
**Die Rolle von KIR- und HLA-Klasse I-Polymorphismen
für die Funktion von Natürlichen Killerzellen in
gesunden und hämatologisch erkrankten Personen**

Kumulative Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Angela Riccarda Manser

aus Düsseldorf

Düsseldorf, Januar 2016

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

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

Referent: Prof. Dr. Markus Uhrberg
Korreferent: Prof. Dr. Joachim Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 30.03.2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen.....	III
Verzeichnis der im Text verwendeten Abbildungen.....	V
Zusammenfassung.....	VI
Summary.....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Die humane Hämatopoiese.....	1
1.2 Das Immunsystem.....	2
1.3 Natürliche Killerzellen.....	3
1.3.1 Phänotypische Merkmale von NK-Zellen	4
1.3.2 Funktion und Effektormechanismen der NK-Zellen	5
1.4 Rezeptoren der NK-Zellen	6
1.4.1 Die Natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren	7
1.4.2 Rezeptoren der NKG2-Familie.....	8
1.4.3 Leukozyten-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren.....	9
1.4.4 Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren.....	10
1.4.4.1 Struktureller Aufbau der KIR.....	10
1.4.4.2 Genetische Organisation des <i>KIR</i> -Locus	12
1.4.4.3 Die Liganden der KIR.....	13
1.4.4.4 Genetische Variabilität der <i>KIR</i>	15
1.4.4.5 Das KIR-Repertoire	16
1.5 Alterung und Differenzierung von NK-Zellen	18
1.6 NK-Zellen und Schwangerschaft.....	19
1.7 NK-Zellen und Erkrankungen des hämatopoietischen Systems	20
1.8 NK-Zell-Repertoire und Virus-Infektionen.....	22
1.9 Ziele der Arbeit.....	22
2 Publikationen	24
2.1 Human KIR repertoires: shaped by genetic diversity and evolution.....	24

2.2 Age-related changes in NK cell repertoires: impact on NK cell function and immune surveillance	45
2.3 Lack of association between KIR genes and acute lymphoblastic leukemia in children	57
2.4 KIR ligand C2 is associated with increased susceptibility to childhood ALL and confers an elevated risk for late relapse.....	63
2.5 Selective downregulation of HLA-C and HLA-E in childhood acute lymphoblastic leukaemia.....	70
2.6 Impaired cytotoxicity associated with defective natural killer cell differentiation in myelodysplastic syndromes.....	76
3 Literatur.....	88
4 Lebenslauf.....	105
5 Publikationen im Rahmen der Doktorarbeit	106
5.1 Vorträge	106
5.2 Poster-Präsentationen.....	106
5.3 Veröffentlichungen	106
6 Danksagung.....	108
7 Eidesstattliche Erklärung.....	110

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>)
AIDS	Erworbenes Immundefizienz-Syndrom (<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>)
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
CB	Nabelschnurblut (<i>Cordblood</i>)
CD	Differenzierungsgruppe (<i>Cluster of differentiation</i>)
CMV	Zytomegalie-Virus (<i>Cytomegalovirus</i>)
CNV	Variation in Kopienzahl (<i>Copy number variation</i>)
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
FcγRIIIa	Fc-gamma-Rezeptor-III-alpha
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HPC	Hämatopoietische Vorläuferzelle (<i>Hematopoietic progenitor cell</i>)
HSC	Hämatopoietische Stammzelle (<i>Hematopoietic stem cell</i>)
HSCT	Hämatopoietische Stammzelltransplantation (<i>Hematopoietic stem cell transplantation</i>)
IFN-γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILT	Immunglobulin-ähnliches Transkript (<i>Immunoglobulin-like transcript</i>)
ITAM	(<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>)
ITIM	(<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>)
ITSM	(<i>Immunoreceptor tyrosine-based switched motif</i>)
Kb	Kilobasen
KIR	Killerzell-Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor
KLR	Killerzell-Lektin-ähnliche Rezeptorfamilie

LIR	Leukozyten-Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor
LRC	Leukozyten-Rezeptor-Komplex (<i>Leukocyte receptor complex</i>)
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major histocompatibility complex</i>)
MIC	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I-Ketten-verwandt (<i>Major histocompatibility complex class I chain related</i>)
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül (<i>Neural cell adhesion molecule</i>)
NCR	Natürlicher Zytotoxizitäts-Rezeptor (<i>Natural cytotoxicity receptor</i>)
NKC	NK-Zell Gen-Komplex (<i>NK cell gene complex</i>)
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PB	Peripheres Blut
PCR-SSP	Polymerase Kettenreaktion mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden (<i>polymerase chain reaction with sequence specific primers</i>)
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAIL	Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand (<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>)
ULBP	UL-16 bindendes Protein (<i>UL-16 binding protein</i>)
%	Prozent
+	Positiv
-	Negativ
>	Größer

Verzeichnis der im Text verwendeten Abbildungen

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der menschlichen Hämatopoiese 1
Abbildung 2: Genomische Organisation des NKC auf Chromosom 12..... 8
Abbildung 3: Genomische Organisation des LRC auf Chromosom 19 10
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Aufbaus der KIR-Rezeptoren 11
Abbildung 5: Genomische Organisation der *KIR*-Haplotypen 12
Abbildung 6: Anordnung der *HLA*-Gene auf Chromosom 6 14

Zusammenfassung

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) vermitteln eine frühzeitige Detektion und Eliminierung von Virus-infizierten und entarteten Zellen. Dazu exprimieren sie inhibitorische Rezeptoren der Killerzell-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptor- (KIR-) und NKG2-Rezeptor-Familie, mit denen sie eine intakte Oberflächenexpression ihrer Liganden, der humanen Leukozyten-Antigen-Moleküle der Klasse I (HLA-Klasse I-Moleküle), detektieren. Wenn eine Körperzelle HLA-Klasse I herunterreguliert, z.B. weil sie Virus-infiziert ist und deswegen der HLA-restringierten adaptiven Immunantwort entgehen will, kann dies von NK-Zellen erkannt werden und zur Abtötung der Zielzelle führen, ein Mechanismus der als „*missing-self*“ Erkennung bezeichnet wird. Die hier präsentierte Arbeit besitzt zwei Schwerpunkte. Zum einen beschreibt sie wie die genetischen Polymorphismen des *HLA*- und *KIR*-Systems die Rezeptorexpression und Funktion der NK-Zellen in gesunden Personen beeinflussen. Zum anderen wird untersucht, welchen Einfluss dies auf die Suszeptibilität für bestimmte hämatologische Erkrankungen hat.

Die entsprechenden Analysen zeigen, dass abhängig von der Anzahl und Art der vererbten *KIR*-Gene ein Individuum zwischen 32 bis 4096 verschiedene Möglichkeiten hat seine KIR und NKG2-Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu kombinieren wodurch individuell verschieden komplexe NK-Zell-Repertoires entstehen. Es wurde ein neues Modell ausgearbeitet mit dem sich die Aufrechterhaltung der großen genetischen Diversität der *KIR*-Gene erklären lässt. Das Modell basiert darauf, dass es zwei *KIR*-Haplotypgruppen gibt, die mit distinkten Vor- und Nachteilen assoziiert sind, deren Kombination aber synergistisch wirkt und so zur Selektion und zum Fortbestand beider Haplotypgruppen in verschiedenen Populationen führen (siehe Abschnitt 2.1). Des Weiteren zeigte sich in Analysen der KIR- und NKG2A-Expression in verschiedenen Alterssegmenten, dass es von der Geburt bis ins Erwachsenenalter zu deutlichen und stabilen Veränderungen des NK-Zell-Repertoires kommt. Hieraus wurde ein neues Modell der Veränderungen des NK-Zell-Repertoires im Zuge der Alterung entwickelt (siehe Abschnitt 2.2).

Die Komplexität der miteinander interagierenden KIR- und HLA-Klasse I-Systeme wurde auch in hämatologischen Erkrankungen untersucht. In einer Kohorte von pädiatrischen Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) konnte in Analysen von *KIR*- und *HLA*-Klasse I-Genen ein signifikant höheres Vorkommen des KIR-Liganden *HLA-C2* beobachtet werden. Korrelationen der genetischen Daten mit den klinischen Verläufen der Patienten verdeutlichten, dass *HLA-C2* nicht nur einen neuen Risikofaktor für die Suszeptibilität einer pädiatrischen ALL darstellt, sondern auch, dass durch das Vorhandensein des C2-Epitops das Risiko eines Rezidivs nach beendeter Therapie signifikant erhöht war (siehe Abschnitte 2.3 und 2.4). Durchflusszytometrische Messungen der leukämischen Blasten zeigten eine verringerte Oberflächenexpression der zwei wichtigen NK-Zell-Liganden HLA-C und HLA-E in pädiatrischen ALL-Patienten. Interessanterweise waren deren NK-Zellen trotz der fehlenden inhibitorischen Liganden nicht in der Lage, die leukämischen Zellen zu eliminieren, was einen Defekt in der NK-Zell-Aktivierung vermuten lässt (siehe Abschnitt 2.5). Auch in Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (MDS) konnten funktionale NK-Zell-Defekte beobachtet werden. Im Rahmen dieser Studie zeigten die NK-Zellen fast aller Patienten eine verminderte Funktion, was in einer signifikant verringerten NK-Zell-Zahl und einem unreiferen Phänotyp der NK-Zellen begründet war. Diese funktionalen Veränderungen korrelierten mit einer schlechteren Zytotoxizität aufgrund eines Defekts in der Beladung der zytotoxischen Granula mit Perforin und Granzyme B (siehe Abschnitt 2.6).

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse tragen zu einem besseren Verständnis der genetischen Faktoren bei, welche die NK-Zell-Funktion in gesunden Personen, während der Alterung, und in hämatologischen Erkrankungen beeinflussen. Zudem könnte die Identifizierung von *HLA-C2* als neuer Risikofaktor für das Auftreten eines späten Rezidivs dazu führen, dass die Therapieansätze für die betroffenen Patienten entsprechend angepasst werden.

Summary

Natural killer (NK) cells enable early detection and elimination of virus-infected and transformed cells. For this purpose, they express inhibitory receptors encoded by the KIR and NKG2 receptor families, which together enable to determine the proper cell surface expression of its ligands, which are the human leukocyte antigen (HLA) class I molecules. NK cells become cytotoxic if the inhibitory NK cell receptors, that are expressed on a given NK cell, are not properly inhibited by the respective ligands due to downregulation of HLA class I, a mechanism called 'missing-self' recognition. The present thesis was focussed on two main aspects, namely how the extensive genetic polymorphism of *HLA* class I and *KIR* genes influences NK cell receptor expression and function in the healthy population and secondly how it influences susceptibility to hematological malignancies.

The work shows that the clonal expression of KIR and NKG2A leads to distinct NK cell repertoires with 32 to 4096 different receptor combinations depending on the inherited number and kind of *KIR* genes. A new model is presented in which the two main *KIR* haplotype groups are associated with divergent risks and benefits leading to balancing selection and maintenance of the two haplotype groups in the population (see section 2.1). Furthermore, analysis of KIR and NKG2A expression in different age segments shows that the NK cell repertoire goes through major changes from birth to adulthood (see section 2.2).

Next, by analyses of *KIR* and *HLA* class I genes in a large cohort of patients with pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) we found a significantly increased incidence of the KIR ligand *HLA-C2* in patients. Analysis of clinical data revealed that *HLA-C2* not only constitutes a novel susceptibility factor for ALL but that it is also associated with a significantly increased risk for relapse after cessation of chemotherapy (see sections 2.3 and 2.4). Flow cytometric analyses revealed that leukemic blasts of childhood ALL patients had reduced surface expression levels of the major NK cell ligands HLA-C and HLA-E. Interestingly, patients' NK cells were not able to eliminate the leukemic cells despite the lack of these inhibitory ligands, suggesting a general deficiency in NK cell activation (see section 2.5). Functional NK cell deficiency was also observed in

myelodysplastic syndrome (MDS). This work showed impaired function of the NK cell compartment in most MDS patients either because NK cell numbers were strongly reduced or NK cells were immature. In the latter case, immaturity was associated with poor cytotoxicity due to a defective loading of cytotoxic granules with perforin and granzyme B (see section 2.6).

The results presented in this thesis contribute to a better understanding of the genetic factors that influence human NK cell function in health, ageing, and hematological disease. Furthermore, the identification of *HLA-C2* as a novel risk factor for leukemic relapse might guide the adjustment of therapeutic regimens for individual patients accordingly.

1 Einleitung

1.1 Die humane Hämatopoiese

Der Mensch ist täglich einer Vielzahl verschiedener Krankheitserreger, wie Viren, Bakterien oder Pilzen, ausgesetzt, gegen die er sich zur Wehr setzen muss. Mit Hilfe des Immunsystems wird gewährleistet, dass diese Pathogene entweder erst gar nicht in den Organismus eindringen, oder, dass sie vernichtet werden, wenn es zur Infektion gekommen ist.

Ein Großteil der Zellen des Immunsystems befindet sich im peripheren Blut (PB) und zirkuliert so durch den Körper. Neben dem wässrigen Teil des Blutes, in dem unter anderem Proteine, Salze und Zucker gelöst sind, besteht das Blut aus zellulären Bestandteilen, nämlich den roten Blutkörperchen (Erythrozyten), den Blutplättchen (Thrombozyten) und den weißen Blutkörperchen (Leukozyten). Letztere bilden das Immunsystem und werden aufgrund der Morphologie ihres Zellkerns weiterhin in Granulozyten und Agranulozyten (Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen und Lymphozyten) unterteilt.

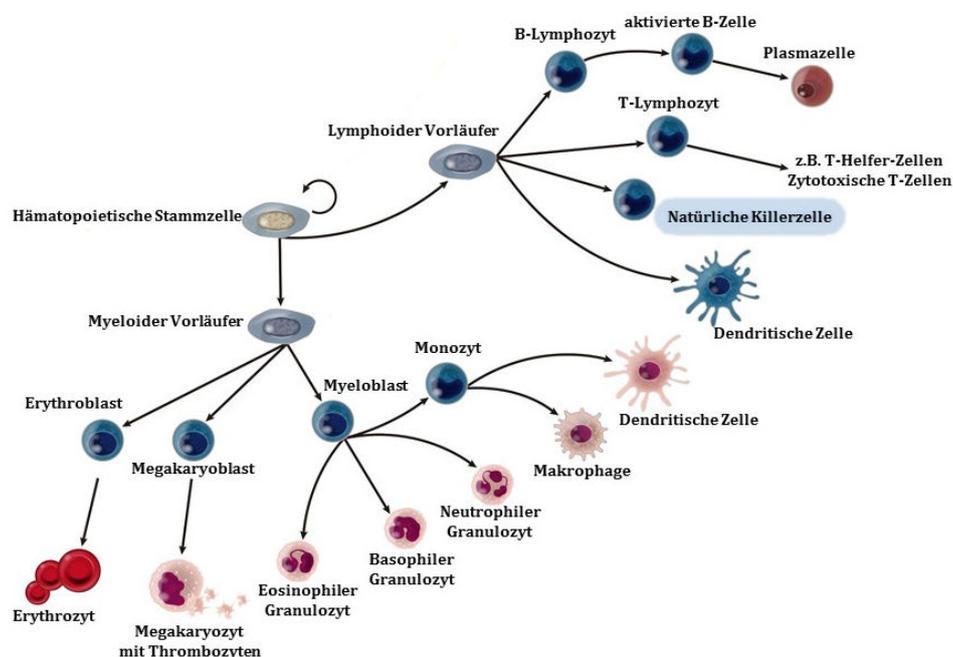


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der menschlichen Hämatopoiese. Schematische Darstellung der humanen Hämatopoiese inklusive der für das Immunsystem wichtigen Zellen. Modifiziert nach (Genetex).

Alle Zellen des Blutes stammen von einer hämatopoietischen Stammzelle (*hematopoietic stem cell*, HSC) ab (Abbildung 1). Eine HSC ist in der Lage über eine asymmetrische Zellteilung sich selbst zu erneuern, sowie eine hämatopoietische Vorläuferzelle (*hematopoietic progenitor cell*, HPC) zu generieren. Aus dieser kann anschließend, wie in Abbildung 1 zu sehen ist, ein myeloider oder ein lymphoider Vorläufer entstehen, der jeweils unter Anwesenheit bestimmter Zytokine und Transkriptionsfaktoren in verschiedene Zelltypen differenziert (siehe Abbildung 1).

1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem verfügt über zwei verschiedene Abwehrmechanismen: die angeborene und die erworbene/adaptive Immunantwort.

Die angeborene Immunantwort stellt die erste Verteidigungslinie des Körpers dar. Unter anderem dienen die Haut, Schleimhäute, Speichel und der Magen-Darm-Trakt als Barriere, um das Eindringen eines Erregers in den Körper zu verhindern. Neben diesen physiologischen Barrieren und dem Komplementsystem nehmen zellvermittelte Prozesse einen wichtigen Teil des angeborenen Immunsystems ein. Dabei ist es die Aufgabe von Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen (*dendritic cell*, DC) und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) Pathogene zu bekämpfen, ohne vorher stimuliert werden zu müssen. Sie sind in der Lage körperfremde von körpereigenen Strukturen und Peptiden zu unterscheiden und vernichten Pathogene, sowie infizierte Zellen durch Phagozytose oder durch Lyse der befallenen Zelle. Zudem bilden sie als sogenannte antigenpräsentierende Zellen, zu denen Makrophagen und DCs gehören, das Bindeglied zwischen beiden Immunantworten, da sie durch die Präsentation körperfremder Peptide die Zellen, die Teil der erworbenen Immunantwort sind, stimulieren.

Die Aufgabe der erworbenen Immunantwort besteht darin, wesentlich gezielter und anpassungsfähiger auf körperfremde Strukturen zu reagieren. Sie wird vermittelt durch zelluläre Abwehrmechanismen der B- und T-Zellen, sowie durch humorale, antikörpervermittelte Mechanismen. Eine besondere Eigenschaft besteht zudem in der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, so dass bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Pathogen schneller reagiert werden kann.

Die im Vergleich zur angeborenen Immunantwort gezieltere Immunreaktion entsteht durch die große Vielfalt antigenspezifischer Rezeptoren auf B- und T-Lymphozyten, die durch genetische Rekombinationsereignisse entstehen. Die Diversität eines B-Lymphozyten beruht auf membrangebundenen oder löslichen Immunglobulinen (Ig) zur spezifischen Antigenerkennung. B-Zellen sind in der Lage nach Antigenkontakt, entweder vermittelt durch eine antigenpräsentierende Zelle oder durch freie Antigene, zu spezialisierten Plasmazellen zu differenzieren (siehe Abbildung 1), die lösliche Immunglobuline produzieren und somit die humorale Immunantwort darstellen. Ist ein Pathogen von Antikörpern „umhüllt“, können Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems diesen Antigen/Antikörper-Komplex erkennen und vernichten. Die B-Zelle kann allerdings auch ihrerseits, neben DCs und Makrophagen, als antigenpräsentierende Zelle für T-Zellen fungieren. Zur Erkennung der Antigene besitzen T-Lymphozyten den sogenannten T-Zell-Rezeptor (*T cell receptor*, TCR), wobei jeder TCR für ein unterschiedliches Antigen spezifisch ist. Dabei werden die Fremdartigene den T-Zellen über zwei verschiedene Moleküle präsentiert: über humane Leukozyten-Antigene (*human leukocyte antigen*, HLA) der Klasse I (HLA-Klasse I) und der Klasse II (HLA-Klasse II)(siehe Abschnitt 1.4.4.3). Wie in Abbildung 1 zu erkennen ist, gibt es zwei Haupt-T-Zell-Populationen, T-Helfer-Zellen und zytotoxische T-Zellen. Sie unterscheiden sich in der Expression ihrer Oberflächenrezeptoren und besitzen unterschiedliche Funktion. Die Oberflächenrezeptoren aller Zellen werden in so genannte Differenzierungsgruppen (*cluster of differentiation*, CD) unterteilt und in der CD-Nomenklatur zusammengefasst. T-Zellen besitzen den T-Zell-Marker CD3 (Kung, *et al* 1979, Van Wauwe, *et al* 1980), der mit dem TCR assoziiert ist (Brenner, *et al* 1985) und für die Signaltransduktion innerhalb der Zelle verantwortlich ist (Oettgen, *et al* 1985). CD4⁺ T-Helfer-Zellen erkennen Fremdartigene über die Präsentation in HLA-Klasse II-Molekülen und können nach erfolgter Aktivierung andere Immunzellen durch Ausschüttung von Interleukinen (IL) stimulieren. Auf der anderen Seite werden CD8⁺ zytotoxische T-Zellen aktiviert, wenn sie Fremdartigene, präsentiert von HLA-Klasse I-Molekülen erkennen, wodurch ihre zytotoxische Funktion initialisiert wird.

1.3 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen

Immunantwort, indem sie eine der ersten Verteidigungslinien gegen Virus-infizierte und entartete Zellen bilden. Dabei ist es zum einen ihre Aufgabe zytotoxisch aktiv zu sein und zum anderen Zytokine und Chemokine zu sekretieren, um dadurch andere Immunzellen anzulocken. Außerdem wird durch die NK-Zell-Antwort die Zeit überbrückt, die das adaptive Immunsystem benötigt, bis es spezifisch auf Pathogene reagieren kann.

1.3.1 Phänotypische Merkmale von NK-Zellen

NK-Zellen wurden erstmals 1975 als Immunzellen beschrieben, die schnell und ohne vorherige Induktion zytotoxisch aktiv sein können (Herberman, *et al* 1975, Kiessling, *et al* 1975a, Kiessling, *et al* 1975b). Sie machen etwa 15% der Lymphozyten des PB aus und lassen sich anhand ihrer Oberflächenmarker als CD3⁻ Lymphozyten definieren, die CD56 (*neural cell adhesion molecule*, NCAM) und/oder CD16 (Fc-gamma-Rezeptor-III-alpha, FcγRIIIa) tragen (Hercend, *et al* 1985, Lanier, *et al* 1986, Lanier, *et al* 1989) (siehe Abbildung 1). CD16 ist ein niedrig-affiner Rezeptor für Fc-Fragmente von IgG Antikörpern, wodurch die sogenannte Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) induziert wird.

Abhängig von der Expressionsstärke des CD56 werden NK-Zellen unterschieden in CD56^{bright} NK-Zellen (CD56^{bright} CD16^{low/-}), die circa (ca.) 5-10% der NK-Zellpopulation ausmachen, eine unreifere Vorstufe in der NK-Zell-Entwicklung darstellen und deren Hauptaufgabe die Produktion von Zytokinen und Chemokinen ist, sowie in reife CD56^{dim} NK-Zellen (CD56^{dim} CD16⁺), die hauptsächlich zytolytische Funktion übernehmen, aber auch Zytokine produzieren können (Chan, *et al* 2007, Cooper, *et al* 2001, Jacobs, *et al* 2001, Lanier, *et al* 1986, Romagnani, *et al* 2007). Neben diesen beiden gut charakterisierten Zelltypen wurden auch NK-Zell-Populationen beobachtet, die phänotypisch CD56^{dim} CD16⁻ oder CD56⁻ CD16⁺ NK-Zellen sind. Dabei wird vermutet, dass CD56^{dim} CD16⁻ NK-Zellen entweder aktivierte Zellen sind, bei denen CD16 durch Metalloproteasen proteolytisch abgespalten wurde (Harrison, *et al* 1991), oder, dass es sich dabei um Vorläufer handelt, die noch zu reifen CD56^{dim} CD16⁺ differenzieren (Lutz, *et al* 2011). Letzteres gilt ebenfalls für die CD56⁻ CD16⁺ Zellpopulation (McCullar, *et al* 2008), wobei auch vermutet wird, dass es sich aufgrund einer hohen Apoptoserate um seneszente oder sterbende NK-Zellen handelt (Lutz, *et al* 2011).

1.3.2 Funktion und Effektormechanismen der NK-Zellen

Verschiedene Subpopulationen der NK-Zellen können unterschiedliche Effektormechanismen wahrnehmen, deren Ziel es meist ist eine andere Zelle zu töten. Dazu muss die NK-Zelle jedoch wissen, welche Zelle überhaupt getötet werden soll und welche nicht, sie muss also den körpereigenen Zellen gegenüber tolerant sein. 1986 konnte erstmals gezeigt werden, dass NK-Zellen das Vorhandensein oder die Abwesenheit von „Selbst“-Strukturen erkennen (Kärre, *et al* 1986) und wenige Jahre später bekam dieser Mechanismus den Namen „missing-self“-Hypothese (Ljunggren and Kärre 1990). Kärre konnte zudem zeigen, dass diese „Selbst“-Strukturen, die die NK-Zelle sucht, Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) Klasse I-Moleküle sind. Ist deren Expression intakt, wird die NK-Zelle über die Bindung eines inhibitorischen Rezeptors inhibiert und somit eine zytotoxische Reaktion verhindert. Hat die Zelle jedoch keine oder eine verringerte HLA-Klasse I-Expression, wie es bei Virus-befallenen oder tumorös entarteten Zellen vorkommen kann, bleibt das inhibitorische Signal aus. Die Aktivierung der NK-Zelle tritt jedoch erst ein, wenn zeitgleich auch ein stimulatorisches Signal auftritt, als eine Art Schutzmechanismus reicht das Ausbleiben des inhibitorischen Signals nicht aus, um die Zelle zu aktivieren. Wenn es die Aufgabe von NK-Zellen ist die Zelle auf das Vorhandensein der humanen Form des MHC, auf HLA-Klasse I-Moleküle, zu untersuchen, braucht dementsprechend jede NK-Zelle mindestens einen Rezeptor für HLA-Klasse I. Dies wurde 1997 unter der „at least one“-Theorie zusammengefasst (Uhrberg, *et al* 1997, Valiante, *et al* 1997), wobei inzwischen gezeigt werden konnte, dass es durchaus NK-Zellen gibt, die keinen inhibitorischen Rezeptor für HLA-Klasse I besitzen (Anfossi, *et al* 2006, Cooley, *et al* 2007, Fernandez, *et al* 2005), welche dann jedoch eine verringerte Zytotoxizität aufweisen, da sie hyporesponsiv sind. Dadurch stellte sich heraus, dass eine NK-Zelle durch den Erwerb eines inhibitorischen Rezeptors für „Selbst“, ein Prozess, der als Lizenzierung bezeichnet wird, erst eine Art funktionale Reife bekommt, mit der Sie ihrer Funktion vollständig nachgehen kann (Kim, *et al* 2005).

Wie bereits in 1.3.1 erwähnt, können NK-Zellen Zytokine und Chemokine ausschütten und infolgedessen andere Zellen des Immunsystems aktivieren. Dazu gehört unter anderem der Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Interferon γ (IFN- γ), IL-17 und IL-22. Nachdem man lange davon ausging, dass lediglich CD56^{bright} NK-Zellen in der Lage seien,

Zytokine zu sekretieren, ist der jetzige Stand der Dinge, dass nach IL-12/IL-18-Aktivierung CD56^{bright} NK-Zellen besser Zytokine sekretieren, während nach Aktivierung durch eine Zielzelle CD56^{dim} NK-Zellen bessere Zytokin-Produzenten darstellen (Luetke-Eversloh, *et al* 2013).

Letztere verfügen zudem über Mechanismen, mit denen sie direkt Zielzellen töten können. Nach erfolgter Aktivierung können NK-Zellen, die aufgrund ihrer Morphologie auch als große granuläre Lymphozyten bezeichnet werden, Granula in Richtung der Zielzelle entleeren, in denen sich die zytotoxischen Substanzen Granzym B, eine Serinprotease, und Perforin befinden. Dabei wird vermutet, dass sich die NK-Zelle durch die innerhalb der zytotoxischen Granula Membran-assoziierten Moleküle CD107a, CD107b und Cathepsin-B vor der Selbstzerstörung vor und nach der Degranulation schützt (Chavez-Galan, *et al* 2009). Der Mechanismus, über den Granzym und Perforin in die Zielzelle gelangen ist jedoch noch nicht abschließend geklärt: entweder perforiert Perforin die Zellmembran, wodurch die Granzyme in die Zielzelle gelangen, oder das Ganze wird endozytotisch von der Zielzelle aufgenommen und Perforin perforiert anschließend die Endosomen innerhalb der Zielzelle (Cullen and Martin 2008, Lieberman 2003, Lord, *et al* 2003, Voskoboinik, *et al* 2010). Im Inneren der Zelle angekommen wird der Caspase-Signalweg initiiert, was zur Apoptose der Zielzelle führt. Beim Menschen sind fünf serin-proteolytische Granzyme bekannt (A, B, H, K, M), von denen A und B zytotoxische Funktion haben und die Funktion der Granzyme H, K, und M noch nicht vollständig bekannt ist.

Es gibt weitere Möglichkeiten die Zielzelle durch die Induktion von Apoptose zu töten. Diese werden durch Bindung des Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor der Zielzelle, sowie durch Bindung des Tumornekrosefaktor-verwandten Apoptose-induzierenden Liganden (*tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*, TRAIL) an den entsprechenden TRAIL-Rezeptor auf der Zielzelle ausgelöst.

1.4 Rezeptoren der NK-Zellen

Die Funktion der NK-Zelle wird durch Signale von inhibitorischen und stimulatorischen Rezeptoren bestimmt, die auf der NK-Zell-Oberfläche exprimiert werden. Dabei sind hauptsächlich drei Rezeptorfamilien für die Aktivierung und Inhibition der NK-Zelle verantwortlich, die natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren (*natural cytotoxicity receptors*,

NCR), die Rezeptoren der NKG2-Familie, sowie die Killerzell-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (*killer-cell immunoglobulin-like receptors*, KIR)(Trowsdale, *et al* 2001).

1.4.1 Die Natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren

Natürliche Zytotoxizitäts-Rezeptoren besitzen alle eine stimulatorische Funktion und kommen fast ausschließlich auf NK-Zellen vor. Genomisch sind NKp30 (*NCR3*) und NKp44 (*NCR2*) auf Chromosom 6 und NKp46 (*NCR1*) auf Chromosom 19 lokalisiert. Während NKp30 und NKp46 bereits auf der Oberfläche ruhender NK-Zellen exprimiert sind, wird NKp44 erst dann exprimiert, wenn die Zelle vorher mittels IL-2 stimuliert wurde (Pende, *et al* 1999, Sivori, *et al* 1997, Vitale, *et al* 1998). Die Expression der Liganden der NCRs wird meist durch zellulären Stress, Infektion oder tumoröse Transformation der Zelle induziert.

Es ist bekannt, dass NKp46 verschiedene virale Haemagglutinine bindet (Jarahian, *et al* 2011, Jarahian, *et al* 2009, Mandelboim, *et al* 2001), außerdem wurde gezeigt, dass Heparan-Sulfat-Proteoglykane einen zellulären Liganden für NKp46 darstellen (Bloushtain, *et al* 2004).

Für NKp30 konnten BAT3 (HLA-B assoziiertes Transkript 3) und B7-H6 als Liganden nachgewiesen werden (Brandt, *et al* 2009, Pogge von Strandmann, *et al* 2007). BAT3, welches unter Stressbedingungen von Tumorzellen exprimiert wird und so die NK-Zell-Zytotoxizität fördert, wird ebenfalls von dendritischen Zellen exprimiert, so dass die NK-Zelle über NKp30-BAT3 mit der dendritischen Zelle kommuniziert und die IFN- γ Produktion induziert wird (Ferlazzo, *et al* 2002, Simhadri, *et al* 2008, Vitale, *et al* 2005). Interessanterweise konnte für NKp30 auch eine inhibitorische Funktion nachgewiesen werden. Arnon *et al.* konnten zeigen, dass das Zytomegalie-Virus (*cytomegalovirus*, CMV)-spezifische Protein pp65 ein Ligand für NKp30 ist und direkt die NK-Zell-Zytotoxizität supprimiert (Arnon, *et al* 2005).

Wie für NKp46, konnten für NKp44 Interaktionen mit viralen Haemagglutininen und Heparan-Sulfaten nachgewiesen werden (Arnon, *et al* 2001, Hershkovitz, *et al* 2007). Auch für NKp44 konnte ein inhibitorischer Mechanismus nachgewiesen werden, da das sogenannte *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) als Ligand für NKp44 fungieren und die NK-Zelle an der IFN- γ Sekretion und in ihrer Zytotoxizität hindern kann (Rosental, *et al* 2011).

1.4.2 Rezeptoren der NKG2-Familie

Rezeptoren, die durch die NKG2-Gene im NK-Zell Gen-Komplex (NK *cell gene complex*, NKC) auf Chromosom 12 kodiert werden (siehe Abbildung 2), sind Teil der Killerzell-Lektin-ähnlichen Rezeptorfamilie (*killer-cell lectin-like receptor*, KLR). Sie gehören wie CD94 zur C-Typ Lektin Familie, da sie eine C-Typ Lektin-Domäne aufweisen, und besitzen eine Typ II Membran-Orientierung mit einem extrazellulären C-Terminus (Chang, *et al* 1995, Houchins, *et al* 1991). Funktional weisen sie sowohl inhibitorische (NKG2A) als auch stimulatorische (NKG2C, -D, -E) Funktionen auf. Bei NKG2A wird das inhibitorische Signal über ITIM-Motive (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*) vermittelt (Houchins, *et al* 1991, Lazetic, *et al* 1996), während NKG2C mit DAP12 assoziiert (Lanier, *et al* 1998a), dessen ITAM-Motive (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) ein stimulatorisches Signal erzeugen.

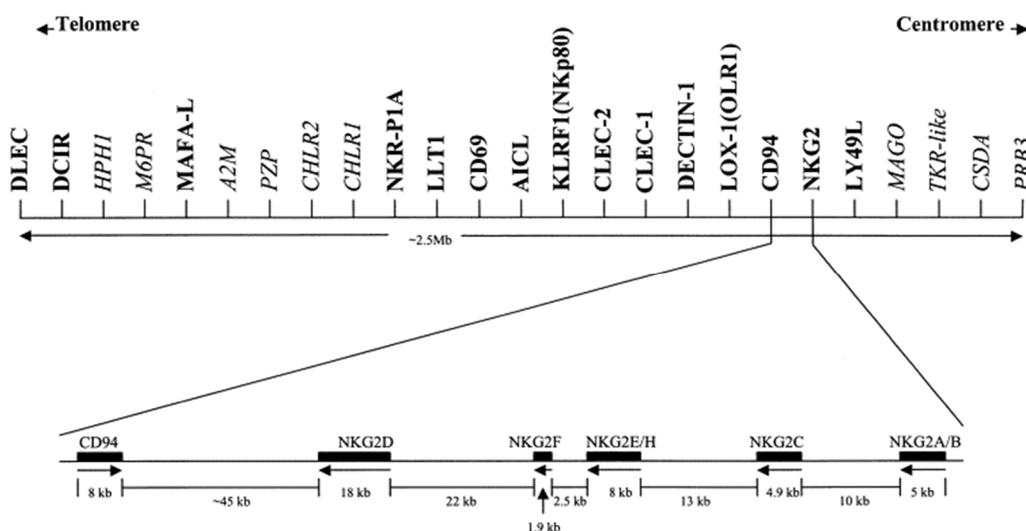


Abbildung 2: Genomische Organisation des NKC auf Chromosom 12. Aus (Borrego, *et al* 2002).

Mit Ausnahme von NKG2D, der ein Homodimer bildet (Li, *et al* 2001) und mit DAP10 assoziiert ist (Wu, *et al* 1999), bilden die anderen NKG2-Moleküle Heterodimere mit CD94 (Carretero, *et al* 1997, Chang, *et al* 1995, Lazetic, *et al* 1996). Als Ligand besitzen sowohl CD94/NKG2A als auch CD94/NKG2C das nicht-klassische HLA-E (Borrego, *et al* 1998, Braud, *et al* 1998, Lee, *et al* 1998b) wobei die Affinität von HLA-E zu CD94/NKG2A höher als die zu CD94/NKG2C ist (Vales-Gomez, *et al* 1999). Die Besonderheit von

HLA-E besteht darin, dass es die Signalpeptide der klassischen HLA-Moleküle (HLA-A, -B, -C) präsentiert, so dass dadurch die Expressionsstärke der gesamten HLA-Klasse I-Moleküle wiedergespiegelt wird (Lee, *et al* 1998a). Zu erwähnen ist hier auch, dass *HLA-E* einen Dimorphismus aufweist, der zu schwächer und stärker exprimierten Allelen führt (Geraghty, *et al* 1992, Strong, *et al* 2003).

NKG2D bindet die Stress-induzierten MHC-Klasse I-Ketten-verwandten (*MHC class I chain related*, MIC) Proteine A und B, sowie verschiedene UL-16 bindende Proteine (*UL-16 binding protein*, ULBP) (Bauer, *et al* 1999, Cosman, *et al* 2001). Für NKG2D konnte gezeigt werden, dass das erzeugte stimulatorische Signal in der Lage ist, auch bei gleichzeitiger Inhibition, z.B. durch CD94/NKG2A, eine Aktivierung der NK-Zelle zu verursachen (Bauer, *et al* 1999). Weitere beschriebene Moleküle der NKG2-Familie sind das stimulatorische NKG2E, welches ebenso Dimere mit CD94 bildet, jedoch nicht an die Oberfläche der Zellen gelangt, sondern intrazellulär bleibt (Orbelyan, *et al* 2014), NKG2B, das lediglich eine *Splice*-Variante von NKG2A darstellt (Plougastel, *et al* 1996), und NKG2F, worüber nur sehr wenig bekannt ist.

1.4.3 Leukozyten-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren

Leukozyten-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren, die auch als Immunglobulin-ähnliche Transkripte (*immunoglobulin-like transcript*, ILT) bezeichnet werden und auf Chromosom 19 im sogenannten Leukozyten-Rezeptor-Komplex (*leukocyte receptor complex*, LRC) kodiert sind (siehe Abbildung 3), wurden Ende der 1990-Jahre entdeckt (Arm, *et al* 1997, Borges, *et al* 1997, Cella, *et al* 1997, Colonna, *et al* 1999, Colonna, *et al* 1997, Colonna, *et al* 1998, Cosman, *et al* 1999, Cosman, *et al* 1997, Fanger, *et al* 1999, Fanger, *et al* 1998, Nakajima, *et al* 1999, Samaridis and Colonna 1997, Wagtmann, *et al* 1997). Auch hier gibt es Vertreter mit stimulatorischer, bzw. inhibitorischer Funktion, die in Bezug auf die Signalweiterleitung innerhalb der Zelle den im nächsten Abschnitt beschriebenen KIR ähneln. Sie sind auf annähernd allen Leukozyten exprimiert, auf NK-Zellen kommt vor allem ILT-2 (LIR1) vor, der eine inhibitorische Funktion besitzt. Als Liganden für LIR1 wurden verschiedene HLA-Klasse I-Moleküle, sowie das virale Klasse I-Homolog UL18 beschrieben (Fanger, *et al* 1999).

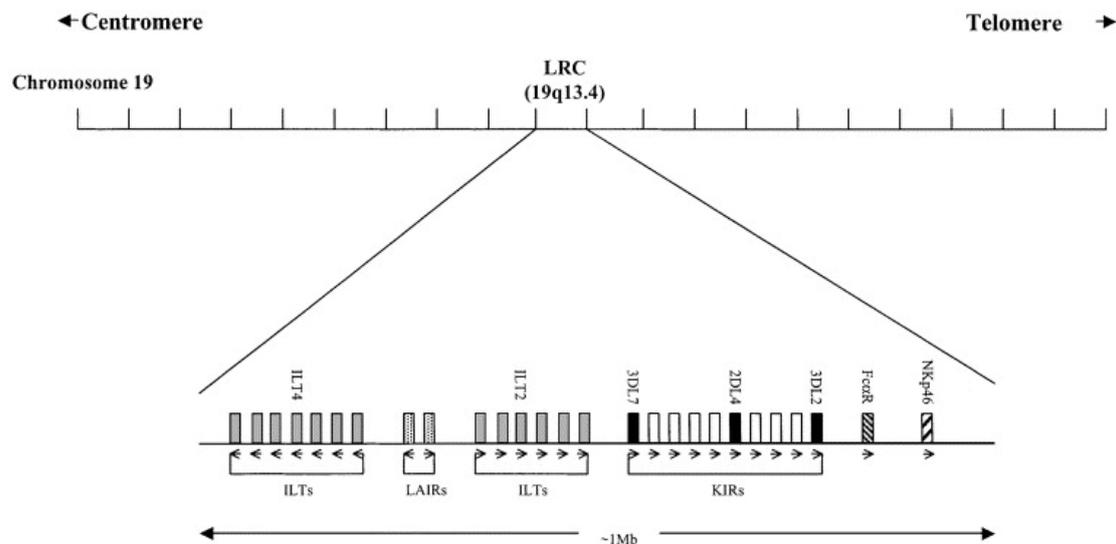


Abbildung 3: Genomische Organisation des LRC auf Chromosom 19. Aus (Borrego, *et al* 2002).

1.4.4 Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren

Wie in der NKG2-Familie, kodieren auch *KIR*-Gene sowohl für stimulatorische als auch inhibitorische Rezeptoren. Die *KIR*-Genfamilie befindet sich, wie die *ILTs*, auf dem langen Arm von Chromosom 19 im LRC (Abbildung 3). Da es sich bei *KIR* um ein polygenes System handelt, ist der Komplex je nach genetischer Zusammensetzung zwischen 150 Kilobasen (Kb) und mehr als 200 Kb groß und verfügt zudem über ein besonders hohes Maß an Sequenzpolymorphismen (Uhrberg 2005a, Uhrberg 2005b, Uhrberg, *et al* 1997). Es gibt 15 verschiedene *KIR*-Loci, die zu insgesamt 17 verschiedenen *KIR*-Genen führen. Neben den NK-Zellen können auch Subpopulationen der T-Zellen *KIR* exprimieren.

1.4.4.1 Struktureller Aufbau der KIR

Die einzelnen *KIR* unterscheiden sich bezüglich ihres Aufbaus in der Zahl ihrer extrazellulären Domänen und in der Länge der zytoplasmatischen Kette. In der *KIR*-Nomenklatur (Marsh, *et al* 2003) spiegelt sich dies in der Bezeichnung *KIR2D* (zwei extrazelluläre Domänen) bzw. *KIR3D* (drei extrazelluläre Domänen) wieder, sowie in dem Zusatz L (lang) oder S (*short*), was die Länge des intrazellulären Teils des späteren Rezeptors angibt (Abbildung 4).

Ein inhibitorischer KIR besitzt eine lange zytoplasmatische Kette mit zwei ITIM-Motiven, die, sobald der Ligand gebunden wurde, phosphoryliert werden und die inhibitorische Signalkaskade in Gang setzen. Stimulatorische KIR, mit einer kurzen zytoplasmatischen Kette, besitzen eine geladene Aminosäure in der Transmembran-Region (Abbildung 4) über die sie mit DAP12 interagieren, dessen ITAM-Motive nach Bindung des KIR-Liganden das stimulatorische Signal initiieren (Lanier, *et al* 1998b).

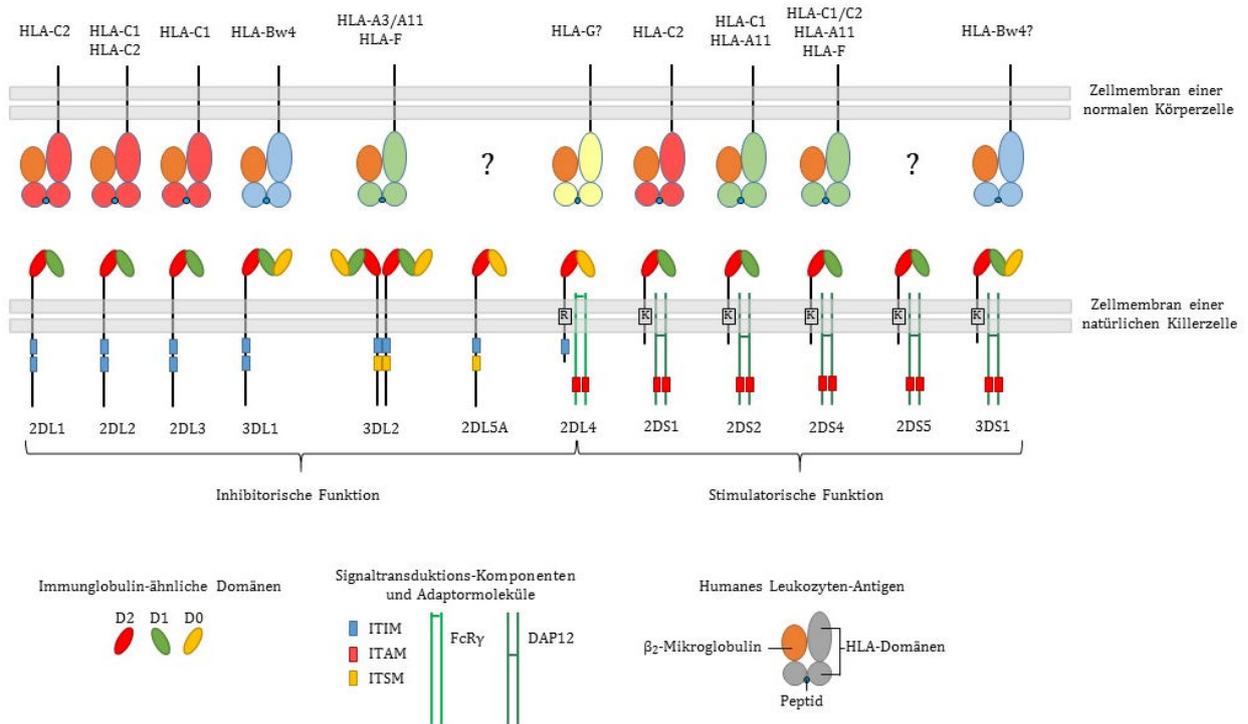


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Aufbaus der KIR-Rezeptoren. KIR-Rezeptoren unterscheiden sich in der Anzahl ihrer extrazellulären Domänen, sowie in der Länge der zytoplasmatischen Kette. ITIM-Motive in der langen zytoplasmatischen Kette inhibitorischer KIR bzw. ITAM-Motive im Adaptormolekül DAP12, welches mit stimulatorischen KIR assoziiert ist, sind für die Signalkaskade innerhalb der Zelle verantwortlich. Gezeigt sind die KIR, die auch auf der Oberfläche einer NK-Zelle exprimiert werden, inklusive ihren HLA-Liganden. Modifiziert nach (Saunders, *et al* 2015).

Von den definierten 17 verschiedenen *KIR*-Genen besitzen acht inhibitorische Eigenschaften (KIR2DL1-3, KIR2DL5A-B, KIR3DL1-3) während sechs KIR stimulatorische Eigenschaften aufweisen (KIR2DS1-5, KIR3DS1). KIR2DL4 bildet in diesem System eine Ausnahme, da er sowohl inhibitorische als auch stimulatorische Strukturen besitzt und damit auf beide Arten wirken kann (Faure 2002, Kikuchi-Maki, *et al* 2003, Selvakumar, *et al* 1996). Eine weitere Ausnahme besteht darin, dass KIR2DL4 in

allen NK-Zellen konstitutiv exprimiert wird (Rajagopalan and Long 1999, Valiante, *et al* 1997), während die anderen KIR klonal verteilt sind (Ciccone, *et al* 1992). Bei *KIR2DP1* und *KIR3DP1* handelt es sich lediglich um Pseudogene. Daneben gibt es zwei weitere *KIR*, deren Genstruktur intakt ist, die aber ebenfalls aus noch nicht genau definierten Gründen nicht exprimiert werden, nämlich *KIR2DL5B* und *KIR3DL3* (Trundley, *et al* 2006, Vilches, *et al* 2000a).

1.4.4.2 Genetische Organisation des *KIR*-Locus

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei *KIR* um ein besonders polymorphes System. Innerhalb des *KIR*-Locus sind die *KIR*-Gene in verschiedenen Haplotypen organisiert (Abbildung 5). Abhängig von ihrer genetischen Zusammensetzung unterscheidet man zwischen *A*- und *B*-Haplotypgruppen. Beide Haplotypgruppen besitzen die vier *framework* *KIR* *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* und *KIR3DP1* (Uhrberg, *et al* 1997, Wilson, *et al* 2000).

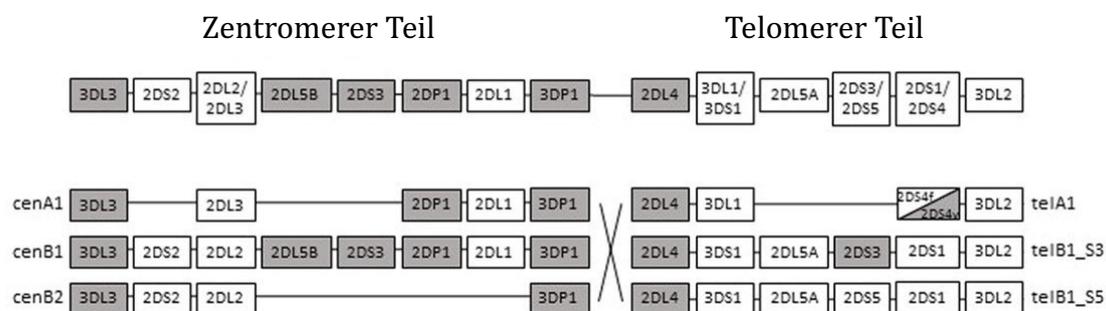


Abbildung 5: Genomische Organisation der *KIR*-Haplotypen. Der *KIR*-Locus auf Chromosom 19 kann in einen zentromeren und einen telomeren Bereich unterteilt werden. *KIR2DL2*/*KIR2DL3*, *KIR3DL1*/*KIR3DS1*, *KIR2DS3tel*/*KIR2DS5tel*, und *KIR2DS1*/*KIR2DS4* sind hier an jeweils einem Locus dargestellt, da sie entweder Allele des gleichen Gens sind, oder sich gegenseitig innerhalb eines Haplotyps ausschließen. Auf Basis der genetischen Zusammensetzung kann man drei verschiedene zentromere und drei telomere Teile definieren, aus denen sich alle häufigen Haplotypen zusammensetzen lassen. *KIR*, die aus verschiedenen Gründen nicht auf der Zelloberfläche einer reifen NK-Zelle exprimiert werden, sind grau hinterlegt. Modifiziert nach (Manser, *et al* 2015).

Neben diesen vier *KIR* besitzt der *A*-Haplotyp noch *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1*, *KIR2DS4* und *KIR2DP1*, wobei *KIR2DS4* hierbei den einzigen *KIR* mit stimulatorischer Funktion darstellt.

Gruppe *B*-Haplotypen können im Gegensatz zu Gruppe *A*-Haplotypen verschiedene Kombinationen von *KIR*-Genen beinhalten. Generell unterscheiden sie sich von den *A*-Haplotypen dadurch, dass ihnen entweder mindestens ein Gen der *A*-Haplotypen fehlt und/oder sie mindestens ein zusätzliches Gen besitzen (*KIR2DL2*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* und/oder *KIR3DS1*) (Uhrberg, *et al* 2002, Uhrberg, *et al* 1997). Während also die *B*-Haplotypgruppe eine große Variabilität insbesondere in der Anzahl stimulatorischer *KIR* aufweist (Abbildung 5), besitzt die *A*-Haplotypgruppe eine definierte und nichtvariable Kombination von *KIR*-Genen, die aber eine größere allelische Vielfalt aufweisen (Shilling, *et al* 2002a).

Da sich ein *KIR*-Genotyp aus zwei *KIR*-Haplotypen zusammensetzt (*AA*, *AB* oder *BB*), entstehen durch die unterschiedliche Anzahl der *KIR*-Gene, durch die unterschiedliche Kopienzahl eines Gens (*copy number variation*, CNV) und durch allelische Diversität eines Gens *KIR*-Genotypen mit verschiedensten genetischen Zusammensetzungen.

1.4.4.3 Die Liganden der KIR

Wie in Abschnitt 1.2 kurz erwähnt, kodieren die *HLA*-Gene für Oberflächenmoleküle, die der Antigenpräsentation dienen. Die entsprechenden *HLA*-Gene liegen auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (Abbildung 6). Bei *HLA* handelt es sich ebenfalls um ein hochgradig polymorphes System. So sind zum jetzigen Zeitpunkt bereits über 10000 *HLA*-Klasse I-Allele und über 3500 *HLA*-Klasse II-Allele bekannt (Robinson, *et al* 2015).

Die beiden Klassen der *HLA*-Moleküle sind dabei für die Präsentation von Peptiden aus unterschiedlichen Zellkompartimenten verantwortlich. Während *HLA*-Klasse I-Moleküle auf fast jeder kernhaltigen Körperzelle exprimiert werden und Peptide präsentieren, die von zytosolischen Proteinen stammen, ist *HLA*-Klasse II normalerweise nur auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und zuständig für die Präsentation von Peptiden, die über endozytotische Vesikel aufgenommen wurden. Dabei werden sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺ T-Zellen nur dann aktiviert, wenn das präsentierte Peptid körperfremden Ursprungs ist. Um einer solchen Fremd-Erkennung durch T-Zellen zu entgehen, verfügen Virus-infizierte oder entartete Zellen über Mechanismen, die *HLA*-Expression herunter zu regulieren. Wird jedoch *HLA*-Klasse I auf der Oberfläche verringert, um der T-Zell-Antwort zu entgehen, tritt der in 1.3.2 beschriebene Effekt des „*missing-self*“ ein, wodurch die NK-Zelle aktiviert wird.

Die Funktion der NK-Zelle wird definiert durch die Balance aus inhibitorischen und stimulatorischen Signalen. Der Großteil der KIR besitzt Liganden, die zur HLA-Klasse I gehören (siehe Abbildung 4), jedoch ist nicht für jeden KIR ein Ligand bekannt.

Sowohl der inhibitorische KIR2DL1 als auch der stimulatorische KIR2DS1 besitzen als einzigen Liganden Moleküle, die zur HLA-C-Gruppe 2 (HLA-C2) gezählt werden, wobei die Interaktion von KIR2DL1 zu HLA-C2 eine höhere Bindungsaffinität besitzt als HLA-C2 zum entsprechenden stimulatorischen KIR2DS1 (Biassoni, *et al* 1997).

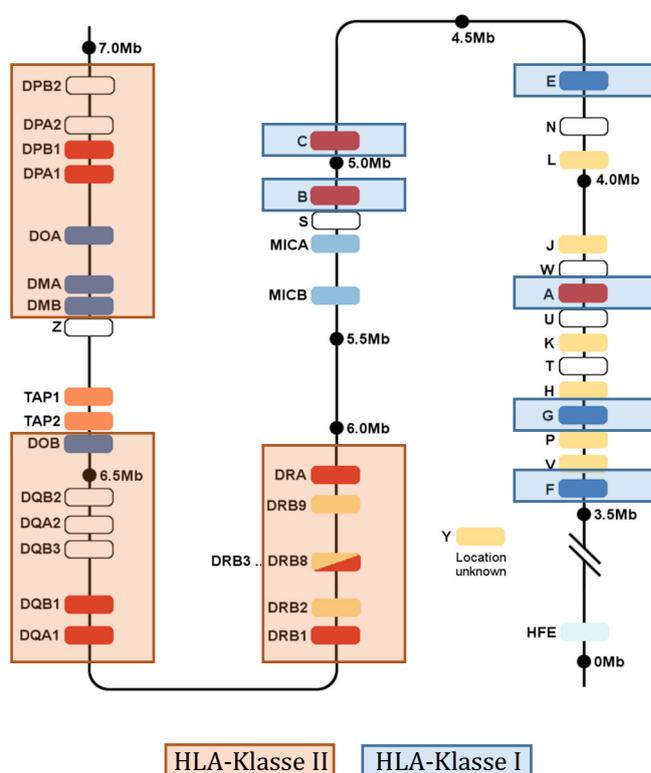


Abbildung 6: Anordnung der HLA-Gene auf Chromosom 6. Gene, die zur HLA-Klasse I gehören sind blau hinterlegt, Gene, die Proteine der HLA-Klasse II kodieren, sind orange hinterlegt. Aus (Robinson, *et al* 2015)

HLA-C-Gruppe 1-Moleküle (HLA-C1) stellen die Liganden für die inhibitorischen KIR2DL2 und KIR2DL3, sowie für den stimulatorischen KIR2DS2, letzterer jedoch nur mit sehr schwacher Affinität (David, *et al* 2013, Vales-Gomez, *et al* 1998, Winter and Long 1997). Dabei gilt die Interaktion und damit die Inhibition von KIR2DL1/HLA-C2 als stärkste, gefolgt von KIR2DL2/HLA-C1 und KIR2DL3/HLA-C1 (Winter, *et al* 1998). Ob ein HLA-C-Allel das C1-Epitop oder das C2-Epitop besitzt, wird dabei über die Aminosäurepositionen 77 (C1=Serin oder C2=Asparagin) und 80 (C1=Asparagin oder

C2=Lysin) im Protein entschieden. KIR2DL2 kann zusätzlich mit HLA-C2 interagieren, was auch für wenige KIR2DL3-Allele gezeigt werden konnte, in beiden Fällen ist jedoch die Bindungsaffinität zu HLA-C1 wesentlich höher (Frazier, *et al* 2013, Moesta, *et al* 2008, Pende, *et al* 2009). HLA-Bw4 repräsentiert den Liganden für KIR3DL1 (Cella, *et al* 1994, D'Andrea, *et al* 1995, Gumperz, *et al* 1995). Auch hier gibt es ähnlich wie bei HLA-C an Aminosäureposition 77 und 80 Unterschiede, die definieren, ob das Bw4- oder das Bw6-Epitop im Protein vorliegen und damit, ob es einen Liganden für die NK-Zelle darstellt oder nicht. Da das Bw4-Epitop auch auf manchen HLA-A-Allelen exprimiert sein kann, fungieren auch diese Allele als Ligand für KIR3DL1. Es wurde lange Zeit vermutet, dass KIR3DS1 die gleiche Liganden-Spezifität besitzt wie KIR3DL1, jedoch ist dies nach wie vor umstritten und KIR3DS1 scheint, wenn überhaupt, Peptid-abhängig mit HLA-Bw4 zu interagieren (Carr, *et al* 2007, O'Connor, *et al* 2015). Die HLA-A-Allele A3 und A11 stellen Liganden für KIR3DL2 (A3/A11) und KIR2DS2 (A11) dar (Dohring, *et al* 1996, Liu, *et al* 2014). Neben den Liganden A3/A11 konnte gezeigt werden, dass KIR3DL2 mit HLA-F einen weiteren HLA-Klasse I-Liganden, und mit CpG-Oligodesoxynukleotiden auch einen löslichen Liganden besitzt (Goodridge, *et al* 2013, Sivori, *et al* 2010). KIR2DS4 besitzt eine etwas breitere Spezifität, da HLA-C1-, HLA-C2-, HLA-F- und HLA-A1102-Moleküle als niedrigaffine Liganden definiert werden konnten (Goodridge, *et al* 2013, Graef, *et al* 2009). Für KIR2DL4 galt lange Zeit HLA-G als Ligand, was jedoch in jüngeren Studien bezweifelt wurde (Le Page, *et al* 2014, Moradi, *et al* 2015, Rajagopalan and Long 1999). Stattdessen wurde mit Heparan-Sulfat/Heparin ein löslicher Ligand beschrieben (Brusilovsky, *et al* 2013). Für KIR2DS5 und KIR2DL5 wurden bisher keine Liganden beschrieben.

1.4.4.4 Genetische Variabilität der *KIR*

Es gibt auf genetischer Basis mehrere Ebenen, die bereits für eine hohe Diversität des *KIR*-Genotyps sorgen. So entsteht durch die zwei Haplotypgruppen mit unterschiedlicher genetischer Zusammensetzung, sowie durch die Kopienzahl und allelische Vielfalt eines Gens eine hohe Variabilität. Ein weiterer genetischer Faktor ist die unterschiedliche Verteilung der *KIR*-Genotypen/-Haplotypen, sowie von *KIR*-Allelen in den verschiedenen Bevölkerungsgruppen. Während beispielsweise in ostasiatischen Populationen mehr als 50% der Bevölkerung homozygot *KIR*-Haplotyp AA sind, ist der

A-Haplotyp in den australischen Aborigines kaum vorhanden (Gonzalez-Galarza, *et al* 2015, Toneva, *et al* 2001, Yao, *et al* 2011, Yawata, *et al* 2002). In der kaukasischen Bevölkerungsgruppe sind ca. 30% homozygot *KIR*-Haplotyp AA (Hsu, *et al* 2002, Uhrberg, *et al* 2002). Gleiches spiegelt sich auf allelischer Ebene wieder, da *KIR*-Allele in verschiedenen Populationen, so auch in den Mitteleuropäern, mit unterschiedlich hohen Frequenzen vertreten sind (Hou, *et al* 2012, Vierra-Green, *et al* 2012). Allele eines Gens unterscheiden sich dabei in der Oberflächen-Expression und der Bindung an den Liganden, was direkt die NK-Zell-Aktivität beeinflusst (Babor, *et al* 2014, Bari, *et al* 2009, Dunphy, *et al* 2015, Gardiner, *et al* 2001, Gumperz, *et al* 1996, Moesta, *et al* 2008).

1.4.4.5 Das *KIR*-Repertoire

Die Expression an sich, sowie die Expressionsstärke eines *KIR* auf der Oberfläche der NK-Zelle wird durch viele verschiedene Faktoren reguliert. So kann ein *KIR* zwar genetisch vorhanden sein, jedoch kaum oder gar nicht transkribiert werden. Bestimmte Allele von *KIR2S4* und *KIR3DL1*, sowie alle bekannten Allele von *KIR2DL5B*, *KIR2DS3*, *KIR3DL3* und die Pseudogene *KIR2DP1* und *KIR3DP1* werden nicht auf der Oberfläche der NK-Zelle exprimiert (Maxwell, *et al* 2002, Trundley, *et al* 2006, VandenBussche, *et al* 2009, Vilches, *et al* 2000b).

Wie bereits erwähnt sind *KIR*, mit Ausnahme von *KIR2DL4*, klonal verteilt, was bedeutet, dass NK-Zellen unterschiedliche Kombinationen von *KIR* exprimieren. Die Gesamtheit der NK-Zellen mit verschiedenen Rezeptor-Kombinationen wird dabei als *KIR*-Repertoire bezeichnet. Grundlage dieser klonalen Verteilung sind Genregulationsmechanismen. Die Promotoren der *KIR*-Gene verfügen über eine >90%ige Homologie, lediglich die Promotoren von *KIR2DL4* und *KIR3DL3* weisen eine andere Struktur auf (Trompeter, *et al* 2005). Sogenannte CpG-Inseln, an denen Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) -Methylierung erfolgen kann, sind in besonders hoher Dichte in den *KIR*-Promotoren vorhanden. Es konnte gezeigt werden, dass die Promotoren von exprimierten *KIR* demethyliert sind und im Gegensatz dazu die Promotoren der nicht-exprimierten *KIR* methyliert sind (Chan, *et al* 2003, Santourlidis, *et al* 2002), jedoch ließ sich die Expression eines *KIR* mit methyliertem Promotor durch einen Methyltransferase-Inhibitor induzieren. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Veränderungen der Chromatinstruktur, sowie Histonmodifikationen

Einfluss auf die Expression eines KIR haben (Santourlidis, *et al* 2008). Dieses epigenetische Muster wird dabei stets von einer Zelle an ihre Tochterzellen weitergeben (Wolffe and Matzke 1999).

Obwohl die Gene für *KIR* und *HLA* auf verschiedenen Chromosomen liegen, beeinflusst das eigene HLA das KIR-Repertoire innerhalb einer Person. Während bereits 1996 in Mäusen gezeigt werden konnte, dass sich das Repertoire der murinen Ly49 Rezeptoren in Richtung solcher Zellen verschiebt, die einen Rezeptor für eigenes MHC besitzen (Held, *et al* 1996), konnte anfänglich im Menschen lediglich gezeigt werden, dass sich die Repertoires von Geschwistern mit identischen *KIR*- und *HLA*-Klasse I-Genen weniger stark unterscheiden, als die Repertoires von Geschwistern mit unterschiedlichem *HLA* (Shilling, *et al* 2002b). In der Folgezeit beschäftigten sich mehrere Gruppen mit zum Teil gegensätzlichen Ergebnissen mit diesem Thema (Andersson, *et al* 2009, Dunphy, *et al* 2015, Schonberg, *et al* 2011b, Yawata, *et al* 2006). In der Mehrzahl der Studien konnte eine Abhängigkeit der Frequenz eines KIR vom eigenen HLA nachgewiesen werden, dahingehend, dass die Frequenz von NK-Zellen erhöht ist, die einen KIR für eigenes HLA besitzen.

Das eigene HLA hat jedoch nicht nur Einfluss auf die Frequenz eines KIR innerhalb des Repertoires, sondern auch auf die Funktion der NK-Zelle. Wie in 1.3.2 schon beschrieben, konnte gezeigt werden, dass die Funktion von NK-Zellen abhängig davon ist, ob sie einen inhibitorischen Rezeptor für eigenes HLA-Klasse I besitzen oder nicht (Anfossi, *et al* 2006, Fernandez, *et al* 2005, Kim, *et al* 2005). Über diese Lizenzierung erlangt die NK-Zelle somit ihre funktionale Reife. Zur Diskussion steht, ob es sich beim Prozess der Lizenzierung eher um eine Entwaffnung (*disarming*) oder um eine Bewaffnung (*arming*) mit zytotoxischen Funktionen handelt (Raulet and Vance 2006). Da nicht-lizenzierte NK-Zellen zum einen tolerant gegenüber körpereigenen Zellen sind, obwohl sie keinen inhibitorischen Rezeptor für eigenes HLA-Klasse I exprimieren, und zudem keineswegs funktional völlig inaktiv sind, sondern eine verringerte Funktionalität aufweisen, wird davon ausgegangen, dass es sich um eine Entwaffnung handelt.

1.5 Alterung und Differenzierung von NK-Zellen

Während die Funktion und das Repertoire von T-Zellen im Zuge der Alterung intensiv beforscht werden, gibt es bisher nur wenige stichhaltige Erkenntnisse zu Änderungen von NK-Zell-Phänotyp und -Funktion im Rahmen der Alterung. In den existierenden Studien wurden oft nur sehr kleine Kohorten untersucht und die Ergebnisse variieren häufig stark. (Almeida-Oliveira, *et al* 2011, Campos, *et al* 2014, Chidrawar, *et al* 2006, Le Garff-Tavernier, *et al* 2010, Lutz, *et al* 2011). Es besteht allerdings ein weitgehender Konsensus darüber, dass Alterung mit steigenden NK-Zell-Frequenzen und innerhalb des NK-Zell-Kompartiments mit einer Verringerung der unreiferen CD56^{bright} NK-Zellen einhergeht. Genauer ist über den Differenzierungsstatus von NK-Zellen bekannt. Wie in 1.3.1 beschrieben gelten CD56^{bright} NK-Zellen als unreifere Vorstufe der CD56^{dim} NK-Zellen. Dies wird unter anderem dadurch gestützt, dass CD56^{bright} NK-Zellen längere Telomere besitzen, was für weniger bisher durchgeführte Zellteilungen spricht, und, dass sie eine höhere Proliferationsrate und eine niedrigere Apoptoserate besitzen, als CD56^{dim} NK-Zellen (Cooley, *et al* 2007, Lutz, *et al* 2011, Romagnani, *et al* 2007).

Auch innerhalb der CD56^{dim} NK-Zellen gibt es Unterschiede im Differenzierungsstatus, was in zahlreichen Studien untersucht wurde (Beziat, *et al* 2010, Bjorkstrom, *et al* 2010b, Campos, *et al* 2014, Le Garff-Tavernier, *et al* 2010, Lutz, *et al* 2011, Romagnani, *et al* 2007). Da während der NK-Zell-Differenzierung erst NKG2A und anschließend KIR exprimiert wird, gilt der Erwerb von KIR und die Herunterregulation von NKG2A als Schritt in Richtung terminale Differenzierung (Beziat, *et al* 2010). Innerhalb der KIR-Familie konnte gezeigt werden, dass als erster KIR KIR2DL4 exprimiert wird, gefolgt von KIR2DL2/3 und schließlich KIR2DL1 (Fischer, *et al* 2007, Schonberg, *et al* 2011b). Somit gilt eine KIR2DL1⁺ NK-Zelle als weiter differenziert im Vergleich zu einer KIR2DL3⁺ NK-Zelle. Des Weiteren zeigen KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen eine reduzierte Expression von verschiedenen Naivitätsmarkern, sowie einen Anstieg an CD57, im Vergleich zu KIR⁺NKG2A⁺ CD56^{dim} NK-Zellen, was ebenfalls für einen höheren Reifegrad spricht (Beziat, *et al* 2010, Bjorkstrom, *et al* 2010b, Brenchley, *et al* 2003).

Da das Verhältnis zwischen NKG2A und KIR also einen wichtigen Schritt in der Differenzierung der NK-Zelle markiert, wurde dies bereits von mehreren Gruppen untersucht (Almeida-Oliveira, *et al* 2011, Beziat, *et al* 2010, Bjorkstrom, *et al* 2010b, Campos, *et al* 2014, Le Garff-Tavernier, *et al* 2010, Lutz, *et al* 2011, Lutz, *et al* 2005, Schonberg, *et al* 2011a). Viele dieser Studien betrachteten KIR und NKG2A dabei

getrennt voneinander. Stattdessen untersuchte Schönberg das gesamte NK-Zell-Repertoire (KIR-Repertoire inklusive NKG2A) aus Nabelschnurblut (*cordblood*, CB) und PB und konnte zeigen, dass CB-NK-Zellen im Gegensatz zu PB-NK-Zellen von NKG2A dominiert werden (Schonberg, *et al* 2011a). Bezüglich der zytotoxischen Funktionen und der Fähigkeit Zytokine zu produzieren, konnten keine gravierenden Unterschiede zwischen jungen und älteren Personen beobachtet werden (Campos, *et al* 2014, Hazeldine, *et al* 2012, Le Garff-Tavernier, *et al* 2010).

1.6 NK-Zellen und Schwangerschaft

Während der Schwangerschaft übernehmen NK-Zellen, die während des ersten Trimesters die Hauptpopulation von Leukozyten im Uterus ausmachen, eine besondere Rolle (Moffett-King 2002). Fetale Trophoblasten, die in mütterliches Gewebe einwandern, sind dabei für die Ausbildung der Blutgefäße in der Decidua zuständig, welche über die Plazenta versorgt wird. Dabei muss die Ausbildung der Blutgefäße gut kontrolliert werden, da der Fötus weder über- (zu großes Baby bei der Geburt) noch unterversorgt sein darf. Bei einer der häufigsten Schwangerschaftskomplikationen, der Präeklampsie, werden die Blutgefäße nicht richtig ausgebildet, was zur Unterversorgung im späteren Verlauf der Schwangerschaft bis hin zur Totgeburt führen kann. 1996 konnte King zeigen, dass fetale Trophoblasten HLA-C-Moleküle exprimieren (King, *et al* 1996). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Repertoire uteriner NK-Zellen zu HLA-C-spezifischen KIR verschoben ist (Sharkey, *et al* 2008) und, dass NK-Zellen eine direkte Rolle in der Trophoblasten-Invasion in die Decidua übernehmen, da sie die dafür benötigten Chemokine exprimieren. Mechanistisch scheint dabei die Inhibition der NK-Zelle von besonderem Nachteil zu sein: Mütter, die homozygot für den von inhibitorischen *KIR*-Genen dominierten *KIR*-Haplotyp *AA* sind und deren Föten HLA-C2 exprimieren, welches den stärksten KIR-Liganden darstellt, besitzen ein besonders hohes Risiko für Schwangerschaftskomplikationen, da sich durch die Inhibition der NK-Zellen die Expression von Chemokinen, die Invasion der Trophoblasten und damit die Ausbildung der deciduellen Blutgefäße verringert (Hanna, *et al* 2006, Hiby, *et al* 2010, Hiby, *et al* 2008, Hiby, *et al* 2004, Sharkey, *et al* 2008).

1.7 NK-Zellen und Erkrankungen des hämatopoietischen Systems

Leukämien machen etwa 2,5% aller Krebserkrankungen aus (WHO), in Kindern ist die akute lymphatische Leukämie sogar die häufigste onkologische Erkrankung und macht über 80% der kindlichen Leukämien aus. Weiterentwickelte chemotherapeutische Ansätze und Stammzelltransplantationen (*hematopoietic stem cell transplantation*, HSCT) sind nur zwei Gründe dafür, dass die Überlebensraten einer pädiatrischen ALL inzwischen bei 90% liegen (Pui, *et al* 2012). Eine ALL kann dabei in jedem Vorläufer der B- und T-Zell-Entwicklung entstehen und wird dementsprechend aufgrund ihres Immunphänotyps klassifiziert. Die leukämischen Zellen befinden sich dabei meist in einem unreifen Zustand und werden als Blasten bezeichnet.

Aufgrund der räumlichen Nähe im Blut und den lymphoiden Organen und ihrer zytotoxischen Funktion sind NK-Zellen für die Kontrolle der Entstehung und Etablierung einer Leukämie von besonderer Bedeutung. In den letzten Jahren konnten einige Gruppen zeigen, dass es einen Zusammenhang zwischen verschiedenen *KIR*-Genen und ihren Liganden in der Entstehung bzw. der Wiederkehr der Leukämie nach Transplantation gibt (Almalte, *et al* 2011, de Smith, *et al* 2014, Giebel, *et al* 2005). Zudem scheinen maligne entartete Zellen verschiedene Mechanismen entwickelt zu haben, um der Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen. So ist der leukämische Klon in der Lage die Expression verschiedener HLA-Klasse I-Allele herunter zu regulieren, womit sie der Erkennung durch T-Zellen entgehen (Demanet, *et al* 2004, Verheyden, *et al* 2009) (siehe hierzu auch Abschnitt 2.5). In diesem Zusammenhang sollte ein Verlust der NK-Zell-Liganden zu „*missing-self*“ führen, jedoch gibt es Studien, die zeigen, dass der leukämische Klon ebenfalls die Liganden für stimulatorische Rezeptoren der NK-Zelle herunter reguliert, so dass die NK-Zelle nicht stimuliert werden kann (Pende, *et al* 2005). Dies wird unterstützt durch die Beobachtung, dass NK-Zellen von Patienten, die aufgrund einer TAP-Defizienz annähernd kein HLA-Klasse I exprimieren, ebenfalls eine verringerte Zytotoxizität und Zytokinproduktion aufweisen (Sleiman, *et al* 2014), da die NK-Zellen nicht lizenziert werden können. Ein weiterer Mechanismus, mit dem sich die Leukämie vor der Zerstörung durch die NK-Zelle schützt, scheint eine Art Perforin-Resistenz zu sein, da die Bindung von Perforin an die Leukämiezelle direkt mit NK-Zellvermittelter Zytotoxizität korreliert werden konnte (Lehmann, *et al* 2000). Der Verlust von NK-Zell-Funktionen zeigt sich auch in anderen Erkrankung des hämatopoietischen Systems, da NK-Zellen von Patienten mit Myelodysplastischem

Syndrom (MDS), einer Knochenmarkserkrankung, bei der die Hämatopoiese gestört ist, ebenfalls eine verminderte Zytotoxizität besitzen (siehe hierzu auch Abschnitt 2.6), was in den entsprechenden Studien durch eine verringerte Expression stimulatorischer Rezeptoren erklärt wurde (Carlsten, *et al* 2010, Epling-Burnette, *et al* 2007).

Neben der Chemotherapie ist die allogene Stammzelltransplantation (*hematopoietic stem cell transplantation*, HSCT) ein weiteres Mittel, die Leukämie zu therapieren und zu bekämpfen. Die HSCT hat das Ziel die gesamten Zellen des Blutes eines Patienten durch Zellen eines gesunden Spenders zu ersetzen. Dabei gewinnen NK-Zellen, sowie der immungenetische Status der polymorphen *KIR*-Gene und *HLA* Klasse I-Liganden im Rahmen der HSCT immer mehr an Bedeutung. Werden bei der Transplantation auch alloreaktive NK-Zellen, also lizenzierte NK-Zellen des Spenders, für die der Empfänger keinen Liganden besitzt, übertragen, hat dies im allgemeinen mehrere Vorteile: zum einen werden mögliche residuale T-Zellen und antigenpräsentierende Zellen des Empfängers getötet, was ein Anwachsen des Transplantats begünstigt und Abstoßungsreaktionen verhindert, zum anderen werden auch residuale leukämische Zellen getötet, was das Überleben der Patienten begünstigt (Giebel, *et al* 2003, Miller, *et al* 2007, Ruggeri, *et al* 2002). Im Rahmen der Rekonstitution konnte gezeigt werden, dass die in Abschnitt 1.5 beschriebene sequentielle Expression der *KIR* dazu führt, dass zuerst *KIR2DL3* exprimiert wird. In Patienten, die *HLA-C1* exprimieren, hat dies den Vorteil, dass sie schneller über lizenzierte, funktionale NK-Zellen verfügen, als Patienten, die *HLA-C2* exprimieren (Fischer, *et al* 2007). Im gleichen Kontext ist eine kürzlich erschienene Studie zu sehen, in der das *C2*-Epitop als Risikofaktor für kindliche ALL identifiziert wurde (Babor, *et al* 2014)(siehe hierzu auch Abschnitt 2.4). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass das klinische Ergebnis nach HSCT bei Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML) signifikant besser ist, wenn der Empfänger mindestens ein *HLA-C1*-Allel besitzt (Cooley, *et al* 2014). Cooley *et al.* fanden darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen *KIR*-Genotyp und Rezidiv-Risiko. Patienten, die ein Transplantat erhielten, das homozygot den *KIR*-Haplotyp *AA* besaß, hatten ein höheres Risiko für ein Rezidiv, als Patienten mit transplantierten *B*-Haplotypen (Cooley, *et al* 2009, Cooley, *et al* 2010). Im Gegensatz zu AML konnte ein Einfluss des *KIR*-Polymorphismus auf die Suszeptibilität für ALL, sowie die Inzidenz in rezidivierenden ALL Patienten nicht bestätigt werden (Babor, *et al* 2012, Babor, *et al* 2014)(siehe hierzu auch Abschnitt 2.3 und 2.4)

1.8 NK-Zell-Repertoire und Virus-Infektionen

Eine der Hauptaufgaben von NK-Zellen besteht in der frühzeitigen Bekämpfung von Virus-Infektionen. In diesem Zusammenhang wurden *KIR-HLA*-Konstellationen untersucht, die vor- oder nachteilig für den Krankheitsverlauf und die Erkennung durch NK-Zellen sein können. So wurde in einer Kohorte von Hepatitis-C-Virus (HCV)-infizierten Patienten beschrieben, dass Homozygotie für *KIR2DL3* und *HLA-C1* mit einer Ausheilung der Infektion assoziiert war (Khakoo, *et al* 2004). Dieser Effekt wurde dadurch erklärt, dass NK-Zellen in einem homozygoten *HLA-C1* Individuum weniger stark durch *KIR2DL3* inhibiert werden, als sie es über *KIR2DL2* werden, so dass die NK-Zelle leichter über stimulatorische Signale aktiviert werden kann (Winter, *et al* 1998). Eine andere Studie zeigte, dass sich das Risiko für die Entstehung von Leberkrebs verringert, wenn die HCV-Patienten *KIR3DS1/HLA-Bw4* besitzen (Lopez-Vazquez, *et al* 2005). Auch im Rahmen einer Infektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) war das Fortschreiten der Infektion in das erworbene Immundefizienzsyndrom (*Acquired immunodeficiency syndrome, AIDS*) hochsignifikant verlangsamt, wenn die Patienten genetisch *KIR3DS1* und *HLA-Bw4* besaßen (Martin, *et al* 2002).

Aber nicht nur KIR scheint einen Einfluss auf den Verlauf einer Virus-Infektion zu haben, auch umgekehrt scheint die Virus-Infektion einen Einfluss auf die KIR-Expression einer Person zu nehmen. In verschiedenen Infektionssituationen konnte beobachtet werden, dass die Patienten noch mehrere Monate nach der Infektion vor allem solche NK-Zellen besaßen, die den stimulatorischen Rezeptor NKG2C, sowie einen inhibitorischen KIR für eigenes HLA-Klasse I exprimieren, wobei die Expansion abhängig vom CMV-Status der Person zu stehen scheint (Beziat, *et al* 2012, Beziat, *et al* 2013, Bjorkstrom, *et al* 2010a, Guma, *et al* 2004, Guma, *et al* 2006).

1.9 Ziele der Arbeit

Die Ziele der Arbeit lassen sich im Wesentlichen in zwei Hauptfelder unterteilen. Zum einen sollten die Faktoren zusammengefasst werden, die für die Formung des NK-Zell-Repertoires verantwortlich sind. Dabei wurde der Fokus darauf gelegt, welchen Einfluss der *KIR*-Polymorphismus und das Vorhandensein von zwei *KIR*-Haplotypgruppen auf die Zusammensetzung des Repertoires nehmen. Was ist der Vorteil eines Systems, das aus zwei komplementären Haplotypgruppen besteht, bzw. wie bleiben beide

Haplotypgruppen in verschiedensten Populationen und sogar unterschiedlichen Spezies erhalten? Des Weiteren sollte untersucht werden, wie das eigene *HLA*-Klasse I-System und die eigene immunologische Historie an der Formung des Repertoires beteiligt sind, und ob es dabei zu einer progradienten Entwicklung zu einem seneszenten NK-Zell-Repertoire kommt. Dazu wurden umfangreiche Analysen genetischer und durchflusszytometrischer Studien durchgeführt, um daraus Modelle der NK-Zell-Repertoire-Komplexität und der NK-Zell-Alterung zu erstellen (siehe Abschnitt 2.1 und 2.2).

Im zweiten Teil der Arbeit sollte auf die Relevanz dieser NK-Zell-Biologie für hämatologische Erkrankungen eingegangen werden. Dazu wurden in zwei Studien DNA-Proben gesunder Personen und pädiatrischer Leukämien dahingehend untersucht, ob es auf Basis der *KIR*- oder *HLA*-Genetik Risikofaktoren für die Entstehung der Leukämie gibt und ob es einen Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf der Krankheit gibt (siehe Abschnitt 2.3 und 2.4).

In zwei weiteren Studien wurde der Frage nachgegangen, wie leukämische bzw. präleukämische Zellen der Erkennung durch NK-Zellen entkommen. Zum einen wurde dazu die Expression *HLA*-Klasse I-kodierter NK-Zell-Liganden auf den Lymphozyten (vor allem auf den darin enthaltenen leukämischen Blasten) pädiatrischer ALL-Patienten untersucht (siehe Abschnitt 2.5). Zum anderen wurden umfangreiche phänotypische und funktionale Charakterisierungen der NK-Zellen von MDS-Patienten durchgeführt und mit gesunden Personen verglichen (siehe Abschnitt 2.6).

Die Ermittlung von Risikofaktoren und *Immunescape*-Mechanismen ist von hoher klinischer Relevanz, da dadurch Therapieansätze entsprechend verbessert, angepasst oder geändert werden können, wodurch die Überlebensraten bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen weiter gesteigert werden könnten.

2 Publikationen

2.1 Human KIR repertoires: shaped by genetic diversity and evolution

Manser AR, Weinhold S and Uhrberg M (2015), *Human KIR repertoires: shaped by genetic diversity and evolution. Immunological Reviews*, 267: 178–196. doi: 10.1111/imr.12316.

Diese Arbeit wurde in *Immunological Reviews* zum Thema „*Co-Evolution of lymphocyte Receptors with MHC class I*“ publiziert. © 2015 John Wiley & Sons Ltd. Die Genehmigung zum Abdruck der Publikation in dieser Dissertation wurde von *John Wiley & Sons Ltd.* eingeholt.

Impact Factor Immunological Reviews: 10,120

Eigene Mitwirkung an dieser Publikation:

- Auswertung verschiedener Studien
- Re-Analyse von >600 eigenen *KIR*-Genotypisierungen
- Entwicklung genetischer Modelle
- Anfertigung der Abbildungen und Tabellen inklusive der Verarbeitung entsprechender Rohdaten
- Schreiben des Manuskriptes

Im Rahmen dieses *Reviews* wurden, basierend auf verschiedenen Studien, die bekannten Faktoren zusammengefasst und diskutiert, die das humane *KIR*-Repertoire formen. Dabei wurden vor allem der *KIR*-Polymorphismus, das Vorhandensein von zwei *KIR*-Haplotypgruppen, das eigene HLA und die eigene immunologische Geschichte thematisiert. Auf der Basis bereits publizierter *KIR*-Haplotyp-Frequenzen wurde hierfür eine umfangreiche Matrix mit theoretisch zu erwartenden *KIR*-Genotyp-Frequenzen erstellt und zudem für jeden Genotyp die potentielle Größe des *KIR*-Repertoires der reifen NK-Zelle berechnet. Mehr als 600 selbst durchgeführte *KIR*-Genotypisierungen

wurden für diese Arbeit re-analysiert, Genotypfrequenzen kalkuliert und mit den theoretisch zu erwartenden Genotyp-Frequenzen verglichen.

Vorteile einzelner *KIR*-Gene und *KIR*-Haplotypen wurden herausgearbeitet und mit Studien zur Reproduktion verglichen. Es wurde der Frage nachgegangen, welche Gründe es gibt, dass die beiden *KIR*-Haplotypgruppen trotz Evolution und Selektionsdruck in verschiedenen zivilisierten und indigenen Populationen erhalten geblieben sind, und ob es vergleichbare Beobachtungen in anderen Spezies (Rhesusaffe, Schimpanse) gibt. Durch aufwendige Analysen genetischer, sowie durchflusszytometrischer Studien und dem Vergleich mit eigenen Datensätzen entstand ein neues Modell zur Komplexität des NK-Zell-Repertoires und dessen Bedeutung für eine effiziente Initialisierung der angeborenen Immunantworten.

2.2 Age-related changes in NK cell repertoires: impact on NK cell function and immune surveillance

Manser AR, Uhrberg M (2015) *Age-related changes in natural killer cell repertoires: impact on NK cell function and immune surveillance. Cancer Immunology Immunotherapy*. doi:10.1007/s00262-015-1750-0.

Diese Arbeit wurde als Teil der *Symposium-in-Writing*-Serie zum Thema „*Natural killer cells, ageing and cancer*“ in *Cancer Immunology, Immunotherapy* publiziert. © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015. Die Genehmigung zum Abdruck der Publikation in dieser Dissertation wurde vom Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015 eingeholt.

Impact Factor Cancer Immunology, Immunotherapy: 3,941

Eigene Mitwirkung an dieser Publikation:

- Auswertung verschiedener Studien
- Re-Analyse von publizierten, sowie unpublizierten laboreigenen durchflusszytometrischen Datensätzen
- Anfertigung der Abbildungen und Tabellen inklusive der Verarbeitung entsprechender Rohdaten
- Schreiben des Manuskriptes

In diesem *Review* wurden Veränderungen im Rahmen der Differenzierung und Alterung einer NK-Zelle diskutiert und welchen Einfluss dies auf eine korrekte Immunkontrolle durch NK-Zellen hat. Die phänotypischen Unterschiede zwischen verschiedenen NK-Subpopulationen, sowie deren Relevanz für die NK-Zell-Funktion wurden thematisiert und in einen Zusammenhang gebracht mit hämatologischen Erkrankungen.

Durch Re-Analyse der Primärdaten laboreigener früherer Studien konnte erstmals ein Profil der KIR und NKG2A Expression über die gesamte Lebensspanne erstellt werden (siehe *Figure 1*). Die Daten zeigen, dass es zu einer Transition von einem neonatalen NKG2A-dominierten zu einem adulten KIR-geprägten NK-Zell-Repertoire kommt. Auf der Basis dieser Daten, sowie verschiedener anderer alters-assoziierter Studien wurde

ein Modell der NK-Zell-Alterung entwickelt, in dem differenzierungs- und alterungsbedingte Effekte, sowie der Einfluss von Virus-Infektionen berücksichtigt werden (siehe *Figure 2*).

2.3 Lack of association between KIR genes and acute lymphoblastic leukemia in children

Babor F, Manser A, Schonberg K, Enczmann J, Borkhardt A, Meisel R, Uhrberg M (2012) Lack of association between KIR genes and acute lymphoblastic leukemia in children. *Blood* 120 (13):2770-2772. doi:10.1182/blood-2012-07-440495.

Diese Arbeit wurde in *Blood* publiziert. © *The American Society of Hematology*. Die Genehmigung zum Abdruck der Publikation in dieser Dissertation wurde von der *American Society of Hematology* eingeholt.

Impact Factor Blood: 10,452

Eigene Mitwirkung an dieser Publikation:

- Durchführung der *KIR*-Genotypisierungen der 204 gesunden Personen
- Auswertung aller *KIR*-Typisierungen
- Multifaktorielle Analyse der Assoziation von *KIR* und ALL
- Schreiben des Manuskripts

In einer 2011 erschienenen Studie von Almalte *et al.* gab es eine hochsignifikante Assoziation mit dem Fehlen stimulatorischer *KIR*-Gene und der Suszeptibilität einer pädiatrischen ALL in franco-kanadischen Kindern (Almalte, *et al* 2011). Basierend auf diesen Ergebnissen führten wir eine ähnliche Studie mit 218 pädiatrischen ALL-Patienten (185 B-ALL, 33 T-ALL) und 204 gesunden Spendern mit europäischer Ethnizität (ca. 92% deutsch) durch, die 2012 als „*letter to the editor*“ publiziert wurde. Anders als in der franco-kanadischen Studie analysierten wir jedoch nicht einzelne *KIR*-Gene isoliert voneinander, sondern verwendeten zwei verschiedene auf PCR-SSP (*polymerase chain reaction with sequence specific primers*) basierende Typisierungsprotokolle, bei denen sechs inhibitorische (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*) und sechs stimulatorische (*KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1*) *KIR*-Gene bestimmt werden. Diese *KIR*-Typisierung ermöglichte dabei die Bestimmung des *KIR*-Genotyps und der *KIR*-Haplotypen, was aufgrund der

starken Homologie und des Kopplungsungleichgewichts (*linkage disequilibrium*) einiger *KIR*-Gene die Typisierungsqualität und -Plausibilität erhöhte.

Die anschließenden Auswertungen und Analysen zeigten, dass in der von uns analysierten Kohorte weder auf Basis einzelner *KIR*-Gene noch im Zusammenhang mit verschiedenen Haplotyp-Konstellationen Risikofaktoren für eine kindliche ALL ermittelt werden konnten. Sowohl die Frequenzen der einzelnen *KIR*-Gene, als auch die Frequenzen der Haplotypen *AA*, *AB* und *BB* waren übereinstimmend in B-ALL, T-ALL und der Kontrollkohorte.

2.4 KIR ligand C2 is associated with increased susceptibility to childhood ALL and confers an elevated risk for late relapse

Babor F*, Manser AR*, Fischer JC, Scherenschlich N, Enczmann J, Chazara O, Moffett A, Borkhardt A, Meisel R, Uhrberg M (2014) *KIR ligand C2 is associated with increased susceptibility to childhood ALL and confers an elevated risk for late relapse. Blood 124 (14):2248-2251. doi:10.1182/blood-2014-05-572065.*

***gleichberechtigte Erstautoren**

Diese Arbeit wurde in *Blood* publiziert. © *The American Society of Hematology*. Die Genehmigung zum Abdruck der Publikation in dieser Dissertation wurde von der *American Society of Hematology* eingeholt.

Impact Factor Blood: 10,452

Eigene Mitwirkung an dieser Publikation:

- Durchführung und Auswertung der *KIR*-Allel-Subtypisierungen
- Durchführung und Auswertung der Experimente zur Bestimmung der Kopienzahl der *KIR*-Gene
- Durchführung und Auswertung der durchflusszytometrischen Experimente
- Auswertung der *HLA*-Typisierungen und Bestimmung des NK-Zell-Liganden
- Statistische Analysen
- Schreiben des Manuskripts
- Bearbeitung der Gutachter-Kommentare

In dieser Studie beschäftigten wir uns mit möglichen Risikofaktoren einer ALL innerhalb des *HLA*-Systems. Dazu wurden mit einer 320 Individuen umfassenden pädiatrischen ALL-Kohorte und einer 1515 Personen umfassenden Kontrollgruppe umfangreiche genetische Typisierungen durchgeführt. Dies umfasste die *HLA-B*- und *HLA-C*-Typisierung inklusive Bestimmung des Bw4/Bw6-Epitops und des C1/C2-Epitops, die *KIR2DL1*-Allelsubtypisierung und die Bestimmung der Kopienzahl von *KIR2DL1* und *KIR2DS1*. Dabei stellte sich der *KIR*-Ligand *HLA-C2* als Risikofaktor heraus, da seine

Frequenz in der Patientenkohorte signifikant erhöht war. Die anschließende Korrelation des klinischen Verlaufs der Krankheit und der *HLA-C*-Epitope ergab, dass Patienten mit steigender Zahl an *C2*-Epitopen ein signifikant höheres Risiko besaßen, nach beendeter Therapie (2,5 Jahre nach Diagnose) ein Rezidiv zu bekommen.

Durch die hohe *HLA-C2*-Frequenz rückten die *C2*-spezifischen *KIR KIR2DL1* und *KIR2DS1* in den Vordergrund. Nähere Analysen der Kopienzahl und der Allelfrequenzen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Kohorten.

Die Identifizierung von *HLA-C2* als neuen Risikofaktor für ein Rezidiv ist von besonderer klinischer Relevanz. Patienten, die das *C2*-Epitop besitzen, könnten entsprechend länger therapiert oder engermaschiger kontrolliert werden, um das Auftreten eines Rezidivs zu verhindern und die Überlebensrate zu verbessern.

2.5 Selective downregulation of HLA-C and HLA-E in childhood acute lymphoblastic leukaemia

Reusing SB, Manser AR, Enczmann J, Mulder A, Claas FH, Carrington M, Fischer JC, Borkhardt A, Babor F and Uhrberg M (2015), *Selective downregulation of HLA-C and HLA-E in childhood acute lymphoblastic leukaemia. British Journal of Haematology*. doi: 10.1111/bjh.13777.

Diese Arbeit wurde im *British Journal of Haematology* publiziert. © 2015 John Wiley & Sons Ltd. Die Genehmigung zum Abdruck der Publikation in dieser Dissertation wurde von *John Wiley & Sons Ltd* eingeholt.

Impact Factor British Journal of Haematology: 4,711

Eigene Mitwirkung an dieser Publikation:

- Etablierung durchflusszytometrischer Protokolle
- Datenanalyse
- Schreiben des Manuskriptes

In dieser Studie wurde die Expression der KIR-Liganden HLA-B, HLA-C und HLA-E auf Lymphozyten sowohl durchflusszytometrisch als auch molekularbiologisch auf Transkriptionsebene überprüft.

Dabei zeigte sich im Vergleich von 31 neu-diagnostizierten B-ALL-Patienten zu 32 gesunden Spendern, dass die CD19⁺ Lymphozyten der Patienten eine signifikant geringere Expression von HLA-C und HLA-E auf ihrer Oberfläche besaßen, während die Gesamt-HLA-Klasse I-Expression (panHLA-Klasse I) und die Expression von HLA-Bw4 und -Bw6 vergleichbar waren. Diese Verringerung von HLA-C und HLA-E beschränkte sich auf CD45⁻ leukämischen Blasten, die Expression von HLA-C und -E auf den nicht-leukämischen CD45⁺ B-Zellen der Patienten waren vergleichbar zur Kontrolle-Kohorte. Übereinstimmend dazu war die Expression auf Transkriptionsebene in leukämischen CD34⁻ CD19⁺ Blasten verringert, während sie in nicht-leukämischen CD34⁻ CD19⁺ B-Zellen vergleichbar mit der Expression auf B-Zellen gesunder Spender waren.

Untersuchungen der NK-Zell-Aktivität zeigten, dass spezifische NK-Zellen von gesunden Personen trotz dieser „*missing-self*“-Situation nicht in der Lage waren zu degranulieren, was das Vorhandensein weiterer Immunevasions-Mechanismen vermuten lässt.

2.6 Impaired cytotoxicity associated with defective natural killer cell differentiation in myelodysplastic syndromes

Hejazi M, Manser AR, Frobel J, Kundgen A, Zhao X, Schonberg K, Germing U, Haas R, Gattermann N, Uhrberg M (2015) *Impaired cytotoxicity associated with defective natural killer cell differentiation in myelodysplastic syndromes. Haematologica* 100 (5):643-652. doi:10.3324/haematol.2014.118679.

Diese Arbeit wurde in *Haematologica* publiziert. © 2015 Ferrata Storti Foundation. Die Genehmigung zum Abdruck der Publikation in dieser Dissertation wurde von der Ferrata Storti Foundation eingeholt.

Impact Factor Haematologica: 5,814

Eigene Mitwirkung an dieser Publikation:

- Datenanalyse
- Schreiben des Manuskriptes

Im Rahmen dieser Studie wurden der Phänotyp und die Funktion der NK-Zellen von 75 neu diagnostizierten MDS-Patienten durchflusszytometrisch analysiert und mit denen gesunder Personen gleichen Alters verglichen. Diverse strukturelle und funktionale Unterschiede/Defekte wurden beobachtet: Die Patienten wiesen eine signifikant verringerte NK-Zell-Zahl auf, die mit der Krankheitsprognose korrelierte, sowie eine Verschiebung innerhalb der NK-Zell-Population zu unreifen CD56^{bright} NK-Zellen. Analysen der NK-Zell-Subpopulationen und Messungen der Apoptoserate zeigten, dass in den Patienten die CD56^{dim} NK-Zell-Zahl signifikant verringert war, was jedoch nicht in einer höheren Apoptoserate dieser Zellen begründet war. Des Weiteren war auch das KIR-Repertoire der wenigen reifen CD56^{dim} NK-Zellen in den MDS-Patienten zu einem unreiferen Phänotyp verschoben.

Funktional waren die NK-Zellen trotz vergleichbarer Degranulation kaum in der Lage Zielzellen, die als fremd erkannt werden müssten, zu eliminieren. In weiteren Experimenten zeigte sich, dass dies an einer signifikanten Reduktion von Perforin und

Granzym B in den lysosomalen Granula lag. Diese zytotoxische Defizienz konnte durch Langzeit-Stimulation mit IL-2 aufgehoben werden, was einen wirksamen therapeutischen Ansatz für diese Patienten darstellen könnte.

3 Literatur

- Almalte, Z., Samarani, S., Iannello, A., Debbeche, O., Duval, M., Infante-Rivard, C., Amre, D.K., Sinnett, D. & Ahmad, A. (2011) Novel associations between activating killer-cell immunoglobulin-like receptor genes and childhood leukemia. *Blood*, **118**, 1323-1328.
- Almeida-Oliveira, A., Smith-Carvalho, M., Porto, L.C., Cardoso-Oliveira, J., Ribeiro Ados, S., Falcao, R.R., Abdelhay, E., Bouzas, L.F., Thuler, L.C., Ornellas, M.H. & Diamond, H.R. (2011) Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. *Hum Immunol*, **72**, 319-329.
- Andersson, S., Fauriat, C., Malmberg, J.A., Ljunggren, H.G. & Malmberg, K.J. (2009) KIR acquisition probabilities are independent of self-HLA class I ligands and increase with cellular KIR expression. *Blood*, **114**, 95-104.
- Anfossi, N., Andre, P., Guia, S., Falk, C.S., Roetynck, S., Stewart, C.A., Bresó, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., Romagne, F., Ugolini, S. & Vivier, E. (2006) Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*, **25**, 331-342.
- Arm, J.P., Nwankwo, C. & Austen, K.F. (1997) Molecular identification of a novel family of human Ig superfamily members that possess immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs and homology to the mouse gp49B1 inhibitory receptor. *J Immunol*, **159**, 2342-2349.
- Arnon, T.I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., Porgador, A., Honigman, A., Plachter, B., Mevorach, D., Wolf, D.G. & Mandelboim, O. (2005) Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol*, **6**, 515-523.
- Arnon, T.I., Lev, M., Katz, G., Chernobrov, Y., Porgador, A. & Mandelboim, O. (2001) Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol*, **31**, 2680-2689.
- Babor, F., Manser, A., Schonberg, K., Enczmann, J., Borkhardt, A., Meisel, R. & Uhrberg, M. (2012) Lack of association between KIR genes and acute lymphoblastic leukemia in children. *Blood*, **120**, 2770-2772; author reply 2772.
- Babor, F., Manser, A.R., Fischer, J.C., Scherenschlich, N., Enczmann, J., Chazara, O., Moffett, A., Borkhardt, A., Meisel, R. & Uhrberg, M. (2014) KIR ligand C2 is associated with increased susceptibility to childhood ALL and confers an elevated risk for late relapse. *Blood*, **124**, 2248-2251.
- Bari, R., Bell, T., Leung, W.H., Vong, Q.P., Chan, W.K., Das Gupta, N., Holladay, M., Rooney, B. & Leung, W. (2009) Significant functional heterogeneity among KIR2DL1 alleles and a pivotal role of arginine 245. *Blood*, **114**, 5182-5190.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L. & Spies, T. (1999) Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, **285**, 727-729.

- Beziat, V., Dalgard, O., Asselah, T., Halfon, P., Bedossa, P., Boudifa, A., Hervier, B., Theodorou, I., Martinot, M., Debre, P., Bjorkstrom, N.K., Malmberg, K.J., Marcellin, P. & Vieillard, V. (2012) CMV drives clonal expansion of NKG2C+ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. *Eur J Immunol*, **42**, 447-457.
- Beziat, V., Descours, B., Parizot, C., Debre, P. & Vieillard, V. (2010) NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. *PLoS One*, **5**, e11966.
- Beziat, V., Liu, L.L., Malmberg, J.A., Ivarsson, M.A., Sohlberg, E., Bjorklund, A.T., Retiere, C., Sverreremark-Ekstrom, E., Traherne, J., Ljungman, P., Schaffer, M., Price, D.A., Trowsdale, J., Michaelsson, J., Ljunggren, H.G. & Malmberg, K.J. (2013) NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood*, **121**, 2678-2688.
- Biassoni, R., Pessino, A., Malaspina, A., Cantoni, C., Bottino, C., Sivori, S., Moretta, L. & Moretta, A. (1997) Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50.1 and p58.1 receptors for HLA-Cw4 molecules. *Eur J Immunol*, **27**, 3095-3099.
- Bjorkstrom, N.K., Lindgren, T., Stoltz, M., Fauriat, C., Braun, M., Evander, M., Michaelsson, J., Malmberg, K.J., Klingstrom, J., Ahlm, C. & Ljunggren, H.G. (2010a) Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. *J Exp Med*, **208**, 13-21.
- Bjorkstrom, N.K., Riese, P., Heuts, F., Andersson, S., Fauriat, C., Ivarsson, M.A., Bjorklund, A.T., Flodstrom-Tullberg, M., Michaelsson, J., Rottenberg, M.E., Guzman, C.A., Ljunggren, H.G. & Malmberg, K.J. (2010b) Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood*, **116**, 3853-3864.
- Bloushtain, N., Qimron, U., Bar-Ilan, A., Hershkovitz, O., Gazit, R., Fima, E., Korc, M., Vlodaysky, I., Bovin, N.V. & Porgador, A. (2004) Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46. *J Immunol*, **173**, 2392-2401.
- Borges, L., Hsu, M.L., Fanger, N., Kubin, M. & Cosman, D. (1997) A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules. *J Immunol*, **159**, 5192-5196.
- Borrego, F., Kabat, J., Kim, D.K., Lieto, L., Maasho, K., Pena, J., Solana, R. & Coligan, J.E. (2002) Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol*, **38**, 637-660.
- 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 signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med*, **187**, 813-818.

- Brandt, C.S., Baratin, M., Yi, E.C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C.D., Kaifu, T., Chabannon, C., Moretta, A., West, R., Xu, W., Vivier, E. & Levin, S.D. (2009) The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med*, **206**, 1495-1503.
- Braud, V.M., Allan, D.S., O'Callaghan, C.A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G.S., Lazetic, S., Young, N.T., Bell, J.I., Phillips, J.H., Lanier, L.L. & McMichael, A.J. (1998) HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*, **391**, 795-799.
- Brenchley, J.M., Karandikar, N.J., Betts, M.R., Ambrozak, D.R., Hill, B.J., Crotty, L.E., Casazza, J.P., Kuruppu, J., Migueles, S.A., Connors, M., Roederer, M., Douek, D.C. & Koup, R.A. (2003) Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood*, **101**, 2711-2720.
- Brenner, M.B., Trowbridge, I.S. & Strominger, J.L. (1985) Cross-linking of human T cell receptor proteins: association between the T cell idiotype beta subunit and the T3 glycoprotein heavy subunit. *Cell*, **40**, 183-190.
- Brusilovsky, M., Cordoba, M., Rosental, B., Hershkovitz, O., Andrade, M.D., Pecherskaya, A., Einarson, M.B., Zhou, Y., Braiman, A., Campbell, K.S. & 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*, **191**, 5256-5267.
- Campos, C., Pera, A., Sanchez-Correa, B., Alonso, C., Lopez-Fernandez, I., Morgado, S., Tarazona, R. & Solana, R. (2014) Effect of age and CMV on NK cell subpopulations. *Exp Gerontol*, **54**, 130-137.
- Carlsten, M., Baumann, B.C., Simonsson, M., Jadersten, M., Forsblom, A.M., Hammarstedt, C., Bryceson, Y.T., Ljunggren, H.G., Hellstrom-Lindberg, E. & Malmberg, K.J. (2010) Reduced DNAM-1 expression on bone marrow NK cells associated with impaired killing of CD34+ blasts in myelodysplastic syndrome. *Leukemia*, **24**, 1607-1616.
- Carr, W.H., Rosen, D.B., Arase, H., Nixon, D.F., Michaelsson, J. & Lanier, L.L. (2007) Cutting Edge: KIR3DS1, a gene implicated in resistance to progression to AIDS, encodes a DAP12-associated receptor expressed on NK cells that triggers NK cell activation. *J Immunol*, **178**, 647-651.
- Carretero, M., Cantoni, C., Bellón, T., Bottino, C., Biassoni, R., Rodríguez, A., Pérez-Villar, J.J., Moretta, L., Moretta, A. & López-Botet, M. (1997) The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *European Journal of Immunology*, **27**, 563-567.
- Cella, M., Dohring, C., Samaridis, J., Dessing, M., Brockhaus, M., Lanzavecchia, A. & Colonna, M. (1997) A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing. *J Exp Med*, **185**, 1743-1751.
- Cella, M., Longo, A., Ferrara, G.B., Strominger, J.L. & Colonna, M. (1994) NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4- positive HLA alleles with isoleucine 80. *J Exp Med*, **180**, 1235-1242.

- Chan, A., Hong, D.L., Atzberger, A., Kollnberger, S., Filer, A.D., Buckley, C.D., McMichael, A., Enver, T. & Bowness, P. (2007) CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol*, **179**, 89-94.
- Chan, H.W., Kurago, Z.B., Stewart, C.A., Wilson, M.J., Martin, M.P., Mace, B.E., Carrington, M., Trowsdale, J. & Lutz, C.T. (2003) DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. *J Exp Med*, **197**, 245-255.
- Chang, C., Rodríguez, A., Carretero, M., López-Botet, M., Phillips, J.H. & Lanier, L.L. (1995) Molecular characterization of human CD94: A type II membrane glycoprotein related to the C-type lectin superfamily. *European Journal of Immunology*, **25**, 2433-2437.
- Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M.C., Zenteno, E., Chavez, R. & Lascurain, R. (2009) Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol*, **6**, 15-25.
- Chidrawar, S.M., Khan, N., Chan, Y.L., Nayak, L. & Moss, P.A. (2006) Ageing is associated with a decline in peripheral blood CD56bright NK cells. *Immun Ageing*, **3**, 10.
- Cicone, E., Pende, D., Viale, O., Di Donato, C., Tripodi, G., Orengo, A.M., Guardiola, J., Moretta, A. & Moretta, L. (1992) Evidence of a natural killer (NK) cell repertoire for (allo) antigen recognition: definition of five distinct NK-determined allospecificities in humans. *J Exp Med*, **175**, 709-718.
- Colonna, M., Nakajima, H., Navarro, F. & Lopez-Botet, M. (1999) A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *J Leukoc Biol*, **66**, 375-381.
- Colonna, M., Navarro, F., Bellon, T., Llano, M., Garcia, P., Samaridis, J., Angman, L., Cella, M. & Lopez-Botet, M. (1997) A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med*, **186**, 1809-1818.
- Colonna, M., Samaridis, J., Cella, M., Angman, L., Allen, R.L., O'Callaghan, C.A., Dunbar, R., Ogg, G.S., Cerundolo, V. & Rolink, A. (1998) Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. *J Immunol*, **160**, 3096-3100.
- Cooley, S., Trachtenberg, E., Bergemann, T.L., Saeteurn, K., Klein, J., Le, C.T., Marsh, S.G., Guethlein, L.A., Parham, P., Miller, J.S. & Weisdorf, D.J. (2009) Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*, **113**, 726-732.
- Cooley, S., Weisdorf, D.J., Guethlein, L.A., Klein, J.P., Wang, T., Le, C.T., Marsh, S.G., Geraghty, D., Spellman, S., Haagenson, M.D., Ladner, M., Trachtenberg, E., Parham, P. & Miller, J.S. (2010) Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*, **116**, 2411-2419.
- Cooley, S., Weisdorf, D.J., Guethlein, L.A., Klein, J.P., Wang, T., Marsh, S.G., Spellman, S., Haagenson, M.D., Saeteurn, K., Ladner, M., Trachtenberg, E., Parham, P. & Miller, J.S. (2014) Donor

- killer cell Ig-like receptor B haplotypes, recipient HLA-C1, and HLA-C mismatch enhance the clinical benefit of unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *J Immunol*, **192**, 4592-4600.
- Cooley, S., Xiao, F., Pitt, M., Gleason, M., McCullar, V., Bergemann, T.L., McQueen, K.L., Guethlein, L.A., Parham, P. & Miller, J.S. (2007) A subpopulation of human peripheral blood NK cells that lacks inhibitory receptors for self-MHC is developmentally immature. *Blood*, **110**, 578-586.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A. & Caligiuri, M.A. (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, **22**, 633-640.
- Cosman, D., Fanger, N. & Borges, L. (1999) Human cytomegalovirus, MHC class I and inhibitory signalling receptors: more questions than answers. *Immunol Rev*, **168**, 177-185.
- Cosman, D., Fanger, N., Borges, L., Kubin, M., Chin, W., Peterson, L. & Hsu, M.L. (1997) A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity*, **7**, 273-282.
- Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M. & Chalupny, N.J. (2001) ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*, **14**, 123-133.
- Cullen, S.P. & Martin, S.J. (2008) Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ.*, **15**, 251-262.
- D'Andrea, A., Chang, C., Franz-Bacon, K., McClanahan, T., Phillips, J. & Lanier, L. (1995) Molecular cloning of NKB1. A natural killer cell receptor for HLA-B allotypes. *J Immunol.*, **155**, 2306-2310.
- David, G., Djaoud, Z., Willem, C., Legrand, N., Rettman, P., Gagne, K., Cesbron, A. & Retiere, C. (2013) Large spectrum of HLA-C recognition by killer Ig-like receptor (KIR)2DL2 and KIR2DL3 and restricted C1 SPECIFICITY of KIR2DS2: dominant impact of KIR2DL2/KIR2DS2 on KIR2D NK cell repertoire formation. *J Immunol*, **191**, 4778-4788.
- de Smith, A.J., Walsh, K.M., Ladner, M.B., Zhang, S., Xiao, C., Cohen, F., Moore, T.B., Chokkalingam, A.P., Metayer, C., Buffler, P.A., Trachtenberg, E.A. & Wiemels, J.L. (2014) The role of KIR genes and their cognate HLA class I ligands in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **123**, 2497-2503.
- Demant, C., Mulder, A., Deneys, V., Worsham, M.J., Maes, P., Claas, F.H. & Ferrone, S. (2004) Down-regulation of HLA-A and HLA-Bw6, but not HLA-Bw4, allospecificities in leukemic cells: an escape mechanism from CTL and NK attack? *Blood*, **103**, 3122-3130.
- Dohring, C., Scheidegger, D., Samaridis, J., Cella, M. & Colonna, M. (1996) A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J Immunol.*, **156**, 3098-3101.

- Dunphy, S.E., Guinan, K.J., Chorcora, C.N., Jayaraman, J., Traherne, J.A., Trowsdale, J., Pende, D., Middleton, D. & Gardiner, C.M. (2015) 2DL1, 2DL2 and 2DL3 all contribute to KIR phenotype variability on human NK cells. *Genes Immun*, **16**, 301-310.
- Epling-Burnette, P.K., Bai, F., Painter, J.S., Rollison, D.E., Salih, H.R., Krusch, M., Zou, J., Ku, E., Zhong, B., Boulware, D., Moscinski, L., Wei, S., Djeu, J.Y. & List, A.F. (2007) Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors. *Blood*, **109**, 4816-4824.
- Fanger, N.A., Borges, L. & Cosman, D. (1999) The leukocyte immunoglobulin-like receptors (LIRs): a new family of immune regulators. *J Leukoc Biol*, **66**, 231-236.
- Fanger, N.A., Cosman, D., Peterson, L., Braddy, S.C., Maliszewski, C.R. & Borges, L. (1998) The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor-mediated signaling in monocytes. *Eur J Immunol*, **28**, 3423-3434.
- Faure, M.a.L., EO (2002) KIR2DL4 (CD158d), an NK Cell-Activating Receptor with Inhibitory Potential. *J Immunol.*, **168**, 6208-6214.
- Ferlazzo, G., Tsang, M.L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R.M. & Munz, C. (2002) Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med*, **195**, 343-351.
- Fernandez, N.C., Treiner, E., Vance, R.E., Jamieson, A.M., Lemieux, S. & Raulet, D.H. (2005) A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood*, **105**, 4416-4423.
- Fischer, J.C., Ottinger, H., Ferencik, S., Sribar, M., Punzel, M., Beelen, D.W., Schwan, M.A., Grosse-Wilde, H., Wernet, P. & Uhrberg, M. (2007) Relevance of C1 and C2 epitopes for hemopoietic stem cell transplantation: role for sequential acquisition of HLA-C-specific inhibitory killer Ig-like receptor. *J Immunol*, **178**, 3918-3923.
- Frazier, W.R., Steiner, N., Hou, L., Dakshanamurthy, S. & Hurley, C.K. (2013) Allelic variation in KIR2DL3 generates a KIR2DL2-like receptor with increased binding to its HLA-C ligand. *J Immunol*, **190**, 6198-6208.
- Gardiner, C., Guethlein, L., Shilling, H., Pando, M., Carr, W., Rajalingam, R., Vilches, C. & Parham, P. (2001) Different NK Cell Surface Phenotypes Defined by the DX9 Antibody Are Due to KIR3DL1 Gene Polymorphism. *J Immunol.*, **166**, 2992-3001.
- Genetex Literature Stem Cell Development.
<http://www.genetex.com/web/Literature2/Literature2ResearchType.aspx>.
- Geraghty, D.E., Stockschleider, M., Ishitani, A. & Hansen, J.A. (1992) Polymorphism at the HLA-E locus predates most HLA-A and -B polymorphism. *Hum Immunol*, **33**, 174-184.
- Giebel, S., Locatelli, F., Lamparelli, T., Velardi, A., Davies, S., Frumento, G., Maccario, R., Bonetti, F., Wojnar, J., Martinetti, M., Frassoni, F., Giorgiani, G., Bacigalupo, A. & Holowiecki, J. (2003)

- Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood*, **102**, 814-819.
- Giebel, S., Locatelli, F., Wojnar, J., Velardi, A., Mina, T., Giorgiani, G., Krawczyk-Kulis, M., Markiewicz, M., Wylezol, I. & Holowiecki, J. (2005) Homozygosity for human leucocyte antigen-C ligands of KIR2DL1 is associated with increased risk of relapse after human leucocyte antigen-C-matched unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*, **131**, 483-486.
- Gonzalez-Galarza, F.F., Takeshita, L.Y., Santos, E.J., Kempson, F., Maia, M.H., da Silva, A.L., Teles e Silva, A.L., Ghattaoraya, G.S., Alfirevic, A., Jones, A.R. & Middleton, D. (2015) Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. *Nucleic Acids Res*, **43**, D784-788.
- Goodridge, J.P., Burian, A., Lee, N. & Geraghty, D.E. (2013) HLA-F and MHC class I open conformers are ligands for NK cell Ig-like receptors. *J Immunol*, **191**, 3553-3562.
- Graef, T., Moesta, A.K., Norman, P.J., Abi-Rached, L., Vago, L., Older Aguilar, A.M., Gleimer, M., Hammond, J.A., Guethlein, L.A., Bushnell, D.A., Robinson, P.J. & Parham, P. (2009) KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced specificity for HLA-A*11 while diminishing avidity for HLA-C. *J Exp Med*, **206**, 2557-2572.
- Guma, M., Angulo, A., Vilches, C., Gomez-Lozano, N., Malats, N. & Lopez-Botet, M. (2004) Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood*, **104**, 3664-3671.
- Guma, M., Cabrera, C., Erkizia, I., Bofill, M., Clotet, B., Ruiz, L. & Lopez-Botet, M. (2006) Human cytomegalovirus infection is associated with increased proportions of NK cells that express the CD94/NKG2C receptor in aviremic HIV-1-positive patients. *J Infect Dis*, **194**, 38-41.
- Gumperz, J., Litwin, V., Phillips, J., Lanier, L. & 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. & Tyan, D. (1996) Heterogeneous phenotypes of expression of the NKB1 natural killer cell class I receptor among individuals of different human histocompatibility leukocyte antigens types appear genetically regulated, but not linked to major histocompatibility complex haplotype. *J Exp Med*, **183**, 1817-1827.
- Hanna, J., Goldman-Wohl, D., Hamani, Y., Avraham, I., Greenfield, C., Natanson-Yaron, S., Prus, D., Cohen-Daniel, L., Arnon, T.I., Manaster, I., Gazit, R., Yutkin, V., Benharroch, D., Porgador, A., Keshet, E., Yagel, S. & Mandelboim, O. (2006) Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med*, **12**, 1065-1074.
- Harrison, D., Phillips, J.H. & Lanier, L.L. (1991) Involvement of a metalloprotease in spontaneous and phorbol ester-induced release of natural killer cell-associated Fc gamma RIII (CD16-II). *J Immunol*, **147**, 3459-3465.

- Hazeldine, J., Hampson, P. & Lord, J.M. (2012) Reduced release and binding of perforin at the immunological synapse underlies the age-related decline in natural killer cell cytotoxicity. *Aging Cell*, **11**, 751-759.
- Held, W., Dorfman, J.R., Wu, M.F. & Raulet, D.H. (1996) Major histocompatibility complex class I-dependent skewing of the natural killer cell Ly49 receptor repertoire. *Eur J Immunol*, **26**, 2286-2292.
- Herberman, R.B., Nunn, M.E., Holden, H.T. & Lavrin, D.H. (1975) Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer*, **16**, 230-239.
- Hercend, T., Griffin, J.D., Bensussan, A., Schmidt, R.E., Edson, M.A., Brennan, A., Murray, C., Daley, J.F., Schlossman, S.F. & Ritz, J. (1985) Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone. Characterization of two natural killer-associated antigens, NKH1A and NKH2, expressed on subsets of large granular lymphocytes. *J Clin Invest*, **75**, 932-943.
- Hershkovitz, O., Jivov, S., Bloushtain, N., Zilka, A., Landau, G., Bar-Ilan, A., Lichtenstein, R.G., Campbell, K.S., van Kuppevelt, T.H. & Porgador, A. (2007) Characterization of the recognition of tumor cells by the natural cytotoxicity receptor, NKp44. *Biochemistry*, **46**, 7426-7436.
- Hiby, S.E., Apps, R., Sharkey, A.M., Farrell, L.E., Gardner, L., Mulder, A., Claas, F.H., Walker, J.J., Redman, C.W., Morgan, L., Tower, C., Regan, L., Moore, G.E., Carrington, M. & Moffett, A. (2010) Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J Clin Invest*, **120**, 4102-4110.
- Hiby, S.E., Regan, L., Lo, W., Farrell, L., Carrington, M. & Moffett, A. (2008) Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. *Hum Reprod*, **23**, 972-976.
- Hiby, S.E., Walker, J.J., O'Shaughnessy, K. M., Redman, C.W., Carrington, M., Trowsdale, J. & Moffett, A. (2004) Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med*, **200**, 957-965.
- Hou, L., Chen, M., Ng, J. & Hurley, C.K. (2012) Conserved KIR allele-level haplotypes are altered by microvariation in individuals with European ancestry. *Genes Immun*, **13**, 47-58.
- Houchins, J.P., Yabe, T., McSherry, C. & 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**, 1017-1020.
- Hsu, K., Liu, X., Selvakumar, A., Mickelson, E., O'Reilly, R. & Dupont, B. (2002) Killer Ig-Like Receptor Haplotype Analysis by Gene Content: Evidence for Genomic Diversity with a Minimum of Six Basic Framework Haplotypes, Each with Multiple Subsets. *J Immunol*, **169**, 5118-5129.

- Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., Sykora, K. & Schmidt, R. (2001) CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol*, **31**, 3121-3126.
- Jarahian, M., Fiedler, M., Cohnen, A., Djandji, D., Hammerling, G.J., Gati, C., Cerwenka, A., Turner, P.C., Moyer, R.W., Watzl, C., Hengel, H. & Momburg, F. (2011) Modulation of NKp30- and NKp46-mediated natural killer cell responses by poxviral hemagglutinin. *PLoS Pathog*, **7**, e1002195.
- Jarahian, M., Watzl, C., Fournier, P., Arnold, A., Djandji, D., Zahedi, S., Cerwenka, A., Paschen, A., Schirmacher, V. & Momburg, F. (2009) Activation of natural killer cells by newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase. *J Virol*, **83**, 8108-8121.
- Kärre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G. & Kiessling, R. (1986) Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*, **319**, 675-678.
- Khakoo, S.I., Thio, C.L., Martin, M.P., Brooks, C.R., Gao, X., Astemborski, J., Cheng, J., Goedert, J.J., Vlahov, D., Hilgartner, M., Cox, S., Little, A.M., Alexander, G.J., Cramp, M.E., O'Brien, S.J., Rosenberg, W.M., Thomas, D.L. & Carrington, M. (2004) HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science*, **305**, 872-874.
- Kiessling, R., Klein, E., Pross, H. & 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. & 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., Yusa, S., Catina, T.L. & Campbell, K.S. (2003) KIR2DL4 is an IL-2-regulated NK cell receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN-gamma production. *J Immunol*, **171**, 3415-3425.
- Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S.M., Lybarger, L., Song, Y.J., Yang, L., French, A.R., Sunwoo, J.B., Lemieux, S., Hansen, T.H. & Yokoyama, W.M. (2005) Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*, **436**, 709-713.
- King, A., Boocock, C., Sharkey, A.M., Gardner, L., Beretta, A., Siccardi, A.G. & Loke, Y.W. (1996) Evidence for the expression of HLA-A-C class I mRNA and protein by human first trimester trophoblast. *J Immunol*, **156**, 2068-2076.
- Kung, P., Goldstein, G., Reinherz, E.L. & Schlossman, S.F. (1979) Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science*, **206**, 347-349.
- Lanier, L.L., Corliss, B., Wu, J. & Phillips, J.H. (1998a) Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity*, **8**, 693-701.
- Lanier, L.L., Corliss, B.C., Wu, J., Leong, C. & Phillips, J.H. (1998b) Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature*, **391**, 703-707.

-
- Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.I., Loken, M.R. & Phillips, J.H. (1986) The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*, **136**, 4480-4486.
- Lanier, L.L., Testi, R., Bindl, J. & Phillips, J.H. (1989) Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med*, **169**, 2233-2238.
- Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J.P., Lanier, L.L. & Phillips, J.H. (1996) Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol*, **157**, 4741-4745.
- Le Garff-Tavernier, M., Beziat, V., Decocq, J., Siguret, V., Gandjbakhch, F., Pautas, E., Debre, P., Merle-Beral, H. & Vieillard, V. (2010) Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell*, **9**, 527-535.
- Le Page, M.E., Goodridge, J.P., John, E., Christiansen, F.T. & Witt, C.S. (2014) Killer Ig-like receptor 2DL4 does not mediate NK cell IFN-gamma responses to soluble HLA-G preparations. *J Immunol*, **192**, 732-740.
- Lee, N., Goodlett, D.R., Ishitani, A., Marquardt, H. & Geraghty, D.E. (1998a) HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J Immunol*, **160**, 4951-4960.
- Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Ishitani, A., Navarro, F., Lopez-Botet, M. & Geraghty, D.E. (1998b) HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5199-5204.
- Lehmann, C., Zeis, M., Schmitz, N. & Uharek, L. (2000) Impaired binding of perforin on the surface of tumor cells is a cause of target cell resistance against cytotoxic effector cells. *Blood*, **96**, 594-600.
- Li, P., Morris, D.L., Willcox, B.E., Steinle, A., Spies, T. & Strong, R.K. (2001) Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat Immunol*, **2**, 443-451.
- Lieberman, J. (2003) The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol*, **3**, 361-370.
- Liu, J., Xiao, Z., Ko, H.L., Shen, M. & Ren, E.C. (2014) Activating killer cell immunoglobulin-like receptor 2DS2 binds to HLA-A*11. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**, 2662-2667.
- Ljunggren, H.G. & Karre, K. (1990) In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*, **11**, 237-244.
- Lopez-Vazquez, A., Rodrigo, L., Martinez-Borra, J., Perez, R., Rodriguez, M., Fdez-Morera, J.L., Fuentes, D., Rodriguez-Rodero, S., Gonzalez, S. & Lopez-Larrea, C. (2005) Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the killer cell immunoglobulin-like receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. *J Infect Dis*, **192**, 162-165.
-

-
- Lord, S.J., Rajotte, R.V., Korbitt, G.S. & Bleackley, R.C. (2003) Granzyme B: a natural born killer. *Immunol Rev.*, **193**, 31-38.
- Luetke-Eversloh, M., Killig, M. & Romagnani, C. (2013) Signatures of human NK cell development and terminal differentiation. *Front Immunol*, **4**, 499.
- Lutz, C.T., Karapetyan, A., Al-Attar, A., Shelton, B.J., Holt, K.J., Tucker, J.H. & Presnell, S.R. (2011) Human NK cells proliferate and die in vivo more rapidly than T cells in healthy young and elderly adults. *J Immunol*, **186**, 4590-4598.
- Lutz, C.T., Moore, M.B., Bradley, S., Shelton, B.J. & Lutgendorf, S.K. (2005) Reciprocal age related change in natural killer cell receptors for MHC class I. *Mech Ageing Dev*, **126**, 722-731.
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T.I., Bushkin, Y., Davis, D.M., Strominger, J.L., Yewdell, J.W. & Porgador, A. (2001) Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature*, **409**, 1055-1060.
- Manser, A.R., Weinhold, S. & Uhrberg, M. (2015) Human KIR repertoires: shaped by genetic diversity and evolution. *Immunol Rev*, **267**, 178-196.
- Marsh, S., Parham, P., Dupont, B., Geraghty, D., Trowsdale, J., Middleton, D., Vilches, C., Carrington, M., Witt, C., Guethlein, L., Shilling, H., Garcia, C., Hsu, K. & Wain, H. (2003) Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Immunogenetics*, **55**, 220-226.
- Martin, M.P., Gao, X., Lee, J.H., Nelson, G.W., Detels, R., Goedert, J.J., Buchbinder, S., Hoots, K., Vlahov, D., Trowsdale, J., Wilson, M., O'Brien, S.J. & Carrington, M. (2002) Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet*, **31**, 429-434.
- Maxwell, L.D., Wallace, A., Middleton, D. & Curran, M.D. (2002) A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. *Tissue Antigens*, **60**, 254-258.
- McCullar, V., Oostendorp, R., Panoskaltis-Mortari, A., Yun, G., Lutz, C.T., Wagner, J.E. & Miller, J.S. (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*, **36**, 598-608.
- Miller, J.S., Cooley, S., Parham, P., Farag, S.S., Verneris, M.R., McQueen, K.L., Guethlein, L.A., Trachtenberg, E.A., Haagenson, M., Horowitz, M.M., Klein, J.P. & Weisdorf, D.J. (2007) Missing KIR ligands are associated with less relapse and increased graft-versus-host disease (GVHD) following unrelated donor allogeneic HCT. *Blood.*, **109**, 5058-5061.
- Moesta, A.K., Norman, P.J., Yawata, M., Yawata, N., Gleimer, M. & Parham, P. (2008) Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J Immunol*, **180**, 3969-3979.
- Moffett-King, A. (2002) Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol*, **2**, 656-663.
-

- Moradi, S., Berry, R., Pymm, P., Hitchen, C., Beckham, S.A., Wilce, M.C., Walpole, N.G., Clements, C.S., Reid, H.H., Perugini, M.A., Brooks, A.G., Rossjohn, J. & Vivian, J.P. (2015) The Structure of the Atypical Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor, KIR2DL4. *J Biol Chem*, **290**, 10460-10471.
- Nakajima, H., Samaridis, J., Angman, L. & Colonna, M. (1999) Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor gamma-chain. *J Immunol*, **162**, 5-8.
- O'Connor, G.M., Vivian, J.P., Gostick, E., Pymm, P., Lafont, B.A., Price, D.A., Rossjohn, J., Brooks, A.G. & McVicar, D.W. (2015) Peptide-Dependent Recognition of HLA-B*57:01 by KIR3DS1. *J Virol*, **89**, 5213-5221.
- Oettgen, H.C., Terhorst, C., Cantley, L.C. & Rosoff, P.M. (1985) Stimulation of the T3-T cell receptor complex induces a membrane-potential-sensitive calcium influx. *Cell*, **40**, 583-590.
- Orbelyan, G.A., Tang, F., Sally, B., Solus, J., Meresse, B., Ciszewski, C., Grenier, J.C., Barreiro, L.B., Lanier, L.L. & Jabri, B. (2014) Human NKG2E is expressed and forms an intracytoplasmic complex with CD94 and DAP12. *J Immunol*, **193**, 610-616.
- Pende, D., Marcenaro, S., Falco, M., Martini, S., Bernardo, M.E., Montagna, D., Romeo, E., Cognet, C., Martinetti, M., Maccario, R., Mingari, M.C., Vivier, E., Moretta, L., Locatelli, F. & Moretta, A. (2009) Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood*, **113**, 3119-3129.
- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L. & 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.
- Pende, D., Spaggiari, G.M., Marcenaro, S., Martini, S., Rivera, P., Capobianco, A., Falco, M., Lanino, E., Pierri, I., Zambello, R., Bacigalupo, A., Mingari, M.C., Moretta, A. & Moretta, L. (2005) Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood*, **105**, 2066-2073.
- Plougastel, B., Jones, T. & Trowsdale, J. (1996) Genomic structure, chromosome location, and alternative splicing of the humanNKG2A gene. *Immunogenetics*, **44**, 286-291.
- Pogge von Strandmann, E., Simhadri, V.R., von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K.S., Hansen, H.P., Rothe, A., Boll, B., Simhadri, V.L., Borchmann, P., McKinnon, P.J., Hallek, M. & Engert, A. (2007) Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity*, **27**, 965-974.
- Pui, C.H., Mullighan, C.G., Evans, W.E. & Relling, M.V. (2012) Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood*, **120**, 1165-1174.

- Rajagopalan, S. & Long, E.O. (1999) A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med*, **189**, 1093-1100.
- Raulet, D.H. & Vance, R.E. (2006) Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol*, **6**, 520-531.
- Robinson, J., Halliwell, J.A., Hayhurst, J.D., Flicek, P., Parham, P. & Marsh, S.G. (2015) The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Res*, **43**, D423-431.
- Romagnani, C., Juelke, K., Falco, M., Morandi, B., D'Agostino, A., Costa, R., Ratto, G., Forte, G., Carrega, P., Lui, G., Conte, R., Strowig, T., Moretta, A., Munz, C., Thiel, A., Moretta, L. & Ferlazzo, G. (2007) CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol*, **178**, 4947-4955.
- Rosental, B., Brusilovsky, M., Hadad, U., Oz, D., Appel, M.Y., Afergan, F., Yossef, R., Rosenberg, L.A., Aharoni, A., Cerwenka, A., Campbell, K.S., Braiman, A. & Porgador, A. (2011) Proliferating cell nuclear antigen is a novel inhibitory ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *J Immunol*, **187**, 5693-5702.
- Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W.D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., Martelli, M.F. & Velardi, A. (2002) Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*, **295**, 2097-2100.
- Samaridis, J. & Colonna, M. (1997) Cloning of novel immunoglobulin superfamily receptors expressed on human myeloid and lymphoid cells: structural evidence for new stimulatory and inhibitory pathways. *Eur J Immunol*, **27**, 660-665.
- 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**, 418-425.
- Santourlidis, S., Trompeter, H.I., Weinhold, S., Eisermann, B., Meyer, K.L., 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**, 4253-4261.
- Saunders, P.M., Vivian, J.P., O'Connor, G.M., Sullivan, L.C., Pymm, P., Rossjohn, J. & Brooks, A.G. (2015) A bird's eye view of NK cell receptor interactions with their MHC class I ligands. *Immunol Rev*, **267**, 148-166.
- Schonberg, K., Fischer, J.C., Kogler, G. & Uhrberg, M. (2011a) Neonatal NK-cell repertoires are functionally, but not structurally, biased toward recognition of self HLA class I. *Blood*, **117**, 5152-5156.
- Schonberg, K., Srihar, M., Enczmann, J., Fischer, J.C. & Uhrberg, M. (2011b) Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood*, **117**, 98-107.

-
- Selvakumar, A., Steffens, U. & Dupont, B. (1996) NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains. *Tissue Antigens*, **48**, 285-294.
- Sharkey, A.M., Gardner, L., Hiby, S., Farrell, L., Apps, R., Masters, L., Goodridge, J., Lathbury, L., Stewart, C.A., Verma, S. & Moffett, A. (2008) Killer Ig-like receptor expression in uterine NK cells is biased toward recognition of HLA-C and alters with gestational age. *J Immunol*, **181**, 39-46.
- Shilling, H., Guethlein, L., Cheng, N., Gardiner, C., Rodriguez, R., Tyan, D. & Parham, P. (2002a) Allelic Polymorphism Synergizes with Variable Gene Content to Individualize Human KIR Genotype. *J Immunol*, **168**, 2307-2315.
- Shilling, H., Young, N., Guethlein, L., Cheng, N., Gardiner, C., Tyan, D. & Parham, P. (2002b) Genetic Control of Human NK Cell Repertoire. *J Immunol*, **169**, 239-247.
- Simhadri, V.R., Reiners, K.S., Hansen, H.P., Topolar, D., Simhadri, V.L., Nohroudi, K., Kufer, T.A., Engert, A. & Pogge von Strandmann, E. (2008) Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function. *PLoS One*, **3**, e3377.
- Sivori, S., Falco, M., Carlomagno, S., Romeo, E., Soldani, C., Bensussan, A., Viola, A., Moretta, L. & Moretta, A. (2010) A novel KIR-associated function: evidence that CpG DNA uptake and shuttling to early endosomes is mediated by KIR3DL2. *Blood*, **116**, 1637-1647.
- 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**, 1129-1136.
- Sleiman, M., Brons, N.H., Kaoma, T., Dogu, F., Villa-Forte, A., Lenoble, P., Hentges, F., Kotsch, K., Gadola, S.D., Vilches, C. & Zimmer, J. (2014) NK cell killer Ig-like receptor repertoire acquisition and maturation are strongly modulated by HLA class I molecules. *J Immunol*, **192**, 2602-2610.
- Strong, R.K., Holmes, M.A., Li, P., Braun, L., Lee, N. & Geraghty, D.E. (2003) HLA-E allelic variants. Correlating differential expression, peptide affinities, crystal structures, and thermal stabilities. *J Biol Chem*, **278**, 5082-5090.
- Toneva, M., Lepage, V., Lafay, G., Dulphy, N., Busson, M., Lester, S., Vu-Trien, A., Michaylova, A., Naumova, E., McCluskey, J. & Charron, D. (2001) Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. *Tissue Antigens*, **57**, 358-362.
- Trompeter, H.I., Gomez-Lozano, N., Santourlidis, S., Eisermann, B., Wernet, P., Vilches, C. & Uhrberg, M. (2005) Three structurally and functionally divergent kinds of promoters regulate expression of clonally distributed killer cell Ig-like receptors (KIR), of KIR2DL4, and of KIR3DL3. *J Immunol*, **174**, 4135-4143.
- Trowsdale, J., Barten, R., Haude, A., Stewart, C.A., Beck, S. & Wilson, M.J. (2001) The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunol Rev*, **181**, 20-38.
-

-
- Trundley, A.E., Hiby, S.E., Chang, C., Sharkey, A.M., Santourlidis, S., Uhrberg, M., Trowsdale, J. & Moffett, A. (2006) Molecular characterization of KIR3DL3. *Immunogenetics*, **57**, 904-916.
- Uhrberg, M. (2005a) The KIR gene family: life in the fast lane of evolution. *Eur J Immunol*, **35**, 10-15.
- Uhrberg, M. (2005b) Shaping the human NK cell repertoire: an epigenetic glance at KIR gene regulation. *Mol Immunol*, **42**, 471-475.
- Uhrberg, M., Parham, P. & Wernet, P. (2002) Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics*, **54**, 221-229.
- Uhrberg, M., Valiante, N.M., Shum, B.P., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyan, D., Lanier, L.L. & Parham, P. (1997) Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*, **7**, 753-763.
- Vales-Gomez, M., Reyburn, H.T., Erskine, R.A., Lopez-Botet, M. & Strominger, J.L. (1999) Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *Embo j*, **18**, 4250-4260.
- Vales-Gomez, M., Reyburn, H.T., Erskine, R.A. & Strominger, J. (1998) Differential binding to HLA-C of p50-activating and p58-inhibitory natural killer cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14326-14331.
- Valiante, N.M., Uhrberg, M., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K., Arnett, K.L., D'Andrea, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L. & Parham, P. (1997) Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity*, **7**, 739-751.
- Van Wauwe, J.P., De Mey, J.R. & Goossens, J.G. (1980) OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. *J Immunol*, **124**, 2708-2713.
- VandenBussche, C.J., Mulrooney, T.J., Frazier, W.R., Dakshanamurthy, S. & Hurley, C.K. (2009) Dramatically reduced surface expression of NK cell receptor KIR2DS3 is attributed to multiple residues throughout the molecule. *Genes Immun*, **10**, 162-173.
- Verheyden, S., Ferrone, S., Mulder, A., Claas, F.H., Schots, R., De Moerloose, B., Benoit, Y. & Demanet, C. (2009) Role of the inhibitory KIR ligand HLA-Bw4 and HLA-C expression levels in the recognition of leukemic cells by Natural Killer cells. *Cancer Immunol Immunother*, **58**, 855-865.
- Vierra-Green, C., Roe, D., Hou, L., Hurley, C.K., Rajalingam, R., Reed, E., Lebedeva, T., Yu, N., Stewart, M., Noreen, H., Hollenbach, J.A., Guethlein, L.A., Wang, T., Spellman, S. & Maiers, M. (2012) Allele-level haplotype frequencies and pairwise linkage disequilibrium for 14 KIR loci in 506 European-American individuals. *PLoS One*, **7**, e47491.
- Vilches, C., Gardiner, C.M. & Parham, P. (2000a) Gene structure and promoter variation of expressed and nonexpressed variants of the KIR2DL5 gene. *J Immunol*, **165**, 6416-6421.
-

- Vilches, C., Rajalingam, R., Uhrberg, M., Gardiner, C., Young, N. & Parham, P. (2000b) KIR2DL5, a Novel Killer-Cell Receptor with a D0-D2 Configuration of Ig-Like Domains. *J Immunol*, **164**, 5797-5804.
- Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L. & 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**, 2065-2072.
- Vitale, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Pende, D., Arico, M., Moretta, L. & Moretta, A. (2005) NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood*, **106**, 566-571.
- Voskoboinik, I., Dunstone, M.A., Baran, K., Whisstock, J.C. & Trapani, J.A. (2010) Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol*, **235**, 35-54.
- Wagtmann, N., Rojo, S., Eichler, E., Mohrenweiser, H. & Long, E.O. (1997) A new human gene complex encoding the killer cell inhibitory receptors and related monocyte/macrophage receptors. *Curr Biol*, **7**, 615-618.
- WHO Globocan 2008: cancer incidence and mortality worldwide. <http://globocan.iarc.fr>.
- Wilson, M., Torkar, M., Haude, A., Milne, S., Jones, T., Sheer, D., Beck, S. & Trowsdale, J. (2000) Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4778-4783.
- Winter, C.C., Gumperz, J.E., Parham, P., Long, E.O. & Wagtmann, N. (1998) Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol*, **161**, 571-577.
- Winter, C.C. & Long, E.O. (1997) A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. *J Immunol*, **158**, 4026-4028.
- Wolffe, A.P. & Matzke, M.A. (1999) Epigenetics: regulation through repression. *Science*, **286**, 481-486.
- Wu, J., Song, Y., Bakker, A.B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L.L. & Phillips, J.H. (1999) An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*, **285**, 730-732.
- Yao, Y., Shi, L., Tao, Y., Lin, K., Liu, S., Yu, L., Yang, Z., Yi, W., Huang, X., Sun, H., Chu, J. & Shi, L. (2011) Diversity of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in four ethnic groups in China. *Immunogenetics*, **63**, 475-483.
- Yawata, M., Yawata, N., Draghi, M., Little, A.M., Partheniou, F. & Parham, P. (2006) Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med*, **203**, 633-645.

Yawata, M., Yawata, N., McQueen, K., Cheng, N., Guethlein, L., Rajalingam, R., Shilling, H. & Parham, P. (2002) Predominance of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression. *Immunogenetics*, **54**, 543-550.

4 Lebenslauf

Diplom-Biologin Angela Riccarda Manser

geboren am 20. November 1983

in Düsseldorf

ledig

Hochschulausbildung

Seit 04.2009 Promotionsstudium am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ), Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

10.2003 – 09.2008 Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Abschluss des Studiums mit Diplom (Note 1,5)
Thema der Diplomarbeit: „Neue Oxidoreduktasen aus Pflanzen“
am Institut für Molekulare Enzymtechnologie im Forschungszentrum Jülich (IMET)

Schulausbildung

08.1994 – 06.2003 Erasmus-Gymnasium, Grevenbroich
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note 2,1)

08.1990 – 06.1994 Gebrüder-Grimm-Grundschule, Grevenbroich-Wevelinghoven

5 Publikationen im Rahmen der Doktorarbeit

5.1 Vorträge

Natural Killer Cell Symposium 2015, Göttingen:

Differential impact of HCMV infection on KIR repertoire formation dependent on *KIR* genotype.

5.2 Poster-Präsentationen

14th Meeting of the Society of Natural Immunity, NK2013, Heidelberg sowie

Natural Killer Cell Symposium 2014, Hannover:

Analysis of KIR repertoires on human T cells reveals selective expression of KIR3DL2 on a subset of naïve CD4 T cells.

5.3 Veröffentlichungen

Babor F, **Manser A**, Schonberg K, Enczmann J, Borkhardt A, Meisel R, Uhrberg M (2012) Lack of association between *KIR* genes and acute lymphoblastic leukemia in children. *Blood* 120 (13):2770-2772. doi:10.1182/blood-2012-07-440495.

Babor F, **Manser AR**, Fischer JC, Scherenschlich N, Enczmann J, Chazara O, Moffett A, Borkhardt A, Meisel R, Uhrberg M (2014) KIR ligand C2 is associated with increased susceptibility to childhood ALL and confers an elevated risk for late relapse. *Blood* 124 (14):2248-2251. doi:10.1182/blood-2014-05-572065.

Hejazi M, **Manser AR**, Frobel J, Kundgen A, Zhao X, Schonberg K, Germing U, Haas R, Gattermann N, Uhrberg M (2015) Impaired cytotoxicity associated with defective natural killer cell differentiation in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 100 (5):643-652. doi:10.3324/haematol.2014.118679.

Manser AR, Uhrberg M (2015) Age-related changes in natural killer cell repertoires: impact on NK cell function and immune surveillance. *Cancer Immunol Immunother.* doi:10.1007/s00262-015-1750-0.

Manser, AR, Weinhold, S and Uhrberg, M (2015), Human KIR repertoires: shaped by genetic diversity and evolution. *Immunological Reviews*, 267: 178–196. doi: 10.1111/imr.12316.

Reusing, SB, **Manser, AR**, Enczmann, J, Mulder, A, Claas, FH, Carrington, M, Fischer, JC, Borkhardt, A, Babor, F and Uhrberg, M (2015), Selective downregulation of HLA-C and HLA-E in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*. doi: 10.1111/bjh.13777.

Schonberg K, Rudolph J, Vonnahme M, Parampalli Yajnanarayana S, Cornez I, Hejazi M, **Manser AR**, Uhrberg M, Verbeek W, Koschmieder S, Brummendorf TH, Brossart P, Heine A, Wolf D (2015) JAK Inhibition Impairs NK Cell Function in Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer Res* 75 (11):2187-2199. doi:10.1158/0008-5472.can-14-3198.

6 Danksagung

Nun noch ein Dankeschön an die Personen, die mich und diese Arbeit in den letzten Jahren unterstützt haben.

Ein erster, großer Dank gilt Prof. Dr. Markus Uhrberg für die Betreuung meiner Arbeit in seiner Arbeitsgruppe, die konstruktiven Diskussionen und die lustigen Gespräche, wenn wir mit n=1 versuchten die Immunologie zu revolutionieren. Danke, dass ich von dem „fahrenden Zug“ nicht abspringen musste.

Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei Prof. Dr. Joachim Ernst aus der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät für die Übernahme des Korreferats und der Mentorenschaft.

Bei dem kommissarischen Direktor des ITZ Dr. Johannes Fischer möchte ich mich bedanken für die Möglichkeit am ITZ arbeiten zu können und so manch hilfreichen durchflusszytometrischen Tipp.

Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Dr. Borkhardt (Direktor der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und klinische Immunologie), Prof. Dr. Haas (Direktor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie) und Dr. Spohn (DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen) für die Bereitstellung von Proben und Bluten.

Ich danke den Mitarbeitern des HLA-Labors unter der Leitung von Dr. Jürgen Enczmann dafür, dass ich immer Eure PCR-Maschinen benutzen durfte, für die vielen HLA-Typisierungen, und dass Ihr immer ein offenes Ohr für Fragen habt.

Danke an Dr. Hans-Ingo Trompeter dafür, dass man mit Fragen immer zu Dir kommen kann.

Ein dickes Dankeschön an alle meine Kollegen, Ehemalige und „Teilzeit“ Mitglieder der AG Uhrberg für die gute Arbeitsatmosphäre im Labor, die Abende im Scotties, oder beim Waffelbacken. Dabei möchte ich einigen Kollegen besonders danken:

Liebe Sandra, danke, dass Du mich zu Beginn meiner Arbeit betreut hast. Es tut mir leid, dass ich den microRNAs den Rücken gekehrt habe, aber Du weißt ja wie schwierig die sein können!

Liebe Katharina, dank Dir habe ich beim Thema Durchflusszytometrie nicht mehr den Kopf voller Fragezeichen. Ein riesen Dank für die lustigen Stunden im Sorter-Raum und dafür, dass Du unsere Geräte am Leben hältst!

Liebe Maryam, liebe Sarah, liebe Ricarda, liebe Nadine: Vielen Dank, dass Ihr die Arbeit im Labor und Büro so angenehm macht, dass man mit Euch immer lachen (und manchmal auch weinen) kann, danke für eine (fast immer) gefüllte Süßigkeiten-Schublade und dafür, dass Ihr in guten und schlechten Tagen (klingt wie in einer Ehe?!) immer ein offenes Ort habt und zu Freunden geworden seid! Nadine, unser lebendiger Pipettierroboter, danke für die (gefühlte) Millionen PCRs, die Du für mich angesetzt hast! Ich wünsche Dir von Herzen, dass es wieder aufwärts geht!

Liebe Kathrin, danke für alles, was ich von Dir über NK-Zellen, KIR und Durchflusszytometrie lernen durfte. Ich hoffe, dass Dich Deine neuen Kollegen zu schätzen wissen! P.S. der nächste Cocktail geht auf mich!

Das größte Dankeschön geht an meine ganze Familie! Danke, dass Ihr mich bis hierhin begleitet habt, Euch immer für meine Arbeit interessiert habt und gefragt habt, was ich gerade mache und wie es läuft!

Ganz besonders danke ich meinen Eltern. Danke, dass Ihr mich immer unterstützt und immer für mich da seid. Ohne Euch wäre das nicht möglich gewesen!

Mein letzter Dank geht an Yücel. Danke, dass es Dich in meinem Leben gibt!

7 Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, den