

Sebastian Stark  
Dr. med.

## **Isoleuzin-Zipper Fusionsproteine und ihr Einsatz bei Untersuchungen von Oberflächenrezeptor-Liganden-Interaktionen bei Natürlichen Killerzellen**

Geboren am 10.10.1978 in Marburg / Lahn  
Staatsexamen am 13.12.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Immunologie  
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. C. Watzl

Natürliche Killerzellen (NK Zellen) fielen als dritte Lymphozyten-Population durch ihre Fähigkeit auf, Tumorzellen und virusinfizierte Zellen sofort beim ersten Kontakt töten zu können. Während die verwandten T- und B-Zellen zur später einsetzenden, erworbenen oder adaptiven Immunität zu rechnen sind, gehören die NK Zellen zur angeborenen oder innaten Abwehr. Damit spielen sie eine wichtige Rolle im Rahmen der ersten, frühen Phase der Immunantwort. Ihre Funktion wird bestimmt durch das Zusammenspiel eines festen Repertoires an aktivierenden und inhibierenden Oberflächenrezeptoren.

Wichtig auf der Seite hemmender Rezeptoren sind die so genannten KIRs (killer cell Ig-like receptors). Diese erkennen MHC Klasse I-Moleküle (MHC I: major histocompatibility complex class I) und kontrollieren somit die Intaktheit der Zellen. Den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildet die Untersuchung aktivierender NK Zell-Oberflächenrezeptoren. Diese werden vertreten durch die *Natural Cytotoxicity Receptors* (NCR) mit NKp30, NKp44 und NKp46, den NKG2D-Rezeptor, die Familie der SLAM-verwandten Rezeptoren (SRR: SLAM-related receptors) mit 2B4, CRACC (CS-1) und NTB-A, sowie die Rezeptoren NKp80, DNAM-1 und CD96 (Tactile).

Für die Arbeiten mit den aktivierenden Rezeptoren wurden zunächst auf dem NK Zell-Gebiet neuartige Isoleuzin-Zipper (ILZ)-Fusionsproteine etabliert. Über ihre charakteristische Isoleuzin-Sequenz, an die jeweils die extrazelluläre Domäne eines Rezeptors gebunden ist, lagern sie sich zu trimeren Fusionskonstrukten zusammen. Identität und Funktionalität der dreiwertigen Proteine konnten eindeutig demonstriert werden, nachdem sie durch Transfektion der humanen 293T Zelllinie mit entsprechenden DNA-Vektoren erfolgreich produziert wurden. Mit Hilfe der ILZ-Fusionsproteine war es möglich, die Identität des Liganden von NTB-A aufzuklären. NTB-A ist homophil und interagiert damit wie andere SRR-Familienmitglieder mit sich selbst.

Das Hauptaugenmerk der weiteren Untersuchungen lag auf Wechselwirkungen zwischen NK Zellen selbst oder zwischen NK Zellen und ihrer Umgebung, bestehend aus

potentiellen Zielzellen oder anderen lymphatischen Zellen. Rezeptoren der SRR-Familie, die auf vielen lymphatischen Zellen zu finden sind, waren hierbei von besonderem Interesse. Sie interagieren entweder mit sich selbst oder aber haben einen Liganden, der ebenfalls auf NK Zellen oder aber anderen hämatopoetischen Zellen zu finden ist. Vor dem Hintergrund dieser Verteilungsmuster stellte sich die Frage, ob SRR für die Kommunikation zwischen Zellen des lymphatischen Systems bedeutsam sein könnten. Bei unseren Versuchen im humanen System war die Inter-NK Zell-Kommunikation über SRR hinsichtlich Proliferation und Ausbildung des zytotoxischen Potentials frisch isolierter NK Zellen ohne Bedeutung. Wir konnten aber zeigen, dass SRR auf NK Zellen mehr als kostimulatorisch sind und Zytotoxizität auslösen, wenn sie durch Überexpression ihrer Liganden auf Zielzellen verstärkt angesprochen werden. Insbesondere bei Verlust der NK Zell-Inhibition über MHC I-Moleküle gewinnen die SRR an Gewicht und bewirken Zielzellyse. Unter diesen Umständen kann sogar gegenseitige NK Zell-Lyse beobachtet werden, trotz gleicher Herkunft der Spenderzellen. Hierbei schien die 2B4-CD48-Wechselwirkung besonders bedeutend zu sein, da bei unseren Versuchen neben 2B4 auch CD48 die Zytotoxizität einer NK Zelle anschalten konnte. Das bisher nur als reiner Ligand für 2B4 auf NK Zellen gehandelte CD48 konnte zudem nach Stimulation auf einer NK Zelllinie Interferon (IFN)- $\gamma$ -Produktion auslösen. Damit muss nun auch CD48 zur wachsenden Familie aktivierender NK Zell-Rezeptoren gezählt werden, während das SRR-Familienmitglied 2B4 als CD48-Ligand ebenfalls eine neue Funktion erhält.

Das bisherige Bild von den Funktionen der SRR-Familie auf Zellen des lymphatischen Systems konnte durch unsere Beobachtungen bei NK Zellen vervollständigt werden. Diese erlauben auch einen neuen Blick auf die Beteiligung von NK Zellen an einer XLP (X-linked lymphoproliferative disease) genannten Immundefizienz. Für deren Pathogenese spielt unter anderem ein Defekt in der 2B4-Signaltransduktionskaskade eine Rolle. Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektionen können bei betroffenen Individuen tödlich verlaufen. Interessanterweise wird durch eben diese EBV-Infektionen auf B-Zellen auch der 2B4-Ligand CD48 vermehrt exprimiert. Gesunde NK Zellen könnten diese veränderten Zellen also mit Hilfe des 2B4-Rezeptors erkennen und eliminieren. Analog dazu könnten Virusinfektionen lymphatischer Zellen gesteigerte Expression auch weiterer SRR-Liganden zur Folge haben. Möglicherweise sind funktionierende NK Zellen alleine durch ihr SRR-Repertoire in der Lage, derartig veränderte Zellen im Organismus zu detektieren und auf der Stelle zu eliminieren. NK Zellen würden somit andere für effektive Immunabwehr wichtige Zellen kontinuierlich überprüfen und die "kranken" unter ihnen ausschalten.