UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus der Interdisziplinären Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation

Klinikdirektor: Prof. Dr. med. N. Kröger

Untersuchung des Einflusses des KIR2DL1-Rezeptors auf die Zytotoxizität von Natürlichen Killerzellen an Zelllinien des Multiplen Myeloms und der Akuten Myeloischen Leukämie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Karla Jungk

aus Hamburg

Hamburg 2014

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 29.09.2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. Nicolaus Kröger

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Eiermann

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis 3

2. Zielsetzung 6

3. Einleitung 8

3.1. Natürliche Killerzellen 8

3.1.1. Definition und Funktion 8

3.1.2. Rezeptoren 9

3.1.2.1. Killerzell-Immunoglobulin-ähnliche-Rezeptoren (KIRs) 11

3.1.2.2. Rezeptoren vom C-Typ-Lektin 12

3.1.2.3. Natürliche Zytotoxizitäts-Rezeptoren 13

3.1.3 Lizensierung von NK-Zellen 14

3.1.4 Modelle der KIR-vermittelten Interaktion mit den Zielzellen im Rahmen von Stammzelltransplantationen 15

3.2. Das multiple Myelom 16

3.2.1. Definition 16

3.2.2. Ätiologie 17

3.2.3. Pathogenese 18

3.2.4. Klinik 18

3.2.5. Therapie 21

3.3. Arbeitshypothesen und Versuchsaufbau 23

4. Material und Methoden 24

4.1. Material 24

4.1.1. Laborgeräte 24

4.1.2. Kits 24

4.1.3. Klone 25

4.1.4. Vektoren 25

4.1.5. Zelllinien 25

4.1.5.1. NK-Zelllinie 25

4.1.5.2 MM-Zelllinien 25

4.1.5.3. AML-Zelllinien 26
4.1.6. Zellkulturmedien allgemein 26
4.1.6.1. Zellkulturmedien MM 26
4.1.6.2. Zellkulturmedium AML 26
4.1.7. Nährmedien 26
4.1.8. Material Maxi Prep 27
4.1.9. Material reverse Transfektion 27
4.1.10. Material RNAi-Stealth-Transfektion 27
4.1.11. Material Westernblot 28
4.1.12. Antikörper Westernblot 29
4.1.13. Material LDH-Assay 29
4.2. Methoden 29
4.2.1. Versuchsaufbau 29
4.2.2. Transformation 30
4.2.3. Maxiprep 30
4.2.4. Herstellung der stabilen NK-Zelllinie; Reverse Transfektion und klonale Selektion 31
4.2.5. RNAi-Stealth-Transfektion 33
4.2.6. Western Blot 33
4.2.7. LDH-Assay/Cyto Tox 96® Non-Radioactive Cytotoxity Assay 35
4.2.8. Statistik 36
5. Ergebnisse 37
5.1. Nomenklatur 37
5.2. Western Blot 38
5.3. LDH-Assay/Cyto Tox 96® Non-Radioactive Cytotoxity Assay 41
5.3.1. Lysepotential von unbehandelten NK-Zellen der Zelllinie KHYG-1 41
5.3.2. Lysepotential von NK-Zellen der Zelllinie KHYG-1 nach Transfektion mit Mock siRNA 42
5.3.3. LDH-Assay mit MM- und AML- Zellen als Target 44

5.3.3.1. Lysepotential von NK-Zellen der Zelllinie KHYG-1 mit Überexpression von KIR2DL1 44

5.3.3.2 Lysepotential von NK-Zellen der Linie KHYG-1 mit Überexpression von KIR2DL1 nach RNAi Transfektion 46

6. Diskussion 48

7. Zusammenfassung 55

8. Abkürzungsverzeichnis 56

9. Abbildungsverzeichnis 59

10. Tabellenverzeichnis 61

11. Literaturverzeichnis 62

12. Danksagung 66

13. Lebenslauf 67

14. Eidesstattliche Erklärung 68

2. Zielsetzung

Das Multiple Myelom (MM) und die akute myeloische Leukämie (AML) sind hämatologische Neoplasien, die mit allogener Stammzelltransplantation behandelt werden können.

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) vom Spender sind hierbei als Zellen des angeborenen Immunsystems möglicherweise in der Lage durch ihre Alloreaktivität den Graft versus Myeloma/Leukemia Effekt zu verstärken und somit Rezidiven vorzubeugen.

Im Gegensatz zu den NK-Zellen, ist für die T-Zellen des Spenders nach allogener Stammzelltransplantation bekannt, dass diese sowohl eine Spender-gegen-Wirt-Reaktion (Graft versus host disease (GvHD)), als auch einen gegen die maligne Grunderkrankung (Graft-versus-Leukemia (GvL)) gerichteten Effekt hervorrufen können. Während es sich bei der GvHD um eine unerwünschte Reaktion auf den Wirtsorganismus handelt, ist die gegen maligne Zellen gerichtete GvL-Reaktion erwünscht und essentiell für den kurativen Effekt der allogenen Stammzelltransplantation.

Verantwortlich für diese Reaktion sind vor allem die T-Zellen des Spenders. Die Rolle von NK-Zellen des Spenders ist nicht eindeutig geklärt, jedoch können diese, Krebszellen, auch ohne spezifische Antigenerkennung, lysieren. Die Funktion der NK-Zellen wird hierbei unter anderem durch ein Zusammenspiel verschiedener stimulierender und inhibierender Zell-Zell-Interaktionen reguliert.

In letzter Zeit ist vor allem die Gruppe der inhibitorischen Killerzell Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (KIRs) in das wissenschaftliche Interesse gerückt. Diese Oberflächenrezeptoren werden von NK-Zellen exprimiert und erkennen Epitope, wie sie für den MHC-Klasse I-Komplex typisch sind (Beim Menschen: humanes Leukozytenantigen, hier: HLA-Klasse I-Komplex).

Interagieren diese KIRs mit Zellen, denen der passende Ligand fehlt, fehlt das inhibitorische Signal und die Zielzelle wird lysiert. Da die KIR-Rezeptoren auf unterschiedlichen Chromosomen wie das HLA-System lokalisiert sind, kann es bei einer allogenen HLA-gematchten Stammzelltransplantation zu einem KIR-Mismatch und somit zu einer NK-Zell vermittelten Reaktion kommen.

Mit folgenden Fragestellungen beschäftigt sich diese experimentelle Arbeit:

1. Was ist die Rolle der inhibitorischen KIRs am Beispiel des KIR2DL1 Rezeptors auf Myelomzellen und was resultiert in vitro, wenn durch Transfektion einer sonst KIR2DL1 freien NK-Zelllinie mit KIR2DL1 isoliert die Interaktion zwischen KIR2DL1 und den Myelomzellen betrachtet wird?
2. Lassen sich die verschiedenen KIR-Ligand-Modelle an Zellen des Multiplen Myeloms nachvollziehen?

3. Einleitung

3.1. Natürliche Killerzellen

3.1.1. Definition und Funktion

Das Immunsystem umfasst zwei unterschiedliche Systeme. Zum einen das angeborene „unspezifische“ Immunsystem und zum anderen das adaptive „spezifische“ Immunsystem. Das angeborene Immunsystem umfasst Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, Granulozyten sowie NK-Zellen und entfaltet seine Wirkung unmittelbar nach dem Initialkontakt mit einem Erreger. Dem gegenüber steht das adaptive Immunsystem, das sich erst nach Kontakt mit pathogenen Mikroorganismen entwickelt und T-und B-Lymphozyten einschließt [1].

NK-Zellen sind große granuläre Zellen und stellen mit 10-15% die drittgrößte Gruppe der im Blut zirkulierenden Lymphozyten dar. Sie entstehen im Knochenmark aus hämatopoetischen Stamm- sowie Vorläuferzellen [2, 3]. Zusätzlich zum Knochenmark sind sie auch noch in bestimmten Organen zu finden wie in der Leber, Niere, Plazenta und in der Lunge [4]. Schon früh differenzieren sie sich aus der lymphatischen Reihe, werden jedoch nicht in den primären Lymphorganen geprägt und gehören so weder zu den B- noch zu den T-Zellen.

NK-Zellen wurden erstmals Mitte der 70er Jahre aufgrund ihrer Fähigkeit zur schnellen zytotoxischen Aktivität gegenüber von Erregern befallenen oder entarteten Zellen, ohne vorherige Sensibilisierung, entdeckt. Sie zeichnen sich durch das Vorhandensein des Oberflächenmoleküls CD56 und das Fehlen des T-Zell Markers CD3 aus [1, 5]. Bezüglich ihrer CD56 Expression, die durchflusszytometrisch nachzuweisen ist, kann man die NK-Zellen in zwei Gruppen einteilen, und zwar in $CD56^{bright}$ NK-Zellen, die vorwiegend zytokinvermittelte immunmodulatorische Funktionen besitzen und $CD56^{dim}$ NK-Zellen, die stark zytotoxisch wirken [6].

Nach Aktivierung der NK-Zelle durch Zytokine wie IL-2, IL-12, IL-25, IL-18 und IL-21, werden Interferon γ, Tumor Nekrose Faktor (TNF) und der Granulozyten/Makrophagen stimulierenden Faktor (GM-GSF) sezerniert. Die Zytotoxizität wird durch das Ausschütten von Perforinen und Granzymen bedingt [5]. Unter den immun-kompetenten Zellen nehmen NK-Zellen eine Zwischenstellung ein, da sie sowohl antikörpervermittelte als auch nicht antikörpervermittelte Zytotoxizität aufweisen. Zielzellen, die auf ihrer Oberfläche HLA–Komplexe aufweisen, üben auf die NK-Zelle

inhibitorische Signale aus und werden nicht lysiert. Von den meisten NK-Zellen wird mindestens ein inhibitorischer Rezeptor exprimiert, da dieser für die Aktivierung der Zelle von zentraler Bedeutung ist, und um sicherzustellen, dass keine körpereigenen Zellen angegriffen werden [5]. Diesen Vorgang nennt man „Lizensierung“ (siehe auch Kapitel 3.1.3).

Fehlen die HLA-Oberflächenmoleküle (z.B virusinfizierte Zellen, Tumorzellen, die einer Erkennung durch das Immunsystem, insbesondere den T-Zellen, zu entgehen versuchen), fehlt der inhibitorische Ligand des entsprechenden inhibitorischen Rezeptors und die Zelle wird lysiert. Die NK-Zelle kann so binnen Sekunden aktiviert werden, da es keiner Antigenpräsentation bedarf [7].

Antikörpervermittelt können NK-Zellen jedoch auch eine Zelllyse herbeiführen (Antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC). ADCC verläuft über eine Aktivierung des FcγRIII-Rezeptors, der dem CD16-Marker auf T-und NK-Zellen entspricht. Diese Rezeptoren erkennen und binden den Fc-Teil von IgG (daher FcγR) und sind in verschiedenen Varianten auf verschiedenen Zellen zu finden. FcγRIII besitzt eine niedrige Affinität zum Liganden und wird auf Granulozyten und NK-Zellen exprimiert. Zu dessen Aktivierung sind Antikörper der IgG-Klasse erforderlich und somit eine vorherige Sensibilisierung und klonale Expansion von B-Zellen sowie deren Antikörperproduktion [2].

3.1.2. Rezeptoren

Nach allgemeinem immunologischen Verständnis wird Fremdgewebe durch darauf spezialisierte Rezeptoren auf Immunzellen erkannt, was zur Aktivierung der Zelle führt und zur Lyse der Zielzelle, wie dies beispielsweise durch zytotoxische T-Zellen und ihren T-Zell-Rezeptor geschieht.

Eine revolutionäre Gegen-Hypothese für die Funktionsweise von NK-Zellen formulierten 1985 Kärre und Ljunggren in Form der Missing-self-Theorie [8]. Gemäß dieser Theorie sollen NK-Zellen ihre Zielzellen an einem Verlust oder einer Veränderung von HLA-Klasse-I Oberflächenmolekülen, also an „fehlendem Selbst“ (Missing-self) statt an „Fremd“, erkennen.

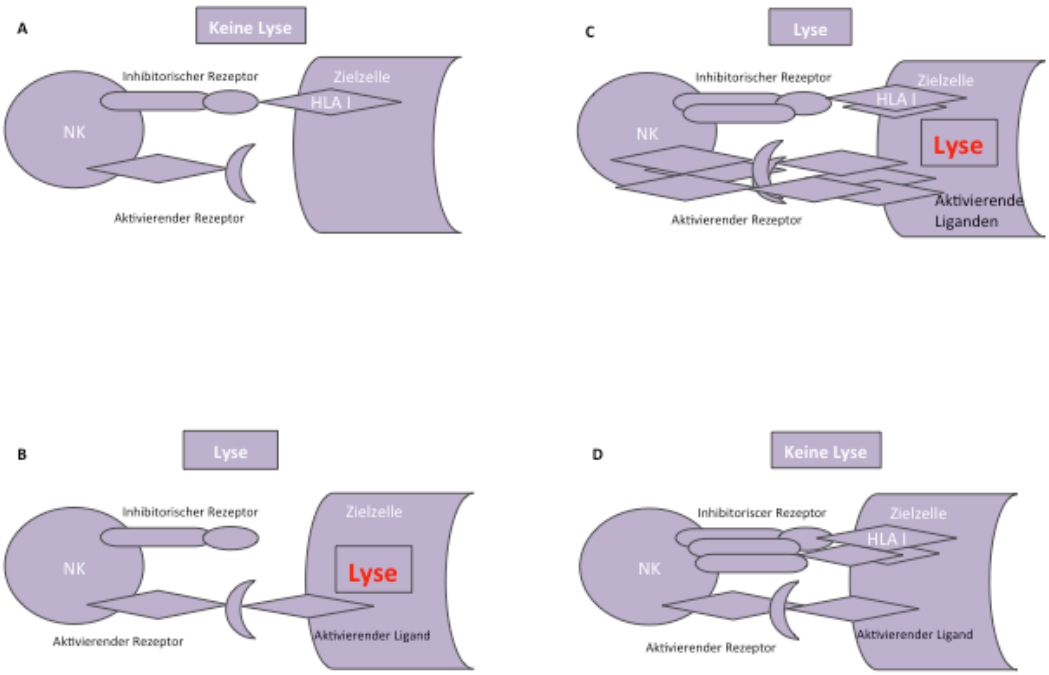

Abbildung 1

Regulation des Aktivierungszustandes von NK-Zellen durch inhibitorische und aktivierende Rezeptoren

A) In diesem Beispiel interagieren inhibitorische Rezeptoren mit ihrem HLA-Ligand in Abwesenheit von aktivierenden Signalen. Die Zielzelle wird nicht lysiert.
B) Wenn umgekehrt nur aktivierende Signale auf die Zelle treffen und inhibitorische Signale fehlen, wird die Zelle lysiert, da die NK-Zelle die Zielzelle als fremd identifiziert hat.
C) Hier ist der Zustand der NK-Zelle dem Zustand in vivo genauer nachempfunden. Es treffen immer mehrere Signale auf die Zelle ein, je nachdem welches Signal dominiert, ist die Reaktion der Zelle unterschiedlich. Überwiegen wie in diesem Beispiel die aktivierenden Signale, wird die Zelle lysiert
D) Hier überwiegen die inhibitorischen Signale und die Zielzelle wird nicht lysiert.

Im weiteren Verlauf der Forschung wurden jedoch auch Zellen gefunden die trotz normaler HLA-Expression lysiert wurden, sowie Zellen mit fehlender oder fehlerhafter HLA-Expression, die keine Aktivierung von NK-Zellen bewirken (beispielsweise

Erythrozyten). Die Regulierung der Aktivität ist folglich viel komplizierter und nicht allein durch die „Missing-self“ Hypothese erklärbar [1]. Ein kompliziertes Zusammenspiel von inhibitorischen und aktivierenden Signalen bestimmt den Aktivierungszustand der NK-Zelle. Auch Zytokine spielen hier eine wichtige Rolle, da sie die Proliferation und die sekretorische Funktion entscheidend beeinflussen [4].

Näherungsweise werden die Rezeptoren in aktivierende und inhibierende Rezeptoren eingeteilt, wobei beide Gruppen vor allem HLA-Klasse-I-Moleküle erkennen und verschiedenen Subklassen zugeordnet werden können. Zu diesen Subklassen gehören die KIRs, die Rezeptoren vom C-Lektin-Typ und die natürlichen zytotoxischen Rezeptoren (natural cytotoxity receptors, NCR) [1]

3.1.2.1. Killerzell-Immunoglobulin-ähnliche-Rezeptoren (KIRs)

KIRs gehören zu der Immunglobulin Superfamilie und zeichnen sich durch zwei bis drei immunglobulinartige extrazelluläre Domänen aus, die HLA-Klasse-I-Moleküle vom Typ HLA-A, HLA-B und HLA-C binden. Funktionell können KIRs zwei unterschiedliche Signale in die Zelle senden, nämlich inhibitorische und aktivierende [1].

Die Gruppe der inhibierenden KIR-Rezeptoren umfasst die Isoformen KIR2DL und KIR3DL mit je zwei bzw. drei extrazellulären Immunglobulin-(Ig)-ähnlichen Domänen und langer zytoplasmatischer Domäne. Die lange zytoplasmatische Domäne der inhibierenden KIRs besitzt ein tyrosinhaltiges inhibierendes Motiv (immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif, ITIM), das nach Bindung des Liganden an den Rezeptor inhibitorische Signale weitervermittelt, die zu einer allgemeinen Deaktivierung der NK-Zellfunktion führen.

Das ITIM wird bei diesem Vorgang von membranständigen Kinasen phosphoryliert, wodurch die Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 an den Rezeptorkomplex binden können, wobei es durch Dephosphorylierung aller nachgeschalteten Signalkomponenten zur Abschaltung der Effektorwirkung der NK-Zellen kommt [1, 9].

KIR2DL2 sowie KIR2DL3 binden alle HLA-C-Allelprodukte, die mit einem Serinrest an Position 77 der Aminosäuresequenz und einem Asparaginrest an Position 80 der schweren Kette (HLA-C Ser77Asn80) ausgestattet sind und HLA-C Gruppe 1 (hier im Folgenden “C1” genannt) genannt werden. Dagegen bindet KIR2DL1 an HLA-C-Moleküle der Gruppe 2 (hier im Folgenden “C2” genannt), die durch einen Asparaginrest an Position 77 und einen Lysinrest an der Position 80 (HLA-C Asn77Lys80) gekennzeichnet sind [10].

Die aktivierenden Rezeptoren KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DL4, KIR2DS4, KIR2DS5 und KIR3DS1 mit kurzem zytoplasmatischem Teil sind über ihren Transmembranteil mit Adaptermolekülen verknüpft, die aktivierende tyrosinhaltige Immunrezeptor Motive (immunoreceptor tyrosin-based activating motif, ITAM) umfassen und aktivierende Signale über die Rekrutierung der Tyrosinkinasen Syk und ZAP-70 weiterleiten. Die aktivierenden Rezeptoren besitzen im Allgemeinen eine geringere Affinität für HLA-Liganden. So binden KIR2DS1 und KIR2DS2 mit geringerer Affinität an dieselben HLA-C-Liganden wie KIR2DL1 und KIR2DL2/3 [11].

Aufgrund der Zytokinfreisetzung gilt KIR2DL4 trotz seiner langen zytoplasmatischen Domäne als aktivierender KIR-Rezeptor [12]. Die Liganden für KIR2DS3 und KIR2DS5 sind bisher unbekannt [13].

3.1.2.2. Rezeptoren vom C-Typ-Lektin

Rezeptoren vom C-Typ-Lektin werden selektiv von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen exprimiert. Sie sind Heterodimere und bestehen aus einer gemeinsamen Untereinheit, dem CD94, und dem kovalent daran gebundenen C-Typ-Lektin NKG2, der extrazellulären Domäne des Rezeptors. Vier unterschiedliche Versionen des Transkripts der NKG2 Familie liegen vor NKG2A (mit seiner Splice-Variante NKG2B), NKG2C, NKG2E (mit seiner Splice-Variante NKG2H) und NKG2F. NKG2D ist eine fünfte Version, die im Vergleich mit den anderen Versionen kaum identische Sequenzen erhält [14].

Von diesen Rezeptoren ist nur NKG2A inhibitorisch, alle anderen C-Typ-Lektin-Rezeptoren aktivieren NK-Zellen. Die Liganden für C-Typ-Lektin-Rezeptoren sind HLA-Klasse-I-Moleküle [14-16].

3.1.2.3. Natürliche Zytotoxizitäts-Rezeptoren

Die Natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren (natural cytotoxicity receptors; NCRs) sind für die NK-Zellen spezifisch und eine der Hauptmechanismen der NK-Zelle zur Abtötung von Tumorzellen. Das bewies die Inkubation von NK-Zellen mit Antikörpern gegen verschiedene NCRs, die die Lyse der Zielzelle verhindern konnten [17]. Die NCRs und der C-Typ-Lektin ähnliche Rezeptor NKG2D erkennen, im Gegensatz zu KIRs und Rezeptoren vom C-Lektin Typ, Targets, die HLA-Klasse-1 negativ sind.

Drei NCRs sind bekannt und zwar NKp30, NKp44 und NKp46. Sie gehören zur Ig-Superfamilie.

Die Liganden, die mit den NCRs assoziieren, sind verschiedene Signal- und Adaptermoleküle (siehe Tabelle 2). Diese wurden nach Stimulation mit spezifischen Antikörpern gegen genannte Rezeptoren nachgewiesen. Eine Stimulation der NCRs auf ruhenden NK-Zellen führte jedoch zu keiner wirksamen Zytotoxizität [1, 18].

Tabelle 1

Inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren und ihre Liganden

Rezeptor	**Ligand**
KIR	
KIR2DL1	HLA-C2 (Cw2, 4, 5, 6, 15, 17, 18)
KIR2DL2/3	HLA-C1 (Cw1, 3 (9, 10), 7, 8, 12, 14, 16)
KIR2DL5	nicht bekannt
KIR3DL1	HLA-Bw4
KIR3DL2	HLA-A3, -A11
KIR3DL3	nicht bekannt
KIR3DL7	nicht bekannt
C-Typ-Lektin-Rezeptoren	
CD94/NKG2A/B	HLA-E
Immunglobulinähnliche Transkripte	
ILT-2 (LIR1)	nicht bekannt
Andere Rezeptoren	
P75/AIRM	nicht bekannt
Irp60	nicht bekannt
LAIR-1	Ep-CAM

Tabelle 2

Aktivierende NK-Zell-Rezeptoren und ihre Liganden

Rezeptor	**Ligand**
MHC-Klasse I spezifisch	
KIR	
KIR2DS1	HLA-C2 (Cw2, 4, 5, 6, 15, 17, 18)
KIR2DS2	HLA-C1 (Cw1, 3 (9, 10), 7, 8, 12, 14, 16)
KIR2DL4	HLA-G
KIR2DS3/4	nicht bekannt
KIR2SS5	nicht bekannt
KIR3DS1	nicht bekannt
C-Typ-Lektin-Rezeptoren	
CD94/NKG2C	HLA-E
CD94/NKG2E/H	nicht bekannt
Nicht MHC-Klasse I spezifisch	
Natürliche Zytotoxizitäts-Rezeptoren	
NKp46	CD3ζ, CD3ζ-FcεRIγ
NKp44	DAP-12
NKp30	CD3ζ
C-Typ-Lektin-Rezeptoren	
NKG2D	MICA, MICB, ULPB-1, -2, -3
Korezeptoren	
CD16 (FcyRIII)	Fc (IgG)
CD2	CD58 (LFA-3)
LFA-1	ICAM-1
2B4	CD48
NKp80	nicht bekannt
CD69	nicht bekannt
CD40 Ligand	CD40

3.1.3. Lizensierung von NK-Zellen

Ein wesentlicher Teil der Entwicklung von NK-Zellen ist das Lernen zwischen “selbst” und “fremd“ zu unterscheiden. Die Fähigkeit zur Lyse eines Target, sowie die Toleranz gegenüber Zellen, die HLA-Klasse-I-Moleküle exprimieren, ist für die NK-Zelle essentiell. Diese Eigenschaften erlangt die NK-Zelle durch einen Prozess, der als “Lizensierung” bezeichnet wird [19]. Für die Lizensierung sind bestimmte Rezeptoren von besonderer Bedeutung, nämlich die inhibitorischen KIRs (KIR2DL1/2/3). Erst durch die Interaktion von mindestens einem dieser Rezeptoren mit dem jeweiligen HLA-Klasse-I-Ligand (C1, C2 oder Bw4), erlangen die NK-Zellen Ihre vollständige

Effektorfunktion. Fehlen diese inhibitorischen KIRs kann alternative auch der CD94/NKG2A-Rezeptor, der zu den C-Typ-Lektin- Rezeptoren zählt, eine lizensierende Funktion ausführen [20]. Fehlt auch dieser Rezeptor, werden NK-Zellen hyporesponsiv [21]. In dem von Joncker und Fernandez [22] postuliertem Rheostat-Modell wird deutlich, dass das zytotoxische Potential von NK-Zellen, je nach Art und Intensität der lizensierenden Signale, sehr unterschiedlich ausfallen kann. Diese hängen ab von der Expressionsdichte der HLA-Klasse-I-Moleküle auf normalen Körperzellen. Je mehr inhibitorische Rezeptoren letztendlich vorhanden sind, desto stärker ausgeprägt sind die zytotoxischen Effektormechanismen [22].

3.1.4. Modelle der KIR-vermittelten Interaktion mit den Zielzellen im Rahmen von Stammzelltransplantationen

NK-Zellen interagieren mit ihren Zielzellen hauptsächlich über Ihre Rezeptoren (siehe auch 3.1.2.). Dieses ist von besonderer therapeutischer Bedeutung im Rahmen von Stammzelltransplantationen. Sowohl die Beseitigung verbliebener Leukämiezellen, als auch eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit und die Verminderung der Rückfallrate, werden auf die Interaktionen von NK-Zellen des Spenders mit den Körperzellen des Empfängers zurückgeführt. Als erstes konnte dieser Vorteil an Patienten mit AML beobachtet werden [23]. Diese Interaktion ist Gegenstand von mehreren Theorien, bzw. Modellen, nämlich einerseits dem “Rezeptor-Ligand-Modell” und andererseits dem “Ligand-Ligand-Modell”. Bei dem Rezeptor-Ligand-Modell wird angenommen, dass die Empfänger homozygot für die HLA-Klasse-I-Moleküle sind und der Spender mindestens ein KIR exprimiert, welcher keinen korrespondierenden Liganden beim Empfänger aufweist (z.B Spender hat KIR2DL1 als Rezeptor und dem Empfänger fehlt der passende Ligand HLA-C2). Dieses führt zur Lyse der Zielzelle, da dem inhibitorischen Rezeptor der passende Ligand fehlt.
Beim Ligand-Ligand-Modell basiert die Alloreaktivität auf dem HLA-C Typing. Das heißt dem Empfänger fehlt ein vom Spender exprimierter KIR-Ligand. Somit fehlen die inhibitorischen Signale und die Zielzelle wird lysiert [24, 25].

Des Weiteren gibt es noch das KIR-Genotyp-Modell. Hier wird die Kombination verschiedener KIR-Rezeptoren in Hinblick auf die Überlebenswahrscheinlichkeit des Empfängers untersucht. Je weniger aktivierende KIR-Rezeptor-Gene beim Spender vorhanden sind, desto ausgeprägter sind die positiven Effekte für den Empfänger [24]. Aufgrund jedoch unterschiedlicher Transplantationsprotokolle und Patientenkollektive sind die Aussagen über einen etwaigen Vorteil, der abhängig vom Genotyp ist, kontrovers.

3.2. Das Multiple Myelom

3.2.1. Definition

Das Multiple Myelom, welches die zweithäufigste hämatologische Neoplasie darstellt, zeichnet sich durch diffuse oder multilokuläre Infiltration des Knochenmarks aus. Die Erkrankung beginnt mit einem Klon maligne transformierter Plasmazellen, die sich klonal vermehren, die Hämatopoese verdrängen und den Knochen lysieren. Die meisten dieser Plasmazellklone bilden im Serum und/oder im Urin nachweisbare monoklonale Immunglobuline, welche aufgrund ihrer Spezifität nicht an der normalen Immunabwehr beteiligt sind. Meistens handelt es sich hierbei um komplette Immunglobulinmoleküle vom Typ IgG oder IgA , oder Immunglobulin Leichtketten (κ und λ), die sogenannten Bence-Jones Proteine [26, 27].

Im Deutschen wird der Begriff Multiples Myelom dem Plasmozytom oder auch M. Kahler gleichgesetzt, obwohl es sich bei dem Plasmozytom per definitionem um einen „solitären Tumor aus Plasmazellen“ handelt, während das Multiple Myelom durch disseminiert vorkommende Plasmazellnester im Knochenmark charakterisiert ist.

Die sekundäre Monoklonale Gammopathie und die Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS) sind als Differenzialdiagnosen vom Multiplen Myelom abzugrenzen. Die sekundäre monoklonale Gammopathie ist bei anderen malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems und Autoimmunerkrankungen zu betrachten. Bei der MGUS handelt es sich um eine primär nicht maligne Erkrankung, die ebenfalls mit einem Anstieg vom monoklonalen Plasmazellen einhergeht (Serumkonzentration < 3 g/dl), jedoch kommt es zu keinen zusätzlichen Symptomen wie Osteolysen und die Plasmazellinfiltration im Knochenmark liegt bei <10%. Liegt die Serumkonzentration der monoklonalen Immunglobuline über 3 g/dl

und beträgt die Plasmazellinfiltration über 10% spricht man von einem „smoldering multiple myeloma“ (SMM) [28].

Bei ca. 3% aller 50-jährigen Personen und älter, tritt eine MGUS auf, wobei die Prävalenz mit dem Alter steigt. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich aus der MGUS ein Multiples Myelom entwickelt, liegt bei 1% pro Jahr [28].

Die Inzidenz für das Multiple Myelom beträgt in Mitteleuropa altersadjustiert 4/100.000 Personen jährlich, wobei die Erkrankung in den meisten Fällen erst nach dem 40. Lebensjahr auftritt und mit dem Alter stark ansteigt. 75% der Patienten sind bei Erstdiagnose über 60 Jahre alt, das mediane Erkrankungsalter liegt bei 71 Jahren [27].

3.2.2. Ätiologie

Die Ätiologie des Multiplen Myeloms ist ungeklärt. Verschiedene Ursachen spielen möglicherweise eine Rolle, wie genetische, hormonale und ethnische Faktoren, sowie Umwelteinflüsse. Chromosomale Veränderungen, z.B. Translokation 14q32, Deletion 13q14, 17p13 und 11q-Anomalien werden gehäuft beobachtet und als Ursache diskutiert. Als Grund für diese Veränderungen wird ionisierende Strahlung vermutet. Des Weiteren konnte man feststellen, dass Menschen afrikanischer Abstammung unter einem erhöhten Risiko leiden am Multiplen Myelom zu erkranken, im Gegensatz zur asiatischen Bevölkerung, bei der eine verringerte Inzidenz beobachtet werden konnte. Diese Tatsache lässt ebenfalls vermuten, dass genetische Faktoren eine Rolle spielen .

Weitere Risikofaktoren für die Entstehung des Multiplen Myeloms sind der Kontakt mit Insektiziden, Phenoxyherbiziden, Benzol, Schwermetallen und Asbest. Möglicherweise begünstigt auch der dauerhafte Gebrauch von Haarfärbemitteln die Entstehung der Erkrankung [29]. Ein erhöhtes Risiko an einem Multiplen Myelom zu erkranken wird für Verwandte ersten Grades von Myelompatienten diskutiert. Ob es sich dabei um vererbbare disponierende Faktoren wie HLA-Unterschiede, DNA-Veränderungen oder Zytokin/Hormon-Antwortmuster handelt, die zu einer malignen Entartung prädisponieren, ist derzeit nicht geklärt [30] .

Die MGUS und das SMM, welches in der Literatur als „asymptomatisches Multiples Myelom“ bezeichnet wird, gelten ebenfalls als Risikofaktor. Die MGUS geht, wie schon erwähnt, mit einer Häufigkeit von ca. 1% pro Jahr in ein Multiples Myelom über, während die Häufigkeit, dass ein SMM in ein Multiples Myelom übergeht, deutlich höher ist [28].

3.2.3. Pathogenese

Die Entstehung maligner Plasmazellen ist ein multifaktorieller, noch weitgehend unbekannter Prozess, dem eine Vielzahl von strukturellen chromosomalen Aberrationen vorausgeht.

Eine dieser Veränderungen spielt sich möglicherweise am Genlocus 14q32 ab, der für die Antikörperschwerketten kodiert. Als Folge einer Translokation mit Partner-Loci wie 11q13, 4p16, 6p21, 16q23 und 20q11, welche Onkogene tragen, wird eine Überexpression dieser Onkogene im weiteren Verlauf angenommen. Dies könnte sich proliferativ auf das Tumorwachstum ausüben [31].

Die Entstehung von malignen Plasmazellklonen aus B-Zellen findet im Lymphknoten statt. Durch den Blutstrom gelangen diese Zellen ins Knochenmark, wo sie die gesunden hämatopoetischen Stammzellen durch ungehindertes Wachstum verdrängen. Die Interaktionen zwischen den Myelomzellen und der Mikroumgebung im Knochenmark ist hierbei ebenso wichtig wie die vorrausgegangenen chromosomalen Veränderungen.

Für den Erhalt der Tumorzellen sind Wachstumsfaktoren, wie Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor Alpha (TNF-alpha) und vasoendothelial growth factor (VEGF) wichtig. Für VEGF gilt, dass er durch Stimulation von Knochenmarkstromazellen die Produktion von IL-6 unterstützt. Zusammen mit IL-6 gilt er als ein Hauptfaktor für das Tumorwachstum, die Angiogenese und wirkt auf die malignen Zellen schützend vor medikamenteninduzierter Apoptose [32]. IL-6 kann auch von Myelomzellen selbst gebildet werden, so dass von einem zusätzlichen autonomen Proliferationsanreiz ausgegangen werden kann [33].

3.2.4. Klinik

Symptome zu Beginn der Erkrankung sind meist uncharakteristische Symptome wie Gewichtsverlust, Nachtschweiß und Knochenschmerzen und treten oft erst im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium auf. Patienten berichten über Müdigkeit, Abgeschlagenheit und Schmerzen in Rücken oder Rippen. Es treten pathologische Frakturen auf, als Folge instabiler Osteolysen. Begleitend wird oft eine stark

beschleunigte BSG gemessen, eine leicht erhöhte BSG schließt ein Multiples Myelom jedoch nicht aus. Beim Bence-Jones Myelom sind BSG und Serumelektrophorese kaum verändert.

Nach den Kriterien der International Myeloma Working Group (IMWG) gibt es mehrere Symptome, von denen mindestens zwei gegeben sein müssen. Diese sind: 1. Klonale Plasmazellen im Knochenmark (> 10%), 2. Nachweisbares Monoklonales Protein im Serum und /oder Urin, 3. Endorganschäden (siehe CRAB-Kriterien (3.2.5)).

Das Multiple Myelom wird je nach hauptsächlich gebildeter Immunglobulinschwerkettenklasse unterschieden. Eine Ausnahme stellt das sogenannte „Bence-Jones-Myelom“ dar, welches ausschließlich Ig-Leichtketten produziert. Der am häufigsten sezernierte Ig-Schwerkettentyp ist das IgG, welches von ca. 60% der Myelompatienten gebildet wird. In ca. 20% der Fälle wird IgA gebildet. IgD tritt nur in ca. 1-2% auf. In <1% werden keine Ig-Globuline sezerniert, es handelt sich dann um ein asekretorisches Myelom.

Die Ig-Produktion kann als erhöhte Proteinkonzentration im Blut/Urin nachgewiesen werden und imponiert wegen des monoklonalen Proteinanstiegs in der Immunelektrophorese als typische monoklonale Gammopathie, auch M-Gradient genannt. Die sogenannten Bence-Jones-Proteine werden nicht nur vom „Bence-Jones-Myelom“ sezerniert, sondern auch vom Multiplen Myelom des Subtyps IgG und IgA. Bence-Jones-Proteine fallen beim Erhitzen auf 50°C aus und gehen bei weiterem Temperaturanstieg wieder in Lösung [34].

Insbesondere das IgD- und das Leichtketten-Myelom gehen mit einer sogenannten „Myelomniere“ einher, der sogenannten „Cast-Nephropathie“. Aufgrund der Leichtkettenablagerung in der Niere kommt es zu einer progredienten toxischen renalen Funktionseinschränkung. Klinisch äußert sich die Leichtkettenablagerung in einem nephrotischen Syndrom: 50% der Patienten entwickeln eine Niereninsuffizienz von denen 10% dialysepflichtig werden. Insgesamt gibt es drei Manifestationsformen des Multiplen Myeloms an der Niere, und zwar die Myelomniere, die AL-Amyloidose und die Leichtkettennephropathie. Des Weiteren können die hohen Immunglobulin-Konzentrationen zu einem Hyperviskositätssyndrom führen, infolge von Polymerenbildung, insbesondere von IgA. Erfolgt die Polymerenbildung bei niedrigen Temperaturen spricht man von Kyroglobulinen, die zu Raynaud-artigen Durchblutungsstörungen führen können. Vor allem die Augen, Gehirn, Herz und Nieren sind betroffen

Obwohl es zu einer gesteigerten Produktion von monoklonalen Antikörpern kommt, haben diese Antikörper keine Abwehrfunktion. Es kommt daher während des Progresses der Krankheit zu einem Antikörpermangel, der sich in vermehrter Infektanfälligkeit äußert. Fieber ist in diesem Zusammenhang ein Infektzeichen und nicht, wie bei Leukämien oft vorkommend, ein unspezifisches Begleitsymptom [34].

Laborchemisch lässt sich infolge der Knochendestruktion oft eine Hyperkalzämie nachweisen, welche u.a. zu gastrointestinalen Symptomen, Muskelschwäche, Erregungszuständen und einer weiteren Verschlechterung der Nierenfunktion führt. Ein wichtiger prognostischer Parameter für die Tumoraktivität ist das $ß_2$-Mikroglobulin im Serum, welches die Leichtkette des Klasse I-Komplexes darstellt und auf der Oberfläche jeder Zelle zu finden ist. Hohe Konzentrationen an $ß_2$-Mikroglobulin gehen mit einer hohen Tumorzelllast und demnach auch mit einer schlechten Überlebensprognose einher. LDH und CRP stellen ebenfalls Laborparameter dar, die prognostisch genutzt werden können.

Als zunehmend wichtige Diagnostik wird die molekulargenetische Testung angesehen, da chromosomale Anomalien als prognostisch negative Faktoren gelten (siehe Kapitel 2.1.3).

Anhand der diagnostisch bestimmbaren Parameter findet mittels der Durie-Salmon-Klassifikation oder des International Staging Systems (ISS) eine Einteilung in ein Erkrankungsstadium I-III statt. Eine eingeschränkte Nierenfunktion ist bei der Einteilung nach Durie und Salmon ein ungünstiger Faktor, so dass die Stadien, je nach Vorliegen einer Nierenbeteiligung, die Zusätze A für normale und B für eingeschränkte Nierenfunktion erhalten [35]. Die ISS-Einteilung bezieht die beiden Laborparameter Albumin und ß2-Mikroglobulin im Serum in die Stadieneinteilung mit ein. Stadium 1 bedeutet ß2-Mikroglobulin unter 3,5 mg/l und Albumin über 3,5 g/dl. Stadium 2 ist alles was nicht Stadium 1 und 3 ist, Stadium 3 hingegen bedeutet, dass ß2-Mikroglobulin im Serum über 5,5 mg/l ist [36].

Die Stadieneinteilung nach Salmon und Durie gilt als orientierendes Maß für die Tumormasse, ist aber kein zuverlässiger Prognoseparameter. Die meisten Patienten befinden sich bei Diagnosestellung bereits im Stadium III.

Parameter	Stadium I	Stadium III
Hämoglobin	> 10 g/dl	< 8,5 g/dl
Serum-Ca	normal	> 3 mg/dl
Osteolysen	maximal eine	fortgeschritten
IgG	< 50 g/l	> 70 g/l
IgA	< 30 g/l	> 50 g/l
Leichtketten (Urin)	< 4 g/24h	>12 g/24h
A = normale Nierenfunktion (Kreatinin < 2 mg/dl)		
B = eingeschränkte Nierenfunktion (Kreatinin > 2 mg/dl)		
Staduim II: Weder Stadium I, noch Stadium III		

Abbildung 2

Einteilung nach Salmon und Durie

3.2.5. Therapie

Die International Myeloma Working Group (IMWG) hat festgelegt, dass eine Therapie nur bei symptomatischen Patienten von Nöten ist. Sie hat dazu die “CRAB”-Kriterien zur Festlegung einer Behandlungsindiktion definiert.

Dazu gehören Hyperkalzämie, Niereninsuffizienz, Anämie und Knochenbeteiligung (“HyperCalcemia”, “Renal insufficiency”, “Anemia”, “Bone lesions”). Ein Kriterium reicht, um die Behandlung zu starten. Ziel ist immer das Erreichen einer Krankheitsremission, bzw. das Kontrollieren der Symptome [37]. Die Behandlung erfolgt, wenn möglich, im Rahmen von klinischen Studien.

Bei asymptomatischen Patienten wird zunächst keine spezifische Therapie begonnen, sondern engmaschig kontrolliert. Eine einzelne Osteolyse kann eine operative Stabilisierung und/oder lokale Bestrahlung erforderlich machen. Bis es von der Diagnose zu einem Progress der Krankheit kommt vergehen im Median zwei bis drei Jahre und bei manchen Patienten bleibt der Progress sogar komplett aus [34].

Die Induktionstherapie wird nach heutigen Empfehlungen mit den Substanzen Bortezomib, Thalidomid und Lenalidomid begonnen [38].

Die konventionelle chemotherapeutische Behandlung, umfasst die alkylierende Substanz Melphalan (Alkeran) in Kombination mit Prednisolon (MP- oder Alexanian-Schema). Diese Therapieschemata werden bei Patienten, die älter als 65 sind

angewendet und bei Patienten, die für eine Hochdosis Chemotherapie nicht geeignet sind. Die Zugabe von Thalidomid senkt die Letalität um ca. 40%/4 Jahre, wobei sich ein Überlebenszeitgewinn von ca. 18 Monaten ergibt. Mit dieser Behandlung wird eine Ansprechrate von 70% erzielt und eine mediane Remissionsdauer von 12 bis 18 Monaten. Da Melphalan stark stammzelltoxisch ist, wird es vor einer Stammzellentnahme bei geplanter autologer Transplantation vermieden.

Bei jungen Patienten <65 Jahre mit gutem Allgemeinzustand kommt eine Hochdosistchemoherapie mit anschließender autologer oder allogener Stammzelltransplantation in Frage. Diese Behandlung erfolgt mit dem Ziel einer Langzeitremission. Unter Berücksichtigung des biologischen Alters, sowie der Komorbiditäten ist eine dosisreduzierte Hochdosis-Chemotherapie mit Transplantation autologer Blutstammzellen jedoch auch bei älteren Patienten möglich („reduced intensity conditioning“) [39].

Die allogene Stammzelltransplantation bietet die Chance einer Heilung bzw. einer Langzeitremission aufgrund des Graft-versus-Leukaemia-Effekts (GvL). Dieser wird durch die transplantierten Spenderlymphozyten, d.h. eine immunologische Reaktion, die zum Absterben maligner Plasmazellen führt, erreicht. Die Verpflanzung von immunkompetenten Zellen birgt jedoch auch das Risiko einer GvHD, bei der die Spenderlymphozyten das gesunde Gewebe des Stammzellempfängers angreifen. Neben der GvHD stellen Infektionen ein großes Problem der allogenen SCT dar. Die behandlungsassoziierten Nebenwirkungen gehen mit einer Mortalität von bis zu 40% einher. Die Therapieassoziierte Mortalität der allogenen SCT mit Zellen von Familien- oder Fremdspendern ist daher wesentlich höher (15-25%) als bei autologer SCT (2-3%).

Dennoch wird gerade bei jungen Patienten in gutem Allgemeinzustand eine allogene Stammzelltransplantation angestrebt, denn bei diesem Verfahren entfällt die Gefahr der Transplantatkontamination mit verbliebenen malignen Plasmazellen und zudem möchte man so den GvL-Effekt nutzen um eine Langzeitremission zu erreichen [40] [39, 41-43].

3.3. Arbeitshypothesen und Versuchsaufbau

Die Zielsetzung dieser Arbeit im Auge behaltend, war die Motivation einen Versuchsaufbau zu entwickeln, mit denen sich die darin erwähnten Fragestellungen bearbeiten lassen.

Zuerst sei erwähnt, dass der Versuchskern in den Experimenten mit den Zelllinien des Multiplen Myeloms bestand. Die Zelllinie der Akuten Myeloischen Leukämie haben wir lediglich verwendet, da hier, im Gegensatz zu den Zelllinien es Multiplen Myeloms, auch welche mit dem Ligandenkomplex C2/C2 verfügbar waren.

Wir wollten zeigen, dass KIR2DL1 auf NK-Zellen, je nach Ligand auf den Myelomzellen, entweder einen inhibierenden oder einen aktivierenden Effekt auslöst. Um den KIR-Effekt isoliert zu untersuchen haben wir eine NK-Zelllinie ohne KIR2DL1 (KHYG-1) gewählt und folgende Versuche durchgeführt:

1. Transfektion der KHYG-1 Zelllinie mit KIR2DL1
2. Testung der KIR2DL1 exprimierenden NK-Zelllinie auf unterschiedlichen Myelomzelllinien hinsichtlich KIR-Rezeptor-Ligand- und des Ligand-Ligand-Modell.

Auf einen Chrom-Release-Assay haben wir verzichtet, da der LDH-Assay vergleichbare Resultate bringt, ohne radioaktive Substanzen zu verwenden.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Laborgeräte

Brutschrank	Kendro/Langenselbold/Germany
Eismaschine	Hoshizaki/Nagoya/Japan
Kühlschrank mit Gefrierfach	Liebherr/Bulle/Schweiz
Kühltruhe, -80ºC	Haraeus/Hanau/Deutschland
Laborpipetten	Eppendorf/Hamburg/Germany
Tischzentrifuge	Heraeus/Hanau/Deutschland
Zentrifuge, 6K10	Sigma/Osterode/Germany
Mikroskop	Hund Wetzlar/Wetzlar/Germany
Wasserbad	Thermo Scientific/Bonn/Germany
Vortex-Genie®2	Scientific-Industries/New York/USA
Rüttler: Typ Vx7	Janke&Kunkel/Staufen/Germany

4.1.2. Kits

EndoFree® Plasmid Maxi Prep Purification Kits

- Qiagen/Venlo/Niederlande

Cyto Tox 96® Non-Radioactive Cytotoxity Assay

- Promega/Madison/USA

4.1.3. Klone

Der Klon, also die genetische Information betreffend identische Form des Homo-sapiens Killer-cell-immunoglobin-like-receptors (KIR2DL1) mit zwei Domänen und einem langen cytoplasmatischem Schwanz, stammt von der Firma OriGene/Rockville/USA und liegt bereits als transfektionsfertige Plasmid-cDNA vor.

4.1.4. Vektoren

Der Vektor, also das Transportmolekül (Plasmid), in dem die DNA von KIR2DL1 enthalten ist, wird bezeichnet als pCMV6-XL5 und stammt ebenfalls von der Firma OriGene/Rockville/USA.

4.1.5. Zelllinien

4.1.5.1. NK-Zelllinie

Es wurde eine Immortalisierte NK-Zelllinie verwendet. Hierbei handelt es sich um KHYG-1. Das in diesem Fall Interessante ist, dass KHYG-1 kein KIR2DL1 exprimiert. Das heisst, wenn wir KIR2DL1 im Laufe der Versuche nachgewiesen haben, wurde dieses Protein durch die erfolgreiche Transfektion in die Zelllinie exprimiert (erhalten vom DSMZ, Braunschweig).

4.1.5.2. MM-Zelllinien

Es wurden drei immortalisierte Zelllinien von Myelompatienten verwendet die eine Plasmainfiltration von 100% aufweisen. Bei ihnen handelt es sich um die Zelllinien MOLP-8 (C1/C2), KMS-12-BM (C1/C1) und RPMI-8226 (C1/C2) (erhalten vom DSMZ, Braunschweig). Wichtig war hier, dass die Zelllinien unterschiedliche HLA-C Liganden exprimieren um den Effekt von KIR2DL1 zu testen.

4.1.5.3. AML-Zelllinien

Die hier verwendeten AML-Zelllinie wird als OCI-M1 (C2/C2) bezeichnet (erhalten vom DSMZ, Braunschweig).

4.1.6. Zellkulturmedien allgemein

RPMI 1640	Invitrogen/Gibco/Karlsruhe/Germany
Fetales Bovines Serum (FBS)	Invitrogen/Gibco/Karlsruhe/Germany
Penicillin 10.000 U/ml	Invitrogen/Gibco/Karlsruhe/Germany
Streptomycin 10.000 U/ml	Invitrogen/Gibco/Karlsruhe/Germany

4.1.6.1. Zellkulturmedien MM

Alle MM-Zelllinien wurden in 90% RPMI 1640 + 10% FBS kultiviert.

4.1.6.2. Zellkulturmedium AML

Das Medium für die AML-Zelllinie setzt sich jeweils zu unterschiedlichen Teilen zusammen.

OCI-M1: 80-90% IMDM + 10-20% FBS.

4.1.7. Nährmedien

Als Nährmedium wurde für alle Versuche, die ein Nährmedium erfordern, das E. coli fast media™ von der Firma Fermentas Life Sciences/St. Leon-Rot/Deutschland verwendet. Dieses Nährmedium ist einmal als Fast Media™ LB Liquid Amp und als

Fast Media™ LB Agar Amp IPTG/X-Gal zu erhalten. Beide Produkte haben in dieser Versuchsreihe Verwendung gefunden.

4.1.8. Material Maxi Prep

Siehe EndoFree® PlasmidMaxi Prep Purification Kit (Qiagen/Venlo/Niederlande).

4.1.9. Material reverse Transfektion

Siehe True Clone Application Guide (Origene/Rockville/USA).

Ansonsten verwendet:

pCMV6-XL5 Vektor	Origene/Rockville/USA
2,5 µl FuGene® Transfection Reagent	Promega/Madison/USA
100 µl Optimem Lösung	Invitrogen/Karlsruhe/Deutschland
RPMI 20%, FCS, IL-2, 0,5 µg/0,2% G418	Eigens zusammengestellt

4.1.10. Material RNAi-Stealth-Transfektion

125 µl BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo	Invitrogen/Gibco/Karlsruhe/Germany
250 µl Lipofectamine™ 2000 Reagenz	Invitrogen/Gibco/Karlsruhe/Germany
50 pmol RNA Stealth™	Invitrogen/Gibco/Karlsruhe/Germany
Optimem I/II medium	Gibco/Karlsruhe/Germany
24-well plate	Greiner Bio-One/Frickenhausen/Germany
RNAi Basic Control Kit-Human	Invitrogen/Gibco/Karlsruhe/Germany

4.1.11. Material Westernblot

XCell SureLock™ Mini-Cell	Invitrogen/Gibco/Karlsruhe/Germany
XCell II™ Blot Module Kit CE Mark	Invitrogen/Gibco/Karlsruhe/Germany
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel 1 mm 12 well	Invitrogen/Gibco/Karlsruhe/Germany
Top-BlockTM	Fluka Analytical/St. Gallen/Switzerland
Sponge Pad for XCell II™ Blotting	Invitrogen/Gibco/Karlsruhe/Germany
Chromatography paper 3 mm chr (15x20 cm)	Whatman/Freiburg/Germany
Amersham HybondTM-ECLTM-Nitrocellulose Membrane	Amersham/Freiburg/Germany
Amersham Hyperfilm™ MP (18 × 24 cm)	GE Healthcare/Freiburg/Germany
Entwicklungkammer (18 x 24 cm)	Rego/Haan/Germany
Power Supply Model 250/2,5	Biorad/München/Germany
Falcons 15 ml/50 ml	Eppendorf/Hamburg/Germany
E-Cups/Eppendorf tubes 1,5 ml	Eppendorf/Hamburg/Germany
Entwickler	Amersham/Freiburg/Germany
NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen/Gibco/Karlsruhe/Germany
NuPAGE® Transfer Buffer (20 x)	Invitrogen/Gibco/Karlsruhe/Germany
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4 x)	Invitrogen/Gibco/Karlsruhe/Germany
NuPAGE® Sample Reducing Agent (10 x)	Invitrogen/Gibco/Karlsruhe/Germany
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen/Gibco/Karlsruhe/Germany
Proteaseinhibitoren	Sigma/Steinheim/Germany
NaCl	J.T. Baker/Deventer/Netherlands
ECL™ Western Blotting Analysis System	GE Healthcare/Freiburg/Germany
RIPA Lyse Puffer	Bio Vision/California/USA

4.1.12. Antikörper Westernblot

Der für den Westernblot benötigte primäre spezifische Antikörper stammt von der Firma Abcam/Cambridge/UK und wird bezeichnet als Mouse monoclonal (2F9) to KIR2DL1. Der sekundäre Antikörper wird bezeichnet als Mouse IgG und stammt von der Firma RD Systems/Minneapolis/USA.

4.1.13. Material LDH-Assay

Siehe Cyto Tox 96® Non-Radioactive Cytotoxity Assay (Promega/Rockville/USA).

4.2. Methoden

4.2.1. Versuchsaufbau

Folgende Arbeitsschritte haben wir uns überlegt um die zielgesetzten Fragestellungen zu bearbeiten:
Das Ziel dieser Versuchsreihe war zuerst die Vervielfältigung der DNA des KIR2DL1-Gens mittels Bakterientransformation und anschließend dessen Aufreinigung. Die DNA ist in einem Vektor frei im Handel (siehe Material) verfügbar. Die Aufreinigung erfolgte nach vorgegebenem Protokoll (siehe Kapitel 4.2.3).
Die erste Frage die wir uns stellten war, ob es generell möglich ist, KIRs in die NK-Zellen zu transfizieren.
Des Weiteren stellten wir uns die Frage, ob es dauerhaft gelingt KIR2DL1, auf der sonst KIR2DL1-freien NK-Zelllinie (KHYG-1) zu exprimieren. Die Transfektion erfolgte in sechs Ansätzen, wovon zwei über drei Wochen vital blieben. Durch wöchentlichen Western Blot konnte die Transfektion in die NK-Zellen nachgewiesen werden. Mit der Aussaat von diesen zwei Ansätzen konnten die funktionellen Assays, wie der LDH-Assay und die RNAi-Stealth-Transfektion durchgeführt werden, womit wir nachweisen konnten, dass KIR2DL1 die Lyseeigenschaften von KHYG-1 in vitro verändert. Wir haben uns, wie schon erwähnt, für den LDH-Assay entschieden, da dieser, anders als der Chrom-Release-Assay, ohne Radioaktivität durchgeführt werden kann und dabei

den gleichen Zweck erfüllt. Der LDH- und Chrom-Release-Assay sind beide dazu da um Zytotoxizität nachzuweisen. Der LDH-Assay diente hier zur funktionellen Kontrolle der zytotoxischen Eigenschaften von NK-Zellen, wenn KIR2DL1 überexprimiert wird. Mit der RNAi-Stealth-Transfektion, die hier verwendet wurde um die Translation der DNA in die Aminosäuresequenz für KIR2DL1, mittels funktionsuntüchtiger mRNA (inhibitorische RNA (RNAi)) zu verhindern, konnte bestätigt werden, dass die Effekte von KIR2DL1 nicht als zufällig zu verstehen sind. Mit diesen NK Zellen wurde dann auch der LDH-Assay durchgeführt. So konnten die Ergebnisse dieses Assays, die zwei unterschiedlichen Expressionsgrade von KIR2DL1 berücksichtigt, verglichen werden. Die genauen Schritte werden in dem nun folgenden Teil erläutert.

4.2.2. Transformation

Um von der DNA des KIR2DL1-Gens, die die Firma OriGene bereits in einem Vektor (siehe Material 4.1.4) liefert, eine genügend große Menge zu erhalten wurde die DNA in Bakterien (hier Escherichia coli) transformiert und anschließend via QIAGEN® EndoFree Plasmid Maxi Kit aufgereinigt. Die Transformation der Bakterien begann mit dem Schritt, dass die Bakterien mit der Plasmid-DNA vermengt und gemischt wurden. Danach erfolgte die Inkubation 30 min auf Eis. Nach den 30 min wurde die Bakteriensuspension 40 s in ein Wasserbad gebracht, welches 42°C warm ist und versetzte ihr so einen Hitzeschock, was dazu führt dass sich Poren in der Bakterienmembran bilden und der Vektor aufgenommen und repliziert wird. Danach inkubierten die Bakterien erneut 2 min auf Eis. Die entstandene Suspension wurde nun auf LB Agar Amp Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C gelagert.

4.2.3. Maxiprep

Die Aufreinigung der KIR2DL1 cDNA erfolgte nach dem Protokoll des EndoFree® Plasmid Maxi Prep Purification Kits der Firma Qiagen/Venlo/Niederlande. Zuerst mussten die einzelnen Bakterienkolonien von den angelegten LB Agar Amp Platten gepickt, also aufgenommen werden. Die gepickten Kolonien wurden in 3-4 ml LB Liquid Amp aufgenommen und 12–16 h bei 37°C und 220 RPM geschüttelt. Nach der abgelaufenen Zeit wurden die angewachsenen Bakterien aus dem Schüttler

genommen und der Inhalt wurde in ein verschließbares Gefäß überführt. In diesem Gefäß erfolgte eine Zentrifugierung bei 6000 x g über 15 min. Der entstandene Überstand wurde verworfen. Das Bakterienpellet wurde mit 10 ml QIAGEN® Buffer P1 resuspendiert. Nach der Resuspension wurden 10 ml QIAGEN® Buffer P2 dazugegeben, mit der Bakteriensuspension vermengt und 5 min inkubiert. In dieser Zeit wurden die QIAGEN® tip 500 Filter äquilibriert. Nach der Inkubation wurden 10 ml QIAGEN® Buffer P3 dem Lysat zufügt und mit dem Lysat vermengt. Anschliessend wurde das Lysat in die QIAfilter® Maxi Cartridges überführt und 10 min stehengelassen. Dann wurde das Lysat in ein 50 ml Falcon durchgedrückt, in den 2,5 ml QIAGEN®Buffer ER zugegeben wurden. Danach wurde erneut vermengt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Falconinhalt wurde dann auf den äquilibrieten QIAGEN® tip 500 Filter gegeben bis er komplett durchgelaufen ist. Zwei Waschgänge folgten dann, indem jeweils 30 ml QIAGEN® Buffer QC dazugegeben wurde. Schließlich wurde die DNA mit 15 ml QIAGEN® Buffer QN eluiert. Nach diesem Schritt wurden 10,5 ml Isopropanol zu der eluierten DNA in das Falcon gegeben und 45 min bei 4500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dann wurde erneut mit 5 ml Ethanol und 15 ml Aqua des. gewaschen, indem 15 min bei

4500 x g zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Falcon wurde auf den Kopf gestellt um die DNA zu trocknen. Mit einer Auslaufpipette und Papiertüchern wurden vorsichtig die Ethanolreste entfernt. Dann wurden 250 µl QIAGEN® Buffer TE auf das Pellet gegeben und vermengt. Die aufgereinigte DNA konnte nun so weiterverwendet werden. Zur Lagerung wurde sie bei -20°C weggefroren.

4.2.4. Herstellung der stabilen NK-Zelllinie; Reverse Transfektion und klonale Selektion

Zur Herstellung der stabilen Linie wurden die NK-Zelllinie KHYG-1 mit der DNA von KIR2DL1 transfiziert. Dies geschah via pCMV6-XL5 Vektor (siehe auch Material 4.1.4).

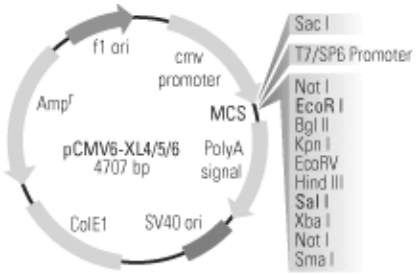

Abbildung 3

Vektor Diagramm pCMV6-XL5

Die NK-Zellen sollten zum Zeitpunkt der Transfektion zu 60-70% konfluent sein (d.h. die Oberfläche des Zellkulturgefäßes also zu 60-70% von den adhärenten NK-Zellen bedeckt sein) und die Kultur sollte am Tag vorher gesplittet (vereinzelt) worden sein, um die durch Kontaktinhibition verlangsamte Zellteilungsrate zu vermeiden. Für die Transfektion wurde 1 µg cDNA von KIR2DL1 und 2,5 µl FuGene® Transfection Reagent Transfektionsreagenz eingesetzt. Als Medium diente jeweils 100 µl Optimem Lösung. Zu Beginn der Transfektion wurde in zwei 24-Well-Platten (greiner bio-one) jeweils 100 µl Optimem-Lösung vorgelegt. Anschliessend wurde auf eine Platte die cDNA und das FuGene® Transfection Reagent zugegeben, auf die andere Platte die NK-Zellen. Der Ansatz inkubierte 5 min bei Raumtemperatur. Nach 5 min wurde die cDNA mit dem Transfektionsreagent zu den NK-Zellen gegeben, es erfolgte eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur über 20 min.

Während dieser Inkubationszeit wurden erneut zwei 12-Well-Zellkulturplatten mit jeweils 500 µl Optimem-Lösung vorbereitet. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit dem Transfektionsreagent auf die vorbereiteten Platten gegeben und 45 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde ein Selektionsmedium, bestehend aus RPMI 20%, FCS, IL-2,

0,5 µg/0,2% G418 dazugegeben. Der ganze Ansatz inkubierte erneut 1-2 Wochen bei 37°C. Zum Ausselektieren wurde alle 3-4 Tage erneut Selektionsmedium zugegeben. Die klonalen Zellen wurden geerntet und in frische 24-Well Platten überführt. Dort wurden sie mit Medium versorgt und verblieben erneut 1-2 Passagen in diesen Wells. Im Rahmen dieser experimentellen Studie wurde mit einem Teil dieser Klone Assays durchgeführt, der andere Teil wurde jeweils weggefroren.

4.2.5. RNAi-Stealth-Transfektion

Die Methode der RNAi-Stealth-Transfektion diente dazu, dass die DNA von KIR2DL1 nicht mehr in das Protein des Rezeptors übersetzt wird. Die inhibitorische RNA (RNAi) verhindert diesen sonst für die Expression wichtigen Schritt. Die Zelllinien wurden zuerst bei 60% Konfluenz in Optimem Medium ohne Serum überführt und mit einer Konzentration von 3 x 10^5 Zellen/ml in einer Gesamtvolumen von 350 µl in eine 24-Well Platte (greiner bio-one) ausplattiert. Die transiente reverse Transfektion wurde mit Lipofectamine 2000 durchgeführt, ein auf der Methode der kationischen Lipofektion basierende Reagenz. Es wurde je 1 µl der gut durchmischten Lipofectaminereagenz in 50 µl Optimem I Medium ohne Serum aufgelöst. Nach erneutem gründlichen Mischen wurde die Lösung für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden 50 pmol der Stealth RNAi in 50 µl Optimem I Medium ohne Serum in einem Well einer Gewebskulturplatte oder einem anderem sterilem Gefäß aufgelöst. Zu der RNAi/Medium Lösung wurden im Laufe des weiteren Procedere 1 µl Fluorescent Control Reagenz zugefügt. Nach fünfminütiger Inkubationszeit wurde die angesetzte Lipofectamine 2000 Reagenz vollständig der RNAi/Medium Lösung zugeführt und erneut vermischt. Die gesamte Lösung wurde für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Inkubationszeit folgend wurden die vorbereiteten Zellen in den RNAi-Lipofectamine 2000 Komplex überführt und bei 37°C für vier Stunden inkubiert. Nach diesen vier Stunden Inkubation wurde 1 ml RPMI-1640 (Invitrogen,Carlsbad) mit 10% FCS (Invitrogen,Carlsbad), sowie 10.000 U/ml Penicillin und 10.000 U/ml Streptomycin (Invitrogen,Carlsbad) dem RNAi-Lipofectamine 2000-Zell-Komplex zugeführt. Das Endvolumen betrug insgesamt 1,5 ml.

4.2.6. Western Blot

Für den Western Blot wurden jeweils 1 x 10^6 Zellen der NK–Zelllinie KHYG-1, die KIR2DL1 durch die reverse Transfektion überexprimiert, in 15 ml Falcons überführt und zentrifugiert (22°C, 7 min, 1400 x g). Der Überstand wurde jeweils verworfen und das Zellpellet gelöst. Anschließend wurden 500 µl RIPA Lyse Puffer sowie je 15 µl Proteaseinhibitor zugegeben und die ganze Lösung wurde bei 4°C 30 min in schräger Lage „gerüttelt“. Danach erfolgte der vollständige Transfer in 1,5 ml Eppendorf tubes (E-Cups) und erneut eine Zentrifugation (4°C, 30 min, 13000 x g). Der Überstand

wurde unter Auslassung des Pellets in neue 1,5 ml E-Cups überführt. Das entstandene Reinprotein war nun zu weiterer Verwendung bereit. Für das weitere Procedere musste an erster Stelle das Wasserbad auf 70°C vorgeheizt werden. Danach wurden die Proben wie folgt vorbereitet: 13 µl Proteinlysat (Zielproteinkonzentration 30 µg) wurden mit 5 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x) und 2 µL NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x) gemischt, vorgetext, zentrifugiert (4-22°C, 15 s, max./min) und für 10 min bei 70°C im Wasserbad denaturiert (Wasserbad Köttermann/Walter F.C. Ebel Laboratoriumbedarf). Zwischenzeitlich wurden die NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gele 1 mm vorbereitet und ein Puffer aus NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20 x) angesetzt und dazugegeben. Zusätzlich wurde 500 µl Antioxidans zwischen die Gele gegeben und die Taschen sorgfältig ausgewaschen. Die Proben wurden nach dem Wasserbad zentrifugiert und 12 µl in die entsprechenden Geltaschen pipettiert. Der Gellauf wurde dann gestartet und lief bei konstant 195 V für 1 h (300 W/950 mA) Die Kühlung erfolgte mittels eines Eiswasserbades. Anschließend wurden die NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gele 1 mm aus der Verkleidung gelöst und zurechtgeschnitten. Dann wurde zwischen je 2-3 x Sponge Pad,

2 x Chromatography Paper, bei direkter Auflage die Amersham Hybond™-ECL™Nitrocellulosemenbrane in das XCell II™ Blot Module Kit eingefügt und in die XCell SureLock™ Mini-Cell einbaut. Das XCell II™ Blot Module Kit sollte mit angesetztem Puffer aus NuPAGE® Transfer Buffer (20x) aufgefüllt werden, die Aussenkammer mit herkömmlichen Wasser. Der Blotvorgang lief bei konstant 25 V über 1 h. Die Kühlung erfolgt erneut mittels eines Eiswasserbades. Anschließend wurde die Amersham Hybond™-ECL™Nitrocellulosemenbrane in 25 ml Top-Block™ Lösung inkubiert (12 h + 4°C). Die Top-Block™-Lösung wurde dann verworfen und die Amersham Hybond™-ECL™Nitrocellulosemenbrane mit 10 ml neuer Top-Block™ Lösung und 10 µl des primären Antikörpers für 3-4 h unter Schütteln abgedeckt inkubiert. Die Top-Block™/Antikörper-Lösung wurde dann verworfen und die Amersham Hybond™-ECL™Nitrocellulosemenbrane 4 x á 10 min mit 25 ml TBS-Tween® Puffer (Waschpuffer) unter Schütteln gewaschen. Dann wurden 10 ml Top-Block™ und 2,5 µl sekundärer Antikörper wie bei Erstinkubation hinzugefügt und 1 h unter Schütteln abgedeckt inkubiert. Die Top-Block™/Antikörper- Lösung wurde erneut verworfen und die Amersham Hybond™-ECL™Nitrocellulosemenbrane 4 x á 10 min mit 25 ml TBS-Tween® Puffer (Waschpuffer) unter Schütteln gewaschen. Die Amersham Hybond™-ECL™-Nitrocellulosemenbrane wurde dann mit 6 µl ECL™ Western Blotting Analysis System (je 3 µl Detectionreagenz 1&2) 1 min unter schütteln inkubiert, dabei wurde mit möglichst wenig Licht gearbeitet. Die Amersham Hybond™-

ECL™-Nitrocellulosemenbrane wurde getrocknet und in 18 x 24 cm Entwicklungkammer überführt. Die Ergebnisse wurden in der Dunkelkammer auf Amersham Hyperfilm™ MP (18 x 24 cm) mittels eines Entwicklers optisch dargestellt.

4.2.7. LDH-Assay/Cyto Tox 96® Non-Radioactive Cytotoxity Assay

Der Nachweis der Zytotoxizität erfolgte nach dem Protokoll des Cyto Tox 96® Non-Radioactive Cytotoxity Assay der Firma Promega/Madison/USA.

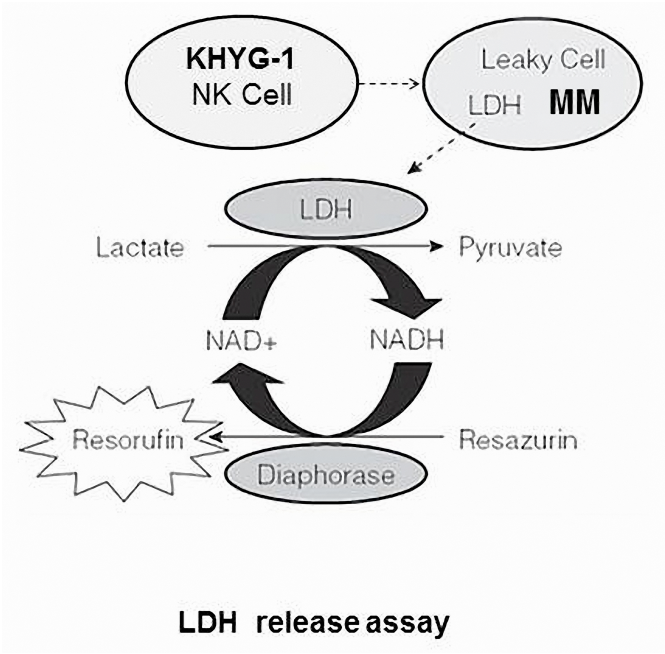

Abbildung 4

Prinzip LDH-Assay nach Promega

NK-Zellen wurden hierzu in einer Konzentration von 2 x 10^4 Zellen/Well mit den Target-Zelllinien (siehe Material MM- und AML-Zelllinien) in einer 96-Well Flachbodenplatte mit 200 µl Zellkulturmedium 4 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit 10 µl je 100 µl Zellen mit der Promega® Lysis Solution. Als Kontrolle für die spontane LDH-Abgabe von Zellen dienten unbehandelte Zellen. Nach der Inkubation wurden die Mikrotiterplatten 4 min bei 250 x g zentrifugiert. Vom zellfreien Überstand wurden 50 µl abgenommen und in

eine neue 96-Well Flachbodenplatte überführt. Dem Zellkulturüberstand wurden dann 50 µl Promega® Substate Mix, einem Gemisches aus Katalysator (Diaphorase) und einem Substrat (Tetrazoliumsalz) zugesetzt und 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach diesen 30 min wurde 50 µl Promega® Stop Solution zu jedem Well zugefügt.

Das Prinzip der Reaktion ist Folgendes: LDH gelangt aus lysierten Zellen in den Zellkulturüberstand. Es katalysiert dort die Oxidation von Lactat zu Pyruvat und reduziert dabei NAD^+ zu $NADH^+$ + H^+. Durch Übertragung dieser H^+-Ionen auf das gelbliche Tetrazoliumsalz entsteht rötliches Formazan. Die Menge des gebildeten Formazans korreliert direkt mit der LDH-Enzymaktivität in dem Zellkulturüberstand.

Formazan hat ein Absorptionsmaximun bei ca. 500 nm und konnte daher photometrisch mit Hilfe eines ELISA-Readers bei 490 nm bestimmt werden. Als Referenzwellenlänge wurde 690 nm gewählt. Die Zytotoxizität kann laut Hersteller nun folgendermaßen berechnet werden:

$$\%\ \text{Cytotoxicity} = \frac{\text{Experimental} - \text{Effector Spontaneous} - \text{Target Spontaneous}}{\text{Target Maximum} - \text{Target Spontaneous}} \times 100$$

Abbildung 5

Berechnung Zytotoxizität nach Promega

4.2.8 Statistik

Die statistischen Berechnungen des p-Wertes wurden mit dem Programm SPSS durchgeführt. Hierbei wurde der Wilcoxon Test als nichtparametrischer Test für verbundene Stichproben zur Berechnung des p-Wertes benutzt. Ein p-Wert kleiner als p = 0,05 gibt eine Signifikanz an.
Folgende Signifikanzniveaus haben wir in dem Ergebnisteil markiert:
Zwischen p = 0,05 und p = 0,01 (*), p = 0,01 und p = 0,001 (**), und ein p-Wert kleiner als 0,001 (***). Alle anderen Berechnungen wurden mit dem Programm Excel durchgeführt.

5. Ergebnisse

In folgendem Abschnitt werden die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen dieser Versuchsreihe aufgeführt, in der es erstmals gelang eine NK-Zelllinie (KHYG-1) transient mit KIR2DL1 zu transfizieren. Die Transfektion erfolgte in sechs Ansätzen, wovon nur zwei über drei Wochen vital blieben. KIR2DL1, der zu den inhibitorischen Rezeptoren der KIR-Familie zählt, kontrolliert entscheidend die Aktivierung der NK-Zellen und ist daher als Vertreter der inhibitorischen KIRs von besonderem wissenschaftlichen Interesse. Beachtenswert ist, dass die hier initial verwendete NK-Zelllinie KHYG-1 kein KIR2DL1 als Oberflächenrezeptor exprimiert, wodurch direkte Rückschlüsse auf die Funktion des Rezeptors möglich sind. Die erste Herausforderung in dieser Versuchsreihe stellte sich in der Transfektion dieser besagten NK-Zelllinie mit der DNA von dem hier untersuchten KIR2DL1. Nachdem die Transfektion durch den Western Blot erfolgreich nachgewiesen werden konnte, wurde der LDH-Assay verwendet, um die zytotoxischen Eigenschaften der NK-Zellen unter Überexpression des Rezeptors, in Gegenwart von MM-Zelllinien und einer AML-Zelllinie genauer zu untersuchen. Als Kontrolle dieser Versuche wurde der LDH-Assay nach RNAi Transfektion durchgeführt, bei der inhibitorische RNA das Rezeptorgen in seiner Expression wieder gestoppt hat. Es wurde sowohl KIR2DL1 RNAi, sowie Mock RNAi verwendet. Mock RNAi diente der internen Kontrolle, da diese RNA keine Reaktionen in der Zielzelle hervorruft.

5.1. Nomenklatur

Wie schon in Kapitel 3.1.2 beschrieben, sind KIRs spezifisch für HLA-Klasse-I-Moleküle. Diese Spezifität konnte jedoch nur für vier der KIRs nachgewiesen werden (KIR2DL1, KIR2DL2/3 und KIR3DL1 [44]. KIR2DL1 bindet HLA-C Allelprodukte mit einem Lysinrest an Position 80, die in diesem Ergebnisteil als “C2” bezeichnet werden. Steht an Position 80 des HLA-Allels Asparagin anstatt Lysin, wird das Produkt hier als “C1” bezeichnet. Diese Nomenklatur bezeichnet zusammengefasst die Allotypen des HLA-Klasse-I Lokus, die hier exprimiert die Liganden des untersuchten KIR Rezeptors darstellen. In vitro wurden noch weitere Liganden für KIRs nachgewiesen (siehe

Tabelle 1 und 2). Aus Übersichtsgründen, den Versuchsaufbau betreffend, seien an dieser Stelle jedoch nur C1 und C2 erwähnt.

5.2. Western Blot

Mittels wöchentlichem Western Blot konnte die stabile Transfektion der NK-Zelllinie KHYG-1 mit KIR2DL1 nachgewiesen werden. Nachfolgend sind die zwei entstandenen Ansätze der transfizierten NK-Zellen verwendet worden, um das integrierte Rezeptorprotein beispielhaft zuerst nach einer Woche Expression im Western Blot nachzuweisen. Das gelang erfolgreich, es bildeten sich Banden bei ca. 38 kDa, die in der nachfolgenden Abbildung 6 dargestellt sind. Links daneben ist die interne Kontrolle mit der unbehandelten NK-Zelllinie dargestellt, es erscheint keine Bande. Des Weiteren wurden Kontrollbanden mit ß-Actin (ACTB) angefertigt um, von der molekularen Größe ausgehend, zu verifizieren, dass es sich um Klone von KIR2DL1 handelt. Klon 1 und 2, aus den zwei nach Transfektion gewonnenen vitalen Zelllinien, sind als identisch zu betrachten. Um den zeitlichen Verlauf darzustellen sieht man in Abbildung 7 ebenfalls einen Western Blot, der drei Wochen nach Transfektion angefertigt worden ist. Hier bleiben alle Banden aus (außer die Kontrollbanden ß-Actin). Somit wird deutlich, dass die Expression von KIR2DL1 auf der hier verwendeten NK-Zelllinie KHYG-1 als transient zu betrachten ist, da das Rezeptorprotein nach drei Wochen nicht mehr nachzuweisen ist.

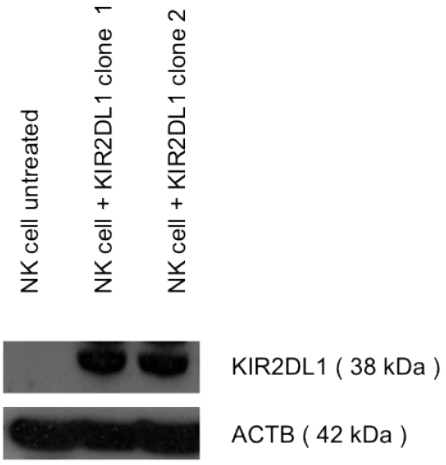

Abbildung 6

Western Blot mit zwei Klonen der transient mit KIR2DL1 transfizierten NK-Zelllinie KHYG-1 (NK+KIR2DL1). Die Banden bei 38 kDa zeigen die beiden identischen Klone 1 und 2 nach einer Woche. Die unbehandelten NK-Zellen sind frei von KIR2DL1 auf der Oberfläche, die Bande bleibt aus.

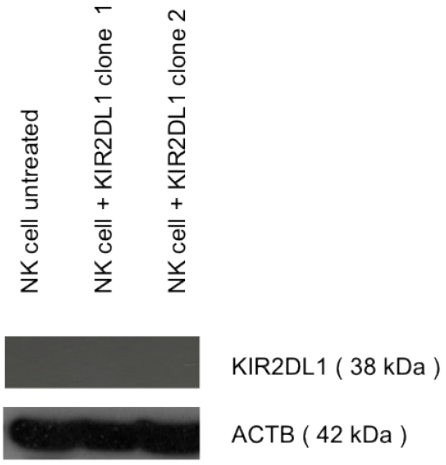

Abbildung 7

Western Blot mit zwei Klonen der transient mit KIR2DL1 transfizierten NK-Zelllinie KHYG-1 (NK+KIR2DL1). Die Banden bei 38 kDa der beiden identischen Klone 1 und 2 bleiben nach drei Wochen aus. Die unbehandelten NK-Zellen sind frei von KIR2DL1 auf der Oberfläche, die Bande bleibt, nach wie vor, aus.

In den folgenden Versuchen wurde die NK–Zelllinie KHYG-1 mit inhibitorischer Kontroll-RNAi (Mock siRNA) inkubiert, die in vitro keine Wirkung zeigt und hier als funktionelle Kontrolle diente. So konnten sicher zufällige toxische Wirkungen und Reaktionen von KIR2DL1 ausgeschlossen werden. Inhibiert man die Expression jedoch mit funktionsfähiger RNAi, wird KIR2DL1 in vitro nicht mehr exprimiert. Die folgende Abbildung 8 beweist die transiente Transfektion von KIR2DL1 in die NK-Zelllinie und macht gleichzeitig deutlich, wie es möglich sein kann, die NK-Zellen in ihrer Expression von KIR2DL1 herunterzuregulieren. Als Kontrolle diente hier wieder ß-Actin (ACTB), welches annähernd die gleiche molekulare Größe besitzt wie das Rezeptorprotein. Es gelang KIR2DL1, sowohl in der unbehandelten Linie NK+KIR2DL1, als auch bei der mit control RNAi (Mock siRNA) transfizierten Linie, nachzuweisen. In den Versuchen mit inhibitorischer und funktionstüchtiger RNAi dagegen, gelang es KIR2DL1 vollständig in der Expression zu inhibieren. Eine Kontrolle mit rekombinantem KIR2DL1 bestätigte die erfolgreiche Inhibition der Expression der Rezeptorgene.

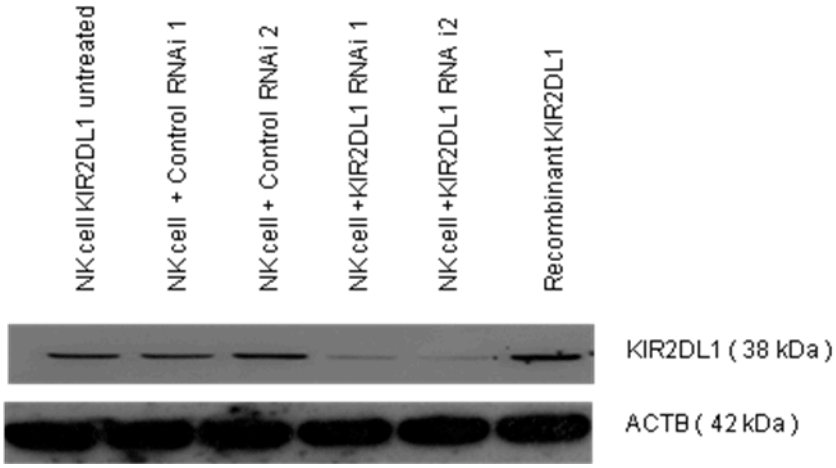

Abbildung 8

Western Blot mit Control RNAi (Mock siRNA) und inhibitorischer RNA. Es zeigt sich eine Inhibition der Expression der Rezeptorgene für KIR2DL1 bei der Transfektion mit inhibitorischer RNAi. Bei der Transfektion mit Control RNAi (Mock siRNA) jedoch, findet man nach wie vor eine Bande bei 38 kDa. Die nicht mit inhibitorischer RNA behandelten NK-Zellen, sowie das rekombinante KIR2DL1 zeigen ebenfalls die Bande bei 38 kDa.

5.3. LDH-Assay/Cyto Tox 96® Non-Radioactive Cytotoxity Assay

5.3.1. Lysepotential von unbehandelten NK-Zellen der Zelllinie KHYG-1

Der LDH-Assay wurde im Zuge dieser Versuchsreihe verwendet um die Zytotoxizität der NK-Zelllinie KHYG-1 unter dem Einfluss von KIR2DL1 in Gegenwart von Zelllinien des Multiplen Myeloms und der Akuten Myeloischen Leukämie nachzuwiesen. Um die Ergebnisse im richtigen Kontext interpretieren zu können, wurden zuerst NK-Zellen vom Wildtyp der NK-Zelllinie KHYG-1 (NK-WT) mit den Zelllinien des Multiplen Myeloms (Molp8, KMS12BM und RPMI8266) in einem sechsfachen Ansatz getestet. Die NK-Zellen vom Wildtyp weisen ein gemischtes Rezeptorrepertoire auf. Das Genom dieser NK-Zellen ist durch Evolution entstanden und weist daher neben inhibierenden auch aktivierende Rezeptoren auf (siehe auch Kapitel 3.2.1). Das Lyseverhalten wird also nicht zu einem grossen Teil, wie bei der hier durch Transfektion entstandenen Zelllinie, durch inhibierende Rezeptoren (in diesem Fall: KIR2DL1) bestimmt. Das wird in der Abbildung 9 deutlich, da bei allen drei MM-Zelllinien, mit jeweils unterschiedlichem HLA-Ligandenmuster, die Lyse sich nicht in Ihren Signifikanzniveaus unterscheidet. Vergleicht man RPMI8266 (68,4% Lyse (nachfolgend immer angegeben als Mittelwert, siehe hier auch Tabelle 3)) und KMS12BM (60,7% Lyse) liegt der p-Wert bei $p = 0,001$ (**), vergleicht man KMS12BM (60,7% Lyse) und MOLP8 (67,1%), liegt er bei $p = 0,002$ (**).

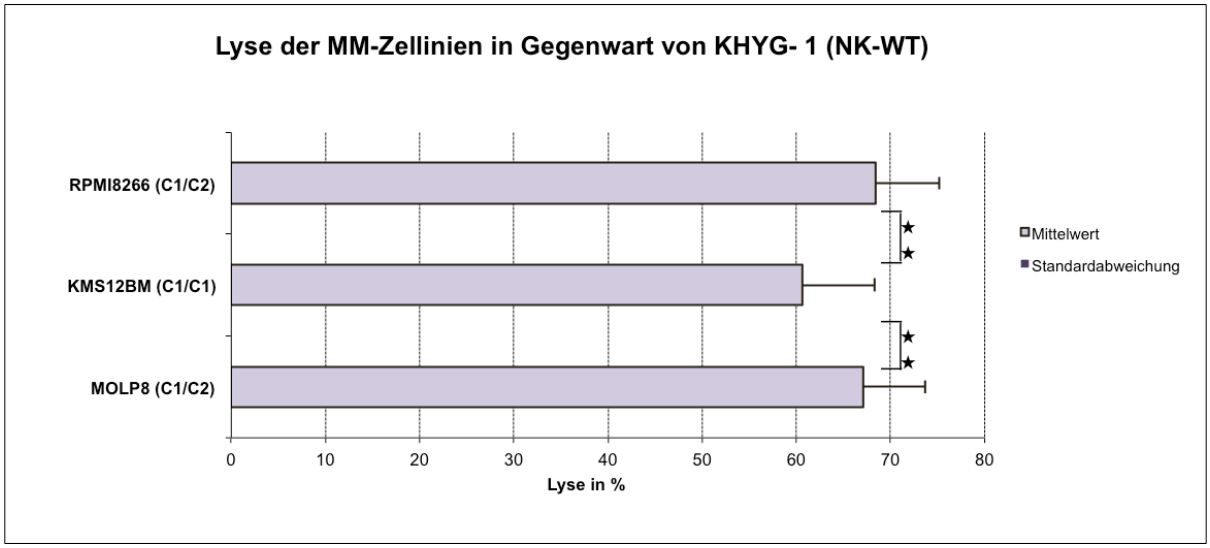

Abbildung 9

Testung der Zytotoxizität mit unbehandelten NK-Zellen der Zelllinie KHYG-1 an Zellen des Multiplen Myeloms. Bei allen drei Zelllinien (RPMI 8266, KMS12BMi, MOLP 8) ist die Lyse signifikant unterschiedlich. Die Zellen haben ein durchschnittliches Rezeptorrepertoire und erlauben die Interpretation der nachfolgenden Versuche mit der NK-Zelllinie KHYG-1, die auf Ihrer Oberfläche durch die vorangegangene erfolgreiche Transfektion, KIR2DL1 als inhibierenden Rezeptor aufweist.

Tabelle 3

Mittelwert und Standardabweichung des LDH-Assays mit MM-Zelllinien in Gegenwart von KHYG-1

Parameter	MOLP8 (C1/C2)	KMS12BM (C1/C1)	RPMI8266 (C1/C2)
Mittelwert	67,1	60,7	68,4
Standardabweichung	6,6	7,6	6,7

5.3.2. Lysepotential von NK-Zellen der Zelllinie KHYG-1 nach Transfektion mit Mock siRNA

Um die Ergebnisse des Zytotoxizitäts-Assays mit den NK-WT-Zellen der Zelllinie KHYG-1 zu bestätigen, wurde anschließend mit Mock siRNA im Rahmen einer RNAi-Stealth-Transfektion transfiziert und wieder ein LDH-Assay sechsfach durchgeführt. Mock siRNA sollte keine Reaktionen in der Zielzelle hervorrufen. Diese Ergebnisse dienten als Kontrolle für die nachfolgenden Versuche und erlauben Ihre eindeutige Interpretation. In Abbildung 10 ist dieser Teil der Versuchsreihe visualisiert. Die drei

MM-Zelllinien werden in Gegenwart von der NK-WT Linie nach Transfektion mit Mock siRNA in ähnlichem Maße lysiert, wie es durch die unbehandelten NK-WT Zellen zu beobachten war (siehe Abbildung 9). Die Mittelwerte der Lyse durch den LDH-Assay sind hier für RPMI8266 62,5%, für KMS12BM 69,1% und für MOLP8 67.9% (siehe auch Tabelle 4). Vergleicht man RPMI8266 und KMS12BM liegt der p-Wert bei p = 0,001 (**), vergleicht man KMS12BM und MOLP8, liegt er bei p = 0,6 (n.s.).

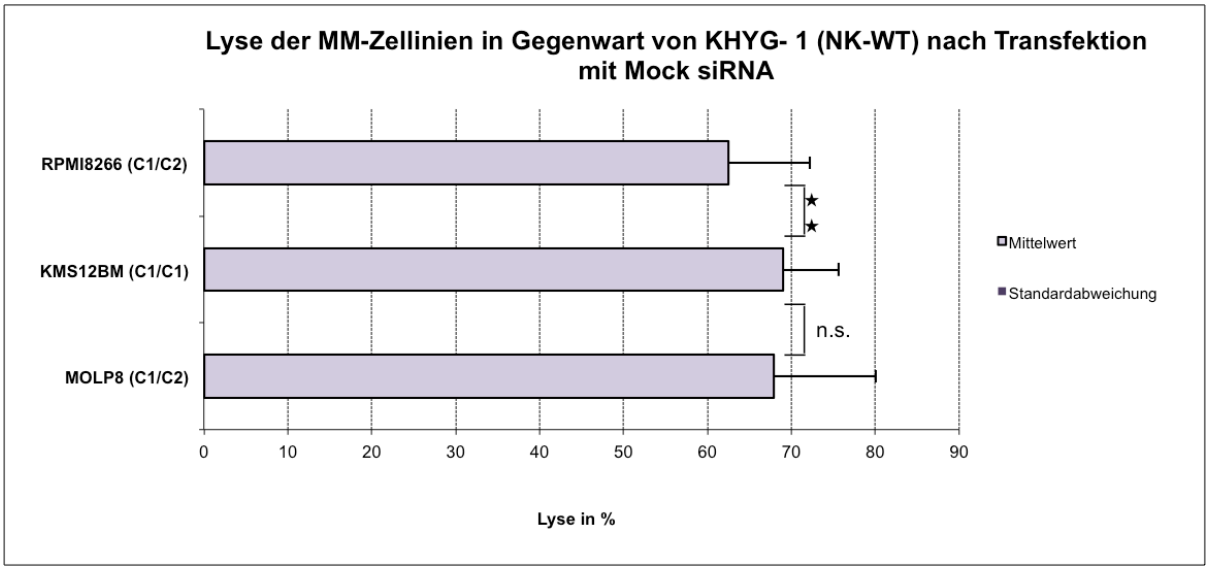

Abbildung 10

Testung der Zytotoxizität mit unbehandelten NK-Zellen der Zelllinie KHYG-1 nach RNAi Transfektion mit Mock siRNA an Zellen des Multiplen Myeloms. Die Lyse der drei MM-Zelllinien unterscheidet sich untereinander nur teilweise signifikant (RPMI8266und KMS12BM p = 0,001 (**), KMS12BM und MOLP8 p = 0,6 (n.s.)). Dieses Ergebnis ist im Kontext des ersten Versuchs zu werten und lässt keinen Zusammenhang mit einem aktivierenden oder inhibierendem Rezeptorprofil erkennen.

Tabelle 4

Mittelwert und Standardabweichung des LDH-Assays mit MM-Zelllinien und NK-Zellen der Zelllinie KHYG-1 nach Transfektion mit Mock siRNA.

Parameter	MOLP8 (C1/C2)	KMS12BM (C1/C1)	RPMI8266 (C1/C2)
Mittelwert	67,9	69,1	62,5
Standardabweichung	12,2	6,6	9,7

5.3.3. LDH-Assay mit MM- und AML- Zellen als Target

Jeder der nachfolgenden Versuche wurde in sechs Ansätzen durchgeführt.

5.3.3.1. Lysepotential von NK-Zellen der Zelllinie KHYG-1 mit Überexpression von KIR2DL1

Erstes Ziel dieser Versuchsreihe war die Transfektion und die Erzeugung von Klonen von NK-Zellen der Zelllinie KHYG-1, die KIR2DL1 auf der Zelloberfläche als Rezeptorprotein aufweisen (NKL-KIR2DL1). Nachdem dieses Bemühen erfolgreich im Western Blot nachgewiesen werden konnte, wurden die Klone in Bezug auf Ihre Zytotoxizität im LDH-Assay getestet. Durchgeführt wurde der Assay zuerst mit MM-Zelllinien und einer AML-Zelllinie, da diese C2/C2 als Ligandenkomplex aufweist. KIR2DL1 nutzt HLA-C2 Komplexe als Liganden. Bei diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass Zelllinien die C2 als passende Liganden auf Ihrer Oberfläche aufweisen (RPMI8266, MOLP8 und OCI-M1), signifikant weniger als die lysiert werden, als die, bei denen dieser Komplex fehlt (KMS12BM). Somit konnte an dieser Stelle der auf NK-Zellen inhibitorische Effekt von KIR2DL1 nachgewiesen werden. In der Abbildung 11 ist ebendies zu sehen. Die MM-Zelllinien RPMI8266 (C1/C2) und Molp8 (C1/C2), die jeweils C2 und damit den passenden Liganden für KIR2DL1 aufweisen, werden deutlich weniger lysiert (40,2% und 41,9% Lyse) als KMS12BM, die Zelllinie, die nur C1 und auf ihrer Oberfläche trägt (61,4% Lyse) (siehe auch Tabelle 5). Da keine MM-Zelllinie mit dem Ligandenkomplex C2/C2 verfügbar war, haben wir uns einer AML-Zelllinie (OCI-M1) bedient, die diesen Ligandenkomplex aufweist, um möglichst eindeutige Schlüsse über das Lyseverhalten unserer hier behandelten NK-Zellen ziehen zu können.

Es ist festzustellen, dass die Lyse der AML-Zelllinie mit Ligandenmuster C2/C2 (OCI-M1) unter Einfluss von KIR2DL1 ebenfalls, wie die MM-Zelllinien RPMI8255 und Molp8 inhibiert wird. Die Inhibition der NK-Zelle ist hier deutlich durch das ineffektivere Lyseverhalten abzusehen. Es ist sogar festzustellen, dass bei vorhandenem Ligandenkomplex C2/C2 die Lyse am effektivsten mit nur 32,3% Zelllyse inhibiert wird. Vergleicht man die Signifikanzniveaus, so ist erst einmal festzustellen dass OCI-M1 (C2/C2) signifikant weniger unter dem Einfluss von KIR2DL1 lysiert wird als KMS12 BM (C1/C1), $p = 0,000$ (***). Das KIR-Ligand Mismatchmodell können wir somit hier bestätigen, sogar bei der AML-Zelllinie OCI-M1 in einem funktionell höheren Ausmaß als bei den MM-Zelllinien RPMI8266 und Molp8. Die Lyse von den Zelllinien, die beide C1/C2 als Ligandenkomplex aufweisen (RPMI8266 und Molp8) unterscheidet sich, wie

zu erwarten, nicht signifikant p = 0,187 (n.s). Die Lyse wiederum vom OCI-M1 (C2/C2) und Molp 8 (C1/C2) unterscheidet sich ebenfalls signifikant p = 0,001 (**), was bestätigt, dass C2 der Ligand für KIR2DL1 ist und bei Vorhandensein auf der Oberfläche von Targetzellen für eine ineffektivere Lyse sorgt, wenn KIR2DL1 als inhibitorischer Rezeptor auf der NK-Zelle vorhanden ist. Vergleicht man schließlich KMS12BM (C1/C1) und RPMI 8266 (C1/C2), so ist auch hier der Unterschied signifikant p = 0,003 (**), was sich daraus erklären lässt, dass KIR2DL1 C2 als passenden Liganden benötigt, um die NK-Zelle zu inhibieren.

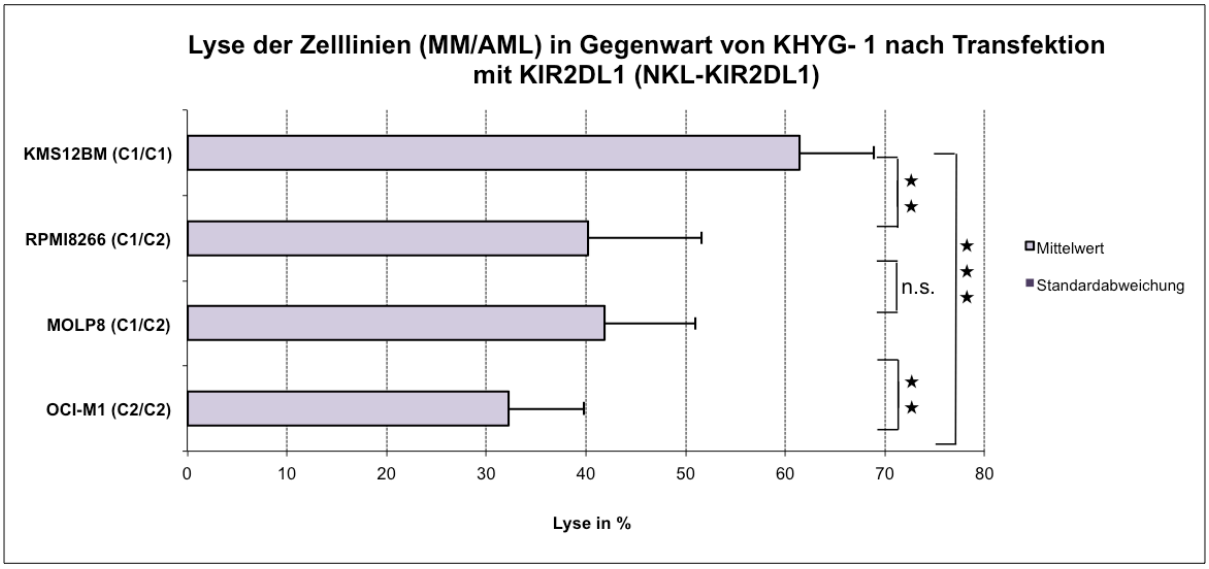

Abbildung 11

Testung der Zytotoxizität mit Klonen der NKL-KIR2DL1-Linie an Zellen des Multiplen Myeloms. Die NK-Zell-Klone, die KIR2DL1 als Rezeptor auf Ihrer Oberfläche aufweisen lysieren die MM-Zelllinien, die den passenden Liganden C2 auf Ihrer Oberfläche aufweisen, signifikant weniger als die MM-Zelllinie, die nur C1 als Liganden auf der Oberfläche trägt. Am effektivsten werden die NK-Zellen von OCI-M1 (C2/C2) inhibiert. Vergleicht man KMS12BM (C1/C1) und OCI-M1 (C2/C2), so ist ein erheblicher Unterschied der Lyse zwischen diesen beiden Zelllinien nachzuweisen (p = 0,000 (***)).

Tabelle 5

Mittelwert und Standardabweichung des LDH-Assays mit MM- und AML-Zellen als Target in Gegenwart von NKL-KIR2DL1

Parameter	OCI-M1 (C2/C2)	MOLP8 (C1/C2)	RPMI8266 (C1/C2)	KMS12BM (C1/C1)
Mittelwert	**32,3**	**41,9**	**40,2**	**61,4**
Standardabweichung	**7,6**	**9,1**	**11,4**	**7,4**

5.3.3.2. Lysepotential von NK-Zellen der Linie KHYG-1 mit Überexpression von KIR2DL1 nach RNAi Transfektion

Um die schon gewonnen Ergebnisse zu validieren wurde eine RNAi Transfektion mit inhibitorischer RNA durchgeführt. Die von uns durch Transfektion erzeugte NK-Zelllinie NKL-KIR2DL1 zeigt nach der Transfektion mit siRNA und der damit provozierten Verminderung der Expression des Gens für KIR2DL1 in Gegenwart von MOLP8, RPMI8266 und OCI-M1, die den für KIR2DL1 passenden Liganden C2 aufweisen, keine Inhibition der Lyse mehr.

Dieser Versuch zeigt, dass die Effekte von KIR2DL1 nicht als zufällig zu verstehen sind und bestätigt die Funktion von KIR2DL1 als inhibitorischen Rezeptor. Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, besteht zwischen der prozentuellen Lyse der verwendeten Zelllinien KMS12BM (63,3%), RPMI8266 (64,9%), MOLP8 (65,8%) und OCI-M1 (68,1%), (siehe auch Tabelle 6) kein signifikanter Unterschied, so dass davon auszugehen ist, dass die inhibitorischen Effekte, wenn C2 als Ligand auf den Targetzellen vorhanden ist und die NK-Zellen KIR2DL1 auf ihrer Oberfläche tragen, von KIR2DL1 ausgehen. Vergleicht man die Zelllinien, die Signifikanz betreffend, so ist zwischen der Lyse der einzelnen Zelllinien kein signifikanter Unterschied festzustellen (KMS12BM/RPMI8266 $p = 0,75$ (n.s.), RPMI8266/MOLP8 $p = 0,756$ (n.s.) MOLP8/OCI-M1 $p = 0,506$ (n.s.)). Vergleicht man nun die Zelllinien, die nur C1/C1 (KMS12BM) oder nur C2/C2 (OCI-M1) aufweisen, so ist die Lyse, die bei dem vorhergegangenen Versuch ohne RNAi Transfektion noch signifikant unterschiedlich war ($p = 0,000$ (***)), nun nicht mehr als signifikant einzuordnen ($p = 0,307$ (n.s.)).

Diese Beobachtung bestätigt den Erfolg dieser Versuchsreihe und die Missing-self-Theorie, die erstmals 1985 von Kärre und Ljunggren formuliert worden ist. Fehlt der passende HLA-Ligand, oder ist er verändert, so dass er nicht erkannt wird, wird die Zielzelle lysiert. Diese Beobachtung können wir hier ganz speziell für KIR2DL1 bestätigen.

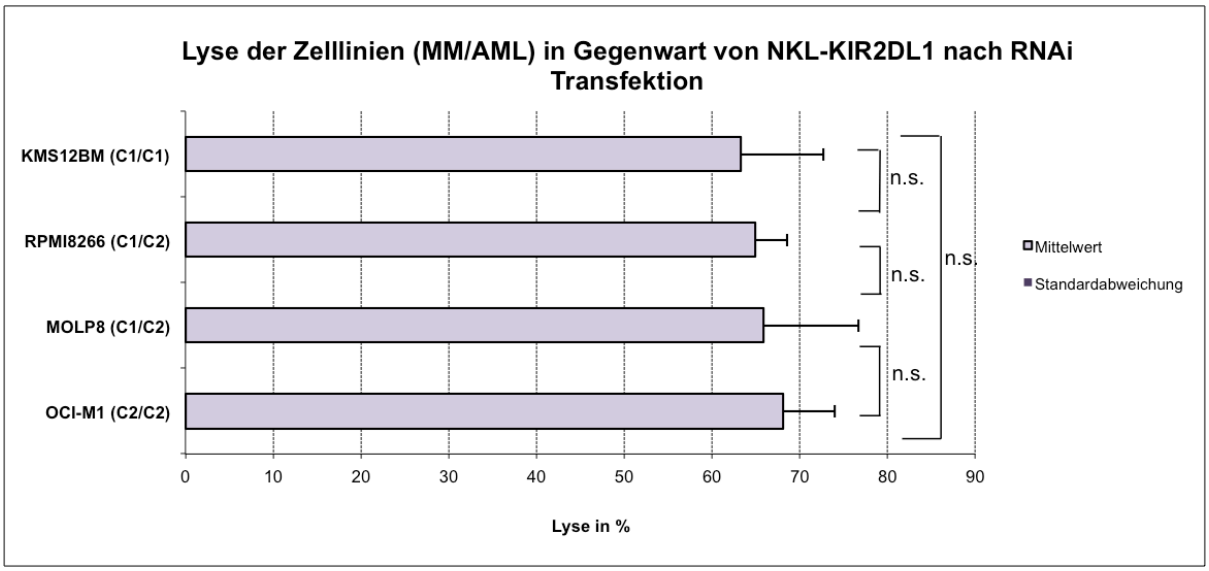

Abbildung 12

Testung der Zytotoxizität mit Klonen der NKL-KIR2DL1-Linie nach RNAi Transfektion an Zellen des Multiplen Myeloms. Es ist keine Inhibition der Lyse mehr zu beobachten, wenn C2 als passender Ligand vorliegt. Folglich ist festzuhalten, dass die inhibitorischen Effekte, die Lyse betreffend, KIR2DL1 zuzuschreiben sind.

Tabelle 6

Mittelwert und Standardabweichung des LDH-Assays mit MM- und AML-Zellen als Target in Gegenwart von NKL-KIR2DL1 nach RNAi Transfektion

Parameter	OCI-M1 (C2/C2)	MOLP8 (C1/C2)	RPMI8266 (C1/C2)	KMS12BM (C1/C1)
Mittelwert	**68,1**	**65,8**	**64,9**	**63,3**
Standardabweichung	**5,9**	**10,9**	**3,6**	**9,5**

6. Diskussion

KIR2DL1 gehört zur Gruppe der inhibitorischen NK-Zell-Rezeptoren und erkennt als Liganden Epitope der C2 Gruppe. Interagiert KIR2DL1 nicht mit seinem entsprechenden Liganden, überwiegen in vivo die Signale der aktivierenden Rezeptoren und die Zielzelle wird lysiert.

Da wir auf der hier verwendeten NK-Zelllinie (KHYG-1), die initial kein KIR2DL1 auf ihrer Oberfläche aufweist, KIR2DL1 überexprimiert haben, konnte der Effekt dieses Rezeptors isoliert untersucht werden. Die hier verwendeten Zelllinien des MM und der AML haben unterschiedliche Ligandenmuster auf Ihrer Oberfläche exprimiert und wir konnten nachweisen, dass Zellen, die keine HLA-C2 Epitope aufweisen, von einer signifikant höheren Lyserate betroffen waren.

Zu bedenken gilt, dass wir in dieser Studie nur einen einzigen biologischen Faktor untersucht haben, von dem man nur schwer die Situation in vivo, wie sie sich am häufigsten darstellt, nämlich auf die nach allogener SCT, schließen kann. Da es aber für das Verständnis wichtig ist, alle Faktoren so genau wie möglich zu kennen und deren Funktion vorherzusagen, haben wir KIR2DL1 als einen der verbreitesten inhibitorischen NK-Zell-Rezeptoren isoliert untersucht [24].

Da es uns in zwei Ansätzen für jeweils drei Wochen gelang diesen Rezeptor hochzuregulieren, stellt sich die Frage, wie man die Situation in vitro verbessern kann. NK-Zellen sind, wie auch schon andere Arbeitsgruppen festgestellt haben, nur sehr schwer zu kultivieren [45]. Es stellt sich die Frage, wie man die Protokolle zur Kultivierung standardisieren kann um eine höhere Ausbeute und Vitalität von NK-Zellen zu erhalten. Jüngst wurde ein standardisiertes Protokoll für die Präparation und Aufarbeitung von Donor NK-Zellen entwickelt, um die Zytotoxizität bzw. Aktivität zwischen unterschiedlichen Spendern zu vergleichen [46].

In dieser Versuchsreihe geht es um Interaktionen zwischen NK-Zellen und neoplastischen Zellen des hämatologischen Formenkreises (MM- und AML-Zellen), bei denen allogene bzw. autologe SCT ein anerkanntes Therapieregime darstellt. Das Augenmerk muss daher besonders auf diese Therapieformen gerichtet werden.

Für den Transplantationserfolg bei Knochenmarks- bzw. Stammzelltransplantationen ist eine Übereinstimmung der Haupthistokompatibilitätsantigene (HLA-Antigene der

Klassen I und II) zwischen Spender und Empfänger von zentraler Bedeutung. Diese Notwendigkeit ergibt sich aus der HLA-Restriktion in der T-Zell Rezeptorerkennung. Nach heutigem Verständnis wird angenommen, dass auch die NK-Zell-Rezeptoren und Ihre Liganden bei einer SCT eine zentrale Rolle spielen. Die meisten NK-Zellen exprimieren mindestens einen inhibitorischen KIR-Rezeptor der einen bestimmten HLA-Komplex erkennt, der bei dem jeweiligen Individuum ebenfalls vorkommt. So wird sichergestellt, dass das körpereigene Gewebe nicht von den NK-Zellen angegriffen wird [5].

Es konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen, die mit Tumorzellen zusammengebracht werden, die keine oder nur wenige HLA-Komplexe aufweisen, diese lysieren [8, 47]. Einige experimentelle Studien konnten diesen Sachverhalt in vivo sowohl bei induzierten, als auch bei spontan entstandenen Tumoren bei Mäusen bestätigen [48]. Es wird daher vermutet, dass eine Kompatibilität der HLA-Komplexe mit denen der KIRs, insbesondere der inhibitorischen, auch bei SCT von Nachteil ist, da die Tumorzellen in dieser Konstellation nicht lysiert werden. Aus diesen Beobachtungen ergab sich das „KIR-Ligand-Mismatchmodell“ bzw. die „Missing-Self-Hypothese“, welche im Rahmen von SCT und adoptiver Immuntherapie eine wichtige Rolle zu spielen scheinen [47].

Dieses Modell konnte erstmals von Velardi et al. im Rahmen von haploidentischer SCT bei myeloischen Leukämien nachgewiesen werden [3, 49]. Ein Mismatch der HLA-Klasse-I-Komplexe senkte hier signifikant die Rezidivraten und wirkte sich positiv auf Gesamtüberleben aus, bei gleichzeitiger Senkung der Wahrscheinlichkeit einer GvHD.

Bei unverwandten Spendern, die eine Stammzelltransplantation erhalten haben, konnte dieser Effekt in einigen Studien ebenfalls nachgewiesen werden, jedoch nicht in allen [50, 51].

Die positiven Effekte, hat man das Setting einer Stammzelltransplantation vor Auge, der Inkompatibilität der inhibitorischen KIRs mit ihren Liganden, konnte in vitro an dieser Versuchsreihe verdeutlicht werden. Liegt eine solche vor, wird die Zielzelle lysiert. Sind die Liganden der Spenderzelle und der Zielzelle jedoch kompatibel, wird die NK-Zelle unter dem Einfluss der inhibierenden KIR-Rezeptoren in Ihrer Aktivität gehemmt. Die Lyse der Myelom-, bzw. AML-Zellen konnte unter Überexpression der KIR-Rezeptoren, in diesem Fall KIR2DL1, bei Ligandeninkompatibilität in dem LDH–Zytotoxizitätsassay zufriedenstellend nachgewiesen werden.

Gegen ein Auswahlkriterium, wie eine HLA-Inkompatibilität, für eine SCT spricht, dass Patienten mit kompletter HLA-Inkompatibilität von einer signifikant höheren

Komplikationsrate betroffen sind. Eine wichtige Frage ist, ob die positiven Effekte des KIR-Mismatch die negativen Effekte des HLA-Mismatch überdecken können [49]. Mittels PCR kann jedoch exakt der Genotyp von KIR Rezeptoren bestimmt werden und nicht immer ist bei einer HLA–Liganden Kompatibilität eine KIR–Liganden-Kompatibilität nachzuweisen, was daran liegt dass die KIR-Gene (Chromosom 19) unabhängig von den HLA-Genen (Chromosom 6) vererbt werden [52]. Anzahl und Typ der inhibierenden KIR-Gene variieren in jedem Individuum, was im Umkehrschluss bedeutet, dass die NK-Zellen in einem Individuum nur ein Teil der jeweils möglichen Rezeptoren exprimieren, und es sich lohnt bei SCT den KIR-Genotyp zu bestimmen, um eventuell ein weiteres Auswahlkriterium in der Spenderwahl berücksichtigen zu können [4]. Diese Beobachtungen variieren jedoch stark. Unterschiede mögen darin begründet sein, dass verschiedene Protokolle für das Transplantationsregime verwendet wurden. Dies kann unterschiedliche Konditionierung beinhalten, unterschiedliche Bemessung der Stammzelllendosen, unterschiedliche T-Zell Depletion und Variation der immunsuppressive Therapie. Ziel sollte es sein, die Transplantationsprotokolle zu vereinheitlichen um verschiedene Methoden besser vergleichen zu können und um gezielte Aussagen bezüglich des Überlebensvorteils treffen zu können [4, 53].

Positive Effekte bezüglich KIR–Rezeptoren und deren Dichte unabhängig von der Kompatibilität konnten bis jetzt jedoch nur bei Patienten mit AML und nicht bei anderen malignen hämatologischen Erkrankungen nachgewiesen werden [54]. Jüngst konnte gezeigt werden, dass bei einem Patientenkollektiv mit AML eine verminderte Anzahl von KIRs im Vergleich zur Kontrollgruppe zu finden war [55].

In Anbetracht der Vielzahl von unterschiedlichen Tumorzellarten ist es anzunehmen, dass einige effektiver von NK-Zellen lysiert werden als andere. Es konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass Leukämien der myeloischen Reihe besser lysiert werden, als solche der lymphatischen Reihe [56].

Die unterschiedliche Ausstattung der Tumorzellen mit HLA-Klasse-I-Molekülen und mit aktivierenden Liganden ist hierbei ein entscheidender Punkt für die Effektivität der Lyse. Den malignen Zellen ist es oftmals möglich der Lyse zu entgehen, meist durch nicht vorhandene Liganden für aktivierende Rezeptoren [57-59].

Berücksichtigt man die Tumorzellmasse, ist davon auszugehen, dass NK-Zellen am effektivsten agieren wenn die Tumorlast gering ist. Große solide Tumoren stellen keine

gute Voraussetzung dar, wohingegen eine kleine Tumorlast, wie zum Beispiel in Form der „minimal residual disease“ gut von NK-Zellen lysiert werden kann. Diese Form der Rückfallerkrankung tritt nach chirurgischen Eingriffen, Chemotherapie und auch nach Stammzelltransplantationen auf, die hier in dem besonderen Interesse stehen. NK-Zell-Therapie bei grossen Tumoren stellt eine Herausforderung dar, denn nicht nur die Rezeptoren alleine spielen eine Rolle. Noch ist es weitgehend unklar, wie die NK-Zellen Tumorzellen auffinden und sie infiltrieren [60]

Die Unterschiede bei verschiedenen Tumorarten werden deutlich, und es wird klar, dass es eine besondere Herausforderung darstellt, diese nachzuweisen.

Allogene SCT ist, wie schon beschrieben, ein etabliertes Verfahren zur Behandlung von vielen hämatologischen Erkrankungen. Ein Mismatch zwischen Donor KIRs und den HLA-Komplexen des Empfängers scheint hier von Vorteil zu sein [3]. Der Anti-Tumor-Effekt kann jedoch am besten in Abwesenheit von Spender-T-Zellen erzielt werden, die vorher dem Transplantat entfernt worden sind. Spender T-Zellen neigen dazu, da auch ein HLA-identischer Spender dem Empfänger nicht vollständig immunologisch gleichen kann, eine GvHD zu induzieren. Allerdings führt gerade eine noch vorhandene Alloreaktivität zu dem gewünschten GvL-Effekt. Kann eine Alloreaktivität nachgewiesen werden, können eine schnellere Wiederbesiedlung des Knochenmarks, sowie paradoxerweise auch reduzierte Raten von GvHD nachgewiesen werden. Die Abnahme der GvHD wird dabei der alloreaktiven Aktivität der rekonstituierten NK-Zellen gegenüber Antigen-präsentierende Zellen (APC, Dendritische Zellen) des Patienten zugeschrieben, wodurch eine Präsentation von Patientenantigenen gegenüber T-Zellen des Spenders verhindert werden soll [49].

Die Frage stellt sich, wie man die NK-Zellen des Spenders, sowie die des Empfängers am besten beeinflussen kann um eine möglichst potente GvL-Reaktion zu erzielen.

Zukünftig sind verschiedene Modelle zur Verstärkung des GVL-Effektes denkbar. Zytokine, Wachstumsfaktoren oder immunmstimulative Medikamente können eingesetzt werden um die NK-Zell-Reaktivität zu verstärken. Auch gibt es die Möglichkeit monoklonale Antikörper zu verwenden, die Signalkaskade über den Inhibierenden Rezeptor unterbrechen. Small interfering RNA (siRNA) ist ebenfalls in der Lage den inhibierenden Rezeptor zu unterbinden, nämlich durch mangelnde Genexpression. Die Folge ist, dass nur aktivierende Rezeptoren exprimiert werden und die Zielzelle lysiert wird [61].

Diese experimentelle Möglichkeit wurde in dieser Versuchsreihe im Rahmen der RNAi Transfektion erfolgreich durchgeführt und stellt einen interessanten Ansatzpunkt für die Weiterentwicklung der NK-Zell-Therapie dar. In den hier durchgeführten Versuchen konnte die Möglichkeit zur Unterbindung von Inhibitorischen KIRs nachgewiesen werden, da KIR2DL1 als Vertreter dieser Rezeptoren auf der Oberfläche der hier verwendeten NK-Zelllinie war und nach dem Versuch keine inhibierende Funktion mehr hatte. Das beweist in vitro, dass eine Inhibition durch RNAi möglich ist.

Ist es in vivo ebenfalls möglich den inhibierenden Rezeptor zu unterbinden, überwiegen die aktivierenden Signale durch die verbleibenden Rezeptoren und es müsste eine erhöhte Anti-Tumor-Aktivität in Form von verstärkter Lyse der Zielzellen nachgewiesen werden können [5]. In präklinischen Versuchsreihen konnte dies an Mäusen nachgewiesen werden, und zwar sowohl in autologen als auch in allogenen Transplantationssettings [62].

Allerdings gibt es auch den begründeten Ansatz, dass NK-Zellen durch das Fehlen von inhibitorischen Rezeptoren hyposensitiv werden [20, 63]. Das liegt darin begründet, dass NK-Zellen erst durch die Interaktion mit HLA-Klasse-I-Moleküle, ihre volle Effektorwirkung entfalten können, das sogenannte „Licensing“ fehlt. Vorherige Stimulation mit Zytokinen kann die NK-Zelle jedoch in einen voraktivierten Zustand bringen, der keines „Licensing“ bedarf [63]. Es gibt jedoch Beobachtungen, die gezeigt haben, dass die KIRs erst sechs Wochen nach Transplantation funktional sind. In der frühen Phase dominieren die NKG2A-Rezeptoren, die zu den C-Typ-Lektin Gruppe gehören, das funktionelle Repertoire [21].

Ein anderer Ansatzpunkt für die Verstärkung der Anti-Tumor-Aktivität, ergibt sich aus eigenen Reparatur- und Regenerierungssystemen der Zelle. Durch Chemotherapie und Bestrahlung entstehen DNA-Schäden. Die Liganden für den aktivierenden NKG2D-Rezeptor zum Beispiel scheinen durch genotoxischen Stress vermehrt exprimiert zu werden. Das Immunsystem wird so in Alarmbereitschaft versetzt und auf die Elimination von potentiell gefährlichen Zellen vorbereitet [64] .

Auch kann die Expression von neuartigen aktivierenden bispezifischen Antikörpern auf NK-Zellen gesteigert werden, die zweierlei Funktionen besitzen. Zum einen die Erkennung des entsprechenden Liganden auf Tumorzellen und zum anderen die Induktion bestimmter Immunmodulatorischer Funktionen, die die Effektivität und die Lysebereitschaft von NK-Zellen steigern [65].

NK-Zellen spielen auch eine große Rolle bei Übertragungen von immunkompetenten Zellen. Ihre Ursprünge hat die adoptive Immuntherapie in den 1980er Jahren, in denen sogenannte „Lymphokine-activated-killer-cells“, sog. LAK-Zellen, deren Population auch NK-Zellen beinhalteten, transferiert wurden. Diese Transfers fanden jedoch nur unter dem Einsatz großer Mengen IL-2 statt, das sich auf den Empfängerorganismus stark toxisch auswirkt und daher mit vielen Nebenwirkungen verbunden war [66]. Heute ist es möglich immunkompetente Zellen, insbesondere NK-Zellen, schonender und ohne Nebenwirkungen zu übertragen.

Da allogene NK-Zellen ein größeres Potential besitzen können, da sie von einem nicht verwandten Donor stammen, was den GvT-Effekt und somit die Tumorlyse angeht, sind sie hier von besonderem Interesse. Die Frage, die sich klinisch stellt ist allerdings wie diese Alloreaktivität in ihrer klinischen Auswirkung beschaffen ist, das heißt de facto, wie hoch der Grad der zu erwartenden Lyse einzuschätzen ist. K. J. Malmberg hat in einer Studie herausfinden können, dass der Grad der Lyse erheblich variiert, nämlich von 1% bis 60% [4].

In einer Studie mit haploidentischen Spendern, jedoch nicht im Rahmen einer SCT, konnte bestätigt werden, dass sich eine Hochdosischemotherapie zusammen mit NK-Zellinfusion und IL-2 Applikation positiv auf das Gesamtüberleben auswirkt. Interessanterweise erreichten von den 19 an der Studie beteiligten Personen mit AML, von denen vier ein alloreaktives NK-Zell-Repertoire besaßen, drei eine komplette Remission [67].

Die hiesige Studie verdeutlicht und untermauert die durchschlagenden Erfolge, die erzielt werden können, wenn die NK-Zell-Rezeptoren berücksichtigt werden und ein Mismatch im Rahmen des KIR-Ligand Mismatchmodells vorliegt. Sie trägt einen Teil zu der Weiterentwicklung dieser Therapien bei, auch gerade im Rahmen eines allogenen Settings. Es stellt sich, gerade im Kontext der vorliegenden Versuchsreihe die Frage, ob ein KIR-Ligand-Mismatch nicht ein weiteres Kriterium zur Auswahl des Spenders darstellen sollte, um so möglichst potente GvL Effekte zu erzielen.

Klinische Anwendung findet dieses Procedere schon in Donor-Lymphozyten-Infusionen (DLI), bei denen aufgereinigte NK-Zellen des Spenders appliziert werden. Besonders bei Rückfällen nach SCT, oder bei prophylaktischer Anwendung bei Hochrisikogrupen ist dieses Verfahren vielversprechend [68]. Auch vor SCT im Rahmen der Präkonditionierung konnten Erfolge gezeigt werden. Zusätzliche Antitumoraktivität, verminderte GvHD-Rate und die Verbesserung und Beschleunigung der Wiederbesiedlung des Knochenmarks zeichnen dieses Verfahren aus [49, 69].

An diesen Beispielen erkennt man, wie vielversprechend die Erfolge bis dato sind, es wird aber auch klar, dass noch viel mehr Potential in Ausschöpfung der NK-Zell-Aktivität vorhanden ist.

7. Zusammenfassung

Natürliche Killerzellen sind große, granuläre Lymphozyten, die zum angeborenen Immunsystem gehören. Sie repräsentieren etwa 10% der Lymphozyten im peripheren Blut und übernehmen wichtige Funktionen bei der Abwehr von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen. NK-Zellen exprimieren spezifische Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche, die sich Killerzell Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIRs) nennen. KIRs sind sehr polymorph und werden klonal auf NK-Zellen exprimiert. KIR-Rezeptoren können sowohl aktivierend als auch inhibitorisch auf die NK-Zelle wirken und damit ggf. die Lyse der Zielzelle einleiten.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt der inhibitorischen KIR-Rezeptoren untersucht. Es wurde eine NK-Zelllinie transient mit KIR2DL1 transfiziert.

Im Rahmen dessen wurden im zeitlichen Verlauf Zytotoxizitätsassays durchgeführt. Zum einen konnte das Rezeptor-Ligand und das Ligand-Ligand-Modell mit dieser Versuchsreihe bestätigt werden und zum anderen konnten erstmals experimentell Vorteile auch bei Zellen des Multiplen Myeloms nachgewiesen werden und nicht nur, wie bis dato bekannt, bei der akuten myeloischen Leukämie.

Die Fragen die sich im Rahmen der Zielsetzung dieser Arbeit stellten, lassen sich nun wie folgt beantworten:

1. Es ist möglich KIRs transient in NK-Zellen zu transfizieren, die Expression ließ sich drei Wochen beobachten und die exprimierten KIRs waren in vitro funktionsfähig.
2. Das Rezeptor-Ligand-Modell konnte hier bestätigt werden. Fehlt der passende Ligand (C2) auf den Myelomzellen, übt KIR2DL1 keinen inhibitorischen Effekt auf die NK-Zelle aus, die Myelomzelle wird lysiert. Auch das Ligand-Ligand-Modell lässt sich anhand dieser Versuchsreihe nachvollziehen. Fehlt dem Empfänger im Sinne der Missing-Self-Theorie ein vom Spender exprimierter KIR-Ligand, wird die Zielzelle, also in diesem Kontext die Myelomzelle, des Empfängers lysiert.

Anhand dieser Resultate konnte in vitro bestätigt werden, dass KIR2DL1, bei einem Mismatch mit den HLA-Komplexen auf der Zielzelle, in der Lage ist Krebszellen zu eliminieren. Gezielte Manipulationen von KIR-Rezeptoren könnten daher in der zellulären Therapie eine größere Rolle spielen.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTB	Beta Actin (monoklonal)
ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität
AML	Akute myeolische Leukämie
APC	Antigen-präsentierende Zelle
bp	Basenpaare
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	ungefähr
CD	Differenzierungsantigen (cluster of differentiation)
c DNA	zur mRNA komplementäre (complementary) DNS
DLI	Donorlymphozyteninfusion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
CRP	c-reaktives Protein
dNTP	Didesoxy-Nukleotid-Triphosphat
EDTA	Di-Natriumethylendiamintetraacetat
FAB	French-American-British
FBS	fötales Rinderserum
g	Gramm
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor
GvHD	Graft-versus-Host-Erkrankung
GvL	Graft-versus-Leukaemia-Effekt
GvM	Graft-versus-Myeloma-Effekt
GvT	Graft-versus-Tumor-Effekt
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
IMDM	Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-enthaltendes aktivierendes Motiv (immunoreceptor tyrosin-based activating motif)
ITIM	Immunrezeptor Tyrosin-enthaltendes inhibierendes Motiv (immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif)
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KIR	Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
LDH	Lactatdehydrogenase
LRC	Leukozyten-Rezeptor-Komplex (leucoyte receptor complex)
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex (major histocompatibility complex)
MGUS	Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz
min	Minuten
MM	Multiples Myelom
NCR	Natürlicher-Zytotoxizitätsrezeptor (natural cytotoxicity receptor)
NK	Natürliche Killerzelle
NK-WT	NK-Zellen vom Wildtyp
NKL-KIR2DL1	Stabil transfizierte Linie von NK-Zellen mit KIR2DL1
n.s.	Nicht signifikant
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration
PML	Promyelozytenleukämie
RPMI Medium	Medium vom Rosewell Park Memorial Institut
RNA	Ribonuclein acid
RNAi	Inhibitory ribonuclein acid
SCT	Stammzelltransplantation
SMM	Smoldering multiple myeloma
TNF	Tumornekrosefaktor

VEGF	Vasoendothelial growthfactor
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1

Regulation des Aktivierungszustandes von NK-Zellen durch inhibitorische und aktivierende Rezeptoren 10

Abbildung 2

Einteilung nach Salmon und Durie 21

Abbildung 3

Vektor Diagramm pCMV6-XL5 (nach Promega) 32

Abbildung 4

Prinzip LDH-Assay (nach Promega) 35

Abbildung 5

Berechnung Zytotoxizität (nach Promega) 36

Abbildung 6

Western Blot mit zwei Klonen der stabil mit KIR2DL1 transfizierten NK-Zelllinie (NK-KIR2DL1) nach einer Woche 39

Abbildung 7

Western Blot mit zwei Klonen der stabil mit KIR2DL1 transfizierten NK-Zelllinie (NK-KIR2DL1) nach drei Wochen 39

Abbildung 8

Western Blot mit Control RNAi und inhibitorischer RNAi 40

Abbildung 9

Lyse der MM-Zelllinien in Gegenwart von KHYG-1 (NK-WT) 42

Abbildung 10

Lyse der MM-Zelllinien in Gegenwart von KHYG-1 (NK-WT) nach Transfektion mit Mock si RNA 43

Abbildung 11

Lyse der Zelllinien (MM/AML) in Gegenwart von KHYG-1 nach Transfektion mit KIR2DL1 (NKL-KIR2DL1) 45

Abbildung 12

Lyse der Zelllinien (MM/AML) in Gegenwart von NKL-KIR2DL1 nach RNAi Transfektion 47

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1

Inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren und ihre Liganden 13

Tabelle 2

Aktivierende NK-Zell-Rezeptoren und ihre Liganden 14

Tabelle 3

Mittelwert und Standardabweichung des LDH-Assays mit MM-Zellen in Gegenwart von KHYG-1 42

Tabelle 4

Mittelwert und Standardabweichung des LDH-Assays mit MM-Zelllinien und NK-Zellen der Zelllinie KHYG-1 nach Transfektion mit Mock siRNA 43

Tabelle 5

Mittelwert und Standardabweichung des LDH-Assays mit MM- und AML-Zellen als Target in Gegenwart von NKL-KIR2DL1 45

Tabelle 6

Mittelwert und Standardabweichung des LDH-Assays MM- und AML-Zellen als Target in Gegenwart von NKL-KIR2DL1 nach RNAi Transfektion 47

11. Literaturverzeichnis

1. Farag, S.S., et al., *Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect.* Blood, 2002. **100**(6): p. 1935-47.
2. Robertson, M.J. and J. Ritz, *Biology and clinical relevance of human natural killer cells.* Blood, 1990. **76**(12): p. 2421-38.
3. Ruggeri, L., et al., *Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation.* Blood, 1999. **94**(1): p. 333-9.
4. Malmberg, K.J., et al., *NK cell-mediated targeting of human cancer and possibilities for new means of immunotherapy.* Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(10): p. 1541-52.
5. Ljunggren, H.G. and K.J. Malmberg, *Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(5): p. 329-39.
6. Farag, S.S. and M.A. Caligiuri, *Human natural killer cell development and biology.* Blood Rev, 2006. **20**(3): p. 123-37.
7. Kiessling, R., E. Klein, and H. Wigzell, *"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, 1975. **5**(2): p. 112-7.
8. Ljunggren, H.G. and K. Karre, *Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism.* J Exp Med, 1985. **162**(6): p. 1745-59.
9. Gagne, K., et al., *Relevance of KIR gene polymorphisms in bone marrow transplantation outcome.* Hum Immunol, 2002. **63**(4): p. 271-80.
10. Vales-Gomez, M., et al., *Kinetics of interaction of HLA-C ligands with natural killer cell inhibitory receptors.* Immunity, 1998. **9**(3): p. 337-44.
11. Lanier, L.L., *NK cell recognition.* Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 225-74.
12. Katz, G., et al., *MHC class I-independent recognition of NK-activating receptor KIR2DS4.* J Immunol, 2004. **173**(3): p. 1819-25.
13. Khakoo, S.I. and M. Carrington, *KIR and disease: a model system or system of models?* Immunol Rev, 2006. **214**: p. 186-201.
14. Lazetic, S., et al., *Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits.* J Immunol, 1996. **157**(11): p. 4741-5.
15. Phillips, J.H., et al., *CD94 and a novel associated protein (94AP) form a NK cell receptor involved in the recognition of HLA-A, HLA-B, and HLA-C allotypes.* Immunity, 1996. **5**(2): p. 163-72.
16. Lanier, L.L., *NK cell receptors.* Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 359-93.
17. Pessino, A., et al., *Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity.* J Exp Med, 1998. **188**(5): p. 953-60.
18. Pende, D., et al., *Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells.* J Exp Med, 1999. **190**(10): p. 1505-16.
19. Kim, S., et al., *HLA alleles determine differences in human natural killer cell responsiveness and potency.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(8): p. 3053-8.
20. Fernandez, N.C., et al., *A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules.* Blood, 2005. **105**(11): p. 4416-23.

21. Bjorklund, A.T., et al., *NK cells expressing inhibitory KIR for non-self-ligands remain tolerant in HLA-matched sibling stem cell transplantation.* Blood, 2010. **115**(13): p. 2686-94.
22. Joncker, N.T., et al., *NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model.* J Immunol, 2009. **182**(8): p. 4572-80.
23. Sun, J.Y., et al., *Killer Ig-like receptor (KIR) compatibility plays a role in the prevalence of acute GVHD in unrelated hematopoietic cell transplants for AML.* Bone Marrow Transplant, 2005. **36**(6): p. 525-30.
24. Kroger, N., et al., *Low number of donor activating killer immunoglobulin-like receptors (KIR) genes but not KIR-ligand mismatch prevents relapse and improves disease-free survival in leukemia patients after in vivo T-cell depleted unrelated stem cell transplantation.* Transplantation, 2006. **82**(8): p. 1024-30.
25. Bishara, A., et al., *The beneficial role of inhibitory KIR genes of HLA class I NK epitopes in haploidentically mismatched stem cell allografts may be masked by residual donor-alloreactive T cells causing GVHD.* Tissue Antigens, 2004. **63**(3): p. 204-11.
26. Spicka, I. and P. Klener, *[Multiple myeloma--clinical symptoms, diagnosis, prognosis, therapy].* Cas Lek Cesk, 2000. **139**(13): p. 391-5.
27. Einsele H., N.R., Goldschmidt H. , Kortüm M., *DGHO-Leitlinie Multiples Myelom.* 2009.
28. Rajkumar, S.V., A. Dispenzieri, and R.A. Kyle, *Monoclonal gammopathy of undetermined significance, Waldenstrom macroglobulinemia, AL amyloidosis, and related plasma cell disorders: diagnosis and treatment.* Mayo Clin Proc, 2006. **81**(5): p. 693-703.
29. Mester, B., et al., *Occupation and malignant lymphoma: a population based case control study in Germany.* Occup Environ Med, 2006. **63**(1): p. 17-26.
30. Chang, E., Smedby KE, Hjalgrim H, Porwit-MacDonald A, Roos G, Glimelius B, Adami HO., *Family history of hematopoietic malignancy and risk of lymphoma.* Journal of the National Cancer Institut, 2005. **97**(19): p. 1466-74.
31. Fonseca, R., et al., *International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review.* Leukemia, 2009. **23**(12): p. 2210-21.
32. Dankbar, B., et al., *Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma.* Blood, 2000. **95**(8): p. 2630-6.
33. Klein, B., et al., *Interleukin-6 in human multiple myeloma.* Blood, 1995. **85**(4): p. 863-72.
34. Kyle, R.A. and S.V. Rajkumar, *Multiple myeloma.* N Engl J Med, 2004. **351**(18): p. 1860-73.
35. Durie, B.G. and S.E. Salmon, *A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival.* Cancer, 1975. **36**(3): p. 842-54.
36. Dimopoulos, M.A., et al., *The International Scoring System (ISS) for multiple myeloma remains a robust prognostic tool independently of patients' renal function.* Ann Oncol, 2012. **23**(3): p. 722-9.
37. Giralt, S., et al., *International myeloma working group (IMWG) consensus statement and guidelines regarding the current status of stem cell collection and*

high-dose therapy for multiple myeloma and the role of plerixafor (AMD 3100). Leukemia, 2009. **23**(10): p. 1904-12.

38. Cavo, M., et al., *Short-term thalidomide incorporated into double autologous stem-cell transplantation improves outcomes in comparison with double autotransplantation for multiple myeloma.* J Clin Oncol, 2009. **27**(30): p. 5001-7.
39. Gahrton, G., et al., *Allogeneic bone marrow transplantation in multiple myeloma. European Group for Bone Marrow Transplantation.* N Engl J Med, 1991. **325**(18): p. 1267-73.
40. Palumbo, A. and S.V. Rajkumar, *Multiple myeloma: chemotherapy or transplantation in the era of new drugs.* Eur J Haematol, 2010. **84**(5): p. 379-90.
41. Barlogie, B. and G. Gahrton, *Bone marrow transplantation in multiple myeloma.* Bone Marrow Transplant, 1991. **7**(2): p. 71-9.
42. Jagannath, S. and B. Barlogie, *Autologous bone marrow transplantation for multiple myeloma.* Hematol Oncol Clin North Am, 1992. **6**(2): p. 437-49.
43. Barosi, G., et al., *Management of multiple myeloma and related-disorders: guidelines from the Italian Society of Hematology (SIE), Italian Society of Experimental Hematology (SIES) and Italian Group for Bone Marrow Transplantation (GITMO).* Haematologica, 2004. **89**(6): p. 717-41.
44. Wagtmann, N., et al., *Killer cell inhibitory receptors specific for HLA-C and HLA-B identified by direct binding and by functional transfer.* Immunity, 1995. **3**(6): p. 801-9.
45. Cichocki, F. and J.S. Miller, *In vitro development of human Killer-Immunoglobulin Receptor-positive NK cells.* Methods Mol Biol, 2010. **612**: p. 15-26.
46. Sierich, H. and T. Eiermann, *Comparing individual NK cell activity in vitro.* Curr Protoc Immunol, 2013. **Chapter 14**: p. Unit14 32.
47. Ljunggren, H.G. and K. Karre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition.* Immunol Today, 1990. **11**(7): p. 237-44.
48. Wu, J. and L.L. Lanier, *Natural killer cells and cancer.* Adv Cancer Res, 2003. **90**: p. 127-56.
49. Ruggeri, L., et al., *Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants.* Science, 2002. **295**(5562): p. 2097-100.
50. Miller, J.S., et al., *Missing KIR ligands are associated with less relapse and increased graft-versus-host disease (GVHD) following unrelated donor allogeneic HCT.* Blood, 2007. **109**(11): p. 5058-61.
51. Davies, S.M., et al., *Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor.* Blood, 2002. **100**(10): p. 3825-7.
52. Pegram, H.J., et al., *Activating and inhibitory receptors of natural killer cells.* Immunol Cell Biol, 2011. **89**(2): p. 216-24.
53. Witt, C.S., *The influence of NK alloreactivity on matched unrelated donor and HLA identical sibling haematopoietic stem cell transplantation.* Curr Opin Immunol, 2009. **21**(5): p. 531-7.
54. Stringaris, K., et al., *Donor KIR genes 2DL5A, 2DS1 and 3DS1 are associated with a Reduced Rate of Leukaemia Relapse after HLA-Identical Sibling Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukaemia but not other Haematological Malignancies.* Biol Blood Marrow Transplant, 2010.

55. Shahsavar, F., et al., *KIR2DS3 is Associated with Protection against Acute Myeloid Leukemia.* Iran J Immunol, 2010. **7**(1): p. 8-17.
56. Pende, D., et al., *Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112).* Blood, 2005. **105**(5): p. 2066-73.
57. Costello, R.T., et al., *Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia.* Blood, 2002. **99**(10): p. 3661-7.
58. Jager, M.J., et al., *HLA expression in uveal melanoma: there is no rule without some exception.* Hum Immunol, 2002. **63**(6): p. 444-51.
59. Salih, H.R., H.G. Rammensee, and A. Steinle, *Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding.* J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4098-102.
60. Albertsson, P.A., et al., *NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity.* Trends Immunol, 2003. **24**(11): p. 603-9.
61. Sheridan, C., *First-in-class cancer therapeutic to stimulate natural killer cells.* Nat Biotechnol, 2006. **24**(6): p. 597.
62. Koh, C.Y., et al., *Augmentation of antitumor effects by NK cell inhibitory receptor blockade in vitro and in vivo.* Blood, 2001. **97**(10): p. 3132-7.
63. Kim, S., et al., *Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules.* Nature, 2005. **436**(7051): p. 709-13.
64. Gasser, S., et al., *The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor.* Nature, 2005. **436**(7054): p. 1186-90.
65. Zhang, T., A. Barber, and C.L. Sentman, *Generation of antitumor responses by genetic modification of primary human T cells with a chimeric NKG2D receptor.* Cancer Res, 2006. **66**(11): p. 5927-33.
66. Rosenberg, S.A., et al., *Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer.* N Engl J Med, 1985. **313**(23): p. 1485-92.
67. Miller, J.S., et al., *Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer.* Blood, 2005. **105**(8): p. 3051-7.
68. Kolb, H.J., B. Simoes, and C. Schmid, *Cellular immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation in hematologic malignancies.* Curr Opin Oncol, 2004. **16**(2): p. 167-73.
69. Lundqvist, A., et al., *Reduction of GVHD and enhanced antitumor effects after adoptive infusion of alloreactive Ly49-mismatched NK cells from MHC-matched donors.* Blood, 2007. **109**(8): p. 3603-6.

12. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Nicolaus Kröger, der mir die Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit in der Interdisziplinären Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf ermöglicht hat und stets großes Interesse an meiner Arbeit zeigte. Er stand mir bei Fragen oder Unklarheiten stets zur Seite ohne mich jemals unter Zeitdruck zu setzen.

Besonderer Dank gilt Herrn York Hildebrandt und Dr. Thomas Binder, die mich im Zuge dieser Arbeit mit ganzer Kraft unterstützt haben. Ihre umfangreiche Laborerfahrung und Geduld haben einen wesentlichen Teil zu der zügigen Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren möchte ich dem ganzen Laborteam, insbesondere Frau Anita Badbaran und Herrn Tim Lüttkens, für die sehr angenehme Zusammenarbeit danken. Stets konnte ich auf Unterstützung und wertvolle Ratschläge zählen. Nicht zuletzt das trägt dazu bei, dass ich mich immer gerne an diese schöne Zeit erinnern werde.

Auch Prof. Thomas Eiermann und Frau Heidi Duske gilt mein Dank für die Hilfe bei der Transfektion und der Bereitstellung des Buffy-Coats.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie danken, die mich während der Fertigstellung dieser Arbeit stets ermutigt und motiviert hat.

13. Lebenslauf

Karla Johanna Jungk, geb. Fröhlich

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 29.11.1984

Geburtsort: Hamburg

Familienstand: verheiratet

Studium

10/2004 - 07/2005	Studium der Rechtswissenschaft an der Universität Hamburg
10/2005 - 11/2011	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
02/2012 - heute	Ärztin in Weiterbildung im Fachbereich Anästhesie an der Park Klinik Manhagen, Großhansdorf, Schleswig-Holstein

Schule

1991-1995	Grundschulbesuch in Hamburg/Wandsbek
1995-2004	Besuch des Charlotte-Paulsen-Gymnasiums in Hamburg-Wandsbek
07/2004	Abitur (Abschlußnote 1,5)

Sonstige Interessen und Kenntnisse

- Englisch fließend, Spanisch Grundkenntnisse
- Sport, Internationale Reisen, fernöstliche Länder, Kochen

14. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....