

Untersuchungen zur antileukämischen Funktion von Natürlichen Killerzellen in Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Maryam Hejazi

aus Teheran

Düsseldorf, Juni 2017

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

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

Referent: Prof. Dr. Markus Uhrberg
Korreferent: Prof. Dr. Philipp A. Lang

Tag der mündlichen Prüfung:

Für Anash

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	5
Zusammenfassung	10
Summary	12
1 Einleitung	14
1.1 Das humane Immunsystem	14
1.2 Hämatopoiese	15
1.3 Natürliche Killerzellen	17
1.3.1 Effektormechanismen der NK-Zellen	19
1.3.1.1 Zytotoxizität (Perforin/Granzym B)	20
1.3.1.2 Zytokinproduktion	22
1.3.1.3 ADCC	23
1.3.1.4 Todesrezeptor Signalweg (Fas-FasL)	23
1.3.2 Rezeptoren der NK-Zellen	24
1.3.2.1 Die Natürliche Zytotoxizitäts-Rezeptoren (NCR)	24
1.3.2.2 NKG2-Familie	24
1.3.2.3 Killerzell-Immunoglobulin-ähnliche Rezeptoren	25
1.3.3 Selbst-Toleranz der NK-Zellen	28
1.3.4 Entwicklung und Alterung von NK-Zellen	28
1.3.5 NK-Zellen und hämatologische Erkrankungen	30
1.3.5.1 Das Myelodysplastische Syndrom	31
1.3.5.1.1 Pathogenese	33
1.3.5.1.2 Diagnose	34
1.3.5.1.3 Klassifikation	34
1.3.5.1.4 Prognose	38
1.3.5.1.5 Therapie	39
1.4 Ziele der Arbeit	40

2	Material und Methoden	41
2.1	Material	41
2.1.1	Antikörper	41
2.1.2	Chemikalien	42
2.1.3	Medien und Puffer	44
2.1.4	Kits	45
2.1.5	Primer	46
2.1.6	Geräte	46
2.1.7	Software	47
2.1.8	Zellen	47
2.2	Methoden	48
2.2.1	Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut	48
2.2.2	Bestimmung der Zellzahl	48
2.2.3	Einfrieren von Zellen	49
2.2.4	Auftauen von Zellen	49
2.2.5	Durchflusszytometrie	50
2.2.5.1	Extrazelluläre Antikörperfärbung	50
2.2.5.2	Intrazelluläre Antikörperfärbung	50
2.2.6	Funktionale Analyse der NK-Zellen	51
2.2.6.1	CD107a-Degranulationsassay	51
2.2.6.2	CFSE-Zytotoxizitätsassay	51
2.2.6.3	IFN- γ Produktion	52
2.2.7	Zellsortierung	53
2.2.7.1	Magnetische Zellsortierung	53
2.2.7.2	Durchflusszytometrische Zellsortierung	53
2.2.8	Apoptose Analysen	54
2.2.9	Expansion der NK-Zellen	54
2.2.10	Generierung der NK-Zellen	55
2.2.11	DNA-Isolation aus Vollblut	56
2.2.12	KIR-Typisierung	56
2.2.13	Gelelektrophorese	59

2.2.14	FISH-Analysen	59
2.2.15	Statistik	60
3	Ergebnisse	61
3.1	Charakteristik der Patienten	61
3.2	Analyse der Lymphozyten-Subpopulationen	63
3.2.1	Analyse der NK-Zellen im Alter	67
3.2.2	Analyse der NK-Zellen nach Subtyp und IPSS	68
3.3	Funktionalität der NK-Zellen in MDS-Patienten	70
3.3.1	CD107- und Zytotoxizitätsassay	70
3.3.2	Intrazelluläre Messung von Perforin und Granzym B.....	75
3.3.3	Intrazelluläre Produktion von IFN- γ	77
3.4	Etablierung einer Methode zur Expansion der NK-Zellen.....	79
3.4.1	Wiederherstellung der NK-Zellfunktion nach Stimulation	81
3.5	Analyse der CD56 ^{dim} und CD56 ^{bright} Subpopulationen.....	82
3.6	Spontane Apoptose der NK-Zellen	86
3.7	Analyse der Rezeptoren der NK-Zellen	87
3.8	<i>in vitro</i> Generierung der NK-Zellen	92
3.9	Klonale Beteiligung der NK-Zellen.....	98
4	Diskussion	102
4.1	Phänotypische Merkmale der NK-Zellen	103
4.2	Beeinträchtigte Funktion der NK-Zellen.....	105
4.3	Verminderte Expression von Perforin und Granzym B	109
4.4	Defekte in der Ausreifung von NK-Zellen	111
4.4.1	CD56 ^{dim} und CD56 ^{bright} Subpopulationen.....	111
4.4.2	KIR- und NKG2-Familie	112
4.4.3	Marker der terminalen NK-Zell-Differenzierung.....	114
4.5	NK-Zellgenerierung aus CD34 ⁺ HSC.....	116
4.6	Gehören die NK-Zellen zum malignen MDS-Klon?	118
4.7	Zusammenfassung und Ausblick.....	120
	Literaturverzeichnis	122

Eigene Publikationen	139
Lebenslauf..... Fehler! Textmarke nicht definiert.	
Danksagung	140
Eidesstaatliche Erklärung.....	143

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>)
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloide Leukämie
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
bp	Basenpaar
CAR	Chimäre Antigenrezeptoren (<i>chimeric antigen receptor</i>)
CD	Differenzierungsgruppe (<i>cluster of differentiation</i>)
CFDA-SE	<i>Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CLP	gemeinsamer lymphoider Vorläufer (<i>common lymphoid progenitor</i>)
CMML	Chronische myelomonozytische Leukämie
CMP	gemeinsamer myeloider Vorläufer (<i>common myeloid progenitor</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DC	dendritische Zellen (<i>dendritic cells</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	deoxynukleotidtriphosphate

DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Epo	Erythropoietin
ER	endoplasmatischen Retikulum
FBS	Fötale Bovines Serum
Fc-Fragment	<i>crystallisable fragment</i>
FcγRIII	Fc-gamma-Rezeptor III
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FISH	Fluorescence in situ hybridization
Flt-3	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Koloniestimulierender Faktor (<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
Gy	Grey
HCMV	humanes Zytomegalievirus (<i>human cytomegalovirus</i>)
HDACi	Histon deacetylase Inhibitor
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
HLH	familiärer hämophagozytische Lymphohystiozytose
HSC	hämatopoietische Stammzellen (<i>hematopoietic stem cells</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
Int1	Intermediäres Risiko I
Int2	Intermediäres Risiko II
IPSS	Internationales Prognosesystem (<i>International Prognostic Scoring System</i>)
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>

KIR	Killer-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren
KM	Knochenmark
L	Liter
LAMP-1	lysosomale Membranglykoprotein-1 (<i>lysosomal associated membrane protein 1</i>)
LRC	Leukozyten-Rezeptor-Komplex (<i>leukocyte receptor complex</i>)
MACS	<i>magnetic cell separation</i>
MSC	mesenchymale Stammzellen (<i>mesenchymal stem cells</i>)
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MDS-U	Myelodysplastisches Syndrom-unklassifiziert
MDSC	myeloide Suppressorzellen (<i>myeloid-derived suppressor cells</i>)
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität (<i>mean fluorescence intensity</i>)
min	Minute
MIC	<i>Major histocompatibility complex class I chain-related</i>
MNC	mononukleäre Zellen (<i>mononuclear cells</i>)
NCAM	neurales Zelladhäsionsmolekül (<i>neural cell adhesion molecule</i>)
NCR	natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren (<i>natural cytotoxicity receptor</i>)
NK	Natürliche Killerzellen
NKG2	<i>natural killer cell group antigen 2</i>
NKT	NK-ähnliche T-Zellen
PB	peripheres Blut
PBMC	mononukleäre periphere Blutzellen (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCR	<i>Polymerase Kettenreaktion</i> (<i>Polymerase chain reaction</i>)

PE	Phycoerythrin
PI	Propidium Iodid
PS	Phosphatidylserin
RA	Refraktäre Anämie
RAEB	Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss (<i>excess blasts</i>)
RAEB-T	Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss in Transformation
RARS	Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
RARS-T	Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten mit Thrombozytose
RCMD	Refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien
RCMD-RS	Refraktäre Zytopenie mit Ringsideroblasten
RCUD	Refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie
RN	Refraktäre Neutropenie
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Refraktäre Thrombozytopenie
SCF	Stammzellfaktor (<i>stem cell factor</i>)
Std	Stunde
SZT	Stammzelltransplantation
t-MDS	therapie-assoziiertes MDS
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	TNF-verwandter Apoptose-induzierender Ligand (<i>TNF-related apoptosis-inducing Ligand</i>)
TRAILR	TRAIL Rezeptor
U	<i>Unit</i>
ULBP	UL16-bindendes Protein
vs.	Versus

WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organisation</i>)
%	Prozent
+	positiv
-	negativ
<	kleiner
≥	größer/gleich
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
V	fünf

Zusammenfassung

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen des Knochenmarks, die mit einer ineffektiven Hämatopoiese einhergehen und vor allem alte Menschen betrifft (>70 Jahre). Im Gegensatz zu den Untersuchungen der myeloiden Zellen, die im Rahmen dieser Erkrankung vor allem betroffen sind, haben sich in der Vergangenheit nur wenige Studien mit der Rolle der Lymphozyten, im Speziellen der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), in der Pathogenese des MDS beschäftigt. NK-Zellen sind eine Subpopulation der Lymphozyten, deren wichtigste Aufgabe die Bekämpfung von virusinfizierten und entarteten Zellen ist. Um solche malignen Zielzellen zu erkennen und zu eliminieren, exprimieren NK-Zellen unter anderem Rezeptoren der KIR- und NKG2-Familie, sowie die zytotoxische Moleküle Granzym B und Perforin. Es war bereits bekannt, dass NK-Zellen von MDS-Patienten funktionale Störungen aufweisen können, jedoch wurden in den entsprechenden, oft widersprüchlichen Studien die NK-Zellen nicht ausreichend charakterisiert.

Um die Rolle der NK-Zellen genauer zu charakterisieren wurden in dieser Arbeit die NK-Zellen von neu-diagnostizierten MDS-Patienten und altersgleichen gesunden Spendern umfangreich phänotypisch und funktional untersucht. Dazu wurden verschiedene durchflusszytometrische Multiparameter-Protokolle erarbeitet, um einzelne NK-Zellsubpopulationen hinsichtlich ihrer Expression der zytotoxischen Moleküle und spezifischen NK-Zellrezeptoren zu analysieren, sowie deren Effektorfunktion gegenüber einer Zielzelllinie zu überprüfen. Dabei stellte sich heraus, dass nur eine kleine Gruppe der Patienten eine normale NK-Zellzahl und -Funktion aufwies (Gruppe 1). Die Mehrheit der Patienten besaßen normale NK-Zellzahlen, allerdings mit eingeschränkter Funktion (Gruppe 2). Weiterhin wurde in dieser Arbeit zu erstem Mal eine kleine Gruppe Patienten (13%) definiert, die sich durch das fast vollständige Fehlen von NK-Zellen kennzeichnen (Gruppe 3). Diese Gruppe-3-Patienten zeigten klinisch eine signifikant schlechtere Prognose im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen.

Die MDS-Patienten der Gruppe 2 zeigten eine stark erhöhte Frequenz von unreifen NK-Zellen, insbesondere KIR⁻NKG2A⁻ NK-Zellen und KIR2DL2/3⁺ NK-Zellen sowie

eine erhöhte Expression des von naiven NK-Zellen exprimierten Rezeptors CD62L. Die in diesen Patienten beobachtete funktionale Defizienz korrelierte dabei signifikant mit der niedrigen Expression von Perforin und Granzym B. Interessanterweise konnte die Funktionalität der NK-Zellen durch geeignete Stimulationsprotokolle unter Verwendung von IL-2 wiederhergestellt werden.

In vitro Differenzierungsexperimente zeigten, dass die hämatopoietischen Stammzellen (HSC) aller drei definierten Patientengruppen in der Lage waren zu NK-Zellen auszudifferenzieren, Patienten der Gruppe 2 und 3 zeigten jedoch einen deutlich verzögerten Verlauf. Dies bedeutet, dass das Differenzierungspotenzial der HSC in Richtung der NK-Zelllinie grundsätzlich vorhanden ist, es jedoch durch intrinsische Defekte der HSC und/oder eine schlechtere Unterstützung der Knochenmarknische in den Patienten zu den beobachteten funktionalen und phänotypischen Veränderungen der NK-Zellen kommen kann.

Schließlich zeigten immungenetische Analysen (FISH) von MDS-Patienten mit 5q-Syndrom, dass die NK-Zellen Teil des malignen MDS-Klons waren, während die ebenfalls analysierten B- und T-Zellen im allgemeinen keine Beteiligung am Klon aufwiesen. In einem der Patienten konnte nachgewiesen werden, dass sich die klonale Beteiligung auf solche NK-Zellen beschränkte, die funktional defizient waren und kein Perforin exprimierten, während Perforin-exprimierende funktionale NK-Zellen des gleichen Patienten keine klonalen Marker zeigten.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass die ausgeprägte NK-Zell-Defizienz in MDS-Patienten wahrscheinlich auf einem Ausreifungsdefekt beruht, dessen mögliche Ursachen eine dysfunktionale Stammzellnische sowie eine klonale Beteiligung des NK-Zellkompartiments sind.

Summary

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of clonal hematopoietic disorders of the elderly (>70 years), characterized by ineffective hematopoiesis, peripheral cytopenias and high risk of progression to acute myeloid leukemia (AML). In contrast to the many studies conducted on myeloid cell function in MDS, only few studies have investigated the role of the lymphoid lineage, in particular natural killer cells (NK cells) in pathogenesis of MDS. NK cells are cytotoxic lymphocytes involved in the immune response against tumors and virus-infected cells. In order to recognize and eliminate malignant cells, NK cells express receptors of the KIR and NKG2 family, as well as the cytotoxic molecules granzyme B and perforin. A reduced function of NK cells has already been described in MDS patients; however, in these often contradictory studies NK cells were not sufficiently characterized.

To this end, the phenotype and function of NK cells in elderly MDS patients was compared to age-matched healthy donors. For this purpose, different flow cytometric multiparameter protocols were developed to analyze individual NK cell subpopulations, regarding the expression of cytotoxic molecules and specific NK cell receptors, as well as their effector function against target cell line.

It turned out that only a small group of patients had normal levels of NK cell count and cytotoxicity (group 1). The majority of patients showed normal or reduced NK cell count with suppressed cytotoxicity (group 2). Remarkably, one subgroup of patients (13%) had no detectable NK cell population, here described as NK cell-deficient patients. The latter were predominantly high-risk group patients and exhibited a significant correlation to poor prognosis. NK cell from group 2 patients were predominantly immature due to a high frequency of the hyporesponsive KIR⁻NKG2A⁻ subset, dominant expression of KIR2DL2/3, and increased levels of CD62L, a marker of naïve NK cells. Furthermore, low levels of perforin and granzyme B correlated with suppressed function of NK-cells in this group of patients. Interestingly, the cytotoxicity of NK cells could be fully reconstituted by appropriate IL-2 stimulation.

In order to find out if NK cell deficiency in MDS is related to a defect in the NK cell differentiation pathway, hematopoietic stem cells (HSC) of all three groups of MDS patients were isolated from bone marrow and subjected to an *in vitro* NK cell differentiation assay. It turned out that NK cells could be successfully generated from HSC of all analyzed MDS groups. However, NK cell differentiation from HSC was less efficient in group 2 and group 3 patients. These data suggest that HSC from MDS patients generally have the potential to differentiate into NK cells but intrinsic defects of HSC and/or lack of stromal support prohibits their phenotypic and functional maturation.

Finally, immunogenetic analysis (FISH) of MDS patients with 5q-syndrome showed that NK cells, but not T- and B-cells, belong to the malignant MDS clone. In one patient, the clonal involvement could be tracked down specifically to the subset of functionally deficient NK cells that were characterized by a lack of perforin expression, whereas NK cells of the same patient that expressed normal levels of perforin showed no clonal label.

In summary, the present study shows that NK cell deficiency in MDS patients is probably due to a maturation defect that in turn could be due to a dysfunctional stem cell niche and/or clonal involvement of NK cells.

1 Einleitung

1.1 Das humane Immunsystem

Das menschliche Immunsystem repräsentiert einen Abwehrmechanismus des Körpers gegen pathogene Mikroorganismen wie Viren, Bakterien und Pilze und besteht aus einer „angeborenen“ und einer „erworbenen“ Immunantwort. Um eine effiziente Immunantwort zu erreichen, überlappen und interagieren diese miteinander.

Die angeborene Immunantwort ist die erste Verteidigungslinie des Körpers für die Bekämpfung von Pathogenen. Hat ein Pathogen die physikalischen (Haut) oder chemischen Barrieren (Speichel, Magensäure) durchdrungen, beginnen zelluläre Bestandteile der angeborenen Immunsystem diese zu bekämpfen. Dazu gehören Monozyten/Makrophagen, Granulozyten, Dendritische Zellen (DC) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die in der Lage sind, konservierte Oberflächenstrukturen der Pathogene oder das Nichtvorhandensein von körpereigenen Strukturen zu erkennen. Zusätzlich setzen diese Zellen eine Reihe von Zytokinen frei, um weitere Effektorzellen der angeborenen Immunantwort zum Infektionsort zu locken und gleichzeitig die Zellen des erworbenen Immunsystems zu rekrutieren. Zellen der angeborenen Immunantwort können die Krankheitserreger nicht spezifisch erkennen und bieten keinen Schutz gegen eine erneute Infektion, es wird also kein immunologisches Gedächtnis gebildet. In vielen Fällen kann eine Infektion nicht vollständig vom angeborenen Immunsystem kontrolliert werden und erfordert ein Eingreifen des erworbenen (=adaptiven) Immunsystems. Im Gegenteil zum angeborenen Immunsystem werden die Pathogene spezifisch erkannt und es kommt zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Hierzu gehören T- und B-Zellen, die mithilfe ihrer hochspezifischen Rezeptoren jedes beliebige Antigen erkennen können. Diese spezifische Erkennung erfolgt bei T-Zellen durch den T-Zell-Rezeptor und bei B-Zellen durch membrangebundene Immunglobuline (Ig), die als B-Zell-Rezeptor bezeichnet werden. Durch die somatische Rekombination besitzt jede B- und T-Zelle individuelle

Rezeptoren, die hochvariable Anteile besitzen und dadurch bestimmte Epitope erkennen.

T-Zellen besitzen den Marker CD3 (*cluster of differentiation*, CD) und bestehen aus verschiedenen Subpopulationen. Zu den wichtigsten gehören CD4⁺ T-Helfer-Zellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen. Beide Populationen erkennen Fremdartigene, die über HLA-Moleküle (Humane Leukozyten-Antigene) präsentiert werden. Dabei unterscheidet man zwischen zwei verschiedenen Molekülen: HLA Klasse-I und Klasse-II. HLA Klasse-I Moleküle werden auf allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert und präsentieren die Fremdartigene an zytotoxischen T-Zellen. HLA Klasse-II Moleküle werden auf sogenannten antigenpräsentierenden Zellen (APZ) exprimiert. Zu Ihnen gehören Makrophagen, B-Zellen und DCs und sie präsentieren den T-Helfer-Zellen die Fremdpeptide. Zytotoxische T-Zellen besitzen zytotoxische Granula, mit denen sie die infizierten Zellen gezielt abtöten können. T-Helfer-Zellen setzen nach der Aktivierung eine Reihe von Interleukinen frei, die andere Zellen wie Monozyten, B-Zellen und zytotoxische T-Zellen aktivieren.

Die B-Zellen vermitteln die humorale Immunantwort. Neben membrangebundenen Igs (B-Zell-Rezeptor) exprimieren diese Zellen auch HLA Klasse-II Moleküle und können die Fremdpeptide an T-Helfer-Zellen präsentieren. Diese produzieren wiederum Zytokine, die die B-Zellen zur Proliferation und Differenzierung zu Plasmazellen anregen. Plasmazellen sind in der Lage, lösliche Igs zu produzieren, die spezifisch an Pathogene binden und sie somit für die anderen Zellen des Immunsystems, wie NK-Zellen und Phagozyten, markieren.

1.2 Hämatopoiese

Täglich werden ca. $1,5 \times 10^{11}$ Blutzellen gebildet und somit ist das Blut eines der am stärksten regenerativen Organe im Körper (Bryder, *et al* 2006). Die Bildung und Entwicklung der Blutzellen wird als Hämatopoiese bezeichnet. Die verschiedenen Blutzellen leiten sich von einer kleinen Population multipotenter Stammzellen ab, die erstmals während der embryonalen Entwicklung im Dottersack gebildet werden. Diese sogenannten hämatopoietischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSC) sind

in der Lage sowohl sich selbst zu erneuern, als auch sich in verschiedene hämatopoietische Zellen zu differenzieren (Siminovitch, *et al* 1963). Bei der Selbsterneuerung der HSC gibt es zwei Möglichkeiten der Zellteilung: die symmetrische und die asymmetrische Zellteilung. Bei der symmetrischen Zellteilung entstehen zwei identische Tochterzellen mit Stammzellcharakter, wohingegen bei einer asymmetrischen Zellteilung eine Stammzelle und eine differenzierte Tochterzelle gebildet wird (Morrison and Kimble 2006). Die langlebigen HSC befinden sich hauptsächlich im Knochenmark (KM), in der sog. Knochenmarknische. Diese setzt sich aus Endothelzellen, mesenchymalen Stammzellen (MSC) und Osteoblasten zusammen und bildet somit eine spezielle Umgebung, die das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung der HSC steuert.

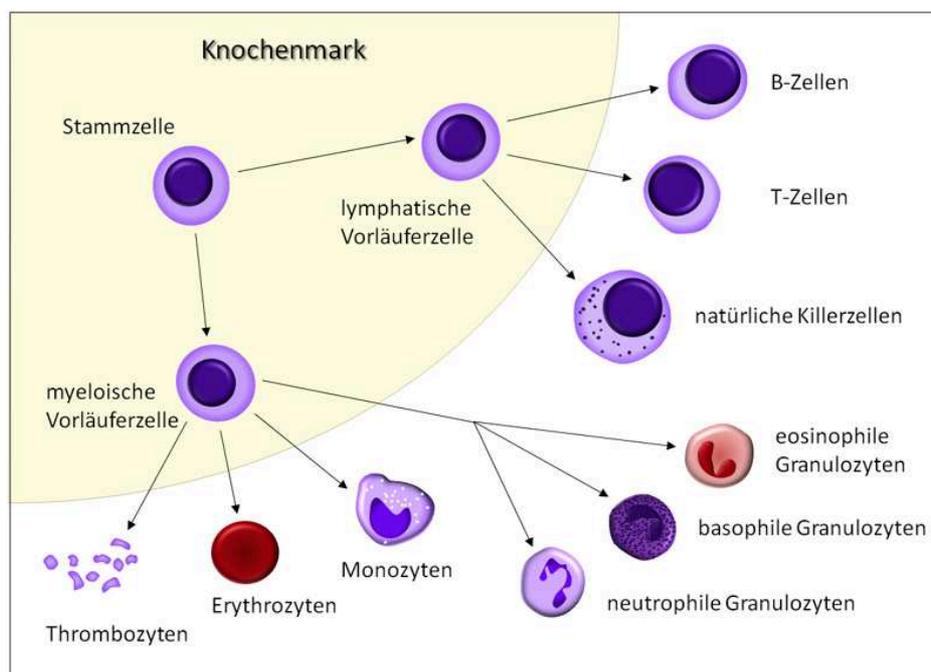


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Hämatopoiese (Kompetenznetz-Leukämien)

Zunächst entstehen die gemeinsamen myeloischen (*common myeloid progenitor*, CMP) oder lymphatischen (*common lymphoid progenitor*, CLP) Vorläuferzellen. Die CLP bringen in weiteren Differenzierungsschritten die reifen lymphoiden Zellen wie T-

und B-Zellen, sowie NK-Zellen hervor. Aus den CMP entwickeln sich Thrombozyten, Monozyten, Erythrozyten und Granulozyten (Abbildung 1).

Zur Identifikation hämatopoietischer Stammzellen kann die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle herangezogen werden. So exprimieren frühe hämatopoietische Vorläuferzellen CD34⁺, ein Oberflächenmolekül welches mit der Differenzierung der HSC verloren geht. Durch spontane Veränderungen des Erbgutes in hämatopoietischen Stammzellen können entartete Zellen entstehen, die einen Differenzierungsdefekt aufweisen und als unreife Progenitorzellen (Blasten) im Knochenmark und Blut akkumulieren. So kann sich eine Gruppe von Zellen bilden, die dieselben Merkmale tragen und als „Klon“ bezeichnet werden. Breitet sich der maligne Klon im Knochenmark aus, kommt es zu klonalen Erkrankungen, wie Leukämien oder zum myelodysplastischen Syndrom (MDS), mit dem sich die vorliegende Arbeit beschäftigt.

1.3 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gehören zur angeborenen Immunantwort und spielen eine essentielle Rolle bei der Bekämpfung von Virus-infizierten und entarteten Zellen. NK-Zellen sind in der Lage, zytotoxisch aktiv zu werden, zum anderen sekretieren sie Zytokine, um dadurch andere Zellen des Immunsystems zu rekrutieren. Zum ersten Mal wurden die NK-Zellen auf Grund ihrer Fähigkeit entdeckt, Tumorzellen *in vitro* abzutöten (Kiessling, *et al* 1975). Man stellte fest, dass sie die entarteten Zellen ohne vorherige Aktivierung töteten, wodurch ihre Bezeichnung als „natürliche“ Killerzellen entstand (Kiessling, *et al* 1975). Neben T- und B-Zellen gehören die NK-Zellen zu den Lymphozyten und machen in der Regel 5-15% der Lymphozyten des peripheren Blutes (PB) aus. Morphologisch werden die NK-Zellen als große (~ 15µm) granuläre Zellen beschrieben, die phänotypisch anhand der Abwesenheit von CD3 und des Vorhandenseins von CD56 (*neural cell adhesion molecule*, NCAM) und/oder CD16 auf der Oberfläche identifiziert werden können (Hercend, *et al* 1985, Lanier, *et al* 1986, Lanier, *et al* 1989). CD16 ist ein niedrigaffiner FcγRIII auf NK-Zellen, der das Fc-Fragment der IgG bindet und dadurch die NK-Zellen für die sogenannte Antikörper-

abhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) gegenüber IgG-markierten Zielzellen aktivieren kann (Mandelboim, *et al* 1999).

Anhand der Expressionsstärke von CD56 können die NK-Zellen in zwei Subpopulationen unterteilt werden (Abbildung 2): CD56^{bright} NK-Zellen (CD56^{bright}, CD16^{-/dim}) stellen eine unreifere Vorstufe der NK-Zellen dar und besitzen vorwiegend immunregulatorische Funktionen, indem sie Zytokine produzieren (Chan, *et al* 2007, Romagnani, *et al* 2007). Dazu zählen Interferon (IFN)- γ , Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-10, IL-13 und GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (Cuturi, *et al* 1989, Martin-Fontecha, *et al* 2004). CD56^{dim} NK-Zellen (CD56^{dim}, CD16⁺) stellen mit ca 90% die Mehrheit der NK-Zellen im PB dar. Sie weisen große Mengen an zytotoxischen Granzym- und Perforin-haltigen Granula auf und besitzen daher hauptsächlich zytotoxische Funktionen (Cooper, *et al* 2001, Jacobs, *et al* 2001).

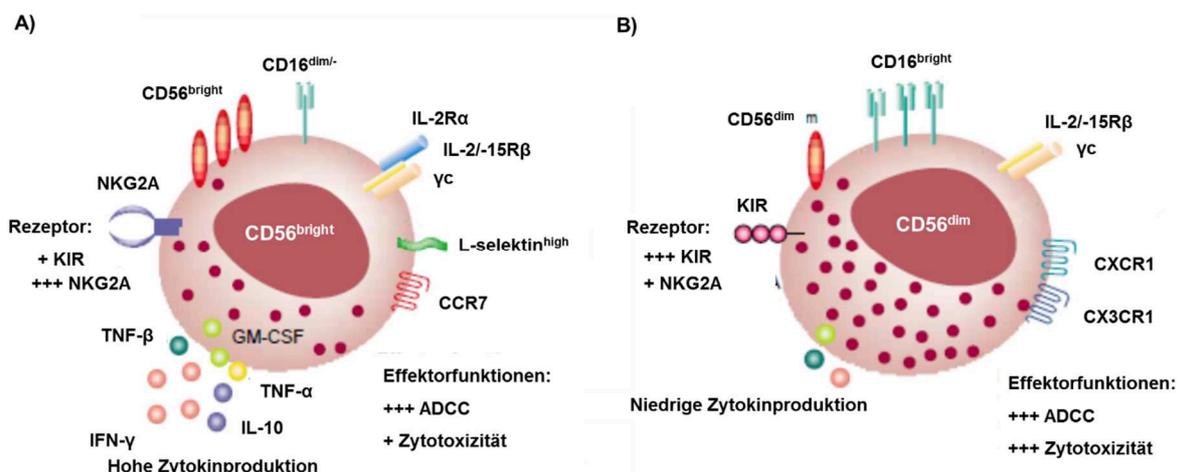


Abbildung 2: Subpopulationen der NK-Zellen. Unterschiede in Rezeptorexpression und Funktion der CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zellen. **A)** CD56^{bright} NK-Zelle: hohe Produktion von Zytokinen wie IFN- γ , TNF- α , IL-10 und GM-CSF, erhöhte Expression von NKG2A, niedrige Expression von Killer-Immunoglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIR) und CD16 und dadurch geringe Zytotoxizität und ADCC (Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität), geringer Anteil an zytotoxischen Granula. **B)** CD56^{dim} NK-Zelle: hohe Expression von KIR und CD16 und dadurch erhöhte Zytotoxizität und ADCC, niedrige Zytokinproduktion und Proliferation durch die Expression des schwachaffinen IL-2 Rezeptor (IL-2R β). Adaptiert nach (Cooper, *et al* 2001)

Gegenstand der Diskussion ist immer noch, in welchem Verhältnis diesen beiden Subpopulationen zueinander stehen. Es wurde gezeigt, dass CD56^{dim} NK-Zellen direkt

aus CD56^{bright} NK-Zellen generiert werden können (Freud, *et al* 2014, Luetke-Eversloh, *et al* 2013). Diese Studien schließen allerdings nicht aus, dass manche CD56^{bright} Zellen aktivierte NK-Zellen sind, die CD56 hochreguliert und CD16 verloren haben. Möglicherweise sind die CD56^{bright} NK-Zellen im peripheren Blut eine heterogene Gruppe, bestehend aus unreifen Zellen, die aus dem Knochenmark ausgewandert sind sowie reifen aktivierten NK-Zellen (Berahovich, *et al* 2006).

Neben diesen beiden Zelltypen sind auch Populationen wie CD56^{dim}CD16⁻ und CD56⁻CD16⁺ beobachtet worden. Es wird vermutet, dass es sich bei diesen Zelltypen um Vorläuferzellen handelt, die noch zu reifen CD56^{dim}CD16⁺ Zellen differenzieren (Lutz, *et al* 2011). CD56^{dim}CD16⁻ NK-Zellen können auch aktivierte NK-Zellen sein, bei denen CD16 herunterreguliert oder der extrazelluläre Teil durch „shedding“ enzymatisch abgetrennt wurde (Harrison, *et al* 1991).

1.3.1 Effektormechanismen der NK-Zellen

Wie bereits in 1.3 beschrieben, zeichnet sich die Funktion der NK-Zellen durch die Zytotoxizität und Ausschüttung von Zytokinen aus. Diese Effektormechanismen sind mit der Entstehung einer hochentwickelten und robusten Maschinerie verbunden, die die Einleitung dieser Effektormechanismen kontrollieren, um körpereigene Schäden zu vermeiden (Vivier, *et al* 2008). Das bedeutet vor allem, dass die Funktion der NK-Zellen reguliert werden muss. Für das Verständnis dieser Regulation war die „*missing self*“-Hypothese, die Ende 1980er von Kärre und Ljunggren formuliert wurde, von enormer Bedeutung (Karre, *et al* 1986). Diese besagt, dass die NK-Zelle in der Lage ist, die Expression der HLA Klasse-I Moleküle auf der Zelloberfläche zu erkennen. Diese Spezifität ist bedingt durch die Expression verschiedener inhibitorischer und stimulatorischer Rezeptoren auf der NK-Zelle. Sind die HLA Klasse-I Moleküle vorhanden, wird die NK-Zelle über die Bindung von inhibitorischen Rezeptoren inhibiert. So werden alle kernhaltigen Körperzellen durch die Aktivierung der Inhibitorischen Signalkaskade vor der Lyse durch die NK-Zellen geschützt. Bei entarteten Zellen und vielen Virus-infizierten Zellen wird jedoch die Expression der

HLA Klasse-I Moleküle herabreguliert, wodurch diese Zellen aufgrund des Fehlens der Inhibition für die NK-Zellen angreifbar werden.

Die Intensität und Qualität der NK-Zellfunktion hängt sowohl von Zytokinen im Mikromilieu als auch von anderen Zellen des Immunsystems wie T-Zellen, Makrophagen und DCs ab. Es ist mittlerweile bekannt, dass IL-2 die Proliferation, Zytotoxizität und zum Teil die Zytokinproduktion der NK-Zellen fördert. IL-12, IL-15 und IL-18 zählen ebenfalls zu den Aktivatoren der NK-Zellfunktion.

1.3.1.1 Zytotoxizität (Perforin/Granzym B)

Die Zytotoxizität der NK-Zellen basiert auf der Degranulation zytotoxischer Granula. Diese werden oft als „sekretorische Lysosomen“ bezeichnet, da sie die Charakteristik von Lysosomen aufweisen (Burkhardt, *et al* 1990, Peters, *et al* 1991). Sie beinhalten eine Reihe von Lysosom-spezifischen Enzymen, ebenso wie Proteine, die spezifisch für zytotoxische Granula sind. Zu diesen Proteinen zählen unter anderem Perforin und Granzym B. Durch Bildung einer immunologischen Synapse zwischen NK- und Zielzelle werden die Granula in Richtung der Bindungsstelle polarisiert (Bryceson, *et al* 2006). Zu einer Degranulation kommt es dann, wenn die stimulatorischen Signale gegenüber den inhibitorischen überwiegen. Perforin und Granzym B sind in ruhenden NK-Zellen exprimiert und werden nach der Degranulation in der immunologischen Synapse freigesetzt. Ein Marker für aktivierte NK-Zellen sind CD107 Moleküle (lysosomale Membranglykoprotein-1, LAMP-1), die sich auf der Innenmembran der Granula befinden und nach der Degranulation auf die Oberfläche gelangen (Alter, *et al* 2004). Es wird vermutet, dass die CD107 Moleküle am Schutz der NK-Zelle vor der Selbstzerstörung durch Perforin beteiligt sind (Cohnen, *et al* 2013).

Perforin ist ein Ca^{2+} -abhängiges, porenformendes Protein, welches Granzym B ermöglicht in die Zielzelle zu gelangen, um dort die Apoptose einzuleiten. Studien haben gezeigt, dass Perforin-defiziente Mäuse anfällig für Virusinfektionen und Tumoren sind (Kagi, *et al* 1994, Lowin, *et al* 1994). In Patienten mit „familiärer hämophagozytischer Lymphohistiozytose“ (FHL) konnten biallelische Perforin-Mutationen als ursächlich für eine Immundefizienz nachgewiesen werden

(Goransdotter Ericson, *et al* 2001, Stepp, *et al* 1999). Perforin wird nach der Synthese im endoplasmatischen Retikulum (ER) in die zytotoxischen Granula verpackt. Es gibt verschiedene Mechanismen, wie eine vorzeitige Aktivierung von Perforin in den zytotoxischen Granula verhindert wird: Das saure Milieu (pH 5,1-5,4) in den Granula sorgt dafür, dass Perforin inaktiv bleibt (Kataoka, *et al* 1997). Es wurde lange Zeit angenommen, dass Perforin in den Granula an seinen Inhibitor Serglycin gebunden ist und es erst zu einer Spaltung dieser Verbindung und zur Aktivierung des Perforin kommt wenn Perforin in der Synapse freigesetzt wird, (Masson, *et al* 1990, Pipkin and Lieberman 2007). Diese Annahme gilt heute als unwahrscheinlich, da in einer Studie gezeigt wurde, dass die NK-Zellen von Serglycin-defizienten Mäusen funktional sind (Grujic, *et al* 2005, Voskoboinik, *et al* 2010).

Das Wort Granzym ist eine Kombination aus den Worten Granula und Enzyme und beschreibt eine Gruppe von Serin-Proteasen, die in den zytotoxischen Granula von NK- und T-Zellen gelagert sind und den programmierten Zelltod, die Apoptose, einleiten können. Beim Menschen sind bisher fünf Granzyme bekannt: Granzym A, B, H, K und M. Sie weisen ähnliche Strukturen auf, zeigen jedoch Unterschiede in ihrer Chromosomen-Position und Substratspezifität. Während die Expression und biologische Funktion von Granzym A und B gut erforscht ist, bleibt vieles über Granzym H, K und M unbekannt. Granzym B scheint am effizientesten in der Auslösung von Apoptose in den Zielzellen zu sein: Zielzellen, die *in vitro* Granzym B und Perforin ausgesetzt sind, sterben innerhalb von 5-8 Minuten durch Apoptose (Lopez, *et al* 2013, Sutton, *et al* 2000, Voskoboinik, *et al* 2015).

Das Zusammenspiel zwischen Granzym B und Perforin ist allerdings noch nicht eindeutig geklärt. Es ist unklar, ob Perforin die Zielzellmembran permeabilisiert, wodurch Granzym B in der Zielzelle gelangen kann oder beide Moleküle durch Endozytose von der Zielzelle aufgenommen werden und Perforin erst Poren in der Endosomenmembran bildet.

Es stellt sich nun die Frage, wie die NK-Zellmembran vor dem freigesetzten Perforin und Granzym B geschützt wird. Balaji *et al.* haben im Jahr 2002 dazu eine Hypothese vorgestellt. Diese besagt, dass Cathepsin B, ein Protein in der Membran der Granula, bei der Degranulation und Verschmelzung der beiden Membranen an die

Plasmamembran der NK-Zelle transportiert wird und Perforin-Moleküle, die in Richtung NK-Zelle wandern, durch Proteolyse inaktiviert (Balaji, *et al* 2002, Pipkin and Lieberman 2007). Eine weitere Studie besagt, dass die CD107 Moleküle auf der NK-Zelloberfläche in der Lage sind, nach der Degranulation die Bindung von Perforin an NK-Zellmembran zu verhindern und somit bieten einen Schutzmechanismus gegen freigesetztes Perforin (Cohnen, *et al* 2013).

1.3.1.2 Zytokinproduktion

Neben ihrer zytotoxischen Aktivität sezernieren die NK-Zellen Zytokine wie IFN- γ , TNF- α und GM-CSF. Diese aktivieren weitere Zellen des Immunsystems wie T-Zellen, Makrophagen und DCs, stimulieren die Expression der HLA Klasse-I Moleküle und somit die Antigenpräsentation (Rock, *et al* 2002). Auf diese Weise können NK-Zellen die Immunantwort regulieren und einen Einfluss auf das adaptive Immunsystem ausüben.

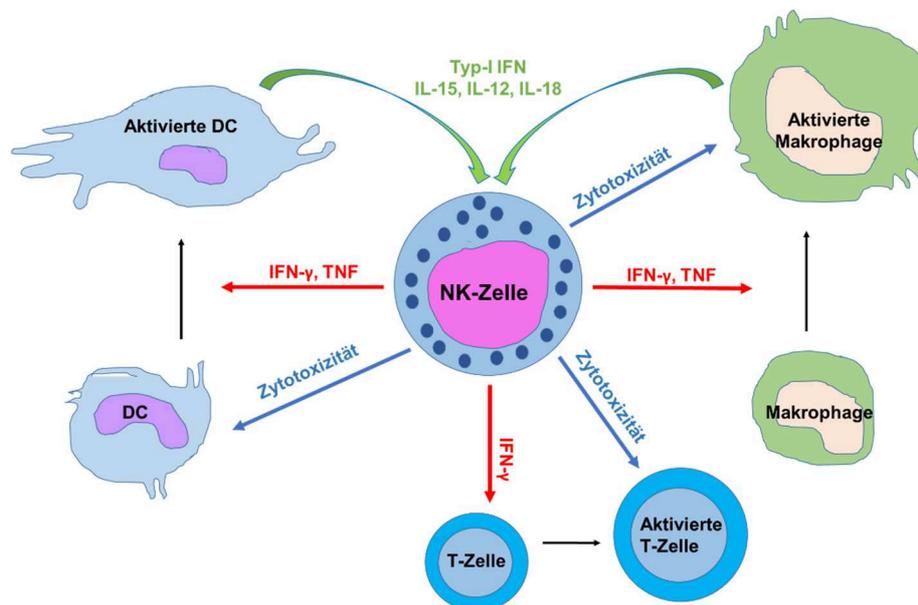


Abbildung 3: Regulation der Immunantwort durch die NK-Zellen. Nach der Aktivierung durch löslichen Faktoren wie IL-15, IL-12 und IL-18 fördern (roter Pfeil) die NK-Zellen die Ausreifung und Aktivierung von DCs, Makrophagen und T-Zellen mittels einer Kombination aus Oberflächen Rezeptoren und Zytokinen. Umgekehrt, können die NK-Zellen unreife DCs und aktivierte CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen abtöten (blauer Pfeil). Adaptiert nach (Vivier, *et al* 2008)

1.3.1.3 ADCC

ADCC steht für antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*) und beschreibt einen Mechanismus, bei dem die antikörperbeladenen Zielzellen durch Effektorzellen, wie NK-Zellen, Makrophagen oder DCs, zerstört werden. Die Mehrzahl der NK-Zellen exprimiert CD16, einen Fc-Rezeptor mit niedriger Affinität zu Immunglobulin-G (IgG), welches den Fc-Teil der an die Zielzelle gebundenen Antikörper erkennt und daran bindet. Sobald dieser Kontakt zustande kommt, wird eine Signalkaskade in der NK-Zelle aktiviert, die zur Degranulation der NK-Zelle oder/und Ausschüttung von Zytokinen führen kann (Mandelboim, *et al* 1999).

1.3.1.4 Todesrezeptor Signalweg (Fas-FasL)

Ein weiterer Mechanismus, der zur Eliminierung der Zielzelle führt, ist der Fas/Fas-Ligand Signalweg, der sowohl von NK-Zellen, als auch von T-Zellen benutzt wird. Fas-Ligand (FasL) gehört zur TNF-Familie und wird von NK-Zellen, T-Zellen, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert. Fas-Rezeptor (CD95) wird in verschiedene Zelltypen, wie aktivierten B- und T-Zellen und auch in verschiedenen Tumorzellen exprimiert. Die Bindung von Fas-Rezeptor und FasL löst den Caspase Signalweg aus, was zur Lyse der Zielzelle führt (Sharma, *et al* 2000, Suda, *et al* 1995). Dieser Vorgang spielt u.a. eine essentielle Rolle bei der Beseitigung aktivierter B- und T-Zellen und Aufrechterhaltung der Homöostase während der Immunantwort (Sharma, *et al* 2000). Nach dem gleichen Prinzip erfolgt auch die Bindung von TRAIL (TNF-verwandter Apoptose-induzierender Ligand, *TNF-related apoptosis-inducing Ligand*) an die verschiedenen TRAIL-Rezeptoren (TRAILR) (Pan, *et al* 1997, Walczak, *et al* 1997).

1.3.2 Rezeptoren der NK-Zellen

Die Regulierung der NK-Zellfunktion erfolgt durch eine Reihe von inhibitorischen und stimulatorischen Rezeptoren, die auf der NK-Zelloberfläche exprimiert werden. Dabei kann zwischen drei Haupt-Gruppen unterschieden werden: Natürliche Zytotoxizitäts-Rezeptoren (*natural cytotoxicity receptor*, NCR), C-Typ Lektin-ähnliche Rezeptoren (NKG2-Familie) und Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (*killer-cell immunoglobulin-like receptors*, KIR).

1.3.2.1 Die Natürliche Zytotoxizitäts-Rezeptoren (NCR)

Die NCR sind stimulatorische Rezeptoren, deren Expression auf NK-Zellen beschränkt ist. Beim Menschen werden NKp30, NKp44 und NKp46 auf NK-Zellen exprimiert, die Expression von NKp44 wird jedoch erst nach der Stimulation mit IL-2 hochreguliert (Fuchs, *et al* 2005, Vitale, *et al* 1998). Studien haben gezeigt, dass eine Zusammenarbeit der NCR für die optimale Erkennung und Eliminierung der Zielzellen von enormer Bedeutung ist (Augugliaro, *et al* 2003, Horton and Mathew 2015).

Für NKp30 sind bis jetzt drei Liganden bekannt: HLA-B assoziiertes Transkript 3 (BAT3), was von Tumorzellen bei Stress ausgeschüttet wird und direkt an NKp30 bindet (Pogge von Strandmann, *et al* 2007), B7-H6, was auf der Oberfläche verschiedener Tumorzellen exprimiert wird (Brandt, *et al* 2009, Pesce, *et al* 2015) und pp65 Protein des humanen Zytomegalievirus (HCMV), dessen Bindung an NKp30 zur Inhibierung der Zytotoxizität führt (Arnon, *et al* 2005). Für NKp44 und NKp46 konnte gezeigt werden, dass sie an virale Hämagglutinine von Influenza und Parainfluenza binden (Mandelboim, *et al* 2001).

1.3.2.2 NKG2-Familie

NKG2 Rezeptoren, die zur C-Typ-Lektin Familie gehören, werden auf NK-Zellen und eine Subpopulation der zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺) exprimiert. Sie besitzen sowohl inhibitorische (NKG2A) als auch stimulatorische (NKG2C, -D und -E) Eigenschaften.

Bis auf NKG2D bilden alle Heterodimere mit CD94 (Lazetic, *et al* 1996). NKG2A und NKG2C binden an HLA-E Moleküle (Borrego, *et al* 1998, Braud, *et al* 1998, Finton and Strong 2012). HLA-E ist ein nicht klassisches HLA-Molekül, das die Signalpeptide der HLA-A, -B und -C präsentiert und dadurch die Expression der gesamten HLA Klasse-I Moleküle wiedergibt. HLA-A, -B und -C gehören zur HLA Klasse-I Genfamilie.

Der zytoplasmatische Teil von NKG2A trägt zwei ITIM-Motive (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*), die die inhibitorische Signalkaskade aktivieren (Houchins, *et al* 1991). Das stimulatorische Gegenstück, NKG2C, ist ein DAP12-assoziiertes Rezeptor und bindet mit niedrigerer Affinität ebenfalls an HLA-E (Vales-Gomez, *et al* 1999). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Frequenz der NKG2C⁺ NK-Zellen in HCMV-seropositiven Individuen ansteigt (Guma, *et al* 2004, Monsivais-Urenda, *et al* 2010, Wagner and Fehniger 2016).

Im Gegensatz zu NKG2A und NKG2C bildet NKG2D Homodimere, die stressinduzierte MHC Klasse-I-assoziierte Moleküle MICA/B (*Major histocompatibility complex class I chain-related*, MIC) und ULBP1-6 (*UL16 binding protein*) binden und durch die Assoziation mit DAP10 ein stimulatorisches Signal auslösen (Bauer, *et al* 1999, Cerwenka and Lanier 2003, Cosman, *et al* 2001). NKG2D wirkt als eigenständiger stimulatorischer Rezeptor und die vermittelte Aktivierung der NK-Zellen kann die gleichzeitige Inhibition durch inhibitorische Rezeptoren überwiegen (Cerwenka and Lanier 2003).

NKG2E, ein weiterer Rezeptor dieser Familie, bildet ebenfalls Heterodimere mit CD94, bleibt jedoch intrazellulär und wird nicht auf der Oberfläche exprimiert (Orbelyan, *et al* 2014).

1.3.2.3 Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren

Die Rezeptoren der KIR-Familie sind die wichtigsten Rezeptoren der NK-Zellen für die *missing self*-Erkennung und bestehen aus stimulatorischen und inhibitorischen Rezeptoren. Diese werden von *KIR*-Genen kodiert, die im Leukozyten-Rezeptor-Komplex (*leukocyte receptor complex*, LRC) auf Chromosom 19q13.4 lokalisiert sind. Bis heute sind 17 *KIR*-Gene identifiziert worden, darunter zwei Pseudogene

(KIR2DP1, KIR3DP1). Es gibt insgesamt acht inhibitorische (KIR2DL1-3, KIR2DL5A-B, KIR3DL1-3) und sechs stimulatorischen KIR (KIR2DS1-5, KIR3DS1). KIR2DL4 besitzt sowohl inhibitorische als auch stimulatorische Eigenschaften. Der Aufbau einzelner KIR unterscheidet sich in der Anzahl der extrazellulären Domänen und der Länge der zytoplasmatischen Kette. Sie können entweder zwei (KIR2D) oder drei (KIR3D) extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Domäne besitzen. Inhibitorische KIR werden mit einem „L“ (*engl. long*) in der Nomenklatur gekennzeichnet und besitzen eine lange zytoplasmatische Kette, die zwei tyrosinhaltige ITIM-Motive enthält. Diese können phosphoryliert werden und somit die inhibitorische Signalkaskade aktivieren, was zu einer schnellen Deaktivierung der NK-Zellfunktionen führt (Moretta, *et al* 2001). Stimulatorische KIR besitzen hingegen eine kurze zytoplasmatische Kette (gekennzeichnet als „S“, *engl. short*) mit einer positiv geladenen Aminosäure in der Transmembranregion, die an das Adaptermolekül DAP12 mit aktivierenden ITAM-Motiven (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) binden kann. Dadurch werden die aktivierenden Signale weitergeleitet und die NK-Zellfunktion in Gang gesetzt (Lanier 1998).

Die meisten inhibitorischen KIR erkennen die hochpolymorphen HLA Klasse-I Moleküle. Unter den drei klassischen HLA Klasse I-Proteinen HLA-A, -B und -C nimmt HLA-C eine Sonderstellung ein, da nur im Fall von HLA-C alle bekannten Allotypen auch Liganden der KIR darstellen und sich in zwei Ligandengruppen einteilen lassen: HLA-C1 und HLA-C2 lassen sich durch die Aminosäuren an Position 77 (C1: Serin, C2: Asparagin) und 80 (C1: Asparagin, C2: Lysin) definieren. Sowohl KIR2DL1 als auch KIR2DS1 besitzen HLA-C-Gruppe 2 (HLA-C2) als Ligand. HLA-C-Gruppe 1 (HLA-C1) repräsentieren die Liganden für KIR2DL3, KIR2DS2 und KIR2DL2, letzterer kann jedoch mit niedrigerer Affinität auch an HLA-C2 binden. Die stimulatorischen KIR der strukturell-homologen Rezeptorpaare KIR2DL1/S1 und KIR2DL2/L3/S2 binden an den gleichen Ligand wie inhibitorische KIR, jedoch mit einer wesentlich geringeren Affinität (Biassoni, *et al* 1995, Vales-Gomez, *et al* 2001). Bw4 wird von einem Teil der HLA-A und HLA-B Allotypen exprimiert und stellt den Liganden für KIR3DL1 dar.

Bei den *KIR*-Genen handelt es sich um ein stark polymorphes und polygenes System (Uhrberg, *et al* 1997). Aufgrund An- bzw. Abwesenheit eines *KIR*-Gens lassen sich

zwei Haplotyp-Gruppen, Haplotyp-Gruppe *A* und Haplotyp-Gruppe *B* definieren. Beide Haplotyp-Gruppen besitzen die sogenannten *framework*-Gene, KIR2DL4, KIR3DL2, KIR3DL3 und KIR3DP1, die in allen Individuen vorkommen (Uhrberg, *et al* 1997, Wilson, *et al* 2000). Haplotyp-Gruppe *A* umfasst zusätzlich zu *framework*-Genen eine begrenzte Anzahl von *KIR*-Genen mit nur einem stimulatorischen KIR, KIR2DS4, und den inhibitorischen KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1 und dem Pseudogen KIR2DP1. Die Haplotyp-Gruppe *B* ist wesentlich komplexer und beinhaltet eine variable Anzahl an *KIR*-Genen. In einem diploiden Organismus werden zwei Haplotypen zu einem Genotyp kombiniert und es entstehen dadurch homozygote *AA*-, *BB*- oder heterozygote *AB*-Individuen. Der *KIR*-Genotyp *AA* besitzt alle *KIR*-Gene der Haplotyp-Gruppe *A*. *KIR*-Genotyp *AB*-Individuen besitzen zusätzlich zu den Haplotyp *A*-Gene mindestens ein Gen der Haplotyp-Gruppe *B* und beim Genotyp *BB* fehlt mindestens ein Gen des Haplotyps *A*. Etwa 30% der kaukasischen Bevölkerung sind homozygot für *KIR*-Haplotyp *A* (Hsu, *et al* 2002, Uhrberg, *et al* 2002).

Die Expression der *KIR*-Gene wird epigenetisch reguliert. Unter Epigenetik versteht man vererbare Gen-Modifikationen, die nicht auf Veränderungen der DNA-Sequenz beruhen (Goldberg, *et al* 2007). Zu diesen Modifikationen zählt auch die DNA-Methylierung. Die Promotorregionen der *KIR*-Gene weisen eine hohe Dichte an CpG Nukleotiden auf, die sogenannten CpG-Inseln, die die Zielsequenz für DNA-Methylierung darstellen. Die Promotoren von exprimierten KIR sind demethyliert und im Gegensatz dazu die Promotoren von nicht exprimierten KIR methyliert (Santourlidis, *et al* 2002). Andere epigenetische Regulationsmechanismen, wie Veränderungen der Chromatinstruktur durch Histonmodifikationen, können ebenfalls die Expression der *KIR*-Gene beeinflussen (Santourlidis, *et al* 2008).

Die Verteilung des KIR ist klonal, was bedeutet, dass auf einzelnen Zelle verschiedene Kombinationen von KIR exprimiert werden können. Diese Kombinationen werden als KIR-Repertoire bezeichnet, welche von Zelle zu Zelle und auch in verschiedenen Individuen unterschiedlich sind (Shilling, *et al* 2002, Valiante, *et al* 1997).

1.3.3 Selbst-Toleranz der NK-Zellen

NK-Zellen tragen inhibitorische Rezeptoren, welche die Anwesenheit der HLA Klasse-I Moleküle erkennen. Da diese auf allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert werden, sind sie durch die Aktivierung der inhibitorischen Signalkaskade vor der Lyse durch die NK-Zellen geschützt. Das Ganze bedeutet, dass jede NK-Zelle mindestens einen inhibitorischen Rezeptor für körpereigenes HLA Klasse-I exprimieren muss. Dies wurde 1997 unter der „*at least one*“ Theorie zum ersten Mal beschrieben (Uhrberg, *et al* 1997, Valiante, *et al* 1997) Neue Studien haben jedoch gezeigt, dass es eine Population von NK-Zellen gibt, die keinen inhibitorischen Rezeptor für körpereigene HLA Klasse-I exprimieren (Anfossi, *et al* 2006, Fernandez, *et al* 2005). Diese Zellen besitzen einen funktionell eingeschränkten Phänotyp und sind hyporesponsiv. Die Entstehung dieser hyporesponsiven Zellen wurde anhand der Lizenzierungs-Hypothese erklärt. Diese besagt, dass die NK-Zellen für die funktionale Entwicklung neben den inhibitorischen Rezeptoren auch den entsprechenden HLA Klasse-I Liganden benötigen (Kim, *et al* 2005, Yokoyama and Kim 2006). Das bedeutet, dass die NK-Zellen erst durch den Erwerb eines inhibitorischen Rezeptors für körpereigene HLA Klasse-I Moleküle funktional reif werden. Die Lizenzierung bietet somit eine Garantie für Selbst-Toleranz und vermeidet Autoimmunreaktionen.

1.3.4 Entwicklung und Alterung von NK-Zellen

NK-Zellen entstehen im Menschen aus CD34⁺ hämatopoietischen Stammzellen (HSC). Jedoch ist die Entstehung aus lymphoiden oder myeloiden Vorläuferzellen immer noch umstritten. Während bereits gezeigt wurde, dass die NK-Zellen aus lymphoiden Vorläuferzellen (CLP) entstehen (Kondo, *et al* 1997), gibt es auch Studien über die Entstehung der NK-Zellen aus myeloiden Vorläuferzellen (CMP) (Perez, *et al* 2003).

Das Knochenmark gilt als primärer Ort für die Entstehung von NK-Zellen (Caligiuri 2008, Colucci, *et al* 2003) und das Knochenmarkstroma spielt dabei eine wichtige Rolle. Die Stromazellen exprimieren IL-15, was für die NK-Zell Entwicklung und die

Viabilität von reifen NK-Zellen entscheidend ist (Mrozek, *et al* 1996). Neben IL-15 sind weitere Differenzierungsfaktoren wie Flt-3 oder IL-7 und auch der Zellkontakt zwischen HSC und Endothelzellen in der Knochenmarknische von Bedeutung. Nach der Entstehung im Knochenmark können die NK-Zellen in verschiedene Organe wandern, um sich weiter zu differenzieren.

Im Jahr 2006 haben Freud und Caligiuri fünf aufeinanderfolgende Stadien der NK-Zelldifferenzierung in Lymphknoten identifiziert (Freud, *et al* 2006). Nach diesem Modell gelten die CD56^{dim} Zellen als ausdifferenzierte Subpopulation der NK-Zellen, die sich aus CD56^{bright} Zellen entwickeln. Mehrere Fakten unterstützen diese Hypothese: CD56^{bright} Zellen sind die erste Subpopulation, die nach einer Stammzelltransplantation im Blut erscheinen (Jacobs, *et al* 1992). Es ist auch gezeigt worden, dass die CD56^{bright} NK-Zellen längere Telomere besitzen, was ein Maßstab für durchgeführte Zellteilungen ist (Romagnani, *et al* 2007). Nur CD56^{dim} Zellen exprimieren CD57, was ein Marker für ausdifferenzierte Zellen ist. Außerdem, sind CD56^{bright} NK-Zellen in der Lage, sich *in vitro* in Kokultur mit Gelenk-Fibroblasten zu CD56^{dim} Zellen zu entwickeln (Chan, *et al* 2007).

Die CD56^{dim} NK-Zellen sind allerdings keine homogene Population und innerhalb dieser Population gibt es ebenfalls Unterschiede im Differenzierungsstatus. Während der NK-Zelldifferenzierung wird erst NKG2A, gefolgt von KIR, auf der Oberfläche exprimiert. Daher gelten NKG2A⁺KIR⁺ NK-Zellen, die während der Differenzierung NKG2A herunterreguliert haben, als terminal-differenzierte NK-Zellen (Beziat, *et al* 2010). Dabei ist KIR2DL4 der erste KIR, der in den NK-Zellen exprimiert wird, gefolgt von KIR2DL3 und KIR2DL1 (Schonberg, *et al* 2011b). Das bedeutet, dass die KIR2DL1⁺ NK-Zellen einen höheren Reifegrad aufweisen als KIR2DL3⁺ NK-Zellen.

NK-Zelldifferenzierung kann auch *in vitro* erfolgen. Miller *et al.* etablierte bereits 1999 ein System, bei dem die HSC aus Knochenmark zusammen mit murinen AFT024 Nährzellen und in Anwesenheit von Faktoren wie IL-15, IL-7, IL-3, IL-2 und Flt3-Ligand kokultiviert wurden (Miller, *et al* 1999). Durch die Verwendung der murinen embryonalen Leberzelllinie EL-08 konnte dieses System verbessert und eine höhere Frequenz von KIR⁺ NK-Zellen differenziert werden (McCullar, *et al* 2008). In unserem Labor konnte darüber hinaus ein Protokoll ohne murine akzessorische Zellen etabliert

werden, bei dem stattdessen humane mesenchymale Stammzellen (MSC) eingesetzt werden die aus Knochenmark isoliert wurden und eine Komponente der Stammzellnische darstellen (Brands 2014).

Während die Differenzierung von NK-Zellen intensiv beforscht wird, gibt es wenige Erkenntnisse über NK-Zellen im Rahmen der Alterung. Mehrere Studien zeigen, dass es während des Alterns zu einer Erhöhung der NK-Zellfrequenz kommen kann (Borrego, *et al* 1999, Camous, *et al* 2012, Solana, *et al* 2006). Andererseits gibt es eine Umverteilung der NK-Subpopulationen, so dass die Frequenz der CD56^{dim} NK-Zellen, insbesondere der ausdifferenzierten CD57⁺ NK-Zellen erhöht ist. Trotz dieser Erhöhung bleibt die Zytotoxizität der NK-Zellen im Alter unverändert (Kutza and Murasko 1996).

1.3.5 NK-Zellen und hämatologische Erkrankungen

Zahlreiche Studien haben gezeigt dass NK-Zellen eine bedeutsame Rolle bei der Kontrolle hämatologischen Tumoren spielen. Dieser Kontrollmechanismus gelingt allerdings nicht immer. Der Grund dafür kann in zweierlei Hinsichten diskutiert werden. Einerseits finden die Tumorzellen Wege, die Kontrolle des Immunsystems zu unterlaufen, was als *Immune escape* bezeichnet wird. Die Tumorzellen sind in der Lage, durch die Reduzierung der HLA Klasse-I-Expression der T-Zell-Kontrolle zu entgehen (Demanet, *et al* 2004, Verheyden, *et al* 2009). Dieser Verlust macht allerdings die Tumorzellen anfälliger gegenüber einer Lyse durch die NK-Zellen. Es gibt jedoch weitere Mechanismen, die den Tumorzellen den *immune escape* vor der NK-Zellantwort ermöglichen. In diesem Kontext ist HLA-G relevant, ein nicht-klassisches HLA Klasse-I Molekül, das als Ligand für KIR2DL4 gilt und dessen Expression auf Trophoblasten in der Plazenta während der Schwangerschaft begrenzt ist. HLA-G scheint für der Toleranz der Mutter gegenüber dem Fötus eine wichtige Rolle zu spielen. Eine erhöhte HLA-G-Expression auf leukämischen Blasten ist in Patienten mit AML (akute myeloide Leukämie) und chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) beobachtet worden (Locafaro, *et al* 2014, Maki, *et al* 2008). Allerdings wird die Bindung von KIR2DL4 an HLA-G in neuen Studien bezweifelt (Le Page, *et al*

2014, Moradi, *et al* 2015). Des Weiteren können Tumorzellen die Liganden für stimulatorische Rezeptoren, wie MICA und ULBPs (Liganden für NKG2D) herunterregulieren und dadurch die Aktivierung der NK-Zellen verhindern (Pende, *et al* 2005). Einige Tumorzellen setzen zudem lösliche MICA und ULBPs frei, die zum Beispiel durch proteolytische Abspaltung entstehen. Diese können dann die NKG2D Rezeptoren auf der NK-Zellen blockieren, was zum Ausfall des stimulatorischen Signals führt (Marcus, *et al* 2014, Salih, *et al* 2003).

Neben den *Immune escape* Mechanismen der Tumoren weisen andererseits die NK-Zellen von hämatologisch-erkrankten Patienten ausgeprägte phänotypische und funktionale Defekte auf. In AML Patienten konnte eine verminderte Expression von NKp30 und NKp46, sowie eine Hochregulierung des inhibitorischen Rezeptors NKG2A nachgewiesen werden (Baier, *et al* 2013, Costello, *et al* 2002, Fauriat, *et al* 2007, Sanchez-Correa, *et al* 2011, Stringaris, *et al* 2014). Die phänotypischen Veränderungen waren begleitet von funktionalen Defizienzen, wie einer geringen CD107-Degranulation und Zytotoxizität der NK-Zellen und ebenfalls niedrige Produktion von TNF- α und IFN- γ (Costello, *et al* 2002, Fauriat, *et al* 2007, Stringaris, *et al* 2014).

1.3.5.1 Das Myelodysplastische Syndrom

Das myelodysplastische Syndrom (MDS) umfasst eine heterogene Gruppe von erworbenen klonalen Erkrankungen der hämatopoietischen Stammzellen, die durch eine ineffektive Hämatopoiese gekennzeichnet sind. Früher wurden diese Erkrankungen auch als schleichende Leukämie oder Präleukämie bezeichnet. Der Begriff myelodysplastische Syndrome stammt aus dem Griechischen und ist eine Kombination der Worte „*myelos*“ (Knochenmark) und „*dys plasein*“ (schlecht gebildet) und beschreibt die veränderten Vorläuferzellen im Knochenmark.

MDS gehört zu den häufigsten hämatologischen Erkrankungen und tritt vorwiegend bei älteren Menschen auf (Durchschnittsalter von 70 Jahren), jedoch können auch jüngere Menschen und Kinder betroffen sein (Passmore, *et al* 1995). Die Inzidenz einer MDS-Diagnose liegt weltweit bei 4/100.000 Personen im Jahr, die mit zunehmendem

Alter stark ansteigt und in der Altersklasse über 80 Jahren 50/100.000 im Jahr erreicht (Neukirchen, *et al* 2011). Dabei sind Männer häufiger an MDS erkrankt als Frauen (Germing, *et al* 2013).

Man unterscheidet zwischen der primären und sekundären MDS, auch Therapie-assoziiertes MDS (t-MDS) genannt, die als Folge einer Chemo- oder Strahlentherapie auftritt.

In den vergangenen Jahren wurden die phänotypischen und funktionalen Merkmale der NK-Zellen in MDS-Patienten untersucht. Bereits im Jahr 1994 wurde die verminderte Zytotoxizität der NK-Zellen in MDS-Patienten beobachtet (Ogata, *et al* 1994). Diese Beobachtung wurde in den darauf folgenden Jahren von weiteren Gruppen bestätigt (Carlsten, *et al* 2010, Epling-Burnette, *et al* 2007, Gleason, *et al* 2014, Kiladjian, *et al* 2006), jedoch ist die genaue Ursache für die mangelhafte Funktion der NK-Zellen noch nicht bekannt. Epling-Burnette *et al.* konnten einen Zusammenhang zwischen der Zytotoxizität der NK-Zellen und einer verringerten Expression von NKp30 und NKG2D nachweisen (Epling-Burnette, *et al* 2007). Kiladjian *et al.* berichteten ebenfalls über eine geringe Zytotoxizität und IFN- γ Produktion, welche selbst nach IL-2 Stimulation unverändert blieb (Kiladjian, *et al* 2006). In diesen Studien wurden die NK-Zellen im PB untersucht und eine Veränderung in Frequenz der NK-Zell-Population konnte nicht beobachtet werden. Untersuchungen der NK-Zellen im Knochenmark der MDS-Patienten zeigten eine verringerte Expression von DNAM-1 und NKG2D, was mit einer erhöhten Blastenzahl assoziiert war (Carlsten, *et al* 2010).

Auf der Suche nach einer Methode zur Verbesserung der NK-Zellfunktion hat die Arbeitsgruppe von J.S. Miller aus Minnesota, vor einigen Jahren einen bispezifischen Antikörper entwickelt, der einerseits an CD16 der NK-Zellen und andererseits an CD33, exprimiert auf den myeloiden Blasten, binden kann (CD16xCD33). Dadurch konnte die Eliminierung der CD33⁺ AML-Blasten durch NK-Zellen gefördert werden (Gleason, *et al* 2012). Der Einsatz dieses Antikörpers in MDS-Patienten zeigte ebenfalls eine Steigerung der NK-Zellfunktion (Gleason, *et al* 2014). Durch die Bindung von CD16xCD33 an CD33⁺ myeloide Suppressorzellen (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSC), die in MDS-Patienten erhöht vorhanden sind und bekanntlich die

Funktion von NK-Zellen unterdrücken, konnte eine Verbesserung der NK-Zellfunktion erreicht werden (Gleason, *et al* 2014, Hoechst, *et al* 2009, Li, *et al* 2009).

1.3.5.1.1 Pathogenese

Über die Mechanismen, die zur Entstehung des MDS führen ist nach wie vor wenig bekannt. In den meisten Fällen kann ein krankheitsauslösender Faktor nicht identifiziert werden (Neukirchen, *et al* 2011) und die Krankheit gilt bis heute als idiopathisch (unbekannte Ursache). Studien über die genetischen Aberrationen in MDS haben gezeigt, dass die Abnormalität der HSC klonal ist und bis jetzt nicht vollständig geklärt ist, ob außer myeloiden Zellen noch die lymphoiden Zellen oder Stroma-Zellen im Knochenmark zu dem malignen Klon gehören. Es wird angenommen, dass die Erkrankung mehrstufig (*multistep*) verläuft (Nolte and Hofmann 2008). Der auslösende Faktor kann chemisch, genetisch (Mutationen) oder Bestrahlungs-assoziiert sein. Eine Akkumulation dieser Faktoren kann den Zellzyklus und die Transkription von Tumorsuppressoren beeinflussen und zur Expansion des malignen MDS-Klons führen (Nolte and Hofmann 2008). In frühen Stadien des MDS ist eine erhöhte Apoptose in HSC zu sehen, was mit vermehrter Expression der Rezeptoren wie Fas und TRAIL assoziiert ist (Bouscary, *et al* 1997, Kerbauy and Deeg 2007, Sloand, *et al* 2002, Zang, *et al* 2001). In dieser Phase sind sowohl die normalen als auch die abnormalen HSC aktiv und tragen beide zur Hämatopoiese bei, was eine leichte Reifungsstörung zur Folge hat. Die gesteigerte Apoptose, begleitend von Reifungsstörungen der HSC führt zu verschiedenen peripheren Zytopenien. In späteren Erkrankungsstadien ist die Apoptose vermindert, die Proliferation der HSC erhöht und der maligne Klon dominiert. So kommt es zu schwerwiegenden Reifungsstörungen, Überschuss an Blasten (unreife Zellen) und schließlich zum Übergang in eine AML.

1.3.5.1.2 Diagnose

Bei meisten MDS-Patienten sind periphere Zytopenien einer oder mehrerer Zellreihen und Dysplasie der hämatopoietischen Vorläuferzellen im Knochenmark, eventuell begleitend mit einer Vermehrung von Blasten nachweisbar. 80-90% der Patienten zeigen zum Zeitpunkt der Diagnose eine Anämie (Erythrozytopenie), 40% eine Neutropenie (Verminderung der Neutrophilen) und 45% eine Thrombozytopenie (Mangel an Thrombozyten) (Steensma and Bennett 2006). Diese Symptome können allerdings auch in anderen Erkrankungen vorkommen, so dass eine morphologische Untersuchung des Blutes und des Knochenmarks, sowie die Anfertigung eines Differenzialblutbildes für die genaue Diagnose entscheidend sind. Weisen diese Untersuchungen auf eine hämatologische Erkrankung hin, wird eine Knochenmarkprobe aus dem Beckenkamm zytologisch und histologisch untersucht. Bei etwa 50% der MDS-Patienten liegt eine chromosomale Aberration vor. Die wesentlichen Aberrationen sind ein Verlust des langen Arms des Chromosom 5 (del(5q)), Verlust der Chromosomen 5 oder 7 und Trisomie 8.

1.3.5.1.3 Klassifikation

Das erste Klassifikationssystem der MDS war die FAB-Klassifikation, die 1982 von der *French-American-British Cooperation Group* vorgeschlagen wurde. Dieses System basierte auf zytomorphologischen Kriterien, medullärem und peripheren Blastenanteil sowie der Monozytenzahl im Blut und war fast 20 Jahre lang das Standard System in der MDS-Diagnostik. Diese Klassifikation unterteilt MDS in 5 Subtypen (Tabelle 1).

Tabelle 1: FAB-Klassifikation des MDS (Bennett, et al 1982)

Subtyp	Abkürzung	Blastenanteil medullär	Blastenanteil peripher
Refraktäre Anämie	RA	< 5%	< 1%
Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten	RARS	< 5%	< 1%
Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss (<i>excess blasts</i>)	RAEB	5-20%	< 5%
Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss in Transformation	RAEB-T	20-30%	< 5%
Chronische myelomonozytische Leukämie	CMML	< 20%	< 5%

Refraktäre Anämie (RA) beschreibt eine Anämie, die nicht auf die Behandlungen mit Eisen, Folsäure oder Vitamin B₁₂ anspricht. RA unterscheidet sich von Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS) durch das Vorhandensein von mindestens 15% Ringsideroblasten im Knochenmark. Ringsideroblasten sind die Erythroblasten (Erythrozyten-Vorläuferzellen), die perinukleär angeordnete, eisenbeladene Granula enthalten, bei denen es sich um ferritinhaltige Mitochondrien handelt. Diese beiden Subtypen stellen frühe Stadien des MDS mit niedrigem Blastenanteil im Blut und im Knochenmark dar. Die mediane Überlebenszeit ist verglichen mit anderen Subtypen höher (32 Monate bei RA, 42 Monate bei RARS). Die Subtypen Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss (RAEB) und Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss in Transformation (RAEB-T) sind durch einen erhöhten Blastenanteil im Knochenmark (5-20% bei RAEB und 20-30% bei RAEB-T) gekennzeichnet und zählen zu den fortgeschrittenen Stadien des MDS. Die Lebenserwartung ist hier deutlich geringer (12

Monate bei RAEB und 5 Monate bei RAEB-T) und es besteht ein hohes Risiko zum Übergang in eine AML (44% bei RAEB und 66% bei RAEB-T). Bei der RAEB-T können sogar bereits Auerstäbchen, kleine stäbchenförmige Granula als charakteristisches Merkmal der AML, auftreten (Löffler H 2004). Der letzte definierte Subtyp in der FAB-Klassifikation ist Chronische myelomonozytische Leukämie (CMML) und beschreibt ein RAEB mit vermehrter Monozytenzahl. Die Lebenserwartung beträgt 20 Monate und eine 14%ige Wahrscheinlichkeit, eine AML zu entwickeln.

Im Laufe der Zeit zeigte sich, dass es Patienten gibt, die mit Hilfe des FAB-Systems nicht klassifiziert werden können. Im Jahr 1999 wurde ein überarbeitetes Klassifikationssystem durch eine Arbeitsgruppe der Weltgesundheitsorganisation (WHO) vorgeschlagen (Harris, *et al* 1999). Dieses berücksichtigt die Anzahl der betroffenen Zellreihen, die mikroskopischen Befunde aus Blut und Knochenmark und die chromosomalen Aberrationen (Harris, *et al* 1999). Im Jahr 2007 wurden einige Neuerungen beschlossen und so entstand eine neue Unterteilung die in Tabelle 2 dargestellt ist.

Nach der WHO-Klassifikation gilt das 5q-Syndrom als eigenständiger Subtyp. RAEB-T wurde abgeschafft und zu AML zugeordnet. Neue Subtypen wie Refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien (RCMD), unklassifizierte MDS (MDS-U) und Refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie (RCUD), welche aus RA, Refraktäre Neutropenie (RN) und Refraktäre Thrombozytopenie (RT) bestehen, sind eingeführt worden. Weiterhin werden die FAB-Subtypen RAEB und CMML in zwei Untergruppen, abhängig vom Blastenanteil im Knochenmark und im Blut, aufgeteilt.

Tabelle 2: WHO-Klassifikation des MDS (Vardiman, et al 2009)

Subtyp	Abk.	Merkmale im Blut	Merkmale im Knochenmark
5q-Syndrom	del(5q)	Uni- oder Bizytopenie <1% Blasten	normale oder vermehrte Megakaryozyten, <5% Blasten
Refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie	RCUD	Uni- oder Bizytopenie <1% Blasten	Unilineäre Dysplasien <5% Blasten
a) Refraktäre Anämie	RA	Uni- oder Bizytopenie <1% Blasten	Dyserythropoiese <5% Blasten
b) Refraktäre Thrombozytopenie	RT	Uni- oder Bizytopenie <1% Blasten	Dysmegakaryopoiese <5% Blasten
c) Refraktäre Neutropenie	RN	Uni- oder Bizytopenie <1% Blasten	Dysgranulopoiese <5% Blasten
Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten	RARS	Anämie, keine Blasten	Dyserythropoiese <5% Blasten 15% Ringsideroblasten
Refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien	RCMD	Bi- oder Panzytopenie <1% Blasten	Dysplasien in 2-3 Linien, <5% Blasten
Refraktäre Zytopenie mit Ringsideroblasten	RCMD- RS	Bi- oder Panzytopenie <1% Blasten	Dysplasien in 2-3 Linien, <5% Blasten 15% Ringsideroblasten
Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss I	RAEB I	Uni- bis Panzytopenie keine Auerstäbchen <5% Blasten	Dysplasien in 2-3 Linien, 5-9% Blasten keine Auerstäbchen
Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss II	RAEB II	Uni- bis Panzytopenie Auerstäbchen +/- 5-19% Blasten	Dysplasien in 2-3 Linien 10-19% Blasten, Auerstäbchen +/-
unklassifizierte MDS	MDS-U	Uni- bis Panzytopenie <1% Blasten	Dysplasien in <10% der Zellen mind. 1 Zellreihe, keine Auerstäbchen, <5% Blasten
chronische myelomonozytäre Leukämie I	CMML I	Uni- bis Panzytopenie <5% Blasten >1*10 ³ Monozyten / µL	Dysplasien in 1-3 Linien oder genet. oder mol. Klonalitätsbefund, <10% Blasten
Chronische myelomonozytäre Leukämie II	CMML II	Uni- bis Panzytopenie 5-9% Blasten >1*10 ³ Monozyten / µL	Dysplasien in 1-3 Linien oder genet. oder mol. Klonalitätsbefund, 10-19% Blasten
Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten mit Thrombozytose	RARS-T	Anämie, Thrombozytose, keine Blasten	Dyserythropoiese <5% Blasten 15% Ringsideroblasten

1.3.5.1.4 Prognose

Unter Berücksichtigung verschiedener klinischer, morphologischer und zytogenetischer Parameter, wie Blastenanteil im Blut und Knochenmark, Ausmaß der Dysplasien und Karyotyp, werden die Patienten Risikogruppen zugeteilt. Das internationale Prognosesystem (*International Prognostic Scoring System*, IPSS) gehört zu den meist genutzten Systemen. Hierbei werden drei Risikomerkmale in der Bewertung berücksichtigt, was zu einer Verteilung auf vier Risikogruppen führt (siehe Tabelle 3, Tabelle 4).

Tabelle 3: Berechnungsgrundlagen des IPSS

Score	0	0,5	1	1,5	2
% Blasten im Knochenmark	0-4	5-10	-	11-20	21-29
Anzahl der Zytopenien	0-1	2-3	0	-	-
Zytogenetische Risikogruppe	gut	intermediär	schlecht	-	-

Tabelle 4: Risikogruppen nach IPSS (Greenberg, et al 1997)

Score	Risikogruppe	mediane Überlebenszeit	Zeit bis AML-Entwicklung
0	Niedrigrisiko (<i>low</i>)	68 Monate	113 Monate
0,5-1	Intermediäres Risiko I (Int1)	42 Monate	40 Monate
1,5-2	Intermediäres Risiko II (Int2)	14 Monate	13 Monate
≥ 2,5	Hochrisiko (<i>high</i>)	5 Monate	2 Monate

Aus therapeutischer Sicht werden die Risikogruppen „niedrig“ und „intermediär I“ als niedrigrisiko-MDS und „intermediär II“ und „hoch“ als hochrisiko-MDS bezeichnet.

1.3.5.1.5 Therapie

Die Behandlung des MDS hängt von viele Faktoren wie Risikogruppe, Patientenalter und klinischem Zustand ab. Bei Niedrigrisiko-MDS ist die Anämie die häufigste Therapieindikation. Das Ziel der Therapie ist die Aufrechterhaltung der Lebensqualität, die sich auf unterstützende Maßnahmen wie Transfusionen von Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten konzentriert. Bei Patienten mit hohem Transfusionsbedarf steigt der Eisengehalt im Körper an und kann zur Beeinträchtigung vieler Organfunktionen führen. Daher müssen diese Patienten Medikamente bekommen, die das Eisen binden und über die Niere ausscheiden lassen (Eisenchelatoren). Die Anwendung verschiedener hämatopoietischer Wachstumsfaktoren wie G-CSF und des Erythropoiese-stimulierenden-Faktors Erythropoietin (Epo) haben sich in den letzten Jahren durchgesetzt und stellen mittlerweile Routinemaßnahmen zur Behandlung von Niedrigrisiko-MDS dar. Diese Faktoren stimulieren die gesunden Stammzellen im Knochenmark, was zur Produktion von reifen Blutzellen führt. Der Einsatz immunmodulatorischer Substanzen, wie Lenalidomid, ist eine alternative Therapiemöglichkeit.

Bei hochrisiko-MDS gilt die allogene Stammzelltransplantation (SZT) als einzig kuratives Therapieverfahren. Dabei handelt es sich um die Übertragung der Stammzellen aus Knochenmark, Nabelschnurblut oder PB (Apheresat) von einem gesunden Spender in den Patient. Bei Patienten, die für eine allogene SZT nicht in Frage kommen, existieren alternative Therapieformen wie Chemotherapie oder Zugabe von DNA-Methyltransferase Inhibitoren wie 5-Azacytidin oder einem Histon-deacetylase-Inhibitor (HDACi) (Cameron, *et al* 1999, Christman 2002, Raj and Mufti 2006).

1.4 Ziele der Arbeit

MDS sind eine Reihe hämatologischer Erkrankungen, die durch ineffektive Hämatopoese in einer oder mehreren myeloiden Linien gekennzeichnet werden. Die NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Eliminierung von entarteten Blutzellen. Es ist bekannt, dass die NK-Zellen in MDS-Patienten funktional beeinträchtigt sind, jedoch sind die biologischen Mechanismen, die diesen Veränderungen zugrunde liegen, bleiben weiterhin unklar. Im Rahmen dieser Arbeit sollen die phänotypische und funktionale Charakteristik der NK-Zellen in MDS-Patienten und altersgleichen gesunden Spendern untersucht werden. Dabei soll die NK-Zellfunktion durch Analysen der zytotoxischen Moleküle Perforin und Granzym B innerhalb der Granula in Kombination mit einem CD107-Degranulationsassay, einem Zytotoxizitätsassay und der intrazellulären IFN- γ Produktion bestimmt werden. Diese funktionalen Analysen sollen mittels Durchflusszytometrie mit der Expression verschiedener NK-Zellrezeptoren korreliert werden. Zusätzlich soll anhand der im Labor bereits etablierten Methode der *in vitro* NK-Zelldifferenzierung aus hämatopoietischen Vorläuferzellen untersucht werden, ob sich die CD34⁺ HSC von MDS-Patienten *in vitro*, in Gegenwart von Zytokinen und Stromazellen, zu NK-Zellen entwickeln lassen. Zum Schluss soll mittels FISH-Analysen bestimmt werden, ob neben den myeloiden Linien auch lymphoide Linien, im speziellen die NK-Zellen der MDS-Patienten, Teil des malignen Klons sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Antikörper	Konjug	Klon	Isotyp	Firma
CD3	APC-	UCHT1	IgG1	Biolegend
	ECD	UCHT1	IgG1	Beckman Coulter
	PE-Cy5	UCHT1	IgG1	Beckman Coulter
	PE-Cy5	UCHT1	IgG1	Biolegend
	PE-Cy7	UCHT1	IgG1	Biolegend
CD16	FITC	3G8	IgG1	Biolegend
	PE	3G8	IgG1	Beckman Coulter
CD19	FITC	HIB19	IgG1	Biolegend
CD34	PE	581	IgG1	Beckman Coulter
CD38	PE-Cy5	LS198-4-3	IgG1	Beckman Coulter
CD56	APC	N901	IgG1	Beckman Coulter
	PE	N901	IgG1	Beckman Coulter
	PE-Cy5	N901	IgG1	Beckman Coulter
	PE-Cy7	HCD56	IgG1	Biolegend
	PE-	REA-196	IgG1	Miltenyi Biotech
CD57	FITC	HCD57	IgM	Biolegend
CD62L	PE-	DREG56	IgG1	Beckman Coulter
CD107	FITC	H4A3	IgG1	BD Pharmingen
	PE-Cy5	H4A3	IgG1	BD Pharmingen
CD158a,h (KIR2DL1/S1)	FITC	HP-MA4	IgG1	Biolegend
	PE	EB6B	IgG1	Beckman Coulter

CD158b1,b2,j (KIR2DL2/3/S2)	PE-Cy5	GL183	IgG1	Beckman Coulter
	PE-Cy7	GL183	IgG1	Beckman Coulter
CD158e1,e2 (KIR3DL1/S1)	FITC	Z27	IgG1	Beckman Coulter
	APC	Z27	IgG1	Beckman Coulter
CD158e1	FITC	DX9	IgG1	Biolegend
CD159a (NKG2A)	PE	Z199	IgG2b	Beckman Coulter
CD314 (NKG2D)	PE	1D11	IgG1	Biolegend
CD337 (NKp30)	PE	Z25	IgG1	Beckman Coulter
Granzym B	FITC	GB11	IgG1	Biolegend
IFN- γ	FITC	B27	IgG1	Biolegend
<i>Lineage cocktail 1</i>	FITC	CD3, Klon SK7 CD16, Klon 3G8 CD19, Klon SJ25C1 CD20, Klon L27 CD14, Klon M ϕ P9 CD56, Klon NCAM16.2		BD Pharmingen
Perforin	PE	dG9	IgG2b	Biolegend

2.1.2 Chemikalien

Produktgruppe	Produkt	Firma
DNA Isolation, PCR, Gelelektrophorese	Agarose	Peqlab
	Aqua dest	fischar/Braun
	Borsäure	Roth
	DNA Leiter, 100 bp	Invitrogen
	dNTPs	Peqlab
	EDTA	Roth
	Ethanol 70%	Roth
	Ethidiumbromid	Roth
	HotstarTaq DNA-Polymerase	Qiagen
	Ladepuffer (10x)	Thermo scientific

	Polymerase-Puffer (10x)	Qiagen	
	Tris-Base	Roth	
Antikörpermarkierung	Albumin Fraktion V, proteasefrei	Roth	
	DPBS	Lonza	
	<i>Fixation Solution</i>	Biolegend	
	humanes Albumin	octapharma	
	<i>Intracellular Staining Perm Wash</i>	Biolegend	
	Propidium Iodid	Biolegend	
	Zellkultur	Ascorbinsäure (20 mg/ml)	Sigma-Aldrich
Biocoll Separating Solution		Merck Millipore	
DMEM 4,5g/l D-Glucose		Gibco	
DMSO		Santa Cruz	
Ethanolamin (50µM)		Sigma-Aldrich	
Fötale Bovines Serum (FBS)		Merck	
HAM's F12		Merck	
humanes AB Serum "off the clot"		Merck	
L-Glutamin		Gibco/Thermo Fisher Scientific	
Lyse-Puffer (isotone Ammoniumchlorid Lösung)		UKD	
Monensin (GolgiStop)		BD	
Penicillin/Streptomycin		Gibco	
RPMI 1640		Lonza	
Sodium-Selenit (50µg/l)		Sigma-Aldrich	
β-Mercaptoethanol (24 µM)		Gibco	
Trypsin 0,5%		Gibco	
Zytokine		Flt-3	Miltenyi Biotec
		IL-2 (Proleukin)	Novartis
		IL-3	Miltenyi
		IL-7	Miltenyi
	IL-15	Miltenyi	
	SCF	Miltenyi	

2.1.3 Medien und Puffer

Medium	Zusammensetzung
Standardmedium	RPMI 1640
	10% FBS
	1% Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml/10.000 µg/ml)
Einfriermedium	45% Standardmedium
	45% FBS
	10% DMSO
NK-Medium	Standardmedium
	5% Humanes AB Serum (hitzeinaktiviert)
	1000 U/ml IL-2
K562-Medium	DMEM (4,5g/l D-Glucose)
	10% FBS
	1% Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml/10.000 µg/ml)
NK1-Medium (bis Tag 7)	27,5 ml DMEM (4,5g/l D-Glucose)
	12,5 ml HAM's F12
	10 ml Humanes AB Serum
	50 µmol/ml Ethanolamin
	50 µg/ml Natriumselenit
	24 µM β-Mercaptoethanol
	500 µl Penicillin/Streptomycin
	1000 U/ml IL-2
	5 ng/ml IL-3
	20 ng/ml IL-7
	10 ng/ml Flt3-Ligand
20 ng/ml SCF	
NK2-Medium (ab Tag 7)	30 ml DMEM (4,5g/l D-Glucose)
	15 ml HAM's F12

	5 ml Humanes AB Serum
	50 µmol/ml Ethanolamin
	50 µg/ml Natriumselenit
	24 µM β-Mercaptoethanol
	500 µl Penicilin/Streptomycin
	1000 U/ml IL-2
	10 ng/ml IL-15
	20 ng/ml IL-7
	10 ng/ml Flt3-Ligand
	20 ng/ml SCF
Färbepuffer für Durchflusszytometrie	500 ml DPBS
	2 mM EDTA
	0,5% BSA (Albumin Fraktion V)
MACS Puffer	500 ml DPBS
	2 mM EDTA
	5 ml Humanes Albumin
TBE-Puffer	107,8 g Tris-Base
	55 g Borsäure
	8,2 g EDTA
	1 L Aqua dest.

2.1.4 Kits

Kit	Firma
FITC Annexin V Apoptose Kit mit 7-AAD	Biolegend
CD3 MicroBeads, human	Miltenyi
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen
Vybrant® CFDA SE Cell Tracer Kit	Thermo Fisher Scientific

2.1.5 Primer

Primer für die KIR-Typisierung nach (Ordonez, *et al* 2012)

KIR	Sense	Antisense	Länge
KIR2DL1	GTTGGTCAGATGTCATGTTTGAA	CCTGCCAGGTCTTGCG	142
KIR2DL2	AAACCTTCTCTCTCAGCCCA	GCCCTGCAGAGAACCTACA	142
KIR2DL3	AGACCCTCAGGAGGTGA	CAGGAGACAACCTTTGGATCA	156
KIR2DL5	ATCTATCCAGGGAGGGGAG	CATAGGGTGAGTCATGGAG	147
KIR3DL1	CCATyGGTCCCATGATGCT	CCACGATGTCCAGGGGA	108/109
	TCCATCGGTCCCATGATGTT		
KIR3DL2	CATGAACGTAGGCTCCG	GACCACACGCAGGGCAG	131
KIR2DS1	TCTCCATCAGTCGCATGAG	GGTCACTGGGAGCTGAC	96
	TCTCCATCAGTCGCATGAA		
KIR2DS2	TGCACAGAGAGGGGAAGTA	CCCTGCAAGGTCTTGCA	110
KIR2DS3	CTTGTCTGCAGCTCCT	GCATCTGTAGGTTCTCCT	158
KIR2DS4	GGTTCAGGCAGGAGAGAAT	CTGGAATGTTCCGtKATG	133/111
KIR2DS5	AGAGAGGGGACGTTTAACC	CTGATAGGGGGAGTGAGT	147
KIR3DS1	CATCGGTTCCATGATGCG	CCACGATGTCCAGGGGA	107
	CATCAGTTCCATGATGCG		

2.1.6 Geräte

Gerät	Firma
Binokular Mikroskop	Zeiss
Bestrahlungsgerät RS225	GULMAY Incorporated
Brutschrank	Binder
Cell Dyn 3500R	Abbott Laboratories
Durchflusszytometer Canto I	BD
Durchflusszytometer CyAn ADP	Beckman Coulter

Sorter MoFlo XDP	Beckman Coulter
Thermocycler GeneAmp PCR System	Applied Biosystems

2.1.7 Software

Programm	Firma
BD FACS Diva	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Endnote X7	Thomson Reuters, USA
GraphPad Prism 5	Graphpad Software, USA
Kaluza Analysis Software 1.5a	Beckman Coulter, Krefeld, Detuschland
Microsoft Office 2013	Microsoft Deutschland GmbH, Stuttgart, Detuschland
Summit	Beckman Coulter, Krefeld, Detuschland

2.1.8 Zellen

Zellen		Ursprung
Primäre Zellen	PBMC von MDS-Patienten	
	PBMC von altersgleichen gesunden Spendern	
	PBMC aus „ <i>buffy coat</i> “	
Zelllinien	K562	Blut einer Patientin mit chronischer myeloider Leukämie
	EL-08	Murine Embryonale Leberzelllinie
	MSC	Pädiatrische mesenchymale Stammzellen

Die Blut-Proben der MDS-Patienten wurden von der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinischer Immunologie der Uniklinik Düsseldorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Rainer Haas bereitgestellt. Die Blut-Proben von altersgleichen gesunden Spendern wurden von freiwilligen Spendern zur Verfügung gestellt. *Buffy coats* wurden von DRK Blutspendedienst BaWü Hessen und teilweise von der Blutbank der Uniklinik Düsseldorf bereitgestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut

Die mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMCs) von Patienten und gesunden Spendern wurden spätestens 24 Stunden nach der Blutentnahme mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert.

Zunächst wurde das Blut im Verhältnis 1:2 mit PBS-EDTA verdünnt, langsam in einem 50 ml Röhrchen auf 15 ml Ficoll geschichtet und für 20 min bei 900 g ohne Bremse und 21°C zentrifugiert. Ficoll besitzt eine größere Dichte (1,077 g/ml) als Lymphozyten und Monozyten und eine geringere Dichte als Erythrozyten und Granulozyten. Nach der Zentrifugation besteht die oberste Schicht aus Blutplasma und Thrombozyten. Zwischen der obersten Schicht und der Ficoll-Schicht befindet sich eine weiße Interphase bestehend aus Lymphozyten und Monozyten. Die Erythrozyten und Granulozyten bilden das Pellet. Die Interphase wurde vorsichtig abgenommen und zwei Mal mit PBS gewaschen (10 min, 300 g, 4°C).

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Aus der Zellsuspension wurden 20 µl abgenommen und im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt. Aus dieser Mischung wurden 20 µl in eine Neubauerzählkammer

pipettiert und am Lichtmikroskop gezählt. Trypanblau kann die permeable Membran toter Zellen durchdringen und sie blau färben. Gezählt wurden die lebenden Zellen in allen vier großen Quadraten. Die Zellzahl wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{mittlere Zahl pro Quadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.2.3 Einfrieren von Zellen

PBMC von Patienten und gesunden Spendern wurden direkt nach der Isolation eingefroren. Dafür wurden die Zellen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt. DMSO verhindert die Kristallbildung während des Einfrierprozesses, da dies die Zellen mechanisch zerstören würde. Die toxischen Eigenschaften von DMSO erfordern zügiges Arbeiten mit vorgekühlten Medien.

Die Zellen wurden in einer Konzentration von maximal $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml in kaltem Einfriermedium ohne DMSO aufgenommen. Je 500 μl der Zellsuspension wurden in Einfrierröhrchen überführt und mit 500 μl Einfriermedium mit 20% DMSO versetzt. Dadurch ergab sich eine Endkonzentration von 10% DMSO. Die Einfrierröhrchen wurden zwei Tage bei -80°C gelagert und anschließend zur dauerhaften Lagerung in -196°C flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.4 Auftauen von Zellen

Auch beim Auftauen von Zellen ist rasches Arbeitstempo erforderlich um den toxischen Effekt des DMSO auf die Zellen zu minimieren.

Ein 15 ml Röhrchen aufgefüllt mit FBS-haltigem Standardmedium wurde bereitgestellt. Einfrierröhrchen wurden im 37°C warmen Wasserbad erwärmt und vor dem vollständigen Auftauen (Eisklumpen war noch zu sehen) in das vorbereitete Röhrchen überführt. Dann wurde die Zellsuspension bei 4°C , 300 g für 10 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden ein zweites Mal mit PBS gewaschen und das Pellet wurde anschließend in dem gewünschten Medium/Puffer resuspendiert.

2.2.5 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können verschiedene Eigenschaften von Zellen wie Granularität und Größe, aber auch vor allem Fluoreszenzeigenschaften bestimmt werden. Dafür müssen die Zellen mit Antikörpern markiert werden, die mit einem Fluorophor gekoppelt sind. Bei der Messung werden die Zellen vereinzelt durch eine Kapillare gesaugt und passieren Laser mit verschiedenen Anregungswellenlängen, die die antikörpergekoppelte Fluorophore anregen. Die von den Fluorophoren aufgenommene Energie wird in Form von Licht definierter Wellenlänge emittiert und von Detektoren gemessen. Zusätzlich zu den Fluoreszenzen wird das Streulicht detektiert. Das Vorwärtsstreulicht ist ein Maß für die Größe und das Seitwärtsstreulicht bestimmt die Granularität der Zelle.

2.2.5.1 Extrazelluläre Antikörperfärbung

$2 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden in 200 μ l Färbepuffer aufgenommen und in einem Polypropylen-Rundbodenröhrchen überführt. Die Antikörper für die Oberflächenproteine wurden hinzugegeben und für 20 min bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Färbepuffer gewaschen (10 min, 300g, 4°C) und durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.5.2 Intrazelluläre Antikörperfärbung

Die extrazelluläre Färbung der Oberflächenproteine wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (siehe 2.2.5.1). Als nächstes wurden die Zellen mit *Fixation Buffer* versetzt und für 20 min bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen mit *Intracellular Staining Perm Wash* (1x, mit destilliertem Wasser verdünnt) wurden die Antikörper für intrazelluläre Proteine zugegeben und 30 min bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Die Zellen wurden anschließend einmal mit *Intracellular Staining Perm Wash* (1x) und einmal mit PBS gewaschen (300g, 7 min, 4°C).

2.2.6 Funktionale Analyse der NK-Zellen

2.2.6.1 CD107a-Degranulationsassay

CD107a (LAMP-1, Lysosomen assoziiertes Membran-Protein 1) ist ein Marker für die Aktivität der NK-Zellen, der sich in ruhenden Zellen auf der Innenseite der Granula befindet. Die Stimulation der NK-Zelle durch eine Zielzelle verursacht eine Verschmelzung der Granula mit der Plasmamembran, woraufhin die CD107a Moleküle auf die Zelloberfläche gelangen, wo sie mit spezifischen Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch analysiert werden können.

Für den Assay wurden die PBMC 16 Std. in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ /ml in NK-Medium (siehe 2.1.3) kultiviert. Als Zielzelle wurde die HLA-Klasse I-negative K562 Zelllinie verwendet. Die PBMC und K562 Zellen wurden geerntet und deren Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden jeweils in einer Konzentration von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml in NK-Medium aufgenommen. Anschließend wurden sie zusammen im Verhältnis 10:1 in ein *Well* einer 96-wellplatte (Rundboden) mit bereits vorpipetiertem Antikörper gegen CD107, kultiviert ($1 \cdot 10^7$ PBMC + $1 \cdot 10^6$ K562). In einem weiteren *Well* wurden PBMC ohne Zielzellen pipetiert, um die spontane (zielzellunspezifische) Degranulation der NK-Zellen zu messen. Nach einer Stunde Inkubation (37°C, 5% CO₂) wurde Monensin zugegeben. Monensin blockiert den Golgi-Proteintransport und verhindert dadurch die Wiederinternalisierung der CD107 Moleküle. Nach weiteren fünf Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet, mit weiteren Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Siehe 2.2.5.1 und 2.2.5.2).

2.2.6.2 CFSE-Zytotoxizitätsassay

Mit diesem Assay kann bestimmt werden, wie effizient die NK-Zellen ihre Zielzellen abtöten können. Zuerst wurden die HLA-Klasse I negativen K562 Zellen (Zielzellen) mit CFDA-SE (*Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) 15 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS + 20% FBS gewaschen

(300g, 7 min, 21°C) und mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml in NK-Medium aufgenommen. CFDA-SE wird dabei von den Zellen aufgenommen und dort von intrazellulären Esterasen zu fluoreszierendem CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*) prozessiert. Die mit IL-2 stimulierten PBMCs (16 Std. Inkubation in NK-Medium) wurden geerntet, gezählt und ebenfalls mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml in NK-Medium resuspendiert. Anschließend wurden die PBMCs und K562 Zellen im Verhältnis 10:1 ($1 \cdot 10^7$ PBMC + $1 \cdot 10^6$ K562) in ein *Well* einer 96-wellplatte (Rundboden) für fünf Stunden bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellen geerntet, mit PBS gewaschen (300g, 7 min, 21°C) und mit Propidium Iodid (PI) versetzt. Propidium Iodid ist ein fluoreszierender DNA-Farbstoff, der die perforierte Membran toter Zellen durchdringen kann. Im Durchflusszytometer wurde die Frequenz der CFSE⁺PI⁺ Zellen bestimmt. Diese Zellen stellen K562 Zellen dar, die während des Assays getötet wurden. Um die spontane Lyse der K562 zu bestimmen wurden die K562 Zellen ohne PBMC kultiviert. Die spezifische Lyse wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{spezifische Lyse (\%)} = \text{experimentelle Lyse} - \text{spontane Lyse}$$

2.2.6.3 IFN- γ Produktion

Dieses Assay diente dem Nachweis von IFN- γ , welches nach der Inkubation mit K562 Zellen in den NK-Zellen (IL-2 stimuliert) produziert wird und intrazellulär detektiert werden kann. Der Assay wurde wie der bereits beschriebene CD107-Degranulationsassay (2.2.6.1) durchgeführt. Anstatt Monensin wurde Brefeldin A zugegeben. Brefeldin A inhibiert die Protein-Sekretion zwischen dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi Apparat. Nach weiteren fünf Stunden Inkubation wurde eine extrazelluläre Färbung der Oberflächenmarker und anschließend intrazelluläre Färbung mit Antikörper gegen IFN- γ durchgeführt.

2.2.7 Zellsortierung

2.2.7.1 Magnetische Zellsortierung

Die MACS Technologie (*Magnetic Activated Cell Sorting*) ist eine Methode zur Isolierung von bestimmten Zellpopulationen aus einem Zellgemisch, die von der Firma Miltenyi Biotec entwickelt worden ist. Dafür werden die MACS *Microbeads* und ferromagnetische Trennsäulen benötigt. Bei den *Microbeads* handelt es sich um kleine magnetische Kügelchen, die an monoklonale Antikörper gebunden sind. So werden die Zellen, die einen bestimmten Marker auf der Oberfläche aufweisen, magnetisch markiert. Bei der Übertragung des Zellgemischs auf die Trennsäule bleiben die markierten Zellen in der Säule, während die unmarkierten Zellen die Säule passieren. Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten der Trennung: die Positivselektion, bei der die gewünschten Zellen mit den *Microbeads* markiert werden und Negativselektion oder auch Depletion, wo die markierten Zellen in der Säule zurückgehalten werden und die aufgereinigten, unmarkierten Zellen von Interesse die Säule passieren.

In dieser Arbeit wurden CD3-*Microbeads* verwendet, um die T-Zellen aus der PBMC zu entfernen. Bis zu $1 \cdot 10^7$ Zellen wurden in 80 μl MACS-Puffer aufgenommen, 20 μl CD3 *Microbeads* zugegeben und für 15 Min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen (300g, 7 min, 4°C), in 500 μl Puffer aufgenommen und auf der Trennsäule (im magnetischen Feld) gegeben. Durchgelaufene Zellen (Eluat) wurden in einem Röhrchen aufgesammelt, gezählt und deren Reinheit durchflusszytometrisch gemessen.

2.2.7.2 Durchflusszytometrische Zellsortierung

Die Sortierung der Zellen basiert auf der gleichen Technik wie die durchflusszytometrische Analyse, mit dem Unterschied, dass nach der Messung die Zellen in einem Röhrchen aufgefangen werden. In dieser Arbeit wurde ein MoFlo XDP

Zellsortierer der Firma Beckman Coulter verwendet. Die Zellen wurden, wie in 2.2.5 beschrieben, mit Antikörpern gefärbt und die gewünschten Zellen sortiert.

2.2.8 Apoptose Analysen

Diese Methode ermöglicht die Färbung apoptotischer Zellen durch die Verwendung des mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Annexin V und anschließender durchflusszytometrischer Analyse. Annexin V bindet an Phosphatidylserine (PS), die normalerweise auf der Innenseite der Membran lokalisiert sind und während der Apoptose auf die Außenseite transportiert werden. Werden die Zellen nekrotisch und ihre Zellmembran durchlässig, kann Annexin V in die Zelle eindringen und an der Innenseite der Membran binden. Daher können bei alleiniger Färbung mit Annexin V die apoptotischen nicht von den nekrotischen Zellen unterschieden werden. Man kombiniert daher die Annexin V-Markierung mit einer 7-AAD-Färbung. 7-AAD kann die DNA toter Zellen färben. Apoptotische Zellen sind daher Annexin V-positiv und 7-AAD-negativ, während die bereits nekrotischen Zellen positiv für beide Parameter sind.

Kryokonservierte PBMC von MDS-Patienten und altersgleichen gesunden Spendern wurden aufgetaut. Die Zellen wurden in einer Konzentration von $0,2-1 \cdot 10^7$ Zellen/ml in *Annexin V binding Buffer* resuspendiert, jeweils 5 μ l Annexin V-FITC und 7-AAD zugegeben und für 15 min in RT und im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde 400 μ l *binding Buffer* zu jedem Röhrchen gegeben und durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.9 Expansion der NK-Zellen

Die gefrorenen PBMC von Patienten und gesunden Spendern wurden aufgetaut. T-Zellen wurden mittels *CD3-Microbeads* (magnetische Zellsortierung, 2.2.7.1) aus der Zellsuspension entfernt, um ein späteres Wachstum dieser Zellen in der Kultur zu vermeiden. Nach der Depletion wurden die restlichen Zellen in NK-Medium aufgenommen.

Als Feeder-Zellen wurden die PBMCs aus drei verschiedenen *Buffy Coats* und die Zelllinie K562 verwendet. Bei einem *Buffy Coat* handelt es sich um eine konzentrierte Leukozyten-Suspension, die entsteht, wenn man Blut mit Gerinnungshemmern versetzt und abzentrifugiert. Aus den *Buffy Coats* wurden die PBMCs anhand der Dichtegradientenzentrifugation isoliert und gemischt. Die auf diese Weise entstandene Zellmischung wurde ebenso wie die K562-Zellen mit Röntgenstrahlung bestrahlt (15 Gy für PBMC, 40 Gy für K562). Die bestrahlten PBMC und K562, sowie T-Zell-depletierten Zellen wurden in folgendem Verhältnis zusammen gemischt:

$1 \cdot 10^6$ bestrahlte PBMC + $1 \cdot 10^5$ bestrahlte K562 + $1 \cdot 10^5$ T-Zell-depletierte Zellen in 1 ml NK-Medium in einem *well* einer 24-*Well*-Platte.

Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Am Tag 7 wurden alle Zellen geerntet, gezählt und durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.10 Generierung der NK-Zellen

Vor Beginn einer NK-Zellgenerierung wurden 24-*Well*-Platten mit 0,2%iger Gelatinelösung beschichtet und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Gelatinelösung abgenommen und die Platten mit offenem Deckel zum Trocknen unter der Sterilbank stehen gelassen. Pro *Well* wurden 40.000 EL-08 Zellen ausgesät. Die Platten waren nach ca. zwei Tagen konfluent bewachsen und wurden mit Röntgenstrahlung (15 Gy) am Gulmay RS225 bestrahlt.

Die aufgereinigten CD34⁺ HSC aus dem Knochenmark von MDS-Patienten und altersgleichen gesunden Spendern wurden freundlicherweise vom Forschungslabor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie der Uniklinik Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 50.000 Zellen/ml in NK1 Medium aufgenommen und pro *Well* 1 ml pipettiert. Nach einer Woche wurde das NK1 Medium durch NK2 Medium ersetzt, im weiteren Verlauf der Generierung wurde das NK2 Medium regelmäßig gewechselt. Jede Woche wurde mit einem Teil der Zellen eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt, um den

Verlauf der Generierung zu dokumentieren. In der Regel dauerte eine Generierung 5-6 Wochen, wobei CD56 frühestens ab der zweiten Woche nachweisbar war. Am Ende der Generierungskultur wurden die Zellen geerntet und anschließend mit Antikörpern gefärbt. In einigen Experimenten wurden pädiatrischen MSC als *Feeder*-Zellen vorbereitet. Der Vorbereitungsablauf der beschichteten Platten ähnelte denen mit EL-08 Zellen.

2.2.11 DNA-Isolation aus Vollblut

Die DNA-Isolierung aus Blut wurde mit dem Qiaamp DNA Blood Kit von Qiagen entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die Konzentration der isolierten DNA wurde mit am Spektrophotometer gemessen.

2.2.12 KIR-Typisierung

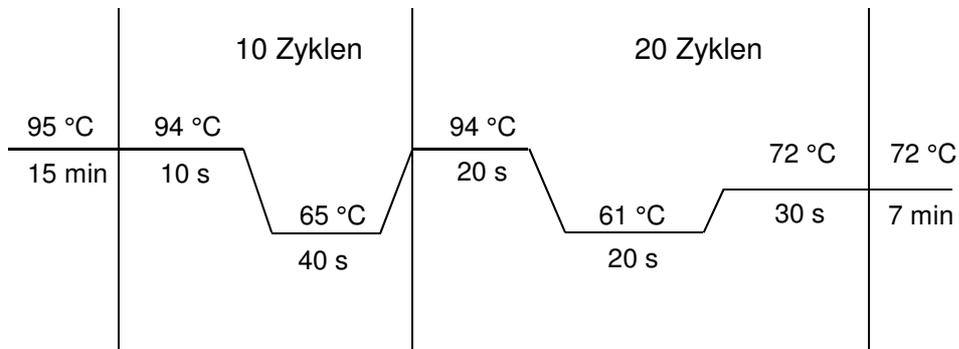
Die KIR-Gene zeigen untereinander eine hohe Homologie. Aufgrund dieser Homologie ist ein sorgfältiges Primer-Design für die Typisierung von großer Bedeutung. In Abschnitt 2.1.5 sind die verwendete Primer aufgelistet (Ordonez, *et al* 2012).

Für die PCR wurde die HotstarTaq-Polymerase verwendet, die erst nach der Initiation bei 95°C aktiviert wird. Alle PCR-Reaktionen wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt.

PCR-Ansatz:

PCR-Puffer (10x)	1 µl
dNTPs (10nmol/µl)	0,3 µl
3'-Primer	2 µl
5'-Primer	2 µl
HotStar Taq DNA-Polymerase	0,1 µl
DNA (40-50 ng)	2 µl
Aqua dest.	Auf 10 µl auffüllen

Die KIR-Typisierung wurde mit folgendem Programm durchgeführt:



Die 40 häufigsten KIR-Genotypen innerhalb der kaukasoiden Population in der folgenden Tabelle aufgeführt (Uhrberg, *et al* 2002).

Haplotyp	Ganotyp	2DL1	2DL2	2DL3	2DL5	3DL1	3DL2	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1
AA	1	x		x		x	x				x		
AB	2	x	x	x		x	x		x		x		
AB	3	x	x	x	x	x	x		x	x	x		
AB	4	x		x	x	x	x	x			x	x	x
BB	5	x	x		x	x	x		x	x	x		
AB	6	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
AB	7	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
AB	8	x	x	x	x	x	x		x		x		
BB	9	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
BB	10		x			x	x		x		x		
AB	11	x		x	x	x	x	x		x	x		x
AB	12	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x
AB	13	x	x	x	x	x	x	x	x		x		x
AB	14	x		x	x	x	x	x			x		x
AB	15	x	x	x		x	x				x		

BB	16		X	X		X	X		X		X		
BB	17	X	X		X	X	X	X	X		X	X	X
BB	18	X	X		X	X	X	X	X	X	X		X
AB	19	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
AB	20	X		X		X	X	X			X		
BB	21	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X
AB	22	X	X	X	X	X	X	X	X		X		
BB	23		X		X	X	X	X	X		X	X	X
BB	24	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X
BB	25	X	X		X		X	X	X	X		X	X
AB	26	X		X	X	X	X	X			X	X	
AB	27	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	
BB	28	X	X		X	X	X		X		X		
AB	29	X		X	X	X	X	X	X		X		X
BB	30	X	X	X	X		X	X	X	X		X	X
AB	31	X		X	X	X	X		X	X	X		
BB	32	X	X		X	X	X		X	X	X	X	
BB	33		X	X	X	X	X	X	X	X	X		
AB	34	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	
BB	35	X	X	X	X		X	X	X	X			X
AB	36	X		X	X	X	X				X		
AB	37	X		X	X	X	X			X	X		
BB	38	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
BB	39	X	X	X		X	X	X	X	X		X	
BB	40		X	X		X	X	X	X		X		

2.2.13 Gelelektrophorese

Die Produkte der PCR wurden mittels Elektrophorese in einem Agarosegel aufgetrennt. Es wurden Agarosegele mit 2% Agarosegehalt verwendet. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid versetzt. Die PCR-Produkte wurden mit Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für eine Stunde bei 180 V. Mit Hilfe des Ethidiumbromids konnten die DNA-Fragmente im UV-Licht (Geldokumentationsgerät) sichtbar gemacht werden.

2.2.14 FISH-Analysen

Die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) ist eine Methode, um Nukleinsäure-Sequenzen, wie DNA und RNA, in einzelnen Zellen, im Zellkern, auf Chromosomen oder in Gewebeschnitten zu visualisieren. Dabei werden sequenzspezifische Nukleinsäure-Sonden verwendet, die komplementär zu den Zielsequenzen sind und mit diesen einen doppelsträngigen Hybrid bilden. Die Sonden sind meistens mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert.

Diese Analysen wurden im Institut für Humangenetik und Anthropologie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. B. Royer-Pokora durchgeführt. Insgesamt wurden vier MDS-Proben für diese Analysen verwendet.

Die PBMC der MDS-Patienten wurden aufgetaut und mit Antikörpern gefärbt. Die zu untersuchenden Populationen wurden durchflusszytometrisch sortiert und anschließend für die FISH-Analysen verwendet. Für FISH-Analysen wurden die Sonden für einen Locus in 5p als Kontrolle und für das Gen EGR-1 in 5q31 Locus verwendet.

	genetische Aberration	Analysierte Populationen	Sonde	Chromosom-Banden
Patient A	Deletion 5q	T-Zellen	EGR1	5p15.2 - 5q31
		B-Zellen		
		NK-Zellen		
Patient B	Deletion 5q	T-Zellen	EGR1	5p15.2 - 5q31
		B-Zellen		
		Perforin ⁻ NK-Zellen		
		Perforin ⁺ NK-Zellen		
Patient C	Deletion 5q	T-Zellen	EGR1	5p15.2 - 5q31
		B-Zellen		
		Perforin ⁻ NK-Zellen		
		Perforin ⁺ NK-Zellen		
Patient D	Deletion 5q	T-Zellen	EGR1	5p15.2 - 5q31
		B-Zellen		
		Perforin ⁻ NK-Zellen		
		Perforin ⁺ NK-Zellen		

2.2.15 Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit GraphPad Prism 5 durchgeführt. Bei Normalverteilung der Daten wurde *Student's* zweiseitigen ungepaarten t-Test und beim Vergleich der mehr als zwei Gruppen *1-way-Anova* angewendet. Unterschiede wurden als signifikant betrachtet wenn $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (**).

3 Ergebnisse

3.1 Charakteristik der Patienten

Insgesamt wurden 75 MDS-Patienten und 30 gesunde Spender in dieser Arbeit eingeschlossen. Im Rahmen einer Kooperation mit der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie der Uniklinik Düsseldorf, unter der Leitung von Herrn Prof. Rainer Haas, wurden die Proben der MDS-Patienten für diese Arbeit bereitgestellt. Die Einwilligung wurde gemäß der Deklaration von Helsinki von allen Patienten eingeholt. MDS tritt vorwiegend im hohen Alter auf und die Alterung geht bekanntermaßen mit Veränderungen in den Kompartimenten des Immunsystems, unter anderem den Lymphozyten, einher. Um altersspezifische Effekte auszuschließen, war ein Vergleich mit einer Kohorte von altersgleichen gesunden Spendern erforderlich. Diese Proben wurden von verschiedenen freiwilligen Spendern, zur Verfügung gestellt. Tabelle 5 stellt die Charakteristik der MDS-Patienten dar. Übereinstimmend mit anderen Studien, waren in der Patientenkohorte mehr Männer betroffen als Frauen (Verhältnis 1,5:1) (Neukirchen, *et al* 2011). Auf den Zeitpunkt der Blutentnahme bezogen, lag das Durchschnittsalter in der Patientenkohorte bei 71 Jahren (41-90 Jahre) und in der gesunden Kohorte bei 72 Jahren (51-90 Jahre). Bei der Auswahl der Patienten wurde darauf geachtet, dass sie vorher keine MDS-spezifischen Therapien bekommen hatten, damit der Vergleich mit der Kontrollkohorte tatsächlich MDS-spezifische Effekte und nicht medikamentös bedingte Veränderungen widerspiegelt. Die Mehrheit der Patienten bekam regelmäßig Erythrozytenkonzentrate transfundiert. 78% der Patienten wurden nach dem IPSS System als Niedrigrisiko- (niedrig/intermediär I) und 22% als Hochrisiko-Patienten (intermediär II/hoch) eingestuft. Sie konnten nach der WHO-Klassifikation in sieben Subtypen aufgeteilt werden: RA, RARS, RCMD, RAEB I/II, CMML- 5q-Syndrom und MDS-U. (Für die Definition der Klassifizierung siehe Tabelle 2)

Tabelle 5: Charakteristik der MDS-Patienten

	Total
gesunde Spender	30
Alter: 51-90 Jahre (Median 72 Jahre)	
MDS-Patienten	75
Geschlecht	
Männlich	45
Weiblich	30
Alter (Jahre)	
40-60	7
60-70	22
70-80	30
> 80	16
WHO Subtyp	
RA	3
RARS	5
RCMD	43
RAEB I/II	13
CMML	6
5q-Syndrom	4
MDS-U	1
IPSS	
Niedrigrisiko	35
Intermediär I (Int1)	24
Intermediär II (Int2)	11
Hochrisiko	5

3.2 Analyse der Lymphozyten-Subpopulationen

Aus 10-20 ml peripherem Blut der MDS-Patienten und gesunden Spendern wurden PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und bis zu weiteren Analysen kryokonserviert. Die Kryokonservierung ist ein gängiger Schritt, der sowohl die logistischen Herausforderungen bei der Beschaffung der Proben, als auch die methodische Varianz minimiert. Zudem zeigten sich im direkten Vergleich von frischen und aufgetauten Proben keine signifikanten Unterschiede in den phänotypischen Analysen. Die zentrale Aufgabe dieser Arbeit war es, die phänotypischen und funktionalen Merkmale der NK-Zellen in MDS-Patienten zu untersuchen. Zunächst sollte mittels Durchflusszytometrie und basierend auf der Expression der Marker CD56 und CD3, die Frequenz der verschiedenen PBMC-Subpopulationen in den Patienten und den altersgleichen gesunden Spendern ermittelt werden. Bei diesen Analysen wurde die Lymphozyten-Population basierend auf ihrer Größe und Granularität bestimmt. Danach wurden innerhalb der Lymphozyten-Population die NK-Zellen als $CD56^+CD3^-$, die NK-ähnliche T-Zellen (NKT-Zellen) als $CD56^+CD3^+$ und die T-Zellen als $CD3^+CD56^-$ Lymphozyten definiert (Abbildung 4).

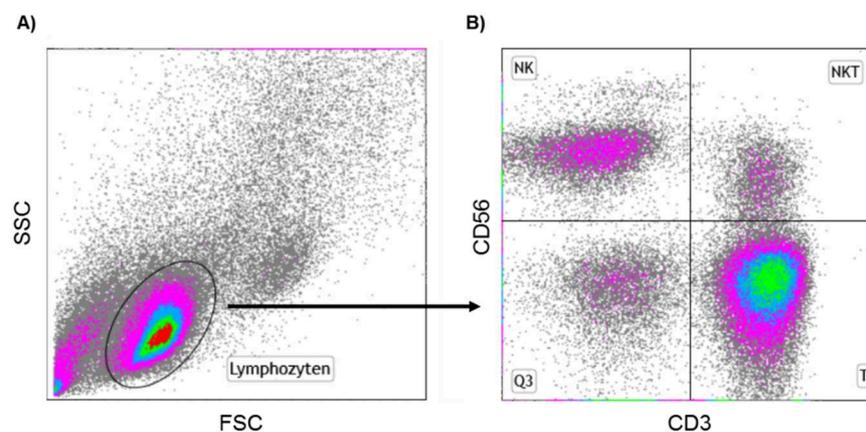


Abbildung 4: Die durchflusszytometrische Darstellung der Lymphozyten-Subpopulationen eines gesunden Spenders. Aufgetaute PBMC wurden nach der Antikörperfärbung am Durchflusszytometer analysiert. **(A)** Die Lymphozyten wurden nach ihrer Größe (*Forward-Scatter*, FSC) und Granularität (*Side-Scatter*, SSC) bestimmt. **(B)** Aufgrund der Expression von CD56 und CD3 wurden drei Lymphozyten-Subpopulationen definiert: NK-Zellen ($CD56^+CD3^-$), NK-ähnliche T-Zellen (NKT, $CD56^+CD3^+$) und T-Zellen ($CD3^+CD56^-$).

Die hier untersuchten NKT Zellen sind nicht zu verwechseln mit den häufig auch als NKT-Zellen bezeichneten CD1-spezifische T-Zellen mit definiertem T-Zellrezeptor.

Dabei wurde eine deutliche Verringerung der NK-Zellfrequenz in MDS-Patienten beobachtet (gesund: $13,7\% \pm 1,5$; MDS: $8,8\% \pm 1,3$; $p=0,0368$) (Abbildung 5A). Besonders auffallend war, dass eine Subgruppe von Patienten eine stark reduzierte NK-Zellfrequenz von $<1\%$ zeigte. Solche geringen Frequenzen konnten in der gesunden Kohorte nicht beobachtet werden (NK-Zellfrequenz: 2-35%).

Im Gegensatz zu den NK-Zellen, zeigten beide Kohorten vergleichbare Frequenzen der T-Zellen (gesund: $64,9\% \pm 1,7$; MDS: $67,7\% \pm 2,5$) und NKT-Zellen (gesund: $5,04\% \pm 0,7$; MDS: $5,37\% \pm 0,7$) im peripheren Blut (Abbildung 5 B,C).

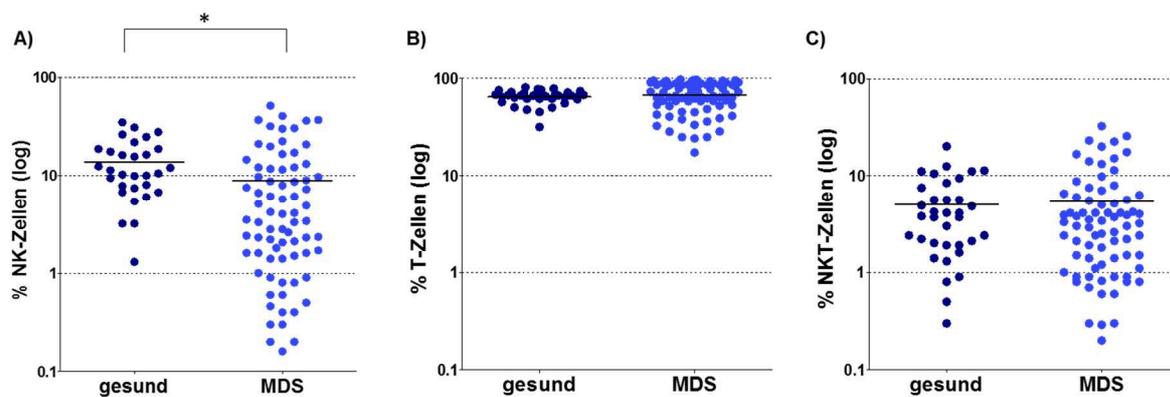


Abbildung 5: geringe NK-Zellfrequenz bei MDS-Patienten. Frequenz (%) von NK-Zellen ($CD56^+CD3^-$) (A), T-Zellen ($CD3^+CD56^-$) (B) und NKT-Zellen ($CD3^+CD56^+$) (C) anhand durchflusszytometrischen Analysen in 75 MDS-Patienten und 30 altersgleichen gesunden Spendern. Jeder Punkt repräsentiert ein Individuum, die horizontalen Linien stellen den Mittelwert dar. Die Y-Achse ist logarithmisch dargestellt. (* $P < 0,05$)

Die Verringerung oder Erhöhung der Frequenz einer Zellpopulation muss nicht mit einer gleichzeitigen Veränderung der absoluten Zellzahlen einhergehen. Daher ist es wichtig, auch die absoluten Zellzahlen zu analysieren, da diese genauere Informationen geben als der prozentuale Wert. Unter der absoluten Zellzahl versteht man die Zellzahl pro $1\mu\text{l}$ ($=1\text{mm}^3$) Blut, die anhand des Differentialblutbilds der Patienten und den gesunden Spendern am Tag der Blutentnahme und der Frequenz der einzelnen Populationen berechnet wurde. Nach diesen Analysen konnte kein

Unterschied in der Zellzahl von T-Zellen (gesund: $1456 \pm 92,4$; MDS: $1206 \pm 87,3$; $p=0,0825$) und NKT-Zellen (gesund: $114,5 \pm 21,1$; MDS: $97,6 \pm 23,8$; $p=0,6544$) zwischen beiden Kohorten erkannt werden (Abbildung 6 B,C). Allerdings wurde eine stark signifikante Verminderung der NK-Zellzahl in MDS-Patienten beobachtet (gesund: $319,7 \pm 41,6$; MDS: $107 \pm 16,1$; $p < 0,0001$) (Abbildung 6A): 10 von 75 Patienten (13,3%) zeigten eine NK-Zellzahl < 10 Zellen/ mm^3 . Diese Patienten werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit als „NK-Zelldefizient“ bezeichnet. Solche geringen NK-Zellzahlen konnten in der Kontrollkohorte nicht beobachtet werden.

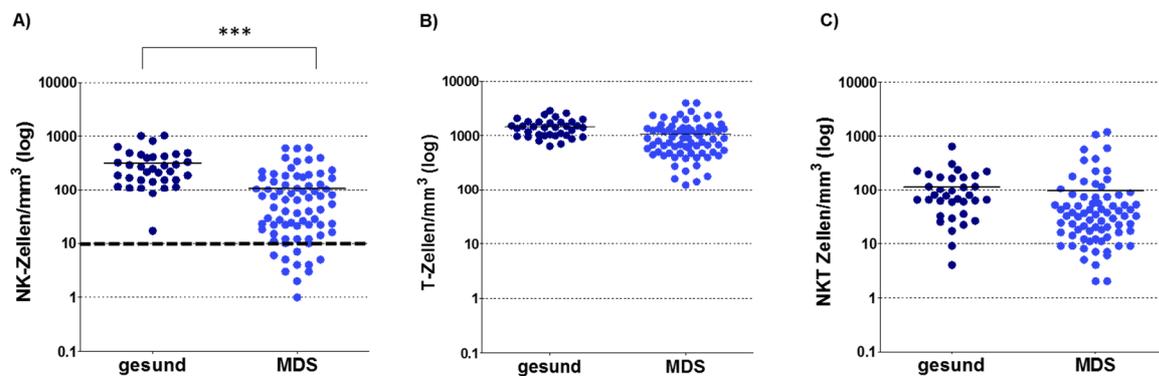


Abbildung 6: stark reduzierte NK-Zellzahl in MDS-Patienten. Absolute Zellzahl ($/\text{mm}^3$) der NK-Zellen (A), T-Zellen (B) und NKT-Zellen (C) in 75 MDS-Patienten und 30 altersgleichen gesunden Spendern wurden folgendermaßen berechnet: (Absolute Zellzahl der Lymphozyten) x (Frequenz der jeweiligen Population). Die gestrichelte Linie in (A) grenzt die NK-Zelldefizienten Individuen ab. Jeder Punkt repräsentiert ein Individuum und die horizontalen Linien stellen den Mittelwert dar. Die Y-Achse ist logarithmisch dargestellt. (***) $P < 0,001$

Abbildung 7A stellt die repräsentativen *Dot Plots* der CD56- und CD3-Expression in einem gesunden Spender und einem Patienten mit NK-Zelldefizienz dar. In NK-Zelldefizienten Patienten konnte keine klar definierte NK-Zellpopulation identifiziert werden.

Um festzustellen, ob die NK-Zelldefizienz mit einer Verminderung der T-Zellen einhergeht, wurden die Zellzahlen beider Populationen gegenübergestellt. Dabei konnte keine Korrelation zwischen NK- und T-Zellzahl beobachtet werden (Abbildung 7B).

Danach wurde der Frage nachgegangen, ob die NK-Zelldefizienz eine Folge der Herunterregulation des CD56 Markers auf den NK-Zellen ist. Daraufhin wurde die Expression weiterer NK-Zellmarker wie CD16 auf den NK-Zellen von NK-Zelldefizienten Patienten untersucht. Diese Untersuchungen haben ergeben, dass die NK-Zelldefizienten Patienten auch keine CD16-Expression aufweisen (<1%) (Daten nicht gezeigt).

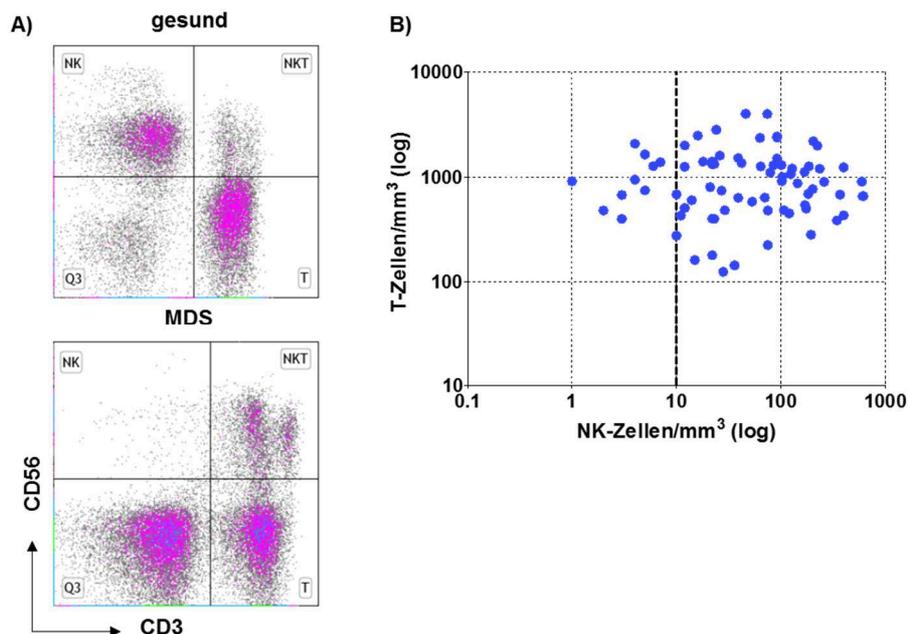


Abbildung 7: Keine Korrelation zwischen NK-Zelldefizienz und verminderte T-Zellfrequenz (A) Repräsentative durchflusszytometrische *Dot Plots* zeigen die Expression von CD56 und CD3 in PBMC von einem gesunden Spender (oben) und einem MDS-Patienten mit NK-Zelldefizienz (unten). **(B)** Das Punktediagramm stellt die absolute Zellzahl (/mm³) von NK- und T-Zellen gegeneinander. Die gestrichelte Linie grenzt die NK-Zelldefizienten Individuen ab.

Um einen Effekt der Kryokonservierung auf die Frequenz der NK-Zellen auszuschließen, wurden die durchflusszytometrischen Analysen mit frisch isolierten PBMC von drei NK-Zell-defizienten Patienten wiederholt. Dabei wurde die NK-Zelldefizienz bei allen Patienten bestätigt. Zwischen beiden Analysen (mit gefrorenen und frischisolierten PBMC) lagen gut zwei Jahre, so dass auch gezeigt werden konnte, dass die NK-Zelldefizienz in diesen Patienten im Laufe der Zeit konstant bleibt.

3.2.1 Analyse der NK-Zellen im Alter

Wie in der Literatur bereits beschrieben, tritt MDS vorwiegend bei älteren Menschen auf. Andererseits ist es bekannt, dass es im Rahmen der Alterung zur Verschiebung von Subpopulationen des Immunsystems kommen kann. Dazu zählt der Anstieg der NK-Zellfrequenz. Um den Effekt der Alterung auf die Frequenz und Zellzahl der NK-Zellen in Patienten und gesunden Spendern zu interpretieren, wurden sie in vier Altersgruppen aufgeteilt (40-60, 60-70, 70-80 und 80-90 Jahre) und dabei die NK-Zellfrequenz und -Zellzahl in diesen Gruppen miteinander verglichen. (Abbildung 8).

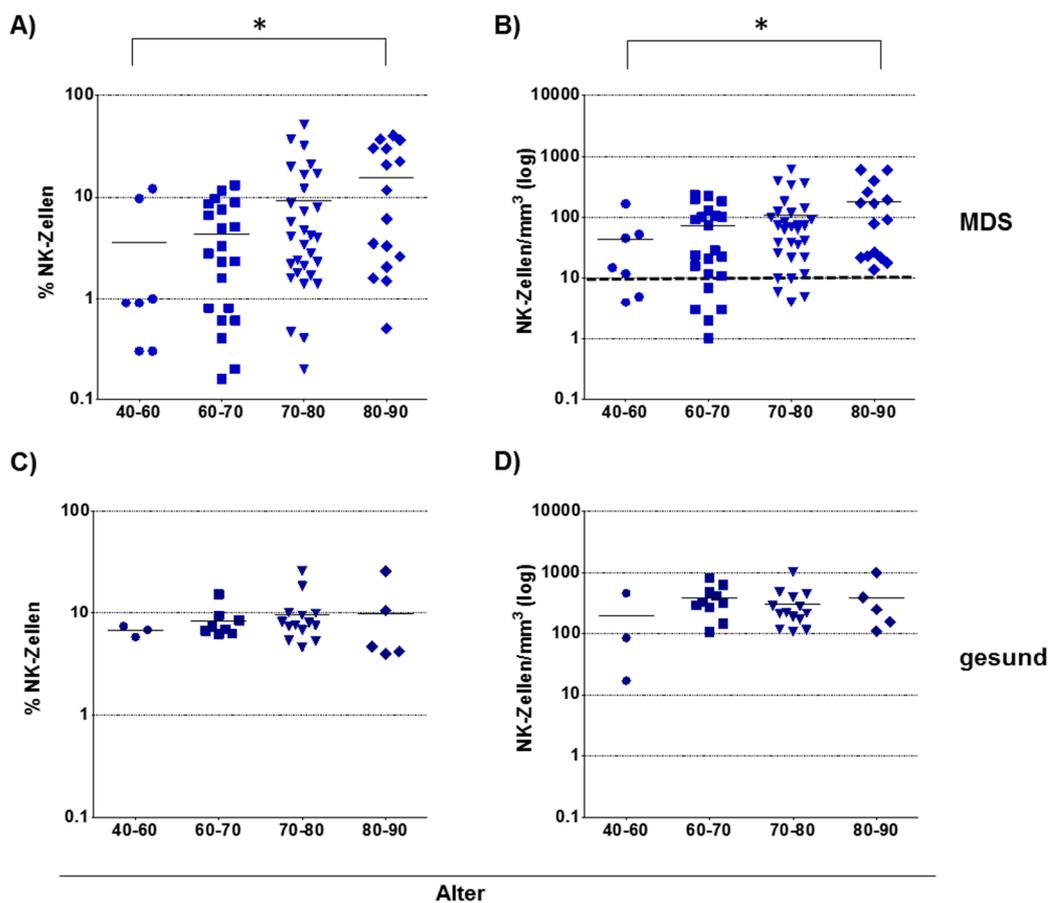


Abbildung 8: NK-Zelldefizienz kommt überwiegend in jüngeren Patienten vor. NK-Zellfrequenz (%) (A) und NK-Zellzahl (/mm³) (B) in 75 MDS-Patienten aufgeteilt in vier Altersgruppen (in Jahren): 40-60 (n=7), 60-70 (n=22), 70-80 (n=30) und 80-90 (n=16). Die Gestrichelte Linie in (B) grenzt die NK-Zelldefizienten Patienten ab. NK-Zellfrequenz (%) (C) und NK-Zellzahl (/mm³) (D) in 30 altersgleichen gesunden Spender (in Jahren): 40-60 (n=3), 60-70 (n=8), 70-80 (n=14) und 80-90 (n=5). Statistische Signifikanz wurde mittels *1-way Anova* berechnet. (*P<0,05)

Es wurde festgestellt, dass NK-Zelldefizienz vorwiegend in den jüngeren Patienten vorkommt. 28% der Patienten zwischen 40-60 Jahren zeigten eine NK-Zelldefizienz, während bei 60-70 Jährigen 22%, bei 70-80 Jährigen 10% und bei 80-90 jährigen 0% NK-Zelldefizienz aufwiesen. Anhand der statistischen Methode *1-way Anova* wurde die Signifikanz zwischen den vier Altersgruppen berechnet und innerhalb der Patienten eine signifikante Erhöhung der NK-Zellfrequenz und -Zellzahl mit zunehmendem Alter beobachtet. In der Kontrollkohorte konnte dagegen kein eindeutiger Anstieg der NK-Zellzahl und -Frequenz erkannt werden.

3.2.2 Analyse der NK-Zellen nach Subtyp und IPSS

Als nächstes wurde untersucht, ob sich bei den MDS-Patienten eine Korrelation zwischen der beobachteten NK-Zelldefizienz und einer bestimmten krankheitsspezifischen Diagnose (IPSS und Subtyp) feststellen lässt (Abbildung 9). Die Aufteilung nach IPSS in Niedrigrisiko (Niedrigrisiko/Intermediär-I, *low/int1*) und Hochrisiko (Intermediär II/hochrisiko, *int2/high*) ergab, dass sowohl die Frequenz (Niedrigrisiko: $10,3\% \pm 1,6$; Hochrisiko: $3,3\% \pm 1$; $p=0,0281$), als auch die Zellzahl (Niedrigrisiko: 123 ± 19 ; Hochrisiko: $45 \pm 15,6$; $p=0,0462$) der NK-Zellen in Patienten mit Hochrisiko-MDS signifikant reduziert waren (Abbildung 9A,C). Die NK-Zelldefizienz wurde bei Hochrisiko-Patienten deutlich häufiger beobachtet (5% in *low/int1* und 44% in *int2/high*, $P < 0,001$), was auf eine starke Assoziation zwischen der NK-Zelldefizienz und dem IPSS hindeutet.

Nach ihrem Subtyp wurden die Patienten in drei Gruppen, RA/RARS, RCMD und RAEB I/II aufgeteilt. Wie bereits erwähnt besteht bei Patienten mit RAEB I/II das höchste Risiko für einen AML-Übergang, wobei die RA/RARS Patienten eher einen milderen Krankheitsverlauf zeigen. Auch bei dieser Aufteilung fand sich eine deutliche Korrelation mit dem Schweregrad des MDS (Abbildung 9B,D). Sowohl die Frequenz (RA/RARS: $18,9\% \pm 4,6$; RAEB I/II: $3,9\% \pm 1,1$; $p=0,0013$), als auch die Zellzahl (RA/RARS: $236,3 \pm 68,26$; RAEB I/II: $52 \pm 18,57$; $p=0,0049$) der NK-Zellen in der RAEB I/II-Gruppe waren signifikant niedriger, als die in der RA/RARS-Gruppe. Die Patienten mit NK-Zelldefizienz befanden sich signifikant häufiger in der Hochrisikogruppe RAEB

Basierend auf der NK-Zellzahl lässt sich zusammenfassend sagen, dass es eine kleine Gruppe (13%) von MDS-Patienten gibt, die eine NK-Zellzahl von <10 Zellen/ mm^3 Blut aufweisen. Diese Patienten werden in dieser Arbeit als „NK-Zelldefizient“ bezeichnet. Es sind hauptsächlich Patienten jüngeren Alters zwischen 40-60 Jahren mit einer ungünstigen Prognose (IPSS und WHO Klassifizierung).

3.3 Funktionalität der NK-Zellen in MDS-Patienten

Anhand von drei verschiedenen *Assays* sollte die NK-Zellfunktion in MDS-Patienten und altersgleichen *gesunden* Spendern ermittelt werden: Durch den CD107-Degranulationsassay, den Zytotoxizitätsassay und durch die intrazelluläre Produktion von IFN- γ . Aufgrund einer begrenzten Zellzahl innerhalb der Patientenproben konnte nicht jeder Assay bei jedem Patienten durchgeführt werden. Die Patienten mit NK-Zelldefizienz mussten aufgrund der geringen Zellzahl aus diesen Analysen ausgeschlossen werden.

3.3.1 CD107- und Zytotoxizitätsassay

Der CD107-Degranulationsassay hat sich bis jetzt als Standard-Assay für die Funktionalität der NK-Zellen durchgesetzt und gibt eine Aussage darüber, ob die NK-Zellen in Gegenwart der HLA Klasse-I-negativen Zielzellen (K562 Zelllinie) aktiviert werden. Daraufhin wird die Expression von CD107 Molekülen, die nach Degranulation der NK-Zelle auf der Oberfläche gelangen, durchflusszytometrisch detektiert. Insgesamt waren 30 Patienten und 20 altersgleiche gesunde Spender in diese Experimente inbegriffen. Die PBMC wurden vorher 16 Stunden in IL-2-haltigem NK-Zellmedium kultiviert.

Der CD107-Assay ergab vergleichbare Werte für die Degranulation zwischen Patienten und gesunden Spendern (gesund: $25,5\% \pm 1,9$; MDS: $27,5\% \pm 2,6$; $p=0,5761$) (Abbildung 10A). Hierbei wurden nur die CD107⁺ NK-Zellen gemessen.

Während der CD107-Assay Aufschluss darüber gibt, ob und wie stark die NK-Zellen in Gegenwart von Zielzellen aktiviert werden, zeigt der Zytotoxizitätsassay, wie viele Zielzellen durch die NK-Zellen tatsächlich abgetötet werden. Hierfür wurden die PBMC

von 43 MDS-Patienten und 20 gesunden Spendern untersucht. Da in diesen Versuchen die HLA Klasse-I-negative K562 Zelllinie als Zielzelle verwendet wurde, war davon auszugehen, dass eine Lyse der Zielzellen auf NK-Zellen zurückzuführen ist und nicht auf zytotoxische T-Zellen.

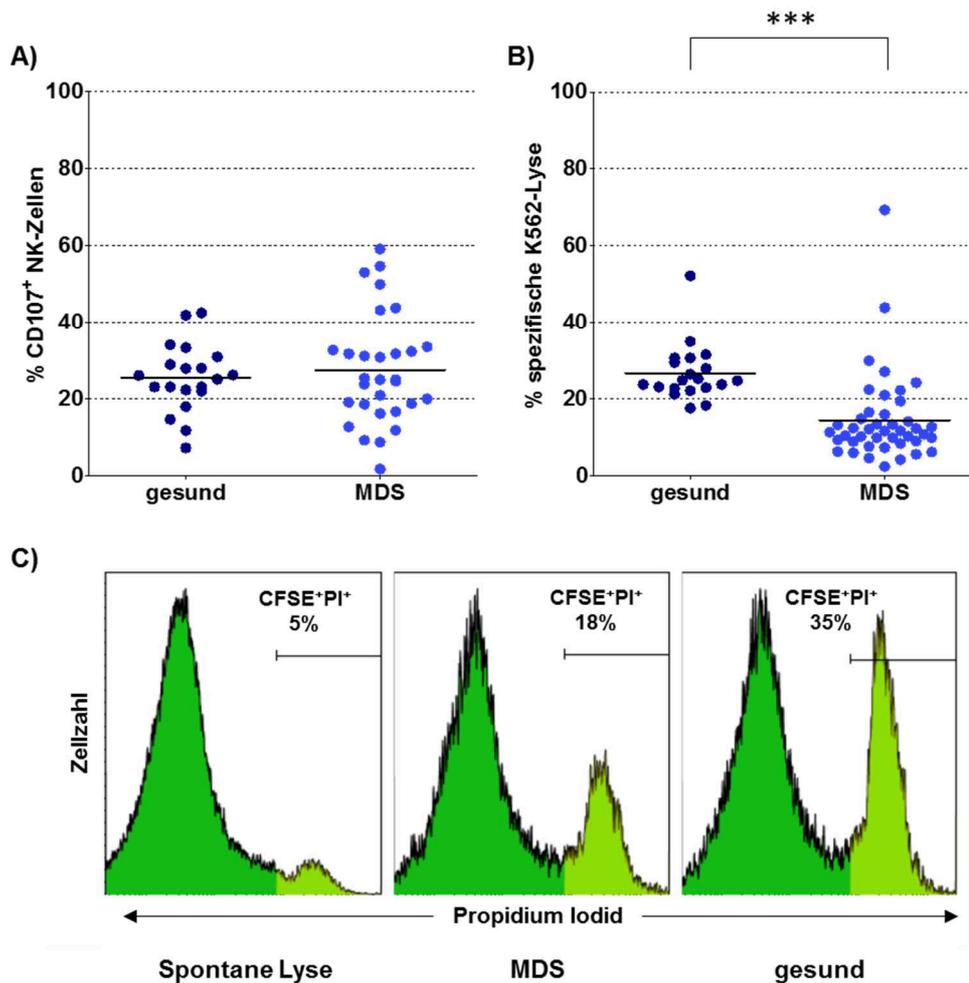


Abbildung 10: Stark verminderte Zytotoxizität der NK-Zellen in MDS-Patienten. (A) Die Degranulation der mit IL-2 stimulierten NK-Zellen nach der Kultivierung mit K562 Zielzellen wurde in 30 Patienten und 20 altersgleichen gesunden Spendern durchflusszytometrisch untersucht (CD56⁺CD3⁻CD107⁺). (B) Der Zytotoxizitätsassay wurde mit 20 gesunden Spendern und 43 Patienten durchgeführt. Die spezifische Lyse der K562 nach der Inkubation mit PBMC (IL-2 stimuliert, Verhältnis 10:1) wurde durchflusszytometrisch als CFSE⁺PI⁺ Zellen gemessen. Patienten mit einem Zytotoxizitätswert von <20% werden als funktionsdefizient betrachtet. (C) Repräsentative Darstellung der K562-Lyse von einem Patient mit verminderter NK-Zellzytotoxizität und einem gesunden Spender. Das linke Histogramm stellt die spontane Lyse der K562 ohne Effektorzellen dar, das mittlere Histogramm die K562-Lyse durch die NK-Zellen eines funktionsdefizienten Patienten und das rechte Histogramm die K562-Lyse durch die NK-Zellen eines repräsentativen gesunden Spenders gemessen als CFSE⁺PI⁺ Zellen.

Um die NK-Zell-spezifische Lyse der K562 zu berechnen wurde die spontane Lyse der K562 (ohne Effektorzellen) von dem gemessenen Wert (Effektorzellen + K562) abgezogen.

Die Ergebnisse verdeutlichen eine hoch signifikante Verminderung der NK-Zellzytotoxizität in MDS-Patienten (gesund: $26,7\% \pm 1,6$; MDS: $14,5\% \pm 1,7$; $p < 0,0001$) (Abbildung 10B). 81% der Patienten zeigten eine Zytotoxizität $< 20\%$, während nur bei 10% der gesunden Spendern solch eine geringe Zytotoxizität gemessen wurde. Anhand dieser Analysen und aufgrund von Normwerte wurde eine 20%ige spezifische Lyse als Grenzwert festgelegt und NK-Zellen mit einem Zytotoxizitätswert von $\geq 20\%$ als „funktional“ und $< 20\%$ als „nicht funktional“ definiert.

Bei der Analyse der Zytotoxizitäts-Daten musste berücksichtigt werden, dass die Frequenz der NK-Zellpopulation innerhalb der PBMC in MDS-Patienten stark schwankte. Aus diesem Grund wurde ermittelt, ob ein Zusammenhang zwischen der verringerten Zytotoxizität und der NK-Zellfrequenz besteht. Wie aus Abbildung 11 zu entnehmen ist, besteht in der Patientenkohorte eine leichte Korrelation zwischen beiden Parametern ($p = 0,0207$). Es ist jedoch deutlich zu erkennen, dass die Mehrheit der Patienten mit normaler NK-Zellfrequenz (2-15%) eine verminderte Zytotoxizität $< 20\%$ aufweisen.

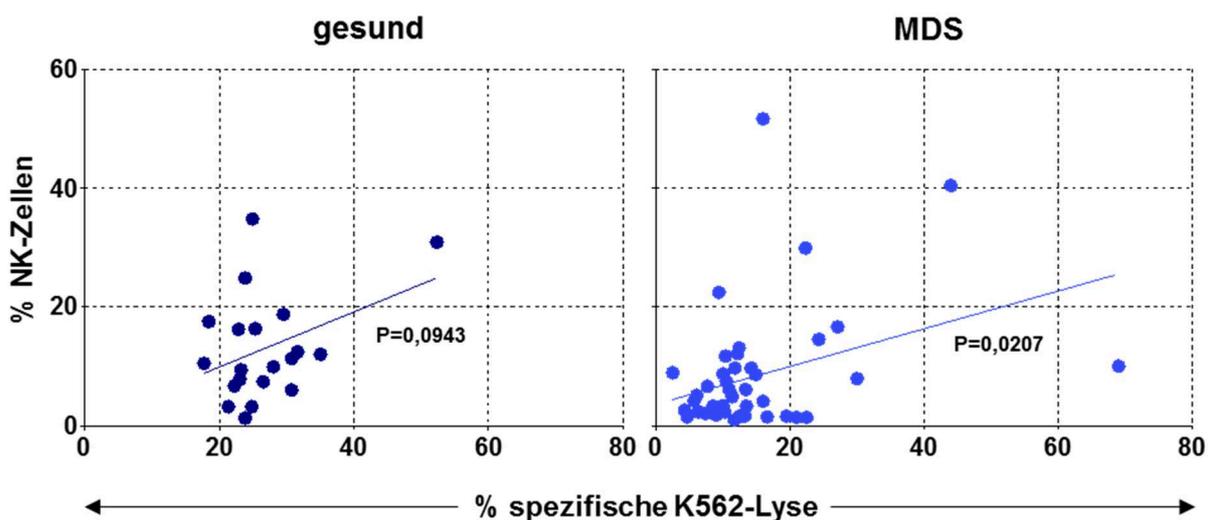


Abbildung 11: Korrelation zwischen Zytotoxizität und NK-Zellfrequenz in den gesunden Spendern und den Patienten. Die Gegenüberstellung der NK-Zellfrequenz innerhalb der PBMC und der Zytotoxizität der NK-Zellen in altersgleichen gesunden Spendern (**links**) und MDS-Patienten (**rechts**). Die Geraden stellen die lineare Regression dar (gesund $P = 0,0943$, MDS $P = 0,0207$).

Um zu klären, in wie weit die Funktionsdefizienz der NK-Zellen auf eine bestimmten Krankheitsprognose (Subtyp bzw. IPSS) beschränkt ist, wurden die Zytotoxizitätsdaten in verschiedenen Gruppen ausgewertet (Abbildung 12). Hier konnte weder zwischen den Niedrigrisiko (*low/Int1*) und Hochrisiko (*Int2/high*) Gruppen (Niedrigrisiko: $15,5\% \pm 2$; Hochrisiko: $9,2\% \pm 0,7$; $p=0,1848$), noch zwischen den verschiedenen Subtypen (RA/RARS: $16,4\% \pm 3,5$; RAEB I/II: $9,9\% \pm 1,8$; $p=0,1064$) ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Allerdings fiel auf, dass kein Patient mit funktionalen NK-Zellen der Hochrisiko-Gruppen (*Int2/high* und RAEB I/II) zugewiesen werden konnte.

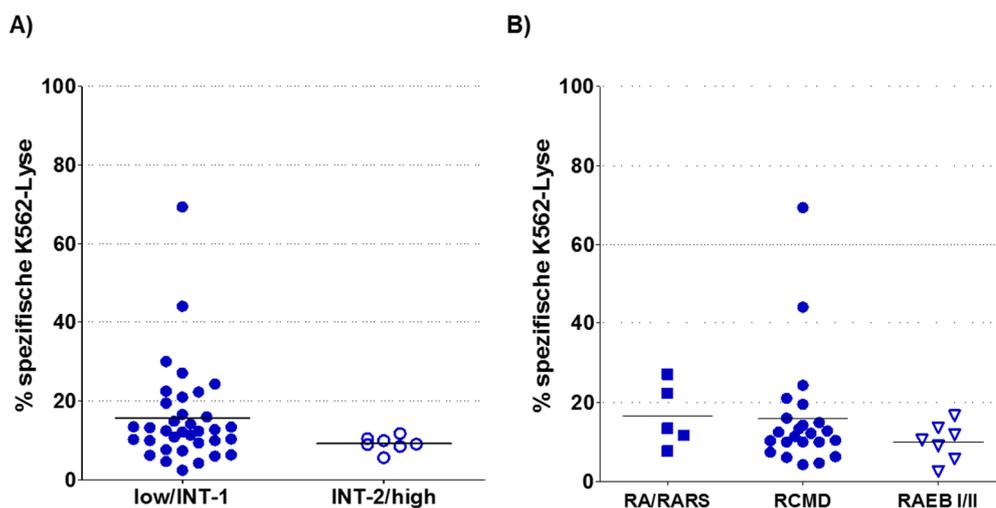


Abbildung 12: Keine Korrelation zwischen Zytotoxizität der NK-Zellen und Prognose in MDS-Patienten. Darstellung der Zytotoxizität von NK-Zellen in MDS-Patienten aufgeteilt nach (A) IPSS Gruppen, Niedrigrisiko / Intermediär I (*low/Int1*, $n=36$) und Hochrisiko / Intermediär II (*Int2/high*, $n=7$) und (B) WHO-Subtypen: Refraktäre Anämie/Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RA/RARS, $n=5$), Refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien (RCMD, $n=23$) und Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss I/II (RAEB I/II, $n=7$). Die spezifische Lyse der K562 nach der Inkubation mit PBMC (IL-2 stimuliert, Verhältnis 10:1) wurde durchflusszytometrisch als CFSE+PI+ K562 Zellen gemessen. Jeder Punkt repräsentiert ein Individuum, die horizontalen Linien stellen den Mittelwert dar.

Der CD107-Assay spiegelt das Aktivierungspotential der NK-Zellen wider, während der Zytotoxizitätsassay Aufschluss darüber gibt, ob die NK-Zellen die Zielzellen tatsächlich abtöten können. Wie bereits aus der Literatur bekannt ist, besteht eine positive Korrelation zwischen der CD107-Expression und der Zytotoxizität der NK-Zellen

(Aktas, *et al* 2009). In der Patientenkohorte konnte diese Korrelation jedoch nicht beobachtet werden ($p=0,9047$) (Abbildung 13). Bei Patienten mit funktionsdefizienten NK-Zellen (Zytotoxizität $<20\%$) schwankte die CD107-Expression zwischen 1% und 60%.

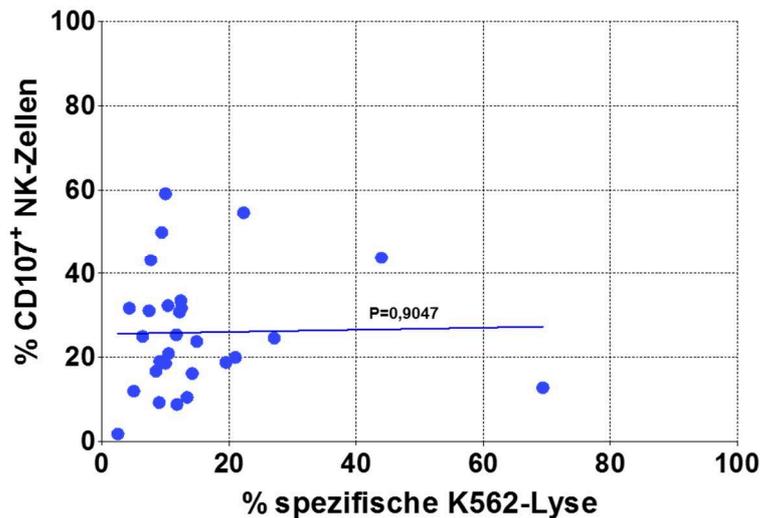


Abbildung 13: Kein Zusammenhang zwischen Degranulation und Zytotoxizität der NK-Zellen in MDS-Patienten. Die X-Achse stellt die Zytotoxizität (%) und die Y-Achse die Degranulation (%CD107+ NK-Zellen) der NK-Zellen dar. Die blaue Linie stellt die lineare Regression dar ($P=0,9047$).

Demnach lassen sich die MDS-Patienten anhand der NK-Zellzahl und funktionalen Analysen in drei Gruppen aufteilen (Abbildung 14):

Gruppe 1: Eine kleine Gruppe von Patienten mit normaler NK-Zellzahl und -Funktion (≥ 10 NK-Zellen/ mm^3 Blut, Zytotoxizität $\geq 20\%$, $n=8$)

Gruppe 2: eine große Gruppe von Patienten mit normaler bzw. reduzierter NK-Zellzahl und eingeschränkter Funktion (Zytotoxizität $<20\%$, $n=35$)

Gruppe 3: Patienten mit NK-Zelldefizienz (<10 NK-Zellen/ mm^3 Blut, $n=10$, 13% aller Patienten).

Die Gruppe 3-Patienten wurden aufgrund sehr geringer NK-Zellzahl aus den Funktionsanalysen ausgeschlossen und daher wurden 0-Werte für die Zytotoxizität in Abbildung 14 eingetragen.

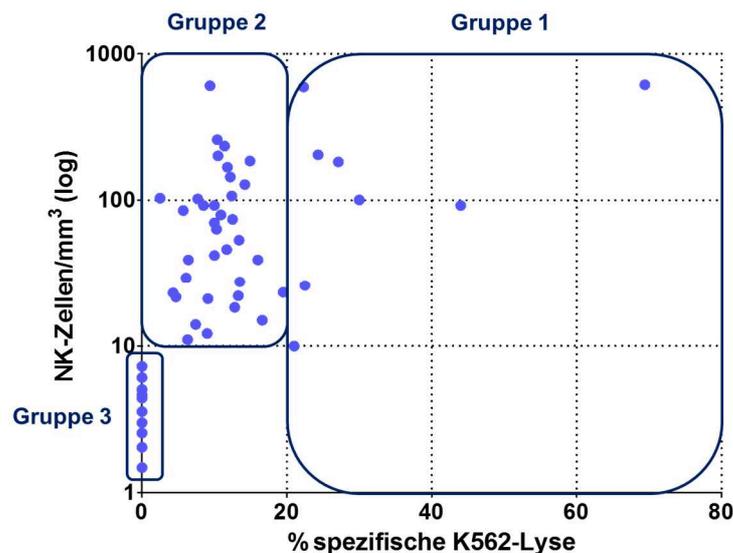


Abbildung 14: Die Aufteilung der MDS-Patienten in drei Gruppen anhand der Zellzahl und funktionalen Analysen der NK-Zellen. Gruppe 1: Patienten mit normaler NK-Zellzahl und -Funktion (≥ 10 NK-Zellen/mm³ Blut, Zytotoxizität $\geq 20\%$, n=8), **Gruppe 2:** Patienten mit normaler bzw. reduzierter NK-Zellzahl und verminderter Funktion (Zytotoxizität $< 20\%$, n=35) und **Gruppe 3:** Patienten mit NK-Zelldefizienz (< 10 NK-Zellen/mm³ Blut, n=10). Patienten der Gruppe 3 waren nicht in den funktionalen Analysen eingeschlossen.

3.3.2 Intrazelluläre Messung von Perforin und Granzym B

Die Granula der NK-Zellen beinhalten zytotoxische Moleküle, wie Granzym B und Perforin, die nach der Aktivierung und Degranulation der NK-Zellen in Richtung der Zielzelle freigesetzt werden und gemeinsam in der Zielzelle apoptotische Prozesse induzieren. Somit hat die Beladung der Granula in den NK-Zellen eine wichtige Rolle bei der zytotoxischen Funktion dieser Zellen.

Die starke Diskrepanz zwischen Degranulation und Zytotoxizität der NK-Zellen in der Patientenkohorte ließ die Frage aufkommen, ob die Granula mit Perforin und Granzym B beladen sind. Aus diesem Grund wurde die Expression von Perforin und Granzym B anhand einer intrazellulären Antikörperfärbung durchflusszytometrisch ermittelt. Die NK-Zellen bestehen bekanntlich aus zwei Subpopulationen, CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zellen. Dabei sind die letzteren die reiferen NK-Zellen, deren Granula zytotoxische Moleküle beinhalten. Daher wurden diese Analysen auf die CD56^{dim} Subpopulation beschränkt. Die Ergebnisse verdeutlichen einen signifikanten Unterschied in der

Expression von Granzym B und Perforin in der Patientenkohorte verglichen mit den gesunden Spendern (Abbildung 15). Der Mittelwert für die Granzym B- und Perforin Expression lag in der gesunden Kohorte bei 88% und 82%, während nur 70% und 55% der NK-Zellen in Patienten Granzym B bzw. Perforin exprimierten.

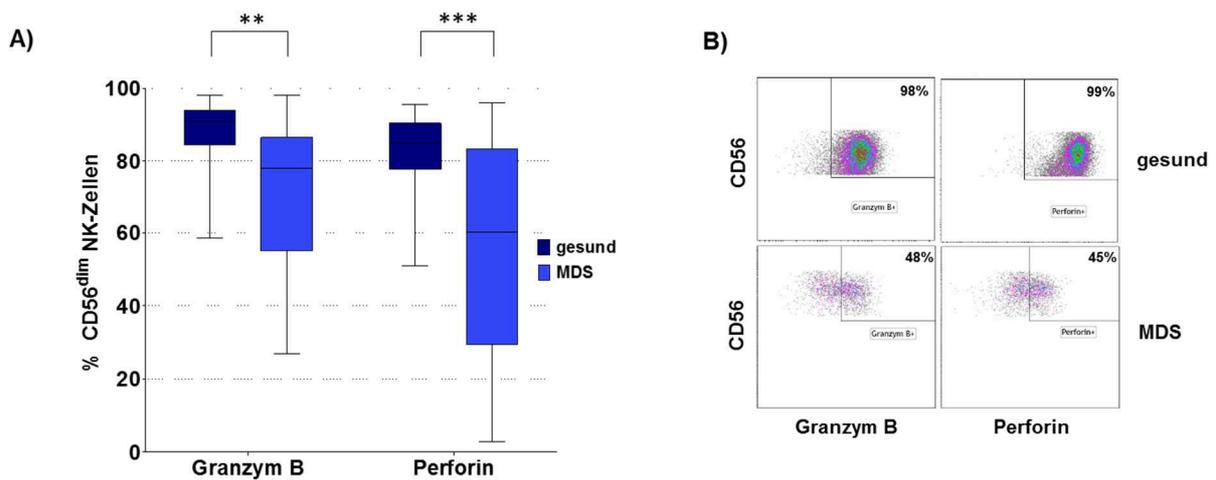


Abbildung 15: Stark verminderte Expression von Granzym B und Perforin in MDS-Patienten. (A) Die Expression von Granzym B und Perforin in CD56^{dim} NK-Zellen wurde mittels intrazellulärer Färbung in 37 MDS-Patienten (hellblau) und 20 gesunde Spender (dunkelblau) durchflusszytometrisch ermittelt. (**P<0,01, ***P<0,001) **(B)** Repräsentative Darstellung (*Dot Plots*) der Expression von Granzym B und Perforin in CD56^{dim} NK-Zellen in einem gesunden Spender (oben) und einem MDS Patienten (unten).

Abbildung 15B zeigt repräsentative *Dot plots* eines MDS-Patienten und eines gesunden Spenders, wo die unterschiedliche Expression von Granzym B und Perforin in CD56^{dim} NK-Zellen deutlich zu erkennen ist. 98% und 99% der NK-Zellen in dem gesunden Spender sind Granzym B⁺ bzw. Perforin⁺. Die Expression von Granzym B und Perforin beträgt im Patienten 48% bzw. 45%.

Wurde die Expression von Perforin und Granzym B direkt gegenübergestellt, konnte sowohl in der Kontrollkohorte, als auch in der Patientenkohorte eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von Perforin und Granzym B beobachtet werden (Lineare Regression; *gesund* und *MDS* p<0,0001) (Abbildung 16). So gut wie alle gesunden Spender zeigen innerhalb der CD56^{dim} Population eine Granzym B- und Perforin-Expression von über 80%. In der Patientenkohorte geht dabei die geringe Granzym B-Expression mit einer noch niedrigeren Expression von Perforin einher.

Dabei wurde eine starke Assoziation zur Zytotoxizität der NK-Zellen festgestellt. Alle Gruppe 1-Patienten (mit funktionalen NK-Zellen) zeigten eine Perforin/Granzym B-Expression $\geq 60\%$ (Abbildung 16, rechts, ungefüllte Punkte). Es konnte kein Patient mit einer Perforin/Granzym B-Expression $< 60\%$ der Gruppe 1 zugewiesen werden.

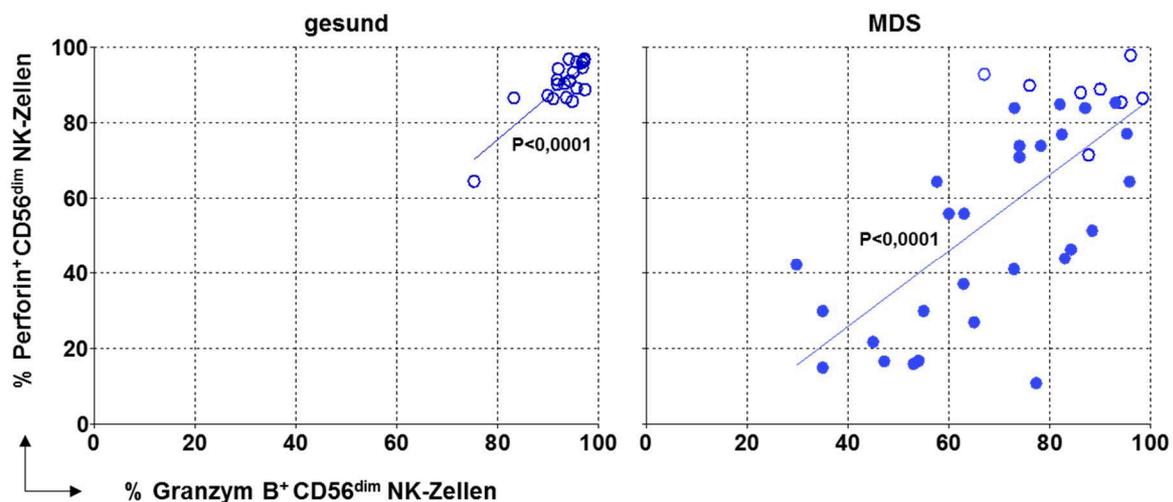


Abbildung 16: Starke Korrelation zwischen der Perforin- und Granzym B-Expression und Assoziation zur Zytotoxizität. Dargestellt ist die Expression von Granzym B gegen Perforin in 20 gesunden Spendern (**links**) und 37 MDS-Patienten (**rechts**). Rechts: Die ungefüllten Punkte stellen die Individuen mit normaler NK-Zellzytotoxizität (spezifische K562-Lyse $\geq 20\%$) und die gefüllten Punkte zeigen die Individuen mit geringer NK-Zellzytotoxizität (spezifische K562-Lyse $< 20\%$). Jeder Punkt repräsentiert ein Individuum. Die blaue Linie stellt die lineare Regression dar ($P < 0,0001$).

3.3.3 Intrazelluläre Produktion von IFN- γ

Neben ihrer zytotoxischen Funktion besitzen die NK-Zellen die Aufgabe, verschiedene Zytokine zu sekretieren. Diese Eigenschaft der NK-Zellen ist in den CD56^{dim} und CD56^{bright} NK-Zellen unterschiedlich ausgeprägt. CD56^{bright} NK-Zellen zeigen eine geringere Zytotoxizität als CD56^{dim} NK-Zellen und zeichnen sich hauptsächlich durch Zytokin-Produktion als Haupteffektorfunktion aus. In diesem Teil der Arbeit sollte die intrazelluläre Produktion von IFN- γ in NK-Zellen von Patienten und gesunden Spendern miteinander verglichen werden. Um die Zytokine in den NK-Zellen intrazellulär zu detektieren, musste zuerst deren Sekretion gehemmt werden, sodass

die Zytokine in der Zelle akkumulieren. Dies erfolgte durch die Zugabe von Brefeldin A, welches den Protein-Transport zwischen Golgi Apparat und ER inhibiert.

Die Ergebnisse zeigten eine signifikant verminderte Produktion der IFN- γ in den NK-Zellen der Patienten (gesund: 17,1% \pm 3,7; MDS: 6,2% \pm 1,9) (Abbildung 17A).

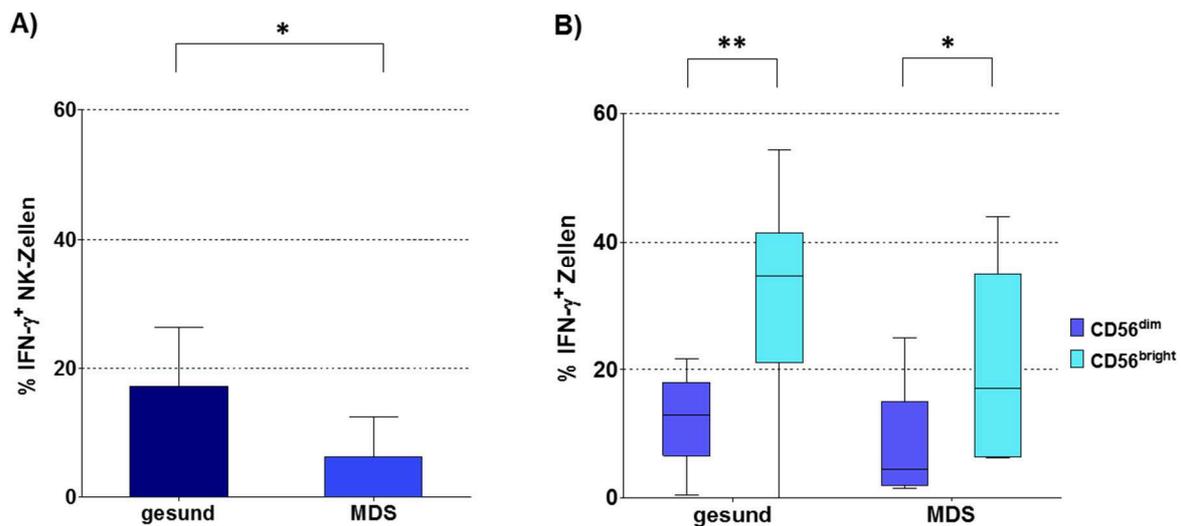


Abbildung 17: Verminderte IFN- γ Produktion von NK-Zellen in MDS-Patienten. Die intrazelluläre IFN- γ Produktion von NK-Zellen (IL-2 stimuliert) in Gegenwart von K562 Zielzellen wurde in 10 MDS-Patienten und 7 altersgleichen gesunden Spendern durchflusszytometrisch untersucht. Die Diagramme zeigen die Frequenz der IFN- γ + Zellen innerhalb der NK-Zellen (**A**) und in CD56^{dim}/CD56^{bright} Subpopulationen (**B**) (*P<0,05; **P<0,01)

Die Aufspaltung der NK-Zellen in die CD56^{bright} und CD56^{dim} Subpopulationen ergab, dass CD56^{bright} NK-Zellen sowohl in den Patienten als auch in gesunden Spendern deutlich mehr IFN- γ produzieren, was mit den Erkenntnissen aus der Literatur übereinstimmt (Abbildung 17B). Dabei fällt auf, dass die IFN- γ Produktion in den beiden CD56^{bright} und CD56^{dim} Subpopulationen in den Patienten niedriger ist (CD56^{dim}: gesund 12,5% \pm 2; MDS 7,6% \pm 3,5; p=0,1774) (CD56^{bright}: gesund 30,8% \pm 4,6; MDS 19,8% \pm 4,8; p=0,1311).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die MDS-Patienten und die gesunden Spender sich in der Degranulationsaktivität der NK-Zellen nicht unterscheiden. Jedoch ist die Zytotoxizität der NK-Zellen in MDS-Patienten stark vermindert. Diese Diskrepanz ist auf die beeinträchtigte Expression von Granzym B und Perforin

zurückzuführen. Es konnte ebenfalls eine positive Korrelation zwischen der niedrigen Perforin/Granzym B-Expression und der verminderten Zytotoxizität der NK-Zellen in den Patienten beobachtet werden. Die NK-Zellen der MDS-Patienten haben außerdem eine signifikante Verringerung der IFN- γ Produktion im Vergleich zu den gesunden Spendern aufgezeigt.

3.4 Etablierung einer Methode zur Expansion der NK-Zellen

Um eine optimale Stimulation und Proliferation von NK-Zellen zu erreichen ist meist die Zugabe von Zytokinen nicht ausreichend. Viele Methoden haben bereits gezeigt, dass die Zugabe von *Feeder*-Zellen zu einer effektiveren Proliferation von NK-Zellen führt (Campbell 1999, Pierson, *et al* 1996). Basierend auf diesen Methoden wurde in dieser Arbeit ein Expansionsprotokoll mit bestrahlten K562-Zellen und einer PBMC-Mischung verschiedener Spender (ebenfalls bestrahlt) als *Feeder*-Zellen in der Gegenwart von IL-2 etabliert. Dabei sollen die NK-Zellen durch den Kontakt mit ihren Liganden und durch die von Feeder-Zellen produzierten löslichen Faktoren stimuliert werden.

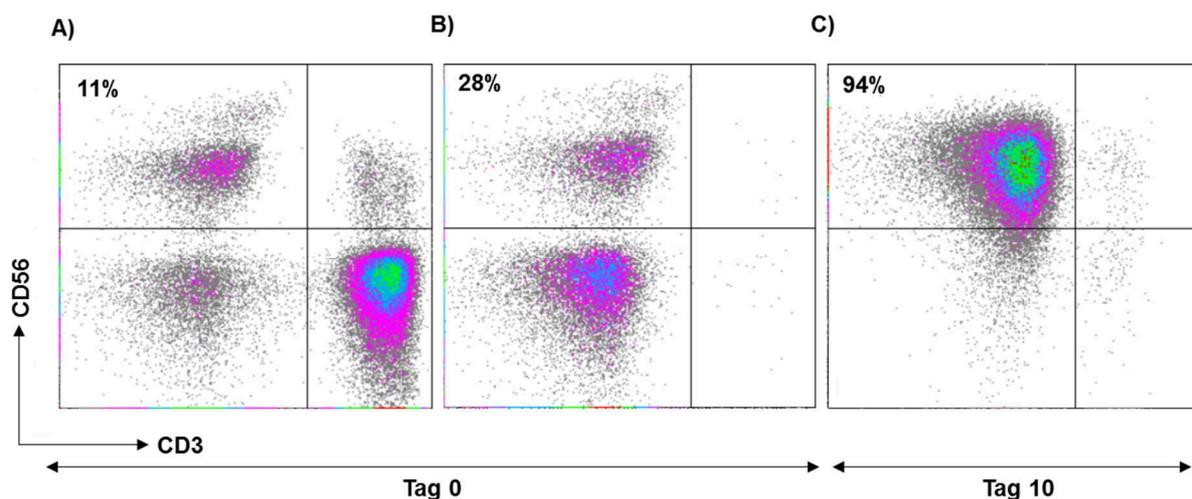


Abbildung 18: Repräsentative Dot Plots der Expansion der NK-Zellen eines gesunden Spenders. (A) verschiedene Populationen innerhalb der Lymphozyten vor der CD3-Depletion, (B) Populationen innerhalb der Lymphozyten nach der CD3-Depletion mittels magnetischer Zellsortierung (MACS), (C) und nach 10 Tagen Inkubation der CD3-depletierten PBMC mit bestrahlten K562 und bestrahlten PBMC, welche aus drei verschiedenen *Buffy coats* isoliert und gemischt wurden, in Anwesenheit von IL-2.

Als Ausgangsmaterial wurden CD3-depletierte PBMC verwendet, so dass eine mögliche Expansion von T-Zellen ausgeschlossen werden konnte. In Abbildung 18 sind die PBMC Subpopulationen vor (Abbildung 18A) und nach der CD3-Depletion beispielhaft in einem gesunden Spender dargestellt (Abbildung 18B). Die Frequenz der NK-Zellen lag vor der CD3-Depletion bei 11% und nach der CD3-Depletion bei 28%. Nach 10 Tagen Kultivierung bestand die Zellmischung über 90% aus NK-Zellen (Abbildung 18C).

Insgesamt wurden fünf MDS-Patienten und drei altersgleiche gesunde Spender in diesem Experiment analysiert. Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, konnten die aus MDS-Patienten isolierten NK-Zellen ebenfalls erfolgreich expandiert werden. Die Reinheit aller Kulturen an Tag 10 lag bei 80-96% NK-Zellen. Die Expansionsrate der NK-Zellen variierte von Person zu Person, sowohl in den gesunden Spendern, als auch in den Patienten. In den gesunden Spendern wurde eine Expansionsrate zwischen 25- und 190-fach (Mittelwert 99-fach) und in den Patienten zwischen 12- und 130-fach (Mittelwert 54-fach) beobachtet.

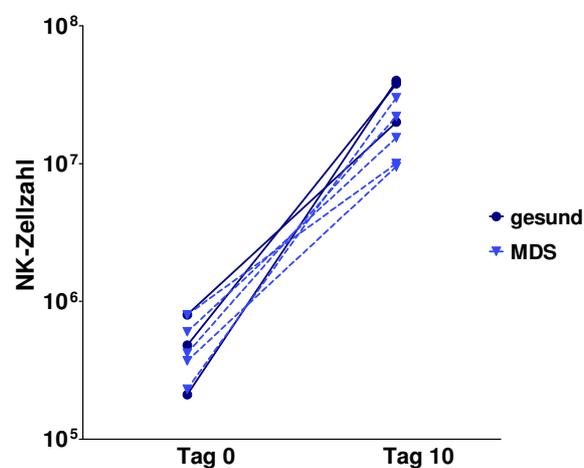


Abbildung 19: Expansion der NK-Zellen von MDS-Patienten und gesunden Spendern. Insgesamt wurden CD3-depletierte PBMC von fünf MDS-Patienten und drei gesunden Spendern zehn Tage lang in Anwesenheit von bestrahlten K562 und bestrahlter PBMC-Mischung aus drei verschiedene *Buffy coats* und IL-2 kultiviert.

3.4.1 Wiederherstellung der NK-Zellfunktion nach Stimulation

Nach der erfolgreichen Expansion und Stimulation der NK-Zellen in Patienten und gesunden Spendern sollte nun geprüft werden, ob die Stimulation der NK-Zellen die Defizienz auf der Ebene der Perforin/Granzym B-Expression und Zytotoxizität beheben kann. Für diesen Zweck wurden die NK-Zellen von fünf Patienten und drei altersgleichen gesunden Spendern, wie in Abschnitt 3.4 beschrieben, zehn Tage lang mit IL-2 und Feeder-Zellen stimuliert. Anschließend wurden die Zytotoxizität der stimulierten NK-Zellen und ihre Perforin/Granzym B-Expression untersucht und mit den initialen Analysen (am Tag 0) verglichen (Abbildung 20). Diese Analysen ergaben, dass die Expression von sowohl Granzym B (Abbildung 20A), als auch Perforin (Abbildung 20B) in allen MDS-Patienten gefördert werden konnte. Die niedrige Expression von Granzym B (zwischen 33% und 75%) und Perforin (zwischen 25% und 70%) in den Patienten konnte nach zehn Tage Stimulation auf das Niveau der gesunden Spender gebracht werden ($\geq 95\%$).

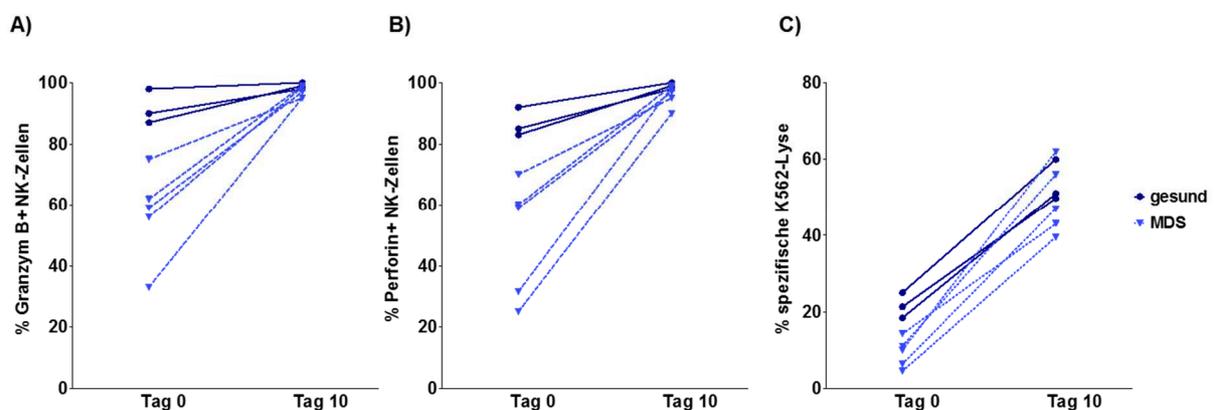


Abbildung 20: Wiederherstellung der Funktion und Perforin/Granzym B-Expression in NK-Zellen von MDS-Patienten nach Stimulation. NK-Zellen von fünf MDS-Patienten und drei altersgleichen gesunden Spendern wurden zehn Tage lang durch die Zugabe von Feeder-Zellen (bestrahlte K562 und PBMC-Mischung aus drei verschiedenen *Buffy coats*) und in Gegenwart von IL-2 stimuliert. Anschließend wurde die Expression von Granzym B (A) und Perforin (B), sowie die Zytotoxizität der stimulierten NK-Zellen (C) ermittelt.

Ähnliches wurde bei der Zytotoxizität der NK-Zellen beobachtet. Bei allen fünf Gruppe 2-Patienten konnte eine gesteigerte Zytotoxizität auf 40-60% festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die funktionale Defizienz nach der Stimulation und Expansion der NK-Zellen vollständig wiederhergestellt werden konnte, und zwar sowohl auf der Ebene der Zytotoxizität, als auch in der Beladung der zytotoxischen Granula, d.h. es handelt sich bei der beobachteten funktionalen Defizienz der NK-Zellen in MDS-Patienten um einen reversiblen Prozess.

3.5 Analyse der CD56^{dim} und CD56^{bright} Subpopulationen

Nachdem die funktionalen Eigenschaften von NK-Zellen in Patienten ausführlich analysiert wurden, sollten die phänotypischen Merkmale näher studiert und mit der Funktion korreliert werden. Im Laufe der Untersuchungen wurde deutlich, dass die CD56^{bright} Subpopulation in einigen Patientenproben verstärkt vorhanden war. Um es genauer zu betrachten, wurde die Frequenz der CD56^{bright} NK-Zellen in beiden Kohorten miteinander verglichen, wobei eine signifikant erhöhte Frequenz in der Patientenkohorte gegenüber der gesunden Personen festgestellt werden konnte (gesund: 6,48%±0,6; MDS 13,7%±1,7; p=0,0076) (Abbildung 21). Dabei gab es keinen Zusammenhang mit der NK-Zellfrequenz, da die übermäßige Frequenz der CD56^{bright} NK-Zellen sowohl bei Patienten mit normalen, als auch mit verminderter NK-Zellfrequenz (1-2%) beobachtet werden konnte. In Abbildung 21B ist eine durchflusszytometrische Messung von NK-Zellen aus PB eines gesunden Spenders (oben) und zweier MDS-Patienten (unten) exemplarisch dargestellt. Die Frequenz der CD56^{bright} Subpopulation innerhalb der NK-Zellen des gesunden Spenders beträgt 3%. 63% der NK-Zellen in einem Patienten mit niedriger NK-Zellfrequenz (1,5%) und 39% in einem Patient mit normaler NK-Zellfrequenz (5,4%) bestehen aus CD56^{bright} Zellen.

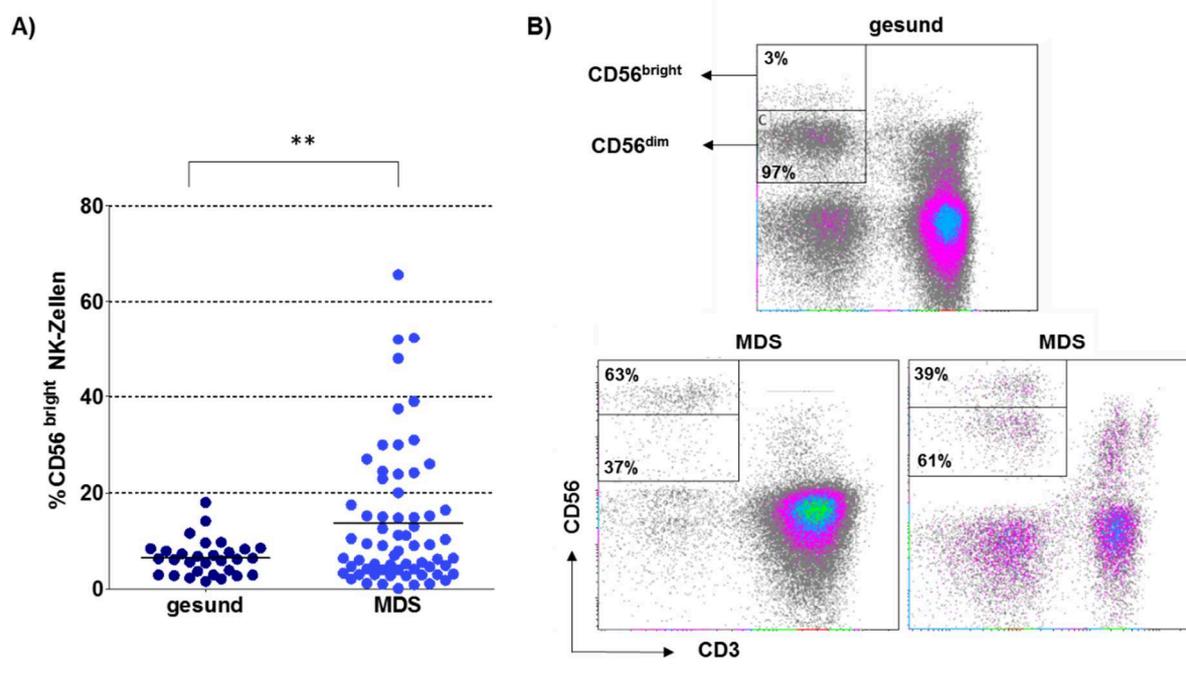


Abbildung 21: Erhöhte Frequenz der CD56^{bright} Subpopulation in MDS-Patienten. (A) Frequenz der CD56^{bright} Zellen innerhalb der NK-Zellen in 65 MDS-Patienten und 30 altersgleichen gesunden Spendern. (** $P < 0,01$). **(B)** Repräsentative *Dot plots* der CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zellen in einem altersgleichen gesunden Spender (oben) und zwei MDS-Patienten (unten). Die Frequenzen beziehen sich auf NK- Zellen (CD56⁺CD3⁻).

Als nächstes wurde überprüft, ob die erhöhte Frequenz der CD56^{bright} NK-Zellen mit einer Erhöhung der absoluten Zellzahl zusammenhängt (Abbildung 22A). Trotz der signifikant erhöhten Frequenz der CD56^{bright} NK-Zellen in Patienten, war die Zellzahl vergleichbar zu der Zellzahl gesunder Spender (gesund: $16,7 \pm 1,9$; MDS $14,3 \pm 2,6$; $p = 0,5652$). Die Zellzahl der CD56^{dim} NK-Zellen (Abbildung 22B) hingegen war in Patientenkohorte signifikant stark vermindert (gesund: $288,9 \pm 31$; MDS $108,5 \pm 16$; $p < 0,0001$).

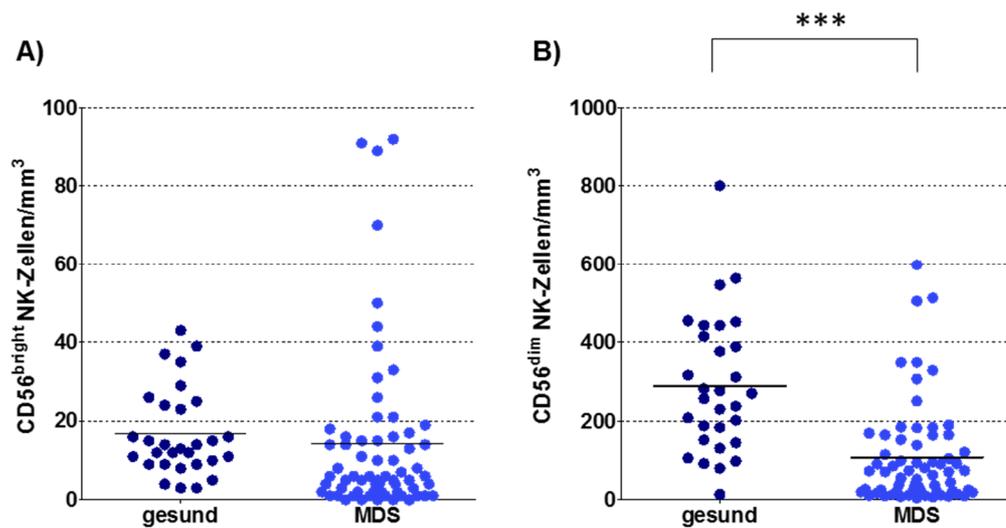


Abbildung 22: stark verringerte Zellzahl der CD56^{dim} Subpopulation in MDS-Patienten. Absolute Zellzahl von CD56^{bright} (A) und CD56^{dim} (B) in 65 MDS-Patienten und 30 altersgleichen gesunden Spendern. (**P<0,001)

Um die Ursache für die funktionale Defizienz der NK-Zellen der MDS-Patienten aufzuklären, wurden die Zellzahl und -Frequenz der CD56^{bright} und CD56^{dim} Subpopulationen in Gruppe 1- (normale Funktion der NK-Zellen) und Gruppe 2- Patienten (verminderte Funktion der NK-Zellen) separat analysiert (Abbildung 23). Gruppe 2- Patienten zeigten dabei eine signifikant erhöhte Frequenz der CD56^{bright} Subpopulation (Gruppe1 vs. Gruppe 2: $p=0,1534$; Gruppe 1 vs. gesund: $p=0,3111$; Gruppe 2 vs. gesund: $p=0,0008$) (Abbildung 23A), sowie eine stark verringerte Zellzahl der CD56^{dim} Subpopulation (Gruppe1 vs. Gruppe 2: $p=0,0170$; Gruppe 1 vs. gesund: $p=0,2411$; Gruppe 2 vs. gesund: $p<0,0001$) (Abbildung 23D).

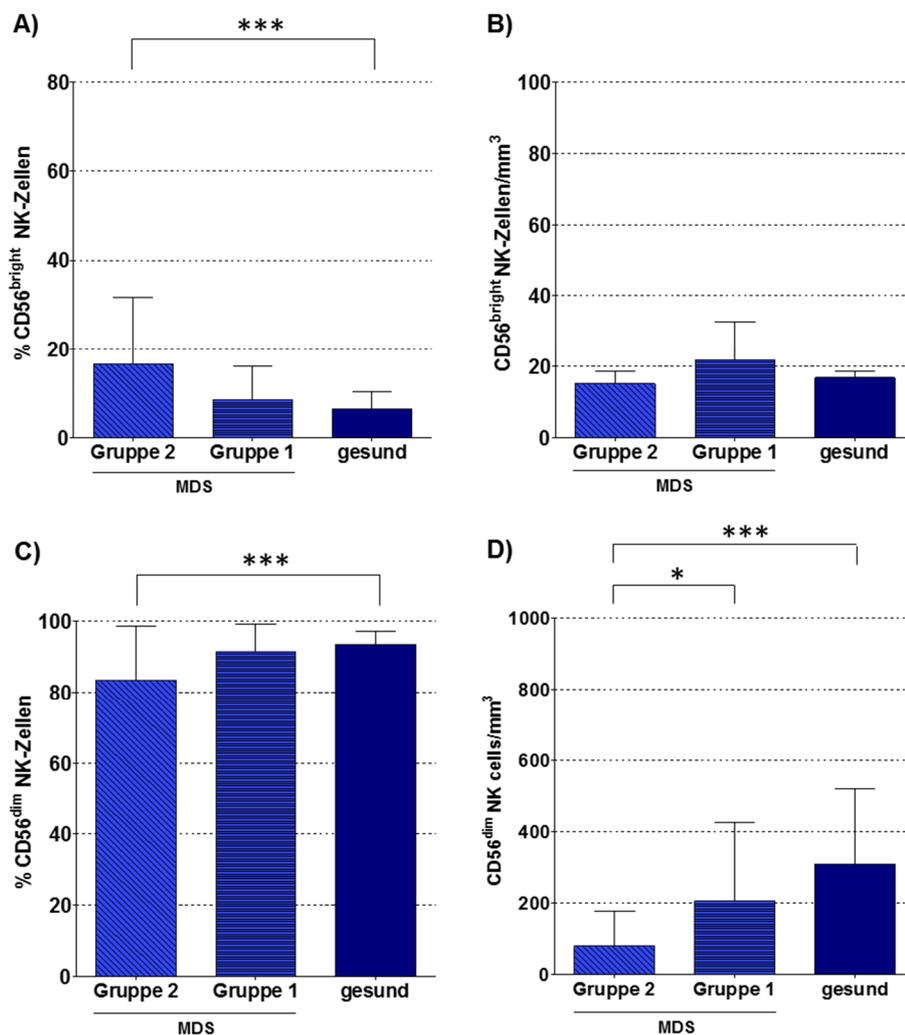


Abbildung 23: starke Verringerung der CD56^{dim} Zellzahl und erhöhte CD56^{bright} Frequenz in Patienten mit funktional-defizienten NK-Zellen. Frequenz (A) und Zellzahl (B) der CD56^{bright} NK-Zellen und Frequenz (C) und Zellzahl (D) der CD56^{dim} NK-Zellen in Gruppe 1-Patienten (mit funktionalen NK-Zellen, Zytotoxizität $\geq 20\%$, n=35), Gruppe 2-Patienten (mit funktional-defizienten NK-Zellen, Zytotoxizität $< 20\%$, n=8) und altersgleichen gesunden Spender (n=30) (*P<0,05, ***P<0,001).

Im Gegensatz dazu wurde bei den Gruppe 1-Patienten kein Unterschied in der Frequenz und Zellzahl der beiden Subpopulationen zur Kontrollkohorte festgestellt. Der Vergleich von Gruppe 1- und Gruppe 2-Patienten zeigte eine signifikant reduzierte Zellzahl der CD56^{dim} Subpopulation in Gruppe 2-Patienten. Sowohl Gruppe 1- als auch Gruppe 2-Patienten zeigten keinen Unterschied in der Zellzahl der CD56^{bright} Subpopulation im Vergleich zur Kontrollkohorte (Gruppe1 vs. Gruppe 2: p=0,4592; Gruppe 1 vs. gesund: p=0,4566; Gruppe 2 vs. gesund: p=0,6952) (Abbildung 23B).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei MDS-Patienten eine signifikante Erhöhung der Frequenz der CD56^{bright} NK-Zellen zu sehen ist, die mit einer starken Verminderung der CD56^{dim} NK-Zellzahl einhergeht und, dass diese Unterschiede verstärkt bei Gruppe 2-Patienten beobachtet werden konnten.

3.6 Spontane Apoptose der NK-Zellen

Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod. Durch Markierung der Zellen mit Annexin V können apoptotischen Zellen durchflusszytometrisch bestimmt werden. Annexin V kann in frühapoptotischen Zellen an Phosphatidylserine binden, die während der Apoptose auf die Außenseite der Membran transportiert werden. Da die Membran in nekrotischen (spätapoptotischen) Zellen durchlässig ist, kann Annexin V die Zellen durchdringen und ebenfalls an der Innenseite der Membran binden. Daher ist eine Kombination von Annexin V mit DNA-bindenden Farbstoffen, wie Propidium Iodid oder 7-AAD notwendig, um die apoptotischen von nekrotischen Zellen zu unterscheiden.

Wie aus den Ergebnissen in Abschnitt 3.5 ersichtlich, ist sowohl die Frequenz, als auch die absolute Zellzahl der CD56^{dim} Subpopulation in MDS-Patienten stark verringert. Um zu überprüfen, ob dieses Phänomen mit der Apoptose dieser Zellen korreliert, wurde die Apoptose in NK-Zellsubpopulationen der Patienten und altersgleichen gesunden Spendern untersucht (Abbildung 24).

Nach diesen Analysen konnte kein Unterschied in der Frequenz apoptotischer Zellen der CD56^{dim} (Abbildung 24A) und CD56^{bright} Subpopulationen (Abbildung 24B) zwischen beiden Kohorten ermittelt werden (CD56^{dim}: $p=0,7835$; CD56^{bright}: $p=0,4102$), wobei festgestellt werden muss, dass es in den MDS-Patienten sehr starke Schwankungen in der Apoptoserate gibt. Unabhängig von der Erkrankung zeigte sich, dass die CD56^{dim} Zellen in beiden Kohorten eine signifikant höhere spontane Apoptose aufwiesen als die CD56^{bright} Zellen. (gesund: CD56^{dim} $20,8\% \pm 3,6$; CD56^{bright}: $7,2\% \pm 0,8$; $p < 0,0001$) (MDS: CD56^{dim} $22\% \pm 3,2$; CD56^{bright}: $8\% \pm 0,8$; $p=0,0001$). Insgesamt legen diese Ergebnisse nahe, dass die starke Verminderung der CD56^{dim} NK-Zellen in MDS-Patienten nicht auf einer erhöhten Apoptoserate beruht.

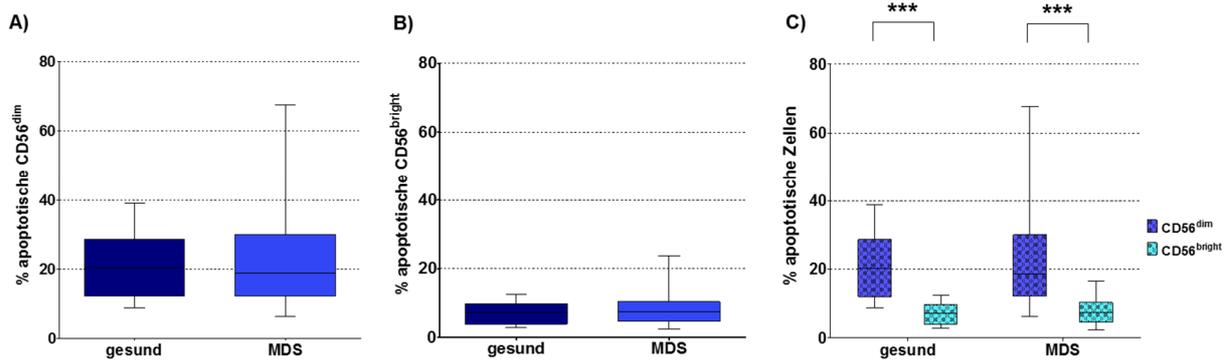


Abbildung 24: Apoptose der CD56^{dim} und CD56^{bright} Subpopulationen in Patienten und gesunden Spendern. Frequenz (%) der apoptotischen Zellen in CD56^{dim} (A) und CD56^{bright} (B) Subpopulationen von 20 MDS-Patienten und 13 altersgleichen gesunden Spendern mittels Annexin V/7-AAD-Analyse. Apoptotische Zellen wurden dabei als Annexin V-positiv und 7-AAD-negativ definiert. (C) Das Diagramm stellt den signifikanten Unterschied der Frequenz apoptotischen Zellen zwischen den CD56^{dim} und CD56^{bright} Subpopulationen in sowohl MDS-Patienten als auch gesunden Spendern dar. (***) $P < 0,001$

3.7 Analyse der Rezeptoren der NK-Zellen

Im Folgenden sollte analysiert werden, ob die Funktionsdefizienz der NK-Zellen von MDS-Patienten mit der Expression bestimmter inhibitorischer oder stimulatorischer NK-Zellrezeptoren korreliert. Daraufhin wurde von 30 MDS-Patienten und 20 altersgleichen gesunden Spendern eine genetische KIR-Typisierung durchgeführt (Ordonez, *et al* 2012). Tabelle 6 stellt die KIR-Genotypen in den Patienten und den gesunden Spendern dar (Uhrberg, *et al* 1997).

Anschließend wurde mittels Multiparameter-Durchflusszytometrie die Expression verschiedener KIR (KIR2DL1/S1, KIR2DL2/L3/S2 und KIR3DL1) und NKG2A auf der Oberfläche ermittelt. Basierend auf diesen Daten wurde ein Diagramm über das KIR-Repertoire der NK-Zellen in der Patienten- und Kontrollkohorte erstellt (Abbildung 25A). Es stellte sich heraus, dass sich die NK-Zellen von MDS-Patienten und den gesunden Spendern in verschiedenen Parametern unterscheiden. Die NK-Zellen der Patienten wiesen eine auffallend hohe Frequenz von KIR⁺NKG2A⁻ Zellen auf (gesund: 16,6%±1,3; MDS: 30,8%±4,3; $p=0,0074$). Bei diesen Zellen handelt es sich wahrscheinlich um unreife NK-Zellen, die aufgrund fehlender Lizensierung hyporesponsiv sind. Daher wurde die Frequenz dieser Zellen der Zytotoxizität der NK-

Zellen gegenübergestellt, wobei jedoch kein Zusammenhang festgestellt werden konnte (Lineare Regression $p=0,6914$) (Abbildung 25B).

Tabelle 6: KIR-Typisierung der Patienten und gesunden Spender

Haplotyp	Genotyp	2DL1	2DL2	2DL3	2DL5	3DL1	3DL2	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1	n (Patient)	n (gesund)
AA	1	x		x		x	x				x			12	7
AB	2	x	x	x		x	x		x		x			6	2
AB	3	x	x	x	x	x	x		x	x	x			1	2
AB	4	x		x	x	x	x	x			x	x	x	3	3
BB	5	x	x		x	x	x		x	x	x			1	3
AB	6	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	1
AB	7	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	1	0
AB	12	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	1	1
AB	15	x	x	x		x	x				x			1	0
BB	17	x	x		x	x	x	x	x		x	x	x	1	0
BB	25	x	x		x		x	x	x	x		x	x	1	0
BB	30	x	x	x	x		x	x	x	x		x	x	1	1
BB	35	x	x	x	x		x	x	x	x			x	1	0

Innerhalb der KIR-Familie konnte eine Verschiebung des NK-Zellrepertoires der Patienten hin zu einer bevorzugten Expression von KIR2DL2/3, der als erster inhibitorischen KIR auf der Oberfläche der NK-Zellen exprimiert wird, beobachtet werden ($p=0,0180$). Im Gegensatz dazu war die Expression der „späten“ KIR2DL1 ($p=0,0004$) und KIR3DL1 ($p=0,0210$) in Patienten stark reduziert. Innerhalb der Subpopulationen mit zwei bzw. drei Rezeptoren auf der Oberfläche (KIR oder NKG2A), welche eine sehr reife Population von NK-Zellen darstellen, war die Frequenz der Subpopulationen mit KIR2DL1-Expression deutlich geringer als in gesunden Spendern. Beim Vergleich der NK-Zellen, die nur jeweils einen der drei KIR exprimieren, konnte eine starke Tendenz zur KIR2DL3 Expression in Patienten

nachgewiesen werden (Abbildung 25 C). 81% der NK-Zellen in Patienten mit ein KIR auf der Oberfläche exprimieren KIR2DL3, während diese Zahl bei gesunden Spendern 41% beträgt ($P < 0,001$).

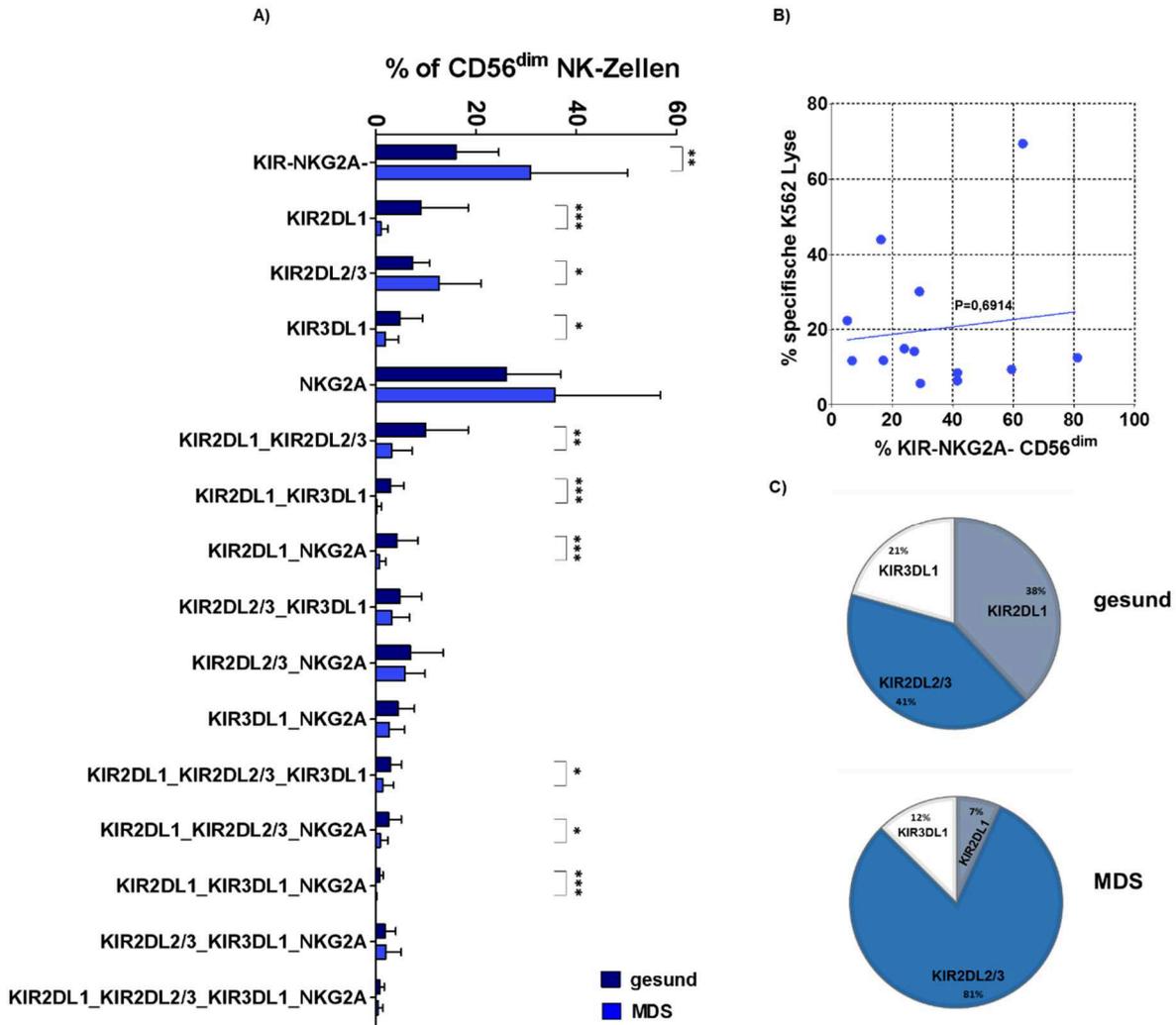


Abbildung 25: Unreifer Phänotyp der NK-Zellen in MDS-Patienten. (A) KIR-Repertoire, basierend auf der Expression von KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR3DL1 und NKG2A, in CD56^{dim} NK-Zellen von 30 Patienten und 20 altersgleichen gesunden Spendern. **(B)** Analyse der Korrelation von Zytotoxizität und Frequenz der KIR-NKG2A⁻ in der NK-Zellen von Patienten (n=13). **(C)** Kuchendiagramme zur Darstellung der Frequenz der CD56^{dim} NK-Zellen, die jeweils einen einzigen KIR (KIR2DL1, KIR2DL2/3 oder KIR3DL1) exprimieren, in gesunden Spendern (oben) und Patienten (unten). (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$)

Aufgrund der Verwendung eines Antikörpers gegen KIR2DL2/L3/S2 (Klon GL183) bei den durchflusszytometrischen KIR-Analysen konnte zwischen diesen drei KIR nicht unterschieden werden. Das Gleiche gilt für den Antikörper gegen KIR2DL1/S1 (Klon HP-MA4 oder EB6B). Aus diesem Grund wurde das KIR-Repertoire von Patienten, die homozygot für Haplotyp-Gruppe *A* (*AA*) und heterozygot bzw. homozygot für Haplotyp-Gruppe *B* (*AB*, *BB*) sind, separat analysiert. Individuen der Haplotyp-Gruppe *AA* besitzen kein KIR2DL2, KIR2DS2 und KIR2DS1, so dass das detektierte Signal die Expression von KIR2DL3 bzw. KIR2DL1 eindeutig widerspiegelt. Diese Daten zeigen vergleichbare Ergebnisse zur Abbildung 25A.

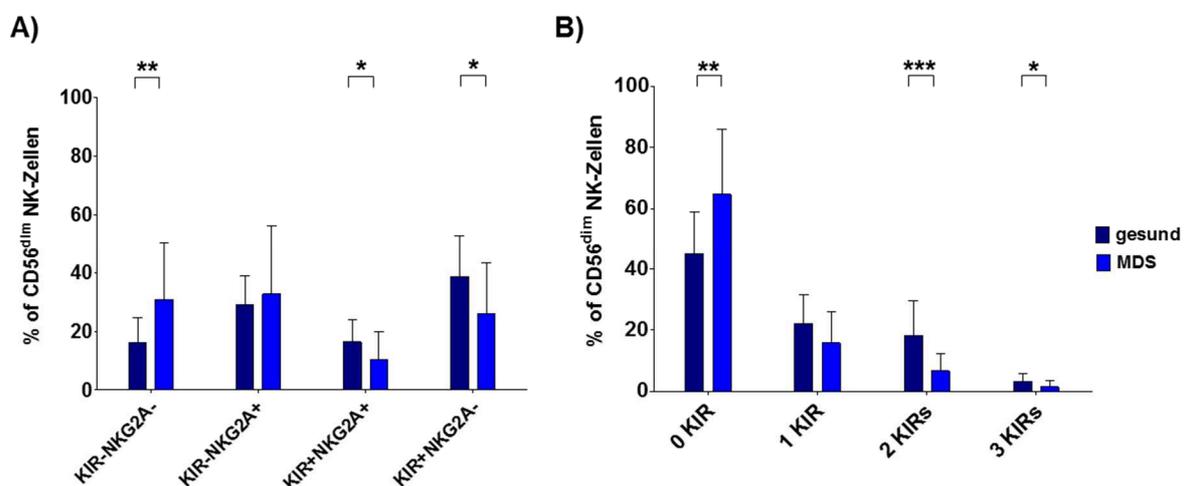


Abbildung 26: Expression der verschiedenen Subpopulationen in CD56^{dim} NK-Zellen, basierend auf der Expression von KIR und NKG2A. (A) Frequenz der vier NK-Zell Subpopulationen basierend auf die Expression von KIR (KIR2DL1, KIR2DL2/3 und KIR3DL1) und NKG2A in CD56^{dim} NK-Zellen. **(B)** Frequenz der CD56^{dim} NK-Zellen, die 0-3 KIR auf der Oberfläche tragen. Die Analysen wurden mit 30 MDS Patienten und 20 altersgleichen gesunden Spendern durchgeführt. (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001)

Basierend auf der Expression von KIR und NKG2A können vier Subpopulationen der NK-Zellen definiert werden. Während der Entwicklung wird als erstes NKG2A und anschließend KIR auf der Oberfläche exprimiert, so dass die KIR⁻NKG2A⁻ Subpopulation die unreiferen Zellen und die KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen die terminal-differenzierten reifen NK-Zellen darstellen. In der Patientenkohorte wurde, wie bereits in Abbildung 25 gezeigt, eine starke Erhöhung der Frequenz der unreifen KIR⁻NKG2A⁻

Subpopulation ($p=0,0035$) beobachtet, während es zu einer Verminderung der reiferen KIR^+NKG2A^+ und KIR^+NKG2A^- NK-Zellen kommt (Abbildung 26A).

Übereinstimmend mit den Analysen der vollständigen NK-Zellrepertoires (Abbildung 25A) ergab die Analyse der NK-Zellen in Abhängigkeit von der Anzahl der KIR auf der Oberfläche ebenfalls eine Erhöhung der Frequenz von unreiferen Zellen. Die Frequenz der NK-Zellen ohne KIR auf der Oberfläche war in der Patientenkohorte signifikant erhöht ($p=0,0042$), während die NK-Zellen, die zwei bzw. drei KIR tragen, deutlich verringert waren ($p=0,0002$, $p=0,0386$).

Als nächstes sollte die Expression weiterer Marker wie CD57 und CD62L, die den Reifegrad der NK-Zellen widerspiegeln, untersucht werden. Die Expression von CD57 ist auf $CD56^{dim}$ NK-Zellen beschränkt und geht mit einem Verlust der Proliferationsstärke und einer erhöhten zytotoxischen Kapazität einher, was auf einen höheren Differenzierungsgrad hindeutet (Lopez-Verges, *et al* 2010). CD57 wird in $CD56^{bright}$ NK-Zellen kaum oder gar nicht exprimiert. CD62L spielt bei der Migration der naiven Lymphozyten in lymphatisches Gewebe eine wichtige Rolle und wird überwiegend in $CD56^{bright}$ NK-Zellen exprimiert.

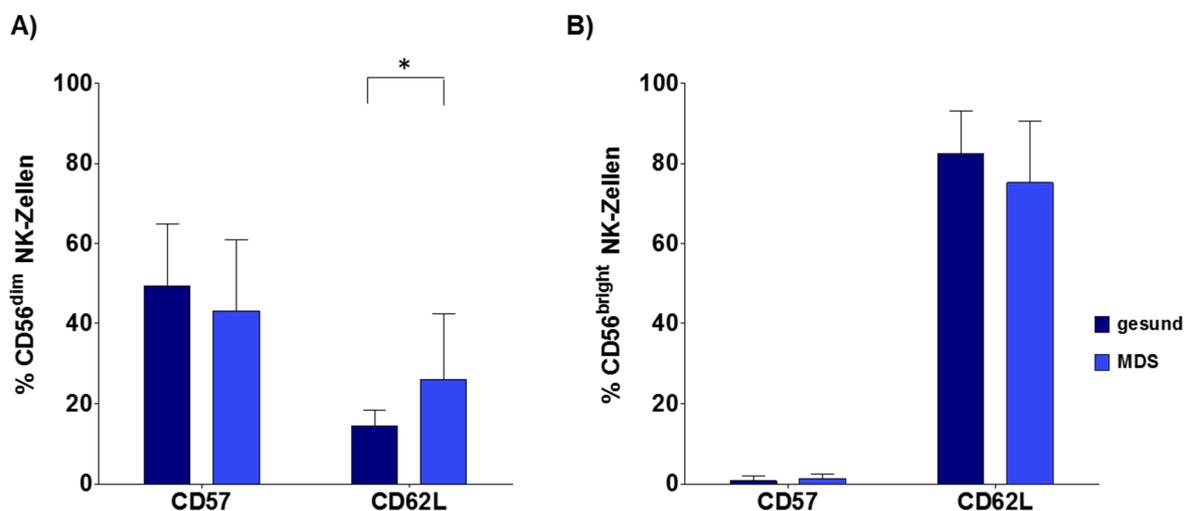


Abbildung 27: Erhöhte Expression von CD62L in $CD56^{dim}$ NK-Zellen von MDS-Patienten. Expression von CD57 und CD62L wurde in $CD56^{dim}$ (A) und $CD56^{bright}$ NK-Zellen (B) von 16 MDS-Patienten und zehn gesunden Spendern durchflusszytometrisch untersucht. (* $P<0,05$)

$CD56^{dim}$ NK-Zellen der Patienten wiesen eine signifikant vermehrte CD62L-Expression auf (gesund: $14,4\% \pm 1,2$; MDS: $25,8\% \pm 5,2$; $p=0,0379$), während kein Unterschied in

der CD57-Expression zwischen beiden Kohorten festgestellt wurde (gesund: 49,3%±4,7; MDS: 43%±5,7; p=0,4076) (Abbildung 27A). Bei Betrachtung der CD56^{bright} NK-Zellen in beiden Kohorten wurde, eine hohe CD62L-Expression und eine sehr geringe bzw. keine Expression von CD57 beobachtet. Dabei wurde jedoch kein Unterschied zwischen beiden Kohorten festgestellt (Abbildung 27B).

Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass die NK-Zellen von MDS-Patienten einen unreifen Phänotyp aufweisen. Innerhalb der CD56^{dim} NK-Zellen zeigten die Patienten eine signifikant erhöhte Frequenz der KIR⁻NKG2A⁻ Zellen, wohingegen die Expression von reiferen Subpopulationen KIR⁺NKG2A⁺ und KIR⁺NKG2A⁻ reduziert war. Die dominante Expression von KIR2DL3, die geringe Frequenz der NK-Zellen mit mehreren KIR auf der Oberfläche und die vermehrte Expression von CD62L auf den CD56^{dim} NK-Zellen der Patienten bestätigen diese Hypothese.

3.8 *in vitro* Generierung der NK-Zellen

Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob die beobachtete NK-Zelldefizienz und der funktionale Defekt auf eine unvollständige Ausdifferenzierung der hämatopoietischen Stammzellen (HSC) der MDS-Patienten zu reifen NK-Zellen zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck wurden CD34⁺ HSC aus MDS-Patienten isoliert und deren Differenzierungspotential in die NK-Zell Entwicklungslinie mit Hilfe eines bereits in unserem Labor etablierten Protokolls ausgetestet (Brands 2014). Die isolierten CD34⁺ HSC aus dem Knochenmark wurden vom Forschungslabor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie zur Verfügung gestellt und zusammen mit *Feeder*-Zellen (murinen EL-08 Zellen oder pädiatrischen MSC) in einem Expansionsmedium (NK1-Medium) kultiviert. Die beinhalteten Zytokine IL-3 und SCF sorgen dabei für eine Expansion der CD34⁺ HSC. Nach einer Woche wird durch die Zugabe der Zytokine IL-2 und IL-15 (NK2-Medium) die Ausdifferenzierung der expandierten HSC zur NK-Zelle in Gang gesetzt, wodurch nach weiteren 4 Wochen reife NK-Zellen, die NKG2A und KIR tragen, geerntet werden können (Abbildung 28).

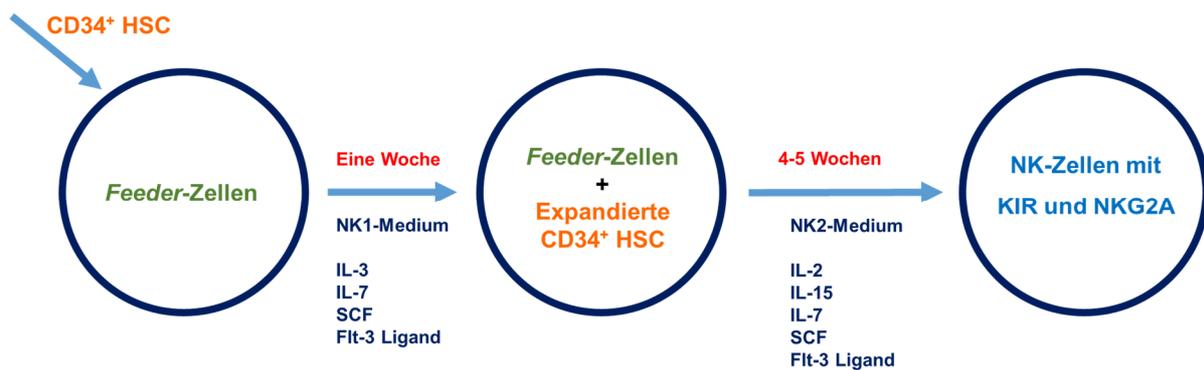


Abbildung 28: Schematische Darstellung der *in vitro* NK-Zellgenerierung. Vor Beginn der NK-Zellgenerierung wurden die *Feeder*-Zellen (EL-08-Zellen oder pädiatrische MSC) in einer 24-Well-Platte ausgesät und bestrahlt. Die isolierten CD34⁺ HSC wurden zusammen mit den *Feeder*-Zellen in NK1-Medium (IL3, IL-7, SCF und Flt-3 Ligand) kultiviert. Nach einer Woche wurde das NK1-Medium durch NK2-Medium (IL-2, IL-15, IL-7, SCF und Flt-3 Ligand) ersetzt. Die Zellen wurden für weitere 4-5 Wochen kultiviert. Der Ablauf der Generierung wurde jede Woche anhand durchflusszytometrischer Messungen dokumentiert.

In diesen Experimenten wurden insgesamt drei MDS-Patienten, die den drei verschiedenen, von uns definierten, NK-Zell-Gruppen 1, 2 und 3 angehörten sowie ein altersgleicher gesunder Spender untersucht. Es konnten in allen drei Patientengruppen einschließlich eines NK-Zell-defizienten Patienten (Gruppe 3), erfolgreich NK-Zellen aus CD34⁺ HSC generiert werden. Jedoch fiel auf, dass der Ablauf der NK-Zellgenerierung in Gruppe 2 und Gruppe 3-Patienten im Vergleich zu dem Gruppe 1-Patienten und zu dem gesunden Spender deutlich langsamer war.

Als erstes wurden CD34⁺ Zellen aus Knochenmark einer Patientin (funktionale NK-Zellen, Niedrigrisiko-MDS) und eines altersgleichen gesunden Spenders ausdifferenziert (Abbildung 29). Bei der Patientin handelte es sich um eine 72-jährige Frau, die sowohl bezüglich ihrer NK-Zellzahl, als auch NK-Zellfunktion, Werte im Normbereich aufwies und somit zur Gruppe 1 gehörte (Siehe 3.3.1). Bei der Probe des 67-jährigen gesunden Spenders wurden die CD34⁺ Zellen ebenfalls aus dem Knochenmark isoliert. Als *Feeder*-Zellen wurden pädiatrische MSC verwendet, die durch eine Kooperation mit der Klinik für Kinder-Onkologie, Hämatologie und Klinische Immunologie zur Verfügung gestellt wurden. Allgemein wurde ein vergleichbarer Ablauf der Differenzierung in beiden Kulturen beobachtet. Anhand von wöchentlichen

durchflusszytometrischen Messungen ab der zweiten Woche konnte der Ablauf und die Entwicklung der NK-Generierung dokumentiert werden (Abbildung 29).

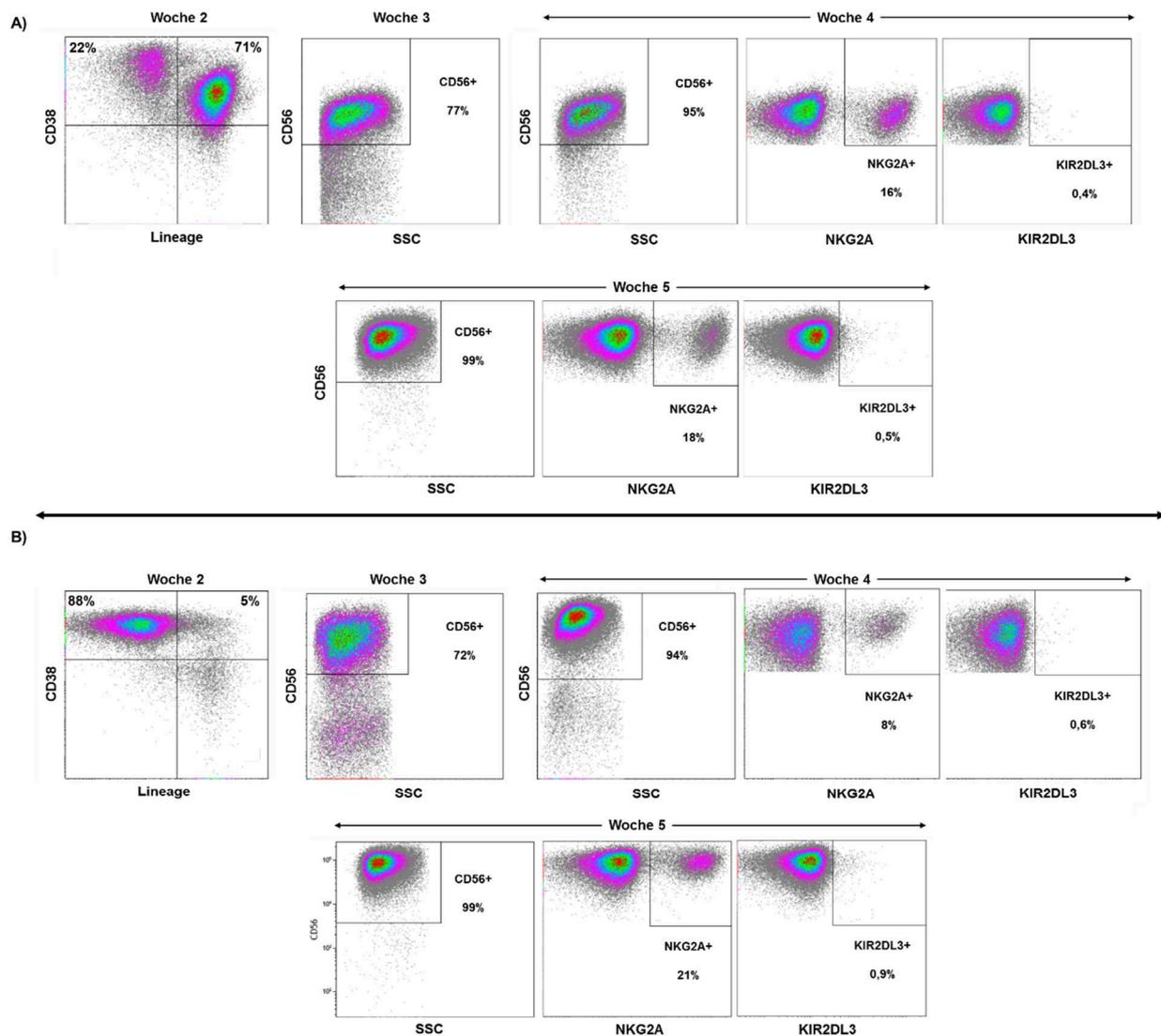


Abbildung 29: Vergleichbarer Ablauf der NK-Zelldifferenzierung aus CD34⁺ Zellen einer Gruppe 1 Patientin und einem altersgleichen gesunden Spender. Angereicherte CD34⁺ Zellen aus dem Knochenmark eines gesunden Spenders (**A**) und einer Patientin mit Niedrigrisiko-MDS (**B**) wurden auf MSC *Feeder*-Zellen zu NK-Zellen differenziert. Die Expression von CD38 und der *Lineage*-Marker wurde in der zweiten Kulturwoche ermittelt. In der dritten Woche wurde bereits die Expression des CD56-Marker festgestellt und in der vierten und fünften Woche wurde die Expression von NKG2A und KIR2DL3 auf den NK-Zellen gemessen.

In der zweiten Woche konnte in beiden Kulturen eine Differenzierung Richtung lymphatischer Vorläuferzellen festgestellt werden. Diese äußerte sich durch den

Verlust von CD34 und eine erhöhte Expression von CD38. Mittels der sogenannten *Lineage*-Marker (Lin) sollten die verschiedenen lymphoiden Differenzierungsmarker auf der Oberfläche detektiert werden (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, und CD56). Obwohl in der ersten Kulturwoche deutlich mehr Lin⁺ Zellen in der Differenzierungskultur mit gesunden CD34⁺ Zellen vorhanden waren (gesund: 71%; MDS: 5%), zeigten beide Kulturen in den nächsten Wochen ein vergleichbare Expression von CD56. In der fünften Woche bestanden beide Kulturen zu 99% aus CD56⁺ Zellen, die eine vergleichbare Expression von NKG2A (gesund: 18%; MDS: 21%) und KIR2DL3 (gesund: 0,5; MDS: 0,9) aufwiesen.

In einem weiteren Experiment wurde die NK-Generierung mit CD34⁺ Zellen aus einer Gruppe 2-Patientin (eingeschränkte NK-Zellfunktion, Niedrigrisiko-MDS) durchgeführt (Abbildung 30).

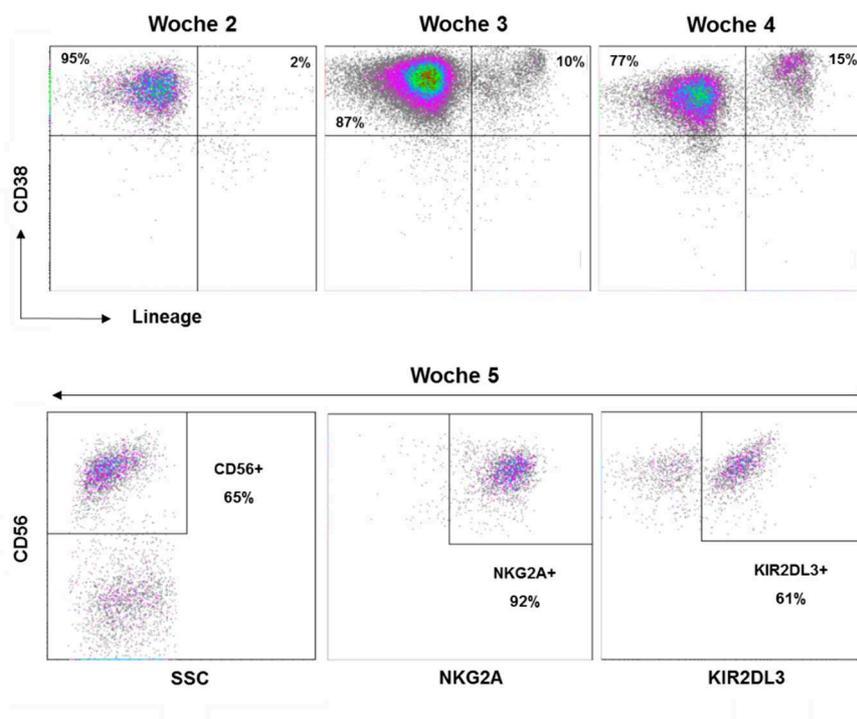


Abbildung 30: Verzögerter Ablauf der NK-Zelldifferenzierung aus CD34⁺ HSC in einer Gruppe 2-Patientin. CD34⁺ HSC, isoliert aus Knochenmark der Patientin, wurden in Gegenwart von humanen MSC fünf Wochen lang kultiviert. Die Expression von CD38 und *Lineage*-Markern wurde in der zweiten, dritten und vierten Woche durchflusszytometrisch ermittelt. In der fünften Woche der Differenzierung wurde die Expression der NK-Zellmarker CD56, NKG2A und KIR2DL3 ermittelt.

Auffallend war, dass nur 2% der Zellen in der zweiten Woche *Lineage*-Marker exprimierten. Im Verlauf der dritten und vierten Kulturwoche konnte ein Anstieg der Lin⁺-Zellen auf 10% bzw. 15% beobachtet werden. Erst in der fünften Woche waren reife NK-Zellen mit NKG2A und KIR2DL3 auf der Oberfläche nachweisbar. 65% der Zellen exprimierten CD56, davon 92% NKG2A⁺ und 61% KIR2DL3⁺. NKG2A ist der erste inhibitorische Rezeptor und KIR2DL3 der erste KIR, die im Laufe der Entwicklung auf der Oberfläche der NK-Zellen exprimiert werden. Im Vergleich zu der NK-Zellgenerierungen mit den HSC aus dem gesunden Spender und Gruppe 1-Patienten konnte ein deutlich verlangsamter Ablauf der NK-Zellentwicklung beobachtet werden. Nach fünf Wochen exprimierten nur 65% der Zellen den NK-Zell-Marker CD56.

Zum Schluss wurden CD34⁺ Zellen aus dem Knochenmark eines Patienten mit NK-Zelldefizienz (Gruppe 3) in der Differenzierungskultur angesetzt (Abbildung 31). Als *Feeder*-Zellen wurden EL-08 Zellen verwendet. Als Kontrolle wurden CD34⁺ Zellen, isoliert aus einem Nabelschnurblut, ebenfalls auf EL-08 Zellen differenziert. Bereits in den ersten Wochen konnte ein Unterschied zwischen beiden Kulturen festgestellt werden. In der Patientenkultur konnte in den ersten drei Wochen nur eine sehr langsame Expansion der CD34⁺ Zellen beobachtet werden, so dass der Wechsel zu NK2-Medium erst ab der vierten Woche erfolgte.

Aufgrund der sehr geringen Zellzahl konnten die Zellen nur einmal in Woche 5 durchflusszytometrisch analysiert werden, die restlichen Zellen wurden für eine weitere Woche in Kultur behalten. Während in der Kontrollkultur in der fünften Woche fast alle Zellen CD56⁺ waren (Abbildung 31B, erster *Plot*), bestand die Patientenkultur zu diesem Zeitpunkt nur zur 24% aus CD56⁺ Zellen (Abbildung 31A, erster *Plot*). Die Expression von NKG2A und KIR2DL3 lag zu diesem Zeitpunkt in der Patientenkultur bei 62% bzw. 0,2% und in der Kontrollkultur bei 19% und 1%. In der sechsten Woche erreichte die CD56-Expression in der Patientenkultur 44%, von denen 88% NKG2A und 0,5% KIR2DL3 exprimierten. Zu diesem Zeitpunkt sind die Zellen in der Kontrollkultur bereits typischerweise terminal differenziert und größtenteils apoptotisch.

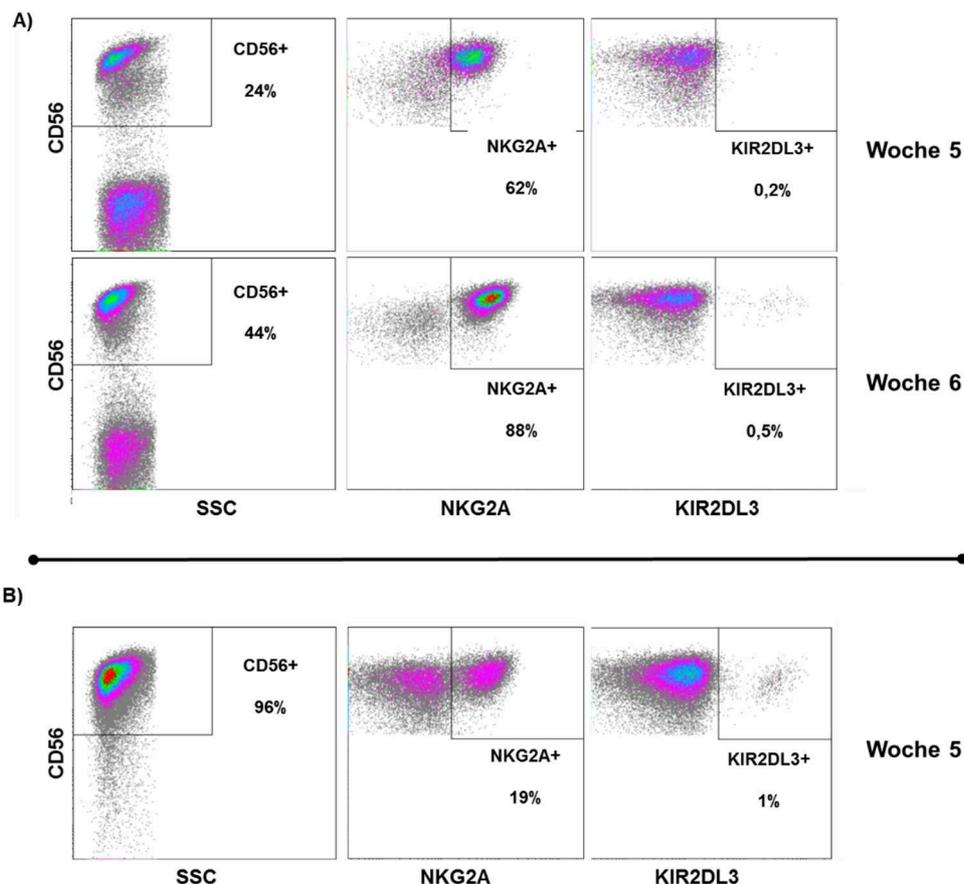


Abbildung 31: Verzögerte NK-Zelldifferenzierung der NK-Zellen aus CD34⁺ Zellen, isoliert aus Knochenmark von einem MDS-Patient mit NK-Zelldefizienz (Gruppe 3). (A) Die CD34⁺ Zellen des Patienten wurden auf EL-08 Feeder-Zellen kultiviert. Aufgrund der langsamen Expansion wurden die Zellen drei Wochen in NK1-Medium kultiviert. Anschließend erfolgte der Wechsel zu NK2-Medium. Durchflusszytometrisch wurden die Zellen in den Wochen 5 und 6 analysiert. Dabei wurde die Expression von CD56, NKG2A und KIR2DL3 ermittelt. (B) NK-Zelldifferenzierung mit CD34⁺ Zellen, isoliert aus Nabelschnurblut, auf EL-08 Zellen. Die *Dot plots* stellen die Expression von CD56, NKG2A und KIR2DL3 in der fünften Woche dar.

Mit den generierten NK-Zellen aus der Patientenkultur wurde anschließend ein Zytotoxizitätsassay durchgeführt. Als Kontrolle wurden die generierten NK-Zellen aus einer parallel dazu durchgeführten Kultur (vier Wochen alt, bereitgestellt von einer Kollegin) verwendet. Die Frequenz der CD56⁺-Zellen lag bei 85%. Obwohl die generierten NK-Zellen aus der Patientenkultur zwei Wochen älter waren, zeigten sie eine geringere Zytotoxizität im Vergleich zur den generierten NK-Zellen aus der

Kontrollkultur (CFSE+PI+ Zielzellen: 34,3% mit Kontrollkultur-NK-Zellen und 20,5% mit Patientenkultur-NK-Zellen) (Abbildung 32).

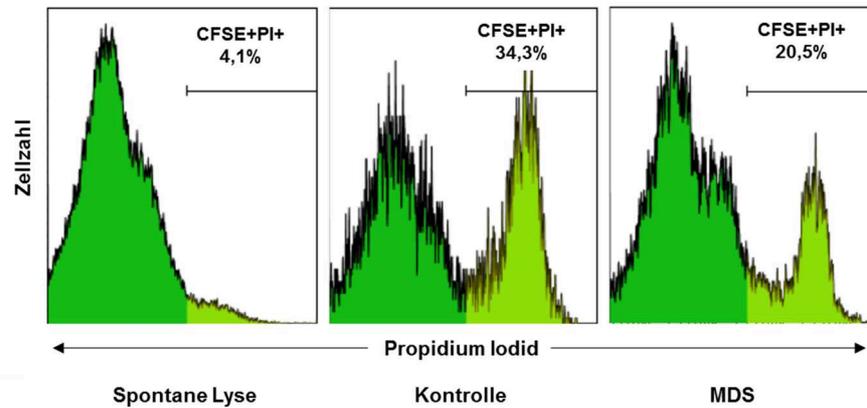


Abbildung 32: Die verminderte Zytotoxizität der generierten NK-Zellen aus CD34⁺ HSC eines Gruppe 3 Patienten. Das linke Histogramm stellt die spontane Lyse der K562 ohne Effektorzellen dar, das mittlere Histogramm die K562-Lyse durch generierte NK-Zellen, aus Nabelschnurblut HSC (Woche 4) und das rechte Histogramm die K562-Lyse durch die generierten NK-Zellen aus CD34⁺ HSC eines Gruppe 3 Patienten (Woche 6).

Zusammenfassend konnten bei allen drei MDS-Patienten aus HSC NK-Zellen generiert werden (Gruppe 1, 2 und 3). Jedoch fiel auf, dass bei den Gruppe 2- und Gruppe 3- Patienten die NK-Zellentwicklung deutlich langsamer verlaufen ist. Zudem war auffällig, dass die generierten CD56⁺ Zellen der Gruppe 2- und Gruppe 3- Patienten eine deutlich höhere Expression von NKG2A aufwiesen.

3.9 Klonale Beteiligung der NK-Zellen

Eine mögliche Ursache der in dieser Arbeit gezeigten strukturellen und funktionalen NK-Zelldefizienz könnte in der Beteiligung des malignen Klon an der lymphoiden Entwicklung in den MDS-Patienten, insbesondere in die NK-Zelllinie, liegen. Es gibt hierzu bisher keine systematischen Untersuchungen in der Literatur. Ein Standard-Verfahren, um das Ausmaß der klonalen genetischen Aberrationen in MDS-Patienten zu betrachten, ist die FISH-Methode. Diese Technik beruht auf der Hybridisierung von

DNA-Sonden, die spezifische chromosomale Strukturen identifizieren. FISH kann an Knochenmarkszellen, besonders erfolgreich an aufgereinigten CD34⁺ Zellen von Patienten, durchgeführt werden und trägt so zur Diagnostik der Krankheit bei. Wie bereits bekannt ist, gehören die myeloiden Blutzellen in MDS-Patienten zum malignen Klon. Es ist allerdings noch unklar, inwieweit die lymphoiden Blutzellen eine klonale Beteiligung aufweisen. Insgesamt wurden vier Patienten mit 5q-Syndrom in diese Untersuchungen eingeschlossen. Die Deletion im langen Arm des Chromosoms 5 (del(5q)) ist die häufigste Chromosomenaberration in MDS und kann anhand von spezifischen DNA-Sonden (Sonde EGR-1, Chromosombande 5q31) mittels FISH detektiert werden.

Als Maßstab für die Funktionalität der NK-Zellen wurden diese Zellen, basierend auf der Perforin-Expression, in zwei Populationen, Perforin⁻ und Perforin⁺, durchflusszytometrisch sortiert. Zusätzlich wurden von jedem Patienten die T- und B-Zellen sortiert. Die FISH-Analysen wurden mit den aufgereinigten Zellen im Institut für Humangenetik und Anthropologie der Uniklinik Düsseldorf durchgeführt. Abbildung 33 stellt eine repräsentative FISH-Analyse der NK-Zellen in einem Patient mit 5q-Syndrom dar.

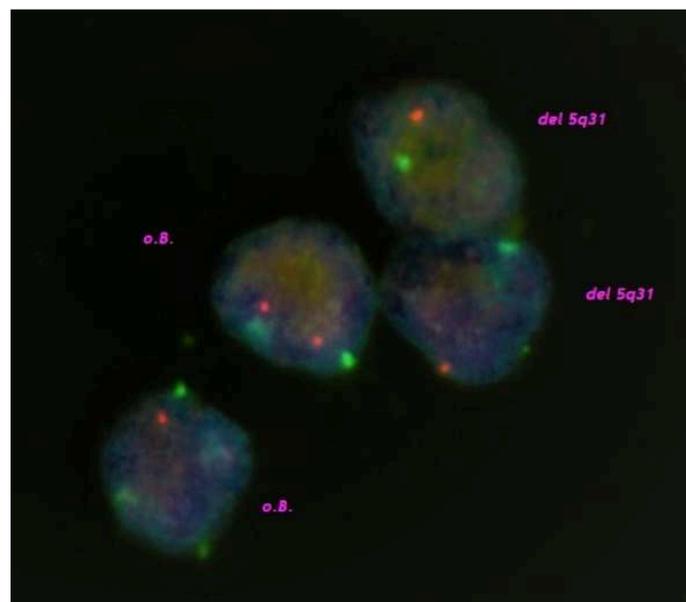


Abbildung 33: FISH-Analyse bei einem MDS-Patient mit 5q-Syndrom. Deletion des Locus EGR-1 in 5q31: nur 1 rotes Signal bei zwei erhaltenen grünen Signalen des Kontroll-Locus bei 5p. Jeweils zwei Signale zeigen einen Normalbefund (o.B (ohne Befund)).

Die Ergebnisse der FISH-Analysen der vier Patienten sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Bei zwei Patienten (Patient A und B) konnte eine eindeutige Beteiligung des malignen Klons in NK-Zellen festgestellt werden, während bei B-Zellen sehr geringe und bei T-Zellen keine aberranten Zellen beobachtet wurde. Interessanterweise gehörten alle aberranten NK-Zellen bei Patient B zur der Perforin⁻ Subpopulation, während die Perforin⁺ NK-Zellen keine Beteiligung des malignen Klons zeigten.

Tabelle 7: FISH-Analysen bei MDS-Patienten mit 5q-Syndrom

	Gruppe	Population	Anzahl der aberranten Zellen
Patient A	2	NK-Zellen	76%
		T-Zellen	9,60%
		B-Zellen	16,40%
Patient B	2	Perforin ⁻ NK-Zellen	86,0%
		Perforin ⁺ NK-Zellen	0%
		T-Zellen	0%
		B-Zellen	7%
Patient C	2	Perforin ⁻ NK-Zellen	0%
		Perforin ⁺ NK-Zellen	6%
		T-Zellen	0%
		B-Zellen	0%
Patient D	1	Perforin ⁻ NK-Zellen	6,2%
		Perforin ⁺ NK-Zellen	0%
		T-Zellen	0%
		B-Zellen	0%

Bei der Analyse der zwei weiteren Patienten (Patient C und D) konnte eine geringe Frequenz der aberranten Zellen in NK-Zellen beobachtet werden, die Werte waren jedoch sehr nah am sogenannten *cut-off* Limit (5%).

Zusammenfassend konnte anhand der FISH-Analysen festgestellt werden, dass die NK-Zellen die einzige Lymphozyten-Subpopulation waren, die konsistent und mit teilweise sehr hoher Frequenz die maligne genetische Aberration aufwies. Die Daten aus diesen Analysen deuten darauf hin, dass die frühe hämatopoietische Vorläuferzelle, aus der sich die aberrante Hämatopoiese in MDS-Patienten ergibt, keineswegs auf die Myelopoiese beschränkt ist sondern auch lymphoides Potential insbesondere in die Line der NK-Zellen aufweist.

4 Diskussion

MDS ist durch eine ineffektive Hämatopoiese, eine gestörte Blutzellausreifung im Knochenmark und dementsprechend einem Mangel an reifen Blutzellen im peripheren Blut gekennzeichnet. Dabei sind eine oder mehrere myeloiden Linien betroffen. Inwieweit die Lymphopoiese beeinträchtigt ist, ist bis heute nicht genau geklärt, jedoch gibt es eindeutige Hinweise darauf, dass lymphatische Zellen bei MDS durchaus in ihrer Funktion beeinträchtigt sind (Fozza, *et al* 2016). Eine niedrige Lymphozyten-Zellzahl ist dabei assoziiert mit einer ungünstigen Prognose, was darauf hindeutet, dass diese Zellen den Verlauf der Krankheit stark beeinflussen (Jacobs, *et al* 2010). In den vergangenen Jahren wurde immer mehr deutlich, dass die NK-Zellen von MDS-Patienten phänotypische und funktionale Defekte aufweisen. Bereits im Jahr 1994 wurde über die verminderte Funktion der NK-Zellen in MDS-Patienten berichtet (Ogata, *et al* 1994). Seitdem haben sich mehrere Studien mit der Ursache dieser funktionalen Defizienz beschäftigt, die gewonnenen Ergebnisse waren jedoch oft sehr widersprüchlich, so dass es bisher unklar war, welche Faktoren zur funktionalen Defizienz der NK-Zellen beitragen (Carlsten, *et al* 2010, Epling-Burnette, *et al* 2007, Gleason, *et al* 2014, Hejazi, *et al* 2015, Kiladjian, *et al* 2006).

Ziel dieser Arbeit war die NK-Zellen von MDS-Patienten phänotypisch und funktional zu charakterisieren, um die möglichen Ursachen und Mechanismen der Funktionsdefizienz der NK-Zellen zu begreifen. Dabei sollten die Patienten mit einer Kohorte aus gesunden Spendern verglichen werden. Da MDS vorwiegend im hohen Alter auftritt und die Alterung bekanntermaßen mit Veränderungen der Lymphozyten einhergeht (Borrego, *et al* 1999, Camous, *et al* 2012, Chidrawar, *et al* 2006, Lutz, *et al* 2011, Manser and Uhrberg 2016), diente eine Kohorte aus altersgleichen gesunden Spendern (über 55 Jahren) als Kontrollgruppe, so dass altersspezifische, MDS-unabhängige Effekte ausgeschlossen werden konnten.

4.1 Phänotypische Merkmale der NK-Zellen

MDS ist eine Stammzellerkrankung, die durch eine gestörte Reifung und Proliferation der HSC charakterisiert wird. Dabei steigt die Zahl der Blasten im Knochenmark an wodurch die Bildung normaler Erythrozyten und Leukozyten verhindert wird.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen der NK-Zellfrequenz in MDS-Patienten bringen unvorhergesehene neue Kenntnisse zutage: Eine Gruppe der Patienten zeigte eine sehr geringe NK-Zellfrequenz von $<1\%$ (Abbildung 5). In durchflusszytometrischen Analysen war bei diesen Patienten keine eindeutige NK-Zellpopulation, basierend auf der Expression von CD56 und CD3, zu erkennen. Insgesamt war die NK-Zellfrequenz der Patienten im Vergleich zu den altersgleichen gesunden Spendern signifikant niedriger. Die Analysen der absoluten Zellzahl der NK-Zellen zeigten das gleiche Bild (Abbildung 6). Die NK-Zellzahl war in den Patienten noch stärker beeinträchtigt als NK-Zellfrequenz. Bei 13% der Patienten lag die NK-Zellzahl <10 Zellen/mm³. Diese Gruppe der Patienten wird in dieser Arbeit als NK-Zelldefizient bezeichnet. Diese Ergebnisse widersprechen vorherigen Studien, die eine unveränderte oder sogar erhöhte NK-Zellfrequenz in MDS-Patienten beobachtet haben (Chamuleau, *et al*/2009, Epling-Burnette, *et al*/2007, Iwase, *et al* 1995, Kiladjian, *et al*/2006). In einer neueren Studie wurde allerdings ebenfalls über eine geringere NK-Zellfrequenz in MDS-Patienten berichtet, jedoch wurden keine absoluten Zellzahlen analysiert (Gleason, *et al* 2014). Bemerkenswert ist hierbei auch, dass innerhalb der T- und NKT-Zellpopulationen kein Unterschied hinsichtlich der Frequenz und der Zellzahl zwischen Patienten und gesunden Spendern zu beobachten war. Die vorliegenden Ergebnisse deuten deshalb darauf hin, dass innerhalb der Lymphozyten insbesondere die NK-Zellen der MDS-Patienten betroffen sind.

In den durchflusszytometrischen Analysen wurden die NK-Zellen als CD56⁺CD3⁻-Zellen definiert. Im weiteren Verlauf der Analysen sollte deshalb sichergestellt werden, dass die beobachtete NK-Zelldefizienz nicht allein auf dem Fehlen des CD56 Markers basierte. Dazu wurden andere NK-Zellmarker, wie CD16, in verschiedenen NK-Zelldefizienten Patienten untersucht und dabei eine vergleichbar geringe Frequenz des CD16 Markers gemessen. Diese Beobachtung schließt die Annahme aus, dass

die NK-Zelldefizienz der MDS-Patienten lediglich auf einer Störung der CD56-Expression basiert.

Aus logistischen Gründen wurde der Großteil der Analysen in dieser Arbeit mit kryokonservierten Proben von Patienten und gesunden Spendern durchgeführt. Durch diese Gleichbehandlung erscheint es unwahrscheinlich, dass die beobachtete NK-Zelldefizienz ein Effekt der Kryokonservierung sein könnte. Um diesen Punkt näher zu untersuchen, wurden Analysen an frisch-isolierten PBMC von drei NK-Zelldefizienten Patienten durchgeführt: die Analysen stimmten mit den vorherigen Ergebnissen an eingefrorenem Material überein und bestätigten an frischem Material bei allen drei Patienten das Vorhandensein einer NK-Zelldefizienz. Somit kann sichergestellt werden, dass die beobachtete NK-Zelldefizienz keine Folge der Kryokonservierung ist. Da zwischen den Analysen der kryokonservierten und frisch-isolierten Proben gute zwei Jahre liegen, kann zudem angenommen werden, dass die NK-Zelldefizienz im Laufe der Zeit konstant erhalten bleibt.

NK-Zellen sind bekanntlich in der Lage, Virus-infizierte Zellen zu beseitigen, so dass ein systematischer Mangel an NK-Zellen zu erhöhten Virus-Infektionen führen kann. Bei den NK-Zelldefizienten Patienten wurden jedoch keine übermäßigen Infektionen beobachtet. Es muss allerdings erwähnt werden, dass nur eine begrenzte Anzahl der NK-Zelldefizienten Patienten über einer längeren Zeit zur Behandlung in der Uniklinik Düsseldorf erschienen sind und daher keine verlässliche Aussage über die vorgekommenen Virus-Infektionen in diesen Patienten getroffen werden kann.

Zusätzlich zu Virus-infizierten Zellen könne NK-Zellen ebenfalls Tumor-Zellen erkennen und vernichten. So kann auch spekuliert werden, dass das Fehlen der NK-Zellen in NK-Zelldefizienten Patienten zu einer schlechteren Prognose der Krankheit beiträgt. Tatsächlich werden die meisten Patienten mit NK-Zelldefizienz als Hochrisiko-Patienten eingestuft (Intermediär II/hoch). Die Tatsache, dass deutlich weniger NK-Zelldefiziente Patienten zur Niedrigrisiko Gruppe gehören, deutet darauf hin, dass eine Korrelation zwischen der NK-Zelldefizienz und der ungünstigen Prognose besteht. Mit Progression der Krankheit in Hochrisiko-Patienten dominiert der maligne MDS-Klon, es kommt zur schweren Reifungsstörungen und einem Überschuss an Blasten, die im Knochenmark und Blut akkumulieren. Die NK-Zelldefizienz kann daher auch als eine

Folge der gestörten NK-Zellentwicklung im Knochenmark betrachtet werden. Andererseits gehört die Eliminierung der Tumorzellen zu den Hauptfunktionen der NK-Zellen und die Abwesenheit der NK-Zellen trägt in Hochrisiko-Patienten zu einer schlechten Prognose der Krankheit bei.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen der NK-Zelldefizienz und dem Alter der Patienten festgestellt (Abbildung 8). Insgesamt wurden 75 Patienten und 30 gesunde Spender untersucht. Die NK-Zelldefizienz trat vorwiegend in jüngeren Patienten auf. Dies kann daran liegen, dass die jüngeren Patienten, die in dieser Arbeit untersucht worden sind, überproportional einen schweren Krankheitsverlauf zeigen und als Hochrisiko eingestuft werden. Kündgen et al. demonstrierten in einer Studie mit 2500 MDS-Patienten, dass die jüngeren Patienten (<50 Jahre), im Vergleich zu den älteren Patienten, eine signifikant höhere Frequenz von RAEB-II Subtyp aufweisen (Kuendgen, *et al* 2006). Insgesamt konnte in den MDS-Patienten der vorliegenden Studie eine positive Korrelation zwischen NK-Zellfrequenz und -Zellzahl und zunehmendem Alter beobachtet werden. Verschiedene Studien über den Einfluss der Alterung auf die Lymphozytenpopulationen zeigen ebenfalls einen Anstieg der NK-Zellfrequenz und -Zellzahl in gesunden älteren Menschen (Borrego, *et al* 1999, Lutz, *et al* 2005). In unserer altersgleichen Kontrollkohorte konnte kein entsprechender altersabhängiger Anstieg der NK-Zellen Spendern beobachtet werden. Allerdings kann die geringe Zahl der gesunden Spender der Grund dafür sein, dass der Alterungseffekt innerhalb dieser Kohorte nicht erkennbar ist. Um eine verlässliche Aussage machen zu können, wäre es wünschenswert longitudinale Untersuchungen der gleichen Individuen über Jahre hinweg durchzuführen.

4.2 Beeinträchtigte Funktion der NK-Zellen

Die Funktionalität der NK-Zellen kann aus verschiedenen Blickwinkeln untersucht werden. Mit Hilfe des, inzwischen weit verbreiteten, CD107-Degranulationsassays wird bestimmt, ob und wie stark die NK-Zellen in Gegenwart von Zielzellen aktiviert werden. Dieser Assay beruht auf der durchflusszytometrischen Detektion des CD107 Markers, der nach der Degranulation auf die Zelloberfläche der NK-Zellen transportiert wird. Ein Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit, anhand der Antikörperfärbung die

Aktivierung verschiedener Subpopulationen von NK-Zellen zu untersuchen. Dieser Assay gibt jedoch keinen Aufschluss darüber, ob bzw. wie viele Zielzellen durch die NK-Zellen getötet werden. Um diese Frage zu beantworten, muss ein Zytotoxizitätsassay durchgeführt werden. In den bisherigen Studien wurde die Zytotoxizität der NK-Zellen in MDS-Patienten hauptsächlich mittels Chrom-Release-Assays bestimmt. Bei diesem Assay werden die Zielzellen mit dem radioaktiven Isotop ^{51}Cr markiert, was durch die Zelllyse in den Überstand freigesetzt wird. Die Menge des freigesetzten ^{51}Cr gilt als Maß für die Zytotoxizität der NK-Zellen. Der Nachteil dieses Assays ist allerdings die Problematik, die der Umgang mit radioaktiven Stoffen mit sich bringt. In dieser Arbeit wird zum ersten Mal die Zytotoxizität der NK-Zellen in MDS-Patienten anhand eines CFSE-Zytotoxizitätsassays, einer Durchflusszytometrie-basierten Methode, ermittelt.

Die funktionalen Assays wurden mit IL-2-stimulierten PBMC durchgeführt. Frühere Studien hatten gezeigt, dass die Bindung der NK-Zellrezeptoren an ihren Liganden im allgemeinen nicht ausreicht, um eine effektive Lyse der Zielzellen auszulösen und die ruhenden NK-Zellen daher zuerst mit IL-2 stimuliert werden müssen (Bryceson, *et al* 2006). IL-2 bindet an den aus drei Untereinheiten bestehenden IL-2-Rezeptor (IL-2R α , β , γ), wodurch die Aktivierung und Proliferation von NK-Zellen angeregt wird.

In dieser Arbeit konnte kein Unterschied in der Degranulation der NK-Zellen zwischen den Patienten und den gesunden Spendern festgestellt werden. Die Patienten verhalten sich jedoch in Bezug auf Degranulation sehr heterogen. Bei einem Patienten konnte nur eine sehr geringe CD107-Expression auf der Oberfläche der NK-Zellen detektiert werden (1,5%), während es eine Reihe von Patienten gab, deren NK-Zellen eine Degranulationsaktivität bis zu 60% zeigten. Diese Beobachtung widerspricht einer Studie, in der über eine verminderte Degranulation der NK-Zellen, sowohl im peripheren Blut, als auch im Knochenmark, berichtet wird (Carlsten, *et al* 2010). Hinsichtlich der Zytotoxizität wurde ein anderes Bild beobachtet. Der von vielen Studien postulierte Rückgang der NK-Zellzytotoxizität war hier in der Mehrheit der Patienten nachzuweisen und im Vergleich zu den altersgleichen gesunden Spendern wurde eine hoch signifikante Verminderung der Zytotoxizität in den NK-Zellen der Patienten beobachtet.

Der CD107-Degranulationsassay wird mittlerweile in vielen Laboren als Standardassay für die Analyse der NK-Zellfunktion verwendet (Uhrberg 2005). Die beobachtete Diskrepanz zwischen dem Degranulationsassay und dem Zytotoxizitätsassay in MDS-Patienten war deshalb nicht zu erwarten. Viele Patienten mit einer hohen Degranulationsaktivität zeigten eine schwache Zytotoxizität. Unsere Daten deuten deshalb darauf hin, dass die Verwendung des CD107-Degranulationsassays für die Analyse der NK-Zellfunktion fragwürdig ist und zumindest für MDS-Patienten nicht als zuverlässiger Assay zur Messung der Funktion der NK-Zellen verwendet werden kann.

Für die Zytotoxizitätsassays wurden als Effektorzellen PBMC der Patienten und gesunden Spender und als Zielzelle HLA Klasse-I-negative K562-Zellen verwendet, so dass eine HLA-restringierte Aktivierung der T-Zellen durch die Zielzellen ausgeschlossen war. Bei der Gegenüberstellung der NK-Zellfrequenz innerhalb der PBMC und der Zytotoxizität der NK-Zellen war eine leichte Korrelation zwischen beiden Parametern in den Patienten zu sehen. Jedoch wurde deutlich, dass die NK-Zellzytotoxizität der MDS-Patienten auch im Vergleich zu Kontrollen mit vergleichbaren NK-Zellfrequenzen signifikant erniedrigt war. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die geringe Frequenz der NK-Zellen in MDS-Patienten die Ursache für die verminderte Zytotoxizität ist. Die Durchführung des Zytotoxizitätsassay mit aufgereinigten NK-Zellen war aufgrund der zu niedrigen NK-Zellzahl innerhalb der Patientenproben, vor allem nach dem Auftauen der Zellen, nicht möglich.

In einer Studie aus dem Jahr 2007 wurde über eine Korrelation zwischen einer verringerten NK-Zellfunktion und einer schlechten Prognose in MDS-Patienten berichtet (Epling-Burnette, *et al* 2007). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Zytotoxizität und der Prognose in MDS-Patienten beobachtet werden, was jedoch an der geringen Anzahl der untersuchten Patienten in den jeweiligen Gruppen liegen kann. Allerdings ist auffällig, dass auch hier alle Patienten mit funktionalen NK-Zellen zur Niedrigrisiko-Gruppe gehören.

Die Funktion der NK-Zellen zeichnet sich, zusätzlich zur Zytotoxizität, auch durch die Produktion verschiedener Zytokinen aus. Auf dieser Weise üben NK-Zellen einen regulatorischen Effekt auf die Immunantwort aus. IFN- γ gilt als wichtigstes Zytokin der

NK-Zellen, deren Produktion unter anderem durch IL-12, IL-18 und auch IL-2 angeregt wird. In dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Produktion von IFN- γ in IL-2-stimulierten NK-Zellen, in Gegenwart von K562 Zielzellen, durchflusszytometrisch gemessen. Die Sekretion von IFN- γ aus den NK-Zellen wurde durch die Zugabe von Brefeldin A, welches den Protein-Transport zwischen dem Golgi-Apparat und dem ER inhibiert, gehemmt. Auf die gesamte NK-Zellpopulation bezogen, ließ sich eine signifikant verminderte IFN- γ -Produktion in der Patientenkohorte feststellen. Die getrennte Betrachtung der CD56^{dim} und CD56^{bright} Subpopulationen zeigte lediglich eine Tendenz zu einer verringerten IFN- γ -Produktion in beiden Subpopulationen der Patientenkohorte. CD56^{bright} NK-Zellen sind dabei im Allgemeinen die Subpopulation, die hauptsächlich für die Zytokin-Produktion verantwortlich ist, jedoch, im Vergleich zu CD56^{dim} NK-Zellen, kaum zytotoxisch aktiv sind. Diese Erkenntnis wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt, da gezeigt werden konnte, dass die CD56^{bright} NK-Zellen in beiden Kohorten signifikant mehr IFN- γ produzierten als CD56^{dim} NK-Zellen. Die Letzteren sind jedoch auch in der Lage, nach Stimulation mit HLA Klasse-I-negativen Zielzellen und IL-2, verschiedene Zytokine wie IFN- γ und TNF- α zu produzieren, so dass die Rollenverteilung zwischen den beiden Subpopulationen deshalb nicht so streng getrennt werden kann.

Zusammenfassend wird in dieser Arbeit eine stark beeinträchtigte Funktion der NK-Zellen in MDS-Patienten, hinsichtlich der Zytotoxizität und IFN- γ -Produktion, beobachtet, während die Degranulation der NK-Zellen unverändert bleibt. Basierend auf der Zytotoxizität und Zellzahl der NK-Zellen werden die MDS-Patienten (n=75), wie unter Punkt 3.3.1 aufgeführt, in drei Gruppen aufgeteilt: **Gruppe 1**-Patienten (n=8) besitzen eine normale NK-Zellfrequenz und Zellzahl, die auch funktional sind (Zytotoxizität $\geq 20\%$), **Gruppe 2**-Patienten weisen eine normale oder teilweise verringerte NK-Zellzahl mit beeinträchtigter Zytotoxizität (Zytotoxizität $< 20\%$) auf, und schließlich **Gruppe 3**-Patienten, mit einer NK-Zelldefizienz (NK-Zellzahl < 10 Zellen/mm³).

4.3 Verminderte Expression von Perforin und Granzym B

NK-Zellen verdanken ihre zytotoxische Aktivität den vorhandenen Granula, die zytotoxische Moleküle wie Perforin und verschiedene Granzyme beinhalten. Diese Moleküle werden nach der Degranulation der NK-Zellen freigesetzt und lösen auf kooperative und noch nicht völlig verstandene Weise die Lyse der Zielzellen aus. Zunächst ermöglicht Perforin Granzym B den Eintritt in die Zielzelle, indem es in der Zellmembran der Zielzelle Poren bildet. Das so eingedrungene Granzym B aktiviert dann die Apoptose, die zur Lyse der Zielzelle führt.

Die beobachtete Diskrepanz zwischen Degranulation und Zytotoxizität der NK-Zellen in den Patienten lässt die Frage aufkommen, ob die Granula der NK-Zellen in den Patienten mit Perforin und Granzym B beladen sind. Daher wurde die Expression dieser beiden Moleküle anhand intrazellulärer Antikörperfärbungen durchflusszytometrisch analysiert. Innerhalb der NK-Zellen ist die CD56^{dim} Subpopulation für die zytotoxische Aktivität zuständig, sodass die Expression von Perforin und Granzym B auf diese Subpopulation beschränkt ist. Daher wurde die Expression von Perforin und Granzym B nur in CD56^{dim} NK-Zellen betrachtet.

Die Ergebnisse zeigten eine signifikant verminderte Expression der beiden Moleküle in den NK-Zellen der Patienten, wobei die Perforin-Expression stärker beeinträchtigt war. Dies bedeutet, dass die Patienten prozentual weniger NK-Zellen mit Perforin und Granzym B besitzen. In beiden Kohorten wurde eine stark signifikante Korrelation zwischen der Expression von Perforin und Granzym B beobachtet. In der Kontrollgruppe betrug die Expression beider Molekülen in fast allen Individuen über 80%. In der Patientenkohorte ging die geringe Granzym B-Expression mit einer noch niedrigeren Perforin-Expression einher. Diese Korrelation lässt vermuten, dass die Perforin und Granzym B-Expression ähnlichen Regulationsmechanismen unterliegt.

Im nächsten Schritt wurde untersucht ob der beobachtete Mangel an Perforin und Granzym B in den NK-Zellen tatsächlich mit verminderter NK-Zellzytotoxizität korreliert. Alle Gruppe 1-Patienten zeigten eine Perforin/Granzym B-Expression von $\geq 60\%$, während dort keine Patienten mit einer verminderten Perforin-Granzym B-

Expression zu finden waren. Es gab jedoch eine kleine Gruppe von Patienten, die trotz normaler Perforin/Granzym B-Expression eine schwache Zytotoxizität aufwiesen. Die Degranulationsanalysen von zwei Patienten aus dieser Gruppe zeigten eine stark verminderte CD107 Mobilisierung (1,5% und 9% CD107-Expression), so dass vermutet werden kann, dass in diesen Patienten tatsächlich die verminderte Degranulation zur schwachen Zytotoxizität führt. Darüber hinaus muss man konstatieren, dass es neben dem Perforin/Granzym B Mechanismus weitere weniger spezifische Mechanismen gibt, die von NK-Zellen für die Lyse ihrer Zielzellen verwendet werden, welche in dieser Arbeit nicht untersucht wurden. Dazu zählt in erster Linie der Fas/FasL Signalweg. FasL wird auf NK-Zellen exprimiert, wobei dessen Bindung an Fas (exprimiert auf vielen Tumorzellen) die Apoptose in den Fas-tragenden Zellen auslösen kann (Sharma, *et al* 2000, Suda, *et al* 1995). Weiterhin exprimieren NK-Zellen auch TRAIL, welches in Zellen die den TRAIL-Rezeptor exprimieren Apoptose auslösen kann (Pan, *et al* 1997, Walczak, *et al* 1997). Ob diese Mechanismen bei den NK-Zellen der MDS-Patienten eine Rolle spielen ist zurzeit nicht bekannt.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass die verminderte Zytotoxizität der NK-Zellen in MDS-Patienten im Zusammenhang mit einem Mangel an Perforin- und Granzym B-haltigen NK-Zellen steht. Das bedeutet, dass die NK-Zellen der Patienten durchaus in der Lage sind, nach Kontakt mit der Zielzelle und einer angemessenen Stimulation, zu degranulieren und ihre Granula ausschütten. Diese enthalten aber nicht in allen NK-Zellen Perforin und Granzym B, wodurch der Effekt auf die Zielzelle minimiert wird. Diese Beobachtungen können nicht nur für MDS, sondern auch für weitere hämatologische Erkrankungen, wie AML, die eine Funktionsdefizienz der NK-Zellen aufweisen, relevant sein.

Es stellte sich nun die Frage, ob die Funktionsdefizienz der NK-Zellen durch Stimulation wiederhergestellt werden könnte. Kiladjian *et al.* berichteten in einer Studie über eine beeinträchtigte *in Vitro* Proliferation der NK-Zellen (Kiladjian, *et al* 2006). Die NK-Zellen der Patienten und der gesunden Spender wurden 7-10 Tage mit IL-2 stimuliert. Dabei konnte keine Proliferation der NK-Zellen in den Patientenproben beobachtet werden, während die NK-Zellen der gesunden Spender sich bis zu 6

Wochen vermehrt haben. Die Zugabe von IL-2 ist jedoch für eine optimale Proliferation und Expansion der NK-Zellen nicht ausreichend. Eine Reihe von Protokollen verwenden, zusätzlich zu Zytokinen, bestrahlte *Feeder*-Zellen, unter anderem RPMI 8866-Zellen und eine PBMC-Mischung aus verschiedenen Individuen (Campbell 1999). Die Zelllinie RPMI 8866 hat die Eigenschaft, die Proliferation und Expansion der NK-Zellen durch die Produktion von IL-12 zu unterstützen (Valiante, *et al* 1992). Die Verwendung der PBMC-Mischung verschiedener Spender hat dabei den Zweck, den NK-Zellen den Kontakt mit ihren Liganden zu ermöglichen und ebenfalls die Produktion von löslichen Faktoren zu unterstützen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine modifizierte Methode zur Expansion der NK-Zellen verwendet, bei der die RPMI 8866 Zellen durch die HLA Klasse-I-negativen K562 Zellen ersetzt wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl bei MDS-Patienten, als auch in den altersgleichen gesunden Spendern innerhalb einer 10-tägigen Kokultur eine effektive Expansion der NK-Zellen erreicht werden konnte. Dabei konnte das Expressionslevel von Perforin und Granzym B, sowie die Zytotoxizität der NK-Zellen in Gruppe 2-Patienten komplett wiederhergestellt werden, was bedeutet, dass der funktionale Defekt in diesen Patienten reversibel ist. Unklar ist zurzeit, ob sich durch Zugabe von Zytokinen auch eine Reaktivierung der endogenen NK-Zellen im Patienten erreichen lässt, da die alleinige Zugabe von IL-2 in MDS keinen ausreichenden Stimulus darzustellen scheint. Evtl. ist hierzu ein weiterer Stimulus über direkten Kontakt mit *third party*-Zellen erforderlich.

4.4 Defekte in der Ausreifung von NK-Zellen

4.4.1 CD56^{dim} und CD56^{bright} Subpopulationen

NK-Zellen werden anhand der Expression des CD56 Markers in zwei Subpopulationen aufgeteilt. Die zytotoxischen CD56^{dim} NK-Zellen entwickeln sich, nach allgemeinem Kenntnisstand, aus den CD56^{bright} NK-Zellen. Letztere übernehmen eine immunregulatorische Funktion und sind in der Lage verschiedene Zytokine zu produzieren.

Im Laufe der Untersuchungen fiel auf, dass es einige Patienten gab, die eine erhöhte Frequenz der CD56^{bright} Subpopulation aufwiesen. Auf die gesamte Kohorte bezogen, bestätigte sich dieser signifikante Anstieg in der Frequenz der CD56^{bright} Subpopulation in der Patientenkohorte (Abbildung 21). Bei der Analyse der absoluten Zellzahl der beiden Subpopulationen wurde jedoch ein anderes Bild beobachtet. Während die Zellzahl der CD56^{dim} Subpopulation in der Patientengruppe stark vermindert war, war kein Unterschied in der Zellzahl der CD56^{bright} Subpopulation zwischen beiden Kohorten zu sehen (Abbildung 22). Dieses Phänomen war besonders in Gruppe 2-Patienten zu beobachten.

Die niedrige Zellzahl der CD56^{dim} NK-Zellen in MDS-Patienten warf die Frage auf, ob diese Zellen schneller sterben und somit ein Zusammenhang zur Apoptoserate dieser Zellen besteht. Daraufhin wurde die spontane Apoptose der einzelnen Subpopulationen der NK-Zellen in der Patienten- und Kontrollkohorte untersucht. Sowohl in CD56^{dim} als auch in CD56^{bright} NK-Zellen, war die Apoptoserate zwischen den beiden Kohorten gleich, so dass es unwahrscheinlich scheint, dass die verminderte Zellzahl der CD56^{dim} NK-Zellen auf die erhöhte Apoptose dieser Zellen zurückzuführen ist. Auffällig war, dass die CD56^{bright} NK-Zellen deutlich weniger Apoptose aufwiesen als die CD56^{dim} NK-Zellen. Diese Daten stimmen mit einer Studie überein, die ebenfalls über die geringere Apoptose in CD56^{bright} NK-Zellen gesunder Spender berichten (Lutz, *et al* 2011).

4.4.2 KIR- und NKG2-Familie

Über die Expression von KIR und NKG2A in MDS-Patienten ist bislang wenig bekannt. Epling-Burnette *et al.* zeigten eine geringe Expression der stimulatorischen Rezeptoren NKp30 und NKG2D in MDS-Patienten, während in weiteren Studien kein Unterschied in der Expression dieser Rezeptoren beobachtet wurde (Carlsten, *et al* 2010, Epling-Burnette, *et al* 2007, Kiladjian, *et al* 2006). Durch diese widersprüchlichen Ergebnisse ist noch unklar, ob in MDS-Patienten eine Korrelation zwischen der Funktion und der Expression bestimmter Rezeptoren besteht. In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal verschiedene inhibitorische Rezeptoren wie KIR2DL1, KIR2DL2/3 und

KIR3DL1, sowie NKG2A, welche die vier wichtigsten HLA Klasse-I-spezifischen inhibitorischen NK-Zellrezeptoren darstellen, mithilfe der Multiparameter-Durchflusszytometrie in MDS-Patienten untersucht. Bei der Analyse des KIR-Repertoires wurde, übereinstimmend mit älteren Studien, beobachtet, dass es eine Subpopulation von NK-Zellen in der Patienten- und Kontrollgruppe gibt, die weder KIR noch NKG2A auf der Oberfläche exprimieren (Abbildung 25). Diese KIR⁻NKG2A⁻ NK-Zellen exprimieren keinen HLA Klasse-I-spezifischen inhibitorischen Rezeptor, was dem weithin akzeptierten Model „*at least one*“ widerspricht. Anfossi et al. und Cooley et al. zeigten, dass diese Subpopulation der NK-Zellen hyporesponsiv sind (Anfossi, et al 2006, Cooley, et al 2007). Die Frage bleibt jedoch offen, wie die Selbsttoleranz der beschriebenen NK-Zellen gewährleistet wird, wenn sie offenbar keinen selbst-HLA Klasse-I-spezifischen inhibitorischen Rezeptoren exprimieren. Erwähnenswert ist, dass nicht alle inhibitorische KIR in diesen Studien durchflusszytometrisch detektiert werden konnten, da zu diesem Zeitpunkt nicht gegen alle KIR monoklonale Antikörper vorhanden waren. Jedoch konnte Cooley et al. auch mit Q-RT-PCR (*quantitative real-time PCR*) die Abwesenheit von inhibitorischen KIR innerhalb dieser Zellen bestätigen. Sie zeigten ebenfalls, dass die KIR⁻NKG2A⁻ Subpopulation unreife NK-Zellen darstellt, die sich *in vitro* und in Anwesenheit von *Feeder*-Zellen und Zytokinen, wie IL-15, zu reiferen NK-Zellen, mit KIR und NKG2A auf der Oberfläche, differenzieren lassen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Frequenz der KIR⁻NKG2A⁻ NK-Zellen in MDS-Patienten deutlich höher war, als in den gesunden Spendern, sodass der Anteil an hyporesponsiven NK-Zellen entsprechend größer war. Innerhalb der KIR-Familie konnte eine Verschiebung des NK-Zellrepertoires der Patienten hin zu einer bevorzugten Expression von KIR2DL2/3 beobachtet werden. Aus früheren Studien unseres Labors sowie anderer Arbeitsgruppen (Fischer, et al/2007, Miller and McCullar 2001) war bereits bekannt, dass KIR2DL2/3 als erster inhibitorischer KIR auf der Oberfläche der entstehenden NK-Zellen exprimiert wird und insofern vermehrt auf naiven NK-Zellen zu finden ist. In den MDS-Patienten zeigte sich eine erhöhte Expression von KIR2DL2/3 auf den NK-Zellen, die jeweils nur einen der drei untersuchten KIR exprimierten. Die Expression der „späteren“ KIR2DL1 und KIR3DL1 war hingegen in MDS-Patienten signifikant reduziert, sodass sich auch auf Basis der

KIR-Expression ein unreiferer Phänotyp der NK-Zellen der MDS-Patienten verdeutlichte.

Miller et al. hatten bereits zuvor die Expression von KIR und NKG2A in *in vitro* generierten NK-Zellen analysiert und konnten zeigen, dass NKG2A, gefolgt von KIR, der erste Rezeptor ist, der auf der Oberfläche der NK-Zellen exprimiert wird (Miller and McCullar 2001). Innerhalb der KIR-Familie wird KIR2DL2/3 als erster KIR, gefolgt von KIR2DL1 und KIR3DL1, exprimiert (Fischer, *et al* 2007). Anhand der Ergebnisse dieser Studien lässt sich somit eine sequentielle Expression der NK-Zellrezeptoren nachweisen: zunächst entstehen KIR⁻NKG2A⁻, dann KIR⁻NKG2A⁺ und schließlich KIR⁺NKG2A⁺ NK-Zellen. Im Laufe der weiteren Entwicklung wird NKG2A herunterreguliert, so dass terminal-differenzierte KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen entstehen. Bei der Betrachtung dieser vier Subpopulationen in den Patienten und den gesunden Spendern wurde festgestellt, dass es neben der erhöhten Frequenz der KIR⁻NKG2A⁻ NK-Zellen zu einer Verminderung der reiferen KIR⁺NKG2A⁺ und enddifferenzierten KIR⁺NKG2A⁻ NK-Zellen in MDS-Patienten kommt.

Die beschriebenen phänotypischen Charakteristiken der NK-Zellen in MDS-Patienten ähneln denen von NK-Zellen aus Nabelschnurblut (neonatale NK-Zellen). Studien haben gezeigt, dass neonatale NK-Zellen eine erhöhte Frequenz der CD56^{bright} Subpopulation aufweisen (Le Garff-Tavernier, *et al* 2010). Innerhalb der CD56^{dim} Subpopulationen ist die Expression von NKG2A erhöht, was mit einer Verminderung der KIR-Expression einhergeht, außerdem ist die NK-Zellfunktion in neonatalen NK-Zellen geringer, als in NK-Zellen aus peripherem Blut (Le Garff-Tavernier, *et al* 2010, Schonberg, *et al* 2011a).

4.4.3 Marker der terminalen NK-Zell-Differenzierung

Zusätzlich zu KIR und NKG2A wurden noch weitere Parameter wie CD57 und CD62L, deren Expression auf der Oberfläche der NK-Zellen den Reifegrad dieser Zellen widerspiegelt, untersucht. CD57 ist als ein Marker für die Identifizierung der terminal-differenzierten NK-Zellen mit geringem Proliferation- und hohem Zytotoxizitätspotenzial bekannt und wird hauptsächlich auf der CD56^{dim} Subpopulation

exprimiert (Bjorkstrom, *et al* 2010, Lopez-Verges, *et al* 2010). Die CD56^{bright} NK-Zellen tragen kein CD57 auf der Oberfläche und exprimieren CD62L, was allgemein auf naiven Lymphozyten exprimiert wird und für die Migration dieser Zellen in lymphatisches Gewebe eine wichtige Rolle spielt. Es besteht also eine negative Korrelation zwischen der Expression von CD57 und CD62L auf den NK-Zellen. Die Analyse dieser beiden Moleküle auf den NK-Zellen der Patienten und gesunden Spendern stellte eine signifikant höhere Expression von CD62L auf der CD56^{dim} Subpopulation in MDS-Patienten dar. Bei der CD57-Expression auf CD56^{dim} NK-Zellen war jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen zu sehen. CD62L wurde auf CD56^{bright} NK-Zellen beider Gruppen gleich hoch exprimiert und wie erwartet wurde keine Expression von CD57 auf diesen Zellen gemessen.

Mehrere Studien konnten zeigen, dass in früher Phase nach einer hämatopoietischen Stammzelltransplantation (HSCT) die NK-Zellen im peripheren Blut vorwiegend aus CD56^{bright} Subpopulation bestehen, die sich im Laufe der Zeit zu CD56^{dim} NK-Zellen ausdifferenzieren (Dulphy, *et al* 2008, Jacobs, *et al* 1992, Vago, *et al* 2008). Zusätzlich wurde über eine erhöhte Expression von NKG2A und CD62L auf den CD56^{dim} NK-Zellen berichtet, die in der späteren Phasen nach der HSCT stark abnimmt und zu einer bevorzugten Expression von KIR übergeht (Shilling, *et al* 2003, Vago, *et al* 2008). Die Ergebnisse legen nahe, dass ein sequentielle Ausreifung der CD56^{bright} zu frühen CD56^{dim} NK-Zellen (KIR⁻NKG2A⁺CD62L⁺) und schließlich zu terminal-differenzierten CD56^{dim} NK-Zellen (KIR⁺NKG2A⁻CD62L⁻) *in vivo* stattfindet.

Insgesamt sprechen die phänotypischen Merkmale der NK-Zellen in MDS-Patienten, wie erhöhte Frequenz der KIR⁻NKG2A⁻ Zellen, reduzierte Frequenz der reiferen Subpopulationen KIR⁺NKG2A⁺ und KIR⁺NKG2A⁻, dominante Expression von KIR2DL3 und vermehrte Expression von CD62L auf CD56^{dim} NK-Zellen dafür, dass, obwohl MDS eine Krankheit der älteren Menschen ist, die NK-Zellen unreif sind. Es kann darüber hinaus spekuliert werden, dass der Defekt in der Ausreifung der NK-Zellen in MDS-Patienten ursächlich für die beeinträchtigte Funktion dieser Zellen ist.

4.5 NK-Zellgenerierung aus CD34⁺ HSC

Eine ineffektive Hämatopoiese ist das Hauptmerkmal des MDS, wodurch periphere Zytopenien einer oder mehrerer Zelllinien entstehen. *In vitro* Studien konnten bereits zeigen, dass das Proliferations- und Differenzierungspotential der CD34⁺ HSC zur myeloiden Zelllinie in MDS-Patienten stark vermindert ist (Greenberg 1986, Greenberg and Mara 1979, Sawada 1994, Sawada 1996). Dabei ist der Effekt von verschiedenen Wachstumsfaktoren auf MDS-HSC ebenfalls vermindert (Nagler, *et al* 1990, Schipperus, *et al* 1990). Wie effektiv die Differenzierung der MDS-HSC in die lymphoide Linie abläuft, bleibt größtenteils unklar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum ersten Mal CD34⁺ HSC der MDS-Patienten *in vitro* und in Gegenwart von *Feeder*-Zellen zu NK-Zellen ausdifferenziert. Die Hypothese war, ob die NK-Zelldefizienz in Gruppe 3-Patienten oder die funktionale Defizienz der NK-Zellen in Gruppe 2-Patienten auf einen Ausreifungsdefekt der CD34⁺ HSC zurückzuführen sind. Für diesen Zweck wurden CD34⁺ HSC aus drei MDS-Patienten, jeweils ein Patient aus Gruppe 1, 2 und 3 und einem altersgleichen gesunden Spender in Gegenwart von *Feeder*-Zellen und Zytokinen zu NK-Zellen ausdifferenziert. Interessanterweise gelang die NK-Zellgenerierung aus HSC aller MDS Gruppen. Aus allen Generierungskulturen konnten NK-Zellen mit KIR (KIR2DL2/3) und NKG2A auf der Oberfläche gewonnen werden, jedoch war der Verlauf der Generierung in jedem Patient unterschiedlich. Während der Gruppe 1-Patient eine vergleichbare NK-Zellgenerierung zu dem gesunden Spender zeigte, wurde bei der Gruppe 2 und Gruppe 3-Patienten ein deutlich verzögerter Ablauf der NK-Zellgenerierung beobachtet. In der zweiten Kulturwoche trugen bei dem gesunden Spender der größte Teil der Zellen (70%) *Lineage*-Marker (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, und CD56), während nur 5% der Zellen des Gruppe 1-Patient Lin⁺ waren. Trotz des beobachteten Unterschieds in der zweiten Woche, wurde ab der dritten Woche bei beiden Kulturen ein sehr ähnlicher Ablauf der NK-Zellgenerierung festgestellt. Nach der fünften Woche bestand die Generierungskultur, sowohl bei dem Gruppe 1-Patienten, als auch bei dem gesunden Spender, aus CD56⁺ Zellen, die auch zu gleichem Anteil KIR2DL3 und NKG2A trugen.

Bei dem Gruppe 2- und Gruppe 3-Patienten wurde eine sehr langsame Proliferation der HSC und eine weniger effektive NK-Zellgenerierung beobachtet. Am Ende der Generierung bestand die Kultur nur zum Teil aus CD56⁺ Zellen, die KIR und NKG2A trugen. Auffallend in beiden Kulturen war die hohe Expression von NKG2A auf den CD56⁺-Zellen. Dies deutete, neben der niedrigen Frequenz CD56⁺ Zellen, ebenfalls auf einen verlangsamten Ablauf der Generierung hin, da NKG2A im Allgemeinen als erster inhibitorische Rezeptor, noch vor der Initiation der KIR-Expression, auf NK-Zellen exprimiert wird und im Laufe der Entwicklung herunterreguliert wird.

Die ineffiziente Myelopoese in MDS-Patienten basiert auf den intrinsischen Defekten in CD34⁺ HSC, die durch verschiedenen Arten von Mutationen innerhalb der Zelle entstehen und zur Bildung des malignen MDS-Klons führen. Der zelluläre Mechanismus, der dazu führt, dass die normale HSC durch eine maligne MDS-HSC ersetzt wird, ist noch nicht detailliert geklärt. Dies kann durch direkte Wechselwirkung zwischen normalen und malignen HSC, aber auch durch indirekte Interaktion zur Knochenmarknische vermittelt werden. Die Knochenmarknische besteht aus einer extrazellulären Matrix (wie Kollagen und Fibronectin) und zellulären Elemente, wie Osteoblasten, Adipozyten, Endothelzellen und vor allem MSC. Die MSC wurden erstmals von Friedenstein (Friedenstein, *et al* 1968) als fibroblastenartige, adhären wachsende Zellpopulation aus Knochenmark-Aggregat beschrieben, welche ein hohes Proliferation- und Differenzierungspotenzial besitzen und sich zu verschiedenen Geweben ausdifferenzieren können. Im Knochenmark spielen sie bei der Hämatopoese eine wichtige Rolle, indem sie Wachstum und Entwicklung der HSC unterstützen. Bisher wurde die Rolle der MSC in der Pathogenese des MDS in einigen Studien untersucht und festgestellt, dass die MDS-MSK molekular und funktional verändert sind und in deutlich geringerem Maße die Hämatopoese im Knochenmark unterstützen (Aanei, *et al* 2012, Geyh, *et al* 2013, Klaus, *et al* 2010, Varga, *et al* 2007). Ob es sich hierbei um primäre intrinsische Defekte der MSC handelt, oder ob diese sekundär, infolge der Expansion des malignen Klons, entstanden sind, bleibt unklar. Mit Blick auf die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse kann vermutet werden, dass die intrinsische Aberrationen der MDS-HSC zur einer ineffektiven NK-Zellgenerierung im Knochenmark führen, was die geringe Zellzahl und den unreifen Phänotyp der NK-

Zellen in MDS-Patienten erklären könnte. Die HSC der Patienten mit NK-Zelldefizienz (Gruppe 3) ließen sich *in vitro* und in Gegenwart von gesunden Stroma-Zellen zu NK-Zellen differenzieren, jedoch war der Ablauf der NK-Zellgenerierung im Vergleich zu den gesunden HSC deutlich verzögert. *In vivo* trägt bei diesen Patienten vermutlich der Mangel an unterstützenden Stroma-Zellen im Knochenmark durch die Veränderungen der MSC zur gestörten NK-Zellgenerierung bei, was dann zu einem vollständigen Fehlen von NK-Zellen im Blut führen kann.

4.6 Gehören die NK-Zellen zum malignen MDS-Klon?

Die Hämatopoese in MDS-Patienten ist klonal. Das bedeutet, dass sie auf eine oder wenige entartete HSC zurückgeht. Eine Vielzahl von genetischen Aberrationen tragen zur Entstehung des malignen MDS-Klons bei, die sich im Laufe der Krankheit im Knochenmark verbreiten und somit zu einem Ausreifungsdefekt der Blutzellen führen. Hierbei sind die Chromosomen 5 und 7 am häufigsten betroffen. Dabei sind Deletionen die am häufigsten vorkommenden Aberrationen, bei denen ein Teil des genetischen Materials verloren geht. So wurde vermutet, dass die betroffenen Chromosomregionen Gene tragen, die von pathologischer Relevanz sind. Zum Beispiel konnte für das 5q-Syndrom in einem Mausmodell bereits gezeigt werden, dass die Deletion des kurzen Armes von Chromosom 5 zu einem Verlust des Genes *RPS14* führt und einen MDS-Phänotyp verursacht (Ebert 2009).

Die Störungen der Hämatopoese in MDS beschränken sich hauptsächlich auf die Myelopoese, es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die lymphatischen Vorläuferzellen ebenfalls zum malignen Klon gehören. Miura et al. konnten anhand von FISH-Analysen in MDS-Patienten mit Monosomie 7 eine erhöhte Frequenz von aberranten Zellen innerhalb der NK-Zellpopulation zeigen (in drei von vier untersuchten Patienten), während B- und T-Zellen weniger betroffen waren (Miura, et al/2000). Diese Ergebnisse konnten Jahre später von Kiladjian et al., bestätigt werden. Hierbei konnte eine Beteiligung der NK-Zellen in drei Patienten mit jeweils 5q-Deletion, 7q-Deletion und Trisomie 8 nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Beteiligung des malignen Klon innerhalb der NK-, T- und B-Zellen in vier MDS-Patienten mit 5q-Syndrom mittels FISH-Analysen untersucht. In zwei Patienten war eine hohe Frequenz der aberranten Zellen innerhalb der NK-Zellpopulation zu erkennen, was mit den Daten der obengenannten Studien vereinbar ist. In einem Patienten waren die chromosomalen Aberrationen auch in B- und T-Zellen nachweisbar, jedoch mit einer deutlich geringeren Frequenz. Es stellte sich nun die Frage, ob eine Korrelation zwischen der Beteiligung der NK-Zellen am malignen Klon und der funktionalen Defizienz der NK-Zellen einiger Patienten bestand. Da die Perforin-Expression der NK-Zellen ein sensibler Parameter für ihre Zytotoxizität ist, wurden die NK-Zellen von drei MDS-Patienten in Perforin⁻ und Perforin⁺ Subpopulationen sortiert und mittels FISH analysiert. Interessanterweise zeigten die Perforin⁻ NK-Zellen in einem MDS-Patienten eine sehr hohe Beteiligung am malignen Klon (86%), während in Perforin⁺ NK-Zellen, und auch in B- und T-Zellen, keine Klonbeteiligung festgestellt werden konnte. In zwei anderen Patienten konnte keine genaue Aussage über die Beteiligung des Klon in den untersuchten Populationen getroffen werden. Innerhalb ihrer NK-Zellen war eine geringe Frequenz an aberranten Zellen detektiert worden, die Werte lagen jedoch sehr nah am *cut-off* Limit (5%).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die NK-Zellen in MDS-Patienten häufig zum malignen Klon gehören und zumindest in einigen Fällen auch mit der funktionalen Defizienz der NK-Zellen assoziiert sind.

4.7 Zusammenfassung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich MDS-Patienten in drei Gruppen einteilen lassen, die sich in Phänotyp und Funktion ihrer NK-Zellen unterscheiden und signifikante Unterschiede in der Krankheits-Prognose aufweisen. Neben einer kleinen Gruppe von MDS-Patienten mit normaler NK-Zell-Frequenz und Funktion (Gruppe 1) konnte eine weitere Gruppe von MDS-Patienten definiert werden, die sich durch eine fast vollständige Abwesenheit von NK-Zellen auszeichnet und eine schlechte Prognose in IPSS und WHO Klassifizierung aufweist (Gruppe 3). Die größte Gruppe zeichnet sich durch das Vorhandensein von funktional defizienten NK-Zellen aus (Gruppe 2). In dieser Gruppe deuten die phänotypischen Merkmale wie eine erhöhte Frequenz der CD56^{bright} Subpopulation und KIR⁻NKG2A⁻ CD56^{dim} NK-Zellen, eine reduzierte Expression der reiferen Subpopulationen KIR⁺NKG2A⁺ und KIR⁺NKG2A⁻, die dominante Expression von KIR2DL3 und die vermehrte Expression von CD62L auf den CD56^{dim} NK-Zellen auf eine unvollständige Ausreifung der NK-Zellen als Ursache dieser funktionalen Defizienz hin. Die verminderte Zytotoxizität der NK-Zellen in Gruppe 2 korreliert zudem mit der beeinträchtigten Expression der zytotoxischen Moleküle Perforin und Granzym B.

Die phänotypischen und funktionalen Defekte der NK-Zellen und vor allem die Abwesenheit der NK-Zellen in Gruppe 3 sind wahrscheinlich auf eine ineffektive NK-Zelldifferenzierung aus HSC zurückzuführen sein. Es kann jedoch keine verlässliche Aussage darüber getroffen werden, ob der Ausreifungsblock durch einen intrinsischen Defekt der MDS-HSC oder eine dysfunktionale Stammzellnische, wie z.B. den Mangel an unterstützenden Stroma-Zellen, verursacht wird. Um diese Frage näher zu untersuchen, könnten *in vitro* NK-Zelldifferenzierungen in einem Modell der MDS-Stammzellnische durchgeführt werden, in dem man z.B. mesenchymale Stammzellen (MSC) aus Knochenmark von MDS-Patienten mit und ohne NK-Zelldefekt isoliert und als *Feeder*-Zellen für die Ausreifung von gesunden HSC zu NK-Zellen verwendet. Dadurch könnte festgestellt werden, ob die MSC der MDS-Patienten in der Lage sind, die NK-Zelldifferenzierung der gesunden HSC zu unterstützen.

Die vorliegende Arbeit liefert eindeutige Hinweise darauf, dass die NK-Zellen, insbesondere die funktional-defizienten NK-Zellen zum malignen MDS-Klon gehören können. Es ist allerdings unklar, wie der maligne Klon die Differenzierung und Funktion der NK-Zellen beeinflusst und ob eine klonale Beteiligung der NK-Zellen die Hauptursache für die beobachteten ausgeprägten Defizienzen ist. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass durch geeignete Stimulationsprotokolle die Funktionalität der NK-Zellen wiederhergestellt werden kann. In diesem Zusammenhang konnte in klinischen Studien bereits gezeigt werden, dass eine Behandlung mit immunmodulatorischen Medikamenten wie Thalidomid die Funktion der NK-Zellen in einigen MDS-Patienten verstärken kann (Hayashi, *et al* 2005). Thalidomid führte auch in Patienten mit multiplem Myeloma zu einer Erhöhung der NK-Zellfrequenz, was für NK-Zelldefiziente MDS-Patienten ebenso relevant sein könnte. Wachstumsfaktoren wie Erythropoietin werden seit Jahren zur Stimulation der Blutbildung bei MDS-Patienten eingesetzt. Eine interessante Frage, die sich aus der vorliegenden Arbeit ergibt ist, inwiefern eine gezielte Stimulation der NK-Zelldifferenzierung, z.B. durch Gabe von IL-15 die Funktionalität des NK-Zellkompartiments und im Endeffekt auch das Krankheitsbild des MDS positiv beeinflussen würden.

Schließlich stellt sich auch die Frage, ob in Zukunft der Einsatz von genmodifizierten NK-Zellen, z.B. durch Transfektion mit einem chimären Antigenrezeptor (CAR) mit Spezifität für den MDS-Klon, eine alternative Therapie-Methode für MDS-Patienten darstellen könnte. Für diese Therapie könnten beispielsweise autologe NK-Zellen in Gruppe 2-Patienten und allogene NK-Zellen in Gruppe 3-Patienten verwendet werden. Die Herstellung von geeigneten CAR-NK-Zellen gegen den MDS-Klon könnte eine effektive Erkennung und Abtötung der malignen Zellen ermöglichen.

Literaturverzeichnis

- Aanei, C.M., Flandrin, P., Eloae, F.Z., Carasevici, E., Guyotat, D., Wattel, E. & Campos, L. (2012) Intrinsic growth deficiencies of mesenchymal stromal cells in myelodysplastic syndromes. *Stem Cells Dev*, **21**, 1604-1615.
- Aktas, E., Kucuksezer, U.C., Bilgic, S., Erten, G. & Deniz, G. (2009) Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol*, **254**, 149-154.
- Alter, G., Malenfant, J.M. & Altfeld, M. (2004) CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*, **294**, 15-22.
- Anfossi, N., Andre, P., Guia, S., Falk, C.S., Roetynck, S., Stewart, C.A., Bresò, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., Romagne, F., Ugolini, S. & Vivier, E. (2006) Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*, **25**, 331-342.
- Arnon, T.I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., Porgador, A., Honigman, A., Plachter, B., Mevorach, D., Wolf, D.G. & Mandelboim, O. (2005) Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol*, **6**, 515-523.
- Augugliaro, R., Parolini, S., Castriconi, R., Marcenaro, E., Cantoni, C., Nanni, M., Moretta, L., Moretta, A. & Bottino, C. (2003) Selective cross-talk among natural cytotoxicity receptors in human natural killer cells. *Eur J Immunol*, **33**, 1235-1241.
- Baier, C., Fino, A., Sanchez, C., Farnault, L., Rihet, P., Kahn-Perles, B. & Costello, R.T. (2013) Natural killer cells modulation in hematological malignancies. *Front Immunol*, **4**, 459.
- Balaji, K.N., Schaschke, N., Machleidt, W., Catalfamo, M. & Henkart, P.A. (2002) Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med*, **196**, 493-503.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L. & Spies, T. (1999) Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, **285**, 727-729.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. & Sultan, C. (1982) Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*, **51**, 189-199.

- Berahovich, R.D., Lai, N.L., Wei, Z., Lanier, L.L. & Schall, T.J. (2006) Evidence for NK cell subsets based on chemokine receptor expression. *J Immunol*, **177**, 7833-7840.
- Beziat, V., Descours, B., Parizot, C., Debre, P. & Vieillard, V. (2010) NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. *PLoS One*, **5**, e11966.
- Biassoni, R., Falco, M., Cambiaggi, A., Costa, P., Verdiani, S., Pende, D., Conte, R., Di Donato, C., Parham, P. & Moretta, L. (1995) Amino acid substitutions can influence the natural killer (NK)-mediated recognition of HLA-C molecules. Role of serine-77 and lysine-80 in the target cell protection from lysis mediated by "group 2" or "group 1" NK clones. *J Exp Med*, **182**, 605-609.
- Bjorkstrom, N.K., Riese, P., Heuts, F., Andersson, S., Fauriat, C., Ivarsson, M.A., Bjorklund, A.T., Flodstrom-Tullberg, M., Michaelsson, J., Rottenberg, M.E., Guzman, C.A., Ljunggren, H.G. & Malmberg, K.J. (2010) Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood*, **116**, 3853-3864.
- Borrego, F., Alonso, M.C., Galiani, M.D., Carracedo, J., Ramirez, R., Ostos, B., Pena, J. & Solana, R. (1999) NK phenotypic markers and IL2 response in NK cells from elderly people. *Exp Gerontol*, **34**, 253-265.
- Borrego, F., Ulbrecht, M., Weiss, E.H., Coligan, J.E. & Brooks, A.G. (1998) Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med*, **187**, 813-818.
- Bouscary, D., De Vos, J., Guesnu, M., Jondeau, K., Viguier, F., Melle, J., Picard, F., Dreyfus, F. & Fontenay-Roupie, M. (1997) Fas/Apo-1 (CD95) expression and apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, **11**, 839-845.
- Brands (2014) Untersuchungen zur epigenetischen Regulation der KIR-Gene während der Entwicklung von natürlichen Killerzellen. *Inaugural Dissertation*.
- Brandt, C.S., Baratin, M., Yi, E.C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C.D., Kaifu, T., Chabannon, C., Moretta, A., West, R., Xu, W., Vivier, E. & Levin, S.D. (2009) The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med*, **206**, 1495-1503.
- Braud, V.M., Allan, D.S., O'Callaghan, C.A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G.S., Lazetic, S., Young, N.T., Bell, J.I., Phillips, J.H., Lanier, L.L. & McMichael, A.J. (1998) HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*, **391**, 795-799.

- Bryceson, Y.T., March, M.E., Ljunggren, H.G. & Long, E.O. (2006) Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev*, **214**, 73-91.
- Bryder, D., Rossi, D.J. & Weissman, I.L. (2006) Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol*, **169**, 338-346.
- Burkhardt, J.K., Hester, S., Lapham, C.K. & Argon, Y. (1990) The lytic granules of natural killer cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments. *J Cell Biol*, **111**, 2327-2340.
- Caligiuri, M.A. (2008) Human natural killer cells. *Blood*, **112**, 461-469.
- Cameron, E.E., Bachman, K.E., Myohanen, S., Herman, J.G. & Baylin, S.B. (1999) Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet*, **21**, 103-107.
- Camous, X., Pera, A., Solana, R. & Larbi, A. (2012) NK cells in healthy aging and age-associated diseases. *J Biomed Biotechnol*, **2012**, 195956.
- Campbell, K.S., Colonna, M. (1999) Natural Killer Cell Protocols, Cellular and Molecular Methods. **121**.
- Carlsten, M., Baumann, B.C., Simonsson, M., Jadersten, M., Forsblom, A.M., Hammarstedt, C., Bryceson, Y.T., Ljunggren, H.G., Hellstrom-Lindberg, E. & Malmberg, K.J. (2010) Reduced DNAM-1 expression on bone marrow NK cells associated with impaired killing of CD34+ blasts in myelodysplastic syndrome. *Leukemia*, **24**, 1607-1616.
- Cerwenka, A. & Lanier, L.L. (2003) NKG2D ligands: unconventional MHC class I-like molecules exploited by viruses and cancer. *Tissue Antigens*, **61**, 335-343.
- Chamuleau, M.E., Westers, T.M., van Dreunen, L., Groenland, J., Zevenbergen, A., Eeltink, C.M., Ossenkoppele, G.J. & van de Loosdrecht, A.A. (2009) Immune mediated autologous cytotoxicity against hematopoietic precursor cells in patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica*, **94**, 496-506.
- Chan, A., Hong, D.L., Atzberger, A., Kollnberger, S., Filer, A.D., Buckley, C.D., McMichael, A., Enver, T. & Bowness, P. (2007) CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol*, **179**, 89-94.
- Chidrawar, S.M., Khan, N., Chan, Y.L., Nayak, L. & Moss, P.A. (2006) Ageing is associated with a decline in peripheral blood CD56bright NK cells. *Immun Ageing*, **3**, 10.

- Christman, J.K. (2002) 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, **21**, 5483-5495.
- Cohnen, A., Chiang, S.C., Stojanovic, A., Schmidt, H., Claus, M., Saftig, P., Janssen, O., Cerwenka, A., Bryceson, Y.T. & Watzl, C. (2013) Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood*, **122**, 1411-1418.
- Colucci, F., Caligiuri, M.A. & Di Santo, J.P. (2003) What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol*, **3**, 413-425.
- Cooley, S., Xiao, F., Pitt, M., Gleason, M., McCullar, V., Bergemann, T.L., McQueen, K.L., Guethlein, L.A., Parham, P. & Miller, J.S. (2007) A subpopulation of human peripheral blood NK cells that lacks inhibitory receptors for self-MHC is developmentally immature. *Blood*, **110**, 578-586.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A. & Caligiuri, M.A. (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, **22**, 633-640.
- Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M. & Chalupny, N.J. (2001) ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*, **14**, 123-133.
- Costello, R.T., Sivori, S., Marcenaro, E., Lafage-Pochitaloff, M., Mozziconacci, M.J., Reviron, D., Gastaut, J.A., Pende, D., Olive, D. & Moretta, A. (2002) Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, **99**, 3661-3667.
- Cuturi, M.C., Anegón, I., Sherman, F., Loudon, R., Clark, S.C., Perussia, B. & Trinchieri, G. (1989) Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. *J Exp Med*, **169**, 569-583.
- Demanet, C., Mulder, A., Deneys, V., Worsham, M.J., Maes, P., Claas, F.H. & Ferrone, S. (2004) Down-regulation of HLA-A and HLA-Bw6, but not HLA-Bw4, allospecificities in leukemic cells: an escape mechanism from CTL and NK attack? *Blood*, **103**, 3122-3130.
- Dulphy, N., Haas, P., Busson, M., Belhadj, S., Peffault de Latour, R., Robin, M., Carmagnat, M., Loiseau, P., Tamouza, R., Scieux, C., Rabian, C., Di Santo, J.P., Charron, D., Janin, A., Socie, G. & Toubert, A. (2008) An unusual CD56(bright) CD16(low) NK cell subset dominates the early posttransplant period following HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol*, **181**, 2227-2237.

- Ebert, B.L. (2009) Deletion 5q in myelodysplastic syndrome: a paradigm for the study of hemizygous deletions in cancer. *Leukemia*, **23**, 1252-1256.
- Epling-Burnette, P.K., Bai, F., Painter, J.S., Rollison, D.E., Salih, H.R., Krusch, M., Zou, J., Ku, E., Zhong, B., Boulware, D., Moscinski, L., Wei, S., Djeu, J.Y. & List, A.F. (2007) Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors. *Blood*, **109**, 4816-4824.
- Fauriat, C., Just-Landi, S., Mallet, F., Arnoulet, C., Sainty, D., Olive, D. & Costello, R.T. (2007) Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood*, **109**, 323-330.
- Fernandez, N.C., Treiner, E., Vance, R.E., Jamieson, A.M., Lemieux, S. & Raulet, D.H. (2005) A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood*, **105**, 4416-4423.
- Finton, K.A. & Strong, R.K. (2012) Structural insights into activation of antiviral NK cell responses. *Immunol Rev*, **250**, 239-257.
- Fischer, J.C., Ottinger, H., Ferencik, S., Sribar, M., Punzel, M., Beelen, D.W., Schwan, M.A., Grosse-Wilde, H., Wernet, P. & Uhrberg, M. (2007) Relevance of C1 and C2 epitopes for hemopoietic stem cell transplantation: role for sequential acquisition of HLA-C-specific inhibitory killer Ig-like receptor. *J Immunol*, **178**, 3918-3923.
- Fozza, C., Crobu, V., Isoni, M.A. & Dore, F. (2016) The immune landscape of myelodysplastic syndromes. *Crit Rev Oncol Hematol*, **107**, 90-99.
- Freud, A.G., Yokohama, A., Becknell, B., Lee, M.T., Mao, H.C., Ferketich, A.K. & Caligiuri, M.A. (2006) Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med*, **203**, 1033-1043.
- Freud, A.G., Yu, J. & Caligiuri, M.A. (2014) Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues. *Semin Immunol*, **26**, 132-137.
- Friedenstein, A.J., Petrakova, K.V., Kurolesova, A.I. & Frolova, G.P. (1968) Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, **6**, 230-247.
- Fuchs, A., Cella, M., Kondo, T. & Colonna, M. (2005) Paradoxical inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44. *Blood*, **106**, 2076-2082.

- Germing, U., Kobbe, G., Haas, R. & Gattermann, N. (2013) Myelodysplastic syndromes: diagnosis, prognosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int*, **110**, 783-790.
- Geyh, S., Oz, S., Cadeddu, R.P., Frobel, J., Bruckner, B., Kundgen, A., Fenk, R., Bruns, I., Zilkens, C., Hermsen, D., Gattermann, N., Kobbe, G., Germing, U., Lyko, F., Haas, R. & Schroeder, T. (2013) Insufficient stromal support in MDS results from molecular and functional deficits of mesenchymal stromal cells. *Leukemia*, **27**, 1841-1851.
- Gleason, M.K., Ross, J.A., Warlick, E.D., Lund, T.C., Verneris, M.R., Wiernik, A., Spellman, S., Haagenson, M.D., Lenvik, A.J., Litzow, M.R., Epling-Burnette, P.K., Blazar, B.R., Weiner, L.M., Weisdorf, D.J., Valleria, D.A. & Miller, J.S. (2014) CD16xCD33 bispecific killer cell engager (BiKE) activates NK cells against primary MDS and MDSC CD33+ targets. *Blood*, **123**, 3016-3026.
- Gleason, M.K., Verneris, M.R., Todhunter, D.A., Zhang, B., McCullar, V., Zhou, S.X., Panoskaltis-Mortari, A., Weiner, L.M., Valleria, D.A. & Miller, J.S. (2012) Bispecific and trispecific killer cell engagers directly activate human NK cells through CD16 signaling and induce cytotoxicity and cytokine production. *Mol Cancer Ther*, **11**, 2674-2684.
- Goldberg, A.D., Allis, C.D. & Bernstein, E. (2007) Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, **128**, 635-638.
- Goransdotter Ericson, K., Fadeel, B., Nilsson-Ardnor, S., Soderhall, C., Samuelsson, A., Janka, G., Schneider, M., Gurgey, A., Yalman, N., Revesz, T., Egeler, R., Jahnukainen, K., Storm-Mathiesen, I., Haraldsson, A., Poole, J., de Saint Basile, G., Nordenskjold, M. & Henter, J. (2001) Spectrum of perforin gene mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Am J Hum Genet*, **68**, 590-597.
- Greenberg, P., Cox, C., LeBeau, M.M., Fenaux, P., Morel, P., Sanz, G., Sanz, M., Vallespi, T., Hamblin, T., Oscier, D., Ohyashiki, K., Toyama, K., Aul, C., Mufti, G. & Bennett, J. (1997) International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*, **89**, 2079-2088.
- Greenberg, P.L. (1986) In vitro culture techniques defining biological abnormalities in the myelodysplastic syndromes and myeloproliferative disorders. *Clin Haematol*, **15**, 973-993.
- Greenberg, P.L. & Mara, B. (1979) The preleukemic syndrome: correlation of in vitro parameters of granulopoiesis with clinical features. *Am J Med*, **66**, 951-958.
- Grujic, M., Braga, T., Lukinius, A., Eloranta, M.L., Knight, S.D., Pejler, G. & Abrink, M. (2005) Serglycin-deficient cytotoxic T lymphocytes display defective secretory granule maturation and granzyme B storage. *J Biol Chem*, **280**, 33411-33418.

- Guma, M., Angulo, A., Vilches, C., Gomez-Lozano, N., Malats, N. & Lopez-Botet, M. (2004) Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood*, **104**, 3664-3671.
- Harris, N.L., Jaffe, E.S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H.K., Vardiman, J., Lister, T.A. & Bloomfield, C.D. (1999) The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol*, **10**, 1419-1432.
- Harrison, D., Phillips, J.H. & Lanier, L.L. (1991) Involvement of a metalloprotease in spontaneous and phorbol ester-induced release of natural killer cell-associated Fc gamma RIII (CD16-II). *J Immunol*, **147**, 3459-3465.
- Hayashi, T., Hideshima, T., Akiyama, M., Podar, K., Yasui, H., Raje, N., Kumar, S., Chauhan, D., Treon, S.P., Richardson, P. & Anderson, K.C. (2005) Molecular mechanisms whereby immunomodulatory drugs activate natural killer cells: clinical application. *Br J Haematol*, **128**, 192-203.
- Hejazi, M., Manser, A.R., Frobel, J., Kundgen, A., Zhao, X., Schonberg, K., Germing, U., Haas, R., Gattermann, N. & Uhrberg, M. (2015) Impaired cytotoxicity associated with defective natural killer cell differentiation in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, **100**, 643-652.
- Hercend, T., Griffin, J.D., Bensussan, A., Schmidt, R.E., Edson, M.A., Brennan, A., Murray, C., Daley, J.F., Schlossman, S.F. & Ritz, J. (1985) Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone. Characterization of two natural killer-associated antigens, NKH1A and NKH2, expressed on subsets of large granular lymphocytes. *J Clin Invest*, **75**, 932-943.
- Hoechst, B., Voigtlaender, T., Ormandy, L., Gamrekashvili, J., Zhao, F., Wedemeyer, H., Lehner, F., Manns, M.P., Greten, T.F. & Korangy, F. (2009) Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor. *Hepatology*, **50**, 799-807.
- Horton, N.C. & Mathew, P.A. (2015) NKp44 and Natural Cytotoxicity Receptors as Damage-Associated Molecular Pattern Recognition Receptors. *Front Immunol*, **6**, 31.
- Houchins, J.P., Yabe, T., McSherry, C. & Bach, F.H. (1991) DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med*, **173**, 1017-1020.
- Hsu, K.C., Liu, X.R., Selvakumar, A., Mickelson, E., O'Reilly, R.J. & Dupont, B. (2002) Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with

- a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol*, **169**, 5118-5129.
- Iwase, O., Aizawa, S., Kuriyama, Y., Yaguchi, M., Nakano, M. & Toyama, K. (1995) Analysis of bone marrow and peripheral blood immunoregulatory lymphocytes in patients with myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol*, **71**, 293-299.
- Jacobs, N.L., Holtan, S.G., Porrata, L.F., Markovic, S.N., Tefferi, A. & Steensma, D.P. (2010) Host immunity affects survival in myelodysplastic syndromes: Independent prognostic value of the absolute lymphocyte count. *Am J Hematol*, **85**, 160-163.
- Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., Sykora, K.W. & Schmidt, R.E. (2001) CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol*, **31**, 3121-3127.
- Jacobs, R., Stoll, M., Stratmann, G., Leo, R., Link, H. & Schmidt, R.E. (1992) CD16- CD56+ natural killer cells after bone marrow transplantation. *Blood*, **79**, 3239-3244.
- Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K.J., Podack, E.R., Zinkernagel, R.M. & Hengartner, H. (1994) Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature*, **369**, 31-37.
- Karre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G. & Kiessling, R. (1986) Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*, **319**, 675-678.
- Kataoka, T., Togashi, K., Takayama, H., Takaku, K. & Nagai, K. (1997) Inactivation and proteolytic degradation of perforin within lytic granules upon neutralization of acidic pH. *Immunology*, **91**, 493-500.
- Kerbaui, D.B. & Deeg, H.J. (2007) Apoptosis and antiapoptotic mechanisms in the progression of myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol*, **35**, 1739-1746.
- Kiessling, R., Klein, E. & Wigzell, H. (1975) "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*, **5**, 112-117.
- Kiladjian, J.J., Bourgeois, E., Lobe, I., Braun, T., Visentin, G., Bourhis, J.H., Fenaux, P., Chouaib, S. & Caignard, A. (2006) Cytolytic function and survival of natural killer cells are severely altered in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, **20**, 463-470.
- Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S.M., Lybarger, L., Song, Y.J., Yang, L., French, A.R., Sunwoo, J.B., Lemieux, S., Hansen, T.H. & Yokoyama, W.M. (2005) Licensing of

- natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*, **436**, 709-713.
- Klaus, M., Stavroulaki, E., Kastrinaki, M.C., Fragioudaki, P., Giannikou, K., Psyllaki, M., Pontikoglou, C., Tsoukatou, D., Mamalaki, C. & Papadaki, H.A. (2010) Reserves, functional, immunoregulatory, and cytogenetic properties of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with myelodysplastic syndromes. *Stem Cells Dev*, **19**, 1043-1054.
- Kompetenznetz-Leukämien Blut und Blutbildung. https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/patienten/leukaemien/blut_und_blutbildung/.
- Kondo, M., Weissman, I.L. & Akashi, K. (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*, **91**, 661-672.
- Kuendgen, A., Strupp, C., Aivado, M., Hildebrandt, B., Haas, R., Gattermann, N. & Germing, U. (2006) Myelodysplastic syndromes in patients younger than age 50. *J Clin Oncol*, **24**, 5358-5365.
- Kutza, J. & Murasko, D.M. (1996) Age-associated decline in IL-2 and IL-12 induction of LAK cell activity of human PBMC samples. *Mech Ageing Dev*, **90**, 209-222.
- Lanier, L.L. (1998) NK cell receptors. *Annu Rev Immunol*, **16**, 359-393.
- Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.I., Loken, M.R. & Phillips, J.H. (1986) The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*, **136**, 4480-4486.
- Lanier, L.L., Testi, R., Bindl, J. & Phillips, J.H. (1989) Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med*, **169**, 2233-2238.
- Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J.P., Lanier, L.L. & Phillips, J.H. (1996) Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol*, **157**, 4741-4745.
- Le Garff-Tavernier, M., Beziat, V., Decocq, J., Siguret, V., Gandjbakhch, F., Pautas, E., Debre, P., Merle-Beral, H. & Vieillard, V. (2010) Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell*, **9**, 527-535.
- Le Page, M.E., Goodridge, J.P., John, E., Christiansen, F.T. & Witt, C.S. (2014) Killer Ig-like receptor 2DL4 does not mediate NK cell IFN-gamma responses to soluble HLA-G preparations. *J Immunol*, **192**, 732-740.

- Li, H., Han, Y., Guo, Q., Zhang, M. & Cao, X. (2009) Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol*, **182**, 240-249.
- Locafaro, G., Amodio, G., Tomasoni, D., Tresoldi, C., Ciceri, F. & Gregori, S. (2014) HLA-G expression on blasts and tolerogenic cells in patients affected by acute myeloid leukemia. *J Immunol Res*, **2014**, 636292.
- Löffler H, R.J., Haferlach T, Heilmeyer L, Begemann H (2004) Atlas der klinischen Hämatologie.
- Lopez-Verges, S., Milush, J.M., Pandey, S., York, V.A., Arakawa-Hoyt, J., Pircher, H., Norris, P.J., Nixon, D.F. & Lanier, L.L. (2010) CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood*, **116**, 3865-3874.
- Lopez, J.A., Susanto, O., Jenkins, M.R., Lukoyanova, N., Sutton, V.R., Law, R.H., Johnston, A., Bird, C.H., Bird, P.I., Whisstock, J.C., Trapani, J.A., Saibil, H.R. & Voskoboinik, I. (2013) Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood*, **121**, 2659-2668.
- Lowin, B., Hahne, M., Mattmann, C. & Tschopp, J. (1994) Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature*, **370**, 650-652.
- Luetke-Eversloh, M., Killig, M. & Romagnani, C. (2013) Signatures of human NK cell development and terminal differentiation. *Front Immunol*, **4**, 499.
- Lutz, C.T., Karapetyan, A., Al-Attar, A., Shelton, B.J., Holt, K.J., Tucker, J.H. & Presnell, S.R. (2011) Human NK cells proliferate and die in vivo more rapidly than T cells in healthy young and elderly adults. *J Immunol*, **186**, 4590-4598.
- Lutz, C.T., Moore, M.B., Bradley, S., Shelton, B.J. & Lutgendorf, S.K. (2005) Reciprocal age related change in natural killer cell receptors for MHC class I. *Mech Ageing Dev*, **126**, 722-731.
- Maki, G., Hayes, G.M., Naji, A., Tyler, T., Carosella, E.D., Rouas-Freiss, N. & Gregory, S.A. (2008) NK resistance of tumor cells from multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia patients: implication of HLA-G. *Leukemia*, **22**, 998-1006.
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T.I., Bushkin, Y., Davis, D.M., Strominger, J.L., Yewdell, J.W. & Porgador, A. (2001) Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature*, **409**, 1055-1060.

- Mandelboim, O., Malik, P., Davis, D.M., Jo, C.H., Boyson, J.E. & Strominger, J.L. (1999) Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5640-5644.
- Manser, A.R. & Uhrberg, M. (2016) Age-related changes in natural killer cell repertoires: impact on NK cell function and immune surveillance. *Cancer Immunol Immunother*, **65**, 417-426.
- Marcus, A., Gowen, B.G., Thompson, T.W., Iannello, A., Ardolino, M., Deng, W., Wang, L., Shifrin, N. & Raulet, D.H. (2014) Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. *Adv Immunol*, **122**, 91-128.
- Martin-Fontecha, A., Thomsen, L.L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. (2004) Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol*, **5**, 1260-1265.
- Masson, D., Peters, P.J., Geuze, H.J., Borst, J. & Tschopp, J. (1990) Interaction of chondroitin sulfate with perforin and granzymes of cytolytic T-cells is dependent on pH. *Biochemistry*, **29**, 11229-11235.
- McCullar, V., Oostendorp, R., Panoskaltis-Mortari, A., Yun, G., Lutz, C.T., Wagner, J.E. & Miller, J.S. (2008) Mouse fetal and embryonic liver cells differentiate human umbilical cord blood progenitors into CD56-negative natural killer cell precursors in the absence of interleukin-15. *Exp Hematol*, **36**, 598-608.
- Miller, J.S. & 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**, 705-713.
- Miller, J.S., McCullar, V., Punzel, M., Lemischka, I.R. & Moore, K.A. (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.
- Miura, I., Kobayashi, Y., Takahashi, N., Saitoh, K. & Miura, A.B. (2000) Involvement of natural killer cells in patients with myelodysplastic syndrome carrying monosomy 7 revealed by the application of fluorescence in situ hybridization to cells collected by means of fluorescence-activated cell sorting. *Br J Haematol*, **110**, 876-879.
- Monsivais-Urenda, A., Noyola-Cherpitel, D., Hernandez-Salinas, A., Garcia-Sepulveda, C., Romo, N., Baranda, L., Lopez-Botet, M. & Gonzalez-Amaro, R. (2010) Influence of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire in children. *Eur J Immunol*, **40**, 1418-1427.

- Moradi, S., Berry, R., Pymm, P., Hitchen, C., Beckham, S.A., Wilce, M.C., Walpole, N.G., Clements, C.S., Reid, H.H., Perugini, M.A., Brooks, A.G., Rossjohn, J. & Vivian, J.P. (2015) The structure of the atypical killer cell immunoglobulin-like receptor, KIR2DL4. *J Biol Chem*, **290**, 10460-10471.
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M.C., Biassoni, R. & Moretta, L. (2001) Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*, **19**, 197-223.
- Morrison, S.J. & Kimble, J. (2006) Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, **441**, 1068-1074.
- Mrozek, E., Anderson, P. & Caligiuri, M.A. (1996) Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*, **87**, 2632-2640.
- Nagler, A., Binet, C., Mackichan, M.L., Negrin, R., Bangs, C., Donlon, T. & Greenberg, P. (1990) Impact of marrow cytogenetics and morphology on in vitro hematopoiesis in the myelodysplastic syndromes: comparison between recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (CSF) and granulocyte-monocyte CSF. *Blood*, **76**, 1299-1307.
- Neukirchen, J., Schoonen, W.M., Strupp, C., Gattermann, N., Aul, C., Haas, R. & Germing, U. (2011) Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Dusseldorf MDS-registry. *Leuk Res*, **35**, 1591-1596.
- Nolte, F. & Hofmann, W.K. (2008) Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes. *Ann Hematol*, **87**, 777-795.
- Ogata, K., Fujii, H., Yokose, N., An, E., Tamura, H., Kamikubo, K., Dan, K., Hamaguchi, H., Sakamaki, H., Onozawa, Y. & et al. (1994) Defective natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity does not imply clonal involvement of NK cells in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*, **87**, 396-398.
- Orbelyan, G.A., Tang, F., Sally, B., Solus, J., Meresse, B., Ciszewski, C., Grenier, J.C., Barreiro, L.B., Lanier, L.L. & Jabri, B. (2014) Human NKG2E is expressed and forms an intracytoplasmic complex with CD94 and DAP12. *J Immunol*, **193**, 610-616.
- Ordenez, D., Moraru, M., Gomez-Lozano, N., Cisneros, E. & Vilches, C. (2012) KIR typing by non-sequencing methods: polymerase-chain reaction with sequence-specific primers. *Methods Mol Biol*, **882**, 415-430.
- Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A.M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J. & Dixit, V.M. (1997) The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*, **276**, 111-113.

- Passmore, S.J., Hann, I.M., Stiller, C.A., Ramani, P., Swansbury, G.J., Gibbons, B., Reeves, B.R. & Chessells, J.M. (1995) Pediatric myelodysplasia: a study of 68 children and a new prognostic scoring system. *Blood*, **85**, 1742-1750.
- Pende, D., Spaggiari, G.M., Marcenaro, S., Martini, S., Rivera, P., Capobianco, A., Falco, M., Lanino, E., Pierri, I., Zambello, R., Bacigalupo, A., Mingari, M.C., Moretta, A. & Moretta, L. (2005) Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood*, **105**, 2066-2073.
- Perez, S.A., Sotiropoulou, P.A., Gkika, D.G., Mahaira, L.G., Niarchos, D.K., Gritzapis, A.D., Kavalakis, Y.G., Antsaklis, A.I., Baxevanis, C.N. & Papamichail, M. (2003) A novel myeloid-like NK cell progenitor in human umbilical cord blood. *Blood*, **101**, 3444-3450.
- Pesce, S., Tabellini, G., Cantoni, C., Patrizi, O., Coltrini, D., Rampinelli, F., Matta, J., Vivier, E., Moretta, A., Parolini, S. & Marcenaro, E. (2015) B7-H6-mediated downregulation of NKp30 in NK cells contributes to ovarian carcinoma immune escape. *Oncoimmunology*, **4**, e1001224.
- Peters, P.J., Borst, J., Oorschot, V., Fukuda, M., Krahenbuhl, O., Tschopp, J., Slot, J.W. & Geuze, H.J. (1991) Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med*, **173**, 1099-1109.
- Pierson, B.A., Gupta, K., Hu, W.S. & Miller, J.S. (1996) Human natural killer cell expansion is regulated by thrombospondin-mediated activation of transforming growth factor-beta 1 and independent accessory cell-derived contact and soluble factors. *Blood*, **87**, 180-189.
- Pipkin, M.E. & Lieberman, J. (2007) Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol*, **19**, 301-308.
- Pogge von Strandmann, E., Simhadri, V.R., von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K.S., Hansen, H.P., Rothe, A., Boll, B., Simhadri, V.L., Borchmann, P., McKinnon, P.J., Hallek, M. & Engert, A. (2007) Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity*, **27**, 965-974.
- Raj, K. & Mufti, G.J. (2006) Azacytidine (Vidaza(R)) in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Ther Clin Risk Manag*, **2**, 377-388.
- Rock, K.L., York, I.A., Saric, T. & Goldberg, A.L. (2002) Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv Immunol*, **80**, 1-70.

- Romagnani, C., Juelke, K., Falco, M., Morandi, B., D'Agostino, A., Costa, R., Ratto, G., Forte, G., Carrega, P., Lui, G., Conte, R., Strowig, T., Moretta, A., Munz, C., Thiel, A., Moretta, L. & Ferlazzo, G. (2007) CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol*, **178**, 4947-4955.
- Salih, H.R., Antropius, H., Gieseke, F., Lutz, S.Z., Kanz, L., Rammensee, H.G. & Steinle, A. (2003) Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood*, **102**, 1389-1396.
- Sanchez-Correa, B., Morgado, S., Gayoso, I., Bergua, J.M., Casado, J.G., Arcos, M.J., Bengochea, M.L., Duran, E., Solana, R. & Tarazona, R. (2011) Human NK cells in acute myeloid leukaemia patients: analysis of NK cell-activating receptors and their ligands. *Cancer Immunol Immunother*, **60**, 1195-1205.
- Santourlidis, S., Graffmann, N., Christ, J. & Uhrberg, M. (2008) Lineage-specific transition of histone signatures in the killer cell Ig-like receptor locus from hematopoietic progenitor to NK cells. *J Immunol*, **180**, 418-425.
- Santourlidis, S., Trompeter, H.I., Weinhold, S., Eisermann, B., Meyer, K.L., Wernet, P. & Uhrberg, M. (2002) Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *J Immunol*, **169**, 4253-4261.
- Sawada, K. (1994) Impaired proliferation and differentiation of myelodysplastic CD34+ cells. *Leuk Lymphoma*, **14**, 37-47.
- Sawada, K. (1996) Proliferation and differentiation of myelodysplastic CD34+ cells. *Leuk Lymphoma*, **22**, 43-51.
- Schipperus, M., Sonneveld, P., Lindemans, J., Hagemeijer, A., Vink, N., Pegels, J. & Abels, J. (1990) The effects of interleukin-3, GM-CSF, and G-CSF on the growth kinetics of colony-forming cells in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, **4**, 267-272.
- Schonberg, K., Fischer, J.C., Kogler, G. & Uhrberg, M. (2011a) Neonatal NK-cell repertoires are functionally, but not structurally, biased toward recognition of self HLA class I. *Blood*, **117**, 5152-5156.
- Schonberg, K., Sribar, M., Enczmann, J., Fischer, J.C. & Uhrberg, M. (2011b) Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood*, **117**, 98-107.

- Sharma, K., Wang, R.X., Zhang, L.Y., Yin, D.L., Luo, X.Y., Solomon, J.C., Jiang, R.F., Markos, K., Davidson, W., Scott, D.W. & Shi, Y.F. (2000) Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol Ther*, **88**, 333-347.
- Shilling, H.G., McQueen, K.L., Cheng, N.W., Shizuru, J.A., Negrin, R.S. & Parham, P. (2003) Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood*, **101**, 3730-3740.
- Shilling, H.G., Young, N., Guethlein, L.A., Cheng, N.W., Gardiner, C.M., Tyan, D. & Parham, P. (2002) Genetic control of human NK cell repertoire. *J Immunol*, **169**, 239-247.
- Siminovitch, L., McCulloch, E.A. & Till, J.E. (1963) THE DISTRIBUTION OF COLONY-FORMING CELLS AMONG SPLEEN COLONIES. *J Cell Comp Physiol*, **62**, 327-336.
- Sloand, E.M., Kim, S., Fuhrer, M., Risitano, A.M., Nakamura, R., Maciejewski, J.P., Barrett, A.J. & Young, N.S. (2002) Fas-mediated apoptosis is important in regulating cell replication and death in trisomy 8 hematopoietic cells but not in cells with other cytogenetic abnormalities. *Blood*, **100**, 4427-4432.
- Solana, R., Pawelec, G. & Tarazona, R. (2006) Aging and innate immunity. *Immunity*, **24**, 491-494.
- Steensma, D.P. & Bennett, J.M. (2006) The myelodysplastic syndromes: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*, **81**, 104-130.
- Stepp, S.E., Dufourcq-Lagelouse, R., Le Deist, F., Bhawan, S., Certain, S., Mathew, P.A., Henter, J.I., Bennett, M., Fischer, A., de Saint Basile, G. & Kumar, V. (1999) Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science*, **286**, 1957-1959.
- Stringaris, K., Sekine, T., Khoder, A., Alsuliman, A., Razzaghi, B., Sargeant, R., Pavlu, J., Brisley, G., de Lavallade, H., Sarvaria, A., Marin, D., Mielke, S., Apperley, J.F., Shpall, E.J., Barrett, A.J. & Rezvani, K. (2014) Leukemia-induced phenotypic and functional defects in natural killer cells predict failure to achieve remission in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, **99**, 836-847.
- Suda, T., Okazaki, T., Naito, Y., Yokota, T., Arai, N., Ozaki, S., Nakao, K. & Nagata, S. (1995) Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol*, **154**, 3806-3813.
- Sutton, V.R., Davis, J.E., Cancilla, M., Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Sedelies, K., Browne, K.A. & Trapani, J.A. (2000) Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J Exp Med*, **192**, 1403-1414.

- Uhrberg, M. (2005) The CD107 mobilization assay: viable isolation and immunotherapeutic potential of tumor-cytolytic NK cells. *Leukemia*, **19**, 707-709.
- Uhrberg, M., Parham, P. & Wernet, P. (2002) Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics*, **54**, 221-229.
- Uhrberg, M., Valiante, N.M., Shum, B.P., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyan, D., Lanier, L.L. & Parham, P. (1997) Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*, **7**, 753-763.
- Vago, L., Forno, B., Sormani, M.P., Crocchiolo, R., Zino, E., Di Terlizzi, S., Lupo Stanghellini, M.T., Mazzi, B., Perna, S.K., Bondanza, A., Middleton, D., Palini, A., Bernardi, M., Bacchetta, R., Peccatori, J., Rossini, S., Roncarolo, M.G., Bordignon, C., Bonini, C., Ciceri, F. & Fleischhauer, K. (2008) Temporal, quantitative, and functional characteristics of single-KIR-positive alloreactive natural killer cell recovery account for impaired graft-versus-leukemia activity after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, **112**, 3488-3499.
- Vales-Gomez, M., Erskine, R.A., Deacon, M.P., Strominger, J.L. & Reyburn, H.T. (2001) The role of zinc in the binding of killer cell Ig-like receptors to class I MHC proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1734-1739.
- Vales-Gomez, M., Reyburn, H.T., Erskine, R.A., Lopez-Botet, M. & Strominger, J.L. (1999) Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *Embo j*, **18**, 4250-4260.
- Valiante, N.M., Rengaraju, M. & Trinchieri, G. (1992) Role of the production of natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12) in the ability of B cell lines to stimulate T and NK cell proliferation. *Cell Immunol*, **145**, 187-198.
- Valiante, N.M., Uhrberg, M., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K., Arnett, K.L., D'Andrea, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L. & Parham, P. (1997) Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity*, **7**, 739-751.
- Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellstrom-Lindberg, E., Tefferi, A. & Bloomfield, C.D. (2009) The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, **114**, 937-951.

- Varga, G., Kiss, J., Varkonyi, J., Vas, V., Farkas, P., Paloczi, K. & Uher, F. (2007) Inappropriate Notch activity and limited mesenchymal stem cell plasticity in the bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. *Pathol Oncol Res*, **13**, 311-319.
- Verheyden, S., Ferrone, S., Mulder, A., Claas, F.H., Schots, R., De Moerloose, B., Benoit, Y. & Demanet, C. (2009) Role of the inhibitory KIR ligand HLA-Bw4 and HLA-C expression levels in the recognition of leukemic cells by Natural Killer cells. *Cancer Immunol Immunother*, **58**, 855-865.
- Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L. & Moretta, A. (1998) NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med*, **187**, 2065-2072.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. (2008) Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*, **9**, 503-510.
- Voskoboinik, I., Dunstone, M.A., Baran, K., Whisstock, J.C. & Trapani, J.A. (2010) Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol Rev*, **235**, 35-54.
- Voskoboinik, I., Whisstock, J.C. & Trapani, J.A. (2015) Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol*, **15**, 388-400.
- Wagner, J.A. & Fehniger, T.A. (2016) Human Adaptive Natural Killer Cells: Beyond NKG2C. *Trends Immunol*, **37**, 351-353.
- Walczak, H., Degli-Esposti, M.A., Johnson, R.S., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Boiani, N., Timour, M.S., Gerhart, M.J., Schooley, K.A., Smith, C.A., Goodwin, R.G. & Rauch, C.T. (1997) TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *Embo j*, **16**, 5386-5397.
- Wilson, M.J., Torkar, M., Haude, A., Milne, S., Jones, T., Sheer, D., Beck, S. & Trowsdale, J. (2000) Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4778-4783.
- Yokoyama, W.M. & Kim, S. (2006) Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol Rev*, **214**, 143-154.
- Zang, D.Y., Goodwin, R.G., Loken, M.R., Bryant, E. & Deeg, H.J. (2001) Expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, Apo2L, and its receptors in myelodysplastic syndrome: effects on in vitro hemopoiesis. *Blood*, **98**, 3058-3065.

Eigene Publikationen

Schönberg K, **Hejazi M**, and Uhrberg M: Clonal analysis of NK cell effector functions by multi-parameter flow cytometry. *Methods Mol Biol.* 2012

Poertner L, Schönberg K, **Hejazi M**, Bruennert D, Neumann F, Galonska F, Reusch U, Littel M, Haas R. and Uhrberg M: T and NK cells of patients with B cell NHL exert cytotoxic function against lymphoma cells following binding of the respective bispecific tetravalent antibody CD19xCD3 or CD19xCD16. *Cancer Immunol. Immunother.* 2012 Oct;61(10):1869-75

Hejazi M, Manser AR, Fröbel J, Kündgen A, Zhao X, Schönberg K, Germing U, Haas R, Gattermann N, Uhrberg M.: Impaired cytotoxicity associated with defective natural killer cell differentiation in myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 2015 ;100(5):643-52

Schönberg K, Rudolph J, Vonnahme M, Parampalli Yajnanarayana S, Cornez I, **Hejazi M**, Manser AR, Uhrberg M, Verbeek W, Koschmieder S, Brümmendorf TH, Brossart P, Heine A, Wolf D.: JAK Inhibition Impairs NK Cell Function in Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer Res.* 2015, 1;75(11):2187-99

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in den letzten Jahren unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein erster und großer Dank gilt meinen Doktorvater, Prof. Dr. Markus Uhrberg, der es mir ermöglicht hat, in seiner Arbeitsgruppe an diesem interessanten Thema zu arbeiten. Ich danke für die hervorragende fachliche Betreuung. Er war mir jederzeit ein Ansprechpartner. Ich habe es nie für selbstverständlich gehalten, vielen Dank!

Bei Herrn Prof. Dr. Philipp Lang möchte ich mich recht herzlich für die Übernahme des Korreferats bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem Direktor des ITZ Dr. Johannes Fischer für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seinem Institut anfertigen zu dürfen.

Ich bedanke mich herzlichst bei Prof. Rainer Haas, dem Direktor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie, der in einer gemeinsamen Kooperation die Untersuchung der Blutproben von MDS-Patienten ermöglicht hat. Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Ulrich Germing, Prof. Norbert Gattermann und Dr. Andrea Kündgen für die Bereitstellung der Blutproben. Ein großer Dank an die ehemalige Mitarbeiterin des hämatologischen Forschungslabors Dr. Julia Fröbel, welche durch ihr Engagement und ihre Freundlichkeit die Bereitstellung der Patientenproben so einfach und unkompliziert gemacht hat.

Vielen lieben Dank an alle Freiwilligen, die mir für diese Arbeit Blut gespendet haben.

Danke an die Mitarbeiter des HLA-Labors unter der Leitung von Dr. Jürgen Enczmann für das Benutzen der PCR-Maschinen und für viele kleine Gefälligkeiten. Ebenfalls herzlichen Dank an Dr. Hans-Ingo Trompeter für seine Hilfsbereitschaft.

Den Mitarbeitern der ITZ Apharese-Station danke ich für die zahlreichen Blutabnahmen.

Herrn Prof. Dr. Arndt Borkhardt, Direktor der Klinik für Kinder-Onkologie, Hämatologie und Klinische Immunologie danke ich herzlich für die Bereitstellung der pädiatrischen mesenchymalen Stammzellen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Walter Däubener und Prof. Dr. Reiner U. Jänicke für das Benutzen des Bestrahlungsgerätes.

Weiterer Dank gilt Prof. Dr. Brigitte Royer-Pokora und Dr. Barbara Hildebrandt für die Durchführung der FISH-Analysen.

Lieber Katharina Raba danke ich für die exzellente und geduldige Einführung in die Durchflusszytometrie, für die unzähligen Hilfsaktionen an Canto und Cyan und ihre ansteckende positive Ausstrahlung und ihre stetige Aufmunterungen.

Ein riesen Dankeschön an meine lieben Kollegen und ehemalige Mitglieder der AG Uhrberg für die tolle und harmonische Arbeitsatmosphäre, die ich immer sehr geschätzt habe:

Liebe Angie, Danke für die schöne Tage in und außerhalb des Labors, für das Beantworten unendlicher Fragen und für viele „Moment Mal!“ Momente. Vor allem Danke für das Korrekturlesen dieser Arbeit (ist „das“ hier richtig?) und deine übermenschliche Genauigkeit beim Finden jeder winzigen Fehler! Vielen Dank!

Liebe Sandra, danke für deine unermüdliche Unterstützung und dafür, dass du immer ein offenes Ohr hattest. Liebe Nadine, danke für deine direkte und liebenswerte Art und dass du nie aufgegeben hast, aus uns bessere Labormitarbeiter (oder einfach bessere Menschen!) zu machen. Meine liebste Sarah (bei dir kommen meine mütterliche Gefühle hoch!), Danke für deine ansteckende Fröhlichkeit und die einen oder anderen wissenschaftlichen, aber auch „nicht-wissenschaftlichen“ Ratschläge ;) Liebe Ricarda, dir danke ich für die tollen gemeinsamen Tage und wünsche dir alles Gute in deinem neuen Job.

Ein ganz besonderes Dankeschön an meine Freunde, die für die Abwechslung außerhalb des Laboralltags gesorgt und mich immer aufgebaut haben.

Ein großer Dank gilt meiner Familie, besonders meinem Bruder. Danke, dass Ihr euch für meine Arbeit interessiert habt, immer für mich da wart und fest an mich geglaubt habt.

Ein herzliches Dankeschön an meine wundervolle Kinder, Kian und Nika, die mich glücklich machen und mein Leben auf eine unglaubliche Art und Weise bereichern.

Mein größter Dank gilt meinem Mann und bestem Freund Arash, den ich liebe und der mich täglich unterstützt und motiviert. Du gibst mir für so vieles die nötige Kraft. Ohne dich wäre ich nicht da, wo ich heute bin. Vielen Dank!

Und jetzt ein paar Worte auf Persisch an meine lieben Eltern, die mir stets zur Seite standen und mich einfach bei allem unterstützt haben:

پدر و مادر عزیزم از تمامی زحماتی که برایم کشیده اید متشکرم و امیدوارم بتونم روزی یک ذره کوچکی از این همه عشق و محبت رو جبران کنم. اگر کمک های مامان مخصوصا تو این هفته های آخر نبود کار من به انتها نمی رسید. دوستتون دارم.

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Arbeit selbständig und unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Ich erkläre gleichzeitig, dass ich die vorgelegte Dissertation in dieser oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner Institution eingereicht habe.

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

Düsseldorf, den

Maryam Hejazi