

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen-Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologin Nicole Schwinn
aus Dieburg
Tag der mündlichen Prüfung:
18. Dezember 2007

**Erkennung von humanen Melanomzellen durch
Natürliche Killerzellen –
Expression und Regulation der Liganden des
aktivierenden Immunrezeptors NKG2D**

Gutacher: PD Dr. Viktor Umansky

PD Dr. Anne Régnier-Vigouroux

Meiner Familie

*„Wenn die Menschen nur über das sprächen, was sie begreifen,
dann würde es sehr still auf der Welt sein.“*

Albert Einstein

Danksagung

Viele Menschen trugen erheblich zum Gelingen dieser Arbeit bei. Namentlich erwähnen möchte ich dabei besonders:

Prof. Dr. Dirk Schadendorf, der mir die Möglichkeit gab in seiner Arbeitsgruppe diese Arbeit durchzuführen. Insbesondere möchte ich ihm für die außergewöhnliche Unterstützung in jeder Phase dieser Arbeit und auch darüber hinaus danken.

PD Dr. Viktor Umansky für die Übernahme des Referats und für die zahlreichen, immer wieder anregenden Diskussionen.

PD Dr. Anne Régnier-Vigouroux danke ich für ihre Bereitschaft das Ko-Referat zu übernehmen, und dass sie immer wieder den Weg nach Mannheim auf sich genommen hat, um meine Arbeit zu begleiten.

PD Dr. Annette Paschen gilt mein besonderer Dank. Durch ihre überragende Betreuung und ihre motivierende Art in jeder erdenklichen Situation, trug sie in erheblichem Maß zum Gelingen dieser Arbeit bei. Die vielen Diskussionen brachten immer wieder neue Ideen, Sichtweisen und Denkanstöße. Danke für alles!

Dr. Adelheid Cerwenka möchte ich für die erfolgreiche Kollaboration, besonders in der Anfangsphase, sowie für die immer wieder interessanten Diskussionen danken. Auch die Mitglieder dieser Arbeitsgruppe trugen zum Gelingen dieser Kollaboration bei. Ein herzliches Dankeschön für Herstellung der Transduktanten, die Hilfe bei der quantitativen PCR, für die Beantwortung meiner nicht enden wollenden Fragen und das freundschaftliche Arbeitsklima.

Bei Dr. Norbert Arens bedanke ich mich ganz besonders für die Einführung in die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und die gelungene Betreuung in diesem Bereich.

Was ist ein Doktorand ohne seine Kollegen...

Vielen Dank an alle Post-Docs und Doktoranden der AG Schadendorf. Sie haben mit interessanten Vorschlägen und Diskussionsrunden die Qualität dieser Arbeit wesentlich beeinflusst.

Darüber hinaus möchte ich besonders Dr. Wolfram Osen und seine Gruppe erwähnen, die mich in die Arbeit des Radioaktiv-Labors einführten und mir immer wieder diesbezüglich hilfreich zur Seite standen. Ein herzliches Dankeschön dafür.

Auch dem Team rund um Antje Sucker möchte ich danken, dass sie mir immer wieder meine zahlreichen Fragen beantworteten, den Nachschub an Melanomzelllinien ermöglichten und für ein herausragend gutes Arbeitsklima sorgten. Ganz besonders danke ich dabei Claudia und Sandra, die tatkräftig zur Seite standen, wenn ihre Hilfe nötig war.

Tanja und Iris, was wäre ich ohne euch? Auch wenn gelegentlich nicht alles nach Plan lief, habt Ihr mit zahlreichen Ratschlägen, Aufmunterungen und eurer Herzlichkeit erheblich dazu beigetragen, dass die Freude und der Spaß an der Arbeit nicht verloren gingen. Ein grenzenloses Dankschön dafür.

Meinem Freundeskreis, der mir ermöglicht hat, die Arbeit und das Leben mit anderen Augen betrachten zu können. Darüber hinaus hat jeder einzelne mich auf seine Art wieder auf die Beine gestellt, wenn es nötig war und sich in schönen Zeiten mit mir gefreut. Ich kann nicht in Worte fassen, wie dankbar ich euch für all das bin.

Ohne meine Familie, ihr Engagement und ihre Unterstützung wäre vieles nicht möglich gewesen. Ihr habt mir in jeder Lebenslage einen unbeschreiblichen Rückhalt gegeben und mir immer hilfreich und tatkräftig zur Seite gestanden. Erst durch euch bin ich da, wo ich heute bin. Danke für alles!

Inhalt

1	<i>Zusammenfassung</i>	1
1.1	Deutsche Zusammenfassung	1
1.2	English Summary	3
2	<i>Einleitung</i>	5
2.1	Das maligne Melanom	5
2.1.1	Die Epidemiologie des malignen Melanoms	5
2.1.2	Die Entstehung des malignen Melanoms	6
2.1.3	Die Therapiemöglichkeiten für das maligne Melanom.....	7
2.2	Das humane Immunsystem	9
2.2.1	Das angeborene Immunsystem	10
2.2.2	Das adaptive Immunsystem	11
2.3	Die Natürlichen Killerzellen	13
2.3.1	Die Regulation der Aktivität von Natürlichen Killerzellen	15
2.3.1.1	Die HLA Klasse I-abhängige Regulation	16
2.3.1.2	Die HLA Klasse I-unabhängige Regulation	18
2.3.2	Der aktivierende Immunrezeptor NKG2D.....	20
2.3.2.1	Die Liganden des NKG2D Rezeptors.....	22
2.3.2.2	Die Regulation von NKG2D und seinen Liganden	25
2.4	Zielsetzung	27
3	<i>Material und Methoden</i>	28
3.1	Materialien	28
3.1.1	Zelllinien.....	28
3.1.2	Reagenzien.....	30
3.1.3	Verbrauchsmaterialien	32
3.1.4	Geräte.....	33
3.1.5	Antikörper.....	35
3.2	Methoden	37
3.2.1	Zellkultur	37
3.2.1.1	Passagieren von Zelllinien	37
3.2.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	38
3.2.1.3	Zellzahlbestimmung	39
3.2.1.4	Zytokinbehandlung von Tumorzelllinien	39
3.2.1.5	Isolierung von polyklonalen NK-Zellen aus Buffy Coats.....	40
3.2.1.6	Elektroporation	43

3.2.2	RT-PCR	45
3.2.3	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	47
3.2.4	Quantitative Versuche.....	50
3.2.4.1	Durchflusszytometrie – Fluorescence activated cell-sorting (FACS).....	50
3.2.4.2	Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)	51
3.2.4.3	Radioaktiver Lyse-Versuch	53
3.2.4.4	Quantitative PCR – TaqMan®	54
4	<i>Ergebnisse</i>	58
4.1	Erkennung von Melanomzellen durch Natürliche Killerzellen	58
4.1.1	Analyse der Oberflächenexpression der NKG2D Liganden mit dem Fusionsprotein hNKG2D-F _c	59
4.1.2	Analyse der MIC und ULBP Region auf Metaphasechromosomen mittels Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH).....	60
4.1.3	Expressionsprofile der einzelnen NKG2D Liganden in Melanomzellen.....	64
4.2	Einfluss von Zytokinen auf die Expression der NKG2D Liganden in Melanomzellen . 68	
4.2.1	Charakterisierung der IFN- γ -vermittelten Reduktion der NKG2D Liganden.....	71
4.2.1.1	Einfluss der IFN- γ Konzentration auf die Oberflächenexpression der NKG2D Liganden	71
4.2.1.2	Einfluss der Inkubationsdauer mit IFN- γ auf die Oberflächenexpression der NKG2D Liganden	71
4.2.1.3	Vergleich der NKG2D Liganden-spezifische RNA- und Oberflächenexpression nach IFN- γ Behandlung	72
4.2.1.4	Freisetzung der NKG2D Liganden	73
4.2.1.5	Die Rolle von STAT1 in der Regulation der IFN- γ -abhängigen Expression der NKG2D Liganden	75
4.2.1.6	Expressionsprofile weiterer aktivierender Liganden	77
4.2.2	Erkennung von Melanomzellen durch Natürliche Killerzellen in Abhängigkeit von IFN- γ	77
4.2.2.1	Erkennung der Melanomzellen durch NKL-Zellen	77
4.2.2.2	Erkennung der Melanomzellen durch polyklonale NK-Zellen von gesunden Spendern	80
4.3	Expression der NKG2D Liganden auf den Zellen verschiedener Tumorentitäten 82	
4.3.1	Analyse der Oberflächenexpression der NKG2D Liganden auf Glioblastomzellen	82
4.3.2	Analyse der Oberflächenexpression der NKG2D Liganden auf weiteren Tumorzelllinien.....	84
5	<i>Diskussion</i>	85
5.1	Erkennung von Melanomzellen durch Natürliche Killerzellen	85
5.2	Einfluss von Zytokinen auf die Expression der NKG2D Liganden in Melanomzellen . 89	
5.2.1	Einfluss von IFN- α und TNF- α auf die NKG2D Ligandenexpression	90
5.2.2	Einfluss von IFN- γ auf die NKG2D Ligandenexpression.....	91

5.2.2.1	Molekulare Mechanismen der Regulation der NKG2D Ligandenexpression in Abhängigkeit von IFN- γ	93
5.2.2.2	Erkennung der Melanomzellen durch Natürliche Killerzellen in Abhängigkeit von IFN- γ ..	97
5.3	Expression der NKG2D Liganden auf Zellen verschiedener Tumorentitäten in Abhängigkeit von IFN-γ.....	103
5.4	Interaktion zwischen Tumor und Natürlichen Killerzellen <i>in vivo</i> und der potentielle Einfluss von IFN-γ.....	104
6	<i>Literaturverzeichnis</i>.....	109
7	<i>Anhang</i>.....	125
7.1	Ergänzendes Material zu den Ergebnisse	125
7.1.1	Darstellung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie.....	125
7.1.2	Kreuzreaktivität der Primer.....	126
7.1.3	Kreuzreaktivität der Antikörper	127
7.1.4	Erkennung der Melanomzellen durch die Natürliche Killerzelllinie NKL – Kontrollzelllinien .	129
7.1.5	Durchflusszytometrische Analyse der isolierten polyklonalen NK-Zellen aus Buffy Coats	130
7.2	Abkürzungsverzeichnis.....	131

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Das maligne Melanom stellt eine der aggressivsten Tumorarten dar und ist durch eine stetig ansteigende Inzidenz weltweit charakterisiert. Die Tumormetastasen zeichnen sich häufig durch eine reduzierte und in selteneren Fällen durch den vollständigen Verlust der HLA Klasse I Expression aus, wodurch sich das Melanom der adaptiven Immunantwort durch T-Lymphozyten entziehen kann. Der HLA Klasse I Komplex inhibiert über die Interaktion mit spezifischen Rezeptoren die zytotoxische Aktivität Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen). Folglich ist der Verlust der HLA Klasse I Expression ('missing self') mit einer Aktivierung von NK-Zellen verbunden, sofern diese stimulierende Signale über weitere Rezeptoren erhalten. Die Aktivierung der NK-Zellen beruht demnach auf der Balance aktivierender und inhibierender Signale. Einer der bedeutendsten aktivierenden Rezeptoren auf NK-Zellen ist NKG2D, der nach Interaktion mit seinen Liganden eine effiziente Stimulierung von NK-Zellen induzieren kann. Die NKG2D Liganden MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 und ULBP3 werden häufig auf transformierten Zellen als Stressmarker exprimiert, ihre Regulation ist allerdings nur unzureichend analysiert.

In dieser Arbeit wurde die NKG2D-vermittelte Erkennung HLA-Klasse I-defizienter Melanomzellen durch NK-Zellen untersucht, wobei der Fokus auf der Expression und Regulation der NKG2D Liganden in den Tumorzellen lag. Zunächst wurde ein detailliertes RNA und Proteinexpressionsprofil der NKG2D Liganden erstellt. Dabei waren MICA und ULBP2 Transkripte in allen, MICB und ULBP3 Transkripte in den meisten analysierten Linien detektierbar. Auf der Oberfläche exprimierten die Melanomlinien fast ausschließlich die Liganden MICA und ULBP2. Folglich wird die Expression der NKG2D Liganden nicht ausschließlich transkriptionell reguliert.

Um den Einfluss von Zytokinen auf die Regulation der NKG2D Liganden zu bestimmen, wurden die Melanomzellen mit den wichtigen immunmodulatorischen Zytokinen Interferon-alpha ($\text{IFN-}\alpha$), Tumor Nekrose Faktor-alpha ($\text{TNF-}\alpha$) und Interferon-gamma ($\text{IFN-}\gamma$) behandelt. Nach viertägiger Inkubation beeinflusste lediglich $\text{IFN-}\gamma$ die Expression der NKG2D Liganden in den analysierten Melanomzellen deutlich. Die Oberflächenexpression von MICA und teilweise auch von ULBP2 wurde signifikant reduziert. Dies resultierte in einer eingeschränkten NKG2D-vermittelten Lyse der Melanomzellen durch die Natürliche Killerzelllinie NKL. Die $\text{IFN-}\gamma$ -vermittelte Reduktion der MICA/ULBP2 Oberflächenexpression korrelierte

nicht mit einer entsprechenden Verringerung der spezifischen RNA Menge. Zudem schien die IFN- γ -abhängige Regulation der MICA Oberflächenexpression nicht ausschließlich von STAT1, dem klassischen Vermittler IFN- γ -induzierter Signale, abhängig zu sein. Es wird daher ein komplexer Kontrollmechanismus vermutet, der die Expression der NKG2D Liganden post-transkriptionell beeinflusst. Da auf Glioblastomzellen, im Gegensatz zu verschiedenen Karzinomzelllinien, ebenfalls eine IFN- γ -induzierte verringerte Oberflächenexpression der Liganden detektierbar war, könnte der IFN- γ Effekt zumindest für Zellen neuroektodermalen Ursprungs konserviert sein.

Basierend auf den Daten dieser Arbeit ist anzunehmen, dass sich HLA Klasse I-negative Melanomzellen nicht nur einer T-Zellantwort, sondern möglicherweise auch einer NK-Zellantwort durch Reduktion der Oberflächenexpression der NKG2D Liganden in einer IFN- γ reichen Tumorumgebung entziehen können. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zu einem besseren Verständnis der Interaktion von Melanom- und NK-Zellen bei und sollten bei der Optimierung bestehender und der Entwicklung neuer Therapien für Melanompatienten berücksichtigt werden.

1.2 English Summary

Malignant melanoma is one of the most aggressive tumors with a continuously growing incidence. In the metastatic disease stage tumor cells are characterized by a frequent downregulation and in some cases by an irreversible total loss of HLA class I expression. Consequently these melanoma cells can escape a T lymphocyte-mediated adaptive immune response. HLA class I molecules inhibit the activation of Natural Killer cells (NK cells) by interacting with specific receptors. Therefore loss of HLA class I expression ('missing self') is associated with an activation of NK cells if stimulating signals are provided by the tumor cells to NK receptors. Thus activation of NK cells is based on the balance of inhibitory and activating signals. NKG2D is one of the most crucial activating receptors expressed on NK cells. After interaction with its ligands MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 and ULBP3 this receptor can induce an effective stimulation of NK cells. The NKG2D ligands are stress induced antigens on transformed cells, however their regulation has been analyzed only insufficiently.

This work explores the NKG2D-mediated recognition of HLA class I-deficient melanoma cells by NK cells focusing on the expression and regulation of NKG2D ligands in tumor cells. Initially a detailed profile of RNA and protein expression was compiled. MICA and ULBP2 transcripts were detected in all, MICB and ULBP3 transcripts were expressed by most melanoma cell lines analyzed. On the surface only MICA and ULBP2 were detected unequivocally, thus surface expression did not mirror RNA content. Consequently NKG2D ligand expression is not only regulated transcriptionally.

To determine the influence of cytokines on the regulation of NKG2D ligands, melanoma cells were treated with the important immunomodulating cytokines Interferon-alpha, Tumor Necrosis factor-alpha and Interferon-gamma (IFN- γ), respectively. After cytokine treatment of melanoma cells for four days IFN- γ was the only cytokine capable of affecting NKG2D ligand expression. In doing so, surface expression of MICA and in part also of ULBP2 was reduced significantly. This resulted in impaired NKG2D-mediated lysis of melanoma cells by the NK cell line NKL. There was no correlation between MICA/ULBP2 surface expression and corresponding RNA concentration. Moreover IFN- γ -induced downregulation of surface-MICA was not solely dependent on STAT1, the characteristic mediator of IFN- γ induced signaling. Hence a complex controlling mechanism is assumed which influences post-transcriptionally the expression of NKG2D ligands. In contrast to diverse carcinoma cell lines, glioblastoma cells also downregulate surface expression of NKG2D ligands in the pres-

ence of IFN- γ . Therefore the observed IFN- γ effect may be conserved at least for cells of neuroectodermal origin.

Based on the data of this work one can assume that HLA class I-negative melanoma cells can not only evade T cell-dependent immune responses but might also elude NK immune activity by reducing surface expression of NKG2D ligands in an IFN- γ rich environment. The results of this work contribute to an improved understanding of the melanoma and NK cell interaction and should be considered when amending established and designing new therapies for melanoma patients.

2 Einleitung

Die Haut ist das größte und vielseitigste Organ aller Säugetiere. Ähnlich einer Hülle umgibt sie den Körper und schützt so den Organismus vor schädlichen Umwelteinflüssen, wie beispielsweise dem Eindringen von Pathogenen. Jedoch kann die Haut selbst ebenso von Krankheiten betroffen sein und auch verschiedene Arten von Tumoren hervorbringen. Der Hautkrebs wird dabei in maligne und nicht-maligne Formen unterteilt. Zum nicht-maligen oder auch weißen Hautkrebs zählen das Basalzellkarzinom und das Squamouszellkarzinom. Obwohl beide Typen die häufigsten auftretenden Hauttumore darstellen, zeichnen sie sich durch eine geringe Metastasierungsfähigkeit aus. Im Gegensatz dazu steht das maligne Melanom, welches zu den aggressivsten Tumoren überhaupt zählt. Die Erkennung des malignen Melanoms durch spezifische Zellen des Immunsystems ist Gegenstand dieser Arbeit.

2.1 Das maligne Melanom

Zurzeit ist der schwarze Hautkrebs ein sehr schwierig zu behandelnder solider Tumor. Obwohl er nur ca. 1% der gesamten Tumor-assoziierten Todesfälle ausmacht, ist er nach dem Auftreten von Fernmetastasen durch eine 5-Jahres-Überlebensrate von unter 10% charakterisiert (Schultz & Schuler, 2005).

2.1.1 Die Epidemiologie des malignen Melanoms

Die Häufigkeit des malignen Melanoms ist eng mit dem Leben in gewissen geographischen Zonen assoziiert, wobei überwiegend die hellhäutige Bevölkerung betroffen ist. Während Australien weltweit die höchsten Patientenzahlen hinsichtlich des malignen Melanoms aufweist (56 männliche bzw. 43 weibliche Fälle auf 100.000 Einwohner), liegt in Deutschland die Häufigkeit bei ungefähr 10 Patienten pro 100.000 Einwohner (Lehnert et al., 2005). Auffällig ist die in den letzten Jahrzehnten stark gestiegene Inzidenz, wobei eine Verdopplungsrate alle 10-20 Jahre festgestellt werden kann (Diepgen & Mahler, 2002). Die Mortalitätsrate ist dabei auf einem stabilen Niveau geblieben bzw. sinkt leicht ab (Buettner et al., 2005; Diepgen & Mahler, 2002; Lasithiotakis et al., 2006). Dieses Phänomen ist sehr wahrscheinlich auf die zahlreichen Aufklärungskampagnen und der damit verbundenen frühzeitigen Erkennung eines Melanoms zurückzuführen. Auch bessere diagnostische Verfahren (z.B. Ultraschall der Lymphknoten) und standardisierte Behandlungsmethoden (z.B. Sicherheitsabstände bei der chirurgischen Entfernung) sind in den letzten drei Dekaden zum Einsatz gekommen. Dies alles führt neben der früheren Erkennung zu einer optimierten Behandlung und einer verbes-

serten Nachsorge (Buettner et al., 2005; de Vries & Coebergh, 2004; Lasithiotakis et al., 2006; Ringborg et al., 1996).

2.1.2 Die Entstehung des malignen Melanoms

Als Ursache der Entstehung eines Melanoms sind verschiedene Risikofaktoren bekannt, darunter die angeborene Prädisposition (Pigmentierung der Haut, Anzahl melanozytärer Nävi, gehäuftes Auftreten des malignen Melanoms in der Familie) und unterschiedliche Umwelteinflüsse, wie beispielsweise die Strahlenbelastung durch UV-Licht im Kindesalter (Diepgen & Mahler, 2002; Holly et al., 1987; Wiecker et al., 2003). Zudem kann eine Suppression des Immunsystems, wie bei AIDS- oder Transplantations-Patienten, zu einem erhöhten Risiko führen (Markovic et al., 2007).

Auf zellulärer Ebene resultiert das Melanom aus einer Transformation der Melanozyten. Diese liegen in der Epidermis, genauer in der Basalschicht (Stratum basale) und zeichnen sich durch die Produktion von Melanin aus. Das Melanin wird in Melanosomen über die dendritischen Zellfortsätze der Melanozyten zu den Keratinozyten befördert, um die darunter liegenden Zellschichten vor der DNA-schädigenden UV-Strahlung zu schützen (Costin & Hearing, 2007). Bemerkenswerterweise kann gerade diese UV-Strahlung dazu führen, dass die DNA der Melanozyten geschädigt wird, wodurch Mutationen auftreten können, die für die Entstehung des Melanoms verantwortlich sind.

Genetisch gesehen ist die Entstehung eines Melanoms sehr kompliziert. Sehr häufig treten Mutationen im Bereich des MAP-Kinase-Signalwegs auf (Proto-Onkogene B-RAF und N-RAS; Brose et al., 2002; Tsao et al., 2004). Auch der Mikrophthalmia-assoziierte Transkriptionsfaktor (MITF), wichtiger Regulator Melanozyten-spezifischer, sowie proliferativer Gene, scheint bei der Entstehung des Melanoms von Bedeutung zu sein (Gray-Schopfer et al., 2007; Levy et al., 2006). Ist ein familiär gehäuftes Auftreten von Melanomen festzustellen, so ist eine Mutation des Tumor-Suppressor-Gens 'Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A' (CDKN2A) oder 'Cyclin-dependent kinase 4' (CDK4) oftmals die Ursache. Auch bestimmte Allele für den Melanocortin-1 Rezeptor korrelieren mit einem höheren Risiko für die Entstehung eines malignen Melanoms (Markovic et al., 2007). Weiter Moleküle, die bei der Entwicklung des Melanoms eine Rolle spielen, indem sie die Apoptose-Sensitivität vermindern, sind 'apoptotic peptidase activating factor-1' (APAF-1), Lipid Phosphatase 'phosphate and tensin homologue' (PTEN), 'nuclear factor κ B' (NF- κ B) und 'B-cell leukaemia/lymphoma 2' (Bcl-2; Gray-Schopfer et al., 2007)

2.1.3 Die Therapiemöglichkeiten für das maligne Melanom

Trotz einer verbesserten Behandlung von Melanompatienten durch standardisierte Methoden und einer optimierten Nachsorge, konnten innerhalb der letzten drei Jahrzehnte keine markanten Verbesserungen in der Behandlung von Melanompatienten erreicht werden. Die Standardtherapie stellt nach wie vor die chirurgische Entfernung des Tumors dar. Dadurch kann bei Einhaltung der Sicherheitsabstände und je nach Tiefe des Tumors bereits eine vollständige Heilung erreicht werden. Gegebenenfalls werden zudem Wächterlymphknotenbiopsien durchgeführt (Ringborg et al., 1996; Schultz & Schuler, 2005).

Die zurzeit angewandten Chemotherapien für Patienten mit Melanomen in frühen als auch in späten Stadien weisen nach derzeitigem Kenntnisstand keine gesteigerte Überlebensraten auf, können aber, vor allem bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf, zur Linderung der Beschwerden beitragen (Schultz & Schuler, 2005). Hierbei galt Dacarbazin (DTIC) lange Zeit als Standardtherapeutikum, wird in den letzten Jahren aufgrund geringerer Nebenwirkungen aber zunehmend durch Temozolomid ersetzt (Wolchok & Saenger, 2007). Dieses ist ein stark lipophiles Medikament, das die Blut-Hirn-Schranke passieren kann und auch bei der Behandlung von häufig auftretenden Hirnmetastasen eingesetzt wird. Zurzeit wird es in einigen Studien in Kombination mit anderen Medikamenten, wie dem anti-angiogenisch wirkenden Thalidomid, getestet, wobei vielfach starke Nebenwirkungen auftreten. Als weitere Chemotherapeutika wurden und werden unter anderem Carboplatin (vernetzt DNA und verhindert DNA-Replikation), Paclitaxel (verhindert normale Mikrotubuli-Organisation), Fotemustin (induziert DNA-Strangbrüche) und Sorafenib (Inhibitor des MAP-Kinase Signalswegs) in verschiedenen klinischen Studien getestet, jedoch bislang nur mit mäßigem Erfolg (Garbe & Eigentler, 2004; Wolchok & Saenger, 2007; Zimpfer-Rechner et al., 2003).

Ein völlig neuartiger Therapieansatz ist die Behandlung mit Oblimersen (G3139). Dieser Wirkstoff ist eine spezifische 'small interfering RNA' (siRNA; siehe auch Kapitel 2.2.1.6.), welcher die Synthese des Apoptose-Regulatorproteins Bcl-2 deutlich reduziert (Klasa et al., 2000). Das Wachstum des Tumors in Melanompatienten wird bei Anwendung mit Oblimersen deutlich einschränkt, wobei die Blockierung von Bcl-2 nicht hauptsächlich dafür verantwortlich zu sein scheint (Raffo et al., 2004). Trotz der unklaren Wirkweise werden aufgrund guter klinischer Ansprechraten zurzeit Mono- und Polychemotherapien mit Oblimersen, besonders mit DTIC, sowie Kombinationen mit Zytokinen angewandt (Kasper et al., 2007).

In rund 3-15% aller auftretenden malignen Melanome sind spontane Regressionen zu beobachten (Jack et al., 2006). Eine Ursache hierfür liegt sehr wahrscheinlich in der Immunogenität des Melanoms, weshalb zunehmend verschiedene Strategien in der Immuntherapie an-

gewendet werden. In Folge einer Immuntherapie sollen die körpereigenen Immunzellen aktiviert werden und dann in die Lage sein, die Tumorzellen zu erkennen und zu lysieren (Jack et al., 2006). Zu den unspezifischen Immuntherapien gehört unter anderem die systemische Gabe von Zytokinen, um verschiedene Zellen des Immunsystems zu aktivieren (Atkins, 2006). In einer Phase III Studie wurde die Wirksamkeit von Interferon-gamma (IFN- γ) bei der Behandlung des malignen Melanoms getestet (Kleeberg et al., 2004). Mit dem verwendeten Behandlungsschema und den eingesetzten Dosierungen konnte jedoch keine Verbesserung des Gesamtüberlebens nach Verabreichung von IFN- γ festgestellt werden. In einer Meta-Analyse von elf randomisierten adjuvanten Interferon-alpha (IFN- α) Studien, konnte eine signifikante Verlängerung des krankheitsfreien Überlebens (einige Monate) und ein Trend für eine Verlängerung der Überlebenszeit festgestellt werden. Eine Erhöhung der Remissionsrate wird häufig durch die Kombination von IFN- α mit DTIC erzielt, welche aber letztendlich nicht zu einer signifikanten Verlängerung des Gesamtüberlebens führt (Garbe & Eigentler, 2007). Immuntherapien mit hohen Dosen Interleukin-2 (IL-2) werden aufgrund starker Nebenwirkungen und hoher Zytotoxizität unterdessen sehr zurückhaltend eingesetzt, wenngleich teilweise gute Ansprechraten bei Patienten in Stadium IV beschrieben wurden (Atkins, 2006; Jack et al., 2006). Zurzeit werden auch IL-2 und IFN- α gemeinsam zur Therapie verwendet (Garbe & Eigentler, 2004). Es wurde jedoch beobachtet, dass durch die Anwendung von IL-2 vermehrt regulatorische T-Zellen (T_{reg}) aktiviert werden (siehe auch Kapitel 2.2.2). Diese $CD4^+$ $CD25^+$ T-Zellen sind in der Lage, andere Immunzellen in ihrer Aktivität einzuschränken. In diesem Zusammenhang ist der Rezeptor CTLA-4 auf T_{reg} von Bedeutung. Durch die Antikörper-vermittelte Blockierung von CTLA-4 konnten regulatorische T-Zellen vermehrt deaktiviert und die Inaktivität von zytotoxischen T Lymphozyten (cytotoxic T lymphocytes, CTL) zum Teil aufgehoben werden (Yamaguchi & Sakaguchi, 2006; Zou, 2006). In zwei von drei durchgeführten Studien, in denen CTLA-4 Antikörper bei Patienten mit malignem Melanom eingesetzt wurden, konnten zwar gute klinische Ansprechraten erzielt werden, diese korrelierten jedoch häufig mit dem Auftreten von Autoimmunreaktionen, wie Vitiligo oder Kolitis (Lejeune, 2006; Sansom & Walker, 2006).

Vakzinierungen von Patienten mit Tumor-assoziierten Antigenen, wie MelanA oder gp100, oder mit autologen Tumorslysaten führten zwar bei einigen Patienten zu Tumorregressionen, sind aber noch in Phase III Studien zu testen (Jack et al., 2006). Bei der Vakzinierung mit Antigen- bzw. mit Tumorslysat-beladenen autologen Dendritischen Zellen stabilisierte sich häufig die Erkrankung, wobei selten Total-Remissionen auftraten (Jack et al., 2006). Vakzinierungen sind im Allgemeinen jedoch nur bei Patienten in weniger fortgeschrittenen Stadien

sinnvoll, da das Immunsystem intakt sein muss, um T-Lymphozyten zu aktivieren und eine effektive Immunantwort auszulösen. Eine Alternative dazu stellt der adoptive Transfer von *ex vivo* expandierten autologen tumorspezifischen T-Zellen dar. Es werden dabei zwar gute Ansprechraten erzielt, allerdings treten auch hierbei starke Nebenwirkungen auf (Dudley et al., 2005; Jack et al., 2006). So sind aufgrund der nicht-myoablativen Chemotherapie, die zu einer kurzfristigen Zerstörung der Lymphozyten des Patienten führt, besonders Anämien und opportunistischen Infektionen feststellbar. Die autologen Tumor-spezifischen T-Zellen können Auto-Immunreaktionen gegenüber den Melanozyten hervorrufen, was sich häufig in einer Vitiligo manifestiert.

Obwohl das Melanom in frühen Stadien gut therapiert werden kann, ist es bei einem fortgeschrittenen Krankheitsverlauf schlecht zu behandeln. Selbst bei Anwendung neueren Therapien beträgt die mittlere Lebenserwartung nur sechs bis neun Monate nach dem Auftreten von Fernmetastasen (Atkins, 2006; de Vries & Coebergh, 2004; Schultz & Schuler, 2005). Der aggressive Verlauf des Tumors verlangt daher dringend neue Ansätze in der Therapie. Basierend auf den immunogenen Eigenschaften des Melanoms sollten diese vor allem in den Interaktionen mit dem Immunsystem gesucht werden. Das Zusammenspiel von Tumor und Immunsystem ist jedoch sehr komplex und bislang nicht im Einzelnen bekannt. Dementsprechend kann sowohl die erfolgreiche Entwicklung neuartiger Therapien, als auch die Steigerung der Effizienz von bereits vorhandenen Strategien nur dann erzielt werden, wenn die Interaktionen zwischen Tumor und Immunsystem besser verstanden sind.

2.2 Das humane Immunsystem

Der menschliche Organismus ist zahlreichen Erregern aus seiner Umwelt ausgesetzt. Um sich sowohl aktiv als auch passiv dagegen zu schützen, hat sich im Laufe der Evolution ein sehr effektives Zusammenspiel von Immunzellen und Mediatoren entwickelt. Die Zellen des Immunsystems gehen während der Ontogenese aus der fetalen Leber bzw. im adulten Stadium aus den pluripotenten hematopoietischen Stammzellen des Knochenmarks hervor und zirkulieren im Blutkreislauf bzw. im Lymphsystem (Delves & Roitt, 2000a). Die Effektorzellen des Immunsystems (Natürliche Killerzellen, B- und T-Lymphozyten) gehen in der folgenden Entwicklung aus lymphoiden Vorläuferzellen hervor. Die restlichen Zellen dieses Systems, wie Makrophagen und Dendritische Zellen (Ausnahme: plasmazytäre Dendritische Zellen), entwickeln sich aus myeloiden Vorläuferzellen. Eine durch die Zellen des Immunsystems induzierte Immunantwort kann dabei spezifisch (adaptive Immunantwort) oder unspezifisch (angeborene Immunantwort) gegen das Pathogen erfolgen. Obwohl sich adaptives und ange-

borenes Immunsystem hinsichtlich ihrer Wirkungsweise unterscheiden, besteht eine enge Interaktion zwischen beiden Verteidigungsmechanismen.

Eine zentrale Rolle im Rahmen von Immunantworten spielt der Haupthistokompatibilitäts-Komplex (engl.: Major Histocompatibility Complex – MHC), der im humanen System als humaner Leukozytenantigen (HLA) Komplex bezeichnet wird. Diese hoch polymorphen Moleküle werden in zwei große Gruppen, die MHC Klasse I und die MHC Klasse II Moleküle, unterteilt, deren Gene auf Chromosom 6 des Menschen lokalisiert sind. Dabei werden die klassischen Klasse I Moleküle (HLA-A, HLA-B und HLA-C) auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert, während Klasse II Moleküle (HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP) überwiegend auf den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems (engl.: antigen presenting cells – APC) vorhanden sind (Delves & Roitt, 2000a). Alle HLA Klasse I Moleküle zeichnen sich durch eine $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$ Domäne aus, wobei $\alpha 1$ und $\alpha 2$ eine Furche ausbilden, in der Peptide bestimmter Größe gebunden werden können. Die $\alpha 3$ Domäne hingegen beinhaltet den Transmembranbereich und kann mit $\beta 2$ Mikroglobulin ($\beta 2m$) assoziieren. Nur nach Assoziation mit $\beta 2m$ und einem körperfremden oder körpereigenen Peptid kann der HLA Komplex stabil auf der Oberfläche exprimiert werden. Dieser MHC/Peptid Komplex kann dann von T-Zellen erkannt werden und gegebenenfalls zu deren Aktivierung führen.

Darüber hinaus wurde bereits in den 1970er Jahren bekannt, dass der HLA-Komplex auch für die Kontrolle der Aktivität von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) von Bedeutung ist (siehe Kapitel 2.3).

2.2.1 Das angeborene Immunsystem

Aufgabe des angeborenen Immunsystems ist ein unspezifischer Schutz vor Infektionen ohne die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses. Dieser Schutz wird zunächst über verschiedene mechanische (z.B. die Haut; Verbindungen zwischen Epithelzellen – ‘tight junctions’), chemische (z.B. niedriger pH-Wert im Magen; Enzyme in der Tränenflüssigkeit) und mikrobiologische (körpereigene Bakterienflora kompetitiert mit Pathogenen) Barrieren erreicht. Ist es einem Erreger dennoch gelungen die erste Verteidigungslinie zu überwinden, versucht das angeborene Immunsystem den Krankheitserreger innerhalb der ersten Stunden nach der Infektion zu zerstören oder zumindest die Ausbreitung zu verhindern. Dies geschieht über molekulare sowie zelluläre Komponenten. Das Komplementsystem, das aus einer großen Zahl unterschiedlicher Plasmaproteine besteht, erkennt körperfremde Eindringlinge und kann sie direkt zerstören. Auch eine Markierung von pathogenen Erregern oder Substanzen durch Proteine des Komplementsystems ist möglich, wodurch phagozytotische Zellen den Komplex aufnehmen und unschädlich machen können (Nauta et al., 2004). Diese Mechanismen haben

zur Folge, dass nun besonders Zellen des angeborenen Immunsystems zum Ort der Infektion rekrutiert werden. Es sind vor allem Monozyten/Makrophagen, Neutrophile, sowie Dendritische Zellen (engl.: dendritic cells – DC). Sie alle sind phagozytotische Zellen, die Pathogene über bestimmte Rezeptoren erkennen, aufnehmen und zerstören können (Delves & Roitt, 2000a). Makrophagen und DC können durch die Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und Lipid-Mediatoren Entzündungsreaktionen auslösen, woraufhin weitere Zellen des Immunsystems zur Entzündungsstelle gelockt werden. Die Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, die NK-Zellen, Natürliche Killer T- (NKT-) Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen werden ebenfalls in dieses Gebiet rekrutiert und aktiviert (siehe auch 2.2.2). Sie tragen während der ersten Stunden und Tage nach der Infektion erheblich zur Bekämpfung von Pathogenen bei. Die genaue Funktion und Bedeutung der NK-Zellen, auch über die Bekämpfung von Krankheitserregern hinaus, wird in Kapitel 2.3 ausführlich beschrieben.

Die DC stellen die wichtigste Verbindung zum adaptiven Immunsystem dar. Sie zeichnen sich unter anderem durch die Expression von klassischen Rezeptoren des angeborenen Immunsystems aus, die konservierte Strukturen von Bakterien (PAMP – engl.: pathogen associated molecular pattern) erkennen können. Darunter befinden sich Lipopolysaccharid- (LPS), Manno- und Toll-like Rezeptoren (TLR). Nach Erkennung solcher Strukturen können DC die Pathogene aufnehmen und werden dadurch aktiviert. Während ihrer Reifung bewegen sie sich zum nächsten lokalen Lymphknoten, wo sie das Antigen über MHC Klasse I und MHC Klasse II Moleküle auf ihrer Oberfläche anderen Zellen des Immunsystems präsentieren können (Delves & Roitt, 2000a). Nach der Reifung exprimieren sie verstärkt ko-stimulatorische Moleküle zur Aktivierung weiterer Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems.

2.2.2 Das adaptive Immunsystem

Sollte das angeborene Immunsystem nicht in der Lage sein den Erreger zu beseitigen, sind es die Zellen des adaptiven Immunsystems, die einige Tage nach der Infektion spezifisch die pathogenen Substanzen eliminieren. Vermittelt wird diese Immunantwort durch T- und B-Lymphozyten, die sich durch somatische Rekombination ihrer Rezeptoren, klonale Selektion nach Antigenkontakt und Bildung eines immunologischen Gedächtnisses auszeichnen.

Nach der klonalen Selektion sind die naiven T-Lymphozyten in der Lage prozessierte Peptidpitope aus körperfremden und körpereigenen Antigenen zu unterscheiden. Diese zu Peptiden gekürzte Antigenstrukturen werden durch den MHC Klasse I Komplex auf nahezu allen kernhaltigen Zellen bzw. durch den MHC Klasse II Komplex auf professionellen APC (B-Zelle, DC oder Makrophagen) präsentiert. T-Zellen können durch ihren T-Zell-Rezeptor (engl.: T cell receptor – TCR), welcher aus einem Heterodimer mit einer α und einer β Kette

besteht, den Peptid/MHC Komplex erkennen. Verstärkt wird diese Bindung durch den Ko-Rezeptor CD8 (interagiert mit MHC Klasse I) bzw. CD4 (interagiert mit MHC Klasse II). Identifizieren die T-Lymphozyten das Epitop als körperfremd, so können sie aktiviert werden. Für eine effektive Aktivierung und eine Proliferation der T-Zellen ist unter anderem die Bindung weiterer ko-stimulatorischer Rezeptoren notwendig, wie beispielsweise die CD28/B7 und CD40L/CD40 Interaktion (Delves & Roitt, 2000a; Delves & Roitt, 2000b).

T-Zellen werden in verschiedene Subpopulation aufgeteilt. Die wichtigsten Gruppen des adaptiven Immunsystems sind dabei die zytotoxischen T-Zellen ($CD3^+CD4^-CD8^+$) und die T-Helfer-Zellen (T_H ; $CD3^+CD4^+CD8^-$). Die CTL stellen die wichtigsten Vermittler der zellulären zytotoxischen Immunantwort dar, während die T-Helfer-Zellen besonders für die Aktivierung von B-Lymphozyten von Bedeutung sind (T_H2), aber auch Makrophagen aktivieren und die T-Zellantwort der CTL induzieren und aufrechterhalten können (T_H1). Daneben existieren noch weitere T-Zellarten, wie die $\gamma\delta$ T-Zellen, welche im TCR anstatt der $\alpha\beta$ Ketten, ein Heterodimer aus γ und δ Kette aufweisen. Diese Zellen spielen vor allem in der angeborenen Immunität eine Rolle, da sie die Antigene direkt erkennen können, ohne dass diese auf MHC Molekülen präsentiert werden (Delves & Roitt, 2000a; Delves & Roitt, 2000b).

Zunehmend wird auch über NKT-Zellen berichtet, welche sich durch die Expression des T-Zell-Rezeptors und NK-typische Rezeptoren, wie CD56 und CD161 auszeichnen (Makino et al., 1995; Norris et al., 1999). NKT-Zellen werden als heterogene T-Zell-Subpopulation angesehen und dem adaptiven Immunsystem zugeordnet. Sie sollten daher nicht mit NK-Zellen gleichgestellt werden. Aktiviert werden NKT-Zellen durch Glykolipide, welche durch das monomorphe HLA Klasse I-ähnliche Molekül CD1d präsentiert werden (Linsen et al., 2005). Eine Beteiligung dieser Zellen bei verschiedenen Autoimmun-Erkrankungen, sowie bei der Tumorbekämpfung ist wahrscheinlich (Linsen et al., 2005; Seino et al., 2006). Das Wissen um den Einfluss regulatorischer T-Zellen (Suppressor T-Zellen, T_{reg} ; hauptsächlich $CD4^+CD25^+FOXP3^+$) hat in den letzten Jahren verstärkt an Bedeutung gewonnen. Obwohl sie notwendig sind, um die Immunantwort des Organismus zu begrenzen und zu terminieren, können sie dadurch auch indirekt das Tumorstadium fördern, indem sie die Aktivität der Effektorzellen einschränken und so die Lyse von Tumorzellen, unter anderem durch CTL, verhindern (Wing et al., 2005; Zou, 2006). Ein wichtiges Molekül in diesem Zusammenhang ist CTLA-4 (Sansom & Walker, 2006).

B-Zellen werden als die Effektorzellen der humoralen Immunität bezeichnet. Nach Bindung des Antigens über den B-Zell-Rezeptor und Aktivierung durch bestimmte T-Zellen (T_H2) kommt es zur somatischen Hypermutation. Durch den Einfluss bestimmter Zytokine wandelt

sich die aktivierte B-Zelle dabei zur B-Gedächtniszelle oder Plasmazelle um (Acosta-Rodriguez et al., 2007). Als Plasmazelle sekretiert sie große Mengen spezifischer Antikörper, die an das entsprechende Antigen binden. Dadurch kann das markierte Objekt direkt inaktiviert bzw. durch phagozytotische Zellen erkannt und aufgenommen werden. Auch das Komplementsystem und NK-Zellen werden dadurch aktiv.

Diese grundlegenden Mechanismen des Immunsystems wurden durch die Analyse der Interaktionen der Zellen des Immunsystems mit verschiedenen Pathogenen beschrieben. Bei der Eliminierung von Tumorzellen verwenden die Zellen des Immunsystems sehr ähnliche Strategien, wobei sich der Tumor häufig einer Immunantwort durch unterschiedliche Mechanismen entziehen kann.

2.3 Die Natürlichen Killerzellen

Natürliche Killerzellen gehören zu den Zellen des angeborenen Immunsystems, da sie nicht in der Lage sind Antigen-spezifische Rezeptoren durch somatische Rekombination zu erzeugen. Bereits Mitte der 1970er Jahre wurde das Phänomen der natürlich auftretenden Zytotoxizität einiger Lymphozyten gegenüber allogenen Tumorzellen beschrieben (Herberman et al., 1975a; Herberman et al., 1975b; Kiessling et al., 1975a; Kiessling et al., 1975b; Peter et al., 1975; Pross & Jondal, 1975). Diese Zellen wurde einige Zeit später als große granuläre Lymphozyten bezeichnet, die weder T- noch B-Zellen sind (Grossi et al., 1982; Timonen et al., 1979). Obwohl sie zunächst als unbedeutende Population angesehen wurden, nehmen sie heute eine Schlüsselrolle in der Bekämpfung von Pathogenen und Tumorzellen ein (Biron et al., 1989; Hokland & Kuppen, 2005). Allerdings sind sie auch an Autoimmunkrankheiten und bei der Induktion von Frühgeburten beteiligt (Martin-Pagola et al., 2004; Sargent et al., 2007).

Nach ihrer Reifung im Knochenmark sind NK-Zellen vor allem im Blut, aber auch in Leber, Niere und Lunge, sowie in Lymphknoten und lymphatischen Geweben zu finden und während der frühen Schwangerschaft in der Decidua des Uterus detektierbar. NK-Zellen können in Entzündungsherde und Tumore einwandern (Colucci et al., 2003; Sargent et al., 2007).

Natürliche Killerzellen repräsentieren cirka 10% aller humanen peripheren mononukleären Zellen des Blutes und exprimieren auf ihrer Oberfläche, im Gegensatz zu T-Lymphozyten, keinen CD3 Komplex. Sie zeichnen sich jedoch durch das Vorhandensein von CD56, einem neuronalen Adhäsionsmolekül (engl.: neuronal cell adhesion molecule – N-CAM), aus. Das Protein CD56 wird von einem Großteil der NK-Zellen (ca. 95% der peripheren NK-Zellen) nur schwach exprimiert. Allerdings weist diese Population auf der Oberfläche den IgG Rezep-

tor $F_c\gamma RIII$ (CD16) auf und wird demnach als $CD56^{dim}CD16^+$ bezeichnet. Diese Zellen besitzen eine hohe zytotoxische Aktivität, da sie sich durch große Mengen an Perforin-haltigen Granula auszeichnen. Jedoch sekretieren sie kaum $IFN-\gamma$ oder $TNF-\alpha$. Im Gegensatz dazu kann ein Teil der verbleibenden NK-Zell-Gruppe, die CD56 stark exprimiert, aber keine CD16 Moleküle auf der Oberfläche präsentiert ($CD56^{bright}CD16^-$), deutlich mehr $IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$ abgeben, zeichnet sich aber durch geringere Zytotoxizität aus (Cooper et al., 2001; Robertson et al., 1996a). Zwar unterteilt man NK-Zellen grob in diese beiden Gruppen, es wurden allerdings wesentlich mehr Subpopulationen von ausdifferenzierten NK-Zellen gefunden. Da diese in verschiedenen gesunden Individuen mit einer ungefähr gleichen Häufigkeit auftreten, kann auf unterschiedliche Funktionen jeder einzelnen Untergruppe geschlossen werden (Jonges et al., 2001). Ob die unterschiedlichen Gewebe, in denen NK-Zellen gefunden werden, Einfluss auf die Entwicklung der NK Subtypen haben und somit Grundlage der großen Mannigfaltigkeit von NK-Zellen sind, ist nicht vollständig geklärt (Colucci et al., 2003). Neuerdings wurde jedoch eine Änderung in der Definition von NK-Zellen vorgeschlagen, so dass alle Subpopulationen unabhängig von der Lokalisation mit eingeschlossen werden können. Demnach sollten NK-Zellen als enorm zytotoxisch wirkende, $IFN-\gamma$ produzierende $CD3^-NKp46^+$ Lymphozyten bezeichnet werden, die abhängig von IL-15 sind und auf IL-12 ansprechen (Walzer et al., 2007).

Obwohl Natürliche Killerzellen ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind, teilen sie viele Eigenschaften mit T-Zellen, wie z.B. die Zytotoxizität. Sie sind auch an der Regulation des adaptiven Immunsystems, etwa durch Freisetzung von $IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$, beteiligt bzw. werden durch dieses reguliert. Beispielsweise interagieren NK-Zellen direkt am Entzündungsherd und auch in den Lymphknoten mit Dendritischen Zellen, die wiederum für die Aktivierung von T-Zellen verantwortlich sind (Cooper et al., 2004; Degli-Esposti & Smyth, 2005; Fernandez et al., 1999). Durch $IFN-\gamma$ Sekretion der NK-Zellen werden DC aktiviert und Makrophagen rekrutiert. NK-Zellen können DC wiederum lysieren und dadurch indirekt die Aktivierung von T-Zellen verhindern (Ferlazzo et al., 2002; Pende et al., 2006). T-Zellen sind in der Lage NK-Zellen zu aktivieren, können selbst auch durch NK-Zellen in ihrer Proliferation gestoppt oder zerstört werden. Damit können NK-Zellen eine T-Zell Antwort begrenzen (Cerboni et al., 2007; Robertson et al., 1996a; Trivedi et al., 2005). NK-Zellen bilden demnach eine wichtige Brücke zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem.

Die Regulation der NK-Zellen ist im Allgemeinen zahlreichen inneren und äußeren Einflüssen unterworfen. So ist bekannt, dass NK-Zellen von jungen und älteren Menschen, von Gesunden, Krebs- und Autoimmun-Patienten oder auch Rauchern unterschiedliche Aktivitäten

haben (Borrego et al., 1999; Jonges et al., 2001). Diese Unterschiede lassen sich auf die hoch komplexe Regulation auf zellulärer Ebene zurückführen.

2.3.1 Die Regulation der Aktivität von Natürlichen Killerzellen

Allgemein ist bekannt, dass NK-Zellen IL-2 zur Proliferation bzw. IL-15 zur Homöostase benötigen (Cooper et al., 2002; Krishnaraj & Bhooma, 1996; Ranson et al., 2003). Die Aktivierung der NK-Zellen wird über eine große Anzahl verschiedener aktivierender und inhibierender Rezeptoren auf ihrer Oberfläche reguliert, durch die sie gesunde von infizierten oder transformierten Zellen unterscheiden können. Diese Regulation ist bis heute nicht vollständig verstanden und gilt, vor allem im Vergleich mit T- und B-Lymphozyten, als überaus kompliziert. Prinzipiell entscheidet die Balance aktivierender und inhibierender Zellkontakt-abhängiger Signale, sowie der Einfluss verschiedener Zytokine über den Aktivitätsstatus von NK-Zellen. Dabei wird die Aktivität definiert als die Fähigkeit Zielzellen, unter anderem durch die Freisetzung von zytotoxischen Granula, zu zerstören und Zytokine wie IFN- γ , TNF- α , TNF- β , IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-13 und den Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) freizusetzen (Lanier, 2003). Außerdem können NK-Zellen neben Zytokinen auch Chemokine, darunter CCL4, CCL5 und CCL22, sekretieren, sowie durch die Expression des Fas-Liganden (CD95L) und des TNF-verwandten Apoptose-induzierenden Liganden (engl.: TNF-related apoptosis-inducing ligand – TRAIL) Apoptose in der Zielzelle auslösen (Kashii et al., 1999; Robertson, 2002; Smyth et al., 2005a; Zwirner et al., 2007).

Die Entscheidung, ob eine körpereigene Zelle zerstört werden soll, basiert auf der An- bzw. Abwesenheit aktivierender und inhibierender Moleküle auf der Zielzelle. Die 'missing self' Hypothese legte dabei den Grundstein für das Verständnis der Regulation von NK-Zellen (Karre et al., 1986; Ljunggren & Karre, 1990). Diese basiert auf der Beobachtung, dass durch Bakterien oder Viren befallene, sowie durch maligne Transformation entartete Zellen den MHC Komplex herabregulieren oder sogar ganz die Fähigkeit verlieren, diesen auf der Oberfläche zu präsentieren (D'Urso et al., 1991; De Lerma Barbaro et al., 2005). Solche Zellen mit verändertem HLA Phänotyp entziehen sich teilweise oder sogar ganz der adaptiven T-Zellantwort (Ruiz-Cabello et al., 1991). Bestimmte Rezeptoren der NK-Zellen interagieren mit MHC Klasse I Molekülen und inhibieren die NK-Zelle. Sollte nun der individuell spezifische MHC Klasse I Komplex auf einer Zelle herabreguliert sein oder gänzlich fehlen (= 'missing self'), so bleibt das inhibierende Signal aus und die NK-Zelle kann aktiviert werden. Allerdings können befallene oder transformierte Zellen eine unveränderte HLA Klasse I Expression besitzen, aber dennoch durch NK-Zellen lysiert werden, sofern die Zielzellen starke Signale an die NK-Zelle liefern (= 'induced self'; Diefenbach & Raulet, 2001). Mittlerweile sind

zahlreiche unterschiedliche inhibierende und aktivierende Rezeptoren und Liganden entdeckt worden, die sowohl MHC Klasse I-abhängig als auch -unabhängig auf NK-Zellen wirken. Eine Übersicht, der hier erwähnten Moleküle ist in Tabelle 2-1 dargestellt.

2.3.1.1 Die HLA Klasse I-abhängige Regulation

Rezeptoren für MHC Klasse I Moleküle auf NK-Zellen, aber auch auf $\gamma\delta$ T-Zellen und $\alpha\beta$ Gedächtnis-T-Zellen (abgesehen vom TCR), sind vor allem die 'Killer cell immunoglobulin-like receptors' – KIR. Sie wurden zunächst als Proteine beschrieben, die mit HLA-C interagieren und ein inhibierendes Signal in der NK-Zelle auslösen können (Bottino et al., 1995). Mittlerweile sind weitere KIR bekannt, die mit anderen klassischen MHC Molekülen, wie HLA-A und -B interagieren können. Die Familie der KIR-Moleküle besteht aus einer Gruppe polymorpher Moleküle mit zwei (KIR2) bzw. drei (KIR3) Immunglobulin-ähnlichen Domänen, wobei jede NK-Zelle mindestens ein KIR Gen exprimiert. Die KIR Rezeptoren bestehen sowohl aus inhibierenden, als auch aus aktivierenden Rezeptoren, wobei davon auszugehen ist, dass aktivierende KIR nicht ausschließlich mit HLA Klasse I Molekülen interagieren. So konnte gezeigt werden, dass KIR2DS4 mit einem Protein auf der Oberfläche von Melanom-Zellen interagiert, das kein MHC Klasse I Protein darstellt, aber dennoch ein aktivierendes Signal liefern kann (Katz et al., 2004). Verantwortlich für das inhibierende bzw. stimulierende Potential der KIR Rezeptoren ist deren molekulare Struktur. Während inhibierende KIR eine längere zytosolische Domäne mit ITIM- (immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif) Struktur aufweisen (KIR2/3DL), fehlt diese bei den aktivierenden KIR (KIR2/3DS; Uhrberg, 2005). Diese haben stattdessen eine geladene Aminosäure im Transmembranbereich, wodurch das aktivierende Adapter-Molekül DAP12 binden kann (Lanier et al., 1998b). Eine Ausnahme bildet dabei KIR2DL4, welches mit dem nicht-klassischen HLA-G Molekül interagiert. KIR2DL4 besitzt neben einer ITIM-ähnlichen Domäne auch eine geladene Aminosäure im Transmembranbereich und kann demnach aktivierende Funktionen übernehmen. Da KIR2DL4 in jedem Individuum und scheinbar auf jeder NK-Zelle vorhanden ist, liegt eine besondere Bedeutung des Moleküls nahe.

Tabelle 2-1: HLA Klasse I-abhängig und -unabhängig wirkende Rezeptoren auf NK-Zellen.

<i>Rezeptor</i>	<i>Ligand</i>	<i>Wirkung</i>
HLA Klasse I-abhängig wirkende Rezeptoren ¹		
KIR2/3DL	vor allem MHC Klasse I	inhibierend
KIR2/3DS	vor allem MHC Klasse I	
KIR2DL4	HLA-G	aktivierend/ inhibierend
CD94/NKG2A	HLA-E	inhibierend
CD94/NKG2C	HLA-E	aktivierend
LIR-1 (ILT-2)	klassische HLA Klasse I Moleküle und HLA-G	inhibierend
HLA Klasse I-unabhängig wirkende Rezeptoren		
CEACAM1	homophile Interaktion	inhibierend
KLRG-1	E-, N-, R-Cadherine	inhibierend
Mitglieder der B7-Familie (z.B. 4IgB7-H3)	unbekannt	inhibierend
Glycan-bindende Moleküle (z.B. Siglecs, IRp60)	Glycane, genaue unbekannt	inhibierend
IgS-Familie (z.B. CD2, CD48, CD244 = 2B4, NTB-A)	homo- und untereinander hetero- phile Interaktion	aktivierend/ inhibierend
CD161 (NKR-P1A)	LLT-1	aktivierend/ inhibierend
CD16 (F _c γIII)	Immunglobulin (F _c -Teil)	aktivierend
Toll-like Rezeptoren (TLR)	Pathogen-assoziierte Strukturen (PAMPs), z.B. LPS	aktivierend
LFA-1	ICAM-Moleküle	aktivierend
DNAM-1	PVR, Nectin-2	aktivierend
'Natural Cytotoxicity Receptors' (NCR): NKp30, NKp44, NKp46	virale Proteine, Hämagglutinin, weitere unbekannt	aktivierend
NKG2D	MICA, MICB, ULBP1-4, RAET1G	aktivierend

¹ Die entsprechenden Literaturverweise sind dem Text zu entnehmen.

Abkürzungen: KIR, killer cell immunoglobulin-like receptors; LIR, leukocyte immunoglobulin-like receptor; ILT-2, immunoglobulin-like transcript; CEA, carcinoembryonic antigen; CEACAM, CEA-related cell adhesion molecule; KLRG, killer-cell lectin-like receptor; NTB-A, NK-T-B-antigen; Siglec, sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin; IRp60, inhibitory receptor protein 60; NK, natural killer, NKR-P; NK-cell receptor protein; LFA, lymphocyte function-associated antigen; DNAM, DNAX accessory molecule; NKG2, NK group 2 molecules; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; ICAM, intercellular cell adhesion molecule; LLT-1, lectin-like transcript; PVR, poliovirus receptor; MIC, MHC class I chain-related molecule; ULBP, UL-16 binding protein; RAET, retinoic acid early inducible transcripts.

Weitere Rezeptoren, die an HLA Klasse I Moleküle binden können, sind die Heterodimere der CD94/NKG2 Familie, wobei NKG2D eine Ausnahme darstellt und nicht mit CD94 und HLA Klasse I Molekülen interagieren kann (siehe Kapitel 2.3.2). CD94/NKG2A bindet an HLA-E und vermittelt daraufhin über die beiden ITIM von CD94 ein inhibierendes Signal in der Zelle (Braud et al., 1998; Le Drean et al., 1998; Lee et al., 1998). Das Molekül CD94/NKG2C hingegen kann nach Bindung von HLA Klasse I mit DAP12 in Wechselwirkung treten und dadurch ein aktivierendes Signal induzieren (Lanier et al., 1998a).

Auch der Leukozyten Immunglobulin-ähnliche Rezeptor LIR-1 (ILT-2) auf NK-Zellen kann nach Bindung verschiedener MHC Klasse I Liganden inhibierend wirken (Chapman et al., 1999). Dabei scheint die Interaktion von HLA-G mit LIR-1 die Funktionsfähigkeit der NK-Zellen gegenüber den Chorionzellen während der Schwangerschaft einzuschränken (Gonen-Gross et al., 2003).

2.3.1.2 Die HLA Klasse I-unabhängige Regulation

Obwohl die 'missing-self' Hypothese ein gewisses Grundverständnis der Aktivierung bzw. Inhibierung von NK-Zellen ermöglicht, ist die Regulation wesentlich komplexer und nicht grundsätzlich abhängig von HLA. Dies zeigt sich vor allem in der stetig wachsenden Zahl neu entdeckter HLA-unabhängiger inhibierender Rezeptoren und ihrer Liganden, die einen erheblichen Anteil zur Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen beitragen (Tabelle 2-1).

Verschiedene Zelladhäsionsmoleküle sind in der Lage inhibierende Signale in der NK-Zelle auslösen. Dazu gehören die homophil interagierenden CEACAM1 Proteine (carcinoembryonic-antigen-related celladhesion molecule 1; CD66a), die in ihrer zytosolischen Domäne über ITIM Motive verfügen, wodurch das inhibierende Signal induziert wird (Markel et al., 2002). Zudem können Epitheliale (E)-, Neuronale (N)- und Retinale (R)-Cadherine inhibierend auf NK-Zellen wirken, nachdem sie an ihren Rezeptor KLRG1 (Killer cell lectin-like receptor G1) gebunden haben, der über eine ITIM Struktur verfügt (Ito et al., 2006; Tessmer et al., 2007). Weitere inhibierende Rezeptoren stammen aus der B7-Familie, wobei vor allem das Molekül 4IgB7-H3 über einen noch unbekanntem Liganden die Aktivität von NK-Zellen einschränken kann (Castriconi et al., 2004). Auch Glycan-bindende Moleküle, wie die Sialinbindenden Immunglobulin-ähnlichen Lectine (Siglecs) und IRp60 (CD300a) können nach Bindung an ihren Rezeptor ein inhibierendes Signal in der NK-Zellen induzieren (Avril et al., 2004; Cantoni et al., 1999). Auch der Rezeptor CD161 (NKR-P1A), ein C-Typ Lectin, kann nach Bindung an den Liganden LLT-1 (lectin-like transcript) in der NK-Zelle inhibierende Signale auslösen (Kumar & McNerney, 2005; Rosen et al., 2005). Auf Melanomzellen scheint LLT-1 möglicherweise eine aktivierende Funktion zu haben (Konjevic et al., 2007). Ebenfalls

inhibierend wirken können die Moleküle der Immunglobulin Superfamilie (IgSF) CD2, CD48, 2B4 (CD244) und NTB-A (Brown et al., 1998; Moretta et al., 2001). Mitglieder dieser Gruppe sind dafür bekannt, homophil oder auch heterophil miteinander zu interagieren. Bemerkenswerterweise können diese Moleküle sowohl inhibierende, als auch aktivierende Signale in der NK-Zelle auslösen (Brown et al., 1998; Chuang et al., 2000; Chuang et al., 2001; Sivori et al., 2000).

Die bekanntesten HLA-unabhängig aktivierende NK Rezeptoren, die direkt mit der angeborenen Immunität in Verbindung gebracht werden, sind CD16 und die TLR. Die Bindung eines Antikörpers an den $F_c\gamma$ III-Rezeptor CD16 aktiviert die NK-Zelle, wodurch die so genannte Antikörper-abhängige Zell-Zytotoxizität (engl.: antibody-dependent cell cytotoxicity – ADCC) induziert wird. TLR binden verschiedene charakteristische Oberflächenmoleküle von Pathogenen. Zu diesen PAMP gehören beispielsweise LPS der Gram-negativen oder die Teichonsäuren auf Gram-positiven Bakterien, aber auch doppelsträngige RNA. Ein weiterer aktivierender HLA Klasse I-unabhängiger NK-Rezeptor ist das β 2 Integrin LFA-1 (leucocyte function-associated antigen-1; Barber et al., 2004). LFA-1 interagiert mit verschiedenen ICAM-Molekülen (intracellular cell adhesion molecules) und induziert ein aktivierendes Signal in der NK-Zelle. Das Transmembran-Glykoprotein DNAM-1 (DNAX accessory molecule-1; CD 226), das bereits im Jahr 1985 unter dem Namen 'TLisa1' in der Maus entdeckt wurde, kann ebenfalls ein aktivierendes Signal einleiten (Burns et al., 1985; Shibuya et al., 1996). Dabei kann der ursprünglich als Adhäsionsmolekül beschriebene DNAM-1 Rezeptor mit PVR (Poliovirus Rezeptor; CD155) oder mit Nectin-2 interagieren (CD112; Bottino et al., 2003; Pende et al., 2005).

Zu den wichtigsten aktivierende Rezeptoren auf NK-Zellen, die keine HLA Klasse I Moleküle binden, gehören die Natürliche Killerzell-Rezeptoren (engl.: natural cytotoxicity receptors – NCR) NKp30, NKp44 und NKp46 (Pende et al., 1999; Sivori et al., 1997; Vitale et al., 1998). Sie werden aufgrund ihrer Struktur der Immunglobulin-Superfamilie zugeordnet, weisen aber keine Homologie zueinander auf. Alle NCR-Moleküle zeichnen sich durch positiv geladene Aminosäuren in ihrem Transmembranbereich aus, die zur Assoziation mit verschiedenen ITAM (immunoreceptor tyrosin activatory motif)- tragenden Molekülen, wie CD3 ζ , $F_c\epsilon$ RI γ und DAP12 führt (Moretta et al., 2000). Die Aktivierung der NK-Zelle wird dabei kooperativ ausgelöst (Moretta et al., 2000). Die Rezeptoren NKp30 und NKp46 befinden sich auf aktivierten und auf ruhenden NK-Zellen, während NKp44 nur auf aktivierten NK-Zellen vorhanden ist (Pende et al., 1999; Sivori et al., 1997; Vitale et al., 1998). Zudem sind NKp30 und NKp46 ausschließlich auf NK-Zellen vorhanden, im Gegensatz zu NKp44, der offenbar auch

$\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert wird (von Lilienfeld-Toal et al., 2006). Die Liganden der NCR sind weitestgehend unbekannt. Bisher sind vereinzelt virale Proteine, wie Hämagglutinin, als Interaktionspartner beschrieben, wobei man davon ausgeht, dass auf infizierten Zellen und Tumorzellen weitere Liganden vorhanden sein müssen (O'Connor et al., 2006).

Der Rezeptor NKG2D, der ebenfalls unabhängig von HLA Klasse I fungiert, stellt vorwiegend bei der Erkennung von Virus-, Bakterien-infizierten Zellen, sowie Tumorzellen, ein besonderes Molekül dar. NKG2D ist in der Lage humane NK-Zellen sehr stark zu aktivieren, wobei seine Liganden, MICA, MICB, ULBP1-4 auf Tumorzellen, im Gegensatz zu gesunden Zellen, stärker bzw. überhaupt erst exprimiert werden. Dies macht ihn zu einem der wichtigsten Moleküle auf NK-Zellen. In Abbildung 2-1 ist das Prinzip der NKG2D-vermittelten NK-Zellaktivierung vereinfacht dargestellt.

2.3.2 Der aktivierende Immunrezeptor NKG2D

Im Menschen wird NKG2D, neben NK-Zellen, auch auf $\gamma\delta$ T-Zellen, NKT-Zellen und CD8⁺ T-Zellen sowohl als ko-stimulatorisches als auch als direkt aktivierendes Molekül exprimiert (Bauer et al., 1999; Groh et al., 2001). In der Maus ist er zudem in der Lage Makrophagen unmittelbar zu aktivieren (Jamieson et al., 2002). Der Rezeptor ist auch unter dem Namen 'killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1' (KLRK1) bzw. CD314 bekannt, dessen Gen sich im NK Gen Komplex auf Chromosom 12 des Menschen, im Abschnitt p12.2-12.3 befindet. Basierend auf der Lokalisation des Gens wird das Molekül zur Familie der NK Gruppe 2 (NKG2) gezählt. Der Aminosäuresequenz zufolge ist das ca. 42 kDa große Protein aber nur zu 21% homolog zu den NKG2 Proteinen (Houchins et al., 1991; Zwirner et al., 2007). Als Protein mit intrazellulärem Aminoterminus gehört es zum Typ II der Transmembranproteine, wobei der extrazelluläre Anteil eine C-Typ Lectin-ähnliche Domäne aufweist. Zur Bindung eines Liganden bildet NKG2D ein Homodimer aus, wobei diese diagonal mit der Oberfläche der $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Domänen der Liganden interagiert (siehe Kapitel 2.3.2.1). Jedes Monomer tritt dabei mit einer α -Helix von $\alpha 1$ und $\alpha 2$ in Kontakt, was ähnlich zur Bindung des T-Zellrezeptors an den MHC/Peptid Komplex ist (Li et al., 2001). Die Bindung der Liganden erfolgt nicht über einen 'induced-fit' Mechanismus, da jeder Ligand eine andere Art der Interaktion bevorzugt (McFarland et al., 2003; McFarland & Strong, 2003). Die Signalweiterleitung nach der Liganden-Bindung erfolgt über DNAX-aktivierenden Proteine der molekularen Masse 10 kDa (DAP10; Wu et al., 1999). Der positiv geladene Transmembranbereich eines humanen NKG2D Moleküls interagiert mit den negativen Transmembranbereichen eines DAP10 Homodimers (Garrity et al., 2005). Daraufhin wird das Tyr-Ile-Asn-Met

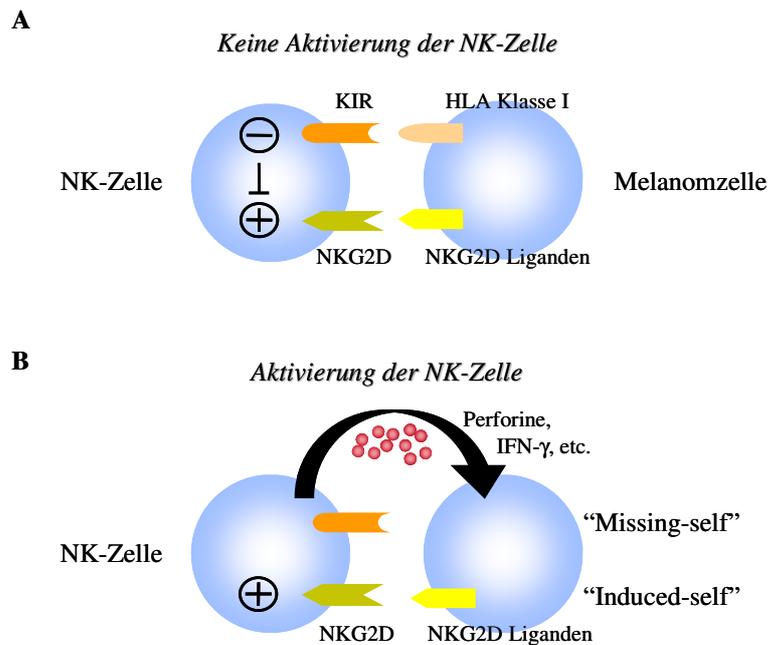


Abbildung 2-1. Vereinfachte schematische Darstellung der Aktivierung von NK-Zellen durch humane Melanomzellen

(A) HLA Klasse I-bindende Rezeptoren, wie beispielsweise KIR Moleküle, vermitteln nach Kontakt mit den entsprechenden Liganden inhibierende Signale, so dass NK-Zellen, trotz der Anwesenheit von aktivierenden Signalen in der Regel inaktiv bleiben. Eine Ausnahme stellt ein sehr hoher Expressionslevel der aktivierenden Liganden gegenüber den inhibierenden HLA Klasse I Molekülen dar. Dann kann eine Aktivierung auch unabhängig der MHC Klasse I Expression erfolgen (nicht dargestellt). (B) Bleibt das inhibierende Signal aus, etwa durch den fehlenden HLA Klasse I Komplex (= 'missing self'), kann die NK-Zelle durch aktivierende Moleküle, wie beispielsweise durch NKG2D Liganden, aktiviert werden (= 'induced self'). Sie sekretiert daraufhin unter anderem Perforine, wodurch die Melanomzelle zerstört werden kann, und IFN- γ .

Motiv im zytosolischen Bereich von DAP10 phosphoryliert. An das phosphorylierte Tyr-Ile-Asn-Met Motiv von DAP10 können die regulatorische Untereinheit p85 der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und das 'Growth factor receptor-bound protein 2' (Grb2) binden (Chang et al., 1999; Garrity et al., 2005; Upshaw et al., 2006; Wu et al., 1999). Die Rekrutierung von p85 an DAP10 initiiert den PI3K/Akt-Signalweg, wodurch die Ausschüttung von Calcium erzielt und der MAPK-Signalweg aktiviert wird (Jiang et al., 2000). Nach Bindung von Grb2 an DAP10 wird die nachfolgende Signalweiterleitung eingeleitet, die abhängig von Src Kinasen wie SLP-76, Phospholipase C γ 2 (PLC- γ 2) und Vav-1, sowie Rho-Familie GTPasen ist (Billadeau et al., 2003; Chang et al., 1999). Der Signalweg über Grb2 bewirkt die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen offenbar gemeinsam mit PI3K (Upshaw et al., 2006). Des Weiteren sind wahrscheinlich auch die Moleküle Janus Kinase-2 (JAK2) und Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) 5 an der Weiterleitung des aktivierenden Signals durch NKG2D beteiligt (Sutherland et al., 2002).

Die Bedeutung von NKG2D wurde besonders offensichtlich, nachdem die Klärung einer *Pseudomonas aeruginosa* Infektion in Mäusen erst durch Unterstützung des Rezeptors erreicht werden konnte (Borchers et al., 2006b). Die Relevanz von NKG2D zeigte sich zudem in Methylcholanthren behandelten Mäusen. Diese Tiere wiesen nach der Blockierung von NKG2D ein deutlich früheres Erscheinen von Fibrosarkomen auf (Smyth et al., 2005b). Des Weiteren werden die Liganden des Rezeptors auf vielen Tumoren, sowie Bakterien- und Virus-befallenen Zellen exprimiert und fungieren dadurch als eine Art Sensitivitätsmarker für krankhaft veränderte Zellen.

2.3.2.1 Die Liganden des NKG2D Rezeptors

Zu den humanen Liganden des NKG2D Rezeptors gehören die MHC Klasse I-verwandten Moleküle A und B (engl.: MHC class I chain-related molecule – MIC) und die UL-16 bindenden Proteine (engl.: unique-like 16 binding proteins – ULBP). Die beiden Gruppen unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz und in ihrer Struktur. Obwohl MICA nur zu 20-25% homolog zu der Sequenz der ULBP Moleküle ist, sind Proteine beider Gruppen in der Lage NKG2D zu binden (Radosavljevic et al., 2002).

MICA und MICB

MICA und MICB zeichnen sich, ihrem Namen entsprechend, durch ihre große Homologie zu den HLA Klasse I Molekülen aus. Sie besitzen eine HLA-ähnliche $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Domänenstruktur, wobei sie nicht in der Lage sind $\beta 2$ Mikroglobulin oder Peptide zu binden (Abbildung 2-2; Bahram et al., 1994; Groh et al., 1996; Li et al., 2001; Zwirner et al., 1998). Zudem besitzen sie eine Transmembran-Domäne, sind stark glykosyliert und zumindest MICA weist eine S-Acylierung auf (Eleme et al., 2004). Die Gene von MICA/B liegen im MHC Komplex auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 im Bereich 21.3 (6p21.3) und zeichnen sich durch 'heat shock' Bindungsstellen im Promotorbereich aus (Groh et al., 1996). Ähnlich wie bei HLA Klasse I treten auch bei MICA und MICB zahlreiche polymorphe Formen/Allele auf (61 für MICA, 30 für MICB; www.anthonynolan.org.uk/HIG; Stand: September 2007), die häufig an gewisse ethnische Gruppen geknüpft sind (Eleme et al., 2004). Ein extremes Beispiel hierfür sind Populationen in Ost-Asien, sowie in Paraguay, die sich durch einen MICA/B Null-Haplotyp auszeichnet, der häufig mit dem Vorhandensein des HLA-B48 Allels assoziiert ist (Aida et al., 2002; Komatsu-Wakui et al., 2001; Ota et al., 2000). Homozygote Personen mit diesem Haplotyp scheinen gesund zu sein. Einige Krankheiten, vor allem gastrointestinale Autoimmunerkrankungen, wie die Behçet-Krankheit oder der Typ I Diabetes, werden mit gewissen polymorphen Formen von MICA in Verbindung gebracht, wobei oft

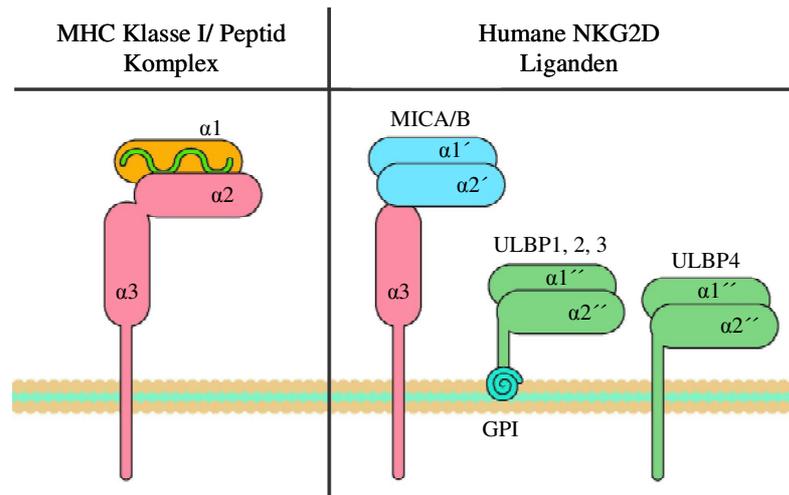


Abbildung 2-2. Struktur der NKG2D Liganden

Die Liganden des NKG2D Rezeptors im Vergleich mit dem MHC Klasse I Peptid Komplex (modifizierte Darstellung aus Lanier, 2005)

die Kopplung an ein bestimmtes HLA-B Allel von Bedeutung ist (Eleme et al., 2004; Hughes et al., 2005; Sanjeevi, 2006). Der Einfluss des MICA/MICB Polymorphismus auf ein erhöhtes Risiko für die Entstehung des Squamozellkarzinom ist kontrovers (Kennedy et al., 2002; Stephens, 2001; Tamaki et al., 2007).

In gesunden Zellen werden MICA und MICB in einigen Zelltypen wie Keratinozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, sowie Monozyten transkribiert, konnten aber lediglich auf der Oberfläche von Epithelzellen (vor allem Darmepithel) entdeckt werden (Borchers et al., 2006a; Eleme et al., 2004; Zwirner et al., 1998). Allerdings werden sie verstärkt auf der Oberfläche von gestressten Zellen, sowie auf Bakterien- oder Virus-infizierten Zellen exprimiert (Borchers et al., 2006b; Groh et al., 1996; Tieng et al., 2002; Yamamoto et al., 2001). Zudem zeigen zahlreiche transformierte Zellen MICA/B Expression (Groh et al., 1999; Pende et al., 2002). Interessanterweise können MICA und MICB auch auf verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimiert werden. So ist MICA nach der Stimulation von T-Zellen auf der Oberfläche von $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen detektierbar (Cerboni et al., 2007; Eleme et al., 2004). Auch mit $IFN-\alpha$ -behandelte Dendritische Zellen zeigen eine Expression von MICA und MICB, was in der Aktivierung von NK-Zellen resultiert (Jinushi et al., 2003a). Die Liganden scheinen daher eine Bedeutung bei der NK-vermittelten Regulation der Aktivität von Immunzellen zu haben.

UL-16 binding proteins – ULBP

Die zweite Gruppe der NKG2D Liganden wurde zunächst in der Maus als Retinsäure-induzierte frühe Gene 1 (engl.: retinoic acid early inducible genes 1 – RAE1) entdeckt und

einige Zeit später auch als Liganden des NKG2D Rezeptors beschrieben (Cerwenka et al., 2000; Steinle et al., 2001; Sutherland et al., 2002; Zou et al., 1996). Im Menschen wurde kurz darauf die entsprechende homologe Gruppe zu dieser Familie gefunden und als Retinsäure-induzierte frühe Transkripte (engl.: retinoic acid early inducible transcripts 1 – RAET1) bzw. ULBP bezeichnet (Cosman et al., 2001; Radosavljevic et al., 2002). Diese Genfamilie besteht aus zehn Mitgliedern, wobei sechs Genprodukte als funktionale Glykoproteine beschrieben wurden. Fünf Mitglieder dieser Gruppe, ULBP1-4 (RAET1I, H, N und E) und RAET1G binden an NKG2D, wobei in Tumorzellen aus RAET1G und RAET1E Spliceformen (RAET1G2 bzw. RAET1E2) hervorgehen können. (Bacon et al., 2004; Cao et al., 2007; Chalupny et al., 2003; Radosavljevic & Bahram, 2003; Sutherland et al., 2002). RAET1E2 kann ebenso an NKG2D binden und die Aktivität von NK-92 deutlich reduzieren, möglicherweise durch Blockierung oder Internalisierung von NKG2D (Cao et al., 2007). Von der Spliceform RAET1G2, sowie dem Protein RAET1L wurde bislang noch nicht gezeigt, dass es mit NKG2D interagieren kann. Während ULBP1-3 und RAET1L über einen GPI-Anker in der Membran lokalisiert sind, besitzen die restlichen Mitglieder dieser Gruppe eine Transmembrandomäne mit zytosolischem Bereich (Abbildung 2-2). Alle Mitglieder der ULBP/RAET1-Familie zeichnen sich, wie die MIC Moleküle, durch eine MHC Klasse I-ähnliche α 1- und α 2-Domäne aus, wobei α 3 komplett fehlt. Kodiert sind die Proteine im Menschen auf dem langen Arm des Chromosoms 6 (6q24.2-25.3).

Transkripte von ULBP1-3 sind in zahlreichen gesunden Geweben und Zelllinien zu finden und werden in den entsprechenden gestressten oder malignen Geweben stärker exprimiert (Cosman et al., 2001; Eagle & Trowsdale, 2007). Im Gegensatz dazu ist die RNA von ULBP4 und RAET1G nur in wenigen gesunden Geweben exprimiert, wohingegen sie in transformierten Zellen häufiger vorkommt (Bacon et al., 2004; Chalupny et al., 2003). Die Oberflächenexpression in gesunden Geweben der Proteine aus der ULBP Familie, ist nicht eindeutig festzustellen. Es wird aber vermutet, dass die ULBP Proteine, wie auch die MIC Proteine auf Epithelzellen exprimiert werden. Allerdings wurden ULBP Proteine auch auf Zellen des Immunsystems detektiert. So ist das Protein ULBP1 auf reifen Dendritischen Zellen vorhanden, was wiederum zu einer Aktivierung oder zumindest Ko-Stimulation von T- und NK-Zellen führen kann (Ferlazzo et al., 2002; Schrama et al., 2006). Auf der Oberfläche von aktivierten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sind zudem die Proteine ULBP1-3 vorhanden (Cerbioni et al., 2007). Wie auch bei den MIC Molekülen, scheint die Oberflächenexpression der ULBP Proteine Einfluss auf die NK-vermittelte Regulation der Aktivität von Immunzellen hinzuweisen.

2.3.2.2 Die Regulation von NKG2D und seinen Liganden

Bisher ist bekannt, dass verschiedene Zytokine die Expression von NKG2D beeinflussen, wobei IL-2, IL-10, IL-12, IL-15, IFN- α und TNF- α den Rezeptor hochregulieren, während IL-21, TGF- β und IFN- γ ihn herabregulieren können (Burgess et al., 2006; Castriconi et al., 2003; Groh et al., 2003; Lee et al., 2004; Strong & McFarland, 2004; Zhang et al., 2005; Zwirner et al., 2007). Diese Zytokine können von verschiedenen aktivierten Zellen des Immunsystems produziert werden und dadurch die NKG2D-vermittelte Aktivität von NK-Zellen beeinflussen. Immunzellen wiederum können durch direkten Zellkontakt von NK-Zellen reguliert werden, wobei die Interaktionen von NKG2D und deren Liganden von Bedeutung sind (siehe Kapitel 2.3.2.1). Demnach wird sowohl über Mediatoren, als auch über direkten Zellkontakt das angeborene mit dem adaptiven Immunsystem verknüpft und gegenseitig reguliert. Außerdem konnte in Maus-Modellen eine anhaltende Stimulation des Rezeptors durch Bindung eines membranständigen Liganden zur Herabregulation von NKG2D führen und dadurch auch die Lyse-Fähigkeit verringern, während die IFN- γ Sekretion bestehen blieb (Coudert et al., 2005; Wiemann et al., 2005). Manche freie NKG2D Liganden binden an NKG2D und induzieren so die Internalisierung des NKG2D-Liganden-Komplexes. Dadurch kann die Aktivität der NK- und CD8⁺- Zellen eingeschränkt werden (Dobrovina et al., 2003; Raffaghello et al., 2004).

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln erwähnt, werden die Liganden von NKG2D nach Hitzeschock und Stress vermehrt produziert. Die Regulation der MIC Gene nach einem Hitzeschock beruht auf den 'heat shock response elements' (HSE) im Promotorbereich, an den unter anderem der 'heat shock factor 1' (HSF-1) binden kann (Groh et al., 1996; Venkataraman et al., 2007). Neben Hitzeschock-Proteinen kann auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B über eine Bindungsstelle im MICA Gen (Intron 1) die Expression dieses Gens beeinflussen (Molinero et al., 2004). Zwar weisen die Intron Sequenzen von ULBP1-3, sowie RAET1G potentielle NF- κ B Bindungsstellen auf, ob diese allerdings einen Einfluss auf die Genexpression besitzen, wurde noch nicht näher untersucht.

Zahlreiche Tumorzelllinien und -gewebe, sowie infizierte Zellen verstärken die Expression der NKG2D Liganden. Nach viraler Infektion, z.B. durch das humane Cytomegalie Virus – HCMV, werden die Liganden stärker transkribiert (siehe Kapitel 2.3.2.1). Auffällig dabei ist, dass HCMV gleichzeitig bestimmte Proteine (unique like – UL) produziert, die mit einigen NKG2D Liganden interagieren und welche dadurch in der Zelle zurückgehalten werden. Während dabei das Protein UL16 die NKG2D Liganden MICB, ULBP1 und ULBP2 binden

kann, interagiert UL142 mit einigen MICA Allelen, was in der reduzierten Erkennung durch NK-Zellen resultiert (Chalupny et al., 2006; Cosman et al., 2001; Dunn et al., 2003; Spreu et al., 2006; Wu et al., 2003). Aber auch nach einer Aktivierung des TLR-Signalwegs können NKG2D Liganden verstärkt exprimiert werden (Nedvetzki et al., 2007).

Bestimmte Zytokine können die Expression der Liganden beeinflussen. TGF- β kann nicht nur NKG2D, sondern auch die Expression von MICA, ULBP2 und ULBP4 vermindern (Eisele et al., 2006; Friese et al., 2004). Von IFN- α und IFN- γ ist bekannt, dass sie in murinen Methylcholanthren induzierten Sarkomen eine verringerte Expression von H60, einem Maus spezifischen NKG2D Liganden, bewirken (Bui et al., 2006).

Verschiedene Differenzierungs-induzierende Substanzen für Zellen von Patienten mit akuter myeloider Leukämie (AML) beeinflussen die transkriptionelle und translationale Expression der NKG2D Liganden. Demnach bewirken 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza), Trichostatin A (TSA), Vitamin D3, Bryostat-1 (Bryo-1) und all-trans Retinsäure (engl.: all-trans retinoic acid; ATRA) gemeinsam eine verstärkte Expression von MICA/B, vor allem aber von ULBP Molekülen in einer AML Zelllinie und auf frisch isolierten Patienten-Blasten (Rohner et al., 2007). Dieser Effekt spiegelt sich in einer verbesserten Erkennung durch frisch isolierte NK-Zellen, sowie durch Zellen der NK Linien NK-92 wider. Verschiedene Histon-Deacetylase-Inhibitoren, darunter auch TSA, können einzeln die Expression von MICA und MICB auf Zellen von unterschiedlichen Leukämie Patienten, verschiedenen leukämischen Zelllinien und hepatozellulären Tumoren verstärken. Dieser Vorgang involvierte den Glykogen Synthase Kinase Signalweg (Armeanu et al., 2005; Kato et al., 2007; Skov et al., 2005). Die Inkubation von Tumorzellen aus Patienten mit chronischer B-Zell Leukämie mit ATRA kann eine erhöhte ULBP3 Konzentration auf der Oberfläche bewirken (Poggi et al., 2004). Dies trifft auch für eine hepatozelluläre Karzinomzelllinie nach Behandlung mit ATRA für die NKG2D Liganden MICA und MICB zu (Jinushi et al., 2003b).

Zwar sind vereinzelt Mechanismen der NKG2D Ligandenregulation untersucht, das Verständnis der Regulation ist dennoch nur gering.

2.4 Zielsetzung

Das maligne Melanom ist ein hochgradig immunogener Tumor, welcher sich *in vivo* häufig durch eine geringe HLA Klasse I Expression auszeichnet. Da HLA Klasse I Moleküle inhibierende Signale an Natürliche Killerzellen liefern, kann die Abwesenheit bzw. Verringerung der Präsentation der HLA Klasse I Moleküle zur Aktivierung von NK-Zellen führen. Für eine Aktivierung von NK-Zellen, die sich unter anderem in der Freisetzung von Zytokinen und Perforinen widerspiegelt, müssen spezifische Rezeptoren stimuliert werden. Dazu gehört unter anderem die Interaktion des Rezeptors NKG2D, der als einer der bedeutendsten aktivierenden Moleküle auf Natürlichen Killerzellen gilt, mit seinen Liganden, die auf transformierten Zellen exprimiert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der NKG2D Liganden in der Erkennung von Melanomzellen durch NK-Zellen *in vitro* zu untersuchen. Dazu wurden Melanomzellen verwendet, die durch Mutationen im $\beta 2$ Mikroglobulin-Gen nicht mehr in der Lage sind HLA Klasse I auf der Oberfläche zu exprimieren. Durch diesen Verlust des für NK-Zellen inhibierenden Signals, sollten gezielt Einblicke in die HLA Klasse I-unabhängige NKG2D-vermittelte Erkennung von Melanomzellen durch NK-Zellen gewonnen werden. Es sollte zunächst das RNA und Proteinexpressionsprofil der aktivierenden NKG2D Liganden in bzw. auf Melanomzellen untersucht werden. Zudem wurde der Einfluss wichtiger Entzündungs-vermittelnder Zytokine, darunter IFN- α , IFN- γ und TNF- α , auf das Expressionsmuster der NKG2D Liganden analysiert.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Zelllinien

Für die Versuche mit Melanomzellen wurden Zelllinien verwendet, die zum überwiegenden Teil aus dem Labor der AG Schadendorf stammen (Ma-Mel; siehe auch Tabelle 3-1). Die adhärent wachsenden Zelllinien wurden vom TA-Team unter der Leitung von Antje Sucker aus verschiedenen Metastasen von Patienten mit malignem Melanom generiert. Dazu wurde das Tumorgewebe soweit möglich vom umgebenden gesunden Gewebe mechanisch befreit, in einer Gewebekulturplatte kultiviert, so dass nach mehrtägiger bzw. mehrwöchiger Inkubationszeit die proliferierenden Tumorzellen als Zelllinie passagiert und konserviert wurden. Bei Ma-Mel 86a und Ma-Mel 86b handelt es sich um Zelllinien, die aus zwei unterschiedlichen Metastasen eines Patienten generiert wurden. Die Metastasen wurden im Abstand von zehn Monaten entfernt.

Glioblastomzelllinien wurden aus dem Tumor von Glioblastom-Patienten generiert. Die Tumore wurden unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von Dr. Tüttenberg (Neurochirurgie, Universitätsklinikum Mannheim) zur Verfügung gestellt. Die Linien Ma-Glio 4a/4b stammen von demselben Patienten. Hierbei wurde Ma-Glio 4b rund zwei Jahre nach der ersten Metastase Ma-Glio 4a entfernt.

Des Weiteren wurden die Kolonkarzinomzelllinien HCT116 und RHO, die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Knebel-Doerberitz (Abteilung Krebsfrüherkennung, DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurden, sowie die Zervixkarzinomzelllinie HeLa und die Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 in den Versuchen eingesetzt. Zudem wurde die myeloide leukämische Zelllinie K562 verwendet.

Die murine pro B-Zelllinie (BaF/3) wurde freundlicherweise von Dr. Adelheid Cerwenka (Abteilung Angeborene Immunität, DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Diese Zelllinie exprimiert keine NKG2D-aktivierenden Liganden. Dadurch konnten BaF/3 Zellen als Negativ-Kontrollen für Versuche eingesetzt werden, in denen verschiedene Fragestellungen bezüglich Expression und Funktion der NKG2D Liganden untersucht wurden. Die große Homologie zwischen den einzelnen NKG2D Liganden machte die Generierung von stabilen BaF/3 Transfektanten für jeden Liganden notwendig. Mit Hilfe dieser Transfektanten konnten sowohl Primer und Sonden der quantitativen PCR, als auch die Antikörper für die Durchflusszytometrie auf Kreuzreaktivität getestet werden (siehe Kapitel 7.1.2 und 7.1.3). Diese Arbeiten

wurden in Kooperation mit Sonja Textor, AG Cerwenka, durchgeführt. Dazu wurden von ihr BaF/3 Zellen mit den retroviralen Plasmiden pMXs-IN transduziert, welche die cDNA des jeweiligen NKG2D Liganden, sowie den Marker LNGFR beinhalteten. Diese retroviralen Plasmide mit den entsprechenden NKG2D Liganden wurden freundlicherweise von Dr. David Cosman, Amgen, Seattle, zur Verfügung gestellt. Die Plasmide wurde dabei zunächst in BOSC23 Zellen eingeschleust, in denen die Plasmide wiederum in Viren verpackt wurden. Die rekombinanten Viren wurden freigesetzt und zur Transduktion von BaF/3 Zellen eingesetzt. Durch nachfolgende LNGFR-Selektion, basierend auf MACS[®]-Technologie, wurden solche BaF/3-Zellen selektiert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit den entsprechenden NKG2D Liganden exprimierten. Diese BaF/3-Transduktanten ermöglichten es, die Interaktionen zwischen dem NKG2D Rezeptor humaner NK-Zellen und dessen Liganden, ohne weitere störende aktivierende oder inhibierende Signale zu untersuchen.

Zur Analyse NKG2D-abhängiger Signale wurde die NK-Zelllinie NKL verwendet. Diese wurde ursprünglich aus dem peripheren Blut eines Patienten mit 'large granular lymphocyte leukemia' (LGL) generiert (Robertson et al., 1996b). NKL-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Alexander Steinle, Tübingen, zur Verfügung gestellt. Bei der Kultivierung in Normalmedium (NM) wurde IL-2 der Firma Chiron Coporation, Emeryville, CA, USA, hinzugegeben, so dass die Proliferation der Zellen ermöglicht werden konnte. Alle weiteren angegebenen Zelllinien wurden in NM kultiviert (siehe Kapitel 3.2.1).

Tabelle 3-1: Verwendete Zelllinien.

<i>Zelllinie</i>	<i>Bemerkung</i>	<i>Quelle</i>
Maligne Melanome		
Mel 249	HLA Klasse I-negativ	AG Maio, Sienna, Italien ¹
Mel 499	HLA Klasse I-negativ	AG Maio, Sienna, Italien ¹
Mel 505	HLA Klasse I-negativ	AG Maio, Sienna, Italien ¹
Mel 592	HLA Klasse I-negativ	AG Maio, Sienna, Italien ¹
Ma-Mel 36	HLA Klasse I-positiv	AG Schadendorf, Mannheim
Ma-Mel 48c	schwach HLA Klasse I-positiv	AG Schadendorf, Mannheim
Ma-Mel 59a	HLA Klasse I-positiv	AG Schadendorf, Mannheim
Ma-Mel 61h	HLA Klasse I-negativ	AG Schadendorf, Mannheim
Ma-Mel 86a	HLA Klasse I-positiv	AG Schadendorf, Mannheim
Ma-Mel 86b	HLA Klasse I-negativ	AG Schadendorf, Mannheim
UKRV-Mel 15a	HLA Klasse I-positiv	AG Schadendorf, Mannheim
UKRV-Mel 2	HLA Klasse I-negativ	AG Schadendorf, Mannheim

<i>Zelllinie</i>	<i>Bemerkung</i>	<i>Quelle</i>
Glioblastome		
Ma-Glio 4a		Dr. Tüttenberg, Neurochirurgie, Mannheim
Ma-Glio 4b		Dr. Tüttenberg, Neurochirurgie, Mannheim
Ma-Glio 5		Dr. Tüttenberg, Neurochirurgie, Mannheim
Ma-Glio 10		Dr. Tüttenberg, Neurochirurgie, Mannheim
verschiedene Tumorzellen		
HCT116	Kolonkarzinom	AG Knebel-Doeberitz, Heidelberg
HeLa	Zervixkarzinom	AG Schadendorf, Mannheim
Jeg3	Chorionkarzinom	AG Schadendorf, Mannheim
K562	Myeloide leukämische Zellen	AG Schadendorf, Mannheim
RHO	Kolonkarzinom	AG Knebel-Doeberitz, Heidelberg
murine pro B-Zelllinien		
BaF/3		AG Cerwenka, Heidelberg
BaF/3+MICA	mit MICA transduziert	AG Cerwenka, Heidelberg
BaF/3+MICB	mit MICB transduziert	AG Cerwenka, Heidelberg
BaF/3+ULBP1	mit ULBP1 transduziert	AG Cerwenka, Heidelberg
BaF/3+ULBP2	mit ULBP2 transduziert	AG Cerwenka, Heidelberg
BaF/3+ULBP3	mit ULBP3 transduziert	AG Cerwenka, Heidelberg

¹ Paschen et al., 2006

3.1.2 Reagenzien

Die allgemeinen Laborchemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

AppliChem (Darmstadt), Biochrom AG (Berlin), Biozym (Oldendorf), Calbiochem (Darmstadt), Fluca (Basel), Gerbu (Gaiberg), Invitrogen (Karlsruhe), J.T.Baker (Deventer, Holland), Merck (Darmstadt), Pharmacia Biotech (Freiburg), Riedel-de Häen (Seelze), Sigma (Steinheim), Roth (Karlsruhe), Terumo (Eschborn).

Destilliertes Wasser (dH₂O) wurde durch die Reinstwasseranlage Seralpur Delta UV/UF von USF Sersal (Ransbach-Baumbach) hergestellt.

Die spezifischen Reagenzien wurden zur besseren Übersichtlichkeit den entsprechenden Versuchen zugeordnet.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Firma</i>
Zellkultur/Allgemein	
Aqua ad injectabilia, steril	Braun, Melsungen
Biocoll (Ficoll®) Separating Solution	Biochrom AG, Berlin
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
PBS (1x)	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories, Pasching
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Trypsin/EDTA (10x)	Biochrom AG, Berlin
Elektroporation	
siRNA (Kontrolle; 100 µM)	Qiagen, Hilden
siRNA (verschiedene STAT1, 40 nmol, SEPOP entsalzt)	Eurogentec, Seraing, Niederlande
RT-PCR	
DEPC behandeltes Wasser	Fermentas, St.Leon-Rot
DFS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	Bioron, Ludwigshafen
dNTPs (10 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/µl) + Puffer	Fermentas, St.Leon-Rot
M-MuLV RiboLock™ (Ribonuklease Inhibitor; 40 U/µl)	Fermentas, St.Leon-Rot
Primer, verschiedene	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Random Hexamer Primer (0,2 mg/ml)	Fermentas, St.Leon-Rot
Reaktionspuffer für DFS-Taq Polymerase (10x; complete)	Bioron, Ludwigshafen
RNeasy Plus Kit	Qiagen, Hilden
Fluoreszenz <i>in situ</i> hybridisierung	
BioNick DNA Labelling System Kit	Invitrogen, Karlsruhe
CGH Target Slides, Metaphase von PHA-stimulierten peripheren Lymphozyten aus dem Blut	Abbott Vysis, Wiesbaden
Cot-1 DNA (1 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Fixogum, Marabu	Marabuwerke, Tamm
KaryoMax Colcemid (10 µg/ml)	Gibco BRL, Karlsruhe
Nick Translation System Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Plasmid DNA Purification Kit	Macherey-Nagel, Düren
Salmon Sperm DNA (geschert, 10 mg/ml)	Stratagene, La Jolla, USA
Spectrum Green-dUTP	Abbott Vysis, Wiesbaden

<i>Bezeichnung</i>	<i>Firma</i>
Spectrum Orange-dUTP	Abbott Vysis, Wiesbaden
Sodium-saline-citrate- (SSC-) Puffer	Sigma, Deisenhofen
Vactashield Mounting Medium mit DAPI	LINARIS, Wertheim-Bettingen
Durchflusszytometrie	
FACS™ Flow, FACS™ Rinse, FACS™ SafeClean	BD Biosciences-Pharmingen Immunocytometry Systems
hNKG2D-F _c Chimer (3 µg für FACS-Färbung)	R&D, Wiesbaden
Enzyme-linked immunosorbent Assay	
BD OptEIA™ Substrate Reagent A/B	BD Biosciences, Heidelberg
Peroxidase Sol B	BD Biosciences, Heidelberg
pNPP (p-nitro-phenyl-phosphat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
sMICA (MICA*04; Standard für ELISA)	Immatics, Tübingen
Streptavidin-ALP	MabTech, Hamburg
TMB Peroxidase Substrat	BD Biosciences, Heidelberg
ULBP2-F _c Chimer (Standard für ELISA)	R&D, Wiesbaden
Radioaktiver Lyse-Versuch	
Na ₂ ⁵¹ CrO ₄	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim
quantitative RT-PCR - TaqMan®	
GAPDH TaqMan® Pre-Developed Assay Reagent (20x)	Applied Biosystems, Darmstadt
qPCR Core Kit (RT-QP73-05)	Eurogentec, Seraing, Niederlande

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Firma</i>
Elektroporationsküvetten 4mm	PeqLab, Erlangen
ELISA Platten (Immunotech™ Plate)	NUNC, Wiesbaden
FACS™ Röhrchen	BD Falcon™, Heidelberg
Gewebekulturflaschen CellStar (25 cm ² ; 75 cm ² ; 175 cm ²)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Gewebekulturflaschen (175 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturplatten (6, 96 Kavitäten)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Glaspipetten (1; 2; 5; 10 und 20 ml)	Hirschmann, Heilbronn
LumaPlate (96well)	Packard, Dreieich

<i>Bezeichnung</i>	<i>Firma</i>
MACS [®] Separation Columns MS/LS/LD	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
MACS [®] (R) Pre-Separation Filters	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Objektträger (76x26 mm)	R. Langenbrinck, Teningen
Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf
Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml)	BD Falcon [™] , Heidelberg
Reaktionsgefäße für PCR	Simport, Beloeil, Kanada
Reaktionsplatten für qPCR	Applied Biosystems, Darmstadt
Spritzen (50 ml)	Terumo, Eschborn
Steritop-Filter (0,2 µm; 0,4 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel

3.1.4 Geräte

<i>Bezeichnung</i>	<i>Firma</i>
37°C Inkubator Function Line	Heraeus, Hanau
Apacitance Extender Plus	BioRad, München
Autoklav HiClave HV-85	Hirayama, Tokyo, Japan
Bildgebende Apparatur für DNA Gele, Universalhood	BioRad, München
Biofuge [®] Fresco	Heraeus, Hanau
Biofuge [®] Pico	Heraeus Instruments, Hanau
Cryo-Einfriergerät Nalagene	Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz
ELISA-Reader Anthos 2010 mit Software	Anthos Labtec, Krefeld
FACSCalibur mit Software Cellquest	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Gefrierschrank -80°C	Forma Scientific, Schwerte
Gelkammer für DNA Gele	BioRad, München
Gene Amp 5700 Sequence Detection	Applied Biosystem, Darmstadt
Gene Pulser II [®]	BioRad, München
Inkubator Innova 4230	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Inkubator US Auto Flow	Nuaire, Fernbrook Lane, USA
Kühlschränke (4°C, -20°C)	Liebherr, Biberach an der Riss
MACS [®] MultiStand	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
MACS [®] Octo	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
MACS [®] quadro	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach

<i>Bezeichnung</i>	<i>Firma</i>
Magnetrührer MR 3002	Heidolph, Schwabach
Mehrkanalpipette (200 µl)	Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf
Mikroskop DMIL	Leica, Wetzlar
Mikroskop DMLS	Leica, Wetzlar
Mikroskop Wiloverts S	S Hund, Wetzlar
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
PCR Maschine PTC-200	MJ Research, Miami, USA
pH-Meter MP 220	Mettler Toledo, Gießen
Photometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotec, Freiburg
Pipettierhilfe accu-jet [®]	Brand, Wertheim
Pulse Controller Plus	BioRad, München
Research Pipetten (10 µl, 20-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Schüttler 3005	GFL, Burgwedel
Sorvall [®] Super T 21	Kendro, Langenselbold
Sterilbank HERA safe	Heraeus, Hanau
Sterilbank SterilGard Class II Type A / B3	Baker Company, Maine, USA
Stickstofftank Chronos Biosafe	Messer, Griesheim
Thermomixer Compact	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Top Count NXT	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Varifuge 3.OR	Heraeus, Hanau
Vortex REAX 2000	Heidolph, Schwabach
Waage BL 3100	Sartorius, Göttinger
Waage BP 210 S	Sartorius, Göttinger
Zentrifuge Universal 30F	Hettich, Tuttlingen

3.1.5 Antikörper

Unkonjugierte Antikörper

<i>Bezeichnung</i>	<i>Spezifität</i>	<i>Einsatz</i>	<i>Verwendete Menge/ Konzentration</i>	<i>Hersteller</i>
MICA	AMO1 Maus anti-human monoklonal, IgG ₁	FACS	0,1 µg	Immatics, Tübingen
		ELISA	5 µg/ml	
		Blockierung ¹	10 µg/ 10 ⁶ Melanomzellen	
MICA	BAMO3 Maus anti-human monoklonal, IgG _{2a}	ELISA	1 µg/ml	Immatics, Tübingen
MICB	BAMO1 Maus anti-human monoklonal	FACS	0,1 µg	Immatics, Tübingen
ULBP1	MAB1380 Maus anti-human monoklonal, IgG _{2a}	FACS	0,1 µg	R&D, Wiesbaden
ULBP2	MAB1298 Maus anti-human monoklonal, IgG _{2a}	FACS	0,1 µg	R&D, Wiesbaden
		ELISA	1 µg/ml	
ULBP2	BUMO1 Maus anti-human monoklonal, IgG ₁	ELISA	1 µg/ml	Immatics, Tübingen
ULBP3	MAB15171 Maus anti-human monoklonal, IgG _{2a}	FACS	0,1 µg	R&D, Wiesbaden
Nectin-2	L14 Maus anti-human, monoklonal, IgG _{2a}	FACS	Hybridom- überstand	Ennio Carbone, Cantanzaro, Italien
PVR	L95 Maus anti human, monokloal, IgG1	FACS	Hybridom- überstand	Ennio Carbone, Cantanzaro, Italien
NKG2D	MAB139 Maus anti-human monoklonal, IgG ₁	Blockierung	5 µg/ 10 ⁷ NKL bzw. CD3 ⁻ CD56 ⁺ Zellen	R&D, Wiesbaden
IFN-γ	1-D1K Maus anti-human, IgG ₁	ELISA	2 µg/ml	Mabtech, Hamburg

<i>Bezeichnung</i>	<i>Spezifität</i>	<i>Einsatz</i>	<i>Verwendete Menge/ Konzentration</i>	<i>Hersteller</i>
IgG₁	MAB002 Maus anti-human	Blockierung	10 µg/ 10 ⁷ NKL bzw. 10 ⁷ CD3 ⁺ CD56 ⁺ bzw. 10 ⁶ Melanomzellen	R&D, Wiesbaden

Konjugierte Antikörper

<i>Bezeichnung</i>	<i>Spezifität</i>	<i>Menge/ Konzentration</i>	<i>Einsatz</i>	<i>Hersteller</i>
R-Phycoerythrin (PE)	Ziege anti-Maus F(ab') ₂ Fragment, IgG	0,25 µg	FACS	Dianova, Hamburg
R-Phycoerythrin (PE)	Ziege anti-human F(ab') ₂ Fragment, IgG	0,25 µg	FACS	Dianova, Hamburg
CD3-FITC	Maus anti-human, IgG ₁	1 µl/ 2x10 ⁵ Zellen	FACS	BD Pharmingen, Heidelberg
CD56-PE	NCAM16.2 Maus anti-human monoklonal, IgG ₁	1 µl/ 2x10 ⁵ Zellen	FACS	BD, Heidelberg
HLA-DR-PE	L243 Maus anti-human, IgG _{2a}	1 µl/ 2x10 ⁵ Zellen	FACS	BD, Heidelberg
IFN-γ biotinyliert	7-B6-1 Maus anti-human, IgG ₁	1 µg/ml	ELISA	Mabtech, Hamburg
CD3-MACS[®] MicroBeads	Maus anti-human monoklonal, IgG _{2a} ,	200 µl/ 10 ⁸ PBL	NK- Isolierung	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
CD56-MACS[®] MicroBeads	Maus anti-human monoklonal, IgG ₁ ,	100 µl/ 10 ⁸ PBL	NK- Isolierung	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
IgG-Streptavidin- HRP	Ziege anti-Maus, IgG _{2a}	1 µg/ml	ELISA	MabTech, Hamburg
IgG-FITC	Maus anti-human, IgG _{2a}	1 µl/ 2x10 ⁵ Zellen	FACS	BD Immunocytometrie Systems
IgG-PE	Maus anti-human, IgG _{2a}	1 µl/ 2x10 ⁵ Zellen	FACS	BD Immunocytometrie Systems

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten der Zellkultur wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Zentrifugationsschritte fanden in den angegebenen Zentrifugen bei einer Geschwindigkeit von 1200 rpm für eine Dauer von sieben Minuten statt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5%. Dafür wurden folgende Medien und Sera verwendet:

<i>Bezeichnung</i>	<i>Einsatz</i>	<i>Firma</i>
OPTI-MEM	Elektroporation	Gibco BRL, Karlsruhe
RPMI	Zellkultur	Biochrom AG, Berlin
Fetales Kälber Serum (engl.: fetal calf serum – FCS)	Zellkultur	PAN, Aidenbach

Diese wurden wie folgt eingesetzt:

Normalmedium (NM): RPMI 1640 (enthält 2 g/l NaHCO₃ und L-Glutamin)
 10% FCS (inaktiviert bei einer Temperatur von 56°C, 30 min)
 1% Penicillin/Streptomycin

Einfriermedium (EM): 90% FCS (inaktiviert bei einer Temperatur von 56°C, 30 min)
 10% DMSO

3.2.1.1 Passagieren von Zelllinien

Adhärente Zelllinien

Die adhärenen Zellen wurden ausschließlich in Normalmedium kultiviert. Es wurde versucht, diese Linien nur bis zu einer Konfluenz von 70-80% wachsen zu lassen, um stressbedingte Veränderungen der Expression von Oberflächenmolekülen durch zu dichte Kultivierung, wie es Zou et al. für Fibroblasten beobachteten, auszuschließen (Zou et al., 2006). Daher erfolgte die Teilung der Zellen ein- bis zweimal wöchentlich. Dazu wurde zunächst das Zellkulturmedium abgenommen und verworfen. Die Flaschen wurden kurz mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde je nach Flaschengröße 1,5-3 ml 2x Trypsin/EDTA zu den Zellen gegeben, um diese vom Flaschenboden abzulösen (Trypsinierung). Dabei wirkt das Trypsin als Endopeptidase und spaltet Aminosäureketten zwischen Lysin und Arginin. Dadurch werden Adhäsionsmoleküle angegriffen und infolgedessen wird die Interaktion zwischen den Zellen und der Plastikoberfläche der Zellkulturflasche unterbrochen, so dass sich die Zellen nach kurzer Inkubationszeit von 3-5 min bei Raumtemperatur ablösen. Durch leichtes Klopfen der Zell-

kulturflasche wurde am Ende der Inkubationszeit die Abtrennung der Zellen festgestellt und noch leicht adhärenente Zellen abgelöst. Um den Prozess der Trypsinierung zu stoppen, wurden die Zellen in ca. 10 ml NM aufgenommen. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, das alte Medium verworfen und ein definiertes Volumen an frischem Medium addiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in der gewünschten Zahl ausgesät. Für eine einfache Passagierung wurde, in Abhängigkeit des Wachstums der entsprechenden Zelllinie, eine 1:5 – 1:10 Verdünnung durchgeführt.

Suspensionszelllinien

Die Suspensionszelllinien NKL, K562 und BaF/3, sowie von BaF/3 sich ableitende Varianten wurden wie folgt kultiviert:

Die Kultivierung der NK-Zelllinie NKL erfolgte in NM + 100 U/ml IL-2, um die Proliferation der NKL zu ermöglichen. Es wurde darauf geachtet, dass die Konzentration der Zellen nicht zu niedrig war, da die NK-Zellen den gegenseitigen Kontakt benötigen, um ausreichend proliferieren zu können. Folglich wurden die Zellen erst bei Farbwechsel des Mediums und großer Dichte ($\geq 5 \times 10^6/\text{ml}$) geteilt. Dafür wurde die homogene Suspension bis auf wenige Milliliter verworfen. Zu den verbleibenden Zellen wurde frisches Medium + IL-2 gegeben. Bei einfacher Passagierung wurde auf Zentrifugation ausdrücklich verzichtet, da NK-Zellen durch diesen Schritt aktiviert werden können.

K562 und alle BaF/3 Zelllinien wurden in NM kultiviert. Nach Farbänderung des Mediums, bedingt durch eine hohe Zelldichte, wurde die gesamte Zellsuspension verworfen. Zu den wenigen in der Flasche verbleibenden Zellen wurde frisches NM gegeben. Aufgrund des sehr starken Wachstums von BaF/3 Zellen wurde, vor Zugabe des frischen NM, die Zellkulturflasche gelegentlich mit 1x PBS gespült.

3.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese gegebenenfalls abgelöst und zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das vorgekühlte Einfriermedium tropfenweise zum Zellpellet hinzu gegeben. Die entstandene Zellsuspension (ca. 1×10^7 NKL-Zellen bzw. $1-3 \times 10^6$ Zellen der anderen Zelllinien) wurde in 2 ml Einfriergefäße überführt und in 4°C kalte Einfrierboxen eingesetzt, welche direkt im Anschluss bei einer Temperatur von -80°C aufbewahrt wurden. Diese Boxen ermöglichten eine kontinuierliche Abkühlung der Zellen von 1°C pro Minute. Nach einigen Stunden bzw. Tagen erfolgte der Transfer in Container mit flüssigem Stickstoff, in denen sie bis zum Auftauen oder als Reserve gelagert wurden.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Einfriergefäß mit der Zellsuspension bei einer Temperatur von 37°C in einem Wasserbad erwärmt. Kurz vor dem vollständigen Auftauen, wurde der Gefäßinhalt in ungefähr 10 ml NM überführt und anschließend für einen Zeitraum von 5 min bei einer Geschwindigkeit von 1000 rpm zentrifugiert. Nachfolgend wurden alle Zellen in eine Zellkulturflasche überführt und inkubiert (37°C, 5% CO₂).

Bei der NK Linie NKL wurde der Inhalt eines Einfriergefäßes direkt nach dem Auftauen in lediglich 2-3 ml NM überführt, wobei zunächst 200 U/ml IL-2 zugegeben wurde. Die Suspension wurde täglich kontrolliert und sofort nach Farbänderung wurden wenige Milliliter an frischem Medium + 200 U/ml IL-2 zugegeben. Je nach Wachstum der Zellen, frühestens aber eine Woche nach dem Auftauen, erhielten die Zellen für die Langzeitkultivierung nur noch 100 U/ml IL-2. Die beste Aktivität zeigten NKL-Zellen dabei einige Wochen nach dem Auftauen, wobei sie gewöhnlich nach cirka drei bis vier Monaten ihre Aktivität bereits verloren.

3.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot der jeweiligen Zellsuspension verwendet, welches je nach Zelldichte unterschiedlich verdünnt wurde. Durch Zugabe eines gleichen Volumens an Tryphanblau-Lösung (0,5%), konnten alle toten Zellen gefärbt werden. Wenige Mikroliter dieser Suspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer überführt, wobei die lebenden Zellen aller vier großen Quadrate, welche wiederum aus 4x4 kleinen Quadraten bestehen, gezählt wurden. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Mittelwertes der vier großen Quadrate. Dieser Wert wurde mit dem Faktor 1×10^4 multipliziert, welcher das Volumen der Kammer berücksichtigt. Unter Beachtung der Verdünnung konnte die Zellzahl pro Milliliter berechnet werden.

3.2.1.4 Zytokinbehandlung von Tumorzelllinien

Für die Versuche, die unter Zytokinbehandlung durchgeführt wurden, wurden Zytokine folgender Firmen eingesetzt:

<i>Bezeichnung</i>		<i>Firma</i>
IFN-α	Roferon, IFN- α 2a; human, rekombinant	Roche, Mannheim
IFN-γ	human, rekombinant	R&D, Wiesbaden
TNF-α	human, rekombinant	R&D, Wiesbaden

Es musste in besonderem Maße auf die Zellkonzentration am Ende der Inkubationszeit geachtet werden, um Einflüsse durch unterschiedliche Zelldichten und sich daraus ergebenden Zellstress zu verhindern. Daher wurde jede Zelllinie in einer bestimmten Zellzahl zu Beginn der Inkubationszeit ausgesät (siehe Tabelle 3-2). Für alle eingesetzten Zytokine und Zelllinien wurde, soweit nicht anders angegeben, die Kultivierung bei einer Inkubationsdauer von 96 h wie folgt durchgeführt:

Das Aussäen der Zellen erfolgte an Tag 0 in der angegebenen Zellzahl. Am nächsten Tag (Tag 1), nachdem die Zellen an die Zellkulturflasche adhären konnten, erfolgte die Zugabe der Zytokine. Die jeweilig eingesetzte Konzentration ist ebenfalls in Tabelle 3-2 angegeben und wurde im Vorfeld bestimmt (Abbildung 4-9 und nicht gezeigt). An Tag 3/4 wurde das Medium erneuert, wobei wiederum Zytokine hinzu gegeben wurden. Das Ablösen der Zellen und die entsprechenden darauf folgenden Versuche (ELISA, FACS, radioaktiver Lyse-Versuch) fanden an Tag 5/6 statt.

Bei den Zeitverlauf-Versuchen wurden die Zellen der einzelnen Ansätze gleichzeitig ausgesät und am Ende des Versuchs zur gleichen Zeit geerntet. Die Zugabe der Zytokine erfolgte frühestens einen Tag nach dem Aussäen, wobei die Zytokine jeweils 36 h, 24 h, 12 h, 8 h bzw. 4 h vor Ernte der Zellen zugegeben wurden. Der Austausch des Mediums erfolgte bei allen Ansätzen an Tag 2 des Versuchs.

3.2.1.5 Isolierung von polyklonalen NK-Zellen aus Buffy Coats

Gewinnung von peripheren Blut-Lymphozyten aus Buffy Coats

Zur Gewinnung von polyklonalen NK-Zellen aus gesunden Donoren wurde anti-koaguliertes Blut aus Buffy Coats (BF) verwendet, die freundlicherweise durch Herrn Dr. Xuan-Duc Nguyen (Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Mannheim) im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt wurden.

Dazu wurde der Inhalt der BF, die nicht älter als 24 h waren, in eine 75 cm² Flasche überführt und mit dem gleichem Volumen an 1x PBS aufgefüllt. Die homogene Suspension wurde auf mehrere 50 ml Reaktionsgefäße verteilt und dabei vorsichtig auf jeweils 15 ml Ficoll® Lösung geschichtet, die auf eine Temperatur von 4°C vorgekühlt war. Ficoll® ist ein Gemisch aus Carbohydrat-Polymeren, mit einer Dichte von 1,078 g/ml. Die nachfolgende Dichtegradientenzentrifugation fand bei einer Geschwindigkeit von 1800 rpm und einer Dauer von 30 min statt, wobei die Zentrifuge am Ende ohne Bremsfähigkeit auslief. Durch diesen Schritt wurden die zellulären Bestandteile des BF aufgetrennt. An der Phasengrenze zwischen der Ficoll-Lösung und dem Plasma reichern sich die peripheren mononukleären Zellen (engl.:

Tabelle 3-2: Eingesetzte Zellzahl für die Kultivierung der Zellen mit Zytokinen

<i>Bezeichnung</i>	\emptyset	<i>IFN-α</i> <i>1000 IU/ml</i>	<i>IFN-γ</i> <i>200 U/ml</i>	<i>TNF-α</i> <i>50 ng/ml</i>
Maligne Melanome				
Mel 249	0,5 ¹	0,5	0,5	0,3
Mel 592	1,0	n.d. ²	1,0	n.d.
Ma-Mel 48c	0,7	n.d.	0,7	n.d.
Ma-Mel 61h	0,5	n.d.	0,5	n.d.
Ma-Mel 86a	0,1	0,1	0,1	0,1
Ma-Mel 86b	0,5	1,0	2,0	0,7
UKRV-Mel 2	0,3	0,3	0,3	0,2
Glioblastome				
Ma-Glio 4a	0,7	n.d.	0,7	n.d.
Ma-Glio 4b	0,5	n.d.	1,0	n.d.
Ma-Glio 5	0,3	n.d.	0,3	n.d.
Ma-Glio 10	0,5	n.d.	0,7	n.d.
sonstige Tumorzellen				
HCT116	0,2	n.d.	0,2	n.d.
RHO	0,3	n.d.	0,3	n.d.
Jeg3	0,5	n.d.	0,5	n.d.
HeLa	0,3	n.d.	0,3	n.d.
K562 ³	0,1	n.d.	0,1	n.d.
<i>Zeitverlauf mit IFN-γ</i> <i>[200 U/ml]</i>		<i>Mel 249</i>	<i>Ma-Mel 86b</i>	
\emptyset		2,0 ⁴	2,5	
4 h		2,0	2,5	
8 h		2,0	2,5	
12 h		2,0	2,5	
24 h		2,0	3,5	
36 h		2,0	4,0	

¹ Es ist die Anzahl der Zellen $\times 10^6$ dargestellt, welche in einer 75 cm² Zellkulturflasche mit einem finalen Volumen von 15 ml NM ausgesät wurden

² n.d.: nicht durchgeführt

³ Da es sich bei K562 Zellen um Suspensionszellen handelt, wurden hierbei die Zellen zunächst in 4 ml NM ausgesät. Am Tag 3/4 wurden die Zellen zentrifugiert und in 10 ml frischem NM + Zytokinen aufgenommen

⁴ Es ist die Anzahl der Zellen $\times 10^6$ dargestellt, welche in einer 175 cm² Zellkulturflasche mit einem finalen Volumen von 25 ml NM ausgesät wurden

peripher blood mononuclear lymphocytes – PBMC) in einem weißen Ring an. Diese weiße Schicht an Zellen wurde mittels einer Einweg-Pipette abgenommen und anschließend dreimal mit 1x PBS gewaschen, um die Zahl der kontaminierenden Thrombozyten zu reduzieren. Danach wurde die Anzahl der PBMC bestimmt, und anschließend wurden jeweils $1,5-2 \times 10^8$ Zellen in eine 175 cm^2 Gewebekulturflasche der Firma Sarstedt überführt. Diese wurde dann für einen Zeitraum von ungefähr 1 h bei einer Temperatur von 37°C und einem CO_2 -Gehalt von 5% inkubiert, so dass die Monozyten adhärieren konnten. Im Überstand befanden sich die peripheren Blut-Lymphozyten (engl.: peripher blood lymphocytes – PBL), welche auch die NK-Zellen beinhalteten. Daher wurde der Überstand abgenommen und die Flasche ein- bis zweimalig mit 1x PBS gewaschen, um restlich Lymphozyten abzuernten. Die erhaltene Zellsuspension wurde pelletiert und die Anzahl der Zellen bestimmt.

Isolierung von polyklonalen NK-Zellen aus PBL

Polyklonale NK-Zellen aus PBL von gesunden Donoren wurden isoliert, indem zunächst alle CD3-positiven Zellen entfernt wurden (negative Selektion) und anschließend eine Anreicherung von CD56-positiven Zellen (positive Selektion) stattfand. Dadurch konnten mit einem Reinheitsgehalt von mindestens 92% polyklonale $\text{CD3}^- \text{CD56}^+$ NK-Zellen isoliert werden. Dieses Verfahren basiert dabei auf der MACS[®]-Technologie von Miltenyi Biotec. Dafür wurden MACS[®]-MicroBeads verwendet, welche an monoklonale CD3- bzw. CD56-Antikörper gekoppelt waren.

Dazu wurden im Einzelnen wie folgt vorgegangen: Zunächst wurden 2×10^8 PBL pelletiert und der verbleibende Überstand oberhalb des Pellets vollständig abgenommen. Dann wurde das in 1,6 ml MACS[®]-Puffer (1x PBS/EDTA 2 mM/BSA 0,5%) resuspendierte Pellet mit 400 μl CD3 MACS[®]-MicroBeads versetzt. Dieser Ansatz wurde für eine Dauer von 30 min bei einer Temperatur von 4°C inkubiert und im Anschluss kurz mit MACS[®]-Puffer gewaschen. Das resultierende Zellpellet wurde in 800 μl MACS[®]-Puffer aufgenommen und über einen MACS[®]-PreSeparationsfilter auf eine LD-MACS[®]-Separationssäule transferiert. Diese wurde unmittelbar vorher mit 2 ml MACS[®]-Puffer äquilibriert und befand sich im entsprechenden MACS[®]-quadro Ständer. Alle CD3-markierten Zellen konnten daher an die LD-Säule binden, während CD3-negative Zellen im Durchfluss vorzufinden waren und gesammelt wurden. Die LD-Säule wurde zwei Mal mit jeweils 1 ml MACS[®]-Puffer gewaschen und auch diese durchfließende Flüssigkeit wurde aufgefangen. Die Suspension (CD3-negativ) wurde dann mit MACS[®]-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 800 μl MACS[®]-Puffer, sowie 200 μl CD56 MACS[®]-MicroBeads versetzt, so dass CD56

exprimierende Zellen markiert wurden. Dieser Ansatz wurde ebenfalls für eine Dauer von 30 min bei einer Temperatur von 4°C inkubiert und im Anschluss mit MACS[®]-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml MACS[®]-Puffer resuspendiert und auf eine, mit 3 ml MACS[®]-Puffer äquilibrierte LS-MACS[®]-Separationssäule gegeben. Mit CD56 MACS[®]-MicroBeads markierte Zellen blieben auch während des dreimaligen Waschens mit jeweils 3 ml MACS[®]-Puffer an der LS-Säule gebunden, während CD3⁻CD56⁻ Zellen im Durchfluss vorzufinden waren. Um die gebundenen CD3⁻CD56⁺ Zellen aus der Säule zu eluieren, wurde die Säule aus der magnetischen Vorrichtung entnommen. Im Anschluss wurden 5 ml NM auf die Säule gegeben, die Zellen mit der Flüssigkeit durch die Säule gedrückt und in einem 15 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Es folgte die Bestimmung der Zellzahl und das Anlegen einer Zellsuspension mit einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml. Davon wurden schließlich je 200 µl in eine Vertiefung einer Zellkulturplatte mit 96 Kavitäten überführt. Die Kultivierung erfolgte in NM mit 200 U/ml IL-2. Um die Qualität der Isolierung anhand des Anteils an CD3⁻CD56⁺ Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmen zu können, wurden 4×10^5 polyklonale CD3⁻CD56⁺ Zellen unmittelbar nach der Isolierung für die Durchflusszytometrie verwendet. Die NK-Zellen wurden an Tag 1 nach der Isolierung im radioaktiven Lyse-Versuch eingesetzt.

3.2.1.6 Elektroporation

STAT1 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch seine Schlüsselrolle bei der Interferon-abhängigen Signalvermittlung entdeckt wurde. Nach seiner Aktivierung kann er als Dimer in den Nukleus vordringen und dort die Transkription von IFN- γ -abhängigen Genen induzieren. Zur Untersuchung des Einflusses von STAT1 auf die Regulation der NKG2D Liganden-expression, wurde die RNA Konzentration von STAT1 in den Melanomzellen durch den Einsatz von siRNA reduziert. Die verwendeten siRNAs (Nr. 1-3) wurden anhand der cDNA Sequenz von STAT1 (Pubmed Zugangsnummer: NM 007315) durch die Firma Eurogentec GmbH bestimmt (Tabelle 3-3). Die siRNA Sequenz Nr. 4 wurde der Publikation von Thomas et al. entnommen (Thomas et al., 2004). Um die siRNA in die Zellen einzubringen, wurden die Zellen elektroporiert. Die Elektroporation ist eine sehr effiziente Methode, um siRNA, oder auch DNA, in eukaryotische Zellen zu schleusen. Dabei werden Melanomzellen unter hoher Spannung in Gegenwart der siRNA gleichzeitig einem elektrischen Impuls ausgesetzt. Daraufhin entstehen in der Plasmamembran der Zellen Poren im Nanometer-Bereich. Durch diesen Prozess wird nun die siRNA in die Zelle aufgenommen. Die siRNA ist dabei eine kurze doppelsträngige RNA Sequenz mit jeweils zwei Nukleotiden Überhang am 3'-Ende. Diese

Tabelle 3-3: Sequenzen der eingesetzten siRNA.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz</i> ¹	
STAT1 Nr. 1²	1 st strand	GCU UCU UGG UCC UAA CGC C ³
	2 nd strand	GGC GUU AGG ACC AAG AAG C
STAT1 Nr. 2	1 st strand	GCU GGA UGA UCA AUA UAG U
	2 nd strand	ACU AUA UUG AUC AUC CAG C
STAT1 Nr. 3	1 st strand	CGC UGC CAA UGA UGU UUC A
	2 nd strand	UGA AAC AUC AUU GGC AGC G
STAT1 Nr. 4⁴	1 st strand	AAC UAG UGG AGU GGA AGC GGA
	2 nd strand	TCC GCU UCC ACU CCA CUA GUU
Kontroll siRNA	1 st strand	UUC UCC GAA CGU GUC ACG U
	2 nd strand	ACG UGA CAC GUU CGG AGA A

¹ in 5' → 3' Richtung

² STAT1 siRNAs Nr. 1-3 wurden durch die Firma Eurogentec GmbH bestimmt

³ alle siRNA mit dTdT-Überhang am 3'-Ende

⁴ aus Thomas et al., 2004

Sequenz induziert in der Zelle die Formation des RISC-Komplexes (engl.: RNA-induced silencing complex), der aus verschiedenen Proteinen besteht. Dieser Komplex zerstört nach Bindung an die doppelsträngige Sequenz, den Sinn-Strang (engl.: 1st strand oder passenger strand) der siRNA, während der Führungsstrang (engl.: guide strand) gemeinsam mit dem RISC-Komplex die Hybridisierung mit der entsprechenden komplementären mRNA vermittelt. Dadurch wird schließlich der Abbau der mRNA induziert. Auf diese Weise kann die Synthese der zu untersuchenden Proteine für einige Tage unterbrochen werden

Für die gezeigten Experimente wurden an Tag 0 jeweils 1×10^7 Melanomzellen in Serumfreiem Opti-MEM Medium resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit Opti-MEM Medium gewaschen, um Serumreste zu entfernen. Nach dem letzten Waschschrift erfolgte die Zugabe von 400 μ l Opti-MEM Medium auf das Zellpellet. Ein Volumen von 200 μ l der Zellsuspension wurden dann in eine 4 mm Elektroporations-Küvette überführt, in der bereits 20 μ l der Kontroll siRNA bzw. je 5 μ l der STAT1 siRNAs Nr. 1-4 vorgelegt waren. Die Küvette wurde im Anschluss in den Biorad Gene Pulser II eingesetzt und bei einer Spannung von 300 V elektroporiert, wobei die Kapazität bei 150 μ F lag. Die mit siRNA elektroporierten Zellen wurden im Anschluss in ein 15 ml Reaktionsgefäß, gefüllt mit Normalmedium, überführt. Die Küvette wurde ein- bis zweimal gewaschen und die Waschsuspension ebenfalls im Reaktionsgefäß gesammelt. Die Zellen wurden daraufhin auf zwei 175 cm² Flaschen aufgeteilt, welche nach Zugabe der Zellen jeweils ein finales Volumen von 25 ml NM enthielten.

Am darauf folgenden Tag (Tag 1) wurde zu je einer der beiden Flaschen mit STAT1- bzw. Kontroll siRNA-elektroporierten Zellen IFN- γ (200 U/ml) gegeben. Das Ablösen der elektroporierten Zellen fand an Tag 4 statt, wobei eine Hälfte der Zellen für die Analyse mittels Durchflusszytometrie und die verbleibende Hälfte zur Überprüfung der Effizienz der siRNA-vermittelten Herabregulation der Expression mittels RT-PCR verwendet wurde.

3.2.2 RT-PCR

Zur Überprüfung der Effizienz der verminderten Expression von STAT1 wurden PCRs (engl.: polymerase chain reaction) durchgeführt. Dazu wurde aus den siRNA-behandelten Zellen RNA isoliert, welche schließlich in cDNA umgeschrieben wurde (reverse Transkription – RT). Im Anschluss fand unter Verwendung der cDNA die PCR statt.

RNA Isolierung

Zur Isolierung von RNA aus tierischen Zellen wurde der RNeasy Plus Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Isolierung erfolgte nach Vorgabe des Herstellers. Im letzten Schritt der Isolierung wurde die RNA mit 30 μ l RNase-freiem Wasser eluiert. Die RNA Konzentration wurde mittels des Photometers bestimmt, wobei die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen wurde. Dazu wurde eine Verdünnung der isolierten RNA in eine Quarzküvette überführt und gemessen. Eine OD_{260nm} von 1 entspricht dabei einer Konzentration von ungefähr 40 μ g/ml RNA.

Herstellung der cDNA

Die reverse Transkription der mRNA in cDNA wurde in Anlehnung an das Protokoll der Firma Fermentas durchgeführt. Die Angaben zur Herstellung von cDNA beziehen sich dabei auf eine RNA Menge von 1 μ g, wodurch 20 μ l cDNA hergestellt werden konnten. Dazu wurde von der RNA Lösung ein Volumen, das 1 μ g RNA beinhaltet, in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt, welches bereits 1 μ l einer Hexamer-Primer-Lösung der Konzentration 0,2 mg/ml enthielt. Dieser Ansatz wurde auf ein Volumen von 11 μ l mit DEPC-Wasser aufgefüllt und für eine Dauer von 5 min bei einer Temperatur von 70°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben auf Eis herab gekühlt und kurz zentrifugiert. Es fand unter Beachtung der Reihenfolge folgende Zugabe statt:

- 4 μ l Reaktionspuffer für cDNA (5x)
- 0,5 μ l M-MuLV RiboLockTM (40 U/ μ l)
- 0,5 μ l DEPC-H₂O
- 2 μ l dNTP (10 mM)

RiboLock™ ist ein Ribonuklease Inhibitor, der die RNasen A, B und C inhibieren und dadurch die RNA vor einer Degradation schützen kann.

Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden pro Ansatz 2 µl M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/µl) hinzu gegeben. Die cDNA wurde dann in der PCR-Maschine nach folgendem Programm generiert:

10 min 25°C
60 min 37°C
10 min 70°C

Kurzfristig wurde die hergestellte cDNA bei einer Temperatur von 4°C, längerfristig bei -20°C gelagert.

PCR

Die PCR wurde, bezogen auf einen Ansatz, wie folgt durchgeführt:

5 µl cDNA (unverdünnt)
5 µl DFS-Taq Reaktionspuffer (10x)
1 µl Primer 1 (10 pmol/µl)
1 µl Primer 2 (10 pmol/µl)
2 µl dNTP (2 mM)
0,3 µl DFS-Taq DNA Polymerase (5 U/µl)
ad 50 µl dH₂O

Zur Amplifikation wurde nachstehendes PCR-Programm gewählt:

2 min 95°C
20 sec 95°C
30 sec 56°C
60 sec 70°C
10 min 70°C

} 30 Zyklen

Es wurden die folgenden Primer eingesetzt:

<i>Bezeichnung</i>		<i>Sequenz</i>
STAT1¹	Primer 1 ²	GTT TTC ATG ACC TCC TGT CAC
	Primer 2	GTG GAC TCC TCC ATG TTC ATC
GAPDH	Primer 1	TGG CGT CTT CAC CAC CAT
	Primer 2	CAC CAC CCT GTT GCT GTA

¹ STAT1 Primer aus Ivanov et al., 2007

² bei Primer 1 handelte es sich um den 'forward' Primer, bei Primer 2 um den 'reverse' Primer

Nach Ende der PCR wurden 20 µl des Ansatzes entnommen und mit 4 µl des DNA-Probenpuffers versetzt. Davon wurden 15 µl in die Taschen eines 2%igen Agarose/1x TAE-Gels +

2 µl Ethidiumbromid überführt, wobei sich der TAE- und der DNA-Probenpuffer wie folgt zusammensetzten:

TAE-Puffer 50x:	24,2%	TrisBase (w/v)
	10%	Na ₂ EDTA 0,5 M, pH 8,0 (v/v)
	5,71%	Essigsäure (v/v)
DNA-Probenpuffer 1x:	3 ml	Glyzerin
	25%	Bromphenolblau (w/v)
	ad 10 ml	dH ₂ O

Das Gel wurde mit den Proben für eine Dauer von 30 min einer Spannung von 100 V ausgesetzt, wobei sich das Gel in 1x TAE-Puffer befand. Das Gel wurde direkt im Anschluss in der bildgebenden Apparatur für DNA-Gele analysiert.

3.2.3 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Zur Überprüfung der Integrität des Chromosoms 6 im Bereich der MIC (6p21.3) und ULBP (6q24.1-25.1) Genloci der Melanomzelllinien Mel 249, Mel 499 und Mel 505 wurden in Kooperation mit Dr. Norbert Arens (Pathologie, Universitätsklinikums Mannheim) Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen (FISH) durchgeführt. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen an Melanomzelllinien und an Chromosomenpräparaten von PHA-stimulierten peripheren Lymphozyten aus dem Blut eines gesunden Donors (CGH Target Slides) wurden miteinander verglichen. Für die FISH-Analyse wurden modifizierte Plasmide verwendet, welche in Bakterien vorlagen und humane genomische DNA beinhalteten. Die DNA der BACs- (engl.: bacterial artificial chromosome) und PACs (engl.: phage P1-derived artificial chromosome) waren zwischen 100 kb und 200 kb groß und zum Bereich der ULBP bzw. MIC Region komplementär. Die Bakterien-Klone wurden amplifiziert und die Plasmide mit dem 'Plasmid DNA Purification' Kit von Macherey-Nagel isoliert. Parallel wurden Glyzerin-Stocks der Klone angelegt. Die Aufreinigung fand nach dem beiliegenden Protokoll des Herstellers statt. Die aufgereinigte DNA der Plasmide wurde dann für die Nick Translation eingesetzt.

Nick Translation

Durch die Nick Translation können Fluoreszenz-markierte DNA Sonden hergestellt werden. Die DNase I und DNA-Polymerase I fügen Einzelstrang- (engl.: nicks) und Doppelstrangbrüche in den DNA-Doppelstrang ein, wobei die 5'-3' Exonuklease Funktion der DNA-Polymerase I Nukleotide im Bruchbereich eines Einzelstrangs entfernen kann. Die entstandene Lücke wird mit Fluoreszenz-konjugierten Nukleotiden, in diesem Fall dUTPs, durch die

DNA-Polymerase I wieder aufgefüllt. Dadurch entsteht eine Sonde, welche Fluoreszenz-markiert ist. Diese Sonde kann mit der komplementären DNA des Chromosoms interagieren. Es wurden dafür folgende humane Klone eingesetzt:

<i>Bezeichnung</i>		<i>Region</i>		<i>Resistenz</i>	<i>Firma</i>
BAC	RP11 291C6	ULBP	6q24.1~25	Chloramphenicol	Invitrogen
PAC	RP1 71I17	MIC	6p21.2~22.1	Kanamycin	Invitrogen

Der Ansatz wurde für jeden einzelnen Klon in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß für PCR wie folgt durchgeführt:

- 1 µg BAC- bzw. PAC-DNA
- 5 µl A4-Nukleotid-Mix aus dem Nick Translations Kit (A,C,G; jeweils 0,2 mM)
- 2,5 µl dTTP (0,2 mM)
- 2,5 µl SpectrumGreen-dUTP (bei Einsatz der BAC-DNA) bzw.
SpectrumOrange-dUTP (bei Einsatz des PAC-DNA)
- 5 µl DNase I/Polymerase I-Mix aus dem BioNick Kit
- ad 50 µl dH₂O

Dieser Ansatz wurde zunächst für eine Dauer von 75 min bei einer Temperatur von 16°C und anschließend für einen Zeitraum von 10 min bei einer Temperatur von 65°C in einem Thermocycler inkubiert. Zur Überprüfung der entstandenen Fragmentlänge wurden je 3 µl des Ansatzes mit 1 µl Probenpuffer versetzt und in einem 1%igen Agarose-Gel in 1x TAE-Puffer analysiert (45 min, 100 V; anschließende Färbung im Ethidiumbromid-Bad). Die Fragmentlänge war dabei stets im gewünschten Bereich von 100 bp bis 800 bp als Schmier sichtbar.

Fällung der DNA und Herstellung der Hybridisierungslösung

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde nun die Fällung der DNA vorbereitet. Dazu wurde wie folgt vorgegangen:

- 47 µl Nick Translation Ansatz des BAC-Klons
- 47 µl Nick Translation Ansatz des PAC-Klons
- 2 µl Salmon sperm DNA (10 mg/ml)
- 30 µl Cot-1 DNA (1 mg/ml)
- 12,6 µl Na-Acetat (3 M, pH 5,2)
- 315 µl Ethanol 100%, eiskalt

Nach gründlichem Mischen des Ansatzes wurde die DNA bei einer Temperatur von -80°C über Nacht gefällt. Die DNA wurde anschließend für eine Dauer von 30 min bei einer Geschwindigkeit von 13000 rpm und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das verbleibende Pellet mit 200 μl eiskaltem Ethanol 70% gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation von lediglich 15 min wurde der Überstand erneut entfernt und das Pellet bei einer Temperatur von 37°C für circa 5 min getrocknet. Zur Herstellung der Hybridisierungslösung wurde dieses Pellet dann in 5 μl Formamid und 5 μl einer Mischung aus 4x SSC-Puffer und Dextransulfat 20% über einen Zeitraum von einer Stunde im Wasserbad bei einer Temperatur von 37°C gelöst. Diese Lösung wurde bei einer Temperatur von -20°C aufbewahrt oder direkt auf die Chromosomenpräparate aufgetragen.

Präparation der Chromosomen

Um erkennen zu können, an welcher Stelle der DNA die markierten Sonden hybridisieren, wurden von den zu untersuchenden Zelllinien Chromosomenpräparate hergestellt. Dazu wurden die Melanomzellen zunächst wie gewohnt in 75 cm^2 Flaschen kultiviert. Einige Stunden vor der Präparation wurde das verbrauchte Medium durch frisches ersetzt. Vier Stunden vor dem Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche wurde das Medium mit Colcemid (finale Konzentration $0,02\text{ }\mu\text{g/ml}$) versetzt, um einen großen Anteil der Zellen in der Metaphase zu arretieren. Im Anschluss wurden die Zellen wie in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben abgelöst und zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ungefähr 0,5 ml abgenommen, worin das Zellpellet resuspendiert wurde. Nach Zugabe von 5 ml einer 56 mM Kaliumchlorid-Lösung wurde die Zellsuspension bei Raumtemperatur für eine Dauer von 30 min inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 1 ml verworfen, um das Pellet in der verbleibenden Lösung zu resuspendieren. Im Anschluss wurde tropfenweise 1 ml der Methanol-Eisessig Fixierlösung (Verhältnis 3:1) zugegeben. Es wurde darauf geachtet, dass die Suspension nach jedem Tropfen gemischt wurde. Das Gemisch wurde erneut zentrifugiert und das Pellet in einem Volumen von 3 ml des Fixanzes resuspendiert. Diese beiden Schritte wurden zwei Mal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in nur wenigen Mikrolitern resuspendiert, so dass die Suspension milchig aussah. Jeweils ein Tropfen davon wurde mittels einer Pasteur-Pipette auf einen, auf eine Temperatur von -20°C vorgekühlten, Objektträger gegeben, welcher anschließend bei Raumtemperatur getrocknet wurde. Nach vollständiger Trocknung wurden die präparierten Objektträger bei einer Temperatur von -20°C gelagert. Unmittelbar vor dem Auftragen der Hybridisierungslösung wurden nicht nur die Chromosomenpräparate der Melanomzellen, sondern auch die Kontrollpräparate des gesunden Donors

bei einer Temperatur von 70°C für einen Zeitraum von 5 h gehärtet. Dadurch wurde die Qualität der Präparate deutlich verbessert.

Hybridisierung

Auf die gehärteten Chromosomenpräparate der Melanom- und Kontrollzellen wurden 2 µl der Hybridisierungslösung aufgetragen und mit einem 1x1 cm großen Deckgläschen abgedeckt, welches mit Fixogum verschlossen wurde. Nach dem Trocknen des Klebers wurde das Präparat bei einer Temperatur von 70°C für eine Dauer von 5 min denaturiert. Die Hybridisierung fand über einen Zeitraum von drei Tagen bei einer Temperatur von 37°C in einer feuchten Kammer statt. Danach wurde das Deckgläschen entfernt und die Chromosomenpräparate zweimal für eine Dauer von 5 min bei einer Temperatur von 42°C in einem Wasserbad mit Schüttelfunktion in 0,05x SSC-Puffer gewaschen. Es folgte das Spülen in 2x SSC-Puffer/NP-40 0,1%, und nach kurzem Trocknen wurden die Chromosomenpräparate mit 20 µl Vectashield/DAPI und einem 24x60 mm Deckglas eingedeckt.

Bis zur Analyse mit dem Fluoreszenz-Mikroskop wurden die Präparate bei einer Temperatur von 4°C abgedunkelt gelagert.

3.2.4 Quantitative Versuche

3.2.4.1 Durchflusszytometrie – Fluorescence activated cell-sorting (FACS)

Für die Durchflusszytometrie wurden die jeweiligen Zellen mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt und nach der Fixierung im FACSCalibur analysiert.

Dazu wurden zunächst $1-2 \times 10^5$ Zellen in jeweils eine Vertiefung einer Zellkulturplatte mit 96 Kavitäten gegeben. Um mögliche Kreuzkontaminationen mit benachbarten Proben zu verhindern, wurden die umgebenden Vertiefungen ausgespart. Die Zellsuspension wurde, wie in allen Schritten während der Färbung, bei einer Geschwindigkeit von 1500 rpm für eine Dauer von 5 min zentrifugiert. Es folgte das Waschen der Zellen mit FACS-Puffer (1x PBS/FCS 10%/NaN₃ 0,1%), wonach das Zellpellet mit dem jeweiligen Primärantikörper (siehe Kapitel 3.1.5) bzw. mit dem Fusionsprotein (siehe Kapitel 3.1.2) versetzt wurde. Nach 30minütiger Inkubationszeit, die abgedunkelt auf Eis stattfand, folgten zwei Waschschrte mit FACS-Puffer. Im Anschluss wurde der sekundäre, Fluoreszenz-konjugierte Antikörper zu den jeweiligen Ansätzen gegeben (siehe Kapitel 3.1.5). Erneut erfolgte abgedunkelt eine Inkubation von 30 min auf Eis. Dann wurden die Zellen wiederholt gewaschen und mit 1x PBS + 4% Formaldehyd, fixiert. Die Proben wurden bei einer Temperatur von 4°C für maximal

eine Woche in Dunkelheit aufbewahrt. In der Regel erfolgte die Messung direkt nach der Färbung bzw. ein bis zwei Tage später.

Wurden die Zellen parallel mit direkt konjugiertem Antikörper gefärbt, so wurden diese Ansätze auf die gleiche Weise behandelt. Lediglich im ersten Schritt, in dem eigentlich der primäre unkonjugierte Antikörper eingesetzt wurde, erfolgten keinerlei Zugaben. Der direkt konjugierte Antikörper wurde dann zum gleichen Zeitpunkt zugegeben, wie der Sekundärantikörper für die anderen Proben.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Tumorzelllinien zu bestimmen, wurden zwei Kontrollfärbungen durchgeführt: (I) Die Tumorzellen wurden mit einer unspezifischen, direkt-konjugierten Isotypkontrolle gefärbt, (II) die Tumorzellen wurden ausschließlich mit dem sekundären, direkt-konjugierten Antikörper gefärbt. Da keine Unterschiede zwischen den Kontrollfärbungen mit dem Isotyp-Antikörper und dem sekundären Antikörper festgestellt werden konnten (nicht gezeigt), wurden alle Ansätze zur Bestimmung der unspezifischen Hintergrundfärbung lediglich mit dem Sekundärantikörper gefärbt.

Bei Darstellung der mittleren Intensität der Fluoreszenz (engl.: mean fluorescence intensity – MFI) wurde bereits die unspezifische Hintergrundfärbung abgezogen:

$$\text{MFI} = \text{MFI}_{\text{spezifische Färbung}} - \text{MFI}_{\text{unspezifischer Hintergrundfärbung}}$$

Der MFI der unspezifischen Hintergrundfärbung lag bei allen dargestellten Versuchen bei einem Wert von 3-4. Die statistische Berechnung wurde mit einem gepaarten zwei-armigen t-Test durch das Programm GraphPad Prism durchgeführt.

3.2.4.2 Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)

IFN- γ ELISA

Nach Aktivierung sind NK-Zellen in der Lage neben Perforinen, u.ä., auch IFN- γ zu sekretieren. Dadurch kann mittels Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) das freigesetzte IFN- γ zur Bestimmung der Aktivität der NK-Zellen herangezogen werden. Für diesen ELISA wurden zunächst NKL-Zellen mit Melanomzellen in einer 96er Mehrfachkulturplatte mit NM inkubiert. Das finale Volumen betrug 200 μl , wobei jeweils 5×10^4 Zellen eingesetzt wurden (Verhältnis Effektor : Target = 1:1). Als Positiv-Kontrolle wurden BaF/3+ULBP2 Zellen verwendet. Zudem wurde in einem Ansatz das spontan freigesetzte IFN- γ durch die NKL-Zellen gemessen. Nach der Inkubation von NKL und Melanomzellen über Nacht wurden 50 μl des Überstandes abgenommen und im IFN- γ ELISA eingesetzt. Dafür wurde einen Tag zuvor eine ELISA-Platte mit 2 $\mu\text{g/ml}$ des anti-IFN- γ Antikörpers in 1x PBS (mAb 1-D1K) beschichtet. Die Inkubation mit dem ersten IFN- γ Antikörper erfolgte über Nacht bei einer

Temperatur von 4°C. Am nächsten Tag wurde die beschichtete ELISA Platte zunächst zwei Mal mit 1x PBS gewaschen und dann mit 1x PBS/Tween 0,05% für die Dauer von einer Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Alle weiteren Schritte wurden ebenfalls bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen mit dem Waschpuffer (1x PBS/ Tween 0,05%/NaCl 0,9%) erfolgte die Zugabe von 50 µl der zu analysierenden Zellkulturüberstände aus dem Ansatz der Melanom- und NKL-Zellen. Für die Quantifizierung der IFN- γ Freisetzung wurde zudem ein IFN- γ Standard (rhIFN- γ) der Konzentrationen 25; 6; 25; 1,56 und 0,4 U/ml in 1x PBS/Tween 0,05% aufgetragen. Die Proben wurden für einen Zeitraum von 1,5 h inkubiert und im Anschluss drei Mal mit dem Waschpuffer gewaschen. Es folgte die Zugabe von 100 µl des biotinylierten IFN- γ Detektions-Antikörper (7-B6-1) in einer Konzentration von 1 µg/ml in 1x PBS. Dieser wurde nun für eine Dauer von 1 h inkubiert, wobei im Anschluss der Überstand durch dreimaliges Waschen mit dem Waschpuffer entfernt wurde. Zur Detektion des Biotins wurden 100 µl einer Streptavidin-Lösung der Konzentration 1 µg/ml Lösung zugegeben. An das Streptavidin war eine alkalische Phosphatase gekoppelt (Streptavidin-ALP). Nach einer einstündigen Inkubationszeit und viermaligem Waschen mit dem Waschpuffer wurden 100 µl des Substrats zugegeben. Die Umsetzung des Substrats (p-Nitro-Phenyl-Phosphat – pNPP) durch die Phosphatase führte zu einem Farbumschlag von farblos nach gelb, welcher nach wenigen Minuten stattfand. Diese Farbänderung spiegelt die Konzentration an detektiertem IFN- γ wider und kann bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen werden. Die resultierende optische Dichte (OD) ist dabei bis OD = 1 direkt proportional zur Konzentration an IFN- γ . In diesem Bereich kann daher, unter Zuhilfenahme des Standards, eine Steigungsgerade ermittelt werden, welche zur Umrechnung der detektierten OD_{405nm} in die entsprechende Konzentration [U/ml] benötigt wird (für den dargestellten Versuch gilt: $R^2_{\text{Standard IFN-}\gamma} = 0,99$).

MICA/ULBP2 ELISA

Die Bestimmung des freigesetzten MICA und ULBP2 nach IFN- γ Behandlung der Melanomzellen wurde mittels ELISA durchgeführt. Dazu wurden die Melanomzellen wie in Kapitel 3.2.1.4 beschrieben für einen Zeitraum von 96 h mit IFN- γ inkubiert, die Zellen im Kontrollansatz blieben unbehandelt. Der Überstand dieser Ansätze wurde vor dem Ablösen abgenommen und zunächst bei einer Temperatur von -20°C gelagert. Vor dem eigentlichen ELISA wurden die Proben auf Eis aufgetaut.

ELISA Platten wurden über Nacht mit dem MICA Antikörper AMO1 (5 µg/ml; 50 µl) bzw. ULBP2 Antikörper BUMO1 (1 µg/ml; 50 µl) jeweils in 1x PBS bei einer Temperatur von 4°C

beschichtet. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe des gleichen Volumens an 1x PBS/BSA 2% zur Blockierung unspezifischer Wechselwirkungen. Nach einstündiger Inkubationszeit bei einer Temperatur von 37°C wurde die Platte vier Mal mit dem Waschpuffer (1x PBS/Tween 0,05%) gewaschen. Darauf folgend wurden jeweils 50 µl der zu analysierenden Proben und das gleiche Volumen des MICA bzw. ULBP2 Standards (sMICA bzw. ULBP2-F_c) der Konzentrationen 1 ng/ml, 100 pg/ml, 10 pg/ml, 1 pg/ml in 1x PBS/BSA 1% zugegeben. Daraufhin wurden die Ansätze bei einer Temperatur von 37°C für einen Zeitraum von 1,5 h inkubiert. Es folgten erneut vier Waschschriffe. Die an die ersten Antikörper gebundenen MICA bzw. ULBP2 Proteine wurde mittels der Antikörper BAMO3 für MICA und MAB1298 für ULBP2 (jeweils 1 µg/ml in 1x PBS/BSA 1%) detektiert. Nach einstündiger Inkubationszeit bei einer Temperatur von 37°C wurden die ungebundenen Antikörper mit dem Waschpuffer entfernt und es erfolgte die Zugabe von 50 µl eines Peroxidase-gekoppelten IgG_{2a} Antikörpers, welcher in 1x PBS/BSA 1% auf eine Konzentration von 0,1 µg/ml verdünnt wurde. Dieser wurde ebenfalls bei einer Temperatur von 37°C für eine Dauer von 1 h inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen wurde zur Quantifizierung ein Volumen von 50 µl des Substrates, welches aus gleichen Teilen TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidindihydrochlorid) Peroxidase Substrat und Peroxidase Sol B bestand, zur Platte gegeben. Der Farbumschlag trat auch hier bereits nach wenigen Minuten ein und wurde durch Zugabe des gleichen Volumens 1 M Phosphorsäure gestoppt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm. Wie auch zur Analyse des IFN-γ ELISAs wurde mittels einer Standardgeraden die ermittelte OD in die entsprechende Konzentration an MICA bzw. ULBP2 umgerechnet ($R^2_{\text{Standard MICA/ULBP2}} = 0,98$). Die Detektionsgrenze lag bei ungefähr 10 pg/ml.

3.2.4.3 Radioaktiver Lyse-Versuch

Um die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen zu bestimmen, wurde ein Standard-Chrom Freisetzungstest durchgeführt. Dazu werden die von den NK-Zellen (Effektoren) zu lysierenden Zielzellen (Targetzellen) mit radioaktivem Chrom (^{51}Cr) markiert, dessen Lyse-bedingte Freisetzung dann quantifiziert wird. Das freie, detektierbare ^{51}Cr ist dabei direkt proportional zur Anzahl der Zielzellen, durch die NK-Zellen lysiert werden.

Dazu wurden zunächst 1×10^6 Zielzellen, also Melanomzellen und Zellen der Kontrollzelllinien, pelletiert. Der Überstand an Medium wurde dekantiert und es erfolgte die Zugabe von 50 µCi $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (maximales Volumen: 50 µl) zum verbleibenden gelockerten Pellet. Dieser Ansatz wurde für eine Dauer von 45-60 min und bei einer Temperatur von 37°C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss erfolgten drei Waschschriffe mit jeweils 10 ml NM, wobei mit

einer Geschwindigkeit von 1500 rpm für eine Dauer von 3 min zentrifugiert wurde. Es wurde darauf geachtet, dass das Pellet vor jeder Zugabe an NM aufgelockert war. Nach dem letzten Waschschrift erfolgte die Aufnahme des Pellets in 10 ml NM. Mit einer Mehrkanalpipette wurde jeweils ein Volumen von 100 µl der radioaktiv markierten Zellsuspension in eine vorbereitete Gewebekulturplatte überführt. Diese 96 Kavitäten Platte enthielt in der ersten Reihe lediglich NM, während die zweite Reihe 1 %iges TritonX100 beinhaltete, um die spontane bzw. maximale Freisetzung an ^{51}Cr der Zielzellen zu bestimmen. In den nachfolgenden Reihen waren NK-Zellen, von einer hohen hin zu einer niedrigen Konzentration, vorgelegt, so dass unterschiedliche Effektor : Target-Ratios bestimmt werden konnten. Nach einer Inkubationszeit von 4 h bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂ Gehalt von 5% wurde ein Volumen von 50 µl des Überstandes entnommen und auf Luma-Platten überführt. Nach Eintrocknen des Mediums, in der Regel am nächsten Tag, erfolgte die Detektion der verbleibenden Radioaktivität mit dem Top-Counter NXL.

Für die Blockierung von NKG2D wurde der anti-NKG2D Antikörper für eine Dauer von 30 min vor der Ko-Inkubation zu dem Pellet der NK-Zellen gegeben. Pro 1×10^7 Zellen wurden 5 µg Antikörper eingesetzt, wobei dieser auch während der Ko-Inkubation vorhanden war. Zur Blockierung von MICA wurden 10 µg des Antikörpers anti-MICA pro 10^6 Zielzellen gleichzeitig mit dem ^{51}Cr für 45-60 min im Wasserbad inkubiert und danach durch die Waschschriffe entfernt. Der Isotyp Kontroll-Antikörper IgG₁ wurde in den entsprechenden Experimenten auf die gleiche Art und Weise eingesetzt wie der anti-NKG2D und anti-MICA Antikörper.

Die Aktivität der NK-Zellen wurde dabei wie folgt berechnet:

$$\text{spezifische Lyse [\%]} = \frac{\left(\text{experimentelle } ^{51}\text{Cr Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr Freisetzung} \right)}{\left(\text{maximale } ^{51}\text{Cr Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr Freisetzung} \right)} \times 100$$

Die einzelnen Ansätze wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt, die spontane Freisetzung betrug in der Regel weniger als 10%, in einigen Ausnahmefällen lag sie bei rund 15%. Die statistische Berechnung wurde mit einem gepaarten zwei-armigen t-Test durch das Programm GraphPad Prism durchgeführt.

3.2.4.4 Quantitative PCR – TaqMan®

Um die Menge der zu untersuchenden RNA quantitativ bestimmen zu können, wurde eine TaqMan® PCR durchgeführt. Diese Methode ist durch den Einsatz von Sonden charakterisiert, an die ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Diese Sonden sind, ähnlich einem Primer,

komplementär zu einem kurzen Abschnitt der cDNA des zu untersuchenden Gens. Sie zeichnen sich durch einen Reporter-Farbstoff an ihrem 5'-Ende und durch einen Quencher-Farbstoff an dem 3'-Ende aus. Durch die räumliche Nähe von Reporter und Quencher unterdrückt der Quencher nach dem Prinzip des Fluoreszenz-Energietransfers die Fluoreszenz des Reporters, wenn dieser durch Licht bestimmter Wellenlänge angeregt wird. Im Laufe der PCR hybridisieren nun sowohl der 5'-Primer (forward) und der 3'-Primer (reverse), die zur Amplifikation des DNA Fragments eingesetzt werden, als auch die Sonde an den entsprechenden Matrizenstrang. Während der Extensionsphase trifft die Polymerase auf die Sonde. Dadurch wird die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der Polymerase induziert, so dass die Sonde geschnitten werden kann. Dadurch kommt es zur Unterbrechung der räumlichen Nähe und der Quencher verliert seinen Einfluss auf den Reporter-Farbstoff, so dass nun die Fluoreszenz des Reporters detektierbar ist. Da nur vollständig gebundene Sonden hydrolysiert werden können, ist die messbare Fluoreszenz eindeutig spezifisch und nimmt mit steigender Menge an PCR-Produkt zu.

Die in der quantitativen PCR verwendeten Sequenzen für Primer und Sonden wurden freundlicherweise von Dr. David Cosman, Amgen, Seattle, zur Verfügung gestellt. Als Reporter wurde 6-FAM (6-Carboxy-Fluorescein), als Quencher wurde MGB (engl.: minor groove-binder) eingesetzt. MGB-Sonden haben den Vorteil, dass sie an ihrem 3'-Ende keinen fluoreszierenden Quencher besitzen, sondern mit der kleinen Furche der DNA wechselwirken können. Dadurch wird die Schmelztemperatur der Sonden erhöht, so dass auch kürzere Sonden eingesetzt werden können und folglich die Spezifität verbessert wird. Dies ist besonders bei der Analyse der NKG2D Liganden wichtig, da diese eine hohe Homologie zueinander aufweisen. Zudem wird die Fluoreszenz des Reporters nicht durch das Signal des Quenchers gestört.

Für den Versuchsansatz wurde zunächst ein Mastermix hergestellt, um Konzentrationsunterschiede der grundlegenden Reagenzien zu vermeiden. Diese Reagenzien stammen dabei aus dem 'qPCR CoreKit' der Firma Eurogentec GmbH und wurden für einen Ansatz wie folgt eingesetzt:

2,5 µl	Reaktionspuffer (10x)
2,5 µl	MgCl ₂ (50 mM)
1 µl	dNTP (5 mM)
0,125 µl	HotGold Star Polymerase (5 U/µl)
9,875 µl	dH ₂ O

Danach erfolgte die Aufteilung des Ansatzes auf die Anzahl der eingesetzten Primer. Dabei wurden Primer und Sonden der NKG2D Liganden einzeln zum Ansatz hinzu gegeben, wäh-

rend für GAPDH ein vorgefertigter Mastermix der Firma Applied Biosystems verwendet wurde. Dieser war ebenfalls aus einer 6-FAM-MGB Sonde, sowie spezifischen Primern für GAPDH, zusammengesetzt (Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4: Sequenzen der eingesetzten Primer und Sonden für die quantitative PCR.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Fragmentgröße</i>
MICA	Primer 1 ¹	CGA TAT CTA AAA TCC GGC GTA GTC
	Primer 2	TGC GGG TGA CAT TCA CCA T
	Sonde	6-FAM-AGG AGA ACA GTG CCC-MGB
MICB	Primer 1	TGC AGA AAC TAC AGC GAT ATC TGA A
	Primer 2	TGC ATG TCA CGG TGA TGT TG
	Sonde	6-FAM-CCA TGG TGA ATG TCA C-MGB
ULBP1	Primer 1	AAG AAT TTT TGA TGT ACT GGG AAC AA
	Primer 2	ATG AAG CAG AGG AAG ATG ATG AGA A
	Sonde	6-FAM-CAC CCT CAG TCC CTG-MGB
ULBP2	Primer 1	GAT GGC TTG AGG ACT TCT TGA TG
	Primer 2	TGG GTT GTG CCT GAG GAC AT
	Sonde	6-FAM-CAT GGA CAG CAC CC-MGB
ULBP3	Primer 1	GCT TAG GGA CTT CCT GAT GCA
	Primer 2	GCT ATG GCT TTG GGT TGA GCT A
	Sonde	6-FAM-CTG GAA CCC ACA GCA C-MGB

¹ bei Primer 1 handelte es sich um den 'forward' Primer, bei Primer 2 um den 'reverse' Primer

Primer und Sonden wurden in den nachstehenden Konzentrationen eingesetzt:

MICA/B, ULBP1-3

0,75 µl Primer 1 (10 pmol/µl)
 0,75 µl Primer 2 (10 pmol/µl)
 2,5 µl Sonde (1 pmol/µl)

GAPDH

2,75 µl dH₂O
 1,25 µl Sonde und Primer
 (Assay Reagent 20x)

Der Mastermix (finales Volumen 20 µl) wurde in spezifische 96er PCR-Platten für die quantitative PCR überführt, wobei diese Platten bereits 5 µl der zu untersuchenden cDNA enthielten, die mit Wasser im Verhältnis 1:1 verdünnt war. Um unspezifische Wechselwirkungen auszuschließen wurde als Negativ-Kontrolle ein cDNA-freies Reaktionsgemisch eingesetzt, welches wie unter Kapitel 3.2.2 beschrieben mit RNA-freiem Wasser anstelle von RNA hergestellt wurde. Dieses Gemisch wurde ebenfalls 1:1 verdünnt, bevor 5 µl davon in der qPCR eingesetzt wurden. Als Positiv-Kontrolle wurden 5 µl verschiedener Plasmide eingesetzt, die

den jeweiligen NKG2D Liganden beinhalteten. Dabei wurde in Vorversuchen eine Konzentration von 5 pg Plasmid/ml als ideal festgelegt. Die Analysen wurden in der Regel mit Doppelbestimmungen durchgeführt, wobei das Gerät 'Gene Amp 5700 Sequence Detection' von Applied Biosystems verwendet wurde. Folgendes PCR-Programm kam dabei zur Anwendung:

2 min	50°C	
10 min	95°C	
20 sec	95°C	} 45 Zyklen
1,5 min	60°C	

Der Grenzwert (Threshold) stellt eine bestimmte, festgelegte Signalstärke dar. Dieser konnte bei diesem Gerät nicht verändert werden, so dass er bei allen Versuchen konstant bei 0,1 lag. Die Fluoreszenz-Intensitäten der Negativ-Kontrollen waren in den dargestellten Versuchen unterhalb des Thresholds.

Zur Quantifizierung der erhaltenen C_T -Werte (= Anzahl der Zyklen, bis die Intensität der Fluoreszenz der hydrolysierten Sonde den Threshold überschreitet), wurde folgende Umrechnung verwendet, die den exponentiellen Verlauf berücksichtigt:

$$x = 2^{-C_T}$$

Mit Hilfe dieser Formel wurden zunächst sowohl die gemessenen C_T -Werte der NKG2D Liganden, als auch der C_T -Wert der endogenen Kontrolle GAPDH umgerechnet. Im Anschluss wurden für jeden einzelnen Ansatz die Werte der NKG2D Liganden auf die endogene Kontrolle bezogen, so dass Zytokin-behandelte mit -unbehandelten Zellen einer Linie verglichen werden konnten. Demnach sind alle Werte der quantitativen RT-PCR als relativ zu GAPDH (rel. GAPDH) dargestellt.

Um Kreuzreaktivitäten auszuschließen, wurde cDNA der BaF/3 Zellen hergestellt, welche je einen der NKG2D Liganden exprimierten, und ebenfalls mittels quantitativer PCR und den entsprechenden Primern und Sonden untersucht. Es konnten keine gravierenden Kreuzreaktivitäten festgestellt werden (vgl. Kapitel 7.1.2). Im Allgemeinen galten Signale, die unterhalb einem C_T -Wert von 35 detektiert wurden als spezifisch.

4 Ergebnisse

Melanome sind sehr immunogene Tumore, die durch verschiedene Effektorzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems erkannt und zerstört werden können. Allerdings entziehen sich die Tumore mittels diverser Mechanismen häufig der Erkennung durch Immunzellen. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass Melanommetastasen die Oberflächenexpression ihrer HLA Klasse I Moleküle reduzieren oder sie sogar vollständig verlieren. Demzufolge entgehen sie der Erkennung durch T-Lymphozyten. Allerdings sollte diese verringerte HLA Klasse I Expression, basierend auf der 'missing-self'-Hypothese, zur Aktivierung von NK-Zellen führen (Karre et al., 1986; Ljunggren & Karre, 1990). Die Interaktion von Melanomzellen und NK-Zellen ist jedoch nur unzureichend charakterisiert. Für eine effiziente Erkennung durch NK-Zellen ist nicht nur eine Reduktion bzw. ein Verlust inhibierender Signale (in der Regel vermittelt durch HLA-Klasse I Moleküle), sondern auch die Oberflächenexpression aktivierender Moleküle auf den Zielzellen erforderlich. Die Proteine MICA, MICB und die Mitglieder der ULBP Familie fungieren als Liganden des aktivierenden NK-Zellrezeptors NKG2D. Die Expression dieser Liganden, ihre Zytokin-abhängige Regulation und ihre Rolle in der Erkennung von Melanomzellen durch NK-Zellen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Um die Aktivierung von NK-Zellen ohne den inhibierenden Einfluss der HLA Klasse I Moleküle untersuchen zu können, eignen sich HLA Klasse I-negative Zellen in besonderem Maße. Der Großteil, der in dieser Arbeit untersuchten Melanomzellen, weist einen irreversible HLA Klasse I Verlust auf, der in der Regel durch verschiedenartige Mutationen im $\beta 2$ Mikroglobulin ($\beta 2m$) Gen hervorgerufen wird (Paschen et al., 2006; Paschen et al., 2003; siehe auch Tabelle 2-1).

4.1 Erkennung von Melanomzellen durch Natürliche Killerzellen

Zu Beginn dieser Arbeit sollte die Erkennung von Melanomzellen durch NK-Zellen analysiert werden. Da der Rolle der NKG2D Liganden im Rahmen dieser Interaktion ein besonderes Interesse galt, wurde die NK-Zelllinie NKL als Effektorzelllinie ausgewählt. Diese Linie wurde verwendet, da deren Repertoire an Rezeptoren relativ gut charakterisiert ist und sie sich durch eine geringe Anzahl inhibierender Rezeptoren auszeichnet. Zudem ist bekannt, dass die Aktivierung dieser Linie überwiegend durch den NKG2D Rezeptor induziert wird.

Da aktivierte NK-Zellen IFN- γ sekretieren, wurde mit einem IFN- γ ELISA die Stimulierung der NK-Zellen bestimmt. Zur Kontrolle der NKL Aktivierung wurde die murine pro B-Zelllinie BaF/3 verwendet, die mit dem humanen ULBP2 Molekül transduziert wurde und dadurch NKG2D-vermittelt NK-Zellen aktiviert. Im Rahmen dieses Versuchs wurden NKL-Zellen mit einer Auswahl an HLA Klasse I-negativen und -positiven Melanomlinien inkubiert. Abbildung 4-1 zeigt das Ergebnis des IFN- γ ELISA. Es ist deutlich zu erkennen, dass die getesteten HLA Klasse I-positiven Melanomzellen Ma-Mel 36, Ma-Mel 59a, Ma-Mel 86a und UKRV-Mel 15a nicht in der Lage waren NKL-Zellen zu aktivieren, was sicher auf die Expression der inhibierend wirkenden HLA-Moleküle zurückzuführen ist. Die Melanomlinien Mel 249, Mel 592 und Ma-Mel 86b konnten wie erwartet NK-Zellen aktivieren, da ihnen der inhibierende HLA Klasse I Komplex fehlt. Interessanterweise konnten die Linien Mel 499 und Mel 505 keine Freisetzung von IFN- γ durch die NKL-Zellen induzieren.

Infolgedessen wurden zunächst die möglichen Gründe untersucht, die es den Melanomlinien Mel 499 und Mel 505 ermöglichten, sich der Erkennung durch NKL zu entziehen, obwohl sie den für die Inhibierung hauptsächlich verantwortlichen HLA Klasse I Komplex nicht exprimieren.

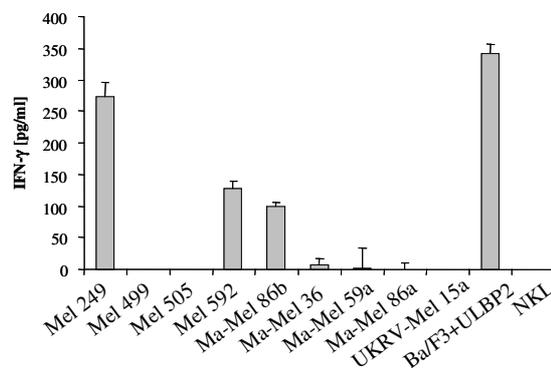


Abbildung 4-1. Aktivierung der NK-Zelllinie NKL durch HLA Klasse I-negative und -positive Melanomzellen

Je 10^4 Melanom- und NKL-Zellen wurden über Nacht ko-inkubiert. Aliquots der Kulturüberstand wurden zur Bestimmung des durch NKL-Zellen freigesetzten IFN- γ im ELISA verwendet. HLA Klasse I-negative Zellen sind Mel 249, Mel 499, Mel 505, Mel 592 und Ma-Mel 86b. HLA Klasse I-positive Zellen sind Ma-Mel 36, Ma-Mel 59a, Ma-Mel 86a und UKRV-Mel 15a. Die Zelllinie BaF/3+ULBP2 repräsentiert die maximale NKG2D-vermittelte Aktivierung der NKL in diesem Versuch. Im Ansatz 'NKL' ist die spontane Freisetzung an IFN- γ durch die NKL-Zellen gezeigt.

4.1.1 Analyse der Oberflächenexpression der NKG2D Liganden mit dem Fusionsprotein hNKG2D-F_c

Da die Melanomzellen Mel 499 und Mel 505 nicht in der Lage waren, die NK-Zelllinie NKL zu aktivieren, wurden die Zellen zunächst auf die Oberflächenexpression der NKG2D Ligan-

den hin untersucht. Wie bereits erwähnt, können NKL-Zellen über den NKG2D Rezeptor aktiviert werden, der als ein wichtiger aktivierender Rezeptor auf humanen NK-Zellen fungiert. Für die Analysen wurde ein Fusionsprotein verwendet, welches aus Anteilen des humanen NKG2D Rezeptors und einem humanen F_c-Teil besteht (hNKG2D-F_c). Dieses Protein ist in der Lage alle NKG2D Liganden zu binden.

Abbildung 4-2 zeigt die Bestimmung der Oberflächenexpression der NKG2D Liganden mittels Durchflusszytometrie. Die ‘Dot-Blot’- Darstellung wurde für eine detaillierte Präsentation der Ergebnisse ausgewählt. Die obere Reihe zeigt die Fluoreszenz der Zellen, die durch Inkubation mit dem Fluoreszenz-gekoppelten sekundären Antikörpers (PE) hervorgerufen wurde. In der unteren Reihe ist die Fluoreszenz der Zellen nach Inkubation mit dem Fusionsprotein hNKG2D-F_c und dem Fluoreszenz-gekoppelten sekundären Antikörper dargestellt.

Es ist erkennbar, dass Mel 249 Zellen die Liganden des NKG2D Rezeptors deutlich auf der Oberfläche exprimieren. Im Gegensatz dazu konnten Mel 499 und Mel 505 nicht mit dem Fusionsprotein markiert werden, was auf einen Liganden Verlust oder auf eine Expression defekter Liganden hindeutet. Beide Umstände könnten die Ursache dafür sein, dass Mel 499 und Mel 505 die NKL-Zellen nicht zur Sekretion von IFN- γ anregen konnten. Dies sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

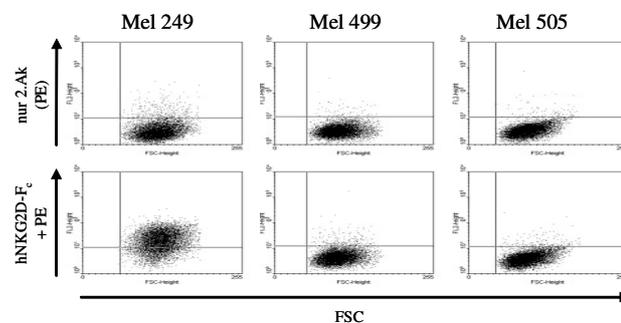


Abbildung 4-2. Analyse der Oberflächenexpression von NKG2D Liganden

Mel 249, Mel 499 und Mel 505 wurden mit dem humanen NKG2D Rezeptor-Fusionsprotein (hNKG2D-F_c) inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit dem sekundären PE-gekoppelten Ziege anti-human Antikörper (untere Reihe). Zur Detektion unspezifischer Fluoreszenzsignale wurden die Zellen in einem Kontrollansatz ausschließlich mit dem sekundären Antikörper inkubiert (obere Reihe). Auf der x-Achse ist der ‘forward scatter’ (FSC) dargestellt, während die y-Achse die Fluoreszenz der Antikörper-markierten Zellen (PE) zeigt. Die Detektion erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACSCalibur).

4.1.2 Analyse der MIC und ULBP Region auf Metaphasechromosomen mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Unter Berücksichtigung der vorangehenden Ergebnisse stellte sich die Frage, ob in Mel 499 und Mel 505 Zellen möglicherweise ein Verlust der MIC und ULBP Genregionen vorlag. Beide Regionen sind auf Chromosom 6 lokalisiert, die MIC Region auf Chromosomarm 6p

(Region 21.3) die ULBP Region auf Chromosomarm 6q (Region 24.1-25.1). Von der ULBP Region ist bekannt, dass sie im Bereich einer fragilen Stelle des Chromosom 6q liegt (Denison et al., 2003; Morelli et al., 2002). Diese fragilen Stellen definieren DNA- bzw. Chromosomenbereiche, in denen die Wahrscheinlichkeit von Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA deutlich höher ist, als in anderen Regionen des Chromosoms. Demnach ist es denkbar, dass die Zelllinien Mel 499 und Mel 505, die nach Inkubation mit dem NKG2D Fusionsprotein keine feststellbare Oberflächenexpression der NKG2D Liganden zeigten, die Genloci der Liganden verloren hatten und demnach diese Liganden nicht mehr exprimieren konnten. Diese Frage sollte mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) untersucht werden. Mit Hilfe dieser Technik lassen sich ausgewählte Chromosomabschnitte an Interphasekernen und Metaphasekernen im Fluoreszenzmikroskop darstellen, so dass Informationen über das Vorhandensein oder den Verlust einer Genregion gewonnen werden können. Dazu wurden von Mel 499 und Mel 505 Zellen Präparate von Metaphasechromosomen hergestellt. Für die FISH Analyse wurden zwei Sonden ausgewählt, die zur MIC bzw. ULBP Region auf Chromosom 6 komplementär waren. Die Sonden wurden während der Nick-Translation Fluoreszenzmarkiert, wobei die DNA der Sonde für den MIC Locus rot, die Sonde für die ULBP Region grün markiert wurde (Abbildung 4-3A). Chromosomenpräparate von Phytohämagglutinin-(PHA-) stimulierten peripheren Lymphozyten aus dem Blut eines gesunden Donors, sowie die Melanomlinie Mel 249, welche die NKG2D Liganden auf ihrer Oberfläche exprimiert, wurden zum Vergleich herangezogen.

Es ist bekannt, dass Tumorzellen häufig einen polyploiden Chromosomensatz aufweisen, so dass die Anzahl der Fluoreszenzsignale für eine Genregion im Vergleich zu normalen Zellen erhöht sein kann. Um einen ersten Überblick über die Anzahl der Signale zu erhalten, wurden zunächst 60 Interphasekerne pro Zelllinie ausgezählt. Dabei war auffällig, dass in den untersuchten Melanomlinien die Anzahl der Signale für beide Regionen schwankte. Mel 249 Zellen zeigten in knapp 87% der untersuchten Kerne drei Signale spezifisch für den MIC und zwei Signale spezifisch für den ULBP Genlocus (Abbildung 4-3B und C). Die gleiche Verteilung war auch für rund 82% der Mel 505 Zellen zu erkennen. Mel 499 Zellen zeigten in 68% der analysierten Interphasekerne vier Signale der MIC Region und zwei für den ULBP Bereich. Unerwartet zeigte die Analyse von Interphasekernen der normalen Zellen eines gesunden Donors dabei ebenfalls Unregelmäßigkeiten, was seine Ursache in der insgesamt etwas schwierigen Auszählung der Signale hatte. Häufig waren unspezifische, sowie übereinander liegende Signale in den Interphasekernen aller untersuchten Proben vorhanden, welche dann als falsch-positive bzw. falsch-negative Signale in die Auswertung eingingen. In den unters-

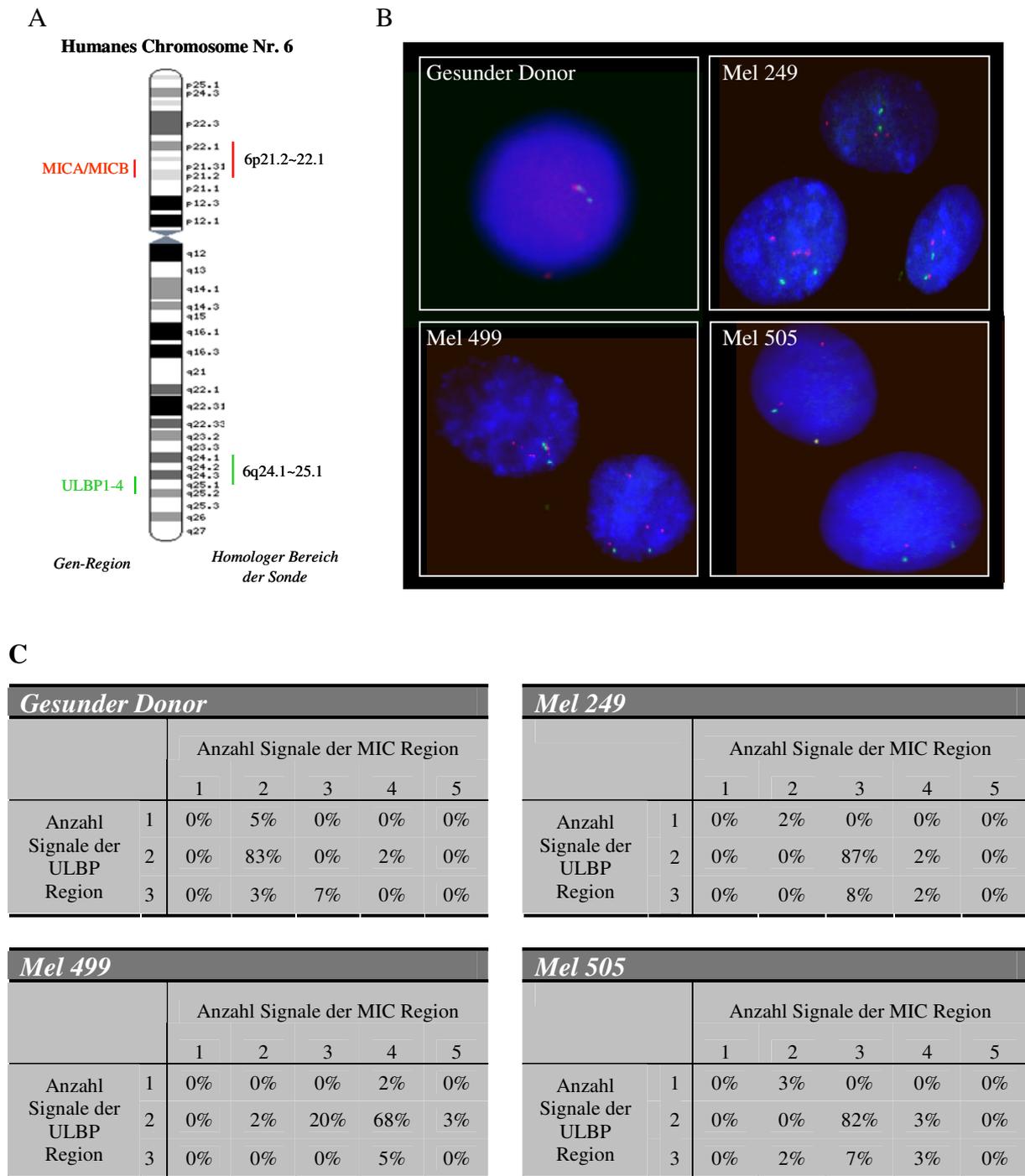


Abbildung 4-3. FISH-Analyse von Mel 499 und Mel 505 – Interphasekerne

Chromosomenpräparate von PHA-stimulierten peripheren Lymphozyten aus dem Blut eines gesunden Donors, Mel 249, Mel 499 und Mel 505 wurden mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen (FISH) auf das Vorhandensein der MIC bzw. ULBP Genloci untersucht. (A) Für die MIC Region wurde die DNA eines PAC-Klons verwendet, die zur Region 6p21.2-22.1 komplementär ist, während für den ULBP Locus die DNA eines BAC-Klons eingesetzt wurde, die komplementär zum Bereich 6q24.1-25.1 war. Während der Nick-Translation wurde die DNA der Sonden mittels Spectrum-Orange (MICA Region; rot) bzw. Spectrum-Green (ULBP Region; grün) dUTPs markiert. (B) Die Interphasen der vier zu untersuchenden Proben sind dargestellt. Die Hybridisierung der Sonden erfolgte auf gehärteten Metaphase-Chromosomenpräparaten für die Dauer von drei Tagen. Die gesamte chromosomale DNA wurde mittels DAPI angefärbt und ist als blaue Fluoreszenz sichtbar. (C) Der prozentuale Anteil der Anzahl der Signale für die MIC bzw. ULBP Region wurde anhand der Auszählung von 60 Interphasekernen je zu untersuchender Probe ermittelt. Die Spalten geben die Anzahl der MIC Loci (1-5 rote Signale) und die Zeilen die Zahl der ermittelten ULBP Loci (1-3 grüne Signale) an.

suchten Zellen war jedoch immer mindestens ein eindeutig spezifisches Signal vorhanden (Abbildung 4-3). Um die Lokalisation der Sonden und somit die Anzahl der Signale zweifelsfrei bestimmen zu können, wurden Metaphasechromosomen untersucht.

In Abbildung 4-4 ist beispielhaft ein Metaphasechromosom 6 von jedem untersuchten Ansatz dargestellt. Im Falle der normalen Zellen des gesunden Donors waren auf jedem Chromatid der p-Arme Signale im Bereich der MIC Genloci detektierbar, die in rot abgebildet wurden. Auf den langen q-Armen waren die ULBP Regionen grün markiert. In Mel 249 waren auf zwei offenbar intakten Chromosomen 6 die Signale für die MIC und ULBP Region detektierbar. Daneben wurden MIC-spezifische Signale auf einem abnormalen Chromosom 6 beobachtet. In Mel 499 waren ebenfalls innerhalb eines Chromosoms spezifische Signale vorhanden, welche jeweils die Region der MIC und ULBP Gene markierten. Zudem schienen einzelne MIC-spezifische Signale auf weiteren Chromosomen präsent zu sein. Ob es sich dabei um ein abnormales Chromosom 6 handelt, welches den ULBP Bereich verloren hat oder um eine Translokation der MIC Region an ein anderes Chromosom, war nicht eindeutig festzustellen.

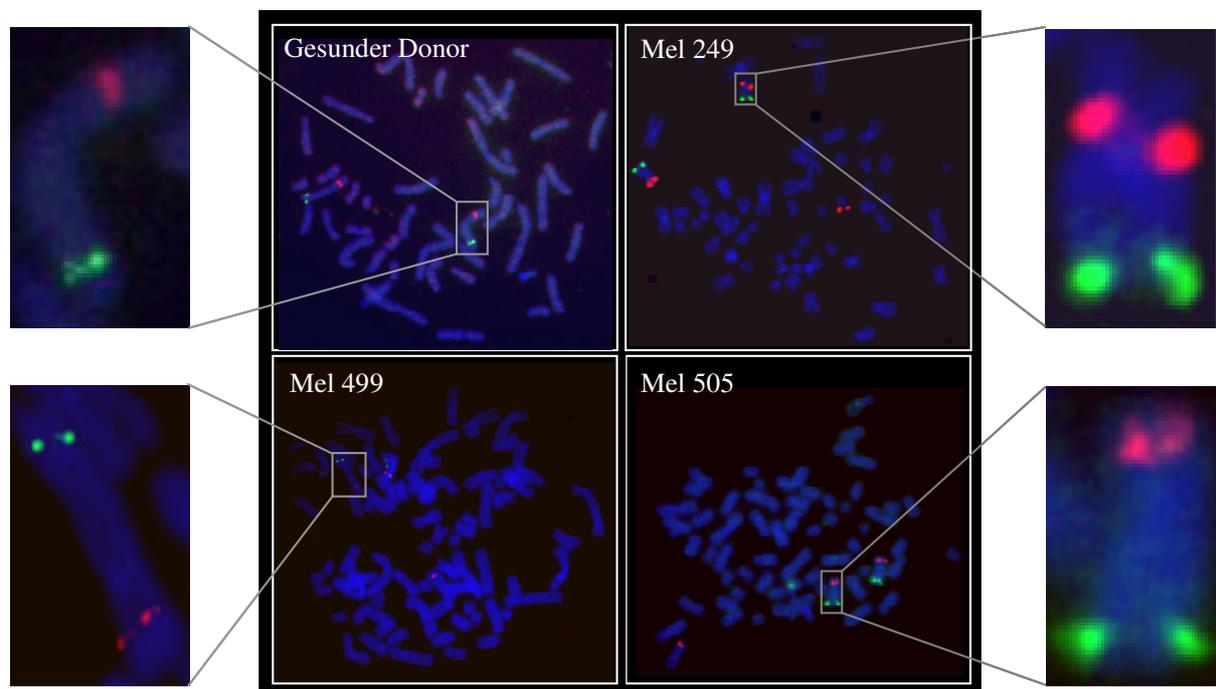


Abbildung 4-4. FISH-Analyse von Mel 499 und Mel 505 – Metaphasechromosomen

Die Chromosomen der Metaphasen des gesunden Donors, Mel 249, Mel 499 und Mel 505 sind dargestellt. Die Präparation erfolgte wie in Abbildung 4-3 beschrieben. Jeweils ein vollständiger Metaphasekern von jeder zu analysierenden Zelllinie und den Kontrollzellen ist gezeigt, wobei jeweils das Chromosom 6 vergrößert wurde. Alle Proben zeigen mindestens ein Signal für den MIC (rot) bzw. ULBP (grün) Genlocus, welcher auf beiden Chromatiden vorhanden ist. Die chromosomale DNA ist mittels DAPI angefärbt und als blaue Fluoreszenz sichtbar.

Die Ergebnisse der FISH-Analyse konnten zwar zeigen, dass die fragwürdigen Loci anwesend waren, ihre Präsenz lässt hingegen keine Rückschlüsse auf die Expression der Gene zu. Aus diesem Grund wurde zunächst mittels RT-PCR untersucht, ob die Melanomlinien RNA der NKG2D Liganden exprimieren.

4.1.3 Expressionsprofile der einzelnen NKG2D Liganden in Melanomzellen

Das Expressionsprofil der NKG2D Liganden MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 und ULBP3 in Mel 499 und Mel 505 Zellen wurde sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene analysiert. Dies geschah mittels TaqMan[®] RT-PCR und Durchflusszytometrie. Um die Ergebnisse dieser Untersuchungen besser einordnen zu können, wurden zusätzlich einige der bereits in Abbildung 4-1 dargestellten Melanomzellen, sowie die Melanomlinien Ma-Mel 61h und UKRV-Mel 2 in die Analysen eingeschlossen. Die verwendeten Melanomzellen sind, mit Ausnahme von Ma-Mel 48c und Ma-Mel 86a, HLA Klasse I-defizient.

In Abbildung 4-5 sind die Resultate der quantitativen TaqMan[®] RT-PCR dargestellt. Die Expressionswerte aller NKG2D Liganden wurden auf die endogene Kontrolle Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert. Es ist deutlich zu erkennen, dass RNA von MICA in allen analysierten Melanomlinien detektierbar war und im Vergleich zu den anderen NKG2D Liganden am stärksten exprimiert wurde. Auch das Gen ULBP2 wurde in allen analysierten Melanomlinien transkribiert, allerdings lag die ULBP2 RNA in wesentlich geringeren Mengen vor als die der MICA RNA. Die MICB und ULBP3 Gene wurden hingegen nicht in allen Linien exprimiert. So zeigten Mel 505 und Mel 592 keine detektierbare MICB RNA. Die RNA von ULBP3 konnte in Mel 499 und Ma-Mel 48c nicht nachgewiesen werden. RNA von ULBP1 war in keiner der Melanomzellen vorhanden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sehr geringe Mengen dieser RNA zwar produziert, aber dennoch nicht detektierbar waren. Vergleicht man Mel 499 und Mel 505 mit den anderen Melanomlinien, so sind keine auffälligen Unterschiede bezüglich der Transkription der NKG2D Liganden festzustellen.

Bemerkenswert ist, dass die Expressionswerte der Liganden zwischen den einzelnen Versuchen stark variierten. Zwar war das Verhältnis der Expression einzelner Liganden zueinander weitgehend unverändert, die Werte relativ zu GAPDH zeigten jedoch Unterschiede im logarithmischen Bereich auf.

Die Oberflächenexpression der NKG2D Liganden ist in Abbildung 4-6 dargestellt. Kreuzreaktionen der monoklonalen Antikörper wurden im Vorfeld ausgeschlossen (siehe Anhang, Kapitel 7.1.3). Der am stärksten exprimierte Ligand von NKG2D war auch hier MICA. Daneben wurde ULBP2 von vielen Melanomzellen deutlich exprimiert. Im Gegensatz dazu

schiene die Liganden MICB, ULBP1 und ULBP3 nur sehr schwach oder gar nicht auf der Oberfläche vorhanden zu sein. Mel 249 und Mel 499 waren hierbei die einzigen Zelllinien, die gelegentlich eine schwache MICB-spezifische Färbung zeigten. Ähnlich war auch die Situation für das Protein ULBP3, welches nur von wenigen Zellen der Linien UKRV-Mel 2, Ma-Mel 86a/86b und Ma-Mel 61h exprimiert wurde. In der 'Dot-Blot' Darstellung wird sichtbar, dass bei einigen Zelllinien nur ein geringer Teil der Zellen die zu untersuchende Proteine deutlich exprimierten. So zeigten beispielsweise wenige Zellen von Ma-Mel 86b und UKRV-Mel 2 eine Färbung für ULBP3. Auch die MICA Expression auf Mel 505 variierte innerhalb der Linie deutlich.

Interessanterweise korrelierte die RNA Expression nicht unbedingt mit der Proteinexpression. Als Erstes fällt in diesem Zusammenhang MICB auf. Während in vielen Melanomzellen rela-

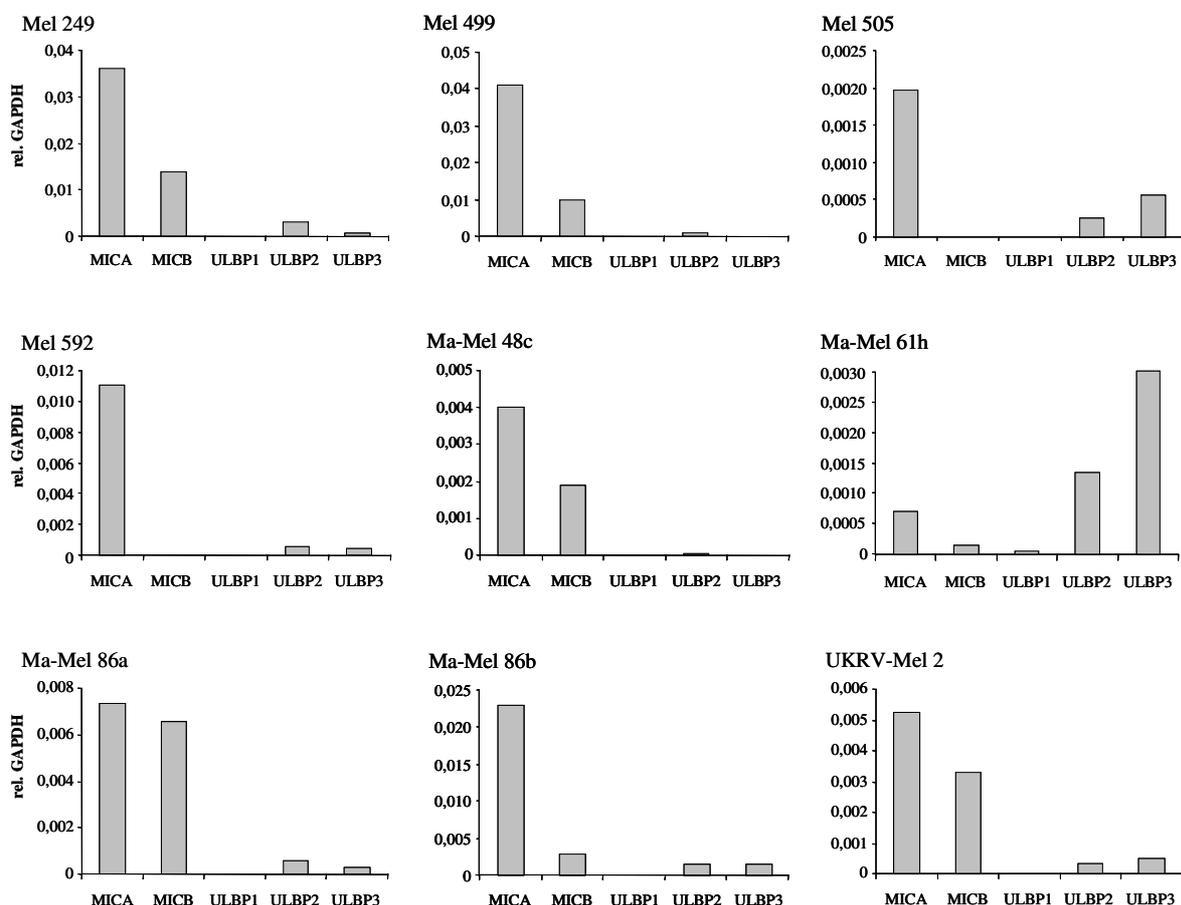


Abbildung 4-5. RNA Expressionsprofile der NKG2D Liganden in verschiedenen Melanomzelllinien

Sieben HLA Klasse I-negative (Mel 249, Mel 499, Mel 505, Mel 592, Ma-Mel 61h, Ma-Mel 86b und UKRV-Mel 2) und zwei HLA Klasse I-positive (Ma-Mel 48c und Ma-Mel 86a) Melanomlinien wurden auf das Expressionsprofil der NKG2D Liganden untersucht. Die Zellen wurden pelletiert und aus dem Pellet wurde die gesamte RNA isoliert. Die daraus hergestellte cDNA wurde für die quantitative Analyse mittels TaqMan® RT-PCR verwendet. Die erhaltenen Werte jedes Liganden (2^{-Ct}) wurden auf die endogene Kontrolle GAPDH normalisiert (rel. GAPDH). Die abgebildeten Ergebnisse stellen einen repräsentativen Versuch von mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar.

tiv große Mengen der MICB RNA, im Vergleich zu den anderen Liganden, vorlagen, war das Protein nur sehr vereinzelt auf der Oberfläche vorhanden. Auch bei ULBP2 ist ein Missverhältnis zwischen RNA und Oberflächenexpression festzustellen, allerdings in gegensätzlicher Richtung. Hier wurden relativ geringe Mengen an RNA produziert, dennoch war das Protein auf allen untersuchten Zellen und häufig auch in großen Mengen detektierbar. Vergleicht man dazu ULBP3, so wird der Unterschied noch deutlicher. Fast alle Linien zeigten nahezu identische RNA Mengen von ULBP2 und ULBP3. Betrachtet man hingegen die Oberflächenexpression, so wurde ULBP3 nur sehr selten und dann auch nur in geringer Konzentration festgestellt.

Ein konkretes Beispiel für die unterschiedlichen RNA und Oberflächenexpressionen wies die Linie Ma-Mel 61h auf. Sie zeigte große Mengen an ULBP3 RNA und geringe Mengen an MICA RNA. Die Oberflächenexpression beider Proteine unterschied sich jedoch völlig davon. MICA war in hoher Konzentration vorhanden, während ULBP3 nicht detektierbar war. Dies alles lässt den Schluss zu, dass die Liganden von NKG2D nicht ausschließlich transkriptionell reguliert werden.

Bemerkenswerterweise wurde durch den Vergleich der in Abbildung 4-2 und Abbildung 4-6 dargestellten Ergebnisse für Mel 499 und Mel 505 Zellen eine deutliche Diskrepanz zwischen der Erkennung durch das Fusionsprotein und die monoklonalen Antikörper sichtbar. Mel 499 und Mel 505 konnten, obwohl keine Bindung des Fusionsproteins detektierbar war, mit den monoklonalen Antikörpern markiert werden. Die Intensität der Fluoreszenz von Antikörpermarkierten Mel 499 und Mel 505 Zellen war vergleichbar mit der Intensität anderer Melanomzellen. Aus welchem Grund Mel 499 und Mel 505 Zellen dennoch weder durch das Fusionsprotein markiert noch durch NKL-Zellen erkannt und lysiert werden konnten, ist bislang unklar und muss durch weitere Untersuchungen außerhalb der vorliegenden Arbeit geklärt werden.

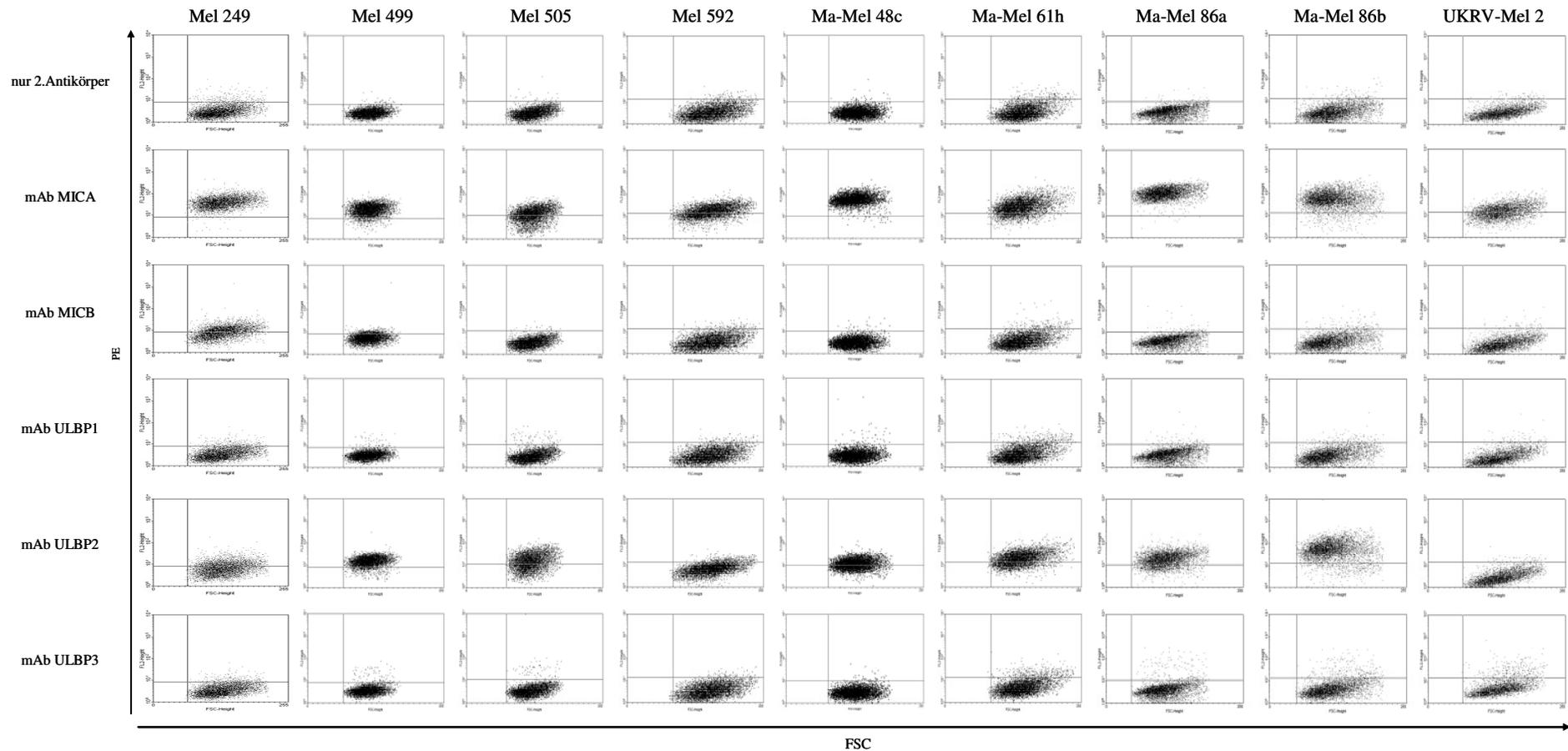


Abbildung 4-6. Oberflächenexpressionsprofile der NKG2D Liganden von verschiedenen Melanomzelllinien

Sieben HLA Klasse I-negative (Mel 249, Mel 499, Mel 505, Mel 592, Ma-Mel 61h, Ma-Mel 86b und UKRV-Mel 2) und zwei HLA Klasse I-positive (Ma-Mel 48c und Ma-Mel 86a) Melanomlinien wurden auf das Expressionsprofil der NKG2D Liganden untersucht. Dazu wurden die Zellen mit den entsprechenden monoklonalen Antikörpern (mAb) gegen MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 und ULBP3 inkubiert. Anschließend erfolgte die Markierung mit dem sekundären PE-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper. Zur Bestimmung der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz wurden die Zellen ausschließlich mit sekundärem Antikörper inkubiert (erste Reihe). Die Detektion erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACSCalibur). Die Resultate sind zur besseren Darstellung als 'Dot-Blot' dargestellt. Auf der x-Achse ist der FSC gezeigt, während die y-Achse die Intensität der Fluoreszenz (PE) der markierten Zellen repräsentiert.

4.2 Einfluss von Zytokinen auf die Expression der NKG2D Liganden in Melanomzellen

Um einen Einblick in die Regulation der NKG2D Liganden in Melanomzellen zu erlangen, sollten die Tumorzellen mit verschiedenen Zytokinen behandelt und deren Einfluss auf die NKG2D Ligandenexpression untersucht werden. Für diese Versuche wurden vier Melanomlinien aufgrund ihrer gleichmäßig guten Wachstumseigenschaften ausgewählt. Dies waren die drei HLA Klasse I-negativen Melanomlinien Mel 249, Ma-Mel 86b und UKRV-Mel 2, sowie die HLA Klasse I-positive Linie Ma-Mel 86a. Diese vier Linien wurden mit den drei Zytokinen IFN- α , IFN- γ und TNF- α behandelt. IFN- α gehört zur Gruppe der Typ I Interferone und kann eine Erhöhung der HLA Klasse I Expression induzieren, wodurch die Immunogenität von Tumorzellen gegenüber T-Zellen verstärkt werden kann (Friedman et al., 1984). Die Wirkungsweise von IFN- α auf die NKG2D Ligandenexpression auf Melanomzellen sollte untersucht werden, da das Zytokin zur adjuvanten Therapie an Melanompatienten im Rahmen klinischer Studien verabreicht wird (siehe Kapitel 1.1.3).

IFN- γ und TNF- α sind wichtige pro-inflammatorische Zytokine. Die Sekretion von IFN- γ findet durch verschiedene Zellen des Immunsystems, unter anderem durch NK-Zellen, statt. Wie auch IFN- α kann IFN- γ eine gesteigerte HLA Klasse I Expression auf der Oberfläche vieler Zellen induzieren und dadurch die Interaktion mit T-Zellen erhöhen. TNF- α wird nicht nur von verschiedenen Zellen des Immunsystems sekretiert, sondern kann auch von Tumorzellen freigesetzt werden. Es wird postuliert, dass IFN- γ und TNF- α das Wachstum des Tumors beeinflussen können (Salazar-Onfray et al., 2007).

Da vor allem MICA und ULBP2 auf den Melanomzellen exprimiert wurden, beschränkten sich die Untersuchungen auf diese beiden Liganden. Zunächst wurde die Expression dieser Proteine auf der Oberfläche nach viertägiger Behandlung mit IFN- α untersucht (Abbildung 4-7A). Hierbei zeigte lediglich die Zelllinie Ma-Mel 86b eine Reduktion der Oberflächenexpression von MICA. Alle anderen untersuchten Zellen wiesen kaum Veränderungen auf.

Bei Verwendung von TNF- α zeigten die behandelten Melanomlinien nach viertägiger Inkubation eine nur leicht erhöhte Expression von MICA und teilweise von ULBP2 im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abbildung 4-7B). Eine biologische Bedeutung dieser gering gesteigerten Expression ist jedoch fraglich und wurde nicht untersucht.

Wurden die Zellen hingegen für den gleichen Zeitraum mit IFN- γ inkubiert, wiesen nicht nur die vier ausgewählten Melanomlinien Mel 249, UKRV-Mel 2, Ma-Mel 86a/86b eine reduzierte Expression der NKG2D Liganden auf. Auch alle weiteren daraufhin untersuchten Melanomlinien, Mel 592, Ma-Mel 48c und Ma-Mel 61h, verringerten die MICA und teilweise

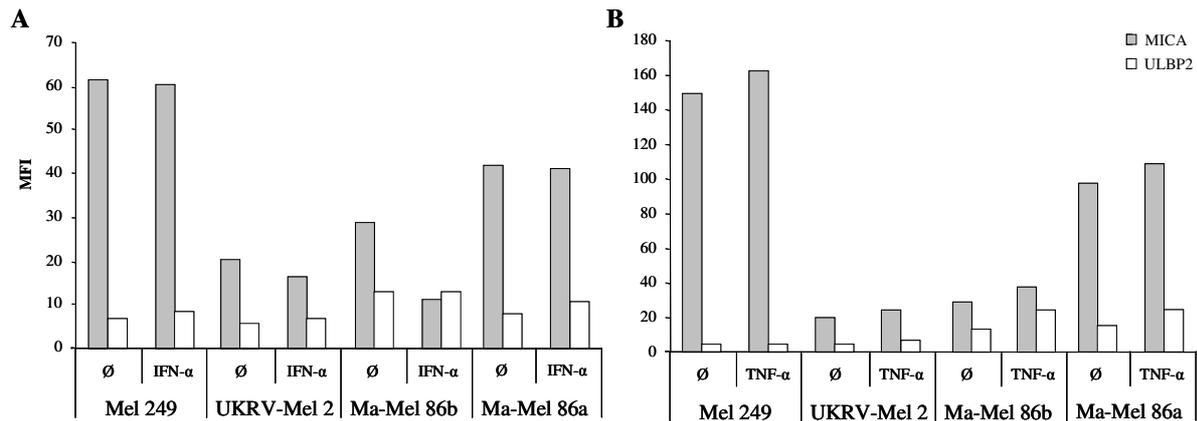


Abbildung 4-7. Einfluss von Zytokinen auf das Oberflächenexpressionsprofil der NKG2D Liganden von Melanomzellen

Drei HLA Klasse I-negative (Mel 249, UKRV-Mel 2, Ma-Mel 86b) und eine HLA Klasse I-positive (Ma-Mel 86a) Melanomlinie wurden für 96 h mit 1000 IU/ml IFN- α (A) bzw. 50 ng/ml TNF- α (B) inkubiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Melanomzellen eingesetzt. Die Anzahl Zytokin-behandelter und -unbehandelter Zellen war zum Zeitpunkt der Zellernte vergleichbar. Die Analyse der Oberflächenexpression von MICA bzw. ULBP2 erfolgte durch Markierung der Zellen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gefolgt von der Färbung mit dem sekundären PE-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper. Die Analyse der markierten Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie, wobei die Werte als mittlere Intensität der Fluoreszenz (MFI) dargestellt sind. Es ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei (IFN- α) bzw. drei (TNF- α) unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen gezeigt.

auch die ULBP2 Präsentation auf ihrer Oberfläche (Abbildung 4-8). Während Abbildung 4-8A das Resultat eines einzelnen Versuchs zeigt, ist in Abbildung 4-8B die gemittelte Expression des MFI von mehreren unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dargestellt (siehe auch Legende zu Abbildung 4-8). Dabei ist anzumerken, dass zwischen den einzelnen Versuchen die Intensität der Fluoreszenz aus noch nicht ermittelten Gründen schwankte, obwohl die Experimente nach einem streng standardisierten Protokoll durchgeführt wurden. Diese Schwankungen sind auch der Grund, weshalb im Falle von Linien wie Ma-Mel 86a, Ma-Mel 61h (für MICA und ULBP2), Mel 592 und UKRV-Mel 2 (für ULBP2) kein signifikanter Unterschied in der Oberflächenexpression zwischen IFN- γ -behandelten und -unbehandelten Zellen vorlag. Betrachtete man allerdings jeden einzelnen Versuch für sich, so waren die MFI-Werte der IFN- γ -behandelten Zellen immer deutlich niedriger als die der unbehandelten (nicht gezeigt).

Im Gegensatz zur reduzierten Expression der NKG2D Liganden, wurde das HLA Klasse II Molekül HLA-DR nach Inkubation mit IFN- γ , wie bereits in der Literatur beschrieben, verstärkt exprimiert (Basham & Merigan, 1983). Eine Ausnahme ist hierbei die HLA-DR Expression auf den Linien Ma-Mel 48c und Ma-Mel 61h. Die Ursache dafür konnte noch nicht eindeutig bestimmt werden.

Da von den drei untersuchten Zytokinen nur IFN- γ einen deutlichen Einfluss auf die Liganden des NKG2D Rezeptors ausübte, lag im Folgenden der Fokus auf diesem Zytokin.

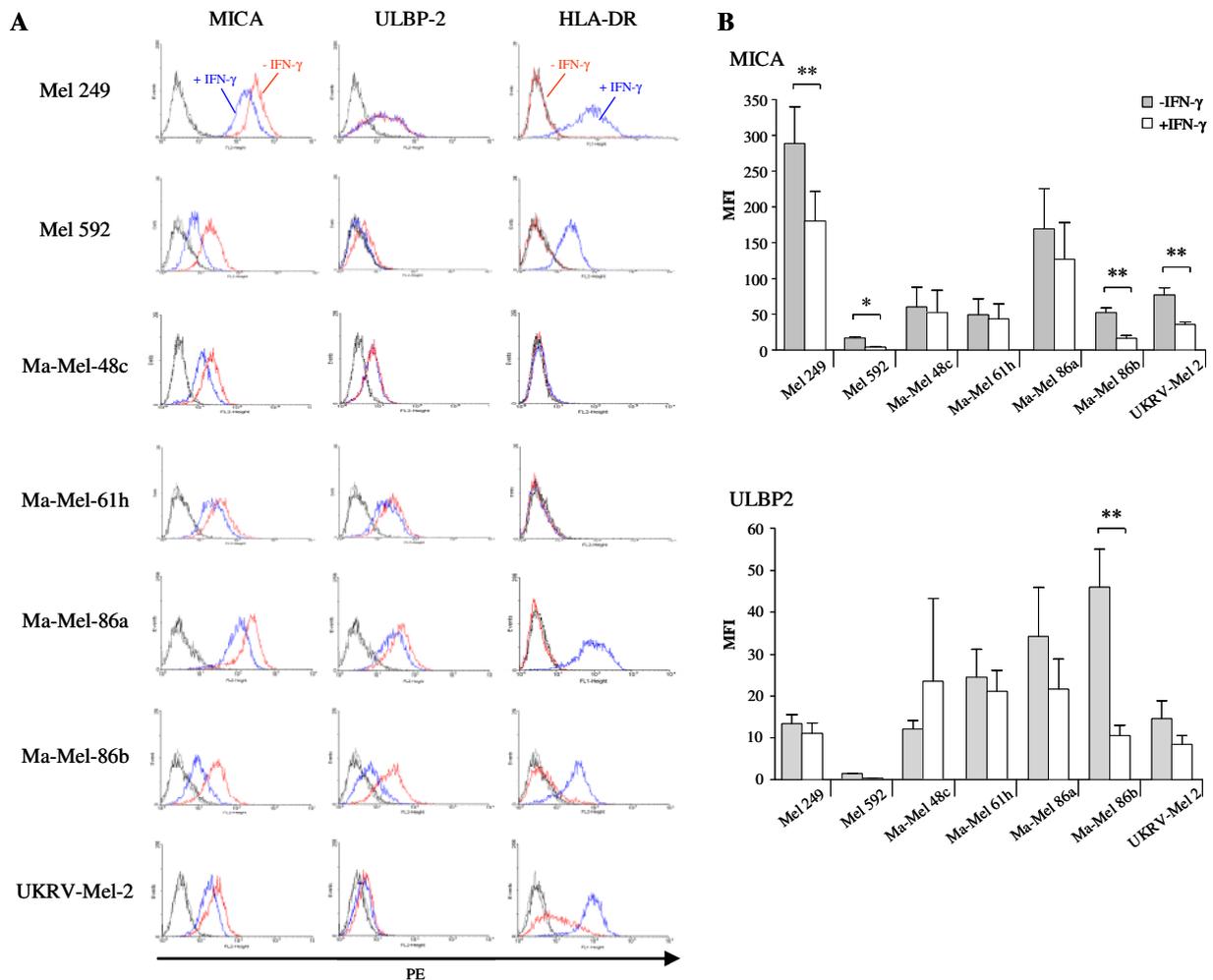


Abbildung 4-8. Einfluss von IFN- γ auf das Oberflächenexpressionsprofil der NKG2D Liganden von Melanomzellen

Fünf HLA Klasse I-negative (Mel 249, Mel 592, Ma-Mel 61h, Ma-Mel 86b, UKRV-Mel 2) und zwei HLA Klasse I-positive (Ma-Mel 48c und Ma-Mel 86a) Melanomlinien wurden für die Dauer von 96 h mit IFN- γ inkubiert. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Melanomzellen eingesetzt. Die Anzahl Zytokin-behandelter und -unbehandelter Zellen war zum Zeitpunkt der Zellernte vergleichbar. Anschließend erfolgte die Analyse der Oberflächenexpression bestimmter Moleküle durch Markierung mit den monoklonalen Antikörpern gegen MICA, ULBP2 und HLA-DR-PE. Für MICA und ULBP2 wurde als sekundärer Antikörper der PE-gekoppelte Ziege anti-Maus Antikörper verwendet. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACSCalibur). (A) Es ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei (Mel 592, Ma-Mel 48c, Ma-Mel 61h und Ma-Mel 86a) bzw. neun (restliche Melanomlinien) unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen als Histogramm dargestellt. Auf der x-Achse ist die Fluoreszenz (PE), auf der y-Achse die Anzahl der Ereignisse (Events) angegeben. Die grauen Linien zeigen die unspezifischen Hintergrundfärbungen durch den sekundären Antikörper des jeweiligen Ansatzes (+/- IFN- γ) an. Die rote Linie stellt die Färbung von unbehandelten, die blaue Linien von IFN- γ -behandelten Melanomzellen dar. (B) Der gemittelte MFI von mindestens drei (Mel 592, Ma-Mel 48c, Ma-Mel 61h und Ma-Mel 86a) bzw. neun (restliche Melanomlinien) unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ist angegeben. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

4.2.1 Charakterisierung der IFN- γ -vermittelten Reduktion der NKG2D Liganden

Es wurde zunächst analysiert, von welchen Faktoren die verminderte NKG2D Ligandexpression auf der Oberfläche der Melanomzellen nach IFN- γ Behandlung abhängig ist.

4.2.1.1 Einfluss der IFN- γ Konzentration auf die Oberflächenexpression der NKG2D Liganden

Ein Faktor, der die Oberflächenexpression beeinflussen kann, ist die Konzentration des eingesetzten Zytokins. Um dies zu überprüfen, wurden Zellen der Linie Ma-Mel 86b, die mit einer besonders starken MICA und ULBP2 Herabregulation auf die Behandlung mit IFN- γ reagierten, für jeweils vier Tage in Gegenwart unterschiedlicher Zytokinkonzentrationen inkubiert. Dabei ist deutlich zu sehen, dass sich mit steigender Menge an IFN- γ die Oberflächenexpression der NKG2D Liganden auf Ma-Mel 86b Zellen verringert (Abbildung 4-9). Die stärkste Reduktion konnte bei einer Konzentration von 200 U/ml festgestellt werden, während durch eine höhere Konzentration an IFN- γ keine weitere Reduktion der NKG2D Liganden erreicht wurde (nicht gezeigt).

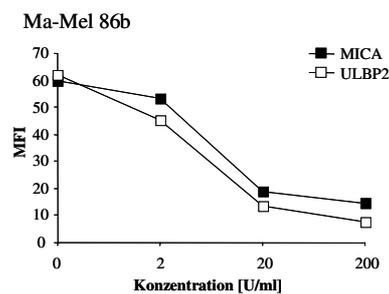


Abbildung 4-9. Einfluss der IFN- γ Konzentration auf die Oberflächenexpression der NKG2D Liganden

Zellen der Linie Ma-Mel 86b wurden über einen Zeitraum von 96 h mit unterschiedlichen Konzentrationen (2, 20, 200 U/ml) an IFN- γ inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse der Oberflächenexpression einzelner NKG2D Liganden durch Markierung mit den monoklonalen Antikörpern gegen MICA bzw. ULBP2 und nachfolgender Färbung mit dem sekundären PE-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper. Die Oberflächenexpression wurde mittels Durchflusszytometrie (FACSCalibur) festgestellt, wobei die mittlere Intensität der Fluoreszenz (MFI) gezeigt ist. Es ist ein repräsentativer Versuch von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dargestellt.

4.2.1.2 Einfluss der Inkubationsdauer mit IFN- γ auf die Oberflächenexpression der NKG2D Liganden

Um den Effekt, den IFN- γ auf die Melanomzellen ausübt, in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit IFN- γ zu untersuchen, wurden die Linien Mel 249 und Ma-Mel 86b herangezogen. Diese wurden zunächst über verschiedene Zeiträume mit IFN- γ inkubiert und zu den entsprechenden Zeitpunkten auf die Oberflächenexpression der NKG2D Liganden hin analysiert.

Dabei wurde das Augenmerk auf die Liganden MICA und ULBP2 gelegt (Abbildung 4-10A). Zunächst konnte ein leichter Anstieg in der Expression innerhalb der ersten 8-12 h für Ma-Mel 86b bzw. 12-24 h für Mel 249 festgestellt werden, wobei diese erhöhte Expression für Ma-Mel 86b im Allgemeinen nicht so stark ausgeprägt war, wie in Abbildung 4-10A gezeigt. Im Anschluss daran erfolgte eine Verringerung der Expression, die bis zum Ende des Versuchs andauerte. Anzumerken ist, dass der Endzeitpunkt dieses Versuchs (48 h) zumindest für MICA nicht der Zeitpunkt der maximalen Reduktion darstellte. Dieser wurde für MICA erst nach 96 h erreicht (Abbildung 4-10B).

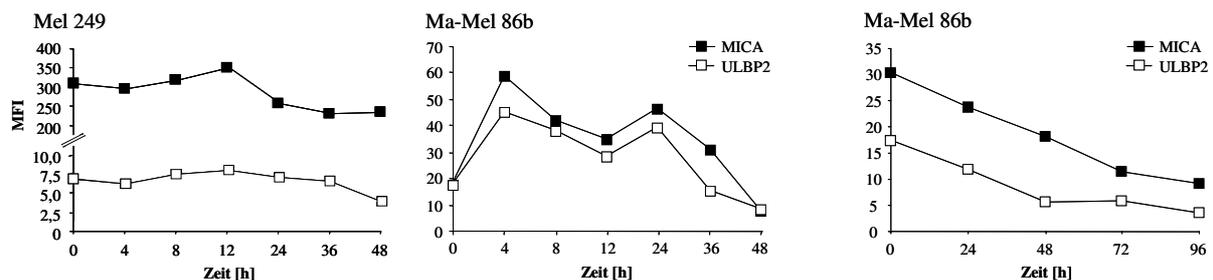


Abbildung 4-10. Einfluss der Zeit auf die IFN- γ -vermittelten Veränderungen der Oberflächenexpression von NKG2D Liganden

Die Zellen der Linien Mel 249 und Ma-Mel 86b wurden für bestimmte Zeitintervalle mit 200 U/ml IFN- γ inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse der Oberflächenexpression einzelner NKG2D Liganden durch Markierung mit den monoklonalen Antikörpern gegen MICA bzw. ULBP2 und nachfolgender Färbung mit dem sekundären PE-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper. Die Oberflächenexpression wurde mittels Durchflusszytometrie (FACSCalibur) festgestellt, wobei die mittlere Intensität der Fluoreszenz (MFI) gezeigt ist. (A) Die Zeitintervalle in diesem Versuch waren 4, 8, 12, 24, 36 und 48 h. (B) Ma-Mel 86b wurde bis zu einer Dauer von 96 h mit 200 U/ml inkubiert, wobei die Zeitintervalle bei 24, 48, 72 und 96 h lagen. Es ist jeweils ein repräsentativer Versuch von mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dargestellt.

4.2.1.3 Vergleich der NKG2D Liganden-spezifische RNA- und Oberflächenexpression nach IFN- γ Behandlung

Um zu überprüfen, ob IFN- γ transkriptionell die Expression der NKG2D Liganden in Melanomzellen beeinflusst, wurde mittels quantitativer PCR (TaqMan[®]) die Liganden-spezifische RNA Menge von IFN- γ -behandelten und -unbehandelten Melanomzellen Mel 249, Ma-Mel 86a/86b und UKRV-Mel 2 verglichen. Der Fokus lag dabei auf MICA und ULBP2, da diese auf allen analysierten Linien vorhanden waren.

Im Vergleich zu unbehandelten Zellen zeigte lediglich die Melanomlinie Ma-Mel 86b reproduzierbar verringerte Liganden-spezifische RNA Werte nach viertägiger Behandlung mit IFN- γ (Abbildung 4-11). Die drei weiteren in diesem Zusammenhang eingehend studierten Linien, Mel 249, Ma-Mel 86a und UKRV-Mel 2, wiesen hingegen keine eindeutig verminderte RNA Expression von MICA und ULBP2 nach IFN- γ Behandlung auf.

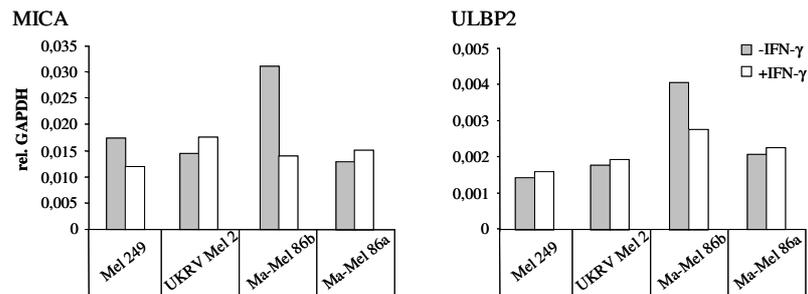


Abbildung 4-11. RNA Expressionsprofile von IFN- γ -behandelten und -unbehandelten Melanomzellen

Die vier Melanomlinien Mel 249, UKRV Mel 2 und Ma-Mel 86a/86b wurden mit 200 U/ml IFN- γ für eine Dauer von 96 h inkubiert und anschließend auf das Expressionsprofil von MICA und ULBP2 untersucht. Dazu wurden die Zellen pelletiert und aus dem Pellet wurde die gesamte RNA isoliert. Die daraus hergestellte cDNA wurde für die quantitative Expressionsanalyse mittels TaqMan[®] RT-PCR verwendet. Die Expressionswerte beider Liganden wurden auf die endogene Kontrolle GAPDH normalisiert (rel. GAPDH). Die abgebildeten Ergebnisse stellen einen repräsentativen Versuch von mindestens vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar.

Um festzustellen, ob die RNA Expression auch zu früheren Zeitpunkten tatsächlich nicht mit der Proteinexpression korrelierte, wurden Mel 249 und Ma-Mel 86b in einem Zeitverlauf-Versuch detailliert auf den am stärksten exprimierten Liganden MICA untersucht. Hierfür wurden die beiden Melanomlinien für bestimmte Zeitintervalle mit IFN- γ inkubiert. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde ein Teil der Zellen für MICA-spezifische Oberflächenfärbungen verwendet, während der andere Teil pelletiert wurde, um daraus RNA zu isolieren und für die quantitative RT-PCR einzusetzen.

In Abbildung 4-12 ist deutlich zu erkennen, dass der Verlauf des MICA RNA Expressionsprofils nicht mit dem der MICA Oberflächenexpression korreliert. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen fällt der MICA-spezifische RNA Gehalt in beiden Linien innerhalb der ersten 8 h nach IFN- γ Zugabe ab, steigt kurz darauf an, um nach etwa 24 h wieder abzusinken. Im Gegensatz dazu verstärkt sich die Proteinexpression anfangs nur kurzfristig und auch lediglich geringfügig, um spätestens nach 12stündiger Inkubationsdauer mit IFN- γ eindeutig abzufallen.

4.2.1.4 Freisetzung der NKG2D Liganden

Als mögliche Ursache für die Unterschiede im Verlauf des Expressionsprofils von RNA und Protein wurde die Freisetzung der Liganden von der Oberfläche der Melanomzellen in Betracht gezogen. Dieses als 'Shedding' bezeichnete Phänomen wurde für die NKG2D Liganden bereits vielfach in der Literatur beschrieben (Groh et al., 2002; Song et al., 2006). Es wurde mittels MICA und ULBP2 ELISA untersucht, ob die vier ausgewählten Melanomlinien in Abhängigkeit von IFN- γ vermehrt NKG2D Liganden von ihrer Oberfläche freisetzen. Dazu wurden die Melanomzellen wiederum über einen Zeitraum von 96 h mit 200 U/ml IFN- γ be-

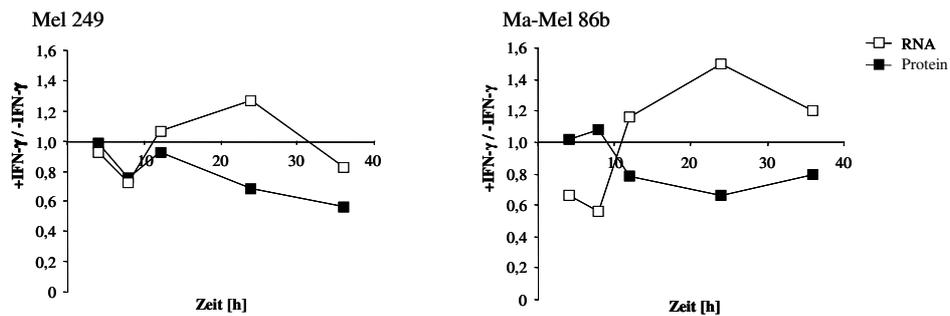


Abbildung 4-12. Vergleich der MICA-spezifischen RNA- und Proteinexpressionsprofile von IFN- γ -behandelten und -unbehandelten Melanomzellen

Mel 249 und Ma-Mel 86b wurden mit 200 U/ml IFN- γ für einen Zeitraum von 4, 8, 12, 24 und 36 h inkubiert. Im Anschluss wurde ein Teil der Zellen pelletiert und aus dem Pellet wurde die gesamte RNA isoliert. Die daraus hergestellte cDNA wurde für die quantitative Analyse mittels TaqMan[®] RT-PCR verwendet. Die erhaltenen Expressionswerte für MICA (2^{-C_t}) wurden zunächst auf die endogene Kontrolle GAPDH normalisiert (rel. GAPDH). Ausgehend von den normalisierten Expressionswerten wurde der Quotient von IFN- γ -behandelten und IFN- γ -unbehandelten Zellen errechnet (+IFN- γ / -IFN- γ). Der nicht pelletierte Teil der Zellen wurde zur Analyse der Oberflächenexpression von MICA verwendet. Dazu wurden die Zellen zunächst mit dem monoklonalen Antikörper gegen MICA markiert, dann mit dem sekundären PE-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper gefärbt. Die Oberflächenexpression wurde mittels Durchflusszytometrie (FACSCalibur) festgestellt. Auch hierbei wurde der Quotient der mittleren Intensität der Fluoreszenz (MFI) von IFN- γ -behandelten zu -unbehandelten Zellen gebildet. Die jeweiligen Quotienten aus TaqMan[®] RT-PCR (rel. GAPDH), sowie aus der FACS-Analyse (MFI) sind dargestellt. Die abgebildeten Ergebnisse stellen einen repräsentativen Versuch von mindestens zwei unabhängigen Versuchen dar.

handelt. Im Anschluss wurde der Zellkulturüberstand zur Bestimmung von freiem MICA (sMICA) bzw. ULBP2 (sULBP2) herangezogen. Die Menge an freigesetzten Proteinen wurde auf die Anzahl der in diesem Versuch eingesetzten Zellen bezogen. Dabei wurde deutlich, dass sMICA und sULBP2 nur in sehr geringen Mengen detektierbar waren (Abbildung 4-13). Die durch den ELISA festgestellte Konzentration lag im Bereich der unteren Detektionsgrenze von 10 pg/ml, was die teilweise hohe Standardabweichung erklärt. Wurden die Melanom-

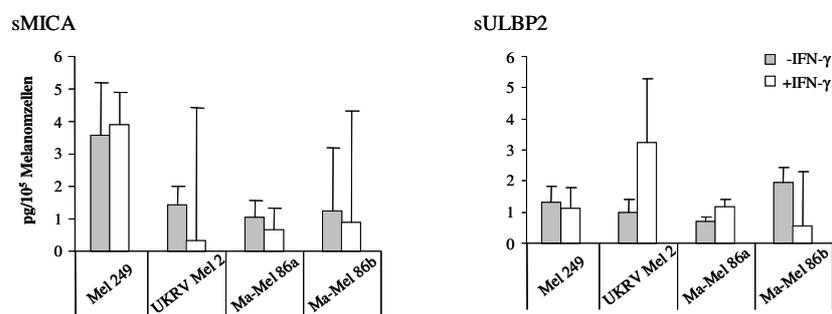


Abbildung 4-13. Nachweis von freigesetzten MICA und ULBP2 Molekülen

Die vier Melanomlinien Mel 249, UKRV Mel 2 und Ma-Mel 86a/86b wurden für einen Zeitraum von 96 h mit einer Konzentration von 200 U/ml IFN- γ inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die Bestimmung von freigesetztem MICA und ULBP2 im ELISA eingesetzt. Die Konzentration an frei vorliegenden Proteinen wurde auf die Anzahl der eingesetzten Melanomzellen normalisiert, so dass der Gehalt an frei vorliegenden Proteinen (A) bzw. sULBP2 (B) in Pikogramm pro 10^5 Melanomzellen dargestellt ist. Es ist ein repräsentativer von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dargestellt

zellen mit IFN- γ behandelt, so wurden die Liganden nicht vermehrt in das umgebende Medium abgegeben.

4.2.1.5 Die Rolle von STAT1 in der Regulation der IFN- γ -abhängigen Expression der NKG2D Liganden

Es wurde analysiert, inwiefern IFN- γ die Expression der Gene der NKG2D Liganden durch Aktivierung der Interferon-induzierten STAT1 Signaltransduktionskaskade beeinflussen kann. IFN- γ initiiert diese Kaskade durch Bindung an den IFN- γ Rezeptor, der daraufhin oligomerisiert. Infolgedessen kommt es zur Aktivierung der Janus-Kinasen (JAK) 1 und 2. Diese ermöglichen die Phosphorylierung des IFN- γ Rezeptor 1 (IFNGR1), wodurch STAT1 binden kann. Nach dieser Interaktion wird STAT1 ebenfalls phosphoryliert und dimerisiert (Greenlund et al., 1995). Als Dimer kann STAT1 nun in den Nukleus vordringen, an IFN- γ -abhängige Elemente (engl: IFN response elements - IRE) binden und dadurch die Transkription spezifischer Gene beeinflussen.

Daher wurde analysiert, ob die durch IFN- γ vermittelte Reduktion der Oberflächenexpression der NKG2D Liganden nach mehrtätiger Zytokininkubation abhängig von STAT1 ist. Aufgrund von Problemen bei der siRNA Elektroporation von Ma-Mel-86b Zellen wurden für diesen Versuch die Melanomlinien Mel 249 und UKRV-Mel 2 eingesetzt. Zur Blockade der STAT1 Expression wurden die Zellen mit STAT1-spezifischer siRNA bzw. zum Vergleich mit unspezifischer siRNA (Kontroll siRNA) elektroporiert. Einen Tag nach der Elektroporation wurden die Zellen mit IFN- γ behandelt bzw. ohne IFN- γ für drei bis vier Tage kultiviert. Zunächst wurde die Qualität der Blockade der STAT1 Expression mittels RT-PCR festgestellt. Es wurde überprüft, ob die STAT1 siRNA eine ausreichende Reduktion des STAT1 RNA Gehalts in den Tumorzellen erzielen konnte. Melanomzellen, die mit STAT1 siRNA elektroporiert wurden, zeigten eine deutlich geringere STAT1 RNA Expression als Melanomzellen, die mit der Kontroll siRNA elektroporiert wurden (Abbildung 4-14A). Allerdings induzierte IFN- γ die Expression von STAT1, so dass die Menge an STAT1 RNA in IFN- γ -behandelten und -unbehandelten Zellen nicht identisch war. Als Kontrolle wurde die Expression von GAPDH in den Zellen bestimmt.

Anhand der parallel durchgeführten Oberflächenfärbung gegen die NKG2D Liganden, konnte je nach Zelllinie ein mehr oder wenig deutlicher Einfluss der STAT1 siRNA auf Präsentation von MICA und ULBP2 erkannt werden. Die unspezifische Kontroll siRNA hatte keinen Effekt auf die IFN- γ -abhängigen Regulation der NKG2D Ligandenexpression (Abbildung 4-14B). In UKRV-Mel 2 Zellen konnte die spezifische STAT1 siRNA Behandlung die Re-

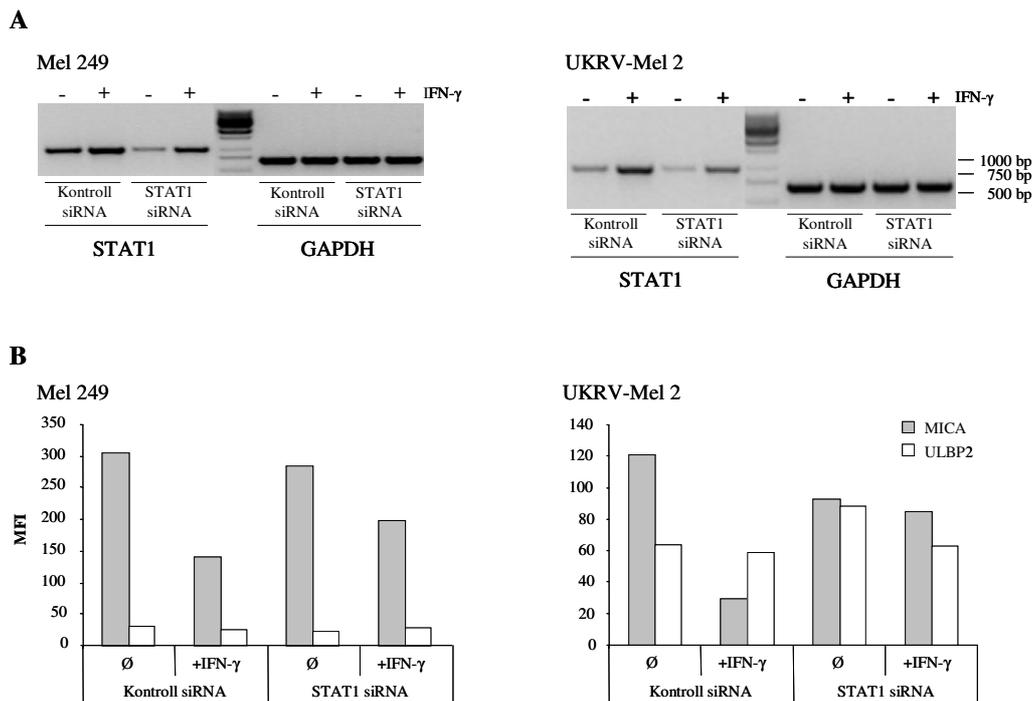


Abbildung 4-14. Herabregulation der STAT1 Expression mittels spezifischer siRNA

Mel 249 und UKRV-Mel 2 wurden mit STAT1-spezifischer siRNA bzw. unspezifischer Kontroll siRNA elektroporiert. Die elektroporierten Zellen wurden ausgesät und erhielten am folgenden Tag 200 U/ml IFN- γ bzw. wurden ohne IFN- γ für drei weitere Tage inkubiert. (A) Nach dreitägiger Inkubation wurde ein Teil der Zellen pelletiert und aus dem Pellet wurde die gesamte RNA isoliert. Diese RNA wurde zur Herstellung von cDNA verwendet, die wiederum in der RT-PCR eingesetzt wurde, um die Expression von STAT1 und GAPDH (endogene Kontrolle) zu untersuchen. (B) Der verbleibende Anteil an nicht pelletierten Zellen wurde zur Analyse der Oberflächenexpression von MICA und ULBP2 verwendet. Dazu wurden diese zunächst mit den monoklonalen Antikörpern gegen MICA bzw. ULBP2 markiert, dann mit dem sekundären PE-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper gefärbt. Die Oberflächenexpression wurde als mittlere Intensität der Fluoreszenz (MFI) mittels Durchflusszytometrie (FACSCalibur) festgestellt. Es ist ein repräsentativer von vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dargestellt.

duktion von MICA auf der Oberfläche nach IFN- γ Inkubation nahezu aufheben. Bei Mel 249 hingegen war dies nur bedingt zu sehen. Die Blockade von STAT1 konnte den IFN- γ Effekt in Mel 249 Zellen nicht gänzlich aufheben. Dies war möglicherweise auf eine ineffizientere Herabregulation der STAT1 Expression in diesen Zellen zurückzuführen, die auch durch weitere Modifikationen des Protokolls nicht verbessert werden konnte.

Des Weiteren fiel auf, dass der reduzierte RNA Gehalt von STAT1 offenbar auch ohne zusätzliche Einwirkung von IFN- γ bereits einen Effekt auf die Expression von MICA hatte. Dies zeigte sich in drei von insgesamt vier durchgeführten Versuchen. Im Vergleich zu Kontroll siRNA behandelten Zellen konnte insbesondere für UKRV-Mel 2 eine verminderte Oberflächenexpression von MICA nach Elektroporation mit STAT1 siRNA beobachtet werden.

4.2.1.6 Expressionsprofile weiterer aktivierender Liganden

Es sollte nun analysiert werden, ob die Behandlung mit IFN- γ auch die Oberflächenexpression der aktivierenden Liganden des NK-Zell-Rezeptors DNAM-1 (CD226) auf den Melanomzellen beeinflusst. In Abbildung 4-15 ist zu erkennen, dass IFN- γ die DNAM-1 Liganden, Nectin-2 und PVR, auf der Oberfläche nicht herabregulierte. Während das Protein Nectin-2 nahezu unverändert auf Melanomzellen exprimiert wurde, konnte PVR nach Zytokinbehandlung sogar vermehrt detektiert werden. Folglich ist die Reduktion der Oberflächenexpression der NKG2D Liganden nach IFN- γ Behandlung ein spezifischer Effekt, der nicht alle Liganden aktivierender NK-Rezeptoren betrifft.

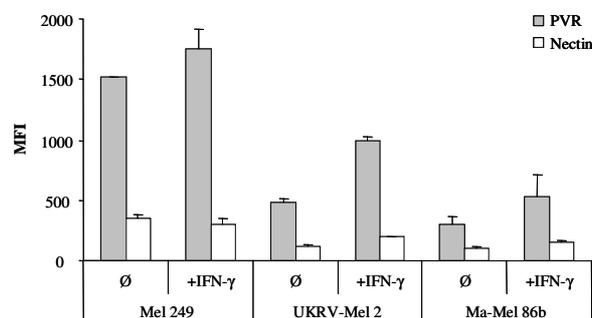


Abbildung 4-15. Expressionsanalyse weiterer NK-aktivierender Liganden auf Melanomzellen

Mel 249, UKRV-Mel 2 und Ma-Mel 86b wurden über einen Zeitraum von 96 h mit 200 U/ml IFN- γ oder in Abwesenheit des Zytokins inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit anti-PVR- bzw. anti-Nectin-2-spezifischen Antikörpern markiert und dann mit dem sekundären PE-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper gefärbt. Die Oberflächenexpression wurde mittels Durchflusszytometrie festgestellt (FACSCalibur), wobei die mittlere Intensität der Fluoreszenz (MFI) dargestellt ist. Es ist der gemittelte MFI von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dargestellt.

4.2.2 Erkennung von Melanomzellen durch Natürliche Killerzellen in Abhängigkeit von IFN- γ

4.2.2.1 Erkennung der Melanomzellen durch NKL-Zellen

Um festzustellen, ob die Reduktion der Oberflächenmoleküle auch eine funktionale Bedeutung hat, wurde die Lyse von IFN- γ -behandelten und -unbehandelten Melanomzellen durch die NK-Zelllinie NKL untersucht. Es wurde zunächst diese Linie verwendet, da sie sich, wie bereits erwähnt, einerseits durch eine geringe Anzahl an inhibierenden Rezeptoren auszeichnet, aber andererseits vor allem über den NKG2D Rezeptor aktiviert wird (Robertson et al., 1996b). Zudem sind nur geringe Mengen von NKp30, NKp44 und NKp46 auf der Oberfläche vorhanden (Boissel et al., 2006).

Für diesen Versuch wurden die HLA Klasse I-negativen Melanomzelllinien Mel 249, UKRV-Mel 2 und Ma-Mel 86b verwendet. Unbehandelte Mel 249 Zellen wurden zu rund 42% von den NKL-Zellen lysiert, während sich die Lyse von IFN- γ -behandelten Mel 249 Zellen um etwa die Hälfte auf ca. 20% reduzierte (Abbildung 4-16A). Ähnlich war auch die Situation für Ma-Mel 86b. Hierbei wurden knapp 30% aller Melanomzellen durch NKL-Zellen lysiert. Wurden Ma-Mel 86b Zellen allerdings mit IFN- γ inkubiert, so reduzierte sich die Lyse um rund zwei Drittel, auf nur noch 10%. Die Melanomzelllinie UKRV-Mel 2 wurde kaum durch NKL-Zellen lysiert, dennoch war auch die Lyse IFN- γ -behandelter UKRV-Mel 2 Zellen im Vergleich zu nicht behandelten Zellen reduziert. Die Resultate dieser Versuche korrelierten sehr gut mit der Oberflächenexpression von MICA, die parallel mit Zellen aus denselben Inkubationsansätzen untersucht wurde (Abbildung 4-16B). Diese reduzierte Oberflächenexpression nach IFN- γ Behandlung spiegelte sich in der verringerten Lyse von Melanomzellen wieder.

Bemerkenswert ist allerdings die Tatsache, dass UKRV-Mel 2 Zellen im Vergleich zu Ma-Mel 86b schlechter lysiert wurden, obwohl sie eine höhere MICA Expression auf der Oberfläche aufwiesen. Die genaue Ursache dafür ist unklar. Es könnte aber eine defekte Struktur der NKG2D Liganden, ein HLA-unabhängiger Inhibitionsmechanismus oder eine geringe Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Tumorzellen in Betracht gezogen werden.

Um eindeutig zu bestätigen, dass tatsächlich die verminderte Oberflächenexpression der NKG2D Liganden auf IFN- γ -behandelten Melanomzellen für die eingeschränkte Aktivierung der NKL-Zellen verantwortlich war, wurden Antikörper-vermittelte Blockierungsversuche von Rezeptor und Liganden durchgeführt. Es wurde zunächst der NKG2D Rezeptor mit monoklonalen Antikörpern (anti-NKG2D) blockiert, um die Interaktion zwischen NKG2D und seinen Liganden zu verhindern. Es ist deutlich zu erkennen, dass in Gegenwart des anti-NKG2D Antikörpers die Lyse beider Melanomzelllinien stark reduziert war. Die Effizienz der Lyse von Melanomzellen in Gegenwart des blockierenden NKG2D Antikörpers ist vergleichbar mit der Lyse von IFN- γ -behandelten Melanomzellen. Dies bedeutet, dass die Behandlung mit IFN- γ die NKG2D Liganden so weit herabreguliert, dass sehr wahrscheinlich eine Stimulierung der NKL-Zellen über NKG2D nicht mehr erfolgen kann. Zudem konnte die Lyse der IFN- γ -behandelten Melanomzellen durch Blockierung des NKG2D Rezeptors nicht weiter vermindert werden.

Die Blockierung von MICA hatte unterschiedliche Auswirkungen auf die Lyse der untersuchten Zelllinien. Indem MICA auf Ma-Mel 86b Zellen blockiert wurde, konnte eine Reduktion der Lyse erreicht werden, die vergleichbar zur Blockierung von NKG2D war. Dies ist bemer-

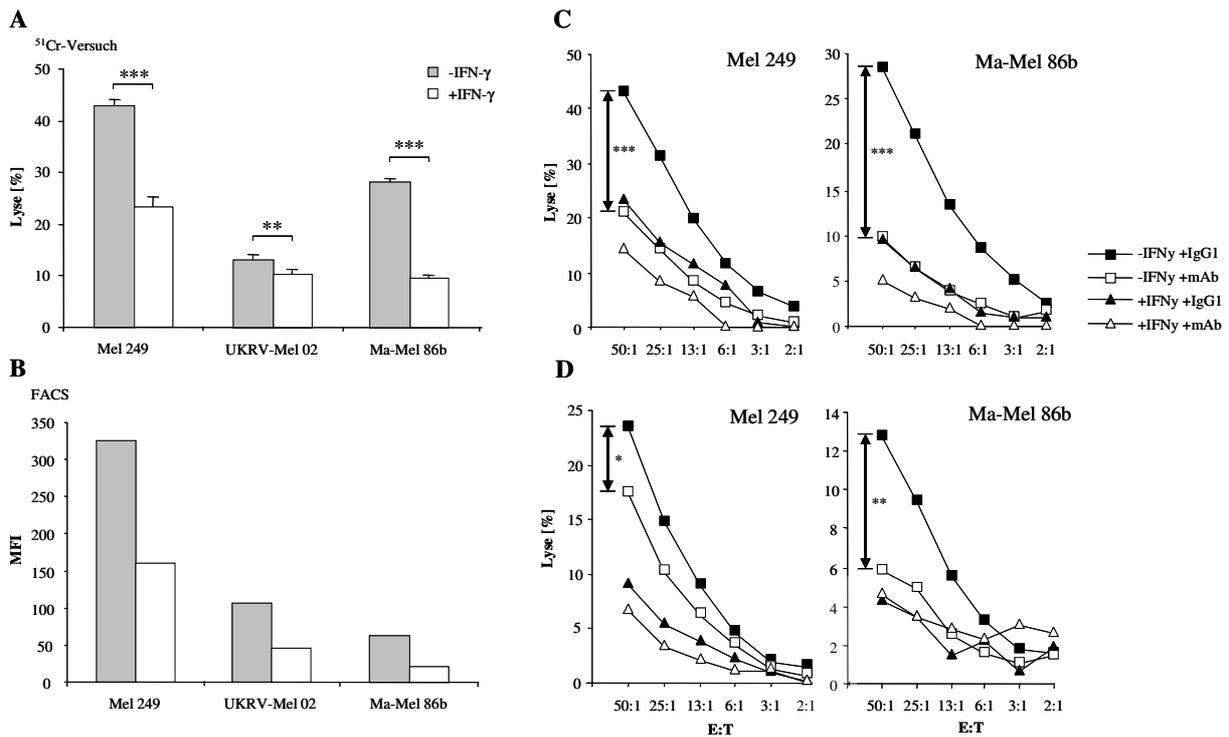


Abbildung 4-16. Erkennung von Melanomzellen durch die Natürliche Killerzelllinie NKL

Die drei HLA Klasse I-negativen Melanomzelllinien Mel 249, Ma-Mel 86b und UKRV-Mel 2 wurden auf ihre Fähigkeit NKL-Zellen zu aktivieren, untersucht. Die Stärke der Lyse wurde mit der Oberflächenkonzentration der NKG2D Liganden verglichen. Die Zellen wurden zunächst für 96 h mit 200 U/ml IFN- γ inkubiert oder blieben unbehandelt. (A, C, D) Melanomzellen wurden zur Untersuchung der Lyse durch NKL-Zellen mit 50 μ Ci $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ inkubiert. Nach Entfernung des freien ^{51}Cr wurden die Melanomzellen für eine Dauer von 4 h mit einem Überschuss an NKL-Zellen inkubiert. Der Prozentsatz der spezifischen Lyse wurde wie folgt errechnet: $[(\text{Freisetzung}_{\text{Experiment}} - \text{Freisetzung}_{\text{spontan}}) / (\text{Freisetzung}_{\text{maximal}} - \text{Freisetzung}_{\text{spontan}})] \times 100$. (A) Ein repräsentativer ^{51}Cr -Freisetzungsversuch von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ist dargestellt. Das Effektor-Target Verhältnis betrug 50:1. (B) Die Oberflächenexpression von MICA auf IFN- γ -behandelten bzw. -unbehandelten Zellen ist dargestellt. Die Melanomzellen wurden zunächst mit dem monoklonalen Antikörper gegen MICA markiert, dann mit dem sekundären PE-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper gefärbt. Die Oberflächenexpression wurde als mittlere Intensität der Fluoreszenz (MFI) mittels Durchflusszytometrie (FACS-Calibur) festgestellt. (C, D) Dargestellt ist die Lyse von IFN- γ behandelten und -unbehandelten Mel 249 und Ma-Mel 86b Zellen bei unterschiedlichen Effektor-Target Verhältnissen. (C) Es erfolgte die Blockierung des NKG2D Rezeptors mit dem monoklonalen Antikörper anti-NKG2D in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/10^7$ NKL-Zellen. Dazu wurden die NKL-Zellen vor der Ko-Inkubation mit den Melanomzellen für eine Dauer von 30 min und während der Ko-Inkubation mit diesem Antikörper inkubiert. (D) Die Blockierung von MICA fand mit dem monoklonalen anti-MICA Antikörper (10 $\mu\text{g}/10^6$ Melanomzellen) während der Inkubation mit ^{51}Cr statt. Zur Kontrolle unspezifischer Wechselwirkungen der blockierenden Antikörper wurde die Isotyp-Kontrolle IgG₁ in der gleichen Konzentration eingesetzt. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,0001$

kenswert, da Ma-Mel 86b Zellen große Mengen an ULBP2 auf der Oberfläche exprimieren (vgl. Abbildung 4-8). Dies führt zu der Annahme, dass MICA auf Ma-Mel 86b ein dominanter Ligand sein könnte. Im Gegensatz dazu konnte die Blockierung von MICA auf Mel 249 Zellen nicht die gleiche Wirkung erzielen wie die Blockade von NKG2D. Zwar kam es vermittelt durch den blockierenden MICA Antikörper zur Verringerung der Lyse, allerdings war diese Reduktion in Gegenwart eines blockierenden NKG2D Antikörpers deutlich stärker ausgeprägt.

4.2.2.2 Erkennung der Melanomzellen durch polyklonale NK-Zellen von gesunden Spendern

Da es sich bei NK-Zellen um Zellen einer Linie handelt, die nur ein bestimmtes Repertoire an blockierenden und aktivierenden Rezeptoren exprimiert, wurden im Folgenden die Lyse der Melanomzellen durch frisch isolierte polyklonale CD3⁻CD56⁺ NK-Zellen untersucht. Dadurch sollte festgestellt werden, ob polyklonale NK-Zellen eines gesunden Donors durch die verminderte NKG2D Ligandenexpression ebenso in ihrer Aktivität gegenüber den Melanomzellen beeinträchtigt werden, wie die NK-Zellen.

Es wurden aus den Buffy Coats von vier unterschiedlichen gesunden Spendern CD3⁻CD56⁺ NK-Zellen isoliert und über Nacht mit IL-2 inkubiert. Am folgenden Tag wurde auch hier mittels eines ⁵¹Cr-Freisetzungsversuchs festgestellt, inwiefern die Melanomzellen durch die polyklonalen NK-Zellen lysiert werden können (Abbildung 4-17). Zur Feststellung der maximalen Aktivität der NK-Zellen wurden K562 und BaF/3+MICA Zellen als Kontrollen eingesetzt. Während die Lyse von K562 Zellen über verschiedene aktivierende Signale vermittelt werden kann, zeigen BaF/3+ MICA Zellen die maximale, durch NKG2D-vermittelte Lyse an. Zudem kann anhand der BaF/3+MICA Zellen die Qualität der NKG2D Blockierung festgestellt werden. Alle vier Donoren reagierten dabei in etwa gleicher Weise auf diese Kontrollzelllinien. Während nach Blockierung des NKG2D Rezeptors BaF/3+MICA Zellen kaum noch lysiert werden konnten, zeigte diese Blockierung keinen Einfluss auf die Erkennung von K562. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass nach Unterbindung der Interaktion von MICA und NKG2D, BaF/3+MICA Zellen sehr wahrscheinlich keine weiteren aktivierenden Liganden auf ihrer Oberfläche aufweisen. Im Gegensatz dazu verfügen K562 Zellen über weitere aktivierende Moleküle, welche den Verlust des NKG2D Signals kompensieren konnten.

Bei der Erkennung der Melanomzellen Mel 249 und Ma-Mel 86b durch CD3⁻CD56⁺ NK-Zellen gab es große Unterschiede. Lediglich die polyklonalen NK-Zellen des Donors 692 wiesen eine verminderte Erkennung von IFN- γ -behandelten Melanomzellen auf. Jedoch scheint dieser Effekt in Mel 249 Zellen nicht auf eine Interaktion des NKG2D Rezeptors mit seinen Liganden zu basieren, da die Blockierung von NKG2D keinen Einfluss darauf nehmen konnte. Ein auf NKG2D-basierender Effekt trat allerdings bei der Melanomlinie Ma-Mel 86b auf. Mit IFN- γ -behandelte Melanomzellen waren weit weniger in der Lage die polyklonalen NK-Zellen des Donors 692 zu aktivieren. Nach Blockierung der NKG2D-Liganden Interaktion zwischen polyklonalen NK-Zellen und unbehandelten Melanomzellen reduzierte sich die Lyse ähnlich stark wie nach der Behandlung der Melanomzellen mit IFN- γ . Interessanterwei-

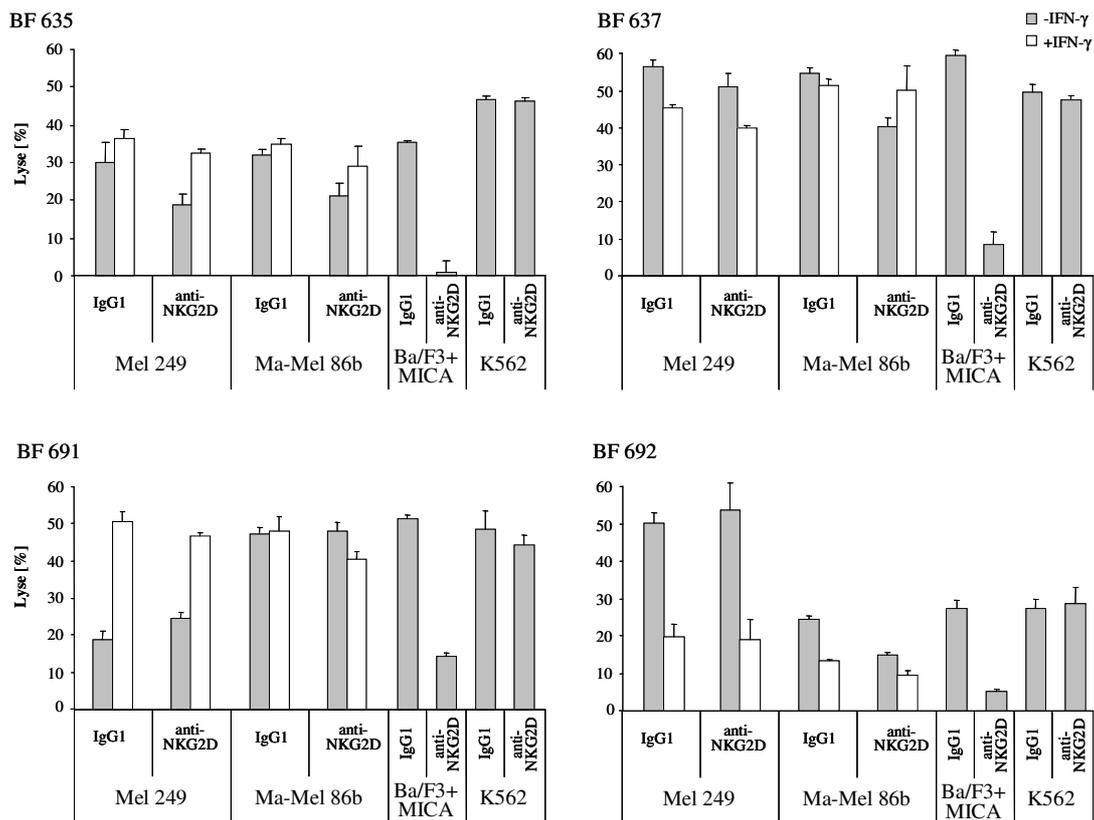


Abbildung 4-17. Erkennung von Melanomzellen durch polyklonale CD3⁺CD56⁺ NK-Zellen

Mel 249 und Ma-Mel 86b Zellen wurden für eine Dauer von 96 h mit 200 U/ml IFN- γ behandelt oder blieben unbehandelt. CD3⁺CD56⁺ NK-Zellen wurden aus Buffy Coats (BF) von gesunden Spendern isoliert und über Nacht mit 200 U/ml IL-2 aktiviert. Die Lyse der IFN- γ -behandelten und -unbehandelten Melanomzellen, sowie der Kontrollzellen Ba/F3+MICA (NKG2D-vermittelte Aktivierung von NK-Zellen) und K562 (Aktivierung von NK-Zellen über verschiedene Rezeptoren) wurde untersucht. Alle eingesetzten Zielzellen (Targets) wurden mit 50 μ Ci Na₂⁵¹CrO₄ inkubiert. Nach Entfernung des freien ⁵¹Cr wurden die Zellen für eine Dauer von 4 h mit einem Überschuss an CD3⁺CD56⁺ NK-Zellen inkubiert. Unmittelbar vor und auch während der Ko-Inkubation erfolgte die Blockierung des NKG2D Rezeptors mit 10 μ g des monoklonalen Antikörpers anti-NKG2D pro 10⁷ CD3⁺CD56⁺ NK-Zellen. Zur Kontrolle von unspezifischen Wechselwirkungen wurden die Zellen mit dem Isotyp-Antikörper (IgG₁) pro 10⁷ CD3⁺CD56⁺ NK-Zellen inkubiert. Das maximale dargestellte Effektor-Target Verhältnis betrug für BF635 10:1, BF637 30:1, BF691 64:1 und BF692 12:1. Der Prozentsatz der spezifischen Lyse wurde wie folgt errechnet: $[(\text{Freisetzung}_{\text{Experiment}} - \text{Freisetzung}_{\text{spontan}}) / (\text{Freisetzung}_{\text{maximal}} - \text{Freisetzung}_{\text{spontan}})] \times 100$.

se zeigten die NK-Zellen des Donors 691 sogar eine verstärkte Aktivität, wenn die Melanomzellen vorher mit IFN- γ behandelt waren.

Insgesamt scheinen die IL-2 aktivierten polyklonalen NK-Zellen weitaus weniger sensitiv gegenüber einer Herabregulation der Liganden zu sein als die NK-Zelllinie NKL.

4.3 Expression der NKG2D Liganden auf den Zellen verschiedener Tumorentitäten

Die Behandlung von Melanomzellen mit IFN- γ führt durch die verminderte Oberflächenexpression der NKG2D Liganden zu einer reduzierten Erkennung durch NKL-Zellen. Es sollte nun analysiert werden, ob dieser Effekt auch bei anderen Tumorzellen festzustellen ist. Aus diesem Grund wurden verschiedene Glioblastomzelllinien und weitere Zelllinien aus Kolon-, Chorion- und Zervixkarzinomen, sowie Leukämie-Zellen untersucht. Alle Zellen wurden dabei auf die gleiche Art und Weise behandelt wie zuvor die Melanomzellen.

4.3.1 Analyse der Oberflächenexpression der NKG2D Liganden auf Glioblastomzellen

Zunächst wurde das Expressionsprofil der NKG2D Liganden auf der Oberfläche von vier Glioblastomzelllinien analysiert. Das Glioblastom ist die meist verbreitete und aggressivste Form des Hirntumors. Zudem entstammen die Gliazellen, aus denen der Tumor hervorgeht, aus den gleichen ektodermalen Vorläuferzellen wie die Melanozyten.

Die verwendeten Linien wurden aus Tumoren von den drei Patienten Ma-Glio 4, Ma-Glio 5 und Ma-Glio 10 angelegt. Von Patient Ma-Glio 4 sind zwei Zelllinien dargestellt, welche dem Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen wurden (siehe Kapitel 3.1.1). Nach Färbung der Liganden von NKG2D durch monoklonale Antikörper konnte mittels der Durchflusszytometrie festgestellt werden, dass alle Linien die Proteine MICA und ULBP2 auf ihrer Oberfläche exprimierten (Abbildung 4-18). Im Gegensatz dazu wurde das Protein ULBP1 auf lediglich drei der vier untersuchten Glioblastomzelllinien detektiert, während die Expression von MICB und ULBP3 nicht eindeutig nachweisbar war. Nach 96stündiger Behandlung mit IFN- γ zeigten alle Glioblastomzelllinien eine verminderte Expression der NKG2D Liganden auf ihrer Oberfläche. Auch hier war dieser Effekt bei den Proteinen MICA und ULBP2 am deutlichsten ausgeprägt. Da diese Zellen auch in der Lage waren, die Liganden in Abhängigkeit von IFN- γ herab zu regulieren, sollte untersucht werden, ob diese verminderte Oberflächenexpression wie im Falle der Melanomzellen zeitabhängig ist (vgl. Abbildung 4-10). Dazu wurden Zellen von Ma-Glio 4a für bestimmte Zeitintervalle mit IFN- γ inkubiert. In Abbildung 4-19 ist zu sehen, dass auch auf den Glioblastomzellen nach einer Inkubationsdauer von etwa 12 h die MICA und ULBP2 Oberflächenexpression eindeutig absinkt. Es ist anzumerken, dass die maximale Reduktion der Oberflächenexpression bei IFN- γ Behandlung nach einem Zeitraum von 96 h erreicht war (nicht gezeigt).

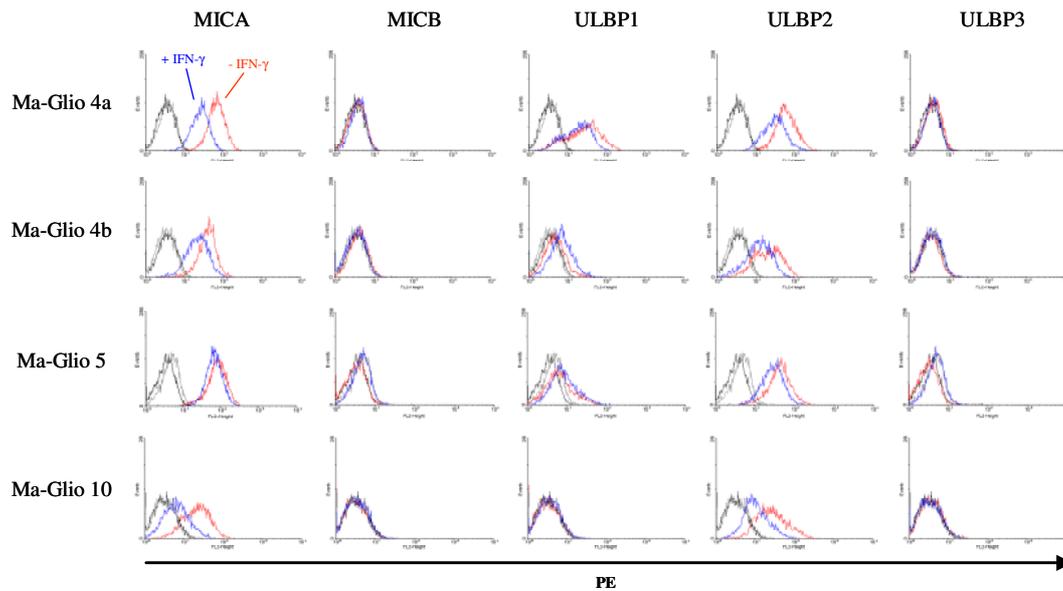


Abbildung 4-18. Oberflächenexpressionsprofile einzelner NKG2D Liganden auf Glioblastomzellen

Die Zellen von vier Glioblastomzelllinien, Ma-Glio 4a/4b, Ma-Glio 5 und Ma-Glio 10, wurden auf das Expressionsprofil der NKG2D Liganden nach Behandlung mit 200 U/ml IFN- γ für 96 h (blaue Linien) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (rote Linien) untersucht. Anschließend erfolgte die Detektion der Oberflächenexpression einzelner NKG2D Liganden durch Markierung mit monoklonalen Antikörpern und nachfolgender Färbung mit dem sekundären PE-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACSCalibur). Es ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen als Histogramm dargestellt. Auf der x-Achse ist die Intensität der Fluoreszenz (PE), auf der y-Achse die Anzahl der Ereignisse (Events) angegeben. Die grauen Linien zeigen die Hintergrundfärbung durch den sekundären Antikörper (+/- IFN- γ) an.

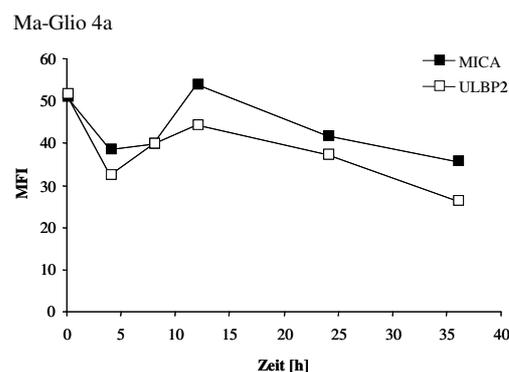


Abbildung 4-19. Oberflächenexpression der NKG2D Liganden auf Ma-Glio 4a Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit IFN- γ

Ma-Glio 4a Zellen wurden für die Zeitintervalle 4, 8, 12, 24 und 36 h mit 200 U/ml IFN- γ inkubiert. Im Anschluss wurde deren MICA und ULBP2 Oberflächenexpression im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen bestimmt. Dazu wurden die Zellen zunächst mit den monoklonalen Antikörpern spezifisch für MICA bzw. ULBP2 markiert, dann mit dem sekundären PE-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper gefärbt. Die Oberflächenexpression wurde mittels Durchflusszytometrie (FACSCalibur) festgestellt und ist als mittlere Intensität der Fluoreszenz (MFI) abgebildet. Der dargestellte Versuch stellt ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar.

4.3.2 Analyse der Oberflächenexpression der NKG2D Liganden auf weiteren Tumorzelllinien

Um zu untersuchen, ob die Herabregulation der NKG2D Liganden nach IFN- γ Behandlung ein allgemeines Charakteristikum von Tumorzellen darstellt, wurden verschiedene Zelllinien aus unterschiedlichen Tumorentitäten analysiert. Diese stammten im Einzelnen von Patienten mit Kolonkarzinom (RHO und HCT116), Zervixkarzinom (HeLa), Chorionkarzinom (Jeg3), und chronischer myeloider Leukämie (K562). Alle Zellen wurden dem Protokoll der Melanomzellen entsprechend für eine Dauer von ungefähr 96 h mit 200 U/ml IFN- γ inkubiert.

Die untersuchten Zelllinien wiesen unterschiedliche Expressionsprofile der Liganden auf. So waren HeLa Zellen durch die deutliche Expression von MICA und ULBP2, sowie geringe Mengen an MICB und ULBP1 charakterisiert, wobei ULBP3 nicht exprimiert zu sein schien (Abbildung 4-20). Auf den beiden Kolonkarzinomlinien wurde MICA am stärksten exprimiert, aber auch das Protein ULBP2 war in hoher Konzentration vorhanden. ULBP1 konnte nur auf HCT116 nachgewiesen werden. Die Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 wies im Allgemeinen nur niedrige Konzentrationen an NKG2D Liganden auf. K562 Zellen waren deutlich durch die Anwesenheit aller NKG2D Liganden charakterisiert, deren Expressionsstärke aus unbekanntem Gründen zwischen den einzelnen unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen stark schwankte. Nach Behandlung mit IFN- γ zeigte keine dieser Linien eine eindeutige Veränderung der Oberflächenexpression der NKG2D Liganden (Abbildung 4-20).

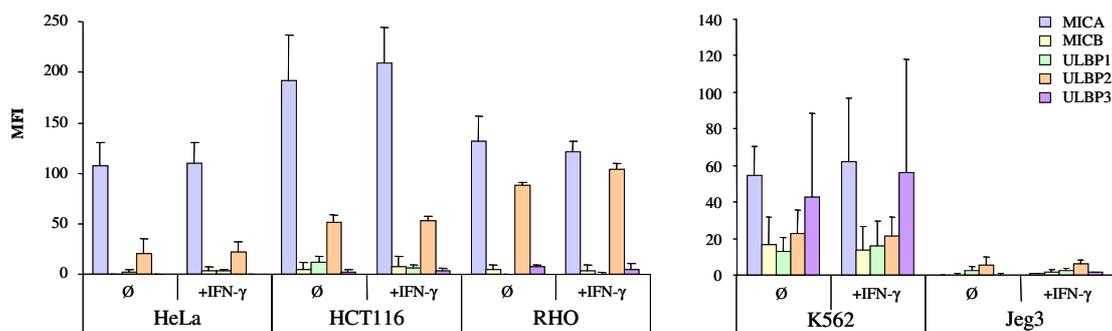


Abbildung 4-20. Oberflächenexpressionsprofile der NKG2D Liganden auf den Zellen unterschiedlicher Tumorentitäten

Fünf Tumorzelllinien, HeLa, HCT116, RHO, K562 und Jeg3, wurden auf das Expressionsprofil der NKG2D Liganden in Abhängigkeit von IFN- γ untersucht. Dazu wurden die Zellen über einen Zeitraum von 96 h mit 200 U/ml IFN- γ behandelt bzw. blieben unbehandelt. Im Anschluss wurden die Zellen zunächst mit den monoklonalen Antikörper spezifisch für MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 und ULBP3 markiert und dann mit dem sekundären PE-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper gefärbt. Die Oberflächenexpression wurde als mittlere Intensität der Fluoreszenz (MFI) mittels Durchflusszytometrie (FACSCalibur) festgestellt. Es ist der gemittelte MFI von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dargestellt.

5 Diskussion

Das maligne Melanom ist ein schwierig zu behandelnder und gleichzeitig überaus aggressiver Tumor, der durch eine stetig ansteigende Inzidenz weltweit charakterisiert ist. Obwohl das Melanom ein sehr immunogener Tumor ist, führten bislang alle Strategien in der Immuntherapie nur zu mäßigen Erfolgen. Hauptsächliche Ursache dafür ist, dass die Interaktionen zwischen Tumor und Immunsystem nur unzureichend verstanden sind. Des Weiteren beschäftigten sich die meisten Untersuchungen bislang lediglich mit der anti-Tumoraktivität von T-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems. Doch adaptives und angeborenes Immunsystem sind eng miteinander verknüpft. Daher untersucht diese Arbeit die Interaktion von Zellen des angeborenen Immunsystems, NK-Zellen, und Melanomzellen. Im Stadium der Metastasierung verlieren bzw. vermindern Melanomzellen häufig die Expression der HLA Klasse I Komplexe auf ihrer Oberfläche und entziehen sich somit teilweise oder sogar gänzlich der Erkennung durch T-Lymphozyten (Ruiz-Cabello et al., 1991). Demnach sind sie zwar weniger zugänglich für T-Zellen, jedoch können durch den Verlust des HLA Klasse I Komplexes, basierend auf der 'missing self' Theorie, NK-Zellen durch solche Tumorzellen aktiviert werden (Ljunggren & Karre, 1990). Im Rahmen dieser Arbeit konnten gezielt Einblicke in die Aktivierung von NK-Zellen durch Melanomzellen gewonnen werden. Durch den Einsatz von HLA Klasse I-negativen Melanomzelllinien in den Experimenten war es möglich, die in erster Linie inhibierenden HLA Klasse I-abhängigen Signale gänzlich auszuschließen und die Aktivierung von NK-Zellen zu untersuchen. Der Fokus der Untersuchungen lag auf der Aktivierung von NK-Zellen durch die Liganden des aktivierenden Rezeptors NKG2D. Im Detail wurden die Expressionsmuster der NKG2D Liganden von verschiedenen Melanomzelllinien analysiert und der Einfluss wichtiger immunmodulatorischer Zytokine auf die Expression der Liganden in den Tumorzellen untersucht.

5.1 Erkennung von Melanomzellen durch Natürliche Killerzellen

In der vorliegenden Arbeit wurden überwiegend HLA Klasse I-negative, aber auch einige HLA Klasse I-positive Melanomzellen auf ihre Erkennung durch NK-Zellen hin analysiert. Die eingesetzten HLA Klasse I-negativen Melanomlinien waren in der Regel durch Mutationen im $\beta 2$ Mikroglobulin-Gen nicht mehr in der Lage HLA Klasse I Komplexe auf der Oberfläche zu exprimieren (Paschen et al., 2006; Paschen et al., 2003). Eine Ausnahme stellen M-Mel 61h Zellen dar, in denen die Ursache des irreversiblen HLA Klasse I Verlusts noch nicht geklärt werden konnte. Der HLA Klasse I Komplex liefert überwiegend inhibierende Signale

an NK-Zellen (Karre et al., 1986; Ljunggren & Karre, 1990). Demnach sollten im Falle einer fehlenden HLA Klasse I Expression, sowie gleichzeitiger Anwesenheit von aktivierenden Molekülen, NK-Zellen durch HLA Klasse I-defiziente Tumorzellen aktiviert werden. Wichtige aktivierende Moleküle sind die Liganden des NKG2D Rezeptors: MICA und MICB, sowie die Proteine der ULBP Familie. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ermittelt werden, welche Rolle die Liganden des NKG2D Rezeptors in der Erkennung von Melanomzellen durch NK-Zellen spielen.

Zunächst wurde die Erkennung von Melanomzellen durch die NK-Zelllinie NKL untersucht, deren Aktivität in erster Linie über den NKG2D Rezeptor kontrolliert wird. Wie erwartet wurden NKL-Zellen durch HLA Klasse I-positive Melanomzellen nicht aktiviert (Abbildung 4-1). Im Gegensatz dazu konnten die HLA Klasse I-negativen Melanomlinien Mel 249, Mel 592 und Ma-Mel 86b in NKL-Zellen die Sekretion von IFN- γ induzieren. Die Melanomlinien Mel 499 und Mel 505 konnten die NKL-Zellen nicht aktivieren, obwohl sie keine HLA Klasse I Komplexe auf der Oberfläche exprimierten. Zudem konnte mit dem NKG2D-Fusionsprotein, welches die NKG2D Liganden auf der Zelloberfläche bindet, auf den Melanomlinien Mel 499 und Mel 505 keine Liganden detektiert werden (Abbildung 4-2). Um die Ursache für das Fehlen der NKG2D Liganden Oberflächenexpression zu untersuchen, wurde zunächst überprüft, ob die betreffenden Genloci in den Tumorzellen mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen (FISH) detektierbar waren. Die MIC und die ULBP Genloci sind auf dem p-Arm bzw. dem q-Arm des Chromosoms 6 lokalisiert. Beide Arme des Chromosoms sind im Melanom häufig von Aberrationen betroffen (Hoglund et al., 2004). Interessanterweise ist auch die ULBP-Genregion im Bereich einer fragilen Stelle des q-Arms lokalisiert. Die FISH-Untersuchungen ergaben jedoch, dass mindestens eine Kopie der Genloci pro Zellkern in den untersuchten Zelllinien vorhanden war (Abbildung 4-3 und 4-4), so dass ein Genverlust der NKG2D Liganden als mögliche Ursache für die fehlende Expression der NKG2D Liganden sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden konnte. Allerdings stellte sich nun die Frage, ob die Transkription der spezifischen Gene und die Translation der entsprechenden mRNA stattfand. Daher wurde mittels quantitativer RT-PCR überprüft, ob die Melanomlinien Mel 499 und Mel 505 RNA der NKG2D Liganden produzieren. Neben diesen beiden Zelllinien wurden weiteren Melanomzelllinien diesbezüglich untersucht. Alle untersuchten Melanomzelllinien exprimierten, unabhängig ihres HLA Klasse I Status, MICA, MICB und ULBP2 RNA, wobei keine gravierenden Unterschiede zwischen Mel 499, Mel 505 und den verbleibenden Melanomlinien festgestellt wurden. Der Nachweis von MIC-spezifischer RNA in Melanomzellen deckt sich dabei weitestgehend mit bereits beschriebenen Befunden (Pende et al.,

2002; Vetter et al., 2002). Sowohl Pende et al., als auch Vetter und Kollegen zeigten, dass die Transkripte der MIC Moleküle in nahezu allen untersuchten Melanomlinien exprimiert werden. Ein detailliertes RNA Expressionsprofil der ULBP Gene wurde für das Melanom bislang noch nicht dargestellt.

Die Oberflächenexpressionen der einzelnen NKG2D Liganden wurden mittels monoklonalen Antikörpern untersucht. Auch hierbei zeigten sich keine Unterschiede zwischen HLA Klasse I-negativen und HLA Klasse I-positiven Melanomlinien. Die Proteine MICA und ULBP2 wurden deutlich exprimiert, wobei MICA in der höchsten Konzentration und auf allen Melanomlinien vorhanden war. Eine Expression der Oberflächenproteine MICB und ULBP3 konnte nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden, während das Protein ULBP1 auf keiner der untersuchten Melanomlinien detektierbar war. Diese Expressionsprofile der NKG2D Liganden auf Melanomzellen, sowie die unabhängige Regulation der einzelnen Liganden, stimmen weitestgehend mit den Daten aus bereits durchgeführten Analysen überein (Cosman et al., 2001; Eagle et al., 2006; Pende et al., 2002). So beschrieben Pende und Kollegen in ihren Untersuchungen MICA als den am häufigsten exprimierten NKG2D Liganden auf der Oberfläche verschiedener Melanomlinien.

Interessanterweise wurden die Proteine MICA und ULBP2 mittels spezifischer Antikörper auch auf der Oberfläche der Melanomlinien Mel 499 und Mel 505 zweifelsfrei detektiert, was im Gegensatz zu den Oberflächenanalysen mit dem Fusionsprotein hNKG2D-F_c stand (vgl. Abbildung 4-2 und Abbildung 4-6). Wie bereits erwähnt, waren die Zellen der Linien Mel 499 und Mel 505 auch nicht in der Lage, die NK-Zelllinie NKL über den NKG2D Rezeptor zu aktivieren (Abbildung 4-1). Ein möglicher Grund hierfür könnten Mutationen innerhalb der Gene von MICA und ULBP2 sein, die zu veränderten Proteinstrukturen und somit zum Funktionsverlust der Proteine führt. Dadurch könnte die Bindung an den NKG2D Rezeptor verhindert werden, während die monoklonalen Antikörper die Proteine durch unterschiedliche Bindungsstellen noch erkennen könnten. NKG2D Liganden sind polymorph, möglicherweise könnte auch die Expression polymorpher Formen mit geringer Affinität zum NKG2D Rezeptor die für Mel 499 und Mel 505 beobachteten Eigenschaften erklären (Steinle et al., 2001). Als weitere mögliche Ursache für die Nicht-Erkennung der NKG2D Liganden auf Mel 499 und Mel 505 durch das Fusionsprotein bzw. den Rezeptor könnte ein verändertes Muster posttranslationaler Modifikationen der Liganden in Frage kommen. So konnte bereits gezeigt werden, dass eine S-Acylierungsstelle des MICA Proteins für eine Aktivierung von NK-Zellen notwendig ist. Fehlt diese Stelle, so ist MICA auf der Oberfläche zwar nachweisbar, aber nicht funktionsfähig (Eleme et al., 2004). Dabei könnte es durchaus ausreichend sein,

wenn lediglich MICA von solchen Mutationen bzw. Modifikationen betroffen wäre, um die NKG2D-abhängige Erkennung durch NKL-Zellen deutlich einzuschränken. Diese Annahme wird durch folgende Beobachtung unterstützt: Obwohl neben MICA auch ULBP2 Proteine auf den Ma-Mel 86b Melanomzellen vorhanden waren, wurden die NKL-Zellen durch die Tumorzellen, nach Antikörper-vermittelter Blockade der MICA Signale, kaum aktiviert (Abbildung 4-16C). Es ist daher zu vermuten, dass das Protein MICA, eventuell auch aufgrund einer besonders hohen Affinität zum Rezeptor, eine Schlüsselrolle in der NKG2D-vermittelten Aktivierung von NK-Zellen einnimmt, zumindest was die Zelllinie Ma-Mel 86b angeht. Falls dies auf die Zellen der Linien Mel 499 und Mel 505 ebenso zutrifft, würde es bedeuten, dass eine Mutation oder veränderte Modifikation von MICA alleine ausreichen kann, um die Aktivierung von NK-Zellen zu verhindern oder zumindest deutlich zu reduzieren.

Eine vermehrte Expression von inhibierenden Liganden auf den Mel 499 und Mel 505 Zellen, die die Aktivierung von NKL-Zellen verhinderte, kann als mögliche Ursache nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Es ist aber eher unwahrscheinlich, da bereits das Fusionsprotein keine Liganden erkennen konnte, obwohl die monoklonalen Antikörper MICA und ULBP2 detektierten.

Eine genaue Ursache, welche die Nicht-Erkennung der NKG2D Liganden durch das Fusionsprotein, sowie das Ausbleiben der Aktivierung von NK-Zellen, trotz fehlendem HLA Klasse I Komplex auf Mel 499 und Mel 505 Zellen, erklärt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt werden. Dazu sind weitere Untersuchungen notwendig, welche die genaue Sequenz und die Modifikationen, vor allem von MICA auf der Oberfläche, aufklären können.

Aus unbekanntem Gründen konnten zwischen den analysierten Melanomlinien beträchtliche Unterschiede in der Expressionsstärke der NKG2D Liganden beobachtet werden. Allerdings wurden solche großen Differenzen für einzelne NKG2D Liganden zwischen Linien von histologisch ähnlichen Tumoren bzw. verschiedener Donoren bereits früher beschrieben (Bui et al., 2006; Cerboni et al., 2007). Die Ursache hierfür wurde nicht eindeutig geklärt, könnte aber auf Polymorphismen von Nukleotiden (engl.: single nucleotide polymorphism = SNP) innerhalb der Promotorregionen einzelner Liganden zurückzuführen sein (Eagle et al., 2006). Für die MICA Promotorregion sind bislang keine SNPs beschrieben, die die Bindung von Transkriptionsfaktoren beeinflussen. Im Gegensatz dazu weisen die Promotorregionen von MICB, ULBP2 und ULBP3 zahlreiche SNPs an verschiedenen Positionen auf, die durchaus die Bindung Transkriptions-relevanter Faktoren beeinflussen könnten (Eagle et al., 2006). Zudem könnten epigenetische Phänomene, sowie unterschiedliche genetische Veränderungen

in der Tumorentstehung bzw. -entwicklung ebenso für das Auftreten der Expressionsunterschiede verantwortlich sein.

Interessanterweise korrelierte der Gehalt an RNA der NKG2D Liganden in den Zellen nicht ohne weiteres mit den Proteinkonzentrationen an der Oberfläche. Besonders auffällig waren diese unterschiedlichen Expressionsprofile für die Linien Ma-Mel 48c und Ma-Mel 61h. Die Zellen der Melanomlinie Ma-Mel 48c exprimierten kaum ULBP2 RNA, auf der Oberfläche konnte das Protein aber zweifelsfrei nachgewiesen werden. Die Melanomlinie Ma-Mel 61h transkribierte in hoher Konzentration ULBP3, allerdings war die Expression des Proteins auf der Oberfläche fraglich. Demzufolge legen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Daten die Vermutung nahe, dass die Expression der NKG2D Liganden in Melanomzellen nicht nur auf der Ebene der Transkription kontrolliert wird.

Mittlerweile gibt es verschiedene Hinweise darauf, dass die Regulation der Liganden tatsächlich nicht nur transkriptionell, sondern wahrscheinlich auch post-transkriptionell stattfindet (Cosman et al., 2001; Eagle et al., 2006; Pende et al., 2002). Einen ersten Anhaltspunkt dafür zeigt die Veröffentlichung von Boissel et al. Darin wird die onkogene Tyrosin Kinase BCR-ABL (break point cluster – BCR; Abelson leukemia-virus protein – ABL) für eine post-transkriptionelle Regulation von MICA, aber nicht für ULBP1 und ULBP2, verantwortlich gemacht (Boissel et al., 2006). BCR-ABL ist ein Onkogen, das typischerweise in Patienten mit akuter myeloider Leukämie exprimiert wird und sowohl den PI3K/mTOR als auch den MAP-Kinase Signalweg aktivieren kann. Es wurde gezeigt, dass die Translation der MICA mRNA über den PI3K/mTOR Signaltransduktionsweg kontrolliert wird. Durch spezifische Blockierung von mTOR mit dem Inhibitor Rapamycin gelang es, die Oberflächenexpression von MICA deutlich zu reduzieren (Boissel et al., 2006).

5.2 Einfluss von Zytokinen auf die Expression der NKG2D Liganden in Melanomzellen

Die Regulation der Liganden des NKG2D Rezeptors ist nach wie vor nicht im Detail aufgeklärt. Lediglich einzelne Elemente dieser komplexen Kontrolle sind bislang entdeckt (vgl. Kapitel 2.3.2.2). Allgemein bekannt ist, dass die NKG2D Liganden als Sensitivitätsmarker für gestresste, transformierte, sowie durch Bakterien und Viren befallene Zellen gelten und somit einen wichtigen Bestandteil des Immunsystems darstellen (Borchers et al., 2006a; Borchers et al., 2006b; Eleme et al., 2004). Für eine effektive Aktivierung und Regulation des Immunsystems sind unter anderem die Zytokine, wie die Interferone und die Mitglieder der TNF-

Familie, von Bedeutung. Der Einfluss dieser Mediatoren auf die Expressionsprofile der NKG2D Liganden und deren Regulation wurde in der vorliegenden Arbeit analysiert.

5.2.1 Einfluss von IFN- α und TNF- α auf die NKG2D Ligandenexpression

Es ist allgemein bekannt, dass die Zytokine IFN- α , IFN- γ und TNF- α einen bedeutenden Einfluss auf viele Zellen des Immunsystems haben. Unter anderem wird durch diese Moleküle die Aktivität verschiedener Zellen des Immunsystems, zum Beispiel von Dendritischen Zellen und NK-Zellen beeinflusst (Jinushi et al., 2003a; Robertson et al., 1996a). Darüber hinaus sind aktivierte NK-Zellen selbst in der Lage die immunmodulatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α zu sekretieren, unter anderem um dadurch Makrophagen anzulocken, DC zu aktivieren und die adaptive Immunantwort zu regulieren. IFN- α und IFN- γ sind zudem von klinischem Interesse, da beide Zytokine bereits zur Behandlung von Melanompatienten im Rahmen klinischer Studien verwendet wurden, wobei sich IFN- α weiterhin in der Testung befindet (siehe Kapitel 2.1.3). Für die Analyse der Regulation der NKG2D Liganden wurden die Melanomzellen mit drei verschiedenen Zytokinen, IFN- α , IFN- γ und TNF- α , inkubiert.

In drei der vier analysierten Melanomzelllinien, die im Rahmen dieser Arbeit mit IFN- α behandelt wurden, konnte das Zytokin kaum eine Veränderung der Expressionsprofile der NKG2D Liganden auf der Oberfläche bewirken. Trotz des Einsatzes einer relativ hohen Konzentration von 1000 IU/ml IFN- α über einen Zeitraum von 96 Stunden, war nur auf der Linie Ma-Mel 86b eine verringerte Oberflächenexpression von MICA festzustellen. Es wurde kürzlich die Präsenz von Bindungsstellen für Interferon regulierende Faktoren (IRF) in der Promotorregion einiger NKG2D Liganden postuliert, wodurch IFN- α möglicherweise Einfluss auf die Regulation der Liganden nehmen könnte (Eagle et al., 2006). Jedoch könnte der Reduktion der Oberflächenexpression auch auf IFN- α -induzierte post-transkriptionelle Mechanismen zurückzuführen sein. Interessanterweise wurde für andere Zellarten beschrieben, dass IFN- α durchaus Einfluss auf die Oberflächenexpression von MICA haben kann. So wurde gezeigt, dass IFN- α in DC die Konzentration der Proteine MICA und MICB auf der Oberfläche steigern kann (Jinushi et al., 2003a). Auch zervikale Karzinomzelllinien erhöhen den Proteingehalt von MICA nach IFN- α Behandlung (Niu et al., 2006). In murinen Zellen wurde die Reduktion eines NKG2D Liganden in Abhängigkeit von IFN- α nachgewiesen. Auf der Oberfläche von Methylcholanthren induzierten Sarkomen konnte die reduzierte Expression des Liganden H60, welcher keine Homologie zu einem bekannten humanen Liganden aufweist, nach IFN- α Behandlung festgestellt werden (Bui et al., 2006). Offenbar kann IFN- α in ver-

schiedenartigen (Tumor-) Zellen die Expression der NKG2D Liganden unterschiedlich beeinflussen.

Das in dieser Arbeit ebenfalls eingesetzte TNF- α kann verschiedene zelluläre Signaltransduktionskaskaden beeinflussen, deren Aktivierung von der Bindung des Zytokins an den TNF-Rezeptor (TNFR) 1 oder 2 abhängig sind. Nach Bindung von TNF- α an TNFR1 kann über mehrere Zwischenschritte NF- κ B aktiviert werden, welches in den Zellkern transloziert, um dort die Expression spezifischer Gene durch Bindung an deren Promotoren oder an Promotorbenachbarte Bereiche zu steuern. Für MICA sind in Intron 1 Bindungsstellen für NF- κ B beschrieben, welche die Expression des Gens beeinflussen können (Molinero et al., 2004). Die Liganden ULBP1, ULBP2, ULBP3 und RAET1G weisen ebenso potentielle NF- κ B Bindungsstellen auf, deren Funktionalität bislang aber unklar ist (Eagle et al., 2006). Demnach wäre ein deutlich verändertes Expressionsprofil der NKG2D Liganden nach Behandlung mit TNF- α zu erwarten gewesen. Tatsächlich konnte nach 96stündiger Inkubation mit TNF- α nur eine geringfügig verstärkte Oberflächenexpression auf den vier Melanomlinien, Mel 249, M-Mel 86a/86b und UKRV-Mel 2, für MICA und teilweise für ULBP2 festgestellt werden. Die Analyse des RNA Gehaltes von TNF- α -behandelten im Vergleich zu -unbehandelten Melanomzellen lies allerdings keinen klaren Einfluss des Zytokins auf den RNA Gehalt der Zellen erkennen (nicht gezeigt).

5.2.2 Einfluss von IFN- γ auf die NKG2D Ligandenexpression

Als wichtiges pro-inflammatorisches Zytokin hat IFN- γ einen deutlichen Einfluss sowohl auf das angeborene, als auch auf das adaptive Immunsystem. Sekretiert von NK- und T-Zellen kann es die Expression zahlreicher Gene regulieren. Des Weiteren verbessert das Zytokin in der Regel die Erkennung von Zielzellen durch T-Lymphozyten, indem es unter anderem die Expression des HLA Klasse I Komplexes induziert (Aki et al., 1994; Andersen et al., 2006). Zudem ist bekannt, dass IFN- γ die Interaktion von NKG2D und dessen Liganden beeinflussen kann, indem es den NKG2D Rezeptor auf NK-Zellen herabreguliert (Zhang et al., 2005).

Bereits veröffentlichte Daten lassen keinen Einfluss von IFN- γ auf die Expression der MICA RNA bzw. des MICA Proteins erkennen (Bahram et al., 1994; Zwirner et al., 1998). Allerdings wurden in diesen Publikationen lediglich die Zelllinien HeLa (Zervixkarzinomzelllinie), U937 (pro-monozytische Lymphomzelllinie) und HUV-EC-C (Endothelzelllinie), sowie frisch isolierte T-Zellen (CD4⁺ bzw. CD8⁺) und B-Zellen (CD19⁺) untersucht. Inwiefern

IFN- γ nun auf Melanomzellen die Expression der Liganden des NKG2D Rezeptors beeinflussen kann, wurde in der vorliegenden Arbeit analysiert.

Dazu wurden sieben Melanomzelllinien für 96 Stunden mit IFN- γ behandelt und anschließend auf die Oberflächenexpression der NKG2D Liganden hin untersucht. Vier der untersuchten Melanomlinien kennzeichnete eine signifikante Reduktion der MICA Oberflächenexpression nach Inkubation mit IFN- γ (Abbildung 4-8). Die verbleibenden drei Melanomzelllinien zeigten in jedem einzelnen Versuch, eine deutlich verringerte, teilweise sehr stark reduzierte Oberflächenexpression von MICA. Ein signifikanter Unterschied konnte in diesen Fällen aber nicht festgestellt werden. Der Grund dafür lag in den großen Unterschieden der gemessenen Fluoreszenzintensitäten zwischen den einzelnen unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Für das Protein ULBP2 war eine signifikante Reduktion der Oberflächenexpression nach Behandlung mit IFN- γ nur für die Linie Ma-Mel 86b vorhanden. Die Melanomlinien Ma-Mel 61h, Ma-Mel 86a und UKRV-Mel 2 zeigten zwar in den einzelnen unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen eine verminderte Expression von ULBP2, in der Summe der Experimente ergab sich aber auch hier wegen der großen Varianz der MFI-Werte keine Signifikanz. Die Ursache für die Expressionsunterschiede konnte nicht zweifelsfrei erklärt werden. Es ist bekannt, dass die Zelldichte Einfluss auf die Expression der Liganden nimmt, wie es für Fibroblasten bereits nachgewiesen wurde (Zou et al., 2006). Aus diesem Grund wurde besonderen Wert auf die Einhaltung eines standardisierten Versuchsprotokolls in den unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen gelegt. Durch diese Standardisierung des Versuchsablaufes sollten dichtebedingte Veränderungen der Expression der NKG2D Liganden eher unwahrscheinlich sein und dürften nicht die Ursache der hohen Varianz der MFI-Werte zwischen den Versuchen darstellen. Eine weitere mögliche Erklärung für die große Varianz könnte die Beschaffenheit der Rundbodenplatten sein, in denen die Inkubationen der Tumorzellen mit Antikörpern für die Bestimmung der NKG2D Oberflächenexpression durchgeführt wurden. Die Hersteller dieser Platten wurden im Verlauf der Arbeit wiederholt gewechselt. Aufgrund der unterschiedlichen Beschaffenheit des Kunststoffes, könnten manche Platten die eingesetzten Antikörper stärker gebunden haben als andere. Dadurch würde in einigen Fällen weniger Antikörper zur Verfügung stehen, was in einer verringerten Intensität der Markierung und schließlich der Färbung resultiert haben könnte. Eine eindeutige Ursache konnte jedoch bislang nicht festgestellt werden.

Interessanterweise scheint der Effekt von IFN- γ auf die NKG2D Ligandenexpression nicht nur auf humane Tumorzellen beschränkt zu sein. Eine Reduktion der Oberflächenexpression

des murinen NKG2D Liganden H60 durch IFN- γ wurde im letzten Jahr durch Bui und Kollegen beschrieben (Bui et al., 2006). In dieser Arbeit untersuchten sie von Methylcholanthren-induzierten Sarkomen abgeleitete Zelllinien und inkubierten diese mit IFN- γ . In Gegenwart des Zytokins verringerte sich die Oberflächenexpression des murinen NKG2D Liganden H60 in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer und der eingesetzten Konzentration. Aus diesem Grund kann vermutet werden, dass der IFN- γ -vermittelten Reduktion der NKG2D Ligandenexpression möglicherweise ein konservierter Mechanismus zu Grunde liegt, welcher die Herabregulation aktivierender Moleküle auf bestimmten Tumorzellen und somit eine reduzierte Erkennung durch NK-Zellen zur Folge hat.

5.2.2.1 Molekulare Mechanismen der Regulation der NKG2D Ligandenexpression in Abhängigkeit von IFN- γ

An vier Melanomzelllinien wurde der Einfluss von IFN- γ auf die Oberflächenexpression und auf die RNA Expression der NKG2D Liganden untersucht. Bemerkenswerterweise konnte nach viertägiger Zytokinbehandlung bei drei der vier Zelllinien keine Reduktion in der Menge der Liganden-spezifischen MICA und ULBP2 RNA festgestellt werden, wenngleich die Oberflächenpräsentation der Liganden reduziert war. Lediglich bei der Melanomlinie Ma-Mel 86b korrelierte die Herabregulation der Oberflächenexpression mit einer Reduktion in der RNA Menge. Die verbleibenden Melanomlinien ließen keine übereinstimmende Regulation erkennen. Die fehlende Korrelation zwischen RNA und Oberflächenprotein der Liganden, wirft die Frage nach der Regulation dieses Prozesses auf. Dazu wurde zunächst untersucht, von welchen Faktoren die verringerte Oberflächenexpression von MICA und ULBP2 abhängig war. Abbildung 4-9 zeigt deutlich, dass mit steigender IFN- γ Konzentration die Präsentation der Liganden auf der Oberfläche von Ma-Mel 86b Zellen vermindert wurde. Des Weiteren war die Reduktion der Oberflächenexpression von der Zeit abhängig. Die niedrigste Konzentration an NKG2D Liganden auf Ma-Mel 86b Zellen wurde nach einer Inkubationsdauer von 96 Stunden erreicht (Abbildung 4-10B).

Um den Einfluss der Zeit auf die Genexpression im Detail zu analysieren, wurde dem MICA-spezifischen RNA Gehalt von IFN- γ -behandelten und -unbehandelten Melanomzelllinien die Menge an Oberflächenproteinen in einem Zeitverlaufversuch gegenübergestellt (Abbildung 4-12). In keiner der beiden untersuchten Melanomzelllinien Mel 249 und Ma-Mel 86b korrelierte der IFN- γ -induzierte Verlauf der MICA RNA Expression mit dem Verlauf der MICA Oberflächenexpression. Auffallend war, dass sich innerhalb der ersten vier bis acht Stunden

die Oberflächendichte des MICA Proteins kaum veränderte bzw. leicht anstieg und nach zehn Stunden in beiden Zelllinien deutlich abfiel. Im Gegensatz dazu stieg die RNA Konzentration in den Stunden 8-24 in IFN- γ -behandelten Zellen im Vergleich zu nicht behandelten Zellen deutlich an, um erst danach abzufallen. Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob IFN- γ innerhalb der ersten Stunden nach Zugabe des Zytokins direkt eine Induktion der Expression auf transkriptioneller Ebene bewirken kann, welche jedoch an der Zelloberfläche nicht sichtbar wird. Demnach sind weitere regulatorische Prozessen zu postulieren. Es ist durchaus denkbar, dass ein von IFN- γ aktivierter Transkriptionsaktivator wie STAT-1 oder ein Transkriptionsfaktor, dessen Expression primär durch IFN- γ induziert wird, an die Promotorbereiche der Gene der NKG2D Liganden binden und deren Transkriptionsrate erhöhen kann. Des Weiteren ist anzumerken, dass der erhöhte RNA Gehalt von MICA in IFN- γ -behandelten Zellen die Folge eines post-transkriptionellen Regulationsmechanismus sein könnte, der zu einer erhöhten Stabilisierung der RNA führt.

Geht man davon aus, dass die MICA-spezifische RNA in IFN- γ -behandelten Melanomzellen erhöht ist, diese RNA translatiert wird, es aber nicht zu einem Anstieg der MICA Oberflächenexpression kommt, so sind mehrere Ursachen hierfür denkbar. Zwirner et al. erwähnen in diesem Zusammenhang unpublizierte Daten, die darauf hindeuten, dass in humanen Melanomzellen MICA Proteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgehalten werden können, welche daraufhin dem proteasomalen Abbau im Zytoplasma zugeführt werden (Zwirner et al., 2007). Es ist durchaus denkbar, dass die Proteine MICA und ULBP2 intrazellulär gebunden und dadurch von der Oberfläche zurückgehalten werden. Schließlich können verschiedene NKG2D Liganden intrazellulär von bestimmten viralen Proteinen gebunden werden (Chalupny et al., 2006; Cosman et al., 2001). ULBP1 und ULBP2 werden durch Bindung an das Protein UL16 des humanen Cytomegalie Virus (hCMV) im ER zurückgehalten (Welte et al., 2003). Auch das Protein MICB wird durch UL16 gebunden und ist daraufhin hauptsächlich im Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert (Dunn et al., 2003; Vales-Gomez et al., 2006). Folglich verringert sich die Oberflächenexpression dieser Liganden, was in einer verminderten Erkennung und Lyse durch NK-Zellen resultiert (Dunn et al., 2003; Spreu et al., 2006; Wu et al., 2003). Auch das hCMV Protein UL142 kann die Expression verschiedener Allele von MICA auf der Oberfläche verhindern, wodurch ebenfalls eine reduzierte Erkennung durch NK-Zellen erfolgt (Chalupny et al., 2006; Zou et al., 2005). Chalupny und Kollegen konnten jedoch nicht nachweisen, dass UL142 direkt mit MICA interagiert. Sie konnten nicht ausschließen, dass ein anderes, durch UL142 induziertes Protein an MICA bindet und den Liganden zurückhält. Bis heute wurde allerdings noch kein zelluläres Protein gefunden,

dass Homologien zu UL16 oder UL142 aufweist und somit für eine intrazelluläre Retention, eventuell auch nach Behandlung mit IFN- γ , verantwortlich sein könnte. In diesem Zusammenhang beschrieben auch Raffaghello und Kollegen, dass das Protein MICB in verschiedenen Zelllinien des Neuroblastoms im Zytosol zurückgehalten werden kann (Raffaghello et al., 2004). Ein Grund dafür wurde allerdings nicht beschrieben.

Die verringerte Oberflächenexpression von MICA und ULBP2 nach Behandlung mit IFN- γ und die diesbezüglich zu beobachtende Diskrepanz zwischen RNA Gehalt und Oberflächenexpression der Liganden, könnte jedoch auch auf das Abspalten der Liganden von der Tumorzelloberfläche durch Metalloproteinasen zurückzuführen sein. Zellen von gastrointestinalen Tumoren setzen MICA und MICB von ihrer Oberfläche frei (sMICA, sMICB), was durch Inhibierung der Metalloproteinase-Aktivität aufgehoben wird (Salih et al., 2006; Salih et al., 2002). Auch andere Tumorarten, darunter Gliome, Neuroblastome und leukämische Zellen, zeigen eine gesteigerte Freisetzung von sMICA, sMICB bzw. sULBP2, die auch in Patientenserum nachgewiesen werden können (Eisele et al., 2006; Raffaghello et al., 2004; Salih et al., 2003; Waldhauer & Steinle, 2006). Dieses freie MICA kann die Oberflächenexpression des Rezeptors NKG2D durch anhaltende Stimulation verringern und dadurch die Aktivität der NK-Zellen reduzieren (Raffaghello et al., 2004).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten ELISA-Experimente zeigten jedoch, dass im Medium der Melanomzelllinien nur sehr geringe Mengen an sMICA und sULBP2 im Medium der Melanomzelllinien detektierbar waren. Zudem wurde kein vermehrtes Freisetzen der Liganden nach Behandlung der Melanomzellen mit IFN- γ beobachtet. Im Gegenteil, in einigen Fällen war eine geringere Konzentration von sMICA und sULBP2 im Kulturüberstand IFN- γ -behandelter Melanomzellen messbar. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass IFN- γ das Freisetzen der Liganden von der Oberfläche von Melanomzellen bewirkt.

Bemerkenswerterweise wurde erst kürzlich ein humaner Ligand, RAET1G2, des NKG2D Rezeptors entdeckt, welcher ausschließlich als freies Protein vorliegt (Bacon et al., 2004). Dieses durch alternatives Spleißen generierte Molekül, ist ebenfalls in der Lage NKG2D nach Bindung herabzuregulieren und dadurch die Aktivität von NK-Zellen zu verringern (Cao et al., 2007). Es ist allerdings nicht bekannt, ob dieses Protein von Melanomzellen produziert wird.

Nach Bindung von IFN- γ an IFNGR erfolgt die Signalweiterleitung in den meisten Fällen über das Protein STAT1. Daher wurde untersucht, ob die verringerte Oberflächenexpression

der NKG2D Liganden nach Inkubation der Melanomzellen mit IFN- γ über den STAT1-abhängigen Signaltransduktionsweg verläuft.

Die Linien Mel 249 und UKRV-Mel 2 wurden mit STAT1-spezifischer siRNA elektroporiert (Abbildung 4-14). Infolge der STAT1 siRNA Behandlung und anschließender dreitägiger Inkubation in Normalmedium, wurden in Abwesenheit von IFN- γ die MICA Oberflächenproteine geringer exprimiert als in Zellen, die mit der Kontroll siRNA elektroporiert wurden. Dies war besonders für die Melanomlinie UKRV-Mel 2 auffällig und legt eine Beteiligung von STAT1 bei der konstitutiven Expression von MICA nahe. Tatsächlich bewirkt STAT1 nicht nur die Induktion oder Repression zahlreicher Gene, sondern ist auch für die konstitutive Expression einiger Gene verantwortlich (Ramana et al., 2000). Darüber hinaus kann STAT1 mit einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren wechselwirken und interagiert mit verschiedenen anderen Signaltransduktionswegen (Ramana et al., 2000).

Nach der siRNA Elektroporation wurde ein Teil der Melanomzellen für drei Tage ebenfalls mit IFN- γ behandelt. Dabei konnte in STAT1 siRNA elektroporierten UKRV-Mel 2 Zellen die reduzierte Oberflächenexpression von MICA nach Behandlung mit IFN- γ fast vollständig aufgehoben werden. Interessanterweise ist die IFN- γ -abhängige Herabregulation der Oberflächenexpression des murinen NKG2D Liganden H60 auch von STAT1 abhängig (Bui et al., 2006). In der betreffenden Studie wurden STAT1-defiziente murine Sarkomzelllinien vergleichend zu STAT1-exprimierenden Sarkomzellen mit IFN- γ behandelt. Während die STAT1-Wildtyp Zellen eine Verringerung der RNA und Proteinexpression von H60 nach der Behandlung mit IFN- γ zeigten, konnten in der STAT1-defizienten Zelllinie keine Unterschiede in der RNA und Proteinexpression von H60 detektiert werden. Daher könnte eine Beteiligung von STAT1 auch in der Expressionskontrolle humaner NKG2D Liganden eine Rolle spielen. Allerdings kann die reduzierte Expression von MICA auf Zellen der Melanomlinie Mel 249 nach IFN- γ Inkubation nicht ausschließlich von STAT1 abhängig sein. Die verringerte Oberflächenexpression von MICA nach IFN- γ Behandlung konnte durch Blockierung von STAT1 in Mel 249 Zellen nur bedingt verhindert werden. Einerseits ist es möglich, dass die Herabregulation von STAT1 mittels siRNA nicht effizient genug verlief, denn in Gegenwart von IFN- γ war wesentlich mehr STAT1-RNA detektierbar als in Kontroll-siRNA elektroporierten Mel 249 Zellen. Andererseits muss die reduzierte Oberflächenexpression nach Inkubation mit IFN- γ nicht zwangsläufig über den JAK/STAT Signalweg verlaufen. Die Veröffentlichung von Ramana und Kollegen bestätigt diese Vermutung (Ramana et al., 2001). Dabei konnten in STAT1-defizienten Fibroblasten muriner Embryonen fast 30 Gene innerhalb der ersten sechs

Stunden nach Gabe von IFN- γ induziert werden. Rund ein Drittel davon waren Transkriptionsfaktoren, die bereits in der ersten Stunde nach IFN- γ Zugabe exprimiert wurden. Auch zwei Proteine, die bei Stressantworten beteiligt sind, Metallothionein und PGHS-2, wurden innerhalb der ersten drei Stunden induziert. Eine Bedeutung dieser Proteine bei der Expression der NKG2D Liganden wurde bislang noch nicht untersucht.

Sowohl die Analyse der RNA Expressionsprofile nach IFN- γ Behandlung, als auch die Elektroporation mit STAT1 siRNA und anschließender IFN- γ Inkubation weisen daraufhin, dass die Reduktion der Oberflächenexpression der NKG2D Liganden in den untersuchten Melanomzellen unterschiedlich reguliert wird. Diese Beobachtungen bestätigen die Aussage, dass die Regulation der Liganden, vor allem nach Behandlung mit IFN- γ , überaus kompliziert ist. Allein die Tatsache, dass Interferone 200-500 Gene beeinflussen können, erschwert die Untersuchungen in diesem Bereich (Boehm et al., 1998; Der et al., 1998). Dennoch scheint es, dass die NKG2D Liganden nach Behandlung der Melanomzellen mit IFN- γ zunächst durch post-transkriptionelle Prozesse reguliert werden. Die Möglichkeiten einer post-transkriptionellen Regulation wurden bereits in Kapitel 5.1 diskutiert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen schließen jedoch nicht aus, dass transkriptionell initiierte Abläufe stattfinden, die jedoch durch Regulierungsmechanismen auf anderer Ebene überlagert werden (vgl. Zeitverlaufsversuche Abbildung 4-12). Es konnte jedoch nicht geklärt werden, in welcher Weise und an welcher Stelle die Liganden nach der Inkubation mit IFN- γ reguliert werden.

Um die Frage nach der Regulation näher klären zu können, werden bereits WesternBlot Analysen durchgeführt. Dadurch soll ermittelt werden, ob aus dem erhöhten Gehalt an RNA nach IFN- γ Behandlung auch tatsächlich mehr Protein gebildet wird, das aber nicht an die Oberfläche gelangen kann. Auch Immunfluoreszenz Untersuchungen sollen etabliert werden, um zu untersuchen, ob und wenn ja in welchem zellulären Kompartiment, zum Beispiel ER oder Golgi-Apparat, die Proteine zurückgehalten werden. Um die Frage der Abhängigkeit von STAT1 zu klären, sollen Versuche mit STAT1-defizienten Melanomlinien durchgeführt werden.

5.2.2.2 Erkennung der Melanomzellen durch Natürliche Killerzellen in Abhängigkeit von IFN- γ

Die häufig verringerte Oberflächenexpression des HLA Klasse I Komplexes auf Melanomzellen *in vivo* macht diese Tumorzellen theoretisch zu einem Angriffsziel für Natürliche Killerzellen. Die eingesetzten β 2m-defizienten Melanomzelllinien eignen sich daher in besonderer

Weise, um die Bedeutung von aktivierenden Liganden bei der Interaktion mit NK-Zellen *in vitro* zu analysieren.

Die untersuchten Melanomzellen reduzierten auf ihrer Oberfläche die Expression der Liganden des aktivierenden Rezeptors NKG2D nach Behandlung mit IFN- γ . Die Bedeutung der Interaktion von Liganden und NKG2D Rezeptor für die Aktivierung von NK-Zellen durch Melanomzellen wurde anhand von Lyse-Versuchen herausgestellt. Dazu wurden die HLA Klasse I-negativen Melanomzelllinien Mel 249, UKRV-Mel 2 und Ma-Mel 86b in einem radioaktiven Lyse-Versuch mit der NK-Zelllinie NKL inkubiert. Nach Behandlung der Melanomzellen mit IFN- γ war für die Melanomlinien Mel 249 und Ma-Mel 86b eine deutliche Reduktion in der Lyse durch die NKL-Zellen zu beobachten. Diese verminderte Lyse der Melanomzellen korrelierte mit der verringerten Oberflächenfärbung gegen MICA, welche nach IFN- γ Behandlung signifikant reduziert wurde (vgl. Abbildung 4-8 und 4-16). Um zu überprüfen, ob die verminderte Erkennung durch NKL-Zellen tatsächlich von NKG2D abhängig war, wurden Blockierungsversuche mit monoklonalem Antikörper gegen den NKG2D Rezeptor durchgeführt (Abbildung 4-16C). Die Erkennung von unbehandelten Mel 249 und Ma-Mel 86b Zellen durch NKL-Zellen konnte auf ca. 50% reduziert werden, wenn der Rezeptor NKG2D mit dem monoklonalen Antikörper anti-NKG2D blockiert wurde. Bemerkenswerterweise wurde nahezu das gleiche Resultat erzielt, wenn die Zellen der Linien Mel 249 und Ma-Mel 86b zuvor mit IFN- γ behandelt wurden.

Das Protein MICA wurde auf der Oberfläche von allen analysierten Melanomzelllinien in der höchsten Konzentration im Vergleich zu den restlichen Liganden exprimiert. Zudem reduzierte der überwiegende Teil der untersuchten Melanomlinien nach IFN- γ Behandlung lediglich die Expression von MICA signifikant auf der Oberfläche. Daher wurde analysiert, inwiefern allein MICA für die verminderte Erkennung durch die NKL-Zellen verantwortlich war. Mittels monoklonalem Antikörper gegen MICA wurde das Protein auf der Oberfläche der Melanomzellen blockiert. Obwohl Ma-Mel 86b Zellen auch ULBP2 auf der Oberfläche exprimieren, zeigte die Melanomlinie nach Blockierung von MICA ein vergleichbares Ergebnis wie es durch die Blockierung des NKG2D Rezeptors erzielt wurde (vgl. Abbildung 4-8, 4-16C und 4-16D). Dies deutet daraufhin, dass das Protein MICA in Ma-Mel 86b Zellen eine bedeutende Rolle bezüglich der Aktivierung von NKL-Zellen einnimmt. Davon unterscheiden sich die Ergebnisse der Linie Mel 249. Nach Blockierung von MICA konnte die Aktivität der NKL-Zellen bei der Erkennung von unbehandelten Mel 249 Zellen nur leicht, dennoch signifikant, verringert werden. Demnach wird auf Zellen der Linien Mel 249 die Aktivität der NKL-

Zellen nicht hauptsächlich durch MICA vermittelt. Oberflächenexpressionsanalysen für diese Linie machten deutlich, dass nach Behandlung mit IFN- γ nur eine deutliche Reduktion der Expression von MICA auftrat, während ULBP2 auf der Oberfläche unverändert blieb. Daher scheint die Restaktivität der NKL-Zellen nach MICA Blockierung auf Mel 249 Zellen vor allem durch ULBP2 induziert zu sein. Es kann in diesem Zusammenhang aber nicht ausgeschlossen werden, dass andere, in dieser Arbeit nicht untersuchte Liganden, wie ULBP4/RAET1E oder RAET1G, für die zurzeit noch keine Antikörper zur Verfügung stehen, an der NKG2D-vermittelten Lyse der Melanomzellen beteiligt sind.

Die NKL-Zellen wiesen im Lyse-Versuch mit den beiden Melanomlinien nach Blockierung von NKG2D eine geringe Restaktivität auf (Abbildung 4-16C). Davon ausgehend, dass über den Antikörper eine vollständige Blockierung des NKG2D Rezeptors erreichbar ist, liegen die Gründe hierfür sehr wahrscheinlich in der Anwesenheit weiterer aktivierender Liganden, welche nicht mit NKG2D interagieren. In Frage kommen die NCR-Rezeptoren und/oder DNAM-1. Allerdings scheinen NKL-Zellen über ein eingeschränktes Repertoire an aktivierenden Rezeptoren zu verfügen, wenngleich keine umfassende Auflistung aller Rezeptoren existiert (Boissel et al., 2006; Robertson et al., 1996b).

Die Ergebnisse demonstrieren zweifelsfrei, dass die Behandlung der Melanomzellen mit IFN- γ die Aktivität der NKL-Zellen beeinträchtigt. Verantwortlich dafür ist die verminderte Expression der NKG2D Liganden auf der Oberfläche der Melanomzellen. Interessanterweise zeigten die Ergebnisse der Durchflusszytometrie eine noch deutlich detektierbare Oberflächenexpression von MICA und ULBP2 in IFN- γ -behandelten Melanomzellen. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Expression der NKG2D Liganden auf den Melanomzellen nicht komplett reduziert werden muss, um die Erkennung durch NKL-Zellen stark zu beeinträchtigen. Es scheint eine Reduktion bis zum Erreichen eines gewissen Grenzwertes auszureichen, um die Aktivierung der NKL-Zellen signifikant zu verringern. Baeriswyl und Kollegen beschrieben kürzlich ein vergleichbares Phänomen (Baeriswyl et al., 2006). Sie reduzierten die NKG2D-Konzentration auf der Oberfläche von polyklonalen, IL-2 aktivierten CD3⁻CD56⁺ NK-Zellen durch den Einsatz lentiviraler NKG2D-siRNA Vektoren. Die siRNA konnte die Konzentration von NKG2D auf der Oberfläche der transduzierten NK-Zellen zwar deutlich reduzieren, dennoch war NKG2D weiterhin zweifelsfrei detektierbar. Die zytotoxische Eigenschaft der NK-Zellen, sowie die Fähigkeit IFN- γ zu sekretieren war hingegen drastisch eingeschränkt. Daher wurde vermutet, dass eine bestimmte NKG2D Rezeptordichte auf NK-Zellen gegeben sein muss, um eine effektive NK-Aktivierung induzieren zu können.

Um die Experimente etwas näher der *in vivo* Situation anzupassen, wurden die Melanomzellen mit frisch isolierten, IL-2 aktivierten, polyklonalen NK-Zellen von gesunden Donoren inkubiert (Abbildung 4-17). Die Fähigkeit dieser CD3⁻CD56⁺ NK-Zellen die Melanomzellen zu erkennen, wurde ebenfalls in einem radioaktiven Lyse-Versuch bestimmt. Die beiden HLA Klasse I-negativen Melanomzelllinien Mel 249 und Ma-Mel 86b wurden durch die IL-2 aktivierte NK-Zellen eindeutig erkannt und lysiert. *In vivo* scheint dieser Prozess nicht effizient genug abzulaufen. Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich in der eingeschränkten Aktivität der NK-Zellen im Patienten (Sibbitt et al., 1984). Es könnte eine reduzierte Oberflächenexpression von NKG2D und CD161 auf den NK-Zellen der Patienten für eine verminderte Funktionsfähigkeit der NK-Zellen gegenüber den Tumorzellen verantwortlich sein (Konjevic et al., 2007). Zusätzlich kann eine inhibierende Mikroumgebung des Tumors eine Rolle spielen. Durch die Sekretion immunsuppressiver Moleküle, wie beispielsweise IL-10 oder TGF- β durch den Tumor, kann die Aktivität der NK-Zellen in dieser Umgebung verringert sein und der Tumor infolgedessen ungehindert wachsen (Kim et al., 2006). Des Weiteren wäre es denkbar, dass NK-Zellen zum Teil nur sehr ineffizient in den Tumor einwandern. Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe an Melanommetastasen scheinen dies zu bestätigen (A. Paschen, unpublizierte Daten).

Eine verringerte Erkennung von IFN- γ -behandelten Melanomzellen durch polyklonale CD3⁻CD56⁺ NK-Zellen konnte im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht eindeutig gezeigt werden. Lediglich die NK-Zellen des Donors 692 zeigten eine verminderte Aktivierung durch die IFN- γ -behandelten Melanomzelllinien Mel 249 und Ma-Mel 86b, die nur in Ma-Mel 86b Zellen NKG2D-vermittelt war. Auch konnte die Aktivierung der polyklonalen NK-Zellen durch Blockierung des NKG2D Rezeptors nicht verhindert werden. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass der Ausfall eines aktivierenden Signals, beispielsweise aufgrund geringer NKG2D Ligandenkonzentrationen, durch andere Rezeptoren auf den polyklonalen NK-Zellen kompensiert werden kann. Eine Blockierung von NKG2D bewirkt kaum eine veränderte Aktivierung der NK-Zellen, wenn die NKG2D Ligandenkonzentration gering ist und der überwiegende Anteil an NK-Zellen eine hohe NCR Konzentration (NCR^{bright}) exprimiert (Moretta et al., 2001). In diesem Fall erfolgt die Aktivierung der NK-Zellen über die NCR. Besteht die NK-Population hingegen überwiegend aus Zellen mit einer schwachen NCR Konzentration (NCR^{dull}) und es sind deutliche Mengen an NKG2D Liganden detektierbar, so verläuft die Aktivierung vorwiegend über NKG2D. Wird jetzt NKG2D blockiert, so resultiert dies in einer verminderten Aktivität der NK-Zellen. In den hier dargestellten Experimenten

war die Expression der NKG2D Liganden durch Analysen der Oberflächenexpression eindeutig bestimmbar. Die Konzentration der NCR und NKG2D Rezeptoren in der polyklonalen NK-Zellpopulation wurde hingegen nicht näher bestimmt. Da die Aktivität der untersuchten Donoren kaum durch die Blockierung von NKG2D in ihrer Aktivität beeinträchtigt wurden, kann vermutet werden, dass die NCR-Rezeptoren dominante Signale an die polyklonalen NK-Zellen vermittelten.

In jüngster Zeit kristallisiert sich immer mehr die Bedeutung von DNAM-1 in der kooperativen Aktivierung von NK-Zellen heraus. Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass PVR und Nectin-2 tatsächlich auf Melanomzellen in hoher Dichte vorhanden sind (Abbildung 4-15) und bestätigen damit frühere Analysen, die zeigen, dass der aktivierende Rezeptor DNAM-1 über die Bindung der beiden Liganden PVR und Nectin-2 auf Melanomzellen erheblich zur Aktivierung von NK-Zellen beiträgt (Carlsten et al., 2007; Castriconi et al., 2007; Pende et al., 2005). Daher könnte das reduzierte bzw. blockierte Signal von NKG2D sowohl durch die NCR-Rezeptoren, als auch durch DNAM-1 kompensiert werden und dadurch die Aktivierung der NK-Zelle erzielen. Ein weiteres Molekül, welches das blockierte NKG2D Signal kompensieren könnte, wäre KIR2DS4. Dieses ist ein aktivierender Rezeptor, welcher nicht nur mit dem HLA Klasse I Molekül Cw4 interagiert, sondern auch ein noch unbekanntes Protein auf HLA Klasse I-negativen Melanomzellen bindet (Katz et al., 2004). Nach der Interaktion des noch unbekanntes Proteins mit KIR2DS4 konnte die Aktivierung von KIR2DS4⁺ NK-Klonen erreicht werden. Aber auch die Existenz weiterer Liganden auf der Oberfläche der Melanomzellen, welche HLA Klasse I-unabhängig eine Aktivierung der Liganden induzieren, kann nicht ausgeschlossen werden (siehe auch Kapitel 2.3.1.2). Demnach ist es sehr schwierig, den Einfluss der reduzierten NKG2D Ligandenexpression auf Melanomzellen mittels polyklonaler NK-Zellen zu dokumentieren.

Allerdings zeigen bereits veröffentlichte Versuche mit Melanomzellen, dass eine NKG2D-vermittelte Aktivierung von polyklonalen NK-Zellen messbar ist (Pende et al., 2002). In diesen Experimenten wurden HLA Klasse I-negative Melanomzelllinien mit direkt frisch isolierten polyklonalen NK-Zellen in einem Lyse-Versuch eingesetzt. Nach Blockierung von NKG2D mit monoklonalem anti-NKG2D Antikörper wurde die Lysefähigkeit der NK-Zellen auf die Hälfte reduziert. Die Diskrepanz zwischen den in dieser Arbeit und von Pende und Kollegen dargestellten Versuchen könnte auf Unterschiede in der Isolierung und Kultivierung der NK-Zellen zurückzuführen sein. Eine zu geringe Konzentration des eingesetzten blockierenden Antikörpers anti-NKG2D kann in den hier gezeigten Versuchen weitestgehend ausgeschlossen werden. Der Ansatz mit BaF/3+MICA Zellen macht deutlich, dass die eingesetzte

Konzentration an blockierendem Antikörper ausreichend war, um die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand zu unterbinden. Da murine BAF/3 Transfektanten humane NK-Zellen nur über die NKG2D Liganden aktivieren sollten, bestätigt dieses Ergebnis auch die Annahme, dass im Falle der Melanomzellen die Aktivierung der polyklonalen NK-Zellen über andere Rezeptoren als NKG2D dominiert wird.

Bemerkenswerterweise wurden NK-Zellen von Donor 691 durch IFN- γ -behandelte Mel 249 besser aktiviert als durch unbehandelte. Die Ursache hierfür ist nicht klar. Eine Beteiligung von Nectin-2 und PVR ist dabei eher unwahrscheinlich. Zwar konnte eine leicht verstärkte Expression der beiden Moleküle nach IFN- γ Inkubation detektiert werden, für Mel 249 geschah dies aber nur in sehr geringem Umfang (Abbildung 4-15). Eine plausible Ursache für die verbesserte Erkennung von IFN- γ -behandelten Mel 249 Zellen könnte in einer erhöhten Expression des aktivierenden Adhäsionsmolekül ICAM-1 liegen. Dies wurde auf einigen Melanomzelllinien nach Behandlung mit IFN- γ in erhöhten Konzentrationen festgestellt (Maio et al., 1989). Durch Interaktion mit dem entsprechenden Rezeptor LFA-1 könnte ICAM-1 zur Aktivierung der polyklonalen NK-Zellen beitragen.

Bislang gibt es nur wenige Ursachen, die eine reduzierte Expression der humanen NKG2D Liganden auf der Oberfläche hervorrufen können. Es wurde die Freisetzung der Liganden von verschiedenen Tumoren durch die Aktivität von Metalloproteinasen beschrieben (siehe Kapitel 5.2.2.1), die Reduktion der Expression auf Gliomazellen in Gegenwart von TGF- β (Eisele et al., 2006; siehe Kapitel 5.3) und die Blockade des PI3K/mTOR-Signalwegs in myeloiden Leukämiezellen mittels Rapamycin (Boissel et al., 2006). Außerdem scheint nun auch IFN- γ eine Rolle in der Reduktion der Expression der NKG2D Liganden einzunehmen, wie die in dieser Arbeit dargestellten Versuche nach Behandlung von Melanomzellen mit IFN- γ zeigen. Inwiefern die dargestellten Ergebnisse auch die Aktivität polyklonaler NK-Zellen, vor allem *in vivo* beeinflussen können, ist unklar. Nach wie vor ist der Einfluss von IFN- γ auf aktivierende und inhibierende Liganden der NK Rezeptoren nur unzureichend untersucht, obwohl dieses Zytokin einen erheblichen Einfluss auf das gesamte Immunsystem hat. Zudem sollten weitere Untersuchungen mit IFN- γ durchgeführt werden, da das Zytokin nicht nur die Expression der Liganden, sondern auch die des Rezeptors beeinflussen kann und dadurch möglicherweise die Interaktion von Tumor und NK-Zellen deutlich beeinträchtigt.

5.3 Expression der NKG2D Liganden auf Zellen verschiedener Tumorentitäten in Abhängigkeit von IFN- γ

Melanomzellen reagieren auf IFN- γ mit einer verminderten Oberflächenexpression der NKG2D Liganden, die sich in einer verminderten Erkennung durch die NKL-Zellen widerspiegelt. Die reduzierte Expression der NKG2D Liganden scheint jedoch eindeutig von der untersuchten Tumorart abhängig zu sein. So wiesen nach viertägiger IFN- γ Behandlung die untersuchten Zelllinien HeLa (Zervixkarzinom) und die Jeg3 (Chorionkarzinom), sowie die Linien der Kolonkarzinome HCT116 und RHO keine eindeutig veränderte Oberflächenexpression nach Behandlung mit IFN- γ auf. Für die Linie HeLa wurden diese Ergebnisse nach 48- bzw. 72stündiger IFN- γ Inkubation mit einer Konzentration von 200 U/ml in Western-Blot-Analysen bereits früher gezeigt, wobei auch der RNA Gehalt dieser Zelllinie nicht durch IFN- γ beeinträchtigt wurde (Bahram et al., 1994; Zwirner et al., 1998). Auch auf den Zelllinien U937 (pro-monozytische Linie) und HUV-EC-C (Endothelzelllinie) kann unter den gleichen Bedingungen keine veränderte Expression der NKG2D Liganden festgestellt werden, ebenso verhalten sich frisch isolierte T-Zellen (CD4⁺ bzw. CD8⁺) und B-Zellen (CD19⁺; Zwirner et al., 1998). Interessanterweise wird ULBP1 auf Blasten von Patienten mit akuter myeloider Leukämie verstärkt exprimiert, wenn diese Zellen für zwei Tage *in vitro* mit einer Kombination aus Wachstumsfaktoren, darunter der flt3 Ligand, 'stem cell factor' (SCF) und 'granulocyte-macrophage colony stimulating factor' (GM-CSF) und IFN- γ inkubiert werden (Rohner et al., 2007). Die erhöhte Oberflächenkonzentration von ULBP1 resultiert nach Blockierung der HLA Klasse I Moleküle in einer erhöhten Aktivität von NK-Zellen.

Das Expressionsmuster der NKG2D Liganden auf den vier untersuchten Glioblastomzelllinien Ma-Glio 4a/4b, Ma-Glio 5 und Ma-Glio 10 decken sich nicht vollständig mit bereits durchgeführten Analysen (Friese et al., 2003). Zwar detektierten Friese und Kollegen ebenfalls in allen verwendeten Tumorklinen und in Zellen von *ex vivo* kultivierten Glioblastomen die Liganden MICA und ULBP2, die Expression der restlichen Liganden korrelierte nur bedingt mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen. Mögliche Gründe könnten in der geringen Anzahl der verwendeten Zelllinien in dieser Arbeit liegen, im Gegensatz zu den 17 untersuchten Linien bei Friese et al.

In Abhängigkeit von IFN- γ reduzierten neben den Melanomzelllinien die vier Glioblastomlinien die Expression der NKG2D Liganden auf der Oberfläche (Abbildung 4-18). Im Gegen-

satz dazu zeigten Wu und Kollegen, dass isolierte Glioblastomzellen nach 24stündiger Behandlung mit IFN- γ die NKG2D Liganden verstärkt exprimieren (Wu et al., 2007). Dadurch konnten diese Zellen NCR- und NKG2D-vermittelt deutlich besser durch NK-Zellen lysiert werden. Zwar exprimierten die Zellen der Glioblastomzelllinie Ma-Glio 4a nach ca. zwölf Stunden ebenfalls mehr MICA und ULBP2 auf ihrer Oberfläche, die Zunahme war allerdings nicht so ausgeprägt, wie die Daten von Wu et al. zeigen (Abbildung 4-19). Die in dieser Arbeit generierten Daten demonstrierten aber auch deutlich, dass über 24 Stunden hinaus die Expression der NKG2D Liganden nach IFN- γ Inkubation stark abfällt.

Die Zelltypen, aus denen Melanom- und Glioblastomzellen resultieren (Melanozyten und Gliazellen) gehen aus einem gemeinsamen neuroektodermalen Vorläufer hervor. Beide Tumorarten reduzieren in Abhängigkeit von IFN- γ die Oberflächenexpression diverser NKG2D Liganden. Daher wäre es interessant zu erfahren, ob diesem Effekt ein Zelltyp-spezifischer Regulationsmechanismus zugrunde liegt, der auch auf anderen Tumorzelllinien gleichen Ursprungs vorzufinden ist. Weitere Untersuchungen in diesem Bereich, wie beispielsweise durch Analyse des Medullablastoms, könnten darüber Aufschluss bringen. Allerdings zeichnen sich die Zellen des Medullablastom nur durch einen geringen Gehalt an NKG2D Liganden auf der Oberfläche aus (Castriconi et al., 2007). Daher führt die Blockierung der NKG2D-Liganden-Interaktion lediglich in einer von drei analysierten Tumorzelllinien zu einer signifikanten Beeinträchtigung der NKG2D-vermittelten Lyse (Castriconi et al., 2007).

Die erzielten Ergebnisse dieser Arbeit weisen daraufhin, dass IFN- γ nur in bestimmten Tumorarten die Expression der NKG2D Liganden eindeutig reduzieren kann. Demnach wird die NKG2D Ligandenexpression in anderen Tumorarten entweder nicht durch IFN- γ beeinflusst oder sie sind in der Lage der IFN- γ -induzierten Reduktion der Liganden auf der Oberfläche entgegen zu wirken.

5.4 Interaktion zwischen Tumor und Natürlichen Killerzellen *in vivo* und der potentielle Einfluss von IFN- γ

Die Aktivität des Immunsystems ist in Krebs-Patienten, vor allem in Melanompatienten mit Tumoren im fortgeschrittenen Stadium, häufig vermindert (Konjevic et al., 2007). Da das Melanom oft resistent bezüglich Chemotherapie, jedoch auch hochgradig immunogen ist, wird unter anderem durch den therapeutischen Einsatz der Zytokine IL-2, IFN- α und IFN- γ versucht, das Immunsystem zu stimulieren (Atkins, 2006; Garbe & Eigentler, 2004; Konjevic

et al., 2003). So haben Moschos und Kollegen bei der systemischen Gabe hoher Konzentrationen von IFN- α gesteigerte Konzentrationen von Lymphozyten (CD3⁺), DC (CD11⁺ CD86⁺) und auch in geringerem Maße von NK-Zellen (CD56⁺) in der unmittelbaren Tumorumgebung des Melanoms festgestellt (Moschos et al., 2006). Jedoch haben Melanompatienten eine allgemein verminderte Aktivität von NK-Zellen des peripheren Blutes (Konjevic et al., 2007). Bezogen auf die absolute Anzahl an NK-Zellen, ist hierbei das Aufkommen an CD3⁻CD16⁺CD56⁺ NK-Zellen deutlich geringer. Auch weitere Untersuchungen zeigen, dass Melanom-Patienten eine schlechtere NK Aktivität besitzen. Im Rahmen einer Therapie mit DITC+IFN- α in Melanom-Patienten kann diese Aktivität nach dem ersten Zyklus kurzfristig signifikant verbessert werden, wobei die Anzahl an peripheren CD16⁺CD56⁺ NK-Zellen konstant bleibt (Konjevic et al., 2003). Der Einfluss von NKG2D ist in diesen Studien allerdings nicht untersucht worden.

Histologische Untersuchungen können die Expression von MICA und MICB in Geweben primärer und metastatischer Melanome nachweisen, welche von CD3⁺ und CD56⁺ Zellen, die gleichzeitig NKG2D exprimieren, infiltriert werden (Vetter et al., 2002). Eine Induktion von MICA/B auf mehr als 10% der Tumorzellen nach Therapie mit Fotemustin, IFN- α und IL-2 wurde bei einem Patienten mit uvealen Melanometastasen erzielt (Vetter et al., 2004). Gleichzeitig konnte eine Infiltration von CD3⁻CD57⁺ Zellen beobachtet werden. Zudem können $\gamma\delta$ T-Zellen, die ebenfalls über den NKG2D Rezeptor aktivierbar sind, in verschiedene Tumore einwandern, welche MICA und MICB exprimieren (Groh et al., 1999).

Die Frage, die sich daraus ergibt ist, weshalb Tumorzellen, im Besonderen Melanomzellen, die *in vivo* die aktivierenden Liganden des NKG2D Rezeptors exprimieren, nicht von infiltrierenden Zellen des Immunsystems erkannt und lysiert werden. Eine Ursache könnten die zu geringe Dichte an NKG2D Liganden auf der Oberfläche von Tumorzellen sein. Möglicherweise liegt diese Konzentration unter einem Grenzwert, so dass eine effektive Aktivierung der NK-Zellen nicht möglich ist (siehe auch Kapitel 5.2.2.2). Freigesetzt durch Metalloproteinasen, reduziert sich die Oberflächenexpression der Liganden, welche dann an den NKG2D Rezeptor auf NK- und T-Zellen binden (Waldhauer & Steinle, 2006). Daraufhin wird der NKG2D-Liganden-Komplex internalisiert und die NKG2D-vermittelte Aktivität vermindert (Dobrovina et al., 2003; Song et al., 2006). Auch durch lang anhaltende Stimulation membranständige Liganden kann die Aktivität muriner NK-Zellen eingeschränkt werden (Coudert et al., 2005). Dieser Mechanismus der Inaktivierung von NK-Zellen wird in gesunden Menschen möglicherweise genutzt, um eine Immunantwort durch die NK-Zellen zu terminieren oder sie zumindest zu begrenzen.

Einige Tumorarten, darunter, das Neuroblastom und eingeschränkt das Melanom, sind durch hohe Konzentrationen an freien NKG2D Liganden im Serum der Patienten charakterisiert (Raffaghello et al., 2004; Salih et al., 2003; Waldhauer & Steinle, 2006; S. Ugurel, persönliche Kommunikation). Dadurch kann eine Anergie der NK- und T-Zellen induziert werden. Interessanterweise konnte im Rahmen einer Studie der Einsatz von anti-CTLA-4 Antikörper oder auch die Vakzinierung mit bestrahlten, GM-CSF sekretierenden autologen Tumorzellen eine gesteigerte anti-MICA Antikörper Konzentration im Serum von Melanompatienten bewirken und so den Gehalt an sMICA reduzieren (Jinushi et al., 2006). Dieser verringerten Konzentration an sMICA folgte eine gesteigerte NKG2D-Expression auf NK- und CD8⁺-Zellen, welche in einer verbesserten Zytotoxizität gegenüber dem Tumor resultierte. Zudem vermittelten die anti-MICA Antikörper die Komplement-abhängige Lyse der Tumorzellen und erhöhten die Kreuz-Präsentation der Tumorantigene durch Dendritische Zellen. Eine genaue Erklärung wie diese beiden Therapien auf die Antikörper-Produktion einwirken, wurde nicht beschrieben.

Die in dieser Arbeit erzielten Beobachtungen könnten erklären, inwiefern IFN- γ eine Rolle in der Aufhebung der Anergie der NK-Zellen spielen könnte, die in Folge erhöhter Konzentrationen an freien NKG2D Liganden auftritt. Die Expression der NKG2D Liganden auf der Oberfläche der Zielzellen wird durch das von aktivierten T- oder NK-Zellen sekretierte IFN- γ reduziert. Schließlich sind kaum noch Liganden vorhanden, welche an NKG2D binden können, um eine erneute Internalisierung des NKG2D-Liganden-Komplex zu induzieren. Durch das Fehlen der NKG2D Liganden könnte sich der Gehalt an NKG2D auf den NK-Zellen wieder normalisieren.

Eine eingeschränkte Aktivität von NK-Zellen ist auch in Lungen- und Kolonkrebspatienten feststellbar, die eine erhöhte Konzentrationen von TGF- β im Serum aufweisen (Lee et al., 2004). Das immunsuppressive Zytokin TGF- β wird besonders von Tumorzellen, sowie von regulatorischen T-Zellen sekretiert (Kim et al., 2006; Yu & Fu, 2006). TGF- β induziert das Wachstum von Fibroblasten und Stromazellen, die unter anderem angiogenische Faktoren freisetzen und so das Wachstum des Tumors verbessern (Kim et al., 2006). Regulatorische T-Zellen sind durch Sekretion von TGF- β in der Lage, die Expression von NKG2D zu reduzieren und dadurch die NKG2D-vermittelte NK-Zellaktivität zu vermindern (Friese et al., 2004; Smyth et al., 2006). Bemerkenswert ist, dass TGF- β sowohl den RNA, als auch den Proteingehalt von NKG2D von NK- und T-Zellen herabregulieren kann (Castriconi et al., 2003; Friese et al., 2004; Lee et al., 2004; Zhang et al., 2005). Darüber hinaus bewirkt TGF- β in

Glioblastomzellen eine verminderte Expression der NKG2D Liganden (Eisele et al., 2006; Friese et al., 2004). Hierbei zeigt sich, dass TGF- β sowohl transkriptionell, als auch translational MICA, ULBP2 und ULBP4 reduzieren kann. Dadurch werden derart behandelte Glioblastomzellen weniger häufig durch polyklonale NK-Zellen erkannt. Die beiden Zytokine TGF- β und IFN- γ scheinen sich in ihrer Wirkungsweise bezüglich NKG2D und dessen Liganden ähnlich zu sein. Bislang sind sie aber die einzigen beschriebenen Moleküle, welche sowohl eine Reduktion von NKG2D, als auch der NKG2D Liganden bewirken können (Bui et al., 2006; Castriconi et al., 2003; Friese et al., 2004, Lee et al., 2004; Zhang et al., 2005; diese Arbeit). Ob durch IFN- γ und TGF- β die Expression weiterer Liganden aktivierender Rezeptoren verringert wird oder inhibierend wirkende Liganden verstärkt exprimiert werden, ist nicht bekannt.

Eine weitere Frage, die es noch eindeutig zu klären gilt, ist, welche Immunzellen in der Tumorumgebung in der Lage sind, IFN- γ zu sekretieren. Aktivierte Natürliche Killerzellen können das Zytokin zwar sekretieren, allerdings scheinen sie, wie bereits erwähnt, nur in geringer Anzahl im Tumor vorhanden zu sein. Aber auch CD8⁺ T-Lymphozyten stellen eine Quelle der IFN- γ Sekretion dar. Bislang weisen Versuche im Tiermodell daraufhin, dass tatsächlich mehrheitlich T-Zellen das Zytokin im Tumor produzieren (Bui et al., 2006) .

Das Interessante an IFN- γ ist, dass es auf der Oberfläche einerseits die NKG2D Liganden reduziert und andererseits die Konzentration der HLA Klasse I Moleküle deutlich erhöht. Durch eine verstärkte HLA Klasse I Expression können T-Zellen effizienter aktiviert werden. Die angeborene Immunantwort könnte so mittels IFN- γ in Richtung einer adaptiven Antwort verschoben werden, welche sich durch eine starke Expression von HLA Klasse I und durch eine geringe Expression der NKG2D Liganden auszeichnet. Melanomzellen zeigen hingegen in vielen histologischen Untersuchungen eine geringe HLA Klasse I Expression. Ein geringer Anteil der Melanomzellen ist aufgrund von Mutationen im β 2 Mikroglobulin Gen überhaupt nicht mehr in der Lage HLA Klasse I Moleküle auf der Oberfläche zu exprimieren und entgeht dadurch völlig der Erkennung durch T-Zellen. Basierend auf der Reduktion der NKG2D Ligandenexpression in Abhängigkeit von IFN- γ , könnten sich die Tumorzellen unter bestimmten Bedingungen somit auch einer NKG2D-vermittelten angeborenen Immunantwort entziehen. Dennoch sollte der Einfluss des angeborenen Immunsystems, insbesondere der NK-Zellen, bei der künftigen Entwicklung von Therapien für Melanom-Patienten stärker berücksichtigt werden. Erste Ansätze dafür finden sich in der prä-klinischen Studie von Germain

und Kollegen (Germain et al., 2005). Sie koppelten rekombinantes MICA an ein Fab' Fragment, unter anderem von monoklonalen CEA Antikörpern (Fab-rMICA). Dadurch konnten MICA-negative Tumorzelllinien, welche den entsprechenden Tumormarker CEA exprimierten, mit Fab-rMICA markiert werden. Diese Zellen konnten schließlich auch signifikant besser NKG2D-vermittelt durch NK-Zellen lysiert werden. Diese Methode hat den Vorteil, dass viele *in vivo* negative Tumore für MIC oder ULBP nun durch NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen erkannt und zerstört werden können. Zudem erhalten CTL durch die Anwesenheit der MIC Moleküle kostimulatorische Signale.

Insgesamt stellt die Tumorumgebung ein kompliziertes Regulationsnetzwerk dar, welches therapeutisch nicht einfach zu durchbrechen ist. Für die Behandlung des malignen Melanoms ist es in Zukunft von besonderer Bedeutung, die immunogenen Eigenschaften des Tumors zu nutzen. Neue Therapien sollten daher auf eine verbesserte Aktivierung des Immunsystems ausgerichtet sein, wofür zunächst eingehende Untersuchungen notwendig sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben dazu beigetragen, die komplexen Interaktionen zwischen Tumor und Zellen des Immunsystems besser verstehen zu können. Nur wenn diese Wechselwirkungen eingehend analysiert sind, können die Therapien zur Behandlung des Melanoms und damit auch die Überlebensdauer der Melanompatienten entscheidend verbessert werden.

6 Literaturverzeichnis

- Acosta-Rodriguez EV, Merino MC, Montes CL, Motran CC, Gruppi A. 2007. Cytokines and chemokines shaping the B-cell compartment. *Cytokine & growth factor reviews* 18(1-2):73-83.
- Aida K, Russomando G, Kikuchi M, Candia N, Franco L, Almiron M, Ubalee R, Hirayama K. 2002. High frequency of MIC null haplotype (HLA-B48-MICA-del-MICB*0107 N) in the Angaité Amerindian community in Paraguay. *Immunogenetics* 54(6):439-441.
- Aki M, Shimbara N, Takashina M, Akiyama K, Kagawa S, Tamura T, Tanahashi N, Yoshimura T, Tanaka K, Ichihara A. 1994. Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *Journal of biochemistry* 115(2):257-269.
- Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. 2006. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol* 126(1):32-41.
- Armeanu S, Bitzer M, Lauer UM, Venturelli S, Pathil A, Krusch M, Kaiser S, Jobst J, Smirnow I, Wagner A, Steinle A, Salih HR. 2005. Natural killer cell-mediated lysis of hepatoma cells via specific induction of NKG2D ligands by the histone deacetylase inhibitor sodium valproate. *Cancer Res* 65(14):6321-6329.
- Atkins MB. 2006. Cytokine-based therapy and biochemotherapy for advanced melanoma. *Clin Cancer Res* 12(7 Pt 2):2353s-2358s.
- Avril T, Floyd H, Lopez F, Vivier E, Crocker PR. 2004. The membrane-proximal immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif is critical for the inhibitory signaling mediated by Siglecs-7 and -9, CD33-related Siglecs expressed on human monocytes and NK cells. *J Immunol* 173(11):6841-6849.
- Bacon L, Eagle RA, Meyer M, Easom N, Young NT, Trowsdale J. 2004. Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D. *J Immunol* 173(2):1078-1084.
- Baeriswyl V, Wodnar-Filipowicz A, Kalberer CP. 2006. The effect of silencing NKG2D through RNA interference on receptor functions in interleukin-2-activated human natural killer cells. *Haematologica*.
- Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. 1994. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(14):6259-6263.
- Barber DF, Faure M, Long EO. 2004. LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity. *J Immunol* 173(6):3653-3659.
- Basham TY, Merigan TC. 1983. Recombinant interferon-gamma increases HLA-DR synthesis and expression. *J Immunol* 130(4):1492-1494.
- 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(5428):727-729.
- Billadeau DD, Upshaw JL, Schoon RA, Dick CJ, Leibson PJ. 2003. NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nature immunology* 4(6):557-564.
- Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. 1989. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *The New England journal of medicine* 320(26):1731-1735.

- Boehm U, Guethlein L, Klamp T, Ozbek K, Schaub A, Futterer A, Pfeffer K, Howard JC. 1998. Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma. *J Immunol* 161(12):6715-6723.
- Boissel N, Rea D, Tieng V, Dulphy N, Brun M, Cayuela JM, Rousselot P, Tamouza R, Le Bouteiller P, Mahon FX, Steinle A, Charron D, Dombret H, Toubert A. 2006. BCR/ABL oncogene directly controls MHC class I chain-related molecule A expression in chronic myelogenous leukemia. *J Immunol* 176(8):5108-5116.
- Borchers MT, Harris NL, Wesselkamper SC, Vitucci M, Cosman D. 2006a. NKG2D ligands are expressed on stressed human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291(2):L222-231.
- Borchers MT, Harris NL, Wesselkamper SC, Zhang S, Chen Y, Young L, Lau GW. 2006b. The NKG2D-activating receptor mediates pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 74(5):2578-2586.
- Borrego F, Alonso MC, Galiani MD, Carracedo J, Ramirez R, Ostos B, Pena J, Solana R. 1999. NK phenotypic markers and IL2 response in NK cells from elderly people. *Experimental gerontology* 34(2):253-265.
- 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(4):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(3):235-246.
- Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Moretta A. 1995. Receptors for HLA class I molecules in human NK cells. *Seminars in immunology* 7(2):67-73.
- Braud VM, Allan DS, 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(6669):795-799.
- Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, Einhorn E, Herlyn M, Minna J, Nicholson A, Roth JA, Albelda SM, Davies H, Cox C, Brignell G, Stephens P, Futreal PA, Wooster R, Stratton MR, Weber BL. 2002. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 62(23):6997-7000.
- Brown MH, Boles K, van der Merwe PA, Kumar V, Mathew PA, Barclay AN. 1998. 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J Exp Med* 188(11):2083-2090.
- Buettner PG, Leiter U, Eigentler TK, Garbe C. 2005. Development of prognostic factors and survival in cutaneous melanoma over 25 years: An analysis of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *Cancer* 103(3):616-624.
- Bui JD, Carayannopoulos LN, Lanier LL, Yokoyama WM, Schreiber RD. 2006. IFN-dependent down-regulation of the NKG2D ligand H60 on tumors. *J Immunol* 176(2):905-913.
- Burgess SJ, Marusina AI, Pathmanathan I, Borrego F, Coligan JE. 2006. IL-21 down-regulates NKG2D/DAP10 expression on human NK and CD8+ T cells. *J Immunol* 176(3):1490-1497.

- Burns GF, Triglia T, Werkmeister JA, Begley CG, Boyd AW. 1985. TLI SA1, a human T lineage-specific activation antigen involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes and anomalous killer cells from their precursors. *J Exp Med* 161(5):1063-1078.
- Cao W, Xi X, Hao Z, Li W, Kong Y, Cui L, Ma C, Ba D, He W. 2007. RAET1E2, a Soluble Isoform of the UL16-binding Protein RAET1E Produced by Tumor Cells, Inhibits NKG2D-mediated NK Cytotoxicity. *The Journal of biological chemistry* 282(26):18922-18928.
- Carlsten M, Bjorkstrom NK, Norell H, Bryceson Y, van Hall T, Baumann BC, Hanson M, Schedvins K, Kiessling R, Ljunggren HG, Malmberg KJ. 2007. DNAX accessory molecule-1 mediated recognition of freshly isolated ovarian carcinoma by resting natural killer cells. *Cancer Res* 67(3):1317-1325.
- Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. 2003. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(7):4120-4125.
- Castriconi R, Dondero A, Augugliaro R, Cantoni C, Carnemolla B, Sementa AR, Negri F, Conte R, Corrias MV, Moretta L, Moretta A, Bottino C. 2004. Identification of 4Ig-B7-H3 as a neuroblastoma-associated molecule that exerts a protective role from an NK cell-mediated lysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(34):12640-12645.
- Castriconi R, Dondero A, Negri F, Bellora F, Nozza P, Carnemolla B, Raso A, Moretta L, Moretta A, Bottino C. 2007. Both CD133(+) and CD133(-) medulloblastoma cell lines express ligands for triggering NK receptors and are susceptible to NK-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol* 37(11):3190-3196.
- Cerboni C, Zingoni A, Cippitelli M, Piccoli M, Frati L, Santoni A. 2007. Antigen-activated human T lymphocytes express cell-surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to autologous NK-cell lysis. *Blood* 110(2):606-615.
- Cerwenka A, Bakker AB, McClanahan T, Wagner J, Wu J, Phillips JH, Lanier LL. 2000. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* 12(6):721-727.
- Chalupny JN, Sutherland CL, Lawrence WA, Rein-Weston A, Cosman D. 2003. ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. *Biochem Biophys Res Commun* 305(1):129-135.
- Chalupny NJ, Rein-Weston A, Dosch S, Cosman D. 2006. Down-regulation of the NKG2D ligand MICA by the human cytomegalovirus glycoprotein UL142. *Biochem Biophys Res Commun* 346(1):175-181.
- Chang C, Dietrich J, Harpur AG, Lindquist JA, Haude A, Loke YW, King A, Colonna M, Trowsdale J, Wilson MJ. 1999. Cutting edge: KAP10, a novel transmembrane adapter protein genetically linked to DAP12 but with unique signaling properties. *J Immunol* 163(9):4651-4654.
- Chapman TL, Heikeman AP, Bjorkman PJ. 1999. The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity* 11(5):603-613.
- Chuang SS, Kim MH, Johnson LA, Albertsson P, Kitson RP, Nannmark U, Goldfarb RH, Mathew PA. 2000. 2B4 stimulation of YT cells induces natural killer cell cytolytic function and invasiveness. *Immunology* 100(3):378-383.

- Chuang SS, Kumaresan PR, Mathew PA. 2001. 2B4 (CD244)-mediated activation of cytotoxicity and IFN-gamma release in human NK cells involves distinct pathways. *J Immunol* 167(11):6210-6216.
- Collins RW. 2004. Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation. *Eur J Immunogenet* 31(3):105-114.
- Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP. 2003. What does it take to make a natural killer? *Nature reviews* 3(5):413-425.
- Cooper MA, Bush JE, Fehniger TA, VanDeusen JB, Waite RE, Liu Y, Aguila HL, Caligiuri MA. 2002. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood* 100(10):3633-3638.
- Cooper MA, Fehniger TA, Fuchs A, Colonna M, Caligiuri MA. 2004. NK cell and DC interactions. *Trends in immunology* 25(1):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(10):3146-3151.
- 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(2):123-133.
- Costin GE, Hearing VJ. 2007. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *Faseb J* 21(4):976-994.
- Coudert JD, Zimmer J, Tomasello E, Cebecauer M, Colonna M, Vivier E, Held W. 2005. Altered NKG2D function in NK cells induced by chronic exposure to NKG2D ligand-expressing tumor cells. *Blood* 106(5):1711-1717.
- D'Urso CM, Wang ZG, Cao Y, Tatake R, Zeff RA, Ferrone S. 1991. Lack of HLA class I antigen expression by cultured melanoma cells FO-1 due to a defect in B2m gene expression. *The Journal of clinical investigation* 87(1):284-292.
- De Lerna Barbaro A, Frumento G, Procopio FA, Accolla RS. 2005. MHC immunoevasins: protecting the pathogen reservoir in infection. *Tissue antigens* 66(1):2-8.
- de Vries E, Coebergh JW. 2004. Cutaneous malignant melanoma in Europe. *Eur J Cancer* 40(16):2355-2366.
- Degli-Esposti MA, Smyth MJ. 2005. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nature reviews* 5(2):112-124.
- Delves PJ, Roitt IM. 2000a. The immune system. First of two parts. *The New England journal of medicine* 343(1):37-49.
- Delves PJ, Roitt IM. 2000b. The immune system. Second of two parts. *The New England journal of medicine* 343(2):108-117.
- Denison SR, Callahan G, Becker NA, Phillips LA, Smith DI. 2003. Characterization of FRA6E and its potential role in autosomal recessive juvenile parkinsonism and ovarian cancer. *Genes, chromosomes & cancer* 38(1):40-52.
- Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH. 1998. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(26):15623-15628.
- Diefenbach A, Raulet DH. 2001. Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunological reviews* 181:170-184.

- Diepgen TL, Mahler V. 2002. The epidemiology of skin cancer. *The British journal of dermatology* 146 Suppl 61:1-6.
- Dobrovina ES, Dobrovin MM, Vider E, Sisson RB, O'Reilly RJ, Dupont B, Vyas YM. 2003. Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. *J Immunol* 171(12):6891-6899.
- Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, Royal RE, Kammula U, White DE, Mavroukakis SA, Rogers LJ, Gracia GJ, Jones SA, Mangiameli DP, Pelletier MM, Gea-Banacloche J, Robinson MR, Berman DM, Filie AC, Abati A, Rosenberg SA. 2005. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 23(10):2346-2357.
- Dunn C, Chalupny NJ, Sutherland CL, Dosch S, Sivakumar PV, Johnson DC, Cosman D. 2003. Human cytomegalovirus glycoprotein UL16 causes intracellular sequestration of NKG2D ligands, protecting against natural killer cell cytotoxicity. *J Exp Med* 197(11):1427-1439.
- Eagle RA, Traherne JA, Ashiru O, Wills MR, Trowsdale J. 2006. Regulation of NKG2D ligand gene expression. *Hum Immunol* 67(3):159-169.
- Eagle RA, Trowsdale J. 2007. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nature reviews* 7(9):737-744.
- Eisele G, Wischhusen J, Mittelbronn M, Meyermann R, Waldhauer I, Steinle A, Weller M, Friese MA. 2006. TGF-beta and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells. *Brain* 129(Pt 9):2416-2425.
- Eleme K, Taner SB, Onfelt B, Collinson LM, McCann FE, Chalupny NJ, Cosman D, Hopkins C, Magee AI, Davis DM. 2004. Cell surface organization of stress-inducible proteins ULBP and MICA that stimulate human NK cells and T cells via NKG2D. *J Exp Med* 199(7):1005-1010.
- Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Munz C. 2002. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKP30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 195(3):343-351.
- Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet M, Tursz T, Maraskovsky E, Zitvogel L. 1999. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nature medicine* 5(4):405-411.
- Friedman RL, Manly SP, McMahon M, Kerr IM, Stark GR. 1984. Transcriptional and post-transcriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells. *Cell* 38(3):745-755.
- Friese MA, Platten M, Lutz SZ, Naumann U, Aulwurm S, Bischof F, Buhring HJ, Dichgans J, Rammensee HG, Steinle A, Weller M. 2003. MICA/NKG2D-mediated immunogene therapy of experimental gliomas. *Cancer Res* 63(24):8996-9006.
- Friese MA, Wischhusen J, Wick W, Weiler M, Eisele G, Steinle A, Weller M. 2004. RNA interference targeting transforming growth factor-beta enhances NKG2D-mediated anti-glioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity in vivo. *Cancer Res* 64(20):7596-7603.
- Garbe C, Eigentler TK. 2004. [Therapy of malignant melanoma at the stage of distant metastasis]. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 55(2):195-213.

- Garbe C, Eigentler TK. 2007. Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of the art 2006. *Melanoma research* 17(2):117-127.
- Garrity D, Call ME, Feng J, Wucherpennig KW. 2005. The activating NKG2D receptor assembles in the membrane with two signaling dimers into a hexameric structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(21):7641-7646.
- Germain C, Larbouret C, Cesson V, Donda A, Held W, Mach JP, Pelegri A, Robert B. 2005. MHC class I-related chain A conjugated to antitumor antibodies can sensitize tumor cells to specific lysis by natural killer cells. *Clin Cancer Res* 11(20):7516-7522.
- Gonen-Gross T, Achdout H, Gazit R, Hanna J, Mizrahi S, Markel G, Goldman-Wohl D, Yagel S, Horejsi V, Levy O, Baniyash M, Mandelboim O. 2003. Complexes of HLA-G protein on the cell surface are important for leukocyte Ig-like receptor-1 function. *J Immunol* 171(3):1343-1351.
- Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. 2007. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445(7130):851-857.
- Greenlund AC, Morales MO, Viviano BL, Yan H, Krolewski J, Schreiber RD. 1995. Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process. *Immunity* 2(6):677-687.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(22):12445-12450.
- Groh V, Bruhl A, El-Gabalawy H, Nelson JL, Spies T. 2003. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(16):9452-9457.
- Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. 2001. Costimulation of CD8 α beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nature immunology* 2(3):255-260.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(12):6879-6884.
- Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. 2002. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419(6908):734-738.
- Grossi CE, Cadoni A, Zicca A, Leprini A, Ferrarini M. 1982. Large granular lymphocytes in human peripheral blood: ultrastructural and cytochemical characterization of the granules. *Blood* 59(2):277-283.
- Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. 1975a. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *International journal of cancer* 16(2):230-239.
- Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. 1975b. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *International journal of cancer* 16(2):216-229.

- Hoglund M, Gisselsson D, Hansen GB, White VA, Sall T, Mitelman F, Horsman D. 2004. Dissecting karyotypic patterns in malignant melanomas: temporal clustering of losses and gains in melanoma karyotypic evolution. *International journal of cancer* 108(1):57-65.
- Hokland M, Kuppen PJ. 2005. Natural killer cells: from "disturbing" background to central players of immune responses. *Molecular immunology* 42(4):381-383.
- Holly EA, Kelly JW, Shpall SN, Chiu SH. 1987. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology* 17(3):459-468.
- Houchins JP, Yabe T, McSherry C, Bach FH. 1991. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* 173(4):1017-1020.
- Hughes EH, Collins RW, Kondeatis E, Wallace GR, Graham EM, Vaughan RW, Stanford MR. 2005. Associations of major histocompatibility complex class I chain-related molecule polymorphisms with Behcet's disease in Caucasian patients. *Tissue antigens* 66(3):195-199.
- Ito M, Maruyama T, Saito N, Koganei S, Yamamoto K, Matsumoto N. 2006. Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *J Exp Med* 203(2):289-295.
- Ivanov SV, Salnikow K, Ivanova AV, Bai L, Lerman MI. 2007. Hypoxic repression of STAT1 and its downstream genes by a pVHL/HIF-1 target DEC1/STRA13. *Oncogene* 26(6):802-812.
- Jack A, Boyes C, Aydin N, Alam K, Wallack M. 2006. The treatment of melanoma with an emphasis on immunotherapeutic strategies. *Surgical oncology* 15(1):13-24.
- Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, Xiong N, Carlyle JR, Raulet DH. 2002. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* 17(1):19-29.
- Jiang K, Zhong B, Gilvary DL, Corliss BC, Hong-Geller E, Wei S, Djeu JY. 2000. Pivotal role of phosphoinositide-3 kinase in regulation of cytotoxicity in natural killer cells. *Nature immunology* 1(5):419-425.
- Jinushi M, Hodi FS, Dranoff G. 2006. Therapy-induced antibodies to MHC class I chain-related protein A antagonize immune suppression and stimulate antitumor cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(24):9190-9195.
- Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Groh V, Spies T, Miyagi T, Suzuki T, Sasaki Y, Hayashi N. 2003a. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 170(3):1249-1256.
- Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Groh V, Spies T, Kimura R, Miyagi T, Mochizuki K, Sasaki Y, Hayashi N. 2003b. Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid. *International journal of cancer* 104(3):354-361.
- Jonges LE, Albertsson P, van Vlierberghe RL, Ensink NG, Johansson BR, van de Velde CJ, Fleuren GJ, Nannmark U, Kuppen PJ. 2001. The phenotypic heterogeneity of human natural killer cells: presence of at least 48 different subsets in the peripheral blood. *Scandinavian journal of immunology* 53(2):103-110.

- Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. 1986. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319(6055):675-678.
- Kashii Y, Giorda R, Herberman RB, Whiteside TL, Vujanovic NL. 1999. Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J Immunol* 163(10):5358-5366.
- Kasper B, D'Hondt V, Vereecken P, Awada A. 2007. Novel treatment strategies for malignant melanoma: a new beginning? *Critical reviews in oncology/hematology* 62(1):16-22.
- Kato N, Tanaka J, Sugita J, Toubai T, Miura Y, Ibata M, Syono Y, Ota S, Kondo T, Asaka M, Imamura M. 2007. Regulation of the expression of MHC class I-related chain A, B (MICA, MICB) via chromatin remodeling and its impact on the susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells. *Leukemia*.
- Katz G, Gazit R, Arnon TI, Gonen-Gross T, Tarcic G, Markel G, Gruda R, Achdout H, Drize O, Merims S, Mandelboim O. 2004. MHC class I-independent recognition of NK-activating receptor KIR2DS4. *J Immunol* 173(3):1819-1825.
- Kennedy C, Naipal A, Gruis NA, Struijk L, ter Schegget J, Willemze R, Claas FH, Bouwes Bavinck JN, Doxiadis, II. 2002. MICA gene polymorphism is not associated with an increased risk for skin cancer. *J Invest Dermatol* 118(4):686-691.
- Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. 1975a. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 5(2):117-121.
- Kiessling R, Klein E, Wigzell H. 1975b. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 5(2):112-117.
- Kim R, Emi M, Tanabe K, Arihiro K. 2006. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res* 66(11):5527-5536.
- Klasa RJ, Bally MB, Ng R, Goldie JH, Gascoyne RD, Wong FM. 2000. Eradication of human non-Hodgkin's lymphoma in SCID mice by BCL-2 antisense oligonucleotides combined with low-dose cyclophosphamide. *Clin Cancer Res* 6(6):2492-2500.
- Kleeberg UR, Suci S, Brocker EB, Ruitter DJ, Chartier C, Lienard D, Marsden J, Schadendorf D, Eggermont AM. 2004. Final results of the EORTC 18871/DKG 80-1 randomised phase III trial. rIFN-alpha2b versus rIFN-gamma versus ISCADOR M versus observation after surgery in melanoma patients with either high-risk primary (thickness >3 mm) or regional lymph node metastasis. *Eur J Cancer* 40(3):390-402.
- Komatsu-Wakui M, Tokunaga K, Ishikawa Y, Leelayuwat C, Kashiwase K, Tanaka H, Moriyama S, Nakajima F, Park MH, Jia GJ, Chimge NO, Sideltseva EW, Juji T. 2001. Wide distribution of the MICA-MICB null haplotype in East Asians. *Tissue antigens* 57(1):1-8.
- Konjevic G, Jovic V, Jurisic V, Radulovic S, Jelic S, Spuzic I. 2003. IL-2-mediated augmentation of NK-cell activity and activation antigen expression on NK- and T-cell subsets in patients with metastatic melanoma treated with interferon-alpha and DTIC. *Clinical & experimental metastasis* 20(7):647-655.
- Konjevic G, Mirjagic Martinovic K, Vuletic A, Jovic V, Jurisic V, Babovic N, Spuzic I. 2007. Low expression of CD161 and NKG2D activating NK receptor is associated with impaired NK cell cytotoxicity in metastatic melanoma patients. *Clinical & experimental metastasis* 24(1):1-11.

- Krishnaraj R, Bhooma T. 1996. Cytokine sensitivity of human NK cells during immunosenescence. 2. IL2-induced interferon gamma secretion. *Immunology letters* 50(1-2):59-63.
- Kumar V, McNerney ME. 2005. A new self: MHC-class-I-independent natural-killer-cell self-tolerance. *Nature reviews* 5(5):363-374.
- Lanier LL. 2005. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23:225-274.
- Lanier LL, Corliss B, Wu J, Phillips JH. 1998a. Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* 8(6):693-701.
- Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips JH. 1998b. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 391(6668):703-707.
- Lasithiotakis KG, Leiter U, Gorkiewicz R, Eigentler T, Breuninger H, Metzler G, Strobel W, Garbe C. 2006. The incidence and mortality of cutaneous melanoma in Southern Germany: trends by anatomic site and pathologic characteristics, 1976 to 2003. *Cancer* 107(6):1331-1339.
- Le Drea E, Vely F, Olcese L, Cambiaggi A, Guida S, Krystal G, Gervois N, Moretta A, Jotereau F, Vivier E. 1998. Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases. *Eur J Immunol* 28(1):264-276.
- Lee JC, Lee KM, Kim DW, Heo DS. 2004. Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *J Immunol* 172(12):7335-7340.
- Lee N, Llano M, Carretero M, Ishitani A, Navarro F, Lopez-Botet M, Geraghty DE. 1998. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(9):5199-5204.
- Lehnert M, Eberle A, Hentschel S, Katalinic A, Kieschke J, Schmidtman I, Schubert-Fritschle G, Stegmaier C, Hense H-W. 2005. Das maligne Melanom der Haut in epidemiologischen Krebsregistern in Deutschland – Inzidenz, klinische Parameter, Variationen in der Erhebung. *Gesundheitswesen* 67:729-735.
- Lejeune FJ. 2006. Anticytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 treatment--can melanoma be cured at the expense of autoimmune disorders? *Melanoma research* 16(5):377-378.
- Levy C, Khaled M, Fisher DE. 2006. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends in molecular medicine* 12(9):406-414.
- Li P, Morris DL, Willcox BE, Steinle A, Spies T, Strong RK. 2001. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nature immunology* 2(5):443-451.
- Linsen L, Somers V, Stinissen P. 2005. Immunoregulation of autoimmunity by natural killer T cells. *Hum Immunol* 66(12):1193-1202.
- Ljunggren HG, Karre K. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology today* 11(7):237-244.
- Maio M, Gulwani B, Morgano A, Ferrone S. 1989. Differential modulation by tumor necrosis factor and immune interferon of HLA class-II antigens expressed by melanoma cells. *International journal of cancer* 44(3):554-559.

- Makino Y, Kanno R, Ito T, Higashino K, Taniguchi M. 1995. Predominant expression of invariant V alpha 14+ TCR alpha chain in NK1.1+ T cell populations. *International immunology* 7(7):1157-1161.
- Markel G, Lieberman N, Katz G, Arnon TI, Lotem M, Drize O, Blumberg RS, Bar-Haim E, Mader R, Eisenbach L, Mandelboim O. 2002. CD66a interactions between human melanoma and NK cells: a novel class I MHC-independent inhibitory mechanism of cytotoxicity. *J Immunol* 168(6):2803-2810.
- Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, Vachon CM, Schild SE, McWilliams RR, Hand JL, Laman SD, Kottschade LA, Maples WJ, Pittelkow MR, Pulido JS, Cameron JD, Creagan ET. 2007. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clinic proceedings* 82(3):364-380.
- Martin-Pagola A, Perez-Nanclares G, Ortiz L, Vitoria JC, Hualde I, Zaballa R, Preciado E, Castano L, Bilbao JR. 2004. MICA response to gliadin in intestinal mucosa from celiac patients. *Immunogenetics* 56(8):549-554.
- McFarland BJ, Kortemme T, Yu SF, Baker D, Strong RK. 2003. Symmetry recognizing asymmetry: analysis of the interactions between the C-type lectin-like immunoreceptor NKG2D and MHC class I-like ligands. *Structure* 11(4):411-422.
- McFarland BJ, Strong RK. 2003. Thermodynamic analysis of degenerate recognition by the NKG2D immunoreceptor: not induced fit but rigid adaptation. *Immunity* 19(6):803-812.
- Molinero LL, Fuertes MB, Girart MV, Fainboim L, Rabinovich GA, Costas MA, Zwirner NW. 2004. NF-kappa B regulates expression of the MHC class I-related chain A gene in activated T lymphocytes. *J Immunol* 173(9):5583-5590.
- Morelli C, Karayianni E, Magnanini C, Mungall AJ, Thorland E, Negrini M, Smith DI, Barbanti-Brodano G. 2002. Cloning and characterization of the common fragile site FRA6F harboring a replicative senescence gene and frequently deleted in human tumors. *Oncogene* 21(47):7266-7276.
- Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta L. 2000. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytolysis. *Immunology today* 21(5):228-234.
- Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytolysis. *Annu Rev Immunol* 19:197-223.
- Moschos SJ, Edington HD, Land SR, Rao UN, Jukic D, Shipe-Spotloe J, Kirkwood JM. 2006. Neoadjuvant treatment of regional stage IIIB melanoma with high-dose interferon alfa-2b induces objective tumor regression in association with modulation of tumor infiltrating host cellular immune responses. *J Clin Oncol* 24(19):3164-3171.
- Nauta AJ, Roos A, Daha MR. 2004. A regulatory role for complement in innate immunity and autoimmunity. *International archives of allergy and immunology* 134(4):310-323.
- Nedvetzki S, Sowinski S, Eagle RA, Harris J, Vely F, Pende D, Trowsdale J, Vivier E, Gordon S, Davis DM. 2007. Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses. *Blood* 109(9):3776-3785.
- Niu JF, Zhang C, Zhang JH, Xu XQ, Zhang WD, Wang JF, Gao CY. 2006. [Up-regulation of IFN-alpha on expression of MICA in the cervical carcinoma cell lines]. *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology* 22(5):557-559.

- Norris S, Doherty DG, Collins C, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE, O'Farrelly C. 1999. Natural T cells in the human liver: cytotoxic lymphocytes with dual T cell and natural killer cell phenotype and function are phenotypically heterogenous and include Valpha24-JalphaQ and gammadelta T cell receptor bearing cells. *Hum Immunol* 60(1):20-31.
- O'Connor GM, Hart OM, Gardiner CM. 2006. Putting the natural killer cell in its place. *Immunology* 117(1):1-10.
- Ota M, Bahram S, Katsuyama Y, Saito S, Nose Y, Sada M, Ando H, Inoko H. 2000. On the MICA deleted-MICB null, HLA-B*4801 haplotype. *Tissue antigens* 56(3):268-271.
- Paschen A, Arens N, Sucker A, Greulich-Bode KM, Fonsatti E, Gloghini A, Striegel S, Schwinn N, Carbone A, Hildenbrand R, Cerwenka A, Maio M, Schadendorf D. 2006. The coincidence of chromosome 15 aberrations and beta2-microglobulin gene mutations is causative for the total loss of human leukocyte antigen class I expression in melanoma. *Clin Cancer Res* 12(11 Pt 1):3297-3305.
- Paschen A, Mendez RM, Jimenez P, Sucker A, Ruiz-Cabello F, Song M, Garrido F, Schadendorf D. 2003. Complete loss of HLA class I antigen expression on melanoma cells: a result of successive mutational events. *International journal of cancer* 103(6):759-767.
- Pende D, Bottino C, Castriconi R, Cantoni C, Marcenaro S, Rivera P, Spaggiari GM, Dondero A, Carnemolla B, Reymond N, Mingari MC, Lopez M, Moretta L, Moretta A. 2005. PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: involvement in tumor cell lysis. *Molecular immunology* 42(4):463-469.
- Pende D, Castriconi R, Romagnani P, Spaggiari GM, Marcenaro S, Dondero A, Lazzeri E, Lasagni L, Martini S, Rivera P, Capobianco A, Moretta L, Moretta A, Bottino C. 2006. Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction. *Blood* 107(5):2030-2036.
- 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(10):1505-1516.
- Pende D, Rivera P, Marcenaro S, Chang CC, Biassoni R, Conte R, Kubin M, Cosman D, Ferrone S, Moretta L, Moretta A. 2002. Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res* 62(21):6178-6186.
- Peter HH, Pavie-Fischer J, Fridman WH, Aubert C, Cesarini JP, Roubin R, Kourilsky FM. 1975. Cell-mediate cytotoxicity in vitro of human lymphocytes against a tissue culture melanoma cell line (igr3). *J Immunol* 115(2):539-548.
- Poggi A, Venturino C, Catellani S, Clavio M, Miglino M, Gobbi M, Steinle A, Ghia P, Stella S, Caligaris-Cappio F, Zocchi MR. 2004. Vdelta1 T lymphocytes from B-CLL patients recognize ULBP3 expressed on leukemic B cells and up-regulated by trans-retinoic acid. *Cancer Res* 64(24):9172-9179.
- Pross HF, Jondal M. 1975. Cytotoxic lymphocytes from normal donors. A functional marker of human non-T lymphocytes. *Clinical and experimental immunology* 21(2):226-235.
- Radosavljevic M, Bahram S. 2003. In vivo immunogenetics: from MIC to RAET1 loci. *Immunogenetics* 55(1):1-9.

- Radosavljevic M, Cuillerier B, Wilson MJ, Clement O, Wicker S, Gilfillan S, Beck S, Trowsdale J, Bahram S. 2002. A cluster of ten novel MHC class I related genes on human chromosome 6q24.2-q25.3. *Genomics* 79(1):114-123.
- Raffaghello L, Prigione I, Airoidi I, Camoriano M, Levreri I, Gambini C, Pende D, Steinle A, Ferrone S, Pistoia V. 2004. Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia (New York, NY)* 6(5):558-568.
- Raffo A, Lai JC, Stein CA, Miller P, Scaringe S, Khvorova A, Benimetskaya L. 2004. Antisense RNA down-regulation of bcl-2 expression in DU145 prostate cancer cells does not diminish the cytostatic effects of G3139 (Oblimersen). *Clin Cancer Res* 10(9):3195-3206.
- Ramana CV, Chatterjee-Kishore M, Nguyen H, Stark GR. 2000. Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene* 19(21):2619-2627.
- Ramana CV, Gil MP, Han Y, Ransohoff RM, Schreiber RD, Stark GR. 2001. Stat1-independent regulation of gene expression in response to IFN-gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(12):6674-6679.
- Ranson T, Vosshenrich CA, Corcuff E, Richard O, Muller W, Di Santo JP. 2003. IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood* 101(12):4887-4893.
- Ringborg U, Andersson R, Eldh J, Glaumann B, Hafstrom L, Jacobsson S, Jonsson PE, Johansson H, Krysander L, Lagerlof B. 1996. Resection margins of 2 versus 5 cm for cutaneous malignant melanoma with a tumor thickness of 0.8 to 2.0 mm: randomized study by the Swedish Melanoma Study Group. *Cancer* 77(9):1809-1814.
- Robertson MJ. 2002. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Journal of leukocyte biology* 71(2):173-183.
- Robertson MJ, Cameron C, Lazo S, Cochran KJ, Voss SD, Ritz J. 1996a. Costimulation of human natural killer cell proliferation: role of accessory cytokines and cell contact-dependent signals. *Natural immunity* 15(5):213-226.
- Robertson MJ, Cochran KJ, Cameron C, Le JM, Tantravahi R, Ritz J. 1996b. Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. *Experimental hematology* 24(3):406-415.
- Rodriguez T, Mendez R, Del Campo A, Jimenez P, Aptsiauri N, Garrido F, Ruiz-Cabello F. 2007. Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines. *BMC cancer* 7:34.
- Rohner A, Langenkamp U, Siegler U, Kalberer CP, Wodnar-Filipowicz A. 2007. Differentiation-promoting drugs up-regulate NKG2D ligand expression and enhance the susceptibility of acute myeloid leukemia cells to natural killer cell-mediated lysis. *Leuk Res*.
- Rosen DB, Bettadapura J, Alsharifi M, Mathew PA, Warren HS, Lanier LL. 2005. Cutting edge: lectin-like transcript-1 is a ligand for the inhibitory human NKR-P1A receptor. *J Immunol* 175(12):7796-7799.
- Ruiz-Cabello F, Klein E, Garrido F. 1991. MHC antigens on human tumors. *Immunology letters* 29(3):181-189.
- Salazar-Onfray F, Lopez MN, Mendoza-Naranjo A. 2007. Paradoxical effects of cytokines in tumor immune surveillance and tumor immune escape. *Cytokine & growth factor reviews* 18(1-2):171-182.
- Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee HG, Steinle A. 2003. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 102(4):1389-1396.

- Salih HR, Goehlsdorf D, Steinle A. 2006. Release of MICB molecules by tumor cells: mechanism and soluble MICB in sera of cancer patients. *Hum Immunol* 67(3):188-195.
- Salih HR, Rammensee HG, Steinle A. 2002. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 169(8):4098-4102.
- Sanjeevi CB. 2006. Genes influencing innate and acquired immunity in type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1079:67-80.
- Sansom DM, Walker LS. 2006. The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology. *Immunological reviews* 212:131-148.
- Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. 2007. NK cells and pre-eclampsia. *J Reprod Immunol*.
- Schrama D, Terheyden P, Otto K, Kammerer U, Brocker EB, Luhder F, Cosman D, Andersen MH, Becker JC. 2006. Expression of the NKG2D ligand UL16 binding protein-1 (ULBP-1) on dendritic cells. *Eur J Immunol* 36(1):65-72.
- Schultz ES, Schuler G. 2005. [Malignant melanoma. Diagnosis and therapy]. *Hno* 53(11):928-939.
- Seino K, Motohashi S, Fujisawa T, Nakayama T, Taniguchi M. 2006. Natural killer T cell-mediated antitumor immune responses and their clinical applications. *Cancer science* 97(9):807-812.
- Shibuya A, Campbell D, Hannum C, Yssel H, Franz-Bacon K, McClanahan T, Kitamura T, Nicholl J, Sutherland GR, Lanier LL, Phillips JH. 1996. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* 4(6):573-581.
- Sibbitt WL, Jr., Bankhurst AD, Jumonville AJ, Saiki JH, Saiers JH, Doberneck RC. 1984. Defects in natural killer cell activity and interferon response in human lung carcinoma and malignant melanoma. *Cancer Res* 44(2):852-856.
- Sivori S, Parolini S, Falco M, Marcenaro E, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. 2000. 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation. *Eur J Immunol* 30(3):787-793.
- Sivori S, Vitale M, Morelli L, Sanseverino L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. 1997. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med* 186(7):1129-1136.
- Skov S, Pedersen MT, Andresen L, Straten PT, Woetmann A, Odum N. 2005. Cancer cells become susceptible to natural killer cell killing after exposure to histone deacetylase inhibitors due to glycogen synthase kinase-3-dependent expression of MHC class I-related chain A and B. *Cancer Res* 65(23):11136-11145.
- Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SL, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y. 2005a. Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular immunology* 42(4):501-510.
- Smyth MJ, Swann J, Cretney E, Zerafa N, Yokoyama WM, Hayakawa Y. 2005b. NKG2D function protects the host from tumor initiation. *J Exp Med* 202(5):583-588.
- Smyth MJ, Teng MW, Swann J, Kyriakopoulos K, Godfrey DI, Hayakawa Y. 2006. CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J Immunol* 176(3):1582-1587.
- Song H, Kim J, Cosman D, Choi I. 2006. Soluble ULBP suppresses natural killer cell activity via down-regulating NKG2D expression. *Cell Immunol* 239(1):22-30.

- Spreu J, Stehle T, Steinle A. 2006. Human cytomegalovirus-encoded UL16 discriminates MIC molecules by their alpha2 domains. *J Immunol* 177(5):3143-3149.
- Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK, Spies T. 2001. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 53(4):279-287.
- Stephens HA. 2001. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends in immunology* 22(7):378-385.
- Strong RK, McFarland BJ. 2004. NKG2D and Related Immunoreceptors. *Advances in protein chemistry* 68:281-312.
- Sutherland CL, Chalupny NJ, Schooley K, VandenBos T, Kubin M, Cosman D. 2002. UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol* 168(2):671-679.
- Tamaki S, Sanefuzi N, Ohgi K, Imai Y, Kawakami M, Yamamoto K, Ishitani A, Hatake K, Kirita T. 2007. An association between the MICA-A5.1 allele and an increased susceptibility to oral squamous cell carcinoma in Japanese patients. *J Oral Pathol Med* 36(6):351-356.
- Tessmer MS, Fugere C, Stevenaert F, Naidenko OV, Chong HJ, Leclercq G, Brossay L. 2007. KLRG1 binds cadherins and preferentially associates with SHIP-1. *International immunology* 19(4):391-400.
- Thomas M, Finnegan CE, Rogers KM, Purcell JW, Trimble A, Johnston PG, Boland MP. 2004. STAT1: a modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 64(22):8357-8364.
- Tieng V, Le Bouguenec C, du Merle L, Bertheau P, Desreumaux P, Janin A, Charron D, Toubert A. 2002. Binding of Escherichia coli adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(5):2977-2982.
- Timonen T, Saksela E, Ranki A, Hayry P. 1979. Fractionation, morphological and functional characterization of effector cells responsible for human natural killer activity against cell-line targets. *Cell Immunol* 48(1):133-148.
- Trivedi PP, Roberts PC, Wolf NA, Swanborg RH. 2005. NK cells inhibit T cell proliferation via p21-mediated cell cycle arrest. *J Immunol* 174(8):4590-4597.
- Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. 2004. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol* 122(2):337-341.
- Uhrberg M. 2005. The KIR gene family: life in the fast lane of evolution. *Eur J Immunol* 35(1):10-15.
- Upshaw JL, Arneson LN, Schoon RA, Dick CJ, Billadeau DD, Leibson PJ. 2006. NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells. *Nature immunology* 7(5):524-532.
- Vales-Gomez M, Winterhalter A, Roda-Navarro P, Zimmermann A, Boyle L, Hengel H, Brooks A, Reyburn HT. 2006. The human cytomegalovirus glycoprotein UL16 traffics through the plasma membrane and the nuclear envelope. *Cell Microbiol* 8(4):581-590.
- Venkataraman GM, Suci D, Groh V, Boss JM, Spies T. 2007. Promoter region architecture and transcriptional regulation of the genes for the MHC class I-related chain A and B ligands of NKG2D. *J Immunol* 178(2):961-969.

- Vetter CS, Groh V, Straten P, Spies T, Brocker EB, Becker JC. 2002. Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma. *J Invest Dermatol* 118(4):600-605.
- Vetter CS, Lieb W, Brocker EB, Becker JC. 2004. Loss of nonclassical MHC molecules MIC-A/B expression during progression of uveal melanoma. *Br J Cancer* 91(8):1495-1499.
- Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, Augugliaro R, Moretta L, Moretta A. 1998. Nkp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 187(12):2065-2072.
- von Lilienfeld-Toal M, Nattermann J, Feldmann G, Sievers E, Frank S, Strehl J, Schmidt-Wolf IG. 2006. Activated gammadelta T cells express the natural cytotoxicity receptor natural killer p 44 and show cytotoxic activity against myeloma cells. *Clinical and experimental immunology* 144(3):528-533.
- Waldhauer I, Steinle A. 2006. Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res* 66(5):2520-2526.
- Walzer T, Jaeger S, Chaix J, Vivier E. 2007. Natural killer cells: from CD3(-)NKp46(+) to post-genomics meta-analyses. *Current opinion in immunology* 19(3):365-372.
- Welte SA, Sinzger C, Lutz SZ, Singh-Jasuja H, Sampaio KL, Eknigk U, Rammensee HG, Steinle A. 2003. Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *Eur J Immunol* 33(1):194-203.
- Wiecker TS, Luther H, Buettner P, Bauer J, Garbe C. 2003. Moderate sun exposure and nevus counts in parents are associated with development of melanocytic nevi in childhood: a risk factor study in 1,812 kindergarten children. *Cancer* 97(3):628-638.
- Wiemann K, Mittrucker HW, Feger U, Welte SA, Yokoyama WM, Spies T, Rammensee HG, Steinle A. 2005. Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *J Immunol* 175(2):720-729.
- Wing K, Suri-Payer E, Rudin A. 2005. CD4+CD25+-regulatory T cells from mouse to man. *Scandinavian journal of immunology* 62(1):1-15.
- Wolchok JD, Saenger YM. 2007. Current topics in melanoma. *Current opinion in oncology* 19(2):116-120.
- Wu A, Wiesner S, Xiao J, Ericson K, Chen W, Hall WA, Low WC, Ohlfest JR. 2007. Expression of MHC I and NK ligands on human CD133+ glioma cells: possible targets of immunotherapy. *Journal of neuro-oncology* 83(2):121-131.
- Wu J, Chalupny NJ, Manley TJ, Riddell SR, Cosman D, Spies T. 2003. Intracellular retention of the MHC class I-related chain B ligand of NKG2D by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *J Immunol* 170(8):4196-4200.
- Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, Phillips JH. 1999. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285(5428):730-732.
- Yamaguchi T, Sakaguchi S. 2006. Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. *Seminars in cancer biology* 16(2):115-123.
- Yamamoto K, Fujiyama Y, Andoh A, Bamba T, Okabe H. 2001. Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochimica et biophysica acta* 1526(1):10-12.
- Yu P, Fu YX. 2006. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 86(3):231-245.

- Zhang C, Zhang J, Sun R, Feng J, Wei H, Tian Z. 2005. Opposing effect of IFN γ and IFN α on expression of NKG2 receptors: negative regulation of IFN γ on NK cells. *Int Immunopharmacol* 5(6):1057-1067.
- Zimpfer-Rechner C, Hofmann U, Figl R, Becker JC, Trefzer U, Keller I, Hauschild A, Schandendorf D. 2003. Randomized phase II study of weekly paclitaxel versus paclitaxel and carboplatin as second-line therapy in disseminated melanoma: a multicentre trial of the Dermatologic Co-operative Oncology Group (DeCOG). *Melanoma research* 13(5):531-536.
- Zou W. 2006. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature reviews* 6(4):295-307.
- Zou Y, Bresnahan W, Taylor RT, Stastny P. 2005. Effect of human cytomegalovirus on expression of MHC class I-related chains A. *J Immunol* 174(5):3098-3104.
- Zou Y, Mirbaha F, Stastny P. 2006. Contact inhibition causes strong downregulation of expression of MICA in human fibroblasts and decreased NK cell killing. *Hum Immunol* 67(3):183-187.
- Zou Z, Nomura M, Takihara Y, Yasunaga T, Shimada K. 1996. Isolation and characterization of retinoic acid-inducible cDNA clones in F9 cells: a novel cDNA family encodes cell surface proteins sharing partial homology with MHC class I molecules. *Journal of biochemistry* 119(2):319-328.
- Zwirner NW, Fernandez-Vina MA, Stastny P. 1998. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. *Immunogenetics* 47(2):139-148.
- Zwirner NW, Fuertes MB, Girart MV, Domaica CI, Rossi LE. 2007. Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: role of the MICA-NKG2D system. *Cytokine & growth factor reviews* 18(1-2):159-170.

7 Anhang

7.1 Ergänzendes Material zu den Ergebnisse

7.1.1 Darstellung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Die dargestellten Bilder der Durchflusszytometrie im Ergebnisteil wurden im Vorfeld bearbeitet. Exemplarisch für diesen Vorgang ist in Abbildung 7-1 die Färbung der Melanomlinie Mel 249 mit dem humanen Fusionsprotein hNKG2D-F_c gezeigt. Zunächst wurden die Zellen nach Größe und Granularität (FSC auf der x-Achse bzw. SSC auf der y-Achse) dargestellt. Die entsprechende Population lebender Zellen wurde markiert. In den darauf folgenden beiden Bildern sind lediglich die Zellen des markierten Bereichs aus der ersten Grafik abgebildet, wobei der FSC weiterhin auf der x-Achse und auf der y-Achse nun die Fluoreszenz der Zellen (PE) angegeben ist. In Abbildung 7-1 zeigt die mittlere Grafik die Hintergrundfluoreszenz von Mel 249 Zellen an, hervorgerufen durch unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers bzw. durch die Eigenfluoreszenz der Zellen. Das rechte Bild stellt hingegen die spezifische Färbung mit dem Fusionsprotein dar, wobei die Fluoreszenz von dem sekundären PE-gekoppelten Ziege anti-human Antikörper stammt, welcher an das Fusionsprotein gebunden hat.

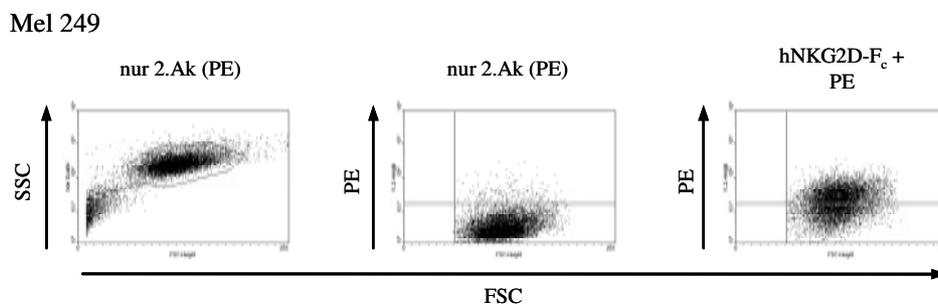


Abbildung 7-1. Gating-Strategie der Durchflusszytometrie

Die Population der Mel 249 Zellen wurde zur Analyse zunächst in der Darstellung FSC gegen SSC markiert (erstes Bild von links). Nur die Zellen dieses Bereichs sind in den beiden verbleibenden Grafiken dargestellt, wobei diese auf der x-Achse den FSC und auf der y-Achse die Fluoreszenz des sekundären Antikörpers (Ziege anti-Maus PE) bzw. die Hintergrundfluoreszenz der Zellen abbilden. Zur Analyse der unspezifischen Hintergrundfärbung durch den sekundären Antikörper wurden die Zellen nur mit diesem inkubiert (mittleres Bild). Mel 249 Zellen, welche mit dem humanen Fusionsprotein des NKG2D Rezeptors (hNKG2D-F_c) und anschließend mit dem sekundären PE-gekoppelten Ziege anti-human Antikörper behandelt wurden, sind im rechten Bild gezeigt. Die Detektion erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACSCalibur).

7.1.2 Kreuzreaktivität der Primer

Um Kreuzreaktivitäten der Primer zwischen den einzelnen NKG2D Liganden auszuschließen, wurden mittels der BaF/3 Zelllinien Transduktanten hergestellt, welche den jeweiligen NKG2D Liganden exprimierten (siehe Kapitel 3.1.1). Es wurde quantitative RT-PCR einerseits mit cDNA aller BaF/3 Linien und andererseits mit 0,1 ng/ml des Plasmids des zu überprüfenden Liganden (Positiv-Kontrolle) durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 7-2 dargestellt. Es konnten keine gravierenden Kreuzreak-

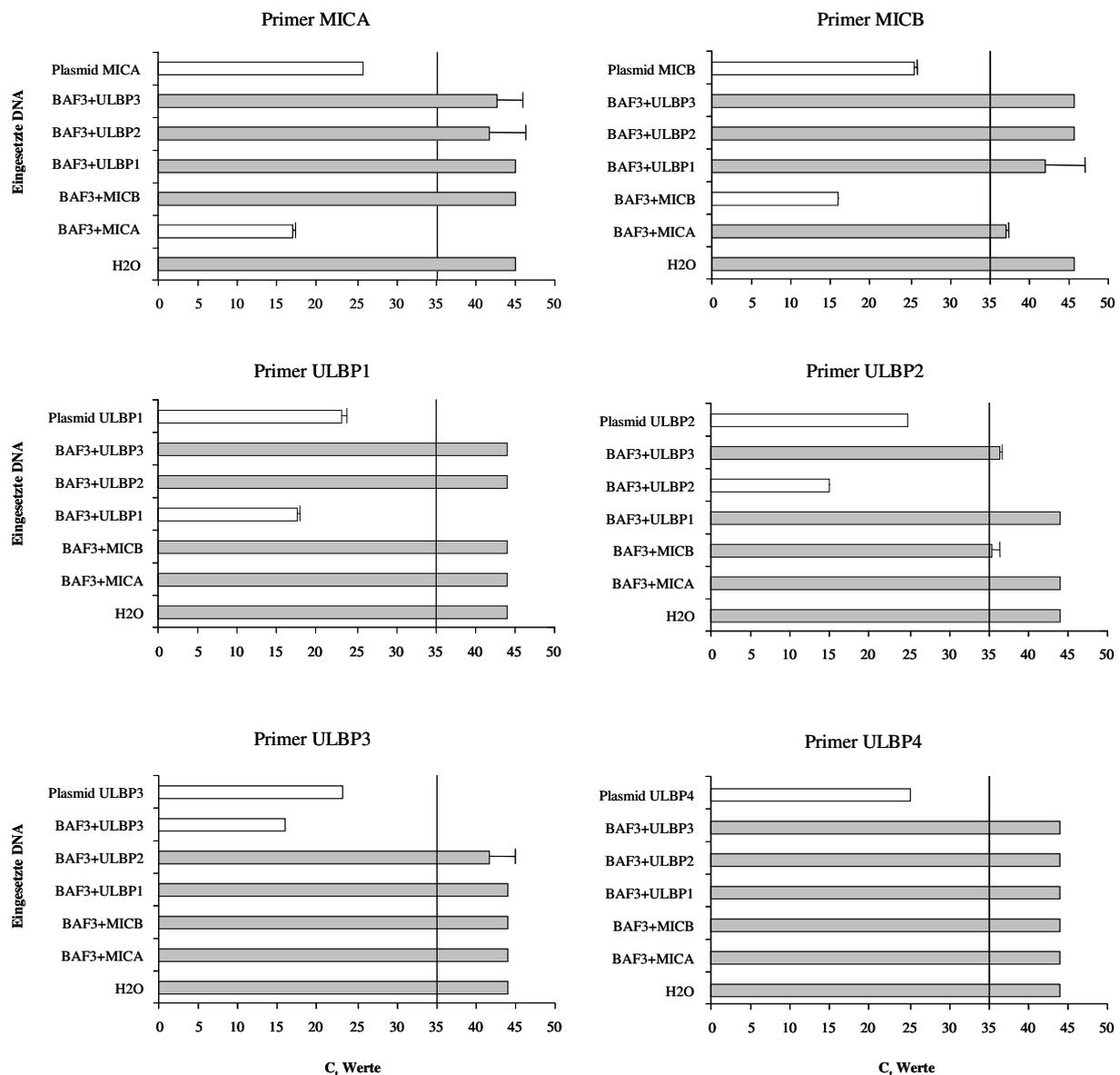


Abbildung 7-2. Kreuzreaktivität der Primer

Die sechs transduzierten BaF/3 Zelllinien BaF/3+MICA, BaF/3+MICB, BaF/3+ULBP1, BaF/3+ULBP2 und BaF/3+ULBP3, sowie die zugehörigen Plasmide wurden auf Kreuzreaktivität von Primer und Sonde der NKG2D Liganden in quantitativen RT-PCR Experimenten untersucht. Die Zellen wurde pelletiert und aus dem Pellet wurde die gesamte RNA isoliert. Diese RNA wurde zur Herstellung von cDNA verwendet, die wiederum in der quantitativen TaqMan® RT-PCR eingesetzt wurde. Zur Kontrolle von unspezifischen Wechselwirkungen mit Bestandteilen des Mastermix wurde bei der cDNA-Synthese Wasser statt RNA eingesetzt und dieser Ansatz in der qPCR getestet (H₂O). Die erhaltenen C_t-Werte jedes Liganden sind dargestellt.

tivitäten festgestellt werden. Da aber in geringem Maße sowohl MICA durch MICB Primer als auch MICB und ULBP3 durch ULBP2 Primer bei einem C_t -Wert von ungefähr 35 detektierbar waren, wurden in den Experimenten nur Signale als spezifisch gewertet, wenn der C_t -Wert unterhalb von 35 lag.

7.1.3 Kreuzreaktivität der Antikörper

Zur Überprüfung der Kreuzreaktivitäten der Antikörper für die einzelnen NKG2D Liganden wurden erneut die transduzierten BaF/3 Zelllinien verwendet. Dabei wurde jede Linie mit den monoklonalen Antikörpern gegen MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 und ULBP3 markiert. Als sekundärer Antikörper wurde der PE-gekoppelte Ziege anti-Maus Antikörper eingesetzt, die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. In Abbildung 7-3 sind die Resultate dargestellt. Es konnten keine unspezifischen Färbungen festgestellt werden. Die schwache Färbung der monoklonalen Antikörper gegenüber MICB und ULBP1 lässt sich sehr wahrscheinlich auf eine geringe Expression der Proteine auf BaF/3+MICB bzw. BaF/3+ULBP1 Zellen zurückführen, da Glioblastomlinien und verschiedene andere Karzinomlinien gegen MICB bzw. ULBP1 angefärbt werden konnten (vgl. Abbildung 4-18 und 4-20 Abbildung 4-20).

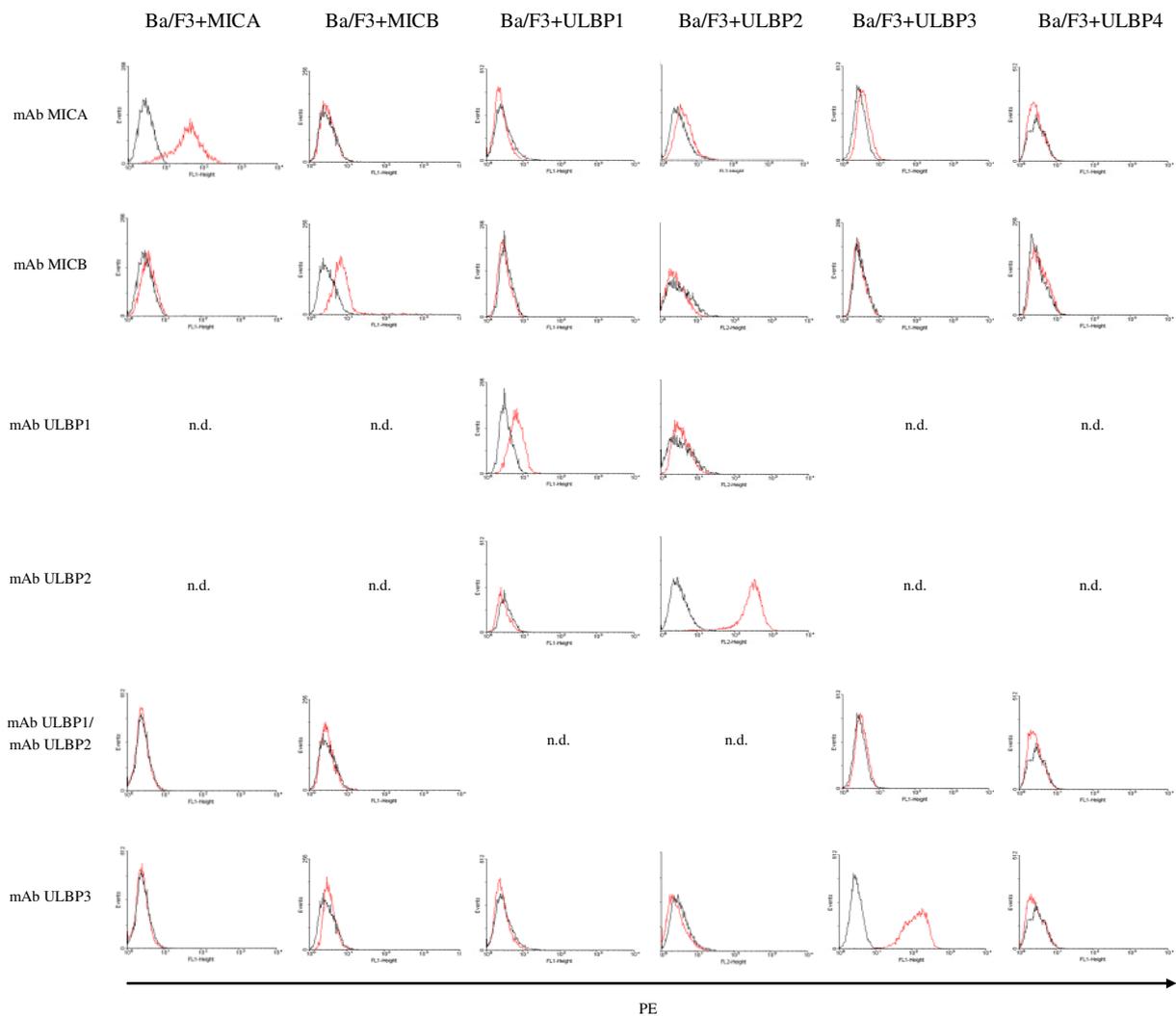


Abbildung 7-3. Kreuzreaktivität der Antikörper

Die sechs transduzierten BaF/3 Zelllinien BaF/3+MICA, BaF/3+MICB, BaF/3+ULBP1, BaF/3+ULBP2, BaF/3+ULBP3 und BaF/3+ULBP4 wurden auf Kreuzreaktivität der Antikörper bezüglich der NKG2D Liganden untersucht. Dazu wurden die Zellen mit den entsprechenden monoklonalen Antikörpern (mAb) gegen MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 und ULBP3 inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit dem sekundären PE-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper (rote Linie). Zur Analyse der unspezifischen Hintergrundfärbung durch den sekundären Antikörper wurden die Zellen nur mit diesem inkubiert (schwarze Linie). Die Detektion erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACSCalibur). Die Resultate sind als Histogramme dargestellt. Auf der y-Achse ist die Anzahl der Ereignisse (Events) angegeben, während die x-Achse die Fluoreszenzintensität der Zellen (PE) repräsentiert.

7.1.4 Erkennung der Melanomzellen durch die Natürliche Killerzelllinie NKL – Kontrollzelllinien

Abbildung 4-16A und C zeigten die IFN- γ abhängige reduzierte Erkennung der Melanomzellen durch NKL-Zellen. Zur Kontrolle der Effizienz der funktionalen Analyse wurden die Kontrollzelllinien BaF/3, BaF/3+MICA und K562 eingesetzt (Abbildung 7-4). Die Ergebnisse zeigen für BaF/3 Zellen die Werte der spontanen Lyse, für BaF/3+MICA Zellen die maximale durch NKG2D-vermittelte Lyse und für K562 Zellen die maximale generelle Aktivierung durch NKL-Zellen. Der Antikörper anti-NKG2D wurde zur Blockierung der NKG2D-vermittelten Lyse eingesetzt. Die eingesetzte Konzentration wurde im Vorfeld bestimmt (nicht gezeigt).

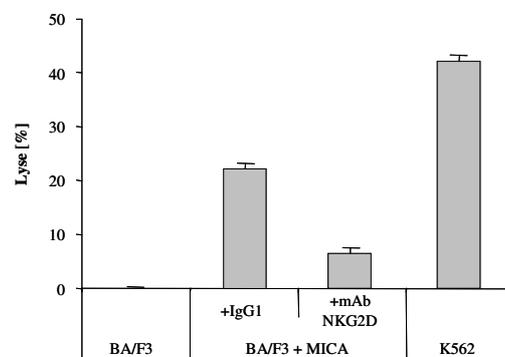


Abbildung 7-4. Erkennung von der Kontrollzellen durch die Natürliche Killerzelllinie NKL

Die drei Kontrollzelllinien BaF/3, BaF/3+MICA und K562 wurden auf ihre Sensitivität gegenüber NKL-Zellen untersucht. Die Kontrollzellen wurden für den radioaktiven Lyseversuch mit 50 μCi $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ inkubiert. Nach Entfernung des freien ^{51}Cr wurden die Zellen für eine Dauer von 4 h mit einem Überschuss an NKL-Zellen inkubiert. Ein repräsentativer ^{51}Cr -Freisetzungsversuch von drei unabhängig voneinander durchgeführten ist gezeigt. Das Effektor-Target Verhältnis betrug 50:1. Zudem erfolgte die Blockierung des NKG2D Rezeptors mit dem monoklonalen Antikörper anti-NKG2D in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/10^7$ NKL-Zellen. Dazu wurden die NKL-Zellen vor der Ko-Inkubation mit den Kontrollzellen für eine Dauer von 30 min mit diesem Antikörper inkubiert. Zur Kontrolle von unspezifischen Wechselwirkungen des blockierenden Antikörpers wurde die Isotyp-Kontrolle IgG₁ in der gleichen Konzentration eingesetzt. Der Prozentsatz der spezifischen Lyse wurde wie folgt errechnet: $[(\text{Freisetzung}_{\text{Experiment}} - \text{Freisetzung}_{\text{Spontan}}) / (\text{Freisetzung}_{\text{maximal}} - \text{Freisetzung}_{\text{Spontan}})] \times 100$.

7.1.5 Durchflusszytometrische Analyse der isolierten polyklonalen NK-Zellen aus Buffy Coats

Die mittels MACS[®]-Technologie isolierten polyklonalen CD3⁻CD56⁺ NK-Zellen, wurden auf die Qualität der Isolierung untersucht. Dazu wurde ein Aliquot der Zellen unmittelbar nach der Isolierung mit direkt gekoppelten monoklonalen CD3-FITC und CD56-PE Antikörpern gefärbt (siehe auch Kapitel 3.1.5). Die Ergebnisse der Färbung von CD3⁻CD56⁺ NK-Zellen aus den Buffy Coats BF 635, BF 637, BF 691 und BF 692 aus gesunden Donoren sind in Abbildung 7-5 dargestellt. Bei der Auswertung dieser Analyse wurde bewusst darauf verzichtet, die Zellpopulation einzugrenzen. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass der Anteil an CD3⁻CD56⁺ Zellen an der Gesamtpopulation bestimmt wurde.

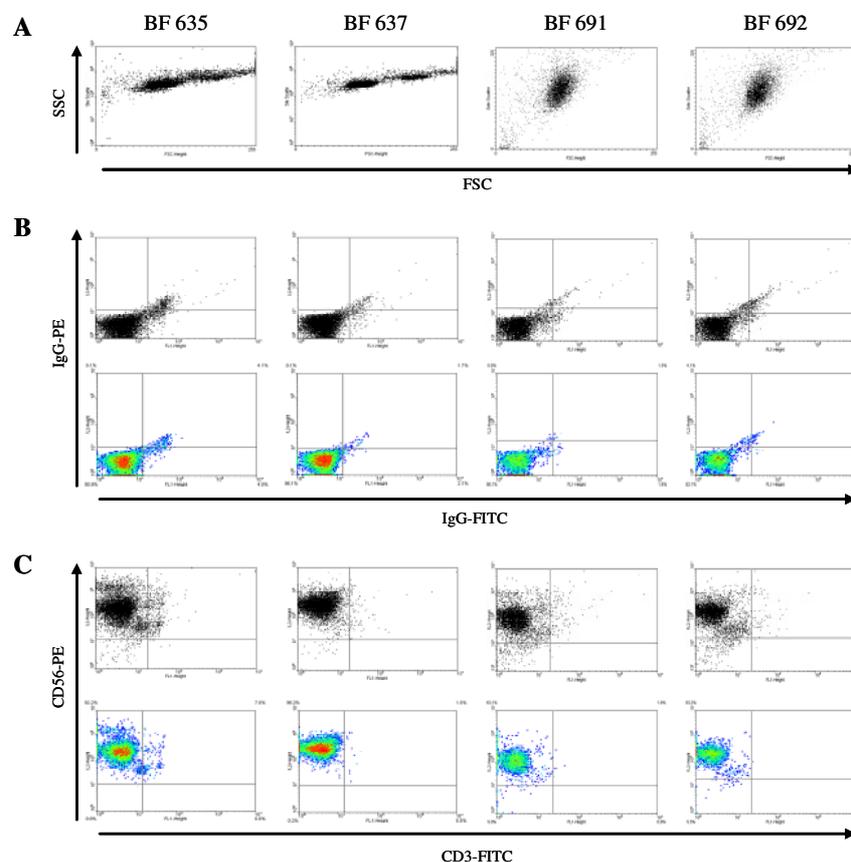


Abbildung 7-5. Analyse der isolierten polyklonalen NK-Zellen aus Buffy Coats

Die isolierten polyklonalen CD3⁻CD56⁺ NK-Zellen der Buffy Coats BF 635, BF 637, BF 691 und BF 692 wurden auf die Qualität der Isolierung überprüft. Die Detektion erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACSCalibur). (A) Es ist die jeweilige Population der isolierten Zellen dargestellt, wobei die x-Achse den FCS und die y-Achse den SSC beschreibt. Für die weiteren Analysen wurden alle Zellen ohne Einschränkung analysiert. (B) Die unspezifischen Hintergrundfärbungen sind dargestellt, wobei direkt konjugierte Isotypen (IgG-FITC und IgG-PE) eingesetzt wurden. Zur besseren Darstellung sind 'Dot-Blots' gezeigt, wobei die untere Reihe 'Density Dot-Blots' darstellen. Die x-Achse gibt die Intensität der Fluoreszenz durch FITC an, während die y-Achse die Intensität der Fluoreszenz durch PE darstellt. (C) Die isolierten Zellen wurden mit je $1 \mu\text{l}/2 \times 10^5$ Zellen der direkt gekoppelten monoklonalen Antikörper gegen CD3 (CD3-FITC) und CD56 (CD56-PE) inkubiert. Der Anteil an CD3⁻CD56⁺ Zellen betrug: BF635: 92,2%; BF637: 98,3%; BF691: 93,1%; BF692: 93,3%.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren wurden im drei Buchstaben Code, der allgemein üblichen Abkürzung, angegeben.

1-9

6-FAM 6-Carboxy-Fluorescein

A

ABL Abelson Leukämie-Virus Protein
ADCC Antibody-dependent cell cytotoxicity
ALM Akute myeloide Leukämie
ALP Alkalische Phosphatase
APAF-1 Apoptotic peptidase activating factor-1
APC Antigen presenting cell
ATRA All-trans retinoic acid

B

β2m β2 Mikroglobulin
BAC Bacterial artificial chromosome
Bcl B-cell leukaemia/lymphoma
BCR Break point cluster
BF Buffy Coat
bp Basenpaar
BSA Bovine serum albumin
bzw. Beziehungsweise

C

ca. Circa
CAM Cell adhesion molecule
CC Chemokin mit zwei Cys in der Nähe des N-Terminus
CCL CC Chemokine Ligand
CD Cluster of differentiation
CDKN2A Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CDK4 Cyclin-dependent kinase 4
CEACAM Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule
Ci Curie (1 Ci = 3,7x10¹⁰ Bq)
Cr Chrom
CTL Cytotoxic T lymphocyte
CTLA-4 CTL Antigen 4
C_t-Wert Wert bis die Intensität der Fluoreszenz einen bestimmten Grenzwert erreicht (qPCR)

D

DAP	DNAX-activating protein
DC	Dendritic cell
DEPC	DiethylenePyrocarbonate
DFS	DNA Free Sensitive
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNAM-1	DNAX-accessory molecule-1; CD 226
DTIC	Dacarbazin
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dTTP	Deoxythymidinetriphosphate
dUTP	Desoxyuridintriphosphat

E

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay
EM	Einfriermedium
engl.	Englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum

F

F _{ab}	Fragment antigen binding
FACS	Fluorescence activated cell sorter
F _c	Fragment crystallizable
FCS	Fetal calf serum
F _c R	F _c -Rezeptor
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FOXP3	Forkhead box protein 3
FSC	Forward Scatter

G

g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulocyte/macrophage colonie-stimulating factor
gp100	Gykoprotein 100
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2

H

HCMV	Humanes Cytomegalie Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HRP	Horse radish peroxidase
HSE	Heat shock response elements

HSF-1	Heat shock factor 1
I-J	
ICAM	Intracellular cell adhesion molecule
IFN	Interferon
IFNGR	Interferon gamma Rezeptor
IgSF	Immunglobulin Superfamilie
IL	Interleukin
ILT-2	Immunoglobulin-like transcript
IRE	Interferon response element
IRF	Interferon regulating factor
IRp60	Inhibitory receptor protein 60
ITAM	Immunoreceptor tyrosin activatory motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif
IU	Internationale Units
JAK	Janus Kinase
K	
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KIR	Killer cell immunoglobulin-like receptors
KLRG	Killer cell lectin-like receptor
L	
LFA	Leukocyte function-associated antigen
LGL	Large granular lymphocyte leukemia
LIR	Leukocyte immunoglobulin-like receptor
LLT-1	Lectin-like transcript 1
LNGFR	Low affinity nerve growth factor receptor; CD271
LPS	Lipopolysaccharid
M	
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mAb	Monoklonal Antibody
MACS	Magnetic activated cell sorter
MAPK	Mitogen-activated protein-kinase
MART-1	
MFI	Mean fluorescence intensity
mg	Milligramm
MGB	Minor groove binder
MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)

MICA/B	MHC class I chain-related molecule A/B
min	Minuten
ml	Milliliter
M-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
N	
N-CAM	Neuronal cell adhesion molecule
NCR	Natural cytotoxicity receptors
n.d.	Nicht durchgeführt
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killerzellen
NKG2D	Natürliche Killerzell-Rezeptor Gruppe 2D
NKL	Natürliche Killerzelllinie
NKR-P	Natürliche Killerzell Rezeptor Protein
NM	Normalmedium
nm	Nanometer
NTB-A	NK-T-B-Antigen
O-Q	
OD	Optische Dichte
PAC	Phage P1-derived artificial chromosome
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBL	Peripher blood lymphocytes
PBMC	Peripher blood mononuclear lymphocytes
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
pg	Pikogramm
PHA	Phytohämagglutinin
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PLC	Phospholipase C
pNPP	P-Nitro-Phenyl-Phosphat
PTEN	Phosphate and tensin homologue
PVR	Poliovirus Rezeptor; CD155
qPCR	Quantitative PCR
R	
RAE	Retinoic acid early inducible genes
RAET	Retinoic acid early inducible transcript
rhIFN	Rekombinantes humanes Interferon
RISC	RNA-induced silencing complex
rpm	Rotationen pro Minute

RT	Reverse Transkription
S	
s	Sekunde
Siglec	Sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin
SLP-76	SH2-domaine-containing leukocyte-phosphoprotein, 76 kDa
sMICA/B	Soluble MICA/B
SNP	Single nucleotide polymorphism
SSC	Side scatter
SSC-Puffer	Sodium-saline-citrate-Puffer
STAT	Signal transducers and activators of transcription
sULBP	Soluble ULBP
T	
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCR	T cell receptor
TGF	Tumor Growth Factor
T _H	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-dihydrochlorid
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
TSA	Trichostatin A
U-Z	
U	Units
UL	Unique like
ULBP	UL 16 binding protein
UV	Ultraviolett
vgl.	Vergleiche
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent