

**Charakterisierung der spezifischen Liganden der
Natürlichen Killerzell-aktivierenden Rezeptoren
NKp46, NKp44 und NKp30 auf Tumorzellen**

Von dem Fachbereich Biologie

**der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines**

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat)

**genehmigte Dissertation
von**

Dipl.-Biol. Mostafa Jarahian

geboren am 23.8.1963, in Mahabad (Iran)

2004

Referent: Prof. Dr. med. M. Szamel

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. F. Momburg

Tag der Promotion: 30.7.2004

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Herrn Priv.-Doz. Dr. Frank Momburg, DKFZ Heidelberg, Frau Prof. Marta Szamel, Institut für Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover, in der Zeit vom 1.1.2001 bis zum 31.3.2004 erstellt.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter Verwendung nur der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

(Mostafa Jarahian)

Danksagung

Herrn PD Dr. Frank Momburg danke ich herzlich für die interessante und abwechslungsreiche Themenstellung, für sein großes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und für seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Ich möchte allen, die mir bei der Erstellung dieser Promotion mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, herzlich danken, insbesondere Frau Prof. Marta Szamel, Herrn PD Dr. Carsten Watzl, Prof. Dr. Peter Altevogt, PD Dr. Reinhard Schwartz-Albiez, Dr. Bernhard Kniep, Dr. Gerhard Moldenhauer, Dr. Thomas Schüler, Dr. Natalio Garcia-Garbi, Dr. Thilo Öelert und Dr. Karen Strenge.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Anita Marx und Ingo Rabe für den Rückhalt und die aufmunternden Worte zur rechten Zeit sowie für ihre langjährige Unterstützung in jeder Hinsicht.

Abkürzungen	1
1. Einleitung	3
1.1. Das Immunsystem	3
1.1.1 Die Rolle von cytotoxischen T-Zellen	5
1.1.2 Die Antitumorantwort des Immunsystems	7
1.2 Natürliche Killerzellen und ihre Rolle in der Immunabwehr	8
1.2.1 Reifung von NK-Zellen	11
1.2.2 NK-Zellen im Blut und in lymphatischen Organen	12
1.2.3 NKT-Zellen	13
1.3 NK-Zell-Rezeptoren	13
1.3.1 MHC-I-spezifische Rezeptoren auf NK-Zellen	13
1.3.2 Lektin-ähnliche NK-Rezeptoren	19
1.3.3 Nicht-MHC-reaktive aktivierende Rezeptoren auf NK-Zellen	21
1.3.3.1 Fc γ -Rezeptor III (CD16)	21
1.3.3.2 CD2	22
1.3.3.3 2B4 (CD244), NTB-A	22
1.3.3.4 NKp80 (KLRF-1)	22
1.3.3.5 NKR-P1	23
1.3.3.6 CD69 und andere Aktivierungsrezeptoren	23
1.3.4 Die Natural Cytotoxicity Receptors (NCR) NKp30, NKp44 und NKp46	23
1.4. Fragestellung	28
2. Material und Methoden	29
2.1 Geräte, Apparaturen	29
2.2 Verbrauchsmaterialien	29
2.2.1 Chemikalien	29
2.2.2 Enzyme und andere Proteine	31
2.2.3 Antikörper	31

Inhaltsverzeichnis

2.2.4	Kits	31
2.3	Zelllinien	32
2.4	Molekularbiologische Methoden	33
2.4.1	Plasmidisolierung (Mini-Präparation)	33
2.4.2	Plasmidisolierung (Maxi-Präparation)	33
2.4.3	DNS-Sequenzierung	34
2.4.4	Restriktionsverdau von Plasmid-DNS	34
2.4.5	DNS-Gelelektrophorese	34
2.4.6	DNS-Extraktion aus Agarosegelen	35
2.4.7	Ligation von DNS-Fragmenten und Transformation	35
2.5	Zellkulturmethoden	36
2.5.1	Kultivierung von eukaryotischen Zellen	36
2.5.2	Trypsinieren von adhärenenten, eukaryotischen Zellen	37
2.5.3	Einfrieren von eukaryotischen Zellen	37
2.5.4	Auftauen und Revitalisieren der eukaryotischen Zellen	37
2.5.5	Bestimmung der Zellzahl	38
2.6	Transfektionen	38
2.6.1	Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Elektroporation	38
2.6.2	Transfektion von eukaryotische Zellen mittels DOTAP und FuGene 6	38
2.6.3	Expression von rekombinantem Protein im Großmaßstab	39
2.6.4	Reinigung der Fusionsproteine	39
2.7	Biochemische Methoden	40
2.7.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	40
2.7.2	Western-Blot	41
2.7.3	Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen	42
2.7.4	Proteinnachweis mit Coomassie-Blau	43
2.7.5	Metabolische Markierung von Zellen mit [³⁵ S]Methionin/Cystein	44
2.7.6	Lysatvorbereitung und Präzipitation	44

Inhaltsverzeichnis

2.7.7	ELISA	45
2.8	Zellfärbungen	47
2.8.1	Immuncytochemie an Cytozentrifugaten	47
2.8.2	Cytofluorimetrie	47
2.9	Natural-Killer(NK)-Zell-Assay	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Herstellung von Expressionsvektoren für NCR-Ig-Fusionsproteine	49
3.1.1	Expression von rekombinanten NCR-Ig-Fusionsproteinen in verschiedenen Zelllinien	52
3.1.2	Sekretion und Aufreinigung der Fusionsproteine	56
3.1.3	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) zum Nachweis der sezernierten Fusionsproteine	58
3.1.4	Screening von humanen oder Nagetier-Tumorzelllinien mit NCR-Fusionsproteinen	59
3.2	Suche nach Proteinliganden für NCR durch Präzipitation aus Zelllysaten	64
3.3	Untersuchungen zur biochemischen Natur der NCR-Liganden	68
3.3.1	Analyse von (Glyko)Proteinen als potentielle Ligandenstrukturen	68
3.3.1.1	Behandlung von lebenden Zellen mit Cycloheximid	68
3.3.1.2	Behandlung von fixierten Zellen mit Proteinase K	69
3.3.1.3	Behandlung von fixierten Zellen mit Chymotrypsin oder Papain	70
3.3.2	Sind Carbohydratdeterminanten von Glykoproteinen Bestandteil der Ligandenstrukturen	71
3.3.2.1	Behandlung von lebenden Zellen mit dem N-Glykosylierungsinhibitor Tunicamycin	72
3.3.2.2	Behandlung von lebenden Zellen mit Desoxymannojirimycin und Castanospermin	72
3.3.2.3	Behandlung von lebenden Zellen mit dem O-Glykosylierungsinhibitor Benzyl-N-acetyl- α -D-galactosaminid	74

Inhaltsverzeichnis

3.3.2.4	Behandlung von fixierten Zellen mit Endoglykosidase F2 und Neuraminidasen	75
3.3.2.5	Analyse der Sulfatierung von Glykoproteinen	77
3.3.3	Analyse der Rolle von Proteoglykanen als potentielle NK-Zell-Liganden	78
3.3.4	Analyse von GPI-Proteinen	80
3.3.4.1	Behandlung von lebenden Zellen mit Mannosamin	80
3.3.4.2	Behandlung von fixierten Zellen mit Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipasen	83
3.3.4.3	Verwendung von GPI-defizienten Zellen	84
3.3.5	Analyse von Glykolipiden als potentielle NCR-Liganden	86
3.3.5.1	Analyse des Einflusses von Brefeldin A und Monensin auf die NCR-Liganden	86
3.3.5.2	Analyse von Endoglycoceraminidase	88
3.3.5.3	Biochemische Untersuchung von Lipiden aus HeLa- und HT29-Zellen	89
3.3.5.4	NK-Assays mit Glykolipid-beladenen Zielzellen	91
3.3.5.5	Analyse von Inhibitoren der Glykosphingolipid-Biosynthese	92
3.3.5.6	Analyse von Ceramid- und Glykosphingolipid-defizienten Zellen	95
3.3.6	Analyse von zellulären Lektinen als potentielle NCR-Liganden	98
3.3.6.1	Analyse von L-Selektin, P-Selektin und Mannose-6-Phosphatrezeptor	98
3.3.6.2	Analyse von L1-CAM und anderen Siglecs als potentielle Liganden von NKp46 und NKp44	99
4	Diskussion	111
5	Zusammenfassung	119
6	Abstract	121
7	Literaturverzeichnis	123

Inhaltsverzeichnis

<i>Abb.</i>	<i>Beschreibungen</i>	<i>Seite</i>
1	<i>Übersicht über Mechanismen der adaptiven Immunreaktionen am Beispiel der Transplantatabstoßung</i>	7
2	<i>NK-Zellen und die Immunantwort gegen Tumorzellen</i>	9
3	<i>Interaktionen von NK-Zellen und dendritischen Zellen (DC) in der Peripherie</i>	11
4	<i>Regulierung von NK-Zell-Immunantwort durch die Balance von aktivierenden und inhibierenden Signalen</i>	14
5	<i>MHC-I-spezifische NK-Zellrezeptoren bei Maus und Mensch</i>	16
6	<i>Verschiedene Mitglieder der Killer Inhibitory Receptor-Familie (KIR)</i>	16
7	<i>Funktionsweise von aktivierenden und inhibierenden KIR-Rezeptoren</i>	18
8	<i>Überblick über MHC-spezifische Ig- und C-Typ-Lektin-ähnliche Rezeptoren, die NK-Zellen aktivieren bzw. inhibieren, zusammen mit ihren signaltransduzierenden Motiven, Adaptormolekülen und Liganden</i>	20
9	<i>Ein Vergleich von aktivierenden und inhibierenden NK-Rezeptoren in Mensch und Maus in Bezug auf normale, gestresste/transformierte und infizierte Zielzellen</i>	21
10	<i>Die Natural Cytotoxicity Receptors (NCR)</i>	25
11	<i>Schematischer Aufbau der NCR-IgG₁-Fusionsproteine</i>	51
12	<i>Diese Abbildung zeigt den schematischen Aufbau der rekombinanten NCR-Fusionsproteine</i>	51
13	<i>Expression von NCR-Fusionsproteinen in COS-Zellen</i>	54
14	<i>Sekretion von Fusionsproteinen durch stabil transfizierte A549-Klone und 221-Zellen</i>	57
15	<i>Fusionsprotein-Konzentrationsbestimmung aus Kulturüberständen von transfizierten 221-Zellen</i>	58
16	<i>Fusionsprotein Konzentrationsbestimmung aus Kulturüberständen von transfizierten A549-Klonen</i>	58
17	<i>CD99-Ig- und CD16-Ig-Fusionsproteine sezerniert von A549-Transfektanten</i>	59
18/19	<i>Screening von Tumorzelllinien mit NCR-Fusionsproteinen</i>	60
20	<i>Immunperoxidasefärbung von HeLa-Zellen mit durch Isoleuzin-Zipper trimerisierten, löslichen NKp30 und NKp44-Proteinen im Vergleich zu NKp30-Ig und NKp44-Ig</i>	62
21	<i>Immunperoxidase-Färbung von Frosch- und Hefezellen mit NCR-Ig</i>	62
22	<i>Oberflächenimmunfluoreszenz mit NCR-Fusionsproteinen</i>	63
23	<i>Western Blot von NKp46- und NKp44-Präzipitaten aus HeLa und 293-Lysaten</i>	64
24	<i>Präzipitationen mit NCR -Fusionsproteinen aus metabolisch markierten Zellen</i>	65
25	<i>Präzipitation mit NCR-Ig aus Zelllysat</i>	66
26	<i>Präzipitation mit NKp30-Ig aus Zelllysat</i>	67
27	<i>Cycloheximid-Behandlung von HeLa-Zellen</i>	69
28	<i>Proteinase K Verdau von fixierten HeLa-Zellen</i>	70
29	<i>Verdau von fixierten Zellen mit Chymotrypsin und Papain</i>	71
30	<i>NCR -Ig-Färbung von Tunicamycin-behandelten HeLa-Zellen</i>	72
31	<i>NCR-Ig-Färbung von Castanospermin-behandelten HeLa-Zellen</i>	73
32	<i>Behandlung von HeLa-Zellen mit einem O-Glykosylierungsinhibitor</i>	74
33	<i>Verdau von fixierten CHO- und Jurkat-Zellen mit Neuraminidase und Mannosidase</i>	76
34	<i>Einfluss von niedrigem pH bzw. Ca²⁺ auf die NCR-Ig-Bindung</i>	76

Inhaltsverzeichnis

35	<i>Cytospin-Immunperoxidasefärbungen von 6-O-Sulfotransferase-defizienten und 6-O-Sulfotransferase-retransfizierten Jurkat-Zellen</i>	77
36	<i>NK-Zellyse von Jurkat-Zellen mit und ohne 6-O-sulfatierte Glykane</i>	78
37	<i>Cytospin-Immunperoxidasefärbungen von Proteoglykan-defizienten CHO-745 und normalen CHO-Zellen</i>	
38	<i>NK -Cytotoxizitätstest mit Proteoglycan-defizienten und normalen CHO-Zellen</i>	79
39	<i>Cytospin-Immunperoxidasefärbungen von mit D-Mannosamin behandelten HeLa-Zellen</i>	80
40	<i>Cytospin-Immunperoxidasefärbungen von mit D-Mannosamin behandelten Jurkat-Zellen</i>	81
41	<i>Cytospin-Immunperoxidasefärbungen von apoptotischen HeLa-Zellen</i>	82
42	<i>Cytospin-Immunperoxidasefärbungen von PI-PLC-behandelten HeLa-Zellen</i>	83
43	<i>Cytospin-Immunperoxidasefärbungen von GPI-defizienten Jurkat-Zellen</i>	84
44	<i>NK-Cytotoxizitätstest mit GPI-positiven und GPI-negativen Jurkat-Zellen</i>	85
45	<i>Cytospin-Immunperoxidasefärbungen von acetonfixierten Ausstrichen von menschlichem und murinem peripheren Blut</i>	85
46	<i>Schema der Sphingolipid-Biosynthese</i>	86
47	<i>Einfluss von Monensin und Brefeldin A auf die Expression von NCR-Liganden</i>	87
48	<i>Immunperoxidase-Färbungen von Endoglycoceraminiidase-behandelten HeLa und HT29-Zellen</i>	88
49	<i>Immunhistochemische Anfärbungen von Gesamtlipidextrakten nach dünnenschichtchromatographischer Auftrennung</i>	89
50	<i>Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Lipiden und immunhistochemische Anfärbungen mit NKp30-Ig oder Orcin</i>	90
51	<i>NK-Cytotoxizitätstest mit Glykosphingolipid-beladenen Jurkat und CHO745-Zielzellen</i>	91
52A/B	<i>Immunperoxidasefärbungen von Tumorzellen, die mit Ceramid-Glucosyltransferase-Inhibitoren behandelt wurden. A</i>	92
53	<i>Immunperoxidasefärbungen von Ceramid-behandelten HeLa-Zellen</i>	95
54	<i>NCR-Ig-Reaktivität von Glykosphingolipid-Defektmutanten</i>	96
55	<i>NK-Zellyse von Glykosphingolipid-exprimierenden und -defizienten CHO-Zellen</i>	97
56	<i>Humane siglecs</i>	99
57	<i>L1 inhibiert die Bindung von MAA-II-Lektin an NKp46-Ig und NKp44-Ig im ELISA</i>	100
58	<i>L1 inhibiert die Bindung von MAA-II-Lektin an NKp46-Ig und NKp44-Ig im ELISA</i>	101
59	<i>Bindung von SNA-Lektin an NCR-Ig-Fusionsproteine im ELISA</i>	102
60	<i>Bindung von MAA-II-Lektin an sialylierte NCR-Ig-Fusionsproteine im ELISA</i>	102
61	<i>Prüfung der Inhibition der MAA-II-Lektin-Bindung durch Siglecs im ELISA</i>	103
62	<i>Bindung von L1 an NCR-Ig-Fusionsproteine im ELISA</i>	104
63	<i>Cytofluorimetrischer Nachweis von L1</i>	105
64	<i>Cytofluorimetrische Färbung mit NCR-Ig</i>	106
65	<i>NK-Cytolyse von 293 und 293-L1-Zellen durch NK92</i>	107
66	<i>NK-Cytolyse von 293 und 293-L1-Zellen durch NK92</i>	107
67	<i>Cytotoxizitätstests mit Klonen aus einer humanen polyklonalen NK-Population</i>	108
68	<i>Inhibition der NK-Cytolyse durch Antikörper</i>	110

Inhaltsverzeichnis

<i>Tabellen</i>	<i>Beschreibungen</i>	<i>Seite</i>
<i>1</i>	<i>KIR-Rezeptoren auf humanen NK-Zellen und ihre HLA-Spezifitäten</i>	<i>17</i>
<i>2</i>	<i>Expression von NCR-Fusionsproteinen in elektroporierten COS-7-Zellen analysiert im Cytospin</i>	<i>52</i>
<i>3</i>	<i>Expression von NCR-Fusionsproteinen in mit DOTAP transfizierten COS-7-Zellen analysiert im Cytospin</i>	<i>53</i>
<i>4</i>	<i>Expression von NCR-Fusionsproteinen in mit FuGene6 transfizierten COS-7-Zellen analysiert im Cytospin</i>	<i>53</i>
<i>5</i>	<i>Expression von NCR-Fusionsproteinen in stabil transfizierten LCL721.221 Zellen analysiert im Cytospin</i>	<i>55</i>
<i>6</i>	<i>Expression von NCR-Fusionsproteinen in stabil transfizierten 1106mel- und A549-Zellen analysiert im Cytospin</i>	<i>56</i>
<i>7</i>	<i>Expression von NCR-Fusionsproteinen in Klonen von stabil transfizierten A549-Zellen</i>	<i>56</i>
<i>8</i>	<i>Expression von NKp46-D1 und NKp46-D2-Ig-Fusionsproteinen in stabil transfizierten A549-Zellen</i>	<i>56</i>
<i>9</i>	<i>Behandlung von HeLa-Zellen mit DMM</i>	<i>73</i>

Abkürzungen

Abkürzungen

Ak	Antikörper
ADCC	Antikörper-abhängige zellvermittelte Cytotoxizität
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BfA	Brefeldin A
BSA	Rinderserumalbumin
CHAPS	3-[(Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
Con A	Concanavalin A
cDNS	Komplementäre DNS (DNS-Kopie der RNS)
CTL	Cytotoxische(r) T-Lymphozyt(en)
DC	Dendritische Zelle
dNTP	Desoxyribonukleotid
DMM	Desoxymannojirimycin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGC II	Endoglycoceraminiidase II
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
Fc	konstantes Fragment von Immunglobulin
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GPI	Glykosyl-phosphatidylinositol
GSL	Glykosphingolipide
h	Stunde(n)
H-2	MHC der Maus
HCMV	Humane Cytomegalievirus
HLA	Humane(s) Leukozyten-Antigen(e), MHC des Menschen
H ₂ O bidest	Zweifach destilliertes Wasser
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILT	immunoglobulin-like transcript
ILZ	Isoleucine zipper“-Antikörper
ITAM	Immunorezeptor Tyrosin-basiertes aktivierendes Motiv
ITIM	Immunorezeptor Tyrosin-basiertes inhibitorisches Motiv
kbp	Kilobasenpaare
KIR	<i>KillerInhibitory Receptor</i>
LFA	<i>Leukocyte Function Antigen</i>
LIR	<i>Leukocyte Inhibitory Receptor</i>
MCMV	Maus-Cytomegalievirus
mAk	monoklonaler Antikörper
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minuten
NCR	<i>Natural Cytotoxicity Receptors</i>

Abkürzungen

NK	Natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
PAS	Protein A Sepharose
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDMP	D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol
PPMP	D-threo-1-phenyl-2-palmitoylamino-3-morpholino-1-propanol
RT	Raumtemperatur
TAE	Tris-Acetat/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
ÜS	Überstand
w/v	Gewicht/ Volumen
VC	<i>Vibrio cholerae</i>

Einleitung

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Im Laufe der Evolution hat sich das Immunsystem zu einem komplexen Abwehrmechanismus entwickelt. Die Immunantwort der Wirbeltiere stellt ein Abwehrsystem dar, das fremde von körpereigenen Stoffen unterscheidet. Ein fremdes Molekül (oder eine Teilstruktur davon), das vom Immunsystem erkannt wird, wirkt als körperfremdes Antigen. Gewöhnlich sind Antigene Proteine (etwa das Hüllprotein eines infizierenden Virus oder an Proteine verknüpfte Kohlenhydrate der Bakterien), die in die Blutbahn des Organismus eingedrungen sind. Diese Abwehrreaktionen des Organismus gegen Pathogene werden einerseits durch die unspezifische (angeborene) und andererseits durch die spezifische (erworbene) Abwehr vermittelt. Beide Systeme verfügen sowohl über humorale als auch über zelluläre Bestandteile und arbeiten ergänzend zusammen. Für eine effektive Bekämpfung und Elimination von Pathogenen ist eine Interaktion zwischen angeborener und erworbener Immunität notwendig, welche durch eine Vielzahl von Zellen und durch unterschiedliche lösliche Faktoren vermittelt wird.

Unter dem Begriff „Angeborene Immunität“ werden alle Abwehrstrategien zusammengefasst, die nicht adaptiv sind. Sie umfasst vor allem die Erkennung von allgemeinen molekularen Mustern, wie Kohlenhydrat- und anderer posttranslationaler Modifikationen, auf Seiten der Pathogene oder der infizierten Zellen.

Bei der angeborenen Immunität handelt es sich im Wesentlichen erstens um Zellen der myeloischen Reihe (eosinophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen), die vor allem Phagozytose betreiben, zweitens um Natürliche Killer (NK)-Zellen, die cytotoxisch wirken, und drittens um lösliche Mediatoren, wie z.B. Komponenten des Komplementsystems. Das Komplementsystem besteht aus rund 20 Proteinen, die sich in einer Kaskade von proteolytischen Reaktionen nacheinander aktivieren. Ist das Antigen Teil einer Zelle, etwa eine Oberflächenstruktur auf einem Bakterium, so richtet sich die Wirkung des Komplements auf die Lyse dieser Zelle. Die Komponenten des Komplementsystems wirken entweder selbst bakteriolytisch oder können zelluläre Funktionen aktivieren, die zur Elimination der Pathogene führen (Janeway und Travers, 1999).

Die spezifisch erworbene Immunität ist nur bei den höheren Wirbeltieren vorhanden. Der spezifische Teil des Immunsystems zeichnet sich durch die Existenz von antigenspezifischen Gedächtnis-Zellen aus, die eine rasche und effektive Immunantwort bei einer erneuten Infektion ermöglichen. Am Beginn der adaptiven Immunantwort steht die Aufnahme und Prozessierung eines fremden Antigens durch antigenpräsentierende Zellen (APZ). Die

Einleitung

Adhäsionsmoleküle, z.B. ICAM-1 auf APZ und LFA-1 auf T-Zellen, ermöglichen zuerst eine frühe Wechselwirkung der naiven T-Zellen mit APZ. Die naiven T-Zellen treten über ihre antigenspezifischen Rezeptoren, die T-Zell-Rezeptoren (TCR), und die Korezeptoren CD4 bzw. CD8 mit dem MHC-Peptid-Komplex in Kontakt. T-Zellrezeptoren (TCR) bestehen aus den hochgradig polymorphen Glykoprotein-Ketten α und β , die durch eine Disulfid-Brückenbindung miteinander verbunden sind. Ihre Variabilität ist das Ergebnis der somatischen Umarrangierung von V (variable), J (joining) und D (diversity) Gen-Segmenten. Der TCR-Komplex enthält auch die invarianten Untereinheiten des CD3-Komplexes (γ , δ und ϵ) sowie die strukturell deutlich verschiedene CD3- ζ -Kette. TCR α/β sind für die Erkennung der Antigene verantwortlich, während der CD3-Komplex die Signaltransduktion einleitet.

Die antigenspezifische T-Zelle benötigt für eine klonale Expansion neben der Erkennung des spezifischen Antigens gleichzeitig noch ein zweites, kostimulierendes Signal von derselben APZ. Zu den kostimulierenden Molekülen auf Seiten der APZ zählen u.a. die B7-Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86). CD28 ist der Ligand von B7 und befindet sich auf der Oberfläche der T-Zelle. Fehlt die B7-CD28-Interaktion, wird die T-Zelle in einen Anergie-Zustand fallen, in dem sie auf eine Aktivierung nicht mehr reagiert (Janeway und Travers, 1999).

Dieser Prozess steuert die Aktivierung der antigenspezifischen Lymphozyten, ihre klonale Proliferation und ihre Differenzierung zu Effektorzellen. Die Gesamtheit der Lymphozyten aus B- und T-Zellen besitzt eine Vielzahl von B- oder T-Zellrezeptoren, jedoch produziert jede B- oder T-Zelle nur einen spezifischen Antikörper beziehungsweise T-Zell-Rezeptor, der nur ein bestimmtes Antigen erkennt.

Die T-Zellen wandern nach ihrer Entstehung im Knochenmark als Prä-T-Lymphozyten in den Thymus ein. Im Thymus laufen die somatischen Rekombinationsprozesse zur Bildung der T-Zellrezeptorvielfalt ab, ebenso der Prozess der klonalen Deletion autoreaktiver Lymphozyten. Sie differenzieren sich nach Antigenkontakt zu CD4⁺ T-Helferzellen oder CD8⁺ cytotoxischen T-Zellen. CD4⁺ Th0-Zellen differenzieren weiter zu CD4⁺ Helferzellen Typ1 (Th1) und Typ2 (Th2). Die CD4⁺ T-Lymphozyten erkennen internalisierte, zelleigene sowie endozytierte bakterielle und parasitäre Antigene, die in endosomalen Vesikeln degradiert werden und ihnen in Form von Peptiden über MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert werden (Kuby, 1999).

Die pro-inflammatorischen Th1-Zellen stimulieren Makrophagen, die nun in die Lage versetzt werden, intrazelluläre Erreger effizienter abzutöten. Dies geschieht mit Hilfe des sezernierten Signalmoleküls Interferon- γ (IFN- γ). Th1-Zellen koordinieren die Immunantwort

Einleitung

durch weitere Cytokine. Sie beschleunigen ihre eigene Proliferation durch die Expression von IL-2 und IL-2-Rezeptor.

Virusbefallene dendritische Zellen können T-Helfer-Zellen aktivieren. Während in der Zelle produziertes Virusmaterial zunächst nur in Form von Peptiden durch MHC-I präsentiert werden kann, gelangen die Hüllproteine des Virus in die Zellmembran, um das Knospen neuer Viren zu ermöglichen. Von dort können sie durch Endocytose in endosomale Vesikel aufgenommen, zu Peptiden prozessiert und durch MHC-II wieder an die Oberfläche gebracht werden. T-Helferzellen (Th2) aktivieren B-Zellen, mit deren Hilfe Antikörperantworten besonders gegen virale Hüllproteine induziert werden, die Viren neutralisieren können. Th2-Zellen produzieren unter anderem IL-4, welches zum einen das humorale Immunsystem aktiviert, und zum anderen zu einer Rekrutierung eosinophiler Granulozyten führt, die cytotoxische Granula enthalten.

Nach der Aktivierung durchlaufen die B-Lymphozyten eine klonale Expansion und produzieren als Plasmazellen Antikörper. Die Antikörper binden einerseits an spezifische Epitope der Pathogene, um sie damit zu neutralisieren, oder machen sie andererseits für Makrophagen und das Komplementsystem erkennbar.

1.1.1 Die Rolle von cytotoxischen T-Zellen

Viren infizieren oft nur bestimmte Zellpopulationen. Wenn periphere Gewebe von Viren infiziert werden, ist dies für naive T-Zellen oft nicht direkt erkennbar. Viele Gewebe enthalten dendritische Zellen als professionelle APZ, die die Fähigkeit besitzen, nach einer Virusinfektion in den Lymphknoten zu wandern und dort naiven $CD8^+$ -T-Zellen Virusantigene durch MHC-I-Moleküle vermittelt zu präsentieren. Im regionalen Lymphknoten entsteht damit also zu jeder Zeit ein Abbild der antigenen Situation im Einstromgebiet. Erkennt eine $CD8^+$ -T-Zelle die Kombination aus eigenem MHC-I mit Fremdpeptid, wird sie aktiviert, beginnt zu proliferieren und bildet einen cytotoxischen T-Zellklon mit Spezifität für diesen MHC-I-Fremdpeptid-Komplex. IL-2 und $IFN-\gamma$ sezernierende Th1-Zellen sind wichtig für die Aktivierung der cytotoxischen T-Zellen. Die fertigen Effektorzellen zirkulieren nun durch die Körpergewebe und überwachen alle Zellen, die ihnen begegnen (Kuby, 1999).

APZ präsentieren neben Peptiden aus endogenen, d.h. von der Zelle selbst synthetisierten Proteinen auch exogene Peptide über den Mechanismus der Kreuzpräsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle (Rock, 1996). Die Antigen-Proteine werden im Cytosol durch Proteasomen verdaut und mit Hilfe der TAP-Peptidtransportermoleküle ATP-abhängig in das

Einleitung

Lumen des ER transportiert und dort auf die MHC-Klasse-I-Moleküle geladen (Momburg und Hämmerling, 1998). Der Peptid-MHC-Klasse-I-Komplex wird dann über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert (Pamer und Cresswell, 1998).

Begegnet die $CD8^+$ -T-Effektorzelle einer Zielzelle mit einem MHC-I-Molekül-Antigen-Komplex, der von ihrem T-Zellrezeptor erkannt wird, leiten sie nun in der entsprechenden Zielzelle Apoptose ein. Dazu besitzen sie zwei Mechanismen: Der erste besteht in der Sekretion von Perforin und Granzymen. Beide sind in Granula gespeichert und werden nach Antigenerkennung freigesetzt. Perforin polymerisiert in der Membran der Zielzelle zu einer großen Pore. Durch diese Pore werden die Granzyme ins Zellinnere geschleust. Dort aktivieren sie Caspasen, welche spezifische Proteasen, die die Apoptosemaschinerie in Gang setzen, darstellen.

Der zweite Mechanismus der Apoptoseeinleitung ist die Induktion des Oberflächensmoleküls Fas-Ligand. Wenn die virusbefallenen Körperzellen das Partnermolekül Fas auf der Oberfläche exprimieren, genügt der Kontakt zwischen Fas-Ligand und Fas, um in der Zielzelle Caspasen zu aktivieren. Durch diese Vorgänge bleibt die cytotoxische T-Zelle selbst unbeschädigt.

Ziel der cytotoxischen Immunantwort ist es, durch Zerstören der befallenen Zellen die Vermehrung des Virus zu stoppen. Normalerweise können die so eintretenden Zellverluste leicht durch Proliferation nicht befallener Zellen wieder ausgeglichen werden. Wenn der Virusbefall und die cytotoxische Immunantwort aber massiv ausfallen, kann es zu schweren Schäden kommen, die eigentlich nicht durch das Virus, sondern erst durch die Abwehr bedingt sind. Ein Beispiel dafür ist eine akute gelbe Leberdystrophie bei Hepatitis-B-Infektion.

Da das Erkennen von pathologischen Veränderungen durch cytotoxische T-Zellen (CTL) an die Präsentationsfunktion von MHC-I gebunden ist, erscheint es notwendig, dass es einen Mechanismus geben muss, der virusinfizierte Zellen beseitigt, die nicht ausreichend MHC-I exprimieren. Verschiedene Viren hemmen die MHC-I-Expression der von ihnen befallenen Zellen (Tortorella et al., 2000). Das ist für sie insoweit ein Selektionsvorteil, als damit während der adaptiven Immunantwort die Erkennung durch CTL behindert wird. Mit dieser Strategie machen sie sich jedoch durch NK-Zellen angreifbar, die durch MHC-I-Moleküle inhibiert werden (s.u.).

Einleitung

Tumorzellen unterbinden die Präsentation ihrer Tumorantigene. Durch Selektion entstehen Zellvarianten, die ihr Antigen entweder verloren oder durch Mutation so verändert haben, dass sie von den CTL nicht mehr erkannt werden (Uyttenhove et al., 1983). Desweiteren können Defekte in der Prozessierungs- und Präsentationsmaschinerie oder eine verminderte oder aufgehobene Expression von MHC-Molekülen zu einer verringerten Antigenpräsentation führen (Hui et al., 1984; Seliger et al., 2002; Garrido and Algarra, 2001).

Die Bekämpfung von Tumorzellen ohne vorausgegangenen Antigenkontakt erfolgt durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen, wobei diese Form der Immunantwort jedoch nicht gegen MHC-präsentierte, tumorassoziierte Antigene gerichtet ist (Bloom, 1982). Es hat sich gezeigt, dass die Sensibilität gegenüber der NK-Zell-Cytotoxizität mit der Abnahme der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf Tumorzellen korreliert (Ljunggren und Kärre, 1985; Lanier et al., 1997). Die Antitumorantwort des Organismus wird durch ein komplexes Zusammenwirken zwischen Tumorzellen, APZ und Effektorzellen (cytotoxischen T-Zellen, T-Helfer-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen) hervorgerufen.

1.2 Natürliche Killerzellen und ihre Rolle in der Immunabwehr

Natürliche Killerzellen bilden neben den T- und B-Zellen die dritte Unterklasse von Lymphozyten. NK-Zellen sind unabhängig voneinander im Jahre 1975 im schwedischen Karolinska Institut (Kiessling et al., 1975a,b) und im amerikanischen National Institute of Health (Herberman et al., 1975) entdeckt worden. 10-15% der zirkulierenden Lymphozyten im menschlichen Blut sind NK-Zellen. NK-Zellen sind auch im Knochenmark, in Lymphknoten, der Milz, der Leber, der Lunge, im Gastrointestinaltrakt und in der Plazenta anzutreffen (Colucci et al., 2003). Sie unterscheiden sich morphologisch von der Mehrzahl der Lymphozyten durch ihre Größe und ihren Reichtum an cytoplasmatischen Granula. Humane NK-Zellen werden phänotypisch definiert über die Expression des FcγRIII (CD16), des CD56-Moleküls (N-CAM) und, zur Abgrenzung von B- und T-Zellen, durch die fehlende B-Zellrezeptor- bzw. T-Zellrezeptor/CD3-Expression (Trinchieri, 1989; Robertson und Ritz, 1990; Cooper et al., 2001).

Im Gegensatz zu den B- und T-Zellen sind NK-Zellen Effektorzellen des angeborenen Immunsystems. NK-Zellen erlangen kein immunologisches Gedächtnis wie B- und T-Lymphozyten im Rahmen der adaptiven Immunität. Obwohl die NK-Zellen fähig sind, allogenes transplantiertes Knochenmark abzustößen (George et al., 1997), sind NK-Zellen in erster Linie wegen ihrer Fähigkeit, infizierte oder transformierte Körperzellen ohne lange Sensibi-

Einleitung

lisierungsphase lysieren zu können, von Bedeutung (Trinchieri, 1989; Moretta et al., 1996; Lanier et al. 1998). So können die NK-Zellen unmittelbar z. B. mit Herpes- oder Influenzaviren infizierte Zellen während der Frühphase einer Infektion abtöten, bis das spezifische Immunsystem die weitere Kontrolle übernimmt (Biron et al., 1999; Brown et al., 2001; Huard und Früh, 2000; Tortorella et al., 2000). NK-Zellen können des weiteren eine adaptive Immunantwort durch Cytokine wie IFN- γ aktivieren (Biron et al., 1999) (siehe Abb. 2).

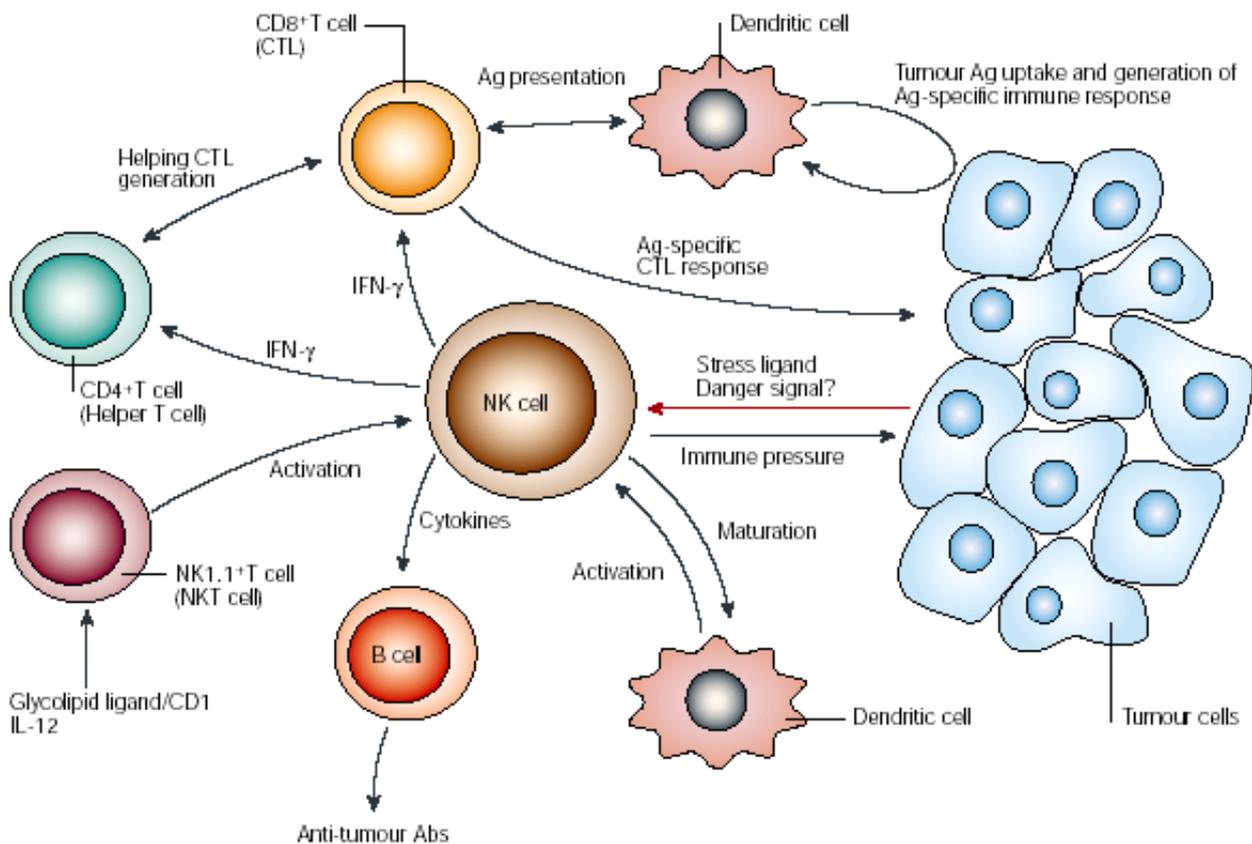


Abb. 2. NK-Zellen und die Immunantwort gegen Tumorzellen. Dieses Schema zeigt die verschiedenen Rollen von NK-Zellen bei der Tumorentwehr in der Vernetzung mit anderen Zellen des Immunsystems. NK-Zellen könnten initial Gefahren- oder Stresssignale erkennen, die von Tumorzellen ausgehen. Sowohl NK-Zellen wie cytotoxische T-Zellen (CTL) sind potente Mediatoren der Antitumorimmunität, da sie letztendlich für die Zerstörung der malignen Zellen verantwortlich sind. NK-Zellen können die Entwicklung einer T-Zell-vermittelten adaptiven Immunantwort durch Cytokine wie IFN- γ stimulieren, aber auch die Reifung von B-Zellen unterstützen, welche Antikörper gegen Tumorantigene produzieren. Die Lyse von Tumorzellen durch NK-Zellen kann dendritische Zellen mit Tumorantigenen versorgen, welche sie nach ihrer Reifung im Lymphknoten gegenüber CTL präsentieren. Aktivierte NKT-Zellen können die Antitumoraktivität von NK-Zellen stimulieren. (Aus Smyth et al., 2002a)

Einleitung

NK-Zellen können Körperzellen durch den Perforin/Granzym-Weg lysieren (Kagi et al., 1994; van den Broek et al., 1995, 1996; Smyth et al., 1999). Sie können mit Fas-Ligand (FasL), TNF α und TRAIL (TNF-verwandter Apoptose-induzierender Ligand) drei Mitglieder der TNF-Familie exprimieren, welche alle die Tumorzellapoptose über entsprechende Todesrezeptoren einleiten können (Kayagaki et al., 1999; Takeda et al., 2001; Bradley et al., 1998). Auch über den Stickoxid (NO)-Weg können NK-Zellen die Apoptose einleiten (Cifone et al., 1999).

NK-Zellen sezernieren Effektorcytokine wie IFN- γ , TNF- α oder GM-CSF (Cooper et al., 2001; Wayne et al., 2004) und verschiedene Chemokine. Insbesondere die IFN- γ -Produktion durch aktivierte NK-Zellen spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr virusinfizierter Zellen, aber auch bei der Tumorabwehr (Biron et al., 1999; Street et al., 2001). Durch IFN- γ werden die Antworten von T-Helfer- und cytotoxischen T-Zellen aktiviert. Von unreifen NK-Zellen sezernierte Th2-Cytokine können den B-Zell-Arm der adaptiven Immunantwort stimulieren (Cooper et al., 2001). NK-Zellen haben die Fähigkeit zur antikörperabhängigen zellulären Cytotoxizität (ADCC), bei der sie antikörperopsonierte Zielzellen über den Fc γ -Rezeptor III (CD16) binden und abtöten. Sie haben damit auch eine direkte Funktion im Rahmen der erworbenen Immunabwehr (Ojo und Wigzell, 1978).

Von großer Bedeutung scheint die Interaktion zwischen NK-Zellen und dendritischen Zellen zu sein. Einerseits wird die Aktivierung und Reifung von NK-Zellen durch Cytokine und Chemokine, die von DC sezerniert werden, wie IL-12, IL-18, IL-15, IL-1, CCL3 und CXCL8 (IL-8) angeregt (Cella et al., 1997; Fernandez et al., 1999; Moretta, 2002; Cooper et al., 2004). Andererseits können durch NK-Zellen lysierte, virusinfizierte oder transformierte Zellen von DC phagozytiert und prozessiert werden. Anschließend kann durch diese DC die adaptive T-Zell-Antwort über die MHC-vermittelte Antigenpräsentation induziert werden (Kelly et al., 2002; Gerosa et al., 2002). Darüber hinaus können aktivierte NK-Zellen TNF- α -vermittelt die Reifung von DC fördern oder unreife und reife DC Perforin- und NKp30-abhängig lysieren und damit die Immunantwort begrenzen (Wilson et al., 1999; Ferlazzo et al., 2002) (siehe Abb. 3).

Einleitung

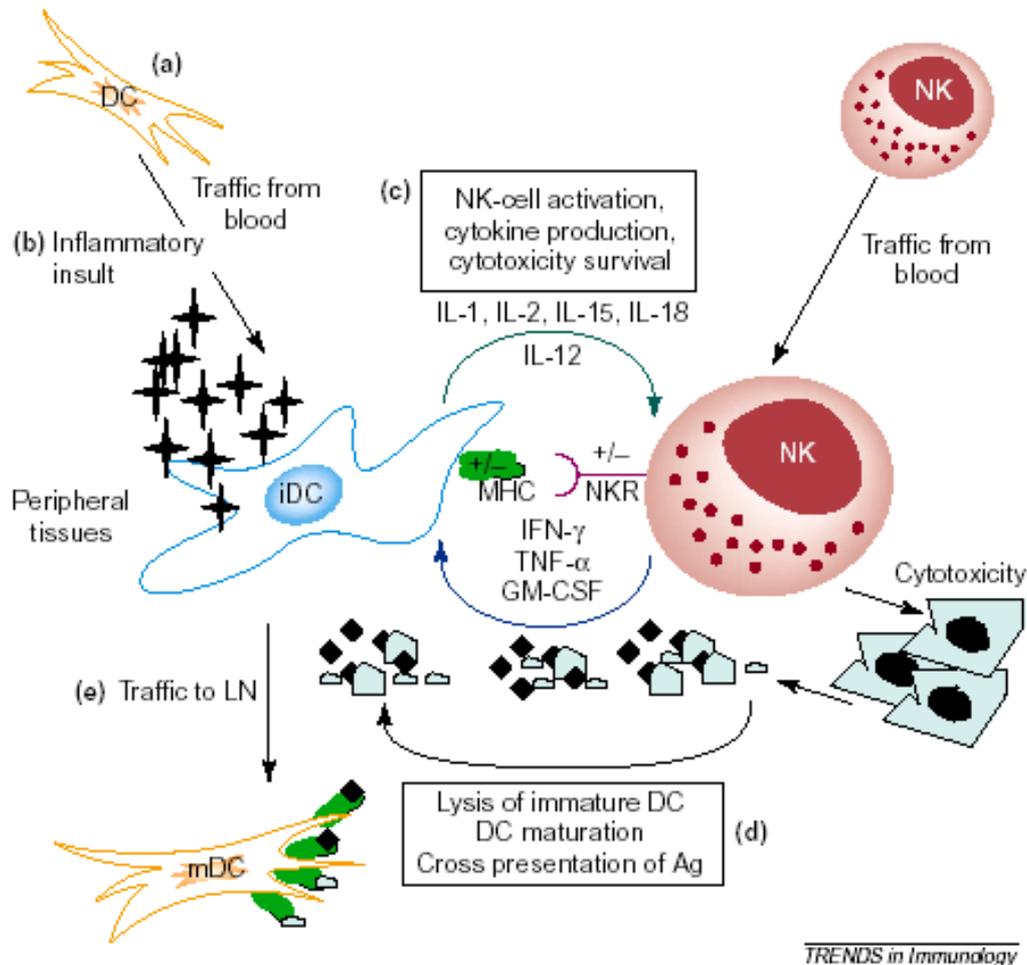


Abb. 3. Interaktionen von NK-Zellen und dendritischen Zellen (DC) in der Peripherie.

a) DC aus dem Blut wandern an den Ort einer Entzündungsreaktion als Antwort auf Entzündungssignale. b) Unreife DC (iDC) phagozytieren dort Pathogene und werden aktiviert. c) Reifende DC schütten eine Vielzahl von Cytokinen aus, die auf NK-Zellen einwirken. Die NK-Zellen werden durch inflammatorische Signale und/oder durch DC-Chemokine aus dem Blut an den Ort der Entzündungsreaktion gelockt. d) Durch Zell-Zell-Kontakt und NK-Zell-Cytokine erhalten DC Reifungssignale. Reife DC exprimieren mehr MHC-I, das wiederum die NK-Zellen inhibiert. NK-Zell-vermittelte Cytolyse von infizierten Zellen kann zur Kreuzpräsentation von Antigenen durch DC führen. NK-Zellen können auch iDC lysieren und so durch die Zerstörung von DC, welche nicht korrekt auf inflammatorische Signale antworten, die Immunantwort begrenzen. e) Reife DC (mDC) können letztlich in die Lymphknoten (LN) wandern und dort Antigene präsentieren. (Aus Cooper et al., 2004)

1.2.1 Reifung von NK-Zellen

NK-Zellen entwickeln sich aus einer fötalen $Fc\gamma RIII^+$, $CD90^+$, $CD117^+$ Thymozytenpopulation (Sanchez et al., 1994). NK-Vorläuferzellen wurden auch in fötalem Blut, der Milz oder der Leber nachgewiesen (Colucci et al., 2003). Damit haben sie die gleichen Vorläuferzellen

Einleitung

wie T-Zellen (Kondo et al., 1997; Akashi et al., 2000). Nach der Geburt treten NK-Vorläuferzellen nur noch im Knochenmark auf.

Die Entwicklung von NK-Zellen aus CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen hängt zunächst vom Kontakt mit den Stromazellfaktoren c-KIT-Ligand und FLT3-Ligand ab (Mrozek et al., 1996; Williams et al., 1997). Die weitere Reifung wird durch IL-15 und die Expression der IL-2/15-Rezeptor- β -Kette auf NK-Vorläuferzellen gefördert (DiSanto et al., 1995; Ogasawara et al., 1998; Kennedy et al., 2000). Membrangebundenes Lymphotoxin stimuliert die IL-15-Produktion durch Knochenmarkstromazellen (Iizuka et al., 1999).

Virusinfizierte oder anderweitig aktivierte dendritische Zellen und Makrophagen produzieren Cytokine wie IFN- α/β , IL-12, IL-15 und IL-18, womit sie NK-Zellen im Blut oder in peripheren Organen effizient aktivieren können (Nguyen et al., 2002). Die Aktivierung und Organrekrutierung von zirkulierenden NK-Zellen ist während einer viralen Infektion oder Tumorzellerkennung deutlich gesteigert (Salazar-Mather et al., 1998; Smyth et al., 1998; Dokun et al. 2001). IL-21 begrenzt die Expansion ruhender NK-Zellen und leitet den Übergang von der angeborenen zur adaptiven Immunantwort ein (Kasaian et al., 2002).

1.2.2 NK-Zellen im Blut und in lymphatischen Organen

Unreife humane NK-Zellen sind negativ für den NK-Marker CD56 (N-CAM), aber exprimieren die aktivierenden Rezeptoren NKR-P1 (CD161) und CD2 (Colucci et al., 2003). Menschliche NK-Zellen in den peripheren lymphatischen Organen bzw. im Blut unterscheiden sich funktionell und in der Expression von Oberflächenantigenen. Mehr als 90% der NK-Zellen im peripheren Blut und 85% der NK-Zellen in der Milz sind CD56⁺, CD16⁺⁺. Sie exprimieren Perforin, die Natural cytotoxicity receptors (NCR) NKp30 und NKp46, inhibitorische KIR- und C-Typ-Lektin-Rezeptoren (Jacobs et al. 2001; Cooper et al. 2001). Die CD56^{dim} NK-Zellpopulation hat eine hohe cytotoxische Aktivität. NK-Zellen aus der Milz zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie die aus dem Blut (Ferlazzo et al., 2004).

Im Gegensatz dazu haben NK-Zellen in Lymphknoten meist einen CD56⁺⁺/CD16⁺ oder CD56⁺⁺/CD16⁻ Phänotyp und ihnen fehlen Perforin, KIR-Rezeptoren und NCR (außer einem geringen Niveau an NKp46). Diese CD56^{bright} NK-Zellen prägen den inhibitorischen Rezeptor CD94/NKG2A, den hochaffinen IL-2-Rezeptor und Homing-Rezeptoren für Lymphknoten (L-Selectin, CXCR3, CCR7) aus. Diese CD56^{bright} NK-Zellen produzieren IFN- γ , TNF- α , GM-CSF und andere Cytokine (Cooper et al., 2001). Auch den NK-Zellen in der Tonsille fehlen Perforin, KIR-Rezeptoren, NKp30 und CD16, sie exprimieren aber

Einleitung

teilweise NKp44 und NKp46 (Ferlazzo et al., 2004). NK-Zellen regulieren nach IL-2-Stimulierung im Lymphknoten und der Tonsille die NCR-Expression und Perforin hoch. Sie erwerben damit eine cytolytische Aktivität gegen unreife DC und andere Zielzellen (Fehniger et al. 2003).

Es ist noch unklar, ob die CD56^{dim} NK-Subpopulation aus der CD56^{bright} NK-Subpopulation durch Differenzierung in sekundären lymphatischen Organen hervorgeht oder eine eigene, noch nicht identifizierte NK-Vorläuferzelle besitzt (Colucci et al., 2003; Cooper et al., 2004). Da sich in den Lymphknoten 40% der NK-Zellen, im peripheren Blut jedoch nur 2% aller menschlichen Lymphozyten befinden, könnten sekundäre lymphatische Organe tatsächlich der Ort der finalen NK-Differenzierung und des Erlernens der Selbsttoleranz sein (Ferlazzo et al., 2004). Bei NK-Zellen der Maus, die kein CD56-Homolog besitzen, sind keine funktionell unterschiedlichen Subpopulationen gefunden worden.

1.2.3 NKT-Zellen

NKT-Zellen stellen eine heterogene Lymphozyten-Subpopulation dar, die sowohl T-Zell-Rezeptoren als auch NK-Marker (NKR-P1A/CD161) exprimieren (Kronenberg und Gapin, 2002). Eine große Untergruppe der NKT-Zellen in Mensch und Maus exprimiert nur wenige T-Zellrezeptorklassen, die spezifisch mit CD1d reagieren. NKT-Zellen haben vor allem eine regulatorische Rolle bei der Induktion und Regulation von verschiedenen Formen der adaptiven Immunantwort (Kronenberg und Gapin, 2002; Wilson und Delovitch, 2003). Über sezerniertes IFN- γ aktivieren sie auch NK-Zellen, was zur Steigerung der NK-Tumorcytolyse führen kann (Soloski, 2001; Smyth et al., 2002b).

1.3 NK-Zell-Rezeptoren

1.3.1 MHC-I-spezifische Rezeptoren auf NK-Zellen

NK-Zellen besitzen aktivierende und hemmende Rezeptoren. Sie werden in ihrer cytotoxischen Aktivität durch eine fein abgestimmte Balance zwischen inhibitorischen und aktivierenden Signalen reguliert (Moretta et al., 2001; Colucci et al., 2002; Farag et al., 2002) (siehe Abb. 4).

Einleitung

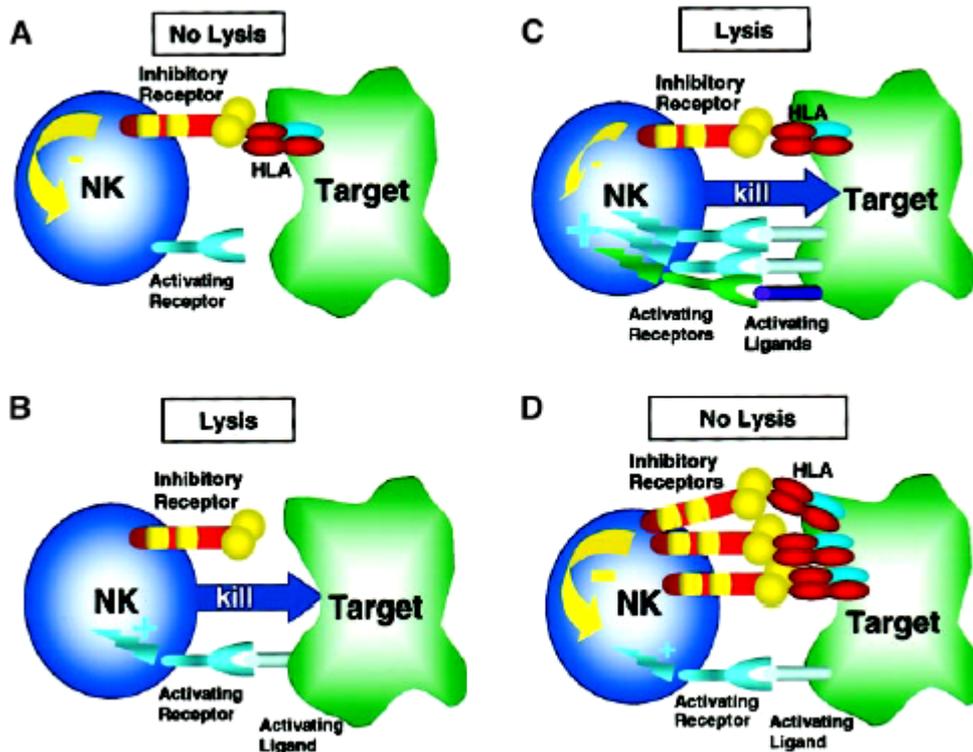


Abb. 4. Regulierung von NK-Zell-Immunantwort durch die Balance von aktivierenden und inhibierenden Signalen. Inhibitorische Rezeptoren (z.B. inhibierende KIR oder CD94/NKG2A) erkennen ihre Liganden, die MHC-Klasse-I-Moleküle (HLA), auf der Oberfläche von Tumor-Zielzellen, wodurch ein inhibitorisches Signal initiiert wird. Aktivierende Rezeptoren (z.B. aktivierende KIR oder CD94/NKG2D) binden andere Liganden auf der Oberflächen von Zielzellen und induzieren NK-Zellaktivierung und Zielzelllyse. A) Wenn inhibitorische Rezeptoren mit HLA in Abwesenheit aktivierender Signale reagieren, ist das Nettosignal negativ und die Lyse ist inhibiert. B) Wenn umgekehrt eine aktivierende Rezeptor/Liganden-Interaktion in Abwesenheit von inhibierenden Signalen stattfindet, führt ein aktivierendes Nettosignal zur NK-Lyse. Diese Situation tritt ein, wenn Zielzellen wenig oder kein MHC-I exprimieren („missing self“) oder wenn ein MHC-I-Allel exprimiert wird, das vom inhibierenden KIR-Typ nicht erkannt wird. Dies kann bei HLA-C-disparaten Knochenmarktransplantationen vorkommen. C) Wenn die aktivierenden Signale über die inhibierenden dominieren, kann ebenfalls Lyse stattfinden. Dieses Szenario ist von Bedeutung, wenn gestresste, infizierte oder transformierte Zellen aktivierende Liganden wie MICA/B hochregulieren. D) Die NK-Lyse ist inhibiert, wenn die inhibierenden Signale überwiegen. Dieses Szenario ist wahrscheinlich gegeben, wenn NK-Zellen normale Gewebe überwachen. (Aus Farag et al., 2002)

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Molekülen an der Oberfläche von NK-Zellen entdeckt, die an MHC-I auf Zellen, mit denen sie in Kontakt stehen, binden und daraufhin der NK-Zelle inhibierende oder aktivierende Signale übermitteln (Lanier, 1998; Rajagopalan und Long, 2000; López-Botet et al., 2000; Borrego et al., 2001; McQueen und Parham, 2002; Farag et al., 2002). Auch bei Untergruppen von T-Zellen sind einige dieser NK-Rezeptoren entdeckt worden (Mingari et al., 2000).

Einleitung

Es gibt drei Subtypen von klassischen MHC-Klasse-I-Molekülen, die bei der Maus H-2K, -D und -L und beim Menschen HLA-A, -B und -C genannt werden. HLA steht für Human Leukocyte Antigen. Sie sind Alloantigene bei Transplantationen und werden daher auch Histokompatibilitätsantigene genannt. Die Genloci von HLA-A, -B und -C (auf dem kurzen Arm von Chromosom 6) besitzen einen ausgeprägten Polymorphismus, deren Determinanten aber zu kreuzreagierenden Gruppen zusammengefasst werden können. Die MHC-I-reaktiven NK-Rezeptoren binden zum einen an die klassischen MHC-I-Moleküle HLA-A, -B, -C bzw. H-2K, -D und zum anderen an nichtklassische HLA-Moleküle wie HLA-E oder HLA-G im Menschen bzw. Qa1^b in der Maus. HLA-A,-B,-C-Moleküle werden auf den meisten kernhaltigen Zellen stark exprimiert. Die HLA-E-Expression ist verknüpft mit der Expression von HLA-I-Molekülen, da HLA-E in der Lage ist, Peptide aus der Signalsequenz von HLA-A,-B,-C, und -G-Molekülen zu erkennen (Braud et al., 1998). HLA-G wird auf Zellen des Trophoblasten exprimiert und schützt den Foetus durch die Stimulierung inhibierender NK-Zellrezeptoren vor maternalen NK-Zellen (King et al., 1996).

Der überwiegende Teil der MHC-I-Rezeptoren von NK-Zellen hat eine inhibitorische Wirkung, was zur Entwicklung der „missing self“-Hypothese geführt hat, die von Kärre und Mitarbeitern formuliert wurde (Ljunggren and Kärre, 1990). Diese besagt, dass die NK-Zellen autologe Zielzellen mit fehlender oder alterierter MHC-I-Expression erkennen und zerstören, sofern sie nicht durch die Bindung von eigenem MHC-I an inhibierende NK-Rezeptoren daran gehindert wird (Lindberg et al., 1999). Diese Rezeptoren sorgen also dafür, dass NK-Zellen tolerant gegenüber normalen Körperzellen sind, jedoch virusinfizierte oder transformierte Zellen mit herunterregulierter MHC-I-Expression angreifen können (Ljunggren und Kärre; 1985; van den Broek et al., 1995; Storkus et al., 1998).

Jedes Individuum hat ein unterschiedliches NK-Zellrezeptor-Repertoire, das MHC-I-spezifische Rezeptoren für eigene, aber auch für fremde MHC-I-Moleküle auf der Oberfläche enthält (Valiante et al., 1997a). In der Maus konnte nachgewiesen werden, dass die NK-Zellen ihre Rezeptorexpression nach zunächst zufälliger Verteilung dem MHC-I-Muster des Wirtes anpassen (Held und Kunz, 1998; Raulet et al., 2001). Der Rezeptor wird in höherer Dichte und auf mehr Zellen exprimiert, wenn im Wirt kein Ligand vorhanden ist. Die Rezeptordichte wird vermindert, wenn die Zellen für den Rezeptor passende MHC-I-Moleküle exprimieren (Korten et al., 1999; Hanke et al., 2001). Über die In-vivo-Selektion und Aktivierung von humanen NK-Zell-Subpopulationen liegen bislang wenige Daten vor. Zwar weiß man, dass verschiedene Cytokine dabei mitwirken, doch die Rolle von Zielzellen bei diesen frühen Ereignissen ist unbekannt. Innerhalb eines individuellen Organismus sind die MHC-I-

Einleitung

spezifischen NK-Rezeptoren klonal verteilt, d.h. eine NK-Zelle exprimiert meist nur einen dieser Rezeptoren, während die Expression von zwei oder mehreren relativ selten ist (Moretta et al., 1996; Valiante et al., 1997b; Uhrberg et al., 1997; Raulet et al., 2001).

Die MHC-I-spezifischen Rezeptoren werden nach ihrer Substanzklasse in zwei Gruppen eingeteilt: Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren und C-Typ-Lektin-ähnliche Rezeptoren (siehe Abb. 5, 6 und 8). Die Ig-ähnlichen Killer Inhibitory Receptors (KIR) sind im Menschen, aber nicht in der Maus nachgewiesen worden (McQueen und Parham, 2002). Ihre Funktion übernehmen die C-Typ-Lektin-ähnlichen Ly49-Rezeptoren bei Nagern (Yokoyama und Seaman, 1993). Die C-Typ-Lektin-ähnlichen Rezeptoren der NKG2/CD94-Familie treten sowohl in der Maus als auch im Menschen auf (Borrego et al., 2001).

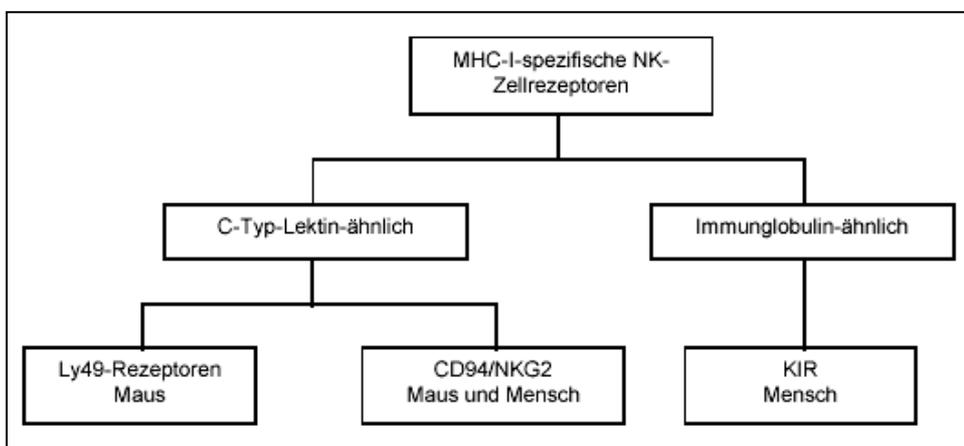
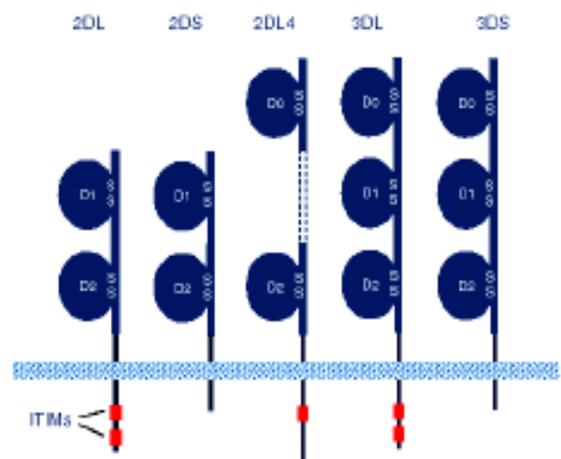


Abb. 5. MHC-I-spezifische NK-Zellrezeptoren bei Maus und Mensch

Die KIR zeichnen sich durch 2 oder 3 extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen aus. Diese können über eine Transmembrandomäne mit langen oder kurzen cytoplasmatischen Domänen kombiniert sein, die inhibierende bzw. aktivierende Signale vermitteln (Borrego et al., 2002; Farag et al., 2002). Die HLA-Ligandenspezifität der KIR ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Abb. 6. Verschiedene Mitglieder der Killer

Inhibitory Receptor-Familie (KIR). D0, D1 und D2 sind Ig-ähnliche extrazelluläre Domänen mit hoher Sequenzhomologie. KIR-2DL, 3DL und 2DL4 besitzen lange cytoplasmatische Domänen mit ein oder zwei ITIMs (Immunrezeptor Tyrosin-basierte Inhibierungsmotive), während die aktivierenden KIR-2DS und 3DS kurze cytoplasmatische Domänen ohne ITIMs aufweisen. (Aus: E.O. Long, M. Colonna, L.L. Lanier, www.ncbi.nlm.gov/PROW/)



Einleitung

Tabelle 1. KIR-Rezeptoren auf humanen NK-Zellen und ihre HLA-Spezifitäten

Inhibierende KIR-Subtypen	
Rezeptor	HLA-Liganden
KIR2DL1 (CD158a)	Gruppe 2 HLA-C Asn77/Lys80 (w2, w4, w5, w6 und verwandte Allele)
KIR2DL2 (CD158b)	Gruppe 1 HLA-C Ser77/Asn80 (w1, w3, w7, w8 und verwandte Allele)
KIR2DL3 (CD158b)	Gruppe 1 HLA-C Ser77/Asn80 (w1, w3, w7, w8 und verwandte Allele)
KIR2DL5 (CD158f)	Unbekannt
KIR3DL1 (CD158e1)	HLA-Bw4
KIR3DL2 (CD158k)	HLA-A3, A11
KIR3DL7 (CD158z)	Unbekannt
Aktivierende KIR-Subtypen	
Rezeptor	HLA-Liganden
KIR2DS1 (CD158h)	Gruppe 2 HLA-C Asn77/Lys80 (w2, w4, w5, w6, und verwandte Allele)
KIR2DS2 (CD158j)	Gruppe 1 HLA-C Ser77/Asn80 (w1, w3, w7, w8, und verwandte Allele)
KIR2DL4 (CD158d)	HLA-G
KIR2DS4 (CD158i)	Unbekannt
KIR2DS5 (CD158g)	Unbekannt
KIR3DS1 (CD158e2)	Unbekannt

(Aus Borrego et al., 2001; Farag et al., 2002)

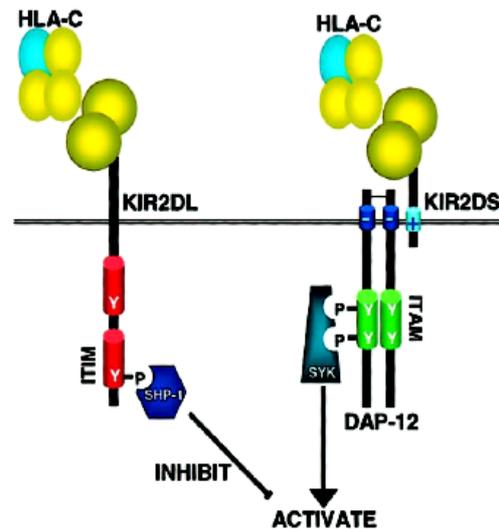
Inhibierende KIR-Rezeptoren enthalten eine oder mehrere Immunorezeptor/Tyrosin-basierte, inhibierende Motive (ITIM) mit der Sequenz I/V/L/SxYxxL/V in ihrem cytoplasmatischen Teil (siehe Abb. 7). Das ITIM wird bei der Rezeptor-Ligand-Interaktion phosphoryliert. Dies führt zur Rekrutierung der SHP-1-Phosphatase, welche die inhibierende Signaltransduktion einleitet (Tomasello et al., 2000). Die aktivierenden KIR besitzen kein ITIM in ihren sehr kurzen cytoplasmatischen Domänen. Sie sind mit dem Adaptor DAP12 assoziiert, der diesen Rezeptoren eine aktivierende Funktion verleiht. Die Adaptern binden über eine negativ geladene Aminosäure innerhalb ihrer Transmembrandomäne an eine positiv geladene Aminosäure innerhalb der Transmembrandomäne der aktivierenden NK-Rezeptoren. Die Adaptern besitzen Immunorezeptor/Tyrosin-basierte, aktivierende Motive (ITAM, YxxL/Ix₆₋₈YxxL/I), die durch Proteintyrosinkinasen phosphoryliert werden, woraufhin aktivierende Signalkaskaden in Gang gesetzt werden (Tomasello et al., 2000; Borrego et al., 2001; Colucci et al., 2002). Wenn NK-Zellen sowohl inhibierende und aktivierende Rezeptoren mit gleichem MHC-I-Ligand exprimieren, dominiert das inhibierende Signal (Valez-Gomez et al., 1998).

Nur das mit HLA-G reagierende KIR2DL4 scheint auf allen NK-Zellen exprimiert zu werden, während die anderen Mitglieder der großen KIR-Rezeptor-Familie klonal verteilt sind (Uhrberg et al., 1997; Borrego et al., 2001). Es gibt eine große Anzahl von Allelen für die 14 verschiedenen KIR-Gene und zahlreiche Haplotypen des Leukozyten-Rezeptor-Komplexes (LRC) auf Chromosom 19 (Borrego et al., 2002; McQueen und Parham, 2002).

Einleitung

Abb. 7. Funktionsweise von aktivierenden und inhibierenden KIR-Rezeptoren.

KIR-Rezeptoren besitzen entweder 2 oder 3 Immunoglobulin-Domänen (2D oder 3D) und einen langen (L) cytoplasmatischen ITIM-tragenden Teil, oder aber einen kurzen cytoplasmatischen Teil mit positiv geladener Aminosäure in der Transmembran-Domäne, die mit dem ITAM-tragenden Adaptor-Molekül DAP-12 assoziiert ist. Wenn inhibierende KIR-Rezeptoren ihre HLA-Liganden binden, phosphorylieren Kinasen aus der Src-Familie die ITIM, was dann eine Rekrutierung der Tyrosin-Phosphatase SHP-1 (und möglicherweise SHP-2) durch ihre SH2-Domäne erlaubt. SHP-1 vermittelt ein negatives Signal durch Dephosphorylierung von verschiedenen Zielmolekülen im ITAM-aktivierten Weg. Wenn jedoch aktivierende KIR durch Liganden belegt werden, phosphorylieren Src-Kinasen das ITAM-enthaltende Adaptormolekül DAP-12, welches wiederum Tyrosinkinasen aus der Syk-Familie aktiviert, die die Aktivierungssignalkaskade induzieren. Da inhibierende KIR eine höhere Affinität zum MHC-I-Typs an aktivierende und inhibierende KIR eine Inhibition der NK-Zelle. (Aus Farag et al., 2002)



KIR-2DL4, KIR-3DL2 und KIR-3DL7 kommen in allen Haplotypen vor. Die Expression von KIR-Rezeptoren ist nicht durch Selbst-MHC-I-Expression reguliert und wird nicht HLA-assoziiert vererbt (Gumperz et al., 1996; Husain et al., 2002). Individuen könnten, ungeachtet ihrer HLA-A, B, C-Haplotypen, jede Kombination von KIR-Rezeptoren besitzen (Frohn et al., 1997). Die molekularen Mechanismen, die die klonalen Unterschiede der Expression von KIR-Genen in NK- und T-Zellen regulieren, sind nicht bekannt. Die Interaktion einiger KIR-Varianten mit HLA-C bzw. HLA-B-Alloformen wird vom MHC-I-gebundenen Peptid beeinflusst (Borrego et al., 2002).

Eine andere Gruppe von MHC-I-spezifischen, Ig-ähnlichen Rezeptoren, genannt ILT (immunoglobulin-like transcript) oder LIR (Leukozyten-inhibierende Rezeptoren), hat zahlreiche Mitglieder, die im humanen Leukozyten-Rezeptor-komplex in Nachbarschaft zu den KIR-Genen kodiert werden. ILT-Rezeptoren werden überwiegend von B-Zellen, myeloiden Zellen und dendritischen Zellen exprimiert (Colonna et al., 1999). ILT-2 (CD85j) ist auch auf NK-Zellen vorhanden, erkennt zahlreiche HLA-A,B,C-Moleküle sowie HLA-G und ist mit 4 cytoplasmatischen ITIM ein inhibierender Rezeptor (Cosman et al, 1997; Navarro et al., 1999). Cytomegalievirus-infizierte, MHC-defiziente Zielzellen produzieren das virale Glykoprotein UL18, das durch Bindung an ILT-2 NK-Zellen inhibiert (Reyburn et al., 1997; Cosman et al, 1997).

Einleitung

1.3.2 Lektin-ähnliche NK-Rezeptoren

Zu den Lektin-ähnlichen Rezeptoren gehören die inhibierenden, homodimerischen Ly49-Rezeptoren (Ly49A, B, C, E, F, G2 und I mit Spezifität für H-2K und H-2D), die in der Maus die funktionellen Äquivalente zu humanen KIR darstellen. Die Ly49-Familie ist durch eine Gengruppe auf Maus-Chromosom 6 kodiert, die NK-Komplex (NKC) genannt wird (Yokoyama und Plougastel, 2003). Ly49 kommt beim Menschen nur als Pseudogen Ly49L vor (Westgaard et al., 1998). Die Expression von Mitgliedern der Ly49-NK-Rezeptor-Familie wird durch Selbst-MHC-Expression reguliert (Tanamachi et al., 2001; Raulet et al., 2001).

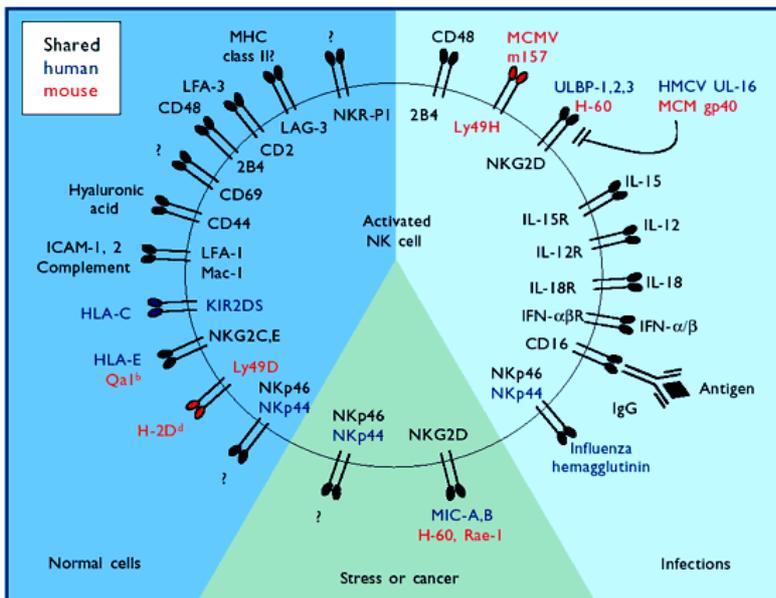
Ly49D und Ly49H haben hingegen eine aktivierende Funktion und sind mit DAP12 assoziiert (Colucci et al., 2002; Yokoyama und Plougastel, 2003). Der Ly49H NK-Aktivierungsrezeptor verleiht bestimmten Mausstämmen eine genetische Resistenz gegen Infektionen mit Maus-Cytomegalievirus (MCMV) (Smith et al., 2002). Wenn NK-Zellen sowohl inhibierende und aktivierende Ly49-Rezeptoren mit gleichem Ligand exprimieren, dominiert das inhibierende Signal. Es wurde jedoch gezeigt, dass eine Kostimulation durch den aktivierenden murinen NK-Zell-Rezeptor Ly49D in Gegenwart von IL12 oder IL18 in der Lage ist, eine Blockade durch den inhibierenden Ly49G2-Rezeptor in Bezug auf die Produktion von IFN- γ zu überwinden (Ortaldo et al., 2003).

Die C-Typ-Lektin-ähnlichen heterodimerischen Rezeptoren der CD94/NKG2-Gruppe kommen sowohl auf humanen als auch murinen NK-Zellen vor und werden im NK-Komplex kodiert (Lanier, 1998). Sie werden auf NK-Zellen und CTL exprimiert (Farag et al., 2002). Wie die KIR liegen die C-Typ-Lektin-Rezeptoren als inhibierende oder aktivierende Varianten vor, die sich insbesondere durch die An- oder Abwesenheit von ITIM in den cytoplasmatischen Domänen unterscheiden. Die inhibierenden Varianten NKG2A/B erkennen die monomorphen HLA-E-Moleküle im Menschen, die über ihre Peptidbeladung einen Hinweis auf die Expression von HLA-A,B,C-Molekülen geben (Braud et al., 1998; Borrego et al., 1998). In der Maus bindet CD94/NKG2A an das nichtklassische MHC-I-Molekül Qa-1^b.

Die aktivierenden Varianten CD94/NKG2C sowie CD94/NKG2E/H, die mit DAP12 assoziiert sind, erkennen ebenfalls HLA-E und noch andere unbekannte Liganden (Borrego et al., 2002). Das entfernt mit den anderen NKG2-Familienmitgliedern verwandte NKG2D tritt als Homodimer auf, das nicht mit CD94 komplexiert ist, jedoch an den aktivierenden Adaptor DAP10 ankoppelt (Wu et al., 1999). NKG2D wird nicht nur auf NK-Zellen, sondern auch auf allen TCR $\gamma\delta^+$ T Zellen sowie aktivierten CD8⁺ TCR $\beta\alpha^+$ T-Zellen exprimiert (Bauer et al., 1999). NKG2D reagiert mit MICA- und MICB-Molekülen. MICA/B sind stressinduzierte, multiallelische MHC-Klasse-I-ähnliche Moleküle mit drei extrazellulären Domänen, die

Einleitung

a



b

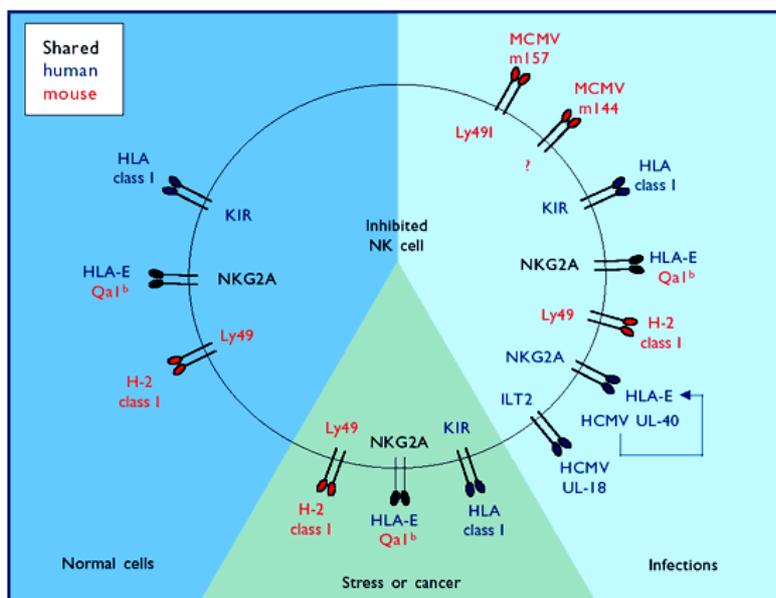


Abb. 9. Ein Vergleich von aktivierenden und inhibierenden NK-Rezeptoren in Mensch und Maus in Bezug auf normale, gestresste/ transformierte und infizierte Zielzellen. In Mensch und Maus gemeinsam vorhandene Moleküle sind in schwarz gezeigt, während speziesspezifische Moleküle in blau (Mensch) oder in rot (Maus) abgebildet wurden. (a) Die NK Zellen können bei der Begegnung mit normalen, gestressten oder Tumorzellen bzw. während einer Infektion aktiviert werden. Diese unterschiedlichen Situationen wurden in dem Bild dargestellt. Aber die Grenzen sind im wirklichen Leben nicht so klar abgegrenzt. Z.B. können Cytokine NK-Zellen sowohl während der Infektion als auch während der Antitumor-Antwort aktivieren. Virale Produkte wie das MCMV-Protein gp40 verhindern eine Interaktion zwischen dem murinen NKG2D-Rezeptor und seinem Ligand H-60, welcher von infizierten Zellen exprimiert wird. In ähnlicher Weise verhindert das HCMV-Protein UL16 die Interaktion zwischen dem humanem NKG2D-Rezeptor und seinen in infizierten Zellen exprimierten ULBP-Liganden. (b) MHC-Klasse-I-Moleküle (HLA im Mensch, H-2 in der Maus) und nicht-klassische MHC-Moleküle (HLA-E im Mensch, Qa1^b in der Maus) inhibieren NK-Zellen während der Begegnung mit normalen oder kranken Zellen. Eine Reihe von anderen Molekülen, die von virusinfizierten Zellen exprimiert werden, ermöglichen es diesen Pathogenen, der Immunantwort auszuweichen, indem sie NK-Zellen inhibieren. Z.B. können die Produkte der MCMV-Gene m157 und m144 an die inhibitorischen Ly49I-Rezeptoren binden. Das MHC-I-ähnliche HCMV-Protein UL18 bindet an den inhibitorischen ILT2-Rezeptor. MCMV-UL40 erhöht die Expression von HLA-E-Molekülen auf infizierten Zellen, welche durch Stimulation von inhibierenden NKG2A-Rezeptoren die NK-Zell-Antwort unterdrücken. (Aus Colucci et al., 2002)

Protein UL16 die Interaktion zwischen dem humanem NKG2D-Rezeptor und seinen in infizierten Zellen exprimierten ULBP-Liganden. (b) MHC-Klasse-I-Moleküle (HLA im Mensch, H-2 in der Maus) und nicht-klassische MHC-Moleküle (HLA-E im Mensch, Qa1^b in der Maus) inhibieren NK-Zellen während der Begegnung mit normalen oder kranken Zellen. Eine Reihe von anderen Molekülen, die von virusinfizierten Zellen exprimiert werden, ermöglichen es diesen Pathogenen, der Immunantwort auszuweichen, indem sie NK-Zellen inhibieren. Z.B. können die Produkte der MCMV-Gene m157 und m144 an die inhibitorischen Ly49I-Rezeptoren binden. Das MHC-I-ähnliche HCMV-Protein UL18 bindet an den inhibitorischen ILT2-Rezeptor. MCMV-UL40 erhöht die Expression von HLA-E-Molekülen auf infizierten Zellen, welche durch Stimulation von inhibierenden NKG2A-Rezeptoren die NK-Zell-Antwort unterdrücken. (Aus Colucci et al., 2002)

Einleitung

1.3.3 Nicht-MHC-reaktive, aktivierende Rezeptoren auf NK-Zellen

1.3.3.1 Fc γ -Rezeptor III (CD16)

CD16 bindet mit niedriger Affinität den Fc-Teil von Immunglobulin G (IgG). Bei der Begegnung der NK-Zelle mit Körperzellen, die mit IgG opsonisiert wurden, kommt es zur Quervernetzung der CD16-Moleküle mit IgG, was über ITAMs in den Adaptoren CD3 ζ oder Fc ϵ RI γ zu einer Aktivierung der NK-Zelle über eine Protein-Tyrosin-Kinase-Kaskade mit anschließender Lyse der Zielzelle führt (Lanier et al., 1988; Colucci et al., 2002). Über diesen Mechanismus kann die NK-Zelle auch an antigenspezifischen Abwehrprozessen teilnehmen, ohne dass sie selbst Spezifität für das Antigen besitzt. Diese ADCC-Aktivität von NK-Zellen spielt eine Rolle bei der Tumorabwehr (Smyth et al., 2002c). Daneben scheint CD16 auch noch eine antikörperunabhängige Funktion bei der Aktivierung von NK-Zellen zu haben (Mandelboim et al., 1999). Die hierbei erkannten Liganden auf Tumorzellen oder virusinfizierten Zellen sind unbekannt.

1.3.3.2 CD2

CD2 ist ein Membranglykoprotein aus der Ig-Superfamilie, das kostimulierende Eigenschaften hat. Es wird auf T- und NK-Zellen exprimiert. Die Cytotoxizität der NK-Zelle wird durch anti-CD2-Antikörper aktiviert (Siliciano et al., 1985; Schmidt et al., 1987). Die NK-Zellaktivierung durch CD2 wird von CD3 ζ vermittelt. Der CD2-Ligand ist CD58 (LFA-3) im Menschen und CD48 in der Maus.

1.3.3.3 2B4 (CD244), NTB-A

2B4 ist ein Typ-I-Glykoprotein aus der CD2-Familie dessen cytoplasmatische Domäne ein ITIM-ähnliches inhibitorisches Motiv (TxYxxV/I) enthält. Der Ligand von 2B4 auf Zielzellen ist CD48. 2B4 wird durch NK-Zellen, T-Lymphozyten und myeloide Zellen in Mensch und Maus exprimiert. 2B4 bindet das intrazelluläre Adaptorprotein SAP. Die Bindung mit SAP verhindert die Interaktion der SHP-2-Phosphatase mit 2B4. 2B4 fungiert als Korezeptor, der die Signale von anderen Aktivierungsrezeptoren verstärkt (Valiante et al., 1993; Sivori et al., 2000). Auch NTB-A, dessen Ligand noch unbekannt ist, vermittelt aktivierende, kostimulatorische Signale in NK-Zellen (Bottino et al., 2001). In der Abwesenheit von funktionellem SAP, wie dies beim X-chromosomalen lymphoproliferativen Syndrom der Fall ist, vermitteln 2B4 und NTB-A inhibierende Signale, in deren Folge schwere Epstein-Barr-Virusinfektionen auftreten (Moretta et al., 2002).

Einleitung

1.3.3.4 NKp80 (KLRF-1)

NKp80 ist ein Typ-II-Membranglykoprotein, das als Dimer auftritt und NK-Zellen kostimuliert. Es wird von ruhenden und aktivierten NK-Zellen sowie von einer kleinen CD56⁺ Untergruppe von T-Lymphozyten exprimiert (Roda-Navarro et al., 2000; Vitale et al., 2001). Seine cytoplasmatische Domäne enthält ein tyrosinbasiertes Motiv. NKp80 assoziiert jedoch nicht mit den Signal-Adaptor-Molekülen DAP12, FcεRIγ oder CD3ζ. NKp80 kooperiert mit NKp46 und NKp44 bei der NK-Zellaktivierung. Der Ligand von NKp80 ist unbekannt.

1.3.3.5 NKR-P1

Auch NKR-P1A/C/F sind lektinähnliche Homodimere mit aktivierender Funktion in Maus und Ratte (Yokoyama und Plougastel, 2003). NKR-P1C ist mit dem FcεRIγ-Homodimer assoziiert. NKR-P1B und D inhibieren NK-Zellen. Im Menschen gibt es nur NKR-P1A. Als Liganden wurden mit C-Typ-Lektinen verwandte Moleküle (Clr) identifiziert (Iizuka et al., 2003; Carlyle et al., 2004).

1.3.3.6 CD69 und andere Aktivierungsrezeptoren

Ein anderer lektinähnlicher NK-Zell-Aktivierungsrezeptor ist CD69 (Llera et al., 2001; Borrego et al., 1999). Der CD69-Ligand ist unbekannt. Die Aktivität von CD69 wird blockiert durch CD94. Es wird angenommen, dass CD69 die cytotoxische Aktivität aktivierter NK- und T-Zellen aufrecht erhält (Borrego et al., 1999).

Eine Reihe anderer NK-Zell-Oberflächenrezeptoren, die jedoch nicht spezifisch für NK-Zellen sind, vermitteln kostimulatorische Signale. Hierzu zählen CD28 mit seinen Liganden CD80 und CD86, CD27 mit seinem Liganden CD70, CD11a und CD11b mit ihren Liganden ICAM-1 (CD54) und ICAM-2 (CD102), CD40L und CD40, DNAM-1 mit seinen Liganden CD112 und CD155, und CD44, das mit Hyaluronsäure reagiert (Colucci et al., 2002; Farag et al., 2002; Bottino et al., 2003).

1.3.4 Die Natural Cytotoxicity Receptors (NCR) NKp30, NKp44 und NKp46

Die Arbeitsgruppe um Prof. A. Moretta (Genua, Italien) identifizierte drei Rezeptoren auf NK-Zellen, die eine nicht-MHC-I-abhängige Cytotoxizität vermitteln (Moretta et al., 2000, 2001) (siehe Abb. 10). Die beiden Rezeptoren NKp46 (Sivori et al., 1997, 1998; Pessino et al., 1998) und NKp30 (Pende et al., 1999) werden auf ruhenden und aktivierten humanen NK-Zellen exprimiert, und sind nicht auf T-Zellen nachzuweisen. NKp44 (Vitale et al., 1998;

Einleitung

Cantoni et al., 1999) ist weitgehend spezifisch für NK-Zellen, kommt aber nur auf IL-2 aktivierten NK-Zellen vor. NKp44 wurde auch auf einer kleinen Subpopulation von TCR γ/δ^+ T-Zellen nachgewiesen (Vitale et al., 1998).

NKp46 enthält zwei extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen vom C2-Typ, eine etwa 40 Aminosäuren lange Stiel-Region, eine Typ-I-Transmembrandomäne und eine cytoplasmatische Domäne ohne ITAM (Pessino et al., 1997; Biassoni et al., 1999). Das Gen von NKp46 liegt auf dem humanen Chromosom 19 in der Nachbarschaft von KIR-, ILT- und LAIR (leukocyte-associated Ig-like receptors)-Genen (Martin et al., 2002). NKp46-Gene sind auch in anderen Säugetieren (Makaken, Mäusen, Ratten, Rindern) nachgewiesen worden (Biassoni et al., 1999; Falco et al., 1999; De Maria et al., 2001; Storset et al., 2003). Humane und Nager-NKp46-Moleküle sind etwa zu 58% der Sequenz identisch. Die Röntgenstrukturanalyse der extrazellulären Domänen von NKp46 zeigt eine große strukturelle Ähnlichkeit mit den Ig-ähnlichen Zelloberflächen-Rezeptoren KIR2DL2, ILT2 und Fc α RI (CD89), was aber keine Rückschlüsse auf potentielle NKp46-Liganden zulässt (Foster et al., 2003). NKp46 enthält eine *N*- und zwei potentielle *O*-Glykosylierungsstellen (Pessino et al., 1998).

NKp30 enthält eine IgV-ähnliche Domäne, einen kurzen membranproximalen Stiel mit *N*-Glykosylierungsstelle, eine Typ-I-Transmembrandomäne und einen cytoplasmatischen Abschnitt ohne ITAM (Vitale et al., 1998). Das NKp30-Gen liegt auf dem humanen Chromosom 6 innerhalb des HLA-Komplexes in der Nachbarschaft von TNF-Genen. NKp30 gibt es in Makakenaffen, jedoch nicht in der Maus (De Maria et al., 2001). NKp30 zeigt keine substantielle Sequenzhomologie mit NKp46 oder NKp44.

NKp44 besitzt eine extrazelluläre Ig-ähnliche Domäne vom V-Typ sowie eine lange Stielregion, die zahlreiche potentielle *O*-Glykosylierungs- und eine *N*-Glykosylierungsstelle aufweist und wahrscheinlich in einer gestreckten, offenen Konformation vorliegt (Cantoni et al., 1999; Moretta et al., 2001). Die Röntgenkristallstruktur der Ig-Domäne von NKp44 wurde analysiert (Cantoni et al., 2003). Sie zeigt Ähnlichkeit zu N-terminalen IgV-ähnlichen Domänen von Sialoadhäsinen wie z.B. Siglec-7/p75/AIRM-1. Dies lässt vermuten, dass NKp44 an sialylierte Carbohydrate bindet, wofür es jedoch bislang keine experimentelle Bestätigung gibt (Biassoni et al., 2003). Das NKp44-Gen liegt ebenfalls am telomerischen Rand des MHC-Komplexes auf Chromosom 6. NKp44 ist bislang nur im Menschen gefunden worden, was auf eine sehr junge Evolutionsspanne bei diesem NCR hinweist. Die geringgradige Ähnlichkeit mit anderen menschlichen Molekülen ist auf die Ig-Domäne beschränkt (Cantoni et al., 1998).

Einleitung

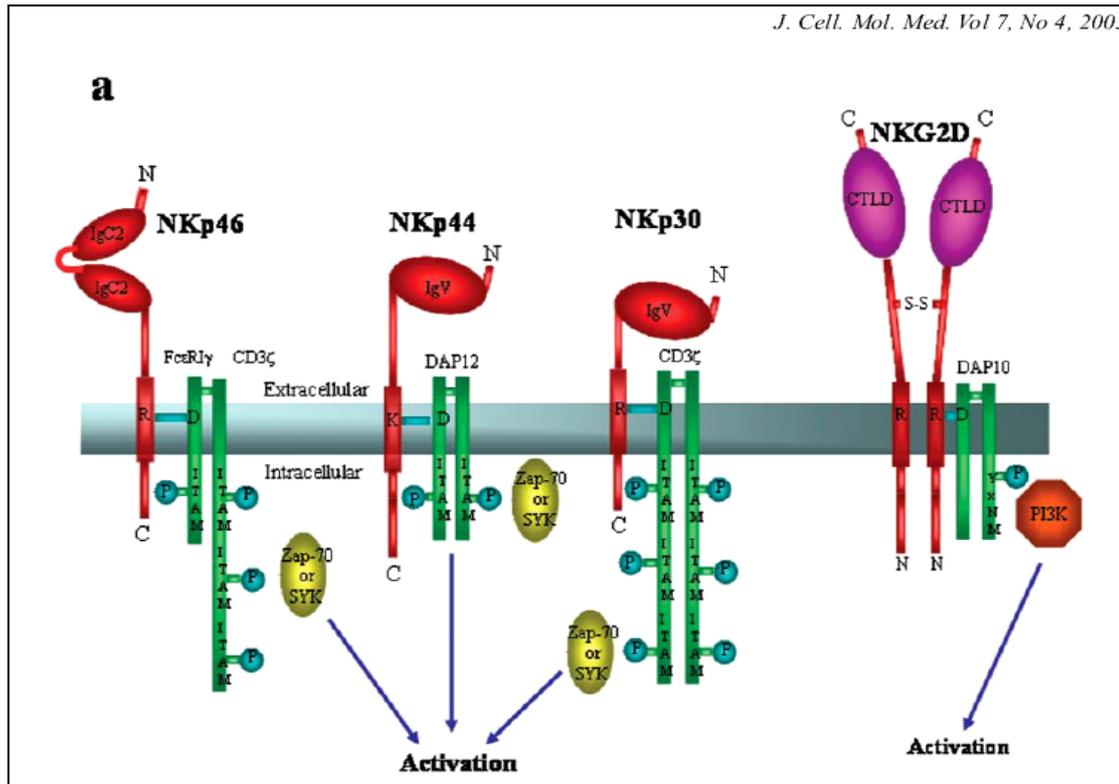


Abb. 10. Die Natural Cytotoxicity Receptors (NCR). Die NCR NKp46, NKp44 und NKp30 gehören zur Immunglobulin-Superfamilie. NKp46 besitzt zwei IgC-ähnliche, extrazelluläre Domänen, während NKp44 und NKp30 jeweils eine IgV-ähnliche extrazelluläre Domäne aufweisen. Die NCR assoziieren mit signaltransduzierenden Adaptormolekülen (*FcεRIγ*, *CD3ζ*, *DAP12*) über eine Salzbrücke zwischen den Transmembrandomänen. Nach Tyrosinphosphorylierung der ITAM werden die Phosphotyrosinkinasen Syk oder ZAP-70 rekrutiert. Im Vergleich zu den NCR ist der aktivierende Rezeptor NKG2D gezeigt, welcher ein Homodimer eines Typ-II-Glykoproteins mit C-Typ-Lektin-Domäne darstellt. NKG2D assoziiert mit dem Adaptor DAP-10, der die Phosphatidylinositol-3-Kinase nach Tyrosin-Phosphorylierung rekrutiert. (Aus Biassoni et al., 2003)

NKp46, NKp44 und NKp30 führen nach Liganden-Interaktion zur Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{++} und Cytokin-Freisetzung (Sivori et al., 1997; Vitale et al., 1998; Pende et al., 1999). Wie auch andere aktivierende NK-Rezeptoren besitzen die NCR Lysinreste innerhalb ihrer Transmembrandomänen, die eine Interaktion mit Asparaginsäureresten in Adaptormolekülen erlauben, welche wiederum aktivierende Signale ins Zellinnere weiterleiten. NKp46 ist mit *CD3ζ*-Homodimeren oder *CD3ζ*-*FcεRIγ*-Heterodimeren assoziiert (Vitale et al., 1998; Cantoni et al., 1999), NKp30 ist in der Transmembranregion mit *CD3ζ*-Homodimeren vergesellschaftet, und NKp44 leitet aktivierende Signale über ein *DAP12*-Homodimer ein (Vitale et al., 1998; Cantoni et al., 1999). Die Quervernetzung von NKp46, NKp30 und NKp44 führt zur Phosphorylierung der membranständigen Proteintyrosinkinasen p56^{lck}

Einleitung

und p59^{fyn} und der cytoplasmatischen Kinasen p72^{syk} und ZAP70 (Augugliari et al., 2003). Eine andere Studie belegt eine Rolle der Phosphatidylinositol-3-Kinase bei der von NKp46 und NKp30 vermittelten Signaltransduktion (Spaggiari et al., 2001). Die 3 NCR sind funktionell in bemerkenswerter Art verknüpft, so dass die antikörpervermittelte Stimulation eines NCR auch zur Phosphorylierung der Adaptoren der beiden anderen NCR führt (Augugliari et al., 2003).

Alle drei Rezeptoren werden von den meisten Individuen in hoher Dichte exprimiert (Phänotyp „bright“), aber in manchen Individuen gibt es NK-Subpopulationen mit schwacher NCR-Expression (Phänotyp „dull“). Diese beiden Phänotypen finden sich auch in NK-Klonen. NK-Zellen mit NKp46^{dull} Phänotyp zeigen eine deutlich geringere cytotoxische Aktivität gegen verschiedene Tumorzelllinien als NKp46^{bright} NK-Zellen (Pende et al., 1999; Sivori et al., 1999; Spaggiari et al., 2001). In NCR^{dull} NK-Zellen ist jedoch die cytotoxische Aktivität nicht generell erniedrigt (Sivori et al., 1999). Der Grund für die unterschiedliche NCR-Expression bei Subpopulationen von NK-Zellen könnte auf Selektionsmechanismen in vivo hinweisen, die von der Expression der noch unbekanntenen Liganden abhängig sein könnte. Die reduzierte NK-Zellfunktion in HIV-Patienten korreliert mit einer geringen Oberflächendichte der drei NCR (De Maria et al., 2003). Auch bei akuten myeloischen Leukämien kann es zu einer Modulation der NCR auf NK-Zellen bzw. der unbekanntenen Liganden auf den Leukämiezellen kommen (Costello et al., 2002).

NKp46, NKp44, NKp30 sind an der MHC-unabhängigen NK-Lyse von zahlreichen humanen Tumorzelllinien, die aus verschiedenen Geweben stammen (Lungen-, Leber-, Brust-Karzinome, Melanome, B-lymphoblastoide Linien) beteiligt (Pessino et al., 1998; Sivori et al., 1999; Pende et al., 1999). Maskierende monoklonale Antikörper, die gegen NKp46, NKp44 bzw. NKp30 gerichtet sind, können die Tumorzelllyse vollständig oder teilweise inhibieren. Einige Tumorzelllinien werden jedoch unabhängig von NCR lysiert. Auch verschiedene murine Zelllinien werden NKp46-abhängig durch humane NK-Zellen lysiert (Pessino et al., 1998). Diese Daten weisen auf konservierte Liganden für humanes und murines NKp46 hin.

Die NK-Aktivierung über mehrere NCR bewirkt eine kooperative Verstärkung der Lyse von verschiedenen Zielzellen, was Experimente mit NCR-blockierenden monoklonalen Antikörpern belegten (Vitale et al., 1998; Pende et al., 1999). Dies ist in guter Übereinstimmung mit dem „cross-talk“ bei der NCR-vermittelten Signaltransduktion (Augugliari et al., 2003). Es gibt jedoch Ausnahmen, da bei gewissen Tumorzellen die Lyse selektiv über einen NCR vermittelt zu werden scheint (Pende et al., 1999). Die kostimulatorische Aktivität

Einleitung

von 2B4 korreliert mit einem NCR^{bright} Phänotyp der NK-Zellen (Sivori et al., 2000). Ähnliches gilt für die Kostimulation über NKp80 (Vitale et al., 2000). Auch das am Komplement-Stoffwechsel beteiligte, GPI-verankerte Molekül CD59 hat kostimulatorische Funktion bei NCR^{bright} NK-Zellen (Marcenaro et al., 2003). CD59 ist physisch mit NKp46 und NKp30 assoziiert (Marcenaro et al., 2003).

NK-Zellen lysieren auch autologe dendritische Zellen, wobei NKp46 und NKp30, nicht jedoch NKp44, in kooperativer Weise involviert sind (Spaggiari et al., 2001). Die Lyse durch IL2-aktivierte NK-Zellen ist deutlich verstärkt nach Cytokin-induzierter DC-Reifung. Die inhibitorische Wirkung von HLA-A,B,C-Molekülen spielt dabei anscheinend keine Rolle.

Mit *Mycobacterium tuberculosis* infizierte Zellen weisen keine verminderte MHC-Klasse-I-Expression auf, werden aber effizient durch NK-Zellen lysiert, wobei NKp46 und NKp30 an der NK-Aktivierung beteiligt sind. Unabhängig von der Präsenz inhibitorisch wirkender MHC-Klasse-I-Moleküle können NK-Zellen also Zielzellen mittels NKp46 lysieren, die mit intrazellulären Bakterien infiziert sind (Vankayalapati et al., 2002). Offensichtlich kann eine starke Liganden-Expression in bestimmten Fällen inhibitorische Signale überspielen.

Anhand von virusinfizierten Zellen und NCR-Immunglobulin-Fusionsproteinen konnte die Gruppe um O. Mandelboim zeigen, dass das Hämagglutinin des Influenzavirus und Hämagglutinin/Neuraminidase des Sendaivirus mit NKp46 und NKp44, aber nicht mit NKp30 reagieren (Mandelboim et al., 2001; Arnon et al., 2001). In Übereinstimmung mit einer Sialinsäure-bindenden Funktion von Hämagglutinin ist für diese Interaktion die Sialylierung von NKp46 und NKp44 notwendig. Das mit Thr₂₀₄ verknüpfte O-Glykan in der membranproximalen Stieldomäne von NKp46 scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen (Arnon et al., 2003). Die zellulären, nichtviralen Liganden der NCR waren zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt.

Fragestellung

1.5 Fragestellung

Wie in der Einleitung ausgeführt, spielen die NK-Zell-Rezeptoren NKp46, NKp30 und NKp44 eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung von NK-Zellen, um anschließend Tumorzellen und bestimmte nichttransformierte Zellen, aber auch virus- oder bakterieninfizierte Zellen zu lysieren. Bislang sind bestimmte virale Hämagglutinine als exogene Liganden für NKp46 und NKp44 identifiziert worden, während über die endogenen Liganden für die drei NCR nichts bekannt ist. In dieser Arbeit soll versucht werden, die biochemische Natur der NCR-Liganden einzugrenzen und sie molekular zu identifizieren. Hierzu sollen rekombinante NCR-Ig-Fusionsproteine, verschiedene biochemische und immunhistochemische Methoden sowie NK-Zell-Cytotoxizitätstests eingesetzt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Brutschränke
Computer für Lumi Imager
Elektrophoresekammer
Elektroporationsgerät
ELISA-Photometer
FACScan Cytofluorimeter
Geltrockner
Glasplatten
Thermomixer
Invertiertes Mikroskop
Inkubationsschüttler G25

Lumineszenz-Imager F1
Magnetrührer
Neubauer-Zählkammer
Pipetten
Semi-dry Blot-Apparatur
Spannungsgerät
Spektrophotometer

Sterile Werkbank
Vortexer
Waagen

Zentrifugen

Zytospin-Zentrifuge

Berthold (Wildbad); Heraeus (Hanau)
Hewlett Packard (Böblingen)
Protean II Xi cell Bio-Rad (München)
BTX Inc. (San Diego)
Multiscan (Titerek)
Becton Dickinson (Heidelberg)
Bio-Rad (München)
Bio-Rad (München)
Eppendorf (Hamburg)
Leitz (Wetzlar)
New Brunswick Scientific (Edison, NJ, USA)
Roche-Boehringer (Mannheim)
Janke & Kunkel (Staufen)
HBG Precicolor
Gilson (Langenfeld)
CTI (Idstein)
Power Pac 3000 (Bio-Rad)
Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech (Freiburg)
Concept (Heidelberg)
Heidolph
Rhewa 942; Sartorius 1254 MP;
Feinwaage Mettler AE 163 Köttermann
Biofuge (Heraeus Sepatech); Biofuge 13 (Heraeus Sepatech); RC-5B Superspeed (Sorvall)
Shandon (Astmoor, GB)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser
Objektträger
Einfrierröhrchen
Elektroporationsküvetten (0,4 cm Spaltbreite)
Gewebekulturflaschen
Petrischalen
15 und 50 ml Röhrchen
1,5 ml Reaktionsgefäße
Röntgenfilme
Vivaspin-Filter (10,000 und 30,000 MWCO)

R. Langenbrinck (Emmendingen)
R. Langenbrinck (Emmendingen)
Nunc (Wiesbaden)
Bio-Rad (München)
TPP (Renner Dannstadt)
TPP (Renner Dannstadt)
TPP (Renner Dannstadt)
Eppendorf (Hamburg)
Kodak (New York)
VIVASPIN AG (Hannover)

2.2.1 Chemikalien

Acrylamid
Aceton
Agarose
N-Acetylsphingosin (C₂-Ceramid)
 ϵ -Aminocapronsäure
Ammoniumperoxodisulfat
Ampicillin
Benzyl-*N*-acetyl- α -D-galactosamid

Bio-Rad Laboratories, München
Sigma, Taufkirchen
Roche Diagnostics, Mannheim
Sigma, Taufkirchen
Sigma, Taufkirchen
Sigma, Taufkirchen
Sigma, Taufkirchen
Sigma, Taufkirchen
Sigma, Taufkirchen

Material und Methoden

Bacto-Agar	Difco, Augsburg
Bacto-Tryptone	Difco, Augsburg
Bacto-Yeast Extract	Difco, Augsburg
CHAPS (3-[(Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfonat)	Sigma, Taufkirchen
Castanospermin	Sigma, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blue	Serva, Heidelberg
Concanavalin A	Amersham Pharmacia, Freiburg
Cycloheximid	Sigma, Taufkirchen
Cyclodextrin	Sigma, Taufkirchen
1-Desoxymannojirimycin (DMM)	Sigma, Taufkirchen
Deoxy-ATP, -CTP, -GTP, -TTP Mix	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DOTAP Transfektionsreagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
DTSSP (3,3'-Dithiobis[sulfosuccinimidylpropionat])	Perbio Science, Bonn
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
FuGene 6 Transfektionsreagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
D-Galactosamin	Sigma, Taufkirchen
D-Glucosamin	Sigma, Taufkirchen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Immobilon P-Membran	Millipore, Eschbach
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
ISP-1 (Myoricin)	Sigma, Taufkirchen
Kaliumcarbonat	Merck, Darmstadt
Kaliumtetrathionat	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
D-Mannosamin	Sigma, Taufkirchen
Mannose-6-phosphat	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Roth, Karlsruhe
[³⁵ S]-Methionin/Cystein (Redivue Pro-Mix) (14,3 mCi/ml)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Methionin-Cystein-freies MEM	ICN, Eschwege
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
[⁵¹ Cr]-Natriumchromat (1000 µCi/ml)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma, Taufkirchen
Phenyl-N-acetyl-α-D-galactosamid	Sigma, Taufkirchen
PDMP (D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol)	Sigma, Taufkirchen
PDPH (3-[2-Pyridyldithio]propionyl hydrazid)	Perbio Science, Bonn
Ponceau-Rot	Sigma, Taufkirchen
PPMP (D-threo-1-phenyl-2-palmitoylamino-3-morpholino-1-propanol)	Sigma, Taufkirchen
UPMI 1640 Medium	Gibco BRL; Karlsruhe
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Tetracyclin	Sigma, Taufkirchen
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tunicamycin	Sigma, Taufkirchen

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Carl Roth, Karlsruhe, bezogen. In der Regel wurden Chemikalien höchsten Reinheitsgrades (pro analysi) verwendet.

Material und Methoden

2.2.2 Enzyme und andere Proteine

Annexin V	Sigma, Taufkirchen
Chymotrypsin	Sigma, Taufkirchen
DNS-Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Endoglycoceraminiase II	Calbiochem, Bad Soden
Endoglycosidase F2	Calbiochem, Bad Soden
<i>Maackia amurensis</i> Lectin II (biotinyliert)	Vector Burlingame, CA, USA
α 2,3-Neuraminidase, Agarose-gekuppelt	Sigma, Taufkirchen
α 2-3,6,8-Neuraminidase (<i>Vibrio cholerae</i>)	Calbiochem, Bad Soden
Neuraminidase (<i>Agrobacterium ureafaciens</i>)	Calbiochem, Bad Soden
Papain	Sigma, Taufkirchen
Phospholipase C	Sigma, Taufkirchen
Phospholipase D	Sigma, Taufkirchen
Proteinase K	Sigma, Taufkirchen
<i>Sambucus nigra</i> Lectin (biotinyliert)	Vector Burlingame, CA, USA
Trypsin	Biochrom, Berlin
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Thyroglobulin	Sigma, Taufkirchen

2.2.3 Antikörper

Ziege anti-Maus-IgG-FITC	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Human-IgG-FITC	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Human-IgG-Alexa 488	Molecular Probes, Leiden (NL)
Ziege anti-human-IgG-F _C -Peroxidase	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Human-IgG	Dianova, Hamburg

ML5	Monoklonaler Ak gegen CD24
SWA11	Monoklonaler Ak gegen CD24
W6/32	Monoklonaler Ak gegen HLA-A, -B, -C
Anti-GM3	
anti-CD59	
UJ127.11	Monoklonaler Ak gegen L1-CAM
Anti-NKp46	
Anti-NKp44	
Anti-NKp30	
Anti-„Isoleucine zipper“	
HEA125	Monoklonaler Antikörper gegen das panepitheliale Glykoprotein Egp34
anti-Cadherin	

2.2.4 Kits

QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
Seize X Mammalian Immunoprecipitation Kit	Perbio Science, Bonn

Material und Methoden

2.3 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
Jurkat	Humanes T-Zell-Lymphom
Jurkat-bcl2	bcl2 transfizierte Jurkat
Jurkat 6-O-Sulfo LacNAc ⁺	Selektierte Jurkat-Zellen
Jurkat-7.X	<i>PIG-A</i> -defiziente Jurkat-Zellen (GPI ⁻)
Jurkat-7.P	<i>PIG-A</i> -retransfizierte Jurkat-Zellen (GPI ⁺)
A549	Humanes Lungencarcinom
A125	Humanes Lungencarcinom (CD24 ⁻)
A125-7.4	CD24-transfizierte A125
CHO	Chinese Hamster Ovarzellen
LY-B	CHO mit def. Serinpalmitoyltransferase-Gen
LY-B/cLCB1	SPT-retransfizierte LY-B Zellen
CHO-745	Proteoglykan-defiziente CHO
CHO/P-Selectin	P-Selectin transfizierte CHO
HeLa	Humanes Cervix-Carcinom
HT29	Humanes Colon-Carcinom
Colo205	Humanes Colon-Carcinom
LoVo	Humanes Colon-Carcinom
SW480	Humanes Colon-Carcinom
LCL721.221 (.221)	Humene B-lymphoblastoide Zelllinie
Mel 1106	Humanes Melanom
MelJuso	Humanes Melanom
SK-MEL1	Humanes Melanom
ZKR	Humanes Melanom
SK29-mel	Humanes Melanom
M14	Humanes Melanom
SK-OV3	Humanes Ovarialcarcinom
LC5	Humane embryonale Lungenzelllinie
293-HEK	Humane embryonale Nierenzelllinie
293-L1	L1-CAM transfizierte 293-HEK
COS-7	Affen-Nierenzelllinie
B16.6	Murines Melanom
GM-95	B16 mit def. Ceramidglucosyltransferase-Gen
3T3 NIH	Maus-Fibroblasten-Zelllinie
Rat-2	Ratten-Fibroblasten-Zelllinie
La-68a E1 α ⁻ T22/2	E1 α -Pyruvatdehydrogenase defiziente humane Fibroblasten
La-68a E1 α ⁺ T22/4	Normale humane Fibroblasten
Ltk-	Thymidinkinase-negative L-Zellen (Maus)
NK92	Humanes NK-Zelllymphom
A20	Maus-B-Zelllymphom
300-19	CD62L-defiziente A20

Material und Methoden

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Plasmidisolierung (Mini-Präparation)

Die Isolierung der Plasmid-DNS aus *E. coli* XL1-Blue-Zellen wurde nach der Methode von Qiagen durchgeführt. Dazu wurden von der Übernachtskultur (2 ml) 1,5 ml abgenommen und 2 min bei 10000 Upm in der Minizentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl Puffer P1 aufgenommen, und dann mit 250 µl Puffer P2 versetzt, 4-6 mal geschwenkt und danach sofort 350 µl Puffer N3 zugegeben. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 13000 Upm wurde der Überstand auf eine QIAprep Säule gegeben und 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Filtrats wurde mit 750µl Puffer PE gewaschen und bei 13000 Upm abzentrifugiert. Nach dem Weggießen des Filtrats wurde ein weiteres Mal abzentrifugiert. Zur Elution der DNS wurde 50 µl TE-Puffer auf die Säule gegeben und nach 2 min Abwarten wurde die DNS 3 min bei 13000 Upm abzentrifugiert.

2.4.2 Plasmidisolierung (Maxi-Präparation)

Für die Isolierung einer größeren Menge an Plasmid-DNS wurde nach der Methode von Qiagen vorgegangen. Die über Nacht gewachsene 100 ml Kultur von plasmidtransformierten *E. coli* XL1-Blue-Zellen wurde in 50-ml-Röhrchen gefüllt und 15 Minuten bei 5000 Upm zentrifugiert. Das Bakterien-Pellet wurde erst in 1 ml Puffer P1 resuspendiert und anschließend mit weiteren 9 ml versetzt. Nach der Zugabe von 10 ml Puffer P2 und der Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurde 10 ml Puffer P3 hinzugefügt und der Ansatz sofort geschwenkt. Einer Inkubation für 20 min auf Eis folgte eine Zentrifugation bei 5000 Upm für 15 min. Der Überstand wurde auf einen Gaze-Filter gegeben und durch die mit 10 ml Puffer QBT equilibrierte Säule filtriert. Nach dem Durchfließen des Überstands wurde die Säule mit 2 x 30 ml Puffer QC gewaschen. Die DNS wurde mit 15 ml Puffer QF eluiert und mit 15 ml Isopropanol gefällt. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 15000 Upm für 30 min im SS34-Rotor der Sorvall-Zentrifuge. Der Überstand wurde danach vorsichtig abpipettiert und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und nochmals 2 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert. Nach gutem Trocknen wurde das Pellet in 250-500 µl TE-Puffer resuspendiert.

Material und Methoden

2.4.3. DNS-Sequenzierung

Die DNS-Sequenzierung erfolgte durch die Firma MWG Biotech, Ebersberg, mit T7- bzw. T3-Polymerase-Primern nach der Dideoxy-Methode von Sanger.

2.4.4 Restriktionsverdaus von Plasmid-DNS

Für alle analytischen Verdaus wurde ca. 1 µg DNS und für alle präparativen Verdaus wurde etwa 5 µg verwendet. Die einzusetzenden Puffer wurden nach den Anleitungen des jeweiligen Protokolls des Herstellers gewählt, von denen das Enzym bestellt war. Von den Restriktionsenzymen wurden im analytischen Verdau 0,5 µl für 60-90 min eingesetzt, im präparativen Verdau 2-3 µl für 90-120 min. Für zwei Enzyme mit unterschiedlichen Temperatur- oder Pufferbedingungen wurden die Verdaus nacheinander angesetzt und die Pufferbedingungen entsprechend angepasst.

Für die Erzeugung glatter Enden wurde zu der verdauten DNS-Menge ein Mix von T4-Polymerase-Puffer, dNTPs (0,1 mM Endkonzentration) und T4-DNS-Polymerase gegeben, und anschließend wurde für 20 min bei 11°C inkubiert. Die T4-Polymerase wurde für 10 min bei 75°C inaktiviert. Die Ansätze wurden mit 6fach-DNS-Ladepuffer versetzt, kurz abzentrifugiert und in Agarose-Gelen aufgetrennt. Zur Vermeidung der Religation geschnittener DNS-Enden von Vektoren wurden die freien Phosphatenden mit 1 µl alkalischer Phosphatase (CIP) entfernt. Die Reaktion verlief bei 5' überstehenden Enden bei 37°C für 30 min, bei glatten Enden und 3'-Überhängen für 15 min bei 37°C und 15 min bei 56°C. Nach dieser Inkubation wurde nochmals 1 µl CIP hinzugegeben und ebenso inkubiert. Anschließend wurde die CIP inaktiviert, indem mit 1/10 Volumen 0,1M TNE-Puffer für 10 min bei 75 °C erhitzt wurde.

2.4.5 DNS-Gelelektrophorese

Auf Grund der negativen Ladungen ihrer Phosphatreste können DNS-Fragmente mit Hilfe eines Agarosegels im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Zugabe von Ethidiumbromid (ca. 0,5 µg/ml im Agarosegel) ermöglicht die Darstellung der aufgetrennten DNS-Fragmente. Die Gele wurden nach Aufkochen der Agarose (0,8 – 1,2% in 1 x TAE-Puffer) im Wasserbad auf etwa 50°C abgekühlt und in den Geltrog mit Probenkamm gegossen. Nach Polymerisation der Agarose und Einsetzen in die Apparatur wurde der Kamm entfernt und die DNS-Proben (1:5 mit 6x-DNS-Probenpuffer versetzt) in Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese verlief in TAE-Puffer bei 100 Volt Spannung für eine Dauer von ca. 60 min. Auf einem UV-Transluminator wurden die Gele bei 254 nm fotografiert.

Material und Methoden

DNS-Agarose-Gele

50 x TAE (Tris-Acetat/EDTA)	Tris-Acetat (pH 8,0)	2 M
	EDTA	50 mM
	Bromphenol Blau	0,25% (w/v)
DNS-Probenpuffer (6 x)	Xylencyanol FF	0,25% (w/v)
	Glycerin	30% (w/v)
Ethidiumbromid	Ethidiumbromid	1 g
	in 100 ml A. dest. gelöst.	

2.4.6 DNS-Extraktion aus Agarosegelen

Für die DNS-Extraktion aus Agarosegelen wurde das Protokoll der Firma Qiagen verwendet. Die Fragmente wurden auf dem UV-Transilluminator bei 366 nm aus dem Gel ausgeschnitten, um Mutationen zu vermeiden, dann gewogen und mit dem dreifachen Volumen an QG1-Puffer versetzt. Während der Inkubation für 10 min bei 50°C wurde die Lösung mehrere Male geschüttelt. Anschließend wurde ein Gelvolumen Isopropanol hinzugegeben und gemischt. Der Ansatz wurde auf die QIAquick Säule pipettiert und bei 13000 Upm 1 min abzentrifugiert. Nach der Entfernung des Filtrats wurden zum Waschen der Säule 750 µl Puffer PE eingesetzt und 1 min bei 13000 Upm abzentrifugiert. Nach dem Wegschütten des Filtrats wurde die Säule nochmals 1 min abzentrifugiert und anschließend in ein Eppendorfgefäß gestellt um die DNS zu eluieren. Zur Elution wurden 30 µl TE-Puffer auf die Säule gegeben, 1 min stehengelassen und danach bei 13000 Upm für 1 min abzentrifugiert.

2.4.7 Ligation von DNS-Fragmenten und Transformation

Für alle Ligationsreaktionen wird T4-DNS-Ligase (MBI-Fermentas) in den Konzentrationen 0,5-1 U/µl, 10x Ligasepuffer und Wasser verwendet. Die Menge der aus dem Gel eluierten Insert- und Vektor-Fragmente wird nach folgender Formel abgeschätzt:

$$\frac{\text{Vektor [ng]} \times \text{Länge des Inserts [kb]}}{\text{Länge des Vektors [kb]}} \times 3 = \text{Insert [ng]}$$

Ligationsansatz:

Vektor-DNS	x µl
Insert-DNS	y µl
T4-DNS-Ligase (10 U/µl)	1 µl
Ligase-Puffer	2 µl
Auf 20 µl steriles Aqua bidest auffüllen.	

Material und Methoden

Die Ligationsansätze wurden für 4 h bei 16°C inkubiert und anschließend wurde der gesamte Ansatz zur Transformation eingesetzt. Kontroll-Ligationen ohne Insert sollten nun wenig oder keinen Hintergrund an Kolonien mehr ergeben, Ligationen mit Insert sollten eine hohe Anzahl an Transformanden ergeben. Der Ligationsansatz wurde mit 40-50 µl der *E. coli* XL-1-Blue-Suspension versetzt, 20 Minuten auf Eis inkubiert und für 2 min einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen. Anschließend wurden die Zellen in Petrischalen auf LB-Agarose-Medium mit Ampicilin (100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Bei bestimmten Plasmiden wurden *E. coli* Me1063/p3 und LB-Agarose-Platten mit Tetracyclin (40 µg/ml) verwendet. Mehrere Bakterienklone wurden am nächsten Tag von der Petrischale gepickt und für Mini-Präparationen in 4 ml LB-Medium mit Ampicilin (100 µg/ml) gegeben. Für Maxi-Präparationen wurde ein Bakterienklon in 200 ml LB mit den oben genannten Antibiotika gegeben. Die Bakteriensuspension wurde über Nacht bei 37°C und 300 Upm im Inkubator geschüttelt und anschließend eine Plasmidisolierung durchgeführt.

LB (Luria Broth)-Medium:	Bacto-Trypton	10 g
	Bacto-Hefe Extrakt	5 g
	NaCl	5 g

wurden in 800 ml bidest. H₂O gelöst, auf pH 7,5 eingestellt, anschließend mit bidest. H₂O auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert.

LB-Ampicillin-Agarplatten:

Zur Bakterienanzucht wurde dem LB Medium vor dem Autoklavieren Agar in einer Endkonzentration von 1,5% zugesetzt. Nach dem Autoklavieren und dem Abkühlen auf 50°C wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 200 µg/ml zugefügt. Das Medium wurde in die Petrischalen gegossen, bei Raumtemperatur abgekühlt und anschließend bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

2.5 Zellkulturmethoden

2.5.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Eukaryotische Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in Kulturflaschen in 10-50 ml Gewebekulturmedium (DMEM oder UPMI-1640) unter Zusatz von 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 50 µM 2-Mercaptoethanol, 1 mM L-Pyruvat, 1% nicht-essentielle Aminosäuren bei 37°C und 5 % CO₂ aufgezogen. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

Material und Methoden

2.5.2 Trypsinieren von adhärennten, eukaryotischen Zellen

Trypsin-EDTA-Lösung: 0,4% (w/v) Trypsin 5 mM EDTA in PBS. Die Passagierung der Zellen wurde routinemäßig nach Erreichen der Konfluenz des Zellrasens gemacht. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gespült, um inhibierende Einflüsse von Serumbestandteilen auf die Trypsinaktivität zu verhindern. Nach Absaugen des PBS wurden die Zellen einmal mit Trypsin/EDTA-Lösung benetzt und dann mit dem in der Flasche verbliebenen Rest ca. 5 min bei Raumtemperatur bis zur Abrundung der Zellen (mikroskopische Kontrolle) inkubiert. Die Zellen wurden abgeklopft und in FCS-haltigem Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in verminderter Dichte wieder ausgesät oder zur weiteren Verarbeitung durch Zentrifugation pelletiert (1500 Upm, 4 min, Heraeus-Minifuge).

2.5.3 Einfrieren von eukaryotischen Zellen

Die Zellen wurden abtrypsiniert, im Medium aufgenommen und in der Heraus Minifuge pelletiert (4 min, 1500 Upm). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und in beschriftete, vorgekühlte Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden zunächst bei -70°C in einer Styropor-Schachtel eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfrier-Medium :	DMSO	10ml
	FCS	50ml
	RPMI-Vollmedium	40ml

2.5.4 Auftauen und Revitalisieren der eukaryotischen Zellen

Die Zellenröhrchen wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen bei RT aufgetaut. Die Zellsuspension wurde vorsichtig entnommen, in 10 ml vorher erwärmtes Medium (37°C) überführt und die Zellen wurden 2 min bei 1500 Upm abzentrifugiert. Das Medium wurde dekantiert, das Zellpellet in 10 ml vorher erwärmtes Medium ohne Selektionsantibiotikum resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde standardmäßig das Medium gewechselt, um restliches DMSO, tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen sowie, falls erforderlich, Selektionsantibiotikum zuzuführen.

Material und Methoden

2.5.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden abtrypsiniert und das Zellpellet in 2-5 ml Medium aufgenommen. Die Zellzahlbestimmung erfolgte durch Auszählung in der Neubauer-Zählkammer in 2-4 Großfeldern, für die Mittelwerte berechnet wurden. Für die Bestimmung der Vitalität wurden 50 µl der abtrypsinierten Kultur und 50 µl Trypanblau-Lösung gemischt, davon 10 µl abgenommen und in der Neubauer-Zählkammer die Zellen ausgezählt, die nicht blau gefärbt waren.

2.6 Transfektionen

2.6.1. Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Elektroporation

1 ml Elektroporationsküvetten mit einer Spaltbreite 0,4 cm wurden mit 100%-igem Ethanol gespült und getrocknet. Pro Ansatz wurden $5-10 \times 10^6$ Zellen in 200 µl Transfektionsmedium (DMEM mit 20mM HEPES ohne andere Zusätze) zu 10 µg steriler DNS-Lösung (Maxi-Prep) in einem Eppendorfgesäß pipettiert, kurz gemischt, in die Küvetten gegeben und etwa 5 min lang auf Eis inkubiert. Als Transfektionsbedingungen wurden am Elektroporationsgerät der Firma BIO-RAD 220 Volt und 960 µF verwendet. Nach der Elektroporation wurden die Zellen wiederum 5 Minuten auf Eis gestellt und anschließend die Ansätze in 10 ml DMEM Vollmedium mit Gentamycin /Amphotericin B (Endkonz. 50 µg/ml) in Kulturflaschen versetzt. Nach 48 Std. wurde den Transfektanten neues Medium mit dem Selektionsantibiotikum Geneticin-Disulfat (G418 Endkonzentration 0,8 –1,0 mg/ml) gegeben. Diese Selektion wurde für 2-4 Wochen durchgeführt.

2.6.2 Transfektion von eukaryotische Zellen mittels DOTAP und FuGene 6

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in 6-Loch-Platten ausgesät. Pro Loch wurden 1×10^6 Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden bei 37°C solange inkubiert, bis sie 50-80% konfluent waren. Inzwischen wurden 10 µg DNS (Maxi-Prep) in Eppendorfgesäßen vorgelegt und mit DMEM/HEPES auf 100 µl aufgefüllt. Nach kurzem Mischen wurden die vorher verdünnte DOTAP-Lösung (30 µl DOTAP + 70 µl HBS-Puffer) oder FuGene 6 (3 µl

Material und Methoden

FuGene 6 + 97 µl DMEM/HEPES) zugefügt und anschließend durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und 15min/25°C inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen pro Ansatz mit 4 ml D-PBS gewaschen. Zu der DNS-Lösung wurden dann 800 µl DMEM Vollmedium ohne Antibiotika gegeben und nach kurzem Mischen auf die Zellen pipettiert. Die Transfektion erfolgte 2-3 Stunden im Brutschrank. Danach wurden die Zellen mit 4 ml PBS gewaschen und mit 2 ml DMEM-Vollmedium mit Antibiotika versetzt. Die transfizierten Zellen wurden am nächsten Tag in Flaschen übertragen und für die Selektion Geneticin (Endkonzentration 0,8 – 1,0 mg/ml) zugegeben.

2.6.3 Expression von rekombinantem Protein im Großmaßstab

Die so erhaltenen transfizierten Massenkulturen wurden durch Cytospin-Färbungen auf Expression der Fusionsproteine überprüft. Einzelklone der Massenkulturen wurden durch limitierte Verdünnung in 96-Loch-Platten gewonnen und im Cytospin auf Expression überprüft und dann expandiert. Zur Gewinnung der von den Zellen in das Kulturmedium sezernierten Fusionproteine wurden transfizierte A549, .221 und COS-7-Zellen verwendet. Die selektierten Klone wurden in 120 cm² Kulturflaschen in Gegenwart von 0,5 mg/ml G418 expandiert. An jedem dritten Tag wurde das Kulturmedium gewechselt und dabei das alte Medium gesammelt und eingefroren. Die in das Kulturmedium abgegebenen löslichen Fusionproteine wurden mit Protein A Sepharose gereinigt.

2.6.4 Reinigung der Fusionsproteine

3-4 ml Protein A Sepharose (PAS) wurden in 50-ml-Röhrchen 3 x mit PBS gewaschen (bei 1500 Upm 3 min abzentrifugiert). Um die unspezifischen Bindungen zu blockieren, wurden 10 ml gepackte PAS mit 40 ml 10%iges FCS in PBS versetzt und 1 Std. bei 4°C gerollt. Die blockierte PAS wurde 3 x mit PBS gewaschen. Die PAS wurde nun in kleine Glassäulen pipettiert. Die Säulen wurden einmal mit Elutionspuffer und anschließend mit 300 ml PBS gewaschen. Danach wurden die Kulturüberstände mit Fusionsproteinen auf die Säule gegeben bzw. langsam über die Säule gepumpt. An PAS gebundenes Ig-Fusionsprotein wurde anschließend mit 3-5 ml (am Anfang 3 ml danach nochmals 2ml) Elutionspuffer (0,1 M Glycin, 0,1 NaCl [pH 3,2 mit HCl]) eluiert. Die eluierten Fusionsproteine wurden in Dialysierschläuche (30 kDa Ausschlussgröße) aufgenommen und über Nacht im Kühlraum gegen 2 Liter PBS und am nächsten Tag noch einmal gegen 1 Liter PBS dialysiert.

Material und Methoden

2.7 Biochemische Methoden

2.7.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine nach Laemmli modifizierte Methode (Laemmli, 1970), in der denaturierte Proteine nach dem Ladung-zu-Masse-Verhältnis im Gel getrennt werden. Die Proteine bewegen sich durch ein elektrisches Feld in einem Polyacrylamid-Netzwerk. Die radikalische Polymerisation von Acrylamid mit dem Quervernetzer N,N'-Methylenbisacrylamid erfolgt mit Ammoniumperoxodisulfat (APS) als Radikalbildner und N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED) als Radikalstabilisator.

Benötigte Lösungen:

AA-BIS (Bio-Rad) 30 %	f. c.	Menge
Acrylamid	4 M (30 %)	145 g
N,N'-Methylenbisacrylamid	65 mM	5 g
Aqua bidest		auf 200ml auffüllen

Das Verhältnis von Acrylamid zu Methylenbisacrylamid beträgt 29:1 (w/w).

5 x Trenngelpuffer:	f. c. (1 x Puffer)	Menge
Tris	375 mM	113,53 g
Natriumdodecylsulfat	3,5 mM	2,5 g
Aqua bidest		auf 200ml auffüllen
pH-Wert mit HCl auf 8,8 einstellen.		

10 % APS:	f. c.	Menge
Ammoniumperoxodisulfat	0,44 M	0,1 g
Aqua bidest		1 ml

Die Lösung ist für ein Monat bei 4 °C haltbar.

4 x Sammelgelpuffer:	f. c. (1 x Puffer)	Menge
Tris	175 mM	16,95 g
Natriumdodecylsulfat	3,5 mM	0,8 g
Aqua bidest.		auf 200ml auffüllen
pH-Wert mit HCl auf 6,8 einstellen.		

10 x Elektrophoresepuffer:	f. c. (1 x Puffer)	Menge
Tris	25 mM	60,55 g
Glycin	190 mM	285,27 g
Natriumdodecylsulfat	3,5 mM	20,19 g
Aqua bidest.		auf 2000ml auffüllen

5 x Probenpuffer:	f. c. (1 x Puffer)	Menge
(1 M) Tris, pH 6,8	30 mM	750 µl
Glycerol	0,7 M	1,25 ml
Mercaptoethanol	35 mM	0,25 g
(15 mM) Bromphenolblau	0,1 M	0,39 g
Aqua bidest.	0,15 mM	250 µl
		auf 5 ml auffüllen

Material und Methoden

Durchführung:

Die Zusätze für das Trenngel werden zusammengegeben und bis ca. 2 cm unter den Rand der kleineren Glasplatte in die Gelkammer pipettiert. Das Trenngel wird mit einem Isopropanol/Wasser-Gemisch (1:1, v/v) überschichtet. Nach ca. 30 Min. ist die Polymerisation abgeschlossen, das Isopropanol/Wasser-Gemisch wird abgegossen und mit Filterpapier vollständig abgesaugt. Das Sammelgel wird zusammengemischt und auf das Trenngel gegeben und mit einem Probenkamm ausgestattet. Wenn das Sammelgel polymerisiert ist (ca. 30 Min.), wird die Gelkammer in der mit Elektrophoresepuffer gefüllten Pufferkammer gesetzt und der Probenkamm vorsichtig entfernt.

PAS-Präzipitate aus Zellkulturüberständen oder aus Detergenz-Lysaten werden mit dem entsprechenden Puffer auf vergleichbare Proteinkonzentrationen und Volumina gebracht und mit 5 x Probenpuffer versetzt, so dass die Endkonzentration des Probenpuffers 1 x beträgt. Die Proben werden bei 95°C für 5 min denaturiert und auf vorgefertigte 10 % SDS-PAGE-Gele aufgetragen. Zur Kalibrierung der Proteinbanden dient ein vorgefärbter Molekulargewichtsstandard. Der Marker wird ebenfalls mit dem Puffer auf das gleiche Volumen aufgefüllt und in die Tasche pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung wird zu Beginn mit einer Stromstärke von 30 mA für 15 min und anschließend mit 20 mA je Gel eingestellt. Die Proteine bewegen sich von der Kathode zur Anode. Die Elektrophorese wird beendet, wenn die Bromphenolbande gerade ausläuft. Nach der SDS-Gelelektrophorese wird das Gel 1h in Fixierer geschwenkt, 2 x 15 Minuten mit DMSO geschüttelt, 30 Minuten mit Rotifluoreszint imprägniert und als letztes gründlich mit Wasser gewaschen (5 x 10 Minuten). Auf einem Geltrockner wird das Gel 2 h bei 80 °C getrocknet und anschließend in einer Autoradiographie-Kassette auf einem Röntgenfilm 2 bis 7 Tage lang exponiert.

2.7.2 Western-Blot

Zur Durchführung des Western Blot nach Towbin et al. (1979) wurden die Proteine nach Beendigung der SDS-Gelelektrophorese bei einem konstanten Strom von 180 mA in einer Blotkammer auf Nitrocellulose elektropheriert. Die dafür benötigten Membranen und Filterpapiere müssen zuvor in Transferpuffer equilibriert werden. Nach dem Transport wird der Blot mit PBS mit 0,1 % Tween-20 3x gewaschen.

Um die unspezifische Bindung von Antikörpern zu reduzieren wird der Blot bei RT/1h mit Milchpulverlösung auf dem Schüttler geschwenkt. Es folgt die Inkubation der Membran für eine weitere Stunde auf dem Schüttler mit dem in PBS/0,05% Tween-20/1% BSA verdünnten (1:2000-1:5000) NCR-Ig-Fusionsprotein. Nach dreimaligem Waschen von jeweils 10

Material und Methoden

Minuten in PBS/Tween-20 wird der Peroxidase-konjugierte Zweitantikörper 1:100000 in PBS/0,05% Tween-20/1% BSA verdünnt und für 1 h mit der Membran auf dem Schüttler inkubiert. Danach wird die Membran in Waschpuffer 3 x 10 min gewaschen.

Der Nachweis von Antigen-Antikörper-Komplexen erfolgt über die Umsetzung eines Chemilumineszenzsubstrates durch die Peroxidase, wobei Photonen freigesetzt werden. Die Membran wurde 20 Sekunden lang in ECL-Lösung (Enhanced Chemiluminescence Supersignal Dura West Extended, Pierce) gebadet, um die Peroxidasereaktion auszulösen, und danach wird die Membran zwischen Folie gelegt und mit dem Lumi-Analyser die Signale aufgenommen. Auf dem Lumi-Analyser-Schirm wurde eine Expositionszeit von 30 sec bis 20 min gewählt.

Reagenzien für Western-Blot:

Kathodenpuffer	40 mM ϵ -Aminocapronsäure 25 mM Tris 20% (v/v) Methanol mit HCl auf pH 9,0 einstellen	
Anodenpuffer	75 mM Tris/HCl pH 7,4 20% Methanol	
PBS-Tween:	0,1% (w/v) Tween-20 in 1 x PBS	
Blocken:	5% (w/v) Milchpulver in PBS-Tween	
1. Antikörper:	1: 100 verd. 1x PBS/0,05 % Tween-20/1 % BSA 1h RT (oder ÜN 4°C) -waschen 3 x 10 min in PBS-Tween	(100 ml Milchpulverlösung +100 ml 1 x PBS)
2. Antikörper (Peroxidase-gekoppelt):	1:10 ⁵ verd. GAHlgG-POX-konjugiert 1% BSA/0,05% Tween-20 -Inkubation 1h RT (oder ÜN 4°C) -Waschen 3 x 10 min. in PBS-Tween	
-Entwicklung im Dunklen		

2.7.3 Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen

Die SDS-Gele werden nach der elektrophoretischen Auftrennung für mindestens 1 h oder über Nacht in der Fixierlösung fixiert. Danach werden die Gele für 45 min in Lösung B sensitiviert. Nach der Sensitivierung wird das Gel 6 x 10 min mit H₂O bidest. gewaschen. Dann wird das Gel für 1-2 h in Silbernitratlösung imprägniert, danach 15 sec mit H₂O bidest. gewaschen und in der Kaliumkarbonatlösung für 5-15 min entwickelt, bis eine ausreichend klare Färbung der Proteine erreicht ist. Danach wird die Farbentwicklung durch Inkubation mit Lösung A gestoppt (10 min). Abschließend wird das Gel für 2 x 30 min gewässert, 20 min

Material und Methoden

in 1% (w/v) Glycerin inkubiert und dann für die Dokumentation in feuchte Cellophanfolie eingeschlagen und im Trockner getrocknet. Die Färbung erfolgt bei RT auf einem Horizontalschüttler in Glasschalen.

Optimierte Silberfärbung für Proben >100 µg Protein zur MALDI-TOF-MS

	halbe -	normale -	doppelte Menge	Zeit
<i>Lsg. A</i>				
Ethanol	75 ml	150 ml	600 ml	2 oder 4 fache Menge erstellen 1 h + über Nacht oder 4 x 30 min (Fixierung)
Essigsäure	25 ml	50 ml	200 ml	
A.dest. ("30 - 10 - 60")	150 ml	300 ml	1200 ml	
<i>Lsg. B</i>				
Kalium tetrathionat 0.3 %	750 µg	1.5 g	6 g	45 min (Sensitisation)
Kaliumacetat 0.5 M	12.3 g	24.5 g	98.14 g	
Ethanol 30 %	75 ml	150 ml	600 ml	
A.dest.	auf 250 ml	auf 500 ml	auf 2 l	
A.dest.	je 250 ml	je 500 ml	je 2 l	6 x 10 Minuten
Silbernitrat	0.5 g	1 g	4 g	1 - 2 h (Imprägnation)
A.dest.	auf 250 ml	auf 500 ml	auf 2 l	
A.dest.	250 ml	500 ml	2 l	1 x max. 15 sec !!!
Kaliumcarbonat	7.5 g	15 g	60 g	30 - 40 min (Entwicklung)
Natriumthiosulfat-pentahydrat [10 %]	31.3 µl	62.5 µl	250 µl	
Formalin [37 %]	75 µl	150 µl	600 µl	
A.dest.	auf 250 ml	auf 500 ml	auf 2 l	
TRIS	10 g	20 g	80 g	45 min (Stoppen)
Eisessig	5 ml	10 ml	40 ml	
A.dest.	auf 250 ml	auf 500 ml	auf 2 l	
A.dest.	je 250 ml	je 500 ml	je 2 l	2 x 30 min (waschen)
	Weiterverarbeitung (in A. dest.) zur Proteindetektion (Aufbewahrung in 30 % Ethanol, 2 % Glycerol bzw. Trocknungsvorbereitung in 2 % Glycerol pur)			

2.7.4 Proteinnachweis mit Coomassie-Blau

Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel oder die Membran je nach Proteinmenge 10 bis 30 Minuten in der angesetzten Coomassie-Blau-Lösung geschwenkt. Nach dem Abgießen der wieder verwendbaren Färbelösung wird die Membran oder das Gel in Fixiererlösung gelegt und so lange entfärbt bis der Hintergrund ausreichend hell erscheint. Nach kurzem Schütteln in Wasser wird das Gel auf ein Fließpapier gelegt mit Frischhaltefolie bedeckt und unter Vakuum 2 h bei 80° C getrocknet.

Material und Methoden

Benötigte Reagenzien:

Coomassieblau-Lösung 500 ml		Entfärber 1000 ml	
Coomassieblau	0,875 g	Essigsäure	75 ml
Methanol	225 ml	Methanol	350 ml
Essigsäure	50 ml	H ₂ O-dest	575 ml
H ₂ O-dest	225 ml		

2.7.5 Metabolische Markierung von Zellen mit [³⁵S]Methionin/Cystein

Für die metabolische Markierung wurden Tumorzellen verwendet, in denen NCR-Liganden vermutet wurden. Aus den Flaschen mit adherenten Zellen wurde das Vollmedium entfernt, mit warmem D-PBS gewaschen und für eine Stunde mit Hungermedium (UPMI ohne Met/Cys) im Inkubator bei 37°C belassen, bevor das Medium gegen 15 ml Markierungsmedium UPMI ohne Met/Cys mit 400 µCi [³⁵S]-Methionin/Cystein ausgetauscht wurde. Die Zellen wurden weiter über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurden nochmal 14 µl [³⁵S]-Methionin/ Cystein (200µCi) pro Flasche zugegeben und für 1 h weiter inkubiert. Nach der Markierung wurde das Medium sorgfältig abgenommen, die Zellen 2x mit 15ml D-PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend von der Plastikoberfläche gekratzt und in Röhrchen mit je 5ml PBS aufgenommen. Die Zellen wurden bei 2000 Upm/2 min in 15ml-Röhrchen abzentrifugiert und der Überstand entfernt.

2.7.6 Lysatvorbereitung und Präzipitation

Die Zellpellets wurden in 2 ml Lyse-Puffer (TBS mit 1% Detergenz [NP-40, CHAPS oder Digitonin], 5 mM MgCl₂ und Proteaseinhibitoren [1 Tbl. Complete EDTA-frei in 15 ml]) resuspendiert, für 1,5 h bei 4°C rotiert und die Kerne bei 4°C 10 min lang bei 13000 Upm abzentrifugiert. In einigen Experimenten wurden die Zellen erst in Mikrosomenpuffer in flüssigem Stickstoff aufgebrochen und Zellmembranen isoliert, bevor sie dann ebenfalls in Detergenz lysiert wurden. Dem postnukleären Überstand wurden NCR-Ig-Fusionsproteine (ca. 25 µg) zugesetzt und für 1-3 h bei 4°C gerollt. Anschließend wurden 50 µl Protein A-Sepharose-Suspension für 1 h bei 4°C zugegeben. Die Präzipitate wurden 4x mit je einem 1 ml Lysepuffer gewaschen und danach mit 40 µl 6x SDS-Sample-Buffer versetzt, 5 min bei 95°C erhitzt und entweder weiter verarbeitet oder eingefroren.

Material und Methoden

Hungermedium:	15 ml Methionin-Cystein-freies MEM
Markierungsmedium:	15 ml Methionin-Cystein-freies MEM 0,375 ml dialysiertes FCS (hitze-inaktiviert) 500 µCi [³⁵ S]Methionin/Cystein
Lyse-Puffer	1 x TBS (150 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂) 1% Detergenz (V/V) 1 Proteaseinhibitor-Tablette / 15 ml

2.7.7 ELISA

Beschichten der Testplatte

In 96-Loch-ELISA-Platten werden mit der Titertek-Multipipette in jedes Loch der Platte 100 µl GAHuIgG+IgM 1:1000 (verdünnt in Carbonatpuffer) pipettiert (Endkonzentration 1 µg/ml). Die Platten werden über Nacht bei 4°C inkubiert.

Waschen der Testplatte

Danach erfolgt das Waschen (3x) der Platten mit der Vacu-Pette. In jedes Testloch werden etwa 200 µl PBS-Tween eingefüllt. Nach dem dritten Waschen wird die Platte umgedreht und auf saugfähiges Papier aufschlagen, um alle Waschflüssigkeit zu entfernen.

Blockieren der unspezifischen Adsorption

Das Blockieren unbesetzter Bindungsstellen erfolgt mit 200 µl Blockierungspuffer (0,2 % Gelatine-Lösung in PBS) pro Loch für 1 h bei 37°C. Die Platten können so für mehrere Monate bei 4°C gelagert werden. Vor Zugabe der Antikörper-Lösung (100 µl/well) werden die Löcher der Platten 3 x mit Waschpuffer gespült.

Auftrag der Proben

Verdünnung der Testproben (hier NCR-Fusionprotein mit HuIgG/Fc) in PBS-Tween ansetzen. Platte ausschlagen und Testproben nach Pipettierschema pipettieren, pro Testloch 100 µl mit Eppendorf-Pipette (Pipettenspitze für jede Verdünnung wechseln).

Testseren:	Mensch Normalserum	1: 1000 bis 1: 1000 000
	Mensch IgG	1: 1000 bis 1:500 000
	Negativkontrolle: Maus IgG	1: 1000

Inkubation für 1 h bei RT.

- Waschen der Testplatte 4 x mit PBS-Tween.
- Pro Testloch 100 µl GAHuIgG/Fc-POX 1: 5000 verdünnt in PBS-Tween mit der Titertek-Pipette pipettieren. Inkubation 1 h bei RT.
- Waschen der Testplatte 5 x mit PBS-Tween.

Material und Methoden

Substratreaktion

- Ansetzen der Substratlösungen erst unmittelbar vor Gebrauch.
- Pro Platte werden etwa 11 ml Substratlösung benötigt. Einwiegen von 11 mg OPD auf der Analysenwaage und in 11 ml Substratpuffer vollständig auflösen (1 mg/ml). Dazu 11 µl 30% H₂O₂ geben und umschütteln. Rasch pro Testloch 100 µl Substratlösung pipettieren. Testplatte mit Alu-Folie abdecken, da das Substrat lichtempfindlich ist.

Stoppen der Reaktion

- Nach etwa 1-10 Minuten (je nach Fortschreiten der Farbreaktion) Zugabe von 50 µl 2 M H₂SO₄-Lösung pro Testloch mit der Titertek-Pipette.

Photometrische Auswertung des Tests

- Messen der Farbreaktion jedes Testansatzes mit dem Titertek Multiscan Plus MKII Photometers (Dynatec MR 5000, Dynex, Denkendorf) bei 492 nm (Meßwellenlänge) und 620 nm (Referenzwellenlänge) ermittelt.

Auswertung

- Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung für jeden 4-fach Ansatz, Eintrag der Ergebnisse in das Pipettierschema. Zeichnen der Eichkurve für Human-IgG 1mg/ml auf halblogarithmisches Millimeterpapier.

Reagenzien und Materialien

Test-Platte: Micro Test III Flexible assay Plate (Falcon 3912)

1x PBS -Tween pH7,2: 0,1% (w/v) für 5Liter

Na ₂ HPO ₄	72g
KH ₂ PO ₄	10g
NaCl	400g
KCl	10g
0,05%	Tween-20

Carbonatpuffer pH 9,6
0,05M Na₂CO₃/NaHCO₃

Substratpuffer pH 6,0
0,1M KH₂PO₄

0,2% Gelatine in PBS mit 0,1%NaN₃

2M H₂SO₄

Ziege Anti-Mensch IgG und IgM 1mg/ml (GαHuIgG+IgM, Dianova)

Ziege Anti-Mensch IgG/Fc gebunden an Peroxidase (GαHuIgG/Fc-Pox, Dianova)

Substrat: Orthophenylendiamin (OPD, Sigma) H₂O₂ 30%ig (Perhydrol, Merck)

Geräte Titertek 8-Kanal Pipette, Vacu-Pette (96-Kanal Pipetten für Mikrotiterplatten, Neo-Lab), Titertek Multiscan Plus MKII (ELISA Photometer)

Material und Methoden

2.8 Zellfärbungen

2.8.1 Immuncytochemie an Cytozentrifugaten

Abtrysinierte adhärenente bzw. geerntete Suspensionszellen ($50-100 \times 10^3$ in DMEM/10%FCS pro Objektträger) wurden auf Glasobjektträger mit Hilfe der Shandon-Cytospinzentrifuge übertragen (3 min bei 700-800U_{pm}) und über Nacht getrocknet. Die Zellen wurden mit Aceton 10 min fixiert und 5min in PBS rehydriert. Bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit 50 µl Erstantikörper bzw. Fusionsproteinen (verdünnt in PBS/0,2% BSA) für 60 min in feuchten Kammern inkubiert. Negativkontrollen wurden durch Verwenden irrelevanter Kontrollantikörper oder Weglassen des Erstantikörpers durchgeführt. Vor der Zugabe des Zweitantikörpers wurden die Objektträger 3 x mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen 30 min bei RT mit einem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper (Ziege anti-Human-IgG-POX oder Ziege anti-Maus-IgG-POX; 1:200 in PBS/0,2% BSA) für 45 min inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 3 x mit PBS gewaschen und mit 50 µl Substratlösung (950 µl 0,1 M Na-Acetat [pH 5,2] + 50 µl Aminoethylcarbazol + 1 µl H₂O₂) für ca. 10 min inkubiert. Danach wurde kurz mit PBS gewaschen. Die gefärbten Zellen wurden auf dem Objektträger mit Glyceringelatine und Deckgläschen eingedeckt und lichtmikroskopisch inspiziert.

2.8.2 Cytofluorimetrie

Die Zellen wurden für eine FACS-Messung zunächst gezählt und $5-10 \times 10^5$ Zellen pro Färbung verwendet. Die Zellen wurden 2 min bei 1500 U_{pm} abzentrifugiert und 1x in FACS-Medium (D-PBS, 1% FCS, 0,1% NaN₃) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in antikörperhaltigen Kulturüberständen oder FACS-Medium mit gereinigten monoklonalen Antikörpern bzw. Ig-Fusionsproteinen resuspendiert (ca. 10 µg/ml). Der Erstantikörper wurde 30-60 min mit den Zellen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit FACS-Medium wurde ein Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)- oder Phycoerythrin (PE)-konjugierter Zweitantikörper in einer 1:200 Verdünnung in FACS-Medium auf die Zellen gegeben und wiederum 30-45 min bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit D-PBS werden die Zellen in 100 µl D-PBS mit Propidiumjodid (Endkonzentration 1 µg/ml) aufgenommen und im FACScan vermessen. Ausgewertet wurden ausschließlich die lebenden Zellen, die sich mit Propidiumjodid nicht anfärben ließen.

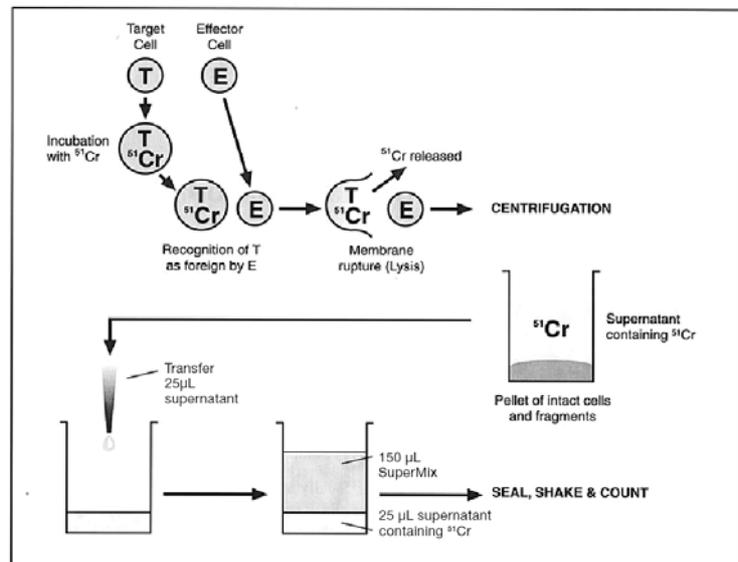
Material und Methoden

2.9 Natural-Killer (NK)-Zell-Assay

Die NK-Zell-Zytotoxizitätstests eingesetzten aktivierten NK-Zellen wurden aus humanen peripheren Blutlymphozyten mit einem Magnetobead-NK-Isolationskit (Miltenyi, Bergisch-Gladbach) aufgereinigt.

Die NK-Zellen waren zu 90-99% CD3⁻ und CD56⁺. Die Zellen wurden in 96-Loch-U-Bodenplatten in einer

Konzentration von 1×10^5 pro Loch mit bestrahlten Feeder-Zellen (1:1-Mischung aus K562 und 721.221, 1×10^5 pro Loch), 1 µg/ml Phytohämagglutinin (PHA-P) und 200 U/ml rIL-2 in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) mit 10% humanem Serum ausplattiert. Die NK-Zellen wurden je nach Bedarf in IMDM/10% Humanserum + 100 U/ml rIL-2 in 96-Loch-U-Bodenplatten expandiert und 2-6 Wochen nach der Aufreinigung verwendet. 5×10^5 Zielzellen wurden in 100 µl Vollmedium resuspendiert und mit 10 µl [⁵¹Cr]-Na-Chromat (100 µCi) 1 h lang bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Inzwischen wurden die NK-Zellen geerntet und die Konzentration entsprechend dem gewünschtem Effektor-Zielzellverhältnis eingestellt und in Triplikaten auf 96-Loch-U-Boden-Platten in 100 µl Portionen in Triplikaten ausgespiet (Effektor:Target-Verhältnis gewöhnlich 20:1; 10:1; 5:1; 2,5:1). Die markierten Zielzellen wurden 2x in PBS gewaschen, in 10ml Medium resuspendiert und anschließend auf der 96-Loch-Platte ausgespiet (100 µl ca. je Loch mit 5000 Zielzellen). Die Platte wurde für 1 min bei 1000 Upm abzentrifugiert und für 4 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Für die Bestimmung der spontanen Freisetzung von ⁵¹Cr wurden Zielzellen ohne NK-Zellen inkubiert und für die Maximalfreisetzung wurden Zielzellen in 0,1% Triton X-100 lysiert. Nach der Inkubation wurden die Überstände durch Filter, welche die Zellen zurückhielten, gesaugt und die freigesetzte Radioaktivität im Gammazähler gemessen. Die spezifische Lyse (%) wurde nach der Formel $(\text{cpm}_{\text{Exp.}} - \text{cpm}_{\text{spont.}}) / (\text{cpm}_{\text{max.}} - \text{cpm}_{\text{spont.}}) \times 100$ berechnet



3 Ergebnisse

3.1 Herstellung von Expressionsvektoren für NCR-Ig-Fusionsproteine

Für diese Arbeit erhielten wir von Dr. Ofer Mandelboim (Hebräische Universität Jerusalem, Israel) cDNA-Klone von IgG₁-Fc-Fusionsproteinen deren 5'-Teil für die Ektodomänen von NKp46, NKp46-D1 (D1 = membrandistale Ig-ähnliche Domäne von NKp46), NKp46-D2 (D2 = membranproximale Ig-ähnliche Domäne von NKp46), NKp44, NKp30, CD16 bzw. CD99 kodieren (Mandelboim et al., 1999; Mandelboim et al., 2001; Arnon et al., 2001). Die CD16-IgG₁-Fc-, KIR-2DL1-IgG₁-Fc- und CD99-IgG₁-Fc-Fusionsproteine sollten als Negativkontrollen im Vergleich zu NCR-Ig eingesetzt werden.

Die cDNS lagen in einem uns unbekanntem Plasmid vor, das sich vermutlich von π H3M ableitet (Aruffo und Seed, 1987). Da keine detaillierten Sequenzinformationen zu erhalten waren, haben wir zunächst die genannten Ektodomänen als HindIII/ BamHI-Fragmente in pBluescript II KS+ subkloniert und ihre Sequenz überprüft. Desgleichen wurde die cDNS des Fc-Teils von humanem IgG₁ als BamHI/XbaI-Fragment in pBluescript subkloniert und sequenziert.

Es ergaben sich folgende Aminosäuresequenzen anhand der übersetzten cDNS-Sequenzen (unterstrichen = Originalsignalsequenz; doppelt unterstrichen = CD5-Signalsequenz; kursiv = „Linker-Aminosäuren“; **N** zeigt potentielle *N*-Glykosylierungsstellen an; *T/S* zeigen potentielle *O*-Glykosylierungsstellen an):

NKp46-Ektodomäne

MSSTLPALLCVGLCLSQRISAQQQTLPKPFIWAEPHFMVPKEKQVTICCGNYGAVEYQLHFEGS
LFAVDRPKPPERINKVKFYIPDMNSRMAGQYSCIYRVGELWSEPSNLLDLVVTEMYDTP~~TL~~SVHP
GPEVISGEKVTFYCRLDTATSMFLLLKEGRSSHVQRGYGKVQAEFPLGPVTTAHRGTYRCFGSY
NNHAWSPSEPVKLLVTGDIEN~~TS~~LAPEDP~~TF~~PDTWGTYLLTTTETGLQKDHALWDP

NKp46-D1 (membrandistale Ektodomäne)

MSSTLPALLCVGLCLSQRISAQQQTLPKPFIWAEPHFMVPKEKQVTICCGNYGAVEYQLHFEGS
LFAVDRPKPPERINKVKFYIPDMNSRMAGQYSCIYRVGELWSEPSNLLDLVVTEMDP

Ergebnisse

NKp46-D2 (membranproximale Ektodomäne)

MPMGSLQPLATLYLLGMLVASCLGRLRVPYDTPTLSVHPGPEVISGEKVTFYCRLDTATSMFLLL
KEGRSSHVQRGYGKVQAEFPLGPVTTAHRGTYRCFGSYNNHAWSPSEPVKLLVTGDIENTSLA
PEDPTFPDTWGTYLLTTETGLQKDHALWDP

NKp44-Ektodomäne

MAWRALHPLLLLLLLFPGSQAQSKAQVLQSVAGQTLTVRCQYPPTGSLYEKKGWCKEASALVC
IRLVTSSKPRTVAWTSRFTIWDDPDAGFFTMTDLREEDSGHYWCRIYRPSDNSVSKSVRFYLV
VSPASASTQTSWTPRDLVSSQTQTQSCVPPTAGARQAPESPSTIPVPSQPQNSTLRPGPAAPDP

NKp30-Ektodomäne

MPMGSLQPLATLYLLGMLVASCLGRLRVPLWVSQPLEIRTLEGSSAFLPCSFNASQGRLAIGSVT
WFRDEVVPGKEVRNGTPEFRGLAPLASSRFLHDHQAELHIRDVRGHDASIYVCRVEVLGLGVG
TGNGTRLVVEKEHPQLGDP

CD99-Ektodomäne

MARGAALALLFGLLGVLVAAPDGGFDLSDALPDNENKKPTAIPKKPSAGDDFDLGDVVDGE
NDDPRPPNPPKMPNPNPNHPSSSGSFSADLADGVSGGEGKGGSDGGGSHRKEGEEADADP

CD16-Ektodomäne

MWQLLLPTALLLVSAGMRTE^LPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCGAYSPEDNSTQWFH
NESRISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLQAPRWVFKEEPILHRC
HSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQ
GLAVSTISSFFPPGDP

KIR-2D-Ektodomäne

MPMGSLQPLATLYLLGMLVASI/AHEGVHRKPSLLAHPGPLVKSEETVILQCWSDVMFEHFLH
REGMFNDTLRLIGEHDGVSKANFSISRMTQDLAGTYRCYGSVTHSPYQVSAPSDPLDIVIIGLYE
KPSLSAQPGPTVLAGENVTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAHERRLPAGPKVNGTQADFPPLGPATH
GGTYRCFGSFHDSPEYEWKSSDPLLVSVTGNPSNSWSPTEPSSKTGNPRHLHDP

Humanes IgG₁ (Fc-Teil)

DPEPKSSDKTHTCPPEPAPEFEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPTPIEKTIKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Ergebnisse

NKp30, NKp46-D2 und KIR-2DL1 waren mit der heterologen ER-Signalsequenz von CD5(Ly-1) kloniert worden. Die Sequenzierungen bestätigten die Identität der NKp46, NKp46-D1, NKp46-D2, NKp44, NKp30, CD16, KIR-2DL1 bzw. CD99 cDNS in den Plasmiden.



Abb. 11. Schematischer Aufbau der NCR-IgG₁-Fusionsproteine

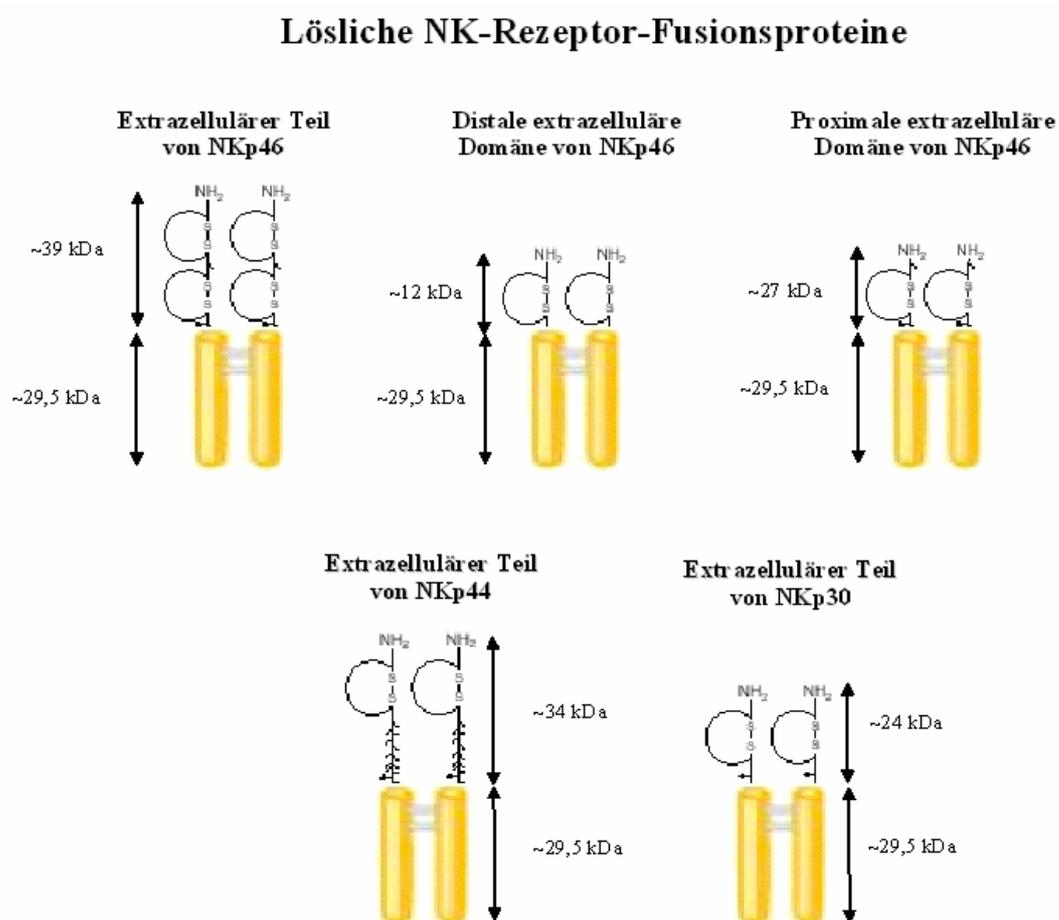


Abb. 12. Diese Abbildung zeigt den schematischen Aufbau der rekombinanten NCR-Fusionsproteine (Ig-Fc in gelb) und die erwarteten ungefähren Molekulargewichte der monomeren Fusionsproteine. Für CD99-Ig, CD16-Ig und KIR-2D-Ig erwarten wir ungefähre Molekulargewichte von ca. 40, 60 bzw. 61 kDa.

Anschließend wurden die cDNS-Fragmente für die verschiedenen Ektodomänen wieder an das 5'-Ende der IgG₁-Fc-cDNS kloniert (siehe Abb. 11 und 12) und die kompletten Konstrukte in den hochexprimierenden Mammalier-Expressionsvektor pHβA-Pr1-neo

Ergebnisse

mit erweiterter multicloning site (pFM92) (Gunning et al., 1987) bzw. in den COS-Zell-Vektor pMT2-mcs (Sambrook et al., 1989) umkloniert. Der Vektor pMT2-mcs führte wegen des in ihm enthaltenen Polyomavirus *origin of replication* zu einer starken Amplifizierung des Plasmids in SV40-T-Antigen positiven COS-7-Zellen. Eine starke Proteinexpression ist in transienten Transfektionen erreichbar, während stabile Transfektanten mit diesem Vektor wegen toxischer Effekte nicht generiert werden können.

3.1.1 Expression von rekombinanten NCR-Ig-Fusionsproteinen in verschiedenen Zelllinien

Die Expressionsvektoren für rekombinante NCR-Ig-Fusionsproteine sollten nun in verschiedene Zelllinien transfiziert werden, um deren Exprimierbarkeit zu zeigen und um stabile Linien zu etablieren, die die Fusionsproteine in zur Aufreinigung ausreichenden Mengen sezernieren. Geeignete Transfektionsbedingungen waren zu etablieren.

Erste Versuche wurden in COS-7-Zellen mit den pFM92 und pMT2-Plasmiden und verschiedenen Transfektionsmethoden durchgeführt. Es wurde zunächst versucht, die pFM92-Plasmide durch Elektroporation zu transfizieren. Die Expression der Fusionsproteine wurde zwei Tage später durch intrazelluläre Immunperoxidase-Färbung von acetonfixierten Cytospin-Präparaten überprüft. Mit einem Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-hIgG-Fc-Antiserum konnte die Expression der NKp46- und NKp30-Fusionsproteine allerdings nur in vereinzelt Zellen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 2). Die anderen Fusionsproteine waren nicht signifikant exprimiert.

<i>pFM92-Plasmide (Elektroporation)</i>	<i>COS-7</i>
CD16-Ig	(+) <1%
NKp46-Ig	(+),+,++ <1%
NKp30-Ig	(+),+,++ <1%
NKp44-Ig	-
CD99-Ig	-

Tabelle 2. Expression von NCR-Fusionsproteinen in elektroporierten COS-7-Zellen analysiert im Cytospin.

-, negativ; (+) = schwach positiv, + = positiv; ++ = stark positiv

Wegen der geringen transienten Expression wurden die Transfektionen der COS-7-Zellen mit den Transfektionsreagenzien DOTAP und FuGene 6 wiederholt. Es zeigten sich bei der Überprüfung der intrazellulären Expression zwei Tage nach

Ergebnisse

Transfektion mit DOTAP deutlich höhere Expressionsraten in der Cytospin-Immunperoxidase-Färbung (siehe Tabelle 3). Auch bei den FuGene6-Transfektanten zeigte sich eine recht gute transiente Expression der pFM92-Plasmide im Vergleich zu den überexprimierbaren pMT2-COS-Vektoren (siehe Tabelle 4).

<i>pFM92-Plasmide DOTAP</i>	<i>Transfektion #1 COS-7</i>	<i>Transfektion #2 COS-7</i>	<i>Transfektion #3 COS-7</i>
CD16-Ig	(+) <1%	(+) <1%	(+),+ <1%
NKp46-Ig	++ 1-20%	(+),+ <1%	(+),+ 1-20%
KIR2DL1-Ig	(+) <1%	(+) <1%	(+) 1-20%
NKp30-Ig	++ 20-40%	(+),+ 1-20%	(+),+ 20-40%
NKp44-Ig	++ 20-40%	(+),+ <1%	(+),+,++ 20-40%
CD99-Ig	(+) <1%	(+) <1%	(+) <1%

<i>pMT2-Plasmide DOTAP</i>	<i>Transfektion #1 COS-7</i>	<i>Transfektion #2 COS-7</i>	<i>Transfektion #3 COS-7</i>
CD16-Ig	++ 1-20%	++ 1-20%	++ 20-40%
NKp46-Ig	++ 20-40%	++ 20-40%	++ 1-20%
KIR2DL1-Ig	++ 1-20%	++ 1-20%	+,++ 1-20%
NKp30-Ig	++ 1-20%	++ 1-20%	++ 20-40%
NKp44-Ig	++ 20-40%	++ 20-40%	++ 1-20%
CD99-Ig	+ 1-20%	++ 1-20%	++ 20-40%

Tabelle 3. Expression von NCR-Fusionsproteinen in mit DOTAP transfizierten COS-7-Zellen analysiert im Cytospin. –, negativ; (+) = schwach positiv, + = positiv; ++ = stark positiv

<i>Transfektion mittels FuGene 6</i>	<i>pFM92-Plasmide COS-7</i>	<i>pMT2-Plasmide COS-7</i>
CD16-Ig	(+),+ 20-40%	+/,++ 20-40%
NKp46-Ig	(+),+,++ 20-40%	+/,++ 20-40%
KIR2DL1-Ig	(+) 1-20%	+/,++ 20-40%
NKp30-Ig	+,++ 20-40%	+/,++ 1-20%
NKp44-Ig	+,++ 20-40%	+/,++ 20-40%
CD99-Ig	(+) 1-20%	+/,++ 20-40%

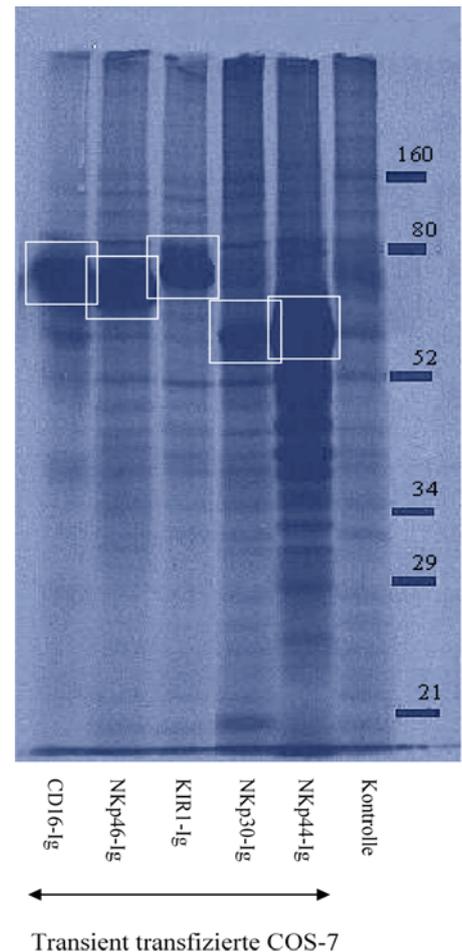
Tabelle 4. Expression von NCR-Fusionsproteinen in mit FuGene6 transfizierten COS-7-Zellen analysiert im Cytospin. –, negativ; (+) = schwach positiv, + = positiv; ++ = stark positiv

Die mit pMT2-Plasmiden transient transfizierte COS-7-Zellen wurden bezüglich der Expression der NCR-Fusionsproteine überprüft. Die entsprechenden Transfektanten wurden mit ³⁵S-Met/Cys biosynthetisch markiert, mit Protein A-Sepharose präzipitiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 13).

Ergebnisse

Abb. 13. Expression von NCR-Fusionsproteinen in COS-Zellen. Transient mit NKp46-Ig, NKp44-Ig, NKp30-Ig, KIR-2D-Ig und CD16-Ig transfizierte COS-7-Zellen wurden metabolisch mit ^{35}S -Cys/Met markiert, lysiert und mit Protein A-Sepharose präzipitiert. Zur Kontrolle wurden untransfizierte COS-7-Zellen metabolisch markiert und ebenfalls mit Protein A-Sepharose präzipitiert.

Das Autoradiogramm in Abb. 13 zeigt, dass NKp46-Ig, NKp44-Ig, NKp30-Ig, CD16-Ig und KIR2D-Ig effizient in transient transfizierten COS-7-Zellen exprimierbar waren. NKp44-Ig lief bei einem unerwartet geringen Molekulargewicht. Dies könnte mit unvollständiger Glykosylierung des normalerweise hochgradig O-glykosylierten NKp44 zusammenhängen.



Mit pFM92-Plasmiden transfizierten COS-7-Zellen wurden 3-4 Wochen lang mit Geneticin selektiert, um stabil exprimierende Massenkulturen zu erhalten. Die NCR-transfizierten COS-7-Massenkulturen wurden später auch durch limitierte Verdünnung kloniert. Es konnten einzelne Klone mit starker Expression von NKp46-Ig, NKp44-Ig und NKp30-Ig isoliert werden. Die NCR-Expression und Sekretion durch COS-7-Zellen war jedoch derjenigen von klonierten A549-Transfektanten unterlegen (s. unten), so dass letztere für die Aufreinigung von Fusionsproteinen eingesetzt wurden.

Die humane B-lymphoblastoide Zelllinie LCL721.221 („221“), die selbst kein Immunglobulin exprimiert, kam ebenfalls als Produzent von NCR-Ig-Fusionsproteinen in Frage. Die pFM92-Plasmide wurden mittels Elektroporation transfiziert. Nach der Selektion der transfizierten 221-Zellen durch Geneticin, überprüften wir die intrazelluläre Expression der NCR-Fusionsproteine in Cytospin-Peroxidasefärbungen. Die drei NCR-Fusionsproteine waren gut nachweisbar, die Kontrollfusionsproteine jedoch nur sehr schwach (Tab. 5).

Ergebnisse

<i>pFM92-Plasmide</i>	<i>721.221</i>
CD16-Ig	–
NKp46-Ig	(+),+,++ 80-100%
KIR2DL1-Ig	(+) 1-20%
NKp30-Ig	+,++ 80-100%
NKp44-Ig	(+),+,++ 80-100%
CD99-Ig	(+) 1-20%

Tabelle 5. Expression von NCR-Fusionsproteinen in stabil transfizierten LCL721.221 Zellen analysiert im Cytospin.

–, negativ; (+) = schwach positiv, + = positiv; ++ = stark positiv

Nach Selektion wurden Zelllysate und Zellüberstand auf das Vorhandensein von Fusionsproteinen im Western Blot analysiert (Abb. 14). Die anfänglich recht gute intrazelluläre Expression und Sekretion der NCR-Fusionsproteine verringerte sich später deutlich. Anscheinend verloren die 221-Transfektanten die Fusionsproteinexpression trotz permanenter Kultivierung in Geneticin. Da sich die A549-Transfektanten (siehe unten) als stabiler herausstellten, wurde mit den 221-Transfektanten nicht weitergearbeitet. Ein weiterer Grund für die Aufgabe des 221-Systems war der Befund, dass NKp46-Ig im Überstand von 221-Zellen stark degradiert wurde.

Als weitere potentielle Expressionssysteme wurden A549 Lungenkarzinomzellen und 1106mel Melanomzellen untersucht. Zwei Tage nach der Transfektion der pFM92-Plasmide mit FuGene 6 wurde die Expression in Cytospin-Immunperoxidasefärbungen nachgewiesen. Während in den Melanomzellen nur eine geringe Subpopulation der Zellen Fusionsproteine exprimiert, zeigten die A549-Kulturen eine gute Expression der NCR-Fusionsproteine (Tab. 6).

<i>pFM92-Plasmide</i>	<i>FuGene6</i>	<i>1106-mel</i>	<i>A549</i>
CD16-Ig		–	+ 1-20%
NKp46-Ig		++ <1%	(+),+ 20-40%
KIR2DL1-Ig		++ <1%	+,++ <1%
NKp30-Ig		++ <1%	+,++ 40-60%
NKp44-Ig		+,++ <1%	+,++ 40-60%
CD99-Ig		–	(+) 1-20%

Tabelle 6. Expression von NCR-Fusionsproteinen in stabil transfizierten 1106mel- und A549-Zellen analysiert im Cytospin. –, negativ; (+) = schwach positiv, + = positiv; ++ = stark positiv

Aus den Geneticin-selektierten Massenkulturen der A549-Transfektanten wurden durch limitierte Verdünnung Einzelklone isoliert und erneut im Cytospin analysiert. Es zeigte sich nun eine homogene Ausprägung der Fusionsproteine (Tab. 7).

Ergebnisse

<i>NKp46-Ig</i>			<i>NKp30-Ig</i>			<i>NKp44-Ig</i>			<i>KIR1-Ig</i>		
Klon	10	(+),+	Klon	23	(+),+,++	Klon	17	+,++	Klon	33	(+)
Klon	6	+ / ++	Klon	39	(+) / ++	Klon	34	+ / ++	Klon	47	(+)
Klon	19	+ / ++	Klon	11	(+) / +	Klon	35	+ / ++	Klon	53	(+)
Klon	18	(+)	Klon	33	(+) / ++	Klon	38	+ / ++	Klon	55	(+)

Tabelle 7. Expression von NCR-Fusionsproteinen in Klonen von stabil transfizierten A549-Zellen. (+) = schwach positiv, + = positiv; ++ = stark positiv

Die cDNS für rekombinante Ig-Fusionsproteine mit der D1- bzw. D2-Ektodomäne von NKp46 wurden erst später in pFM92 kloniert und dann auch in A549-Zellen exprimiert und nach mit Geneticin-Selektion durch limitierte Verdünnung kloniert. Diese Fusionsproteine ließen sich durchweg gut in A549-Zellen exprimieren (Tab. 8).

<i>pFM92-Plasmide</i>		<i>A549</i>	
<i>FuGene 6</i>			
NKp46-D1-Ig	A549	(+),+,++	80-100%
NKp46-D2-Ig		(+),+,++	80-100%

Tabelle 8. Expression von NKp46-D1 und NKp46-D2-Ig-Fusionsproteinen in stabil transfizierten A549-Zellen. (+) = schwach positiv, + = positiv; ++ = stark positiv

3.1.2 Sekretion und Aufreinigung der Fusionsproteine

Es galt nun, die Sekretion der Fusionsproteine ins Medium zu überprüfen. 50 ml Medium, das über 3 Tage von transfizierten A549-Klonen oder 221-Massenkulturen konditioniert worden war, wurde geerntet, die sezernierten Fusionsproteine mit Protein A-Sepharose präzipitiert und nach SDS-PAGE im Western Blot mit Ziege-anti-Human-IgG-Fc-Peroxidase nachgewiesen. Die NCR- und CD99-Fusionsproteine zeigten sich hier als Dimere mit höherem scheinbarem Molekulargewicht (100-130 kDa), da sie unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt wurden. In Abb. 14a sind allerdings auch teilweise die Monomere zu erkennen. Desweiteren sind in Abb. 14a geringere Mengen an anti-Ig-reaktiven Banden mit geringerem MW zu erkennen. Diese Banden stellen wahrscheinlich Degradationsprodukte dar. In Abb. 14b zeigen sich die Fusionsprotein-Dimere ohne Abbauprodukte. Der Vergleich zwischen den 221- und A549-Überständen zeigte deutlich, dass die A549-Transfektanten (mit Ausnahme von NKp46-Ig) wesentlich größere Mengen an Fusionsproteinen sezernierten. NKp30-Ig wurde später isoliert und ist daher hier nicht berücksichtigt.

Ergebnisse

Sekretion von Fusionsproteinen durch NCR-transfizierte A549 und .221 Zellen

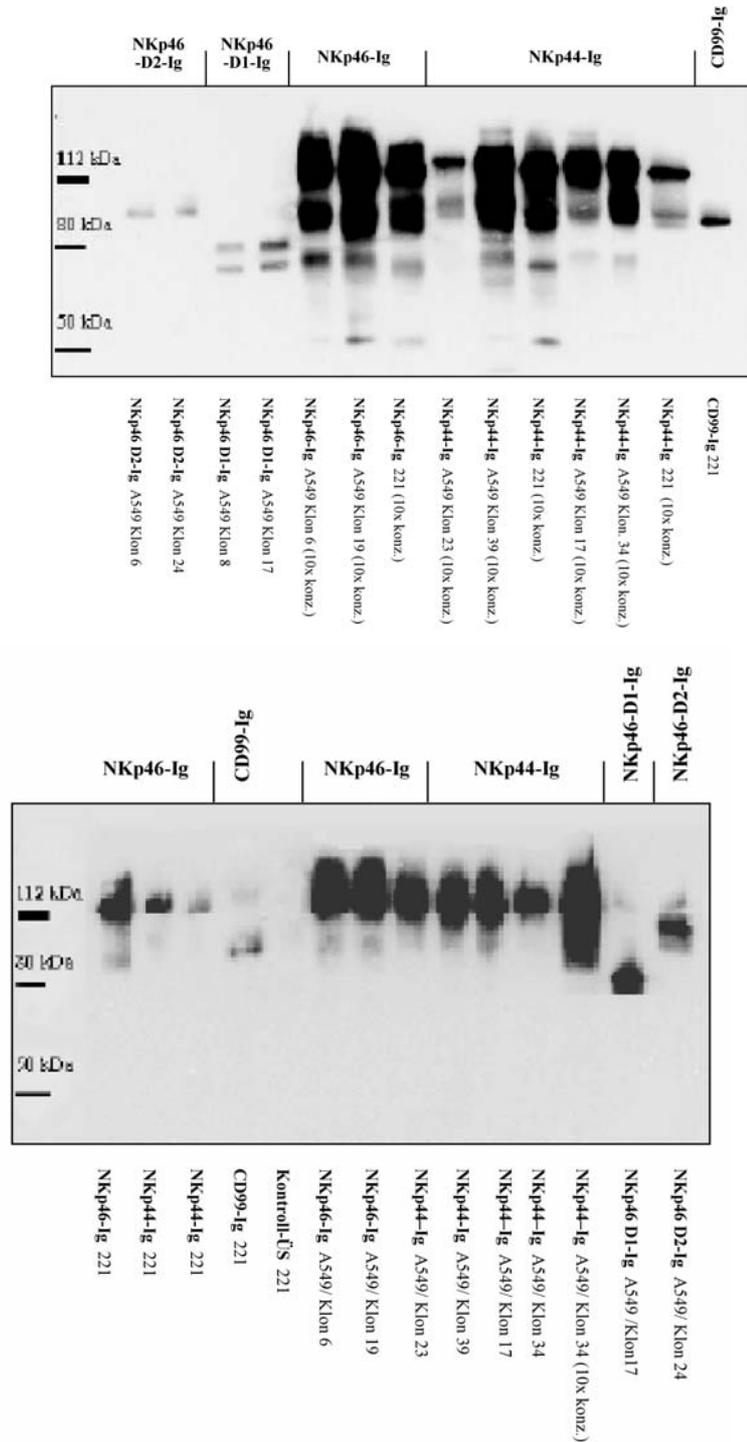
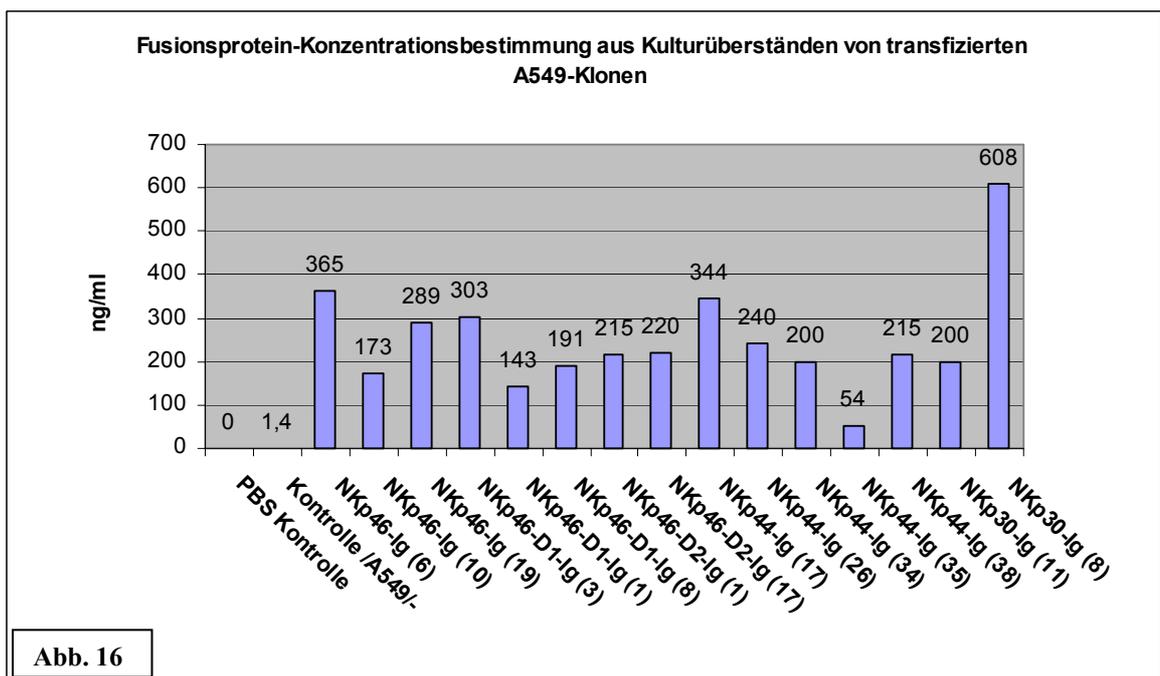
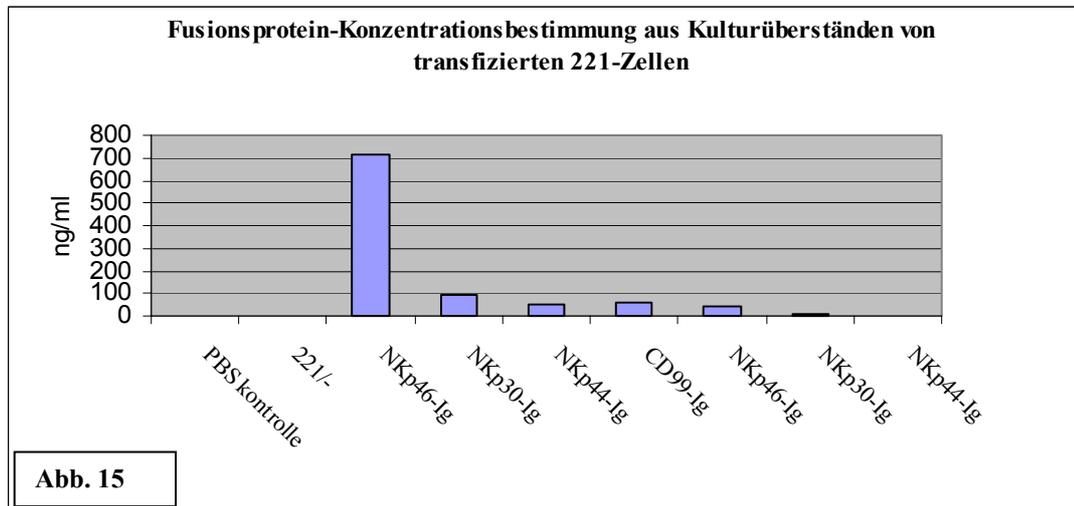


Abb. 14. Sekretion von Fusionsproteinen durch stabil transfizierte A549-Klone und 221-Zellen. Kulturüberstände wurden nach 3 Tagen geerntet und teilweise 10fach aufkonzentriert. Die sezernierten Fusionsproteine wurden mit 100 µl Protein A-Sepharose präzipitiert und dann auf 10%igen SDS-PAGE-Gelen separiert (Abb. 14a reduzierend, Abb. 14b nichtreduzierend), auf PVDF-Membranen elektrotransferiert und mit Ziege-anti-Human-IgG-Fc-POX detektiert.

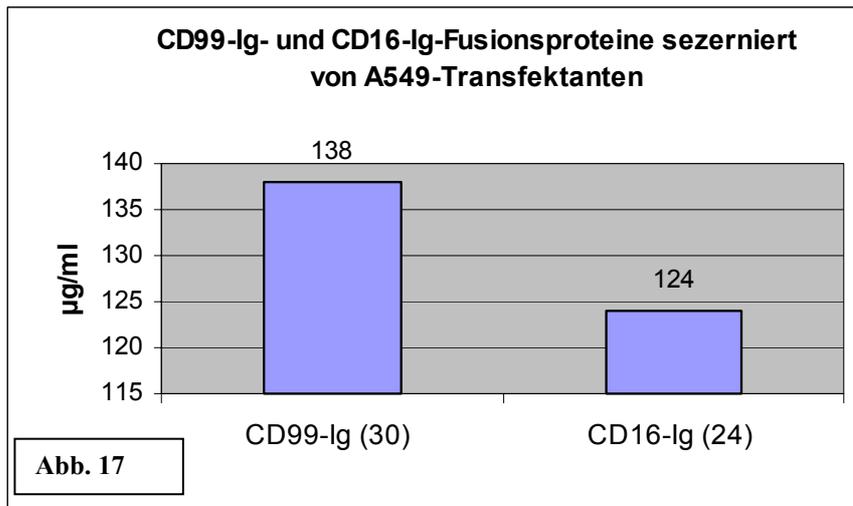
Ergebnisse

3.1.3 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) zum Nachweis der sezernierten Fusionsproteine

Für die quantitative Bestimmung der Fusionsproteine, die von Geneticin-selektierten 221-Massenkulturen und A549-Klonen sezerniert wurden, testeten wir Überstände nach drei Tagen Kultur auf ELISA-Platten, die mit $\text{G}\alpha\text{HulIgG}+\text{IgM}$ beschichtet waren. Die Fusionsprotein-Bindung an die Platten wurde durch einen Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-Human-IgG-Fc-Antikörper ($\text{G}\alpha\text{HulIgG}/\text{Fc-POX}$) detektiert und im ELISA-Reader quantifiziert (siehe Methodenteil). Die Abbildung 15 zeigt, dass die 221-Zellen nur NKp46-Ig in größeren Mengen sezernierten, während alle anderen 221-Transfektanten nur sehr geringe Mengen Fusionsprotein produzierten. Die A549-Klone produzierten durchweg zufriedenstellende Mengen an Fusionsproteinen (Abb. 16 und 17).



Ergebnisse



Von den gut produzierenden A549-Klonen wurden Überstände über mehrere Wochen gesammelt. Bei jeder Aufreinigung wurden ca. 5-6 l Überstand je NCR-Ig über Protein A-Sepharose-Säulen extrahiert und das gebundene Fusionsprotein eluiert und gegen PBS dialysiert. Die Ausbeuten lagen im Bereich von 1-1,5 mg. Die gereinigten Fusionsproteine wurden im ELISA quantifiziert, aufkonzentriert und auf eine Konzentration von 100-150 µg/ml in PBS eingestellt.

3.1.4 Screening von humanen oder Nagetier-Tumorzelllinien mit NCR-Fusionsproteinen

Mit den gereinigten NCR-Fusionsproteinen sowie CD99-Ig als Negativkontrolle für eventuelle unspezifische Bindungen über den IgG₁-Fc-Teil führten wir ein Screening von Zelllinien aus menschlichen Tumoren unterschiedlicher Histogenese durch (Abb. 18 und 19). Es wurden auch einzelne Linien aus Maus, Ratte und Hamster verwendet. Vorversuche zeigten, dass bei Acetonfixierung die Reaktivität der Fusionsproteine mit Liganden erhalten blieb, wohingegen eine Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd oder Methanol die Reaktivität vollständig auslöschte. Detailliertere zellbiologische Untersuchungen wie Doppelfärbungen mit kompartimentspezifischen Antikörpern und konfokale Mikroskopie hätten eine Formalinfixierung erfordert und konnten daher leider nicht durchgeführt werden.

Ergebnisse

Immunoperoxidase-Färbung von acetonfixierten Tumorzellen mit NKp46-D2-Ig, NKp44-Ig und CD99-Ig

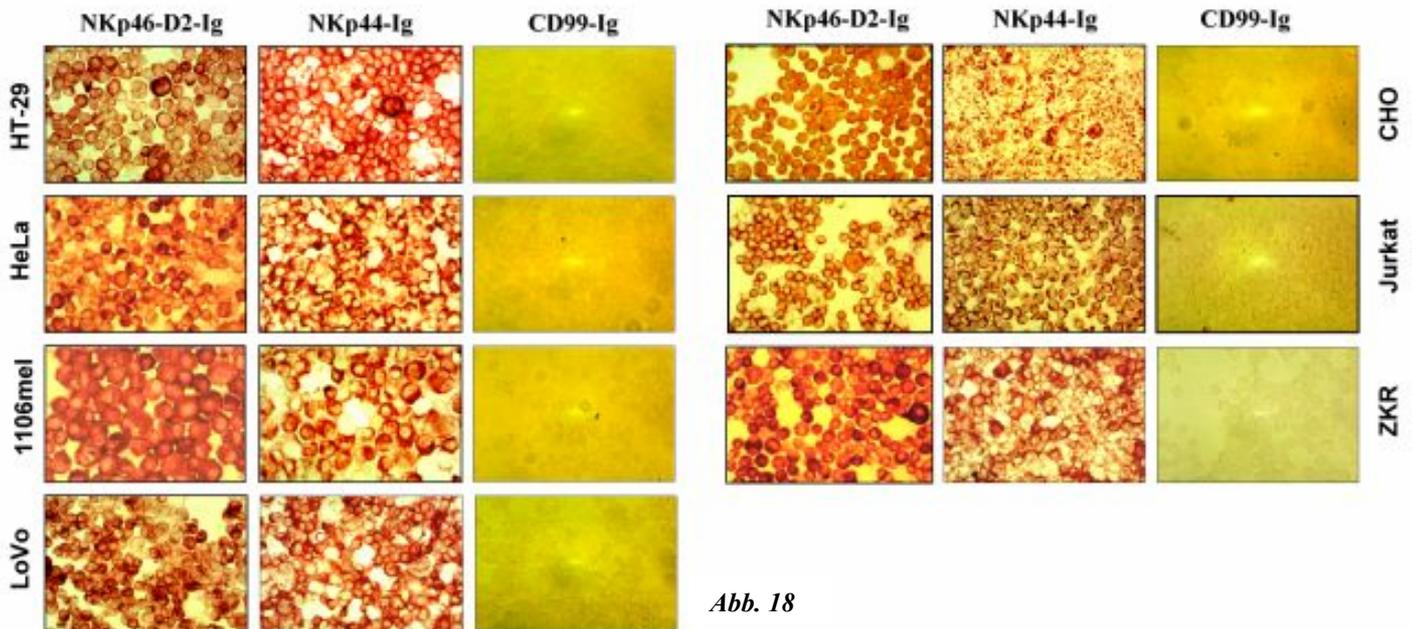


Abb. 18

HT-29 (humanes Colon-Karz.)
CHO (Hamster-Ovarialzellen)
HeLa (humanes Cervix-Karz.)

1106mel (humanes Melanom)
ZKR (humanes Melanom)

LoVo (humanes Colon-Karz.)
Jurkat (humanes T-Zell-Lymphom)

Immunoperoxidase Färbung von acetonfixierten Tumor-Zellen mit NKp30-Ig

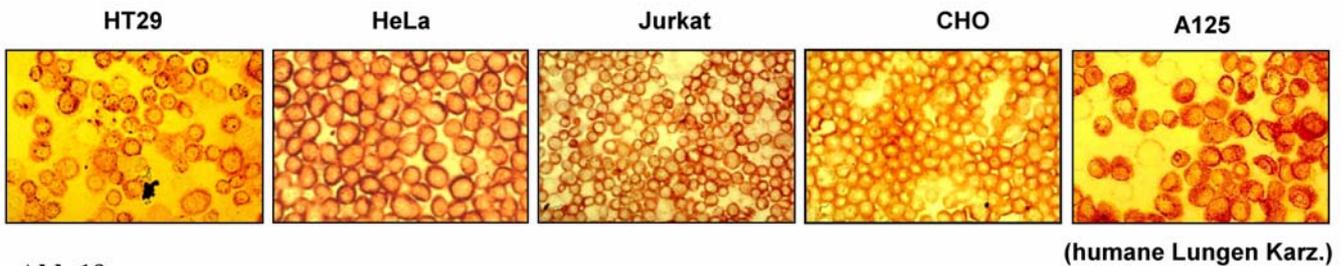


Abb.19

(humane Lungen Karz.)

Abb. 18 und 19. Screening von Tumorzelllinien mit NCR-Fusionsproteinen.
Acetonfixierte Cytospinpräparate wurden mit gereinigten Fusionsproteinen (NKp46-D2-Ig, NKp30-Ig, NKp44-Ig, CD99-Ig) inkubiert. Der Nachweis der Bindung erfolgte durch Peroxidase-konjugiertes Anti-Human-IgG-Fc-Antiserum (GaHulgG/Fc-POX) und Aminoäthylcarbazol/H₂O₂ als Peroxidasesubstrat. Die Zellfärbungen wurden lichtmikroskopisch ausgewertet. Diese Abbildung gibt Beispiele für NCR-markierte Tumorzelllinien.

Ergebnisse

Die immunhistochemischen Färbungen zeigten eine breit gestreute Ausprägung der vermutlichen Liganden von NKp46(D2), NKp44 und NKp30 in Mammalier-Tumorzelllinien. Die Liganden wiesen eine starke intrazelluläre Expression auf. Humane Karzinomzelllinien aus Kolon (HT29, Colo205, LoVo), Cervix (HeLa) und Ovar (SK-OV3) sowie Melanome (MelJuso, SK-MEL1, 1106mel, ZKR) und T-/B-Lymphome (Jurkat, LCL721.220) ließen sich markieren. Keine Färbungen zeigten sich mit den Kontrollfusionsproteinen CD99-Ig oder CD16-Ig.

Auch wenn die acetonfixierten Cytospinpräparate eine genaue Unterscheidung der angefärbten intrazellulären Kompartimente nicht erlaubten, fiel jedoch auf, dass die intrazelluläre Verteilung der von NCR-Fusionsproteinen markierten Strukturen unterschiedlich war. Der Vergleich mit den bekannten lichtmikroskopischen Verteilungsmustern intrazellulärer Kompartimente erlaubte die folgende vorläufige Differenzierung: NKp46-Ig färbte ER-ähnliche Strukturen, kleine Vesikel (Endosomen? Mitochondrien?) sowie in manchen Zellen die Plasmamembran. NKp44-Ig färbte vor allem Golgi-ähnliche Strukturen sowie in manchen Zelllinien auch das Endoplasmatische Retikulum und die Plasmamembran. Die kappenförmig über dem Kern gelegene Golgi-Färbung durch NKp44-Ig war in einigen Zelllinien deutlicher als in anderen ausgeprägt (siehe CHO, Abb. 19). NKp30-Ig fiel durch die markante Anfärbung von relativ großen, intrazellulären Vesikeln in einigen Zelltypen auf (siehe HT29, Abb. 18). Diese mit den NCR-Fusionsproteinen erhaltenen, unterschiedlichen Färbemuster sowie das Fehlen der Färbung durch CD99-Ig und CD16-Ig gaben einen Hinweis auf die Spezifität der Bindung durch den NCR-Teil der Fusionsproteine.

Um die Spezifität unserer Fusionsproteine weiter zu prüfen, färbten wir HeLa-Zellen zum Vergleich mit rekombinanten NKp30- und NKp44-Proteinen an, die durch eine C-terminale Isoleuzin-Reißverschluss-Sequenz trimerisiert wurden und durch einen monoklonalen Anti-„Isoleucine zipper“-Antikörper nachgewiesen werden konnten (von Dr. Carsten Watzl, Universität Heidelberg). Die ILZ-Fusionsproteine zeigten eine ähnliche Bindung an intrazelluläre Strukturen wie unsere Ig-Fusionsproteine. NKp44-ILZ markierte sehr deutlich Golgi-ähnliche Strukturen und NKp30-ILZ färbte große intrazelluläre Vesikel in einigen HeLa-Zellen (Abb. 20).

Auch Zellen der embryonalen Nierenzelllinie XLKE vom Frosch *Xenopus laevis* konnten positiv markiert werden (Abb. 21). Ebenso ließen sich *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen anfärben (Abb. 21).

Ergebnisse

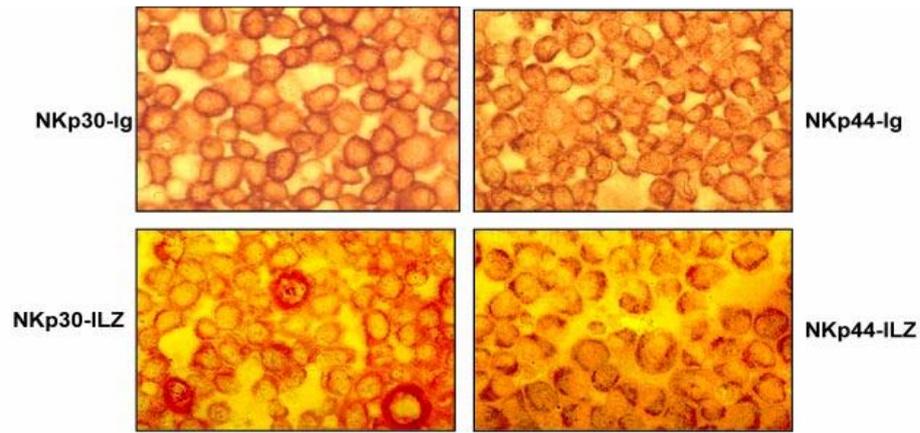


Abb. 20 Immunperoxidasefärbung von HeLa-Zellen mit durch Isoleuzin-Zipper trimerisierten, löslichen NKp30- und NKp44-Proteinen im Vergleich zu NKp30-Ig und NKp44-Ig.

Bei den Hefezellen fiel auf, dass sie nicht homogen angefärbt wurden, sondern dass kleine Subpopulationen die Fusionsproteine besonders kräftig banden. Möglicherweise waren die Ligandenstrukturen zellzyklus- oder reifungsabhängig unterschiedlich ausgeprägt, was jedoch nicht näher untersucht wurde. Der Nachweis der Bindung von NKp46-Ig, NKp44-Ig und NKp30-Ig an diese Zellen gab einen Hinweis auf eine strenge Konservierung der präsumptiven Liganden, wofür insbesondere Carbohydratdeterminanten in Frage kommen.

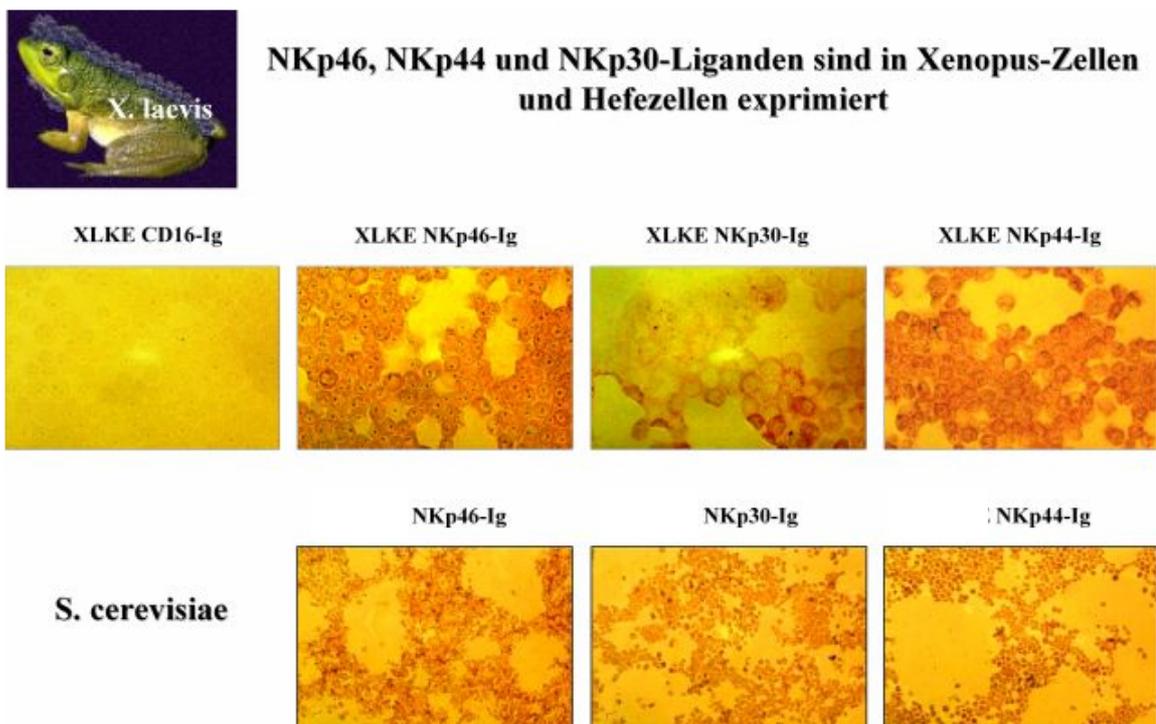


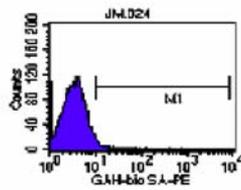
Abb. 21. Immunperoxidase-Färbung von Frosch- und Hefezellen mit NCR-Ig.

Ergebnisse

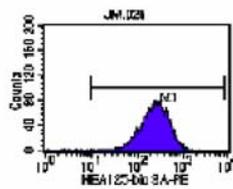
Um zu prüfen, ob ausgewählte Tumor-Zelllinien mit den NCR-Fusionsproteinen an der Zelloberfläche markiert werden können, analysierten wir HeLa- und 293-Zellen nach Inkubation mit Fusionsproteinen zytofluorimetrisch. In Übereinstimmung mit Arnon et al. (2001) konnten wir mit NKp46-Ig, NKp44-Ig und NKp30-Ig diese Zelllinien an der Oberfläche markieren. Die FACS-Färbung mit NKp30-Ig war reproduzierbar am stärksten, während NKp46-Ig und NKp44-Ig nur schwach banden.

Oberflächenfärbung von Tumor-Zellen mit NKp46-Ig, NKp44-Ig, und NKp30-Ig Fusionsproteinen

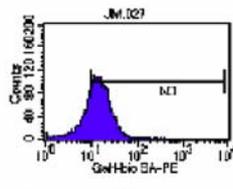
293 Humane Nieren- Karzinom



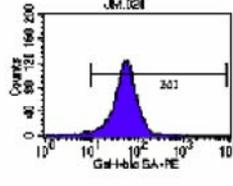
zweite Antikörper



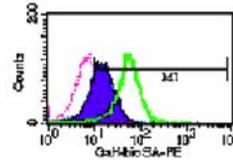
anti-EpCAM



NKp46-Ig

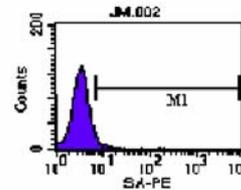


NKp30-Ig

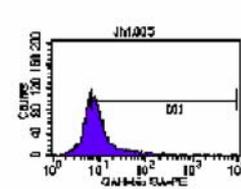


NKp44-Ig

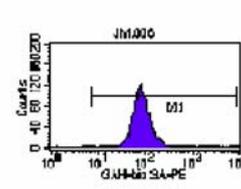
HeLa Humane Gebärmutterhals Karzinom



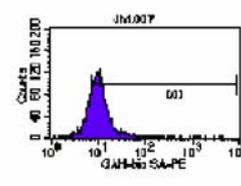
zweite Antikörper



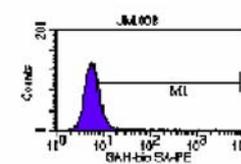
NKp46-Ig



NKp30-Ig



NKp44-Ig



NKp46-D1-Ig

Abb. 22. Oberflächenimmunfluoreszenz mit NCR-Fusionsproteinen. HeLa und HEK-293 Zellen wurden mit gereinigten Fusionsproteinen NKp44-Ig, NKp30-Ig, NKp46-Ig sowie NKp46-Ig-D1 inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit Biotin-gekoppeltem Ziege-Anti-Human IgG/Fc und Streptavidin-Phycoerythrin inkubiert und im Zytofluorometer analysiert. Als Positivkontrolle diente der epitheliale Marker EpCAM, der mit dem Antikörper HEA125-Biotin nachgewiesen wurde.

Ergebnisse

3.2 Suche nach Proteinliganden für NCR durch Präzipitation aus Zelllysaten

Um erste Hinweise auf mögliche Proteinliganden für die NCR zu erhalten, wurden Präzipitationen mit Fusionsproteinen aus Zelllysaten von HeLa- und 293-HEK-Zellen durchgeführt. Das Präzipitat wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt, elektrotransferiert, und die Western Blots wieder mit den Fusionsproteinen angefärbt. Die Verwendung der Fusionsproteine bei Anfärbung der Blots geschah in der Hoffnung, dass mögliche Liganden auch nach SDS-Denaturierung und Elektrotransfer noch binden würden. Die Fusionsproteine konnten auf dem Blot nur mit einem Anti-Human-IgG/Fc-POX Zweitantikörper nachgewiesen werden. Daher erschienen zwangsläufig auch die zur Präzipitation eingesetzten Ig-Fusionsproteine auf dem Blot und überdeckten ein breites Molekulargewichtsspektrum (Abb. 23a). Im Bereich unter 50 kDa erschienen jedoch nach NKp46-Ig-Präzipitation Banden (Abb. 23b), die sich wiederum mit NKp46-Ig, jedoch nicht mit dem Peroxidase-markierten Zweitantikörper oder NKp30-Ig/G α HuIgG-Fc-POX zeigten. Diese Banden konnten also keine Abbauprodukte von NKp46-Ig sein und stellten möglicherweise NKp46-Liganden dar.

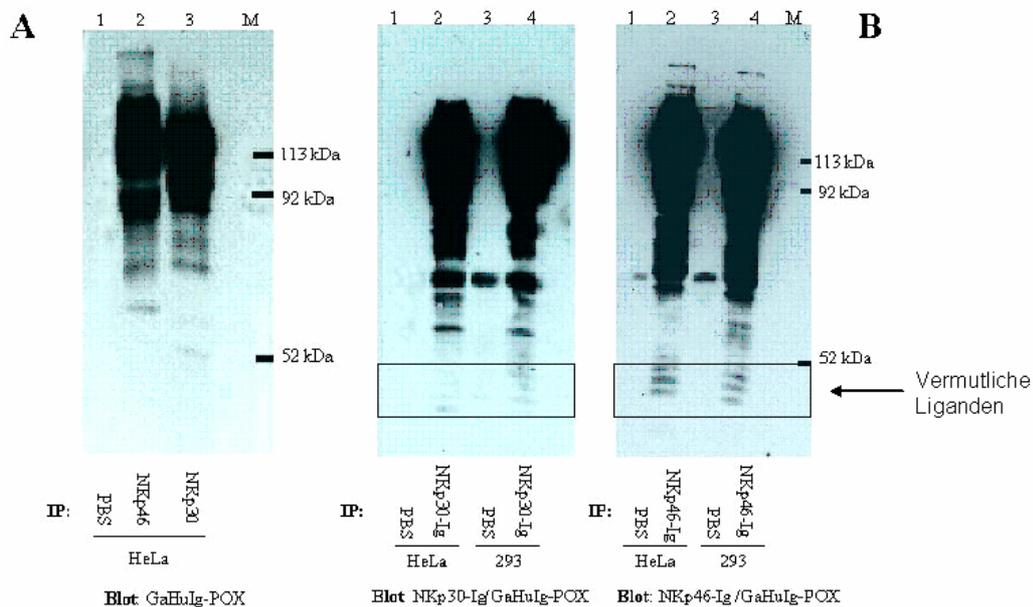


Abb. 23. Western Blot von NKp46- und NKp44-Präzipitaten aus HeLa und HEK-293-Lysaten. NP-40-Lysate von HeLa- und 293-Zellen wurden mit NKp44-Ig und NKp46-Ig (an Protein A-Sepharose gebunden) extrahiert und die gewaschenen Präzipitate im 10% SDS-PAGE-Gel separiert. Nach Elektrotransfer auf PVDF-Membranen erfolgten Inkubationen mit NKp44-Ig oder NKp46-Ig und Ziege-anti-Human-IgG-POX-Zweitantikörper (B) oder nur mit Zweitantikörper (A). NKp46-markierte Banden, die in (A) nicht auftauchen, sind durch den Kasten hervorgehoben.

Ergebnisse

Mit NKp30-Ig färbten sich keine zusätzlichen Banden im Vergleich zur Zweitantikörper-Kontrollfärbung. Um das störende Transferieren von Ig-Fusionsproteinen zu reduzieren, kuppelten wir NKp46-Ig und NKp30-Ig kovalent an eine Agarose-Matrix (Seize Primary Mammalian Immunoprecipitation Kit von Pierce). Wir konnten jedoch anschließend keine Kandidaten für spezifische Proteinliganden auf dem Western Blot nachweisen (nicht gezeigt). Vermutlich hatten die Fusionsproteine durch die Kopplung ihre Reaktivität eingebüßt.

Für die weitere Identifizierung von möglichen Proteinliganden für NCR wurden HeLa-, LoVo- und 1109mel-Zellen mit ^{35}S -Met/Cys metabolisch markiert. NP-40-Lysate wurden mit Protein A-Sepharose 2x vorgereinigt und anschließend wurden an Protein A Sepharose-gebundene Fusionsproteine (NKp46-D1-Ig-, NKp46-D2-Ig-, NKp44-Ig-, CD16-Ig, CD99-Ig) zugefügt. Die Präzipitate wurden mittels 10% SDS-PAGE und Autoradiographie untersucht. Aus Lysaten von allen drei Zelllinien konnten wir Banden präzipitieren, die nicht mit den Kontrollfusionsproteinen, jedoch mit NKp44 (bei ca. 38, 45 und 75 kDa) bzw. NKp46(D2)-Ig (bei ca. 40 kDa) erschienen.

Präzipitation von ^{35}S -markierten Proteinen durch NKp44-Ig und NKp46-Ig

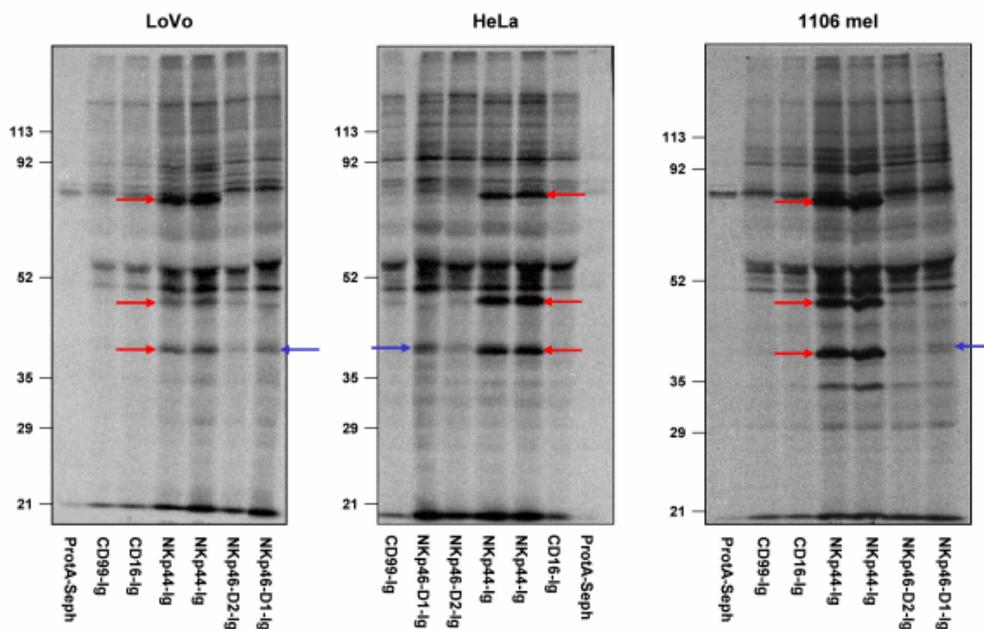


Abb. 24. Präzipitationen mit NCR-Fusionsproteinen aus metabolisch markierten Zellen. LoVo-, HeLa- und 1106mel-Zellen wurden mit ^{35}S -Met/Cys metabolisch markiert und in PBS/1% NP-40 lysiert. Die Lysate wurden mit Protein A-Sepharose 2x vorgereinigt und dann mit vorher an Protein A Sepharose gebundenen Fusionsproteinen NKp46-D1-Ig-, NKp46-D2-Ig-, CD16-Ig, CD99-Ig für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Die Präzipitate wurden mit 10% SDS-PAGE aufgetrennt und 5 Tage lang auf Röntgenfilmen exponiert. Die mit roten Pfeilen markierten Banden scheinen spezifisch für NKp44-Ig und die mit einem blauen Pfeil markierte Bande scheint spezifisch für NKp46(D2)-Ig zu sein.

Ergebnisse

Um diese Proteine zu identifizieren, wurden NCR-Ig-Präzipitate aus NP-40-Lysaten von 3×10^8 HeLa-Zellen hergestellt, durch SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt. Es gelang uns, die in der Autoradiographie identifizierten NCR-spezifischen Banden auch im silbergefärbten Gel zu identifizieren. Die Banden wurden ausgeschnitten und von der Proteinsequenziergruppe des DKFZ mittels der MALDI (matrix-assisted laser desorption ionisation)-Massenspektrometrie analysiert. Bei dieser Methode werden nach Trypsin-Spaltung die entstandenen Peptidfragmente aus der Gelmatrix eluiert und die Molekülmassen von Ionen im Hochvakuum anhand ihrer Flugzeiten spektrometrisch analysiert. Die experimentell ermittelten Peptidmassen werden nun mit einer Liste von Peptidmassen verglichen, die der Computer durch theoretische Spaltung aller Proteine, die in einer gegebenen Datenbank enthalten sind, berechnet hat. Sind die Mindestkriterien für eine eindeutige Zuordnung erfüllt, so gilt das untersuchte Protein als identifiziert (Chaurand et al., 1999).

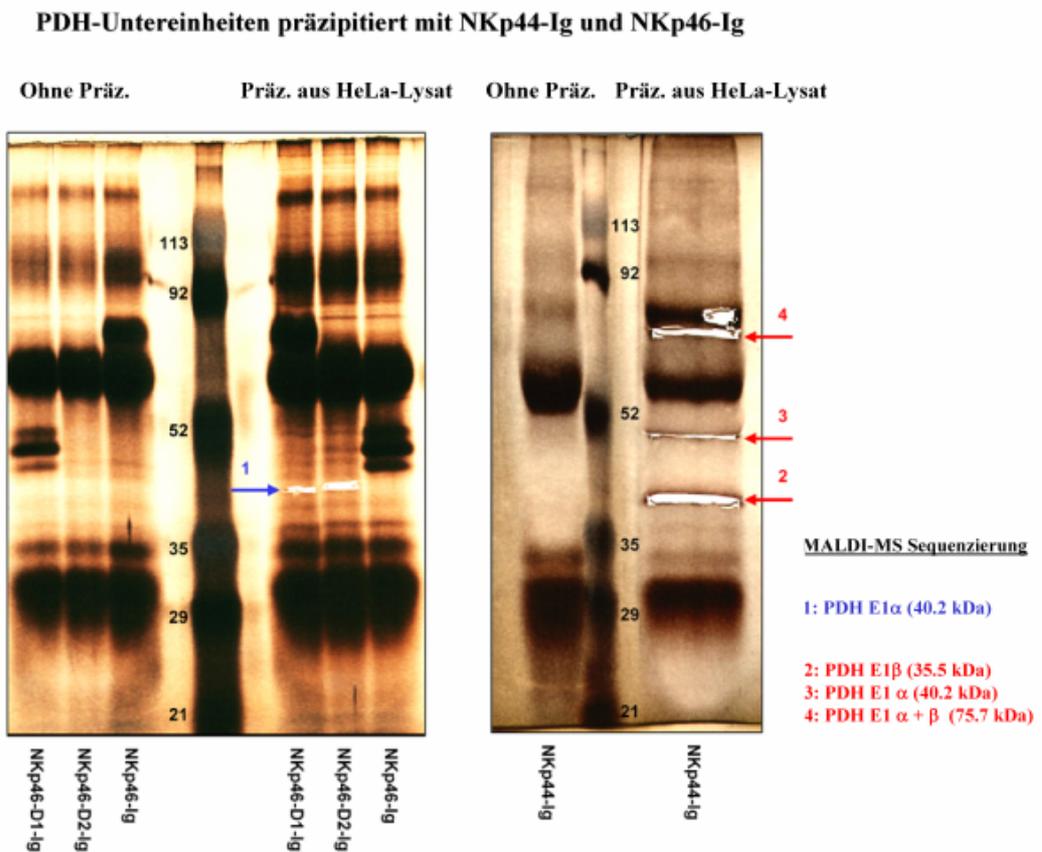


Abb. 25. Präzipitation mit NCR-Ig aus Zelllysat. Präzipitation von Proteinen aus NP40-Zelllysat von HeLa-Zellen mit an Protein A-Sepharose gebundenen NKp44-Ig, NKp46-Ig, NKp46-D1-Ig und NKp46-D2-Ig Fusionsproteinen. Die Präzipitate wurden durch 10% SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt. Ausgewählte Banden, die spezifisch für die NCR-Präzipitate erschienen, wurden ausgeschnitten und durch MALDI-Massenspektrometrie identifiziert.

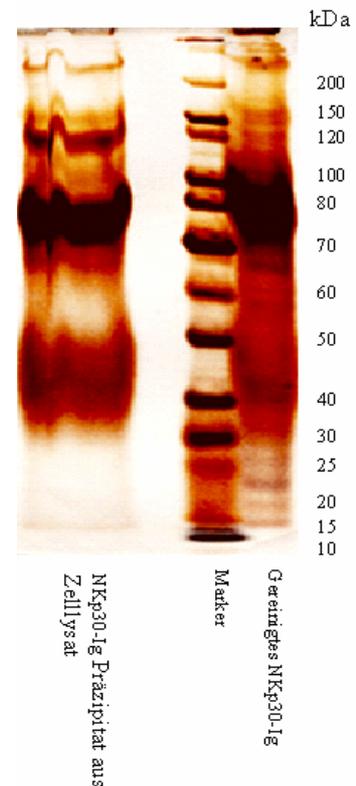
Ergebnisse

Die Identifizierung der Banden durch MALDI-Massenspektrometrie zeigte, dass die durch NKp44-Ig und NKp46-Ig präzipitierten Banden die α - bzw. β -Untereinheiten des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes darstellten. Da der Pyruvatdehydrogenase-Komplex und seine Untereinheiten nicht zu den Zelloberflächenproteinen gehören, sondern in der mitochondrialen Matrix lokalisiert sind, kommen sie als potentielle zellmembranständige Liganden für die aktivierenden NKp44- und NKp46-Rezeptoren jedoch schwerlich in Frage.

Die Untersuchung der E1 α -Pyruvatdehydrogenase defizienten, menschlichen Fibroblasten-Zelllinie (Brown et al., 1997; Lib et al., 2002) (La-68a E1 α^- T22/2) durch Immunoperoxidase-Färbung mit NKp46-Ig, NKp46-D2-Ig, NKp30-Ig, NKp44-Ig zeigte keinen signifikanten Unterschied in Vergleich zur E α 1-retransfizierten Kontrolle (La-68a E1 α^+ T22/4) und bestätigte damit den Verdacht, dass die PDH-Untereinheit E1 α kein spezifischer Ligand für die NKp44 und NKp46 ist (nicht gezeigt).

Nach Präzipitation mit NKp30-Ig konnten im silbergefärbten Gel keine Proteinbanden identifiziert werden, die als Kandidaten für NKp30-Liganden der massenspektrometrischen Analyse unterzogen wurden (Abb. 26).

Abb. 26. Präzipitation mit NKp30-Ig aus Zelllysate.
Präzipitation von Proteinen aus NP40-Zelllysate von HeLa-Zellen mit an Protein A-Sepharose gebundenem NKp30-Ig im Vergleich zu gereinigtem Fusionsprotein. Das Präzipitat wurde durch 10% SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt. Es zeigten sich keine Banden mit Spezifität für das Präzipitat.



Als weitere methodische Ansätze wurden die Nativ-SDS-Gelelektrophorese (Blue-Native SDS-PAGE) nach NCR-Ig-Präzipitation aus Digitonin-Lysaten sowie die biochemische Quervernetzung von NCR auf der Zelloberfläche radioaktiv markierter Zellen geprüft. Diese Ansätze blieben jedoch ebenfalls erfolglos im Hinblick auf die Identifizierung möglicher NCR-Liganden.

3.3 Untersuchungen zur biochemischen Natur der NCR-Liganden

Die bislang dargestellten Versuche, Liganden durch Präzipitation mit NCR-Fusionsproteinen aus Zelllysaten zu isolieren, führten nicht zu dem gewünschten Erfolg. Es bestand die Möglichkeit, dass die löslichen NCR-Ig-Fusionsproteine an ihre Liganden in Detergenz-Lysaten nicht mit ausreichender Avidität banden. Es war weiterhin möglich, dass multimeren Molekülkomplexe, die theoretisch als Liganden dienen können, durch die Detergenzbehandlung zerstört worden waren.

Andererseits schienen die NCR-Fusionsproteine ihre Bindungspartner in Cytoplastenpräparaten gut erkennen zu können. Die biochemische Natur der erkannten Strukturen war unklar. Im Prinzip konnte es sich um Proteine, Glykoproteine oder Glykolipide handeln. Die Anfärbung von Tumorzellen aus evolutionär weit vom Menschen entfernten Spezies ließ uns zu der Vermutung kommen, dass evolutionär konservierte Carbohydratstrukturen direkt als NCR-Liganden dienen oder zumindest zur NCR-Ligand-Interaktion beitragen. Wir beschlossen daher, eine Reihe von orientierenden Experimenten mit Proteinasen, Inhibitoren der Proteinbiosynthese, Glykosidasen, Inhibitoren der Proteinglykosylierung sowie Inhibitoren der Glykolipidbiosynthese durchzuführen, um Aufschluss über die biochemische Natur der NCR-Liganden zu erhalten. Desweiteren wurden Zellen mit enzymatischen Defekten in bestimmten Biosynthesewegen eingesetzt.

3.3.1 Analyse von (Glyko)Proteinen als potentielle Ligandenstrukturen

3.3.1.1 Behandlung von lebenden Zellen mit Cycloheximid

Cycloheximid hemmt die Peptidyltransferase der eukaryotischen 60S Ribosomenuntereinheit und blockiert so die gesamte Proteinsynthese (Stryer 1996; Vazhappilly und Sucher, 2002). Wir behandelten HeLa-Zellen 48 Stunden lang bei 37°C mit 0,3 µg/ml, 3 µg/ml oder 10 µg/ml Cycloheximid und verglichen die Ligandenexpression in Immunperoxidasefärbungen von Cytoplasten. 3-5 µg/ml Cycloheximid werden gewöhnlich zur Inhibition der Proteinbiosynthese von Zellen eingesetzt. Im Vergleich zu kontrollbehandelten HeLa zeigten mit 3 µg/ml behandelte

Ergebnisse

Zellen eine leichte Abschwächung der Färbung mit NKp46-D2-Ig und NKp44-Ig (Abb. 27). Bei dieser Konzentration gab es allerdings auch schon zahlreiche tote Zellen in der Kultur. Dieses Ergebnis ist kein eindeutiger Hinweis auf Proteinliganden. Wenn es sich dennoch um Proteinliganden handeln sollte, wären langlebige Proteine anzunehmen, deren Expression durch die zweitägige Cycloheximidbehandlung nur geringfügig beeinflusst wurde.

Im Einklang mit langlebigen Proteinliganden wäre auch unser Befund, dass sich Erythrozyten aus humanem oder murinem Blut mit den NCR-Fusionsproteinen markieren ließen (siehe Abb. 45). Erythrozyten fehlt das ER zur aktiven Proteinbiosynthese.

Immunoperoxidase-Färbung von Cycloheximid-behandelten HeLa-Zellen mit NKp46-D2-Ig und NKp44-Ig

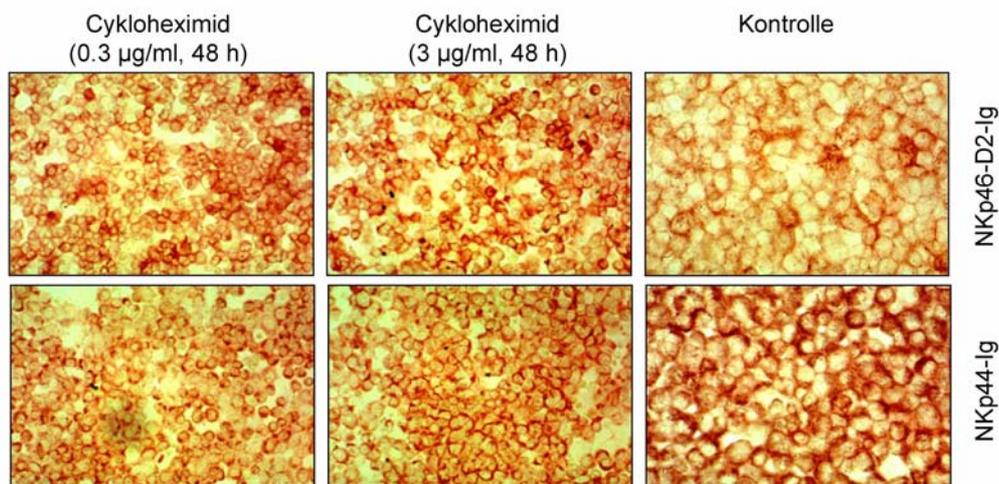


Abb. 27. Cycloheximid-Behandlung von HeLa-Zellen. Eine zweitägige Behandlung mit Cycloheximid verursachte keine signifikante Abschwächung der Bindung von NKp46-D2-Ig und NKp44-Ig.

3.3.1.2 Behandlung von fixierten Zellen mit Proteinase K

Proteinase K ist eine endoproteolytische Serin-Protease aus dem Pilz *Tritirachium album*, die Peptidbindungen an der Carboxylseite von aliphatischen, aromatischen oder hydrophoben Aminosäuren spaltet (Crowe et al., 1991) und wegen dieser geringen Schnittspezifität alle Proteine degradiert. Wir setzten 0,17 µg/ml, 0,5 µg/ml und 1,5 µg/ml in PBS für 30 min bei 37°C ein, um acetontfixierte Zellen auf dem Cytospin zu

Ergebnisse

verdauen. Die Zellmorphologie war bei 0,5 und 1,5 µg/ml stark beeinträchtigt und die Zellen hafteten kaum noch am Objektträger, was auf starken Proteinverdau hinwies. Selbst bei den höchsten Proteinease K-Konzentrationen (0,5 µg/ml oder 1,5 µg/ml) blieb jedoch die Reaktivität der Zellen mit NKp44-Ig und NKp46-D2-Ig unverändert erhalten (Abb. 28). Auch die Reaktivität von NKp30-Ig war nicht vermindert (nicht gezeigt). Hieraus lässt sich folgern, dass entweder die erkannten Peptidepitope in Proteinliganden nicht durch Proteinase K angegriffen, oder dass nicht-proteinöse Strukturen erkannt wurden.

Immunoperoxidase-Färbung von fixierten, Proteinase K-behandelten HeLa-Zellen mit NKp46-D2-Ig und NKp44-Ig

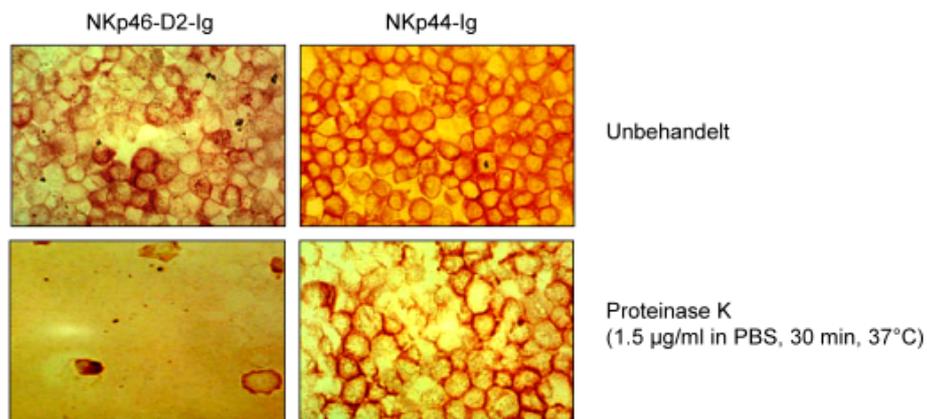


Abb. 28. Proteinase K Verdau von fixierten HeLa-Zellen. Die Behandlung von acetontfixierten HeLa-Zellen mit Proteinase K führte nicht zum Verlust der Reaktivität von NKp46-D2-Ig und NKp44-Ig.

3.3.1.3 Behandlung von fixierten Zellen mit Chymotrypsin oder Papain

Chymotrypsin ist eine Serin-Endoprotease, die die Hydrolyse von Peptidbindungen auf der Carboxylseite von Tyr, Trp, Phe und Met bewirkt (Kossiakoff und Spencer, 1980). Papain ist eine Cystein-Endoprotease mit Präferenz für basische Aminosäuren, Glycin und Leucin. Wir behandelten acetontfixierte HeLa-, Jurkat- und CHO-Zellen mit jeweils 15 mU von diesen Enzymen für 60 min bei Raumtemperatur. Die Immunoperoxidase-Färbungen der Cytospins zeigten keine signifikante Reduktion der Bindung von NKp46-Ig, NKp30-Ig und NKp44-Ig (Abb. 29). Anscheinend waren die Liganden nicht sensitiv gegenüber diesen Proteasen.

Ergebnisse

Chymotrypsin- bzw. Papain-Behandlung von HeLa-, CHO- und Jurkat-Zellen

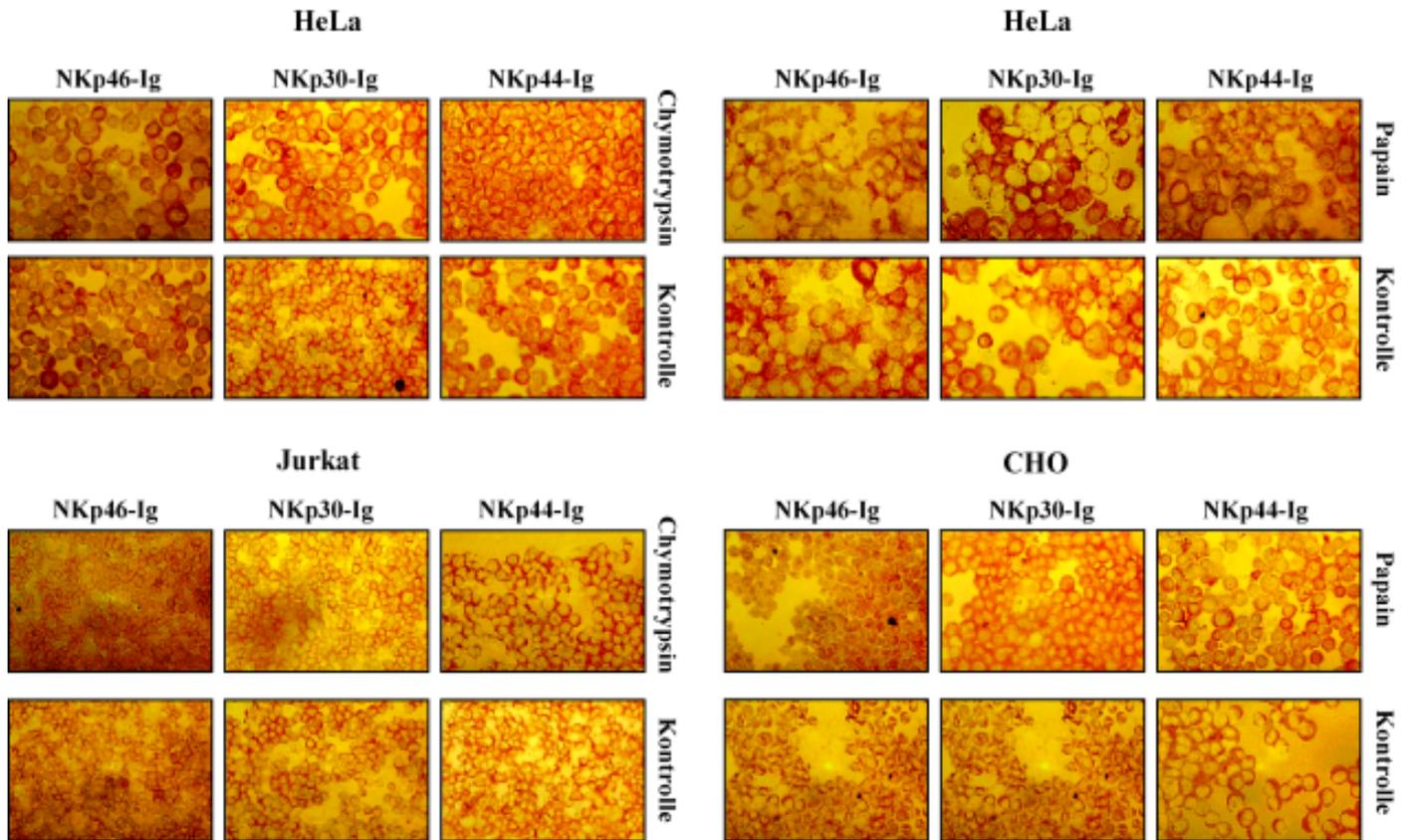


Abb. 29. Verdau von fixierten Zellen mit Chymotrypsin und Papain. Acetonfixierte CHO-, Jurkat-, und HeLa-Zellen wurden für 60 min mit Papain bzw. Chymotrypsin (jeweils 15 mU in PBS, pH 7,5) behandelt. Die anschließende Immunoperoxidase-Färbung mit NKp46-Ig, NKp30-Ig und NKp44-Ig zeigte keine signifikante Verringerung der Rezeptor-Ligand-Bindung.

3.3.2 Sind Carbohydratdeterminanten von Glykoproteinen Bestandteil der Ligandenstrukturen?

Es gibt diverse metabolische Inhibitoren der Proteinglykosylierung sowie zahlreiche Glykosidasen. Diese Werkzeuge erlaubten uns, der Frage nachzugehen, ob Carbohydratdeterminanten von Proteinen als Ligandenstrukturen für NCR in Frage kommen.

Ergebnisse

3.3.2.1 Behandlung von lebenden Zellen mit dem *N*-Glykosylierungsinhibitor Tunicamycin

Tunicamycin inhibiert die Bildung von Dolichylpyrophosphoryl-*N*-Acetylglucosamin in der Synthese von lipidverknüpften Oligosaccharid-Vorläufern und damit die gesamte *N*-Glykosylierung von Glykoproteinen. Wir inkubierten HeLa-Zellen 48 Std. lang bei 37°C in Gegenwart von 4 bzw. 10 µg/ml Tunicamycin. Anschließend wurden die Zellen in der Cytospin-Immunperoxidase-Färbung analysiert. Mit NKp46-D2-Ig und NKp44-Ig zeigte sich keine signifikante Abschwächung der Färbung (Abb. 30). Anscheinend sind *N*-Glykane keine Ligandenstrukturen für diese NCR.

Behandlung von HeLa-Zellen mit Tunicamycin

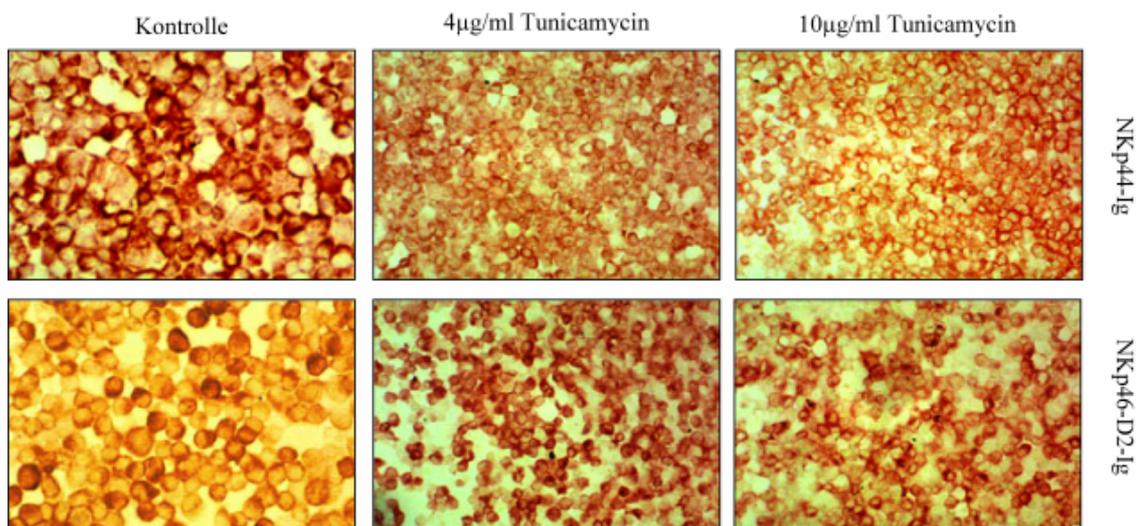


Abb. 30. NCR-Ig-Färbung von Tunicamycin-behandelten HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden in Gegenwart der angegebenen Tunicamycin-Konzentrationen für 48h bei 37°C kultiviert. Danach wurden die Zellen im Cytospin mit NKp46-D2-Ig oder NKp44-Ig gefärbt. Tunicamycin führte nicht zu einer Verminderung der Reaktivität.

3.3.2 Behandlung von lebenden Zellen mit Desoxymannojirimycin und Castanospermin

1-Desoxymannojirimycin (DMM) blockiert die α -Mannosidase I im Golgi-Apparat und damit die Prozessierung von mannosereichen *N*-Glykanen zu *N*-Glykanen vom komplexen Typ. Castanospermin inhibiert die Glucosidase I im ER und damit die weitere *N*-Glykan-Prozessierung im sekretorischen Weg.

Ergebnisse

Jurkat-Zellen zeigten nach 48-stündiger Behandlung mit 1 mM DMM keine Veränderung der Reaktivität mit NKp46-Ig, NKp30-Ig und NKp44-Ig (Tab. 9). Ebenso war die Anfärbbarkeit von HeLa-Zellen mit NKp46-D2-Ig und NKp44-Ig nach zweitägiger Inkubation in Gegenwart von 260 oder 800 μ M Castanospermin nicht reduziert (Abb. 31). Die verwendeten Inhibitorkonzentrationen lagen innerhalb oder oberhalb des Bereichs der empfohlenen Arbeitskonzentrationen. Diese Ergebnisse zeigten, dass die reifen Glykane von *N*-glykosylierten Proteinen wahrscheinlich keine Liganden darstellen oder aber, dass diese *N*-Glykane sehr langlebig waren.

<i>Jurkat</i>	<i>NKp46-Ig</i>	<i>NKp30-Ig</i>	<i>NKp44-Ig</i>
Unbehandelt	++	++	++
1-Desoxymannojirimycin (DMM) 1mM	++	++	++

Tab. 9. Behandlung von HeLa-Zellen mit DMM. Die Immunperoxidasefärbung von acetontfixierten Jurkat-Zellen nach 48-stündiger Behandlung mit dem α -Mannosidase-I-Inhibitor 1-Desoxymannojirimycin zeigte keine Abschwächung der Bindung von NKp46-Ig, NKp30-Ig und NKp44-Ig.

Behandlung von HeLa-Zellen mit Castanospermin

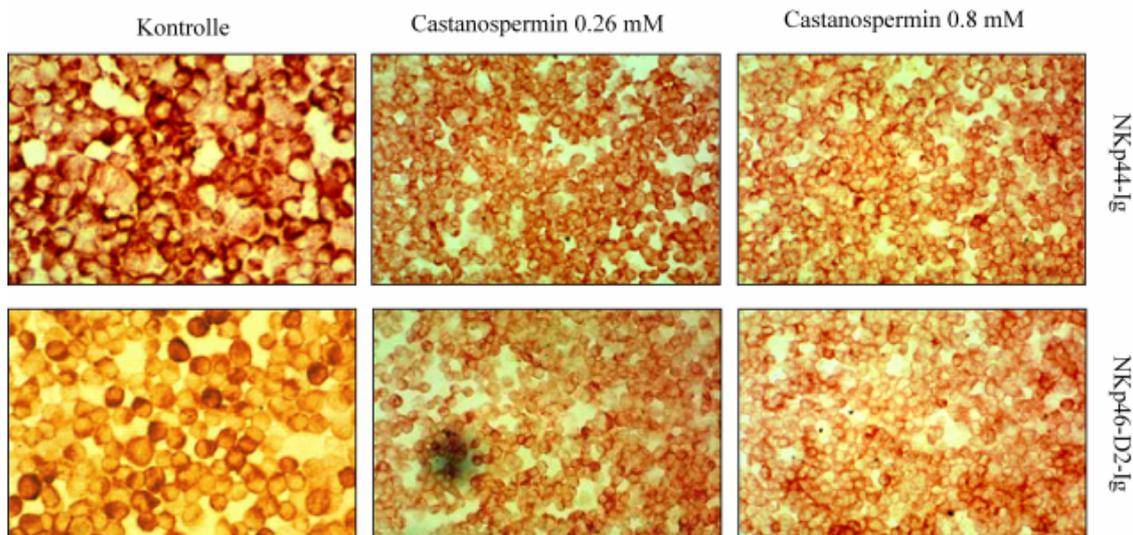


Abb. 31. NCR-Ig-Färbung von Castanospermin-behandelten HeLa-Zellen. Die Immunperoxidasefärbungen von acetontfixierten HeLa-Zellen, die 48 Stunden in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen des Glukosidase-I/II-Inhibitors Castanospermin kultiviert wurden, zeigten keine Abschwächung der Bindung von NKp44-Ig und NKp46-D2-Ig.

Ergebnisse

3.3.2.3 Behandlung von lebenden Zellen mit dem *O*-Glykosylierungsinhibitor Benzyl-*N*-acetyl- α -D-galactosaminid

HeLa-Zellen wurden mit der Verbindung Benzyl-*N*-acetyl- α -D-galactosaminid behandelt, die ein kompetitiver Inhibitor der *N*-Acetyl- α -D-Galactosyltransferase ist und damit die *O*-Glykosylierung von Proteinen blockiert (Kuan et al., 1989). 1 bis 4 mM Benzyl-*N*-acetyl- α -D-galactosaminid (oder DMSO zur Kontrolle) wurden über 48 Std. bei 37°C eingesetzt. Die behandelten Zellen wurden in der Cytospin-Immunperoxidase-Färbung mit NCR-Ig-Fusionsproteinen analysiert. Es zeigten sich unverändert starke Färbungen mit NKp46-D2-Ig, NKp44-Ig und NKp30-Ig (Abb. 32). Mit der verwandten Substanz Phenyl-*N*-acetyl- α -D-galactosaminid (Sadeghi und Birnbaum, 1999) erzielten wir das gleiche Ergebnis (nicht gezeigt).

Behandlung von HeLa-Zellen mit Benzyl-*N*-acetyl- α -D-galactosaminid

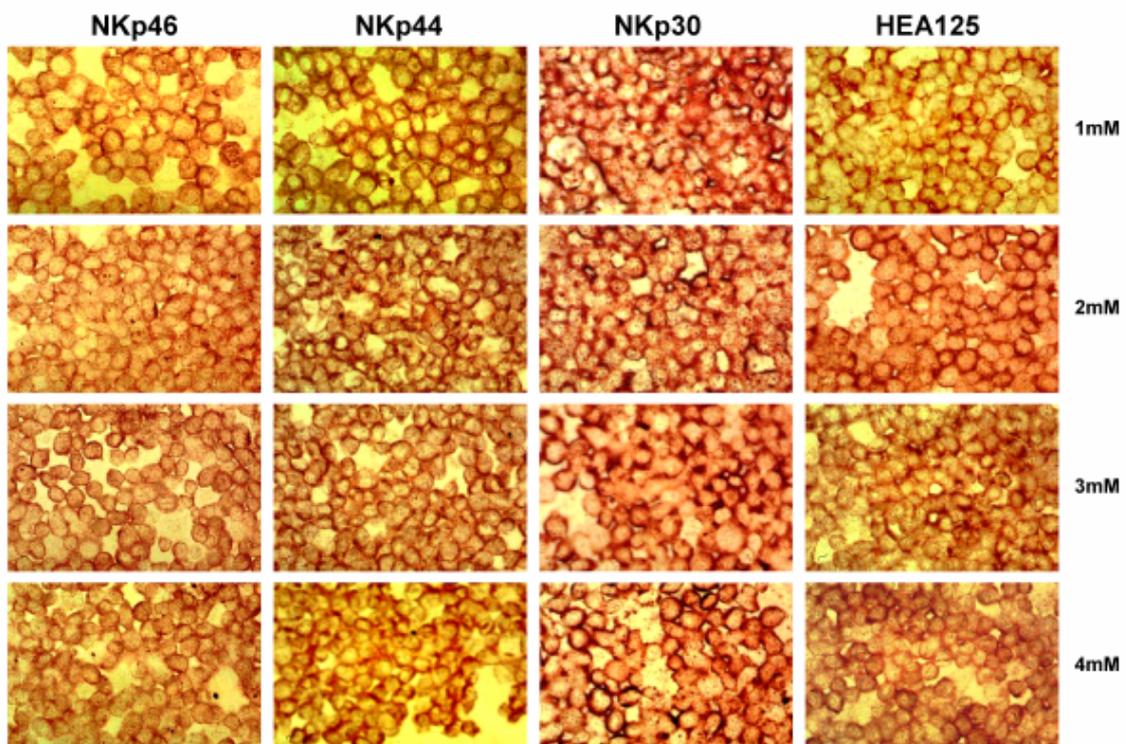


Abb. 32. Behandlung von HeLa-Zellen mit einem *O*-Glykosylierungsinhibitor. HeLa-Zellen wurden in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen von Benzyl-*N*-acetyl- α -D-galactosaminid für 48h kultiviert. Immunperoxidase-Färbungen von Cytospins mit NKp46-Ig, NKp44-Ig und NKp30-Ig zeigten keine dosisabhängige Verminderung der Bindung.

Ergebnisse

3.3.2.4 Behandlung von fixierten Zellen mit Endoglykosidase F2 und Neuraminidasen

Ergänzend zu den metabolischen Inhibitoren verwendeten wir verschiedene Glykosidasen. Endoglykosidase F2 entfernt Asparagin-verknüpfte Oligosaccharide von Glykoproteinen. Wir verwendeten 5 mU in 50 mM NaAc-Reaktionspuffer (pH 4,5) pro Objektträger mit ca. $0,5 \times 10^6$ fixierten Zellen 60 min lang bei 37°C. Bei dieser Konzentration sollte das Enzym im Überschuss vorgelegen haben. Nach Inkubation mit Endoglykosidase F2 beobachteten wir eine deutliche Abschwächung der Reaktivität mit NKp46-Ig, NKp44-Ig und NKp30-Ig (nicht gezeigt). Dies konnte jedoch nicht als Hinweis auf *N*-Glykan-Liganden der NCR-gewertet werden, da bereits die Vorinkubation mit dem Reaktionspuffer allein die Immunperoxidase-Färbung genauso abschwächte (Abb. 34).

Die Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* (VC) (α 2-3,6,8-Neuraminidase) spaltet terminale Neuraminsäurereste von Glykoproteinen ab. Wir verwendeten 1 mU in 50 mM NaAc-Enzympuffer (pH 6,0) mit 1 mM CaCl₂ pro Objektträger (mit ca. $0,5 \times 10^6$ fixierten Zellen) 60 min lang bei 37°C. Wir beobachteten eine Abschwächung der NCR-Ig-Färbungen, die jedoch ebenfalls eher mit dem niedrigen pH des Reaktionspuffers als mit der Enzymwirkung zu tun hatte. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit Neuraminidase aus *Arthrobacter ureafaciens* und rekombinanter α 2,3-Neuraminidase aus *E. coli* gewonnen (nicht gezeigt). Es blieb unklar, warum die Vorinkubation bei pH 5 oder pH 4,5 zu einem Auslöschung der NCR-Reaktivitäten geführt hatte. Möglicherweise wurden die Liganden irreversibel denaturiert. Die gleichzeitige Inkubation bei niedrigem pH und NCR-Ig zeigte diese abgeschwächte Reaktion jedoch nicht, was für eine langsame Denaturierung spricht (Abb. 34). Die einstündige Vorinkubation mit 1 mM CaCl₂ bei neutralem pH verminderte die Reaktivität von NKp46-Ig, NK30-Ig und NKp44-Ig geringgradig (Abb. 34).

Alternativ wurde 1 mU VC-Neuraminidase plus 1 mU α 1-2,3-Mannosidase im Reaktionspuffer bei pH 6,0 verwendet (Abb. 33). Wir beobachteten eine leichte Abschwächung der Bindung der drei NCR-Fusionsproteine an actonfixierten CHO- und Jurkat-Zellen, die jedoch ebenfalls nicht signifikant über die Pufferkontrolle hinausging. Auch durch die enzymatische Behandlung von fixierten Zellen mit Endoglykosidase F und Neuraminidasen erhielten wir also keine Hinweise auf Glycoproteinliganden.

Ergebnisse

Behandlung von fixierten Zellen mit Neuraminidase und Mannosidase

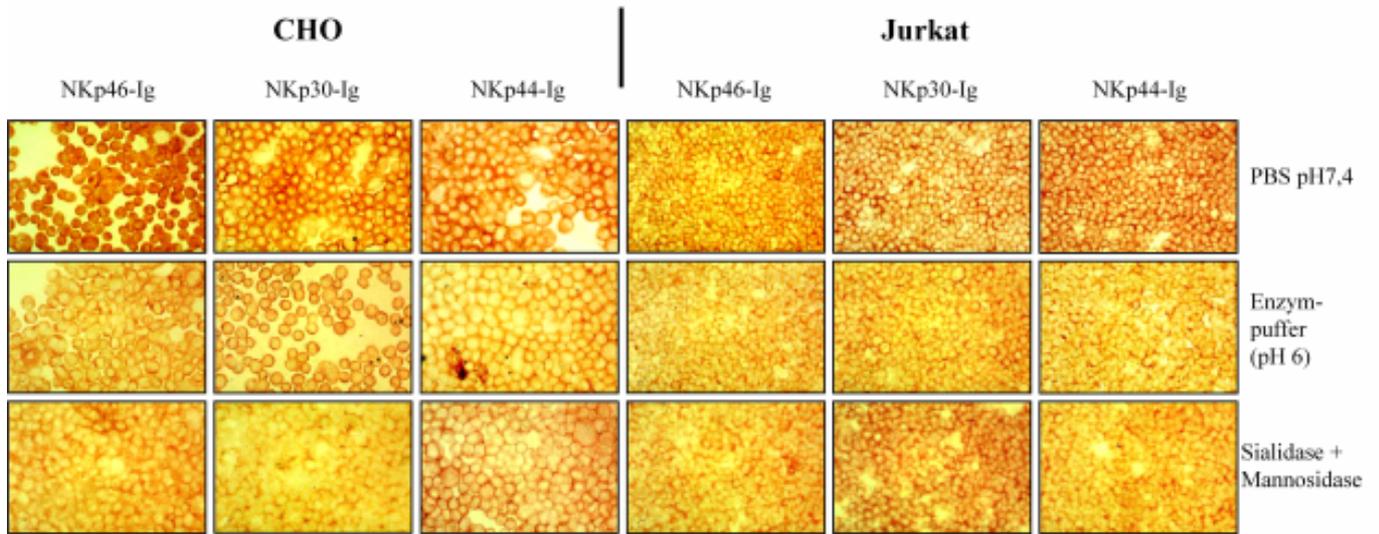


Abb. 33. Verdau von fixierten CHO- und Jurkat-Zellen mit Neuraminidase und Mannosidase. Acetonfixierte CHO- und Jurkat-Zellen wurden für 60 min bei 37°C mit 1 mU VC-Neuraminidase plus 1 mU α 1-2,3-Mannosidase pro Objektträger inkubiert, gewaschen und mit NKp46-Ig, NKp44-Ig und NKp30-Ig angefärbt. Zur Kontrolle wurde entweder PBS (pH 7,4) oder der Enzym-puffer (50 mM Na-Acetat, pH 6,0) verwendet.

Immunoperoxidase-Färbung von HeLa-Zellen behandelt mit PBS bei verschiedenen pH-Werten bzw. 2.5 mM Ca^{2+} in TBS

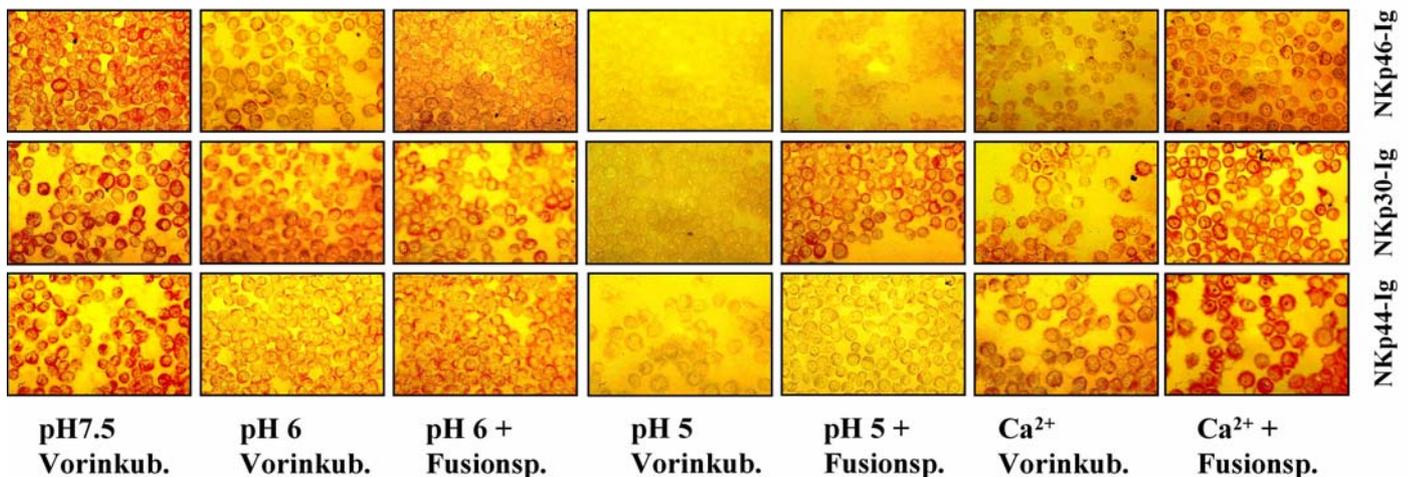


Abb. 34. Einfluss von niedrigem pH bzw. Ca^{2+} auf die NCR-Ig-Bindung. Acetonfixierte HeLa-Zellen wurden entweder für 60 min mit PBS pH7,5, pH6,0 oder pH5,0 vorinkubiert und anschließend mit NCR-Fusionsproteinen gefärbt. Alternativ wurden die Zellen mit Fusionsproteinen gefärbt, die in PBS mit den o.g. pH-Werten eingestellt waren. Daneben wurde 2,5 mM $CaCl_2$ in TBS zur Vorinkubation oder Verdünnung der Fusionsproteine verwendet.

Ergebnisse

3.3.2.5 Analyse der Sulfatierung von Glykoproteinen

L-Selectin (CD62L) erkennt sulfatierte, *O*-glykosylierte Proteine (GlyCAM-1, CD34, MAdCAM-1), und es ist bekannt, dass dendritische Zellen eine *O*-sulfatierte Form des P-Selectin-Liganden PSGL-1 exprimieren (Schäkel et al., 2002). Wir fragten uns, ob die Sulfatierung von *O*-Glykanen eine Rolle bei der NCR-Erkennung von Zielzellen spielt. Cytospins einer 6-*O*-Sulfo-LacNAc-defizienten Jurkat-Variante und von 6-*O*-Sulfo-LacNAc-exprimierenden Jurkat-Zellen wurden mit NKp46-Ig, NKp30-Ig und NKp44-Ig angefärbt. Diese Zellen wurden uns freundlicherweise von Dr. K. Schäkel, Universität Dresden, zur Verfügung gestellt (Schäkel et al., 2002). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Stärke der Zellmarkierung (Abb. 35).

Einfluss von sulfatierten Glykanen auf die NCR-Ig-Bindung

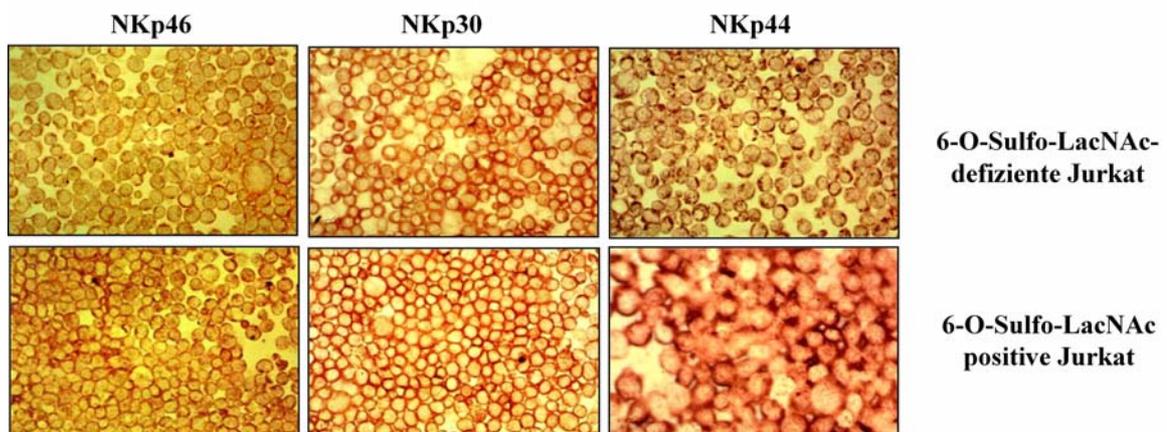


Abb. 35. Cytospin-Immunoperoxidasefärbungen von 6-*O*-Sulfo-LacNAc-defizienten und 6-*O*-Sulfo-LacNAc-positiven Jurkat-Zellen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Bindung von NKp46-Ig, NKp30-Ig und NKp44-Ig.

Wir setzten die 6-*O*-Sulfo-LacNAc-defizienten und -exprimierenden Jurkat-Zellen auch in NK-Zell-Assays ein. Eine polyklonale, frisch generierte NK-Zell-Population lysierte die 6-*O*-Sulfo-LacNAc⁺ Jurkat-Zellen effizienter als die 6-*O*-Sulfo-LacNAc⁻ Jurkat-Zellen (Abb. 36). Dies war jedoch nicht der Fall für die NK-Tumorzelllinie NK92-C1 (Kalina et al., 2000). NK92-C1 exprimiert NKp44, NKp30 und NKp46 (Dr. C. Watzl, Universität Heidelberg, pers. Mitteilung). Bei der Verwendung von polyklonalen NK-Zellpopulationen von anderen Spendern war die Lyse von Sulfotransferase-positiven Jurkat-Zellen allerdings geringer als diejenige von Sulfotransferase-negativen bzw.

Ergebnisse

ungefähr gleich. Anscheinend können 6-O-sulfatierte Glykane eine Rolle bei der NK-Zellaktivierung spielen, die jedoch spenderabhängig variiert. Es blieb jedoch unklar, ob die sulfatierten Oligosacchararide an die NCR oder an andere NK-Zellrezeptoren banden.

Einfluss von sulfatierten Glykanen auf die NK-Lyse

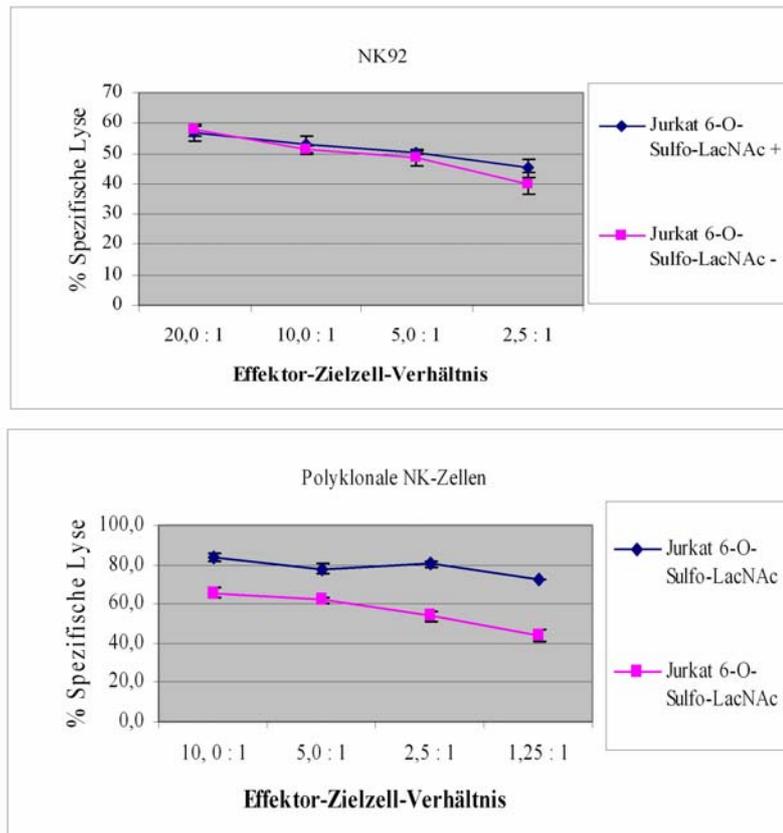


Abb. 36. NK-Zellyse von Jurkat-Zellen mit und ohne 6-O-sulfatierte Glykane. 5×10^5 Zielzellen wurden 1h mit ^{51}Cr (100 μCi) markiert und danach gewaschen. Die Zielzellen wurden für 4h bei 37°C mit Effektor-Zellen in den angegebenen Verhältnissen inkubiert. Die Ergebnisse zeigten, dass polyklonale NK-Zellen 6-O-Sulfo-LacNAc-positive Jurkat-Zellen besser lysieren als 6-O-SulfoLacNAc-defiziente (rechts). NK92-Effektoren lysierten beide Zielzellen gleich (links).

3.3.3 Analyse der Rolle von Proteoglykanen als potentielle NK-Zell-Liganden

Es gibt sechs Klassen von stark negativ geladenen Proteoglykanen (Glykosaminoglykanen), bei denen ein sehr großes Polysaccharid (mit 100-200 Monosaccharidresten) in O- oder N-Verknüpfung an verschiedene Proteinkerne angehängt ist: Hyaluronsäuren, Chondroitin-4-Sulfate, Chondroitin-6-Sulfate, Dermatansulfate, Heparansulfate

Ergebnisse

und Keratansulfate. Um die mögliche Rolle von Proteoglykanen bei der Zielzellerkennung durch NCR zu überprüfen, verwendeten wir die Mutanten-Zelllinie CHO-745 (Franco et al., 2001), die aufgrund eines Enzymdefekts in der Glucuronsäurebiosynthese keine Proteoglykane außer geringen Mengen an Keratansulfat exprimiert (Dr. R. Schwartz-Albiez, pers. Mitteilung). CHO-745-Zellen ließen sich im Vergleich zu CHO-Kontrollzellen unverändert stark mit NKp46-Ig, NKp30-Ig und NKp44-Ig anfärben (Abb. 37). Proteoglykane stellen nach diesem Ergebnis keine Liganden für NCR dar.

Analyse von Proteoglykan-defizienten CHO-Zellen

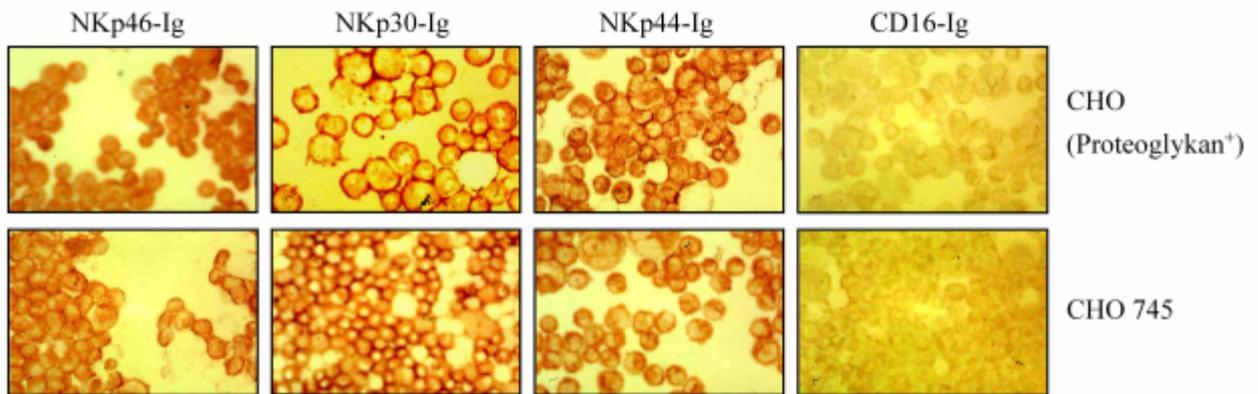


Abb. 37. Cytospin-Immunperoxidasefärbungen von Proteoglykan-defizienten CHO-745 und normalen CHO-Zellen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Bindung von NKp46-Ig, NKp30-Ig und NKp44-Ig. CD16-Ig diente als Negativ-Kontrolle.

Die Proteoglykan-defiziente CHO-Linie wurde zusammen mit normalen CHO-Zellen auch als Zielzellen für NK92 und polyklonale humane NK-Zellen eingesetzt. Interessanterweise war die Lyse von CHO-745 durch die polyklonale NK-Population geringfügig schlechter (Abb. 38). Durch die NK-Linie NK92 wurden CHO-745-Zellen reproduzierbar deutlich besser lysiert als die Kontroll-CHO-Zellen. Das Fehlen von Proteoglykanen hatte also offenbar einen positiven Effekt auf die Lyseeffizienz. Welche NK-Rezeptoren durch die stark anionischen Proteoglykane gebunden wurden und durch welchen Mechanismus NK-Zellen im Nettoeffekt gehemmt wurden, blieb allerdings in diesen Experimenten unklar. Das Ergebnis des NK-Assays bestätigte jedoch den Cytospin-Befund, dass Proteoglykane wahrscheinlich keine NCR-Liganden sind.

Ergebnisse

NK-Zell-Assay mit Proteoglykan-negativen und -positiven CHO-Zellen

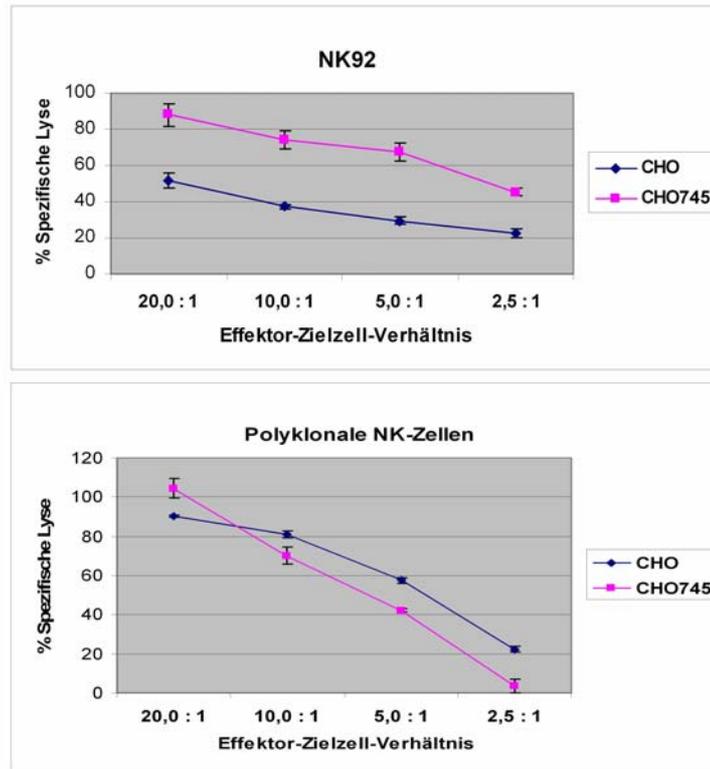


Abb. 38. *NK-Cytotoxizitätstest mit Proteoglykan-defizienten und normalen CHO-Zellen.* Die NK-Zell-Linie NK92 lysierte Proteoglykan-defiziente CHO-745-Mutantenzellen deutlicher effizienter als normale CHO-Zellen. Polyklonale humane NK-Zellen lysierten beide Zelltypen etwa gleich.

3.3.4 Analyse von GPI-Proteinen

Es wurde berichtet, dass Leukämie-Zellen mit einer defekten Synthese von Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Proteinen eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber NK-Zellen aufweisen (Nagakura et al., 2002). Dies veranlasste uns, die mögliche Rolle von GPI-Proteinen als NCR-Liganden zu studieren.

3.3.4.1 Behandlung von lebenden Zellen mit Mannosamin

D-Mannosamin (2-Amino-2-deoxy-mannose) blockiert die Eingliederung von α 1-2 verknüpften Mannosegruppen in das GPI-Lipid und damit die Entstehung von vollständigen GPI-Ankern für Proteine im ER, aber es sollte auch mit der Biosynthese einiger nicht proteinverknüpfter Glykosylinositol-Phospholipide interferieren (Lisanti et

Ergebnisse

al., 1991; McConville und Menon, 2000). Nach 20-stündiger Behandlung mit D-Mannosamin zeigten HeLa-Zellen dosisabhängig eine deutlich verminderte Anfärbbarkeit mit NKp46-Ig, NKp30-Ig und NKp40-Ig (Abb. 39). Zur Kontrolle setzen wir den anti-CD24-Antikörper ML5 ein, der das GPI-verknüpfte Heat stable antigen (CD24) erkennt. Dieses Resultat ließ die Annahme zu, dass es sich bei den NCR-Liganden um GPI-verknüpfte Proteine handelt. Auch in Jurkat-Zellen beobachteten wir diesen Effekt von Mannosamin (Abb. 40). Es fiel auf, dass das Verschwinden der Immunperoxidase-Färbung mit NKp46-Ig, NKp30-Ig und NKp44-Ig nicht gleichmäßig erfolgte. So war die NKp46-Reaktivität von HeLa- und Jurkat-Zellen bei 25 μ M Mannosamin fast vollständig verschwunden, während NKp30-Ig und NKp44-Ig noch färbten. Dies ist als Hinweis darauf zu werten, dass die NKp46- und NKp30-Ligandenstrukturen nicht identisch sind.

Färbung von Mannosamin-behandelten HeLa-Zellen mit NCR-Ig-Fusionsproteinen

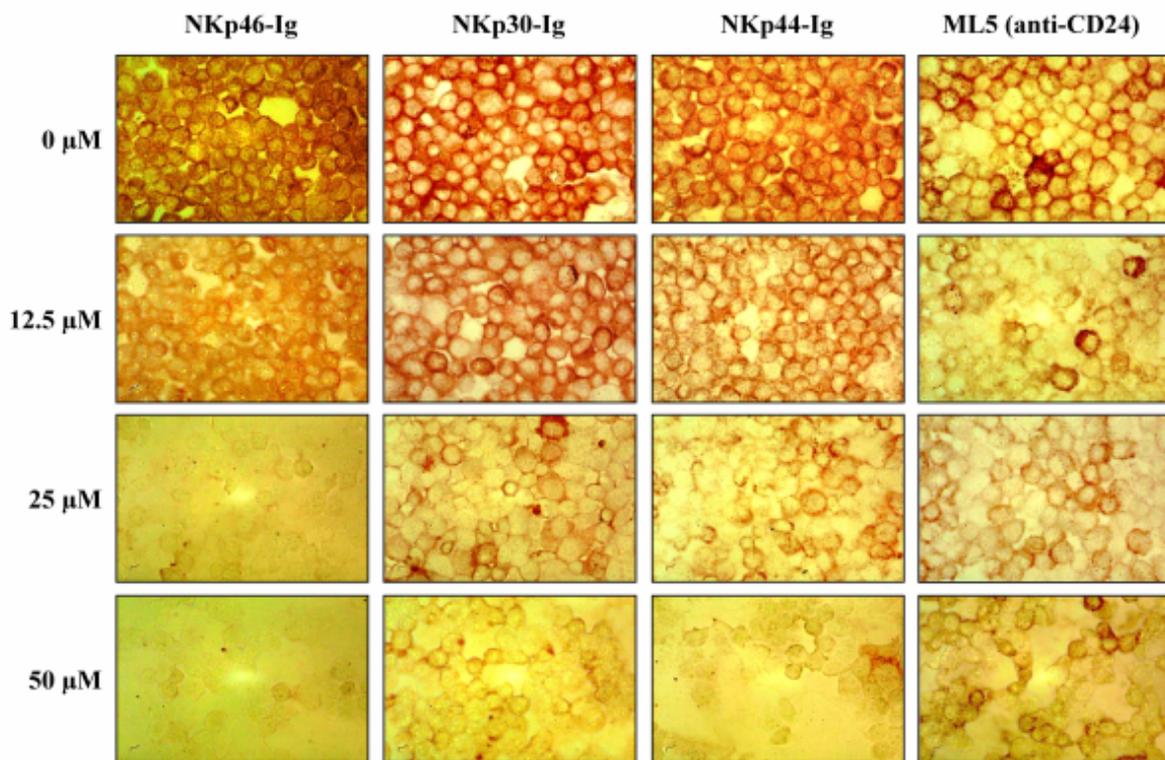


Abb. 39. Cytospin-Immunperoxidasefärbungen von mit D-Mannosamin behandelten HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden für 20 Stunden in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen von D-Mannosamin, einem kompetitiven Inhibitor der Glykosylphosphatidylinositol-Biosynthese, kultiviert. Die Färbungen mit NKp46-Ig, NKp30-Ig und NKp44-Ig zeigten einen deutlichen Verlust der Reaktivität ab 12,5-25 μ M. Zur Kontrolle der Wirksamkeit von D-Mannosamin verwendeten wir einen Antikörper gegen das GPI-verankerte Protein CD24.

Ergebnisse

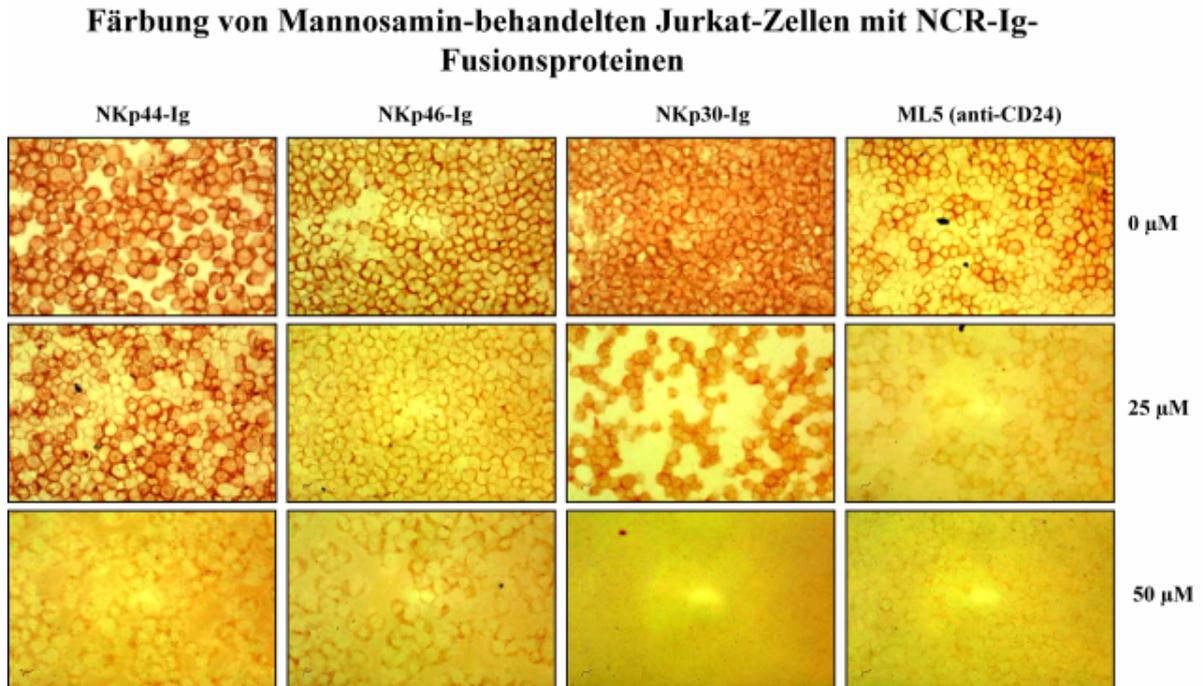


Abb. 40. Cytospin-Immunperoxidasefärbungen von mit D-Mannosamin behandelten Jurkat-Zellen. Jurkat-Zellen wurden über 20 Stunden in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen von D-Mannosamin, einem kompetitiven Inhibitor der Glykosylphosphatidylinositol-Biosynthese, kultiviert. Die Färbungen mit NKp44-Ig, NKp46-Ig und NKp30-Ig zeigten dosisabhängig einen deutlichen Verlust der Reaktivität. Zur Kontrolle der Wirksamkeit von D-Mannosamin verwendeten wir einen Antikörper gegen das GPI-verankerte Protein CD24.

Erst später wurde klar, dass Mannosamin, wie auch andere Aminosucker, über eine oxidative DNS-Schädigung in Zellen Apoptose auslösen können (Hiraku und Kawanishi, 1999). Wir führten weitere Experimente mit Galaktosamin durch, das zwar apoptogen wirkt, aber nicht in die GPI-Biosynthese eingreift. Auch nach Behandlung mit 20 μM D-Galaktosamin war die Reaktivität von Jurkat-Zellen für NKp46-Ig und NKp30-Ig, aber auch die von W6/32 (anti-HLA-A,B,C), anti-CD59 und anti-CD44 fast vollständig ausgelöscht (nicht gezeigt).

Na-Orthovanadat (Na_3VO_4) ist ein potenter Induktor von Apoptose, der Apoptose ebenfalls über einen H_2O_2 -abhängigen Weg einleitet (Huang et al., 2000). Wir verwendeten Orthovanadat in verschiedenen Konzentrationen über 20 Stunden. Dosisabhängig reduzierte die Orthovanadat-Behandlung die Reaktivität von HeLa-Zellen bis zum völligen Verschwinden der Färbung. Bei 25 μM Orthovanadat lösten sich alle Zellen vom Plastik ab und hatten Membranausstülpungen als morphologisches Zeichen von apoptotischen Zellen.

Ergebnisse

Wirkung der Vanadat-induzierten Apoptose auf die NCR-Liganden

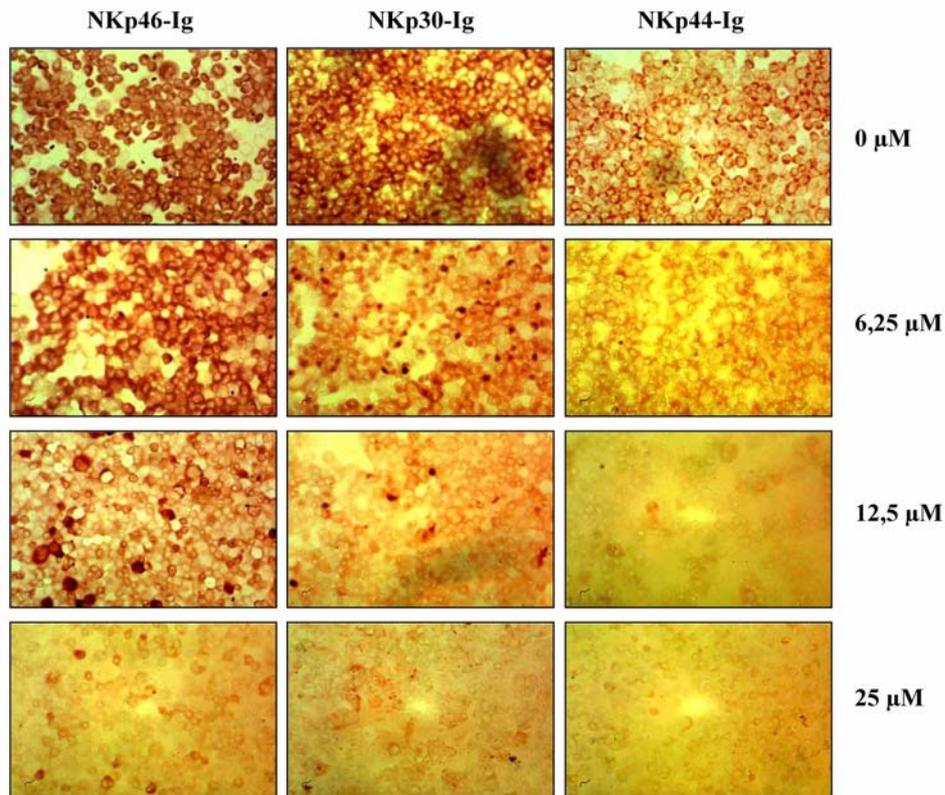


Abb. 41. Cytospin-Immunperoxidasefärbungen von apoptotischen HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden über 20 Stunden in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen von der Apoptose-induzierenden Verbindung Na-Orthovanadat (Na_3VO_4) kultiviert und acetontfixierte Zellen anschließend mit NKp46-Ig, NKp44-Ig und NKp30-Ig angefärbt. Es zeigte sich ein klarer Verlust der Bindung ab 6,25 μM . Morphologische Zeichen der Apoptose wie kondensierte Zellkerne und Plasmamembran-ausstülpungen waren erkennbar.

3.3.4.2 Behandlung von fixierten Zellen mit Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipasen

Parallel wurden Experimente mit den Phospholipasen C und D durchgeführt, welche GPI-Anker unterhalb bzw. oberhalb der Phosphatgruppe zwischen *myo*-Inositol und Alkylacyl(Diacyl)-glycerol spaltet. Nach Inkubation von acetontfixierten Cytospins mit Phospholipase C (2 mU in TBS-Puffer, pH 7,4 mit 0,1 mM CaCl_2) für 45 min bei Raumtemperatur wurden Immunperoxidase-Färbungen mit NCR-Igs bzw. anti-CD24 zur Kontrolle angefertigt. Sowohl bei anti-CD24 wie bei NKp46-Ig und NKp30-Ig zeigte sich eine Abschwächung der Färbung (Abb. 42). Die Bindung von NKp44-Ig blieb unverändert, was im Gegensatz zur Abschwächung durch Mannosamin steht. Der

Ergebnisse

Versuch wurde mit Phospholipase D (7 mU pro Cytospin, 90 min bei Raumtemperatur) wiederholt, aber es zeigte sich keine signifikante Abschwächung bei den NCR-Ig-Färbungen (nicht gezeigt). Durch die Phospholipase-Behandlung von fixierten Zellen ließ sich also kein eindeutiger Hinweis auf GPI-Proteine als NCR-Liganden finden.

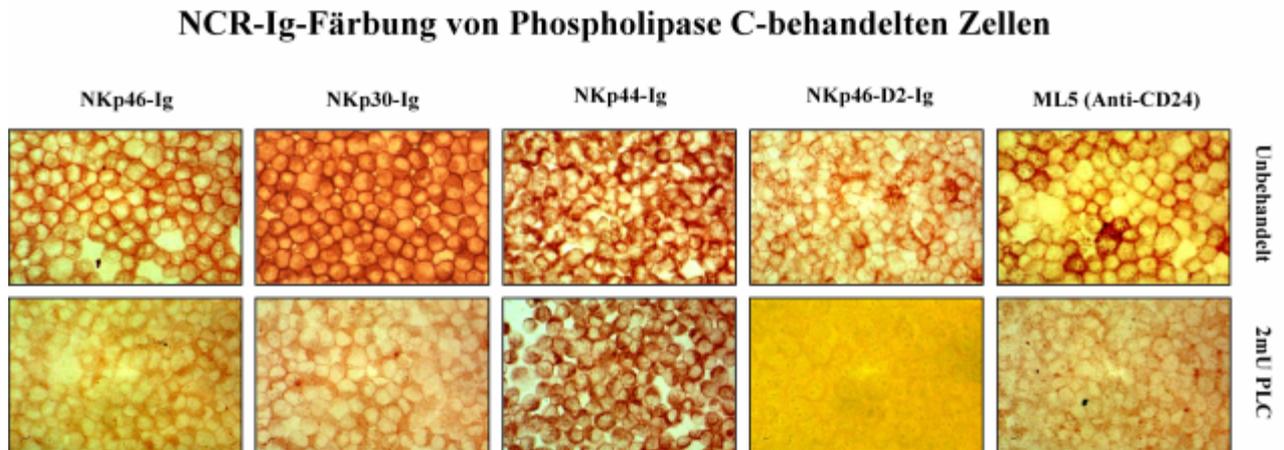


Abb. 42. Cytospin-Immunperoxidasefärbungen von PI-PLC-behandelten HeLa-Zellen. Acetonfixierte HeLa-Zellen wurden für 45 min bei Raumtemperatur mit 2 mU PI-PLC (Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C aus *B. cereus*) inkubiert und anschließend mit NCR-Ig-Fusionsproteinen angefärbt. Es zeigte sich eine Reduktion der Färbung mit Ausnahme von NKp44-Ig. Zur Kontrolle wurde mit dem Antikörper ML5 gegen das GPI-Protein CD24 gefärbt.

3.3.4.3 Verwendung von GPI-defizienten Zellen

Um die Frage, ob GPI-verankerte Proteine oder freie Glykosylinositolphospholipide als NCR-Liganden in Frage kommen, mit endgültiger Sicherheit zu beantworten, verwendeten wir die GPI-defiziente Jurkat-Variante Jurkat-7.X mit einem Defekt im *PIG-A*-Gen (Bastisch et al., 2000), welches normalerweise *N*-Acetylglucosamin auf Phosphatidylinositol überträgt. Zum Vergleich wurden *PIG-A*-rekonstituierte Jurkat-7.P eingesetzt. Diese Zellen wurden uns freundlicherweise von Prof. R. Schmidt, Med. Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt. Die Immunperoxidase-Färbungen von Cytospin zeigten eindeutig, dass Bindungsstellen für NKp46-Ig, NKp30-Ig und NKp44-Ig in Jurkat-7.X und Jurkat-7.P gleichwertig vorhanden waren (Abb. 43). Das Fehlen des GPI-verankerten Proteins CD59 in Jurkat-7.X und dessen Vorhandensein in Jurkat-7.P (Bastisch et al., 2000) konnten wir mit einem CD59-Antikörper reproduzieren (nicht gezeigt).

Ergebnisse

Analyse von *PIG-A*-defizienten Jurkat-Zellen

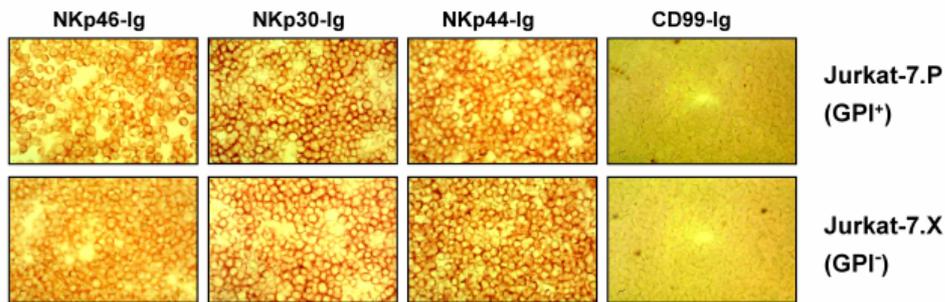


Abb. 43. Cytospin-Immunperoxidasefärbungen von GPI-defizienten Jurkat-Zellen. Jurkat-Mutanten mit einem Enzymdefekt in der GPI-Anker-Biosynthese wurden im Vergleich zu *PIG-A*-retransfizierten Jurkat-Zellen mit NKp46-Ig, NKp30-Ig und NKp44-Ig analysiert. Es zeigte sich kein Unterschied in der Anfärbbarkeit mit den NCR-Ig-Fusionsproteinen.

Jurkat-7.X und Jurkat-7.P-Zellen wurden auch im NK-Assay eingesetzt. Die GPI-defizienten Jurkat-7.X wurden von humanen polyklonalen NK-Zellen etwas geringer lysiert als Jurkat-7.P, was veröffentlichte Daten mit Leukämie-Zellen bestätigt (Nagakura et al., 2002). Diese Zellen zeigten jedoch keine differentielle Empfindlichkeit gegenüber der NK-Linie NK92 (Abb. 44).

NK-Zell-Assay mit GPI-negativen und -positiven Jurkat-Zellen

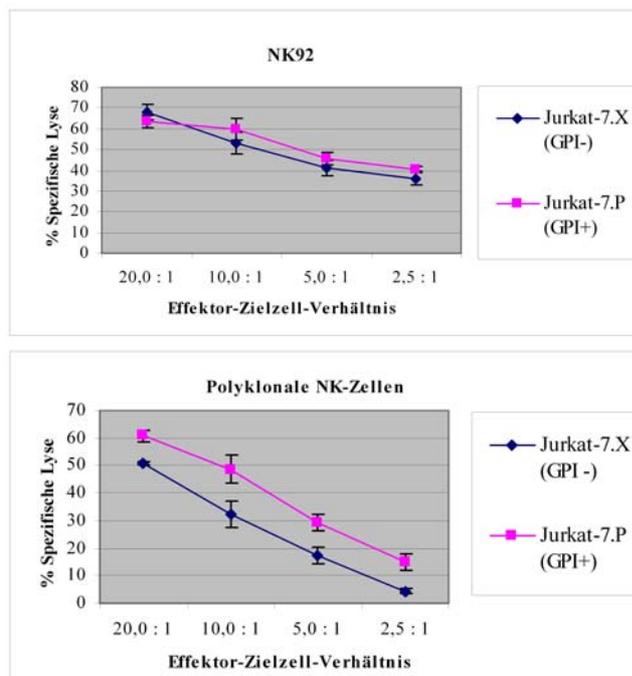


Abb. 44. NK-Cytotoxizitätstest mit GPI-positiven und GPI-negativen Jurkat-Zellen. Die NK-Zell-Linie NK92 lysierte GPI⁺ und GPI⁻ Jurkat-Zellen ohne Unterschied, während polyklonale humane NK-Zellen die GPI⁺ Zellen etwas effizienter lysierten.

Ergebnisse

3.3.5 Analyse von Glykolipiden als potentielle NCR-Liganden

Nachdem orientierende Experimente keine klaren Hinweise auf Proteine als NCR-Liganden erbracht hatten, gingen wir auch der Frage nach, ob die Liganden Glykolipide sein könnten. Mit den NCR-Fusionsproteinen NKp46-Ig, NKp44-Ig und NKp30-Ig konnten wir die Plasmamembran von Erythrozyten aus menschlichem und murinem Blut anfärben (Abb. 45). Erythrozyten exponieren in der Plasmamembran nur eine eingeschränkte Anzahl von überwiegend stark glykosylierten Proteinen, da ihnen das ER für eine aktive Proteinbiosynthese fehlt. Die Plasmamembran von Erythrozyten ist jedoch reich an Sphingolipiden und Phospholipiden.

Immunoperoxidase Färbung von acetonfixierten human und murinen Erythrozyten mit NCR-Ig-Fusionsproteinen

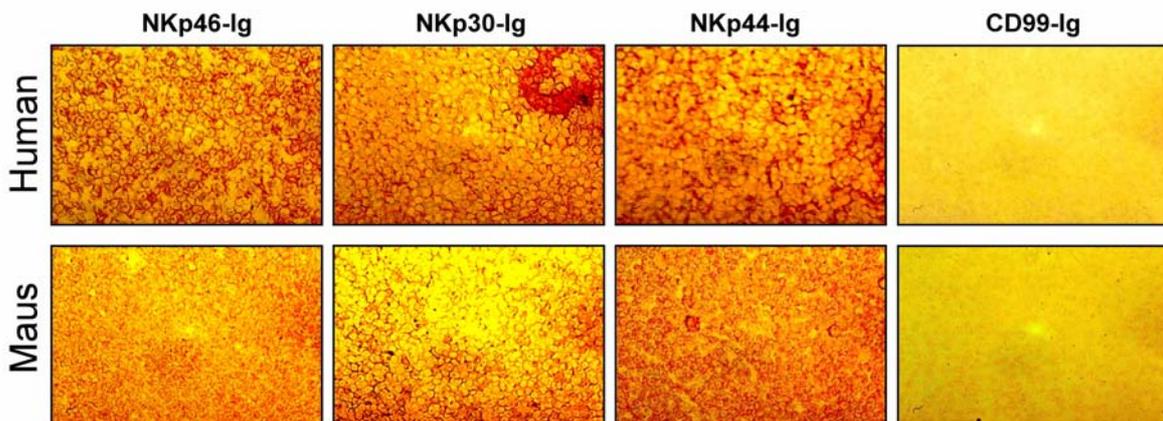


Abb. 45. Cytospin-Immunoperoxidasefärbungen von acetonfixierten Ausstrichen von menschlichem und murinem peripheren Blut. NKp46-Ig, NKp30-Ig und NKp44-Ig färbt die Membran von Erythrozyten. CD99-Ig zeigte keine Färbung.

3.3.5.1 Analyse des Einflusses von Brefeldin A und Monensin auf die NCR-Liganden

Zunächst verwendeten wir den Pilzmetaboliten Brefeldin A (BfA), der den anterograden Vesikeltransport vom ER zum Golgi-Apparat blockiert, was eine Rückverteilung des gesamten Golgi in das ER zur Folge hat. BfA wurde verwendet, um die Glykosphingolipidsynthese zu entkoppeln. Während Lactosylceramid, GM3, GD3 und GT3 noch synthetisiert werden, werden die komplexen Glykosphingolipide (GSL) in Anwesenheit von BfA nicht mehr produziert (Young et al., 1990; Rosales Fritz und

Ergebnisse

Maccioni, 1995; vgl. Abb. 46). Nach Behandlung von HeLa- und HT29-Zellen mit 20 μM BfA über 44 Std. bei 37°C beobachteten wir in der Cytospin-Immunperoxidase-Verfärbung eine gewisse intrazelluläre Umverteilung (stärker granuläre Färbung), es kam jedoch nicht zu einem Verschwinden der Reaktivität von NKp46-D2-Ig, NKp30-Ig und NKp44-Ig (Abb. 47). Allenfalls war die Bindung von NKp30-Ig etwas abgeschwächt. Eine deutliche reduzierte Färbung wäre zu erwarten gewesen, falls es sich bei den Liganden um komplexe GSL gehandelt hätte.

In ähnlicher Weise wurde das Na^+ -Ionophor Monensin eingesetzt, das den vesikulären Transport vom *trans*-Golgi durch das Trans-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran blockiert. Monensin verhindert die Biosynthese von GT3 und der c-Serie der komplexen GSL (van Echten und Sandhoff, 1989; Rosales Fritz et al., 1996; vgl. Abb. 46). 10 μM Monensin über 44 Std. veränderten das intrazelluläre Anfärbungsmuster mit NKp46-D2-Ig, NKp44-Ig und NKp30-Ig im Sinne einer verstärkten Golgi-ähnlichen Färbung, was ähnlich wie bei BfA den gewünschten zellbiologischen Effekt belegt. Die Bindung der NCR-Fusionsproteine war jedoch quantitativ nicht signifikant beeinflusst (Abb. 47).

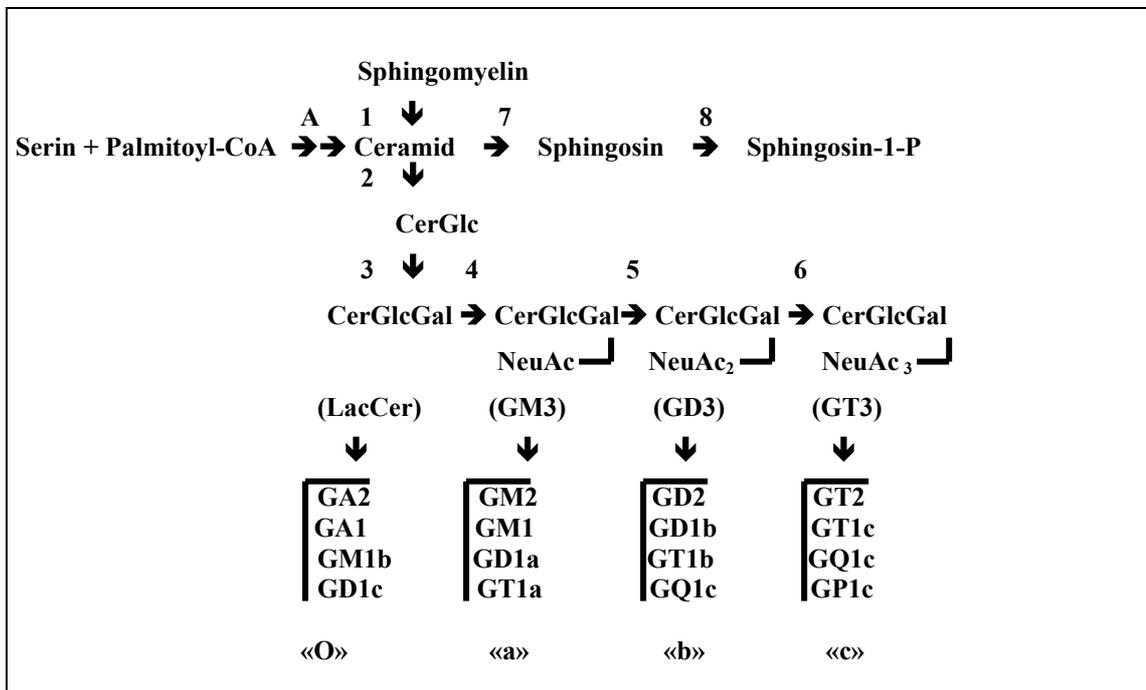
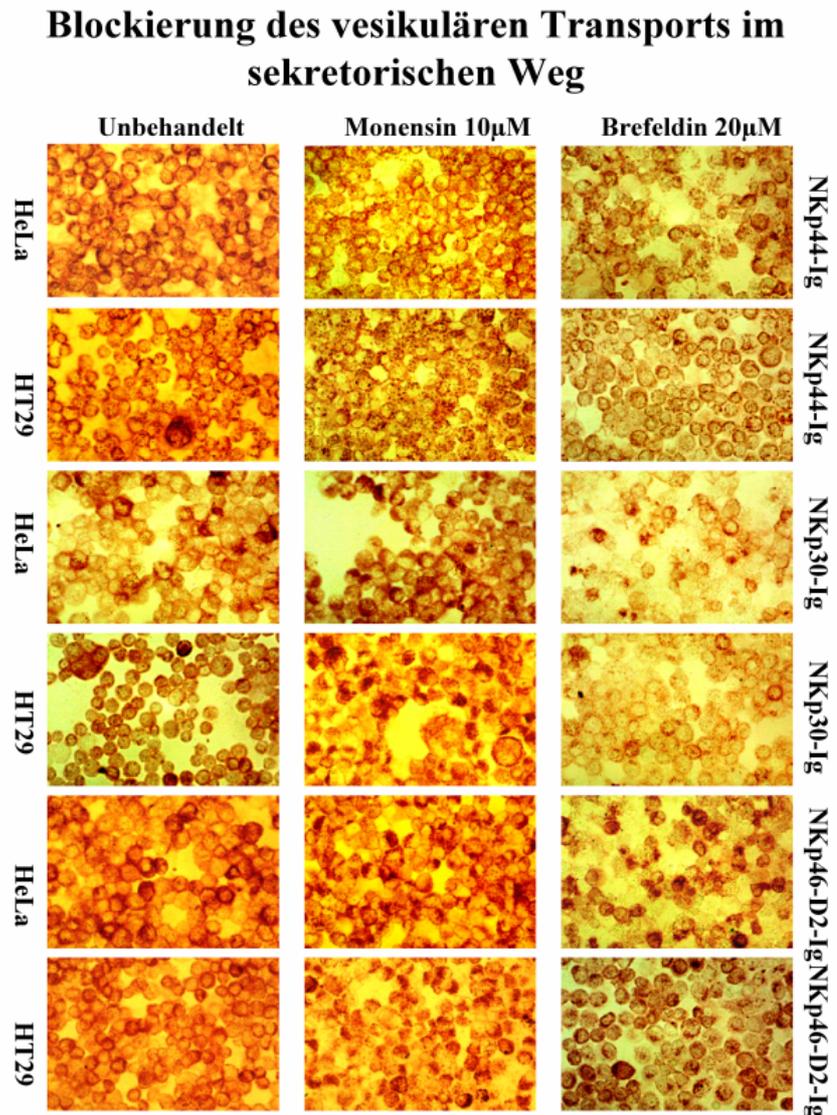


Abb. 46. Schema der Sphingolipid-Biosynthese. Die involvierten Enzyme sind 1) Saure Sphingomyelinase, 2) Glc-T, Glucosylceramidtransferase, 3) Gal-T1, UDP-Gal:Glucosylceramid-Galactosyltransferase, 4) CMP-NeuAc:Lactosylceramid-Sialyltransferase, 5) CMP-NeuAc:GM3-Sialyltransferase (GD3-Synthase), 6) CMP-NeuAc:GD3-Sialyltransferase, 7) Ceramidase, A) De novo Synthese von Ceramid. (Aus Tomassini und Testi, 2002).

Ergebnisse

Abb. 47. Einfluss von Monensin und Brefeldin A auf die Expression von NCR-Liganden.

HeLa- und HT29-Zellen wurden mit 10 μ M Monensin bzw. 20 μ M Brefeldin A für 44h bei 37°C behandelt. Acetonfixierte Cytospins wurden anschließend mit Fusionsproteinen NKp46-D2-Ig, NKp30-Ig und NKp44-Ig gefärbt. Monensin und Brefeldin A, die den vesikulären Transport im sekretorischen Weg blockieren, führten nicht zu einer signifikanten Reduktion der NCR-Ig-Bindung.



3.3.5.2 Analyse von Endoglycoceramaminidase

Als weiteres Reagenz setzten wir den Endoglycoceramaminidase-Activator-II-Komplex ein, um Cytospin-Präparate zu verdauen. EGCCase II hydrolysiert Glycosphingolipide an der Ceramid-Oligosaccharid-Bindung (Ito et al., 1991). Die Behandlung von acetonfixierten Cytospins von HeLa oder HT29-Zellen mit EGCCase II (1,5 mU in PBS, pH 6,5 pro Objektträger) über 1 Std. bei Raumtemperatur hatte eine deutliche Reduktion der Bindung von NKp30-Ig und NKp46-Ig zur Folge, während die NKp44-Ig-Bindung nur leicht abgeschwächt war (Abb. 48). Dieses Ergebnis stimulierte die weitere Untersuchung von Glycosphingolipiden als potentielle Liganden von NCR.

Ergebnisse

NCR-Ig-Färbungen von Endoglycoceraminidase-behandelten Zellen

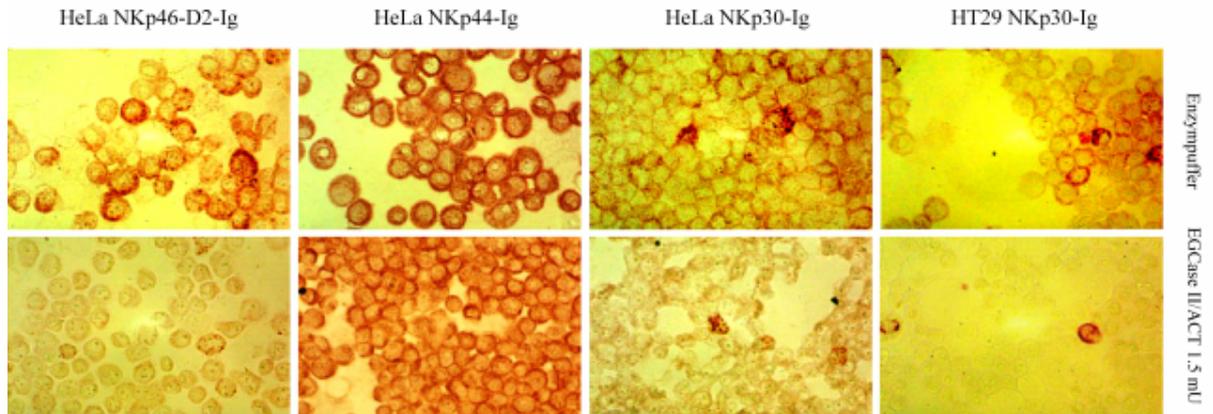


Abb. 48. Immunoperoxidase-Färbungen von Endoglycoceraminidase-behandelten HeLa und HT29-Zellen. Acetonfixierte Cytospins von HeLa und HT29-Zellen wurden 60 min lang mit 1,5 mU EGCase II/ACT bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbungen mit NKp46-D2-Ig und NKp30-Ig waren im Vergleich zur Enzympuffer-Kontrolle deutlich abgeschwächt.

3.3.5.3 Biochemische Untersuchung von Lipiden aus HeLa- und HT29-Zellen

Um die möglichen NCR-Liganden biochemisch identifizieren zu können, nahmen wir Kontakt zu Dr. Bernhard Kniep (Institut für Immunologie, Technische Universität Dresden) auf, der ein Experte für den immunochemischen Nachweis von dünnstschichtchromatographisch aufgetrennten Glykolipiden ist.

Für die Lipid-Analysen wurden je 2×10^8 HeLa- und HT29 Zellen zweimal mit PBS gewaschen, bei 2000 Upm/4°C abzentrifugiert, die Zellsedimente je in etwa 20 ml eiskaltem Methanol resuspendiert und dann auf Trockeneis nach Dresden geschickt. Die Gesamt-Lipidextrakte wurden auf Kieselgel 60-Platten chromatographiert (Malisan et al., 2002). Nach Fixierung und Trocknung wurden die Dünnschichtplatten mit verdünnten NCR-Fusionsproteinen inkubiert und deren Bindung mit einem Ziege-anti-Human-IgG/Alkalische Phosphatase-Zweitantikörper nachgewiesen. Abb. 49 zeigt die deutliche Anfärbung nicht näher identifizierter Lipide bzw. Lipidgemische im Gesamtlipidextrakt durch NKp44-Ig, NKp46-Ig und NKp30-Ig. Die Anfärbung durch NKp46-D2-Ig war schwach. CD99-Ig, das als Negativkontrolle eingesetzt wurde, zeigte praktisch keine Hintergrundfärbung.

Ergebnisse

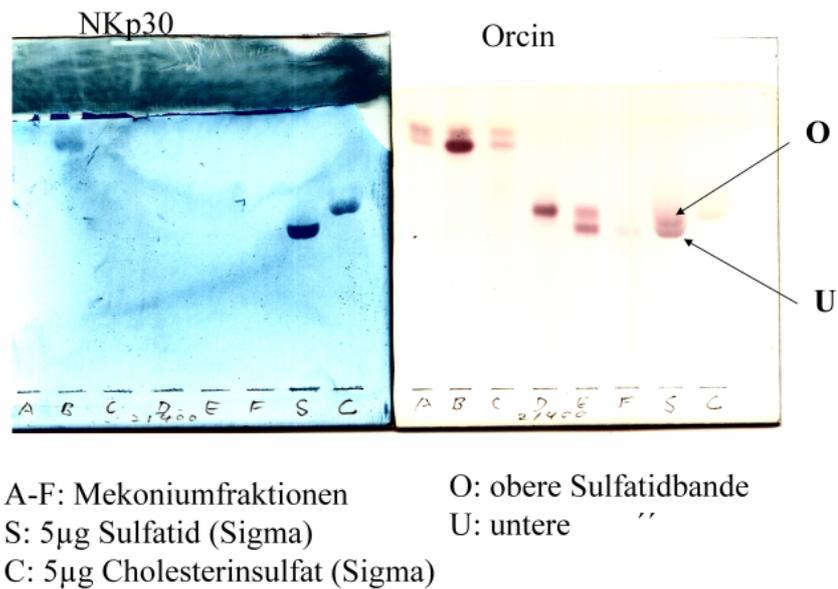
Dünnschichtchromatographie von Gesamt-Lipid extrahiert aus HeLa- und HT29-Zellen



Abb. 49. Immunhistochemische Anfärbungen von Gesamtlipidextrakten nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung. Aus HT29- und HeLa-Zellen extrahierte Lipide wurden auf Kieselgelplatten aufgetrennt und die Platten mit NKp46-Ig, NKp46-D2-Ig, NKp44-Ig, NKp30-Ig und CD99-Ig angefärbt. Die Bindung der Fusionsproteine an Lipidfraktionen wurde mit einem Alkalische Phosphatase-konjugierten Zweitantikörper nachgewiesen. Das Experiment wurde freundlicherweise von Dr. B. Kniep, TU Dresden, durchgeführt.

Weitere gezielte Analysen von Dr. Kniep ergaben Hinweise auf die Bindung von NKp30-Ig an eine polare Variante des einfachen Glykosphingolipids Sulfatid (3-Sulfo-Gal(β 1-1')-ceramid sowie an Cholesterinsulfat (Abb. 50). NKp46-Ig und NKp44-Ig banden deutlich schwächer als NKp30-Ig an dünnschichtchromatographisch separiertes Sulfatid (nicht gezeigt). Anscheinend konnten anionische Glykolipide mit den Fusionsproteinen interagieren.

Ergebnisse



nur die untere Bande bindet NKp30

Abb. 50. Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Lipiden und immunhistochemische Anfärbungen mit NKp30-Ig oder Orcin. Fraktionen von Mekoniumlipiden, Sulfatid bzw. Cholesterinsulfat wurden auf Kiesegelplatten aufgetrennt und mit NKp30-Ig inkubiert. Nur untere Bande des orcingefärbten Sulfatidgemisches wurde durch NKp30-Ig angefärbt. Darüberhinaus reagierte NKp30-Ig auch mit Cholesterinsulfat. Das Experiment wurde freundlicherweise von Dr. B. Kniep, TU Dresden, durchgeführt.

3.3.5.4 NK-Assays mit Glykolipid-beladenen Zielzellen

Um diese biochemischen Daten durch biologische Experimente zu verifizieren, wurden NK-Assays durchgeführt, in denen Jurkat- bzw. CHO-745-Zielzellen mit sulfatierten und nicht-sulfatierten Glykolipiden (Sulfatid, Cholesterinsulfat, Galactosylceramid und Glukosylceramid) beladen wurden. Als Effektorzellen wurden polyklonale humane NK-Zellen und die NK-Linie NK92 eingesetzt. Die Vorbehandlung mit Glykolipiden hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Lyse von Jurkat-Zellen (Abb. 51A, B). Bei den CHO-745-Zellen beobachteten wir eine gewisse Verstärkung der Lyse durch polyklonale NK-Zellen wie NK92 nach der Beladung mit Galaktosylceramid (Abb. 51C, D). Die Lyse von CHO-745 durch polyklonale NK-Zellen war nach Beladung mit Sulfatid jedoch leicht gegenüber der Kontrolle vermindert. Insgesamt ergaben diese Daten keinen klaren Hinweis darauf, dass Sulfatid oder Cerebroside als spezifische Liganden für aktivierende NK-Rezeptoren dienen.

Ergebnisse

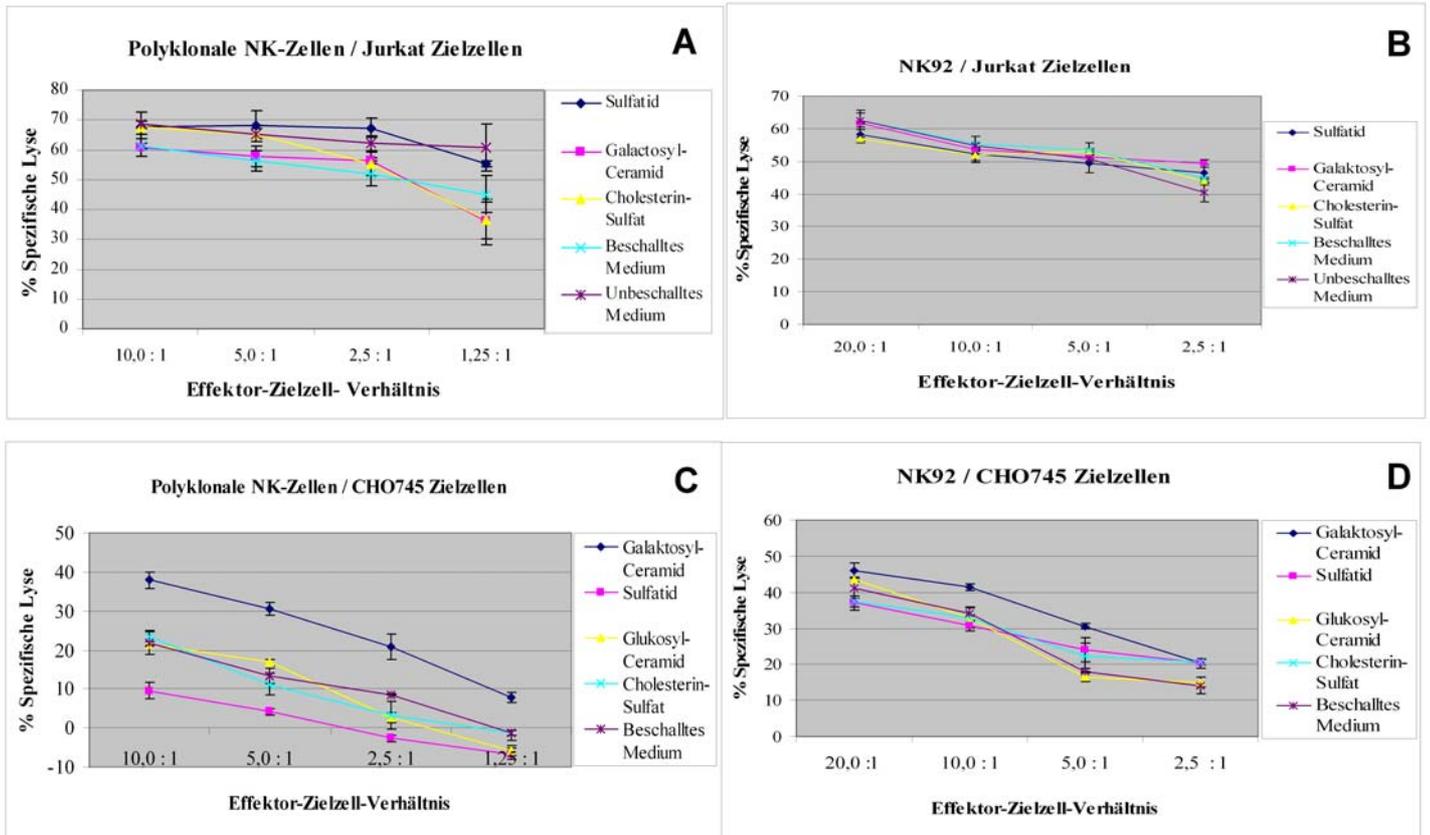


Abb. 51. NK-Cytotoxizitätstest mit Glykosphingolipid-beladenen Jurkat und CHO745-Zielzellen. Um zu überprüfen, ob Sulfatid oder andere Glykosphingolipide NK-Zellen aktivieren können, wurden Sulfatid, Galaktosylceramid, Cholesterinsulfat und Glukosylceramid mittels Ultraschall in Vollmedium gelöst (je 100 µg/ml) und zu den Zielzellen gegeben. Danach wurde dem Medium ^{51}Cr (75 µCi) für 90 min. zugesetzt. Als Kontrolle beschallten wir das Vollmedium für 15 min. Nach der Inkubation wurden die markierten und beladenen Zellen zweimal gewaschen. Die markierten Zellen wurden mit den Effektor-Zellen für 4 h bei 37°C inkubiert. Die spezifische Lyse wurde im Gamma-Zähler ermittelt. Die Beladung mit Sulfatid und Cholesterinsulfat hatten keinen stimulierenden Effekt auf die NK-Lyse.

3.3.5.5 Analyse von Inhibitoren der Glykosphingolipid-Biosynthese

Parallel zur direkten Analyse von zellulären Glykolipiden führten wir Experimente mit Inhibitoren der Glykosphingolipid-Biosynthese durch. PDMP^{10C} (D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol) und PPMP^{16C} (D,L-threo-1-phenyl-2-palmitoylamino-3-morpholino-1-propanol) fungieren als strukturelle Ceramid-Analoga und blockieren kompetitiv die Glukosylceramid-Biosynthese durch Inhibition der UDP-

Ergebnisse

Glukose:*N*-Acylsphingosin-Glukosyltransferase (Inokuchi und Radin, 1987; Inokuchi, 1997; Kasahara et al., 2001). Ein Ergebnis dieser Inhibition ist die Akkumulation von Ceramid und Sphingosin in der Zelle und eine Depletion von Glykosphingolipiden. PDMP/PPMP inhibieren jedoch nicht die UDP-Galaktose:*N*-Acylsphingosin-Galaktosyltransferase und die Beta-Glukocerebrosidase. HeLa- und HT29-Zellen wurden über 36 Std. bzw. 20 Std. in aufsteigenden Konzentrationen von PDMP (Abb. 52A) bzw. PPMP (Abb. 52B) kultiviert.

Behandlung von Zellen mit dem Ceramid-Glucosyltransferase-Inhibitor PDMP

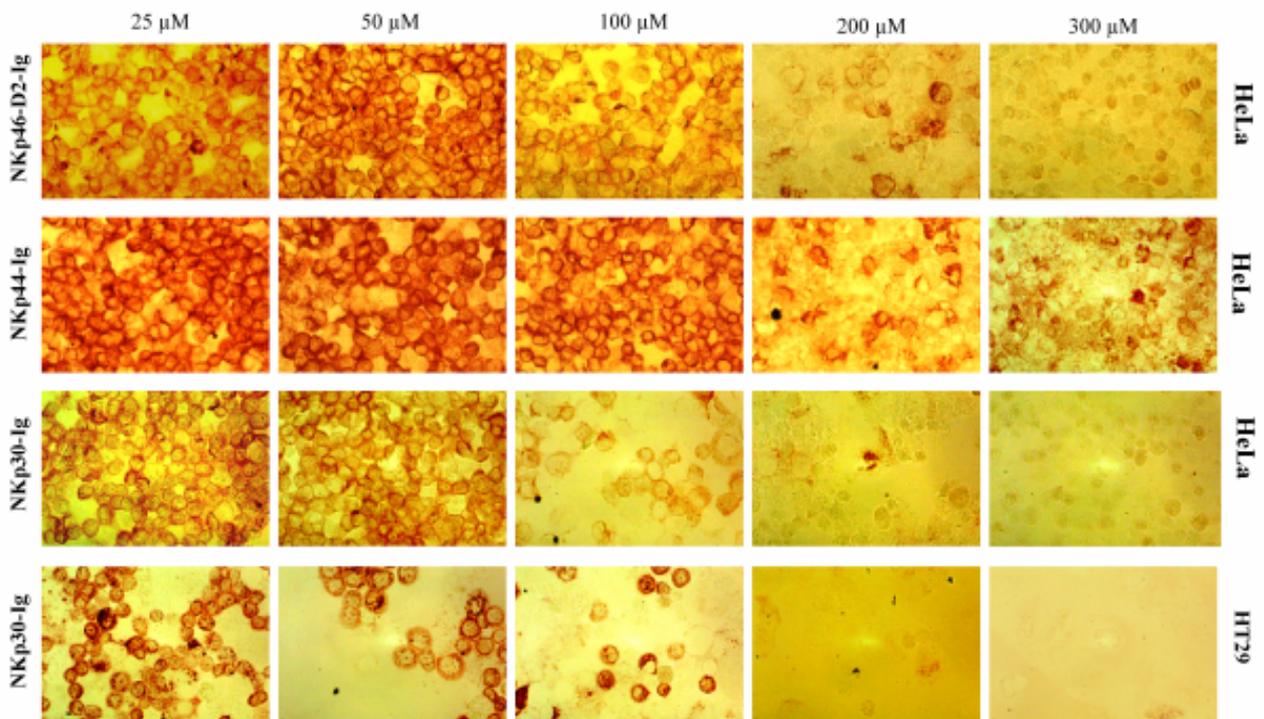


Abb.52A

Abb. 52A/B. Immunperoxidasefärbungen von Tumorzellen, die mit Ceramid-Glucosyltransferase-Inhibitoren behandelt wurden. A: HeLa- bzw. HT29-Zellen wurden für 36 Std. in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen von PDMP kultiviert. Die Färbungen mit NCR-Ig-Fusionsproteinen an acetontfixierten Cytospins zeigten einen dosisabhängigen Verlust der NCR-Ligandenexpression in PDMP-behandelten Zellen. B: HeLa-Zellen wurden für 20 Std. in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen von PPMP kultiviert. Auch hier zeigten die Färbungen mit NCR-Ig-Fusionsproteinen einen Verlust der NCR-Ligandenexpression. Auch die Expression des Proteins Egp34 (HEA125) zeigte sich reduziert bei 50 µM PPMP, nicht jedoch die Expression des Glykosphingolipids GM3.

Ergebnisse

Behandlung von HeLa-Zellen mit dem Ceramid-Glucosyltransferase-Inhibitor PPMP

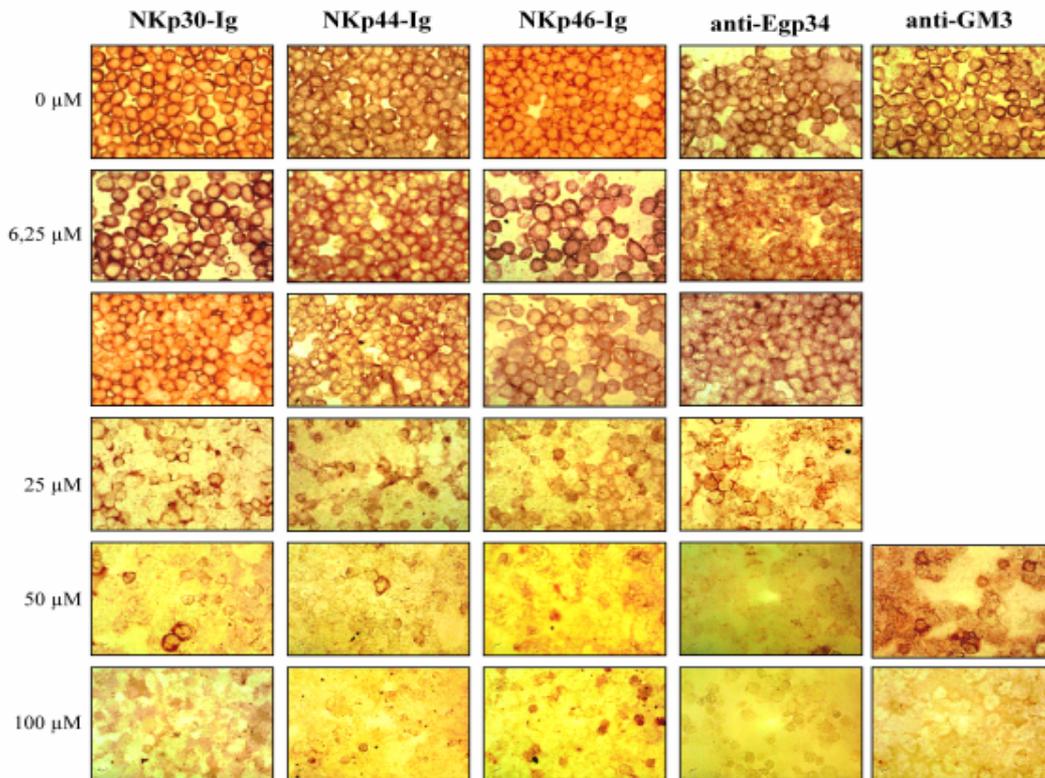


Abb.52B

Die anschließenden Cytospin-Immunperoxidase-Färbungen mit NKp46-(D2)-Ig, NKp44-Ig und NKp30-Ig zeigten einen dosisabhängigen Verlust der Reaktivität der behandelten Zellen ab etwa 100 µM. Die Expression von NKp44-Liganden war jedoch deutlich resistenter gegenüber PDMP. Bei Verwendung von PPMP waren die Färbungen für alle Fusionsproteine schon bei 25 µM signifikant reduziert und bei 50 µM weitgehend verschwunden. Bei PPMP-behandelten HeLa-Zellen setzten wir zum Vergleich monoklonale Antikörper gegen das pan-epitheliale Glykoprotein Egp34 (HEA125) bzw. gegen das Gangliosid GM3 ein. Der Verlust des Glykoproteins Egp34 bei höheren Dosen von PPMP wies auf einen nicht mit der GSL-Biosynthese in Bezug stehenden toxischen Effekt hin. Bemerkenswerterweise war die Färbung für das Glykosphingolipid GM3 bei 50 µM PPMP noch nicht signifikant vermindert. GM3 scheint daher als NCR-Ligand nicht in Frage zu kommen.

Bei den Ergebnissen mit PDMP und PPMP ist zu berücksichtigen, dass beide Inhibitoren in der Lage sind, über die Ceramid-Akkumulation Apoptose zu induzieren (Kasahara et al., 2001; Nicholson et al., 1999; Litvak et al., 2003). Ceramide sind selbst

Ergebnisse

Mediatoren der Apoptose (Pronk et al., 1996; Verheij et al., 1996; Tomassini und Testi, 2002). Wir studierten daher den Effekt von *N*-Acetyl-Ceramid (C_2 -Cer) auf die Expression von NCR-Bindungspartnern. HeLa wurden über 24 Std. mit 40 bzw. 80 μ M C_2 -Cer inkubiert. Obwohl die Zellen nicht mehr adhären waren und Membranausstülpungen („blebs“) als morphologisches Zeichen von Apoptose aufwiesen, waren die Färbungen für NKp46-Ig, NKp44-Ig und NKp30-Ig nur wenig abgeschwächt (Abb. 53). Es blieb unklar, warum exogenes C_2 -Cer einen weniger stark reduzierenden Effekt auf die intrazelluläre Expression von NCR-Liganden hatte als die Ceramid-akkumulierenden Inhibitoren PPMP und PDMP.

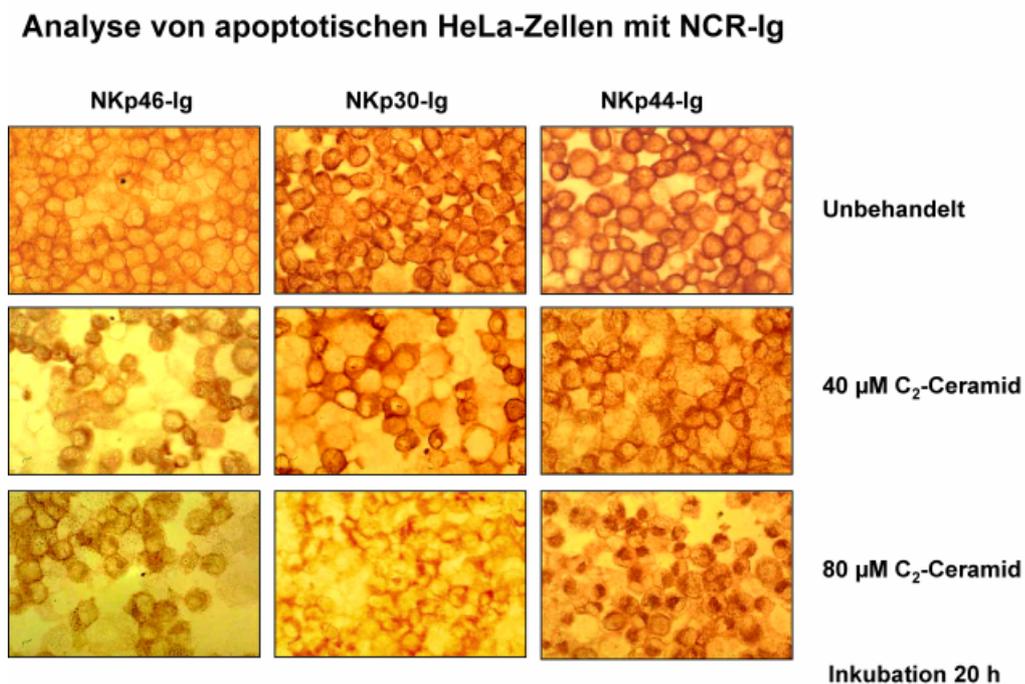


Abb. 53. Immunperoxidasefärbungen von Ceramid-behandelten HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden für 20 Std. mit 40 μ M oder 80 μ M C_2 -Ceramid kultiviert. Die weitgehend apoptotischen Zellen wurden mit NKp46-Ig, NKp44-Ig und NKp30-Ig angefärbt. Es zeigte sich eine leichte Abschwächung der Reaktion im Vergleich zur Kontrolle.

3.3.5.6 Analyse von Ceramid- und Glykosphingolipid-defizienten Zellen

Die bisherigen Ergebnisse hatten die Frage, ob Glykosphingolipide als Ligandenstrukturen für NCR dienen, nicht mit letzter Sicherheit abklären können. Wir bemühten uns daher, Mutantenzelllinien mit Defekten in der Glykolipidbiosynthese aus Japan zu erhalten. Der von der murinen Melanomzelllinie B16 abgeleiteten

Ergebnisse

Defektmutante GM-95 fehlt das Ceramidglucosyltransferase-Gen (Ichikawa et al., 1996). Die CHO-Variante LY-B hat einen Defekt in der Serinpalmitoyltransferase (SPT) und produziert daher keine Ceramide sowie Ceramid-abgeleitete Glykosphingolipide (Hanada et al., 1998). GM-95 wurden im Vergleich zu B16-Wildtyp-Zellen und LY-B im Vergleich zu SPT-retransfizierten LY-B/cLCB1 in der Cytospin-Immunperoxidase-Färbung und im NK-Assay analysiert.

Wie in Abb. 54 gezeigt, zeigten die Defektmutanten keinerlei Abschwächung der Reaktivität von NKp46-Ig, NKp30-Ig und NKp44-Ig. Die Kontrollfusionsproteine CD99-Ig und CD16-Ig färbten diese Zellen gar nicht oder nur sehr schwach an. Als weitere Kontrolle verwendeten wir einen anti-GM3-Antikörper (nicht gezeigt). LY-B und GM-95-Zellen waren eindeutig negativ als Zeichen der fehlenden GSL-Biosynthese. B16-Zellen und CHO-Zellen zeigten eine deutliche Expression von GM3, während die retransfizierten LY-B/cLCB1 nur schwach positiv waren. Anscheinend hatten die Zellen die Expression der transfizierten SPT cDNS teilweise wieder verloren.

Analyse von Glykosphingolipid-defizienten Zellen

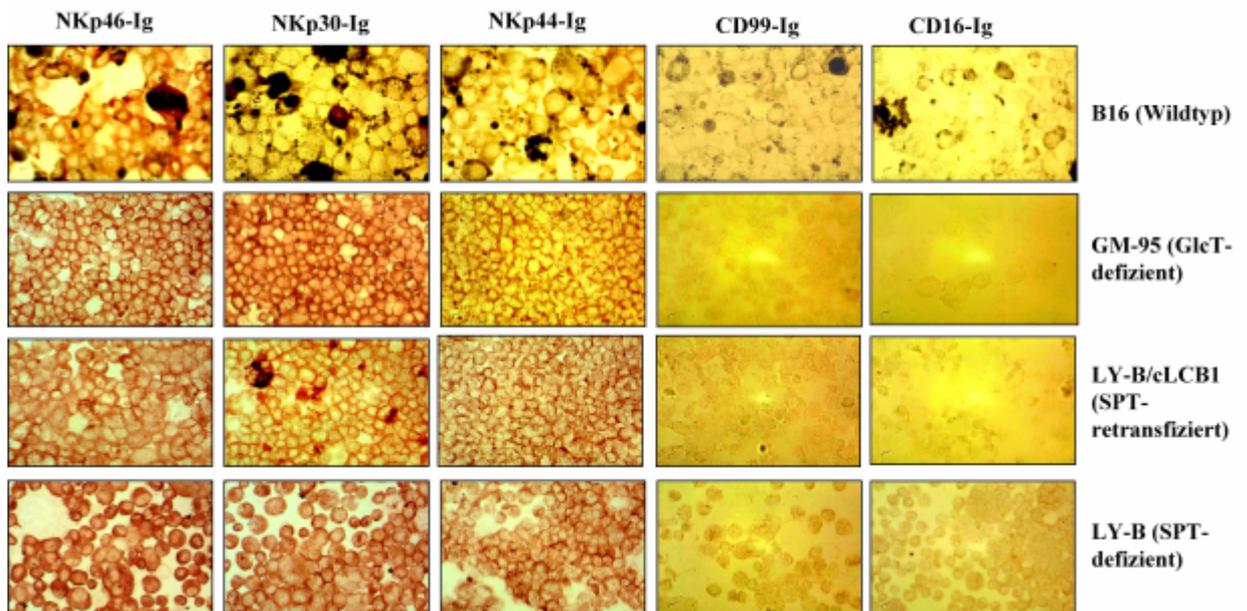


Abb. 54. NCR-Ig-Reaktivität von Glykosphingolipid-Defektmutanten. B16-Maus-Melanom-Zellen und die von B16 abgeleitete Ceramid-Glucosyltransferase(GlcT)-defiziente Mutante GM-95 zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Färbung mit den NCR-Ig-Fusionsproteinen, während CD99-Ig und CD16-Ig nicht banden. Die gleiche Situation zeigte sich bei Serinpalmitoyltransferase-defizienten LY-B CHO-Mutanten und SPT-retransfizierten LY-B-Zellen.

Ergebnisse

Die Ceramid-defiziente LY-B-Zelllinie konnte auch im Vergleich zu CHO-Zellen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber NK-Lyse geprüft werden, während die Maus-Zellen B16.6 und GM-95 nicht signifikant von humanen NK-Zellen lysiert wurden. Es zeigte sich, dass die NK-Zelllinie NK92 CHO-Zellen deutlich schlechter lysierte als LY-B-Zellen (Abb. 55A). Polyklonale NK-Zellen lysierten CHO und LY-B-Zellen etwa gleich (Abb. 55B). Der große Unterschied in der Lyseeffizienz von LY-B-Zielzellen durch NK92 und polyklonale NK-Zellen bestätigte sich in einem Wiederholungsexperiment (Abb. 55C). Anscheinend hatte das Vorhandensein von Glykosphingolipiden einen inhibitorischen Effekt auf NK92-Zellen, der jedoch in der polyklonalen NK-Population nicht deutlich wurde. Es ergaben sich insgesamt keine Anhaltspunkte dafür, dass Glykosphingolipide NK-aktivierende Funktion haben und damit als potentielle NCR-Liganden dienen können.

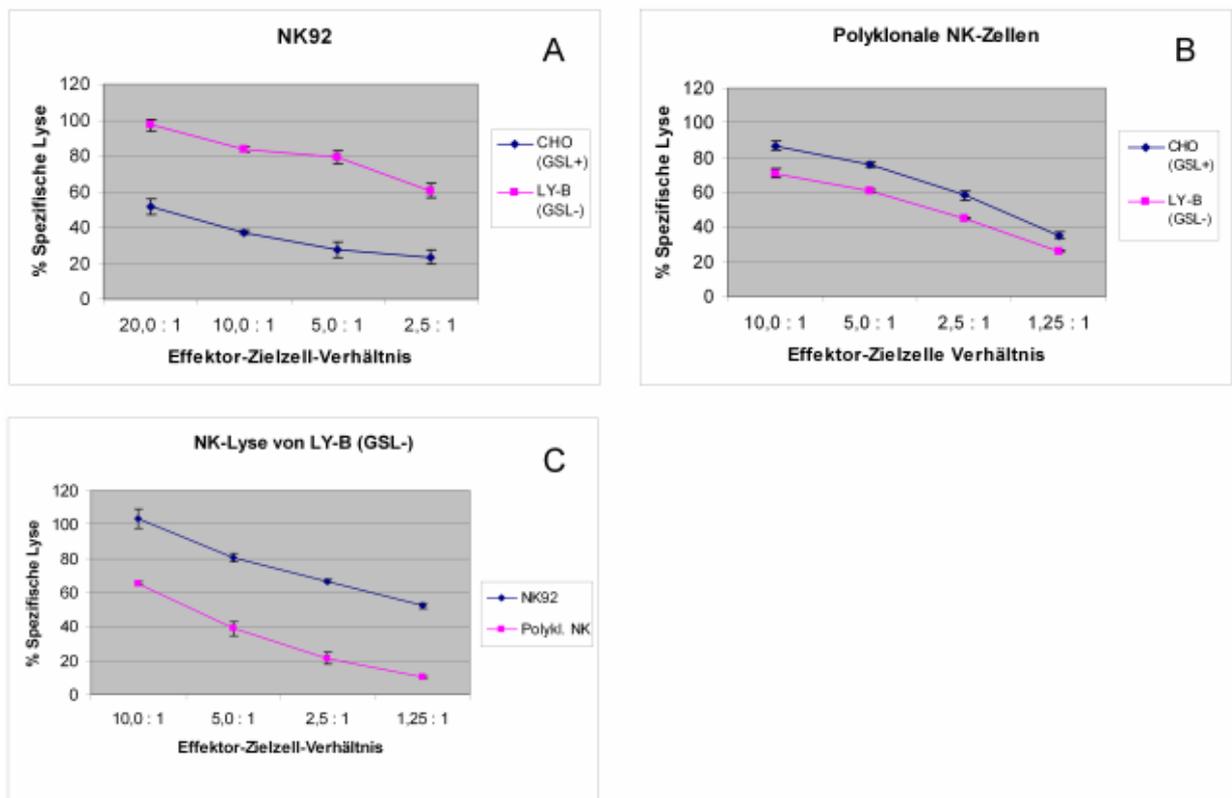


Abb. 55. NK-Zelllyse von Glykosphingolipid-exprimierenden und -defizienten CHO-Zellen. CHO-Zellen und Ceramid-Glucosyltransferase-defiziente LY-B-Zellen wurden in NK-Assays mit der NK-Zell-Linie NK92 und polyklonalen humanen NK-Zellen geprüft. NK92 lysierte die Glykosphingolipid-defiziente CHO-Mutante wesentlich effektiver als normale CHO-Zellen.

Ergebnisse

3.3.6 Analyse von zellulären Lektinen als potentielle NCR-Liganden

Als einzige bislang bekannte Liganden für NKp46 und NKp44 wurden die Hämagglutinine von Influenzavirus und Sendaivirus identifiziert (Mandelboim et al., 2001; Arnon et al., 2001). Für die Interaktion zwischen NKp46 und NKp44 auf der einen Seite und viralen Hämagglutininen auf der anderen Seite ist die Sialylierung dieser NCR von Bedeutung, so dass die Hämagglutinine als Lektine fungieren. Nachdem wir mit den bisher verwendeten methodischen Ansätze die zellulären Liganden von NKp46, NKp44 und NKp30 weder als Protein noch als Glykolipid eindeutig identifizieren konnten, verfolgten wir im dritten Teil der Arbeit die Arbeitshypothese, dass in nicht virus-infizierten Zellen zelluläre Lektine die Bindungspartner von NKp44 und NKp46 sein könnten.

3.3.6.1 Analyse von L-Selektin, P-Selektin und Mannose-6-Phosphatrezeptor

Das C-Typ-Lektin CD62L (L-Selektin) ist auf Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten exprimiert und erkennt hochgradig glykosylierte, fucosylierte und sulfosialylierte Glykoproteine wie CD34, GlyCAM-1 oder MAdCAM-1. NKp44 ist hochgradig *O*-glykosyliert und käme daher theoretisch als Bindungspartner von CD62L in Frage. Auch NKp46 trägt *N*- und *O*-verknüpfte, sialylierte Glykane. CD62L-defiziente und retransfizierte 300-19 Zellen (eine Variante des Maus-B-Zell-Lymphoms A20) standen uns zur Verfügung (Prof. P. Altevogt, DKFZ Heidelberg). Immunperoxidase-Cytospinfärbungen von 300-19 und 300-19/CD62L zeigten jedoch keine Unterschiede in der Reaktivität mit NKp46-Ig und NKp44-Ig (nicht gezeigt). Leider konnten die 300-19-Zellen nicht im NK-Assay geprüft werden, weil die humanen NK-Effektoren diese murinen Zielzellen sehr schlecht lysierten.

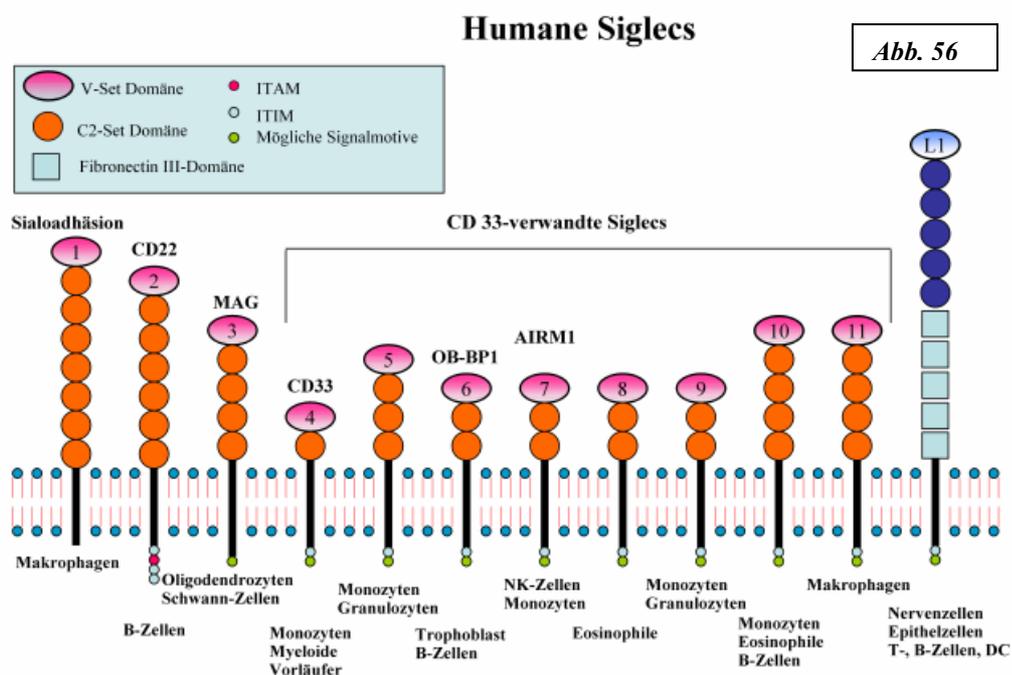
CD62P (P-Selektin) wird auf Endothelzellen und Thrombozyten exprimiert. Bekannte Liganden für CD62P sind CD162 (PSGL-1), das auf Zellen der myeloiden und lymphoiden Reihe exprimiert wird, sowie CD24, das auf myeloiden Zellen und Tumorzellen anzutreffen ist. Wir erhielten CD62P-transfizierte CHO-Zellen von Prof. P. Altevogt, die wir mit untransfizierten CHO-Zellen verglichen. CHO/CD62P- und normale CHO-Zellen wurden effizient durch polyklonale humane NK-Zellen und NK92 lysiert, ohne dass ein signifikanter Unterschied in der Lyse dieser Zielzelle erkennbar wurde (nicht gezeigt).

Ergebnisse

Wir konnten auch keine Beteiligung des Calcium-unabhängigen Mannose-6-Phosphatrezeptors (MPR300) an der Bindung von NKp46-Ig und NKp44-Ig nachweisen. Die Präinkubation von HeLa-Zellen mit einem polyklonalen MPR300-spezifischen Antiserum und die Präinkubation mit dem MPR300-Substrat Thyroglobulin waren nicht in der Lage, die Bindung von NKp46 und NKp44 zu blockieren (nicht gezeigt).

3.3.6.2 Analyse von L1-CAM und anderen Siglecs als potentielle Liganden von NKp46 und NKp44

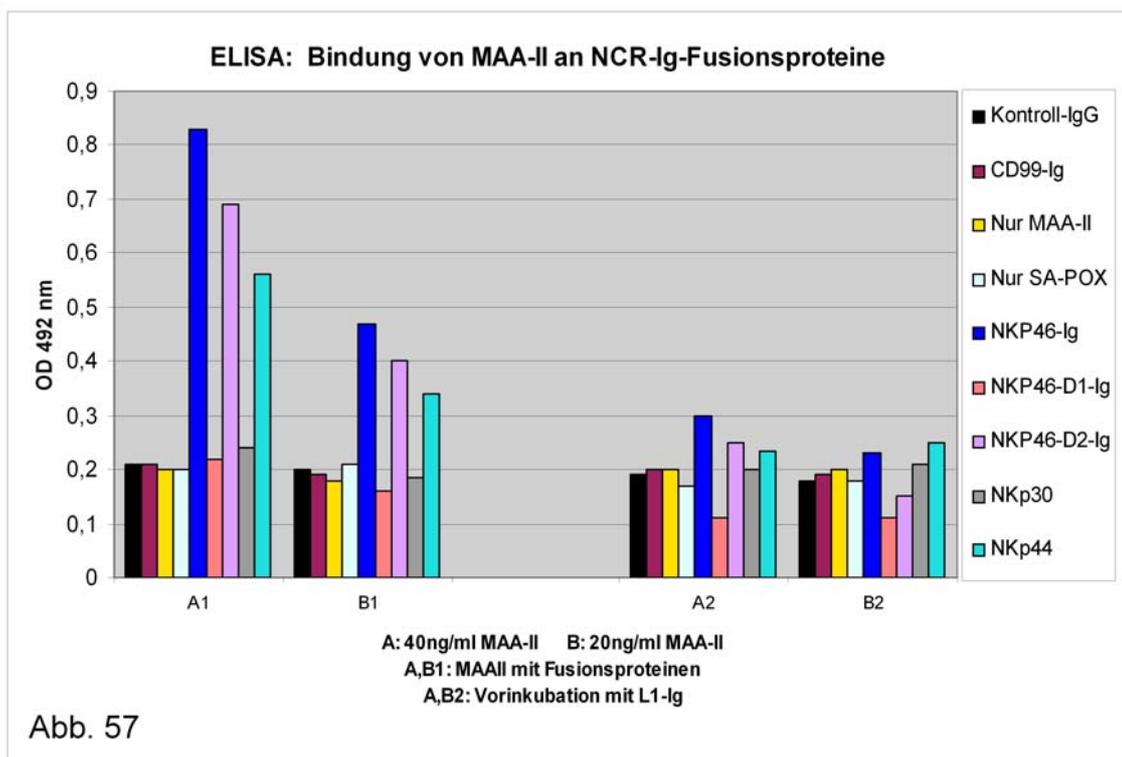
Als nächstes befassten wir uns mit der Familie der I-Lektine, die mehrere Ig-ähnliche Domänen besitzen. Zu den I-Lektinen zählen die Moleküle Siglec-1 bis -11 sowie das entfernter verwandte L1-CAM (L1, CD171). Die Siglecs und L1-CAM erkennen terminale Sialinsäurereste, wobei die Spezifität für die Art der Verknüpfung ($\alpha 2,3$; $\alpha 2,6$; $\alpha 2,8$) variiert (Crocker, 2002). Die Siglecs 1-11 haben allesamt unterschiedliche zelluläre Expressionsmuster und werden auf B-Zellen, Makrophagen, Monozyten, neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten, NK-Zellen sowie Oligodendrozyten und Schwann-Zellen exprimiert (Abb. 56). Das humane L1-Molekül fungiert als Adhäsionsmolekül in homotypischen und heterotypischen Zell-Zell-Interaktionen (Kadmon und Altevogt, 1997; Hortsch, 2000). Es ist involviert bei der Migration von Nervenzellen (Moos et al., 1988; Cohen et al, 1998), spielt aber auch eine Rolle als kostimulierendes Molekül in T-Zellen (Balaian et al., 2000).



Ergebnisse

L1-CAM wird auf humanen neuroektodermalen Tumoren (Melanom, Neuroblastom), Karzinomen (Lunge, Niere, Haut, Ovar, Uterus) und Monozytenleukämien exprimiert (Thies et al., 2002). Zahlreiche Liganden für L1 sind beschrieben worden, wozu u.a. L1 selbst, Laminin, CD24, CD56 und verschiedene Integrine zählen.

Von Prof. P. Altevogt, DKFZ Heidelberg, wurde uns freundlicherweise rekombinantes L1-Ig/Fc Fusionsprotein zur Verfügung gestellt. Dieses enthielt sämtliche 6 Ig-ähnlichen und 5 Fibronectin-III-Domänen des extrazellulären Teils von L1, die mit dem Fc-Teil von humanem IgG₁ fusioniert waren. Von Dr. K. Streng (Institut für Biochemie, Universität Bremen) erhielten wir freundlicherweise rekombinantes Siglec-2-Ig/Fc, Siglec-4-Ig/Fc, Siglec-7-Ig/Fc und Siglec-9-Ig/Fc. Wir studierten die Bindung von L1-Ig an NCR-Proteine zunächst in ELISA-Platten. Zunächst wurden über Ziege-anti-Human-IgG verschiedene NCR-Ig-Fusionsproteine gebunden. Es folgte eine Inkubation mit L1-Ig (als Kulturüberstand einer L1-Ig/Fc sezernierenden Linie) oder irrelevanten Überständen. Als Reporter für die von L1 möglicherweise blockierten Carbohydate in NCR-Proteinen wurden biotinylierte Lektine benutzt, die mit Streptavidin-Peroxidase nachgewiesen wurden. MAAII (*Maackia amurensis* Lektin II) erkennt spezifisch Neu5Ac- α 2,3-Gal- β 1,4-GlcNAc und SNA (*Sambucus nigra* Lektin) Neu5Ac- α 2,6-Gal/GalNAc (Shibuya et al., 1987; Wang und Cummings 1988; Ulloa und Real, 2001).



Ergebnisse

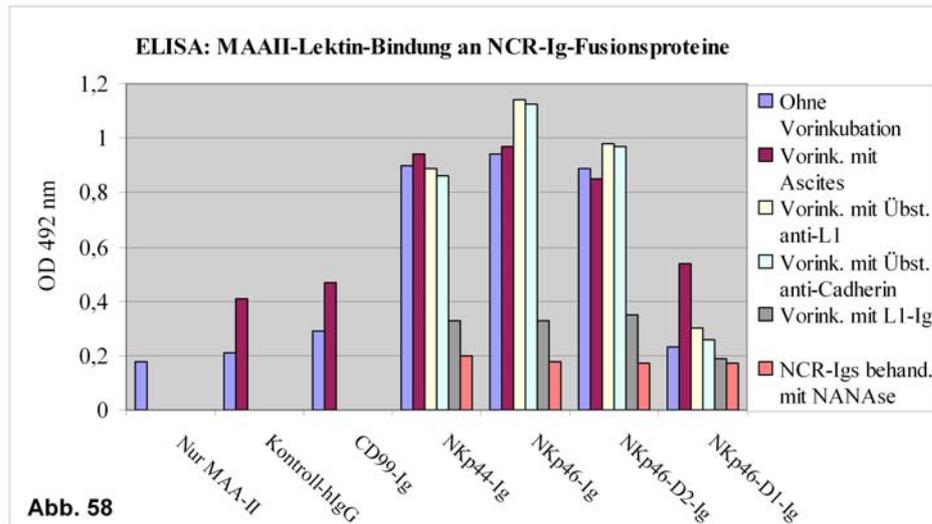


Abb. 57/58. L1 inhibiert die Bindung von MAA-II-Lektin an NKp46-Ig und NKp44-Ig im ELISA. Eine mit Ziege-anti-Human-IgG beschichtete ELISA-Platte wurden mit NKp46-Ig, NKp46-D1-Ig, NKp46-D2-Ig, NKp44-Ig, NKp30-Ig bzw. mit CD99-Ig oder Human-IgG zur Kontrolle inkubiert. Zugängliche α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren wurden anschließend mit dem biotinylierten Lektin MAA-II plus Streptavidin-Peroxidase (SA-POX) und Orthophenylendiamin/H₂O₂ als Substrat nachgewiesen. Diese Reaktion war effizienter bei Verwendung von 40 ng/ml MAA-II (Abb. 57). Die Inkubation mit L1-Ig-Fusionsprotein im Anschluss an die NCR-Ig-Bindung inhibierte die nachfolgende MAA-II-Lektinbindung an NKp46, NKp46-D2 und NKp44 (Abb. 57 A,B2; Abb. 58 graue Balken). L1-Ig lag als Kulturüberstand von transfizierten COS-Zellen vor. Die Inkubation mit irrelevanten Kulturüberständen (Abb. 58: Ascites, anti-L1-Antikörper, anti-Cadherin-Antikörper) hatte keinen blockierenden Effekt. Nachdem NKp44-Ig und NKp46-(D2)-Ig durch Agarose-gebundene Neuraminidase desialyliert wurden, reduzierte sich die MAA-II-Bindung auf Hintergrundniveau („Nur MAA-II“).

In den Abb. 57 und 58 ist gezeigt, dass L1 die Bindung von MAAII-Biotin an Kontroll-IgG, NKp46-Ig, NKp46-D2-Ig und NKp44-Ig drastisch reduziert. MAAII band nicht an die Fusionsproteine CD99-Ig, NKp46-D1-Ig und NKp30-Ig und die L1-Vorinkubation hatte folgerichtig keinen Einfluss. Die Vorinkubation mit irrelevanten Überständen (Ascites, anti-L1-Antikörper, anti-Cadherin-Antikörper) hatte keinen inhibitorischen Effekt.

Dasselbe Experiment wurde auch mit SNA-Biotin durchgeführt (Abb. 59). Da Immunglobulin *N*-glykosyliert ist und anscheinend α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren besitzt, band SNA bereits stark an die mit Ziege-anti-Human-IgG beschichteten Platten. Die NCR-Fusionsproteine führten nur zu einer leichten Steigerung der SNA-Bindung. Diese wurde jedoch nicht durch L1-Ig-Vorinkubation reduziert. Es lässt sich daher feststellen, dass NKp46, NKp46-D2 und NKp44 α 2,3-verknüpfte Sialinsäurereste aufweisen und dass L1 die Bindung von MAA-II-Lektin an diese NCR blockieren

Ergebnisse

konnte. Die Bindung von MAA-II an NKp44-Ig und NKp46-Ig hing eindeutig mit ihrer Sialylierung zusammen, da Neuraminidase-behandelte Fusionsproteine keine MAA-II-Reaktivität mehr zeigten (Abb. 58 und 60). Die Neuraminidase-behandelten NKp44-Ig und NKp46-Ig konnten jedoch noch an die ELISA-Platte binden und ließen sich dort mit monoklonalen Antikörpern gegen NKp46 und NKp44 nachweisen (Abb. 60).

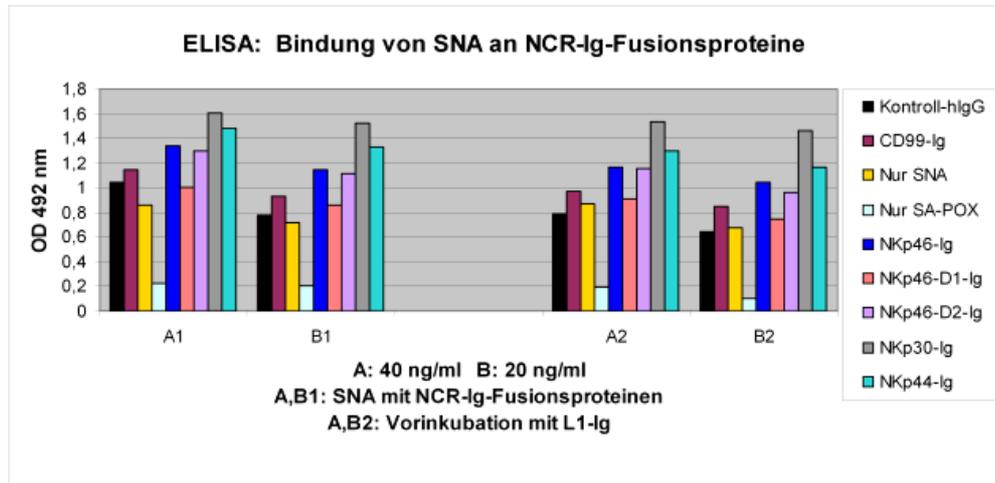


Abb. 59. Bindung von SNA-Lektin an NCR-Ig-Fusionsproteine im ELISA. Eine mit Ziege-anti-Human-IgG beschichtete ELISA-Platte wurden mit NKp46-Ig, NKp46-D1-Ig, NKp46-D2-Ig, NKp44-Ig, NKp30-Ig bzw. mit CD99-Ig oder Human-IgG zur Kontrolle inkubiert. Zugängliche α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren wurden anschließend mit dem biotinylierten Lektin SNA plus Streptavidin-Peroxidase (SA-POX) nachgewiesen. Alle Fusionsproteine wiesen eine starke Bindung von SNA-Lektin auf und diese Bindung war nicht durch Vorinkubation mit L1-Ig zu blockieren.

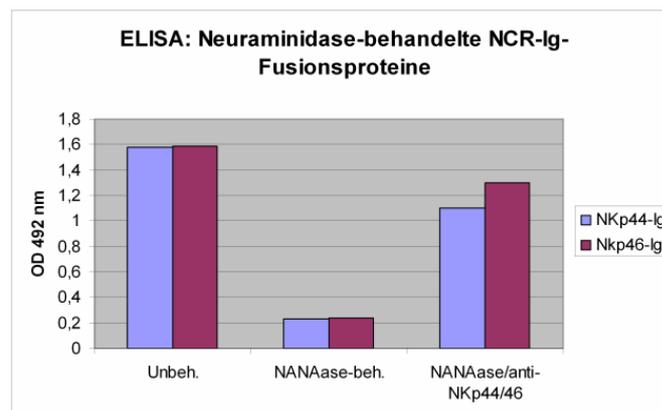


Abb. 60. Bindung von MAA-II-Lektin an sialylierte NCR-Ig-Fusionsproteine im ELISA. Eine mit Ziege-anti-Human-IgG beschichtete ELISA-Platte wurde entweder mit unbehandelten NKp46-Ig oder NKp44-Ig oder mit Neuraminidase-vorbehandelten NKp46-Ig bzw. NKp44-Ig inkubiert. Biotinyliertes MAA-II-Lektin (40 ng/ml) band nicht mehr an desialylierte NCR-Ig-Fusionsproteine. Die Bindung von desialyliertem NKp46-Ig bzw. NKp44-Ig an die ELISA-Platte konnte jedoch mit monoklonalen Antikörpern gegen NKp46 bzw. NKp44 plus Ziege-anti-Maus-IgG-POX nachgewiesen werden.

Ergebnisse

Als nächstes untersuchten wir, ob rekombinante Siglecs ebenfalls in der Lage waren, die Bindung von MAA-II an NCR-Fusionsproteine zu blockieren. Die verwendeten Siglec-2 (CD22), Siglec-4 (MAG), Siglec-7 und Siglec-9-Moleküle besitzen eine unterschiedliche Spezifität für NeuAc-Verknüpfungen (Siglec-2: $\alpha 2,6$; Siglec-4: $\alpha 2,3 \gg \alpha 2,6$; Siglec-7: $\alpha 2,8 \gg \alpha 2,6 > \alpha 2,3$; Siglec-9: $\alpha 2,3 = \alpha 2,6$) (Crocker, 2002). Daher konnte man eine Inhibition der MAA-II-Bindung durch Siglec-4 und Siglec-9 vermuten. Wie in Abb. 61 gezeigt, hatte jedoch keines der Siglec-Ig/Fc-Fusionsproteine (eingesetzte Konzentration: 20 $\mu\text{g/ml}$) einen inhibitorischen Effekt auf die MAA-II-Bindung an NKp46 oder NKp44. Möglicherweise waren die Carbohyrate für die Siglec-Ig-Fusionsproteine konformationell nicht zugänglich. L1-Ig inhibierte wiederum effektiv die MAA-II-Bindung an NKp46 und, in etwas geringerem Maße, an NKp44. Fusionsproteine, die nur die erste membrandistale Ig-Domäne von L1 (L1-D1-Ig) oder die Ektodomäne von Her2/neu enthielten, hatten keinen inhibitorischen Effekt (Abb. 61).

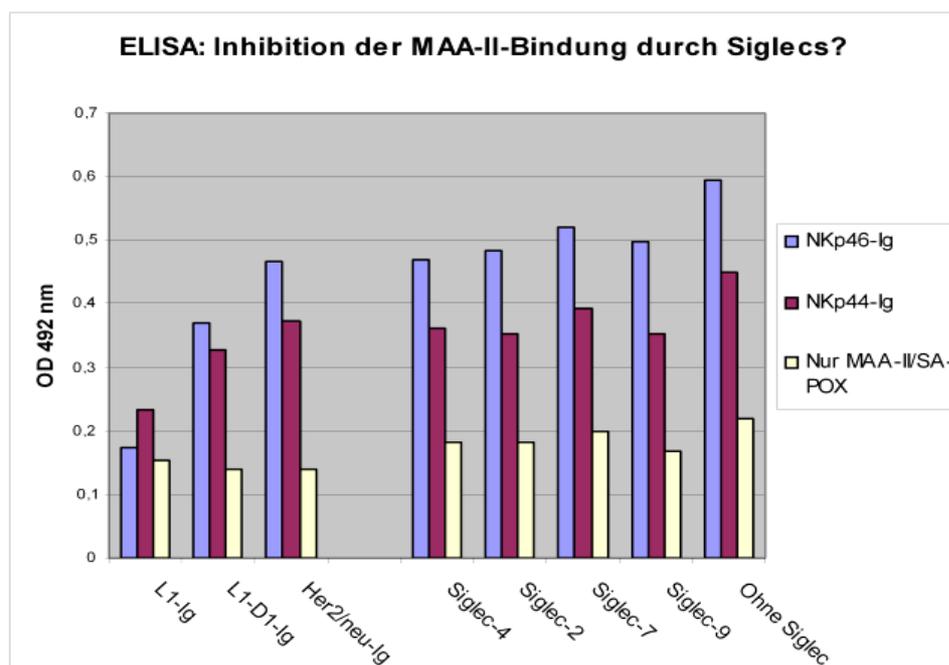


Abb. 61. Prüfung der Inhibition der MAA-II-Lektin-Bindung durch Siglecs im ELISA. NKp46-Ig bzw. NKp44-Ig wurden zunächst an eine mit Ziege-anti-Human-IgG beschichtete ELISA-Platte gebunden. Es folgte eine Inkubation mit Siglec-Ig-Fusionsproteinen (20 $\mu\text{g/ml}$) bzw. Kulturüberständen mit L1-Ig, L1-D1-Ig oder Her2/neu-Ig. Anschließend wurden exponierte $\alpha 2,3$ -Neuraminsäurereste durch biotinyliertes MAA-II-Lektin (40 ng/ml) und SA-POX nachgewiesen. Die Vorinkubation mit L1-Ig blockierte die MAA-II-Bindung, nicht jedoch die Vorinkubation mit Siglec-2, 4, 7, 9-Ig oder L1-D1-Ig oder Her2/neu-Ig.

Ergebnisse

Um einen direkten Hinweis auf die Interaktion von L1 und NKp46 bzw. NKp44 zu erhalten wurden mit NKp46-Ig, NKp46-D1-Ig, NKp46-D2-Ig bzw. NKp44-Ig beschichtete ELISA-Platten mit L1-Ig inkubiert. Gebundenes L1 konnte über den L1-spezifischen biotinylierten Antikörper UJ127.11 (Fogel et al., 2003) und Streptavidin-Peroxidase nachgewiesen werden. Da die ELISA-Platten mit Anti-Human-IgG beschichtet waren, gab es eine deutliche Bindung von L1-IgG/Fc auch in Abwesenheit von NCR-Fusionsproteinen (Abb. 62). Nach Vorinkubation mit NCR-Ig/Fc Fusionsproteinen ließ sich jedoch die L1-Bindung über anti-L1-Biotin doppelt so stark nachweisen. Interessanterweise band L1 nicht nur an NKp46 und NKp46-D2, sondern auch an die membrandistale NKp46-Domäne D1, welche keine MAA-II-reaktiven Neuraminsäurereste aufweist. Dieses Experiment bestätigte also die Interaktion von L1 mit NKp46 und NKp44.

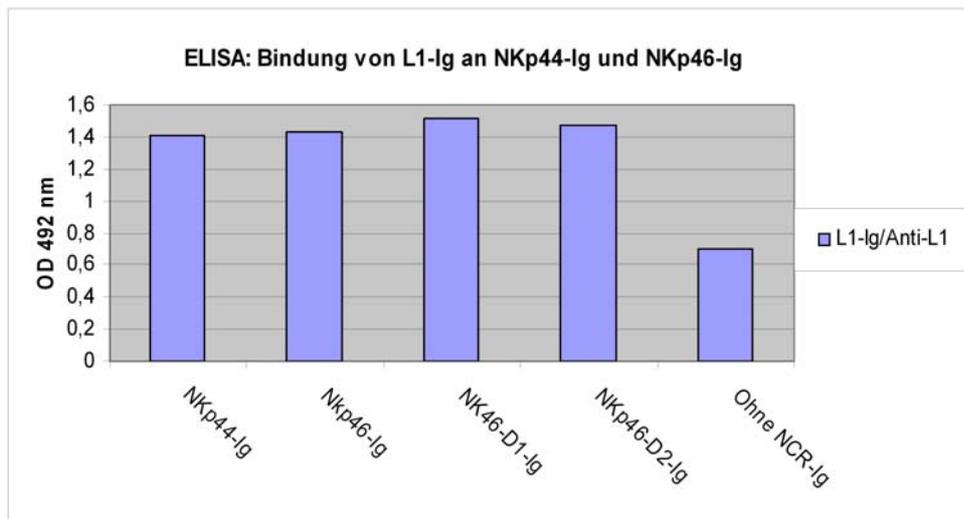


Abb. 62. Bindung von L1 an NCR-Ig-Fusionsproteine im ELISA. NKp46-Ig, NKp46-D1-Ig, NKp46-D2-Ig bzw. NKp44-Ig wurden zunächst an eine mit Ziege-anti-Human-IgG beschichtete ELISA-Platte gebunden. Es folgte eine Inkubation mit dem biotinylierten anti-L1-Antikörper UJ127.11 und Streptavidin-Peroxidase. L1-Ig band an alle NCR-Ig.

Um einen Hinweis auf die Interaktion von L1 und NKp46 bzw. NKp44 unter halbwegs physiologischen Bedingungen zu erhalten, wurden zytofluorimetrische Analysen mit untransfizierten 293-Zellen und L1-transfizierten 293-Zellen durchgeführt, die wir von Prof. P. Altevogt erhielten.

Die Färbung von 293 und 293-L1 mit dem L1-spezifischen Antikörper UJ127.11 belegte, dass untransfizierte 293-Zellen signifikante Mengen an L1 exprimierten

Ergebnisse

(mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) 112; #1 in Abb. 63), während die L1-Transfektanten deutlich größere Mengen exprimierten (MFI 708). Für einige NK-Assays wurde später auch eine andere untransfizierte 293-Linie (#2 in Abb. 63) verwendet, die konstitutiv wesentlich weniger L1 exprimiert (MFI 10).

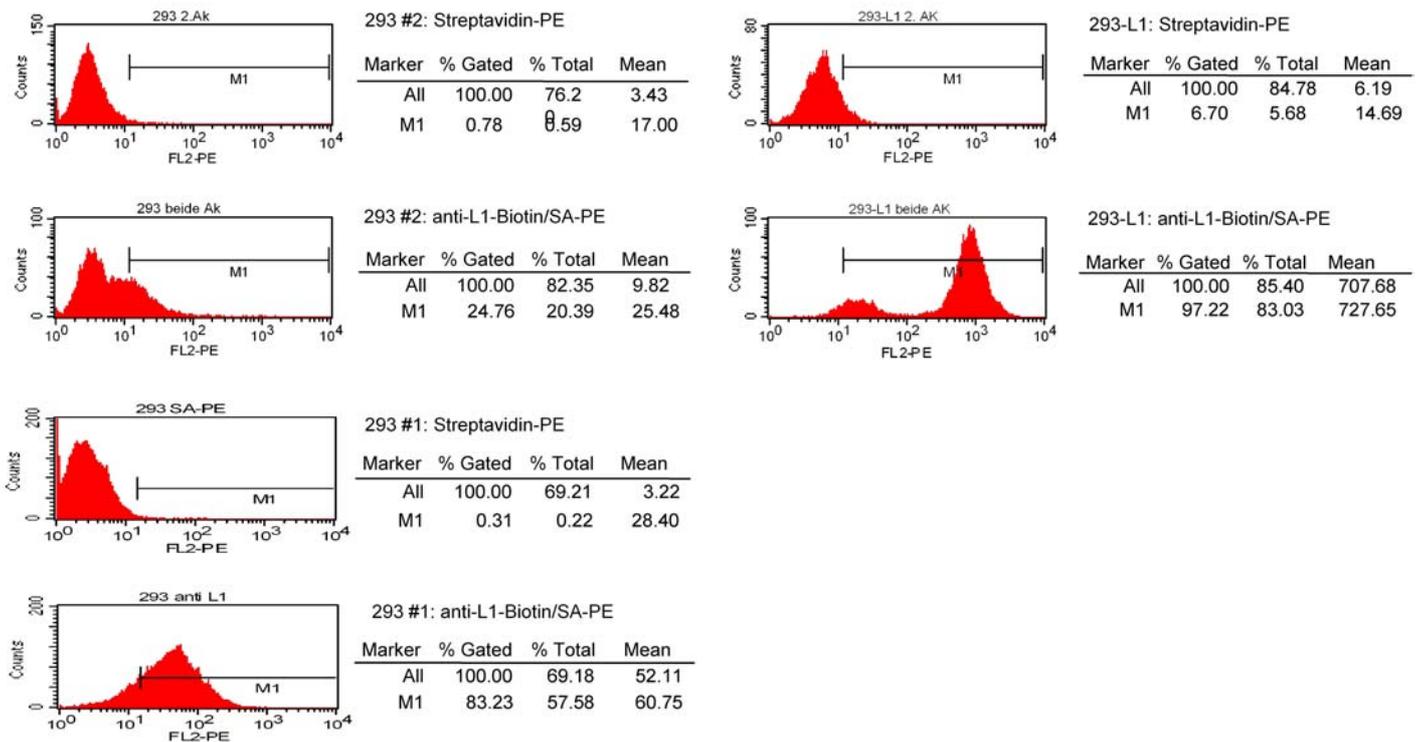


Abb. 63. Cytofluorimetrischer Nachweis von L1. Zwei 293-HEK-Linien aus verschiedenen Quellen sowie L1-transfizierte 293-Zellen wurden im FACS mit dem biotinylierten Antikörper UJ127.11 auf L1-Expression überprüft. Zur Kontrolle wurde mit Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) allein gefärbt.

Die 293-L1 und 293 #1 wurden mit NKp46-Ig und NKp44-Ig und zur Kontrolle mit CD99-Ig inkubiert. NKp46-Ig band stärker an 293-L1 (MFI 32) als an 293 (MFI 14), und NKp44-Ig band ebenfalls etwas stärker an 293-L1 (MFI 29) als an 293 (MFI 17), während CD99-Ig keine Änderung zeigte (Abb. 64). Die Daten konnten in einem hier nicht gezeigten Wiederholungsexperiment bestätigt werden (NKp46-Ig: 293 MFI 17, 293-L1 MFI 50; NKp44-Ig: 293 MFI 48, 293-L1 MFI 73; CD99-Ig: 293 MFI 16, 293-L1 MFI 15). Diese Ergebnisse belegten, dass eine starke L1-Oberflächenexpression die Bindung von NKp46-Ig und NKp44-Ig steigern kann.

Ergebnisse

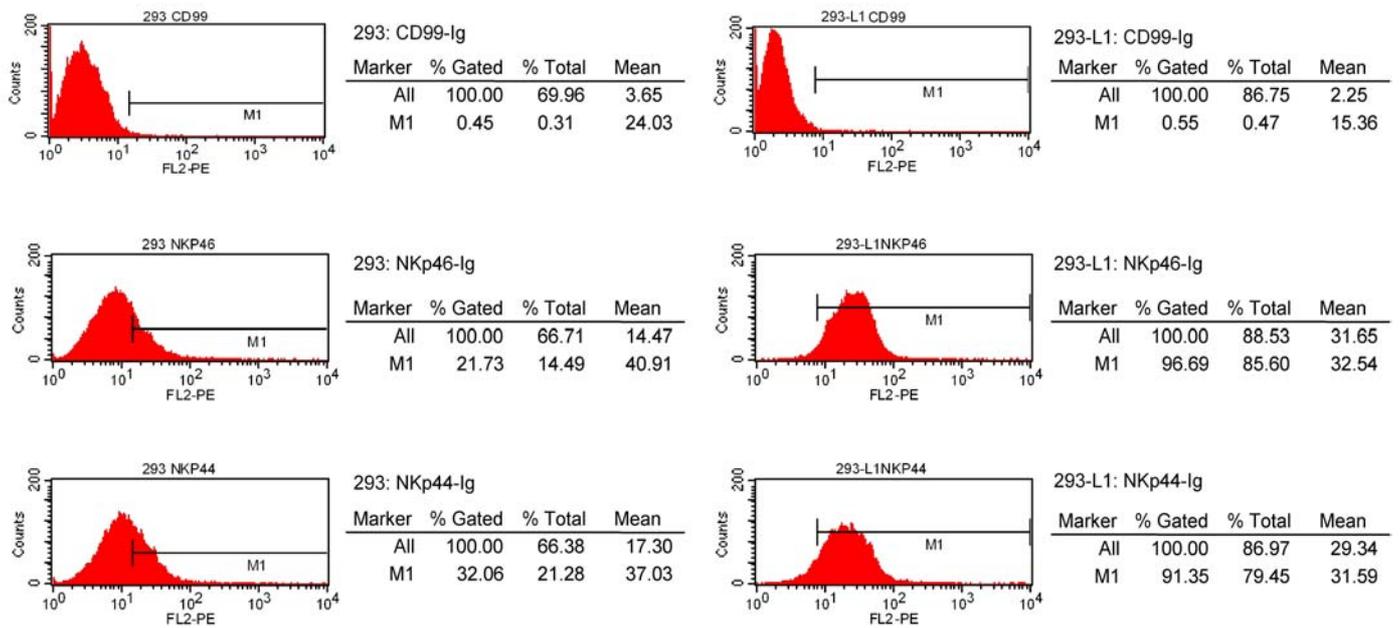


Abb. 64. Cytofluorimetrische Färbung mit NCR-Ig. 293 #1 sowie 293-L1-Transfektanten wurden mit NKp46-Ig, NKp44-Ig und CD99-Ig (als Negativkontrolle) inkubiert. Die Bindung wurde mit Ziege-anti-Human-IgG-Biotin und SA-PE nachgewiesen. In Gegenwart von L1 war die NKp46- und NKp44-Bindung verstärkt nachzuweisen.

In weiteren Experimenten wurde nun abgeklärt, ob polyklonale humane NK-Zellen bzw. NK92-Zellen 293 und 293-L1 mit unterschiedlicher Effizienz lysieren. Die Abbildung 65 zeigt, dass NK92 allgemein die 293-Zellen nicht sehr effizient lysieren. 293-L1 wurden im Vergleich zu den untransfizierten 293 #1 etwas besser lysiert. Dieser Unterschied wurde wesentlich deutlicher, wenn die 293-Zellen mit geringer konstitutiver L1-Expression (293 #2, MFI=10, siehe Abb. 63) verwendet wurden (Abb. 65). Bei Verwendung von polyklonalen, aktivierten NK-Zellen eines humanen Spenders fanden wir eine ca. dreifach effizientere Lyse der L1-transfizierten 293-Zellen (Abb. 66). Dieses Ergebnis, das mit NK-Zellen von 2 weiteren Spendern reproduziert werden konnte, lässt den Schluss zu, dass L1 ein NK-aktivierendes Molekül ist. Bei polyklonalen NK-Zellen von zwei anderen Spendern ließ sich jedoch der stimulierende Einfluss von L1 nicht deutlich zeigen.

Ergebnisse

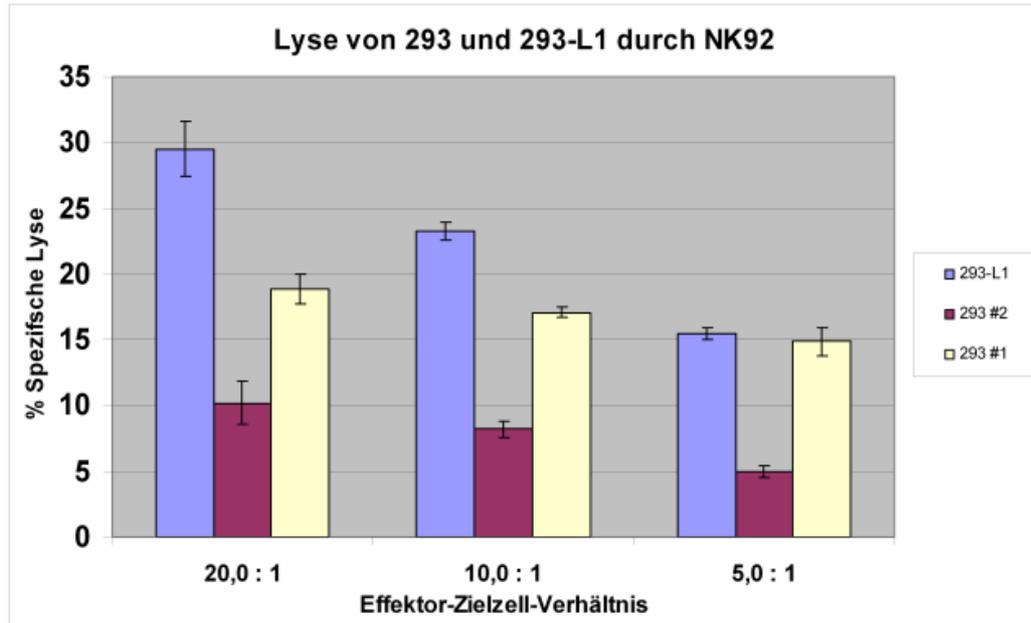


Abb. 65. NK-Cytolyse von 293 und 293-L1-Zellen durch NK92. Untransfizierte 293 #1 (MFI für L1 = 112), 293 #2 (MFI für L1 = 10) und 293-L1-Transfektanten (MFI für L1 = 708) wurden im NK-Assay mit der NK-Zelllinie NK92 analysiert. Die Expression von L1 korrelierte gut mit der Lyse-Effizienz.

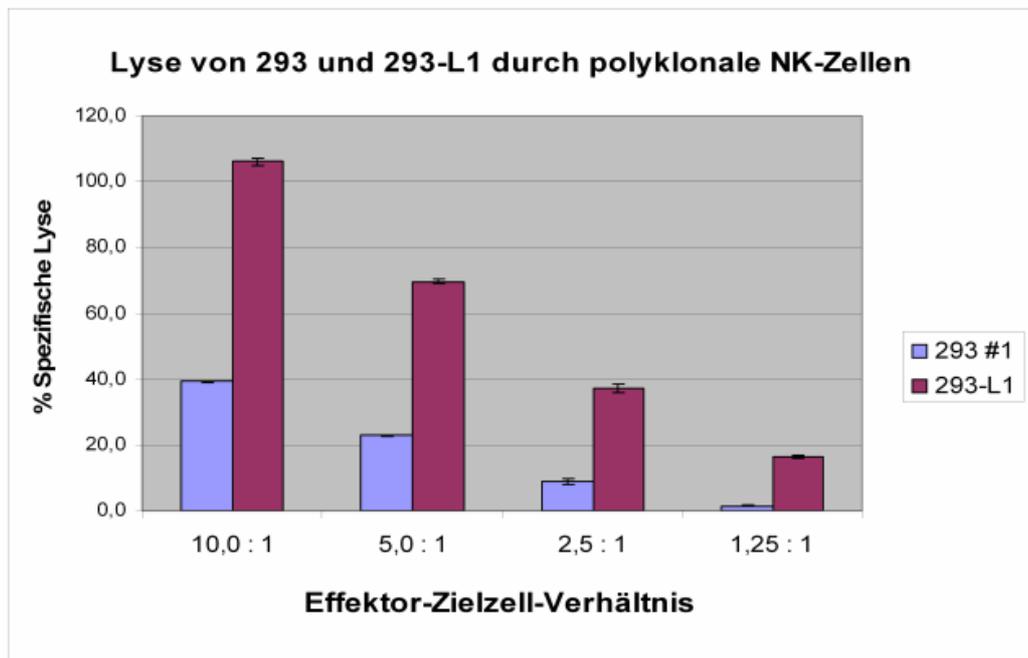


Abb. 66. NK-Cytolyse von 293 und 293-L1-Zellen durch NK92. Untransfizierte 293 #1 (MFI für L1 = 112) und 293-L1-Transfektanten (MFI für L1 = 708) wurde im NK-Assay mit polyklonalen humanen NK-Zellen analysiert. Die Expression von L1 korrelierte gut mit der Lyse-Effizienz.

Ergebnisse

Wir analysierten nicht nur polyklonale, aktivierte Populationen von NK-Zellen, sondern auch NK-Klone, die innerhalb 2-3 Wochen aus solchen Populationen nach Klonierung durch limitierte Verdünnung auswuchsen. Die Abb. 67A/B zeigt einen Cytotoxizitätsassay mit 12 solcher Klone sowie mit 293-L1 und 293-Zellen als Zielzellen. Es ergab sich ein heterogenes Bild. Die Mehrzahl der Klone lysierte 293-L1-Zellen besser (#1, 2, 5, 7, 8, 12), andere Klone lysierten beide Zellen etwa gleich stark (#4, 6, 9, 15) und wieder andere Klone lysierten 293-Zellen stärker als 293-L1 (#11, 14). Bei einem weiteren Spender erhielten wir mehr Klone, die 293 besser lysierten als 293-L1.

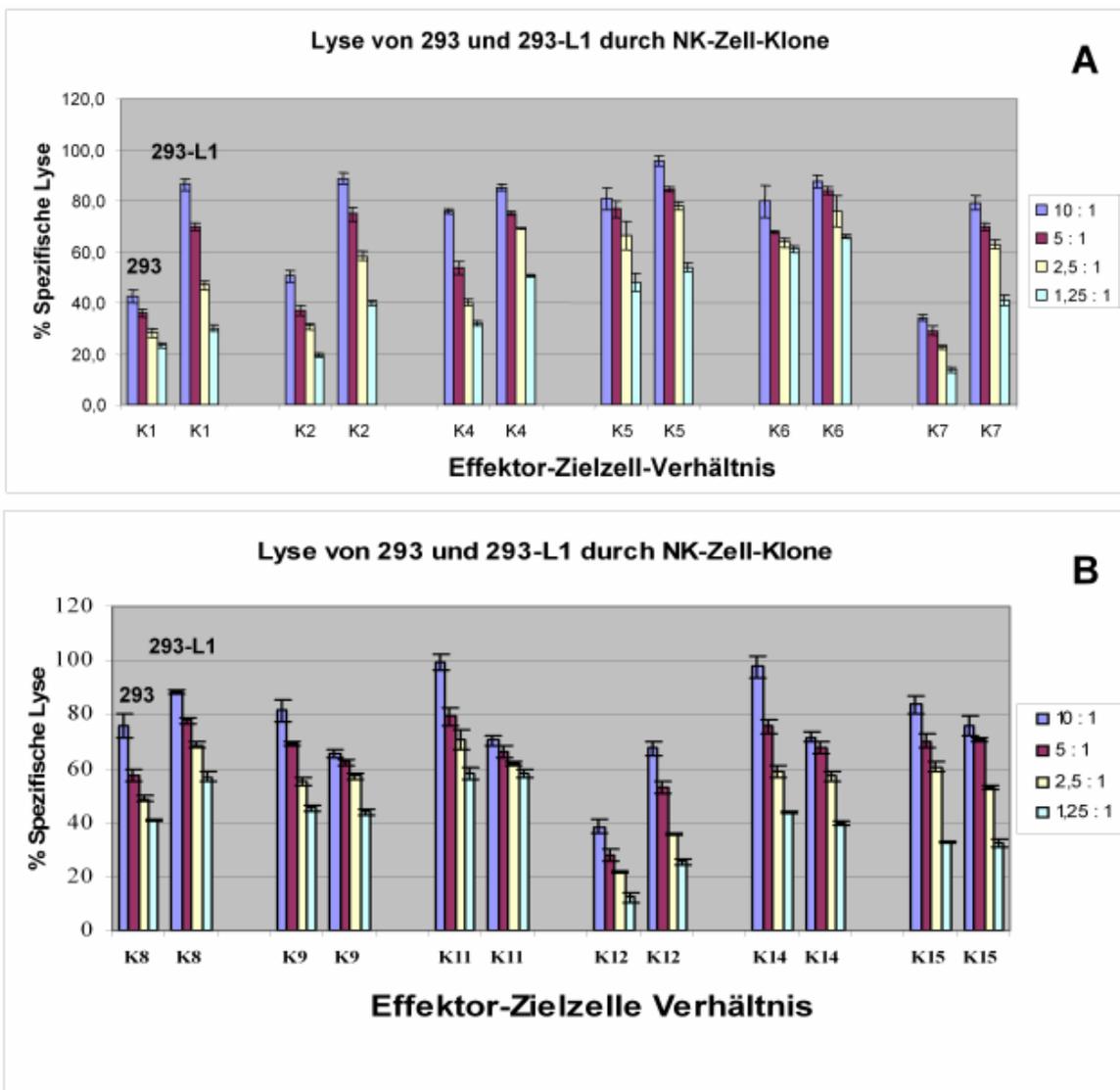


Abb. 67. Cytotoxizitätstests mit Klonen aus einer humanen polyklonalen NK-Population. Zwölf NK-Klone eines humanen Spenders wurden im NK-Assay mit 293 #1 und 293-L1 getestet. Die linksseitigen Gruppen sind immer 293 und die rechtsseitigen Gruppen immer 293-L1. Das Ergebnis zeigt, dass diese NK-Klone sich unterschiedlich in Bezug auf die bevorzugte Lyse von L1-transfizierten 293 oder untransfizierten 293 verhielten.

Ergebnisse

In einem weiteren Ansatz versuchten wir, die verstärkte NK-Cytolyse von 293-L1-Zellen durch Vorinkubation mit dem L1-spezifischen monoklonalen IgG-Antikörper UJ127.11 zu blockieren. Parallel wurden polyklonale NK-Zellen mit monoklonalen IgG-Antikörpern gegen NKp46, NKp44 und NKp30 vorinkubiert, um die aktivierenden Rezeptoren zu blockieren. Dieses Experiment implizierte das Problem, dass IgG-Antikörper über eine CD16-Bindung NK-Zellen generell auch stimulieren können bzw. nach Bindung an Zielzellen NK-Zellen über CD16 konjugieren können („redirected targeting“). Trotz dieser potentiell unspezifisch aktivierenden Wirkung von Antikörpern fanden wir jedoch, dass die Antikörper inhibitorische Effekte auf die NK-Lyse hatten. Während anti-NKp44 nur einen geringen inhibitorischen Effekt zeigte, war dieser deutlicher bei anti-NKp30 und anti-NKp46 (Abb. 68A). Die gleichzeitige Blockade von NKp46 und NKp30 bzw. allen 3 NCR führte zu einer klaren Suppression der Cytolyse. Die Vorinkubation von 293-L1-Zellen mit anti-L1 führte ebenfalls zu einer signifikanten Verminderung der Cytolyse. Dieses Experiment zeigte erstens, dass die polyklonalen NK-Zellen dieses Spenders synergistisch über NKp46 und NK30 aktiviert wurden, und zweitens, dass der aktivierende Effekt von L1 durch einen L1-spezifischen Antikörper, der L1 in der vorletzten membranproximalen Domäne erkennt, teilweise blockiert werden konnte. Die Inhibition durch anti-L1 entsprach in etwa derjenigen durch anti-NKp46. Es ließ sich aus diesem Experiment dennoch nicht direkt schließen, dass L1 mit NKp46 interagiert hatte.

Das gleiche Experiment wurde auch mit 293 #1 durchgeführt, die wenig endogenes L1 exprimieren (Abb. 68B). Zufällig verwendeten wir im gesamten Experiment polyklonale NK-Zellen von einem Spender, dessen NK-Zellen nicht sehr gut zwischen L1-positiven und negativen 293-Zellen diskriminierten. Daher war auch die Cytolyse von 293^{L1(+)} vergleichsweise stark. Die Mischung aus anti-NKp46 und anti-NKp30 hatte auch hier einen inhibitorischen Effekt auf die NK-Zellen. Anti-NKp44 hatte keine inhibitorische Wirkung und auch die Vorinkubation von Zielzellen mit anti-L1 konnte die Cytolyse nicht signifikant reduzieren. Dieses Experiment zeigt, dass 293-Zellen auch in weitgehender Abwesenheit von L1 über NKp46 und NKp30 lysiert werden können und dass somit NKp46 und NKp30 außer L1 auch noch andere Liganden besitzen müssen.

Ergebnisse

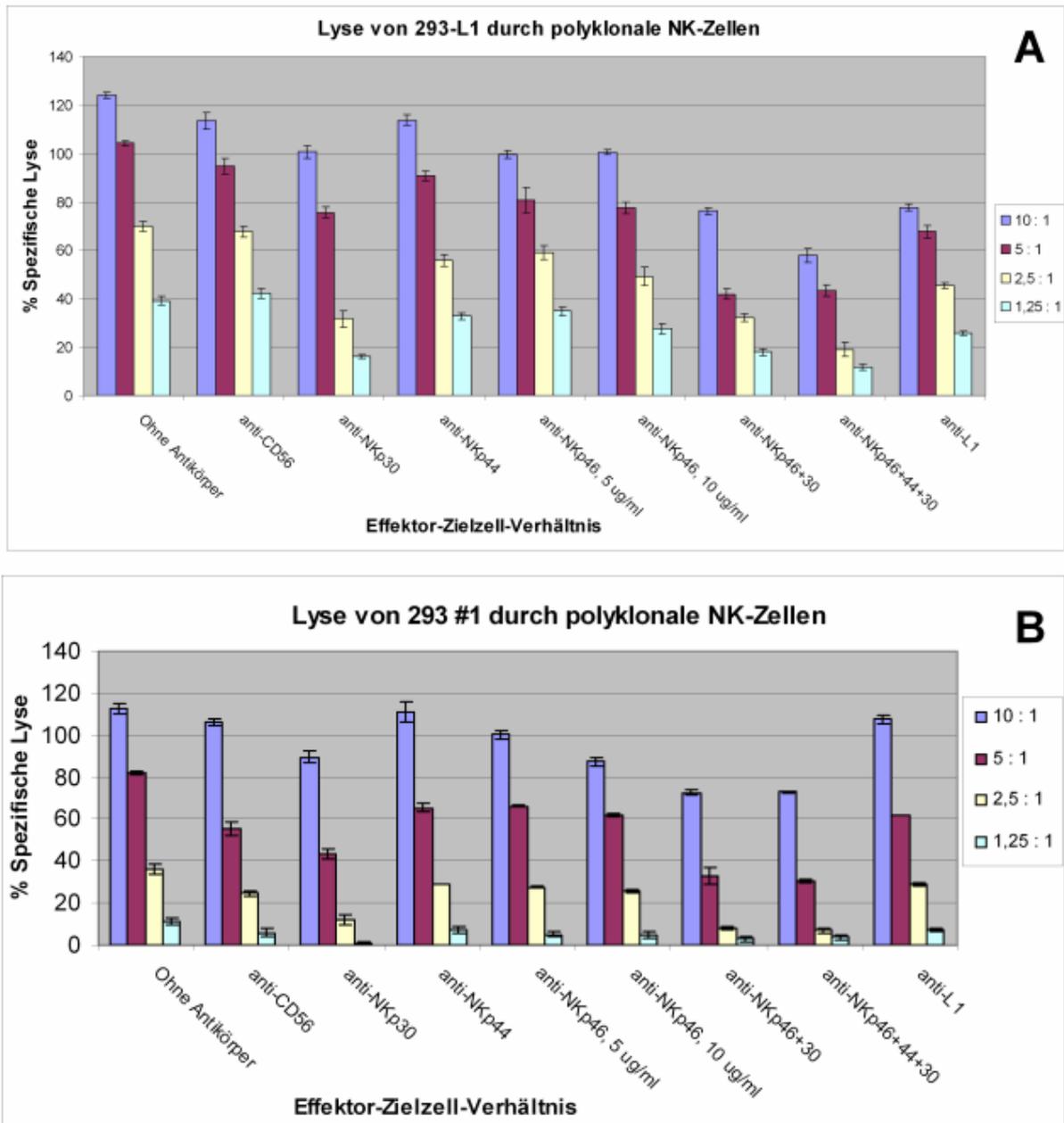


Abb. 68. Inhibition der NK-Cytolyse durch Antikörper. Polyklonale NK-Zellen wurden 30 min mit monoklonalen Antikörpern gegen CD56 (5 µg/ml), NKp30 (5 µg/ml), NKp44 (5 µg/ml) bzw. NKp46 (5 oder 10 µg/ml) einzeln oder in Kombination inkubiert und dann gewaschen. In der ersten und letzten Gruppe wurden die NK-Zellen nicht mit Antikörpern inkubiert. 293-L1 (A) bzw. 293 #1 (B) wurden entweder nicht behandelt oder mit einem anti-L1-Überstand (letzte Gruppe) für 30 min vorinkubiert. Anti-L1 hatte einen inhibierenden Effekt bei der Lyse von 293-L1-Zellen. Die Mischung aus anti-NKp30 und anti-NKp46 hatte einen deutlich blockierenden Effekt bei 293-L1- und 293-Zellen.

4 Diskussion

Das Ziel der Arbeit bestand in der Charakterisierung der bislang unbekanntem Bindungspartner der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren NKp46, NKp44 und NKp30 (zusammen NCR genannt), die an der NK-Zell-vermittelten Cytolyse zahlreicher Tumorzelltypen entscheidend beteiligt sind (Moretta et al., 2001). Die Kenntnis dieser zellulären Liganden für NCR ist von großem Interesse für die Immunbiologie und speziell für die Tumormunologie, da die Hoffnung besteht, durch Induktion dieser Liganden Tumorzellen sensitiver für die NK-Lyse machen zu können.

Die NCR sind seit ca. 7 Jahren bekannt, aber bislang entziehen sich die Liganden allen wissenschaftlichen Anstrengungen in Bezug auf ihre Identifizierung. Uns war zu Beginn dieser Arbeit bekannt, dass bisher verwendete Ansätze wie die Expressionsklonierung von Proteinen in COS-Zellen oder die Generierung von monoklonalen Antikörpern, welche die präsumptiven Liganden auf NK-Zielzellen maskieren sollten, in diversen Arbeitsgruppen nicht zum Erfolg geführt hatten. Möglicherweise stellen die Liganden Komplexe aus mehreren Proteinen dar, oder bestimmte Proteine werden erst durch posttranslationale Modifikationen zu Liganden, oder die Liganden sind wegen ihrer konservierten biochemischen Struktur wenig immunogen.

Als Hauptwerkzeuge standen uns Fusionsproteine der Ektodomänen von NKp46, NKp44 und NKp30 zur Verfügung. Die entsprechenden cDNS waren von unserem Kooperationspartner Dr. O. Mandelboim kloniert worden. Von seiner Arbeitsgruppe wurde auch gezeigt, dass sowohl NKp46-Ig- wie NKp44-Ig-Fusionsproteine mit viralen Hämagglutininen interagieren, wobei die Sialylierung der NCR-Fusionsproteine von Bedeutung ist (Mandelboim et al., 2001; Arnon et al., 2001). NKp30 wurde hingegen nicht von Influenzavirus-Hämagglutinin erkannt. Aus der Tatsache, dass transformierte und normale NK-Zielzellen gewöhnlich nicht mit (Para)Influenzaviren infiziert sind, folgt zwangsläufig, dass die NCR zusätzliche nichtvirale Liganden besitzen müssen.

Die Verwendung von Fusionsproteinen aus Rezeptor-Ektodomänen und dem Fc-Teil von Human-IgG₁ stellt eine etablierte Strategie dar, um nach unbekanntem Rezeptorliganden zu suchen (Ebeling et al., 1996; Murakami et al., 1996; Dohring und Colonna, 1996; Cantoni et al., 1998). Neben der nativen Faltung und der häufig effizienten Sekretion der Ig/Fc-Fusionsproteine in Mammalierzellen bestehen weitere Vorteile in der Möglichkeit die rekombinanten Fusionsproteine über Protein A-Sepharose aufzureinigen sowie in der

Diskussion

Rezeptordimerisierung aufgrund der intermolekularen Disulfidbrücke im Ig/Fc-Teil der Fusionsproteine, welche eine erhöhte Avidität für Liganden zur Folge haben kann.

Nach Umklonierung in einen hoch exprimierenden Expressionsvektor mit β -Aktin-Promoter und Austestung verschiedener Empfängerzellen für die NCR-Expressionsvektoren gelang es uns, sezernierte NCR-Ig/Fc-Fusionsproteine in Milligramm-Mengen aus dem Überstand von transfizierten A549-Karzinomzellen zu isolieren. Mit den über Protein A-Sepharose gereinigten Fusionsproteinen konnten wir epitheliale Tumorzellen in der Oberflächen-Cytofluorometrie färben (s. Abb. 22, 64). Von unseren Fusionsproteinen reagierte NKp30-Ig am stärksten mit 293-HEK- und HeLa-Zellen. Die Oberflächenfärbungen mit NKp46-Ig und NKp44-Ig waren recht schwach und nicht leicht von einer unspezifischen Bindung zu unterscheiden, so dass wir den zuverlässigeren intrazellulären Färbungen den Vorzug gaben. Die NCR-Liganden schienen eher in geringen Mengen auf der Zelloberfläche von nicht virusinfizierten Tumorzellen exprimiert zu sein, was in guter Übereinstimmung mit den Befunden von Mandelboim und Mitarbeitern ist (Arnon et al., 2001)

Die Immunperoxidase-Färbungen von Tumorzellen im Cytospin wiesen durchweg auf eine kräftige intrazelluläre Expression von Bindungspartnern für NKp46, NKp44 und NKp30 hin. Als Negativkontrolle für eine eventuelle unspezifische Bindung über den Ig/Fc-Teil dienten CD16-Ig und CD99-Ig. CD99-Ig färbte Tumorzellen in keinem Fall an. Mit CD16-Ig erhielten wir nur gelegentlich sehr schwache, intrazelluläre Reaktionen.

Auch wenn die lichtmikroskopische Beurteilung intrazellulärer Kompartimente in acetontfixierten Cytospinpräparaten nur grob orientierend sein kann, war es dennoch möglich, sich wiederholende Charakteristika zu beobachten, die spezifisch für die einzelnen NCR erschienen. So konnte man eine deutliche Golgi-ähnliche Färbung durch NKp44-Ig in den meisten Experimenten gut von einer eher feinretikulären, ER-ähnlichen Färbung durch NKp46-Ig differenzieren. Die Färbungen mit NKp46-D2-Ig waren wesentlich akzentuierter und feinvesikulärer als die mit NKp46-D1-Ig, die sich meist verwaschen zeigten. Wir verwendeten daher häufig NKp46-D2-Ig, um NKp46-Liganden nachzuweisen. Dies passt zu neueren Befunden der Mandelboim-Gruppe, dass die membranproximale D2-Domäne von NKp46 allein in der Lage war, mit Tumorzellen auf der Zelloberfläche zu reagieren, während NKp46-D1-Ig nur ganz schwach band (Arnon et al., 2003). In manchen Tumorzelltypen, wie der Kolonkarzinomlinie HT29, fiel die Färbung mit NKp30-Ig durch ein ausgeprägt vesikuläres Muster auf, das an endosomale/lysosomale Färbungen erinnerte, während in anderen Tumorzellen wie z.B. Jurkat oder HeLa eine ringförmige Plasmamembranreaktion imponierte. Die verschiedenen Tumorzelllinien zeigten also in der intrazellulären

Anfärbarkeit mit den NCR-Ig-Fusionsproteinen deutliche Unterschiede. Es ließ sich auch eine Heterogenität innerhalb der Zellpopulationen eines Cytospin-Präparates beobachten, wobei manche große Zellen besonders deutlich vesikulär gefärbt waren (s. Abb. 18/19). Insgesamt lassen diese Befunde die Annahme zu, dass den beobachteten Unterschieden im Färbungsmuster die Spezifität der NCR-Fusionsproteine zu Grunde liegt. Im Hinblick auf unsere biochemischen Befunde, dass NKp46, NKp44 bzw. NKp30 mit für die Zielzell-Erkennung möglicherweise irrelevanten, mitochondrialen Proteinen oder andererseits mit anionischen Glykolipiden reagierten, können wir jedoch nicht völlig ausschließen, dass nicht nur die physiologischen Liganden markiert wurden, sondern dass auch „unspezifische“ Bindungspartner falsch-positive Reaktionen in den intrazellulären Färbungen produzierten.

Zur genaueren Abklärung der betroffenen intrazellulären Kompartimente wäre die konfokale Mikroskopie mit kompartimentspezifischen Markerproteinen in der Doppelfärbung sinnvoll gewesen. Diese konnten jedoch leider nicht durchgeführt werden, da keines der NCR-Ig-Fusionsproteine die Tumorzellen nach Paraformaldehyd-Fixierung noch anfärbte.

Wir erhielten auch Anfärbungen von Zellen aus den evolutionär weit entfernten Organismen Frosch und Hefe. Es stellt sich hier die Frage, warum die evolutionär jungen NCR (NKp44 und NKp30 sind bislang nur in Primaten gefunden worden) so hochgradig konservierte Bindungspartner aufweisen. Bis zur endgültigen biochemischen Charakterisierung der Liganden muss die Frage offen bleiben, ob es sich um unspezifische Kreuzreaktivitäten der NCR-Ig handelte oder tatsächlich um konservierte Bindungspartner, wofür insbesondere Carbohydratdeterminanten in Frage kommen.

Die kräftigen intrazellulären Färbungen stehen im Gegensatz zu den eher schwachen Oberflächenreaktionen. Es könnte sich demzufolge bei den NCR-Liganden um Strukturen handeln, deren Plasmamembranexposition im Normalzustand stark reguliert ist und in Analogie zu Phosphatidylserin oder Hsp70 im Stresszustand vermehrt an der Oberfläche erscheinen (Boas et al., 1998; Ran et al., 2002; Multhoff et al., 1995; Gastpar et al., 2004). Eine konstitutiv starke Expression der aktivierenden NCR-Liganden auf der Plasmamembran von nicht durch Virusinfektion, maligne Transformation, Hitze oder Seneszenz gestressten Zellen erscheint aus immunologischer Sicht wenig sinnvoll, da sie sonst unerwünschten Angriffen durch NK-Zellen ausgesetzt wären. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass viele Arten von normalen Epithelzellen konstitutiv nur wenig MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren (Momburg et al., 1986). Es ist daher fraglich, ob eine solche geringe MHC-I-Expression zur aktiven Suppression von NK-Aktivitäten ausreichend wäre und nicht durch

Diskussion

eine Stimulierung von aktivierenden NCR überspielt werden könnte, falls entsprechende aktivierende Liganden als Gegenspieler auf Epithelzellen exprimiert würden.

Die NCR-Fusionsproteine wurden benutzt, um die direkte Präzipitation von Proteinliganden aus Detergenzlysaten zu erzielen. Die Anfärbung von Western Blots nach Proteinauftrennung ohne vorhergehende Präzipitation hatte keine Hinweise auf NCR-reaktive Banden ergeben. Wir konnten aus metabolisch markierten Zelllysaten drei im Vergleich zu Kontrollpräzipitationen spezifische Proteinbanden mit NKp44-Ig präzipitieren. Dieselben Proteine wurden mit NKp44-Ig aus Lysaten von drei Tumorzelllinien präzipitiert, und eine dieser Banden zeigte sich auch in NKp46-Ig-Präzipitaten. Die massenspektrometrische Mikrosequenzierung dieser Banden ergab, dass es sich um die E1 α - und E1 β -Untereinheiten bzw. E1 α /E1 β -Heterodimere des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes aus der inneren mitochondrialen Membran handelte. E1 α -reaktive antimitochondriale Antikörper werden in Patienten mit der Autoimmunerkrankung Primäre Biliäre Zirrhose gefunden und es ist möglich, dass Komponenten des PDH-Komplexes in frühen Stadien der Apoptose aus Mitochondrien freigesetzt werden und zur Zelloberfläche gelangen (Palmer et al., 2002). Dennoch erscheint es unwahrscheinlich, dass mitochondriale Proteine reguläre Liganden für NK-Rezeptoren darstellen. Die unvermindert starke Anfärbung von humanen E1 α -defizienten Fibroblasten mit NKp46-Ig und NKp44-Ig bestätigte letztendlich die Vermutung, dass es sich bei den Präzipitaten um unspezifische Reaktionen gehandelt haben musste. Ob eine Assoziation von E1 α /E1 β -Komplexen mit Phosphoglykolipiden (Johnson und Denton, 2003) zu der wahrscheinlich unspezifischen Bindung an NKp44-Ig und NKp46-Ig geführt hatten, erschien letztlich von weniger großem Interesse und wurde nicht weiter analysiert.

Unsere Versuche, durch Behandlung mit Cycloheximid, Proteinase K oder anderen Proteinasen Hinweise auf Proteinliganden zu finden, verliefen ergebnislos. Die Langlebigkeit von theoretischen Proteinliganden wäre eine Erklärungsmöglichkeit für die Resistenz gegenüber Cycloheximid. Proteaseverdau-Experimente an fixierten Cytospin-Präparaten zeigten keine Abschwächung der NCR-Reaktionen. Es ist möglich, dass durch eine unvollständige Proteinspaltung bei mangelhafter sterischer Zugänglichkeit die von den NCR erkannten Epitope nicht angegriffen wurden oder dass NCR-reaktive Proteinfragmente nicht ausreichend abgewaschen werden konnten.

Andererseits waren die Liganden für alle drei NCR-Fusionsproteine in apoptotischen Zellen schon nach wenigen Stunden nicht mehr in Cytospins nachweisbar (s. Abb. 39-41). Die Vielzahl der nach Apoptoseinduktion aktivierten Enzymkaskaden (Blatt und Glick, 2001) ließ keine unmittelbaren Schlüsse auf die biochemische Natur der Liganden zu. In diesem

Diskussion

Zusammenhang wäre es allerdings sinnvoll, in zukünftigen Experimenten selektiv Caspase-Inhibitoren bei Mannosamin- oder Vanadat-induzierter Apoptose einzusetzen. Vielleicht lassen sich Bedingungen herausarbeiten, bei denen nur einzelne Proteine degradiert werden, welche dann wiederum Kandidaten für NCR-Liganden darstellten.

Um zu prüfen, ob Asn- oder Ser-/Thr-verknüpfte Oligosaccharide von Glykoproteinen als NCR-Liganden fungieren, führten wir Experimente mit verschiedenen metabolischen Inhibitoren der *N*- bzw. *O*-Glykosylierung durch. Wir gingen bei diesen Inhibitoren z.T. über die empfohlene Wirkkonzentration hinaus bis nahe an den toxischen Bereich heran, so dass eine glykosylierungsblockierende Wirkung innerhalb von zwei Tagen mit Sicherheit eingetreten sein sollte. Wir erhielten jedoch keine Hinweise auf eine negative Beeinflussung der NCR-Ig-Bindung nach Inhibitorbehandlung. Wiederum wären langlebige Glykoproteine eine Erklärungsmöglichkeit für das Ausbleiben der Wirkung dieser Inhibitoren. Aber auch der Einsatz von Endoglykosidase F, diversen Neuraminidasen sowie Mannosidase konnte die präsumptiven Liganden nicht signifikant vermindern, so dass wir den vorläufigen Schluss ziehen, dass die Proteinglykosylierung für die Interaktion von NCR mit Zielzellstrukturen nicht relevant ist. Es stehen allerdings noch Versuche aus, durch Inhibitoren oder mit Enzymen deglykosylierte Zielzellen (z.B. durch Neuraminidase-Behandlung) in NK-Assays als Zielzellen einzusetzen.

Bei der Überprüfung von 6-*O*-Sulfo-LacNAc-defizienten und profizienten Jurkat-Zellen stellten wir fest, dass polyklonale NK-Zellen eines Spenders sehr deutlich durch sulfatierte *O*-Glykane aktiviert wurden (s. Abb. 36). Auch sulfatierte Proteoglykane scheinen eine Rolle bei der NK-Zell-Aktivierung oder Inhibierung zu spielen. In diesem Fall beobachteten wir jedoch, dass die cytolytische Aktivität der NK-Zelllinie NK92 bei Vorhandensein von Proteoglykanen deutlich inhibiert war (s. Abb. 38). Weitere detaillierte Experimente sind nötig, um die Rolle von oberflächenexponierten, sulfatierten Glykanen auf die NK-Lyse abzuklären. Da jedoch die Immunperoxidase-Färbungen mit NCR-Fusionsproteinen überhaupt keine Unterschiede zwischen Zellen mit oder ohne 6-*O*-sulfatierten Glykanen bzw. mit oder ohne Proteoglykanen zeigten, gehen wir davon aus, dass diese Moleküle als NCR-Liganden wahrscheinlich nicht in Frage kommen.

Der Frage, ob Glykosylphosphatidylinositol-verankerte Proteine oder freie Glykosylinositolphospholipide die gesuchten NCR-Liganden darstellen, gingen wir zunächst mit dem GPI-Biosynthese-Inhibitor Mannosamin nach. Die deutlich reduzierte Färbung mit NKp46-Ig, NKp44-Ig und NKp30-Ig wurde zunächst als Hinweis auf GPI-Proteine als Liganden gewertet, und auch nach Behandlung mit Phospholipase C zeigte sich eine leicht

Diskussion

abgeschwächte Färbung. Später wurde jedoch klar, dass Mannosamin wahrscheinlich über seine apoptogene Wirkung und nicht über seine Blockade der GPI-Biosynthese die Liganden zum Verschwinden gebracht hatte. Die unverminderte Anfärbung der GPI-Protein-Defektmutante Jurkat-7.X widerlegte die Hypothese eindeutig, dass GPI-Proteine als Liganden für NKp46/44/30 fungieren. Interessanterweise wurden GPI-defiziente Jurkat etwas schlechter von polyklonalen NK-Zellen lysiert als die GPI-rekonstituierte Variante (s. Abb. 44). Dieser Befund ist in guter Übereinstimmung mit der verminderten NK-Sensitivität von *PIG-A*-defizienten Leukämie-Zellen (Nagakura et al., 2002). Es bleibt offen, welche aktivierenden NK-Rezeptoren durch welche GPI-verankerten Proteine bzw. freie Inositol-phospholipide ligiert werden können. Hier ergibt sich ein weiterer interessanter Ansatzpunkt für zukünftige Arbeiten.

Nachdem in anderen Arbeitsgruppen keine Proteinliganden für NCR aus cDNS-Bibliotheken kloniert werden konnten, bestand die Möglichkeit, dass es sich um nichtproteinöse Liganden wie Glykolipide oder Glykospholipide handelte. Die von uns beobachtete Reaktion von NCR-Ig-Fusionsproteinen mit Hefe-Zellen wäre in Übereinstimmung mit der Annahme von konservierten Glykolipid-Liganden. Darüberhinaus gab es eine Reihe von Publikationen, die auf die Bedeutung der Oligosaccharidausstattung von Zielzellen für ihre Empfindlichkeit gegenüber NK-Zellen hinwiesen (Yogeeswaran et al., 1981; van Rinsum et al., 1986; Ono und Tanaka, 1986; Axberg, 1988). Die Blockade des vesikulären Transports von ER zu Golgi-Apparat bzw. von zum Trans-Golgi-Netzwerk durch Brefeldin A bzw. Monensin verhindert die Biosynthese von verschiedenen komplexen Glykosphingolipiden. Es zeigte sich jedoch kein Einfluss auf die NCR-Liganden-Expression (s. Abb. 47). Der weitgehende Verlust der NKp46- und NKp30-Reaktivität nach Endoglycoceramidase-Behandlung von fixierten Zellen und der vollständige Verlust der NCR-Färbungen nach Behandlung von Zellen mit metabolischen Inhibitoren der Glucosylceramidbiosynthese (PDMP, PPMP) schien zunächst zu belegen, dass Glykosphingolipide als NCR-Liganden involviert sind (s. Abb. 48 und Abb. 52).

Des Weiteren erhielten wir Ergebnisse von unserem Kooperationspartner Dr. B. Kniep aus Dresden, die zeigten, dass NKp46-Ig, NKp44-Ig und NKp30-Ig mit dem dünnschichtchromatographisch aufgetrennten Lipid Sulfatid reagierten. Die Spezifität war jedoch nicht sehr hoch, da auch die anionischen Lipide Cholesterinsulfat und Phosphatidylinositol angefärbt wurden. Es wurde in der Dünnschichtchromatographie keine Reaktion mit neutralen GSL oder Gangliosiden beobachtet. NK-Cytotoxizitätsexperimente mit Zielzellen, die mit Sulfatid, Cholesterinsulfat oder neutralen Glykosphingolipiden beladen

Diskussion

wurden, konnten eine von diesen Lipiden ausgehende, NK-aktivierende Wirkung nicht belegen. Die Verwendung von Glykosphingolipid-Defektmutanten in der Immunperoxidasefärbung und im NK-Assay erbrachte ebenfalls keine Bestätigung, dass Glykosphingolipide von den NCR spezifisch erkannt wurden. Im NK-Assay mit NK92-Effektoren beobachteten wir sogar eine deutlich bessere Lyse der GSL-defizienten CHO-Mutante LY-B. Die Auslöschung der NCR-Reaktivität nach Behandlung mit PPMP und PDMP ließ sich wie schon bei Mannosamin über ihre proapoptische Wirkung (Akkumulation von Ceramid) erklären. Bemerkenswerterweise zeigte sich jedoch dieser Effekt nicht sehr deutlich, wenn wir C₂-Ceramid zur direkten Induktion von Apoptose einsetzten. PPMP und PDMP führen nicht nur als Ceramidglucosyltransferase-Inhibitoren zur Akkumulation von Ceramid und Sphingosin, sondern greifen auch in den vesikulären Transport im sekretorischen Weg ein (Zegers und Hoekstra, 1998). Möglicherweise bewirkten diese pleotropen Effekte von PPMP/PDMP die stärkere Reduktion der NCR-Ig-Färbungen im Vergleich zu C₂-Ceramid.

Da NKp44 und NKp46 mit viralen Hämglutininen (Mandelboim et al., 2001; Arnon et al., 2001), die eine sialinsäurespezifische Lektinfunktion ausüben, interagieren, bestand die Möglichkeit, dass zelluläre Lektine in nicht virusinfizierten Zellen an die NCR auf NK-Zellen in *trans* binden. Hinweise auf L-Selektin, P-Selektin oder den Mannose-6-Phosphatrezeptor als mögliche NCR-Bindungspartner konnten nicht gefunden werden. Aus der Familie der sialinsäurespezifischen, Immunglobulin-ähnlichen zellulären Lektine (Siglecs) kommt nur das Zelladhäsionsmolekül L1-CAM auf epithelialen Tumorzellen vor und daher fokussierten wir unsere Untersuchungen auf L1 als potentiellen Liganden für NKp46 und NKp44. Von L1 seinerseits ist bekannt, dass es verschiedene zelluläre Liganden in *trans* besitzt, wozu L1 selbst, CD24, Neurocan, Phosphocan und Laminin zählen (Hortsch, 2000). L1 wurde auch als kostimulatorisches Molekül auf T-Zellen beschrieben (Balaian et al., 2000). Es ließ sich jedoch nur eine sehr schwache L1-Expression auf polyklonalen humanen NK-Zellen nachweisen, während NK92 L1 nicht nachweisbar exprimierte (Dr. C. Watzl, Universität Heidelberg, pers. Mitteilung). Wir konnten zeigen, dass lösliche L1-Moleküle, welche an α _{2,3}-verknüpfte Neuraminsäurereste bindet (Kleene et al., 2001), mit NKp46, NKp46-D2 und NKp44 interagierten und deren α _{2,3}-sialylierte Glykane so maskierten, dass sie nicht mehr von dem α _{2,3}-sialinsäurespezifischen, pflanzlichen Lektin MAA-II erkannt werden konnten (s. Abb. 57, 58, 61). Die α _{2,3}-reaktiven Siglec-4- und Siglec-9-Moleküle blockierten in rekombinanter Form als Ig-Fusionsproteine die MAA-II-Bindung überraschenderweise nicht, so dass die L1-Ig-vermittelte Zuckermaskierung eine unerwartete Spezifität aufwies. Für die

Diskussion

L1-Bindung an NKp46 und NKp44 war die erste membrandistale Ig-Domäne von L1 nicht ausreichend (s. Abb. 56, 61), was in Übereinstimmung mit der Sialinsäurebindung über die erste der 6 Fibronectin-III-Domänen in L1 ist (Kleene et al., 2001). Die Bindung von L1 wurde für die α 2,3-sialylierten NKp46-Ig bzw. NKp44-Ig-Fusionsproteine beobachtet, nicht jedoch für das ausschließlich α 2,6-sialylierte NKp30-Ig (s. Abb. 59). Dies steht im Gegensatz zu dem kürzlich veröffentlichten Ergebnis, dass, ähnlich wie die Bindung von SNA-Lektin, die Virus-Hämagglutinin-Bindung an NKp46 überwiegend von α 2,6-verknüpften Neuraminsäuren abhängt (Arnon et al., 2003).

Die Bindung von L1-Ig an NKp46 und NKp44 konnte im ELISA-Test auch direkt demonstriert werden. L1 band jedoch nicht nur an die glykantragende D2-Domäne von NKp46, sondern auch an D1 (s. Abb. 62). Hier fand also möglicherweise auch eine homotypische Interaktion einer Ig-ähnlichen Domäne von L1 mit der Ig-ähnlichen Domäne NKp46-D1 statt. Wir fanden, dass L1-überexprimierende 293-Zellen in der Cytofluometrie stärker als 293, die eine geringe konstitutive L1-Expression aufweisen, mit NKp46-Ig und NKp44-Ig abgefärbt werden konnten (s. Abb. 64). Wir werten dieses Ergebnis als Hinweis auf eine Bindung dieser NCR an membranständiges L1.

Polyklonale NK-Zellen und die Linie NK92 lysierten L1-transfizierte 293-Zielzellen deutlich effizienter als 293-Parentalzellen (s. Abb. 65, 66), und ein Anti-L1-Antikörper konnte die Lyse von 293-L1-Transfektanten, aber nicht diejenige von 293-Zellen teilweise blockieren. Bei aktivierten humanen NK-Zellen zeigten sich jedoch deutliche klonale Unterschiede. Es fanden sich auch Klone, deren cytolytische Aktivität bei Überexpression von L1 auf Zielzellen eher inhibiert war. Da Antikörper gegen NKp46 (und NKp30) die Lyse von 293-L1 und 293 in gleichem Maße supprimierten, kommen wir zu der Schlussfolgerung, dass NKp46 neben L1 weitere Liganden auf Seiten der Zielzelle besitzen muss. Die Interaktion von L1 auf Zielzellen mit NKp46 und NKp44 auf NK-Zellen muss durch weitere Experimente bestätigt werden, für die der für diese Doktorarbeit zur Verfügung stehende Zeitrahmen jedoch nicht mehr ausreichte. So soll einerseits versucht werden, NCR durch Antikörper auf L1-reaktiven NK-Zellen zu modulieren, um ihren spezifischen Anteil an der erhöhten Cytolyse von 293-L1-Zellen zu prüfen. In zukünftigen Experimenten mit NKp46/44-CD3 ζ -Reporterzellen soll versucht werden, die NKp46-L1-Bindung in der Zell-Zell-Interaktion zu belegen. Weiterhin soll versucht werden, NKp46-Ig und NKp44-Ig mit L1 aus Zelllysaten zu kopräzipitieren. Die in dieser Arbeit gezeigten Experimente ergeben jedoch bereits jetzt deutliche Hinweise auf L1 als den ersten beschriebenen, zellulären Liganden für die aktivierenden NK-Rezeptoren NKp46 und NKp44.

5 Zusammenfassung

Die cytolytische Aktivität von Natürlichen Killerzellen wird durch ein labiles Gleichgewicht von aktivierenden und inhibierenden Signalen kontrolliert. Die „Natural Cytotoxicity Receptors“ (NCR) NKp46, NKp44 und NKp30 aktivieren zusammen mit anderen aktivierenden Rezeptoren NK-Zellen und befähigen sie zur Cytolyse von normalen, virusinfizierten und transformierten Zellen. Die NCR, die zur Immunglobulin-Superfamilie gehören, funktionieren synergistisch und sind neben NKG2D Hauptmediatoren der NK-Cytotoxizität gegenüber menschlichen Tumorzellen. Die Interaktionspartner von NKp46, NKp44 und NKp30 auf der Tumorzellseite waren nicht bekannt. Die einzigen bekannten Liganden für NKp44 und NKp46 waren virale Hämagglutinine. Das Ziel dieser Arbeit bestand in der molekularen Charakterisierung dieser Tumorzell-Liganden. Als Werkzeuge dienten uns rekombinante Fusionsproteine aus den Ektodomänen von NKp46, NKp44 und NKp30, die mit dem Fc-Teil von humanem IgG fusioniert waren. Wir reinigten diese Fusionsproteine aus dem Kulturüberstand transfizierter Zellen und verwendeten sie für biochemische und immunocytochemische Experimente. Daneben wurden aktivierte humane NK-Zellen in Cytotoxizitätstests mit Zielzellen eingesetzt, die Defekte für bestimmte biosynthetische Stoffwechselwege hatten. Die NCR-Ig-Fusionsproteine banden an die Zelloberfläche von verschiedenen Tumorzellen. Immunperoxidasefärbungen von acetontfixierten Tumorzellen zeigten eine breite und evolutionär konservierte Expression der präsumptiven Liganden auf, die weitgehend intrazellulär exprimiert zu sein schienen. In Präzipitationsexperimenten mit NKp46-Ig und NKp44-Ig und anschließender Mikrosequenzierung aus dem Gel konnten wir Proteine identifizieren, die als mitochondriale Proteine jedoch wahrscheinlich nicht als physiologische NCR-Liganden in Frage kamen. Der Einsatz von verschiedenen Proteasen und Glykosidasen, von Inhibitoren der Proteinbiosynthese, der Protein-N-Glykosylierung bzw. Protein-O-Glykosylierung, von Inhibitoren der Glykosylphosphatidylinositolanker-Biosynthese und der Glykosphingolipidbiosynthese sowie die biochemische Analyse von zellulären Glykolipiden führten nicht zu Ergebnissen im Sinne einer konkreten Identifizierung von NCR-Liganden. Die Proteinglykosylierung schien keine Rolle für die NCR-Ig-Bindung zu spielen und Tumorzellmutanten mit fehlender Glykosylphosphatidylinositol- bzw. Glykosphingolipid-Synthese exprimierten weiterhin die NCR-Liganden. Bei der Untersuchung von zellulären Lektinen stießen wir auf das Zelladhäsionsmolekül L1-CAM, das auf Tumorzellen unterschiedlicher Histogenese stark exprimiert wird. L1 band an α 2,3-verknüpfte Sialinsäurereste in Oligosacchariden der Glykoproteine NKp46 und NKp44 und

Zusammenfassung

interagierte möglicherweise zusätzlich mit der Proteinstruktur. L1 überexprimierende 293-Transfektanten wurden verstärkt von NKp46-Ig und NKp44-Ig markiert. 293-L1-Zielzellen wurden darüberhinaus deutlich effizienter von humanen polyklonalen NK-Zellen und der NK-Zelllinie NK92 lysiert. L1 kommt mit diesen Befunden als ein wahrscheinlicher für NKp46 und NKp44 in Frage. Die biochemische Bestätigung der Interaktion von NKp46/NKp44 und L1 steht allerdings noch aus. Daneben scheint es auch noch andere Liganden für NKp46 zu geben, da auch L1-negative 293-Zellen NKp46-abhängig lysiert werden. Bindungspartner für NKp30 konnten nicht ermittelt werden.

Die Experimente mit NK-Zellen führten zu wichtigen Nebenbefunden, die jedoch wahrscheinlich keinen direkten Bezug zur NCR-vermittelten NK-Zellaktivierung hatten. So konnten wir Hinweise darauf finden, dass sulfatierte Glykoproteine und Proteoglykane eine Rolle bei der NK-Zellyse spielen. Auch das Fehlen von Glycosphingolipiden konnte die NK-Lyse beeinflussen. Die beteiligten NK-Rezeptoren müssen in zukünftigen Arbeiten ermittelt werden.

Schlagwörter:

Natürliche Killer Zell Rezeptoren (NCR)

NKp46/NKp44/NKp30

L1 als zellulärer Ligand

6 Abstract

The cytolytic activity of natural killer-cells is controlled by means of an unstable equilibrium of activating and inhibiting signals. The „Natural Cytotoxicity Receptors“ (NCR) NKp46, NKp44 and NKp30 activate together with other activating receptors NK-cells and make them capable of cytolysis of normal, virus infected and transformed cells. The NCR, as part of the immunoglobulin-superfamily, function synergistically and are in addition to NKG2D the principal mediators of NK-cytotoxicity against human tumour-cells. The interaction partners of NKp46, NKp44 and NKp30 on the tumour-cell side were not known. The only known ligands for NKp44 and NKp46 were viral hemagglutinin (HA). The objective of this research consisted in the molecular characterization of these tumour-cell ligands. As tools we employed recombinant fusion proteins from the ectodomains of NKp46, NKp44 and NKp30, which were fused with the Fc-part of human IgG. We cleaned these fusion proteins from the culture supernatant of transfected cells and used them for biochemical and immunocytochemical experiments. Furthermore activated human NK-cells were employed in cytotoxicity tests with target cells, which had defects for certain biosynthetic metabolism pathways. The NCR-Ig-fusion proteins bound to the cell surface of different tumour-cells. Immunoperoxidase staining of acetone fixed tumour-cells revealed a broad and evolutionary conserved expression of the presumptive ligands, which appear predominantly expressed intracellularly. In precipitation experiments with NKp46-Ig and NKp44-Ig and subsequent micro sequencing from the gel we could identify proteins, most likely as mitochondrial proteins, probably not, however, as physiologic NCR-ligands. The employment of different proteases and glycosidases, of inhibitors of the protein biosynthesis, the protein-*N*-glycosylation and respectively protein-*O*-glycosylation, of inhibitors of the glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis proteins and the glycosphingolipid biosynthesis as well as the biochemical analysis of cellular glycolipids, did not lead to results in the sense of a concrete identification of NCR-ligands. The protein glycosylation did not appear to have any part in the NCR-Ig-binding, and tumour-cell mutants without glycosylphosphatidylinositol respectively glycosphingolipid synthesis continued to express NCR-ligands. In the course of the investigation of cell lectins we encountered the cell adhesion molecule L1-CAM, which is strongly expressed on tumour-cells of varying histogenesis. L1 bound to α 2,3- linked sialic acid residue in oligosaccharides of the glycoproteins NKp46 and NKp44 and possibly interacted additionally with the protein structure. L1 overexpressed 293-transfectants were marked to a greater extent by NKp46-Ig and NKp44-Ig. 293-L1-target-cells were furthermore

Abstract

clearly more efficiently lysed by human polyclonal NK-cells and the NK-cell-line NK92. With these results L1 arises as a probable cellular ligand for NKp46 and NKp44. Biochemical confirmation of the interaction of NKp46/NKp44 and L1 has not yet been achieved. In addition there seem to be also other ligands for NKp46, since also L1-negative 293-cells are NKp46-dependently lysed. Binding partners for NKp30 could not be determined.

The experiments with NK-cells led to important secondary results, which, however, probably had no direct relation to NCR-mediated NK-cell activation. Thus we were able to find indications that the sulfated glycoprotein and proteoglycan play a role in the NK-cell-lysis. The absence of glycosphingolipids also can influence the NK-lysis. The NK-receptors involved will have to be determined in future research.

Keywords:

Natural Cytotoxicity Receptors (NCR)

NKp46/NKp44/NKp30

L1 as cellular ligand

7 Literaturverzeichnis

Akashi K, Reya T, Dalma-Weiszhauz D & Weissman IL. (2000). Lymphoid precursors. *Current Opinion in Immunology*. 12, 144-150.

Arnon TI, Achdout H, Lieberman N, Gazit R, Gonen-Gross T, Katz G, Bar-Ilan A, Bloushtain N, Lev M, Joseph A, Kedar E, Porgador A & Mandelboim O. (2004). The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46. *Blood*. 103, 664-672.

Arnon TI, Lev M, Katz G, Chernobrov Y, Porgador A & Mandelboim O. (2001). Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol*. 31, 2680-2689.

Aruffo A & Seed B. (1987). Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84, 8573-8577.

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.

Axberg I (1988). Increased susceptibility of periodate-treated tumour cells to human but not to mouse or rat natural killer cells. *Scand J Immunol*. 28, 697-704.

Balaian LB, Möhler T & Montgomery AM. (2000). The human neural cell adhesion molecule L1 functions as a costimulatory molecule in T cell activation. *Eur J Immunol*. 30, 938-943

Barten R. & Trowsdale J, (1999). The human Ly-49L gene. *Immunogenetics*. 49, 731-734.

Bastisch I, Tiede A, Deckert M, Ziolk A, Schmidt RE & Schubert J. (2000). Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-deficient Jurkat T cells as a model to study functions of GPI-anchored proteins. *Clin Exp Immunol*. 122, 49-54.

Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL & Spies T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 285, 727-729.

Baxevanis CN, Gritzapis AD & Papamichail M. (2003). In Vivo Antitumor Activity of NKT Cells Activated by the Combination of IL-12 and IL-18. *The Journal of Immunology*. 171, 2953-2959.

Biassoni R, Pessino A, Bottino C, Pende D, Moretta L & Moretta A. (1999). The murine homologue of the human NKp46, a triggering receptor involved in the induction of natural cytotoxicity. *Eur J Immunol*. 1014-1020.

Literaturverzeichnis

Biassoni R, Claudia Cantoni, Marras D, Giron-Michel J, Michela Falco, Moretta L & Dimasi N. (2003). Human Natural Killer cell receptors: insights into their molecular function and structure. *J.Cell.Mol.Med.* 7, No 4, 376-387.

Binah O. (1994). Immune effector mechanisms in heart transplant rejection. *Cardiovasc Res.* 28, 1748-1757.

Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP & Salazar-Mather TP. (1999). Natural Killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual Review in Immunology.* 17, 189-220.

Blatt NB & Glick GD. (2001). Signaling Pathways and Effector Mechanisms Pre-Programmed Cell Death. *Bioorganic & medicinal Chemistry.* 9, 1371-1384.

Bloom BR. (1982). Natural killers to rescue immune surveillance? *Nature* 300, 214.

Boas FE, Forman L & Beutler E. (1998). Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in haemolytic anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 3077-3081.

Borrego F, Kabat J, Kim DK, et al. (2002). Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol.* 38, 637-660.

Borrego F, Kabat J, Kim DK, Lieto L, Maasho K, Peña J, Solana R & Coligan JE. (2001). Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Molecular Immunology* 38, 637-660.

Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Pena J & Solana R. (1999). CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology.* 97, 159-165.

Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE & Brooks AG. (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.

Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, Cantoni C, Grassi J, Marcenaro S, Reymond N, Vitale M, Moretta L, Lopez M & Moretta A. (2003). Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med.* 198, 557-567.

Bottino C, Falco M, Parolini S, Marcenaro E, Augugliaro R, Sivori S, Landi E, Biassoni R, Notarangelo LD, Moretta L & Moretta A. (2001). NTB-A [correction of GNTB-A], a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J Exp Med.* 194, 235-246.

Bradley M, Zeytun A, Rafi-Janajreh A, Nagarkatti PS & Nagarkatti M. (1998). Role of spontaneous and interleukin-2-induced natural killer cell activity in the cytotoxicity and rejection of Fas+ and Fas- tumor cells. *Blood.* 92, 4248-4255.

Literaturverzeichnis

Braud VM, Allan DSJ, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, Lanier LL & McMichael AJ. (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391, 795-799.

Brown EJ. (1997). Adhesive interactions in the immune system. *Trends Cell Biol.* 289-295.

Brown MG, Dokun AO, Heusel JW, Smith HRC, Beckman DL, Blattenberger EA, Dubbelde CE, Stone LR, Scalzo AA & Yokoyama WM. (2001). Vital Involvement of a Natural Killer Cell Activation Receptor in Resistance to Viral Infection. *Science.* 292, 934-937.

Cantoni C, Bottino C, Vitale M, Pessino A, Augugliaro R, Malaspina A, Parolini S, Moretta L, Moretta A & Biassoni R. (1999). NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J. Exp. Med.* 189, 787-796.

Cantoni C, Ponassi M, Biassoni R, Conte R, Spallarossa A, Moretta A, Moretta L, Bolognesi M & Bordo D. (2003). *Structure. (Camb.)* 11, 725-734.

Cantoni C, Verdini S, Falco M, Pessino A, Cilli M, Conte R, Pende D, Ponte M, Mikaelsson MS, Moretta L & Biassoni R. (1998). P49, a putative HLA class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily. *Eur J Immunol.* 28, 1980-1990.

Carlyle JR, Jamieson AM, Gasser S, Clingan CS, Arase H & Raulet DH. (2004). Missing self-recognition of Ocil/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 3527-3532.

Cella M, Sallusto F & Lanzavecchia A. (1997). Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 10-16.

Cerwenka A & Lanier LL. (2003). NKG2D ligands: unconventional MHC class I-like molecules exploited by viruses and cancer. *Tissue Antigens.* 61, 335-343.

Chaurand P, Luetzenkirchen F & Spengler B. (1999). Peptide and protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and MALDI-post-source decay time-of-flight mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 10, 91-103.

Cifone MG, Migliorati G, Parroni R, Marchetti C, Millimaggi D, Santoni A & Riccardi C. (1999). Dexamethasone-induced thymocyte apoptosis: apoptotic signal involves the sequential activation of phosphoinositide-specific phospholipase C, acidic sphingomyelinase, and caspases. *Blood.* 93, 2282-2296.

Cohen NR, Taylor JS, Scott LB, Guillery RW, Soriano P & Furley AJ. (1998). Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Curr Biol.* 8, 26-33.

Colonna M, Nakajima H, Navarro F & Lopez-Botet M. (1999). A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *J Leukoc Biol.* 66, 375-381.

Literaturverzeichnis

Colucci F, Caligiuri MA & Di Santo JP. (2003). What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol.* 3, 413-425.

Colucci F, Di Santo JP & Leibson PJ. (2002). Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons? *Nat Immunol.* 3, 807-813.

Cooper MA, Fehniger TA, Fuchs A, Colonna M & Caligiuri MA. (2004). NK cell and DC interactions. *Trends Immunol.* 25, 47-52.

Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, Carson WE & Caligiuri MA. (2001). Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 bright subset. *Blood.* 97, 3146.

Cosman D, Fanger N, Borges L, Kubin M, Chin W, Peterson L & Hsu ML. (1997). A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity.* 273-282.

Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M & Chalupny NJ. 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 RT, Sivori S, Marcenaro E, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci MJ, Reviron D, Gastaut JA, 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.

Crocker PR. (2002). Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signalling. *Current Opinions in Structural Biology* 12, 609-615.

Crowe JS, et al. (1991). Improved cloning efficiency of polymerase chain reaction (PCR) products after proteinase K digestion, *Nucleic Acids Res.*19, 184.

De Maria A, Biassoni R, Fogli M, Rizzi M, Cantoni C, Costa P, Conte R, Mavilio D, Ensoli B, Cafaro A, Moretta A & Moretta L. (2001). Identification, molecular cloning and functional characterization of NKp46 and NKp30 natural cytotoxicity receptors in *Macaca fascicularis* NK cells. *Eur J Immunol.* 31, 6-56.

De Maria A, Fogli M, Costa P, Murdaca G, Puppo F, Mavilio D, Moretta A & Moretta L. (2003). Impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 and NKp44). *Eur J Immunol.* 33, 2410-2418.

Denton MD, Magee CC & Sayegh MH. (1999). Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet.* 353, 1083-1091.

DiSanto JP, Muller W, Guy-Grand D, Fischer A & Rajewsky K. (1995). Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 377-381.

Literaturverzeichnis

- Dohring C & Colonna M.** (1996). Human natural killer cell inhibitory receptors bind to HLA class I molecules. *Eur J Immunol.* 26, 365-369.
- Dokun AO, Kim S, Smith HR, Kang HS, Chu DT & Yokoyama WM.** (2001). Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nat. Immunol.* 2, 951–956.
- Ebeling O, Duczmal A, Aigner S, Geiger C, Schollhammer S, Kemshead JT, Möller P, Schwartz-Albiez R & Altevogt P.** (1996). L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to alpha v beta 3 integrin. *Eur J Immunol.* 26, 2508-2516.
- Falco M, Cantoni C, Bottino C, Moretta A & Biassoni R.** (1999). Identification of the rat homologue of the human NKp46 triggering receptor. *Immunol Lett.* 411-414.
- Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A & Caligiuri MA.** (2002). Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect *Blood.* 100, 1935-1947.
- Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M & Caligiuri MA.** (2003). CD56 bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood.* 101, 3052.
- Ferlazzo G, Thomas D, Lin SL, Goodman K, Morandi B, Muller WA, Moretta A & Müntz C.** (2004). The Abundant NK Cells in Human Secondary Lymphoid Tissues Require Activation to Express Killer Cell Ig-Like Receptors and Become Cytolytic 1 *The Journal of Immunology.* 172, 1455–1462.
- Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM & Müntz C.** (2002). Human Dendritic Cells Activate Resting Natural Killer (NK) Cells and Are Recognized via the NKp30 Receptor by Activated NK Cells. *J. Exp. Med.* 195, 343–351.
- Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet T, Tursz T, Maras-kovsky E & Zitvogel L.** (1999). Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat. Med.* 5, 405–411.
- Fogel M, Mechtersheimer S, Huszar M, Smirnov A, Abu-Dahi A, Tilgen W, Reichrath J, Georg T, Altevogt P & Gutwein P.** (2003). L1 adhesion molecule (CD 171) in development and progression of human malignant melanoma. *Cancer Lett.* 189, 237-247.
- Foster CE, Colonna M & Sun PD.** (2003). Crystal structure of the human NK cell activating receptor NKp46 reveals structural relationship to other leukocyte receptor complex immunoreceptors. *J Biol Chem.* 278, 46081-46086
- Franco CR, Rocha HA, Trindade ES, Santos IA, Leite EL, Veiga SS, Nader HB & Dietrich CP.** (2001). Heparan sulfate and control of cell division: adhesion and proliferation of mutant CHO-745 cells lacking xylosyl transferase. *Braz J Med Biol Res.* 34, 971-975.

Literaturverzeichnis

- Frohn C, Schlenke P & Kirchner H.** (1997). The repertoire of HLA-Cw-specific NK cell receptors CD158 a/b (EB6 and GL183) in individuals with different HLA phenotypes. *Immunology*. 92, 567-570.
- Futerman AH, Low MG, Ackermann KE, Sherman WR & Silman I.** (1985). Identification of covalently bound inositol in the hydrophobic membrane-anchoring domain of Torpedo acetylcholinesterase. *Biochem Biophys Res Commun*. 129, 312-317.
- Garrido F & Algarra I.** (2001). MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res*. 83, 117-158.
- Gastpar R, Gross C, Rossbacher L, Ellwart J, Riegger J & Multhoff G.** (2004). The Cell Surface-Localized Heat Shock Protein 70 Epitope TKD Induces Migration and Cytolytic Activity Selectively in Human NK Cells. *The Journal of Immunology*. 172, 972-980.
- George T, Yu YY, Liu J, Davenport C, Lemieux S, Stoneman E, Mathew PA, Kumar V & Bennett M.** (1997). Allorecognition by murine natural killer cells: lysis of T-lymphoblasts and rejection of bone-marrow grafts. *Immunological Reviews* 155, 29-40.
- Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G & Trinchieri G.** (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med*. 195, 327-333.
- Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M & Spies T.** (1996). Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93, 12445-12450.
- Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH & Spies T.** (1999). Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6879-6884.
- Gumperz JE, Valiante NM, Parham P, Lanier LL & Tyan D.** (1996). Heterogeneous phenotypes of expression of the NKB1 natural killer cell class I receptor among individuals of different human histocompatibility leukocyte antigens types appear genetically regulated, but not linked to major histocompatibility complex haplotype. *J Exp Med*. 183, 1817-1827.
- Gunning P, Leavitt J, Muscat G, Ng SY & Kedes L.** (1987). A human β -actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA*. 84, 4831-4835.
- Hanada K, Hara T, Fukasawa M, Yamaji A, Umeda M & Nishijima M.** (1998). Mammalian cell mutants resistant to a sphingomyelin-directed cytolysin. Genetic and biochemical evidence for complex formation of the LCB1 protein with the LCB2 protein for serine palmitoyltransferase. *J Biol Chem*. 273, 33787-33794.
- Hanke T & Raulet DH.** (2001). Cumulative inhibition of lymphocytes resulting from engagement of multiple inhibitory Ly49 receptors. *J. Immunol.* 166, 3002-3007.
- Held W & Kunz B.** (1998). An allele-specific, stochastic gene expression process controls the expression of multiple Ly49 family genes and generates a diverse, MHC-specific NK cell receptor repertoire. *Eur.J.Immunol.* 28, 2407-2416.

Literaturverzeichnis

Hiraku Y & Kawanishi S. (1999). Involvement of oxidative DNA damage and apoptosis in antitumor actions of aminosugars. *Free Radic Res.* 31, 389-403.

Hoglund P, Sundback J, Olsson-Alheim MY, Johansson M, Salce-do M, Ohlen C, Ljunggren HG, Sentman CL & Karre K. (1997). Host MHC class I gene control of NK-cell specificity in the mouse. *Immunol.Rev.* 155, 11-28.

Hortsch M. (2000). Structural and functional evolution of the L1 family: are four adhesion molecules better than one? *Mol Cell Neurosci.* 15, 1-10.

Huang W, Li S, Zeng J, Liu Y, Wu M & Zhang M. (2000). Growth inhibition, induction of apoptosis by green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate in cultured rabbit lens epithelial cells. *Yan Ke Xue Bao.* 16, 194-198.

Huard B & Früh K. (2000). A role for MHC class I down-regulation in NK cell lysis of herpes virus-infected cells. *European Journal of Immunology* 30, 509-515.

Hui K, Grosveld F, & Festenstein H. (1984). Rejection of transplantable AKR leukaemia cells following MHC DNA-mediated cell transformation. *Nature* 311, 750-752.

Husain Z, Alper CA, Yunis EJ & Dubey DP. (2002). Complex expression of natural killer receptor genes in single natural killer cells. *Immunology.* 106, 373-380.

Ichikawa S, Sakiyama H, Suzuki G, Hidari KI & Hirabayashi Y. (1996). Expression cloning of a cDNA for human ceramide glucosyltransferase that catalyzes the first glycosylation step of glycosphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 4638-4643.

Iizuka K, Chaplin DD, Wang Y, Wu Q, Pegg LE, Yokoyama WM & Fu YX (1999). Requirement for membrane lymphotoxin in natural killer cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 6336-6340.

Iizuka K, Naidenko OV, Plougastel BF, Fremont DH & Yokoyama WM. (2003). Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKR1 family of natural killer cell receptors. *Nat Immunol.* 4, 801-807.

Inokuchi J & Radin NS. (1987). Preparation of the active isomer of 1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol, inhibitor of murine glucocerebrosidase. *J Lipid Res.* 28, 565-571.

Inokuchi J & Radin NS. (1987). Preparation of the active isomer of 1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol, inhibitor of murine glucocerebrosidase. *J Lipid Res.* 28, 565-571.

Inokuchi J, Mizutani A, Jimbo M, Usuki S, Yamagishi K, Mochizuki H, Muramoto K, Kobayashi K, Kuroda Y, Iwasaki K, Ohgami Y & Fujiwara M. (1997). Up-regulation of ganglioside biosynthesis, functional synapse formation, and memory retention by a synthetic ceramide analog (L-PDMP). *Biochem Biophys Res Commun.* 237, 595-600.

Irie A, Koyama S, Kozutsumi Y, Kawasaki T & Suzuki A. (1998). The molecular basis for the absence of N-glycolylneuraminic acid in humans. *J Biol Chem.* 273, 15866-15871.

Literaturverzeichnis

Ito M, Ikegami Y, Omori A & Yamagata T. (1991). Conversion of endoglycoceramidase-activator II by trypsin to the 27.9 kDa polypeptide possessing full activity: purification of activator for endoglycoceramidase by trypsin treatment followed by trypsin-inhibitor agarose column application. *J Biochem (Tokyo)*. 110, 328-332.

Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, Beul K, Kempf S, Behrens G, Sykora KW & Schmidt RE. (2001). CD56 bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56 dim NK cells. *Eur. J. Immunol.* 31, 3121.

Janeway C & Travers P. (1997). *Immunologie. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.*

Johnson SA & Denton RM. (2003). Insulin stimulation of pyruvate dehydrogenase in adipocytes involves two distinct signalling pathways. *Biochem J.* 369, 351-351.

Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H & Golstein P. (1994). Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science.* 265, 528-530.

Kalina U, Kauschat D, Koyama N, Nuernberger H, Ballas K, Koschmieder S, Bug G, Hofmann WK, Hoelzer D & Ottmann OG. (2000). IL-18 activates STAT3 in the natural killer cell line 92, augments cytotoxic activity, and mediates IFN-gamma production by the stress kinase p38 and by the extracellular regulated kinases p44erk-1 and p42erk-21. *J Immunol.* 165, 1307-1313.

Kasahara Y, Tuder RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC & Voelkel NF. (2001). Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 163, 737-744.

Kasaian MT, Whitters MJ, Carter LL, Lowe LD, Jussif JM, Deng B, Johnson KA, Witek JS, Senices M, Konz RF, Wurster AL, Donaldson DD, Collins M, Young DA & Grusby MJ. (2002). IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity. *Immunity.* 16, 559-569.

Kayagaki N. et al. (1999). Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK-cells. *J.Immunol.* 163, 1906-1913.

Kelly JM, Darcy PK, Markby JL, Godfrey DI, Takeda K, Yagita H & Smyth MJ. (2002). Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection. *Nat Immunol.* 3, 83-90.

Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, Matsuki N, Charrier K, Sedger L, Willis CR, Brasel K, Morrissey PJ, Stocking K, Schuh JC, Joyce S & Peschon JJ. (2000). Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med.* 191, 771-780.

Kiessling R, Klein E & Wigzell H. (1975a). "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukaemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol.* 5, 112-117.

Literaturverzeichnis

Kiessling R, Klein E, Pross H & Wigzell H. (1975b). "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol.* 5, 117-121.

Kiessling R, Wei WZ, Herrmann F, Lindencrona JA, Choudhury A, Kono K & Seliger B. (2002). Cellular immunity to the Her-2/neu protooncogene. *Adv Cancer Res.* 85, 101-44.

King A, Burrows T & Loke YW. (1996). Human uterine natural killer cells. *Nat.Immun.* 15, 41-52.

Kleene R, Yang H, Kutsche M & Schachner M. (2001). The neural recognition Molecule L1 is a Sialic Acid-binding Lectin for CD24, which induces Promotion and Inhibition of Neurite Outgrowth. *J Biol Chem.* 276, 21656-21663.

Kondo E, Yoshino T, Nishiuchi R, Sakuma I, Nishizaki K, Kayagaki N, Yagita H & Akagi T. (1997). Expression of Fas ligand mRNA in germinal centres of the human tonsil. *J Pathol.* 183, 75-79.

Korten S, Wilk E, Gessner JE, Meyer D & Schmidt RE. (1999). Altered donor and recipient Ly49⁺ NK cell subsets in allogeneic H-2d --> H-2b and H-2b --> H-2d bone marrow chimeras. *J.Immunol.* 163, 5896-5905.

Kossiakoff AA & Spencer SA. (1980). Neutron diffraction identifies His 57 as the catalytic base in trypsin. *Nature.* 288, 414-416.

Krmpotic A, Busch DH, Bubic I, Gebhardt F, Hengel H, Hasan M, Scalzo AA, Koszinowski UH & Jonjic S. (2002). MCMV glycoprotein gp40 confers virus resistance to CD8⁺ T cells and NK cells in vivo. *Nat Immunol.* 3, 529-535.

Kronenberg M & Gapin L. (2002). The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 557.

Kuan S-H, Byrd JC, Basbaum C & Kim YC. (1989). *J. Biol. Chem.* 264, 19271-19277.

Kuby J. (1999). Immunology.

Lanier LL, Corliss B & Phillips JH. (1997). Arousal and inhibition of human NK cells. *Immunol Rev.* 155, 145-154.

Lanier LL, Ruitenberg JJ & Phillips JH. (1988). Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *J Immunol.* 3478-3485

Lanier LL. (1998). NK-Cell-Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 359-393.

Li P, Willie ST, Bauer SDL, Spies T & Strong RK. (1999). Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a gammadelta T cell ligand. *Immunity.* 10, 577-584.

Lib MY, Brown RM, Brown GK, Marusich MF & Capaldi RA. (2002). Detection of pyruvate dehydrogenase E1 alpha-subunit deficiencies in females by immunohistochemical demonstration of mosaicism in cultured fibroblasts. *J Histochem Cytochem.* 50, 877-884.

Literaturverzeichnis

- Lindberg J, Martin-Fontecha A & Hoglund P.** (1999). Natural killing of MHC class I(-) lymphoblasts by NK cells from long-term bone marrow culture requires effector cell expression of Ly49 receptors. *Int Immunol.* 11, 1239-1246.
- Lisanti MP, Field MC, Caras IW, Menon AK & Rodriguez-Boulan E.** (1991). Mannosamine, a novel inhibitor of glycosylphosphatidylinositol incorporation into proteins. *EMBO J.* 10, 1969-77.
- Litvak DA, Bilchik AJ & Cabot MC.** (2003). Modulators of ceramide metabolism sensitize colorectal cancer cells to chemotherapy: a novel treatment strategy. *J Gastrointest Surg.* 7, 140-148.
- Ljunggren HG & Kärre K.** (1985). Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Med.* 162, 1745-1759.
- Ljunggren HG & Kärre K.** (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today.* 237-244.
- Llera AS, Viedma F, Sanchez-Madrid F & Tormo J.** (2001). Crystal structure of the C-type lectin-like domain from the human hematopoietic cell receptor CD69. *J Biol Chem.* 276, 7312-7319.
- López-Botet M, Llano M, Navarro F & Bellon T.** (2000). NK cell recognition of non-classical HLA class I molecules. *Semin Immunol.* 12, 109-119.
- Malisan F, Franchi L, Tomassini B, Ventura N, Condo I, Rippo MR, Rufini A, Liberati L, Nachtigall C, Kniep B & Testi R.** (2002). Acetylation suppresses the proapoptotic activity of GD3 ganglioside. *J Exp Med.* 196, 1535-1541.
- Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, Bushkin Y, Davis DM, Strominger JL, Yewdell JW & Porgador A.** (2001). Recognition of hemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by Human NK cells. *Nature.* 409, 1055-1060.
- Mandelboim O, Malik P, Davis DM, Jo CH, Boyson JE & Strominger JL.** (1999). Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 5640-5644.
- Marcenaro E, Augugliaro R, Falco M, Castriconi R, Parolini S, Sivori S, Romeo E, Millo R, Moretta L, Bottino C & Moretta A.** (2003). CD59 is physically and functionally associated with natural cytotoxicity receptors and activates human NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol.* 33, 3367-3376.
- Martin AM, Kulski JK, Witt C, Pontarotti P & Christiansen FT.** (2002). *Trends Immunol.* 23, 81-88.
- McConville MJ & Menon AK.** (2000). Recent developments in the cell biology and biochemistry of glycosylphosphatidylinositol lipids. *Mol Membr Biol.* 17, 1-16.
- McQueen KL & Parham P.** (2002). Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells. *Curr Opin Immunol.* 14, 615-621.

Literaturverzeichnis

- Mingari MC, Ponte M, Vitale C, Bellomo R & Moretta L.** (2000). Expression of HLA class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: a regulated mechanism that controls T-cell activation and function. *Hum Immunol.* 61, 44-50.
- Momburg F & Hämmerling GJ.** (1998). Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class I molecules. *Adv.Immunol.* 68, 191-256.
- Momburg F, Koch N, Möller P, Moldenhauer G & Hämmerling GJ.** (1986). In vivo induction of H-2K/D antigens by recombinant interferon- γ . *Eur J Immunol.* 16, 551-557.
- Moos M, Tacke R, Scherer H, Teplow D, Fruh K & Schachner M.** (1988). Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature.* 334, 701-703.
- Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC & Moretta L.** (2000). Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunology Today.* 21, 228-234
- Moretta A.** (2002). Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol.* 2, 957-64.
- Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R & Moretta A.** (2002). Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol.* 32, 1205-1211.
- Moretta L, Mingari MC, Pende D, Bottino C, Biassoni R & Moretta A** (1996). The molecular basis of natural killer (NK) cell recognition and function. *J Clin Immunol.* 5, 243-253.
- Mrozek E, Anderson P, Caligiuri MA.** (1996). Role of interleukin-15 in the development of human CD56⁺ natural killer cells from CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 87, 2632-2640.
- Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, et al.** (1995). A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *International Journal of Cancer.* 61, 272-279.
- Murakami M, Takahashi Y, Isashi Y, Kon S, Jia WY, Inobe M, Abe R & Uede T.** (1996). Identification and characterization of an alternative cytotoxic T lymphocyte associated protein 4 binding molecule on B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 7838-7842.
- Nagakura S, Ishihara S, Dunn DE, Nishimura J, Kawaguchi T, Horikawa K, Hidaka M, Kagimoto T, Eto N, Mitsuya H, Kinoshita T, Young NS & Nakakuma H.** (2002). Decreased susceptibility of leukemic cells with PIG-A mutation to natural killer cells in vitro. *Blood.* 100, 1031-1037.
- Navarro F, Llano M, Bellon T, Colonna M, Geraghty DE & López-Botet M.** (1999). The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur J Immunol.* 277-283.
- Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Van Deusen JB, Wei XQ, et al.** (2002). Coordinated and distinct roles for IFN- α , IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J. Immunol.* 169, 4279-4287.

Literaturverzeichnis

Nicholson KM, Quinn DM, Kellett GL & Warr JR. (1999). Preferential killing of multidrug-resistant KB cells by inhibitors of glucosylceramide synthase. *Br J Cancer.* 81, 423-430.

Ogasawara K, Hida S, Azimi N, Tagaya Y, Sato T, Yokochi-Fukuda T, Waldmann TA, Taniguchi T & Taki S. (1998). Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells. *Nature.* 391, 700-703.

Ojo E & Wigzell H. (1978). Natural killer cells may be the only cells in normal mouse lymphoid cell populations endowed with cytolytic ability for antibody-coated tumour target cells. *Scand.J.Immunol.* 7, 297-306.

Ono M & Tanaka N. (1986). Augmentation of natural killer activity by neuraminidase treatment of lymphocytes from tumor-bearing mice. *Acta Med Okayama.* 40, 45-53.

Ortaldo JR & Young HA. (2003). Expression of IFN-gamma upon triggering of activating Ly49D NK receptors in vitro and in vivo: costimulation with IL-12 or IL-18 overrides inhibitory receptors. *J Immunol.* 170, 1763-1769.

Palmer JM, Kirby JA & Jones DEJ. (2002). The immunology of primary biliary cirrhosis: the end of the beginning? *Clin Exp Immunol.* 129, 191-197.

Pamer E & Cresswell P. (1998). Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol.* 16, 323-358.

Pardoll D. (1998). Cancer vaccines. *Nature Medicine Vaccine Supplement.* 4, 525-531.

Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, Marcenaro E, Accame L, Malaspina A, Biassoni R, Bottino C, Moretta L & Moretta A. (1999). Identification and Molecular Characterization of NKp30, a Novel Triggering Receptor Involved in Natural Cytotoxicity Mediated by Human Natural Killer Cells. *J. Exp. Med.* 190, 1505–1516.

Pessino A, Sivori S, Bottino C, Malaspina A, Morelli L, Moretta L, Biassoni R & Moretta A. (1998). Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med.* 188, 953-960.

Pronk GJ, Ramer K, Amiri P & Williams LT. (1996). Requirement of an ICE-like protease for induction of apoptosis and ceramide generation by REAPER. *Science.* 271, 808-810.

Rajagopalan S & Long EO. (2000). Use of vaccinia virus for functional gene transfer in natural killer cells. *Methods Mol Biol.* 121:265-272.

Ran S, Downes A & Thorpe PE. (2002). Increased Exposure of Anionic Phospholipids on the Surface of Tumor Blood vessels. *Cancer Research.* 62, 6132-6140.

Raulet DH, Vance RE & McMahon CW. (2001). Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol.* 19, 291-330.

Literaturverzeichnis

Raulet DH. (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol.* 3, 781-790.

Reyburn HT, Mandelboim O, Vales-Gomez M, Davis DM, Pazmany L & Strominger JL. (1997). The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature.* 386, 514-517.

Robertson MJ & Ritz J. (1990). Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood.* 76, 2421-38.

Rock KL. (1996). A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol Today.* 17, 131-137.

Roda-Navarro P, Arce I, Renedo M, Montgomery K, Kucherlapati R & Fernandez-Ruiz E. (2000). Human KLRF1, a novel member of the killer cell lectin-like receptor gene family: molecular characterization, genomic structure, physical mapping to the NK gene complex and expression analysis. *Eur J Immunol.* 30, 568-576.

Rosales Fritz VM & Maccioni HJ. (1995). Effects of brefeldin A on synthesis and intracellular transport of ganglioside GT3 by chick embryo retina cells. *J Neurochem.* 65, 1859-1864.

Rosales Fritz VM, Maxzud MK & Maccioni HJ. (1996). GT3 synthesis in the proximal Golgi occurs in a compartment different from those for GD3 and GM3 synthesis. *J Neurochem.* 67, 1393-1400.

Sadeghi H & Birnbaumer M. (1999). O-Glycosylation of the V2 vasopressin receptor. *Glycobiology.* 9, 731-737.

Salazar-Mather TP, Orange JS & Biron CA. (1998). Early murine cytomegalovirus (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha)-dependent pathways. *J Exp Med.* 187, 1-14.

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), 2nd Ed.

Sanchez MJ, Muench MO, Roncarolo MG, Lanier LL & Phillips JH. (1994). Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus. *J. Exp. Med.* 180, 569-576.

Schäkel K, Kannagi R, Kniep B, Goto Y, Mitsuoka C, Zwirner J, Soruri A, von Kietzell M & Rieber E. (2002). 6-Sulfo LacNAc, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells. *Immunity.* 17, 289-301.

Schmidt RE, Michon JM, Woronicz J, Schlossman SF, Reinherz EL & Ritz J. (1987). Enhancement of natural killer function through activation of the T11 E rosette receptor. *J. Clin. Invest.* 79, 305-308.

Seliger B, Bock M, Ritz U & Huber C. (2002). High frequency of a non-functional TAP1/LMP2 promoter polymorphism in human tumors. *Int J Oncol.* 20, 349-353.

Literaturverzeichnis

Shibuya N, Goldstein IJ, Broekaert WF, Nsimba-Lubaki M, Peeters B & Peumans WJ. (1987). The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(α 2,6)Gal/GalNAc sequences. *J Biol Chem* 262, 1596-1601.

Siliciano RF, Pratt JC, Schmidt RE, Ritz J & Reinherz EL. (1985). Activation of cytolytic T lymphocyte and natural killer cell function through the T11 sheep erythrocyte binding protein. *Nature*. 317, 428–430.

Sivori S, Bottino C, Malaspina A, Morelli L, Moretta L, Biassoni R & Moretta A. (1998). Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med*. 953-960

Sivori S. et al. (1997). p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule, which mediates cell activation. *J. Exp. Med*. 186, 1129-1136.

Sivori S. et al. (1999). NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells: correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur. J.Immunol*. 29, 1647-1655.

Sivori S. et al. (2000). 2B4 functions as a co-receptor in human natural killer cell activation. *Eur. J. Immunol*. 30, 787-793

Smith HR, Heusel JW, Mehta IK, Kim S, Dorner BG, Naidenko OV, Iizuka K, Furukawa H, Beckman DL, Pingel JT, Scalzo AA, Fremont DH & Yokoyama WM. (2002). Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 8826-8831.

Smyth MJ, Crowe NY, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H & Godfrey DI. (2002b). NKT cells - conductors of tumor immunity? *Curr Opin Immunol*. 14, 165-171.

Smyth MJ, Crowe NY, Pellicci DG, Kyparissoudis K, Kelly JM, Takeda K, Yagita H & Godfrey DI. (2002c). Sequential production of interferon-gamma by NK1.1⁽⁺⁾ T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Blood*. 99, 1259-1266.

Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K & Yagita H. (2002a). New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2, 850-861

Smyth MJ, Johnstone RW, Cretney E, Haynes NM, Sedgwick JD, Korner H, Poulton LD & Baxter AG. (1999). Multiple deficiencies underlie NK cell inactivity in lymphotoxin-alpha gene-targeted mice. *J Immunol*. 163, 1350-1353.

Smyth MJ, Kelly JM, Baxter AG, Korner H & Sedgwick JD. (1998). An essential role for tumor necrosis factor in natural killer cell-mediated tumor rejection in the peritoneum. *J Exp Med*. 188, 1611-1619.

Smyth MJ, Kershaw MH & Darcy PK. (1998). Xenospecific CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte generation: accessory function for CD4⁺ T cells and natural killer 1.1⁺ cells. *Transplantation*. 65, 1278-1281

Literaturverzeichnis

Smyth MJ, Krasovskis E, Sutton VR & Johnstone RW. (1998). The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 7024-7029.

Smyth MJ, Thia KY, Cretney E, Kelly JM, Snook MB, Forbes CA & Scalzo AA. (1999). Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. *J Immunol.* 162, 6658-6662.

Solomon KR, Rudd CE & Finberg RW. (1996). The association between GPI-anchored proteins and heterotrimeric G protein alpha subunits in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6053-6058.

Solomon KR, Rudd CE & Finberg RW. (1996) The association between GPI-anchored proteins and heterotrimeric G protein alpha subunits in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6053-8.

Soloski MJ. (2001). Recognition of tumor cells by the innate immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 154.

Spaggiari GM, Carosio R, Pende D, Marcenaro S, Rivera P, Zocchi MR, Moretta L & Poggi A. (2001). NK cell-mediated lysis of autologous antigen-presenting cells is triggered by the engagement of the phosphatidylinositol 3-kinase upon ligation of the natural cytotoxicity receptors NKp30 and NKp46 *Eur. J. Immunol.* 31, 1656–1665.

Storkus WJ, Alexander J, Payne JA, Dawson JR & Cresswell P. (1998). Reversal of natural killing susceptibility in target cells expressing transfected class I HLA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86, 2361-2364.

Storset AK, Slettedal IO, Williams JL, Law A & Dissen E. (2003). *Eur. J Immunol.* 33, 980-990.

Street SE, Cretney E & Smyth MJ. (2001). Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood.* 97, 192-197.

Stryer L. (1996). Vision: from photon to perception. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 557-559.

Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Yamaguchi N, Yagita H & Okumura K. (2001). Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth. *Cell Immunol.* 214, 194-200.

Tanamachi DM, Hanke T, Takizawa H, Jamieson AM & Raulet DR. (2001). Expression of natural killer receptor alleles at different Ly49 loci occurs independently and is regulated by major histocompatibility complex class I molecules. *J Exp Med.* 193, 307-315.

Thies A, Schachner M, Moll I, Berger J, Schulze HJ, Brunner G & Schumacher U. (2002). Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur J Cancer.* 38, 1708-1716.

Literaturverzeichnis

- Tomasello E, Desmoulins PO, Chemin K, Guia S, Cremer H, Ortaldo J, Love P, Kaiserlian D & Vivier E.** (2000). Combined natural killer cell and dendritic cell functional deficiency in KARAP/DAP12 loss-of-function mutant mice. *Immunity*. 13, 355-364.
- Tomassini B & Testi R.** (2002). Mitochondria as sensors of sphingolipids. *Biochimie*. 84, 123-129.
- Tortorella D, Gewurz BE, Furman MH, Schust DJ & Ploegh HL.** (2000). Viral subversion of the immune system. *Annual Review in Immunology* 18, 861-926.
- Trinchieri G.** (1989). Biology of natural killer cells. *Advances in Immunology*. 47, 187-376.
- Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, et al.** (1997). Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 7, 753-763.
- Ulloa F & Real FX.** (2001). Differential distribution of sialic acid in α 2,3 and α 2,6 linkages in the apical membranes of cultured cells and tissues. *J Histochem Cytochem* 49, 501-509.
- Uyttenhove C, Maryanski J & Boon T.** (1983). Escape of mouse mastocytoma P815 after nearly complete rejection is due to antigen-loss variants rather than immunosuppression. *J Exp Med*. 57, 1040-1052.
- Valiante NM & Trinchieri G.** (1993). Identification of a novel signal transduction surface molecule on human cytotoxic lymphocytes. *J Exp Med*. 178, 1397-1406.
- Valiante NM, Lienert K, Shilling HG, Smits BJ & Parham P.** (1997a). Killer cell receptors: keeping pace with MHC class I evolution. *Immunol.Rev.*155, 155-164.
- Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Arnett KL, D'Andrea A, Phillips JH, Lanier LL & Parham P.** (1997b). Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity*. 7, 739-751.
- Van den Broek ME, Kagi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, Melief CJ, Zinkernagel RM & Hengartner H.** (1996). Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*. 184, 1781-1790.
- Van den Broek MF, Kagi D, Zinkernagel RM & Hengartner H.** (1995). Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control in vivo. *Eur J Immunol*. 25, 3514-3516.
- Van Rinsum J, Smets LA, Van Rooy H & Van den Eijnden DH.** (1986). Specific Inhibition of human natural killer cell-mediated cytotoxicity by Sialic Acid and Sialo-oligosaccharides. *Int. J. Cancer*. 38, 915-922.
- Vankayalapati R, Wizel B, Weis SE, Safi H, Lakey DL, Mandelboim O, Samten B, Porgador A, & Barnes PF.** (2002). The NKp46 Receptor Contributes to NK Cell Lysis of Mononuclear Phagocytes Infected with an Intracellular Bacterium. *The Journal of Immunology*. 168, 3451-3457.

Literaturverzeichnis

Vankayalapati R, Wize B., Weis SE., Safi H., Lakey DL., Mandelboim O., Samten B., Porgador A., Barnes PF., (2002). The NKp46 receptor contributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol.* 168, 3451-7.

Vazhappilly R & Sucher NJ. (2002). Turnover analysis of N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1 protein in PC12 cells. *Neuroscience Letters* 318, 153–157

Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S., Birrer MJ, Szabo E, Zon LI, Kyriakis JM, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z & Kolesnick RN. (1996). Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature.* 380, 75-79.

Vitale C, Pitto A, Benvenuto F, Ponte M, Bellomo R, Frassoni F, Mingari MC, Bacigalupo A, Moretta L. (2000). Phenotypic and functional analysis of the HLA-class I-specific inhibitory receptors of natural killer cells isolated from peripheral blood of patients undergoing bone marrow transplantation from matched unrelated donors. *Hematol J.* 1, 136-44.

Vitale M, Falco M, Castriconi R, Parolini S, Zambello R, Semenzato G, Biassoni R, Bottino C, Moretta L & Moretta A. (2001). Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells *Eur. J. Immunol.* 31, 233–242.

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-MHC restricted tumor cell lysis. *J. Exp. Med.* 187, 2065-2072.

Wang WC & Cummings RD. (1988). The immobilized leucoagglutinin from the seeds of *Maackia amurensis* binds with high affinity to complex-type asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked α 2,3 to penultimate galactose residues. *J Biol Chem* 263, 4576-4585

Westgaard IH, Berg SF, Orstavik S, Fossum S & Dissen E. (1998). Identification of a human member of the Ly-49 multigene family. *European Journal of Immunology.* 28, 1839-1846.

Williams NS, Moore TA, Schatzle JD, Puzanov IJ, Sivakumar PV, Zlotnik A, Bennett M & Kumar V. (1997). Generation of lytic natural killer 1.1+, Ly-49- cells from multipotential murine bone marrow progenitors in a stroma-free culture: definition of cytokine requirements and developmental intermediates. *J Exp Med.* 186, 1609-1614.

Wilson JL, Heffler LC, Charo J, Scheynius A, Bejarano M-T & Ljunggren H-G. (1999). Targeting of human dendritic cells by autologous NK cells. *J. Immunol.* 163, 6365–6370.

Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T., Lanier LL & Phillips HJ, (1999). An Activating Immunoreceptor Complex Formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285, 730-732.

Yogeeswaran G, Gronberg A, Hansson M, Dalianis T, Kiessling R & Welsh RM. (1981). Correlation of Glycosphingolipids and Sialic Acid in Yac-1 lymphoma variants with their sensitivity to natural killer cell-mediated lysis. *Int. J. Cancer.* 28, 517-526.

Literaturverzeichnis

Yokoyama WM, Kim S & French AR. (2004). The Dynamic life of natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 12.1–12.25.

Yokoyama WM. (1999). Natural Killer Cells, in Paul, W. E. (Ed.), *Fundamental Immunology*, 4th Edn., Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia. 575-603.

Younsi M, Quilliot D, Al-Makdissy N, Delbachian I, Drouin P, Donner M & Ziegler O. (2002). Erythrocyte membrane phospholipid composition is related to hyperinsulinemia in obese nondiabetic women: effects of weight loss. *Metabolism.* 1261-1268.

Zegers MMP & Hoekstra D. (1998). Mechanisms and functional features of polarized membrane traffic in epithelial and hepatic cells. *Biochem. J.* 336, 257–269.