (2006) Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev.* 20 123-37.

Fatemi M., Hermann A., Pradhan S., Jeltsch A., (2001) The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. J. Mol. Biol. 2001, 309, 1189 – 1199.

Fehniger TA, Shah MH., Turner MJ. (1999) Differential Zytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: impli- cations for the innate immune response. J Immunol; 162:4511–20.

Fehniger, T.A., Cooper, M.A., Nuovo, G.J., Cella M., Facchetti, F., Colonna, M., and Caligiuri, M.A. (2003) CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity 10.1182/blood-2002-09- 2876. Blood *101*, 3052-3057.

Feldman N Gerson A., Fang J., Li E., Zhang Y., Shinkai Y., Cedar H., Bergman Y.(2008) G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. Nature Cell Biol. 8, 188-194.

Felices M., Ankarlo D.E.M, Lenvik T.R, . Miller J.M. (2013) Notch Signaling Induces de novo KIR-Expression and NK Cell Functional Maturation. KIR workshop 2013 Minnesota.

Ferlazzo G, Lin SL., Goodman K., Morandi B., Muller WA., Moretta A., Münz C. (2004). The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig- like receptors and become cytolytic. J Immunol *172*, 1455-1462.

Fischle W., Wang Y. und Allis CD. (2003). Histone and chromatin cross-talk. Curr Opin Cell Biol 15, 172-183.

Frenette PS., Pinho S., Lucas D., Scheiermann C. (2013) Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. Annu Rev Immunol. ;31:285-316.

Freud AG., Caligiuri MA. (2006) Human natural killer cell development. *Immunol Rev*. 214 56-72.

Freud AG., Yokohama A., Becknell B., Lee MT., Mao HC., Ferketich AK (2006b) Evi- dence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. J Exp Med 203-204.

Fics G., Branco MR., Seisenberg S., Santos F., Krueger F., Hore TA., Marques CJ., Andrews S., Reik W (2011) Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. Nature 19:473(7347):398-402.

Fukagawa T., Nogami M., Yoshikawa M., Ikeno M., Okazaki T., Takami Y., Nakayama T., Oshimura M. (2004) Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. Nat. Cell Biol. 6(8):784-91.

Fuks F., Hurd PJ., Wolf D., Nan X. Bird AP., Kouzarides T. (2003) The methyl-CpG- binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. J Biol Chem; 278(6):4035-4040.

Galy A., Travis M., Cen D., Chen B. (1995) Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. Immunity 3: 459-473.

Gardiner C., Guethlein L., Shilling, H., Pando M., Carr W., Rajalingam R., Vilches C., and Parham P. (2001) Different NK Cell Surface Phenotypes Defined by the DX9 Antibody Are Due to KIR3DL1 Gene Polymorphism. J Immunol. 166: 2992-3001.

Gardiner CM. (2008) Killer cell immunoglobulin-like receptors on NK cells: the how, where and why. Int J Immunogenet 35 1-8.

Gardiner-Garden, M. and Frommer, M. (1987) CpG islands in vertebrate genomes. J. Mol. Biol. 196, 261–282.

Glienke J., Sobanov Y., Brostjan C., Steffens C., Nguyen C., Lehrach H., Hofer E. and Francis F. (1998) The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex. *Immunogenetics* 48, 163-73.

Goodridge JP., Witt CS., Christiansen FT. and Warren HS. (2003) KIR2DL4 (CD158d) genotype influences expression and function in NK cells. J Immunol 171 , 1768-74.

Goll, G.M., Kirpekar, F., Maggert, K.A., Yoder, J.A., Hsieh, C.L., Zhang, X., Golic, K.G., Jacobsen, S.E. and Bestor, T.H. (2006) Methylation of tRNAsp by the DNA-Methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, 311, 395-398.

Gómez-Lozano N., Trompeter HI., de Pablo R., Estefanía E., Uhrberg M., Vilches C. (2007) Epigenetic silencing of potentially functional KIR2DL5 alleles: Implications for the acquisition of KIR repertoires by NK cells. Eur J Immunol. Jul;37(7):1954-65.

Gong J., Maki G., Klingemann H-G. (1994) Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. Leukemia 8: 652-58.

Gonzalez IL., Tugendreich S., Hieter P., Sylvester JE. (1993) Fixation times of retroposons in the ribosomal DNA spacer of human and other primates. *Genomics*, 18(1):29-36.

Graffmann N., Santourlidis S., Christ J., Wernet P., Uhrberg M. (2006) Direct and quantitative analysis of chromatin accessibility by MIRECAL--a Micrococcus nuclease/real-time PCR chromatin accessibility assay with locus specificity. Anal Biochem, 354(2): 308-10.

Graham F.L. and van der Eb A.J. (1973) A new technique fort he assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology 52:456-467.

Graham F.L., Smiley J., Russel W.C., Nairn R. (1977) Charactaristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus typ 5. J. Gen. Virol. 36: 59-72.

Gre´goire C. Chasson L., Luci., Tomasello., Geissmann F., Vivier E., Walzer T. (2007) The trafficking of natural killer cells. Immunol. Rev. 220, 169-182.

Grummt I. (2007) Different epigenetic layers engage in complex crosstalk to define the epigenetic state of mammalian rRNA genes. Hum. Mol. Genet. 15;16 Spec No 1.

Grummt I. (2010) Wisely chosen paths regulation of rRNA synthesis: delivered on 30 June 2010 at the 35th FEBS Congress in Gothenburg, Sweden. FEBS J. Nov;277(22):4626-39.

Gu T. P. Guo F, Yang H, Wu HP, Xu GF, Liu W, Xie ZG, Shi L, He X, Jin SG, Iqbal K, Shi YG, Deng Z, Szabó PE, Pfeifer GP, Li J, Xu GL.(2011) The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. Nature 477, 606–610 .

Gumperz, J., Litwin, V., Phillips, J., Lanier, L., and Parham, P. (1995) The Bw4 Public Epitope of HLA-B Molecules Confers Reactivity with Natural Killer Cell Clones that Express NKB1, A Putative HLA Receptor. J Exp Med. 181: 1133-1144.

Gumperz J. E., Valiante N. M., Parham P., Lanier L.L., and Tyan D. (1996) Heterogeneous phenotypes of expression of the NKB1 natural killer cell class I receptor among individuals of different human histocompatibility leukocyte antigens types appear genetically regulated, but not linked to major histocompatibililty complex haplotype. J Exp Med. 183: 1817-27.

Guo JU., Su Y., Zhong C., Ming GL., Song H. (2011) Emerging roles of TET proteins and 5-hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. Cell Cycle ;10(16):2662-8.

Gowher H., Jeltsch A., (2001) J. Enzymatic properties of recombinant Dnmt3a DNA methyltransferase from mouse: the enzyme modifies DNA in a non-processive manner and also methylates non-CpG sites. Mol. Biol. 309, 1201–1208.

Goyal R., Reinhardt R., Jeltsch A., (2006) Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. Nucleic Acids Res. , 34, 1182–1188.

Haase, A. D. askiewicz L, Zhang H, Lainé S, Sack R, Gatignol A, Filipowicz W.. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. EMBO Rep 6, 961-7 (2005).

Hajkova, P., Ancelin K, Waldmann T, Lacoste N, Lange UC, Cesari F, Lee C, Almouzni G, Schneider R, Surani MA.(2008) Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. Nature 452, 877–881.

Hajkova P. Jeffries SJ., Lee C., Miller N., Jackson SP., Surani MA.(2010) Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway. Science 329, 78–82.

Hammond S.M., Bernstein E., Beach D., and Hannon G.J. (2000). An RNA-directed nuclease medi- ates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. Nature 404, 293–6.

Hanna, J., Wald, O., Goldman-Wohl, D., Prus, D., Markel, G., Gazit, R., Katz, G., Haimov-Kochman, R., Fujii, N., Yagel, S., *et al.* (2003) CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16- human natural killer cells 10.1182/blood-2003-02-0517. Blood *102*, 1569-1577.

Hanna J ., Zhai Y, Youssef F, McLachlan K, Mandelboim O. (2004). Novel insights on human NK cells' immunological modalities revealed by gene expression profiling. J Immunol *173*, 6547- 6563.

Hannon G.J. (2002) RNA interference. (Review) *Nature* 418: 244-251.

Haraguchi K., Suzuki T., Koyama N., Kumano K., Nakahara F,. Matsumoto A., Yokoyama Y., Sakata-Yanagimoto M., Masuda S., Takahashi T., Kamijo A., Takahashi K., Takanashi M., Okuyama Y., Yasutomo K., Sakano S., Yagita H., Kurokawa M., Ogawa S., Chiba S.. (2009) Notch activation induces the generation of functional NK cells from human cord blood CD34-positive cells devoid of IL-15. J Immunol. May 15;182(10):6168-78.

Hashimshony T., Zhang J., Bustin M., Cedar H. (2003). The role of DNA methylation in setting up chromatin structure during development. Nature Genet. 34, 187-192.

Hata, K., Okano, M., Lei, H. and Li, E. (2002). Dnmt3l cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltrnsferases of etablish maternal imprints in mice. Developement, 129, 1983-1993.

Herberman, R.B., Nunn, M.E. and Lavrin, D.H. (1975) Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. Int. J. Cancer 16, 216–229.

Herman JG. and Baylin SB. (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. N Engl J Med 349, 2042-2054.

Hermann, A., Gowher, H. and Jeltch A. (2004) Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. Cell. Mol. Life Sci. 61 2571- 2587.

Hodges, E. Molaro A., Dos Santos CO., Thekkat .P, Song Q., Uren PJ., Park J., Butler J., Rafii S., McCombie WR., Smith AD., Hannon GJ. (2011) Directional DNA methylation changes and complex intermediate states accompany lineage specificity in the adult hematopoietic compartment. Mol. Cell 44, 17–28.

Hoglund P., Sundback J., Olsson-Alheim M.Y. *(*1997*)* Host MHC class I genecontrol of NK-cell specificity in the mouse. *Immunol Rev* 155:11-28.

Holmes R. and Zúñiga-Pflücker JC. (2009) The OP9-DL1 System: Generation of T-Lymphocytes from Embryonic or Hematopoietic Stem Cells In Vitro. Cold Spring Harb Protoc.

Houchins J.P., Yabe T., McSherry C. and Bach F.H. (1991) DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp. Med* 173, 1017-20.

Houchins JP., Lanier LL., Niemi E., Phillips JH., Ryan JC. (1997) Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C. J. Immunol. 158:3603–9.

Howard G., Eiges R., Gaudet F., Jaenisch R., Eden A. (2008) Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. Oncogene 27, 404 – 408.

Hsu KC., Chida S., Geraghty DE., Dupont B. (2002) The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev.* 190 40-52.

Huntington ND. Vosshenrich CA., Di Santo JP. (2007) Developmental pathways that generate natural killer cell diversity in mice and humans. Nat. Rev. Immunol. 7, 703-714.

Huntington ND., Legrand N., Alves NL., Jaron B., Weijer K., Plet A., Corcuff E., Mortier E., Jacques Y., Spits H., Di Santo JP. (2009) IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. J Exp Med. Jan 16;206(1):25-34.

Iams J., Creasy R. K., Resnik R., Reznik R. (2004). Maternal-fetal medicine. Philadelphia: W.B. Saunders Co. pp. 31–32.ISBN 0-7216-0004-2.

Immunsystem und Infektiologie 1999 Springer ISBN 3-540-62464-3.

Immunobiology Janeway 2004 Garland ISBN 0-8153-4101-6

Ito S., DÁlessio AC., Taranova OV., Hong K., Sowers LC., Zhang Y. (2010) Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. Nature 26;466(7310):1129-33.

Jacobs R., Stoll M., Stratmann G., Leo R., Link H. Schmidt, R. (1992) CD16- CD56+ natural killer cells after bone marrow transplantation. Blood *79*, 3239-3244.

Jacobs R., Hintzen G., Kemper A., Beul K., Kempf S., Behrens G., Sykora K. W. and Schmidt R. E. (2001) CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. Eur J Immunol 31, 3121-7.

Jamieson, A.M. Diefenbach A., McMahon CW., Xiong N., Carlyle JR., Raulet DH.(2002) The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activa- tion and natural killing. Immunity 17, 19–29.

Janzen W.P, Wigle T.J., Jin J., Frye S. (2010) Epigenetics: Tools and Technologies Drug Discov Today Technol. 2010 ; 7(1): e59–e65.

Jeltsch A. (2006) On the enzymatic properties of Dnmt1: specificity, processivity, mechanism of linear diffusion and allosteric regulation of the enzyme. Epigenetics , 2:63-6.

Jenuwein T. a.nd Allis CD. (2001). Translating the histone code. Science 293, 1074-1080.

Jeong S., Liang G., Sharma S., Lin C., Choi S.H., Han H., Yoo C.B., Egger G., Yang A.S., Jones A. (2009) Selective anchoring of DNA methyltransferases 3A and 3B to nucleosomes containing methylated DNA. Mol. cell. biol. , 29, 5366 – 5376.

Jia D., Jurkowska RZ., Zhang X., Jeltsch A., Cheng X. (2007) Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. Nature. Sep 13;449(7159):248-51. Epub 2007 Aug 22.

Jiricny J. (1996) Mismatch repair and cancer. *Cancer Surv*., 28, 47-68.

Jones P.A. and Takai D. (2001) The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 293, 1068-70.

Jones PA. and Rideout WM. (1992). Methylation, mutation and cancer. *Bioassays*, 14, 33-36.

Jones PL., Veenstra GJ., Wade PA., Vermaak D., Kass SU., Landsberger N. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. Nat Genet; 19(2):187-191.

Jones PA. and Laird PW. (1999). Cancer epigenetics comes of age. Nat Genet 21, 163-167.

Karlhofer FM., Ribuado RK., Yokoyama WM. (1992) MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells. *Nature* 358:66–70.

Kawasaki H., Taira K. and Morris, K.V.(2005) siRNA induced transcriptional gene silencing in mammalian cells. Cell Cycle 4, 442-8.

Kelley J., Walter L., Trowsdale J. (2005) Comparative genomics of natural killer cell receptor gene clusters. PLoS Genet 1:129–39.

Ketting, R.F. Fischer SE., Bernstein E., Sijen T., Hannon GJ., Plasterk RH. (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. elegans. Genes Dev 15, 2654-9.

Khakoo SI., Rajalingam R., Shum BP.,Weidenbach K., Flodin L., (2000). Rapid evolution of NK cell receptor systems demonstrated by comparison of chim- panzees and humans. *Immunity* 12:687– 98.

Kiel MJ., Morrison SJ. (2008) Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. Nat Rev Immunol 8: 290-301.

Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., and Wigzell, H. (1975a). "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. Eur J Immunol *5*, 117-121.

Kiessling, R., Klein, E., and Wigzell, H. (1975b). "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. Eur J Immunol *5*, 112-117.

Kikuchi-Maki A., Catina T.L. Campbell K.S. (2005) Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK cells through association with the Fc receptor gamma protein. *J Immunol* 174, 3859-63.

Kim GD., Ni J., Kelesoglu N., Roberts RJ., Pradhan S. (2002) Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. EMBO J, 15:4183-95.

Kim S., Poursine-Laurent J., Truscott SM., Lybarger L., Song YJ., Yang L. (2005) Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. Nature 436:709–13.

Kim, J.K., Samaranayake M. and Pradhan, S. (2009) Epigenetic mechanism in mammals. *Cell. Mol. Life.Sci*.,66, 596-612.

Kitabayashi I., Yokoyama A., Shimizu K. Ohki, M. (1998) Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation. EMBO J. 17: 2994–3004.

Kitabayashi I., Aikawa Y., Nguyen L.A., Yokoyama, A. Ohki, M., (2001)Activation of AML1-mediated transcription by MOZ and inhibition by the MOZ-CBP fusion protein. EMBO J. 20: 7184–7196.

Kitajima K., Tanaka M,. Zheng J., Sakai-Ogawa E., Nakano T. (2003) In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells to hematopoietic cells on an OP9 stromal cell monolayer. *Method Enzymol*. *365*: *72*-83.

Klaus J., Herrmann D., Breitkreutz I., Hegenbart U., Mazitschek U., Egerer G., Cremer FW., Lowenthal RM., Huesing J., Fruehauf S., Moehler T., Ho AD., Goldschmidt H. (2007) Effect of CD34 cell dose on hematopoietic reconstitution and outcome in 508 patients with multiple myeloma undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. Eur. J. Haematol. Jan;78(1):21-8.

Kondo M., Weissman IL., Akashi K. (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. Cell 91: 661-672.

Kondo M., Scherer DC., King AG., Manz MG., Weissman IL. (2001) Lymphocyte development from hematopoietic stem cells. Curr Opin Genet Dev 11: 520-526.

Kornberg RD., Lorch Y. (1999) Twenty five years of the nucleosome, fundamental partical of the eukaryotic chromosome. Cell 98, 285-294.

Kornbluth, J., Flomenberg, N., and Dupont, B. (1982)Cell surface phenotype of a cloned line of human natural killer cells. *J.Immunol.* 129 (6):2831-2837.

Kouzarides T. (2007) Chromatin modifications and their function. Cell; 128(4):693-705.

Krangel M. S. (2001) V(D)J recombination becomes accessible. *J Exp Med* 193, F27-30.

Krebs in Deutschland 2009/2010 9. Ausgabe, 2013 ISBN:978-3-89606-221-5

Kubicek S., O'Sullivan RJ., August EM. (2007). Reversal of H3K9me2 by a small-molecule inhibitor for the G9a histone methyltransferase. Mol Cell. Feb 9;25(3):473-81.

Kubista M., Andrade JM., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., (2006) The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med 27: 95-125.

Lanier LL., Chang C., Azuma M., Ruitenberg J. J., Hemperly JJ. and Phillips JH. (1991) Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N- CAM/CD56). *J Immunol* 146, 4421-6.

Lander ES. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409, 860–921.

Lande-Diner L., Zhang J., Ben-Porath I., Amariglio N. Keshet I., Hecht M., Azuara V., Fisher A.G., Rechavi G., Cedar H. (2007) Role of DNA methylation in stable gene repression. J.Biol Chem., 282, 12 194 – 12 200.

Lanier LL. (1998) NK cell receptors. *Annu Rev Immunol*. 16 359-93.

Lanier LL. (2005) NK cell recognition. Annu Rev Immunol 23:225–74.

Larsen F., Gundersen G., Lopez R., Prydz, H. (1992) CpG islands as gene markers in the human genome. Genomics 13, 1095–1107.

Lazetic S., Chang C., Houchins JP., Lanier LL. Phillips JH. (1996) Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol* 157, 4741-5.

Lee PP., Fitzpatrick DR., Beard C., Jessup HK., Lehar S., Makar KW., Perez-Melgosa M., Sweetser MT., Schlissel MS., Nguyen S., Cherry SR., Tsai JH., Tucker SM., Weaver WM., Kelso A., Jaenisch R., Wilson C. B. (2001) A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* 15, 763-74.

Lee YC., Lin SJ. (2014) Natural killer cell in the developing life. J Perinat Med. Apr 4.

Le Garff-Tavernier M., Béziat V., Decocq J., Siguret V., Gandjbakhch F., Pautas E., Debré P., Merle-Beral H., Vieillard V. (2010) Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. Aging Cell. Aug;9(4):527-35.

Lehnertz B., Ueda Y., Derijck AA., Braunschweig U., Perez-Burgos L., Kubicek S. (2003:) Suv39h mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin 1. Curr Biol; 13(14):1192-1200.

Lehnertz B., Feldman N., Abu-Remaileh M., Shufaro Y., Gerson A., Ueda .J, Deplus R., Fuks F., Shinkai Y., Cedar H., Bergman Y. (2003b). De novo DNA methylation promoted by G9a prevents reprogramming of embryonically silenced genes. Nature Struct. Mol. Biol. 15, 1176-1183.

Leonhardt H., Page W., Weier HU., Bestor TH. (1992) A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. Cell, 71, 865 –873.

Le Page ME., Goodridge JP., Christiansen FT., Witt CS. (2014) Killer Ig-like receptor 2DL4 does not mediate NK cell IFN-γ responses to soluble HLA-G preparations. J. Immunol 15: 192, 732-40.

Leung RK., Whittaker PA. (2005) RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. Pharmacol Ther. Aug;107(2):222-39.

Levanon, D., Groner, Y., Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes. Oncogene 2004. 23: 4211–4219.

Li H., Wright PW., Anderson SK. (2010) Identification and analysis of novel transcripts and promoters in the human killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genes. Methods Mol Biol. ;612:377-91.

Lian RH., Maeda M., Lohwasser S., Delcommenne M., Nakano T., Vance RE., Raulet DH., Takei F. (2002) Orderly and nonstochastic acquisition of CD94/NKG2 receptors by developing NK cells derived from embryonic stem cells in vitro. J Immunol. May 15;168(10):4980-7.

Liang G., Chan M.F., Tomigahara Y., Tsai Y.C., Gonzales F.A., Li E., Laird P.W., Jones P.A., (2002) Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. Mol. Cell. Biol., 22, 480 – 491.

Lin, I.G., Han, L., Taghva, A., OBrien, L.E. and Hsieh, C.L. (2002). Murine de novo methyltransferase Dnmt3 demonstrates strand asymetry and site preferencein the methylation of DNA in vitro. *Mol. Cell. Biol*., 22, 704-723.

Liu K, Nussenzweig MC (2010) Origin and development of dendritic cells. Immunol Rev 234: 45-54.

Lipardi C., Wei, Q., Paterson, B. M. (2001). RNAi as Random Degradative PCR. siRNA Primers Con- vert mRNA into dsRNAs that Are Degraded to Generate New siRNAs. Cell 107, 297–307.

Ljunggren HG. and Kärre K. (1990) In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. Immunol Today 7:237-44.

Long EO. (1999) Regulation of immune responses through inhibitory receptors. Annu. Rev. Immunol. 17, 875–904.

Long EO., Sik Kim H., Liu D., Peterson ME., Rajagopalan S. (2013) Controlling nat- ural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibi- tion. Annu Rev Immunol 31:227–58.

Luger K., Mader AW., Richmond RK., Sargent DF., Richmond TJ. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. Nature; 389(6648):251-260.

Luger K. and Reichmond TJ. (1998) The histon tails of the nucleosome. Curr. Open. Dev. 8, 140-146.

Maillard P., Ciaudo C., Marchais A., Li Y., Jay F., Ding SW., Voinnet O. (2013) Antiviral RNA interference in mammalian cells. Science 11;342(6155):235-8.

Majumder S., Ghoshal K., Datta J., Smith D.S., Bai S., Jacob S.T., (2006) Role of DNA-Methyltransferases in regulation of human ribosomal RNA gene transcription, J. Biol. Chem. 281 22062–22072.

Mandelboim, O., Wilson, SB., Vales-Gomez, M., Reyburn, HT., Strominger, J. L. (1997) Self and viral peptides can initiate lysis by autologous natural killer cells. Proc. Natl Acad. Sci. USA 94, 4604 – 4609.

Mandelboim O., Lieberman N., Lev M., Paul L., Arnon T.I., Bushkin Y., Davis D.M., Strominger J.L., Yewdell, J.W., and Porgador A.: (2001) Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. Nature 409: 1055-60.

Manitis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Martens, H., Novotny, J., Oberstrass, J., Steck, T. L., Postlethwait, P., and Nellen, W. (2002). RNAi in Dictyostelium: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase. Mol Biol Cell 13, 445–53.

Martin A.M, Kulski J.K, Witt C, Pontarotti P, Christiansen F.T. (2002) Leukocyte Ig-like receptor complex (LRC) in mice and men. Trends Immunol.

Martin, A.M., Kulski, J. K., Gaudieri, S., Witt, C. S., Freitas, E. M., Trowsdale, J., Christiansen, F. T. (2004) Comparative genomic analysis, diversity and evolution of two KIR haplotypes A and B. Gene 335, 121 – 131.

Martin-Fontecha, A., Thomsen LL., Brett S., Gerard C., Lipp M., Lanzavecchia A., Sallusto F. (2004) Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-γ for TH1 priming. Nat. Immunol. 5, 1260–1265.

Martinez, LA. Naguibneva I, Lehrmann H., Vervisch A., Tchénio T., Lozano G,. Harel-Bellan A. (2002) Synthetic small inhibiting RNAs: efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 14849-54.

Mavilio D., Lombardo G., Benjamin J. (2005) Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional subset expanded in HIV-infected viremic individuals. Proc Natl Acad Sci USA; 102:2886–91.

Mayer C., Schmitz KM., Li J., Grummt I., Santoro R. (2006) Intergenic transcripts regulate the epigenetic state of rRNA genes. *Mol Cell*, 5(3):351-61.

McCullar V., Oostendorp R., Panoskaltsis-Mortari A., Yun G., Lutz CT., Wagner JE., Miller JS. (2008) Mouse fetal and embryonic liver cells differentiate human umbilical cord blood progenitors into CD56-negative natural killer cell precursors in the absence of interleukin-15. Exp. Hematol. 5: 598-608.

McIntyre GJ., Fanning GC. (2006) Design and cloning strategies for constructing shRNA expression vectors. BMC Biotechnol. Jan 5;6:1.

McKenna DH. Jr, Sumstad D., Bostrom N., Kadidlo DM., Fautsch S., McNearney S., Dewaard R., McGlave PB., Weisdorf DJ., Wagner JE., McCullough J., Miller JS. (2007) Good manufacturing practices production of natural killer cells for immunotherapy: a six- year single-institution experience. *Transfusion* 47 520-8

McStay B., Grummt I. (2008) The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. Annu Rev Cell Biol; 24:131-57.

Meehan RR., Lewis JD., McKay S., Kleiner EL., Bird AP. (1989) Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell*, 58(3):499-507.

Meisner A. Mikkelsen TS., Gu H., Wernig M., Hanna J., Sivachenko A., Zhang X., Bernstein BE., Nusbaum C., Jaffe DB., Gnirke A., Jaenisch R,. Lander ES. (2008), Genome-scale DNA methxlation maps of pluripotent and differentiated cells. Nature 454, 766-770.

Mette MF., W., van der Winden, J., Matzke, MA., Matzke, A. J. (2000). Transcrip- tional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. Embo J 19, 5194–201.

Méndez-Ferrer, S., Lucas D., Battista M., Frenette PS. (2008). Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. Nature. 452:442–447.

Méndez-Ferrer S., Michurina TV., Ferraro F., Mazloom AR., Macarthur BD., Lira SA., Scadden DT., Ma'ayan A., Enikolopov GN., Frenette PS. (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. NatureAug 12;466(7308):829-34.

Mohn F. (2008); Linage-specific polycomp targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. Mol. Cell. 30, 755-766.

Morandi B., Bougras G., Muller WA., Ferlazzo G., Munz C. (2006) NK cells of human secondary lymphoid tissues enhance T cell polarization via IFN-γ secretion. Eur. J.Immunol. 36, 2394–2400.

Mingari MC., Vitale C., Cantoni C., Bellomo R., Ponte M., Schiavetti F., Bertone S., Moretta A., Moretta L. (1997) Interleukin-15-induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors: selective expression of CD94/NKG2-A as the only HLA class I-specific inhibitory receptor. Eur J Immunol. Jun;27(6):1374-80.

Moffett-King A. (2002) Natural killer cell and pregnancy. Nat. Rev. Immunol 2, 656-663.

Moretta A., Bottino C., Pende D., Tripodi G., Tambussi G., Viale O., Orengo A., Barbaresi M., Merli A., Ciccone E. (1990) Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J Exp Med* 172, 1589- 98.

Moretta A., Vitale M., Bottino C., Orengo AM., Morelli L., Augugliaro R., Barbaresi M., Ciccone E. and Moretta L. (1993) P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med* 178, 597-604.

Moretta, A. Bottino C., Vitale M., Pende D,. Biassoni R., Mingari MC., Moretta L. (1996) Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. Annu. Rev. Immunol. 14, 619–648. 7.

Moretta A., Biassoni R., Bottino C., Mingari MC. and Moretta L. (2000) Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytolysis. Immunol Today 21, 228-34.

Moretta A., Bottino C., Vitale M., Pende D., Cantoni C., Mingari M. C., Biassoni R., Moretta L. (2001) Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytolysis. Annu Rev Immunol 19, 197-223.

Moretta, L., Biassoni, R., Bottino, C., Cantoni, C., Pende, D., Mingari, MC., Moretta, A. (2002a). Human NK cells and their receptors. Microbes Infect *4*, 1539-1544.

Moretta, L., Bottino, C., Pende, D., Mingari, M. C., Biassoni, R., Moretta, A. (2002b). Human natural killer cells: their origin, receptors and function. Eur J Immunol *32*, 1205-1211.

Moretta A., Bottino C., Mingari MC., Biassoni R. Moretta L. (2002c) What is a natural killer cell? Nat. Immunol 3, 6-8.

Moretta L, Moretta A. (2004)Killer immunoglobulin-like receptors. Curr Opin Immuno, 16:626-33.

Moretta, L. Ferlazzo G., Bottino C., Vitale M., Pende D., Mingari MC., Moretta A. (2006). Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. Immunol. Rev. 214, 219–228.

Morrison SJ., Weissman IL. (1994) The longterm repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. Immunity 1: 661-673.

Morris, KV., Chan, SW., Jacobsen, SE., Looney, DJ. (2004) Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. Science 305, 1289-92.

Morris, KV. (2005) siRNA-mediated transcriptional gene silencing: the potential mechanism and a possible role in the histone code. Cell Mol Life Sci 62, 3057- 66.

Morris KV. (2008) RNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. Curr Top Microbiol Immunol. ;320:211-24.

Mortusewicz O., Schermelleh L., Walter J., Cardoso MC., Leonhardt H. (2005) Recruitment of DNA-Methyltransferase I to DNA repair sites. Proc Natl Acad Sci U S A; 102(25):8905-8909.

Molekulare Onkologie, Christoph Wagner ISBN:3-13-103512-9

Mourrain P., Beclin C., Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel JB., Jouette D., Lacombe AM., Nikic S., Picault N., Remoue K., Sanial M., Vo TA., Vaucheret, H. (2000). Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. Cell 101, 533–42.

Mrózek E., Anderson P., Caligiuri MA. (1996) Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. Blood 87: 2632–2640.

Miller JS., McCullar V. (2001) Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2. *Blood* 98 705-13.

Miller JS., McCullar V., Punzel M., Lemischka IR., Moore KA. (1999) Single adult human CD34(+)/Lin-/CD38(-) progenitors give rise to natural killer cells, B-lineage cells, dendritic cells, and myeloid cells. Blood 93 96-106.

Miranda TB. ,Jones PA., (2007) DNA methylation: the nuts and bolts of repression. J.Cell.Physiol. ,213,384–390.

Mizuno T., Chou MY., Inouye, M. (1984) A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (mi- cRNA). Proc Natl Acad Sci U S A 81, 1966–70.

Nagler A., Lanier LL., Cwirla S., Phillips JH. 1989 Comparative studies of human FcRIII positive and negative natural killer cells. J Immunol. 143:3183–91.

Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthetase gene in Petunia results in reversible cosuppression of homologues genes in *trans*. *Plant Cell* 2:279-289.

Nakamura, T. Arai Y., Umehara H., Masuhara M., Kimura T., Taniguchi H., Sekimoto T., Ikawa M., Yoneda Y., Okabe M., Tanaka S., Shiota .K, Nakano T. (2007) PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. Nature Cell Biol. 9, 64–71.

Nakamura, T. Liu YJ., Nakashima H., Umehara H., Inoue K., Matoba S., Tachibana M., Ogura A., Shinkai Y., Nakano T. (2012) PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. Nature 486, 415–419.

Nan X. Ng HH, Johnson CA., Laherty CD., Turner BM., Eisenman RN., Bird A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. Nature 393. 386-389.

Nellen, W., and Lichtenstein, C. (1993). What makes an mRNA anti-sense-itive? Trends Biochem Sci 18, 419–23.

Niehrs C, Schäfer A. (2012) Active DNA demethylation by Gadd45 and DNA repair. Trends Cell Biol. Apr;22(4):220-7.

Okano, M., Xie S., Li E. (1998) Dnmt2 is not require for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stemm cells. *Nucleic Acids Res*., 26, 2536-1540.

Okano M., Xie S., Li E., (1998b) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. Nat. Genet. 19, 219–220.

Okitsu CY. and Hsieh CL. (2007) DNA methylation dictates histone H3K4 methylation. Mol. Cell. Biol. 27, 2746-2757.

Olcese L., Cambiaggi A., Semenzato G., Bottino C., Moretta A., Vivier E. (1997) Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells.

Ooi SK., Qiu C., Bernstein E., Li K., Jia D., Yang Z., Erdjument-Bromage H., Tempst .P, Lin SP., Allis CD., Cheng X., Bestor TH. (2007) DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. Nature. 2007 Aug 9;448(7154):714-7.

Oostendorp RA., Medvinsky AJ., Kusadasi N., Nakayama N., Harvey K., Orelio C., Ottersbach K., Covey T., Ploemacher RE., Saris C., Dzierzak E. (2002A) Embryonal subregion-derived stromal cell lines from novel temperature-sensitive SV40 T antigen transgenic mice support hematopoiesis. J Cell Sci. ;115:2099–2108.

Oostendorp RA., Harvey KN., Kusadasi N., de Bruijn MF., Saris C., Ploemacher RE., Medvinsky AL., Dzierzak EA. (2002) Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity. Blood.

Oostendorp RA., Robin C., Steinhoff C., Marz S., Bräuer R., Nuber UA., Dzierzak EA., Peschel C. (2005) Long-term maintenance of hematopoietic stem cells does not require contact with embryo-derived stromal cells in cocultures. Stem Cells. Jun-Jul;23(6):842-51.

Ouyang Q., Baerlocher G., Vulto .I, Lansdorp PM. (2007) Telomere length in human natural killer cell subsets. Ann N Y Acad Sci; 1106:240–52.

Parham P., Norman P.J., Abi-Rached L., Guethlein L.A. (2012) Human-specific evolution of killer cell immunoglobulin-like receptor recognition of major histocompatibility complex class I molecules Philos Trans R. Soc Lond B Biol Sci. 2012 Mar 19;367(1590):800-11.

Pastor WA., Pape UJ., Huang Y., Henderson HR., Lister R., Ko M., McLoughlin EM., Brudno Y., Mahapatra S., Kapranov P., Tahiliani M., Daley GQ., Lui XS., Ecker JR., Milos PM., Agarwal S., Rao A. (2011) Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. Nature 19;473(7347):394-7.

Papamichail M., Perez SA., Gritzapis AD., Baxevanis CN. (2004) Natural killer lymphocytes: biology, development, and function. *Cancer Immunol Immunother*. 53 176-86.

Passegue E., Jamieson CH., Ailles LE., Weissman IL. (2003) Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? Proc Natl. Acad Sci U S A 100 Suppl 1: 11842--11849.

Papamichail M., Perez SA., Gritzapis AD., Baxevanis CN. (2004) Natural killer lymphocytes: biology, development, and function. Cancer Immunol Immunother. 53 176-86.

Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (1999) Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. J Exp Med. 190: 1505-1516.

Petersen C. P., Bordeleau ME., Pelletier J., Sharp, P. A. (2006) Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. Mol Cell 21, 533-42.

Plougastel B., Jones T., Trowsdale J. (1996) Genomic structure, chromosome location, and alternative splicing of the human NKG2A gene. Immunogenetics 44, 286-91.

Poli A., Michel T., Theresine M., Andres E., Hentges F., Zimmer J. (2009) CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. Immunology Apr;126(4):458-65.

Prendergast GC., Ziff EB. (1991) Methylation-sensitive sequence- specific DNA binding by the c-Myc basic region. Science *251*: 186-189.

Presnell SR., Zhang L., Ramilo CA., Chan HW., Lutz CT. (2006) Functional redundancy of transcription factor-binding sites in the killer cell Ig-like receptor (KIR) gene promoter. Int Immunol. Aug;18(8):1221-32.

Presnell SR., Zhang L., Chlebowy CN., Al-Attar A., Lutz CT. (2012) Differential transcription factor use by the KIR2DL4 promoter under constitutive and IL-2/15-treated conditions. J Immunol. May 1;188(9):4394-404.

Punzel M., Moore KA., Lemischka IR., Verfaillie CM. (1999) The type of stromal feeder used in limiting dilution assays influences frequency and maintenance assessment of human long-term culture initiating cells. *Leukemia* 13, 92-7.

Punzel M., Gupta P., Verfaillie CM. (2002) The microenvironment of AFT024 cells maintains primitive human hematopoiesis by counteracting contact mediated inhibition of proliferation. *Cell Commun Adhes*. 9 149-59.

Quinn AM., Allali-Hassani A., Vedadi M., Simeonov A. (2010) A chemiluminescence- based method for identification of histone lysine methyltransferase inhibitors. Mol Biosyst; 6(5):782-788.

Rajagopalan S. and Long, E. O. (1997) The direct binding of a p58 killer cell inhibitory receptor to human histo-compatibility leukocyte antigen (HLA)-Cw4 exhibits peptide selectivity. J. Exp. Med. 185, 1523 – 1528.

Rajagopalan S., Long EO. (1999). An HLA-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. J. Exp. Med. 189:1093–110.

Rao DD., Vorhies JS, Senzer N., Nemunaitis J. (2009) siRNA vs. shRNA: similarities and differences. Adv. Drug Deliv. Rev. Jul 25;61(9):746-59.

Raulet DH., Gasser S., Gowen BG., Deng W., Jung H. (2013) Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. Annu Rev Immunol 31:413–41.

Ravetch, J.V. and Lanier, L.L. (2000) Immune inhibitory receptors. Science 290, 84–89.

Razin, A. and Riggs, A.D. (1980) DNA methylation and gene function. *Science*, 210, 604-610.

Reik, W. (2007) Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. Nature 447, 425–432.

Rhee I., Backman KE., Park BH., Jair KW. Yen RW., Schuebel KE., Cui H., Feinberg AP., Lengauer C., Kinzel KW., Baylin SB., Vogelstein B. 2002: DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. Nature:4;416(6880):552-6.

Robertson MJ., Cochran KJ., Cameron C., Le JM., Tantravahi R., Ritz J. (1996) Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia.Exp. Hematol. Feb.;24(3):406-15.

Rolink AG., Balciunaite G., Demolière C., Ceredig R. (2006) The potential involvement of Notch signaling in NK cell development. Immunol Lett. Sep 15;107(1):50-7.

Romagnani C., Juelke K., Falco M. (2008) CD56bright CD16-killer Ig-like receptor NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. J Immunol; 178:4947–55.

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988) Primer-dircected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 239:487-491.

Santourlidis S., Trompeter HI., Weinhold S., Eisermann B., Meyer KL., Wernet P., Uhrberg M. (2002) Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. J Immunol, 169(8): 4253-61.

Santourlidis S., Graffmann N., Christ J., Uhrberg M. (2008) Lineage-specific transition of histone signatures in the killer cell Ig-like receptor locus from hematopoietic progenitor to NK cells. J Immunol, 180(1):418-25.

Sasai N. and Defossez PA. (2009) Many paths to one goal? The proteins that recognize methylated DNA in eukaryotes. Int J Dev Biol *53*: 323-334.

Schäfer A. (2013) Gadd45 proteins: key players of repair-mediated DNA demethylation. Adv Exp Med Biol. ;793:35-50.

Schmitz KM., Mayer C., Grummt I. (2010) Interaction of noncoding RNA with the rDNA promoter mediates recruitment of DNMT3b and silencing of rRNA genes. Genes Dev. 15;24(20)2264-9.

Schneider U., Schwenk H., Bornkamm G. (1977) Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. Int J Cancer 19 (5): 621–6.

Schofield R. (1978) The relationship between the spleen colonyforming cell and the haemapoietic stem cell. Blood Cells, 4, 7-25.

Schopman NC., Liu YP., Konstantinova P., Brake O., Berkhout B. (2010) Optimization of shRNA inhibitors by variation of the terminal loop sequence. Antiviral Res. May;86(2):204-11.

Seki, Y. Yamaji M., Yabuta Y., Sano M., Shigeta M., Matsui Y., Saga Y., Tachibana M,. Shinkai Y., Saitou M. (2007). Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. Development 134, 2627–2638.

Sheng H., Wang Y., Jin Y., Zhang Q., Zhang Y., Wang L., Shen B., Yin S., Liu W., Cui L., Li N. (2008) A critical role of IFNgamma in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. Cell Res. Aug;18(8):846-57.

Shestopalov IA. and Zon LI. (2012) Stem cell: the right neighbour. Nature 481: 453-455.

Shi Y., Lan F., Matson C., Mulligan P., Whetstine JR., Cole PA. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. Cell; 119(7):941-953.

Shi L., Sun L., Li Q., Liang J., Yu W., Yi X., Yang X., Li Y., Han X., Zhang Y., Xuan C., Yao Z., Shang Y. (2011) Histone demethylase JMJD2B coordinates H3K4/H3K9 methylation and promotes hormonally responsive breast carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. May 3;108(18):7541-6.

Shi Y. and Whetstine JR. (2007) Dynamic Regulation of Histone Lysine Methylation by Demethylases: Mol. Cell. 12:25(1):1-14.

Shilling HG., Young N., Guethlein LA., Cheng NW., Gardiner CM., Tyan D. and Parham P. (2002) Genetic control of human NK cell repertoire. J Immunol 169, 239-47.

Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H., and Fire, A. (2001a). On the Role of RNA Amplification in dsRNA- Triggered Gene Silencing. Cell 107, 465–76.

Sijen T., Vijn I., Rebocho A., van Blokland R., Roelofs D., Mol, J. N., Kooter, JM. (2001b). Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. Curr Biol 11, 436–40.

Sivori S., Vitale M., Morelli L., Sanseverino L., Augugliaro R., Bottino C., Moretta L. Moretta A. (1997) p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med* 186, 1129-36.

Smallwood A., Estève PO., Pradhan S., Carey M. (2007) Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. Genes Dev. May 15;21(10):1169-78.

Smallwood, SA. Tomizawa S., Krueger F., Ruf N., Carli N., Segonds-Pichon A., Sato S., Hata K., Andrews (2011) Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. Nature Genet. 43, 811–814.

Struhl K. (1998). Histon acetylation and transcriptional regulatory mechanisma. Genes Dev. 12, 599-606.

Stem Cells Scientific Progress and Future Research Directions 2004 ISBN-13: 978-1410218964.

Stewart CA., Van Bergen J., Trowsdale J. (2003) Different and divergent regulation of the KIR2DL4 and KIR3DL1 promoters. J. Immunol. 170:6073–81

Sui X., Price C., Li Z., Chen J. (2012) Crosstalk Between DNA and Histones: Tet's New Role in Embryonic Stem Cells. Curr Genomics ;13(8):603-8.

Sylvester JE., Gonzales IL., Mougey EB. (2004) Structur and organisation of vertebrate ribosomal DNA. The Nucleolus, ed. MO Olson, pp 58-72. New York: Kluwer Acad./Plenum.

Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W. G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., and Mello, C. C. (1999). The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in C. elegans. Cell 99, 123–32.

Tachibana M., Matsumura Y., Fukuda M., Kimura H., Shinkai Y. (2008): G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. EMBO J; 27(20):2681-2690.

Tadokoro Y., Ema H., Okano M., Li E., Nakauchi H. (2007) De novo DNA-Methyltransferase is essential for self-renewal, but not for differentiation, in hematopoietic stem cells. J. Exp. Med. 204, 715–722.

Tahiliani M., Koh KP., Shen Y., Pastor WA., Bandukwala H., Brudno Y., Agarwal S., Iyer LM., Lui DR., Aravind L., Rao A. (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. Science 15;324(5929) 930-5.

Takai D., Jones PA. (2002) Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. Proc Natl Acad Sci U S A; 99(6):3740-3745.

Takizawa H., Schanz U., Manz MG. (2011) Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells: mission accomplished? Swiss Med. Wkly. Dec29;141:w13316.

Tavian M. and Peault B. (2005) Embryonic development of the human hematopoietic system. International Journal of Developmental Biology, 49, 243-250.

Taxman DJ., Livingstone LR., Zhang J., Conti BJ., Iocca HA., Williams KL., Lich JD., Ting JP., Reed W. (2006) Criteria for effective design, construction, and gene knockdown by shRNA vectors. BMC Biotechnol. Jan 24;6:7.

Terriente-Felix A., Li J., Collins S., Mulligan A., Reekie I., Bernard F., Krejci A., Bray S. Notch cooperates with Lozenge/Runx to lock haemocytes into a differentiation programme. Development. 2013 Feb;140(4):926-37.

Timmons L., Fire A. (1998) Specific interference by ingested dsRNA. Nature 395:854.

Trinchieri G. (1989) Biology of natural killer cells. Adv. Immunol. 47, 187–376.

Trowbridge JJ., Snow JW., Kim, J., Orkin, SH. (2009) DNA-Methyltransferase 1 is essential for and uniquely regulates hematopoietic stem and progenitor cells. Cell Stem Cell 5, 442–449.

Trowsdale J.E. (2001) Genetic and functional relationship between MHC and NK receptor genes. Immunity 15, 363-374.

Tse WT., Pendleton JD., Beyer WM., Egalka MC., Guinan EC. (2003) Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. Transplantation Feb.. 15;75(3):389-97.

Uciechowski P., Werfel T., Leo R., Gessner JE., Schubert J., Schmidt RE. (1992) Analysis of CD16+dim and CD16+bright lymphocytes comparison of peripheral and clonal non-MHC-restricted T cells and NK cells. Immunobiology. Jun;185(1):28-40.

Uhrberg, M., Valiante NM., Shum BP., Shilling HG., Lienert-Weidenbach K., Corliss B., Tyan D., Lanier LL.. Parham P. (1997) Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. Immunity 7, 753 – 763.

Uhrberg M. (2005) The KIR gene family: life in the fast lane of evolution. Eur J Immunol, 35:10-15.

Valiante NM., Phillips JH., Lanier LL. Parham P. (1996) Killer cell inhibitory receptor recognition of human leukocyte antigen (HLA) class I blocks formation of a pp36/PLC-γ signaling complex in hu- man natural killer (NK) cells. *J. Exp. Med.* 184:2243–50.

Valiante NM., Uhrberg M., Shilling HG., Lienert-Weidenbach K., Arnett KL., D'Andrea A., Phillips JH., Lanier LL., Parham P. (1997) Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 7 739- 51.

Vales-Gomez M., Reyburn H., Strominger J. (2000) Molecular analyses of the interactions between human NK receptors and their HLA ligands. Hum Immunol. 61: 28-38.

Vattem KM., Staschke KA., Wek, RC. (2001) Mechanism of activation of the double-stranded- RNA-dependent protein kinase, PKR: role of dimerization and cellular localization in the stimulation of PKR phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 (eIF2). Eur J Biochem 268, 3674–84.

Vilches C., Parham P. (2002) KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. Annu Rev Immunol 2002, 20:217-51.

Vitale M., Bottino C., Sivori S., Sanseverino L., Castriconi R., Marcenaro E., Augugliaro R., Moretta L. and Moretta A. (1998) NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 187, 2065-72.

Vitali, P., Basyuk, E., Le Meur, E., Bertrand, E., Muscatelli,F., Cavaille, J. and Huttenhofer, A. (2005) ADAR2-mediated editing of RNA substrates in the nucleolus is inhibited by C/D small nucleolar RNAs. J Cell Biol 169, 745–753.

Vivier E., Raulet DH., Moretta A., Caligiuri MA., Zitvogel L., Lanier LL. (2011) Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. Science 331:44–9.

Von Holt C. (1989). Isolation and chararacterization of histones. Methods Enzymol. 170, 431-523.

Wada H., Matsumoto N., Maenaka K., Suzuki K., Yamamoto K. (2004) The inhibitory NK cell receptor CD94/NKG2A and the activating receptor CD94/NKG2C bind the top of HLA-E through mostly shared but partly distinct sets of HLA-E residues. *Eur J Immunol* 34, 81-90.

Wagtmann N., Biassoni R., Cantoni C., Verdiani S., Malnati MS. (1995) Molecular clones of the p58 natural killer cell receptor reveal Ig-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. Immunity 2:439–49.

Walasek MA., van Os R., de Haan G. (2012) Hematopoietic stem cell expansion: challenges and opportunities. Ann N Y Acad Sci. Aug;1266:138-50.

Waldhauer I., Steinle A. (2008) NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* 27 932- 43.

Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S.H., Zitvogel, L., Vivier, E. (2005) Natural-killer cellsand dendritic cells: “l’union fait la force.” Blood 106, 2252–2258.

Weber M., Hellmann I., Stadler M.B., Ramos L., Paabo S., Rebhan M., Schubeler D. (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome, Nat. Genet. 39 457–466.

World health organisation: http://www.iarc.fr

Williams K., Christensens J., Helin K., (2011) DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? EMBO Rep. Dec 23;13(1):28-35.

Wolf NS. (1997) The hematopoetic microenviroment. Clinics in Haematology, 8, 469-500.

Wolffe AP. and Hayes JJ. (1999). Chromatin disruption and modifikation. Nucleic Acids Res. 27,711-720.

Wossidlo, M. Arand J., Sebastiano V., Lepikhov K., Boiani M., Reinhardt R., Schöler H., Walter J. (2010) Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes. EMBO J. 29, 1877–1888.

Wu J., Song Y., Bakker ABH., Bauer S., Groh V. (1999) An activating recep- tor complex on natural killer and T cells formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285:730–32.

Wu H., Thang Y., (2011): Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. Genes Dev. 1;25(23):2436-52.

Yawata M., Yawata N., Abi-Rached L. and Parham P. (2002) Variation within the human killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene family. *Crit Rev Immunol* 22, 463-82.

Yawata M., Yawata N., Draghi M., Little A. M., Partheniou F. and Parham P. (2006) Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med* 203, 633-45.

Yoder, JA., Walsh, CP. and Bestor, TH. (1997) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet*., 13, 335-340.

Yokoyama WM., Plougastel BFM. (2003) Immune functions encoded by the natural killer gene complex. Nat Rev Immunol 3:304–16.

Yokoyama WM., Kim S., French AR. (2004) The dynamic life of natural killer cells. Annu Rev Immunol ;22:405–429.

Young JI., Hong EP., Castle JC., Crespo-Barreto J., Bowman AB., Rose MF., Kang D., Richman R., Johnson JM., Berget S., Zoghbi HY. (2005) Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102 17551–17558.

Yu J., Freud AG., Caligiuri MA. (2013) Location and cellular stages of natural killer cell development. Trends Immunol; 34:573-82.

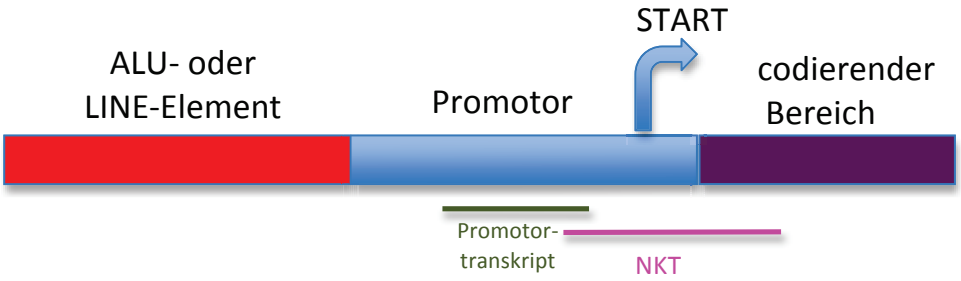
Zappacosta F., Borrego F., Brooks AG., Parker, KC., Coligan, JE. (1997) Peptides isolated from HLA-Cw*0304 conferdifferent degrees of protection from natural killer cell-mediated lysis. Proc. Natl Acad. Sci. USA 94, 6313-6318.

Zhu J., He F., Hu S., Yu J. (2008) On the nature of human housekeeping genes. Trends Genet. 24, 481–484.

Zompi S., Hamerman JA., Ogasawara K., Schweighoffer E., Tybulewicz VL., (2003). NKG2D triggers cytotoxicity in mouse NK cells lacking DAP12 or Syk family kinases. *Nat. Immunol.* 4:565–72.

6 Anhang

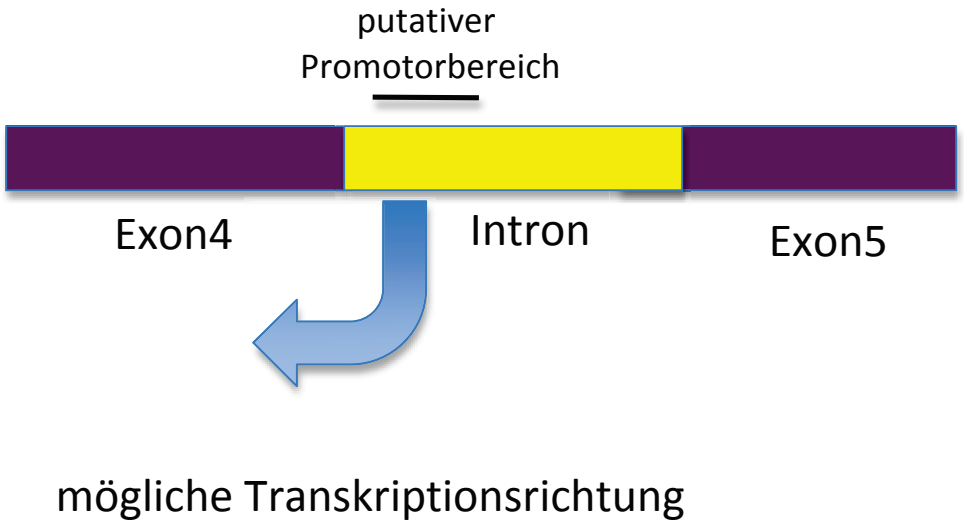
6.1 Lage von Promotortranskripten und NKTs im *KIR*-Promotor



Anhang 1: Schematische Darstellung der relativen Position des Promotortranskriptes und NKTs für ein *KIR*-Gen

Positionsangabe:	NKT2DL3	-240 bp/+45 bp
	Promotortrans.-*KIR2DL3*	-440 bp/-70 bp
	NKT3DL1	–282 bp/ + 78 bp
	Promotortrans.-*KIR2DL4*	–310 bp/-50 bp
	NKT2DL4	–80 bp/+160 bp

6.2 Analyse des putativen *KIR*-Promotors zwischen Exon4 und Exon5 von *KIR2DL3*



Anhang 2: Schematische Darstellung des Exon4, Intron und Exon5 von *KIR2DL3*; in violett gehalten sind die Exons. Im Intron (gelb) kann mittels Promotoranalysesoftware ein putativer Promotor identifiziert werden. Die putative Promotorsequenz ist schwarz hervorgehoben. Exon4 und das anschließende Intron weisen eine erhöhte Zahl an CGs auf.

```
aggtctatat gagaaacctt ctctctcagcccagcCGggc cccaCGgttc tggcaggaga
gagCGtgacc ttgtcctgca gctcccGgagctcctatgac atgtaccatc tatccaggga
gggggaggcc catgaaCGta ggttctctgcagggcccaag gtcaaCGgaa cattccaggc
CGactttcct ctgggccctg ccacccaCGgaggaacctac agatgcttCG gctctttcCG
tgactctcca taCGagtggt caaactCGagtgacccactg cttgtttctg tcacaggtga
ggaaacccca tatctgtctc atgtcctatgatcctagagc cttagctgag gagcttcctg
ctgatgatgg agagaagcat ggacagatgcagagagaaga CGaagcttgg gtgtgaggga
gggatcaggg cacaggatgg cagacagggcacctccaaac cctcctacac ggcctgcatg
aaggccCGCG gccagggctc caggcacacaggcagatgga gaaaaCGgtc aggagagacc
cagaggagag agactgggct cagtttgggaagatcagagg ttccctcagc ccctcaacat
tacccatttc ccagaagccc atcctggcctctcacccaca cagggatgtc atcaccagca
acccctacac cctttacttt tgtttgaagaaatatttatt gaggataaat atacctatat
agcttaccac ctttaacatt tttttttttttgaggcaga gtctagctct gtcccctatg
ctggagtgca gtggcacaat ctcagctcactgcaacttcc gcctcctggg ttcaagtgat
tctcctgctt cagccacctg agtagctggtgctacaggCG CGcaccacca CGccaggcta
ctttttgtat ttttagtaga gagggggtttcaccatgttg gtCGagctgg tctccaactc
ctgaccaCGt gatccacccG catctgcctcccaaagtgct gggattacag gcatgagcca
ccaCGcccag ccacatttac catttttaagtgtaaagtct agtggtcata aatacattta
tatatatata tatatatata tatatacacacacacacaca tatataaaca tatatatata
tatatatata tatatatata tatatattttttttttt
```

tttcctgcct cagcctccct agtagctgggattacaggtg caCGccacca tgcctggcta
ctttttgttt tttttagtat agatggggtttccccatgtt ggctgggctg ctctcaaact
catgacctca actgaggtgc cCGcctCGgtctcccaaagt gcCGggatta caggcatgat
ccacctcacc caacctcttt ttagttctttaaaggacttc cacacttttc tcCGtaaagg
ctgtactaat ttacactcct accaacagggtattagggtt ctcctttctc taccactttg
gcaggatttc ctttgcctgt cttgcagctaaaagccattt tattttattt cattttattt
tgagatggag tttCGctctt gtcacccaggctggagtgca gtggtgCGat cttggctcac
cacaacctcc acctcccagg ttcaagCGattctcctgcct cagcctcccG agtagctgga
attacaggca caCGccacca CGcccaactaaattttgtat ttttagtaga gacagtgttt
cttcatgtgg gtcagactgg tctcaaactccCGaccttat gaggttcacc cacctcaggc
tctcaaaggt ctaggatgac agaCGtgagccaccaCGccc ggcctaaaat ccattttaat
ggggtgagat gaaaactcac tttgattttaatttgtgttt ctctgatgat gagtgaaact
gagcactttt tagtatgtgg ggaaatttcatgtgttttgc tccttttttca attaaatCGt
ttgttttatt gagttgtttg agcttcttatatttctagtt attaatccca tctcagatgc
atagtttgca catatttgct cccaatctgtgggttgtctc ttcactttgt tggtttattt
ttagCGgtgc agaagttgct tagtttgaggtaatcccaat ggtctatttt tgcttCGatt
acttgtgttt tgaaggttta aaacaaaatgtcttccttca gacaaatgtc ctggagcatt
tccccaatat tttcttctac gtgtttcataggttcaggcc ttagactcac atctttaatc
cattttcatt tgagttttgt gtatagtgacaggtagaggt gcagtttcat tcctctgcat
gtagatgtcc aggtttccct gcactgtttattgaaaagac tgtcctttcc tgattgtgag
ttcttggcac ctttgtcaaa gtccattggatgggctgggc atggtggctg acacctgcaa
tttcagcact ttgggagccc aaggCGggtggatcacctga ggccaggagt tcaagattag
tctggcCGac gtgatgaaac attgtctccactaaaaatat aaaaattagc tgagcatggt
ggtcagcacc tgtaatacca ctactcaggagtttgaggcc agagaattga ttgaacccag
gaggctgtgg tggcagtgaa cCGagattgcacctctgcac tccagcctgg gtgacagagc
gagactccat ctcaaaagaa aaaagaaaaaaacattggag gtaaatgcat ggattatatc
tgtgttcttc attctgctcc attgttctacgtgcctttct ttatgccaat gtgatgctgt
tttgcttact acagctctgt aacatattttgagatcaggt agtgtgatgc tcctgttttc
tctttatacc ttgaagtctc aagacagtgggCGtcacata caaaaattac ggaaaaaagg
atcccaggac tcccagggcc caatattagataacagagtg ttggccatga accaacctca
aagatttcca ttgagtagag gacagacaccctcatttcct cacctctctc ctgtctCGtg
ttctaggaaa cccttcaaat agttggccttcacccactga accaagctcc gaaacCG

Promoter predictions for 1 eukaryotic sequence with score cutoff 0.80 (transcription start shown in larger font):

Promoter predictions for seq0 :

```
Start   End    Score                Promoter
Sequence
  345   395    0.82
TTATATATATATATATATATATATATATACACACACACACACATATATAA
  353   403    1.00
ATATATATATATATATATATACACACACACACACATATATAAACATATAT
 2297  2347    0.96
ACTAAAAATATAAAAATTAGCTGAGCATGGTGGTCAGCACCTGTAATACC
```

```
+ 2188   11.2  0.0  0.0  UnnamedSequence      6   299 (2334) C AluSg
SINE/Alu       (16)    294      1   1
+  227   15.6  4.4  0.0  UnnamedSequence    301   345 (2288) C L1MB3
LINE/L1         (41)   6142   6096   2
+   59   10.9  0.0  0.0  UnnamedSequence    346   436 (2197) + (TA)n
Simple_repeat      1     91    (0)   3
+   18    0.0  0.0  0.0  UnnamedSequence    437   456 (2177) + (T)n
Simple_repeat      1     20    (0)   4
+ 2027   20.3 13.5  3.2  UnnamedSequence    458   838 (1795) C L1MA2
LINE/L1        (294)   6006   5597   5
+ 1906   14.5  1.0  0.7  UnnamedSequence    839  1142 (1491) C AluSz
SINE/Alu         (7)    305      1   6
+ 2027   21.8  6.3  3.7  UnnamedSequence   1143  1284 (1349) C L1MA2
LINE/L1        (708)   5596   5465   5
+ 2158   13.7  0.0  0.0  UnnamedSequence   1285  1591 (1042) C AluSp
SINE/Alu         (6)    307      1   7
+ 2980   19.6  2.8  2.1  UnnamedSequence   1592  2179  (454) C L1MA2
LINE/L1        (840)   5464   4842   5
+ 1938   17.0  0.3  0.0  UnnamedSequence   2180  2479  (154) + AluSx1
SINE/Alu           1    301   (11)   8
+ 2980   19.1  2.0  1.7  UnnamedSequence   2480  2632    (1) C L1MA2
LINE/L1       (1302)   4841   4695   5
```

Anhang 3:

In der Sequenz sind Exon4 und Exon5 des *KIR2DL3*-Gens in violett dargestellt. Der Bereich zwischen den Genen (Intron) ist in gelb gehalten. Der putative Promotor ist im Intron schwarz unterstrichen und hervorgehoben. Weiter befinden sich im untersuchten Intron weitere konservierte Elemente wie Lines, Alus und *simple repeats*.

6.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Bedanken, denn ohne sie wäre diese Arbeit in dieser Form nicht entstanden.

Mein erster Dank gilt Herrn Professor Dr. Markus Uhrberg, dass er mir dieses anspruchsvolle und interessante Thema anvertraut hat. Er hat mich in die Welt der NK-Zellen eingeführt und mir die KIRs nähergebracht. Ich konnte vieles von ihm lernen.

Bei Herrn Professor Dr. Beye möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Korreferats bedanken.

Bei Herrn PD. Dr. Santourlidis möchte ich mich ebenfalls ganz herzlich bedanken. Er hat mich in die Welt der Epigenetik eingeführt und mir viel Wissen über ihre Methoden vermittelt.

Bei Özer möchte ich mich auch ganz herzlich für die Bereitstellung der MSC und des MSC-Mediums bedanken. Du hast mir immer auf unkomplizierte Art geholfen.

Bei Agnes, Robert, Silke und Xiaoyi möchte ich mich auch bedanken. Wir hatten viele schöne und lustige Stunden im Labor. Wenn man Hilfe brauchte, wart ihr immer da! Die berühmt berüchtigten Bahnfahrten mit Agnes kann man einfach nicht vergessen.

Nina bei dir bedanke ich mich auch ganz herzlich. Es war eine schöne Zeit mit dir im Labor! Auf dich war immer verlass. Vielen Danke für die letzte schönen Jahre. Auch wenn du im letzten Jahr nicht mehr Teil der Arbeitsgruppe warst hast du mich immer unterstützt.

Bei Ralf bedanke ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und vielen nützlichen Ratschläge, Tipps und Tricks.

Aber der größte Dank gilt meinen Eltern und meiner Oma. Vielen Dank für Euer uneingeschränktes Vertrauen, der großen Unterstützung, in guten wie in schlechten Zeiten. Ohne euch wäre vieles nicht möglich gewesen.

6.4 Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Ich erkläre gleichzeitig, dass ich diese Dissertation in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch in keiner anderen Institution eingereicht habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich vorher noch keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen habe.

Düsseldorf, den 23.06.2014
(Jens Brands)