

**Auswirkungen des HLA Klasse I Polymorphismus sowie anderer
regulatorischen Faktoren auf die KIR-Expression im Rahmen der
Entwicklung von Natürlichen Killer (NK)-Zellen**

Inaugural Dissertation

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

vorgelegt von: Xiaoyi Zhao

aus Chengdu, Sichuan V.R. China

Düsseldorf

im Okt. 2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung.....	1
1. Einleitung.....	4
1.1 Das Immunsystem des Menschen.....	4
1.2 Natürliche Killer (NK)-Zellen.....	4
1.3 MHC-Klasse-I-Moleküle.....	6
1.4 „missing-self“ Hypothese und NK-Zellrezeptoren.....	7
1.5 KIR-Rezeptoren und ihre Liganden.....	10
1.6 Zytotoxizität der NK-Zellen und Killing-Assay.....	13
1.7 Von hämatopoetischen Stammzellen zu NK-Zellen.....	14
1.8 Korrelation der KIR-Expression mit dem HLA-Klasse-I-Typ und klinische Relevanz der KIR/HLA Interaktion.....	17
1.9 Mesenchymale Stammzellen (MSC) als Support für <i>in vitro</i> NK-Zelldifferenzierung.....	19
1.10 Von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) zu NK-Zellen <i>in</i> <i>vitro</i>	20
1.11 Ziel der Arbeit.....	21
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Material.....	23
2.1.1 Geräte.....	23
2.1.2 Materialien für die Zellkultur.....	24
2.1.3 Zellmaterial und Zelllinien.....	25
2.1.4 Zellkulturmedien.....	27
2.1.5 Zytokine für die Zellkultur.....	30
2.1.6 Materialien für Bakterien.....	30
2.1.7 Verwendete Bakterien.....	30
2.1.8 Vektoren.....	31

2.1.9	Enzyme und Chemikalien.....	32
2.1.10	Kits.....	34
2.1.11	Primer	35
2.1.12	shRNAs.....	36
2.1.13	Datenbank und Programm	36
2.1.14	Referenzsequenzen	37
2.2	Methoden	38
2.2.1	Herstellung von elektrokompetenten Bakterien <i>SURE (E.coli)</i>	38
2.2.2	Transformation der Bakterien.....	38
2.2.3	Restriktionsverdau von Vektoren.....	39
2.2.4	Ligation.....	39
2.2.5	Elektroporation	39
2.2.6	Kolonie PCR.....	40
2.2.7	Minipräparation	40
2.2.8	Kontrollverdau.....	41
2.2.9	Sequenzierung	41
2.2.10	Maxipräparation.....	42
2.2.11	Zellkultur	42
2.2.12	Zellzahlbestimmung	42
2.2.13	Einfrieren der Zellen.....	43
2.2.14	Splitten der adhärenen Zellen.....	43
2.2.15	Kultivierung der MSC-Zellen.....	44
2.2.16	Lymphozyten-Isolation aus Vollblut (CB, PB) und Knochenmark	44
2.2.17	Durchflusszytometrie.....	45
2.2.18	Färbung für die Durchflusszytometrie.....	45
2.2.19	Intrazelluläre Färbung für die Durchflusszytometrie	46
2.2.20	Isolation von CD34 ⁺ HSCs aus Nabelschnurblut bzw. Knochenmark	46
2.2.21	NK-Zelldifferenzierung aus CD34 ⁺ Zellen <i>in vitro</i>	47
2.2.22	Zellsortierung.....	48

2.2.23	CD56 ^{dim} - CD56 ^{bright} -NK-Zellen Sortierung.....	48
2.2.24	Isolation von NK-Zellen aus Blut.....	48
2.2.25	Kultivierung von iPS-Zellen.....	49
2.2.26	CD34 ⁺ - Zelldifferenzierung aus iPS-Zellen	49
2.2.27	NK-Zellen-Differenzierung aus iPS-Zellen.....	50
2.2.28	CD107-Assay.....	50
2.2.29	CFSE-Assay.....	51
2.2.30	Granzym und Perforin Detektion	52
2.2.31	Messung von IFN- γ	52
2.2.32	Hybridisierung von shRNA	52
2.2.33	RNA-Interferenz (RNAi).....	53
2.2.34	Ligation der shRNA in lentiviralen Vektoren PCL2.THPC	54
2.2.35	Amplifikation der cDNA	54
2.2.36	Ligation der cDNA in Überexpressionsvektor PCL6	55
2.2.37	Virusproduktion	55
2.2.38	Virus-Titer-Bestimmung.....	56
2.2.39	Virusinfektion von Zellen.....	57
2.2.40	RNA-Isolation	57
2.2.41	Bestimmung der RNA-Reinheit	58
2.2.42	Reverse-Transkriptions (RT)-PCR	58
2.2.43	Phenol-Chloroform-Extraktion.....	59
2.2.44	DNA-Isolation mittels <i>Qiagen DNA blood kit</i>	59
2.2.45	Bestimmung der RNA- und DNA-Konzentration	59
2.2.46	Endprodukt PCR.....	60
2.2.47	Real-Time PCR.....	61
2.2.48	KIR-Typisierungs-PCR auf mRNA Ebene	62
2.2.49	Genomische HLA-C1/C2 Typisierung	62
2.2.50	DNA-Aufreinigung aus PCR-Produkten	62
2.2.51	Gelelektrophorese	63
2.2.52	DNA-Aufreinigung aus Gel.....	63

2.2.53	Lipofektion	64
3	Ergebnisse	65
3.1	Einfluss der HLA-Klasse-I-Liganden auf die KIR-Expression während der NK-Zellentwicklung <i>in vitro</i>	65
3.1.1	NK-Zelldifferenzierung auf EL08- und MSC-Feeder-Zellen	65
3.1.2	HLA-Klasse-I-Expression der MSC-Zelllinien	68
3.1.3	Funktionale Assays der generierten NK-Zellen	70
3.1.4	HLA-C-unspezifische Expression der KIR-Rezeptoren während der NK-Zellentwicklung aus CB isolierten CD34 ⁺ -HSCs	71
3.1.5	Quotient KIR2DL1/KIR2DL3	74
3.1.6	Messung der KIR2DL1- bzw. KIR2DL3-Transkripte der auf C1/C1 und C2/C2-MSCs generierten NK-Zellen	76
3.1.7	KIR3DL1-Expression ist unabhängig vom HLA-Klasse-I-Liganden Bw4	77
3.1.8	HLA-Klasse-I-unspezifische Expression der KIR-Rezeptoren im Verlauf der NK-Zellentwicklung aus CD34 ⁺ -HSCs, die aus Knochenmark isoliert wurden	78
3.1.9	Funktionalität der aus KM-CD34 ⁺ -HSCs entwickelten NK-Zellen	81
3.1.10	NK-Zelldifferenzierung nach Umplattierung auf frische MSC	82
3.1.11	Induktion der KIR-Expression auf <i>ex vivo</i> -isolierten NK-Zellen in Anwesenheit von MSC-Linien mit verschiedenen KIR Liganden	83
3.1.12	MSC verhindern die Proliferation von NK-Zellen	85
3.2	Einfluss der Herunterregulation von HLA-Klasse-I-Molekülen auf die Differenzierung bzw. KIR-Expression von NK-Zellen	87
3.2.1	Herunterregulation von β -2-Mikroglobulin mittels RNAi	87
3.2.2	NK-Zelldifferenzierung auf HLA-Klasse-I-defekten MSC-Zellen	89
3.2.3	NK-Zell Differenzierung aus hämatopoetischen Vorläuferzellen auf TAP-defizienten Fibroblasten	91
3.2.4	Kokultivierung von KIR-negativen NK-Zellen auf	

HLA-Klasse-I-defekten Fibroblasten.....	94
3.3 Überexpression von KIR2DL2 und KIR2DL4.....	97
3.3.1 Überexpression von KIR2DL2 und KIR2DL4 in CD34 ⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen und in NK-Zellen.....	97
3.3.2 NK-Zelldifferenzierung aus KIR2DL2- und KIR2DL4- überexprimierenden HSCs	98
3.4 NK-Zellgenerierung auf murinen Sternzellen der Leber.....	104
3.5 NK-Zelldifferenzierung aus iPS-Zellen.....	107
3.5.1 OP9 dienen als <i>Feeder</i> -Zellen für die Differenzierung der CD34 ⁺ -Zellen aus iPS-Zellen	107
3.5.2 NK-Zellgenerierung aus iPS-basierenden CD34 ⁺ -Zellen.....	108
3.5.3 MSC, eine effiziente Feeder-Zelllinie für die Induktion von KIR aus iPS	112
3.5.4 NK-Zelldifferenzierung aus iPS-Zellen, die aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des Nabelschnurbluts generiert wurden	114
3.5.5 NK-Zelldifferenzierung aus iPS-Zellen direkt in NK-Gen-Medium..	118
4 Diskussion.....	123
4.1 Neue humane <i>in vitro</i> Modelle für die NK-Zellentwicklung	123
4.1.1 Ein vollständig humanes System für die NK-Zelldifferenzierung aus hämatopoetischen Vorläuferzellen.....	123
4.1.2 MSC präsentieren HLA-Klasse-I-Antigene während der NK-Zelldifferenzierung	127
4.1.3 MSC unterstützen auch die NK-Zelldifferenzierung aus iPS-Zellen	128
4.1.4 Gedächtnis der iPS-Zellen und mögliche klinische Anwendung .	129
4.2 Die Entstehung des KIR-Repertoires während der NK-Zellentwicklung ist unabhängig vom HLA-Klasse-I-Typ	130
4.2.1 Die Entwicklung von NK-Zellen aus HSC des Nabelschnurbluts zeigt keine Korrelation der KIR-Expression mit dem HLA-Klasse-I-Typ	131

4.2.2	Die Entwicklung von NK-Zellen aus HSC des adulten Knochenmarks zeigt ebenfalls keine Korrelation der KIR-Expression mit dem HLA-Klasse-I-Typ	132
4.2.3	MSC-Umplattierungsexperimente und der Einsatz von KIR-negativen NK-Zellen bestätigt die Abwesenheit eines direkten Einflusses des HLA-Klasse-I-Typs auf die KIR-Expression während der Differenzierung	133
4.2.4	Der HLA-Klasse-I „ <i>knockdown</i> “ in MSC hat keine Auswirkung auf die KIR-Expression während der NK-Zelldifferenzierung <i>in vitro</i>	134
4.3	Welche Rolle spielt die sequentielle Expression von NK-Zellrezeptoren für die NK-Zellentwicklung	136
4.4	Welche klinische Relevanz hat die genetisch festgelegte und Liganden-unabhängige Induktion der KIR-Expression während der NK-Zelldifferenzierung?	138
5	Literaturverzeichnis	140
	Danksagung	160
	Abkürzung	162
	Eidesstattliche Erklärung	166

Zusammenfassung

Natürliche Killerzellen sind große granuläre Lymphozyten, die zum angeborenen Immunsystem gehören. Sie bilden ca. 5-15% der Gesamtpopulation aller Lymphozyten im peripheren Blut und spielen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Tumorzellen und Virusinfektionen. Über ihre Oberflächenrezeptoren, die KIR-Rezeptoren (*Killer-cell Immunoglobulin like receptor*) sowie lektinartige NKG2-Rezeptoren, können die NK-Zellen die körpereigenen von körperfremden Zellen unterscheiden. Dadurch sind sie in der Lage, die körpereigenen Zellen vor der zytotoxischen Lyse zu schützen und gleichzeitig die körperfremden Zellen zu eliminieren. Es gibt sowohl inhibitorische als auch stimulatorische KIR-Rezeptoren, deren kodierende Gene in hohem Maße polymorph sind und deren klonale Expression zu unterschiedlichen, aber stabilen KIR-Kombinationen, dem sogenannten KIR-Repertoire, auf den NK-Zellen führt. Die meisten KIR-Rezeptoren sind für Produkte der ebenfalls polymorphen HLA-Klasse-I-Gene spezifisch. Um die Auswirkung der HLA-Klasse-I-Moleküle auf die Entstehung des KIR-Repertoires besser zu verstehen, sollte diese Frage in einem geeigneten *in vitro* Modell der NK-Zelldifferenzierung näher untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde ein Protokoll entwickelt, bei dem humane mesenchymale Stammzellen (MSC) als Stammzellnische fungieren und verschiedene HLA-Klasse-I Varianten während der mehrwöchigen Differenzierungsphase an die sich entwickelnden NK-Zellvorläuferzellen präsentieren sollten. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die KIR-Expression während der NK-Zellentwicklung aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) oder aus KIR-negativen NK-Zellen unabhängig von den entsprechenden HLA-Klasse-I-Liganden auf den MSC ist. Hierbei spielte es keine Rolle, ob die hämatopoetischen Vorläuferzellen aus neonataler oder adulter Quelle isoliert wurden. Der siRNA-vermittelte knockdown der HLA-Klasse-I Komponente *beta2 microglobulin* in MSC zeigt ebenfalls keinen Einfluss auf die KIR-Expression und das KIR-Repertoire im Rahmen der NK-Zellentwicklung aus HSCs sowie auch aus KIR-negativen NK-Zellen. Es zeigte sich, dass der inhibitorische Rezeptor KIR2DL3 unter allen Bedingungen das KIR-Repertoire dominierte, unabhängig davon, ob der entsprechende Ligand, das HLA-C1 Epitop, auf den MSC-Feeder-Zellen vorhanden war oder nicht. Ebenso wurde der HLA-C2-spezifische Rezeptor KIR2DL1 unabhängig von seinem Liganden erst zu einem späteren Zeitpunkt und mit geringerer Frequenz in den Kulturen exprimiert. Insgesamt konnte mit Hilfe des hier verwendeten vollständig humanen *in vitro* Modells der NK-Zelldifferenzierung gezeigt werden, dass die Anpassung des

KIR-Repertoires an die polymorphen HLA-Klasse-I-Liganden erst in reifen NK-Zellen und wahrscheinlich durch postnatalen Kontakt mit Viren und anderen Pathogenen erfolgt.

In einem weiteren Teilprojekt konnte gezeigt werden, dass sich humane MSC auch als *Feeder*-Zellen zur Differenzierung von induzierten pluripotenten Stammzellen in NK-Zellen eignen. So konnten aus iPS-Zellen, die aus HSCs des Nabelschnurbluts reprogrammiert worden waren, erfolgreich funktionale NK-Zellen generiert werden. Im Vergleich zu den meist aus Fibroblasten stammenden iPS-Zellen konnten die iPS-Zellen aus HSC effektiver wiederum zu HSC und anschließend zu NK-Zellen ausdifferenziert werden, was wahrscheinlich auf dem bereits für andere Differenzierungsvorgänge beschriebenen „epigenetischen Gedächtnis“ der iPS-Zellen beruht. Die hier entwickelte Methode der effektiven Differenzierung von HSC-iPS zu NK-Zellen ermöglicht damit zum einen die *in vitro* Analyse der sehr frühen Schritte der NK-Zelldifferenzierung und stellt darüber hinaus eine interessante Methode zur Generierung von NK-Zellen zu immuntherapeutischen Zwecken aus einer potentiell unlimitierten Zellquelle dar.

Summary

Natural killer cells (NK cells) belong to the innate immune system. They are kind of large granular lymphocytes, making up about 5-15% of peripheral blood lymphocytes, and playing very critical roles in defending against tumors, and viral infections. They express groups of receptors on their membrane surface, such as the KIR receptors (killer cell immunoglobulin like receptor) and the lectin NKG2 receptors. Through the surface receptors NK cells can recognize the self and non-self cells, thereby NK cells are able to protect the self cells from cytotoxic lysis, on the other hand they can eliminate the non-self cells. The KIR receptors have both stimulatory and inhibitory effects on the NK cells and are responsible for the possible lysis of the target cell. The KIRs are very polymorphic and display a clonal expression. The KIR repertoire of NK cells indicates a specificity for HLA class I type. Different combinations of KIR receptors and HLA class I molecules may have specific effects against certain diseases and immunities. Using MSC cells (mesenchymal stem cells) as feeder cells allows the establishment of a complete human NK cell differentiation system. In the present study it was shown that the KIR expression was totally independent on the HLA class I type of MSC feeder cells during the NK cell development from hematopoietic stem cells (HSC) or NK progenitors. Whether the HSCs come from newborns or adults, did not affect this result. Subsequently the down regulation of the HLA class I in the feeder cells had no effect on the expression of KIR receptors or on the KIR repertoire during the NK cell development from HSCs, as well as from NK precursor cells. KIR2DL3 is the firstly and predominantly expressed KIR receptor during NK cell genesis from HSCs, irrespective of its ligand, HLA-C1. However, KIR2DL1 is the lately and weakly expressed KIR receptor, regardless of its ligand, HLA-C2.

The iPS cells are the cells that retain the characteristics of embryonic stem cells by artificial reprogramming. They have the potential to differentiate into all types of cells. In the present work, a complete human *in vitro* model for NK cell development from iPS cells has been established with the help of human MSC feeder cells. This process has been previously performed on murine OP9 feeder cells. Functional NK cells have been successfully generated in culture. From HSCs-derived iPS cells more CD34⁺ and NK cells were generated compared to those from fibroblast-derived iPS cells, indicating the memory of iPS cells.

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem des Menschen

Das menschliche Immunsystem kann in zwei Hauptteile eingeteilt werden, das angeborene Immunsystem und das adaptive Immunsystem. Die wichtigste Funktion des Immunsystems ist es, Infektionen durch Krankheitserreger wie z.B. Bakterien, Viren und Parasiten zu bekämpfen, Tumorentwicklung zu verhindern, und körperfremde Stoffe zu neutralisieren (*Immunology Janeway 2002*). Die weißen Blutzellen des Immunsystems stammen von den hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark ab, die auf ihrer Oberfläche CD34 (CD steht für *cluster of differentiation*), als Marker exprimieren (Baum *et al.*, 1992; Egeland *et al.*, 1998). Die Stammzellen differenzieren sich dann zu myeloiden Vorläuferzellen, die die Vorstufe von Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen (DCs) und Mastzellen sind, oder zu lymphatischen Vorläuferzellen. Die B-Zellen, T-Zellen und Natürlichen Killer (NK)-Zellen entwickeln sich aus den lymphatischen Vorläuferzellen. Wenn eine Antigen-spezifische Immunantwort ausgelöst wird, wie die Produktion von Antikörpern gegen ein bestimmtes Pathogen (d.h. antigenspezifisch), wird diese Reaktion als adaptive Immunantwort bezeichnet (*Cellular and molecular Immunobiology 2002; Immunology Janeway 2002*). Darin spielen vor allem B- und T-Zellen eine wichtige Rolle. Im Gegensatz dazu sind die NK-Zellen an der Antigen-unabhängigen Immunität beteiligt.

1.2 Natürliche Killer (NK)-Zellen

Die NK-Zellen gehören zu den Lymphozyten, die eine Untergruppe der weißen Blutzellen (Leukozyten) sind. NK-Zellen besitzen keine antigenspezifischen

Rezeptoren, und sie gehören, neben den Myeloiden Zellen, wie Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, zum angeborenen Immunsystem. Im Gegensatz dazu gehören die T- und B-Zellen zum adaptiven Immunsystem (*Immunology* Janeway 2002). Wegen ihrer Morphologie wurden NK-Zellen zunächst als große granuläre Lymphozyten bezeichnet. NK-Zellen entwickeln sich wie die anderen Lymphozyten (B- und T-Zellen) aus lymphatischen Vorläuferzellen. Nach der Reifung der NK-Zellen zirkulieren sie später im Blutkreislauf. Sie sind größer als T- und B-Lymphozyten, und enthalten erkennbare zytoplasmatische Granula. Sie lassen sich aufgrund ihrer Fähigkeit identifizieren, ohne vorherige Immunisierung oder Aktivierung *in vitro* bestimmte Zelllinien lymphatischer Tumoren erkennen und abtöten zu können (Kissling *et al.*, 1975; Herberman *et al.*, 1975; *Immunology* Janeway 2002). NK-Zellen sind fähig Zytotoxizität auszuüben, und spielen eine sehr wichtige Rolle bei der Bekämpfung von frühen Stadien viraler Infektionen und von Tumoren (Hoglund *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 1997). NK-Zellen werden durch einige Oberflächenprotein-Marker charakterisiert, wie z.B. die Expression von CD56 und CD16, anschließend durch die Abwesenheit des T-Zellmarkers CD3 (Rees *et al.*, 2002).

Ungefähr 5-15% der Lymphozyten des peripheren Blutes sind NK-Zellen. Sie sind auch in den sekundären lymphatischen Organen, wie z.B. in der Milz, im Knochenmark, in der Leber, in der Gebärmutter sowie in die Lunge lokalisiert (Grégoire *et al.*, 2007). Kleine Menge von NK-Zellen lassen sich auch in den sekundären lymphatischen Geweben (*SLT*, *secondary lymphoid tissue*) oder in dem Schleimhaut-assoziierten Lymphgewebe (*MALT*, *mucosa-associated lymphoid tissue*) finden (Doherty *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2013). In Fällen von Entzündungen sind die NK-Zellen auch im betroffenen Gewebe anwesend (Moretta *et al.*, 2002). Wie T-Zellen können NK-Zellen zytotoxische Granula, die Granzym und Perforin enthalten, ausschütten und somit in körperfremden oder entarteten Zellen Apoptose induzieren (Trapani *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2004). Sie sind auch in der Lage Zytokine wie z.B. Interferon (IFN)- γ und Tumornekrosefaktor (TNF)- α , zu produzieren (Biron *et al.*, 1999). Auf diese Weise kommunizieren die NK-Zellen mit anderen Zellen, und arbeiten bei der Vernichtung

von infizierten oder malignen Zellen zusammen. Die genaue Reaktion der NK-Zelle hängt von der Art der Aktivierung ab, z.B. fördern IFN- α und - β die zytotoxische Aktivität, während IL-12 auch die Synthese von INF- γ stimuliert (Biron *et al.*, 1999). Die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen wird allerdings nicht nur durch Zytokine, sondern auch durch die Interaktion verschiedener NK-Zell-Rezeptoren mit entsprechenden Liganden auf der *Target*-Zelle kontrolliert. Hier sind die MHC-Moleküle (*Major Histocompatibility-Complex* (MHC) Klasse-I-Moleküle) von besonderer Bedeutung. Sie vermitteln NK-Zellen einerseits die Toleranz gegenüber gesunden körpereigenen Zellen, und andererseits auch die zytotoxische Aktivität bei der Erkennung von körperfremden sowie infizierten Zellen (Braud *et al.*, 1999; Le Bouteille *et al.*, 1999).

1.3 MHC-Klasse-I-Moleküle

Bei den MHC-Klasse-I-Molekülen handelt es sich um Oberflächenproteine, die von allen kernhaltigen gesunden Zellen exprimiert werden. Ihre Aufgabe besteht darin, dem Immunsystem alle von der jeweiligen Zelle synthetisierten Proteine als Peptidfragmente zu präsentieren. In vielen Fällen von viralen Infektionen, sowie auf Tumorzellen werden die körperfremden Peptide bzw. die Peptide, die auf die Entartung hinweisen, nach außen präsentiert und von T-Zellen in Form von Peptid-MHC-I-Komplexen erkannt. In Folge einer erkennenden Bindung werden die betroffenen Zellen lysiert. Aufgrund dieser Erkennungsmechanismen haben viele Arten von Tumorzellen verschiedene Mechanismen entwickelt, um sich vor der adaptiven Immunität schützen können. Viele Tumorzellen und von Viren infizierte Zellen exprimieren fast keine oder nur geringe Menge von MHC-Klasse-I-Molekülen auf ihrer Oberfläche, wodurch sie von T-Zellen kaum erkannt werden können. Eine Hauptaufgabe der NK-Zellen liegt darin, die Herunterregulation von MHC-I-Molekülen auf solchen infizierten sowie entarteten Zellen zu erkennen, die sich so einer Erkennung durch das adaptive Immunsystem im Zuge eines sogenannten

„Immune Escape“ entziehen wollen und diese dann abzutöten (Ljunggren *et al.*, 1990; Karre *et al.*, 1986).

Die MHC-Klasse-I-Moleküle werden bei Menschen als HLA- (*humanes Leukozyten-Antigen*) Klasse-I-Moleküle bezeichnet. Es gibt drei klassische HLA-I-Moleküle, nämlich HLA-A, -B, und -C. Ihre Funktionen bestehen darin, alle Fragmente aller in der Zelle synthetisierten Peptide auf der Zelloberfläche zu präsentieren, wodurch die Zellen mit dem Immunsystem kommunizieren können. Daneben gibt es noch drei sogenannte nichtklassische HLA-I Moleküle, nämlich HLA-E, -F und -G. HLA-E präsentiert selektiv die Signalpeptidfragmente der übrigen HLA-I-Moleküle (Braud *et al.*, 1999). Diese Komplexe sind daher nur auf der Oberfläche von den Zellen zu finden, deren klassische HLA-Moleküle korrekt prozessiert und ausgeschleust werden. HLA-G scheint eine Rolle bei der Suppression der Immunantwort zu spielen (Larsen *et al.*, 2009). Während einer Schwangerschaft wird HLA-G nur von einigen aus dem Fötus stammenden Plazentazellen exprimiert und schützt diese, die ansonsten keine weiteren MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren, vor dem Angriff durch mütterliche NK-Zellen (Le Bouteille *et al.*, 1999). Die Expression von HLA-F ist auf B-Zellen beschränkt, während die genaue Funktion von HLA-F bisher noch unbekannt bleibt (Allan *et al.*, 2002). Es ist neulich beschrieben, dass HLA-F (*open conformers*) mit einer hohen Affinität am stimulatorischen KIR3DS1-Rezeptor bindet (Beltran *et al.*, 2016).

1.4 „missing-self“ Hypothese und NK-Zellrezeptoren

Das Immunsystem ist in der Lage, körperfremde oder virusbefallene Zellen zu erkennen und eliminieren. Gleichzeitig muss es auch fähig sein, die gesunden, körpereigenen Zellen und die körperfremden Zellen voneinander zu unterscheiden, und die körpereigenen vor der Lyse zu schützen. Dies wird mit der „missing-self“ Hypothese beschrieben (Ljunggren *et al.*, 1990; Karre *et al.*, 1986; *Immunology* Janeway 2002). Diese mittlerweile vielfach bestätigte Hypothese besagt,

dass NK-Zellen in der Lage sind, solche Zellen, die keine oder nur geringe Mengen von körpereigenen MHC-I-Molekülen auf ihrer Oberfläche tragen, zu erkennen und anzugreifen, während die normalen, körpereigene MHC-I-Moleküle exprimierenden Zellen nicht durch NK-Zellen angegriffen werden (Bix *et al.*, 1991). Daneben können NK-Zellen jedoch auch durch die Interaktion von aktivierenden Rezeptoren wie z.B. natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren mit ihren Liganden aktiviert werden.

Es gibt zwei Gruppen von Rezeptoren, die zur Immunoglobulin-Superfamilie gehörenden „killer immunoglobulin-like receptors“ (*KIR*) und die lektinartigen Rezeptoren (*killer lectin-like receptors*; *KLRs*), die als *NKG2*-Familie bezeichnet werden (Lanier *et al.*, 1998). Die Kombination dieser Rezeptoren steuert die Reaktion der NK-Zelle in Abhängigkeit von der MHC-Klasse-I-Expression der *Target*-Zelle.

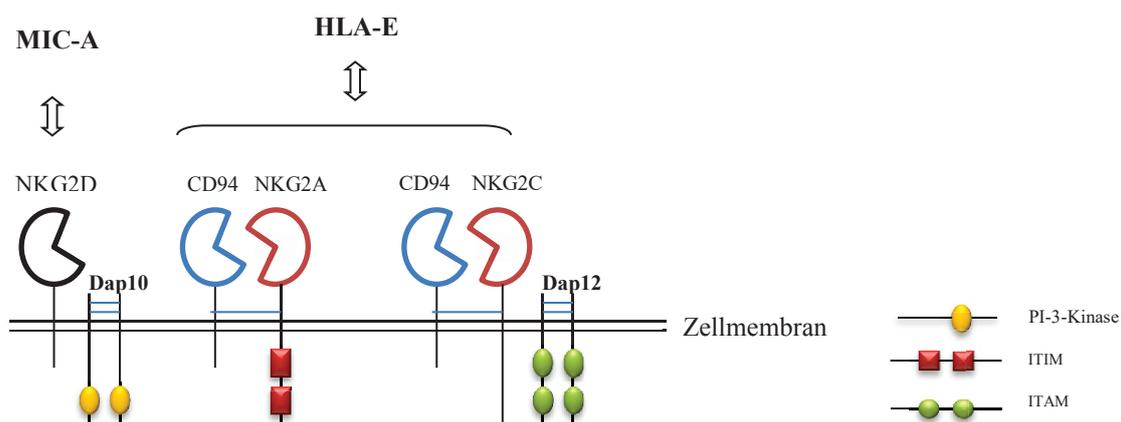


Abb.1-1 Strukturelle Darstellung der NKG2-Rezeptor-Familie mit ihren Liganden. Nomenklatur nach (Andre *et al.*, 2001)

Zu beiden Gruppen gehören nicht nur aktivierende Rezeptoren, sondern vor allem auch inhibierende Rezeptoren. Um Toleranz gegenüber körpereigenen Zellen entwickeln zu können, muss eine reife NK-Zelle mindestens einen inhibitorischen Rezeptor auf der Oberfläche exprimieren, z.B. einen inhibitorischen *KIR*-Rezeptor, der für einen körpereigenen Liganden spezifisch ist, oder *NKG2A*. („at least one“ Hypothese). (Uhrberg *et al.*, 97; Valiante *et al.*, 1997; Raulet *et al.*, 1997). Zwar können auch die NK-Zellen, die keine inhibitorischen Rezeptoren für körpereigene MHC-I-Moleküle besitzen, vorkommen, bei ihnen handelt es sich aber um funktional inaktive oder

unreife NK-Zellen (Freud *et al.*, 2006; Cooley *et al.*, 2007). Diese „*self-blind*“ Zellen sind hyporesponsiv und weisen kaum zytotoxische Aktivität auf und sind somit auch tolerant gegenüber körpereigenen Zellen (Anfossi *et al.*, 2006).

Es wird angenommen, dass die Erkennung der eigenen HLA-Klasse-I-Moleküle für die Zytotoxizität der NK-Zellen benötigt wird, d.h. die NK-Zellen sind inaktiv, solange sie keine körpereigenen HLA-I-Moleküle erkannt haben (Kim *et al.*, 2005). Dieser Prozess wird als „*Licensing*“ bezeichnet. Durch „*Licensing*“ entstehen zwei Gruppen von NK-Zellen: lizenzierte NK-Zellen, die selbst-tolerant und zytotoxisch funktional sind, und nicht-lizenzierte, hyporesponsive NK-Zellen. Die zweite Gruppe von NK-Zellen reagiert sehr schwach auf Stimulation mit Tumor-Zellen, allerdings können sie durch Stimulation mit Zytokinen aktiviert werden (Josson *et al.*, 2009). Für das „*Licensing*“ der NK-Zellen muss es eine physikalische Interaktion zwischen den inhibitorischen KIR und HLA-Klasse-I-Molekülen geben. Man vermutet, dass dies im Knochenmark während der Entwicklungsstadien der NK-Zellen stattfindet und dass daran bestimmte Stroma-Zellen beteiligt sind (Kim *et al.*, 2005).

Die CD56⁺CD3⁻-NK-Zellen können aufgrund der CD56-Expressionsdichte und ihrer Funktionen in zwei Subgruppen unterteilt werden: CD56^{dim}-Zellen sind eine Gruppe von NK-Zellen, die viele Granula und Perforin im Zytoplasma enthalten. Sie exprimieren neben CD56 auch CD16 auf ihrer Oberfläche und weisen ein hohes Potenzial an Zytotoxizität auf. Daneben sind CD56^{bright}-NK-Zellen eine andere Gruppe von NK-Zellen, die weder CD16 noch inhibitorische KIRs tragen, und auf die Zytokin-Produktion wie z.B. IFN- γ und IFN- α spezialisiert sind (Campbell *et al.*, 2001). Man nimmt an, dass die CD56^{bright}-NK-Zellen sich als Vorläufer der CD56^{dim}-Subpopulation verhalten (Farag *et al.*, 2006).

Neben den KIR-Rezeptoren und Rezeptoren aus der NKG2-Familie exprimieren NK-Zellen auch noch eine andere Gruppe von Rezeptoren, die nicht spezifisch für MHC-I-Moleküle sind. Solche Rezeptoren werden als natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren (*natural cytotoxicity receptors*, NCRs) bezeichnet, zu denen NKp30, NKp44 und NKp46 gehören. Sie sind in der Lage, an tumorspezifische und virale Oberflächen-Antigene zu binden, und eine zytotoxische Reaktion der NK-Zellen

zu vermitteln (Sivori *et al.*, 2000; Moretta *et al.*, 2000; Mandelboim *et al.*, 2001; Vitale *et al.*, 1998). Die von Viren infizierten Zellen können auch durch CD16 (FcγRIII), der ein niedrigaffiner Rezeptor für den Fc-Teil von IgG-Antikörpern ist, erkannt werden. CD16 gibt den NK-Zellen aktivierende Signale weiter, wenn Antikörper an einer Zelloberfläche geclustert vorliegen. Es löst dann die sog. „*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*“ (ADCC) aus (Lanier *et al.*, 1998).

1.5 KIR-Rezeptoren und ihre Liganden

Die KIR (*Killer-cell Immunoglobulin like receptor*)-Rezeptor-Familie ist nicht nur polygen, sondern auch polymorph. Insgesamt 15 KIR-Gene sind bisher im Menschen beschrieben worden (Uhrberg *et al.*, 1997; 2002 und 2005a). Sie kodieren als Gen-Cluster auf dem humanen Chromosom 19, im sogenannten Leukozyten-Rezeptor-Komplex (*leukocyte receptor complex*, LRC) (Torkar *et al.*, 1998). Die Expression der KIR-Gene wird hauptsächlich durch epigenetische Modifikationen reguliert. Es wurde gezeigt, dass durch die DNA-Methylierung eines konservierten CpG-Bereichs im Promotor der KIR-Gene klonale KIR-Expressionsmuster aufrechterhalten werden. (Santourlidis *et al.*, 2002). Basierend auf der genetischen Struktur können zwei Gruppen von Haplotypen unterschieden werden: Haplotyp A und B (Uhrberg *et al.*, 1997). Der Haplotyp A besitzt KIR3DL3, KIR2DL3, KIR2DL1, KIR2DL4, KIR3DL1, KIR2DS4 und KIR3DL2. Im Vergleich dazu ist Haplotyp B stärker variabel und besitzt mehr stimulatorische KIR-Rezeptoren.

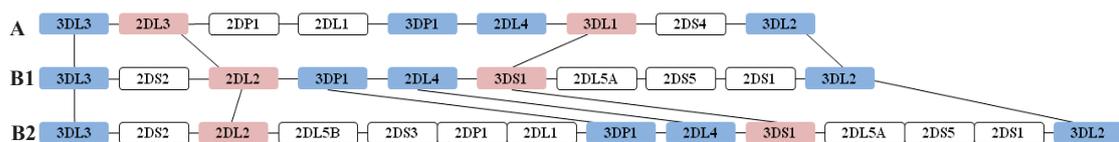


Abb.1- 2: Schematische Darstellung der genomischen Struktur der KIR-Haplotypen. Die rosa und blau markierten sind die „*Framework*“-Gene (modifiziert nach Martin *et al.*, 2003).

Von den bisher bekannten 15 KIR-Genen kommen vier, 3DL3, 3DL1, 2DL4 und

3DL2, in allen Haplotypen vor und werden deswegen als „Framework“-Gene bezeichnet. Davon befindet sich KIR2DL4 in der Mittel, wobei KIR3DL2 am telomeren Ende liegt (Martin *et al.*, 2003). Die KIR-Rezeptoren unterscheiden sich voneinander sowohl in der Anzahl der Immunglobulin-Domänen als auch in der Länge ihrer zytoplasmatischen Anteile. Die inhibitorischen Rezeptoren haben eine lange zytoplasmatische Domäne (L steht für lang), während die stimulatorische Rezeptoren eine kurze zytoplasmatische Domäne (S steht für *short*) besitzen.

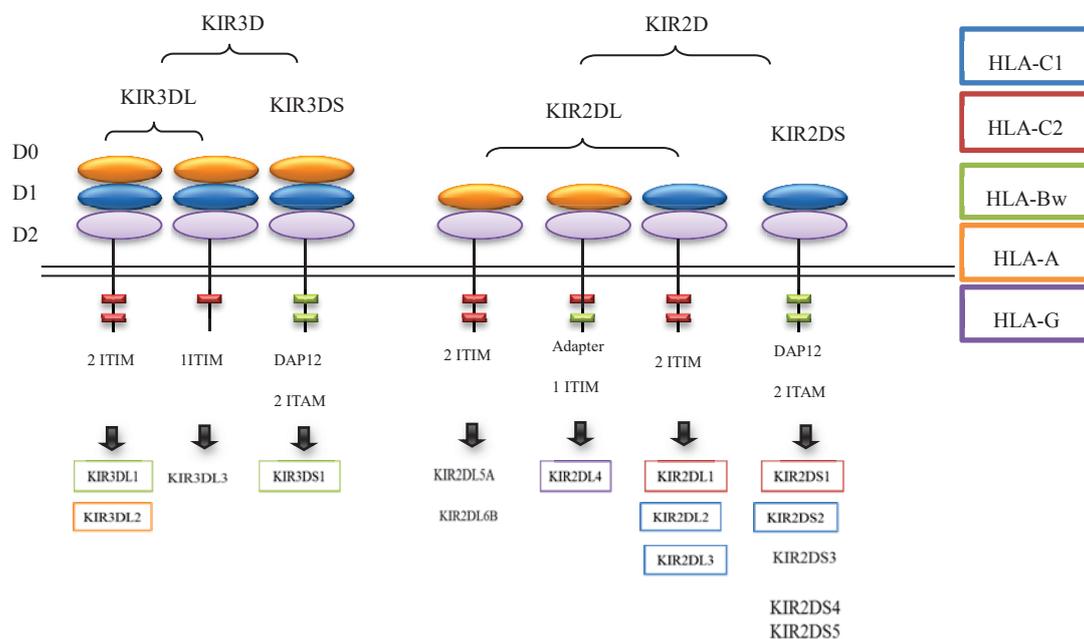


Abb.1- 3: Strukturelle Darstellung der inhibitorischen und aktivierenden KIR-Rezeptoren und ihrer HLA-Liganden. Modifiziert nach (Borrego *et al.*, 2001).

In Abhängigkeit vom *KIR*-Genotyp exprimiert jede NK-Zelle eine bestimmte, von Zelle zu Zelle unterschiedliche Kombination von KIR auf der Oberfläche, wodurch das sogenannte KIR-Repertoire entsteht (Manser *et al.*, 2015). Diese spezifische Kombination wird klonotypisch an die Tochterzellen weitergegeben (Valiante *et al.*, 1997). Die inhibitorischen KIR-Rezeptoren binden an HLA-I-Moleküle, insbesondere HLA-C: KIR2DL1, KIR2DL2, und KIR2DL3 binden an unterschiedliche allele Subgruppen von HLA-C: KIR2DL1 an HLA-C2, KIR2DL3 an HLA-C1, und KIR2DL2 sowohl an HLA-C1 als auch -C2. Weiterhin bindet KIR3DL1 (NKB1) an das HLA-B-kodierte Epitop HLA-Bw4 (Gumperz *et al.*, 1995), und KIR3DL2

(CD158k) an HLA-A, Die Affinität des KIR2DL2 an HLA-C2 ist schwächer als die von KIR2DL1 (Colonna *et al.*, 1993; Colonna *et al.*, 1995). Nach der Bindung an seinen HLA-Liganden kann die NK-Zelle so inhibiert werden. Generell scheinen inhibitorische KIR-Rezeptoren eine höhere Affinität zum jeweiligen Liganden aufzuweisen als die aktivierenden KIR-Rezeptoren deren Liganden allerdings nur sehr unvollständig bekannt sind (Gomez *et al.*, 1998).

Die inhibitorischen KIR-Rezeptoren besitzen ein zytoplasmatische Domäne mit sogenannten ITIMs (*immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motifs*). Diese Signalmotive können über SH2-enthaltende Tyrosin-Phosphatasen eine Hemmung der NK-Zellen vermitteln (Long *et al.* 1999; Vivier *et al.*, 2004). Dagegen weisen die stimulatorischen KIR-Rezeptoren in ihren zytoplasmatischen Anteilen nur sehr kurze Ketten ohne ITIM-Motive auf. Dieser Sachverhalt schlägt sich in der KIR-Nomenklatur nieder, wo das L für *long* also lange zytoplasmatische Kette und damit Inhibition steht (z.B. KIR3DL1) und das S für *short* also kurze zytoplasmatische Kette steht (z.B. KIR3DS1). Sie enthalten aber eine positiv geladene Aminosäure (Arginin oder Lysin) in ihrer Transmembrandomäne, mit der sie über das negativ geladene Adaptormolekül DAP12 (oder auch *killer cell activating receptor associated protein*, KARAP), welches ein sogenanntes ITAM-Motiv (*immunoreceptor tyrosin-based active motif*) besitzt, interagieren können. Die ITAMs können über die Bindung der Protein-Tyrosin-Kinase Syk sowie ZAP70 eine Aktivierung der NK-Zellen auslösen (Lanier *et al.*, 1998; Tomasello *et al.*, 1998).

Innerhalb aller KIR-Rezeptoren stellt KIR2DL4 eine Besonderheit dar, da er nicht klonotypischer exprimiert wird, sondern bei allen NK-Zellen auftritt. Außerdem ist KIR2DL4 ein Zwitter-Molekül. Es besitzt nicht nur ITIM, sondern auch eine positiv-geladene Aminosäure in der Transmembran-Domäne. Aufgrund dieser einzigartigen Eigenschaften hat KIR2DL4 nicht nur stimulatorische, sondern auch inhibitorische Funktionen (Garrington *et al.*, 2003; Kikuchi-Maki *et al.*, 2005). Die Besonderheiten lassen vermuten, dass KIR2DL4 unter verschiedenen Bedingungen unterschiedliche Funktionen ausüben kann (Goodridge *et al.*, 2003). Als einziger KIR-Rezeptor wird KIR2DL4 von allen NK-Zellen entweder intrazytoplasmatisch

oder auf der Zelloberfläche exprimiert (Cantoni *et al.*, 1998; Husain *et al.*, 2002; Valiante *et al.*, 1997). Es wurde in der Literatur beschrieben, dass der Ligand des KIR2DL4 HLA-G ist, welcher nicht zu den klassischen HLA-Klasse-I-Molekülen gehört. HLA-G wird auf der Oberfläche der fetalen Plazentazellen exprimiert, seine Funktion ist noch nicht vollständig geklärt, aber eine Hypothese wäre, dass HLA-G an der Entstehung der immunologischen Toleranz gegen den Embryo beteiligt ist (Rajagopalan *et al.*, 1999; Iams *et al.*, 2004).

1.6 Zytotoxizität der NK-Zellen und Killing-Assay

Die Erkennung der Ziel- bzw. allgemein als *Target* bezeichneten Zellen führt zu dynamische Veränderungen in der Morphologie der NK-Zelle. Die lytischen Granula wandern durch die zytoskelettalen Strukturen zum Erkennungsort (Kuhn *et al.*, 2002). Die Granula-Membran fusioniert mit der Plasmamembran, und die Inhaltsstoffe der Granula werden freigesetzt. CD107a und CD107b, auch als „*m-associated membrane proteins*“ (LAMP-1 und LAMP-2) bezeichnet, werden auf der Innenseite der Granula-Membran exprimiert und werden durch die Degranulation auf die Zelloberfläche gebracht. Es wird davon ausgegangen, dass die Aufgabe von CD107 darin besteht, die Granula-Membran vor den lytischen Inhaltsstoffen der Granula zu schützen (Andrejewski *et al.*, 1999).

NK-Zellen besitzen spezielle lytische Granula, die essentielle „Waffen“ sowohl der NK-Zellen als auch der zytotoxischen T-Zellen sind, und Perforin (*pore forming Protein*) sowie Granzym B enthalten (Peters *et al.*, 1991). Nach Erkennung der *Target*-Zelle kommt es zur höchsten Aktivierungsstufe der NK-Zelle. Die Granula sammeln sich an dem Kontaktort und fusionieren, durch einen Anstieg der Ca^{2+} -Ionen, mit der Membran, wodurch Perforin und Granzym B in die Immunsynapse freigesetzt werden (Liebermann *et al.*, 2003). Perforin und Granzym B, eine Serin-Protease, werden nur in NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen exprimiert (Page *et al.*, 1998; Liebermann *et al.*, 2003). Granzym B, welches die Asparagin-Reste der Proteine in der

Target-Zelle spaltet, gelangt durch Endozytose in die *Target-Zelle* (Motyka *et al.*, 2000; Trapani *et al.*, 2002). Hier spielt das Perforin eine wichtige Rolle. Perforin bildet in der Vesikelmembran Poren und kann damit das Granzym B in das Zytoplasma der Zelle freisetzen. Perforin kann auch direkt in der Zellmembran der *Target-Zelle* Poren bilden. Nach dem Eindringen des Granzym B in die *Target-Zelle* kommt es dann durch Aktivierung von Kaspasen zur Apoptose der *Target-Zelle* (Cullen *et al.*, 2008).

Basierend auf der CD107-Expression auf der NK-Zelloberfläche wurde eine Methode entwickelt, durch welche die Freisetzung der zytotoxischen Stoffe von NK-Zellen festgestellt werden kann, der sogenannte CD107-Assay. Hierbei wird die Expression von CD107 auf der Oberfläche der NK-Zellen als Marker für die Degranulation und somit indirekt der Zytotoxizität gemessen (Uhrberg *et al.*, 2005). Dabei werden die CD107-Proteine nach der Kokultivierung der NK-Zellen mit *Target-Zellen* (HLA-Klasse-I-defekte Zellen K562) für bestimmte Zeit mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Nur solche NK-Zellen, die ihre *Target-Zellen* getroffen und Granula freigesetzt haben, exprimieren CD107 auf ihrer Oberfläche, so dass CD107 als Korrelat für die Zytotoxizität der NK-Zelle angesehen werden kann.

1.7 Von hämatopoetischen Stammzellen zu NK-Zellen

Am Anfang der Hämatopoese steht die asymmetrische Zellteilung der hämatopoetischen Stammzellen. Unter einer asymmetrischen Zellteilung versteht man, dass nach der Zellteilung eine Tochterzelle die Stammzeleigenschaften weiter behält, während die andere die Fähigkeit, sich selbst unter Erhaltung der Pluripotenz zu reproduzieren, verliert und sich ausdifferenziert. Aus dieser Zelle kann eine reife Zelle, die jeder Blutzelltyp sein kann, ausdifferenziert werden (Ogawa *et al.*, 2002). Wie im Abschnitt 1.1 schon erwähnt, tragen die hämatopoetischen Stammzellen (HSC) das Phosphoglykoprotein CD34 als Zeichen für undifferenzierte pluripotente Zellen auf ihrer Oberfläche. Gleichzeitig sind sie negativ für alle bekannten Oberflächenmarker

reifer hämatopoetischer Zellen (meist als „lineage“ Marker bezeichnet, Abk.: lin⁻). Generell sind CD34-exprimierende Zellen vorwiegend im Knochenmark (BM), im Nabelschnurblut (CB), und in geringen Mengen auch im peripheren Blut zu finden (Terstappen *et al.*, 1991; Civin *et al.*, 1996). Weiterhin können CD34-positiven Zellen mit G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) aus dem Knochenmark in das peripherische Blut mobilisiert werden. Die Anreicherung hämatopoetischer Stammzellen im Rahmen klinischer Transplantationen nutzt diese Eigenschaften aus, so dass CD34⁺ HSCs von Spendern isoliert werden können, ohne dass dieses operative Knochenmark entnommen werden muss. Im Menschen findet die NK-Zellentwicklung aus HSCs im Knochenmark statt (Di Santo *et al.*, 2006; Caligiuri 2008). Daran sind auch Endothelzellen beteiligt, deren Aufgabe darin besteht, die zur NK-Zellentwicklung notwendigen Zellkontakte und Zytokine zur Verfügung zu stellen (Yu *et al.*, 2013; Dezell *et al.*, 2012).

In Anwesenheit der Zytokine IL-3, IL-7, IL-2, SCF (*stem cell factor*) und Flt-3-Liganden können die CD34⁺CD38⁻Lin⁻ HSC-Zellen zu NK-Zellen ausdifferenziert werden (Miller *et al.*, 1999; Nakajima *et al.*, 2002). Der Erfolg dieses *in vitro* Kultursystems beruht wesentlich auf der Kokultivierung mit adhärenenten Stromazellen. In der vorliegenden Arbeit wurden eine murine Stromazelllinie aus Knochenmark (EL08), murine Sternzellen der Leber, sowie humane mesenchymale Stammzellen für die Kokulturen als *Feeder*-Zellen verwendet. Diese Typen von *Feeder*-Zellen bieten den CD34⁺-Zellen Zellkontakt an, und sind in der Lage, IRF-1 (der Transkriptionsfaktor *interferon-regulatory factor-1*) zu produzieren. IRF ist ein essenzieller Faktor für die Entstehung der NK-Zellen. So haben IRF-1 „*knock-down*“-Mäuse einen Defekt bei der NK-Zellentwicklung (Ogasawara *et al.*, 1998).

Der ganze Entwicklungsprozess der NK-Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen kann in mehrere Stadien unterteilt werden. In der initialen Phase kommt es zunächst zur Determination der HSC in die lymphatische Richtung. In diesem Stadium wird der NK-Progenitor (NKP) generiert, der später nur noch in Richtung NK-Zelle ausdifferenzieren kann. Der NKP lässt sich phänotypisch über die Expression von

CD34 und IL-2/IL-15 Rezeptoren sowie die Abwesenheit von CD56 charakterisieren (Becknell *et al.*, 2005). In dieser Phase exprimieren die Zellen auch andere lymphatische Marker, wie z. B. CD43 und CD45RA auf ihrer Oberfläche. In der nächsten Phase kommt es zur Ausreifung des NKPs in phänotypisch und funktional charakteristische NK-Zellen. Während der NK-Zellentwicklung ist die Expression des NKG2A-Rezeptors ein charakteristischer Schritt. Es ist ein Zeichen dafür, dass sich die differenzierenden Zellen zu funktionalen NK-Zellen differenzieren. Wenn sich die CD56^{bright} NK-Zellen zu CD56^{dim} NK-Zellen entwickeln, wird die NKG2A-Expression reduziert, gleichzeitig steigt die KIR-Expression sowie die CD16-Expression an. Diese Reihenfolge ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konstant (Blom *et al.*, 2006; Freud *et al.*, 2006; Caligiuri 2008).

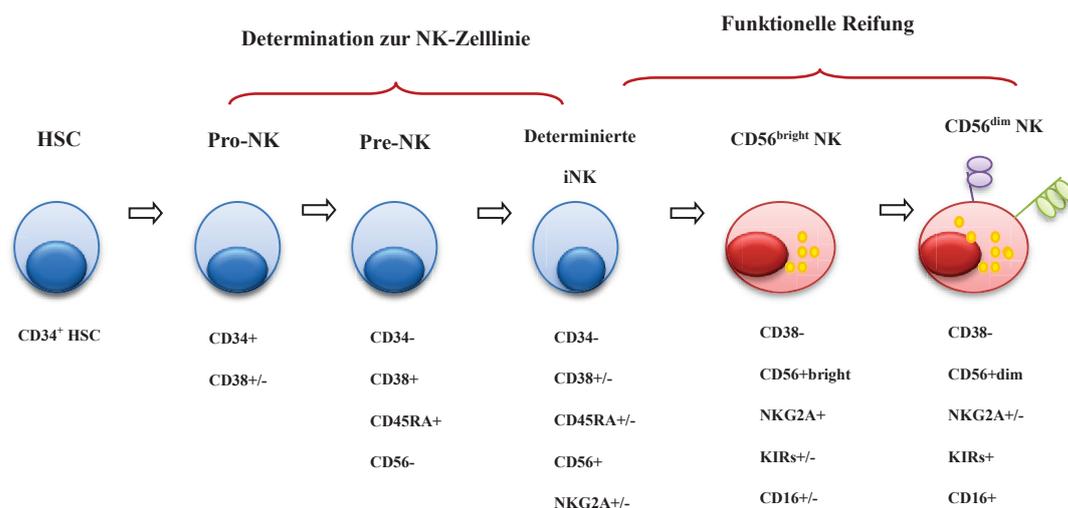


Abb.1- 4: schematische Darstellung der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu NK-Zellen (modifiziert nach Blom *et al.*, 2006 und Freud *et al.*, 2006).

Die Endphase beinhaltet den Export der NK-Zellen zu den peripheren Organen, und es kommt zur Ausbildung der Effektorfunktionen, nämlich der Zytotoxizität und der Produktion von Zytokinen (Colucci *et al.*, 2003).

CD56 ist ein charakteristischer Oberflächenmarker der NK-Zellen (Rees *et al.*, 2002). Er wird schon im frühen Stadium der NK-Zellentwicklung von den Zellen exprimiert. Wie bereits in Abschnitt 1.4 erwähnt, können humane NK-Zellen (aber nicht murine!) mittels der Intensität der CD56-Expression in zwei Untergruppen unterteilt werden.

Die CD56^{bright} NK-Zellen exprimieren CD56 sehr stark auf ihrer Oberfläche, wobei die NK-Zellen, die CD56 mit einer niedrigeren Intensität auf ihrer Oberfläche exprimieren, als CD56^{dim} NK-Zellen bezeichnet werden. CD56^{dim} entwickeln sich aus CD56^{bright} NK-Zellen (Chan *et al.*, 2007; Ouyang *et al.*, 2007). Die CD56^{bright} NK-Zellen sind in der Lage, verschiedene Zytokine zu produzieren, wie z.B. IL-3, IL-10, IL-13, INF- γ und - β (Fehniger *et al.*, 1999; Cooper *et al.*, 2001). Die CD56^{bright} NK-Zellen sind hauptsächlich für NKG2A positiv, sowie ILT2 (*immunoglobulin-like transcript 2*) negativ. Hingegen exprimieren die CD56^{dim} NK-Zellen NKG2A mit einer niedrigeren Häufigkeit. Die Expression von KIRs oder CD16 auf CD56^{bright} NK-Zellen ist sehr beschränkt. Nur eine kleine Gruppe von CD56^{bright} NK-Zellen weisen KIRs sowie CD16 auf ihrer Oberfläche auf, und schwache Tendenz der Expression von klonotypischen KIR-Rezeptoren ist zu detektieren. (Freud *et al.*, 2006; Caligiuri *et al.*, 2008; Beziat *et al.*, 2011).

Die KIR-Expression der CD56^{dim} ist deutlich höher im Vergleich zu den CD56^{bright} NK-Zellen und sie exprimieren klonotypischen KIR-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Darüber hinaus exprimieren die CD56^{dim} NK-Zellen ILT2 und CD16 (Cooper *et al.*, 2011; Jacobs *et al.*, 2011). Innerhalb dieser Phase, von CD56^{bright} zu CD56^{dim}, regulieren die NK-Zellen KIR-Rezeptoren und CD16 auf ihren Oberflächen hoch und sind dann in der Lage, durch Oberflächenrezeptoren die *Target*-Zellen zu binden und durch entsprechende Signale zytotoxisch abzutöten. Nach dieser Phase der NK-Zellentwicklung werden die entstandenen Zellen auch als zytotoxische NK-Zellen bezeichnet.

1.8 Korrelation der KIR-Expression mit dem HLA-Klasse-I-Typ und klinische Relevanz der KIR/HLA Interaktion

Während der funktionalen Reifung der NK-Zellen, spielt die Interaktion zwischen HLA-Klasse-I-Molekülen und KIR-Rezeptoren eine wichtige Rolle. Im Abschnitt 1.4 wurde die „missing-self“ Hypothese erwähnt, die zeigt, dass die NK Zellen nach der

funktionalen Reifung in der Lage sind, die Zellen, die keine eigenen HLA-I-Moleküle exprimieren, zu erkennen, und durch Zytotoxizität abzutöten (Ljunggren *et al.*, 1990; Karre *et al.*, 1986). In der Literatur wurde gezeigt, dass nur solche NK-Zellen, die eigene inhibitorische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren, die Fähigkeit der *Target*-Erkennung und nachfolgenden *Target-Killing* während der NK-Reifung erzielen können. An diesem Reifungsprozess sind HLA-Klasse-I-Moleküle beteiligt (Anfossi *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008; Yokoyama *et al.*, 2006). Weiterhin ist in der Literatur beschrieben, dass die Anwesenheit eines HLA-I-Liganden die Expression des entsprechenden KIR-Rezeptors erhöht. So ist z.B. die Häufigkeit von KIR2DL1-exprimierenden NK-Zellen in Anwesenheit seines Liganden HLA-C2 deutlich erhöht, während in Spendern, welche das HLA-C1 Epitop besitzen, die Expression des spezifischen Rezeptors KIR2DL3 erhöht ist. Auch im Fall von HLA-B führt die Anwesenheit des HLA-B-kodierten Epitops Bw4 zu einer Erhöhung der Frequenz von NK-Zellen die den entsprechenden spezifischen KIR3DL1 exprimieren. (Gumperz *et al.*, 1995; Yawata *et al.*, 2006; Schönberg *et al.*, 2011a; Sleiman *et al.*, 2014). Die HLA Abhängigkeit der KIR Expression ist abhängig von der Gendosis und insofern stärker zu beobachten in Spendern die zwei Kopien des entsprechenden HLA-Allels besitzen.

Der Polymorphismus der *KIR*-Gene sowie ihrer Liganden ist in vielerlei Hinsicht klinisch relevant und beeinflusst z.B. auch die Stammzell-Transplantation für Leukämiepatienten (Fischer *et al.*, 2007), sowie die Kontrolle von Virusinfektionen. So beeinflusst die Anwesenheit des *KIR2DL3* Gens und seinen Liganden, *HLA-C1* die Beseitigung einer Virusinfektion mit Hepatitis C (Khakoo *et al.*, 2004). Weiterhin wurde für die Kombination von *KIR3DS1* und *HLA-Bw4* beschrieben, dass sie die Progression der AIDS Erkrankung in HIV1-infizierte Patienten hemmen können (Martin *et al.*, 2002). Auf der anderen Seite scheint die Anwesenheit von *KIR3DS1* die Gefahr von zervikaler Neoplasie zu erhöhen, besonders im Fall der Abwesenheit des entsprechenden inhibitorischen KIR-Rezeptors *KIR3DL1* für den gleichen Liganden (Carrington *et al.*, 2005; Kuśnierczyk *et al.*, 2013). Schließlich ist die Wahrscheinlichkeit einer Fehlgeburt besonders hoch, wenn die Mutter den *KIR*

AA-Typ besitzt, und gleichzeitig HLA-C2 im Fetus vorhanden ist (Hiby *et al.*, 2004; Hiby *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014).

Aufgrund der vielfältigen Assoziationen von KIR und HLA-I mit verschiedenen Krankheiten ist es wichtig herauszufinden, wo und wann die Anpassung der KIR-Expression an die polymorphen HLA-I-Produkte erfolgt. Passiert dies bereits während der NK-Zellentwicklung oder erst nach dem Zusammentreffen mit entsprechenden Pathogenen?

1.9 Mesenchymale Stammzellen (MSC) als Support für *in vitro* NK-Zelldifferenzierung

Die mesenchymale Stammzellen entwickeln sich aus Mesoderm. Es handeln sich um Stammzellen des Stütz- und Bindegewebes, die in der Lage sind, sich mit hohem Potenzial zu proliferieren und zu differenzieren. Die MSC-Zellen besitzen die Fähigkeit, sich zu Knochen, Knorpeln, Myozyten oder Fettgeweben auszudifferenzieren (Oni 1992; Brighton *et al.*, 1997; Pittenger *et al.*, 1999; Kemp *et al.*, 2005). Andererseits können die MSC-Zellen nicht zu hämatopoetischen Zellen ausdifferenzieren. Die MSC-Zellen befinden sich hauptsächlich im Knochenmark, können aber aus fast allen Geweben isoliert werden. Sie sind adhärent wachsende Zellen, und ihre Morphologie ist ähnlich wie die von Fibroblasten (Nardi *et al.*, 2006; Porcellini *et al.*, 2009). Eine typische MSC-Zelle besitzt einen basalen Zellkörper mit Protrusionen, die sich lang und dünn ausbreiten können. Damit können die Zellen an einer bestimmten Fläche anhaften und wachsen (Netter *et al.*, 1987; Brighton *et al.*, 1991).

In ihrer Eigenschaft als spezialisierte Stromazelle vermitteln MSC zusammen mit hämatopoetischen Stammzellen eine einzigartige Knochenmarknische (Mendez-Ferrer *et al.*, 2010). Ihre Sekretion vieler Proteine, die zu den Bausteinen der Extrazellulärmatrix gehören, ist essentiell für die Unterstützung der Hämatopoese, die im Knochenmark stattfindet. Darüber hinaus bieten die MSC-Zellen den

hämatopoetischen Stammzellen einen Zell-Zell-Kontakt an, der für den Prozess der NK-Zellentwicklung aus HSCs erforderlich ist (Mendez-Ferrer *et al.*, 2010; Branch *et al.*, 2012). Zudem sind die humanen MSC-Zelllinien, die unter GMP-Bedingungen hergestellt werden, für die klinische Forschung und klinische Anwendungen von größerer Bedeutung als die murine *Feeder*-Zelllinien für die NK-Zelldifferenzierung *in vitro*. Schließlich sind MSC-Zelllinien mit unterschiedlichen HLA-Klasse-I-Typen ideale *Feeder*-Zellen um zu untersuchen, welchen Einfluss der HLA-Klasse-I-Polymorphismus für die KIR-Expression der NK-Zellen im Rahmen der NK-Zellentwicklung aus HSCs hat.

1.10 Von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) zu NK-Zellen *in vitro*

Bei iPS-Zellen handelt es sich um pluripotente Stammzellen, die durch künstliche Reprogrammierung aus bereits differenzierten somatischen Zellen, z.B. Hautfibroblasten, generiert werden können. Die Herstellung der pluripotenten Stammzellen erfolgt durch die ektopische Expression spezieller Transkriptionsfaktoren der frühen Embryogenese (z. B. Oct4, Sox2 usw.). Im Rahmen dieser somatischen Reprogrammierung, bei der es zu erheblichen epigenetischen Veränderungen auf der Ebene der DNA-Methylierung und Histonmodifikationen zurück zu einem Stammzell-Phänotyp kommt, erlangen die Zellen wieder die Fähigkeit, sich zu allen Körperzelltypen auszudifferenzieren. Zwar zeigen die iPS-Zellen viele ähnliche Eigenschaften wie die natürlich vorkommenden embryonalen Stammzellen (ES-Zellen), jedoch ist noch ungeklärt, inwieweit die heutigen iPS-Zellen mit den ES-Zellen phänotypisch und funktional identisch sind (Takahashi *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2007). Die iPS-Zellen haben ein hohes medizinisches Potential, um genetische Erkrankungen besser *in vitro* „modellieren“ zu können und nicht zuletzt auch weil die Herstellung von iPS-Zellen weniger ethisch/moralische Probleme mit sich bringt als die Forschung an ES-Zellen,

die aus Embryonen gewonnen werden.

Es ist seit längerem bekannt, dass der Differenzierungsprozess von ES-Zellen zu NK-Zellen *in vitro* durchgeführt werden kann (Kaufman *et al.*, 2001; Woll *et al.*, 2005). Da die iPS-Zellen ähnliche Eigenschaften wie ES-Zellen besitzen, war anzunehmen, dass die Differenzierung von NK-Zellen auch aus iPS-Zellen durchgeführt werden kann; sie bietet damit eine Möglichkeit, die NK-Zelldifferenzierung näher zu untersuchen und besser zu verstehen. Im Vergleich zu dem etablierten Prozess der Entwicklung von HSCs zu NK-Zellen, kann die NK-Zelldifferenzierung aus iPS-Zellen auch den Prozess der frühen Hämatopoese umfassen. Dadurch lässt sich der Entwicklungsprozess von NK-Zellen in frühen Stadien unter definierten Bedingungen durchführen, um mehr Details über die frühe Entstehung von NK-Vorläuferzellen sowie von lymphatischen Vorläuferzellen zu finden und zu analysieren.

1.11 Ziel der Arbeit

NK-Zellen exprimieren inhibitorische Rezeptoren der KIR-Familie, mit denen sie die Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen auf den Körperzellen kontrollieren und so maligne und virus-infizierte Zellen identifizieren können. Um diese Aufgabe effektiv erfüllen zu können, adaptieren NK-Zellen die Frequenz und Menge der jeweiligen benötigten KIR-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, um die hochpolymorphen HLA-Klasse-I-Liganden effektiv detektieren zu können. Ob diese Adaption während der NK-Zelldifferenzierung oder erst in reifen NK-Zellen stattfindet ist bisher unklar. Ziel dieser Arbeit war, die Rolle der HLA-Klasse-I-Liganden während der NK-Zelldifferenzierung zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde ein neues, in diesem Labor entwickeltes *in vitro* System eingesetzt, bei dem hämatopoetische Stammzellen zu NK-Zellen ausdifferenziert werden können und zwar in Anwesenheit von HLA-Klasse-I-exprimierenden MSC, welche als Korrelat einer humanen Stammzellnische fungierten. Durch Einsatz verschiedener MSC mit verschiedenen

HLA-Klasse-I-Molekülen sollte so u.a. festgestellt werden, ob sich die Expression der entsprechenden KIR während der Differenzierungsphase an die vorhandenen HLA-Klasse-I-Moleküle anpasst. Weiterhin sollte festgestellt werden, wie sich die Herunterregulation der HLA-Klasse-I-Expression durch RNA-Interferenz auf den MSC sowie die Modulation der KIR-Expression auf die NK-Zelldifferenzierung auswirkt. Ein verbessertes Verständnis dieser Faktoren ist für den immuntherapeutischen Einsatz von NK-Zellen, z.B. gegen Tumorzellen von großer Bedeutung.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tab.2- 1: Geräte

Gerät	Name	Firma
Bestrahlungsgerät	RS225	GULMAY Incorporated
Cell Dyn	3500R	Abbott Laboratories
CO ₂ -Brutschrank	IG150	Jouan
Durchflusszytometer	Cytomics FC 500	Beckman Coulter
Durchflusszytometer	Cyan	Beckmann Coulter
Durchflusszytometer	FACSCanto	Beckman Coulter
Elektroporator	Pulse Controller Plus Capacitance Extender Plus Gene Pulser® II	Bio RAD
Floureszenz Mikroskop	Axioplan 2 AxioCam HRC	Zeiss
Gel-Kamara	E.A.S.Z. 429K	Herolab
Gefrierschrank -20°C		Liebherr
Gefrierschrank -80°C		Thermo Scientific
Hitzbläcke		Neolab
Inkubationsschüttler	Schüttelapparate 3005-3020 Modell G25	GFLGesellschaft für Labortechnik
Inkubator	Certomat H	B.Braun
Kühlschrank 4°C		Bosch
Küvetten	2-mm-Elektroporationsküvetten	peqLab
Mikroskop	Wilovert S	Hund
Nanodrop	NanoDrop®N-1000	peqLab Biotechniques

Thermo Cycler für	ABI PRISM™ Sequence	PE Applied Biosystems
Real-Time-PCR	Detector 7700	PE Applied Biosystems
Thermocycler	GeneAmpPCR System 9700 und 2700	PE Applied Biosystems
Thermocycler	Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermocycler	ABI Prism 7900HT Sequence Detection System	Appliet Biosystems
Thermocycler	ABI Prism Sequence Detector 7700	Appliet Biosystems
Thermocycler	GeneAmpPCR System 9700	Appliet Biosystems
Ultraschall Desintegrator	Vibra-Cell 75022	Bioblock Scientific
Vortex		IKA
Waage	Precisa600	Oehmen Labortechnik
Zellsorter	MoFlo XDF	Bechman Coulter
Zentrifuge	Zentrifuge Mikro20	Hettich-Zentrifugen
Zentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge(S2)	Biofuge Stratos, Rotor #3335	Thermofischer

2.1.2 Materialien für die Zellkultur

Tab.2- 2: verwendeten Materialien für die Zellkultur

Material	Firma
Advanced DMEM-Medium	Gibco
Deckgläschen	Menzel
Dispase	StemCell
DMEM-Medium high Glucose	Gibco
DMEM-Medium low Glucose	Gibco
DMSO	Sigma
Eppendorfgefäße 0,5, 1 und 2 ml	Eppendorf
FCS	Biochrom
Ficoll(Bicoll)	Biochrom

Humanes Serum Albumin	StemCell und Biochrom
Kanüle	BD Pharma
Küvette	Peglab
MACS-Säule	Miltenyi
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
Objektträger	Engelbrecht
Parafilm	P.Plastik Packaging
Penicillin/Streptomycin	Gibco
RPMI 1640	Lonza
Sterilfilter 0,45 und 0,25µm	Millipore
Sterilpipette 5, 10, und 25ml	Corning
Transfektionsküvetten	Amaxa
Trypanblau(0,4%)	Sigma
Typsin	Gibco
Zellkulturflasche	Corning
Zellkulturplatten 6, 12, 24, 48, 96 Well	Corning
Zellschaber	Greiner
Zentrifugationstube 5 und 25 ml	Greiner

2.1.3 Zellmaterial und Zelllinien

AFT: murine fätale Leberzelllinie

Frische NK-Zellen: isoliert aus Nabelschnurblut (CB) und Periphere Blut (PB)

CD34⁺ Zellen: isoliert aus CB oder Knochenmark (KM)

Hek293T: menschliche embryonale Nierenzellen

K562: HLA-defiziente Zellen, als *Target* für NK-Zellen

EL08: murine embryonale hepatische Stroma Zellen

OP9: murine Knochenmark Stroma Zelllinie

OP9-Delta: murine Knochenmark Stroma Zelllinie, in deren Genom das Delta-Ligand-Gen integriert wurde, und die Delta-Ligand auf

- ihrer Oberfläche exprimiert.
- Fibroblast: menschliche Fibroblasten Zellen
- STF5: menschliche immobilisierte Fibroblasten Zellen (von Dr. Sleiman aus *Laboratory of immunogenetics and allergology, Centre de Recherche Public de la Sante 'CRP-Sante', Luxembourg* zur Verfügung gestellt).
- STF1 und BRE: menschliche immobilisierte TAP-defekte Fibroblasten (von Dr. Sleiman aus *Laboratory of immunogenetics and allergology, Centre de Recherche Public de la Sante 'CRP-Sante', Luxembourg* zur Verfügung gestellt)
- NK3.3: NK-Zelllinie (Kornbluth *et al.*, 1985), *KIR*-Genotyp: *KIR2DL3*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5* und *KIR2DL4*, davon sind nur *KIR2DL3* und *KIR2DL4* exprimiert.
- NKL: eine NK-Zelllinie, die aus dem peripheren Blut eines Patienten, wer an großen Granulären Lymphozyten Leukämie (LGL) litt, hergestellt ist (Robertson *et al.*, 1996).
- iPS-Zellen: Aus Fibroblast oder CB CD34⁺ HSCs generierten pluripotenten Stammzellen (wurden von Prof. Brüstle aus Rheinische Friedrich Wilhelms Universität Bonn, zur Verfügung gestellt.)
- MEF-Zellen: murine embryonale Fibroblasten, *Feeder*-Zellen für iPS-Zellen
- UG26-Zellen: Murine Zelllinie, die die Urogenital Ridges Region (UG) repräsentiert, und von Mausembryo stammt (Oostendorp *et al.*, 2002).
- MSC: menschliche mesenchymale Stammzellen (von Prof. Meisel aus der Kinderklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt).

Tab.2- 3: Information zu verwendeten MSC-Zelllinien.

MSC	HLA-A	HLA-B	HLA-C	Spender Alte
9	A 0201	Bw6/Bw4 B 18CWNF, 51DFXB	C1/C1	3.5

16	A 03DCTR,31DCXX	Bw4/Bw4 B 4403, 5108	C2/C2	1,5
20	A 02EKGG, 26DZRP	Bw4/Bw4 B 2702, 4901	C1/C2	5
34	A 2402, 3201	Bw6/Bw6 B 3931, 4002	C1/C2	2.5
39	A 3, 33	Bw6/Bw6 B 7, 65	C1/C2	8

2.1.4 Zellkulturmedien

NK-Zell-Medium bevor Killing-Assay:

RPMI 1640-Medium, 5% human AB-Serum, 1% Penicillin/Streptomycin, 1000 U/ml IL-2, 10ng/ml IL-15.

EL08:

IMDM-Medium, 15% FCS, 5% Horse Serum, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamine, 1% no essential amino acid, 400µM β-mecarptomethanol.

Frische NK-Zellen aus CB:

RPMI 1640-Medium, 5% human AB-Serum, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, 500 U/ml IL-2, 10ng/ml IL-15.

MSC:

RPMI 1640-Medium, 1%. Penicillin/Streptomycin, Plättchen-Lysat. Das fertige Plättchen-Lysat haltige Medium für MSC-Kultivierung wurde von der Prof. Meisel Arbeitsgruppe aus der Kinderklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt

NK-Generierung-Medium 1:

1/3 Volumen HAM's F12 Medium, 2/3 Volumen DMEM high Glucose Medium, 20% human AB-Serum, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, 1000U/ml IL-2, 5ng/ml IL-3, 20ng/ml IL-7, 20ng/ml FCS (stem cell factor), 10ng/ml flt-3-Lig,

20mg/L, 50µg/L Sodium-Selenit, 24µM β-Mercaptoethanol, 50µM Ethanolamin.

NK-Zellgenerierung-Medium 2:

1/3 Volumen HAM's F12 Medium, 2/3 Volumen DMEM high Glucose Medium, 10% human AB-Serum, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, 1000 U/ml IL-2, 10ng/ml IL-15, 20ng/ml IL-7, 20ng/ml FCS, 10ng/ml flt-3-Lig, 20mg/L, 5µg/L Sodium-Selenit, 24µM β-Mercaptoethanol, 50µM Ethanolamin.

OP9 und OP9-Delta:

DMEM low Glucose Medium, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamine.

Hek293T:

DMEM high Glucose Medium, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 400µM β-Mercaptoethanol

Hek293T (für Virus-Produktion):

Advanced DMEM Medium, 2% oder 5% FCS (für Stammzellen geeignet), 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin.

Fibroblast:

DMEM high Glucose Medium, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin.

KIR-negative NK-Zellen:

RPMI 1640 Medium, 10% human AB-Serum, 1% Penicillin-Streptomycin, 1% L-Glutamin, 1000U/ml IL-2, 10ng/ml IL-15.

CD34 Generierung Medium 1:

DMEM low Glucose Medium, 10% human AB-Serum, 1% Penicillin/Streptomycin,

10ng/ml bFGF, 400µM Monothioglycerol.

CD34 Generierung Medium 2:

DMEM low Glucose Medium, 10% human AB-Serum, 1% Penicillin/Streptomycin, 100µM Monothioglycerol, 5ng/ml bFGF, 50ng/ml SCF, 5ng/ml IL-2, 20ng/ml IL-7.

K562

DMEM high Glucose Medium, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin

NK3.3 Medium:

RPMI1640 Medium, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 10% IL-2 haltiger Kulturüberstand nach Kahle (Kahle *et al.*, 1981)

NKL Medium:

RPMI1640 Medium, 10%FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 500U/ml IL-2

MACS-Puffer:

PBS, 2mM EDTA, 1% human Albumin

Standard Medium:

RPMI 1640 Medium, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin

Einfrieren Medium:

RPMI 1640 Medium, 35% FCS, 10% DMSO

iPS-Zellen Medium:

mTeSR™1-Medium, für die Haltung der human embryonalen Stammzellen.

MEF-Zellen Medium:

DMEM high Glucose Medium, 10% Knock-out Serum, 1% Penicillin/Streptomycin.

2.1.5 Zytokine für die Zellkultur

Tab.2- 4: verwendete Zytokine für Zellkultur

Zytokine	Firma
bFGF	Invitrogen
Flt-3-Ligand	Miltenyi
IL-2	Novartis
IL-3	Miltenyi
IL-6	Miltenyi
IL-7	Miltenyi
IL-15	Miltenyi
SCF	Miltenyi

2.1.6 Materialien für Bakterien

Tab.2- 5: Materialien für die Bakterien

Material	Firma
Agarose	Invitrogen
Ampicillin	Sigma
LB Broth Base	Invitrogen
Select Agar	Invitrogen
Petrischale	Corning

2.1.7 Verwendete Bakterien

E.coli SURE: e14⁻(McrA⁻)Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1lacrecB recJ sbcC:: Tn5(Kan^r) vurC(F' proAB lacI^qZΔM15Tn10(Tet^r))

Die Bakterien stammen von Gibco.

2.1.8 Vektoren

Für die Klonierung und Expression der shRNAs wurde der Vektor PCL2.THPC verwendet. Die schematische Darstellung der Vektorkarte ist in Abb.2- 1 gezeigt. Zur Klonierung von shRNAs wird der verwendete Vektor PCL2.THPC mit den Restriktionsenzymen *Clal* und *MluI* geschnitten, anschließend wird die shRNA in den Vektor ligiert. Der PCL2.THPC Vektor enthält auch GFP (*grün fluoreszierende Protein*) als Reportergen. Nach einer lentiviralen Infektion exprimieren nur die infizierten Zellen das GFP und lassen sich dadurch Durchflusszytometrie von den nicht infizierten Zellen unterscheiden.

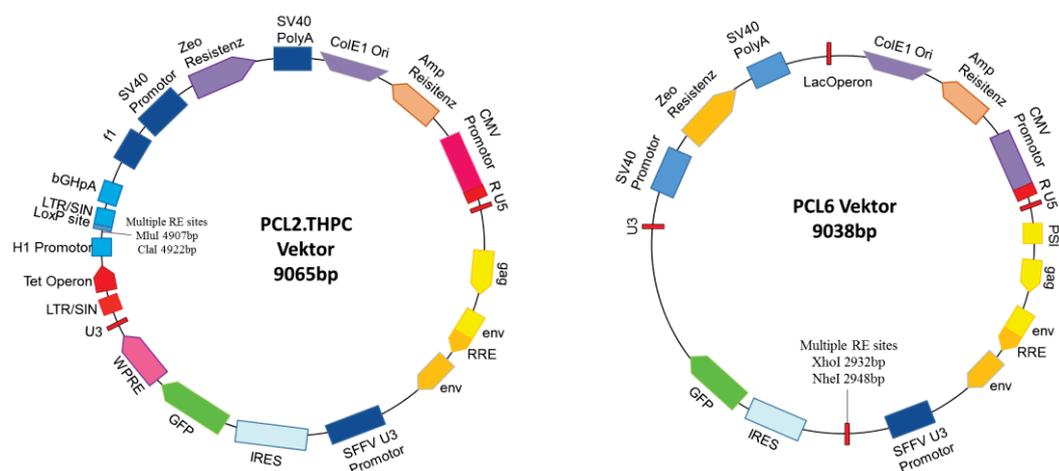


Abb.2- 1: Vektor PCL2.THPC, in dem Vektor ist ein Promotor (H1) für shRNA-Expression enthalten. Vektor PCL6, in dem Vektor ist ein Promotor SFFV U3, für cDNA-Überexpression enthalten.

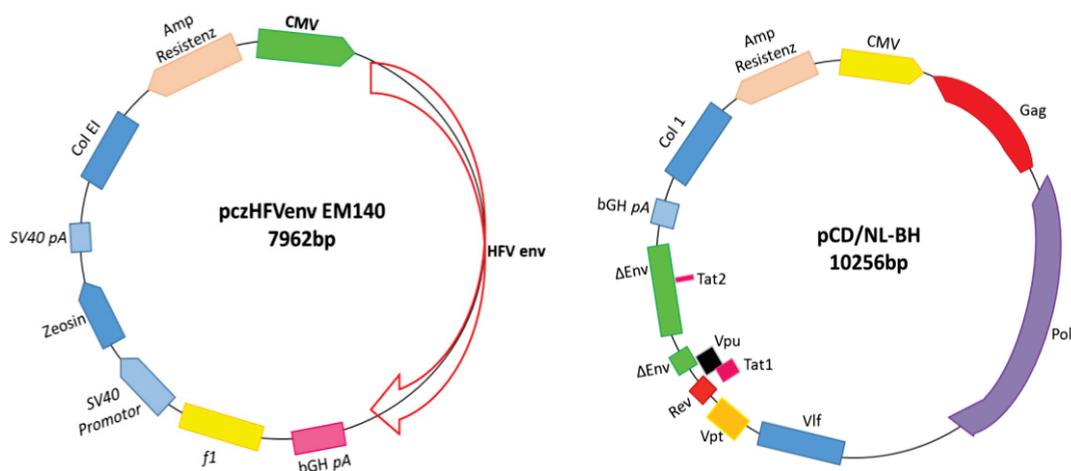


Abb.2- 2: Capsid- und Enzym-Vektorkarte. Der pczHFVenv EM140 (Capsidvektor, Foamy) dient der Verpackung von Viruspartikeln, der pCD/NL-BH (Enzymvektor, Helper) dient der Produktion von Virusproteinen.

Zur Überexpression wurden die gewünschten cDNA-Fragmente in den Vektor PCL6 einkloniert. Der PCL6-Vektor besitzt einen SFFV U3-Promotor, der für die Überexpression der einklonierten cDNA verantwortlich ist. Wie PCL2·THPC enthält PCL6 ebenfalls GFP als Reportergen. Gewünschte cDNA können mit Hilfe der Restriktionsenzymen *NheI* und *XhoI* in pCL6-Vektor einkloniert werden. Nach einer erfolgreichen lentiviralen Infektion exprimieren die infizierten Zellen sowohl die überexprimierte Fragmente als auch GFP.

Für die transiente Virusproduktion in 293T-Zellen wurden folgende Plasmide verwendet. Mit der Hilfe des Helpervektors (pCD/NL-BH) wurden die zur Produktion benötigten Proteine hergestellt, während der Capsidvektor (pczHFVenv EM140) zu der Verpackung des Virus beiträgt.

2.1.9 Enzyme und Chemikalien

Tab.2- 6: Restriktionsenzyme (mit zugehörigem 10x Puffer) zur Klonierung und Kontrolleverdau der Vektoren

Restriktionsenzym	Firma
BamHI	Invitrogen
ClaI	Invitrogen
MluI	Invitrogen
NheI	Invitrogen und Fermentas
XbaI	Invitrogen
XhoI	Invitrogen

Tab.2- 7: Chemikalien und Enzyme

Chemikalien oder Enzyme	Firma
Aqua ad iniectabilia	DeltaSelect GmbH
Advantage2 Polymerase und 10x Puffer	Clontech
Bicoll(Ficoll)	Biochrom

DNA-Leiter, 100bp(0,5mg/μl)	peqLab
DNA-Leiter, 1kb(0,1μg/μl)	Invitrogen
DNase	Qiagen
dNTPs(10mM)	peqLab
EDTA	Merck
Ethidiumbromid(1mg/ml)	Sigma
Hotstar Taq-Polymerase und 10x Puffer	Invitrogen
Lipofectalmin 2000	Invitrogen
M-MLV reverse Transkriptase(200U/μl) und 5x Puffer	Promega
Oligo (dT) 15 Primer (300 μg/ml)	Promega
PBS	Lonza
Retronektin	TAKARA BIO INC
RNase freies Wasser	Qiagen
rRNasin®, RNase Inhibitor (40 U/μl)	Promega
QuantiTest ®SYBR® Green PCR Mastermix	Fermentas
SDS	Merck
Sequencing RR-100 BigDye® Terminator und 5x Puffer	Applied Biosystems
Taq Polymerase(5U/μl) und 10x Puffer	Qiagen
T4-DNA Ligase und 5x Puffer	Invitrogen
Tris	Roth
X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent	Roche

Tab.2- 8: Antikörper für Durchflusszytometrie-Färbungen und Zellsortierung

Antikörper	Farbe	Firma
CD3	FITC, PE, PE-Cy5, APC-Cy7	Biolegend
CD8	FTTC	Beckmann Coulter
CD16	FITC, PE, PE-Cy5	Biolegend
CD34	PE, vioGreen421	Biolegend und Beckman Coulter
CD38	PE-Cy5	Biolegend

CD41	PE	Biolegend
CD45R	FITC	Biolegend
CD56	PE, PC5, PE-Dazzle	Biolegend Beckman Coulter
CD107	PE-Cy5	Beckman Coulter
CD117	PE-Cy7	Beckman Coulter
KIR2DL1	FITC, APC	Beckman Coulter
KIR2DL2/3	FITC, PE, PE-Cy5.5, PE-Cy7	Beckman Coulter und Biolegend
KIR2DS4	PE	Biolegend
KIR3DL1	PE, vioGreen421	Biolegend
HLA-A,B,C	PE	Biolegend
HLA-C,E	Unkonjugiert, IgG-FITC	Biolegend
NKG2A	FITC,PE, APC, PE-Cy7, ECD	Beckman Coulter und Biolegend
NKG2C	PE	Beckman Coulter
Perforin	FITC	Beckman Coulter

Tab.2- 9: Lösungen

Name	Zusammensetzung
DEPC-Wasser	Aqua dest. 0,1% DEPC für12h stehen, anschließend autoklavieren
HBS-Puffer	Hepes 100mM NaCl 280mM Na ₂ HPO ₄ 1,5mM
MACS-Puffer	PBS BSA oder HAS 0,5% w/v EDTA 5mM
TAE-Puffer (Tris-Acetal-EDTA)	Tris 40mM Natrimacetat 20mM EDTA 1mM pH8,5
TE-Puffer (Tris-EDTA)	Tris 89mM EDTA 2,5mM pH7

2.1.10 Kits

Tab.2- 10: verwendete Kits

Kit	Firma
CD3 Depletion Kit	Miltenyi

CD34 Isolation Kit	Miltenyi
CD56 Isolation Kit	Miltenyi
Human NK Cell Enrichment Cocktail	StemCell Technologies
Lineage Depletion Kit	Miltenyi
Plasmid DNA Purification Mini	MACHEREY-NAGEL GmbH&Co. KG
Plasmid DNA Purification Maxi	MACHEREY-NAGEL GmbH&Co. KG
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen
QIAprep Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAshredder	Qiagen
RNeasy Micro Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Rosette Easysep NK isolation KIT	StemCell Technology

2.1.11 Primer

Tab.2- 11: verwendete Primer

Primer	Sequenz 5'-3'	T _m /°C	Bandengröße/bp
sβ-Aktin cDNA	ACTGGGACGACATGGAGAAAAT	56	352
asβ-Aktin cDNA	ATAGCACAGCCTGGATAGCAAC		
sβ2M cDNA	CTCACGTCATCCAGCAGAGA	53,4	213
asβ2M cDNA	CGGCAGGCATACTCATCTTT		
sKIR2DL1 cDNA	GCA CCA TGT CGC TCT	60	356
asKIR2DL1 cDNA	GTC ACT GGG AGC TGA CAC		
sKIR2DL3 cDNA	CCTTCATCGCTGGTGCTG	60	252
asKIR2DL3 cDNA	CAGGAGACAACCTTTGGATCA		
sKIR2DL4 cDNA	CTGTCCCTGAGCTCTACAA	60	541
asKIR2DL4 cDNA	CACTGAGTACCTAATCACAG		

sKIR3DL1 cDNA	ACA TCG TGG TCA CAG GTC C	60	556
asKIR3DL1 cDNA	TGC GTA TGT CAC CTC		
sKIR3DL2 cDNA	CGG TCC CTT GAT GCC TGT	60	368
asKIR3DL2 cDNA	GAC CAC ACG CAG GGC AG		
sKIR2DS4 cDNA	CTG GCC CTC CCA GGT CA	60	450
asKIR2DS4 cDNA	GGA ATG TTC CGT TGA TGC		
sKIR2DS5 cDNA	AGA GAG GGG ACG TTT AAC C	60	416
asKIR2DS5 cDNA	GCC GAA GCA TCT GTA GGC		
s <i>NKG2A</i> cDNA	GGTAACGATAGTTGTTATT	55	325
as <i>NKG2A</i> cDNA	CCAATCCATGAGGATGGTG		
s2DL2 NheI.	CGGCTAGCCGATGTCGCTCATGGTCGTCAGC	58	1047
as2DL2 BamHI.	GATTGAGGATCCTCATGGGCAGGAGACAACTTT		
s2DL4 NheI	CGGCTAGCCGATGTCCATGTCACCCACGGTC	58	978
as2DL4 BamHI	GATTGAGGATCCTCAGATTCCAGCTGCTGGTAC		

2.1.12 shRNAs

Tab.2- 12: verwendete sh- und gsRNA

b2M sh1 (Figueiredo <i>et al.</i> , 2010)	GAATGGAGAGAGAATTGAA
	CTTACCTCTCTCTTAACTT
b2M sh2 (Figueiredo <i>et al.</i> , 2006)	GTGGGATCGAGACATGTAA _t
	CACCCTAGCTCTGTACATT
b2M sh3 (Huang <i>et al.</i> , 2006)	TTGCTATGTGTCTGGGTTT
	AACGATACACAGACCCAAA

2.1.13 Datenbank und Programm

Tab.2- 13: verwendete Datenbanken und Programme

Datenbank/Programm	Firma
--------------------	-------

ABI PRISM™ Sequence Detection Systems Version 1.7 a	Applied Biosystems
ABI PRISM™ Sequence Navigator™ Version 1.0.1	Perkin Elmer
ABI PRISM™ Sequence Analysis Version 3.7	Applied Biosystems
Chromas Version 1.45	Technelysium
Clone Manager Suite	Scientific&Educational software
ClustalW	www.ebi.ac.uk/clustalw/
Cytomics RXP	Beckman Coulter
Kaluza Version 1.0-1.2	Beckman Coulter
Lalign	www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation
NCBI-Server	www.ncbi.nlm.nih.gov
Oligo 6	www.oligo.net
Prism4.03	GraphPad Soft. Inc.
PubMed	www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
RNAdraw	
siRNA <i>Target</i> Designer - Version 1.6	
Stepone Software	Applied Biosystem

2.1.14 Referenzsequenzen

B2M mRNA (human): NM_004048.2

KIR2DL2 mRNA (human): NM_014219.1

KIR2DL4 mRNA (human): XM_002344453.3

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von elektrokompetenten Bakterien *SURE (E.coli)*

Ein paar der gefrorenen Bakterien aus der original Stocklösung wurden auf einer Agarplatte mit 30µg/ml Kanamycin und 12,5µg/ml Tetrazyklin ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine Bakterienkolonie gepickt und eine 25ml Vorkultur angeimpft. Diese Vorkultur wurde gleichfalls über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach ca.16-20h wurde ein Liter LB-Medium mit Kanamycin/Tetrazyklin mit 1/100 Volumen der Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterien wurden wachsen gelassen, bis die Kultur eine optische Dicht (OD) 0,5 erreichte. Anschließend wurden die Bakteriensuspension in einem Eisbad abgekühlt und 15min mit der Geschwindigkeit von 4000g, bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Bakterien wurden auf Eis in einem Liter kaltem, 10%igem Glycerin resuspendiert. Dann wurden sie wie oben abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal mit 500 ml kaltem, 10%igem Glycerin durchgeführt. Danach wurden die Bakterien in 20 ml kaltem, 10%igem Glycerin gut resuspendiert und einmal bei 4000g, 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 2ml Glycerin wieder aufgenommen. Dann wurde die Suspension auf 40µl Aliquots verteilt und in flüssigem Stickstoff schnell gefroren. Die Aliquots der Bakterien wurden bei -80°C im Frierschrank gelagert.

2.2.2 Transformation der Bakterien

Die gewünschte cDNA, die genau analysiert werden sollen, wurden in Vektoren kloniert und in Bakterien transfiziert. In der vorliegenden Arbeit wurde die elektrokompetenten Bakterien *E.coli SURE* durch Elektroporation (2.2.5) transformiert.

2.2.3 Restriktionsverdau von Vektoren

Die PCR-Produkte und der Vektor wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen zusammen in ein Eppendorfgefäß pipettiert und über Nacht im Heizblock bei 37°C geschnitten. Abhängig von der DNA-Konzentration wurde der Restriktionsverdau in einem Volumen von 10-20µl durchgeführt. Dabei wurden 0,5-1µl jedes Enzyms verwendet. Alternative wurden Restriktionsenzyme, die die Fragmente schnell verdauen können, eingesetzt. Hierbei wurden die Ansätze nur für eine halbe Stunde bei 37°C verdaut.

2.2.4 Ligation

Die Ligation wurde in einem möglichst kleinen Volumen (am besten weniger als 10µl) durchgeführt, und der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 14°C im Heizblock inkubiert. Jeweils 100ng Vektor wurde mit einem zehnfachen molaren Überschuss *Insert* zusammenpipettiert und 5min bei 65°C inkubiert, damit alle Fragmente linear vorliegen. Nach der Abkühlung dieses Ansatzes, wurden 2µl Ligase und die entsprechenden Mengen Wasser sowie Puffer hinzugegeben und die Ligation auf 4°C gestellt. Nach ca. 12 bis 18 Stunden wurde der Ligationsansatz mit dem *PCR-Purification Kit* aufgereinigt und dann in 30µl Wasser aufgenommen.

2.2.5 Elektroporation

Pro Elektroporation wurde ein 40µl Aliquot *E.coli SURE* (wie in 2.2.1 angesetzt) ca. 15-20min auf Eis aufgetaut. Jeweils 0,5-2µl Plasmid-DNA wurden zu der Bakteriensuspension hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Nach 20min Inkubation auf Eis wurde die Mischung in eine vorgekühlte 2mm Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 2500V, 200Ohm und 25µF. Die Bakterien wurden in 1 ml LB-Medium ohne Antibiotika aufgenommen und 30min bei 37°C und ca. 300rpm auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 50-500µl aus der Kultur auf

Agarplatten mit 100µg/ml Ampicillin ausplattiert, anschließend über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.6 Kolonie PCR

Wenn das Einsatzmaterial für eine Klonierung genomischer DNA war, wurden nach der über Nacht Inkubation der transformierten Bakterien bei 37°C, Kolonie RCRs durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich das im Vektor einklonierte Fragment aus der jeweiligen Kolonie amplifizieren lässt. Dazu wurden einzelne Kolonien gepickt und in 10µl Wasser auf eine 96-Well-Platte (runder Boden) überführt. Der Rest der jeweiligen Kolonie wurde in 300µl LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin aufgenommen und bei 37°C, ca. 200rpm 3-4 Stunden kultiviert.

Die Kolonien im Wasser wurden 10 Minuten bei 95°C inkubiert, damit sie durch die Hitze lysiert werden. Anschließend wurde die entsprechende Menge des PCR-Mastermix zu jedem Ansatz zugegeben und eine PCR wie in 2.2.46 beschrieben durchgeführt. Die PCR konnte mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese analysiert werden. Kolonien aus denen das Fragment sich amplifizieren ließen, wurden für Minipräparationen eingesetzt.

2.2.7 Minipräparation

Je ca. 2 ml LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin mit einer einzelnen Bakterienkolonie wurden für die Minipräparationen angeimpft. Es wurde über Nacht bei 37°C und ca. 150 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und die Zellen wurden durch einmal 1-minütige Zentrifugation bei 13000rpm pelletiert. Anschließend wurde die Präparation mit Hilfe vom *MN-Miniprep Kit* nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

2.2.8 Kontrollverdau

Um zu überprüfen, ob das richtige Insert in den Vektor inkloniert worden ist, wurden je 1µl Plasmid aus der Minipräparationen erneut verdaut. In den Verdauansätzen wurden entweder die Enzyme verwendet, die auch für die Klonierung eingesetzt wurden, oder solche, die ein für das Insert charakteristisches Schnittmuster ergaben.

Ansatz für den Kontrollverdau:

je Enzym	0,5µl
Plasmid-DNA	1µl
Puffer	1µl
dH ₂ O ad	10µl

Der Verdau erfolgte ca. 30min bis 1h bei 37°C. Anschließend wurden die Proben auf einem Agarosegel aufgetragen und analysiert

2.2.9 Sequenzierung

Die Proben, im Kontrollverdau nach der Minipräparation das gewünschte Schnittmuster, aufwiesen, wurden zur Sequenzierung an das HLA-Labor gegeben. Durchführung nach (Sanger *et al.*, 1977).

Sequenzierungsansatz:

Big Dye Puffer	1µl
Sequenziermix	1µl
Primer	1µl
Plasmid-DNA	1µl
Wasser	6µl

Es wurden vektorspezifische Primer (T7 und T3 für pBluescript II KS+, pGL3 forward/reverse seq für pGL3+) verwendet. Alle Fragmente wurden in beide Richtungen sequenziert, sowie ggf. mit Primern, die Insert-spezifisch sind.

PCR-Program:

96°C	1 min	
96°C	10 s	} 25x
Tm	5 s	
60°C	3 min	
4°C	∞	

2.2.10 Maxipräparation

Je ca. 200ml LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin wurden mit einer einzelnen Bakterienkolonie, die das gewünschte Insert enthielt, angeimpft und über Nacht bei 37°C und ca. 300rpm auf einem Schüttler inkubiert. Nach ca. 16h wurden die Bakterien durch einmal 5-minütige Zentrifugation bei 8000rpm bei 4°C geerntet. Anschließend wurde die Maxipräparation mit dem *MN-Plasmid Maxi Kit* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Plasmid-DNA-Pellet wurde ca. 350µl TE-Puffer aufgenommen.

Nach der Maxipräparation wurde ein Kontrollverdau mit einer 1:10 Verdünnung (ggf.) der DNA durchgeführt (wie oben 2.2.8 beschrieben).

2.2.11 Zellkultur

Die primären Zellen bzw. Zelllinien wurden im jeweiligen Medium bei 37°C bzw. 33°C, 5 % CO₂ kultiviert. Zelllinien wurden bei einer Dichte von ca. 0,5-0,8 Millionen Zellen pro ml gehalten, frische primäre Zellen bei ca. 1-2 Millionen Zellen pro Milliliter. Etwa jeden zweiten Tag wurde frisches Medium hinzugegeben und die Dichte eingestellt.

2.2.12 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt. Die Probe wurde

im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau versetzt. Das Trypanblau ist in der Lage, die toten Zellen anzufärben, wobei die lebendigen Zellen farblos bleiben. Die Mischung wurde auf die Neubauerzählkammer aufgetragen, und vier große innere Quadrate von der Kammer wurden ausgezählt. Die Zellzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Zellzahl von vier Quadraten} / 4 \times \text{Verdünnungsfaktor } 10^4$$

Neben der Neubauerzählkammer konnte die Zellzahl auch durch einen Cell-Dyn durchflusszytometrisch bestimmt werden.

2.2.13 Einfrieren der Zellen

Vor dem Einfrieren wurden die Zellen zunächst abzentrifugiert und das Pellet pro 10 Millionen Zellen in 900µl des entsprechenden Mediums resuspendiert. Je 900µl dieser Zellsuspension wurde auf Cryotubes verteilt und mit je 100µl DMSO versetzt. Anschließend wurden die Zellen bei -80°C eingefroren und später in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen kurz bei 37°C im Wasserbad erwärmt, dann in 10ml, auf 37°C vorgewärmtem Medium gewaschen. Danach wurden sie auf die gewünschte Dichte in Kulturflaschen oder Kulturplatten ausgesät.

2.2.14 Splitten der adhärennten Zellen

Das Medium wurde aus der Kultur abgenommen, ohne die am Boden der Kulturflasche abgesetzten Zellen zu berühren. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde je nach Größe der Kulturflasche so viel 1-prozentiges Trypsin-EDTA zugegeben, dass der Boden der Kulturflasche bedeckt war. Bei 37°C wurde für 5 Minuten inkubiert, oder eventuell kürzer oder länger, bis sich die Zellen vom Boden ablösen. Um dies zu beschleunigen wurden die Zellen von der Gefäßwand geklopft. Danach wurden gleiche Menge Medium und Trypsin-EDTA zugegeben. Die

Zellsuspension wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und 7 Minuten bei 1320rpm und 21°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und das Pellet in ca. 1ml frischem Medium resuspendiert. Die gewünschte Anzahl von Zellen wurde in eine Flasche überführt und mit frischem Medium auf die gewünschte Dichte eingestellt. Vor der Zentrifugation wurden 20µl der Zellsuspension zur Zellzahl-Bestimmung abgenommen.

2.2.15 Kultivierung der MSC-Zellen

Vor dem Auftauen bzw. Splitten der MSC-Zellen wurden 5-10ml 0,1% steril filtrierte Gelatine-Lösung zu der Kulturflasche gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde die Gelatine abgenommen. Nachdem die Flasche getrocknet worden ist, können die MSC in die Flasche ausplattiert werden. Die MSC-Zellen dürfen in den Flaschen nicht zu dicht wachsen. Wenn 2/3 des Bodens der Kulturflaschen mit MSC-Zellen bedeckt sind, wurden die Zellen entsprechend den in 2.2.14 beschriebenen Methoden gesplittet. Das Plättchen-Lysat-haltige Medium zur MCS-Kultivierung wurde freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Prof. Meisel aus der Kinderklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf unter GMP-Bedingungen hergestellt und zur Verfügung gestellt.

2.2.16 Lymphozyten-Isolation aus Vollblut (CB, PB) und Knochenmark

Blut oder Knochenmark-Extrakt wurde abgenommen und 1:1 mit PBS-EDTA verdünnt. Das verdünnte Blut wurde mittels Ficoll sedimentiert. Die Lymphozyten bleiben in der Inter-Phase. Die Lymphozyten wurden mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen, in ein 50ml Falcontube überführt und mit PBS-EDTA gewaschen. Der Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in entsprechenden Medien wieder aufgenommen.

2.2.17 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS=*fluorescence-activated cell sorting*) ermöglicht, dass Zellen mit Hilfe von Lichtstreuung bzw. Fluoreszenzemission zeitparallel auf mehrere Parameter untersucht werden können. Im Durchflusszytometer gelangen Zellen einzeln in einem Trägerstrom aus PBS in den Fokus eines Laserstrahls. Dieser wird durch die Größe sowie Granularität der Zelle gestreut. Somit kann die Streuung basische Informationen über die Struktur der entsprechenden Zelle geben. Die Werte der Streuung werden im sog. *Forward* bzw. *Side Scatter* wiedergegeben (Hulett *et al.*, 1969). Daneben können Proteine, die auf der Zelloberfläche bzw. intrazellulär in der Zelle (besondere Vorbehandlung erforderlich) exprimiert werden, mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gekoppelt werden. Die Emission der Farbstoffe nach Anregung mit dem Laser wird gemessen und gibt Information über die Stärke der Expression des entsprechenden Proteins. Es wurde mit dem Cytomics FC500-, Cantor- und Cyan-Durchflusszytometer der Firma Beckman Coulter gearbeitet. Der Anregungslaser besitzt im Fall von FC500 die Wellenlänge 488nm und 638nm. Mit dem Gerät können bis zu fünf verschiedene Fluorochrome gleichzeitig gemessen werden. Mit dem Cantor bzw. Cyan Durchflusszytometer können sechs bzw. neun verschiedene Fluorochrome gleichzeitig detektiert werden.

2.2.18 Färbung für die Durchflusszytometrie

Pro Probe wurden ca. 250.000 bis 1Mio. Zellen abgenommen, abzentrifugiert, und anschließend in 100-200µl kaltem PBS mit 2mM EDTA aufgenommen. Danach wurden Antikörper mit jeweiliger entsprechender Menge hinzugegeben und gut gemischt. Ein Mastermix für die Antikörper wurde im Fall von größeren Probenmengen angesetzt und die entsprechende Menge der Antikörpermischung auf die einzelnen Proben verteilt. Die Mischung von Zellen und Antikörpern wurden 30min im Dunkeln bei 4°C gefärbt. Nach dem Waschen mit 2ml PBS/EDTA wurden die Zellen abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,5ml PBS/EDTA aufgenommen und die

angefärbte Probe wurde am Durchflusszytometer gemessen.

2.2.19 Intrazelluläre Färbung für die Durchflusszytometrie

Zuerst wurden ca. 250.000 bis 1Mio Zellen wie im Abschnitt 2.2.18 beschrieben gegen alle zu untersuchenden Oberflächenmarker angefärbt. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit Fixierungspuffer bei 4°C für 20min fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen zweimal mit 1x Wasch-Puffer gewaschen, und in 50µl Wasch-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden dann mit entsprechenden intrazellulären Antikörpern bei 4°C für 30min gefärbt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit Wasch-Puffer und einmal mit PBS gewaschen, und in 200-500µl PBS aufgenommen.

2.2.20 Isolation von CD34⁺ HSCs aus Nabelschnurblut bzw. Knochenmark

Humanes Nabelschnurblut oder Knochenmark-Extrakt wurde von der Nabelschnurblutbank bzw. Transplantationsstation des Universitätsklinikums in Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Eine typische Probe besteht aus ca. 50-100ml Blut. Daraus ließen sich mittels Ficoll-Dichte-Zentrifugation die Mononukleären Zellen (MNCS) isolieren (2.2.16). Nach dreimaligem Waschen mit PBS-EDTA wurden aus der Fraktion der MNCS zunächst alle Lineage⁺-Zellen (CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123 und CD235a) mittels magnetischer Zellseparation (MACS) depletiert. Anschließend wurden aus dem Durchfluss die CD34⁺ Zellen angereichert. Dabei wurde wiederum auf das Prinzip der magnetischen Zellisolierung zurückgegriffen. Auf eine Erythrozytenlyse wurde verzichtet, da die HSC sehr empfindlich dagegen sind. Die Reinheit jeder Aufreinigung wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft. Die isolierten CD34⁺ Zellen wurden in eine NK-Zellgenerierungskultur (2.2.21) eingesetzt. Wenn die Reinheit der isolierten Zellen zu niedrig war, wurde die CD34⁺ Anreicherung noch einmal durchgeführt.

2.2.21 NK-Zelldifferenzierung aus CD34⁺ Zellen *in vitro*

Die durch MACS isolierten CD34⁺ HSC-Zellen wurden in NK1-Medium aufgenommen. Pro Well einer 24-Well-Platte wurden 1000-5.000 CD34⁺ Zellen ausplattiert. Als *Feeder*-Zellen dienten EL08 oder MSCs. 24 Stunden bevor die HSCs isoliert wurden, mussten die EL08-*Feeder*-Zellen mit 15gray bestrahlt werden, um ihre Zellteilung zu verhindern (bei MSC-*Feeder* Zellen ist dieser Schritt unnötig.).

In der ersten Woche wurde NK1-Medium verwendet, ab der zweiten Woche nach der Aussaat der HSCs wurde NK2-Medium in die Kulturen zugegeben. Es dauert normalerweise vier bis sechs Wochen, bis die Zellen KIR-Rezeptoren exprimieren und die NK-Zellgenerierung abgeschlossen ist. Die Entwicklung der NK-Zellen wurde durchflusszytometrisch verfolgt. Zum Medium-Wechseln wurde das alte Medium mit der Pipette vorsichtig aus den Kulturen abgenommen und frisches Medium vorsichtig in die Wells zupipettiert ohne die *Feeder*-Zellen zu berühren.

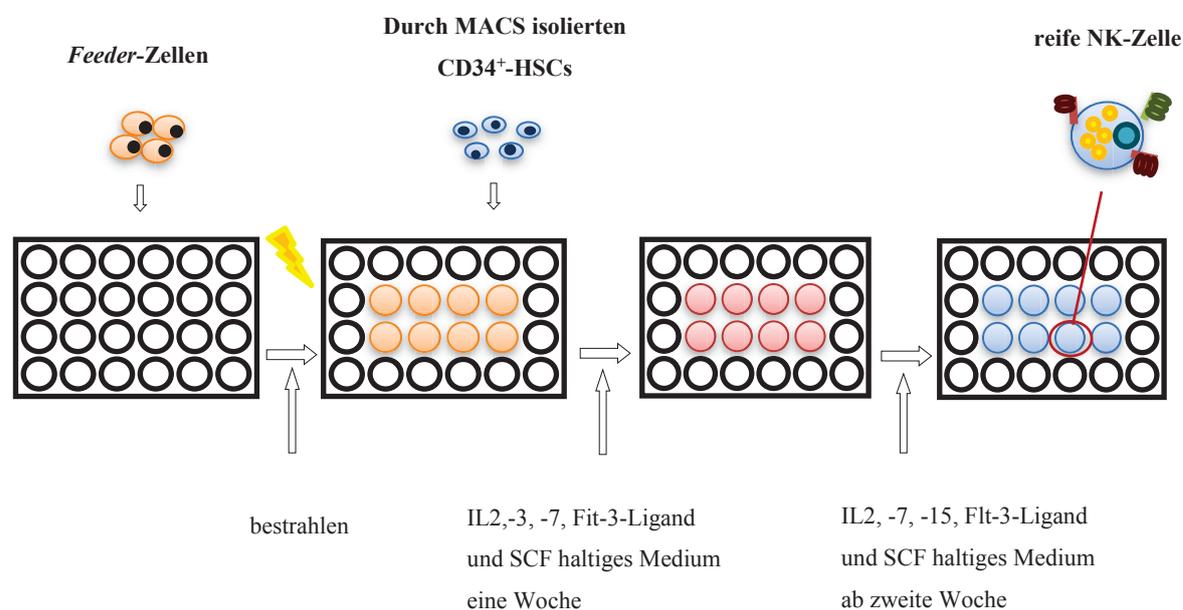


Abb.2- 3: schematische Darstellung der NK-Zelldifferenzierung aus CB oder KM isolierten CD34⁺-HSCs *in vitro*.

2.2.22 Zellsortierung

Die Durchflusszytometrie kann auch zur Isolation von gewünschten Zellen verwendet werden. Die Zellsortierung erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie durchflusszytometrische Analyse. Der einzige prinzipielle Unterschied liegt darin, dass nach der Zellsortierung die Zellen aufgehoben statt verworfen werden. Die Zellen wurden mit entsprechenden Antikörpern inter- sowie intrazellulär angefärbt, und mit der Hilfe des Zellsorters wurden die gewünschten gefärbten Zellpopulationen aussortiert.

2.2.23 CD56^{dim}- CD56^{bright}-NK-Zellen Sortierung

Nach der Lymphozyten-Isolation aus CB oder PB wurde anschließend eine CD3-Depletion durchgeführt. Nach der CD3-Depletion wurden die Zellen mit CD56-, NKG2A- und KIRs-Antikörper gefärbt (wie 2.2.18 beschrieben), und mit Hilfe des Zellsorters, s. 2.2.22 wurden die gewünschten Populationen aussortiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die aussortierten Zellen in Medium für die Kultivierung oder weiteren Experimente aufgenommen.

2.2.24 Isolation von NK-Zellen aus Blut

Neben in 2.2.23 beschriebener Methode können NK- bzw. CD56⁺-NK-Zellen mit dem RosetteSep *NK cell enrichment Kit* von StemCell Technologie nach der Anweisung des Herstellers isoliert werden. Mit diesem Kit können CD56⁺-Zellen isoliert werden, ohne sie durch Bindung von Antikörpern an bestimmte Oberflächenproteine zu aktivieren. Das Prinzip beruht darauf, dass alle ungewünschten Zellen über Antikörper mit Erythrozyten verbunden werden. Es bilden sich so genannte Immunorosetten aus. Diese Methode kann die Dichte der ungewünschten Zellen erhöhen. Nach der Dichtgradienten-Zentrifugation (wie Ficoll) sedimentieren die ungewünschten Zellen, zusammen mit ungebundenen Erythrozyten, im Pellet, wobei die gewünschten

CD56⁺-Zellen sich im Interphase Ring zwischen Plasma und Ficoll befinden.

2.2.25 Kultivierung von iPS-Zellen

Um den undifferenzierten pluripotenten Zustand der iPS-Zellen zu halten, wurden sie erst auf MEF-*Feeder* Zellen in hES-Medium kultiviert, die vorher mit Mytomyzin behandelt worden waren, um ihr Wachstum zu verhindern. Es erfolgten tägliche Mediumwechsel.

Kurz vor Verwendung wurden die iPS-Zellen mit Dispase von den MEF-*Feeder*-Zellen abgelöst und 5min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde ein Volumen des Kulturmediums zu den Zellen gegeben, um die Dispase zu stoppen. Anschließend wurden die iPS-Zell-Kolonien vorsichtig mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturplatte abgekratzt, und in ein Falcontube überführt. Die Zellen sollten nicht zu stark resuspendiert oder vereinzelt werden, da sie nicht überleben können, wenn sie vereinzelt vorliegen. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 4°C 1000rpm wurde das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und auf Zellkultur-Platten, die mit Matrigel beschichtet worden waren, ausgesät. Die iPS-Zellen wurden für ca. eine Woche auf Matrigel kultiviert. Das hES-Medium ist in der Lage das Wachstum der restlichen MEFs-Zellen zu verhindern, damit für weitere Versuch der Einfluss der MEF-Zellen ausgeschlossen werden kann. Dann wurde die iPS-Zellen einsatzbereit für weitere Differenzierungskulturen.

2.2.26 CD34⁺-Zelldifferenzierung aus iPS-Zellen

Frische undifferenzierte iPS-Zellen wurden von der iPS-Zellkultur (sich. 2.2.25) abgenommen, in CD34-Generierung-Medium 1 aufgenommen und auf bestrahlten OP9-, OP9-Delta-, oder unbehandelten MSC-*Feeder*-Zellen ausplattiert. Nach vier Tagen wurde CD34-Generierung-Medium2 verwendet, bis zum Auftreten von CD34⁺-Zellen in der Kultur. Der Prozess der Generierung wurde

durchflusszytometrisch verfolgt.

2.2.27 NK-Zellen-Differenzierung aus iPS-Zellen

FrISChe undifferenzierte iPS-Zellen wurden, wie im Abschnitt 2.2.26 beschrieben, zu CD34⁺-Zellen ausdifferenziert. Die Zellen wurden mit zwei verschiedenen Methoden weiter zu NK-Zellen ausdifferenziert. Erste Möglichkeit: CD34⁺-Zellen wurden mit Hilfe des Zellsorters aufgereinigt, und auf neu angesetzten *Feeder*-Zellen ausplattiert und dann wie in Abschnitt 2.2.21 beschrieben zu NK-Zellen ausdifferenziert. Zweite Möglichkeit: die frischen undifferenzierten iPS-Zellen wurden nach Passage direkt in NK-Gen Medium¹ aufgenommen, auf *Feeder*-Zellen ausplattiert und zu NK-Zellen ausdifferenziert.

2.2.28 CD107-Assay

Die NK-Zellen wurden aus der über Nacht Kultur bzw. der Generierungskultur geerntet. 10⁶ Zellen wurden für die Untersuchung von Perforin und Granzym B nach der Kultivierung abgenommen und der Rest der Zellen für das Assay verwendet.

Zunächst wurde die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt. Die Zellen wurden in IL-2-haltigem NK-Medium aufgenommen und auf eine Konzentration von 10⁷ Zellen/ml eingestellt. Die *Target*-Zellen wurden ebenso gezählt, die nötige Anzahl der Zellen geerntet und auf eine Konzentration von 10⁷ Zellen/ml eingestellt. Das Verhältnis von Effektor-Zellen zu *Target*-Zellen lag bei 1:1 und 10:1. In einer 96-Well-Platte (runder Boden) wurde der Antikörper gegen CD107 vorpipettiert. Zu der positiven Kontrolle wurden jeweils 10µl PMA und Ionomycin gegeben. Die Platte wurde im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) für 1h inkubiert.

Anschließend wurden zu den Wells 2µl Protein-Transport-Inhibitor (Monensin) gegeben und für weitere 5 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in Durchflusszytometrie-Röhrchen geerntet und gefärbt. Anschließend wurden die Zellen

durchflusszytometrisch analysiert. Die Anzahl der CD107⁺/CD56⁺-Zellen entspricht der Menge der zytotoxischen NK-Zellen im Ansatz (Uhrberg *et al.*, 2005).

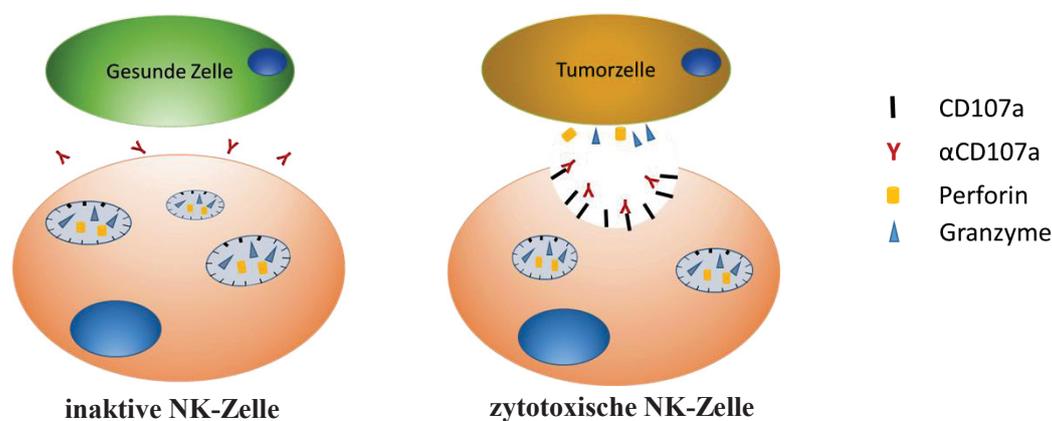


Abb.2- 4: Schematische Darstellung des CD107-Assays, modifiziert nach (Uhrberg *et al.*, 2005)

2.2.29 CFSE-Assay

Mit dem CFSE-Assay wurde die Effizienz des Abtötens von *Target*-Zellen durch NK-Zellen bestimmt. Zuerst wurden die HLA-Klasse-I-defekten K562-*Target*-Zellen mit CFSE-Lösung zusammen pipettiert und für 10min bei 37°C inkubiert, um die lebendigen Zellen anzufärben. Dann wurden die K562 mit PBS gewaschen und bei 1320rpm 7min abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die K562 mit dem ausgerechneten Volumen des Mediums aufgenommen, zu gewünschter Konzentration eingestellt und mit NK-Zellen in bestimmtem Verhältnis zusammenpipettiert. Nach der 6-stündigen Inkubation wurden die Zellen geerntet und mit gewünschten Antikörpern gefärbt. Auch Propidium-Iodid (PI) wurde zu den Zellen zugegeben, um die getöteten Zellen anzufärben. Die Anzahl der abgetöteten *Target*-Zellen wurde durch die Anzahl von CFSE und PI doppelpositiven Zellen minus die Anzahl der doppelpositiven Zellen von unbehandelten *Target*-Zellen ermittelt.

2.2.30 Granzym und Perforin Detektion

Um Granzym und Perforin nachzuweisen muss eine intrazelluläre Färbung durchgeführt werden. Davor wurden zuerst die Oberflächenmarker (z.B. CD56, CD16, KIRs, oder NKG2A, s. 2.2.18) der Zellen angefärbt. Nach der extrazellulären Färbung wurden die Zellen mit im Abschnitt 2.2.19 beschriebener Methode gegen Granzym und Perforin angefärbt. Dann können die Zellen durch Durchflusszytometrie analysiert werden.

2.2.31 Messung von IFN- γ

Die Funktion der NK-Zellen kann durch den Nachweis von IFN- γ bestätigt werden. Die NK-Zellen wurden ohne bzw. mit *Target*-Zellen für 6h inkubiert. Zu einem Well wurden 50ng PMA und 10 μ l Ionomycin gegeben, um die NK-Zellen zu stimulieren. Dieses Well dient als positive Kontrolle. Brefeldin A (10 μ g/ml) wurde eine Stunde nach dem Inkubationsbeginn zugegeben, dadurch wurde die Exozytose von INF- γ -haltigen Vesikeln verhindert und intrazellulär angehäuften. Nach der 6h Inkubation wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und extrazellulär gefärbt. Dann wurden die Zellen gegen IFN- γ intrazellulär gefärbt. Nach zweimal Waschen mit 5ml PBS wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.32 Hybridisierung von shRNA

Die verwendeten shRNAs werden als Einzelstränge bestellt und müssen hybridisiert werden, um in den Expressionsvektor kloniert werden zu können. Die einzelsträngigen RNAs wurden in RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 100pmol/ μ l eingestellt. Je 1 bis 3 μ l jedes Stranges wurden zusammen auf 95°C für 5min im Heizblock inkubiert. Durch ein langsames Abkühlen der Probe auf RT lagerten sich die Einzelstränge zu Doppelstränge zusammen.

2.2.33 RNA-Interferenz (RNAi)

Die Transkription bestimmter Gene können mittels RNAi herunterreguliert werden. Es gibt hauptsächlich zwei Gruppen von kleinen interferierenden RNAs, die miRNA (*micro RNA*) und die siRNAs (*small interfering RNA*). Zu den siRNA gehört die shRNA (*small hairpin RNA*) (Fire *et al.*, 1998). Für einen permanenten runterdrückenden Effekt an Ziel-Transkripten wird shRNA verwendet.

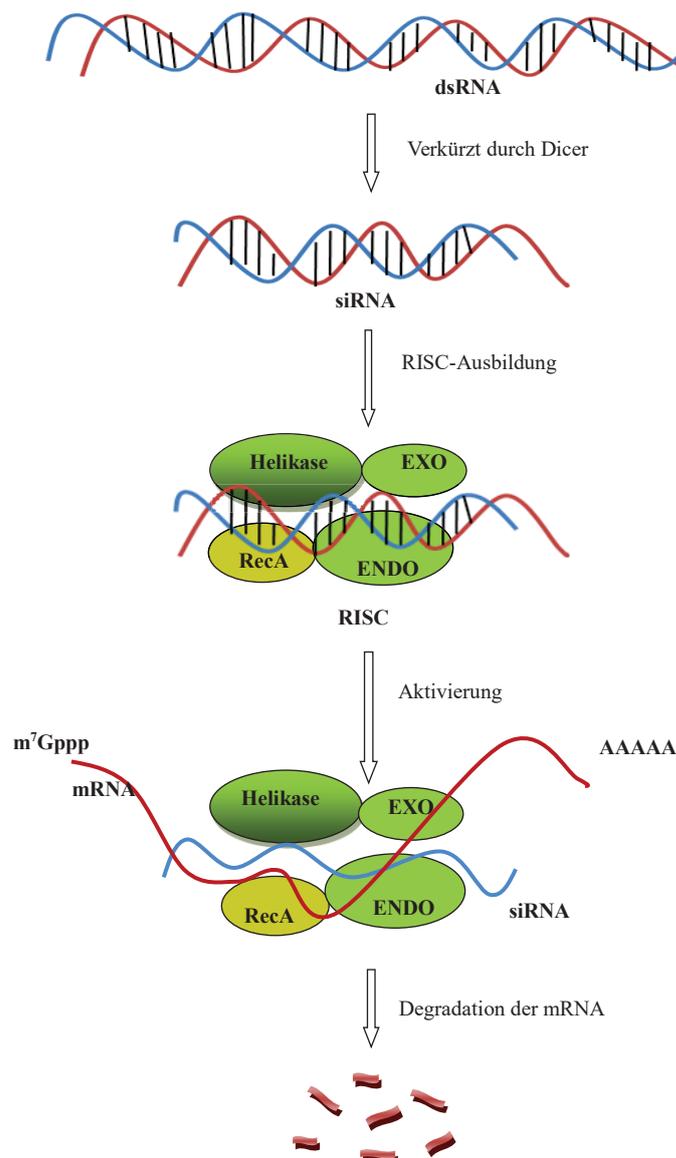


Abb.1- 5: schematische Darstellung der Wirkungsweise von RNAi. Modifiziert nach (Fuchs *et al.*, 2004; Genetik Jannig, Knust 2004). ENDO: Endonuklease. EXO: Exonuklease. RecA: ein Enzym, das mit dem entsprechenden RecA-Protein von *E. coli* verwandt ist.

Zuerst werden doppelsträngige RNA Moleküle durch das Enzym ‚*Dicer*‘ auf eine Länge von 19-21 Nukleotiden gekürzt. Anschließend werden die Doppelstränge voneinander getrennt, und einer der beiden einzelnen Stränge wird in den RISC-Komplex (RNA induced silencing complex) eingebaut (Fuchs *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). Das RISC-Komplex kann anschließend mit Hilfe von inkorporierten RNA-Fragmente komplementär an der *Target*-mRNA binden, und dementsprechenden mRNA, deren Sequenz komplementär zu der siRNA ist, wird degradiert. Auf dieser Weise erfolgt der Abbau bzw. ‚*Silencing*‘ der Ziel-mRNA (Pushparaj *et al.*, 2008; Genetik Janing, Knust 2004).

2.2.34 Ligation der shRNA in lentiviralen Vektoren PCL2.THPC

Die in 2.2.32 hybridisierten doppelsträngigen shRNA wurden in den lentiviralen Vektor PCL2.THPC (s. Abb.2- 1) ligiert. In einem Verhältnis von 1:10 wurden der geschnittene Vektor und das shRNA-Insert auf 65°C für 5min erhitzt. Nach der Abkühlung wurden 2µl Ligase sowie Puffer in die Probe zupipettiert und mit Wasser auf 10µl aufgefüllt. Die Ligation erfolgte dann für 12-18h bei 4°C.

2.2.35 Amplifikation der cDNA

KIR2DL2- und KIR2DL4-cDNA wurden mit Hilfe der PCR, in der Advantage2-Polymerase verwendet wird, aus dem Topo-Vektor mit den Primern aus 2.1.11 amplifiziert (Topo-Vektoren mit KIR2DL2- bzw. KIR2DL4 cDNA-Insert wurden vom Prof. Peter Parham’s Labor, *Departments of Structural Biology and Microbiology & Immunology at the Stanford University School of Medicine* zur Verfügung gestellt). Zur Einklonierung der cDNA in den Überexpressionsvektor PCL6 (s. Abb.2- 1) wurde Primer, die bereits die Schnittstellensequenzen der entsprechenden Restriktionsenzyme (*XhoI* und *NheI*) enthalten, verwendet, somit enthalten die amplifizierten cDNA ebenfalls die Schnittstellen. Anschließend wurde

die cDNA auf 0,5%iges Agarosegel aufgetragen und aufgereinigt (2.2.52). Zum Überprüfen der Sequenz wurde die aufgereinigte cDNA nach 2.2.9 sequenziert und analysiert (Sequenz-Referenz s. 2.1.14).

2.2.36 Ligation der cDNA in Überexpressionsvektor PCL6

Die in 2.2.35 amplifizierten cDNA wurden mit Hilfe der Ligase in den Überexpressionsvektor PCL6 ligiert. In einem Verhältnis zwischen 1:5 und 1:10 wurden der geschnittene Vektor und das Schnittstellen-haltigen cDNA-Insert auf 65°C für 5min erhitzt. Nach der Abkühlung wurden 2µl Ligase sowie Puffer in die Probe pipettiert und mit Wasser auf 10µl (max. 20µl) aufgefüllt. Die Ligation erfolgte für 12-18h bei 4°C.

2.2.37 Virusproduktion

Zunächst wurden 3-5Mio. Hek293T-Zellen in 10 ml Medium (DMEM, 10% FCS, 1%P/S, 1% NEAA) in mit Poly-D-Lysin gecoatete Zellkulturschalen ausplattiert. Pro Vektor bzw. pro herzustellendem Virus wurden fünf solcher Platten benötigt. Diese Platten wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium für Hek293T-Zellen abgenommen, und 9ml Transfektionsmedium wurde zu jeder Zellkulturschale gegeben (adv. DMEM, 2% Virus-FCS, 1% P/S). Die Zellen müssen mindestens eine Stunde vor der Transfektion inkubieren.

Nach der Inkubationszeit wurden die HEK293T-Zellen mit HBS-Puffer (100mM HEPES, 280mM NaCl, 1.5mM Na₂HPO₄) und Vektoren transfiziert. Dazu wurden pro Platte 9,25µg Capsidvektor, 9,25 µg Enzym-Vektor und 18µg von dem Vektor, der das einzubringende Gen, bzw. die shRNA, enthält, mit H₂O auf 600µl in einem Eppi aufgefüllt. Zu der Vektor-Mischung wurde 600µl 2×HBS-Puffer zugegeben. Es wurde invertiertund 15min bei RT inkubiert.

Zwischen der Inkubationszeit wurde Chloroquin zu jede Platte gegeben (Endkonzentration der Chloroquin beträgt $25\mu\text{M}$). Nach 15min wurde das Transfektionsreagenz tropfenweise zu den Platten gut verteilt zugegeben. Platten wurden vorsichtig geschwenkt und zu S2-Labor transportiert.

Am nächsten Tag wurde das Transfektionsmedium abgenommen, und 15ml frisches Medium (adv. DMEM, 5% Virus-FCS, 1% P/S) zu jede Platte gegeben. 30 Stundennach dem Medium-Wechsel erfolgte das erste Ernten der Viren. Der Virusüberstand wurde von jeder Platte abgenommen, dann wurden 15ml Medium für das zweite Ernten zu den Platten gegeben. Der abgeerntete Virusüberstand wurde mittels einer Spritze über einen $45\mu\text{m}$ -Filter in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Es wurde für 1,5h bei 15000 rpm und 4°C , mit Beschleunigung Stufe 9 und Bremse Stufe 3 zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Viren-Pellets in 5ml des Mediums, in dem die zu infizierenden Zellen kultiviert werden sollten, aufgenommen und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

Ca. 18 Stunden später wurde das zweite Ernten der Viren durchgeführt (Schritte wie beim ersten Ernten). Nach der Zentrifugation wurden die zweiten Viren-Pellets mit dem Medium, womit die Viren vom ersten Ernten aufgenommen wurden, resuspendiert, in 500 μl Aliquots in Cyrotubes verteilt und anschließend bei -80°C unter S2-Bedingen aufbewahrt. Da Viren, die zur einmaligen Infektion fähig waren, produziert wurden, wurde der Prozess zu Sicherheitsstufe2 zugeordnet (Trobridge 2009).

2.2.38 Virus-Titer-Bestimmung

Von jeder neuen Virus-Charge wurden die Titer bestimmt. Dazu wurde die gewünschte Menge von Hela-Zellen ausplattiert und 2-3h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurden unterschiedliche Mengen Virus (dies entspricht hier unterschiedlichen Volumina von Virusüberstand) zu den Hela-Zellen gegeben. Nach einem Tag wurde der Überstand abgenommen, und die Hela-Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden sie geerntet (siehe 2.2.14), in frischem Medium

aufgenommen und weiter kultiviert. Nach drei bis sieben Tagen wurde die Infektionsrate durchflusszytometrisch bestimmt. Im Fall von Suspensionszellen wurden NK3.3, wie oben für Hela beschrieben, zur Titer-Bestimmung eingesetzt.

2.2.39 Virusinfektion von Zellen

Vor der Infektion von Suspensionszellen wurden 24-Well-Suspensionskulturplatten mit $8\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Retronektin über Nacht gecoatet. Diese Behandlung sorgt später dafür, dass Zellen und Viren in räumliche Nähe gelangen. Für adhärente Zellen war diese Vorbereitung nicht nötig. Die benötigte Zellzahl wurde in die ggf. mit Retronektin gecoateten Platten ausplattiert. Nach ca. 2-4 Stunden wurde das gewünschte Volumen des Virusüberstandes zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Nach 18-24 Stunden wurden sie einmal mit PBS gewaschen. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen wieder in frischem Kulturmedium aufgenommen und weiter kultiviert. Nach zwei bis sieben Tagen konnte die Expression des grün leuchtenden GFP-Reporter-Gens im Fluoreszenz-Mikroskop beobachtet werden.

2.2.40 RNA-Isolation

Mit Hilfe von *RNeasy Kits* von Qiagen wurde RNA aus Zellen isoliert. Zur Homogenisierung der Lysate wurden QIAshredder-Säulen verwendet. Es wurde nach Anweisung des Herstellers gearbeitet, und auch jeweils der optionale DNase-Verdau durchgeführt. Nach der Konzentrationsbestimmung wurde die gewonnene RNA bei -80°C gelagert. Wenn die RNA nicht direkt aus den Zellen isoliert wurde, wurden diese in RLT-Puffer mit 10 % β -Mercaptoethanol eingefroren. Das β -Mercaptoethanol dient dazu, die RNA-Denaturierung bei erhöhten Temperaturen zu verhindern.

2.2.41 Bestimmung der RNA-Reinheit

Die Reinheit der isolierten RNA wurde vor der cDNA-Synthese überprüft. Dazu dient eine PCR mit Primern gegen den GAPDH-Promotor. Wenn in der RNA-Probe noch DNA-Spuren vorhanden wären, würde diese PCR positiv sein. Bei einem positiven Nachweis der DNA wurde die DNase-Verdau noch einmal durchgeführt, und anschließend wurde die RNA mit dem Qiagen RNeasy Kit noch einmal aufgereinigt.

2.2.42 Reverse-Transkriptions (RT)-PCR

Die vorhandene mRNA wurde vor der Amplifikation in cDNA umgeschrieben. 1-2µg gesamte RNA wurde mit Hilfe der Primer oligo-dT und des „molony murine leukemia virus“ (M-MLV) zu cDNA umgewandelt. Die oligo-dT-Primer können am PolyA-Schwanz der mRNA binden, und M-MLV ist für die Umschreibung zuständig. Um zu analysieren, ob ein bestimmtes Transkript auf RNA-Ebene nachweisbar ist, wurde die RNA zunächst wie folgt in cDNA umgeschrieben:

RNA (1µg)	x µl
Oligo dT Primer (0,5µg/µl)	1µl
dH ₂ O (RNase frei) ad 15	µl

Der Ansatz wurde 5 min bei 70°C im Heizblock inkubiert um Sekundärstrukturen im Template zu delektieren. Danach wurden die übrigen Reagenzien hinzugegeben:

M-MLV-Puffer (5x)	5µl
dNTPs (10mM)	1,25µl
RNasin (40 U/µl)	0,63µl
M-MLV reverse Transkriptase (200U/µl)	1µl
dH ₂ O (RNase frei)	ad 25µl

Die Reaktion erfolgte für 1 Stunde bei 42°C.

2.2.43 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um z.B. PCR-Produkten aufzureinigen wurde eine Mischung von Lösungen aus Chloroform und Isoamylalkohol (im Verhältnis 24:1) 1:1 mit Phenol gemischt. 1 Volumen der gemischten Lösung wurde auf die DNA-Lösung gegeben und gut gemischt. Die Mischung wurde für 10 min bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation vorsichtig abgenommen, ohne die untere Phase zu berühren, und in ein neues Eppendorftube überführt. Anschließend wurden 1/20Volumen 5M NaCl und 3Volumen kaltes absolutes Ethanol nacheinander in die Probe hinzugegeben und nach jeder Zugabe wurde die Probe durch Vortexen gut gemischt. Es wurde 10min bei 13000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden 300µl eiskaltes 70%iges Ethanol hinzugegeben und gut gemischt. Es wurde 1min bei 13000rpm zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Ggf. wurde noch einmal mit 100%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde ca. 10min bei RT getrocknet und dann in 30-50µl TE-Puffer aufgenommen. Anschließend wurde es 10min bei 60°C inkubiert und die Probe vor der weiteren Anwendung abkühlt. Die Konzentration von aufgereinigten Proben wurde mittels Nanodrop bestimmt.

2.2.44 DNA-Isolation mittels *Qiagen DNA blood kit*

Alternativ zur DNA-Isolation mittels Phenol-Chloroform-Extraktion kann DNA mit Hilfe des *Qiagen DNA blood kits* isoliert werden. Zunächst wurden die Zellen aus der Kultur abgenommen und in 200µl PBS (unter $5 \cdot 10^6$ Zellen) aufgenommen. Wenn es sich um Vollblut handelt, kann 200µl Vollblut direkt für die Isolation eingesetzt. Die weiteren Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.45 Bestimmung der RNA- und DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der RNA- und DNA-Konzentration wurde ein Nanodrop verwendet. Beim Nanodrop handelt es sich um ein *UV-Vis Spektrometer*. Zuerst wurde der

Nanodrop mit dem Elutionspuffer, der zur Aufnahme der RNA oder DNA verwendet wurde, eingestellt. Anschließend wurden 0,5 bis 2µl Probe auf den Messfühler des Nanodrops aufgetragen und der Gehalt der RNA- oder DAN-Probe. Nanodrop einmal mit destilliertem Wasser gereinigt, nachdem die Konzentration einer Probe bestimmt worden war.

2.2.46 Endprodukt PCR

DNA-Fragmente bzw. Transkripte wurden mit Hilfe von PCR (*polymerase chain reaction*) amplifiziert (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988). Wenn genomische DNA als Template diente, wurde diese mit dem QIAamp *DNA Blood Mini Kit* von Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers aus Blutzellen isoliert. Wenn möglich wurde für die Klonierungen jedoch Plasmid-DNA als Ausgangsmaterial verwendet. cDNA wurde wie unter 2.2.40 und 2.2.42 beschrieben gewonnen. Sollten die PCR-Produkte kloniert werden, wurde die Advantage2-Polymerase verwendet und Schnittstellen für Restriktionsenzyme über die verwendeten Primer eingefügt. Außerdem wurden für diese Zwecke bis zu 10 der jeweiligen 25µl Ansätze vereinigt.

Mastermix PCR (25µl-Ansatz)

Pro Probe:

Puffer (10 x)	2,5µl
dNTPs (10 mM)	0,5µl
Primer (10 pmol/µl)	1,0µl
Primer (10 pmol/µl)	1,0µl
Taq Polymerase	0,25µl
dH ₂ O ad 25 µl dH ₂ O	8,5µl

Es wurden jeweils 40-100ng DNA eingesetzt.

Mastermix für die PCR mit der Advantage2 Polymerase

Pro Probe (25µl-Ansatz):

Puffer (10x)	2,5µl
dNTPs (10 mM)	0,5µl
Primer (10 pmol/µl)	1,0µl

Primer (10 pmol/μl)	1,0μl
Advantage2 Polymerase	0,5μl
DNA	ca. 80ng
dH ₂ O	ad 25μl

Programm für die Advantage2 Polymerase

95°C	5min	
95°C	5s	} 35 x
T _m °C	15s	
72°C	1min/kb	
72°C	7min	
4°C	∞	

2.2.47 Real-Time PCR

Mit Hilfe eines Fluoreszenzsignals kann bestimmt werden, wie viele Transkripte eine Probe behält. Der in den Experimenten verwendete SYBR-Green-Mix enthielt bereits dNTPs, Polymerase und SYBR-Green, welche die Fluoreszenzfarbstoffe ist. Das SYBR-Green wurde mit einer Wellenlänge von 480nm angeregt, und sein Emissionsmaximum lag bei 520nm. Wenn das SYBR-Green in der kleinen Furche der DNA gebunden ist, leuchtet das SYBR-Green stark. Diese Eigenschaft ermöglicht es, den Anstieg der DNA-Menge zu verfolgen. Während einer PCR wurde die DNA-Menge nach jedem Zyklus durch die Bestimmung der Fluoreszenz gemessen. Nach der Zusammensetzung der Komponenten wurde die Real-Time-Messungen am Step One Plus (Applied Biosystems) durchgeführt.

Mastermix Real-Time-PCR (15μl-Ansatz)

Pro Probe:

Primer (10 pmol/μl)	0,5μl
Primer (10 pmol/μl)	0,5μl
SYBR [®] Green Mastermix	7μl
dH ₂ O	5μl

Programm:

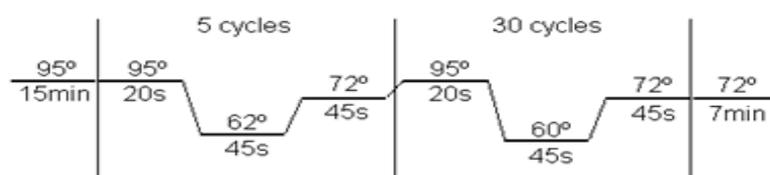
Denaturierung	10min	95°C	
Denaturierung	30s	95°C	} 40X
Annealing	30s	T _m	
Elongation	30s	72°C	

2.2.48 KIR-Typisierungs-PCR auf mRNA Ebene

Mastermix PCR:

H ₂ O	19,89µl
10x Puffer	2,5µl
dNTPs	0,5µl
Hotstar Taq	0,125µl

Programm:



2.2.49 Genomische HLA-C1/C2 Typisierung

Nach der DNA-Isolation wurde die gewonnene DNA für eine PCR zur HLA-C-Typisierung eingesetzt. Dadurch wurde der HLA-C-Typ der Probe festgestellt.

PCR Ansatz:

H ₂ O	18,4µl
Puffer	2,5µl
dNTPs	1µl
Primer 5'	1µl
Primer 3'	1µl
DNA	1µl
Taq	0,125µl

PCR Programm:

95°C	15min	
95°C	15s	} 10X
65°C	30s	
72°C	30s	
95°C	10s	} 22X
58°C	30s	
72°C	30s	
72°C	7min	
4°C	∞	

2.2.50 DNA-Aufreinigung aus PCR-Produkten

Nach einer PCR wurde die DNA der Proben mittels des Qia *Quick PCR Purification*

kits aufgereinigt. Zuerst wurde die DNA auf einer Silicamenbran der Isolationssäule gebunden, dann wurde die Probe mit verschiedenen Puffer gewaschen, damit die restlichen Salze und Proteine von der Membran abgewaschen wurden. Nach dem Waschen wurde die, in der Membran gebundene DNA in Elutionspuffer wiederaufgenommen. Dann war die DNA für weiterer Anwendungen einsatzbereit.

2.2.51 Gelelektrophorese

Um die aufgereinigten DNA-Fragmente analysieren zu können, müssen sie zuerst aufgetrennt werden. Dazu wurden 0,8%-2%ige Agarosegele verwendet. Die Zusammensetzung des Agarosegels hängt der Größe der DNA-Fragmente ab (Maniatis *et al.*, 1989). Die gewünschte Menge von Agarose wurde abgewogen, und in TBE-Puffer aufgeköcht. Nach dem vollständigen Lösen der Agarose wurde 0,3µl/ml Ethidiumbromid zugegeben. Anschließend wurde die Lösung in eine Gelkammer gegossen. Nach der Verfestigung des Gels wurden die DNA-Proben mit 5x Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Proben durch die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids unter UV-Licht sichtbar gemacht.

2.2.52 DNA-Aufreinigung aus Gel

Um gewünschte Fragmente aus PCR-Produkten aufzureinigen, wurde zunächst das PCR-Produkt auf ein maximal 1%iges Agarosegel aufgetragen. Unter UV-Licht wurden die gewünschten Banden vom Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA aus dem Gel, mit Hilfe des Qiagen *Gel Extraction Kits*, aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

2.2.53 Lipofektion

Lipofektion oder Liposom-Transfektion ist eine Methode, mit der Nukleinsäuren wie z.B. Plasmide sowie siRNAs durch Liposomen in Zellen eingebracht werden können. Liposomen sind Vesikel, die aus einem Phospholipid-Bilayer gebildet werden und die Nukleinsäuren umschließen. Sie können leicht mit der Zellmembran fusionieren, wodurch die Nukleinsäuren in die Zielzellen gelangen (Felgner *et al.*, 1987).

Vor der Lipofektion wurde für Suspensionszellen eine 6-Well-Platte mit Retronektin gecoatet (sehen 2.2.39). Für adhärente Zellen ist diese Vorbehandlung nicht nötig. Pro Well wurden 1Mio Zellen aus der Kultur entnommen und abzentrifugiert. Die Zellen wurden in möglichst wenig Medium aufgenommen, in die Platte gegeben, und für 1-3h bei 37°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Liposomen vorbereitet. 1-2µg siRNA wurden mit 100µl RPMI-Medium versetzt. Anschließend wurden 15-20µl Lipofektionsreagenz (X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent) zu der siRNA gegeben und mit der Pipette gut gemischt. Der Ansatz wurde für 15-20min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die siRNA-haltigen Liposomen auf die ausplattierten Zellen gegeben, und über Nacht bei den entsprechenden Kulturbedingungen inkubiert. Am nächsten Tag wurde reichlich Kulturmedium zu den Zellen gegeben. Nach 48h wurde die RNA aus den Zellen isoliert.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der HLA-Klasse-I-Liganden auf die KIR-Expression während der NK-Zellentwicklung *in vitro*

Für die klinischen Anwendungen von *in vitro* differenzierten NK-Zellen ist es grundsätzlich sinnvoll, ein Kultivierungssystem ohne xenogene Komponenten zu etablieren. Aufgrund ihrer Eigenschaften als Hämatopoese-unterstützende Stromazellen boten sich humane MSC-Zellen, die unter GMP-Bedingungen hergestellt wurden, als Alternative zu den bisher verwendeten murinen EL08-Feeder-Zellen an. Durch den vergleichenden Einsatz einer ganzen Serie von MSC-Linien mit unterschiedlichen HLA-Klasse-I Genotypen konnte in diesem System der Einfluss des HLA-Klasse-I-Polymorphismus auf die Expression der HLA-Klasse-I-spezifischen KIR und NKG2-Rezeptoren und damit auf die Ausprägung des NK-Zellrepertoires untersucht werden.

3.1.1 NK-Zelldifferenzierung auf EL08- und MSC-Feeder-Zellen

MACS-isolierte CD34⁺-HSCs wurden auf murine Feeder-Zellen (EL08), sowie humane Feeder-Zellen (MSC) ausplattiert und zu NK-Zellen ausdifferenziert. In der zweiten Woche der NK-Zellentwicklung, begannen die EL08-Feeder-Zellen sich abzulösen, während die MSC-Feeder Zellen weiterhin in gutem Zustand blieben (Abb.3- 1A und B). Die auf den Feeder-Zellen generierten Suspensionszellen waren nach zwei Wochen auf den Feeder-Zellen sichtbar. Abb.3- 1C und D zeigen, dass am Ende der NK-Zelldifferenzierung die EL08-Feeder-Zellen nicht mehr in der Kokultur zu finden waren, während die MSC-Feeder-Zellen noch am Boden der Kulturplatte zu finden waren.

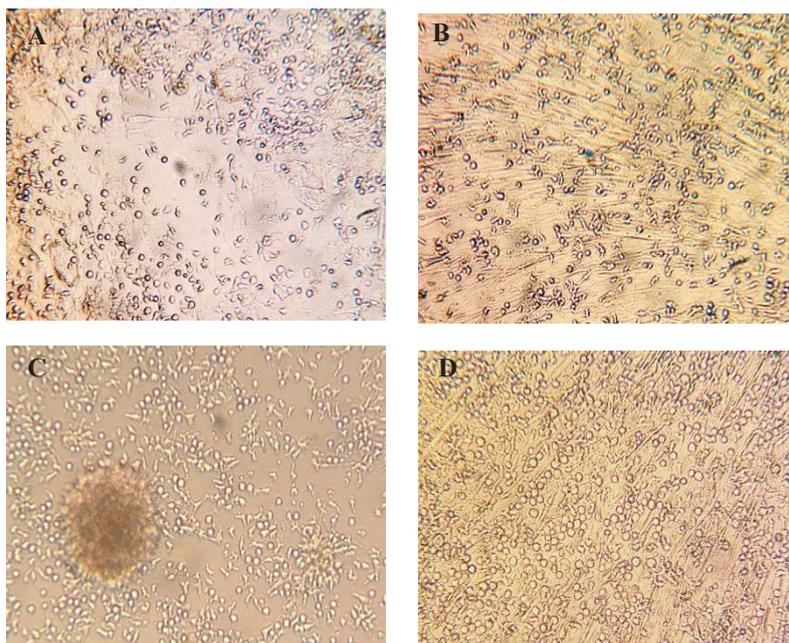


Abb.3- 1: Mikroskopische Aufnahme der differenzierenden NK-Zellen auf *Feeder* Zellen. A und B wurden in Woche 2 aufgenommen, C und D in Woche 5. A und C: murine EL08 Zellen als *Feeder*. B und D: human MSC als *Feeder*.

Nach der Anreicherung der CD34⁺-HSCs exprimierten über 95% der isolierten Zellen CD34 und waren negativ für alle getesteten Lineage Marker (Lin⁻). Ungefähr die Hälfte der CD34⁺-Zellen exprimierten auch CD38 (Abb.3- 2A). In der ersten Woche der NK-Zelldifferenzierung expandieren die CD34⁺-Zellen normal, und die Zellen fingen an, sich in Richtung Lymphozyten zu entwickeln. Nach zwei Wochen hatten die meisten Zellen CD38 auf ihrer Oberfläche exprimiert. Bis dahin waren keine deutlichen Unterschiede zwischen den Zellen, die auf EL08- oder MSC-*Feeder* Zellen generiert waren, zu beobachten (Abb.3- 2B).

Nach drei Wochen waren ungefähr die Hälfte der Zellen auf beiden *Feeder*-Zellen CD56-positiv. Davon war ca. 1% der Zellen, die auf EL08 generiert wurde, für NKG2A positiv, wohingegen ca. 20% der Zellen, die auf MSC generiert wurden, auf ihrer Oberfläche NKG2A exprimierten. Ähnliche Ergebnisse waren bei der *KIR2DL3*-Expression zu beobachten. Ungefähr 0,3% aller Zellen, die auf EL08 gewachsen waren, waren *KIR2DL3* positiv, während 2,5% aller Zellen, die sich auf MSC entwickelt hatten, *KIR2DL3* positiv waren. Während der NK-Zellentwicklung *in vitro* war *KIR2DL3* bei beiden Kulturen der erste detektierbare KIR-Rezeptor, der

auf der Oberfläche der generierten NK-Zellen erscheint (Abb.3- 2C).

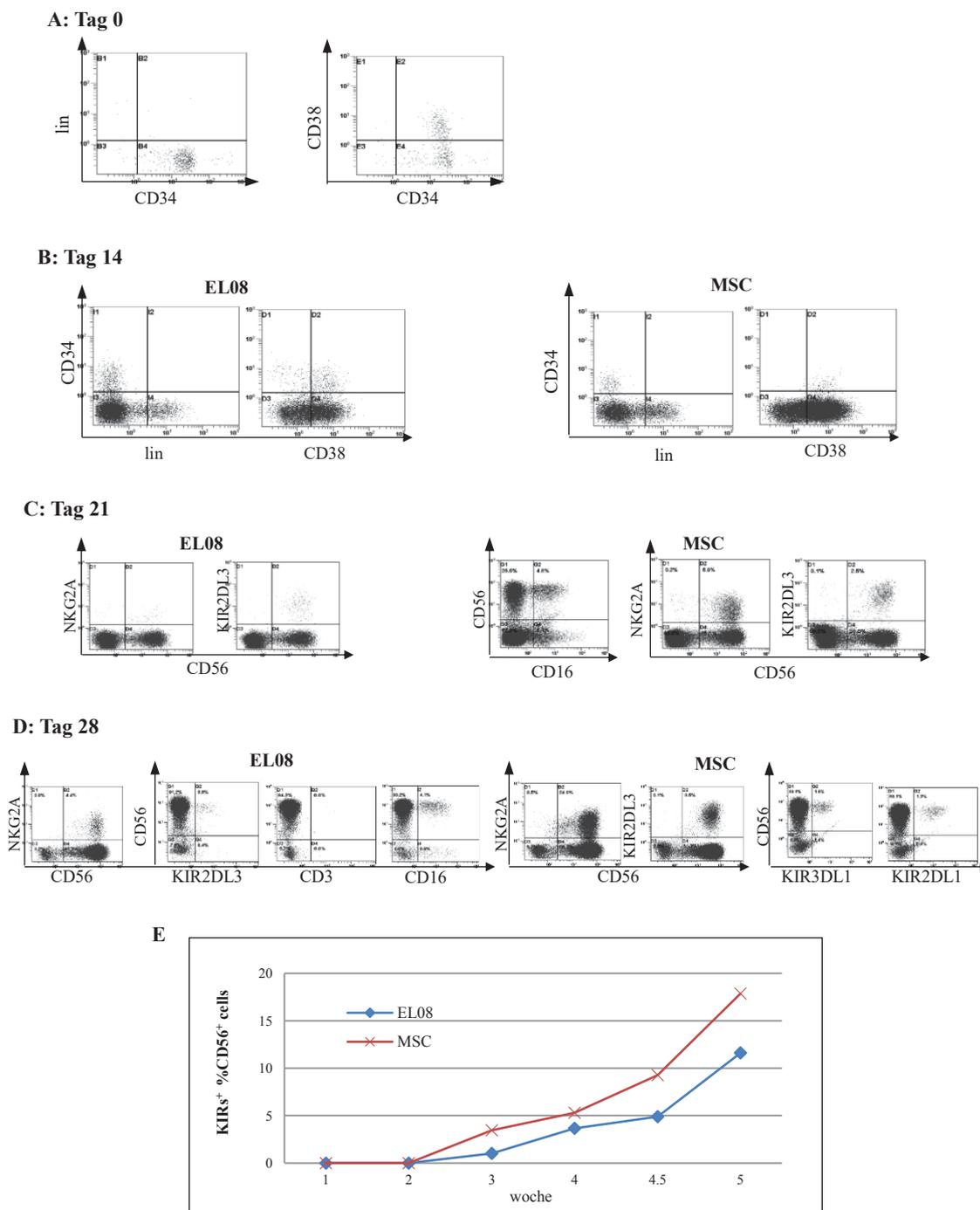


Abb.3- 2: NK-Zellentwicklung aus HSCs auf EL08- und MSC-Feeder-Zellen. A: Tag 0, direkt nach der Isolation von CD34⁺-HSCs. B: Tag 14 der NK-Zelldifferenzierung. C: Tag 21 der NK-Zelldifferenzierung. D: Tag 28 der NK-Zelldifferenzierung. E: kinetischer Verlauf der KIR-Rezeptoren-Expression der generierten Zellen auf EL08- und MSC-Feeder-Zellen. In der Grafik aufgetragene Daten sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit drei CBs.

Nach vier Wochen waren überwiegend CD56-positive Zellen (über 90%) in der Kultur, und die Frequenz der KIR- und NKG2A-positiven Zellen stieg an. Die auf MSC generierten Zellen sind viel effizienter bei der Expression von NKG2A und KIR-Rezeptoren als die auf EL08 generierten Zellen. In der Kokultur mit EL08 waren ausschließlich KIR2DL3 und kaum andere KIR-Rezeptoren zu detektieren, während in der Kokultur mit MSC Zellpopulationen zu finden waren, die positiv für andere KIR-Rezeptoren wie KIR2DL1, oder KIR3DL1 waren (Abb.3- 2D).

Die Beobachtung der KIR-Rezeptorentstehung auf den differenzierenden Zellen im Lauf der Generierung hat deutlich die Tendenz gezeigt, dass im Lauf der NK-Zellentwicklung die auf humanen MSC-Feeder-Zellen ausdifferenzierten NK-Zellen eine höhere Frequenz von KIR-positiven Zellen hatten als die auf murine EL08-Feeder-Zellen ausdifferenzierten NK-Zellen (s. Abb.3- 2E).

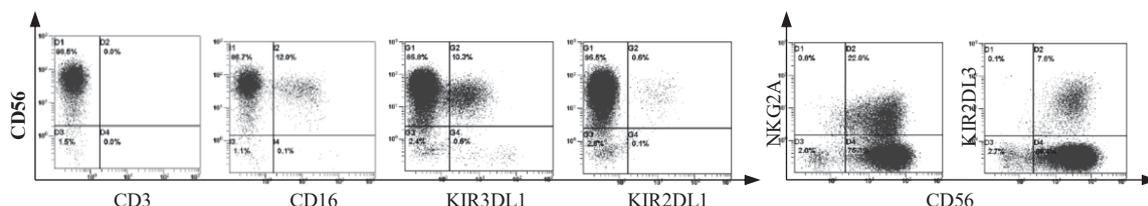


Abb.3- 3: Exemplarische Plots der durchflusszytometrischen Analysen der NK-Zelldifferenzierung aus CD34⁺-HSCs auf MSC-Feeder-Zellen am Ende der NK-Zelldifferenzierung (Tag 35).

Ab der fünften Woche fingen die auf EL08 generierten Zellen an, abzusterben. Im Vergleich dazu, waren die auf MSC generierten Zellen noch weiterhin in guter Verfassung, bis zu der sechsten Woche. Die Prozentzahl des KIR3DL1-Rezeptors ist von Woche 4 zu Woche 5 stark gestiegen, dagegen ist die Prozentzahl des KIR2DL3-Rezeptors um 2% abgesunken.

3.1.2 HLA-Klasse-I-Expression der MSC-Zelllinien

Basierend auf dem erfolgreichen Ergebnis der NK-Zelldifferenzierung auf MSC-Feeder-Zellen, wurden weitere NK-Zellgenerierungen mit mehreren

MSC-Zelllinien, die HLA-Klasse-I-C1/C1 Homozygot (MSC9 und MSC39), HLA-Klasse-I-C1/C2 Heterozygot (MSC20 und MSC34), oder HLA-Klasse-I-C2/C2 Homozygot (MSC16) sind, durchgeführt, um den Einfluss der HLA-Klasse-I-C-Typen auf das KIR-Repertoire zu untersuchen.

Zuerst wurde die Expression von HLA-Klasse-I-C der MSC-Linien untersucht. Die Expression des HLA-Klasse-I wurde durchflusszytometrisch untersucht. Abb.3-4A zeigt, dass fast alle Zellen aus allen MSC-Zelllinien HLA-Klasse-I-Moleküle (HLA-A, B, C) auf ihrer Oberfläche exprimierten. Die gleichen Zellen wurden noch genauer, auf HLA-C und -E untersucht, da diese als Liganden für entsprechende KIR-Rezeptoren fungieren.

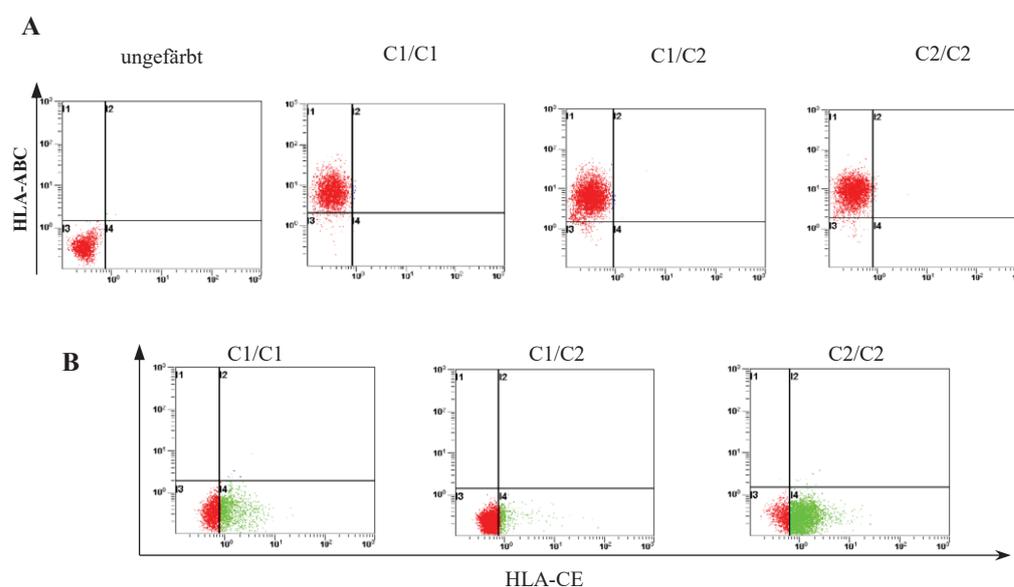


Abb.3-4: HLA-Klasse-I-Expression der MSC-Zelllinien. A: HLA-ABC-Expression der MSC-Zelllinien, mit HLA-C-Typen: C1/C1, C1/C2 und C2/C2. B: HLA-CE-Expression der MSC-Zelllinien mit HLA-C-Typen: C1/C1, C1/C2 und C2/C2.

In Abb.3-4B wurde gezeigt, dass bei jeder MSC-Linie eine kleine klare HLA-CE-positive Population und eine Verschiebung der restlichen Zellen in die Richtung HLA-CE-positiv zu sehen waren. Durch RT-PCR und anschließender Real-Time PCR konnten die Transkripte von HLA-C1 und -C2 intrazellulär nachgewiesen werden.

3.1.3 Funktionale Assays der generierten NK-Zellen

CD34⁺-HSCs aus CBs wurden isoliert und vergleichend auf EL08 und fünf verschiedenen MSC-Linien ausplattiert und zu NK-Zellen ausdifferenziert. Am Ende der NK-Zellgenerierung wurden die in Kultur ausdifferenzierten NK-Zellen für funktionale Assays abgenommen, um zu überprüfen, ob die *in vitro* generierten NK-Zellen fähig waren, die *Target*-Zellen zu erkennen und durch ihre Sekretion der zytotoxischen Stoffe abzutöten.

HLA-Klasse-I-defekte K562-Zellen wurden als *Target*-Zellen für die Experimente eingesetzt. Nach der Kokultivierung mit NK-Zellen wurde die Oberflächen-Expression von CD107, und die Sekretion von Granzym B und Perforin durchflusszytometrisch bestimmt (Abb.3-5A). Im Allgemeinen waren keine auffälligen Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien zu sehen. Ungefähr 20% der CD56-positiven Zellen trugen CD107 auf ihrer Oberfläche mit einer Ausnahme. Die NK-Zellen, die auf MSC39 generiert wurden hatte nur ca. 10% CD107 positive Zellen. Auf EL08 sowie MSC9 und MSC20 waren fast alle NK-Zellen positiv für intrazelluläres Granzym B, während die Prozentzahl der Granzym B positiven Zellen auf MSC16, MSC34, und MSC39 mit 60-80% etwas niedriger war.

Bei den Untersuchungen von Perforin waren die Ergebnisse ähnlich wie bei Granzym B. Mehr als die Hälfte der NK-Zellen, die auf EL08, MSC39, MSC20 und MSC34 differenziert wurden, waren positiv für Perforin. Auf den restlichen *Feeder* Zelllinien waren ca. 40% der NK-Zellen, positiv für Perforin.

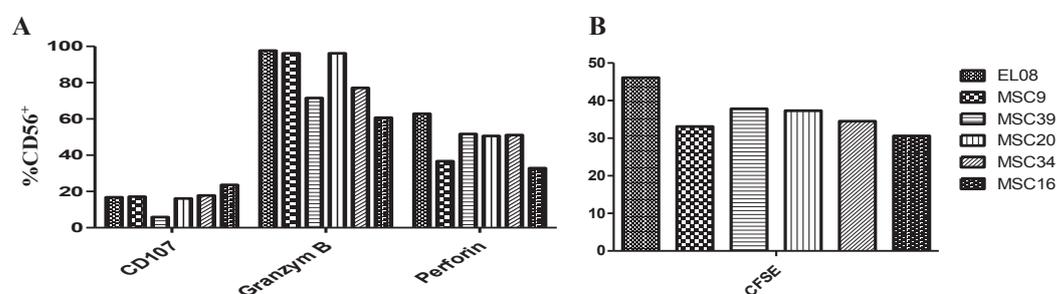


Abb.3- 5: funktionale Assays der *in vitro* differenzierten NK-Zellen. A: CD107-Assay, und Sekretion von Granzym B und Perforin. B: CFSE-Assay.

Die Ergebnisse des Abtötens der *Target*-Zellen (CFSE-Assay) spiegelten die Ergebnisse der Perforin-Sekretion wieder. NK-Zellen, die auf EL08, MSC39, MSC20 und MSC34 generiert wurden, zeigten die höchste Zytotoxizität. Die Lyserate der auf MSC9 und MSC16 generierten NK-Zellen war etwas niedriger als die der anderen (Abb.3- 5B).

Trotz der Unterschiede bei den funktionalen Assays waren alle *in vitro* generierten NK-Zellen in den funktionalen Untersuchungen fähig, zytotoxische Granula (mit Granzym B und Perforin gefüllt) zu produzieren, CD107 auf ihrer Oberfläche zu exprimieren, und die *Target*-Zellen zu erkennen und abzutöten.

3.1.4 HLA-C-unspezifische Expression der KIR-Rezeptoren während der NK-Zellentwicklung aus CB isolierten CD34⁺-HSCs

Um die Auswirkung des HLA-Klasse-I-Polymorphismus auf die KIR-Expression während der NK-Zellentwicklung festzustellen, wurden CD34⁺-HSCs aus Nabelschnurblut isoliert und auf MSC-Linien mit unterschiedlichem HLA-C-Typ, ausplattiert und zu NK-Zellen differenziert. Als die NK-Zellen anfangen, KIR-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche zu exprimieren, wurden sie von der Kultur abgenommen, und ihr KIR-Repertoire durchflusszytometrisch bestimmt. Damit alle vorhandenen KIR-Rezeptoren durchflusszytometrisch analysiert werden konnten wurden diese Untersuchungen ausschließlich an Spenderproben gemacht, die homozygot für den weniger komplexen Gruppe A KIR-Haplotyp waren.

Während der *in vitro* NK-Zellentwicklung aus CD34⁺-HSCs ist KIR2DL3 immer der erste KIR-Rezeptor (außer KIR2DL4), der von den sich entwickelnden NK-Zellen exprimiert wird. Wie Abb.3- 6 zeigt, waren KIR2DL3-positive Zellen bereits in der dritten Woche der Generierung zu sehen, während erst in der vierten Woche KIR2DL1 auf den Zellen zu detektieren war. Die beiden Grafiken zeigen auch, dass sich die Stärke der KIR2DL3- und KIR2DL1-Expression nicht signifikant durch den HLA-C-Typ der *Feeder*-Zellen beeinflussen ließ. Der Verlauf der KIR2DL3- und

KIR2DL1-Expression auf allen Zelllinien war miteinander vergleichbar, und die Expressionskurven hatten die gleiche Tendenz.

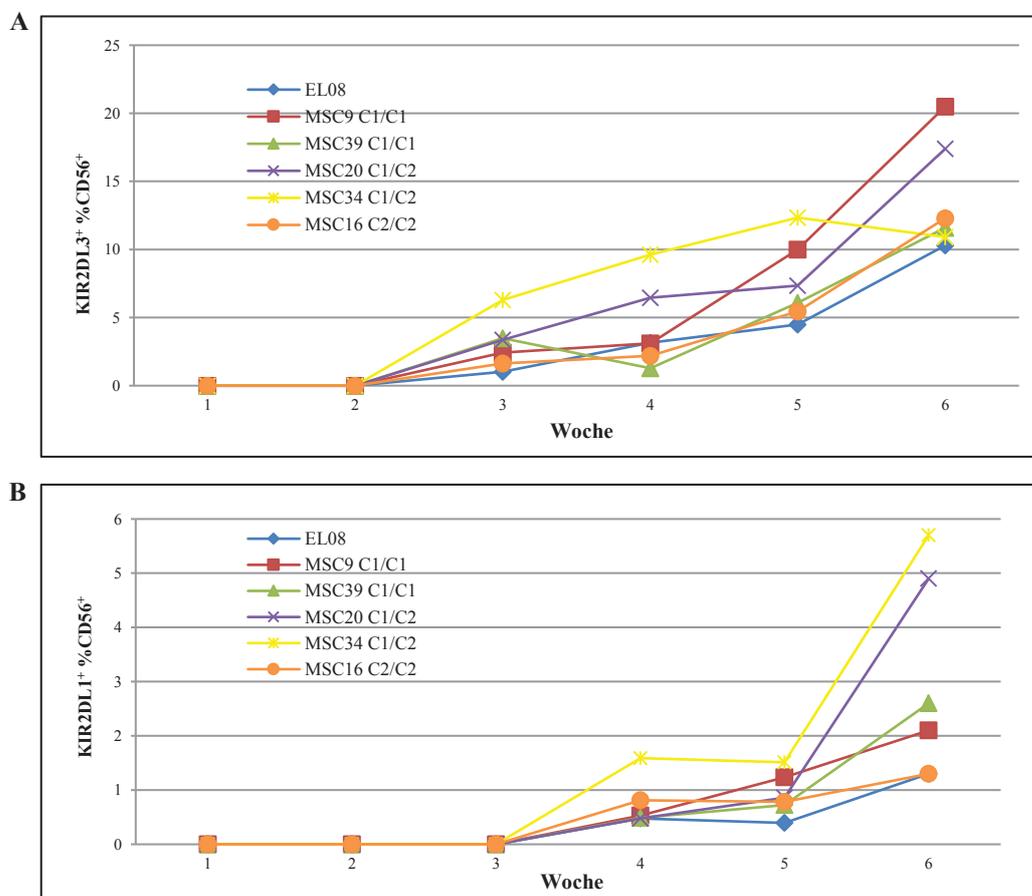


Abb.3- 6: Kinetik der KIR2DL3- und KIR2DL1-Expression im Lauf der NK-Zellentwicklung *in vitro*. A: KIR2DL3-Expression während der NK-Zellentwicklung. B: KIR2DL1-Expression während der NK-Zellentwicklung.

Um die Auswirkungen der HLA-C-Typen auf die KIR-Expression genau zu untersuchen, wurden mehrere NK-Zelldifferenzierungen auf den verschiedenen MSC-Linien durchgeführt. Dafür sind mehrere AA-Typ CBs als CD34⁺-HSCs-Quelle verwendet worden. Auf MSC16, der einzigen HLA-C2/C2 Linie, hatten die generierten Zellen eine relative niedrige Expressionsrate von allen KIR. Um die individuellen Effekte auszuschließen, wurden nach drei NK-Zelldifferenzierungen noch zwei andere HLA-C2/C2 Linien für den Versuch eingesetzt (MSC11 und MSC17).

Die vierte und fünfte Woche der NK-Zelldifferenzierung sind die besten Zeitpunkte,

um die KIR-Expression der generierten Zellen festzustellen. Gründe dafür sind, dass in diesem Zeitraum die differenzierenden Zellen aktiv alle KIR-Rezeptoren exprimieren. Auf der anderen Seite haben die sich differenzierenden Zellen in diesem Zeitraum die Expansionsphase verlassen und fangen an funktional zu reifen und entsprechende Rezeptoren zu exprimieren. Dazu gehören die KIR-Rezeptoren. Ab der sechsten Woche der Differenzierung verlangsamte sich das Wachstum der Zellen und viele Zellen fangen an zu sterben. Gleichzeitig waren auch die MSC-Feeder-Zellen komplett verschwunden. Deshalb wurden die Daten über KIR-Expression in Woche 4 und Woche 5 untersucht, um aussagekräftige Ergebnisse darzustellen.

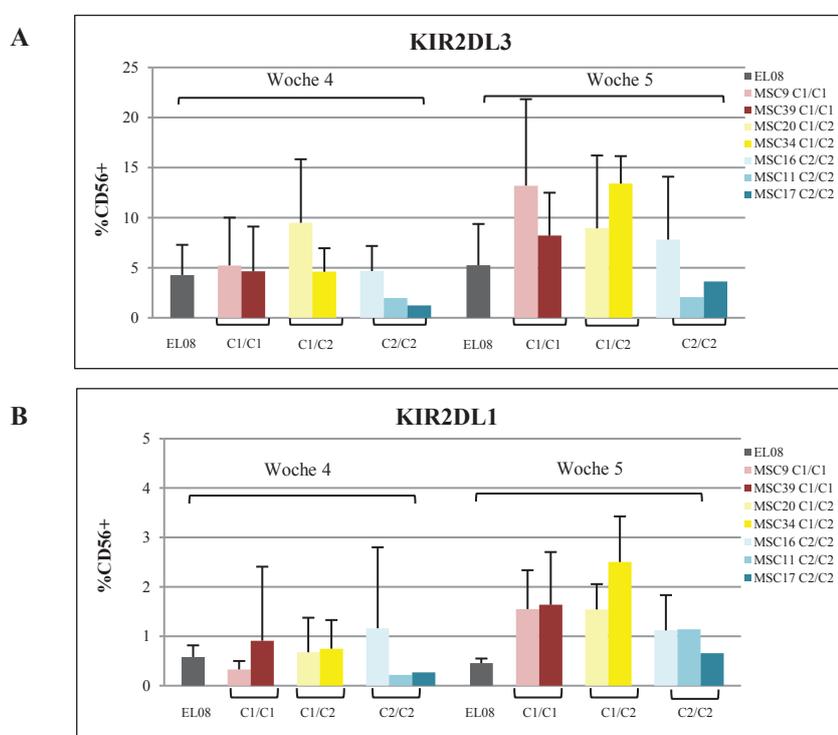


Abb.3- 7: KIR2DL3- und KIR2DL1-Expression in Woche 4 und Woche 5 der NK-Zelldifferenzierungen auf EL08, C1/C1-MSCs, C1/C2-MSCs und C2-C2-MSCs. Mittelwerte und Standardabweichungen sind aus Daten von drei nicht voneinander abhängigen Experimenten berechnet (außer MSC11, und 17 n=2).

In der Abb.3- 7A wurde die Expression von KIR2DL3 mit MSC-Linien mit unterschiedlichen HLA-C-Typen in Zusammenhang gebracht. Unabhängig vom HLA-C-Typ kam KIR2DL3 als erster KIR-Rezeptor auf die Zelloberfläche, und er war auch der am häufigsten exprimierte KIR-Rezeptor. Auf MSC9 (C1/C1) und

MSC20 (C1/C2) generierte NK-Zellen hatten die höchste KIR2DL3-Expressionsrate. Ungefähr 13% der NK-Zellen trugen KIR2DL3 auf ihrer Oberfläche, wobei knapp 10% der NK-Zellen, die auf anderen MSC-Linien (MSC39 C1/C1, MSC20 C1/C2, MSC16 C2/C2) generiert wurden, in der fünften Woche für KIR2DL3 positiv waren. Die anderen beiden C2/C2 MSC Linien (MSC11 und MSC17) waren aus ungeklärten Gründen von Anfang an weniger gute *Supporter* für die NK-Zellentwicklung als die anderen Linien. Die auf MSC11 und MSC17 generierten Zellen zeigten eine schwächere Proliferation und eine geringere Expression aller NK-Zellrezeptoren.

Abb.3- 7B zeigt die KIR2DL1-Expression der generierten NK-Zellen auf unterschiedlichen MSC-Linien in Woche 4 und Woche 5. Ähnlich wie bei der KIR2DL3-Expression hatten die auf MSC34 generierten NK-Zellen die höchste KIR2DL1-Expressionsrate. In der fünften Woche war deutlich zu erkennen, dass die auf allen drei C2/C2 generierte NK-Zellen am wenigsten KIR2DL1⁺-Zellen hatten, trotz der Anwesenheit des KIR2DL1-Ligand: HLA-C2.

Der Vergleich der Ergebnisse der KIR2DL1- und KIR2DL3-Expression zeigte, dass die KIR2DL1- und KIR2DL3-Expression während der Entstehung der NK-Zellen aus CD34⁺-HSCs unabhängig von vorhandenen HLA-C-Liganden ist. Während der NK-Zelldifferenzierung wird KIR2DL3 zeitlich vor KIR2DL1 auf den NK-Zellen exprimiert. Die Frequenz der KIR-exprimierenden NK-Zellen war zwischen verschiedenen MSC-Linien unterschiedlich, dies korreliert aber nicht mit dem HLA-C Genotyp.

3.1.5 Quotient KIR2DL1/KIR2DL3

In den frühen Studien wurde gezeigt, dass das Repertoire der NK-Zellen aus peripherem Blut HLA-C-Ligand-spezifisch ist. Der Quotient von KIR2DL1/KIR2DL3 hatte sich von unter eins zu über eins, von C1/C1 zu C2/C2 gedreht (Schönberg *et al.*, 2011a). Um festzustellen, ob die gleiche HLA-C-Spezifität der KIR-Expression bei der NK-Zellentstehung erscheint, wurde der Quotient von

KIR2DL1/KIR2DL3 von mehreren Experimenten graphisch dargestellt.

In der Abb.3- 8A wird deutlich, dass es keinen einzigen Fall gab, wo der Quotient KIR2DL1/KIR2DL3 über eins betrug. Das bedeutet, dass in allen NK-Zellgenerierungen, egal welche HLA-C-Liganden die *Feeder*-Zellen besitzen und den differenzierenden Zellen präsentieren, überwiegend KIR2DL3 exprimiert wird. Im Vergleich dazu war die Expression von KIR2DL1 viel schwächer. In keinem Fall hat die KIR2DL1-Expression die KIR2DL3-Expression überwogen.

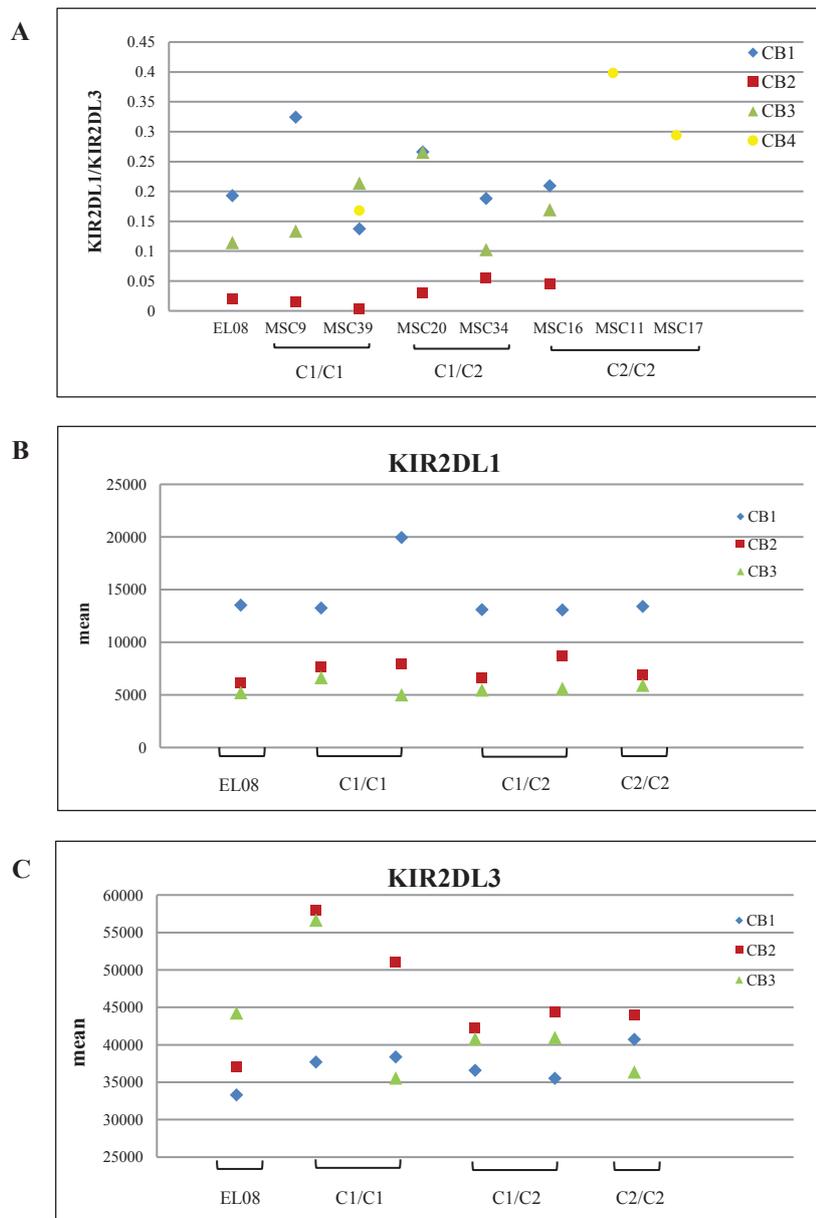


Abb.3- 8: A: Der Quotient von KIR2DL1/KIR2DL3 in der fünften Woche der NK-Zelldifferenzierung. B: *Mean* von KIR2DL1. C: *Mean* von KIR2DL3.

Die *Mean*-Werte der durchflusszytometrischen Analysen zeigen die Expressionsstärke der KIR2DL1- und KIR2DL3-Rezeptoren auf der Zelloberfläche an. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in den *Mean*-Werten zwischen den unterschiedlichen HLA-C-Typen der MSC-Linien festgestellt (Abb.3- 8B und C).

In Abb.3- 8B sieht man, dass die *Mean*-Werte von KIR2DL1 mehr von individuellen CBs abhängig sind, als von den HLA-C-Typen der *Feeder*-Zellen. Egal, ob die Liganden für KIR2DL1 (HLA-C2) und KIR2DL3 (HLA-C1) vorhanden waren, die *Mean*-Werte sowohl von KIR2DL1 als auch von KIR2DL3 der generierten NK-Zellen liegen ungefähr im gleichen Bereich. Wie schon die Prozentzahl der KIR2DL1⁺ und KIR2DL3⁺ NK-Zellen, waren die *Mean*-Werte auch unspezifisch für ihren Liganden.

3.1.6 Messung der KIR2DL1- bzw. KIR2DL3-Transkripte der auf C1/C1 und C2/C2-MSCs generierten NK-Zellen

Die Menge der Transkripte von KIR2DL1 bzw. KIR2DL3 der NK-Zellen, die auf HLA-C1/C1 und -C2/C2-MCSs ausdifferenziert worden sind, wurde mittels Real-Time PCR gemessen, um festzustellen, ob die Expression von KIR2DL1 bzw. KIR2DL3 auf mRNA-Ebene von den HLA-C-Typen der MSC-*Feeder*-Zellen abhängig ist.

Am Ende der NK-Zelldifferenzierung auf HLA-C1/C1 und -C2/C2 MSCs wurden die NK-Zellen von den Kulturen abgenommen. Anschließend wurden die CD56⁺-Zellen durch den Zellsorter aussortiert, um die restlichen *Feeder*-Zellen auszusortieren. RNA wurde aus den NK-Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe der Real-Time PCR wurde die Transkription von KIR2DL1 bzw. KIR2DL3 der NK-Zellen quantitativ bestimmt. Die CD56⁺-NK-Zellen stammen aus drei voneinander unabhängigen Differenzierungen und die Ergebnisse sind in Abb.3- 9 dargestellt. Zur Auswertung wurde die Menge der KIR-Transkripte durch die von β -Aktin normalisiert. Der Δ CT-Wert ist die Differenz des CT-Werts der KIR und des CT-Werts des β -Aktins. Je höher der Δ CT-Wert ist, desto niedriger ist die

Transkript-Menge. Die Grafik in Abb.3- 9 zeigt, unabhängig vom HLA-C-Typ, war die Menge der KIR2DL3-Transkripte deutlich höher als von KIR2DL1. Die KIR2DL1-Transkription der NK-Zellen die auf HLA-C1/C1 oder HLA-C2/C2 generiert wurden war ungefähr gleich stark. Die Anwesenheit des Ligands von KIR2DL1 hat keinen Einfluss auf die Menge von KIR2DL1 auf mRNA-Ebene. Gleiche Ergebnisse wurden bei der Menge von KIR2DL3-Transkripten festgestellt. Ihre Werte von C1/C1 und C2/C2 hatten kaum einen Unterschied.

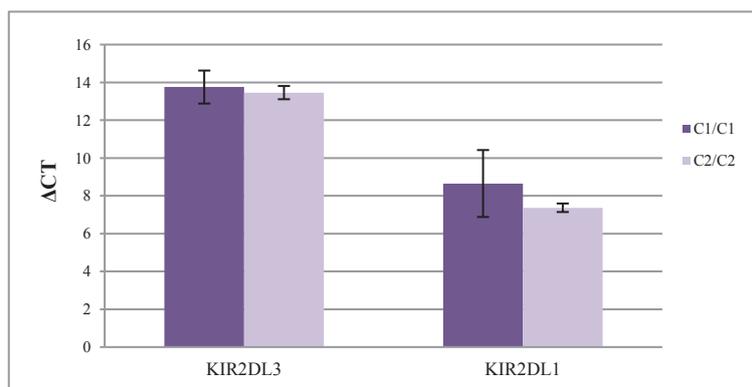


Abb.3- 9: Quantitative Bestimmung der KIR2DL1- und KIR2DL3-Transkription mittel Real-Time PCR. Die Ergebnisse beziehen sich auf drei einzelne Differenzierungen (n=3).

Aus oben erwähnten Ergebnissen geht hervor, dass es auf mRNA-Ebene keine Adaption der KIR-Rezeptoren an den vorhandenen HLA-C-Typen gibt. Keine HLA-C-spezifische Transkription von KIRs kann festgestellt werden. Dies spiegelt die Ergebnisse auf Protein-Ebene wieder.

3.1.7 KIR3DL1-Expression ist unabhängig vom HLA-Klasse-I-Liganden Bw4

Die für die NK-Zelldifferenzierung verwendeten MSC-Zellen unterscheiden sich auch in ihrer Expression von Bw4, dem HLA-B-kodierten Liganden von KIR3DL1. MSC39 und MSC34 sind HLA-Bw6/Bw6 homozygot, MSC9 HLA-Bw4/Bw6 heterozygot, MSC16 und MSC20 HLA-Bw4/Bw4 homozygot. HLA-Bw4 ist der Ligand für KIR3DL1 (Cella *et al.*, 1994; Gumperz *et al.*, 1995).

In der Abb.3- 10 wurde gezeigt, dass keine HLA-Bw4-spezifische Expression von

KIR3DL1 festgestellt werden konnte. In Woche 4 haben die auf MSC39 (Bw6/Bw6) generierten NK-Zellen die höchste KIR3DL1-Expressionsrate, während in Woche 5 die auf MSC9 (Bw4/Bw6) generierten NK-Zellen die höchste KIR3DL1-Expressionsrate zeigen. Knapp 4% der generierten NK-Zellen haben KIR3DL1 auf ihrer Oberfläche exprimiert. Wie schon bei den Ergebnissen der KIR2DL1- und KIR2DL3-Expression, haben die auf MSC16 (Bw4/Bw4) generierten NK-Zellen, auch die niedrigste KIR3DL1-Expressionsrate, obwohl MSC16 homozygot für Bw4 (Ligand für KIR3DL1) ist.

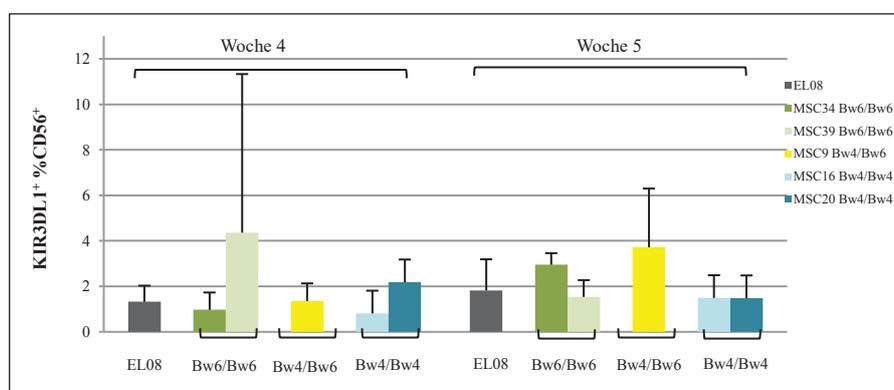


Abb.3- 10: KIR3DL1-Expression in der vierten und fünften Woche der NK-Zelldifferenzierung aus CD34⁺-HSCs auf HLA-B-polymorphen MSC-Feeder-Zellen.

Fasst man die Ergebnisse von allen drei KIR-Rezeptoren zusammen, zeigt sich, dass das KIR-Repertoire der NK-Zellen, die aus CB-CD34⁺-HSCs in vitro differenziert wurden, HLA-Klasse-I-unspezifisch ist und die Stärke der Expression mehr von den MSC-Linien selber als von ihrem HLA-Klasse-I-Typ abhängig ist.

3.1.8 HLA-Klasse-I-unspezifische Expression der KIR-Rezeptoren im Verlauf der NK-Zellentwicklung aus CD34⁺-HSCs, die aus Knochenmark isoliert wurden

Aus den oben beschriebenen Experimenten geht hervor, dass die KIR-Expression der

NK-Zellen während der NK-Zellentwicklung aus CB (also aus Neugeborenen) isolierten CD34⁺-HSCs unabhängig von vorhandenen HLA-Klasse-I-Typen ist. Diese Ergebnisse passen zu einer Studie unserer Arbeitsgruppe in der gezeigt wurde, dass neonatale NK-Zellen aus CB noch keine Anpassung an die HLA-Klasse-I-Liganden des Spenders zeigt (Schönberg *et al.*, 2011b). Im Gegensatz dazu konnte im peripheren Blut von Erwachsenen, wie in der Einleitung beschrieben, eine deutliche Anpassung des KIR-Repertoires festgestellt werden (Schönberg *et al.*, 2011a). Deshalb ergab sich nun die Frage, ob eine Anpassung an die HLA-Klasse-I-kodierten KIR-Liganden stattfindet, wenn das Startmaterial CD34⁺-HSCs aus Knochenmark von erwachsenen Spendern sind. Zu diesem Zweck wurden CD34⁺-HSCs aus Knochenmark von drei gesunden Erwachsenen isoliert, die ebenso wie die CB Proben den KIR-Genotyp AA besitzen und anschließend auf zwei verschiedenen MSC-Linien (MSC39: C1/C1 Bw6/Bw6; MSC16: C2/C2, Bw4/Bw4) ausplattiert und zu NK-Zellen ausdifferenziert. Die KIR-Expression wurde während der NK-Zellentwicklung durchflusszytometrisch verfolgt.

Im Vergleich zu den CD34⁺-HSCs aus Neugeborenen proliferieren die CD34⁺-HSCs aus Erwachsenen deutlich langsamer. Nach einer Woche hatten die Zellen aus CB sich 25 bis 30-fach im NK-Zellgenerierungs-Medium¹ vermehrt, während die Zellen aus dem Knochenmark sich nur 10-20-fach vervielfältigt haben. Aus diesem Grund wurden mehr CD34⁺-HSCs aus Knochenmark für die NK-Zelldifferenzierung eingesetzt. Ansonsten wurden keine klaren Unterschiede während der NK-Zellentwicklung *in vitro* festgestellt. Die CD34⁺-Zellen aus Knochenmark verhielten sich sehr ähnlich wie die aus CB während der NK-Zellentwicklung. Sie waren in der Lage sich zu NK-Zellen mit entsprechenden Oberflächenmarkern in der Kultur auszudifferenzieren.

Wie die Zellen aus CB, haben die aus Knochenmark generierten NK-Zellen in der vierten und fünften Woche die höchste KIR-Expressionsrate erreicht. Deshalb wurden die Daten aus diesen beiden Woche für die Analyse der KIR-Expression verwendet.

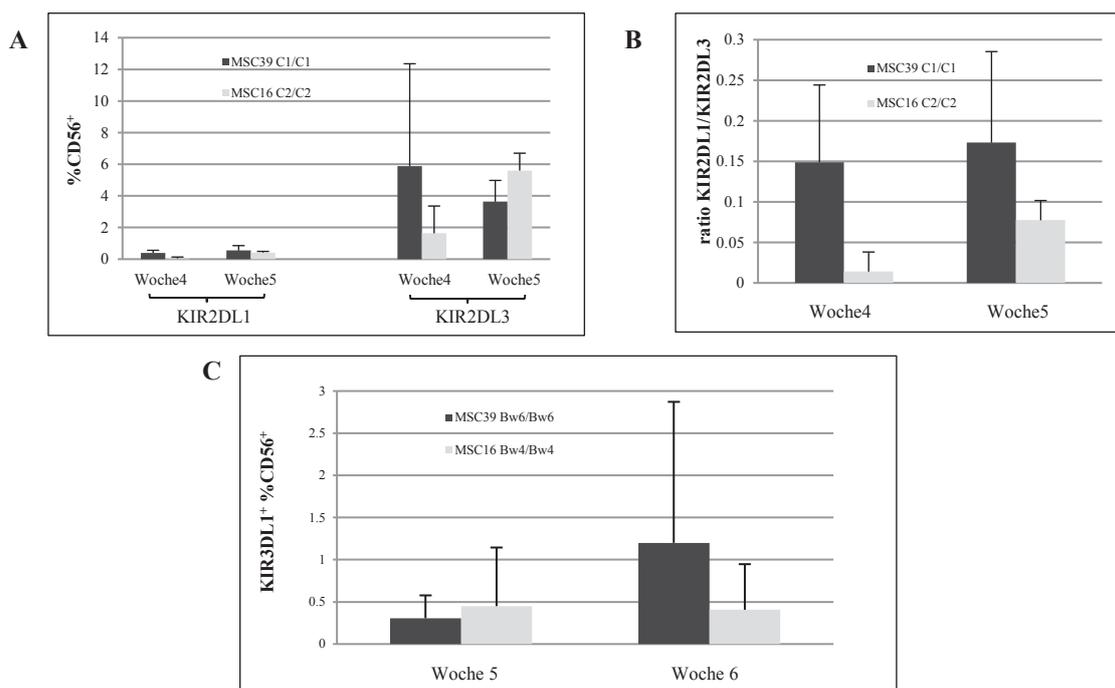


Abb.3- 11: KIR-Expression während der NK-Zelldifferenzierung von CD34⁺-HSCs aus adultem Knochenmark. A: KIR2DL1- und KIR2DL3-Expression in der vierten und fünften Woche der NK-Zelldifferenzierung. B: Quotient von KIR2DL1/KIR2DL3. C: KIR3DL1-Expression in der vierten und fünften Woche der NK-Zelldifferenzierung.

In der Abb.3- 11A wurde die KIR2DL1- und KIR2DL3-Expression dargestellt. Sowohl auf C1/C1-, als auch auf C2/C2- MSC generierten NK-Zellen exprimierten überwiegend KIR2DL3. Im Vergleich dazu war die Prozentzahl der KIR2DL1⁺-Zellen bei beiden Linien viel niedriger. Unabhängig von dem vorhandenen HLA-C-Typ war KIR2DL3 viel stärker exprimiert als KIR2DL1. Auf C2/C2- MSC (Ligand für KIR2DL1) wurden ungefähr gleich viel KIR2DL1⁺ NK-Zellen generiert, wie auf C1/C1- MSC. Trotz der Anwesenheit des KIR2DL1's Liganden HLA-C2 auf den MSC waren viel weniger generierte NK-Zellen KIR2DL1 positiv als KIR2DL3. Der Quotient (Abb.3- 11B) von KIR2DL1/KIR2DL3 lag unabhängig vom HLA-C-Typ weit unter eins, d.h. unter den Kulturbedingungen exprimieren die ausdifferenzierten NK-Zellen die KIR2DL1 und KIR2DL3 Rezeptoren unabhängig vom HLA-C-Typ. Da KIR3DL1 erst in der vierten Woche von den NK-Zellen exprimiert wurde, und erst in der fünften und sechsten ihre höchste Expressionsrate erreichte, wurden die Daten von Woche 5 und Woche 6 für die Analysen der KIR3DL1-Expression

eingesetzt. In der Abb.3- 11C wurde gezeigt, dass die KIR3DL1-Expression auch unabhängig von der Anwesenheit seines HLA-B-Liganden (HLA-Bw4) ist. Bei Abwesenheit von HLA-Bw4 wurden sogar mehr KIR3DL1⁺ NK-Zellen in der sechsten Woche der NK-Zelldifferenzierung detektiert.

Wenn die Ergebnisse der KIR2DL1-, KIR2DL3- und KIR3DL1-Expression zusammengefasst werden, kann keine HLA-Klasse-I-Spezifität der KIR-Expression festgestellt werden. Die Häufigkeit der KIR-Expression war, während der *in vitro* NK-Zelldifferenzierung aus CD34⁺-HSCs (aus CB und Knochenmark), mehr von einzelnen MSC-Linien abhängig als von HLA-Klasse-I-Typen.

3.1.9 Funktionalität der aus KM-CD34⁺-HSCs entwickelten NK-Zellen

Nach der Kokultivierung mit HLA-Klasse-I-defekten K562-Zellen wurde die Zytotoxizität mit Hilfe des CFSE-Assays festgestellt.

In Abb.3- 12 ist zu sehen, dass die aus KM-CD34⁺-HSCs differenzierten NK-Zellen zytotoxisch waren. Sie hatten offensichtlich die *Target*-Zellen erkannt und einen Teil davon durch ihre Zytotoxizität abgetötet. Die generierten NK-Zellen aus Knochenmark 1 hatten mit 40% getöteter Zellen, die höchste *Killingrate*. Die von Knochenmark 2 und Knochenmark 3 waren ungefähr gleich, bei 20%. Dabei spielt der Typ der MSC-Feeder-Zellen keine Rolle.

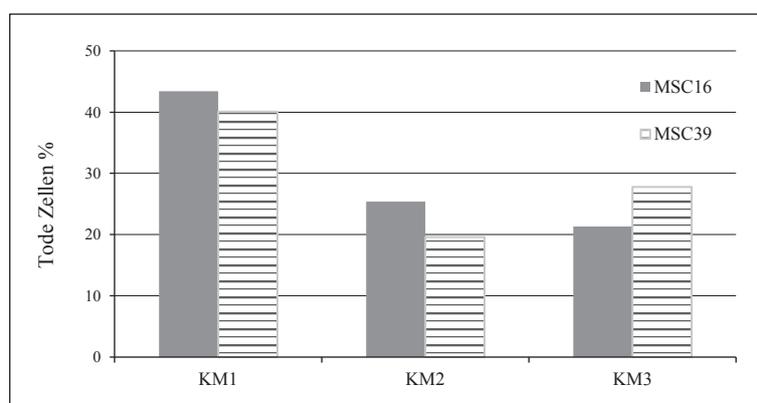


Abb.3- 12: Zytotoxizitätsmessung (CFSE-Assay) mit NK-Zellen, die aus CD34⁺-HSCs des Knochenmarks differenziert wurden. MSC16: HLA-C2/C2, -Bw4/Bw4; MSC39: HLA-C1/C1, -Bw6/Bw6.

3.1.10 NK-Zelldifferenzierung nach Umplattierung auf frische MSC

Die NK-Zelldifferenzierung aus HSCs dauert einige Wochen, in denen die bestrahlten MSC ihre kostimulatorische Funktion ausüben sollen. Obwohl MSC unter diesen Bedingungen sehr lange in Kultur überleben (mindestens 5 Wochen), war nicht auszuschließen, dass die *Feeder*-Zellen (MSC) zum Zeitpunkt der Aktivierung und Expression der KIR-Gene nicht mehr die für die Anpassung an HLA-Klasse-I notwendigen Signale geben könnten. Daher wurden die KIR-negativen NK-Zellen nach zwei Wochen auf frische MSC umplattiert. Zu diesem Zeitpunkt, d.h. ab der dritten Kulturwoche, beginnen die meisten KIR-negativen NK-Zellen, KIR-Rezeptoren zu exprimieren. Eine bzw. zwei Wochen nach der Umplattierung wurde die KIR-Expression der NK-Zellen gemessen.

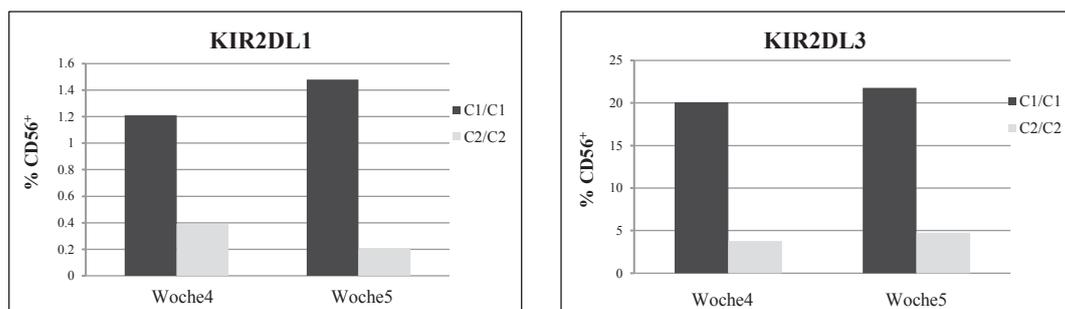


Abb.3- 13: KIR2DL1- und KIR2DL3-Expression in der vierten und fünften Woche der NK-Zelldifferenzierung nach der Umplattierung der KIR-negativen NK-Zellen nach 2 Wochen auf frische MSC.

Im Abb.3- 13 ist dargestellt, dass trotz der Anwesenheit des HLA-C2-Liganden auf der entsprechenden frischen MSC-Linie die Expression des spezifische KIR (KIR2DL1) schwächer war als die Expression des C1-spezifischen Rezeptors KIR2DL3 für den die MSC-Linie gar keinen HLA Liganden hat. In beiden Kulturen war KIR2DL3 der am häufigsten exprimierte KIR-Rezeptor von allen exprimierten KIR-Rezeptoren. Ob die KIR-negativen NK-Zellen auf C1/C1- oder C2/C2-MSC waren, spielte hier keine Rolle. KIR2DL3 wurde wesentlich stärker exprimiert als KIR2DL1. Eine HLA-C-Spezifität bei der KIR-Expression konnte nicht festgestellt werden.

3.1.11 Induktion der KIR-Expression auf *ex vivo*-isolierten NK-Zellen in Anwesenheit von MSC-Linien mit verschiedenen KIR Liganden

In den vorhergegangenen Experimenten konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die fehlende Anpassung der KIR-Expression an die vorhandenen HLA-Klasse-I Liganden ein *in vitro* Artefakt sind, welches durch inadäquate exogene Signale der MSC während der NK-Zellentwicklung hervorgerufen wird. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt die Anpassung des KIR-Repertoires an HLA-Klasse-I-Liganden auf bereits determinierten, aber noch KIR-negativen NK-Zellen untersucht, die *ex vivo* aus CB isoliert wurden. Hierzu wurden CD56^{bright} und CD56^{dim}-NK-Zellen, die keine KIR-Expression zeigten, direkt aus CB isoliert und mit frisch ausplattierten MSC-Feeder-Zellen kokultiviert. Konkret wurden drei verschiedene NK-Zell-Subpopulationen durchflusszytometrisch aus CB aufgereinigt: „Bright“ (CD56^{bright}/KIR⁻), „Dim“ (CD56^{dim}/NKG2A⁺/KIR⁻), und „DN“ (CD56^{dim}/NKG2A⁻/KIR⁻). Auf jedes *Well* wurden 50,000 Zellen von je einer Art ausplattiert. Nach ca. 14 Tagen Kultivierung auf MSC erreichten die NK-Zellen die höchste Rate der KIR-Expression.

Während der Kokultivierung mit MSC-Zellen proliferierte die *Bright*-Population am stärksten. Nach zwei Wochen hatten die *Bright*-Zellen sich fast 5fach vermehrt. Die *Dim*-Zellen waren bei der Proliferation am langsamsten (Verdopplung nach ca. 2 Wochen). Die Proliferationsrate der DN-Zellen lag zwischen den *Bright*- und *Dim*-Zellen. Im Gegensatz dazu hatten die *Bright*-Zellen die niedrigste KIR-Expressionsrate. Die DN-Zellen hatten die höchste KIR-Expressionsrate gefolgt von den *Dim*-Zellen.

KIR2DL3 war wieder der am stärksten exprimierte KIR-Rezeptor, unabhängig von den vorhandenen HLA-C-Typen, wie bei den NK-Zelldifferenzierungen aus CD34⁺-HSCs. Auf beiden, sowohl HLA-C1/C1 als auch HLA-C2/C2-positiven MSC, war die KIR2DL1-Expression viel schwächer als die von KIR2DL3. Die KIR2DL1-Expression von allen drei KIR-negativen NK-Zellpopulationen auf C2/C2 MSC war nicht stärker als die auf C1/C1 MSC, und war viel schwächer als die

KIR2DL3-Expression. Gleiche Ergebnisse wurden bei den auf C1/C1 generierten NK-Zellen beobachtet (Abb.3- 14A). Die KIR3DL1-Expression wurde ebenfalls nicht signifikant durch die vorhandenen HLA-B-Typen beeinflusst. Die Anwesenheit des KIR3DL1 Liganden, HLA-Bw4, führte zu keiner Verstärkung der KIR3DL1-Expression im Vergleich zu den auf HLA-Bw6-homozygoten MSC generierten KIR-negativen NK-Zellen (Abb.3- 14B).

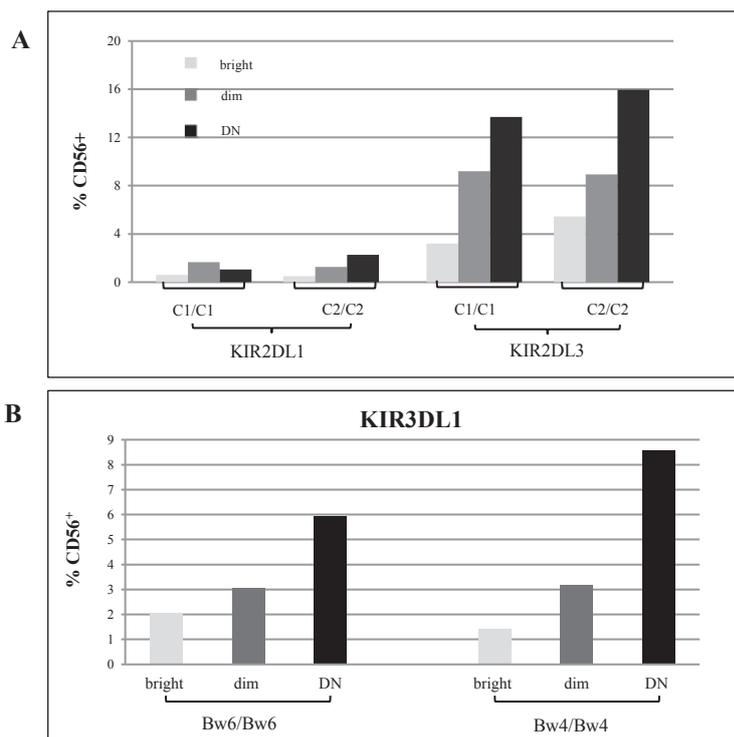


Abb.3- 14: KIR-Expression von KIR-negativen NK-Zellen während der NK-Zelldifferenzierung auf HLA-Klasse-I-unterschiedlichen MSC-Feeder-Zellen. Drei Sorten von KIR-negativen NK-Zellen wurden durchflusszytometrisch aufgereinigt. *Bright*: CD56^{bright}/KIR⁻/NKG2A^{+/-}; *Dim*: CD56^{dim}/KIR⁻/NKG2A⁺; *DN*: CD56^{dim}/KIR⁻/NKG2A⁻ A: KIR2DL1- und KIR2DL3-Expression der KIR-negativen NK-Zellen. B: KIR3DL1-Expression der KIR-negativen NK-Zellen. Daten waren Mittelwerte von zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Zellen waren 14 Tage mit MSC-Feeder-Zellen kultiviert

Im Rahmen der Entwicklung von NK-Zellen aus KIR-negativen NK-Zellen *in vitro* spielten die HLA-Klasse-I-Moleküle keine Rolle in der Entstehung des KIR-Repertoires der differenzierenden Zellen.

3.1.12 MSC verhindern die Proliferation von NK-Zellen

Zu den in Abschnitt 3.1.11 beschriebenen Experimenten wurde auch ein Ansatz mit murinen EL08-Feederzellen als Positivkontrolle angesetzt, um festzustellen, ob die CD56⁺KIR⁻ NK-Zellen überhaupt gut in Kultur überleben und proliferieren können. Zum Beginn wurden 50,000 Zellen pro Welle ausplattiert.

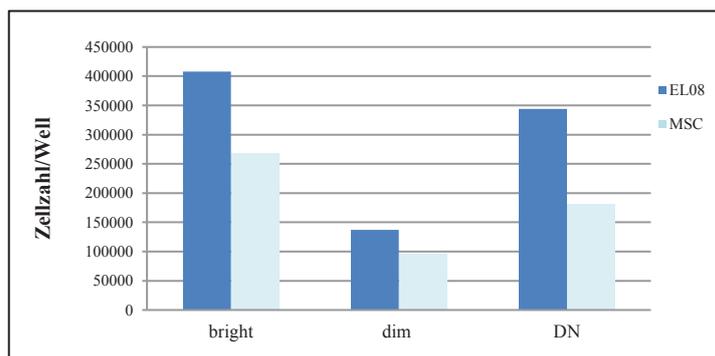


Abb.3- 15: Zellzahl zwei Wochen nach der Ausplattierung der aus CB isolierten CD56⁺KIR⁻ NK-Zellen. Die Werte der NK-Zellen auf MSC sind Mittelwerte der Kulturen von MSC-C1/C1 und -C2/C2.

Nach einer Woche war die Vermehrung der Zellen auf EL08 unter dem Mikroskop deutlich zu erkennen, während auf den MSC-Zellen kein Unterschied in der Zellzahl der sich differenzierenden Zellen festgestellt werden konnte. Zu der Zeit sind fast alle EL08-Feeder-Zellen verschwunden, wohingegen MSC-Feeder-Zellen noch gut zu sehen waren. Die Zellzahl wurde nach zwei Wochen bestimmt und in Abb.3- 15 dargestellt: es zeigt sich, dass die auf EL08 ausplattierten Zellen viel stärker proliferierten als die auf MSC ausplattierten Zellen. Die Zellzahl der DN-Zellen auf EL08 war fast doppelt so groß, wie auf MSC. Auch bei den anderen zwei Arten von KIR-negativen NK-Zellen war die Reduktion der Zellproliferation auf MSC im Vergleich zu EL08 deutlich zu erkennen. Die auf EL08 generierten Zellen hatten nur eine Woche gebraucht, um ihre höchste KIR-Expressionsrate zu erreichen, während die auf MSC genierenden Zellen zwei bis drei Wochen brauchten. Die beobachtete Inhibition der NK-Zellproliferation deutet darauf hin, dass die MSC-Zellen, wie vielfach beschrieben, immunregulatorisch auf Lymphozyten wirken können, u.a.

durch Hemmung des Tryptophan Stoffwechsels der Zielzellen (Meisel *et al.*, 2014).
Interessanterweise wirken die MSC nur auf reife NK-Zellen immunsuppressiv nicht
aber auf hämatopoetische Progenitoren.

3.2 Einfluss der Herunterregulation von HLA-Klasse-I-Molekülen auf die Differenzierung bzw. KIR-Expression von NK-Zellen

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass im Rahmen der NK-Zelldifferenzierung keine Anpassung des KIR-Repertoires an die vorhandenen KIR-Liganden erfolgt. Unklar war jedoch weiterhin, inwiefern die Anwesenheit von HLA-Klasse-I, unabhängig von Unterschieden in den NK-Zell-Liganden C1, C2, und Bw4, die Entwicklung der NK-Zellen beeinflusst. Zu diesem Zweck sollte die Expression von HLA-Klasse-I in den MSC-Linien durch RNA Interferenz (RNAi) reduziert werden.

3.2.1 Herunterregulation von β -2-Mikroglobulin mittels RNAi

Da das β -2-Mikroglobulin (b2M) ein essenzieller Baustein aller HLA-Klasse-I-Moleküle ist, kann HLA-Klasse-I durch die shRNA vermittelte Herunterregulation des b2M reduziert werden. Durch lentivirale Infektion wurden die shRNAs in die MSC-Zellen eingeführt, und in den MSC permanent exprimiert. Eine Woche nach der Infektion wurden die MSC-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Im Anschluss konnte durch Real-Time PCR die Effizienz der shRNAs quantitativ bestimmt werden.

Abb.3-4 zeigte bereits, dass HLA-Klasse-I von jeder normalen MSC-Zelle exprimiert wird. Die unteren Plots (Abb.3- 16A) zeigten die HLA-Klasse-I Expression der infizierten MSC-Zellen an. Die lentivirale Infektion aller Vektoren war erfolgreich, über 95% der MSC-Zellen waren GFP positiv nach der Infektion, d.h. fast alle Zellen waren erfolgreich infiziert. Bei den, mit dem Leervektor infizierten Zellen wurde eine normale HLA-Klasse-I-Expression beobachtet. Knapp 98% aller Zellen waren HLA-Klasse-I positiv. Die HLA-Klasse-I-Expression in den mit shRNA1 gegen b2M infizierten Zellen wurde dramatisch reduziert. Ungefähr 82% der infizierten Zellen hatten keine HLA-Klasse-I-Moleküle mehr auf ihrer Oberfläche, nur 18% der

infizierten Zellen waren noch schwach HLA-Klasse-I positiv. Die Herunterregulation von HLA-Klasse-I durch shRNA2 gegen b2M war viel schwächer als die von shRNA1. Nur die Hälfte der infizierten Zellen waren HLA-Klasse-I negativ. Der Effekt von shRNA3 gegen b2M war am schwächsten von allen drei shRNAs. Nur 18% der infizierten Zellen hatten ihrer HLA-Klasse-I-Expression auf der Oberfläche verloren.

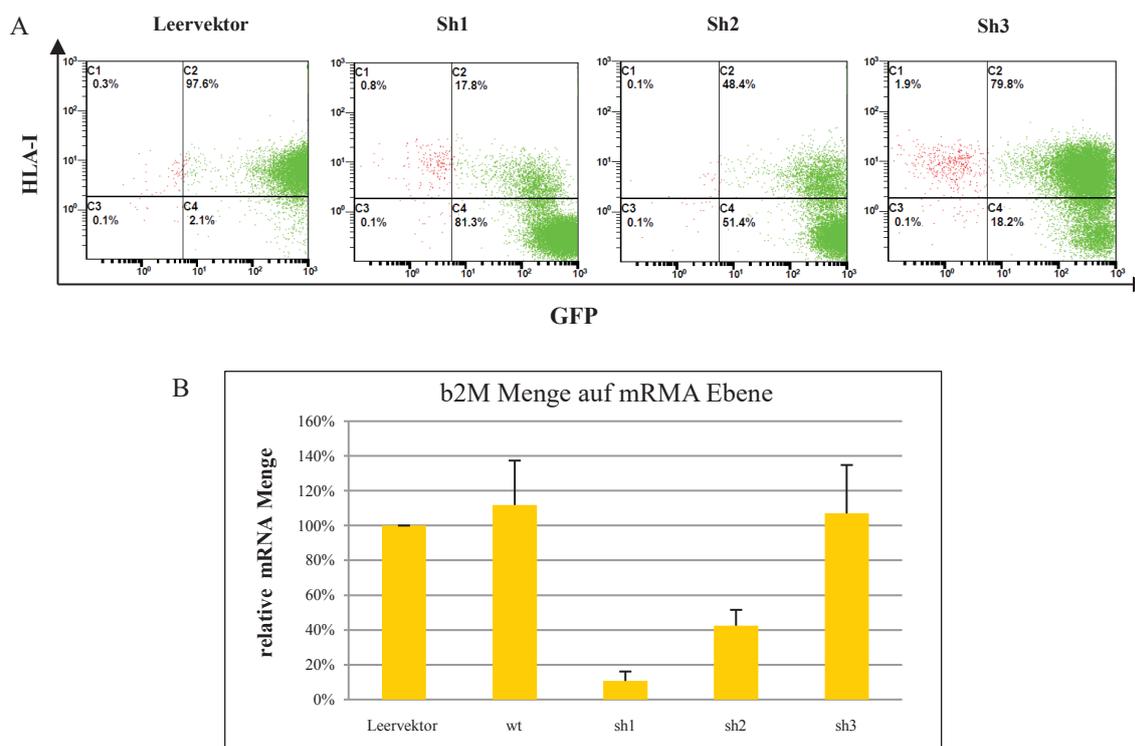


Abb.3- 16: Herunterregulation von b2M mittels shRNA. Drei shRNA-Sequenzen wurden verwendet. A: Durchflusszytometrische Analyse der HLA-Klasse-I-Expression von infizierten Zellen. MSC-Zellen wurden mit PE-markierten Antikörpern gegen HLA-Klasse-I gefärbt, infizierte Zellen wurden über ihre Expression von GFP identifiziert. B: Quantitative Bestimmung der b2M Menge auf mRNA-Ebene von infizierten MSC-Zellen mittels Real-Time PCR. (n=3)

Die Abb.3- 16B zeigt die Bestimmung der b2M-Menge auf mRNA Ebene durch Real-Time PCR. Die Daten stammen aus drei voneinander nicht abhängigen Experimenten. Das Ergebnis der Real-Time PCR spiegelte die Ergebnisse der Durchflusszytometrie wieder. Die shRNA1 hatte den stärksten Effekt auf b2M und reduzierte die Transkription von HLA-Klasse-I um 80%, während die shRNA2 knapp 60% der b2M-Transkription unterdrückte. Keine Herunterregulation der b2M auf mRNA Ebene wurde in den mit shRNA3 infizierten Zellen festgestellt. Die

Ergebnisse der Real-Time PCR zeigten auch, dass mit shRNA1 (die stärkste Reduktion von b2M) anschließend dann auch die stärkste Herunterregulation von HLA-Klasse-I verursacht werden konnte. Basierend auf den Ergebnissen, wurde shRNA1 gegen b2M in den weiteren Experimenten für die Herunterregulation von HLA-Klasse-I in den *Feeder*-Zellen verwendet.

3.2.2 NK-Zelldifferenzierung auf HLA-Klasse-I-defekten MSC-Zellen

Die mit shRNA1 gegen b2M infizierten MSC-Zellen wurden gegen HLA-Klasse-I gefärbt. Die für HLA-Klasse-I negativen MSC-Zellen wurden aufgereinigt und als *Feeder*-Zellen für die NK-Zelldifferenzierung aus HSCs eingesetzt. Parallel dazu wurden MSC-Zellen, die mit dem Leervektor infiziert waren und HLA-Klasse-I normal exprimierten als Kontrolle für die Experimente verwendet.

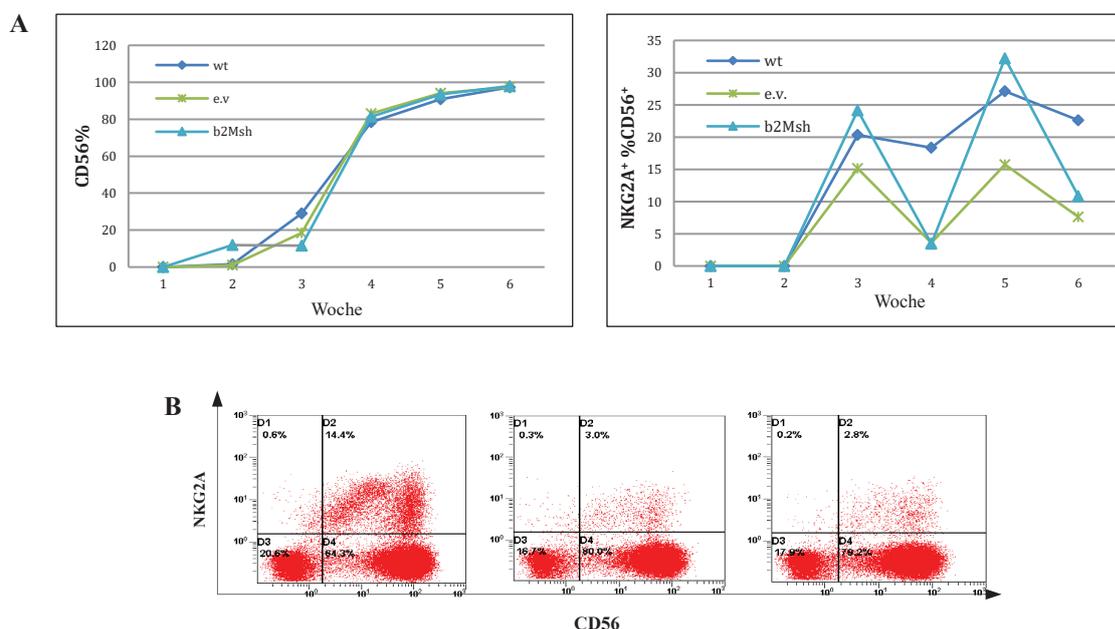


Abb.3- 17: CD56- und NKG2A-Expression der generierten NK-Zellen auf HLA-Klasse-I-defizienten MSC. wt: Wildtyp ev: Leervektor b2Msh: shRNA gegen b2M. A: Darstellung der CD56- und NKG2A-Expression im Lauf der NK-Zelldifferenzierung. Als *Feeder*-Zellen wurden wt: normale MSC-Zellen, e.v.: mit Leervektor infizierte MSC-Zellen und sh: mit shRNA gegen b2M infizierte und HLA-Klasse-I-negative MSC-Zellen verwendet. B: FACS-Plots von Oberflächenfärbungen gegen CD56 und NKG2A auf den differenzierten NK-Zellen.

Die NK-Zellentwicklung auf allen sechs MSC-Linien (wt Bw6/Bw6 C1/C1, wt Bw4/Bw4 C2/C2, Leervektor Bw6/Bw6 C1/C1, Leervektor Bw4/Bw4 C2/C2, b2M sh Bw6/Bw6 C1/C1 und b2M Bw4/Bw4 C2/C2) verlief normal. Die CD56-Expression war auf aller Linien vergleichbar (Abb.3- 17A). Die NKG2A-Expression war bei den MSC, die mit dem Leervektor und mit b2M shRNA transfiziert waren, etwas niedriger als bei den auf Wildtyp-MSC generierten NK-Zellen (Abb.3- 17B).

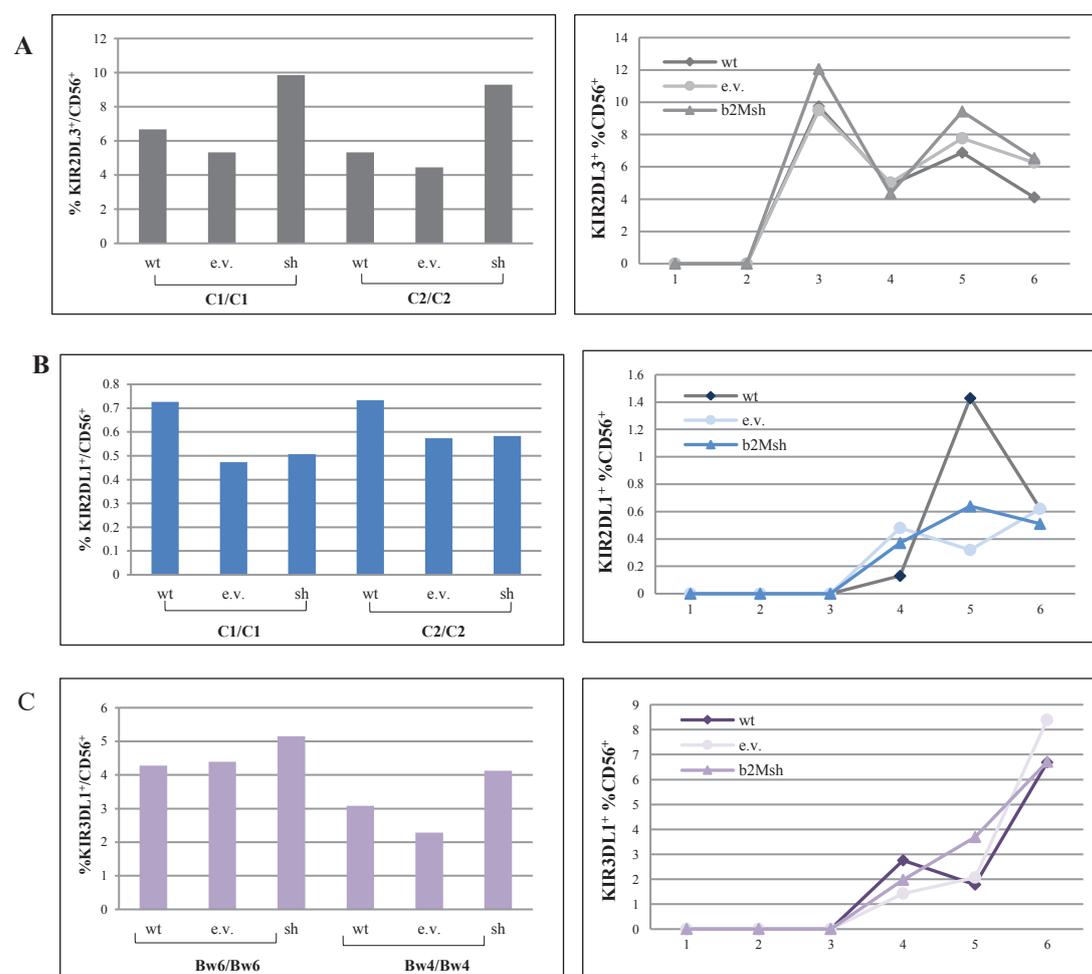


Abb.3- 18: KIR-Expression der NK-Zellen, die auf mit Leervektor, b2Msh infizierten und wildtypischen MSC-Feeder-Zellen generiert wurden. In den linken Abbildungen sind die Mittelwerte aus der vierten, fünften und sechsten Woche der NK-Zelldifferenzierung aufgetragen. In den Grafiken auf der rechten Seite ist die KIR-Expression im Lauf der Zeit exemplarisch dargestellt. A: KIR2DL3-Expression. B: KIR2DL1-Expression. C: KIR3DL1-Expression.

Die KIR2DL3- und KIR3DL1-Expression der NK-Zellen, die auf mit b2M shRNA infizierten MSC generiert wurden war sogar etwas stärker als die von NK-Zellen, die

auf mit Leervektor infizierten oder auf normalen MSC-Feeder-Zellen generiert wurden (Abb.3- 18A und C). Alle generierte NK-Zellen hatten eine sehr niedrige Expressionsrate von KIR2DL1, d.h. weniger als 1% der CD56⁺-Zellen waren für KIR2DL1 positiv (Abb.3- 18B).

Das komplette Ausschalten von HLA-Klasse-I-Molekülen hatte nur sehr begrenzte Auswirkungen auf die NK-Zellentwicklung aus CD34⁺-HSCs *in vitro*. Insgesamt konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression der verschiedenen KIR zwischen NK-Zellen detektiert werden, die auf HLA-Klasse-I positiven oder negativen MSC ausdifferenziert worden waren. KIR2DL3 war der am stärksten exprimierte KIR-Rezeptor unabhängig davon, ob sein Ligand HLA-C1 vorhanden war. Die KIR2DL1-Expression war hingegen viel schwächer als die von KIR2DL3, trotz der Anwesenheit seines Liganden HLA-C2. Ähnliche Ergebnisse ergab die KIR3DL1-Expression. Ob der Ligand HLA-Bw4 vorhanden war, spielte keine Rolle für die Frequenz der KIR3DL1-exprimierenden NK-Zellen.

3.2.3 NK-Zell Differenzierung aus hämatopoetischen Vorläuferzellen auf TAP-defizienten Fibroblasten

Ein weiteres Modell an dem man die Auswirkungen einer nahezu vollständigen HLA-Klasse-I-Defizienz auf das KIR-Repertoire untersuchen kann, sind Zellen von Peptid-Transporter-defizienten Zellen. Zu diesem Zweck wurden in Kooperation mit Prof. J. Zimmer (Luxemburg) Fibroblasten von Patienten verwendet, die einen Defekt in der TAP2-Untereinheit des Peptidtransporter-Komplex aufweisen. Diese Fibroblasten können aufgrund dieses Defekts ihre HLA-Klasse-I-Moleküle nicht mehr mit Peptiden beladen und werden deshalb nicht aus dem ER an die Zelloberfläche befördert. Diese TAP-defizienten Fibroblasten sind im Gegensatz zu den in den vorherigen Experimenten verwendeten b2m knockdown MSC komplett HLA-Klasse-I-defizient. In den entsprechenden Experimenten wurden drei Fibroblasten-Linien als Feeder-Zellen für die NK-Zelldifferenzierung verwendet.

Davon ist die STF5 die Wild-Typ Kontrolle, während die STF1 und BRE immobilisierte TAP-defiziente Zelllinien sind. Als Folge des TAP-Defekts fehlen den beiden Linien die HLA-Klasse-I-Moleküle komplett, während die Kontroll-Linie STF5 HLA-Klasse-I normal exprimiert (Abb.3- 19).

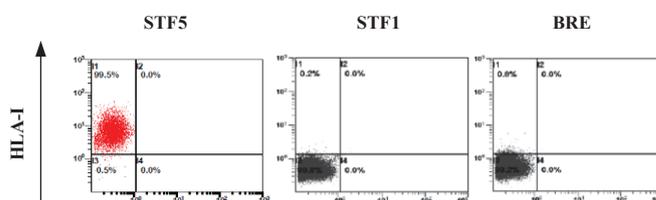


Abb.3- 19: HLA-Klasse-I-Expression der wildtypischen und TAP-defizienten Fibroblasten Linien. STF5: normale Fibroblasten Linie als Kontrolle. STF1 und BRE: TAP-defizient.

Aus Nabelschnurblut wurden $CD34^+$ -HSCs isoliert, die Zellen wurden in NK1-Medium aufgenommen und auf EL08- und drei verschiedenen Fibroblasten-Zellen ausplattiert. Nach einer Woche, kultiviert in NK1-Medium und einer Woche in NK2-Medium wurden Zellen für die Durchflusszytometrie abgenommen. Unabhängig von den gewählten *Feeder*-Zellen exprimierten 60% und 77% $CD38$, ein Oberflächenmarker der auf $CD34^+$ hämatopoetischen Progenitoren zu diesem Zeitpunkt der Kultur typischerweise auftaucht. Die Prozentzahl von $CD38^+$ Zellen lag zwischen 60% und 77%. Die auf EL08-generierten Zellen exprimierten $CD38$ häufig mit $CD56$ zusammen. Zwar exprimierten die Zellen auf allen Fibroblasten $CD38$ auch ungefähr so häufig wie die auf EL08, aber die $CD56$ -Expression war auf diesen Zellen kaum detektierbar (Abb.3- 20).

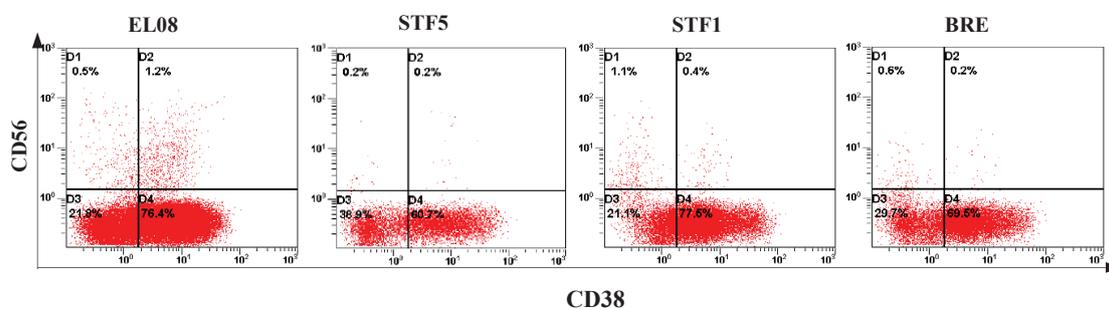


Abb.3- 20: $CD38$ - und $CD56$ -Expression der auf EL08-, STF5-, STF1- und BRE-*Feeder* generierten Zellen nach 2 wöchigen Kultivierung. Davon sind STF1 und BRE TAP-defizient, STF5 ist der Wildtyp Fibroblast.

Die NK-Zellgenerierung auf allen drei Fibroblasten Linien war nicht erfolgreich, die meisten $CD34^+$ -HSCs erreichten lediglich die $CD38^+$ -Phase. Weiterhin war die Proliferation der Zellen wesentlich schlechter im Vergleich zu den Ansätzen in denen die Zellen auf EL08-Zellen kultiviert wurden. Auf allen *Feeder*-Linien waren 1500 $CD34^+$ -HSCs pro *Well* ausplattiert worden. Die Zellzahl der generierten Zellen auf allen *Feeder*-Linien stieg in den ersten drei Wochen an, danach proliferierten die Zellen lediglich auf EL08 bis zur 5. Woche weiter. Dagegen sank die Zellzahl der Zellen auf den drei Fibroblasten schon nach drei Wochen ab (Abb.3- 21).

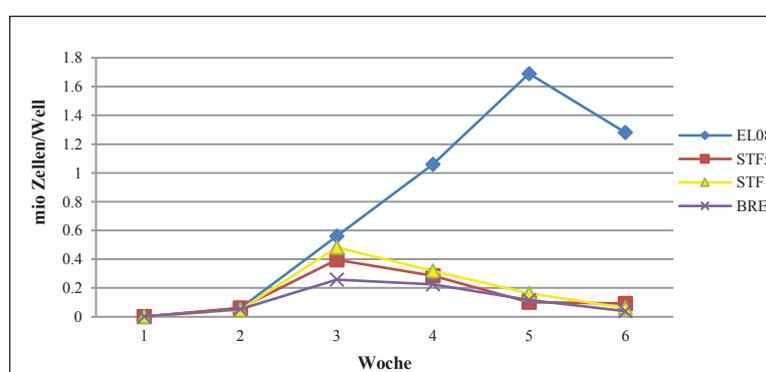
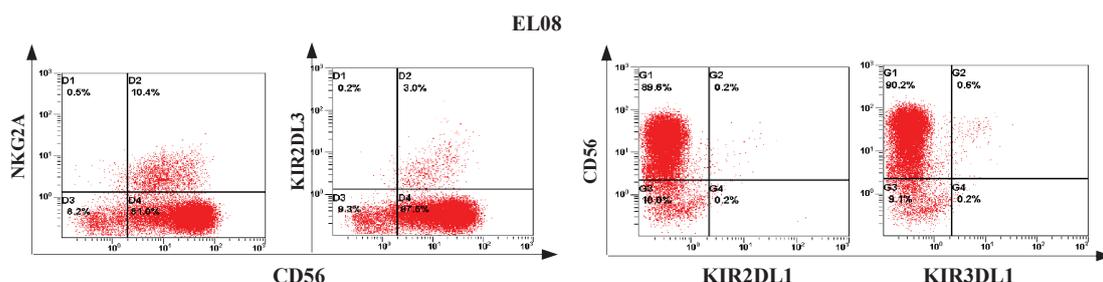


Abb.3- 21: Zellwachstum im Lauf der NK-Zellgenerierung aus HSCs. Wildtyp Fibroblasten STF5 und TAP-defekte Fibroblasten, STF1 und BRE wurden als *Feeder*-Zellen verwendet. EL08 als Kontrolle.

Insgesamt konnten auf den Kontrolle EL08-*Feeder*-Zellen erfolgreich NK-Zellen generiert werden die $NKG2A^+$ bzw. KIR^+ exprimierten, während auf den Fibroblasten Linien nur sehr wenige $CD56^+$ und kaum $NKG2A^+$ bzw. KIR^+ -Zellen zu finden waren (Abb.3- 22). Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Fibroblasten TAP-defekt oder wildtypisch waren.



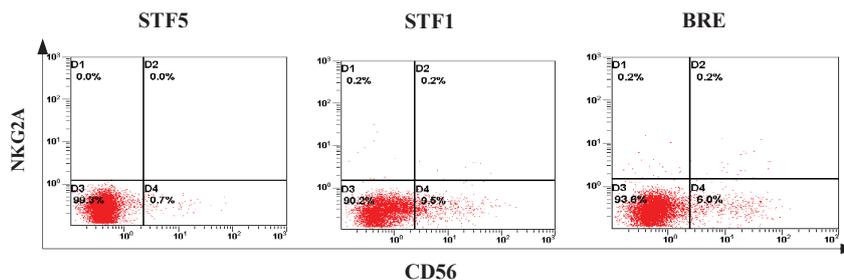


Abb.3- 22: Expression von Oberflächenmarkern am Ende der NK-Zelldifferenzierung auf EL08-, STF5-, STF1- und BRE-Feeder.

3.2.4 Kokultivierung von KIR-negativen NK-Zellen auf HLA-Klasse-I-defekten Fibroblasten

Die vorherigen Ergebnisse zeigen, dass Fibroblasten generell nicht geeignet sind, die NK-Zelldifferenzierung aus $CD34^+$ -HSCs zu unterstützen. Aus diesem Grund wurden weitere Experimente mit KIR-negativen NK-Zellpopulationen durchgeführt.

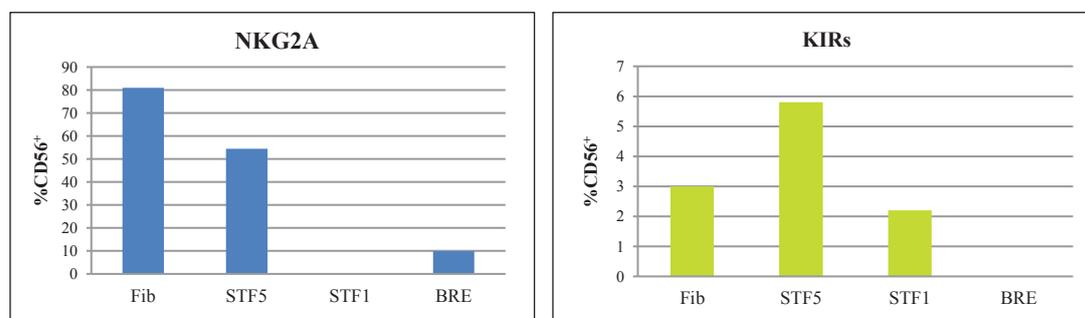


Abb.3- 23: NKG2A- und KIR-Expression von NK-Zellen, die aus $CD56^{\dim}$, $NKG2A^+$, KIR^- NK-Zellen differenziert wurden. Die Analyse erfolgte nach zwei-wöchiger Kokultur auf den entsprechenden Fibroblasten-Linien.

Zwei Arten von $CD56^{\dim}$ aber KIR-negativen NK-Zellen wurden aus Nabelschnurblut durchflusszytometrisch aufgereinigt, eine $NKG2A^+KIR^-$ Zellpopulation („2A“) und eine $NKG2A^-KIR^-$ Zellpopulation („DN“). Die sortierten Zellen wurden dann in NK-Medium aufgenommen und auf den vier Fibroblasten ausplattiert und für zwei Woche kultiviert. Generell war die Proliferationsrate von DN-Zellen viel höher als die

von 2A-Zellen (s. 3.1.11). Nach zweiwöchiger Kultivierung wurde die NKG2A- und KIR-Expression der entstandenen Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

Abb.3- 23 stellt die NKG2A- und KIR-Expression von 2A Zellen dar. Diese Gruppe von Zellen war ursprünglich NKG2A positiv, nach der Kultivierung auf den beiden Wildtyp-Fibroblastenlinien Fib. und STF5 war die Prozentzahl von NKG2A⁺ Zellen um 20% bzw. 45% reduziert. Auf den beiden TAP-defekten Linien war die Prozentzahl von NKG2A⁺ Zellen dramatisch reduziert. Auf STF1 waren kaum noch NKG2A⁺ Zellen zu finden, wobei auf BRE nur knapp 10% der Zellen noch NKG2A auf der Oberfläche trugen (Abb.3- 23 links). Die auf Wildtyp-Fibroblasten generierten NK-Zellen zeigten auch eine stärkere KIR-Expression als die auf TAP-defekten Fibroblasten generierten Zellen. Auf BRE wurden fast keine KIR⁺ Zellen generiert, auf STF1 waren 2,1% von den Zellen KIR positiv, wobei die Prozentzahl von KIR positiven Zellen auf Fib. und STF5 3% bzw. 5.8% betrug (Abb.3- 23 rechts).

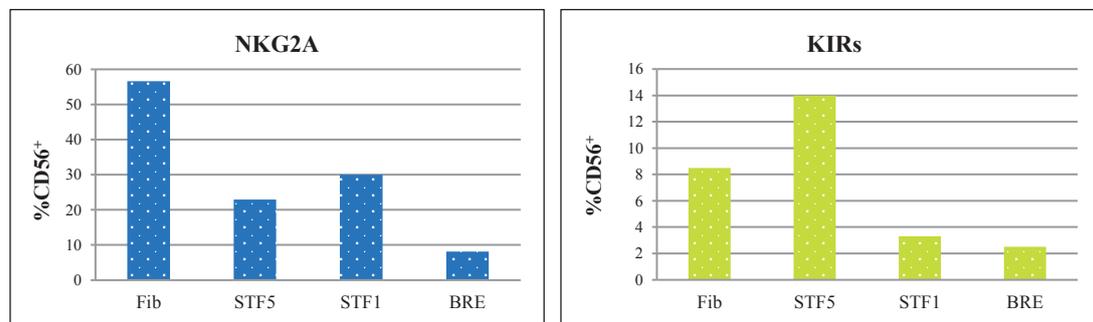


Abb.3- 24: NKG2A- und KIRs-Expression von NK-Zellen, die aus CD56^{dim} DN-NK-Zellen differenziert wurden. DN: KIR-negativ und NKG2A-negativ. Zwei Wochen in der Kokultur.

Ähnliche Ergebnisse waren bei den DN-Zellen zu sehen. Die auf Fibroblasten generierten Zellen exprimierten am meisten NKG2A, während die BRE sowohl für die NKG2A-Expression als auch für die KIR-Expression der schlechteste Support waren. Weniger als 10% der auf BRE generierten Zellen waren NKG2A positiv, nur 2,2% für KIR positiv. Ca. 30% der auf STF1 generierten Zellen exprimierten NKG2A auf ihrer Oberfläche, und auf STF5 waren ca. 25% der Zellen NKG2A positiv (Abb.3- 24 links). Auf STF5 wurde die höchste KIR-Expressionsrate festgestellt, ungefähr 14%

der Zellen haben nach der Kultivierung KIR-Rezeptoren exprimiert, gefolgt von den auf Fib. generierten Zellen, mit über 8%. Die Werte von STF1 lagen dazwischen, bei ungefähr 3,5% (Abb.3- 24 rechts).

Fasst man die Ergebnisse zusammen, konnte festgestellt werden, dass TAP-defekte Fibroblasten die Expression von NKG2A und KIR-Rezeptoren auf den NK-Zellen schlechter induzieren konnten als die wildtypischen Fibroblasten.

3.3 Überexpression von KIR2DL2 und KIR2DL4

KIR-Rezeptoren werden in reifen NK-Zellen klonotypisch, also von Zelle zu Zelle unterschiedlich, exprimiert. Es stellt sich die Frage, ob die Überexpression von bestimmten KIR-Rezeptoren die Expression von anderen KIR-Rezeptoren bzw. die NK-Zellentwicklung beeinflussen kann. Dazu wurden KIR2DL2- und KIR2DL4-kodierende cDNAs generiert und in einen Überexpressionsvektor inkloniert.

CD34⁺ hämatopoetische Progenitorzellen wurden dann mit dem KIR-cDNA-haltigen Überexpressionsvektor mittels Lentiviren infiziert und *in vitro* zu NK-Zellen ausdifferenziert.

3.3.1 Überexpression von KIR2DL2 und KIR2DL4 in CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen und in NK-Zellen

Um den Effekt des Überexpressionsvektors zu überprüfen, wurde die Zelllinie NKL als Testlinie mit den Vektoren lentiviral infiziert. In der Abb.3- 25 wird gezeigt, dass die wildtypischen NKL-Zellen weder KIR2DL2 noch KIR2DL4 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Nach der lentiviralen Infektion waren fast alle Zellen für den GFP-Reporter positiv, d.h. die Infektion war erfolgreich durchgeführt worden. Bei der Überexpression von KIR2DL2 ergab sich, dass die GFP-positiven Zellen auch für KIR2DL2 positiv waren, während die mit dem Leervektor infizierten Zellen nur GFP auf ihrer Oberfläche exprimierten, aber keine KIR2DL2-Expression sichtbar war. Die lentivirale Infektion selbst hatte also keinen Effekt auf die KIR-Expression auf den infizierten NKL-Zellen.

Die Überexpression von KIR2DL4 führte im Gegensatz zur Überexpression von KIR2DL2 nicht zu einer signifikanten Oberflächenexpression. Dies lag daran, dass KIR2DL4 generell auf NK-Zellen nicht auf der Oberfläche exprimiert wird außer wenn sie für längere Zeit stimuliert werden (Goodridge *et al.*, 2003; Kikuchi-Maki *et*

al., 2003; Rajagopalan *et al.*, 2006)

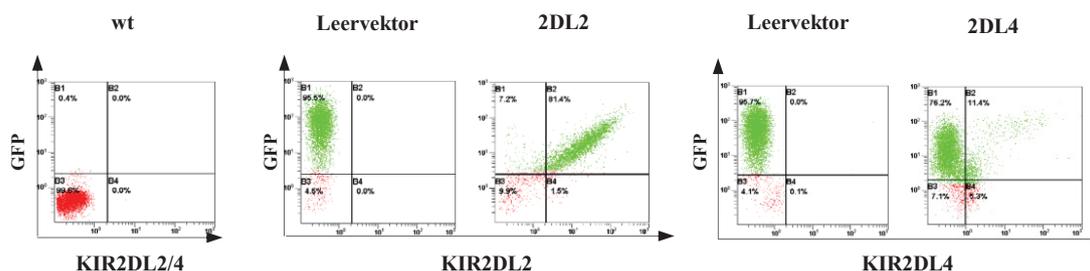


Abb.3- 25: Überexpression von KIR2DL2 und KIR2DL4 mit Hilfe des Überexpressionsvektors PCL6. NKL wurden transfiziert, drei Tagen nach der Transfektion wurden die Zellen analysiert. Wt: ungefärbte Kontroll-Zellen. Leervektor: Zellen wurden mit einem PCL6-Vektor ohne *Insert* infiziert. 2DL2: Zellen wurden mit dem Vektor, in den die cDNA von KIR2DL2 inkloniert war, infiziert. 2DL4: Zellen wurden mit dem Vektor, in den die cDNA von KIR2DL4 inkloniert war, infiziert.

3.3.2 NK-Zelldifferenzierung aus KIR2DL2- und KIR2DL4-überexprimierenden HSCs

CD34⁺-HSCs wurden durch MACS angereichert und anschließend mit Lentiviren, die die KIR2DL2- und KIR2DL4-Überexpressionskonstrukte enthielten, infiziert. Daraufhin wurden die Zellen auf murinen EL08-Feeder-Zellen ausplattiert und zu NK-Zellen ausdifferenziert.

Während der NK-Zellentwicklung waren keine signifikanten Unterschiede in der Zellproliferation zwischen den vier Gruppen von Zellen zu sehen. Die lentiviral infizierten HSCs verhielten sich phänotypisch, d.h. bei mikroskopischer Betrachtung, in der Kultur ähnlich wie die uninfizierten HSCs. Generell zeigten die transfizierten Zellen eine langsamere Differenzierung als die untransfizierten Kontrollen, was eine typische Beobachtung bei transfizierten CD34⁺ Zellen ist und wahrscheinlich auf die Transfektionsbehandlung selbst zurückzuführen ist. Dementsprechend war, wie in Abb.3-26 dargestellt, nach drei Wochen eine moderat geringere Frequenz des späten Progenitormarkers CD38 auf allen infizierten Zellen inklusive der Kontrollen zu beobachten. Im Gegensatz dazu führte die Überexpression der beiden KIR-Rezeptoren zu einer drastischen Reduzierung der Expression des NK-Zellmarkers CD56 im

Vergleich zu untransfizierten sowie mit Leervektor transfizierten Zellen.

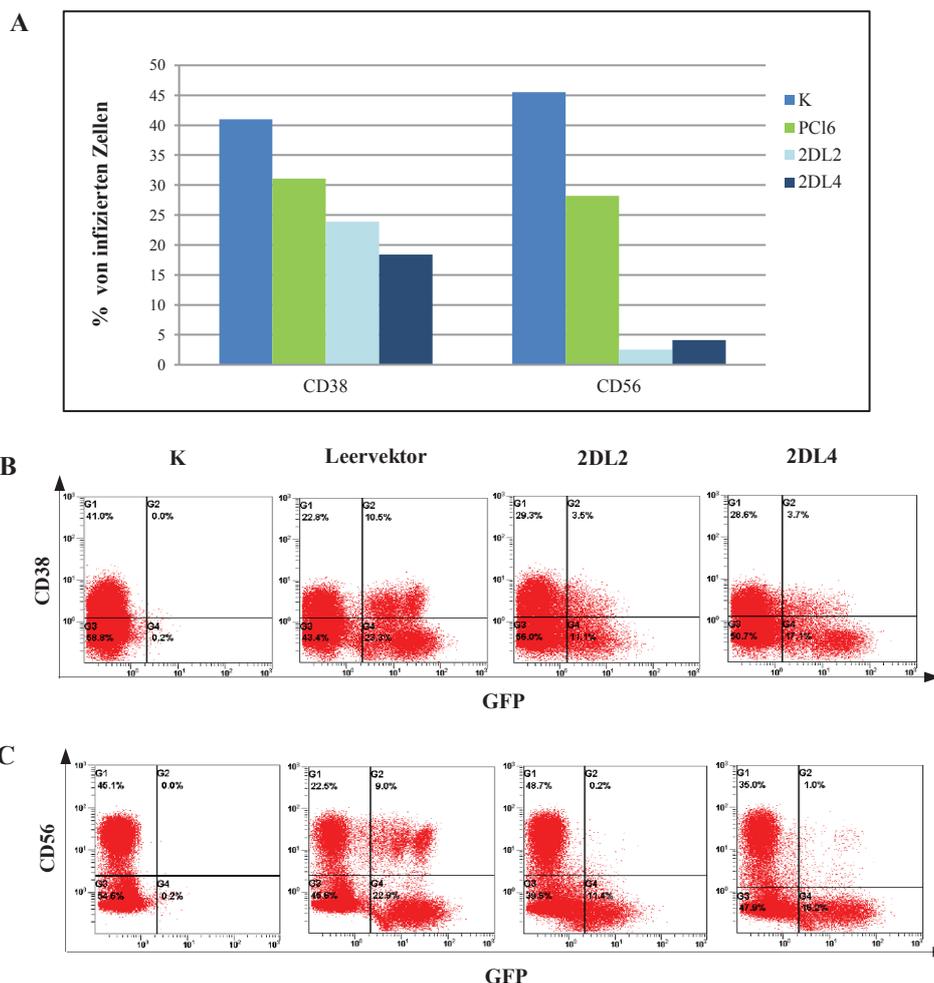


Abb.3-26: CD38- und CD56-Expression nach dreiwöchiger Kultivierung unter NK-Zelldifferenzierungsbedingungen. K: unbehandelte Zellen. Leervektor: die Zellen wurden mit dem PCL6 Leervektor infiziert. 2DL2: die Zellen wurden mit einem KIR2DL2 cDNA überexprimierenden Vektor infiziert. 2DL4: die Zellen wurden mit einem KIR2DL4 cDNA überexprimierenden Vektor infiziert. A: Grafische Darstellung der CD38- und CD56-Expression der differenzierenden Zellen. B: Durchflusszytometrische Plots der CD38-Expression. C: Durchflusszytometrische Plots der CD56-Expression.

Der Verlauf der CD56-Expression während der NK-Zelldifferenzierung ist in Abb.3-27A gezeigt. Bei den Ansätzen *PCL6*, *2DL2* und *2DL4* beziehen sich die Prozentzahlen auf GFP⁺-Zellen. Die CD56-Expression in den Kontrollzellen und den mit Leervektor infizierten Zellen weist keine großen Unterschiede auf. Ab der zweiten Woche war die CD56-Expression deutlich angestiegen, und erreichte in der vierten

Woche die Sättigung, während in der dritten Woche war die CD56-Expression der mit Leervektor infizierten Zellen nur gering niedriger als die von Kontrollzellen. Dagegen war die CD56-Expression von den mit KIR2DL2- und KIR2DL4-Überexpressionsvektor infizierten Zellen viel schwächer als die der Ansätze mit Kontroll- und Leervektor. Am Ende der vierten Woche waren über 80% der Zellen von Kontrolle und Leervektor CD56-positiv, während der Anteil von CD56⁺ Zellen in den 2DL2- und 2DL4-Ansätzen nur bei 10% lag. Ab der vierten Woche sind die Daten allerdings nicht mehr repräsentativ, da der Anteil der transfizierten Zellen von den KIR-Überexpressionsansätzen zu niedrig war.

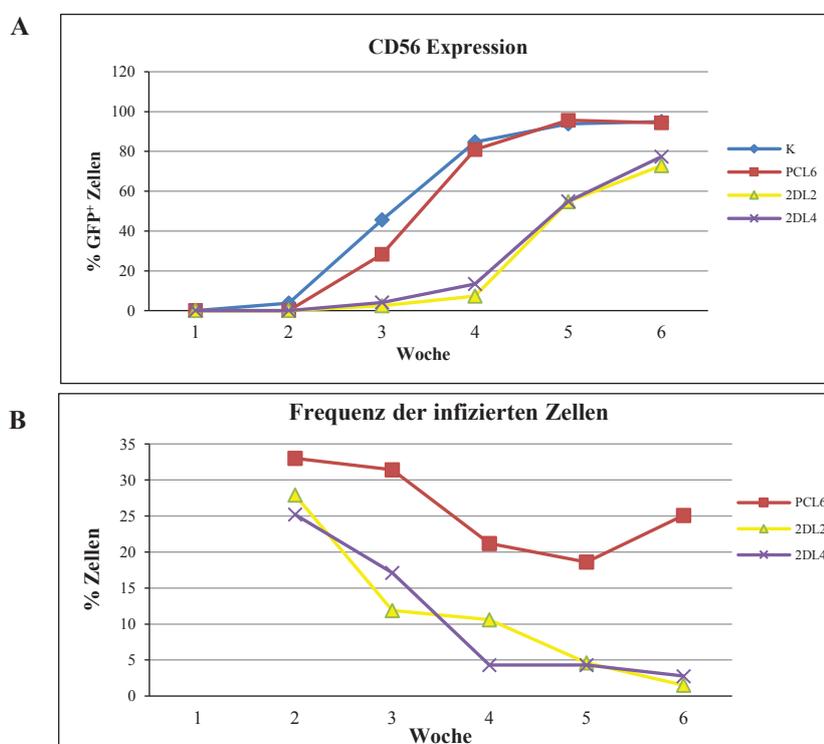


Abb.3- 27: Frequenz von CD56⁺ und GFP⁺-Zellen im Verlauf der NK-Zelldifferenzierung. A: CD56-Expression der Zellen im Lauf der NK-Zelldifferenzierung, bei PCL6, 2DL2 und 2DL4 bezieht sich die Prozentzahl auf GFP⁺-Zellen, bei K auf alle Zellen. B: Prozentzahl der GFP⁺ Zellen im Lauf der NK-Zellentwicklung. K: unbehandelte Zellen; PCL6: Zellen, die mit dem Leervektor PCL6 infiziert wurden; 2DL2: Zellen, die mit dem KIR2DL2-Überexpressionsvektor infiziert wurden; 2DL4: Zellen die mit dem KIR2DL4-Überexpressionvektor infiziert wurden.

Nach drei Wochen in Kultur kam es zu einer starken Reduktion von GFP-positiven Zellen in den KIR2DL2- und KIR2DL4-überexprimierten Ansätzen (Abb.3- 27B).

Dagegen blieb die Menge der GFP⁺ Zellen in den mit Leervektor infizierten Kulturen relativ konstant. Am Ende der vierten Woche war der Anteil der transfizierten Zellen in den 2DL2- und 2DL4-Überexpressions-Kulturen nur noch bei 5% und sank im weiteren Verlauf der Generierung bis auf 2% ab. Im Gegensatz dazu stieg die Frequenz der CD56⁺ NK-Zellen in beiden Ansätzen stark an, was auf eine Verdrängung der transfizierten Zellen durch sich entwickelnde NK-Zellen spricht, die sich entweder aus untransfizierten Vorläufern entwickelt haben oder das vorhandene Insert nicht mehr exprimieren.

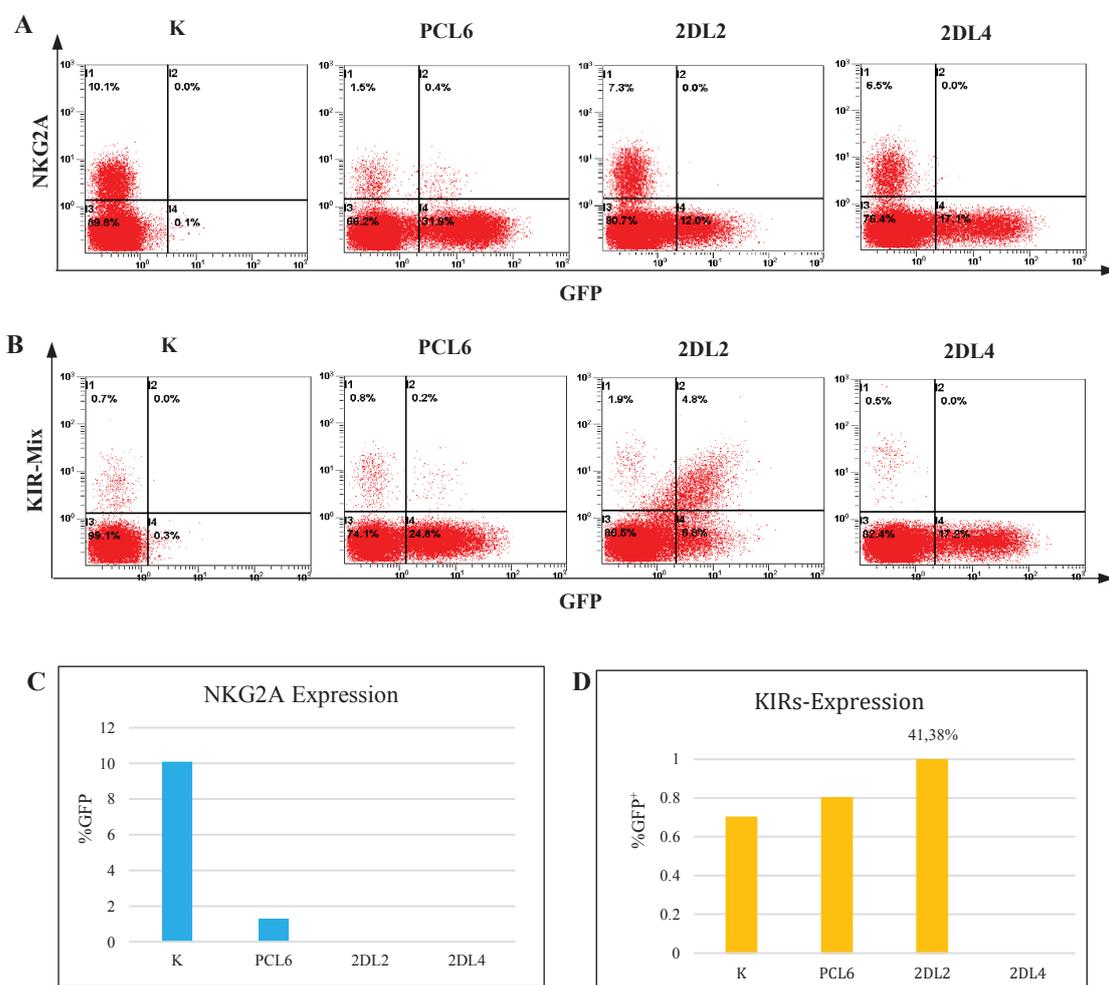


Abb.3- 28: NKG2A- und KIR-Expression der generierten Zellen in der vierten Woche der NK-Zellentwicklung. A: Dot-Plots der NKG2A-Expression. B: Dot-Plots der KIRs-Expression. C: Grafische Darstellung der NKG2A-Expression. D: Grafische Darstellung der KIRs-Expression. KIR-Mix bezieht sich auf eine Mischung von KIR-Rezeptoren-Antikörpern: 2DL2/3, 2DL1, 2DL4, 3DL1. K: Kontrolle, uninfizierte Zellen. PCL6: mit Leervektor infizierte Zellen. 2DL2: mit KIR2DL2-Überexpressionsvektor infizierte Zellen. 2DL4: mit KIR2DL4-Überexpressionsvektor infizierte Zellen.

In der Kontrollkultur wurden erfolgreich NKG2A⁺ und KIR⁺ Zellen differenziert, und bei den mit dem Leervektor infizierten Zellen waren auch NKG2A⁺ bzw. KIR⁺ Zellen in der Kultur zu finden, allerdings in wesentlich verringerter Frequenz. Der Anteil der NKG2A⁺-Zellen in der Kontrolle betrug 10,1%, während dieser von den mit Leervektor infizierten Zellen nur 1,3% aller GFP⁺-Zellen war. Die KIR-Expression der Kontrolle und mit Leervektor infizierten Zellen wiesen dagegen keinen Unterschied auf (Abb.3- 28C und D).

Die mit dem KIR2DL4-Überexpressionsvektor infizierten Zellen exprimierten bis zum Ende der NK-Zelldifferenzierung weder NKG2A noch KIRs auf ihrer Oberfläche. Die mit dem KIR2DL2-Überexpressionvektor infizierten Zellen exprimierten kein NKG2A, und mit Ausnahme von KIR2DL2/3 waren sie bis zum Ende der NK-Zelldifferenzierung, für keine KIR-Rezeptoren positiv (Abb.3- 28A und B).

Eine Population von Zellen, die GFP-positiv, aber KIR-negativ waren, fand sich in der KIR2DL2-Überexpressionskultur (Abb.3- 28B). Sie verloren während der Kultivierung die Expression des cDNA-Inserts, womit sie trotz der Überexpression von KIR2DL2 KIR-negativ waren. Nach vier Wochen exprimierten noch ein paar Zellen GFP, es wies jedoch keine von ihnen noch KIR2DL2 auf ihrer Oberfläche auf. In einer vergleichbaren Kultur, z. B. in der mit KIR2DL2 infizierten Kultur, ließen sich die NKG2A- sowie die KIR-Expression der infizierten und uninfizierten Zellen voneinander unterscheiden. Die uninfizierten Zellen exprimierten ohne Auffälligkeiten NKG2A und KIRs wie die Kontroll- und die mit Leervektor infizierten Zellen, während die mit KIR2DL4 infizierten Zellen keine NKG2A- oder KIR-positiven Zellen aufwiesen. NKG2A war auch nicht in den mit KIR2DL2 infizierten Zellen detektierbar, KIR-positive Zellen hingegen schon. Dies lässt sich mit die Überexpression von KIR2DL2 erklären, da die Intensität der KIR-Expression abhängig von der GFP-Intensität war. Das heißt, die KIR-Expression entstammte dem ektopisch exprimierten KIR2DL2 und nicht dem endogenen *KIR2DL2*-Gen.

Die Ergebnisse aus den Experimenten haben gezeigt, dass die Überexpression von KIR2DL2 oder KIR2DL4 zu einer starken Reduktion von CD56⁺ NK-Zellen führt. Im Gegensatz dazu konnten die Auswirkungen der Überexpression von KIR2DL2 bzw.

KIR2DL4 auf die NK-Zell-Differenzierung nicht zuverlässig beurteilt werden, da bereits die mit dem Leervektor infizierten Kontrollzellen eine Reduktion der NKG2A-Expression zeigten. Dies deutet darauf hin, dass die Prozedur der lentiviralen Transduktion unabhängig von dem eingebrachten Insert (KIR) die Entwicklung von reifen NK-Zellen stark inhibierte.

3.4 NK-Zellgenerierung auf murinen Sternzellen der Leber

Wegen ihrer physiologischen Ähnlichkeit mit Stromazellen könnten die Sternzellen der Leber eine gute Quelle für *Feeder*-Zellen der NK-Zellgenerierung sein. Um dies festzustellen wurden eine NK-Zellgenerierung mit CB-CD34⁺-HSCs auf solchen Sternzellen durchgeführt. Parallel dazu wurde eine Kultur mit MSC-*Feeder*-Zellen als Kontrolle angesetzt.

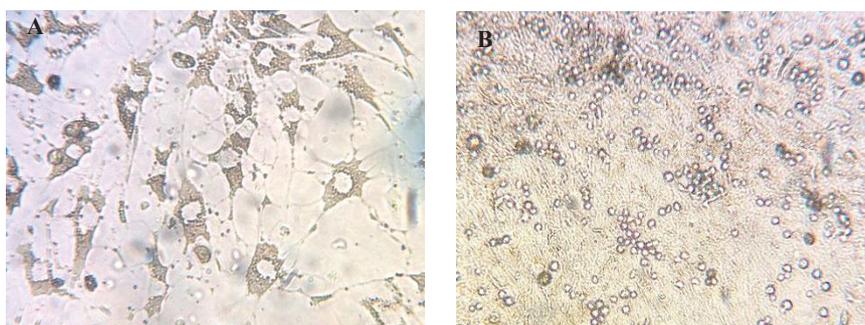


Abb.3- 29: Mikroskopische Aufnahme der Sternzellen in Kultur. A: Sternzellen der Leber in Kultur. B: Kokultur von Sternzellen und differenzierenden Zellen, zwei Wochen nach Starten einer NK-Zelldifferenzierung.

Nach der Ausplattierung von CD34⁺-HSCs war der Verlauf der Kokultur problemlos wie bei allen in dieser Arbeit beschriebenen NK-Zellgenerierungskulturen; die morphologische Veränderung der Sternzellen war hingegen sehr auffällig. Vor der Ausplattierung von CD34⁺-HSCs hatten die Sternzellen das Aussehen von Neuronen (Abb.3- 29A), nach der Ausplattierung verloren die Sternzellen schnell ihre sog. „Sternform“ und wandelten sich zu Zellen, die eine große Ähnlichkeit mit MSC-Zellen aufwiesen (Abb.3- 29B).

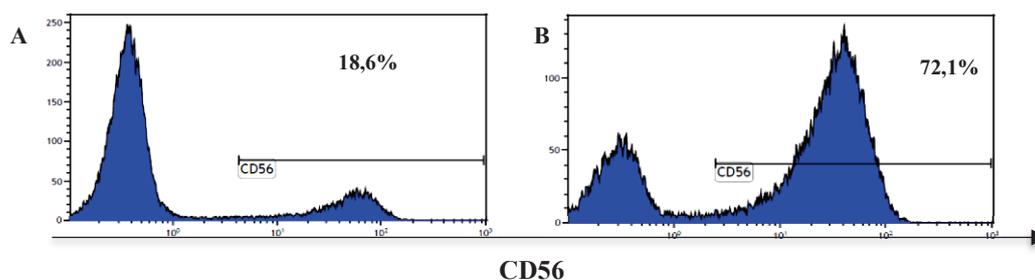


Abb.3- 30: CD56-Expression von NK-Zellen in der dritten Woche der NK-Zelldifferenzierung. A: Leber-Sternzellen als *Feeder*. B: MSC als *Feeder*.

Unter dem Mikroskop sahen die beiden NK-Zellgenerierungskulturen sehr ähnlich aus, und die Zellproliferation beider Kulturen zeigte kaum Unterschiede. Allerdings variierte CD56-Expression der differenzierenden Zellen von beiden Kulturen. Nach drei Wochen waren nur 18,6% der auf Leber Sternzellen differenzierenden Zellen CD56-positiv, während 72,1% der auf MSC differenzierenden Zellen CD56 auf ihrer Oberfläche exprimierten (Abb.3- 30). Nach vier Wochen waren fast alle Zellen auf MSC-*Feedern* CD56-positiv. Trotz eines Anstiegs der CD56⁺-Zellen auf den Leber-Sternzellen von 18,6% auf 71,4% war ihr Anteil stets niedriger als bei den Zellen, die auf MSCs gewachsen waren. Die CD56-Expression der auf Sternzellen differenzierenden Zellen, entsprach ungefähr derjenigen bei den auf MSC differenzierten Zellen eine Woche davor.

Nach vier Wochen hatten sich viele Zellen schon zu reifen NK-Zellen entwickelt. Abb.3- 31 zeigt die Expression von NK-Markern der NK-Zellen, die auf Leber Sternzellen differenziert wurden. 24,5% der CD56⁺-Zellen trugen NKG2A auf ihrer Oberfläche, während 10,8% bzw. 0,43% der CD56⁺-Zellen KIR2DL3 bzw. KIR2DL1 exprimierten. Die Prozentzahl von CD16- und CD56-doppelt positiven Zellen betrug 3,4%. Dies zeigt, dass auf Leber-Sternzellen der Ratte CD34⁺-HSCs zu NK-Zellen generiert werden können.

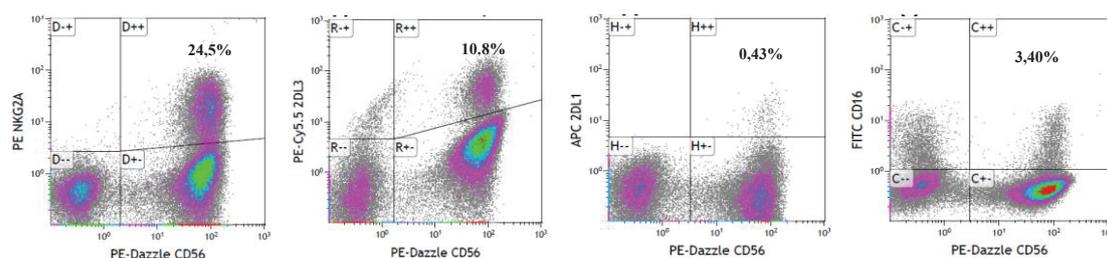


Abb.3- 31: Expression von NK-Zellmarkern der auf Leber-Sternzellen generierten Zellen, nach vier wöchiger Kokultivierung. NKG2A, KIR2DL3, KIR2DL1 und CD16 gegen CD56 wurden in den FACS-Plots aufgetragen. Die Prozentzahl bezieht sich auf CD56⁺-NK-Zellen.

Im Vergleich zu den auf MSC differenzierten NK-Zellen war auf Sternzellen eine nicht signifikant erhöhte Frequenz von NKG2A⁺ NK-Zellen zu finden. Die KIR2DL3-Expression von beiden Gruppen der NK-Zellen war ungefähr gleich stark;

ihr Wert lag bei 10% der CD56⁺-Zellen. KIR2DL1 war in beiden Gruppen von NK-Zellen nur schwach exprimiert. Auf Sternzellen wurden weniger CD16, CD56-doppelt positive Zellen generiert als auf den MSC-Zellen (Abb.3- 32).

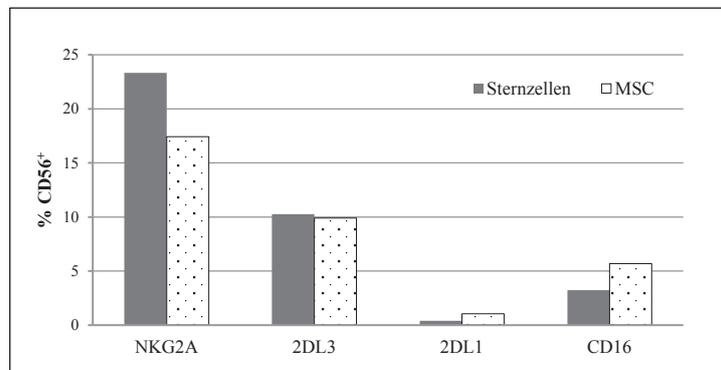


Abb.3- 32: NKG2A-, KIR2DL3, KIR2DL1- und CD16-Expression der NK-Zellen am Ende der NK-Zellentwicklung, die auf Sternzellen und MSC-Feeder-Zellen generiert wurden (n=2).

Die NK-Zelldifferenzierung aus CD34⁺ HSCs auf Leber-Sternzellen konnte in einem zweiten Versuch reproduziert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass Leber-Sternzellen der Ratte für die NK-Zellentwicklung aus HSCs *in vitro* als Feeder-Zellen geeignet sind.

3.5 NK-Zelldifferenzierung aus iPS-Zellen

Um den Prozess der NK-Zellentwicklung besser zu verstehen, sollte ein *in vitro* NK-Zelldifferenzierungsmodell etabliert werden, das auch frühe Stadien der NK-Zellentwicklung aus embryonalen Stammzellen (ES) einschließt. Da die iPS-Zellen fast die gleichen Eigenschaften wie die ES-Zellen besitzen und aufgrund ihrer Herkunft aus somatischen Zellen weniger moralische Probleme aufwerfen als die ES-Zellen, wurden sie als Ausgangsmaterial für die NK-Zellentwicklung verwendet (modifiziert nach Watarai *et al.*, 2010 Knorr *et al.*, 2013).

3.5.1 OP9 dienen als *Feeder*-Zellen für die Differenzierung der CD34⁺-Zellen aus iPS-Zellen

In einem ersten Schritt wurden die iPS-Zellen zu CD34⁺ HSCs differenziert und anschließend unter Bedingungen, welche die NK-Zelldifferenzierung fördern, weiter kultiviert. In unseren bisherigen Studien hat sich gezeigt, dass EL08 die beste *Feeder*-Zelllinie für die NK-Zelldifferenzierung aus CD34⁺-HSCs. Allerdings bleibt die Frage, welche Zelllinie die passende *Feeder*-Zelle für die Entstehung von HSCs aus iPS-Zellen ist. Um diese Frage zu beantworten, wurden fünf murine Zelllinien AFT, EL08, OP9, OP9-Delta und UG als *Feeder*-Zellen für die CD34⁺-HSCs-Differenzierung eingesetzt.

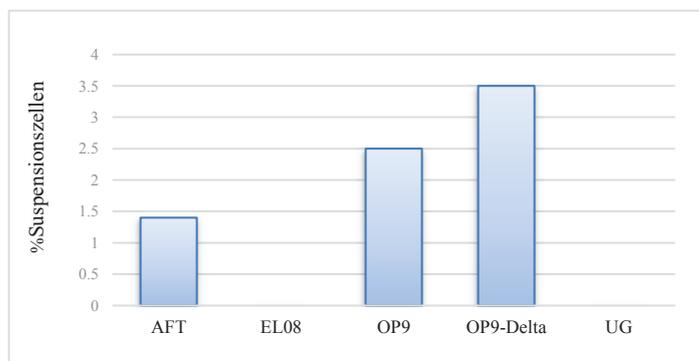


Abb.3- 33: Entstehung von CD34⁺-Zellen aus iPS-Zellen auf fünf murinen *Feeder*-Zelllinien. Die Grafik zeigt den Anteil der entstandenen CD34⁺-Zellmenge an den Suspensionszellen in Prozent nach ca. 10 Tagen in der Differenzierungskultur.

Eine Woche bis zehn Tage später wurden Zellen aus der Kokultur abgenommen, und durchflusszytometrisch analysiert. In den Kokulturen, in denen die EL08- und UG-Zellen als *Feeder*-Zellen eingesetzt wurden, waren keine Zellen CD34-positiv. Im Gegensatz zur NK-Zelldifferenzierung aus CD34⁺-HSCs boten die EL08-Zellen eine schlechte Unterstützung für die Differenzierung von CD34⁺-Zellen aus iPS-Zellen. Die UG-Zellen waren auch für den *Support* der CD34⁺-Zellentwicklung aus iPS-Zellen *in vitro* nicht geeignet.

In den Kulturen, in denen die AFT-, OP9- und OP9-Delta-Zellen als *Feeder*-Zellen verwendet wurden, konnten CD34⁺-Zellen erfolgreich generiert werden. Auf AFT-*Feeder*-Zellen waren knapp 1,5% der Suspensionszellen CD34-positiv, während der Anteil von CD34⁺-Zellen auf OP9 ca. 2,7% betrug. OP9-Delta-Zellen erreichten mit über 3,5% die höchste Rate an generierten CD34⁺-Zellen von allen *Feeder*-Zellen. OP9-Delta bot somit die beste Unterstützung für die CD34⁺-Zellgenerierung, während gar keine CD34⁺-Zellen auf EL08 und UG generiert wurden, die Werte von AFT und OP9 lagen dazwischen. Da OP9- und OP9-Delta die NK-Zellentwicklung besser als AFT unterstützen, und auf ihnen mehr CD34⁺-Zellen generiert werden können, wurden die beiden Zelllinien für weitere Differenzierungsexperimente von CD34⁺-Zellen zu NK-Zellen herangezogen.

3.5.2 NK-Zellgenerierung aus iPS-basierenden CD34⁺-Zellen

Eine Woche vor dem Experiment wurden undifferenzierte iPS-Zellen passagiert und auf Matrigel ausplattiert (Abb.3- 34A). Nach der Entstehung von iPS-Zellkolonien auf der Kulturplatte wurden die iPS-Zellen für die NK-Zelldifferenzierung eingesetzt. Frische, undifferenzierte iPS-Zellen wurden passagiert, in CD34-Generierungsmedium aufgenommen und anschließend auf OP9- und OP9-Delta-*Feeder*-Zellen ausplattiert. Rund eine Woche nach der Ausplattierung differenzierten sich die iPS-Zellen zu sog. EBs (embryo bodies, Abb.3- 34B) aus. Im weiteren Verlauf der Differenzierung lösten sich die adhärennten Zellen vom Boden der Kulturplatte ab, sie vereinzeln sich und

wurden zu freischwimmenden Suspensionszellen. Dies ist auch der Zeitpunkt, an dem sich die iPS-Zellen in die Richtung HSCs ausdifferenzieren. Wegen der geringen Menge der Suspensionszellen und des Abtauchens der Suspensionszellen unter die *Feeder*-Zellen waren die entstandenen Suspensionszellen unter dem Mikroskop kaum zu sehen. Durchflusszytometrisch war eine CD34⁺-Zellpopulation allerdings deutlich zu erkennen (Abb.3- 34C, Quanten-D4). Eine CD43-positive Zellpopulation war auch zu erkennen. CD43 wird hauptsächlich auf T-, B-Zellen, Monozyten und Granulozyten exprimiert (Rosenstein et al., 1991) und wird deshalb als Marker verwendet, um Zellen der hämatopoetischen Linie zu identifizieren.



Abb.3- 34: Mikroskopische Aufnahmen und durchflusszytometrische Analyse der Zellkultur während der CD34⁺-Zellentwicklung aus iPS-Zellen. A: Undifferenzierte iPS-Zellen, kultiviert auf Matrigel. B: Eine Woche nach der Kokultivierung in CD34-Generierungsmedium auf OP9-*Feeder*-Zellen, zu diesem Zeitpunkt entstand der sog. Embryonale Körper (embryo bodies EBs). C: CD34- und CD43-Expression der sich in der Kokultur differenzierenden Zellen.

Für die weitere Differenzierung zur NK-Zelle wurden die CD34⁺-Zellen mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Zellsortierung aus der Kokultur aussortiert. Die sortierten Zellen wurden in das NK-Zellgenerierungsmedium aufgenommen und auf neuen OP9- bzw. OP9-Delta-*Feeder*-Zellen ausplattiert. Nun begann die NK-Zelldifferenzierung aus CD34⁺-Zellen. Mit der Steigerung der Zellzahl der Suspensionszellen waren diese nun auch unter dem Mikroskop sichtbar. Die Zellen wurden gegen Oberflächenmarker gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Nach einer einwöchigen Kultivierung waren noch CD34⁺-Zellen in der Kultur zu sehen (Abb.3- 35A), während sich nach zwei Wochen die CD34⁺-Zellen in der Kultur kaum mehr detektieren ließen. Nach einer Woche exprimierte ungefähr die Hälfte der Zellen

den Oberflächenmarker CD38, nach zwei Wochen waren fast alle Zellen CD38⁺, was darauf hinweist, dass die Zellen sich in die Richtung von Lymphozyten differenzieren, da CD38 hauptsächlich während der Lymphozyten-Differenzierung exprimiert wird (Jackson *et al.*, 1990; Nakagawara *et al.*, 1995). Nach einer Woche exprimierten die Zellen, die CD56-positiv waren, diesen Marker nur schwach. Nach zwei Wochen wurde die CD56-Expression in den Zellen stärker, die CD56-positive Zellpopulation wurde eine sogenannte CD56^{bright}-Population (Abb.3- 35).

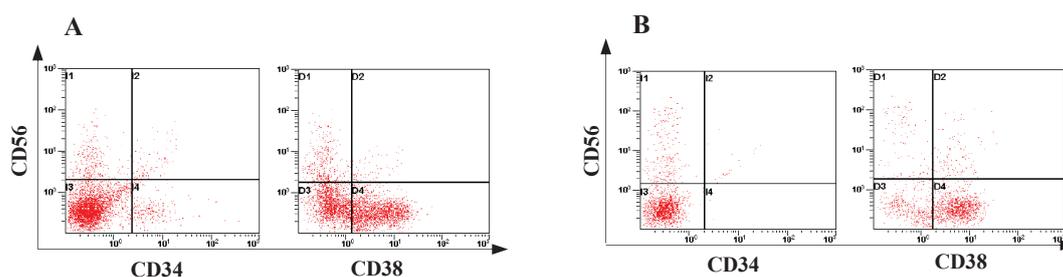


Abb.3- 35: CD34-, CD38- und CD56-Expression während der ersten und zweiten Wochen der NK-Zellentwicklung aus CD34⁺ Zellen. A: Nach einer Woche in NK-Gen-Medium. B: Nach zwei Wochen in NK-Gen-Medium.

Ab der dritten Woche der NK-Zellentwicklung waren die meisten Zellen für CD56 positiv. 78% der Zellen in Kultur trugen CD56 auf ihrer Oberfläche, wobei fast keine Zellen mehr CD34-positiv waren (Abb.3- 36A). Die CD56⁺-Zellen begannen auch NKG2A zu exprimieren, dies zeigt, dass die Zellen noch einen weiteren Schritt zur reifen NK-Zelle gemacht hatten (Abb.3- 36B).

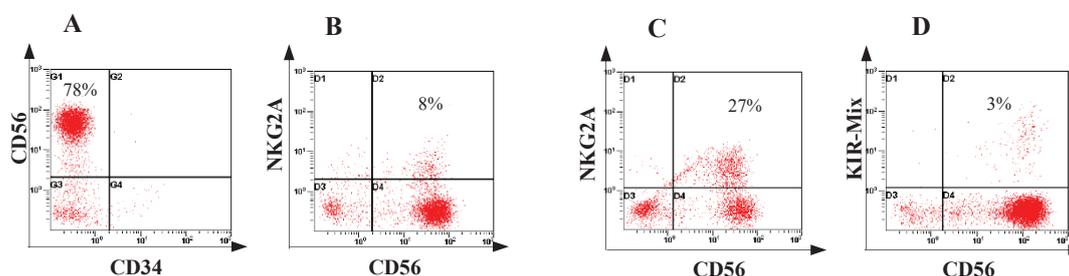


Abb.3- 36: NK-Oberflächenmarker-Expression (CD56, CD34, NKG2A und KIRs) auf den Zellen in der dritten und vierten Woche der NK-Zellentwicklung. KIR-Mix war eine Antikörpermischung, besteht aus KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR3DL1. A und B: Woche 3. C und D: Woche 4.

Nach vier Wochen stieg die Anzahl der NKG2A-positiven Zellen weiter an. 27% der

CD56-positiven Zellen hatten NKG2A auf ihrer Oberfläche exprimiert. Gleichzeitig begannen die Zellen auch KIR-Rezeptoren zu exprimieren. Am Ende der vierten Woche waren ca. 3% der CD56-positiven Zellen KIR-positiv (Abb.3- 36C, D).

Nach der langen *in vitro* Differenzierung von iPS-Zellen zunächst zu CD34⁺-Zellen und dann zu KIR-exprimierenden NK-Zellen verlangsamte sich die Proliferation der Zellen, und diese begannen auch zu sterben. Generell brauchten die Zellen ca. acht Wochen, um sich unter Kulturbedingungen von iPS-Zellen zu NK-Zellen auszudifferenzieren.

Nicht jede Differenzierungskultur führte am Ende zur erfolgreichen Generierung von NK-Zellen. In den Experimenten waren auch viele weitere Typen von Zellen entstanden, z.B. Kardiomyozyten, Adipozyten und undefinierbare Zellen (Abb.3- 37). Unter dem Mikroskop konnte die Herzmuskulatur deutlich erkannt werden, und die entstandenen Kardiomyozyten übten sogar ihre Kontraktionsfunktion gut aus. Daneben waren in vielen Kulturen am Ende der Generierung nur Adipozyten zu finden.

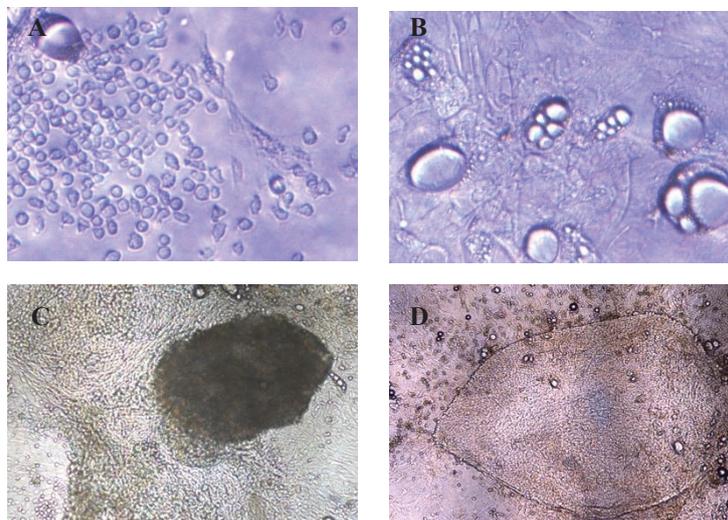


Abb.3- 37: Mikroskopische Aufnahme der generierten Zellen am Ende der NK-Zelldifferenzierung aus iPS-Zellen. A: Erfolgreiche Differenzierung zur NK-Zelle nach acht Wochen: in der Kultur waren NK-Zellen entstanden. B: Differenzierungskultur nach acht Wochen: In der Kultur fanden sich keine Suspensionszellen, also auch keine NK-Zellen. Adipozyten waren hingegen zu finden. C: Entstandener Zellhaufen von Kardiomyozyten in der Differenzierungskultur. D: Undefinierbare adhärenente Zellkolonie in der Differenzierungskultur.

Die aus iPS-Zellen entwickelten NK-Zellen wurden auch in funktionalen Assays eingesetzt. Diese Assays wurden am Ende der achten Woche der Generierung durchgeführt. Da erreichte die Differenzierungskultur die höchste Rate an KIR-positiven Zellen. Danach zeigten die Zellen nur noch eine geringe Tendenz, sich weiter zu differenzieren oder zu proliferieren.

Nach der Kokultivierung mit HLA-I-defekten K562-*Target*-Zellen wiesen 40% bzw. 30% (10:1- und 1:1-Ansatz) der generierten NK-Zellen CD107 auf ihrer Oberfläche auf. Abzüglich der 20% der negativen Kontrolle blieben noch 20% bzw. 10% der generierten NK-Zellen für CD107 positiv (Abb.3- 38A).

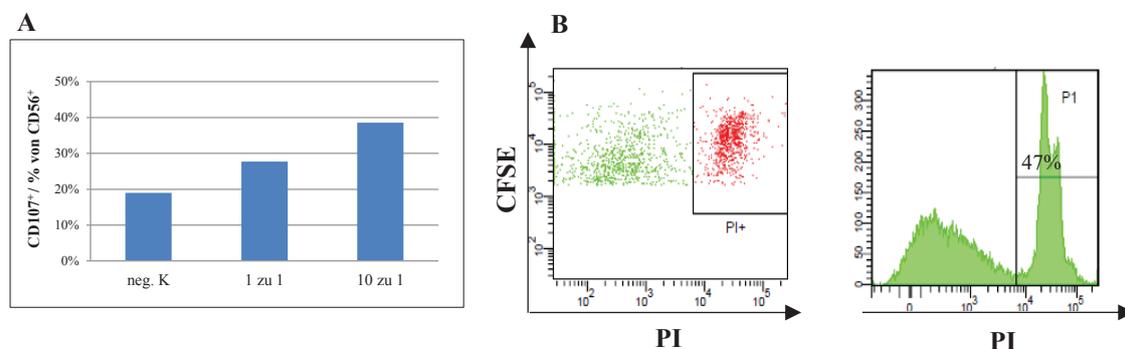


Abb.3- 38: Funktionelle Assays von den aus iPS-Zellen generierten NK-Zellen. A: CD107-Assay. B: CFSE-Assay, *Killing* der *Target*-Zellen.

Die Ergebnisse der CFSE-Assays zeigen, dass 47% der K562-*Target*-Zellen nach der Kokultivierung von differenzierten NK-Zellen abgetötet wurden (Abb.3- 38B). Diese Ergebnisse zeigen, dass sich mit diesem Protokoll aus iPS-Zellen reife und funktionale NK-Zellen differenzieren lassen.

3.5.3 MSC, eine effiziente Feeder-Zelllinie für die Induktion von KIR aus iPS

Als *Feeder*-Zellen können die MSC-Zellen die NK-Zellentwicklung aus HSCs grundsätzlich gut unterstützen. Zudem wurden auf MSC-*Feeder*-Zellen mehr KIR-positive NK-Zellen generiert als auf murinen EL08-*Feeder*-Zellen (s. Abschnitt 3.1.1). Außerdem waren die EL08-Zellen nicht in der Lage, den Prozess der

NK-Zellentwicklung aus iPS-Zellen vom Anfang bis zum Ende hindurch zu unterstützen, da auf ihnen keine CD34⁺ HSCs generiert werden können (s. Abschnitt 3.5.1). Hier stellt sich die Frage, ob die MSC-Zellen den NK-Zelldifferenzierungsprozess aus iPS-Zellen ebenso gut unterstützen können, wie die NK-Zelldifferenzierung aus hämatopoetischen Stammzellen. Zur Beantwortung dieser Frage wurden MSC-Zellen als *Feeder*-Zellen für die Differenzierung von iPS-Zellen zu NK-Zellen eingesetzt. Parallel dazu wurde eine Kultur mit OP9-*Feeder*-Zellen als Kontrolle durchgeführt.

Die meisten Abschnitte der NK-Zellentwicklung aus iPS-Zellen verliefen auf MSCs wie auf den OP9-Zellen (s. Abschnitt 3.5.1 und Abschnitt 3.5.2). Ein bis zwei Wochen nach der Ausplattierung von iPS-Zellen waren CD34⁺ HSCs in den Kulturen nachweisbar. Danach wurden sie durchflusszytometrisch angereichert und in NK-Zellgenerierungsmedium weiter zu NK-Zellen generiert. Sie exprimierten nacheinander CD38, CD56, NKG2A und KIR-Rezeptoren. Bis zur sechsten Woche der NK-Zellgenerierung erreichten die Zellen die höchste Rate der KIR-Expression. Hier zeigten sich die auffälligsten Ergebnisse: auf den MSC-Zellen waren viel mehr KIR-positive NK-Zellen generiert worden als auf den OP9-Zellen.

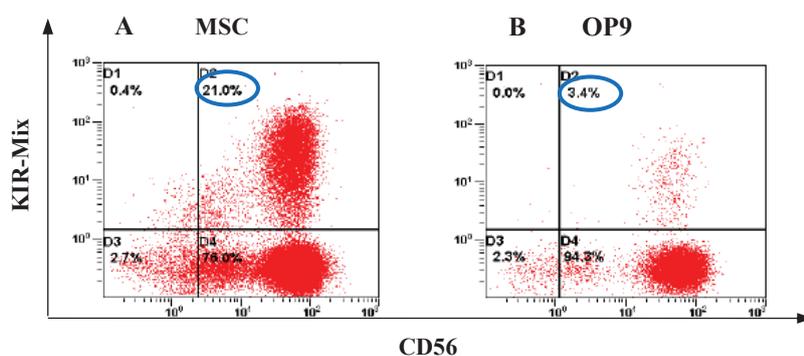


Abb.3- 39: KIR-Expression von den aus iPS-Zellen differenzierten NK-Zellen am Ende der NK-Zelldifferenzierung. KIR-Mix war eine Antikörpermischung, bestehend aus KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR3DL1. A: In dieser Kultur wurden MSC-Zellen als *Feeder*-Zellen verwendet. B: In dieser Kultur wurden OP9-Zellen als *Feeder*-Zellen verwendet.

Abb.3- 39 zeigt die KIR-Expression der differenzierten NK-Zellen. Plot A zeigt die Prozentzahl der KIR⁺-Zellen, die auf MSC-Zellen generiert wurden, 21% aller Zellen,

bzw. 21,65% der CD56⁺ Zellen, waren KIR-positiv. Im Vergleich dazu war die Prozentzahl der KIR⁺ Zellen, die auf OP9-Zellen generiert wurden, viel niedriger, sie betrug nur 3,4% aller Zellen bzw. 3,48% der CD56⁺-Zellen. Die Anwendung von MSC-Zellen als *Feeder*-Zellen führte somit zu einer starken Erhöhung der KIR-Expression auf neu generierten NK-Zellen. Die Proliferationsrate der differenzierenden Zellen auf OP9 sowie MSC war hingegen vergleichbar.

3.5.4 NK-Zelldifferenzierung aus iPS-Zellen, die aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des Nabelschnurbluts generiert wurden

In Abschnitt 3.5.2 wurde schon erwähnt, dass sich nicht alle iPS-Zellen unter den Kulturbedingungen zu CD34⁺-HSCs bzw. NK-Zellen entwickeln konnten. Dies wirft die Frage auf, wie die Effizienz der NK-Zellgenerierung erhöht werden kann. Es gibt Hinweise in der Literatur, dass iPS-Zellen effektiver in das Gewebe ausdifferenzieren können aus dem sie ursprünglich generiert wurden (Ohi *et al.*, 2011; Barrero *et al.*, 2011). Dieses sogenannte epigenetische Gedächtnis könnte mit einer nicht vollständigen Entfernung gewebespezifischer epigenetischer Modifikationen wie DNA-Methylierung und Histonmodifikationen während des Reprogrammierungsprozesses zusammenhängen. Um herauszufinden, ob iPS-Zellen mit hämatopoetischer Herkunft eine effektivere Differenzierung in NK-Zellen als z.B. iPS aus Fibroblasten ermöglichen, wurden CD34⁺-HSC aus Nabelschnurblut isoliert und zu iPS-Zellen reprogrammiert (als iPS-CB kenngzeichnet; die Reprogrammierung wurde von der Gruppe von Prof. Brüstle, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, durchgeführt). Da unsere bisherigen Versuche gezeigt hatten, dass MSC die NK-Zelldifferenzierung gut unterstützen und sich lange in der Generierungskultur halten können, wurden sie hier als *Feeder*-Zellen verwendet. Für die folgenden Experimente wurden zwei verschiedene iPS-Zellen verwendet, die aus CD34⁺-HSCs des humanen Nabelschnurbluts gewonnen wurden sowie eine Kontroll-iPS, die aus humanen Fibroblasten generiert worden war.

Nach der Passage der iPS-Zellen wurden die Zellen zu vielen kleinen Zellclustern geteilt. Diese Zellkolonien waren mit bloßem Auge sichtbar. Dies ermöglichte die Verteilung von einzelnen Kolonien auf die *Feeder*-Zellen, d.h. jedem *Well* einer mit *Feeder*-Zellen beschichteten Kulturplatte wurde nur eine iPS-Zellkolonie zugeteilt. Die Entwicklung der iPS-Zellkolonie wurde in zweitägigem Rhythmus mit dem Mikroskop verfolgt.

Ungefähr nach vier bis zehn Tagen wandelten sich manche adhärennten Zellkolonien zu Suspensionszellen um, und unter dem Mikroskop war dieser Anstieg deutlich zu erkennen. Dann wurde vorsichtig eine Probe aus den Kulturen für die Durchflusszytometrie abgenommen, ohne die *Feeder*-Zellschicht zu schädigen. Wenn die Durchflusszytometrie CD34⁺-Zellen aufwies, wurde eine Kolonie gezählt, die sich in hämatopoetischer Richtung entwickelte. Auf diese Weise wurde die Anzahl der sich zu CD34⁺-Zellen entwickelnden Kolonien, die aus den drei iPS-Zelllinien entstanden waren, festgestellt.

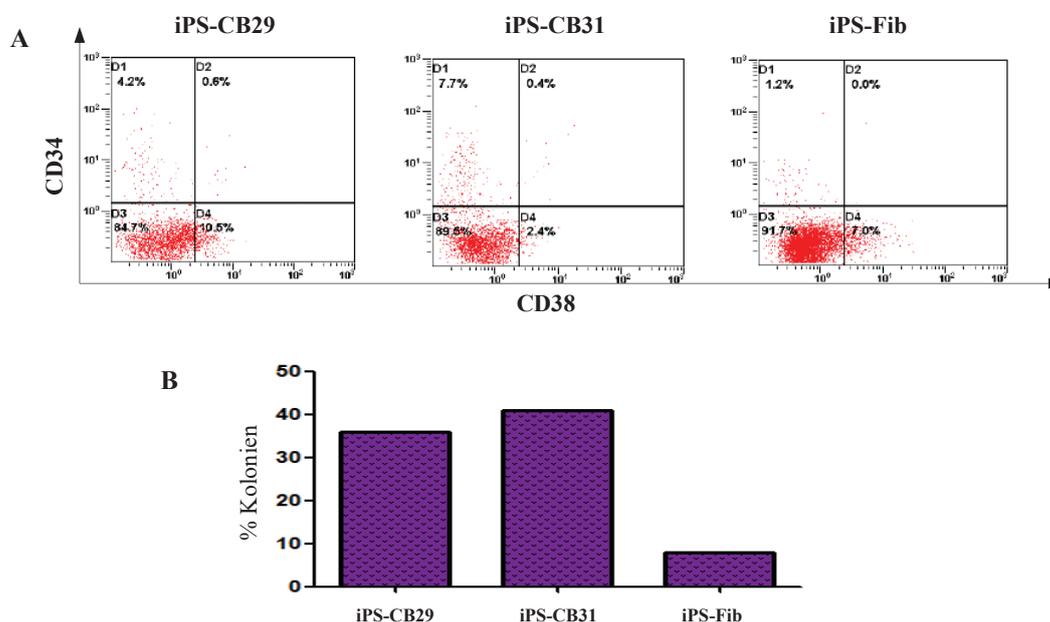


Abb.3- 40: Grafische Darstellung der CD34⁺-Zellentwicklung aus drei unterschiedlichen iPS-Zelllinien. Davon stammen 2 von aus Nabelschnurblut isoliert CD34⁺ reprogrammierten iPS-Zellen, die andere von Fibroblasten. A: CD34-Färbung in der durchflusszytometrischen Analyse. B: Effizienz der Umwandlung von iPS-Zellen zu CD34⁺-Zellen aus den drei iPS-Linien nach einer Woche in Kokultur.

Die Plots in Abb.3- 40 zeigt die CD34-Expression der differenzierenden Zellen. Aus

allen drei iPS-Linien konnten erfolgreich $CD34^+$ Zellen generiert werden, aber die Effizienz variierte. Bei den iPS-CB31-Zellen waren 7,7% der differenzierenden Zellen nach einer einwöchigen Kultivierung für $CD34$ positiv, gefolgt von iPS-CB29 mit 4,2%. Am niedrigsten waren mit nur 1,2% die iPS-Fib (Abb.3- 40A).

Wie bereits erwähnt, wurde die Anzahl der Kolonien gezählt, deren Zellen erfolgreich zu $CD34^+$ -Zellen ausdifferenzierten, um die Effizienz der Umwandlung von iPS- zu $CD34^+$ -Zellen festzustellen. Die Effizienz wurde aus dem Quotienten der Anzahl der $CD34^+$ -Kolonien geteilt durch die Anzahl der ausplattierten Kolonien berechnet. Die Ergebnisse spiegeln die Erkenntnisse aus den durchflusszytometrischen Analysen wieder. Die iPS-CB31-Zellen waren die effektivste Zellquelle, aus der sich $CD34^+$ -Zellen entwickelten. Ungefähr 42% aller ausplattierten Kolonien hatten später $CD34^+$ -Zellen entwickelt, während dieser Anteil bei den iPS-CB29-Zellen 37% betrug und damit nur geringfügig geringer war als bei den iPS-CB31-Zellen. Im Vergleich zu den iPS-CB-Linien war die Effizienz von iPS-Fib deutlich niedriger: In weniger als 10% aller ausplattierten iPS-Fib-Kolonien waren $CD34^+$ -Zellen detektiert werden (Abb.3- 40B).

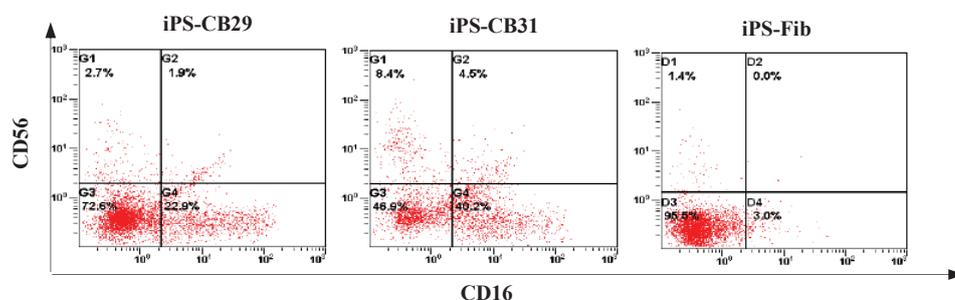


Abb.3- 41: $CD56$ - und $CD16$ -Expression der differenzierenden Zellen in der vierten Woche der NK-Zellentwicklung aus drei Linien von iPS-Zellen.

Trotz des Unterschiedes in der $CD34^+$ -Zellentwicklung war die Differenzierung von iPS- zu NK-Zellen erfolgreich, unabhängig davon, aus welchen iPS-Zellen die $CD34^+$ -Zellen stammten. Sobald gesunde $CD34^+$ -Zellen in den Kulturen generiert worden waren, entwickelten sie sich im NK-Zellgenerierungsmedium zu NK-Zellen. In der vierten Woche der NK-Zelldifferenzierung ließen sich bei allen Kulturen

CD56⁺-Zellen detektieren, wobei zu diesem Zeitpunkt auch CD16⁺CD56⁻-Zellen zu finden waren. Die CD16-positiven Zellen ohne CD56 Expression wurden später zu myeloiden Zellen. CD56 und CD16-doppeltpositive Zellen konnten in diesem Stadium nicht nachgewiesen werden. Die Prozentzahl der CD56⁺-Zellen aus drei iPS-Linien entsprach ungefähr der Prozentzahl von CD34⁺-Zellen zwei Wochen davor (Abb.3- 41).

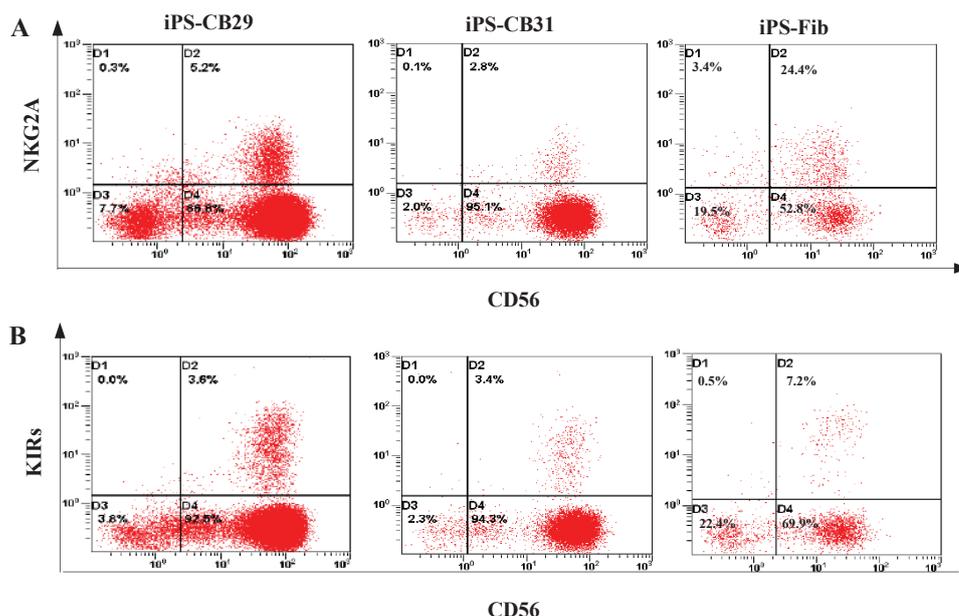


Abb.3- 42: CD56-, NKG2A-, und KIRs-Expression von den aus iPS-CBs und iPS-Fib entstandenen NK-Zellen am Ende (in der achten Woche) der NK-Zelldifferenzierung. A: CD56- und NKG2A-Expression. B: CD56- und KIRs-Expression. KIRs bestand aus KIR2DL1, KIR2DL2/3, und KIR3DL1.

Die differenzierenden Zellen brauchten danach noch zwei Wochen, um sich weiter zu entwickeln, bis sie die NKG2A- bzw. KIR-Rezeptoren exprimierten. Im Gegensatz zur CD34- und CD56-Expression waren die aus iPS-Fib differenzierten NK-Zellen bei der NKG2A- und KIR-Expression denen aus CB voraus. 24,4% bzw. 7,2% der aus iPS-Fib entwickelten Zellen waren für NKG2A und KIRs positiv, während die Prozentzahlen bei den aus iPS-CB29 und iPS-CB31 entwickelten Zellen 5,2% und 3,6% bzw. 2,8% und 3,4% betragen. Zu diesem Zeitpunkt waren fast alle Zellen in den Kulturen für CD56 positiv, unabhängig davon, aus welcher iPS-Linie sie sich zu NK-Zellen entwickelt hatten (Abb.3- 42).

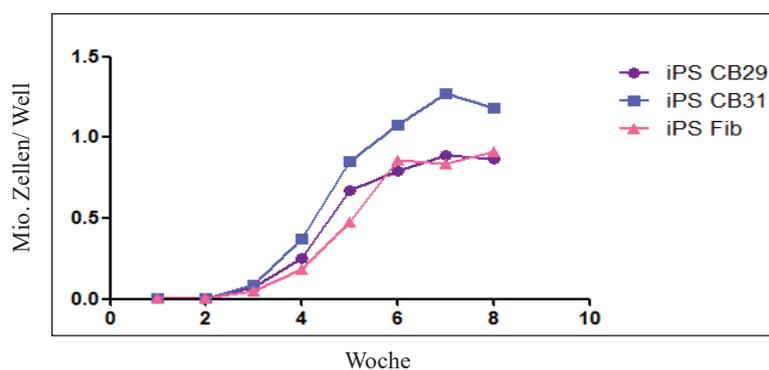


Abb.3- 43: Zellproliferation in den NK-Zelldifferenzierungskulturen aus drei iPS-Zelllinien im Lauf der Zeit.

Abb.3- 43 zeigt eine vergleichbare Proliferation der Zellen im Lauf der Differenzierung an. Alle Zellen aus den drei iPS-Linien begannen ab der zweiten Woche, rasch zu proliferieren. Zwischen der dritten und fünften Woche befanden sich die Zellen aus allen drei Linien in einem logarithmischen Wachstum. Danach verlangsamte sich das Wachstum der Zellen, und nach sieben bis acht Wochen sank die Proliferationsrate der Zellen ab.

Die aus iPS-CB31 differenzierten Zellen proliferierten am besten, bei iPS-CB29 und iPS-Fib war das Wachstum etwas schwächer. Insgesamt weisen die NK-Zelldifferenzierungen aus den drei iPS-Linien aber keine großen Unterschiede in der Zellzahl auf.

3.5.5 NK-Zelldifferenzierung aus iPS-Zellen direkt in NK-Gen-Medium

Bislang waren alle beschriebenen NK-Zelldifferenzierungen aus iPS-Zellen mit einem Zwischenschritt, der CD34⁺-Zellsortierung, durchgeführt worden. Die iPS-Zellen wurden zuerst in CD34-Gen-Medium aufgenommen, zu CD34⁺-Zellen ausdifferenziert und durchflusszytometrisch angereichert. Anschließend wurden sie im NK-Gen-Medium zu NK-Zellen entwickelt. Normalerweise differenzierten sich die Zellen in Kultur mit unterschiedlicher Geschwindigkeit aus. Dadurch entsteht ein großer Verlust von Zellen beim Schritt der CD34⁺-Zellsortierung, da viele Zellen zur

Zeit der Sortierung noch nicht oder schon nicht mehr CD34 exprimierten und somit in die negative Fraktion einsortiert wurden, obwohl viele davon im Grund fähig wären, sich zu NK-Zellen auszudifferenzieren. In einem Experiment wurden nach der CD34⁺-Zellgenerierung die sich in Suspension befindenden CD34-negativen Zellen in sortiert und in eine NK-Zelldifferenzierungskultur eingesetzt. Die Differenzierung war erfolgreich. Am Ende der Differenzierung waren in den Kulturen CD56⁺-Zellen, die NKG2A- bzw. KIR-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimierten, nachweisbar. Aus diesem Grund kam es zur Überlegung, eine NK-Zelldifferenzierungskultur anzusetzen, in der die undifferenzierten iPS-Zellen direkt in NK-Gen-Medium1 aufgenommen wurden. Die Differenzierung wurde mittels Durchflusszytometrie verfolgt. Sobald CD56⁺ Zellen in der Kultur zu detektieren waren, wurde das Medium zu NK-Gen-Medium2 gewechselt.

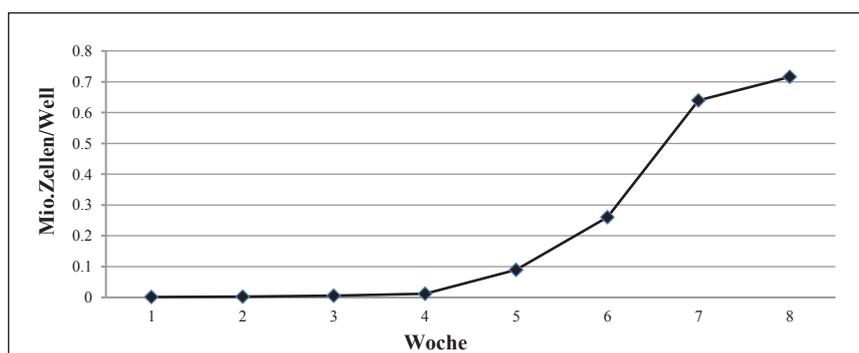


Abb.3- 44: Zahl der lebendigen Suspensionszellen pro Well im Lauf der NK-Zelldifferenzierung aus iPS-Zellen (Mittelwerte aus allen drei iPS-Zelllinien).

Die lebendigen Suspensionszellen in Kultur wurden nach der Ausplattierung von iPS-Zellen wöchentlich gezählt. Die Grafik in Abb.3- 44 zeigt den kinetischen Verlauf der Zellzahl während der NK-Zelldifferenzierung aus iPS-Zellen. In den ersten vier Wochen lag die Zellzahl in einem konstant niedrigen Bereich, ab der fünften Woche kam es dann zu einer starken Steigerung. Eine Phase von logarithmischem Wachstum ließ sich zwischen der vierten und der siebten Wochen beobachten, danach verlangsamte sich die Proliferation der differenzierenden Zellen.

In den ersten zwei Wochen waren kaum hämatopoetische bzw. lymphatische

Oberflächenmarker auf den differenzierenden Zellen zu finden. CD31, CD34, CD38, CD41, CD43 und CD45R wurden mittels Durchflusszytometrie überprüft; keiner von ihnen wurde von den differenzierenden Zellen exprimiert. Unter dem Mikroskop waren kaum Suspensionszellen zu erkennen, dafür wurden aus adhärennten iPS-Zellkolonien entstandene kugelförmige adhärennte Zellhaufen zu beobachten (vergl. Abb.3- 34B).

Ab der dritten Woche fingen die Zellen an, CD34 zu exprimieren. Eine CD34⁺ Zellpopulation konnte durchflusszytometrisch identifiziert werden. Knapp 30% der Zellen waren Lin-positiv (Abb.3- 45B). Das war auch ein Zeichen dafür, dass die Zellen sich aus iPS in Richtung Hämocyten differenzierten. Die CD38- und CD56-Expression war zu diesem Zeitpunkt auf den differenzierenden Zellen sehr niedrig (Abb.3- 45A).

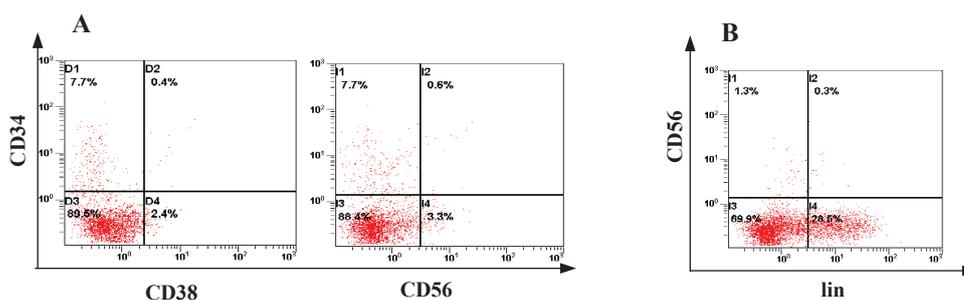


Abb.3- 45: Oberflächenmarker der differenzierenden Zellen in der dritten Woche der NK-Zellgenerierung aus iPS-Zellen. A: Expression von CD34, CD38 und CD56. B: Expression Lin-Cocktail

Unter dem Mikroskop waren am Ende der vierten Woche Suspensionszellen in der Kultur sichtbar. Eine deutliche CD38⁺-Zellpopulation konnte in durchflusszytometrischen Analysen nachgewiesen werden, während die Zahl der CD34⁺-Zellen etwas geringer wurde. Die CD56-Expression war, wie in der Woche zuvor, kaum zu sehen. CD16-positive/CD56-negative Zellen machten 22,8% der differenzierenden Zellen aus (Abb.3- 46A).

Zwischen der vierten und fünften Woche war die entscheidende Phase der NK-Zellentstehung, da in diesem Zeitraum die Zellen anfangen, CD56 zu exprimieren.

Bereits am Ende der fünften Woche trugen 16% der CD56⁺ Zellen schon NKG2A auf ihrer Oberfläche, wobei der Anteil der CD56⁺-Zellen aller differenzierenden Zellen fast 30% betrug (Abb.3- 46B). Ab diesem Zeitpunkt konnten die CD56⁺-Zellen als unreife NK-Zellen bezeichnet werden.

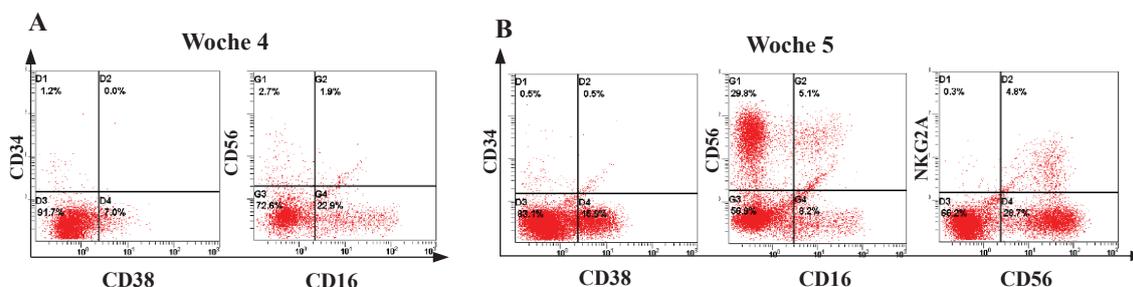


Abb.3- 46: Oberflächenmarker der differenzierenden Zellen in der vierten und fünften Woche der NK-Zelldifferenzierung aus iPS-Zellen. A: Woche 4. B: Woche 5.

Die Vermehrung der Zellen zwischen der fünften und der siebten Woche wurde mikroskopisch kontrolliert. Die Zellen befanden sich in einer rasch wachsenden Phase, in der auch die Zahl von CD56⁺-Zellen schnell zunahm. Bis zu siebten Woche waren fast alle Zellen CD56-positiv. Davon waren ca. 8.6% der Zellen auch für CD16-positiv, wobei CD16-positive, aber CD56-negative Zellen nicht mehr in den Kulturen zu finden waren. 5.47% der CD56⁺-Zellen wiesen NKG2A auf ihrer Oberfläche auf, während knapp 4% der CD56⁺-Zellen KIR2DL3 exprimierten. Im Vergleich zu der letzten Woche fiel die Prozentzahl von NKG2A⁺CD56⁺-Zellen ab, gleichzeitig fingen die Zellen an, KIR-Rezeptoren zu exprimieren. Wie bei den oben beschriebenen NK-Zelldifferenzierungen wurde KIR2DL3 als erster KIR-Rezeptor auf den Zellen exprimiert. Am Ende der Generierung waren auch andere KIR-Rezeptoren nachweisbar, allerdings war ihre Expression sehr beschränkt. Bis zum Ende der Generierung ließen sich in den Kulturen keine CD3⁺-Zellen nachweisen (Abb.3- 47).

Dieser Verlauf der NK-Zelldifferenzierung aus iPS-Zellen ohne CD34⁺-Zellsortierung konnte erfolgreich reproduziert werden. Die generierten NK-Zellen wiesen CD56, CD16, NKG2A und KIR-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche auf. Eine interessante

Beobachtung der Differenzierungskulturen war, dass in mehreren Kulturen sich kontrahierende Kardiomyozyten (Abb.3- 37C) gleichzeitig mit NK-Progenitor bzw. NK-Zellen zu finden waren.

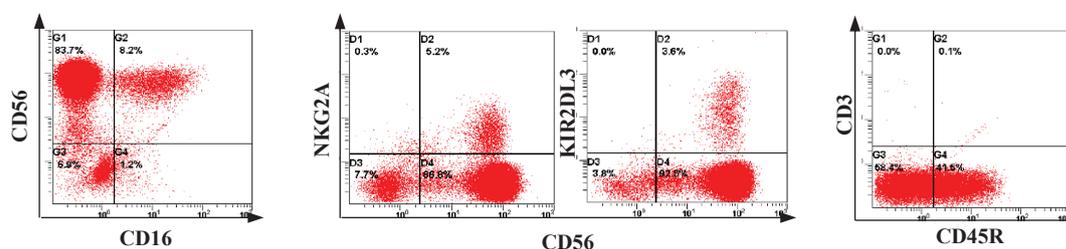


Abb.3- 47: Oberflächenmarker der differenzierenden Zellen in der Endphase (Woche 5) der NK-Zelldifferenzierung aus iPS-Zellen.

Die in Kultur entstandenen NK-Zellen wurden nach dem Erscheinen von KIR-Rezeptoren in funktionelle Assays eingesetzt, in denen die Zytotoxizität gegen HLA-I-defekte K562-Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb.3- 48).

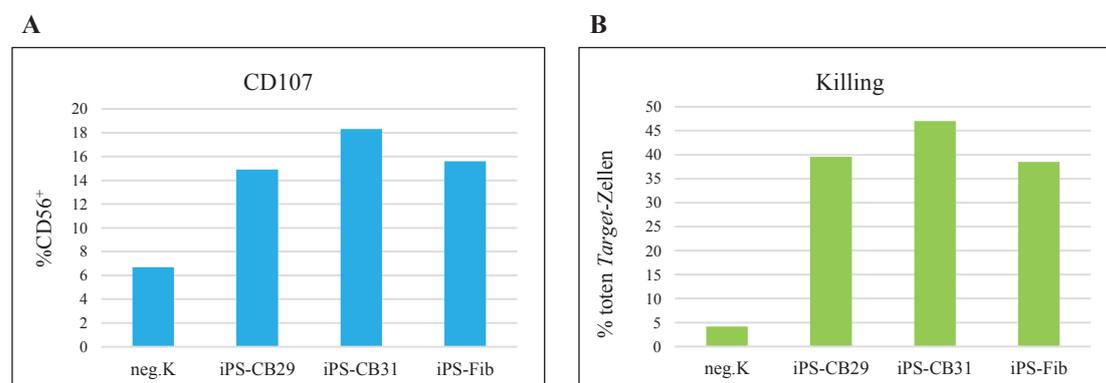


Abb.3- 48: Funktionale Assays der aus iPS-Zellen (iPS-Fib, iPS-CB29 und iPS-CB31) differenzierten NK-Zellen am Ende der NK-Zelldifferenzierung. A: CD107-Assay. B: CFSE-Assay, Messung nach toten *Target*-Zellen. HLA-I-defekte K562 wurde als *Target*-Zellen verwendet.

4 Diskussion

4.1 Neue humane *in vitro* Modelle für die NK-Zellentwicklung

Seit längerem ist bekannt, dass CD56⁺CD3⁻-NK-Zellen aus CB CD34⁺-HSCs auf einigen murinen *Feeder*-Zelllinien unter Kultur-Bedingungen *in vitro* generiert werden können (Miller *et al.*, 1999; Nakajima *et al.*, 2002;). In einer Studie von 2008 wurde auch bereits episodisch beschrieben, dass man NK-Zellen auf humanen MSC generieren kann, die Effizienz der NK-Zellgenerierung war aber sehr gering und die Studie enthält keine Informationen über die Expression von NK-Zellrezeptoren wie NKps, KIR, oder NKG2-Rezeptoren (Frias *et al.*, 2008). Weiterhin konnte vom Kaufman Labor (Minneapolis, USA) gezeigt werden, dass embryonale Stammzellen (ES-Zellen) sowie induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) auf murinen *Feeder*-Zelllinien (Woll *et al.*, 2005 und 2009; Knorr *et al.*, 2013) oder auch ohne *Feeder*-Zellen zu CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen differenzieren können (Ng *et al.*, 2008). Nicht zuletzt auch aufgrund ihres großen Potentials als Antitumor-Therapeutikum ist es deshalb von großem Interesse herauszufinden, von welchen Faktoren die *in vitro* Differenzierung von Stammzellen und das Repertoire der daraus gebildeten reifen NK-Zellen abhängt. Hierzu wurde ein in unserem Labor vor kurzem entwickeltes Zellkultur-Verfahren eingesetzt und weiter optimiert, bei dem MSC des Knochenmarks als humane Stammzellnische verwendet werden und alle eingesetzten Materialien humanen Ursprungs und mit klinischen Anwendungen kompatibel sind (Dissertation Brands 2014).

4.1.1 Ein vollständig humanes System für die NK-Zelldifferenzierung aus hämatopoetischen Vorläuferzellen

In der vorliegenden Arbeit wurden erfolgreich reife NK-Zellen aus CD34⁺-HSCs auf

humanen *Feeder*-Zellen (MSC-Zelllinien) unter Kulturbedingungen generiert, welche den charakteristischen Phänotyp $CD3^{-}CD56^{+}NKG2A^{+}KIR^{+}$ zeigten. Die generierten reifen NK-Zellen waren funktional, d.h. sie waren in der Lage, HLA-Klasse-I-defekte Tumor-Zelllinien wie z.B. K562 zu erkennen und effektiv abzutöten. Alle hier in dem Verfahren verwendeten Materialien waren humanen Ursprungs und für klinische Anwendungen getestet. Solche Vorteile weisen die NK-Zellen, die auf murinen *Feeder*-Zellen generiert wurden, nicht auf. Im Gegensatz zu den bisher verwendeten transformierten murinen Zelllinien handelt es sich bei den MSC um primäre, nicht entartete Zellen. Darüber hinaus, war die KIR-Expression der auf MSC generierten NK-Zellen deutlich höher als die derjenigen Zellen, die auf murinen *Feeder*-Zellen generiert wurden. Dies könnte ebenfalls unter immuntherapeutischen Gesichtspunkten einen methodischen Vorteil darstellen, da NK-Zellen mit verschiedenen KIR-Rezeptoren generiert werden, die eine spezifischere Erkennung von Zielzellen im Kontext bestimmter Krankheiten ermöglichen können. In allen bisher bekannten Methoden zur Generierung von NK-Zellen aus hämatopoetischen Progenitorzellen entstehen größtenteils unreife NK-Zellen, die lediglich den NKG2A-Rezeptor exprimieren, welcher eine weniger spezifische Erkennung von HLA-Klasse erlaubt (Miller *et al.*, 2001). Unter dem NK-Differenzierungsmodell der vorliegenden Arbeit wurden weder CD3-positiven T- noch CD56CD3-deppelpositiven *NK-like* T-Zellen generiert.

Im Vergleich zu den murinen *Feeder*-Zellen ist das NK-Zelldifferenzierungssystem auf MSCs sehr robust und reproduzierbar. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die MSC-Zellen während der ganzen NK-Zelldifferenzierung aus HSCs stabil am Boden der Kulturplatte bleiben und somit den differenzierenden Zellen kontinuierliche Unterstützung anbieten können. Die murinen *Feeder*-Zellen sind hingegen schon nach zwei Wochen der Generierungskultur größtenteils tot oder gar nicht mehr vorhanden. Die kürzere Verweildauer der murinen *Feeder*-Zelllinien in Kultur ergibt sich wahrscheinlich durch eine effektive xenogene Erkennung durch die entstehenden humanen NK-Zellen. Außerdem müssen vor dem Start einer NK-Zelldifferenzierung aus HSCs die MSC-*Feeder*-Zellen im Gegensatz zu murinen

Feeder-Zellen, bei denen es sich um transformierte Zelllinien handelt, nicht bestrahlt werden. Nachdem sich die MSC-Zellen abgesetzt haben, kann die NK-Zelldifferenzierung aus HSCs direkt nach der CD34⁺-HSC-Anreicherung starten, da das NK-Generierungsmedium das Wachstum der MSC-Zellen nicht fördert, aber sie auch nicht abtötet. Die MSC-Zellen bleiben in diesem Medium in einem ruhigen Zustand ohne Proliferation, ein Überwachsen der Kultur durch MSC ist hier nicht zu befürchten.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass MSC-Zellen die NK-Zelldifferenzierung aus HSCs *in vitro* unterstützen können, aber die Proliferation von reifen NK-Zellen verhindern. Dies bestätigt die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse, dass die MSC-Zellen die Proliferation der mit IL-2 aktivierten NK-Zellen verhindern können (Tse *et al.*, 2003; Spaggiari *et al.*, 2006; Spaggiari *et al.*, 2008). MSC-Zellen sind nur immunsuppressiv, wenn sie durch IFN- γ stimuliert werden, dieses wiederum wird von CD56⁺-NK-Zellen, nicht aber von hämatopoetischen Vorläuferzellen produziert (Ryan *et al.*, 2007; Pradier *et al.*, 2011;). Das erklärt auch, warum die MSC-Zellen trotz ihres inhibitorischen Effektes für die Unterstützung der NK-Zellentwicklung aus CD34⁺-HSCs gut geeignet sind.

Im Gegensatz zu MSC sind z.B. Fibroblasten nicht in der Lage die NK-Zelldifferenzierung aus HSCs zu unterstützen. So entstanden auf Fibroblasten lediglich CD38⁺-Vorläuferzellen und keine Zellen mit NK-Zellmarkern wie CD56. Interessanterweise können wiederum auf Fibroblasten KIR⁻ zu KIR⁺-NK-Zellen ausdifferenziert werden, wobei es sich hier um einen sehr späten Schritt der NK-Zelldifferenzierung handelt. Die Gründe für dieses unterschiedliche Verhalten auf MSC- bzw. Fibroblasten-Zellen sind darin zu sehen, dass die MSC-Zellen eine Stroma-Zelllinie und Teil der Knochenmarknische sind, welche in der frühen Phase der NK-Zellentwicklung benötigt wird (Frenette *et al.*, 2013). Durch Expression bestimmter Rezeptoren sind MSC in der Lage den HSCs Differenzierungsstimuli anzubieten und das für die NK-Zellentwicklung essentielle IRF-1 zu produzieren (Ogasawara *et al.*, 1998). Weitere wichtige Kandidaten für diese frühen Differenzierungssignale, deren Rolle in zukünftigen Studien untersucht werden

sollten, sind z.B. Rezeptoren der Notch-Familie wie DLL1, DLL4, und Jagged. Im Gegensatz dazu können diese frühen Differenzierungssignale durch Fibroblasten aufgrund ihres Phänotyps nicht vermittelt werden. Insgesamt bedeutet dies wahrscheinlich, dass die Zell-Zell-Kontakte und IRF-1 in der Phase, in der sich die HSCs zur NK-Zell-Linie determinieren, essenziell sind, danach aber für die späte funktionale Reifung der NK-Zellen keine Rolle mehr spielen. Dies ist auch kompatibel mit den Ergebnissen der NK-Zelldifferenzierung auf murinen Stromazellen wo sich zeigte, dass der Zell-Zellkontakt in den ersten 7 Tagen ausreichend ist um eine Determinierung in die NK-Zelllinie zu erreichen (Dissertation Brands 2014 und eigene Daten). Obwohl nach zwei Wochen NK-Zelldifferenzierung in der Kultur kaum noch murine *Feeder*-Zellen vorhanden waren, reichten die in der frühen Phase vermittelten Signale bereits aus damit sich die HSC auch ohne *Feeder*-Zellen zu CD56⁺NKG2A⁺- bzw. KIR⁺-NK-Zellen entwickeln können. Die Zellkontakte und IRF-1 sind daher für die Determinierung der NK-Zellen wichtig, nicht aber für die funktionale Reifung der NK-Zellen.

Wegen der angesprochenen Eigenschaften von Knochenmark-Stroma-Zellen können MSC-Zellen die NK-Zelldifferenzierung aus HSCs in frühen Phasen gut unterstützen, während sie in der späten Phase die NK-Zell-Reifung verzögern, wodurch die Differenzierung etwas länger dauert als bei murinen *Feeder*-Zellen. Erst wenn die MSC-Zellen von ausreifenden NK-Zellen abgetötet worden sind, kommt es zu einer effektiven Proliferation des reifen NK-Zellpools. Bevor die MSC-Zellen durch die entstandenen NK-Zellen abgetötet werden, haben die differenzierenden Zellen größere Chancen, mit *Feeder*-Zellen bzw. ihren HLA-I-Molekülen zu interagieren als während der Differenzierung auf murinen Stroma-Zellen. Dieser Effekt könnte dazu beitragen, dass entsprechend mehr KIR-positive NK-Zellen generiert werden, wie die Ergebnisse der Experimente, die im Abschnitt 3.1.1 erwähnt wurden, zeigen.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass mesenchymale Stammzellen eine geeignete humane *Feeder*-Zellen-Quelle für Unterstützung der NK-Zellentwicklung *in vitro* aus CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen darstellen. Da die in der vorliegenden Arbeit verwendeten MSC-Zelllinien alle unter

GMP-Bedingungen kultiviert wurden, sind die Experimente auch für klinische Forschungen sowie für die Zelltherapie von Bedeutung. Dies bietet die Möglichkeit, die *in vitro* generierten NK-Zellen in Patienten als Immuntherapeutikum einzusetzen.

4.1.2 MSC präsentieren HLA-Klasse-I-Antigene während der NK-Zelldifferenzierung

Da die verwendeten MSC-Linien alle klassischen HLA-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche exprimierten, konnte in dieser Arbeit erstmals der Einfluss des HLA-Klasse-I-Polymorphismus auf die Expression der HLA-Klasse-I-spezifischen KIR-Rezeptoren *in vitro* untersucht werden. Bisherige Versuche, zu diesem Zweck humane MHC-Klasse-I-Gene auf murinen *Feeder*-Zellen zu exprimieren, waren bisher wenig erfolgreich. Unsere eigenen Untersuchungen sowie die Erfahrungen in anderen Laboren (persönliche Auskunft von Jeff Miller, *University of Minnesota*) zeigten, dass die mit einem HLA-I-Überexpressionsvektor infizierten Zellen die eingebrachten Konstrukte im Laufe der mehrwöchigen Kultivierung größtenteils verlieren, d. h. es ist keine kontinuierliche Exposition mit HLA-I-Molekülen gewährleistet. Dies könnte damit zusammenhängen, dass es sich bei den etablierten murinen *Feeder*-Zelllinien für die NK-Zellgenerierung um Stromazellen aus der embryonalen (EL08) oder fetalen (AFT024) Leber handelt. Für diese Leberzelltypen ist bekannt, dass sie keine oder nur eine sehr schwache endogene Expression von MHC-Klasse-I aufweisen, d.h. eine ektopische Expression von HLA-Klasse-I könnte in AFT024- und EL08-Zelllinien durch endogene Mechanismen gezielt herunterreguliert worden sein.

Zweitens sind die murinen *Feeder*-Zellen, wie oben bereits erwähnt, nicht in der Lage, sich bis zur Phase der KIR-Expression in der Kokultur zu halten; sie verschwinden innerhalb von zwei Wochen aus der NK-Zellgenerierung. Dadurch können sie die Aufgabe, den NK-Zellen die relevanten KIR-Liganden zu dem Zeitpunkt zu präsentieren, wenn die NK-Zellen beginnen die KIR-Rezeptoren zu exprimieren,

nicht erfüllen.

4.1.3 MSC unterstützen auch die NK-Zelldifferenzierung aus iPS-Zellen

Das Kaufman-Labor konnte bereits zeigen, dass funktionale NK-Zellen in einem *in vitro* System in Anwesenheit von verschiedenen Zytokinen auf murinen Stroma-Zelllinien, z.B. AFT aus ES-Zellen (Woll *et al.*, 2005; Woll *et al.*, 2009) bzw. iPS-Zellen (Knorr *et al.*, 2013) generiert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde die NK-Zellentwicklung aus iPS-Zellen *in vitro* in einem vollständigen humanen System durchgeführt. Die Anwendung humaner, von der hiesigen Kinderklinik (Prof. R. Meisel) unter GMP-Bedingungen hergestellter MSC-Zellen als *Feeder*-Zellen ermöglichte die Generierung von NK-Zellen unter Bedingungen, die grundsätzlich einen Einsatz als zelluläres Therapeutikum möglich machen.

Der Einsatz der MSC-Zellen als *Feeder*-Zellen ermöglichte die NK-Zelldifferenzierung aus iPS-Zellen ohne Zwischenschritt, d. h. ohne vorherige durchflusszytometrische Anreicherung der entstandenen CD34⁺-Zellen. Dieses System hat einige Vorteile im Vergleich zu den beschriebenen Methoden, die den Zwischenschritt der Sortierung von CD34⁺-HSCs einschließen. Zunächst werden die differenzierenden Zellen weniger belastet, da sie nicht den Stress der Zellsortierung überstehen müssen. Der Verzicht auf die CD34⁺-Anreicherung hat den weiteren Vorteil, dass in dem ganzen Differenzierungsprozess keine Zellen verlorengehen, die das Potential haben, NK-Zellen zu werden. Da die Zellen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit in den Kulturen differenzierten, gingen Zellen, die zum Zeitpunkt der CD34⁺-Anreicherung kein CD34 auf ihrer Oberfläche exprimierten, aber das Potential, NK-Zellen zu werden, hatten, durch Anreicherung verloren. Dadurch können aus der gleichen Menge von Ausgangszellen, mehr NK-Zellen aus iPS- oder hES-Zellen gewonnen werden. Weiterhin konnte die Zeitspanne der Differenzierung so wesentlich verkürzt werden, im Vergleich zu den NK-Zelldifferenzierungen mit angereicherten CD34⁺-Zellen. Deshalb kann die direkte NK-Zellentwicklung aus iPS-Zellen ohne

Zwischenschritt nicht nur die Generierungszeit verkürzen, sondern auch die Effizienz des Experiments erhöhen.

4.1.4 Gedächtnis der iPS-Zellen und mögliche klinische Anwendung

Durch Reprogrammierung können ausdifferenzierte somatische Zellen wieder zu pluripotenten Stammzellen werden. Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass reprogrammierte Zellen ihre Herkunft nicht „vergessen“ und iPS-Zellen somit über ein „Gedächtnis“ verfügen. Die reprogrammierten Zellen haben zwar das Potential, sich zu allen Typen von Zellen zu differenzieren, bevorzugen jedoch jene Zellarten, die sie ursprünglich einmal waren (Ohi *et al.*, 2011; Barrero *et al.*, 2011). Das sog. „Gedächtnis“ der iPS-Zellen ließ sich auch in den Experimenten der vorliegenden Arbeit beobachten. Die iPS-Zellen, die ursprünglich CD34⁺-HSCs aus Nabelschnurblut waren, wurden viel effizienter zu CD34⁺-Zellen ausdifferenziert, als iPS-Zellen, die ursprünglich Fibroblasten-Zellen waren. Solche Eigenschaften können für die Generierungen bestimmter Arten von Zellen im Rahmen der klinischen Zelltherapie ausgenutzt werden. Handelt es sich hingegen um eine allogene Zelltherapie, sollte die gleiche Art von Zellen als Ausgangsmaterial für die Reprogrammierung verwendet werden, da aus den entsprechenden iPS-Zellen die gewünschten Zellen mit höherer Effizienz generiert werden können.

Interessanterweise kam es im Verlauf der NK-Zelldifferenzierung aus iPS-Zellen mehrere Male vor, dass in NK-Zelldifferenzierungskulturen aus iPS-Zellen Kardiomyozyten generiert wurden. Ein Grund dafür könnte sein, dass sich sowohl die NK-Zellen als auch die Kardiomyozyten aus dem Mesoderm entwickeln (Campbell *et al.*, 2003). Dies kann das Phänomen jedoch nicht hinreichend erklären. T-Zellen bzw. NK-like T-Zellen sind noch enger mit NK-Zellen verwandt als Kardiomyozyten, wurden allerdings nicht in den Differenzierungskulturen aus iPS-Zellen generiert. Warum sich Kardiomyozyten so leicht unter NK-Zelldifferenzierungsbedingungen aus iPS-Zellen generieren lassen, ist bislang noch ungeklärt.

4.2 Die Entstehung des KIR-Repertoires während der NK-Zellentwicklung ist unabhängig vom HLA-Klasse-I-Typ

Für die funktionale Maturierung von NK-Zellen spielen HLA-Klasse-I-Moleküle eine wichtige Rolle. Ihre Interaktion mit KIR-Rezeptoren sowie mit NKG2-Rezeptoren sind für die funktionale Reifung sowie die Toleranz gegenüber körpereigenen Zellen und Geweben verantwortlich. Ein bestimmter KIR-Rezeptor bindet seinen entsprechenden HLA-Klasse-I-Liganden mit einer höheren Affinität als andere KIRs. Die Frequenz und Stärke der KIR-Expression in reifen NK-Zellen gesunder Probanden zeigt eine Abhängigkeit von der Anwesenheit der entsprechenden HLA-Klasse-I-Liganden (Yawata *et al.*, 2006, Schönberg *et al.*, 2011a; und Sleiman *et al.*, 2014). Interessanterweise ist auch die Infektion mit dem weitverbreiteten Cytomegalovirus des Menschen (HCMV) mit einer erhöhten Frequenz von NK-Zellen korreliert die einen inhibitorischen KIR für eigenes HLA-Klasse-I exprimieren. Die biologische Relevanz dieser Adaption des NK-Zellrepertoires im Falle von HCMV-Infektionen ist noch unklar (Orr *et al.*, 2010; Beziat *et al.*, 2013). Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, ob die beobachtete Anpassung des NK-Zellrepertoires schon während der NK-Zelldifferenzierung stattfindet oder ob die Expression in dieser Phase stochastisch erfolgt und erst später, nach Kontakt mit Pathogenen und/oder immunogenen Substanzen, erfolgt.

Um diese Frage möglichst genau untersuchen zu können, wurden hämatopoetische Stammzellen nur aus solchen Nabelschnurblutproben sowie Knochenmarkproben verwendet, die einen KIR-Genotyp der Gruppe *A* aufwiesen (Uhrberg 1997). Hierbei handelt es sich um den häufigsten und gleichzeitig auch einfachsten *KIR*-Genotyp mit lediglich sechs exprimierten KIR. Alle 6 KIR können mit spezifischen Antikörpern voneinander unterschieden werden, so dass durchflusszytometrisch eine eindeutige Identifikation des jeweiligen KIR auf der Oberfläche einer NK-Zelle möglich ist, und zwar auch dann, wenn andere KIR auf der gleichen Zelle koexprimiert werden. Dies ist bei Genotypen in denen ein Haplotyp der Gruppe *B* involviert ist (entweder

heterozygot als *AB*- oder homozygot als *BB*-Genotyp) nur selten möglich, da diese sehr variabel sind und meist über eine größere Zahl von stimulatorischen KIR verfügen, die sich serologisch nicht von den inhibitorischen KIR unterscheiden lassen. Bei Spendern mit einer genetischen *AA*-Konfiguration konnte somit in dieser Arbeit die Expression der entsprechenden HLA-C-spezifischen Rezeptoren KIR2DL3, KIR2DL1 sowie HLA-Bw4-spezifischen KIR3DL1 eindeutig analysiert werden.

Um den sich *in vitro* zu NK-Zellen entwickelnden hämatopoetischen Vorläuferzellen HLA-Klasse-I-Moleküle präsentieren zu können, wurden wie bereits erwähnt, humane MSC-Zelllinien, als Korrelat einer Stammzellnische, mit unterschiedlichen HLA-I-Typen verwendet.

4.2.1 Die Entwicklung von NK-Zellen aus HSC des Nabelschnurbluts zeigt keine Korrelation der KIR-Expression mit dem HLA-Klasse-I-Typ

Die Experimente dieser Arbeit zeigen sehr deutlich, dass in der frühen Entwicklung von NK-Zellen die KIR-Expression unabhängig vom vorhandenen HLA-Klasse-I-Typ ist. Die erste Serie von Experimenten wurde mit CD34⁺-HSC aus Nabelschnurblut als Startmaterial durchgeführt. Diese *in vitro* NK-Zelldifferenzierung aus hämatopoetischen Vorläuferzellen wurde insgesamt mit sieben *AA*-Haplotyp Nabelschnurbluten auf insgesamt sieben (zwei HLA-C1/C1-, zwei HLAC1/C2- und drei HLA-C2/C2-*MSC*; bzw. zwei HLA-Bw6/Bw6-, zwei HLA-Bw4/Bw6 und drei HLA-Bw4/Bw4-*MSC*) *Feeder*-Zelllinien durchgeführt. Die Ergebnisse aus allen NK-Zelldifferenzierungen stimmten überein. Die KIR-Expression begann in der dritten Woche der NK-Zelldifferenzierung aus hämatopoetischen Vorläuferzellen. Unabhängig von vorhandenen HLA-Klasse-I-Typen sowie den Nabelschnurbluten selbst, war KIR2DL3 immer als erster KIR-Rezeptor auf der Oberfläche der differenzierenden Zellen nachzuweisen, darüber hinaus war KIR2DL3 auch immer der KIR-Rezeptor, der am stärksten exprimiert wurde. Die andere KIR-Rezeptoren, KIR2DL1, KIR3DL1 usw. wurden später und schwächer als KIR2DL3 exprimiert.

Dieses Phänomen war bei jeder NK-Zelldifferenzierung auf jeder MSC-Zelllinie ohne Ausnahme zu sehen. So war KIR2DL3 in allen Differenzierungskulturen fünf- bis zehnfach stärker exprimiert als KIR2DL1, unabhängig von der An- oder Abwesenheit des KIR2DL1-Liganden HLA-C2. Die KIR3DL1-Expression zeigte ebenfalls keine Korrelation mit der Anwesenheit des Liganden, HLA-Bw4. Diese Ergebnisse waren konstant bei jeder NK-Zelldifferenzierung zu sehen und ließen sich reproduzieren. Diese Ergebnisse sind somit kompatibel mit *ex vivo* Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, dass die KIR-Expression von NK-Zellen die aus Neugeborenen stammen, unabhängig vom HLA-Klasse-I-Typ der MSC-Feeder-Zellen ist. Darüber hinaus zeigt sich, dass der C1-spezifische KIR2DL3 der erste und am stärksten auf der Oberfläche der NK-Zellen exprimierte KIR-Rezeptor ist.

4.2.2 Die Entwicklung von NK-Zellen aus HSC des adulten Knochenmarks zeigt ebenfalls keine Korrelation der KIR-Expression mit dem HLA-Klasse-I-Typ

Da die CD34⁺ HSC aus Neugeborenen stammten, war unklar, ob sie sich während des NK-Zelldifferenzierungsprozesses genauso verhielten wie adulte CD34⁺ HSC. Um dies zu untersuchen, wurden CD34⁺-HSCs aus Knochenmark von gesunden adulten Spendern, die den KIR-Genotyp AA aufweisen, isoliert und auf MSC-Linien mit unterschiedlichen HLA-C- und HLA-B-Typen ausplattiert und zu NK-Zellen generiert. CD34⁺-HSC wurden aus insgesamt drei Knochenmark-Proben mit dem AA-KIR-Genotyp isoliert und anschließend auf je einer HLA-Bw6/C1 bzw. -Bw4/C2 MSC-Feeder-Zelllinie ausplattiert und zu NK-Zellen ausdifferenziert. Wiederum konnte keine Anpassung der KIR-Expression an HLA-Klasse-I festgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Differenzierungen sind bei den drei Knochenmarkproben reproduzierbar und zeigen, dass sowohl aus neonatalen als auch adulten hämatopoetischen Vorläufer-Zellen des Nabelschnurbluts bzw. des Knochenmarks NK-Zellen entstanden, deren KIR-Repertoire nicht von der Anwesenheit der

entsprechenden HLA-Klasse-I-kodierten Liganden beeinflusst wurde.

4.2.3 MSC-Umplattierungsexperimente und der Einsatz von KIR-negativen NK-Zellen bestätigt die Abwesenheit eines direkten Einflusses des HLA-Klasse-I-Typs auf die KIR-Expression während der Differenzierung

Da die ersten KIR⁺ NK-Zellen während der NK-Zelldifferenzierung nach ca. drei Wochen zu sehen waren, bestand die Möglichkeit, dass die *Feeder*-Zellen zum Zeitpunkt der KIR-Induktion nicht mehr vital genug waren, um die notwendigen Signale an die hämatopoetischen Vorläuferzellen so geben und evt. dann auch eine zu niedrige HLA-Klasse-I-Expression aufwiesen. Es musste daher überprüft werden, ob die Abwesenheit eines Einflusses von HLA-Klasse-I auf die NK-Zellgenerierung evt. auf die zu späteren Zeitpunkten der Kultur fehlende Vitalität der MSC zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck wurden die NK-Zellvorläufer zu dem entsprechenden Zeitpunkt, an dem die Zellen normalerweise beginnen KIR-Rezeptoren zu exprimieren auf frische MSC umplattiert, so dass sichergestellt war, dass im kritischen Moment der KIR-Entstehung die differenzierenden Zellen mit HLA-Klasse-I in Kontakt kommen können. Die Ergebnisse zeigten, dass während der NK-Zellentwicklung aus hämatopoetischen Stammzellen auch nach Umplattierung auf frische MSC keine Anpassung der KIR-Expression an den vorhandenen HLA-Klasse-I-Typ erfolgte.

Schließlich wurde auch noch getestet, ob KIR-negative NK-Zellen, die bereits Oberflächenmarker reifer NK-Zellen besaßen durch die Anwesenheit der polymorphen HLA-I-Moleküle beeinflusst werden. In diesem Experiment wurden daher KIR-negative NK-Zellen *ex vivo* aus AA-Genotyp Nabelschnurbluten isoliert und auf frischen MSC-Linien (HLA-C1/C1, -C2/C2) in Anwesenheit der KIR-induzierenden Zytokine IL-2 und IL-15 kultiviert. Dieses Experiment sparte also alle früheren Schritte der NK-Zelldifferenzierung aus, wodurch der Einfluss von Kulturbedingungen so gut wie möglich ausgeschlossen wurde. Nichtsdestotrotz ließ sich auch hier kein Einfluss der HLA-I-Moleküle auf die KIR-Expression feststellen.

4.2.4 Der HLA-Klasse-I „*knockdown*“ in MSC hat keine Auswirkung auf die KIR-Expression während der NK-Zelldifferenzierung *in vitro*

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die Herunterregulation von HLA-Klasse-I einen Einfluss auf die NK-Zellentwicklung aus HSCs hat. Falls sich die KIR-Expression während der NK-Zelldifferenzierung an HLA-Klasse-I anpasst, würde die Herunterregulation von HLA-Klasse-I-Molekülen die Entstehung des KIR-Repertoires beeinflussen. Die Experimente zeigen wiederum eindeutig, dass ein effektiver HLA-Klasse-I ‚*Knockdown*‘ in den MSC-Feeder-Zellen keinen Einfluss auf die Stärke der KIR-Expression hat, noch auf die Art der entstandenen KIRs. KIR2DL3 wurde, abgesehen von KIR2DL4, welches nicht auf der Oberfläche der NK-Zellen exprimiert wird (Goodridge *et al.*, 2003; Kikuchi-Maki *et al.*, 2003; Rajagopalan *et al.*, 2006), konsistent am frühesten und am stärksten exprimiert, während die Expression der übrigen KIRs wie z.B. des C2-spezifischen KIR2DL1 später erfolgte.

Insgesamt zeigten somit alle Versuchsansätze konsistent, dass das entstehende KIR-Repertoire während der NK-Zelldifferenzierung nicht vom HLA-I-Typ abhängig ist, sondern in einer genetisch festgelegten Reihenfolge exprimiert wird, bei der der C1-spezifische KIR2DL3 als erster KIR-Rezeptor auf die Oberfläche der entstehenden NK-Zellen kommt, unabhängig davon ob die interagierenden Zellen C1 oder C2-kodierende HLA-Klasse-I-Moleküle exprimieren. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sind konsistent mit der früheren Beobachtung unserer Gruppe, dass neonatale NK-Zellen aus Nabelschnurblut im Gegensatz zu adulten NK-Zellen keine Adaption an den jeweiligen HLA-Klasse-I Typ zeigen (Schönberg *et al.*, 2011b). Basierend auf diesen *in vivo* Ergebnissen zusammen mit den *in vitro* Daten erscheint es sehr wahrscheinlich, dass sich bis zur Geburt das NK-Zellrepertoire unabhängig vom vorhandenen HLA-Klasse-I-Typ entwickelt. An der postnatalen Adaption des NK-Zellrepertoires an HLA-Klasse-I könnten somit mehrere Faktoren beteiligt sein, so z. B. das Zusammentreffen und Erkennen von Pathogenen, wie z.B. dem

HCMV-Virus. Im Lauf der HCMV-Infektion kommt es zu einer deutlichen Expansion von NK-Zellen, die einen KIR für eigenes HLA-Klasse-I auf der Oberfläche tragen. Solche Prozesse lassen sich als eine Selektion von funktionalen und selbst schützenden NK-Zellen ansehen. Durch innere und äußere Faktoren erfolgt eine Selektion, und nur die NK-Zellen, die aufgrund ihrer Spezifität bestimmte Aufgaben erfüllen können, werden klonotypisch expandiert. Diese Adaption an HLA-Klasse-I lässt sich dementsprechend vor allem in adulten Individuen nachweisen und basiert wahrscheinlich auf der permanenten Exposition mit einer Vielzahl von Pathogenen, die zu einer selektiven Expansion von NK-Zellklonen führen, die KIR für eigene HLA-Klasse-I-Moleküle exprimieren. Die Persistenz dieser NK-Zellklone wird wahrscheinlich dadurch begünstigt, dass die Interaktion der inhibitorischen KIR mit ihren spezifischen HLA-Klasse-I-Liganden antiapoptotische Signale vermittelt, die das selektive Überleben dieser Klone ermöglichen (Ghio *et al.*, 2009; Saunders *et al.*, 2015).

4.3 Welche Rolle spielt die sequentielle Expression von NK-Zellrezeptoren für die NK-Zellentwicklung

Alle natürlichen Prozesse haben eine eigene Ordnung und Reihenfolge, jeder Schritt sollte weder zu früh noch zu spät erfolgen. Eine Veränderung der Reihenfolge der Prozessschritte könnte zu dramatischen Abweichung oder der Unterbrechung eines Prozesses führen. Dies könnte auch für die NK-Zellentwicklung gelten. Wie in der Literatur beschrieben, gehört die Entstehung der KIR-Rezeptoren zur Endphase der NK-Zelldifferenzierung aus HSCs (Freud *et al.*, 2006). Vor der KIR-Induktion steht als wichtiger Schritt die CD56-Expression. CD56 ist ein charakteristischer Oberflächenmarker für NK-Zellen (Rees *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Reihenfolge durch Überexpression von KIRs in CD34⁺-HSCs verändert. Die ektopische Expression von KIR2DL2 oder KIR2DL4 in den HSCs hatte eine starke Reduktion der CD56-Expression zur Folge (s. Abschnitt 3.3.2). Die meisten Zellen, die die exogene cDNA von KIR2DL2 bzw. KIR2DL4 überexprimierten, hatten es nicht geschafft, innerhalb der ersten vier Wochen der NK-Zelldifferenzierung CD56 auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Sowohl NKG2A- als auch KIR-Expression wurden bis zum Ende der Differenzierung, in den mit einem KIR2DL2- bzw. KIR2DL4-Überexpressionsvektor infizierten Zellen komplett ausgeschaltet.

Allerdings muss bei diesen Versuchen angemerkt werden, dass die lentivirale Infektionsprozess mit dem Leervektor allein auch die CD56-Expression etwas reduziert und die NKG2A-Expression sogar stark reduzierte. Obwohl die KIR-Expression vom Infektionsprozess unbeeinträchtigt blieb, könnte es daher sein, dass die NK-Zellentwicklung durch den Infektionsprozess selbst beeinflusst wurde (s. 3.3.2). Darüber hinaus waren Analysen nach mehr als vier Woche der Differenzierung nicht mehr sinnvoll, da kaum noch transfizierte Zellen existieren (Abb.3- 27) und die wenigen übriggebliebenen hoch wahrscheinlich nicht mehr repräsentativ für gesunde ausdifferenzierte NK-Zellen waren. Da die KIR-Expression der Kontrollkultur mit 0,7%

sehr niedrig war, ist eine endgültige Aussage darüber, ob die Überexpression von exogenem KIR2DL2 oder KIR2DL4 einen Einfluss auf die endogene KIR-Expression hat, nur sehr eingeschränkt möglich. Weitere Experimente werden hier benötigt.

4.4 Welche klinische Relevanz hat die genetisch festgelegte und Liganden-unabhängige Induktion der KIR-Expression während der NK-Zelldifferenzierung?

NK-Zellen spielen in der Schwangerschaft eine große Rolle. Im ersten Trimester der Schwangerschaft findet sich in der dezidualen Kontaktzone zwischen mütterlichem und fetalem Gewebe ein starkes Infiltrat von mütterlichen Lymphozyten, die im Gegensatz zum peripheren Blut (5-10% NK-Zellanteil an den Lymphozyten) meist zu über 70% aus NK-Zellen bestehen. Die häufigste Komplikation während der Schwangerschaft ist die Präeklampsie, bei der die mangelnde Versorgung des Fetus mit mütterlichem Blut im zweiten und dritten Trimester eine starke Gefährdung sowohl für Mutter als auch Kind darstellen. Verschiedene Studien zeigen nun, dass sich das Risiko von Präeklampsie dramatisch erhöht, wenn die Mutter homozygot für den KIR-Haplotyp A und der Fetus einen väterlichen HLA-Haplotyp vererbt bekommt, der das HLA-C2 Epitop aufweist. Das Risiko besteht auch, wenn die Mutter selbst die Kombination von KIR-AA und HLA-C2/C2 hat (Hiby *et al.*, 2004; Xiong *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014). Die Kombination von KIR-AA und HLA-C2/C2 ist in der ganzen humanen Population nur sehr selten zusammen zu finden. So weisen ethnische Populationen die einen hohen Anteil von KIR-A Haplotypen aufweisen, z.B. Japaner, einen sehr niedrigen Anteil an KIR-B Haplotypen auf, in anderen Populationen wie den australischen Aborigines verhält es sich genau umgekehrt (Nakimuli *et al.*, 2015). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten ein Grund für diese Selektion gegenüber der Kombination von KIR-AA und HLA-C2/C2 sein. Die HLA-C1-spezifischen KIR2DL3⁺-NK-Zellen scheinen auch in der Decidua während der Schwangerschaft generell die dominierende NK-Zellpopulation zu sein. Dementsprechend würden die mütterlichen KIR2DL3⁺ NK-Zellen in der Decidua nur bei Feten die einen HLA-C1-Liganden exprimieren einen inhibitorischen Liganden vorfinden, während HLA-C2 homozygote Feten keinen inhibitorischen Liganden für diese dominante NK-Zellpopulation besitzen. Insgesamt scheint die genetische

Kombination von mütterlichem KIR-A/A und fetalem HLA-C2/C2 aufgrund dieser fehlenden Interaktion zwischen mütterlichen NK-Zellen und Fetus zu einer schlechteren Versorgung des Fetus und damit zu einem erhöhten Risiko für Präeklampsie zu führen.

Schließlich könnte der gleiche Mechanismus auch für die Beobachtung eine Rolle spielen, dass Individuen mit der Kombination KIR-AA und HLA-C2/C2 schlechter und langsamer auf akute Virusinfektion reagieren (Pan *et al.*, 2011; Kuśnierczyk *et al.*, 2015).

5 Literaturverzeichnis

- Allan 2002: David S.J. Allan, Eric J.M. Lepin, Veronique M. Braud, Christopher A. O'Callaghan, Andrew J. McMichael. Tetrameric complexes of HLA-E, HLA-F, and HLA-G *Journal of Immunological Methods* 268 (2002) 43– 50.
- Andrejewski 1999: Andrejewski N, Punnonen EL, Guhde G, Tanaka Y, Lullmann-Rauch R, Hartmann D *et al.*, Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice. *J Biol Chem* 1999; 274: 12692–12701.
- Anfossi 2006: Anfossi N., Andre P., Guia S., Falk C. S., Roetyneck S., Stewart C. A., Bresciani V., Frassati C., Reviron D., Middleton D., Romagne F., Ugolini S. and Vivier E. (2006) Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25, 331-42.
- Arens 2010: R. Arens, S. P. Schoenberger: Plasticity in programming of effector and memory CD8 T-cell formation. In: *Immunol Rev.* (2010), Band 235(1), S. 190–205.
- Barrero 2011: Maria J. Barrero & Juan Carlos Izpisua Belmonte. iPS cells forgive but do not forget. *Nature Cell Biology* 13, 523–525 (2011) doi:10.1038/ncb0511-523. Published online 03 May 2011.
- Baum 1992: Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Apr 1;89(7):2804-8.
- Becknell 2005: Becknell B, Caligiuri MA. Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Adv Immunol.* 2005;86:209-39. Review.
- Beltran 2016: Garcia-Beltran WF, Hölzemer A, Martrus G2, Chung AW, Pacheco Y, Simoneau CR, Rucevic M, Lamothe-Molina P1, Pertel T, Kim TE, Dugan H, Alter G, Dechanet-Merville J, Jost S, Carrington M, Altfeld M. Open conformers of HLA-F are high-affinity ligands of the activating NK-cell receptor KIR3DS1. *Nat Immunol.* 2016 Sep;17(9):1067-74. doi: 10.1038/ni.3513. Epub 2016 Jul 25.

- Beziat 2011: Béziat V, Duffy D, Quoc SN, Le Garff-Tavernier M, Decocq J, Combadière B, Debré P, Vieillard V. CD56^{bright}CD16⁺ NK cells: a functional intermediate stage of NK cell differentiation. *J Immunol*. 2011 Jun 15;186(12):6753-61. doi: 10.4049/jimmunol.1100330. Epub 2011 May 9.
- Beziat 2013: Vivien B' eziat, Lisa L. Liu, Jenny-Ann Malmberg, Martin A. Ivarsson, Ebba Sohlberg, Andreas T. Björklund. NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. Submitted September 29, 2012; accepted January 6, 2013. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, January 16, 2013; DOI 10.1182/blood-2012-10-459545.
- Biron 1999: Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P. & Salazar-Mather, T. P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* **17**, 189-220 (1999).
- Bix 1991: M. Bix, N.-S. Liao, M. Zijlstra, J. Loring, R. Jaenisch and D. Raulet, Rejection of class I MHC-deficient hemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice, *Nature* **349** (1991), pp. 329–331.
- Blom 2006: Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol*. 2006; 24:287-320.
- Borrego 2001: Borrego, F., et al., Structure and function of major histocompatibility complex(MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer(NK) cells. *Mol. Immunol.*, 2001.38:p 637-660
- Branch 2012: Branch MJ, Hashmani K, Dhillon P, Jones DR, Dua HS, Hopkinson A (2012). "Mesenchymal stem cells in the human corneal limbal stroma". *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53 (9): 5109–16.
- Brands 2014: Untersuchungen zur epigenetischen Regulation der *KIR*-Genen während der Entwicklung von natürlichen Killerzellen. Dissertation in 06.2014.
- Braud 1998: Braud, V. M., Allan, D. S. & McMichael, A. J. Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules. *Curr Opin Immunol* **11**, 100-8 (1999).

- Brighton 1991: Brighton CT, Hunt RM (1991). "Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus". *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 73 (6): 832–47.
- Brighton 1997: Brighton CT, Hunt RM (1997). "Early histologic and ultrastructural changes in microvessels of periosteal callus". *J Orthop Trauma*. 11 (4): 244–53.
- Caligiuri 2008: Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008 Aug 1;112(3):461-9. doi: 10.1182/blood-2007-09-077438. Review.
- Campbell 2003: Neil A. Campbell, Jane B. Reece: *Biologie*. Spektrum-Verlag 2003, ISBN 3-8274-1352-4, Seite 1208
- Campbell 2001: Campbell JJ, Qin S, Unutmaz D, Soler D, Murphy KE, Hodge MR, Wu L, Butcher EC. Unique subpopulations of CD56⁺ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J Immunol*. 2001;166:6477–82.
- Cantoni 1998: Cantoni C., Verdiani S., Falco M., Pessino A., Cilli M., Conte R., Pende D., Ponte M., Mikaelsson M. S., Moretta L. and Biassoni R. (1998) p49, a putative HLA class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily. *Eur J Immunol* **28**, 1980-90.
- Carrington 2005: Mary Carrington, Sophia Wang, Maureen P. Martin, Xiaojiang Gao, Mark Schiffman, Jie Cheng, Rolando Herrero, Ana Cecilia Rodriguez, Robert Kurman, Rodrigue Mortel, Peter Schwartz, Andrew Glass, and Allan Hildesheim. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J Exp Med*. 2005 Apr 4; 201(7): 1069–1075. doi: 10.1084/jem.20042158
- Cella 1994: Cella M., Longo G. B. Ferrara, J. L. Strominger, M. Colonna 1994. NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80. *J. Exp. Med.* **180**: 1235–1242.
- Cellular and Molecular Immunobiology* 2002 Saunders ISBN 0-7216-0008-5.
- Chan 2007: Chan A, Hong DL, Atzberger A, Kollnberger S, Filer AD, Buckley CD, McMichael A, Enver T, Bowness P. CD56bright human NK cells

- differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol.* 2007 Jul 1;179(1):89-94.
- Civin 1996: Civin C, Alemeida-Porada G, Lee M, Olweus J, Terstappen L, Zanjani E: Sustained, retransplantable, multilineage engraftment of highly purified adult human bone marrow stem cells in vivo. *Blood* 88:4102, 1996 Letters 579 (2005) 5841–5849
- Collins 2005: Robert E. Collins, Xiaodong Cheng. Structural domains in RNAi. *FEBS Letters* 579 (2005) 5841–5849
- Colonna 1993: Colonna M, Borsellino G, Falco M, Ferrara GB, Strominger JL. HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Dec 15;90(24):12000-4.
- Colonna 1995: Colonna M, Samaridis J. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science.* 1995 Apr 21;268(5209):405-8.
- Colucci 2003: Colucci F., Caligiuri M. A. and Di Santo J. P. (2003) What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol* 3, 413-25.
- Cooley 2007: Cooley, S. et al. A subpopulation of human peripheral blood NK cells that lacks inhibitory receptors for self-MHC is developmentally immature. *Blood* 110, 578-86(2007).
- Cooper 2001: Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; 22:633-40
- Cullen 2008: Cullen SP, Martin SJ. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ.* 2008 Feb;15(2):251-62. Epub 2007 Nov 2. Review.
- Davis 2004: Davis DM, Dustin ML. What is the importance of the immunological synapse? *Trends Immunol* 2004; 25: 323–327.
- Dezell 2012: Dezell SA, Ahn YO, Spanholtz J, Wang H, Weeres M, Jackson S, Cooley S, Dolstra H, Miller JS, Verneris MR. Natural killer cell differentiation from hematopoietic stem cells: a comparative analysis of heparin- and stromal cell-supported methods. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012

- Apr;18(4):536-45. doi: 10.1016/j.bbmt.2011.11.023. Epub 2011 Dec 7.
- Di Santo 2006: Di Santo JP. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:257-86.
- Doherty 1999: Doherty DG1, Norris S, Madrigal-Estebas L, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE, O'Farrelly C. The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and CD3+CD56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns. *J Immunol.* 1999 Aug 15;163(4):2314-21.
- Egeland 1998: Egeland T. The CD34 molecule and hematopoietic progenitor cell studies--a challenge in clinical medicine. *Vox Sang.* 1998;74 Suppl 2:467-8.
- Farag 2006: Farag, S. S., and Caligiuri, M. A. (2006) Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev.* 20, 123-137.
- Fehniger 1999: Fehniger TA1, Shah MH, Turner MJ, VanDeusen JB, Whitman SP, Cooper MA, Suzuki K, Wechsler M, Goodsaid F, Caligiuri MA. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol.* 1999 Apr 15;162(8):4511-20.
- Felgner 1987: Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Nov;84(21):7413-7.
- Figueiredo 2006: Constanca Figueiredo, Axel Seltsam, Rainer Blasczyk. Class-, gene-, and group-specific HLA silencing by lentiviral shRNA delivery. *J Mol Med* (2006) 84:425-437; DOI 10.1007/s00109-005-0024-2.
- Figueiredo 2008: Constanca Figueiredo, Axel Seltsam, Rainer Blasczyk. Permanent silencing of NKG2A expression for cell-based therapeutics *J.Mol.Med* s00109-008-0417-0
- Figueiredo 2010: Constanca Figueiredo, Lilia Goudeva, Peter A. Horn, Britta Eiz-Vesper, Rainer Blasczyk and Axel Seltsam. Generation of HLA-deficient platelets from hematopoietic progenitor cells. *TRANSFUSION* 2010;50:1690-1701,

- doi: 10.1111/j.1537-2995.2010.02644.x.
- Fire 1998: Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Fischer 2007: Fischer JC, Ottinger H, Ferencik S, Sribar M, Punzel M, Beelen DW, Schwan MA, Grosse-Wilde H, Wernet P, Uhrberg M. Relevance of C1 and C2 epitopes for hemopoietic stem cell transplantation: role for sequential acquisition of HLA-C-specific inhibitory killer Ig-like receptor. *J Immunol.* 2007 Mar 15;178(6):3918-23.
- Frenette 2013: Frenette PS1, Pinho S, Lucas D, Scheiermann C. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:285-316. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095919. Epub 2013 Jan 3.
- Freud 2006: Freud, A. G. et al. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med* 203, 1033-43 (2006).
- Frias 2008: Frias AM, Porada CD, Crapnell KB, Cabral JM, Zanjani ED, Almeida-Porada G. Generation of functional natural killer and dendritic cells in a human stromal-based serum-free culture system designed for cord blood expansion. *Exp Hematol.* 2008 Jan;36(1):61-8.
- Fuchs 2004: Fuchs U, Damm-Welk C, Borhardt A. Silencing of disease-related genes by small interfering RNAs. *Curr Mol Med.* 2004 Aug;4(5):507-17.
- Ghio 2009: Ghio M, Contini P, Negrini S, Boero S, Musso A, Poggi A. Soluble HLA-I-mediated secretion of TGF-beta1 by human NK cells and consequent down-regulation of anti-tumor cytolytic activity. *Eur J Immunol.* 2009 Dec;39(12):3459-68. doi: 10.1002/eji.200939728.
- Gomez 1998: Vales-Gomez, M., et al., Differential binding to HLA-C of p50-activating and p58-inhibitory natural killer cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998.95:p 14326-14331.
- Goodridge 2003: Goodridge J. P., Witt C. S., Christiansen F. T. and Warren H. S. (2003) KIR2DL4 (CD158d) genotype influences expression and function in NK

- cells. *J Immunol* 171, 1768-74.
- Grégoire 2007: Grégoire C1, Chasson L, Luci C, Tomasello E, Geissmann F, Vivier E, Walzer T. The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev.* 2007 Dec;220:169-82.
- Gumperz 1995: Gumperz, J. E., V.Litwin, J. H.Phillips, L. L.Lanier, P.Parham 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.
- Herbermann 1975;Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer.* 1975 Aug 15;16(2):216-29.
- Hiby2004: Hiby SE, Walker JJ, O'shaughnessy KM, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, Moffett A. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med.* 2004 Oct 18;200(8):957-65. Epub 2004 Oct 11.
- Hiby2010: Hiby SE, Apps R, Sharkey AM, Farrell LE, Gardner L, Mulder A, Claas FH, Walker JJ, Redman CW, Morgan L, Tower C, Regan L, Moore GE, Carrington M, Moffett A. Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J Clin Invest.* 2010 Nov;120(11):4102-10. doi: 10.1172/JCI43998. Epub 2010 Oct 25.
- Hoglund 1997: Hoglund P, Sundback J, Olsson-Alheim MY, *et al.* Host MHC class I gene control of NK-cell specificity in the mouse. *Immunol Rev* 1997, 155:11-28
- Huang 2006: Wen-Chin Huang, Daqing Wu, Zhihui Xie, Haiyen E. Zhau, Takeo Nomura, Majd Zayzafoon, Jan Pohl, Chia-Ling Hsieh, M. Neale Weitzmann, Mary C. Farach-Carson, and Leland W.K. Chung. β 2-Microglobulin is a signaling and growth-promoting factor for human prostate cancer bone metastasis. *Cancer Res* 2006; 66(18). Sep.15, 2006
- Hulett 1969: Hulett HR, Bonner WA, Barrett J, Herzenberg LA. Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence.

- Science*. 1969 Nov 7;166(3906):747-9.
- Husain 2002: Husain Z., Alper C. A., Yunis E. J. and Dubey D. P. (2002) Complex expression of natural killer receptor genes in single natural killer cells. *Immunology* 106, 373-80.
- Iams 2004: Iams J., Creasy R. K., Resnik R., Reznik R. (2004). Maternal-fetal medicine. Philadelphia: W.B. Saunders Co. pp. 31–32. ISBN 0-7216-0004-2.
- Jackson 1990: Jackson DG, Bell JI (1990). "Isolation of a cDNA encoding the human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocyte differentiation". *J. Immunol.* 144
- Jacobs 2001: Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, Beul K, Kempf S, Behrens G, Sykora KW, Schmidt RE. CD⁵⁶^{bright} NK cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56^{dim} NK cells. *Eur J Immunol* 2001; 31:3121-6
- Janeway 2002: Charles A. Janeway jr. u. a. *Immunologie 5. Auflage*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin 2002
- Josson 2009: Jonsson and M. Yokoyama (2009) „Natural Killer Cell Tolerance: Licensing and Other Mechanisms”
- Karre 1986: K., Ljunggren, H. G., Piontek, G. & Kiessling, R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319, 675-8 (1986).
- Kaufman 2001: Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 Sep 11;98(19):10716-21. Epub 2001 Sep 4.
- Kemp 2005: K. C. Kemp, J. Hows, C. Donaldson: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells. In: *Leukemia & Lymphoma*. Band 46, Nr. 11, 2005, S. 1531–1544
- Khakoo 2004: Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ,

- Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WM, Thomas DL, Carrington M. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science*. 2004 Aug 6;305(5685):872-4.
- Kim 2005: Kim S., Poursine-Laurent J., Truscott S. M., Lybarger L., Song Y. J., Yang L., French A. R., Sunwoo J. B., Lemieux S., Hansen T. H. and Yokoyama W. M. (2005) Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 436, 709-13.
- Kim 2008: Kim S, Sunwoo JB, Yang L, Choi T, Song YJ, French AR, Vlahiotis A, Piccirillo JF, Cella M, Colonna M, Mohanakumar T, Hsu KC, Dupont B, Yokoyama WM. HLA alleles determine differences in human natural killer cell responsiveness and potency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 26;105(8):3053-8. doi: 10.1073/pnas.0712229105. Epub 2008 Feb 19.
- Kikuchi-Maki 2003: Kikuchi-Maki A, Yusa S, Catina TL, Campbell KS. KIR2DL4 is an IL-2-regulated NK cell receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN-gamma production. *J Immunol*. 2003 Oct 1; 171(7):3415-25.
- Kikuchi-Maki 2005: Akiko Kikuchi-Maki, Tracey L. Catina and Kerry S. Campbell. Cutting Edge: KIR2DL4 Transduces Signals into Human NK Cells through Association with the Fc Receptor γ Protein1. doi: 10.4049/jimmunol.174.7.3859 *The Journal of Immunology*. April 1, 2005 vol. 174 no. 7 3859-3863
- Kissling 1975: Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol*. 1975 Feb;5(2):117-21.
- Knorr 2013: Knorr DA, Ni Z, Hermanson D, Hexum MK, Bendzick L, Cooper LJ, Lee DA, Kaufman DS. Clinical-scale derivation of natural killer cells from human pluripotent stem cells for cancer therapy. *Stem Cells Transl Med*. 2013 Apr;2(4):274-83. doi: 10.5966/sctm.2012-0084. Epub 2013 Mar 20.
- Knust 2004: Genetik, *Thiemen Verlag*, 2004 W. Janning, E.Knust.
- Kuhn 2002: Kuhn JR, Poenie M. Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton

- during CTL-mediated killing. *Immunity* 2002; 16: 111–121.
- Kuśnierczyk 2013: Kuśnierczyk P. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene associations with autoimmune and allergic diseases, recurrent spontaneous abortion, and neoplasms. *Front Immunol.* 2013;4:8.
- Kuśnierczyk 2015: Kuśnierczyk P, Mozer-Lisewska I, Zwolińska K, et al. Contribution of genes for killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) to the susceptibility to chronic hepatitis C virus infection and to viremia. *Hum Immunol.* 2015;76:102–108. doi: 10.1016/j.humimm.2015.01.020.
- Lanier 1998: Lanier, L. L. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* **16**, 359-93 (1998).
- Larsen 2009: Margit Hørup Larsen and Thomas Vauvert F. Hviid Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease. *j.humimm.* 2009.07.015
- Le Bouteille 1999; Le Bouteiller, P. et al. Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for? *Hum Reprod Update* **5**, 223-33 (1999).
- Lee 2004: Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E.J. and Carthew, R.W. (2004) Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 117, 69–81.
- Liebermann 2003: Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 361–370.
- Ljunggren 1990: H. G. & Karre, K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* **11**, 237-44 (1990).
- Long 1999: Long, E., Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 1999.17:p. 875-904.
- Mandelboim 2001: Mandelboim, O. et al. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* **409**, 1055-60 (2001).
- Manitis 1989: Manitis T, Fritsch E.F, Sambrook J. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Martin 2002: Maureen P. Martin, Xiaojiang Gao, Jeong-Hee Lee, George W. Nelson, Roger Detels, James J. Goedert, Susan Buchbinder, Keith Hoots, David

- Vlahov, John Trowsdale, Michael Wilson, Stephen J. O'Brien & Mary Carrington. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nature Genetics* 31, 429 - 434 (2002) 22 July 2002 | doi:10.1038/ng934
- Martin 2003: Martin M. P., Bashirova A., Traherne J., Trowsdale J. and Carrington M. (2003) Cutting edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over. *J Immunol* 171, 2192-5.
- Manser 2015: Manser AR, Weinhold S, Uhrberg M. Human KIR repertoires: shaped by genetic diversity and evolution. *Immunol Rev.* 2015 Sep;267(1):178-96. doi: 10.1111/imr.12316.
- Martin 2002: Maureen P. Martin, Xiaojiang Gao, Jeong-Hee Lee, George W. Nelson, Roger Detels, James J. Goedert, Susan Buchbinder, Keith Hoots, David Vlahov, John Trowsdale, Michael Wilson, Stephen J. O'Brien & Mary Carrington. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nature Genetics* 31, 429 - 434 (2002) 22 July 2002 | doi:10.1038/ng934
- Martin 2003: Martin M. P., Bashirova A., Traherne J., Trowsdale J. and Carrington M. (2003) Cutting edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over. *J Immunol* 171, 2192-5.
- Meisel 2014: Meisel R, Heseler K, Nau J, Schmidt SK, Leineweber M, Pudelko S, Wenning J, Zimmermann A, Hengel H, Sinzger C, Degistirici Ö, Sorg RV, Däubener W. Cytomegalovirus infection impairs immunosuppressive and antimicrobial effector functions of human multipotent mesenchymal stromal cells. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:898630. doi: 10.1155/2014/898630. Epub 2014 Mar 23.
- Mendez-Ferrer 2010: Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature.* 2010 Aug 12;466(7308):829-34. doi: 10.1038/nature09262.

- Miller 1999: Miller JS., McCullar V., Punzel M., Lemischka IR., Moore KA. (1999) Single adult human CD34(+)/Lin-/CD38(-) progenitors give rise to natural killer cells, B-lineage cells, dendritic cells, and myeloid cells. *Blood* 93 96-106.
- Miller 2001: Miller JS., McCullar V. (2001) Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2. *Blood* 98 705-13.
- Moretta 2000: Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M. C. & Moretta, L. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* 21, 228-34 (2000).
- Moretta 2002: Moretta, A., Bottino, C., Mingari, M. C., Biassoni, R. & Moretta, L. What is a natural killer cell? *Nat Immunol* 3, 6-8(2002).
- Motyka 2000: Motyka, B., Korbitt, G., Pinksoski, M.J., Heibin, J.A., Caputo, A., Hobman, M., Barry, M., Shostak, I., Sawchuk, T., Holmes, C.F., Gaudie, J., Bleackley, R.C., 2000. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for Granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 103, 491– 500.
- Mrozek 1996: Mrózek E, Anderson P, Caligiuri MA. Role of interleukin-15 in the development of human CD56⁺ natural killer cells from CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1996 Apr 1;87(7):2632-40.
- Mullis 1986: Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, et al. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.
- Nakagawara 1995: Nata K, Takamura T, Karasawa T, Kumagai T, Hashioka W, Tohgo A, Yonekura H, Takasawa S, Nakamura S, Okamoto H (February 1997). "Human gene encoding CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase): organization, nucleotide sequence and alternative splicing". *Gene*. 186 (2): 285–92.
- Nakajima 2002: Nakajima H, Zhao R, Lund TC, Ward J, Dolan M, Hirsch B, Miller JS. The

- BCR/ABL transgene causes abnormal NK cell differentiation and can be found in circulating NK cells of advanced phase chronic myelogenous leukemia patients. *J Immunol*. 2002 Jan 15;168(2):643-50.
- Nakimuli 2015: Nakimuli A, Chazara O, Hiby SE, Farrell L, Tukwasibwe S, Jayaraman J, Traherne JA, Trowsdale J, Colucci F, Lougee E, Vaughan RW, Elliott AM, Byamugisha J, Kaleebu P, Mirembe F, Nemat-Gorgani N, Parham P, Norman PJ, Moffett A. A KIR B centromeric region present in Africans but not Europeans protects pregnant women from pre-eclampsia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015 Jan 20;112(3):845-50. doi: 10.1073/pnas.1413453112. Epub 2015 Jan 5.
- Nardi 2006: Nardi, N. Beyer; da Silva Meirelles, L. (2006). "Mesenchymal Stem Cells: Isolation, *In Vitro* Expansion and Characterization". In Wobus, Anna M.; Boheler, Kenneth. *Stem Cells. Handbook of experimental pharmacology*. 174. pp. 249–82.
- Netter 1987: Netter, Frank H. (1987). *Musculoskeletal system: anatomy, physiology, and metabolic disorders*. Summit, New Jersey: Ciba-Geigy Corporation. p. 134.
- Ng 2008: Ng ES, Davis R, Stanley EG, Elefanty AG. A protocol describing the use of a recombinant protein-based, animal product-free medium (APEL) for human embryonic stem cell differentiation as spin embryoid bodies. *Nat Protoc*. 2008;3(5):768-76. doi: 10.1038/nprot.2008.42.
- Nguyen 1997: CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999, 17:189-220.
- Ohi 2011: Ohi Y, Qin H, Hong C, Blouin L, Polo JM, Guo T, Qi Z, Downey SL, Manos PD, Rossi DJ, Yu J, Hebrok M, Hochedlinger K, Costello JF, Song JS, Ramalho-Santos M. Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nat Cell Biol*. 2011 May;13(5):541-9. doi: 10.1038/ncb2239. Epub 2011 Apr 17.
- Ogasawara 1998: Ogasawara K, Hida S, Azimi N, Tagaya Y, Sato T, Yokochi-Fukuda T, Waldmann TA, Taniguchi T, Taki S. Requirement for IRF-1 in the

- microenvironment supporting development of natural killer cells. *Nature* 391:700, 1998
- Ogawa 2002: Ogawa, M. 2002. Changing phenotypes of hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* 30:3.
- Ohi 2011: Ohi Y, Qin H, Hong C, Blouin L, Polo JM, Guo T, Qi Z, Downey SL, Manos PD, Rossi DJ, Yu J, Hebrok M, Hochedlinger K, Costello JF, Song JS, Ramalho-Santos M. Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nat Cell Biol.* 2011 May;13(5):541-9. doi: 10.1038/ncb2239. Epub 2011 Apr 17.
- Oni 1992: Oni OO (1992). "Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus". *J Bone Joint Surg Am.* 74 (4): 633–4.
- Oostendorp 2002: Oostendorp RA1, Harvey KN, Kusadasi N, de Bruijn MF, Saris C, Ploemacher RE, Medvinsky AL, Dzierzak EA. Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity. *Blood.* 2002 Feb 15;99(4):1183-9.
- Orr 2010: Mark T. Orr, William J. Murphy, and Lewis L. Lanier. "Unlicensed" Natural Killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection. *Nat Immunol.* 2010 April ; 11(4): 321–327. doi:10.1038/ni.1849
- Ouyang 2007: Ouyang Q, Baerlocher G, Vulto I, Lansdorp PM. Telomere length in human natural killer cell subsets. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Jun;1106:240-52. Epub 2007 Feb 15.
- Pan 2011: Pan N, Jiang W, Sun H, et al. KIR and HLA loci are associated with hepatocellular carcinoma development in patients with hepatitis B virus infection: a case-control study. *PLoS One.* 2011;6:e25682. doi: 10.1371/journal.pone.0025682.
- Paga 1998: Page, L.J., Darmon, A.J., Vellner, R., Griffiths, G.M., 1998. L is for lytic granules: lysosomes that kill. *Biochim. Biophys. Acta* 1401, 146– 156.
- Peters 1991: Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krahenbuhl O, Tschopp J Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med* 1991; 173:1099–1109.

- Pittenger 1999: M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, D. R. Marshak: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. In: *Science*. Band 284, Nr. 5411, April 1999, S. 143–147.
- Porcellini 2009: Porcellini A (2009). "Regenerative medicine: a review". *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 31 (Suppl. 2). doi:10.1590/S1516-84842009000800017.
- Pradier 2011: Pradier A, Passweg J, Villard J, Kindler V. Human bone marrow stromal cells and skin fibroblasts inhibit natural killer cell proliferation and cytotoxic activity. *Cell Transplant*. 2011;20(5):681-91. doi: 10.3727/096368910X536545. Epub 2010 Nov 5.
- Pushparaj 2008: P.N. Pushparaj, J.J. Aarthi, J. Manikandan, and S.D. Kumar. siRNA, miRNA, and shRNA: *in vivo* Applications. *J Dent Res* 87(11): 992-1003, 2008.
- Rajagopalan 2006: Rajagopalan S, Bryceson YT, Kuppusamy SP, Geraghty DE, van der Meer A, Joosten I, Long EO. Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. *PLoS Biol*. 2006 Jan; 4(1): e9.
- Raulet 1997: Raulet, D. H. et al. Specificity, tolerance and developmental regulation of natural killer cells defined by expression of class I-specific Ly49 receptors. *Immunol Rev* 155,41-52 (1997).
- Rees 2002: Rees, R. C. MHC restricted and non-restricted killer lymphocytes. *Blood Rev* 4, 20410(1990).
- Robertson 1996: Robertson MJ, Cochran KJ, Cameron C, Le JM, Tantravahi R, Ritz J. Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. *Exp Hematol*. 1996 Feb;24(3):406-15.
- Rosenstein 1991: Rosenstein Y, Park JK, Hahn WC, et al. (1992). "CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1." *Nature*. 354 (6350): 233–5.
- Ryan 2007: Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP (2007). "Interferon- γ does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells". *Clinical & Experimental Immunology*. 149 (2): 353–63.

- Saiki 1988: Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sallusto 2004: Federica Sallusto, Jens Geginat, Antonio Lanzavecchia: Central Memory and Effector Memory T cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. In: *Annu Rev Immunol.* (2004). Band 22, S. 745–763.
- Sanger 1977: Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
- Santourlidis 2002: Simeon Santourlidis, Hans-Ingo Trompeter, Sandra Weinhold, Britta Eisermann, Klaus L. Meyer, Peter Wernet, and Markus Uhrberg. Crucial Role of DNA Methylation in Determination of Clonally Distributed Killer Cell Ig-like Receptor Expression Patterns in NK Cells. *The Journal of Immunology*, 2002, 169: 4253-4261.
- Saunders 2015: Saunders PM, Vivian JP, O'Connor GM, Sullivan LC, Pymm P, Rossjohn J, Brooks AG. A bird's eye view of NK cell receptor interactions with their MHC class I ligands. *Immunol Rev.* 2015 Sep;267(1):148-66. doi: 10.1111/imr.12319.
- Schönberg 2011a: Schönberg K, Sribar M, Enczmann J, Fischer JC, Uhrberg M. Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood.* 2011 Jan 6;117(1):98-107. doi: 10.1182/blood-2010-03-273656. Epub 2010 Oct 8.
- Schönberg 2011b: Schönberg K, Fischer JC, Kögler G, Uhrberg M. Neonatal NK-cell repertoires are functionally, but not structurally, biased toward recognition of self HLA class I. *Blood.* 2011 May 12;117(19):5152-6. doi: 10.1182/blood-2011-02-334441. Epub 2011 Mar 17.
- Sivori 2000: Sivori, S. et al. Involvement of natural cytotoxicity receptors in human natural killer cell-mediated lysis of neuroblastoma and glioblastoma cell lines. *J Neuroimmunol* 107, 220-5 (2000).

- Sleiman 2014: Marwan Sleiman, Nicolaas H. C. Brons, Tony Kaoma, Figen Dogu, Alexandra Villa-Fortel, Patrick Lenoble, François Hentges, Katja Kotsch, Stephan D. Gadola, Carlos Vilches and Jacques Zimmer. NK Cell Killer Ig-like Receptor Repertoire Acquisition and Maturation Are Strongly Modulated by HLA Class I Molecules. *The Journal of Immunology* March 15, 2014 vol. 192 no. 6 2602-2610.
- Spaggiari 2006: Grazia Maria Spaggiari, Andrea Capobianco, Stelvio Becchetti, Maria Cristina Mingari, and Lorenzo Moretta. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. February 15, 2006; *Blood*: 107 (4)
- Spaggiari 2008: Spaggiari GM1, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1327-33. Epub 2007 Oct 19.
- Takahashi 2006: Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76. Epub 2006 Aug 10.
- Takahashi 2007: Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861-72.
- Terstappen 1991: Terstappen L, Huang S, Stafford M, Lansdorp P, Loken M: Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34⁺CD38⁻ progenitor cells. *Blood* 77:1218, 1991.
- Tomasello 1998: Tomasello, E., et al., Gene Structure, Expression Pattern, and Biological Activity of Mouse Killer Cell Activating Receptor-associated Protein(KARAP)/DAP-12. *J.Biol.Chem.*, 1998.273(51):p. 34115-34119.

- Torkar 1998: Torkar, M., et al., Isotypic variantion of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor Ioci in the leukocyte receptor complex. *Eur. J. Immunol.*, 1998.28(12):p. 3959-3967.
- Trapani 2002: Trapani JA, Smyth M.J. Functional significance of the perforin/ granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 735–747.
- Trobridge 2009: Trobridge GD (2009) Foamy virus vectors for gene transfer. *Expert Opin Biol Ther* 9: 1427-1436.
- Tse 2003: Tse WT1, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003 Feb 15;75(3):389-97.
- Uhrberg 1997: Uhrberg, M. et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 7,753-63 (1997).
- Uhrberg 2002: Uhrberg M1, Parham P, Wernet P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics*. 2002 Jul;54(4):221-9. Epub 2002 Jun 14.
- Uhrberg 2005a: Uhrberg, M. The KIR gene family: life in the fast lane of evolution. *Eur J Immunol* 35, 10-5 (2005).
- Uhrberg 2005: Uhrberg, M., The CD107 mobilization assay: viable isolation and immunotherapeutic potential of tumor-cytolytic NK cells. *Leukemia*, 2005:p. 1-3.
- Valiante 1997: Valiante, N. M. Uhrberg M, Shiling HG, *et al.* Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 1997, 7:739-751.
- Vitale 1998: Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, Augugliaro R, Moretta L, Moretta A. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med*. 1998 Jun 15;187(12):2065-72.
- Vivier 2004: Vivier, E., J. Nunes, and F. Vely, Natural Killer Cell Signaling Pathway.

- Science*, 2004. 306:p. 1517-1519.
- Wang 2014: Wang S, Li YP, Ding B, Zhao YR, Chen ZJ, XuCY, Fu YB, WangXT. Recurrent miscarriage is associated with a decline of decidual natural killer cells expressing killer cell immunoglobulin-like receptors specific for human leukocyte antigen C. *J Obstet Gynaecol Res* 2014;40:1288– 1295.
- Watarai 2010: Watarai H, Fujii S, Yamada D, Rybouchkin A, Sakata S, Nagata Y, Iida-Kobayashi M, Sekine-Kondo E, Shimizu K, Shozaki Y, Sharif J, Matsuda M, Mochiduki S, Hasegawa T, Kitahara G, Endo TA, Toyoda T, Ohara O, Harigaya K, Koseki H, Taniguchi M. Murine induced pluripotent stem cells can be derived from and differentiate into natural killer T cells. *J Clin Invest*. 2010 Jul;120(7):2610-8. doi: 10.1172/JCI42027.
- Woll 2005: Petter S. Woll, Colin H. Martin, Jeffrey S. Miller and Dan S. Kaufman. Human Embryonic Stem Cell-Derived NK Cells Acquire Functional Receptors and Cytolytic Activity. doi: 10.4049/jimmunol.175.8.5095 *The Journal of Immunology*. October 15, 2005vol. 175 no. 8 5095-5103
- Woll 2009: Petter S. Woll, Bartosz Grzywacz, Xinghui Tian, Rebecca K. Marcus, David A. Knorr, Michael R. Verneris, and Dan S. Kaufman. Human embryonic stem cells differentiate into a homogeneous population of natural killer cells with potent in vivo antitumor activity. *Blood*. 2009 Jun 11;113(24):6094-101. doi: 10.1182/blood-2008-06-165225. Epub 2009 Apr 13.
- Xiong 2013: Xiong S, Sharkey AM, Kennedy PR, Gardner L, Farrell LE, Chazara O, Bauer J, Hiby SE, Colucci F, Moffett A. Maternal uterine NK cell-activating receptor KIR2DS1 enhances placentation. *J Clin Invest* 2013;123:4264 – 4272.
- Yawata 2006: Makoto Yawata, Nobuyo Yawata, Monia Draghi, Ann-Margaret Little, Fotini Partheniou, and Peter Parham. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med*. 2006 Mar 20; 203(3): 633–645. doi:10.1084/jem.20051884.

- Yokoyama 2006: Yokoyama WM, Kim S. Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol Rev.* 2006 Dec;214:143-54.
- Yu 2013: Yu J, Freud AG, Caligiuri MA. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol.* 2013 Dec;34(12):573-82. doi: 10.1016/j.it.2013.07.005. Epub 2013 Sep 19.

Danksagung

An erster Stelle, mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Markus Uhrberg für die Überlassung des interessanten Themas, das Interesse und die Unterstützung an der Arbeit.

Prof. Dr. Thomas Klein danke ich sehr für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Ich möchte meine Eltern bedanken, dass ich auf der Welt bin. Danke für die Unterstützung und Möglichkeit hier in Deutschland mein Studium zu absolvieren. Ich liebe euch.

Ricarda möchte ich mich für die unermüdliche Hilfe bei allen Versuchen und bei allen Kleinlichkeiten herzlichen bedanken. Die Zeit war schön mit dir in- und außerhalb des Labors. Und vielen vielen Dank für das Korrekturlesen. Ich weiß es war eine dramatische Arbeit für dich, meine bis heute noch nicht „deutschierte“ deutsche Sprache zu lesen und zu korrigieren ☺.

Herzlichen Dank an Nina für die interessanten Gespräche und guten Ratschläge und die endlose Geduld und Unterstützung, wenn ich unter Druck und Stress gestanden habe.

Ich danke Jens sehr für die Anweisung in Zellkultur, NK-Zellgenerierung und schöne Bilder vom Mikroskop und auch für die lustigen Gespräche in- und außerhalb des Labors.

Ich bedanke mich bei Bodo Helli für das Korrekturlesen.

Vielen Dank an Maryam für die Anweisung für Killing-Assay.

Vielen Dank an Katharina für Zellsorten und Anweisung an FACS-Geräten.

Ich danke Frau Tillman und Frau Häger für die vielen Sequenzierungen, die sie für mich durchgeführt haben.

Vielen Dank an Simoen, Angela, Sara, Sandra, Rui für die Unterstützung, die interessanten Gespräche und die schönen Stunden in- und außerhalb des Labors.

Herzlichen Dank an Andrea Derksen für die Hilfe während meines ganzen Studiums, es ist ein Glück, dass ich dich kennengelernt habe.

Ich möchte meiner Cousine Dr. Jian Gong herzlichst bedanken, dass du mich während meines Studiums immer unterstützt hast. Ohne dich wäre ich nie nach Deutschland gekommen.

Herzlichen Dank und Liebe an meinem Mann, Wenhao Tao, es ist nicht so einfach unsere Beziehung zwischen so einer Distanz und so langer Zeit so gut zu pflegen. Habe dich lieb.

Herzlichen Dank an Jiaheng, es ist so schön dich kennenzulernen. Die schöne Zeit, wir zusammen verbringen, war einzelartig. Danke, dass du mich immer unterstützt hast, wenn ich in Schwierigkeiten stand.

Besondere Gedanke an mein Opa, wer vor kurz eingeschlafen ist. R.I.P. Ich werde bald wieder im Heimat sein, und bringe ich zu dir ein Straus von Blumen und meine Doktorarbeit mit. Ich werde dich endlos vermissen.

Abkürzung

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität)
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
Ak	Antikörper
AMP	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp.	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CB	cord blood (Nabelschnurblut)
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CLP	common lymphoid progenitor
cm	Zentimeter
CpG	Cytosin-Guanin Dinukleotid
CT	threshold Cycle
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Deoxyguanosine-5'-triphosphate
d.h.	das heißt
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl-Sulfoxide

DNMT	DNA-Methyltransferase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
ds	doppeltsträngig
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetrasessigsäure
evtl.	eventuell
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G	Guanin
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HLA	humanes Leukozyten-Antigen-System
HEK293T-Zelle	Human Embryonic Kidney 293 Zelle
HSA	humanes serum albumin
HSC	hämatopoetische Stammzelle
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Iscoves Modified Dulbecco's Medium
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
kb	Kilobase(n)
KIR	Killer-cell Immunoglobulin like receptor
KM	Knochenmark
L	Liter
LB	lysogeny broth

LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli
M	Molar
MACS	magnetic cell sorting
MEF	murine embryonale fibroblasten
MHC	major Histocompatibility Complex
min.	Minuten
mg	Mikrogramm
ml	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MNC	Mononukleäre Zellen
mRNA	messenger-RNA
MSC	mesenchymale Stammzelle
MW	Molekulargewicht
NK	natürliche Killerzellen
NKC	natural killer cluster
NS	Nukleinsäure
OD	optische Dichte
PB	Peripheres Blut
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PC5	Konjugat aus Phycoerythrin und Cyanin 5
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumjodid
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raum Temperatur

RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
s	Sekunde
S1	Sicherheitsstufe 1
S2	Sicherheitsstufe2
SCF	Stammzellen Faktor (<i>stem cell factor</i>)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH-Gruppe	Sulfhydryl-Gruppe
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
sog.	Sogenannt
t	Zeit
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TE-Puffer	Tris-DETA-Puffer
TGF	transforming growth factor
TLR	toll like recptor
Tm	Schmelzetemperatur
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit(s); Aktivitätseinheit für Enzyme
U	Uracil
usw	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	volumen per volume
w/v	weight per volume
z.B	zum Beispiel
-	negativ
+	positiv

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Xiaoyi Zhao, dass ich die vorliegende Dissertation im Rahmen der Lehrstuhlbetreuung selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet, sowie Zitate kenntlich gemacht habe. Ich erkläre gleichzeitig, dass ich diese Dissertation in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch in keiner anderen Institution eingereicht habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich vorher noch keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen habe.

Düsseldorf, den 16. Okt. 2016

Xiaoyi Zhao