

Aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. H. Kirchner

**Signaltransduktion in NK-Zellen
während der natürlichen Zytotoxizität**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Ulrich Langenkamp
aus Trier

Lübeck 2005

1. Berichtstatter:

Prof. Dr. med. Holger Kirchner

2. Berichtstatter:

Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2005

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 15.07.2005

**gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann
- Dekan der Medizinischen Fakultät -**

Signaltransduktion in NK-Zellen während der natürlichen Zytotoxizität

Inhaltsverzeichnis:	III
Abkürzungsverzeichnis	V
1: Einleitung	Seite 1
1.1: NK-Zellen und deren Bedeutung im Immunsystem	2
1.2: NK-Zell-Rezeptoren	4
1.3: Regulierung der NK-Zell-Funktion <i>in vivo</i>	8
1.4: Effektorfunktionen	9
1.5: Signaltransduktionsmoleküle NF-AT und NF- κ B	9
1.5.1: Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen - NF-AT	10
1.5.2: Nukleärer Faktor κ B – NF- κ B	11
1.6: Zielsetzung	11
2: Material	Seite 13
3: Methoden	Seite 21
3.1: Zellpräparation	21
3.1.1: PBMC	21
3.1.2: Monozyten/T-Zellen	21
3.1.3: NK-Zellen	21
3.1.4: Zielzellen	22
3.1.5: Durchflusszytometrie	23
3.2: Zellkulturverfahren	23
3.2.1: Stimulierung	23
3.3: Kernextrakte	23
3.4: Überstände	24
3.5: RNA-Extraktion	24
3.6: Band shift-Experimente	25
3.6.1: 5- ³² P-Oligonukleotidlabeling	26
3.6.2: Bindereaktion und elektrophoretische Trennung	28
3.6.3: Trocknung der Gele, Detektion der Radioaktivität	28
3.6.4: Super shift	29
3.7: Western blot (Immunoblotting)	29
3.8: Dot blot	30
3.9: Combi blot	31
3.10: ELISA	32
3.11: Gen-Expressions Analysen (GEA)	33
3.12: Auswertung der Ergebnisse	35

4: Ergebnisse	Seite 36
4.1: Transkriptionsfaktoren aus NK-Zellen und T-Zellen differieren in ihren elektrophoretischen Eigenschaften	36
4.2: Höhere basale NF-AT und NF- κ B-Aktivität in NK-Zellen als in PBMC	39
4.3: Verlängerte NF-AT und NF- κ B-Aktivierung in NK-Zellen im Vergleich zu PBMC	40
4.4: Die Bindung der NF- κ 1 – κ 3-Motive ist spezifisch und durch IL-2 verstärkbar	42
4.5: Die Bindung der NF-AT P1 – P3-Motive des IFN- γ -Promotors durch NF-AT-Faktoren ist spezifisch und durch IL-2 verstärkbar	45
4.6: Unterschiedliche Affinität zu den P1 / P2 / P3-Motiven des IFN- γ -Promotors in NK- und T-Zellen	45
4.7: Identifikation von NF-AT und NF- κ B-Proteinen bei der Aktivierung von NK-Zellen	47
4.8: Interferon- γ -Sekretion in NK-Zellen ist zeitversetzt und verlängert im Vergleich zu PBMC	52
4.9: Ermittlung der Genexpressionsmuster in NK-Zellen während der Aktivierung durch Gene-Arrays	54
4.10: Die Expression von IRAK, IFN- γ und TNF- α in den Zielzellen ist vernachlässigbar gering	57
5: Diskussion	58
6: Zusammenfassung	66
7: Literaturverzeichnis	67
8: Danksagung	74
9: Lebenslauf	75

Abkürzungsverzeichnis:

ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity
ARRE-2	Antigen-Receptor-response element-2
AML	Akute myeloische Leukämie
CD	Cluster of differentiation
CMV	Cytomegalie Virus
DAR	Digitaler Autoradiograph
DBD	DNA-binding domain
DNA	Deoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
FACS	Fluorescence activated cell sorter
ICAM	Intercellular adhaesion moleküle
Ig	Immunoglobulin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activating motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
IRAK	Interleukin-receptor associated kinase
GEA	Gene expression array
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony stimulation factor
GvHD	Graft versus host disease
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
KIR	Killer cell immunoglobulin receptor
LGL	Large granular lymphocyte
MACS	Magnetism activated cell sorter
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MHC	Major histocompatibility complex
MICA/B	MHC class I chain-related antigen A bzw B
NCR	Natural cytotoxicity receptors
NF-AT	Nuclear factor of activated T-cells
NF- κ B	Nuclear factor κ B
NHR	N-terminal homology region
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
RNA	Ribonucleic acid
SHP-1	SH2 domain containing phosphatase-1
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
TNFR	Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor
TSST	Toxic shock Syndrom Toxin
ULBP	UL-16 bindendes Protein

1. Einleitung

Tumorerkrankungen spielen eine immer wichtigere Rolle in den Industrienationen. In den westlichen Ländern und den USA ist nach den Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems der Krebs die häufigste Todesursache. Sowohl die Inzidenz und die Prävalenz der Tumorerkrankungen als auch die dadurch entstehenden Kosten steigen kontinuierlich an.

Die seit Jahrzehnten etablierte und dabei kontinuierlich optimierte Therapie fast aller bösartigen Tumoren besteht aus drei Säulen: der chirurgischen Therapie, der Strahlentherapie und der Chemotherapie. Mit diesen Ansätzen werden die entarteten Zellen soweit wie möglich aus dem Körper entfernt und zerstört. Die Optimierung dieser konventionellen Therapieoptionen sorgt für bessere Behandlungsergebnisse, eine höhere Chance auf langes rezidivfreies Überleben und führt bei einigen Tumorentitäten sogar zu deren Heilung. Die Belastung durch eine solche Therapie ist jedoch hoch, die Schäden an gesunden Zellen und Organen sind beträchtlich, und die dabei erzielten Ergebnisse sind doch häufig ernüchternd. Der wichtigste Grund dafür ist sicherlich die Tatsache, dass diese Therapien nicht selektiv auf Tumorzellen wirken, sondern alle Zellen im Körper im Visier haben und nur durch die höhere Stoffwechsel- und Teilungsaktivität der Tumorzellen diese präferentiell zu treffen versuchen. Daher wird schon seit vielen Jahrzehnten an immunologischen Therapieoptionen gearbeitet, die selektiv Tumorzellen erkennen und zerstören, während gesunde Zellen unbeeinträchtigt bleiben.

Aufgrund der Tatsache, dass das Erkennen und Zerstören von Tumorzellen eine wichtige Aufgabe des Immunsystems ist und die täglich im Körper eines jeden Menschen durch Mutationen auftretenden tumorös entarteten Zellen durch das Immunsystem zerstört werden, werden seit vielen Jahren beträchtliche Anstrengungen unternommen, diese Fähigkeit des Immunsystems therapeutisch zu nutzen. Dabei spielt einerseits die Frage eine Rolle, warum die Zellen eines Tumors durch das Immunsystem nicht erkannt wurden und dadurch überhaupt erst die Entstehung einer malignen Erkrankung möglich wurde, andererseits wird mit Hilfe des Immunsystems eine selektive Zerstörung der Tumorzellen bei bereits manifester Erkrankung erhofft. Die dabei denkbaren Therapiemodalitäten sind zahlreich und die Versuche, dieses Potential zu nutzen, ebenfalls. Sie reichen von der Verabreichung hochdosierter Cytokine wie Interleukin-2 (IL-2) zur Stimulierung der Immunzellen [39] über den Einsatz von spezifischen Antikörpern zur Markierung von Tumorzellen und dem Versuch, antigenpräsentierende Zellen zur Präsentation

Einleitung

von Tumorantigenen zur Aktivierung von Immunzellen zu bringen (Tumorvakzinierung) [16] bis hin zur autologen oder heterologen Transfusion zytotoxischer Zellen (DLI, Donor Lymphocyte Infusion) [3].

Bei Letztgenanntem sind T-Zellen und NK-Zellen die Ansatzpunkte. T-Zellen stellen einen beträchtlichen Anteil der zytotoxischen Aktivität im Immunsystem. Die Gabe von T-Zellen wird allerdings durch die starken Nebenwirkungen, die vor allem auf die zytotoxische Wirkung auf gesunde Zellen zurückgeführt werden kann (GvHD, Graft versus Host-Disease, Spender-gegen-Empfänger-Erkrankung), erschwert. Mit Verbesserung der Kenntnisse und der Methodik zielen neuere Ansätze vor allem auf den therapeutischen Einsatz von NK-Zellen ab, da diese eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Tumorzellen einnehmen und zudem aufgrund ihres Wirkungsmechanismus keine gravierende GvHD hervorrufen.

1.1: NK-Zellen und deren Bedeutung im Immunsystem

Morphologisch sind NK-Zellen, die etwa 10 – 15 % der zirkulierenden Lymphozyten ausmachen [64], durch das Vorhandensein des Oberflächenmoleküls CD56 bei gleichzeitigem Fehlen des T-Zell-Markers CD3 definiert [19]. Eine weitere Unterteilung ist entsprechend der Anzahl der CD16- und CD56-Moleküle möglich, wobei 90 % der NK-Zellen eine hohe Dichte an CD16 bei geringer Expression von CD56 aufweisen (CD56^{dim}, CD16^{bright}) und primär zytotoxische Funktionen haben, während Zellen mit CD56^{bright}, CD16^{dim} vornehmlich immunregulatorisch durch die Zytokinsekretion wirken [42]. Weiterhin sind zahlreiche zelluläre Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und CD54 auf NK-Zellen zu finden [64]. NK-Zellen besitzen Rezeptoren für Interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-10, IL-12, IL-15 und IL-18 [19].

Als Teil des angeborenen Immunsystems sind NK-Zellen in der Lage, ohne vorherige Sensibilisierung und Antikörperbildung ihre Zielzellen zu erkennen [4]. Durch diese Eigenschaft werden NK-Zellen zu einer wichtigen Waffe des Immunsystems in der frühen Phase der Immunantwort und einem Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem [79].

Die Fähigkeit der schnellen und effektiven Immunreaktion auf Tumorzellen machen NK-Zellen auch zu einem wichtigen und vielversprechenden Instrument in der experimentellen Tumorthherapie [27]. Unter anderem werden sie im Rahmen eines therapeutischen Heilversuches an der Universität zu Lübeck - von anderen Lymphozyten

Einleitung

durch Apherese gereinigt und stark proliferiert (Faktor: ca. 10^6) sowie stimuliert mit IL-2 und IL-15 - zur experimentellen Therapie metastasierter Nierenzellkarzinome in einer Menge von etwa 10^{12} Zellen transfundiert [10, 27, 57]. Weitere Einsatzgebiete liegen in der Therapie der akuten myeloischen Leukämie (AML), Her2neu-positiver Mammatumoren [15] sowie beim weiteren Tumoren [68].

Zielzellen der NK-Zellen sind vor allem virusinfizierte Zellen und Tumorzellen, die durch Veränderungen an der Zelloberfläche, speziell dem Verlust oder der Modifikation von MHC-I-Molekülen, als Zielzelle erkannt werden [12]. Fremdgewebe sowie Bakterien sind weitere Ziele.

Zur Erkennung und Lyse von Zielzellen bedienen sich NK-Zellen zweier verschiedener Mechanismen, die sich auf der Ebene der Rezeptoren als auch der intrazellulären Signaltransduktion unterscheiden. Diese sind die *Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität* (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) sowie die *natürliche Zytotoxizität*.

ADCC verläuft über eine Aktivierung des Fc γ RIII-Rezeptors, der dem CD16-Marker auf T- und NK-Zellen entspricht [31]. Diese Rezeptoren erkennen und binden den Fc-Teil von monomerem IgG (daher Fc γ R) und sind in verschiedenen Varianten auf verschiedenen Zellen zu finden. Eine Hemmung der ADCC ist folglich möglich mit Antikörpern, die humanes CD16 binden [15]. Fc γ RIII besitzt eine niedrige Affinität zum Liganden und wird auf Granulozyten und NK-Zellen exprimiert [31]. Zu dessen Aktivierung sind Antikörper der IgG-Klasse erforderlich und somit eine vorherige Sensibilisierung und klonale Expansion von B-Zellen sowie deren Antikörperproduktion.

Die *natürliche Zytotoxizität* läuft im Gegensatz dazu ohne vorherige Sensibilisierung und Antikörperbildung ab und kann so zu einer schnellen und direkten Erkennung und Abtötung von Zielzellen führen. Dadurch spielt die natürliche Zytotoxizität eine wichtige Rolle bei der physiologischen Abwehr gegen tumorös entartete Zellen und gegen manifeste Tumorerkrankungen. Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die Untersuchung und Beschreibung der natürlichen Zytotoxizität, weil diese in der Literatur als die entscheidende Art der schnellen Antwort auf tumorös entartete Zellen beschrieben wird [83].

Die in die Auslösung der natürlichen Zytotoxizität involvierten Rezeptoren liegen in großer Anzahl und Vielfalt auf der Oberfläche der NK-Zellen vor. Die Beschreibung dieser Rezeptoren und deren Interaktionen mit Oberflächenmolekülen potentieller

Einleitung

Zielzellen sind zum Verständnis der Regulation von NK-Zell-Aktivität essentiell und daher Gegenstand intensiver Forschungstätigkeit sowie des folgenden Abschnittes dieser Arbeit.

1.2: NK-Zell-Rezeptoren

Nach allgemeinem immunologischen Verständnis wird Fremdgewebe durch darauf spezialisierte Rezeptoren auf Immunzellen erkannt, was zur Aktivierung der Zelle führt und zur Zerstörung der Zielzelle, wie dies beispielsweise durch T-Zellen und ihren T-Zell-Rezeptor geschieht [23]. Eine dazu „revolutionäre“ Gegen-Hypothese für die Funktionsweise von NK-Zellen formulierten 1981 Kärre und Ljunggren mit ihrer Missing-self-Theorie [47]. Gemäß ihrer Theorie sollen NK-Zellen ihre Zielzellen an einem Verlust oder Alteration von MHC-I-Oberflächenmolekülen, also an „fehlendem Selbst“ statt am „Fremd“ erkennen. Dazu dient bei NK-Zellen in erster Linie ein hemmender MHC-I-Rezeptor. Beim Kontakt zwischen einer gesunden Körperzelle und einer autologen NK-Zelle bindet der intakte MHC-Komplex der Zelle an einen NK-Rezeptor, der daraufhin durch hemmende Signale in die NK-Zelle dafür sorgt, daß keine zytotoxische Aktivität von der NK-Zelle ausgeübt wird. Hat jedoch die mit der NK-Zelle in Kontakt tretende Zelle keine oder alterierte MHC-Komplexe, oder ist die Zahl des MHC auf der Zelle verringert, so binden weniger Liganden den hemmenden Rezeptor auf der NK-Zelle, und die aktivierenden Rezeptoren und Signale gewinnen ein stärkeres Gewicht bei der Regulation der NK-Zell-Antwort, so dass im Endeffekt die NK-Zelle aktiviert wird und ihre Zielzelle lysiert. Im weiteren Verlauf der Forschung wurden jedoch Zellen gefunden, die trotz normaler MHC-Expression lysiert wurden und auch Zellen mit fehlender oder fehlerhafter MHC-Expression, die keine Aktivierung von NK-Zellen bewirken (beispielsweise Erythrozyten). Daraus folgt, dass die Regulierung der NK-Zell-Aktivität noch wesentlich komplizierter und nicht allein durch die Missing-Self-Hypothese erklärbar ist. Folgerichtig stieg die Anzahl bekannter NK-Zell-Rezeptoren durch intensive Forschungstätigkeit stark an.

Näherungsweise werden die Rezeptoren in aktivierende und in hemmende Rezeptoren eingeteilt, wobei beide Gruppen vor allem (aber nicht nur) MHC-I-Moleküle erkennen und verschiedenen Subklassen zugeordnet werden können [58]. Zu diesen Subklassen gehören die Killerzell-Immunglobulinartigen Rezeptoren (Killer-cell-Immunglobulin-like-receptors, KIR), die Rezeptoren vom C-Typ-Lekin (C-type lectin receptors) und die

Einleitung

Natürlichen Zytotoxischen Rezeptoren (natural cytotoxicity receptors, NCR). Die Anzahl der auf der NK-Zelle zu findenden Rezeptoren korreliert dabei mit der zytotoxischen Aktivität der Zelle [74].

Die folgenden Tabellen geben einen zusammenfassenden Überblick über die NK-Zell-Rezeptoren und deren morphologisch bedingte Einordnung in ihre Subklassen sowie – soweit bekannt - ihre Liganden.

Tabelle 1: Aktivierende NK-Zell-Rezeptoren und ihre Liganden

Aktivierende Rezeptoren	Bezeichnung	Ligand auf der Zielzelle	Zitate
Killerzell Ig-artige Rezeptoren	KIR2DS1	HLA-C Gruppe 2	[9]
	KIR2DS2	HLA-C Gruppe 1	[9]
	KIR2DL4	HLA-G	
	KIR2DS4	unbekannt	
	KIR2DS5	unbekannt	
	KIR3DS1	unbekannt	[7]
C-type-Lektin-Rezeptoren	NKG-2D	MICA/MICB	[6]
	NKG2C (CD94)	HLA-E	[35]
	NKG2E/H	unbekannt	[35]
Natürliche-Zytotoxizitäts-Rezeptoren	NKp46	unbekannt	[60]
	NKp44	unbekannt	[80]
	NKp30	unbekannt	[14]
Andere Rezeptoren	CD16	Fc-Teil des IgG	
	CD2	CD58	
	LFA-1	ICAM-1	
	2B4	CD48	
	NKp80	unbekannt	
	CD69	unbekannt	
	CD40-Ligand	CD40	

Tabelle 2: Hemmende NK-Zell-Rezeptoren und ihre Liganden

Hemmende Rezeptoren	Bezeichnung	Ligand auf der Zielzelle	Zitate
Killerzell-Ig-artige Rezeptoren	KIR2DL1 (CD158a)	HLA-C Gruppe 2	[18]
	KIR2DL2 (CD158a)	HLA-C Gruppe 1	
	KIR2DL3 (CD158a)	HLA-C Gruppe 1	
	KIR2DL5	unbekannt	
	KIR3DL1	HLA-Bw4	[67]
	KIR3DL2	HLA-A3-11	[59]
	KIR3DL7	unbekannt	
C-type-Lektin Rezeptoren	NKG2A/A (CD94)	HLA-E	
Ig-artige Transkripte	ILT-2 (LIR-1)	Unbekannt	[18]
Andere Rezeptoren	P75/AIRM	unbekannt	
	IRp60	Unbekannt	
	LAIR-1	Ep-CAM	

KIR zeichnen sich durch zwei bis drei immunglobulinartige extrazelluläre Domänen aus, die MHC-Klasse-I-Moleküle vom Typ HLA-C binden. Sie können inhibierend oder aktivierend wirken. Im ersten Fall bewirken sie über ihren intrazellulären Anteil, der Immunrezeptor Tyrosinbasierende hemmende Motive (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs, ITIMs) enthält, eine Dephosphorylierung verschiedener Signalmoleküle. Dabei spielen die Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 eine wichtige Rolle [8]. Diese besitzen eine SH2-Domäne, mit der sie an das ITIM andocken und so ihre Funktion ausüben. Aktivierende KIR sind an Adaptormoleküle gekoppelt, die - wie auch die ADCC vermittelnden Rezeptoren (FcγRIII) [46] – Immunrezeptor Tyrosinbasierende aktivierende Motive (ITAMs) tragen. Dadurch führen sie zur Phosphorylierung verschiedener Signalmoleküle bei Ligandenbindung über die Protein-Tyrosinkinase Syk und IRAK (Interleukin-Rezeptor assoziierte Kinase), was zu einer Aktivierung führt [80] (siehe Bild 1).

Rezeptoren vom C-Typ-Lektin bestehen als Heterodimer aus einer gemeinsamen Untereinheit, dem CD94, und dem kovalent daran gebundenen C-type Lektin NKG2 als

Einleitung

extrazellulärer Domäne des Rezeptors. Das NKG2-Molekül liegt in vier bisher bekannten unterschiedlichen Transkripten (NKG2A-H) vor, wobei einige beschriebene Moleküle nur gering unterschiedliche Splice-Varianten darstellen (NKG2A und NKG2B; NKG2E und NKG2H). Von diesen Rezeptoren ist nur NKG2A inhibitorisch [81], alle anderen C-type-Lektin-Rezeptoren aktivieren NK-Zellen. Die Liganden für C-type-Lektin-Rezeptoren sind MHC-I-Moleküle oder deren Varianten. Ein wichtiger und gut untersuchter Rezeptor dieser Familie ist NKG2D, der bei Bindung von MICA und MICB sowie ULBP zu einer Aktivierung führt. MICA und MICB (Major Histocompatibility Complex Class I Chain related proteins A bzw B) sind durch zellulären Stress induzierte veränderte HLA-Komplexe, wie sie bei Virusinfekten oder Tumoralterationen auftreten können [6]. ULBP 1, 2, und 3 (UL 16 bindendes Protein) sind ebenfalls eine Gruppe veränderter MHC-I-Komplexe, die durch das Vorkommen bei Virusinfektionen beschrieben wurden (UL 16 ist ein Protein des Zytomegalie-Virus CMV) [65].

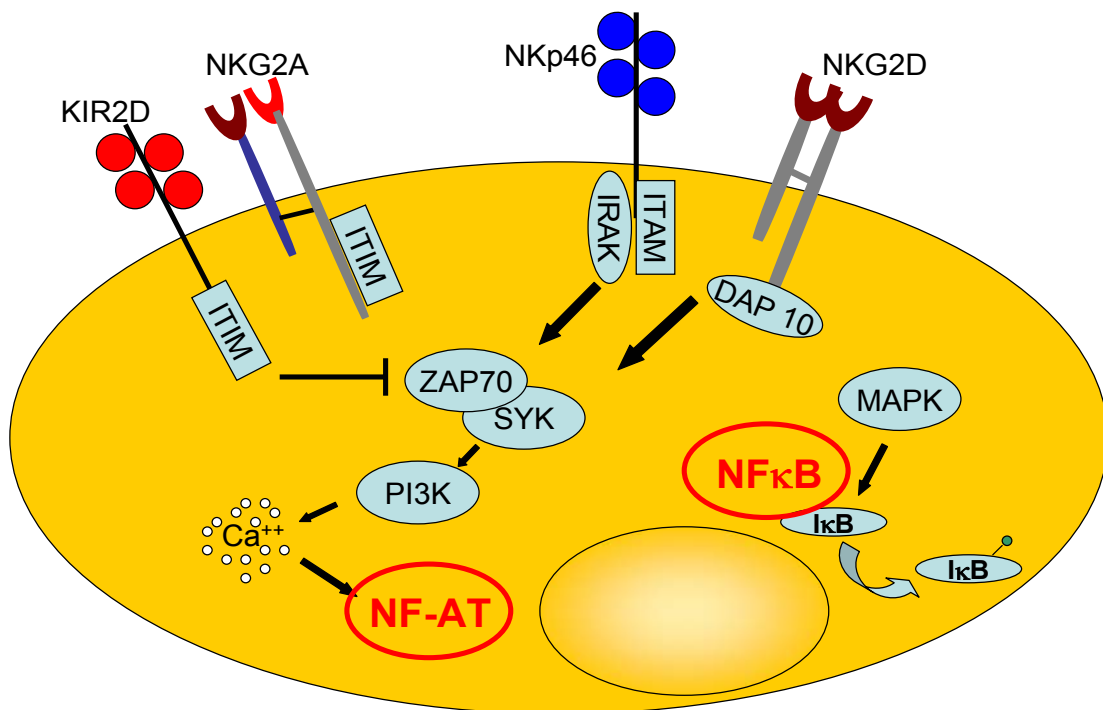


Bild 1: NK-Zell-Rezeptoren und ihre Adaptermoleküle

NK-Zellen besitzen eine Vielzahl aktivierender und hemmender Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, die durch verschiedene Transduktionsfaktoren ihr Signal in den Zellkern tragen und somit über die Reaktion der Zelle auf einen Stimulus entscheiden. Dargestellt sind mit KIR2D und NKG2A zwei hemmende Rezeptoren. NKp46 und NKG2D sind wichtige Beispiele aktivierender Rezeptoren

1.3: Regulierung der NK-Zell-Funktion *in vivo*

Vereinfacht ist die Regulation der NK-Zellen über vier Szenarien vorstellbar. Binden auf der NK-Zelle nur inhibierende, nicht aber aktivierende Rezeptoren ihre Liganden, so bleibt die NK-Zelle inaktiv (Bild 2A, modifiziert nach Farag [25]). Werden aktivierende und inhibierende Rezeptoren von Liganden gebunden, wobei die Zahl der ligandengebundenen inhibierenden Rezeptoren größer ist als die der aktivierenden Rezeptoren, so überwiegen in der Zelle die ITIMs und deren dephosphorylierende Funktion gegenüber den ITAMs, so dass im Saldo die Zelle inaktiv bleibt (Bild 2B). Werden dagegen nur aktivierende Rezeptoren gebunden oder überwiegt die Zahl der aktivierenden Rezeptoren, so liegen mehr ITAMs als ITIMs in der NK-Zelle aktiviert vor, was zu einer Aktivierung der Zelle und damit zu einer Lyse der Zielzelle führt (Bilder 2C und 2D).

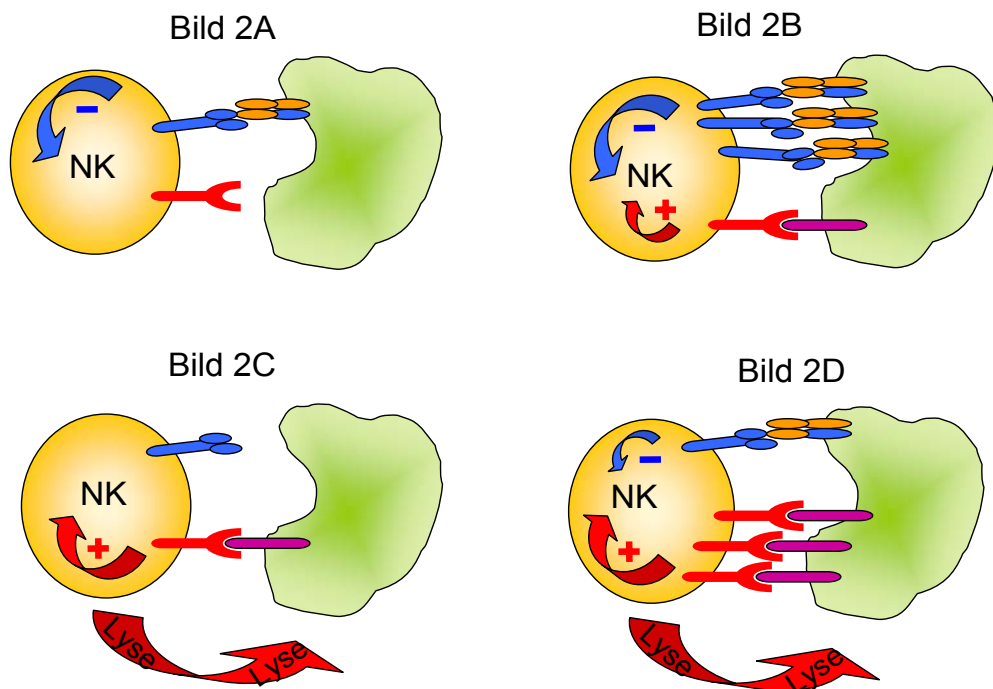


Bild 2: Steuerung der NK-Zell-Anwort durch aktivierende und hemmende Rezeptoren
Hemmende Rezeptoren führen zu einem hemmenden Signal nach Ligandenbindung, aktivierende Rezeptoren dagegen zu einer Aktivierung der Zelle. Dargestellt sind 4 Szenarien der NK-Zell-Zielzell-Interaktion, die entweder zu einer Hemmung der NK-Zelle (Bild 2A und 2B) oder einer Lyse der Zielzelle führt.

1.4: Effektorfunktionen

Als Resultat einer Aktivierung führen NK-Zellen ihre Wirkung auf verschiedene Weise aus. Sie wirken zytotoxisch und lysieren Zielzellen direkt durch Exozytose von mit Granzym A/B und Perforin gefüllten Granulen, die an der Zielzelle Apoptose und Nekrose bewirken [86]. Diese Granulen liegen schon präformiert in ruhenden Zellen im Zytoplasma vor, was NK-Zellen historisch auch den Namen „Large Granular Lymphocytes“ (LGL) eingebracht hat. Daneben sind NK-Zellen in der Lage, in der Zielzelle Apoptose durch das Fas/Fas-Ligand-System zu induzieren. Durch Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen auf Aktivierungsstimulus wird die lokale Wirkung von NK-Zellen verstärkt. Wichtige Oberflächenmoleküle sind ICAM-1 und CD54 [61].

Eine weitere wichtige immunologische Aufgabe ist die Produktion von Zytokinen. Dabei spielt Interferon- γ (IFN- γ) eine entscheidende Rolle in der Kontrolle malignen Wachstums [44], das unter anderem die Inhibition des zellulären Wachstums bewirkt. Außerdem steigert IFN- γ die Expression von MHC-I-Molekülen oder seiner Varianten ULBP und MICA/MICB auf Tumorzellen und fördert damit deren Erkennung [30] und hemmt die Angiogenese im Tumor [84]. TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor- α) und GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony stimulating factor), die ihrerseits sowohl zytotoxisch wirken (IFN- γ und TNF- α) als auch andere Immunprozesse auf autokrine und parakrine Weise stimulieren (IFN- γ und TNF- α) und in die Hämatopoese eingreifen (GM-CSF), sind ebenfalls Produkte von NK-Zellen und werden auf Aktivierung sezerniert.

1.5: Signaltransduktionsmoleküle NF-AT und NF- κ B

Eine zentrale und wichtige Rolle in der Signaltransduktion von der Rezeptorbindung an der Zelloberfläche bis zur Effektorfunktion spielen die ubiquitären Transkriptionsfaktoren NF-AT und NF- κ B. Diese regulieren über die Induktion der Transkription von verschiedenen Genen die Antwort der Zelle auf die Reize ihrer Umgebung im Allgemeinen und auf immunologische Reize im Besonderen. Die Verknüpfung von Rezeptoren und den Transduktionsmolekülen ist dargestellt in Bild 1.

1.5.1: Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen - NF-AT

NF-AT (nuclear factor of activated T-cells) gehört zu einer Familie ubiquitärer Transkriptionsfaktoren. Erstmals wurde NFAT in T-Zellen beschrieben [71] und ist mittlerweile in 6 verschiedenen Isoformen (NF-AT-1-5, NF-AT-x) bekannt [34], die sich jeweils in der DNA-bindenden Domäne (DBD) [36] und in der N-terminal gelegenen Homologie-Region (NHR) [54] gleichen und sich dadurch als NF-AT-Protein auszeichnen. Neben der wichtigen Rolle von NF-AT-Proteinen im Immunsystem werden speziell für NF-AT-5 primär Aufgaben außerhalb des Immunsystems postuliert, so zum Beispiel in der Embryogenese, der neuronalen Differenzierung oder der Regulation fetomaternaler Toleranz („oulying member“) [76]. So lassen sich NF-AT-Moleküle neben ihrem Auftreten in Immunzellen auch im Thymus, in der Milz, dem Bulbus olfaktorius [33], dem Uterus und in Endothelzellen [17] nachweisen.

Das Rezeptorsignal wird über verschiedene Phosphatasen und Phosphokinasen wie die Tyrosinkinasen Syk und ZAP 70 sowie verschiedene MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase, mitogen activated protein kinase) zur Phospholipase C übertragen, die durch Spaltung von Inositoltriphosphat (IP₃) zu Diacylglycerol (DAG) und Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP₂) zu einer Freisetzung der intrazellulären Kalziumspeicher im glatten endoplasmatischen Retikulum sowie einem Kalziumeinstrom aus dem extrazellulären Raum führt [20, 38]. Das Kalzium führt über eine Bindung und konsekutiver Aktivierung von Calzineurin zu einer Aktivierung von Calmodulin. Dieses bindet inaktiv im Cytoplasma vorliegendes NF-AT an der NF-AT-Homologie-Region (NHR), eine etwa 400 Aminosäuren lange, am N-terminalen Ende des Proteins gelegene Sequenz, und führt dadurch zu einer Abspaltung von Phosphatresten [20]. Das dephosphorylierte und dadurch aktivierte NF-AT kann so die Kernporen passieren, gesteuert durch ein nukleäres Importsignal [75] und durch Erhöhung seiner DNA-Bindungs-Affinität an die Promotoren von Regulatorgenen binden – meist im Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren wie Oct und AP-1 - und somit die Genexpression beeinflussen [72].

Ein bekanntes Ziel aktivierter NF-AT-Proteine ist das Antigen-Rezeptor-response-Element 2 (ARRE-2) in der Promotorregion des IL-2-Gens [40]. Weitere bisher bekannte Ziele aktivierter NF-AT-Proteine sind die Promotoren der Gene von IFN- γ , TNF- α , IL-3, IL-4 und GM-CSF [13,17, 56]. Auch der Fas-Ligand wird durch NF-AT reguliert [45].

1.5.2: Nukleärer Faktor κ B - NF- κ B

NF- κ B, erstmals beschrieben im Jahre 1986 [69], ist ein ubiquitär vorkommendes Homo- und Heterodimer, das ebenfalls in inaktivem Zustand – gebunden an die inhibitorische Untereinheit I κ B - im Zytoplasma ruhender NK-Zellen vorliegt. Seinen Namen trägt NF- κ B aufgrund der Tatsache, daß dieser Faktor das Gen der κ -Leichtkette in murinen Prä-B-Zellen aktiviert. Bestandteile menschlicher NF- κ B-Proteine sind RelA, RelB, c-Rel, p50, p52 und p65. Hemmende Untereinheiten sind in drei verschiedenen Splice-Varianten bekannt (I κ B α , β und γ).

Im Falle einer Aktivierung wird durch verschiedene Phosphokinasen - in diesem Zusammenhang sind vor allem MAPK und MEKK-1 (MAPK/ERK kinase kinase 1) beschrieben - I κ B phosphoryliert, das sich im phosphorylierten Zustand vom NF- κ B-Molekül abspaltet und proteolytisch degradiert wird [40]. NF- κ B wird durch diesen Vorgang aktiviert und erlangt wie aktiviertes NF-AT die Fähigkeit, mit Hilfe von nukleären Importsignalen durch die Kernporen in den Zellkern zu gelangen und durch Bindung an Promotor-DNA die Genexpression zu beeinflussen.

Durch NF- κ B beeinflusste Gene sind vor allem proapoptotische Gene und solche Gene, die für Cytokine und Interleukine codieren [73]. Insgesamt hat NF- κ B neben proapoptotischen auch anti-apoptotische und anti-inflammatorische Eigenschaften und besitzt somit eine weite Bandbreite an Funktionen [5, 37, 55].

1.6: Zielsetzung

Bei den Untersuchungen für die vorliegende Arbeit sollte der Ablauf der Signaltransduktions-Kette in NK-Zellen während der natürlichen Zytotoxizität, die auf das Rezeptorsignal folgen und die die Reaktion der NK-Zelle auf Stimulierung steuern, näher charakterisiert werden. Ausgangspunkt waren die unterschiedlichen morphologischen, funktionellen und zellbiologischen Eigenschaften von NK-Zellen und T-Zellen bei gleicher Fähigkeit zur zytotoxischen Aktivität und gleicher lymphozytärer Herkunft.

Die bisher beschriebenen Unterschiede auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren sollten nachvollzogen, die Beteiligung der Faktoren NF-AT und NF- κ B bei der Aktivierung von NK-Zellen nachgewiesen und die funktionellen Besonderheiten von NK-Zellen mit den intrazellulären Vorgängen korreliert und erklärt werden. Im Besonderen sollten die im

Einleitung

Rahmen der natürlichen Zytotoxizität in NK-Zellen aktivierten Transduktionsfaktoren im Hinblick auf ihre Identität, die Kinetik ihrer Aktivierung und ihre zur Lyse der Zielzellen führenden Eigenschaften untersucht und die Ergebnisse mit den Effektorfunktionen der NK-Zellen korreliert werden.

Ein weiteres Ziel war die Untersuchung der NK-Zell-Aktivität auf der Ebene der Genexpression unter Einsatz von Genchips (Gene-Arrays). Der experimentellen Stimulierung diente die Inkubation mit IL-2, dessen aktivierenden Funktionen im Immunsystem und speziell auf Lymphozyten bekannt sind. Zur besseren Simulation an die *in vivo* vorliegenden Bedingungen wurde die Stimulierung weiterhin mit Tumorzell-Linien induziert.

Material

2. Material

2.1: Geräte

Analysenwaage 2002MPI (Sartorius, Göttingen)

CO₂-Inkubator water-jacketed 3029 (Forma Scientific, Labotec, Göttingen)

Dampf-Groß-Sterilisator Hydromat E 14 (Webeco, Bad Schwartau)

Digitaler Auto-Radiograph (EG & G Berthold, Bad Wildbad)

Dot Blotter SRC 96 D Minifold I (Schleicher & Schuell, Dassel)

Durchflußcytometer Epics-Profile II (Coulter Electronics, Krefeld)

Elektrophorese Stromzufuhr EPS 3500 XL (Pharmacia LKB, Freiburg)

ELISA-Reader (Anthos Labtec Instruments, Salzburg/Österreich)

ELISA-Reader ThermoMax microplate reader (Molecular Devices, MWG Biotech, München)

ELISA-Waschgerät (Biotest, Dreieich)

Filmentwickler Crontex TSA (DuPont, Bad Homburg)

Folieneinschweißgerät Polystar 100 GE (Ritsche + Herfurth, Hamburg)

Gefriertruhe Bio-Freezer (Forma-Scientific, Labotec)

Gelelektrophoresekammer Gelelectrophoresis Apparatus GNA-100 (Pharmacia LKB)

Gelelektrophoresekammer (Micro Bio Tec Brand, Gießen)

Gelelektrophoresekammer (Novex, San Diego, Californien, USA)

Geltrockner Aldo-Xer (Schütt, Göttingen)

Geltrockner SGD 2000 (Thermo Servant)

Heißluftsterilisator 2712 (Kottermann, Uetze-Hänigsen)

Hybridisationsofen (Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen)

Laborwaage 12116MP (Sartorius)

Laborwaage LC 6200S (Sartorius)

Netzgerät 3000/150 (Pharmacia LKB)

pH-Meter pHM83 Autocal (Radiometer, Kopenhagen/DK)

Material

Pipette Combi-Pipette Typ 3180 (Eppendorf, Hamburg)

Pipetten Multikanal, 5-50 ml / 50-300 ml (Titertek, ICN, Meckenheim)

Pipetten Vario-Mikroliterpipetten 0,5-10 ml, 10-100 ml, 100-1000 ml (Eppendorf)

Schüttler H S 250 basic (IKA Labortechnik, Staufen)

Spektralphotometer U-3000 (Hitachi, Bremen)

Spektralphotometer Ultrospec II UV/VIS (Pharmacia LKB)

Sterile Werkbank (Nuaire, Plymouth, MN/USA)

Strahlendetektor LB 122 β,γ -Detector (EG & G Berthold)

Strahlendetektor LB 1200 (EG & G Berthold)

Thermomixer 5436 (Eppendorf)

Vakuumkonzentrator Speed Vac Concentrator (Bachofer Laboratoriumsgeräte)

Vakuum-Pumpe Vacu Gene Pump (Pharmacia LKB)

Vakuum-Blotter Vacu Gene XL (Pharmacia LKB)

Vollblut-Zellzähler T-660 (Coulter Electronics)

Western Blot Kammer Multiphor II (Pharmacia Biotech)

Western Blot Kühlgerät Multi Temp III (Pharmacia Biotech)

Zentrifuge Kühlzentrifuge: Centrikon T324 (Kontron, Hamburg)

Zentrifuge Minifuge: Centrifuge 5415C (Eppendorf)

Zentrifuge Omnifuge 2.0.RS (Heraeus Christ, Osterode)

Zentrifuge Tischzentrifuge Sigma 2MK (Sigma Laborzentrifugen, Osterode)

Zentrifuge Zytozentrifuge Cytospin-2 (Shandon, Frankfurt)

2.2: Laborbedarf

Acrylamid-Fertiggele (6%, Novex)

Einmalspritzen, steril 2, 5 und 10 ml (Becton Dickinson, Heidelberg)

Einschweißfolie Hybridization Bags (Life Technologies, Berlin)

Filterpapier (Schleicher & Schuell)

Filmkassetten Hypercassettes Autoradiographie Cassettes (Amersham, Braunschweig)

Material

Frischhaltefolie (herkömmliche Haushaltsfrischhaltefolie)

Gel-Blotting Papier GB 002 (Schleicher & Schuell)

Gewebekulturflaschen, beschichtet, 50, 260 und 800 ml (Nunc, Roskilde/DK)

Gewebekulturplatten, 6- und 24-Loch-Platten (Falcon, Heidelberg)

Gewebekulturschalen 100x20 mm (Falcon)

Hybridisationszylinder (Anfertigung der Wissenschaftlichen Werkstätten der Universität Lübeck)

Kanülen 0,5x25 Nr. 18 (Becton Dickinson)

Kunststoffröhrchen, steril, mit Schraubverschluß, 15 und 50 ml (Sarstedt, Nürmbrecht)

Kunststoffröhrchen, steril, mit Verschlußkappe, 5 ml (Greiner, Nürtingen)

Latex-Einmalhandschuhe (Ansell, München)

Mikroliterspritze (Hamilton, Bonaduz/Schweiz)

Mikrotiterplatten, 96-Loch-Flach- und Rundboden (Falcon)

Mikrotiterplatten, 96-Loch-Flach- und Rundboden „MAXISORP“ (Nunc)

Mikrotiterplatten 96-Loch, Flachboden, fluoreszenzarm (Millipore, Eschborn)

Nylon-Blotting Membran Quiabrane Nylon Plus (Qiagen, Hilden)

Nylonwolle-Säule Uni-Sorb (Wak-Chemie, Bad Homburg)

Nylonwatte (Fenwal Labs. Illinois/USA)

Petrischalen für Gewebekulturen, 145 x 20 mm (Greiner)

Pipettenspitzen, 1-10 ml, kristall (Greiner)

Pipettenspitzen, 10-100 ml, gelb (Greiner)

Pipettenspitzen, 100-1000 ml, blau (Greiner)

Pipettenspitzen, Combitips steril, 2,5 ml / 5 ml / 12,5 ml (Eppendorf)

Pipettenspitzen, Comfortips, 10 ml / 200 ml (Eppendorf)

Pipettenspitzen, PPN Precision Tip, 10-250 ml (Linbro, Amsterdam/Niederlande)

Pipettenspitzen, Sterilfilter-Tips 0,5-10 ml (Biozym Diagnostik, Oldendorf)

Pipettenspitzen, Sterilfilter-Tips 10-100 ml (Biozym Diagnostik)

ProbeQuantG-50 Micro Columns (Pharmacia LKB)

Material

Reaktionsgefäße 1,5 ml (Sarstedt)

Reaktionsgefäße 2 ml (Eppendorf)

Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel 1,5 ml (Sarstedt)

Röntgenfilm Biomax MX Scientific Imaging Film (Kodak, Rochester/USA)

Röntgenfilm TMDG 1, P-MAT (Kodak)

RNA-Konzentrierungs-Filter Microcon YM-30 (Millipore, Bedford/USA)

Stangenpipetten, steril 5, 10 und 25 ml (Greiner)

Zellschaber 18 cm (Falcon)

Zellschaber 25 cm (Costar, Cambridge, Massachusetts, USA)

2.3: Zellkultur-Reagenzien, -Medien und -Zusätze

Fetales Kälberserum, FCS, Myoklone plus-Qualität (Life Technologies)

Ficoll-Trennlösung 1,077g/ml (Seromed Biochrom, Berlin)

Kulturmedium RPMI 1640 (Seromed Biochrom)

Serumfreies Medium (SFM, Ultradoma, BioWhittaker, Heidelberg)

L-Glutamin 200 mM (Seromed Biochrom)

Penicillin 10000 E/ml / Streptomycin 10000 µg/ml (Seromed Biochrom)

Phosphat Buffered Saline, PBS, ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (Life Technologies)

2.4: Reagenzien für molekularbiologischen Methoden

2.4.1: Enzyme

Oligonukleotidlabelling-Kit Ready To Go T4-Polynucleotid-Kinase für die *Bandshift*-Experimente (Pharmacia LKB)

Multiples Myeloma Reverse Transkriptase 50u/µl (Promega, Heidelberg)

Ribonuklease Inhibitor Rnasin 40u/µl (Promega)

2.4.2: Nukleotide und Nukleinsäuren

α-P³²-dCTP, 3000 Ci/mmol (Amersham)

Material

γ -P³²-ATP, 3000 Ci/mmol (Amersham)

γ -P³³-ATP, 3000 Ci/mmol (Amersham)

dATP Li-Salz 100mM (Roche, Mannheim)

dGTP Li-Salz 100mM (Roche)

dTTP Li-Salz 100mM (Roche)

dCTP Li-Salz 10mM (Perkin Elmer)

DTT, 0,1 M (Promega)

Heringsperma-DNA, sonifiziert (Pharmacia LKB)

diverse Oligonukleotide für die *Bandshift*-Versuche (siehe Tabelle 3, TIB Molbiol, Berlin; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)

2.4.3: Superantigene und Zell-Linien

Toxisches-Schock-Syndrom-Toxin 1 (TSST-1, LPS-frei, Serva, Heidelberg)

Jurkat Nuklearer Extrakt sc-2132 250 μ g/0,05ml (Santa Cruz Biotechnology)

Jurkat Nuklearer Extrakt Phorbolstimuliert sc-2133 250 μ g/0,05ml (Santa Cruz Biotechnology)

K562 Nuklearer Extrakt sc-2130 250 μ g/0,05ml (Santa Cruz Biotechnology)

K562 Nuklearer Extrakt Phorbolstimuliert sc-2131 250 μ g/0,05ml (Santa Cruz Biotechnology)

2.5: Immunologische Reagenzien

2.5.1: Supershift-Antikörper

anti-NFAT-c (C-20) sc-1789X (polyklonales Ziegen-IgG, 2 μ g/ml, Santa Cruz Biotechnology)

anti-NFAT-c2 sc-1151 x (polyklonales Ziegen-IgG, 2 μ g/ml, Santa Cruz Biotechnology)

anti-NFAT-3 sc-1153 x (polyklonales Ziegen-IgG, 2 μ g/ml, Santa Cruz Biotechnology)

anti-NFAT-4 sc-1154 x (polyklonales Ziegen-IgG, 2 μ g/ml, Santa Cruz Biotechnology)

anti-NFAT-5 sc-5501 x (polyklonales Ziegen-IgG, 2 μ g/ml, Santa Cruz Biotechnology)

Material

anti NFAT-x ssc-1152 x (polyklonales Ziegen-IgG, 2 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology)

anti-NFκB p50 sc114 x (polyklonales Kaninchen-IgG, 2 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology)

anti-NFκB p65 sc109 x (polyklonales Kaninchen-IgG, 2 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology)

anti-NFκB p52 sc848 x (polyklonales Kaninchen-IgG, 2 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology)

anti-cRel sc272 x (polyklonales Kaninchen-IgG, 2 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology)

2.5.2: Antikörper für Western blot / Dot blot

anti-CD 3-PE-konjugiert (Coulter Electronics)

anti-CD 14-PE-/CD 45-FITC-konjugiert (Coulter Electronics)

anti-IgG1-PE-/IgG1-FITC-konjugiert (Coulter Electronics)

anti-NFκB p65 sc-109X (polyklonales Hasen-IgG, 1 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology)

anti-NFκB p50 sc-114X (polyklonales Hasen-IgG, 1 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology)

anti-NFAT-c sc 1789 (polyklonales Ziegen-IgG, 2 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology)

anti-NFAT-p sc-1151 (polyklonales Ziegen-IgG, 2 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology)

anti-NFAT-3 sc-1153 (polyklonales Ziegen-IgG, 2 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology)

anti-NFAT-4 sc-1154 (polyklonales Ziegen-IgG, 2 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology)

anti-NFAT-5 sc-5501 (polyklonales Ziegen-IgG, 2 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology)

anti-NFAT-x sc-1152 (polyklonales Ziegen-IgG, 2 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology)

anti-Ziegen-IgG, sc-2771 (polyklonales Kaninchen IgG, AP-konjugiert Santa Cruz
Biotechnology)

anti-Kaninchen-IgG, sc-2007 (polyklonales Ziegen IgG, AP-konjugiert Santa Cruz
Biotechnology)

Human IgG Lot: 40566 (polyklonales menschliches IgG; Jackson Immuno Research, West
Grove, PA, USA)

anti-human IgG Lot: 39232 (Rinder-, Pferde-, Mäuse-IgG, AP-konjugiert, Jackson Immuno
Research)

Material

2.6: Testkits

Die Testkitbestandteile sind nicht im Einzelnen aufgeführt.

BandShift Kit (Pharmacia LKB)

ELISA für humanes TNF- α und IFN- γ (selbst herzustellen gemäß der Vorschrift von Herrn Dr. Galatti, Hoffmann La Roche, Basel/Schweiz)

ELISA human TNF-alpha (Bender MedSystems, Wien/Österreich)

ELISA human IFN-gamma (Bender MedSystems)

ELISA für humanes TNF- α (ultrasensitiv), IL-1 β , IL-2, IL-6 (Biermann, Bad Nauheim)

Gene Expression Array Pathfinder Human Apoptosis-5/TNF&FAS Network Kit,
GEA9912050 (Superarray, Frederick, MD, USA)

Gene Expression Array Pathfinder NF- κ B Pathway-2, GEA9912070 (Superarray)

Gene Expression Array Customer Array (Superarray)

NK-Zell-Isolierungskit (human NK cell Isolation Kit II) (Miltenyi, Bergisch Gladbach)

RNA-Isolierungskit RNeasy Mini Kit (Qiagen)

RNA-Isolierungskit Purescript (Gentra, Minneapolis/USA)

Protein-Bestimmungs-Kit Bio-Rad Protein Assay Dye Detergent Concentrate (Bio-Rad,
München)

2.7: Chemikalien und sonstige Reagenzien

Alle außer den nachfolgend aufgeführten Chemikalien wurden in Analysenqualität von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen:

Aqua ad injectabilia, 10 ml-Ampullen (Braun, Melsungen)

Acrylamid-Bisacrylamid (30 %) (Sigma, Deisenhofen)

Dodecylsulfat Na-Salz (Serva)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline DPBS (Bio Whittaker, Verviers/Belgien)

Entwickler D 19 (Kodak)

Material

Essigsäure 100% (Merck)

Färbelösung für Western blot Bio Rad Reagenz

Ficoll 400 (Serva)

Fixierer Unifix (Kodak)

Formaledhyddimethylacetal (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn)

Gel-Ladepuffer 10x Loading Dye (250 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,2 % Brom-phenol-blau, 0,2 % Xylenylol, 40 % Glycerin; Pharmacia LKB)

2 (β)-Mercapto-Ethanol (Sigma)

NP-40 (Nonidet P40 Protein Grade Detergent; Calbiochem, San Diego, Kalifornien, USA)

Pefablock SC Proteinaseinhibitor (Boehringer, Mannheim)

Phenol, flüssig (Fluka, Neu-Ulm)

Photoemulsion NTB-2 (Kodak)

Poly dI-dC*Poly dI*dC (Pharmacia LKB)

Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V (Boehringer)

Substrat für Alkalische Phosphatase BCIP / NBT Alkaline Phosphatase Substrate Kit IV

Tetramethylethyldiamin (TEMED, Bio-Rad)

3. Methoden

3.1: Zellpräparationen

3.1.1: PBMC

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) wurden gewonnen aus Buffy coats gesunder Blutspender. Beim Buffy coat handelt es sich um eine angereicherte Leukozytenfraktion, die bei der Präparation von Erythrozytenkonzentraten und Blutplasma aus Vollblut für Transfusionszwecke zurück bleibt. Aus dieser Leukozytenmischung können durch isopyknische Zentrifugation nach der Methode von Schober et al. die PBMC gewonnen werden [66]. Dazu wird eine Lösung mit bekannter, speziell für diesen Zweck geeigneter Dichte (Ficoll 1,077 g/ml) mit dem Buffy coat überschichtet; nach Zentrifugation kann aus der Interphase zwischen dem Trennmedium vermischt mit dem Serum und den abzentrifugierten Erythrozyten die PBMC „abgesaugt“ werden [53]. Nach mehreren Waschschrritten werden die PBMC mit Hilfe des Vollblut-Zellzähler T-660 in der gewünschten Konzentration eingestellt. Dabei wurde eine Zellausbeute im Bereich von durchschnittlich $10\text{-}15 \times 10^9$ erreicht.

3.1.2: Monozyten / T-Zellen

Monozyten und Makrophagen können aus den PBMC durch ihre Eigenschaft, an Plastikoberflächen anzuhaften, angereichert werden [82]. Dazu werden PBMC in Gewebekulturschalen inkubiert und nach 1-2 Stunden die am Boden anhaftenden Monozyten mit Hilfe eines Zellschabers nach Entfernung der übrigen Zellen durch Absaugen gesammelt. Mit dieser Methode kann auch durch negative Selektion eine Isolation von T-Zellen erfolgen, die nicht haften bleiben. Dabei wird nach einem Inkubationsschritt mit Gewebekulturschalen die nicht anhaftenden Zellen abgesaugt und die darin enthaltenen T- und B-Zellen mit verbleibenden Monozyten weiter aufgereinigt. Dies geschieht mit einer mit Nylon-Wolle gefüllten Säule (Wak[®]-Säule), in der B-Zellen haften bleiben, während T-Zellen ausgewaschen werden können werden [82].

3.1.3: NK-Zellen

Zur Isolierung von NK-Zellen standen zwei qualitativ gleichwertige Methoden zur Verfügung: Entweder erfolgte die Isolierung aus den wie unter 3.1.1 beschrieben

Methoden

aufgereinigten PMBC, die zu etwa 10 % aus NK-Zellen bestehen. Alternativ standen durch Apherese gewonnene NK-Zellen zur Verfügung, die aus PBMC von gesunden Spendern isoliert wurden. Die Untersuchung der NK-Zellen aus letztgenannter Quelle war dabei von besonderem klinischen Interesse, da diese Zellen im Rahmen des therapeutischen Heilversuches bei Tumorpatienten eingesetzt wurden [52].

Zur Isolierung von NK-Zellen diente das NK-Zell-Isolierungs-Kit der Firma Miltenyi-Biotec, das nach dem MACS-Prinzip (Magnetism activated Cell Sorter) arbeitet. Dabei wird ein Cocktail von spezifischen Antikörpern gegen die Oberflächenmerkmale CD3, CD4, CD14, CD15, CD19, CD36, CD123 sowie Glycophorin A zu der Probe gegeben, die Biotin am Fc-Teil des Moleküls tragen. Die „Nicht-NK-Zellen“, vor allem T- und B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Granulozyten und Erythrozyten werden dabei von den Antikörpern gebunden. In einem zweiten Schritt werden mit einem magnetisch aktiven Zweitantikörper mit Spezifität auf Biotin (Micro-Beads) die antikörpergebundenen Zellen wiederum gebunden und werden damit magnetisch detektierbar. In einer Säule im Magnetfeld bleiben so die magnetisch markierten Zellen haften, der Durchfluss (das so genannte Eluat) enthält die gesuchten, nicht antikörpergebundenen Zellen (Prinzip der negativen Selektion). Durch die Präparation von NK-Zellen ohne Antikörperbindung können Artefakte und Prä-Aktivierung vermieden werden. (Testung über CD62, siehe 3.1.5). Genauere Angaben der Isolierungsprozedur kann den Instruktionen des Herstellers entnommen werden (Miltenyi, human NK Cell Isolation Kit II).

Die auf diese Weise gewonnenen NK-Zellen wurden durchflußzytometrisch anhand der Expression des CD56-Oberflächenmerkmals und CD16-Rezeptors charakterisiert (siehe 3.1.3). Dabei konnte eine mittlere Reinheit von > 95% CD56-positiver Zellen erzielt werden (durchflußzytometrische Kontrolle).

3.1.4: Zielzellen

Als Zielzelle für die Untersuchung der natürlichen Zytotoxizität unter *in vivo*-nahen Bedingungen diente die für diese Zwecke üblicherweise verwendete humane erythrozytäre Leukämie-Zell-Linie K562 [49]. Diese wurde in Stammkulturen in Zellkulturflaschen in Konzentrationen von 2×10^5 Zellen/ml kultiviert und zweimal wöchentlich nach mikroskopischer Kontrolle sedimentiert, gezählt, auf die entsprechenden Zellkonzentrationen eingestellt und in frisches Medium umgesetzt.

3.1.5: Durchflußzytometrie

Mittels der Durchflußzytometrie (FACS, fluorescence activated cell sorter) kann spezifisch und sensitiv die Ausprägung zellulärer Oberflächenrezeptoren untersucht werden. Die Zellen werden dazu mit monoklonalen, zuvor z. B. mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) als Farbstoff markierten Antikörpern gegen die zu untersuchenden Moleküle inkubiert. Im Durchflußzytometer kann dann der Anteil rezeptorpositiver Zellen in einer Probe anhand der von den Farbstoffen ausgesendeten Fluoreszenzlichtimpulsen ermittelt werden. Als Kontrolle dienen Antikörper gleichen Isotyps ohne ein spezifisches Antigenepitop.

Die Durchflußzytometer-Technik wurde im Rahmen dieser Arbeit u. a. zur Kontrolle der Oberflächenmarker-Eigenschaften der NK-Zellen eingesetzt. Dabei wurde die Reinheit der mit der MACS-Prozedur isolierten Zellen bestimmt sowie mittels einer Bestimmung des CD62L eine Präaktivierung der NK-Zellen durch die Isolierungsprozedur ausgeschlossen.

3.2: Zellkulturverfahren

3.2.1: Stimulierung

Die Zellen wurden inkubiert in einer Konzentration von 3×10^6 Zellen/ml für die Protein- und RNA-Ansätze bzw. $5 - 10 \times 10^6$ für die Band-Shift-Ansätze in sterilen, pyrogenfreien Kulturplatten bzw. Kulturschalen. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 Medium der Firma Bio Whittaker unter Zusatz von 10 % hitze-inaktiviertem fötalen Kälberserums (fetal calf serum, FCS), 1 % Penicillin (10.000 U/ml), 1 % Streptomycin (10.000 U/ml) sowie 1% L-Glutamin (200mM) verwendet.

Der Stimulierung dienten IL-2-Zugaben mit einer Konzentration von 100 IU pro 10^6 Zellen bzw. TSST-1 (250 ng/ 10^6 Zellen). Bei Inkubation der NK-Zellen mit Zielzellen verwendeten wir Tumorzelllinien der K562-Reihe in einem Effektor-Target-Verhältnis von 10:1 ($1,5 \times 10^7$ NK-Zellen und $1,5 \times 10^6$ Zielzellen in 5 ml Medium) [51].

3.3: Kernextrakte

Die Technik der Präparation von Kernextrakten basiert prinzipiell auf einer Lyse der Zellkerne, bei der die Proteine des Zellkerns mitsamt der Transkriptionsfaktoren freigesetzt und von den übrigen zellulären Bestandteilen getrennt werden. Wir gingen prinzipiell nach der Methode von Trede vor, die wir auf unsere Bedingungen adaptiert

Methoden

und modifiziert haben [51] und die im Folgenden kurz beschrieben wird [78]. Die Zellen wurden nach Stimulierung geerntet und gewaschen. Anschließend wurden in einem ersten Schritt die Zellmembranen lysiert und mit dem Zytosol entfernt. Die übrig bleibenden Zellkerne wurden in einem zweiten Schritt lysiert und das Karyoplasma freigesetzt. DNA sowie die Trümmer der Kernmembranen werden durch Ultrazentrifugation entfernt (Sediment, Pellet), wobei die im Überstand befindlichen Kernextrakte mit den darin enthaltenen Kernproteinen inklusive den Transkriptionsfaktoren gewonnen werden können. Dabei wurden 50 µl Kernextrakt mit einer Protein-Konzentration von 4-10 µg/µl erreicht und in Aliquots von 10 µl bei -80°C tiefgefroren.

Die Protein-Konzentration der Kernextrakte wurde mit Hilfe des „Bio-Rad-Protein-Bestimmungs-Kits“ und des „Hitachi-U-3000-Photometers“ gemäß der Testanleitung des Herstellers durchgeführt.

3.4: Überstände

Die Überstände der Stimulierungsexperimente enthielten die von den Immunzellen während der Stimulierung produzierten Zytokine und wurden zu deren Messung mittels ELISA gewonnen und bei 80°C unter Null tiefgefroren.

3.5: RNA-Extraktion

Als Voraussetzung für das Arbeiten mit RNA müssen alle Materialien und Lösungen frei von RNAsen sein. Dazu müssen erstere autoklaviert und acht Stunden bei 160°C sterilisiert sowie letztere mit 0,02 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt werden, das zu einer unspezifischen Alkylierung etwaiger RNAsen führt. Ferner sind sämtliche Arbeiten mit Einmal-Latex-Handschuhen durchzuführen, um eine nachträgliche Kontamination mit RNAsen zu vermeiden. Die RNA-Isolierung wurde entsprechend der Arbeitsvorschrift des Testherstellers mit Hilfe des RNA-Isolierungs-Kits von Qiagen durchgeführt.

Durch spektralphotometrische Messung der optischen Dichte lässt sich sowohl die Menge als auch die Reinheit der zuvor isolierten RNA quantifizieren. Nukleinsäuren weisen aufgrund ihrer chemischen Struktur bei einer Wellenlänge von 260 nm ein Maximum ihrer Lichtabsorption auf; das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm. Die

Methoden

absolute Extinktion der Lösung in einer Quarzküvette gegen Wasser bei 260 nm ist dabei gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz linear vom RNA-Gehalt abhängig, während über den Quotienten beider Extinktionswerte (260 nm/280 nm) die Kontamination der Probe mit Proteinen beurteilt werden kann. Der Quotient sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen. Das Absorptionsmaximum sollte 260 nm betragen und die Probe frei von Verunreinigungen sein.

Die Proben wurden entweder sofort für die Gen-Expressions-Analyse eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

3.6: Band shift-Experimente

Mit Hilfe der Band shifts sollten Aussagen über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und NF-AT generiert werden. Diese beiden ubiquitären, innerhalb von Minuten aktivierbaren Proteine sind maßgeblich an der Aktivierung der verschiedenen Zytokin-Gene beteiligt und tragen zur Entstehung der Zytotoxizität entscheidend bei.

Band shift-Experimente (Gelshift, Electrophoretic mobility shift assay [EMSA]) weisen insbesondere Wechselwirkungen von Nukleinsäuren mit Proteinen nach. Dabei werden die *in vivo* vorliegenden Verhältnisse dadurch simuliert, dass Transkriptionsfaktoren aus dem Kern von stimulierten Zellen isoliert und diese dann mit *in vitro* synthetisierten, radioaktiv markierten Promotor-Abschnitten der Gene inkubiert werden, an die die Transkriptionsfaktoren *in vivo* binden (so genannte Transkriptionsfaktor-Binderegionen oder - wie im Folgenden bezeichnet - *Binding sites*). Diese Bildung eines Komplexes aus Transkriptionsfaktor und Oligonukleotid kann aufgrund der dadurch entstehenden höhermolekularen Verbindungen mit nativer Acrylamid-Elektrophorese durch Trennung des Komplexes vom übrigen Reaktionsgemisch autoradiographisch sichtbar gemacht werden. Die dabei entstehenden Banden entsprechen diesen Komplexen; die Stärke der Banden steht daher im direkten Zusammenhang mit der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren bzw. mit der Genaktivierung durch die Transkriptionsfaktoren.

Eine normale autoradiographische Auswertung ermöglicht allenfalls semiquantitative Aussagen über das Ausmaß der Transkriptionsfaktor-Aktivierung, vergleichbar zur herkömmlichen RT-PCR. Exakte und objektivierbare quantitative Aussagen sind nur mit Hilfe eines Instruments zur Bestimmung von Position, Intensität und Verteilung ionisierender Strahlung möglich. Dazu dient ein „Phosphoimager“ oder

Methoden

„Digitaler Autoradiograph“ (DAR), der die emittierten β -Strahlen (Elektronen) an einem Gitternetz aus Goldfäden detektiert und verstärkt. Die dabei entstehenden Impulse können mit Hilfe eines speziellen Rechenprogramms (WINDAR) nach Intensität und Ausmaß graphisch dargestellt werden.

3.6.1: 5'-³²P-Oligonukleotidlabeling

Folgende „Transkriptionsfaktor-Promotor-Binderegionen“ (Oligonukleotide) der verschiedenen Zytokin-Gene wurden für die Band-Shift-Experimente verwendet:

Tabelle 3: Oligonukleotide für EMSA

Oligonukleotid	Basensequenz (5' - XXX -3')	Zytokinen, auf dessen Promotor die Binderegion sitzt
κ B1 S	GAT CCT GGG ACA GCC CAG	NF- κ B1/TNF- α -Promotor (-589 - -576)
κ B1 AS	CTG GGC TGT CCC AGG ATC	
κ B2 S	GAT CCG GGG TAT CCT G	NF- κ B2/TNF- α -Promotor (-212 - -202)
κ B2 AS	CAG GAT ACC CCG GAT C	
κ B3 S	GAT CCT GGG TTT CTC CG	NF- κ B3/TNF- α -Promotor (-99 - -89)
κ B3 AS	CGG AGA AAC CCA GGA TC	
κ BC S	GAT CCT CAG <u>AGG GGA CTT TCC</u> GAT G	NF- κ B-Consensus-Sequenz/ TNF- α -Promotor
κ BC AS	CAT CGG <u>AAA GTC CCC TCT GAG</u> GAT C	
κ BM S a	GAT CCT CAG <u>AGG CGA CTT TCC</u> GAT G	NF- κ B-Consensus-Sequenz (Mutante a/TNF- α -Promotor)
κ BM AS a	CAT CGG <u>AAA GTC CCC TCT GAG</u> GAT C	
κ BM S b	AGT TGA <u>GGC GAC TTT CCC AGG C</u>	NF- κ B-Consensus-Sequenz (Mutante b (Santa Cruz))/TNF- α -Promotor
κ BM AS b	GCC TGG <u>GAA AGT CGC CTC AAC T</u>	

Methoden

Tabelle 3 (Fortsetzung): Oligonukleotide bei EMSA

Oligonukleotid	Basensequenz (5' - XXX -3')	Zytokinen, auf dessen Promotor die Binderegion sitzt
ATP 1 S	AGG ACC CAA GGA GTC <u>TAA AGG</u> <u>AAA</u> CTC TAA CTA CAA CAC	NF-AT-P1/IFN- γ -Promotor (-168 - -158)
ATP 1 AS	GTG TTG TAG TTA GAG <u>TTT CCT TTA</u> GAC TCC TTG GGT CCT	
ATP 2 S	GAT CTA <u>AAA TTT CCA</u> <u>GTC</u> CTT GA	NF-AT-P2/IFN- γ -Promotor (-276 - -266)
ATP 2 AS	TCA AGG <u>ACT GGA AAT TTT</u> AGA TC	
ATP 3 S	TAG ATC TAG <u>AAT TTC GTT</u> TTT CAC TTG	NF-AT-P3/IFN- γ -Promotor (-378 - -369)
ATP 3 AS	CAA GTG AAA <u>AAC GAA ATT</u> CTA GAT CTA	
ATM 2 S	GGG AGG TAC AAA ATC GAC GCC AGT CCT TGA ATG GTG TGA A	NF-AT-P2 (Mutante)/ IFN- γ -Promotor
ATM 2 AS	TTC ACA CCA TTC AAG GAC TGG CGT CGA TTT TGT ACC TCC C	
AT IL2 S	GAT CGG AGG AAA AAC TGT TTC ATA CAG AAG GCG T	NF-AT/IL-2-Promotor
AT IL2 AS	ACG CCT TCT GTA TGA AAC AGT TTT TCC TCC GAT C	
AT IL4 S	GAT CTG TGA CTG ACA ATC TGG TGT AAC GAA AAT TTC CAA TGT A	NF-AT/IL-4-Promotor
AT IL4 AS	TAC ATT GGA AAT TTT CGT TAC ACC AGA TTG TCA GTC ACA GAT C	
Oct-1 S	... TCC ATG CAA ATG GAT ...	Oct-1-Kontroll-Oligonukleotid („unrelated“ DNA, Pharmacia)
Oct-1 AS	... ATC CAT TTG CAT GGA ...	
EBNA-1 S	... TAG CAT ATG CTA ...	EBNA-1-Kontroll-Oligonukleotid (Positiv-Kontrolle, Pharmacia)
EBNA-1 AS	... TAG CAT ATG CTA ...	

Erläuterungen: S: Sense; AS: Antisense; a/b: unterschiedliche Mutanten, die Mutationen sind durch Fettdruck, die Bindemotive der Consensussequenz von NF κ B sowie die Haupt-Bindemotive von NFAT an den IFN- γ -Promotor sind durch Unterstreichung kenntlich gemacht; Referenzen: für NF- κ B/TNF- α : [77]; für NF-AT(IFN- γ): [13].

Methoden

Das 5'-Endlabeling mit radioaktivem Phosphor (^{32}P , γ -ATP, Amersham) diente der Detektierbarkeit der Oligonukleotide im Band shift-Experiment. Dazu wurden die einzelsträngigen Oligonukleotide zunächst mit Hilfe des Polynukleotidkinasekits der Firma Pharmacia nach deren Anleitung radioaktiv markiert und anschließend Doppelstränge hergestellt, um der *in vivo*-Situation möglichst vergleichbare Bedingungen zu schaffen.

3.6.2: Bindereaktion und elektrophoretische Trennung

Im Band shift-Experiment werden 1-10 μg Kernproteine zusammen mit 2 μl radioaktiv markierter doppelsträngiger DNA (ds-Oligo) eingesetzt. Während der Bindereaktion kommt es zur Bindung der Transkriptionsfaktoren aus dem Kernextrakt an den ^{32}P -markierten DNA-Abschnitt aus der Promotorregion des nachzuweisenden Gens. Dieses Reaktionsgemisch wird für ein bis zwei Stunden elektrophoretisch bei einer Spannung in Höhe von 200 V und bei einer Stromstärke von ca. 35 mA getrennt mit Hilfe eines nativen Polyacrylamid-Geles. Dabei laufen die ungebundenen Kernproteine und ungebundenen Oligonukleotide wesentlich schneller im elektrischen Feld als die Komplexe aus Transkriptionsfaktor und gebundenem Oligonukleotid. Letztere lassen sich als radioaktiv detektierbare Bande sichtbar machen, während die ungebundenen Oligonukleotide als „freie Radioaktivität“ am unteren Rand des Gels auftauchen. Dabei werden die für das menschliche Auge unsichtbare Radioaktivität während des Laufvorganges durch die Farbstoffe Bromphenolblau (Lauffront, auf Höhe der „freien Radioaktivität“) und Xylenxylol (etwa auf Höhe des Oligo-Transkriptionsfaktor-Komplexes) visualisierbar.

3.6.3: Trocknung der Gele, Detektion der Radioaktivität

Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Gele auf Filterpapier aufgebracht und im Geltdrockner bei 80 $^{\circ}\text{C}$ getrocknet. Die Auswertung erfolgte analog durch das Aufbringen eines Filmes in einer Filmkassette für 48-72 h bei -80°C sowie digital-autoradiographisch durch den Digitalen Autoradiographen [51].

Als „Positiv-Kontrolle“ wurden entsprechende Experimente mit EBNA-1-DNA (EBNA-1 = Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen-1) und EBNA-1-Extrakt (kloniert) durchgeführt, die erfolgreich verliefen.

Die Spezifität der Bindung wurde kontrolliert mit Hilfe eines Überschusses von radioaktiv nicht markierten („kalten“) Oligonukleotiden (der Shift wird „unsichtbar“)

Methoden

bzw. mutierten Oligonukleotiden, die zusammen mit den unmutierten, gelabelten Oligonukleotiden mit den Kernextrakten inkubiert wurden. Dabei lässt sich die Menge an Überschuss mutierten Oligonukleotids titrieren, die zur Verdrängung der unmutierten DNA und damit einer Abschwächung des radioaktiven Signals im EMSA notwendig ist. Bei einer spezifischen Bindung des Transkriptionsfaktors an seinen Promotor ist eine hohe Konzentration/Überschuss (ca. 50-fach) an mutierten Promotor notwendig, um die Bindung überhaupt in einem geringen Maße beeinflussen zu können. (siehe 4.4)

3.6.4: Super shift

Zum eindeutigen Nachweis des mutmaßlich identifizierten Transkriptionsfaktors wird ein Antikörper gegen diesen mit in den Bindungsansatz (siehe 4.4) gegeben. Dieser Antikörper ist für diese Zwecke entwickelt, da er die spezielle Kombination aus dem Transkriptionsfaktor und einem Oligonukleotid, der eine besondere dreidimensionale Struktur besitzt, erkennen können muss.

Im Autoradiogramm erhält man bei positivem Reaktionsverlauf zusätzlich zur geshifteten eine weitere Bande, die durch den trimolekularen Komplex aus Ziel-Oligonukleotid, Transkriptionsfaktor und Antikörper hervorgerufen wird. Dabei entspricht idealerweise die Intensität der beiden oberen Banden der Intensität der geshifteten Bande im Versuchsansatz ohne Antikörper-Zusatz. Üblicherweise wird der Antikörper in einem molaren Verhältnis von ca. 1:10 zum Transkriptionsfaktor eingesetzt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden dem Bindeansatz Antikörper in einer Konzentration von 0,1 µg/ml gegen die Transkriptionsfaktoren NF-κB und NF-AT hinzugesetzt

3.7: Western blot (Immunoblotting)

Im Western Blot lassen sich mit spezifischen Antikörpern Proteine nachweisen. Dazu werden Kernextrakte mit Transkriptionsfaktoren gelelektrophoretisch nach Gewicht und Ladung getrennt, auf eine Membran aufgebracht und diese nacheinander mit einer Antikörperlösung gegen das gesuchte Protein, im zweiten Schritt mit einem gegen den ersten Antikörper gerichteten enzymgebundenen Zweit-Antikörper (typischerweise Alkalische Phosphatase-konjugiert) inkubiert. Dabei findet eine Bindung des ersten Antikörpers (Primary) an das gesuchte Protein statt, anschließend eine Bindung des zweiten Antikörpers (Secondary) an den ersten. Dem zweiten Antikörper kann dann

Methoden

durch Zugabe einer Lösung Substrat für die Alkalische Phosphatase (BCIP / NBT Alkaline Phosphatase Substrate Kit IV) „angeboten“ werden, was zu einem farbigen Produkt verarbeitet wird und dadurch den Komplex und die Anwesenheit des gesuchten Proteins durch violette Markierungen auf der Membran nachweist.

Wir verwendeten 12-prozentige Acrylamid-Fertiggele (Novex, San Diego, Californien, USA) und Nylon-Blotting-Membran (Quiabrane Nylon Plus, Qiagen, Hilden) sowie kommerziell erhältliche Antikörper (Santa Cruz, siehe 2.5.2). Zur Feststellung der idealen Antikörperkonzentrationen stellten wir Verdünnungsreihen der ersten und zweiten Antikörper her und ermittelten so ein ideales Antikörpergemisch von 0,1 µg/ml in einer Lösung aus 10 % BSA für den ersten Antikörper und 1 µg/ml BSA-Lösung für den zweiten Antikörper. Die Inkubationen mit den Antikörpern fanden für jeweils 2 Stunden bei Raumtemperatur statt wurde optimiert zwischen 1 und 24 h und bei verschiedenen Temperaturen. Wir verwendeten erste Antikörper vom Hase oder Ziege, die Zweitantikörper waren dementsprechend gegen Antikörper dieser Tiere gerichtet. Positive Kontrollen mit rekombinant hergestelltem, käuflichem Protein (NF-κB p52, c-Rel) und käuflich erwerbbaaren Kernextrakten der T-Zell-Linie Jurkat führten zu dem erwarteten Nachweis durch den entsprechenden Antikörper. Zur negativen Kontrolle setzten wir proteinfreie Lösungen auf der Membran ein; weiterhin inkubierten wir versuchsweise ohne ersten oder zweiten Antikörper und setzten rekombinante Proteine mit nicht darauf spezifische Antikörper ein (NF-κB p52 mit Antikörper gegen NF-κB p65). Alle dieser negativen Kontrollen führten zu keiner Markierung und bewiesen somit die Spezifität der Nachweise.

3.8: Dot blot

Dem Prinzip des Western blot entsprechend werden beim Dot blotting Proteine mit erstem und zweitem Antikörper auf Membranen nachgewiesen. Im Unterschied zum Western blot werden beim Dot blot die zu untersuchenden Proteingemische nicht elektrophoretisch aufgetrennt, sondern direkt auf einer punktförmigen Fläche (Dot) durch Unterdruck auf Membranen aufgebracht. Dadurch entfällt die zeitaufwendige Gelelektrophorese und der Umgang mit den giftigen Acrylamidgelen. Die beim Dot blot zum Einsatz gelangten Antikörper sind identisch mit denen der beim Western blot benutzten Antikörper. Auch die Antikörperkonzentrationen entsprechen bei unseren Versuchen denen der Western blot-Experimente; die Färbung erfolgte somit ebenfalls

Methoden

durch Substratzugabe für die Alkalische Phosphatase. Diese Technik ist nur dann sinnvollerweise einsetzbar, wenn bekannt ist, dass sich die nachzuweisenden Proteine im Proteingemisch befinden.

3.9: Combi blot

Mit Hilfe des Super shiftes gelang uns kein exakter Nachweis der Beteiligung von NF-AT- und NF- κ B-Transkriptionsfaktoren bei der Aktivierung von NK-Zellen im Band shift. Die für den Super shift verwendbaren käuflichen Antikörper basieren auf der Bindung der dreidimensionalen Strukturen ihrer Antigene, das heißt dem Komplex aus Protein und daran gebundenen Oligonukleotid. Die Bindung findet somit ausschließlich an bestimmte Splice-Varianten/Isoformen statt. Die kommerziellen Antikörper für den Supershift erkennen die typischen Proteine oder ein Gemisch von verschiedenen Splice-Varianten des Epitopes, in diesem Fall die NF-AT-Proteine aus typischen T-Zellen. Da kein Supershift mit diesen Supershiftantikörpern gelang und auch andere Shifthöhen nicht durch diese Antikörper induzierbar waren, liegt der Verdacht nahe, dass es sich bei den NF-AT aus NK-Zellen um andere Splice-Varianten oder Isoformen als in T-Zellen handelt.

Daher war eine alternative Methode notwendig, die im Band shift für die geshifteten Banden verantwortlichen Proteine als die gesuchten nukleären Faktoren eindeutig zu identifizieren. Wir entwickelten eine Methode, die die Band-Shift-Experimente und den klassischen Western blot kombiniert („Combi blot“), der im folgenden Abschnitt beschrieben ist.

Im unmittelbaren Anschluss an einen wie unter 3.6 beschrieben durchgeführten Band shift exponierten wir das Gel für eine Stunde bei 4°C im nicht getrockneten Zustand einem Röntgenfilm. Das zeitliche Limit ist notwendig, um eine Diffusion der Proteine im Gel zu verhindern. Im Anschluss an die Filmentwicklung wurden die Proteine des Gels auf Blotting-Papier durch elektrische Spannung übertragen (geblottet); anschließend wurde die Blotting Membrane wie beim klassischen Western Blot mit erstem und zweitem Antikörper inkubiert und mit Substrat entwickelt. Die dabei auf der Blotting Membran entstehenden Markierungen als spezifischer Nachweis des gesuchten Transkriptionsfaktors können in der Lokalisation (der Höhe) den im Röntgenfilm sichtbaren Banden des Band shift-Experimentes abgeglichen bzw. zugeordnet werden. Dadurch gelingt ein zweifelsfreier Nachweis der Beteiligung eines Transkriptionsfaktors

Methoden

am Aktivierungsprozess, die Aktivierung von NF-AT und NF- κ B kann somit direkt bewiesen werden. Weiterhin ist mit dieser Methode eine Aussage möglich, welche Proteine an den verschiedenen Banden im Band Shift beteiligt sind.

Die von Demczuk unter dem Namen Shift-Western blotting publizierte Methode zielt ebenfalls auf die Detektion von DNA-Komplexen mit Hilfe von Antikörpern. Dabei werden die Protein-DNA-Komplexe auf Acrylamidgelen elektrophoretisch getrennt und die Proteine auf einer Nitrozellulosemembran aufgebracht, während die DNA-Komplexe auf einer Anionen-Austauscher-Membran gebunden werden und damit autoradiographisch nachweisbar sind. Diese Methode ist jedoch deutlich länger im experimentellen Aufbau als der Combi-Blot. Weiterhin ist mit dieser Methode kein exakter Vergleich zwischen den Bandenhöhen in EMSA und Western blot möglich [22].

3.10: ELISA

Zur Messung der Zytokinkonzentration im Kulturüberstand diente die ELISA (*enzyme-linked immuno sorbent assay*)-Technik. Das zu untersuchende Zytokin/Mediatorprotein (allgemein Protein) bindet dabei im Rahmen einer Antigen-Antikörperreaktion an einen monoklonalen Primärantikörper (erster Antikörper), mit dem eine Mikrotiterplatte zuvor beschichtet wurde. Darauf erfolgt die Zugabe eines zumeist biotinierten Sekundärantikörpers (zweiter Antikörper), der gegen ein weiteres Epitop des zu untersuchenden Zytokins gerichtet ist. Das Enzym (meistens eine avidingekoppelte Peroxidase) katalysiert eine Farbstoffreaktion mit einem Substrat. Die Geschwindigkeit der stattfindenden Reaktion ist innerhalb des Messbereichs proportional zur Enzymkonzentration und ermöglicht so durch photometrische Quantifizierung des Farbstoffumsatzes die Bestimmung der zuvor gebundenen Antigenmenge. Durch dieses sehr sensitive Verfahren können geringste Zytokinkonzentrationen gemessen werden (Nachweisgrenze je nach ELISA bei ca. 5 pg/ml), wobei in die Auswertung nur Werte einbezogen wurden, die eine mindestens ebenso große Absorption zeigten wie der kleinste Standard (beispielsweise zwischen 3 und 32 pg/ml bei Zytokinen).

Die kommerziell erworbenen ELISA (IL-1 β -, IL-2, IL-6 und IL-10) wurden entsprechend der dem Testkit beigefügten Arbeitsvorschrift durchgeführt.

3.11: Gen-Expressions Analysen (GEA)

Mit Gen-Expressions-Analysen wird der Status der Genexpression einer Zellpopulation dargestellt. Dies geschieht unter Zuhilfenahme der mRNA der Zellen, die den aktuell in der Zelle transkribierten Genen entsprechen. Diese mRNA wird isoliert und mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben und radioaktiv markiert. Die dadurch erhaltene komplementäre cDNA wird in einem Annäherungsschritt den auf Nitrozellulosemembranen aufgebrauchten Genproben (cDNA-Chips) präsentiert. Diese DNA-Fragmente entsprechen einzelnen Genen, die bei der Expressionsanalyse untersucht werden sollen. Ein Versuchsaufbau kann dementsprechend vorher ausgewählte und auf die Membran aufgebrauchte Gene untersuchen. Tritt eine Hybridisierung ein zwischen den aus den mRNA synthetisierten cDNA und den auf der Membran aufgebrauchten DNA-Genen, so wird dies sichtbar durch eine radioaktive Strahlung im bekannten Bereich des aufgebrauchten Genes auf der Membran. Autoradiographisch wird das Hybrid sichtbar als Punkt, wobei aus dem Hybridisierungsmuster auf der Membran sowie aus der Hybridisierungsintensität auf das Ausmaß der Genexpression zurückgeschlossen werden kann. Die Auswertung erfolgt wie bei EMSA mit Hilfe des Digitalen Autoradiographen (DAR; 3.6.3)

Durch dieses Verfahren wird eine quantitative sowie auch eine qualitative Aussage ermöglicht zu den Genen, die in der untersuchten Zellpopulation exprimiert werden. Die qualitative Aussage lässt sich durch das Vorhandensein eines radioaktiv strahlenden Bereiches auf der Membran tätigen. Dies zeigt eine Hybridisation der radioaktiv markierten cDNA an. Die quantitative Aussage entsteht durch den Vergleich der Expression verschiedener Gene der Zellen bei unterschiedlichen Situationen und im Vergleich zu positiven Kontrollen. Als solche dienen die stoffwechselaktiven House-Keeping-Gene für β -Actin und GAPDH, die auch bei anderen molekularbiologischen Versuchen wie der PCR als Positivkontrolle herangezogen werden. So untersuchten wir die Genexpression bei Immunzellen im Ruhezustand vor Inkubation mit Krebszellen und nach einer Zugabe von Krebszellen. Ein im Vergleich zu den Experimenten mit Zellen im Ruhezustand stärker radioaktiv strahlender Bereich auf der Membran deutet auf eine stärkere Expression des in diesem Bereich aufgebrauchten Genes im stimulierten Zustand als im Ruhezustand hin. Zum Versuchsaufbau sei auf die Versuchsanleitung der GEA-Kits der Firma Superarray verwiesen, deren Test-Kits wir zur Gen-Expressionsanalyse verwendeten.

Methoden

Eine kurze Zusammenfassung des Versuches wird nachfolgend wiedergegeben: Nach der RNA-Extraktion wie unter 3.5 beschrieben wurde die RNA mit Hilfe des aus Multiple-Myeloma-Zellen gewonnenen Enzyms Reverse Transkriptase (MMRT) in cDNA transkribiert und mit α -³²dCTP radioaktiv markiert. Versuche mit ³³P, das für Genexpressionsanalysen auch empfohlen wird, führten bei uns zu wesentlich schwächeren Signalen und einer erschwerten Auswertung, so dass wir die Experimente mit einer Markierung mit ³²P durchführten. Gleichzeitig zur cDNA-Herstellung wird die Membran mit den darauf aufgetragenen Genen mit unspezifischer DNA aus Lachssperma bei 65⁰C in einem Waschpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungen mit der DNA zu vermindern. Anschließend wird die cDNA mit dem gleichen Waschpuffer und unter Zusatz von Lachssperma-DNA für mehrere Stunden bei 65⁰C auf der Membran inkubiert. Nach mehreren Waschschrritten mit Lösungen aus SDS und SSD in verschiedenen Konzentrationen ist die Membran fertig zur Auswertung. Dazu wird sie in feuchtem Zustand in Hybridisationsfolie eingeschweißt und entweder bei -20⁰C zur Belichtung einem Film ausgesetzt und/oder mittels DAR autoradiographisch ausgewertet.

Gene-Arrays auf Fluoreszenzbasis anstelle von radioaktiver Markierung sind ebenfalls möglich. Diese Art des Nachweises der Hybridisation ist jedoch durch eine starke Varianz zwischen unterschiedlichen Versuchsreihen, aber auch innerhalb eines Versuches verbunden. Diese Varianz schränkt die Aussagekraft der erhaltenen Ergebnisse stark ein, daher entschieden wir uns für die Markierung der cDNA mit ³²P.

Die Membran kann durch Kochen mit einer konzentrierten SDS-Lösung zum erneuten Gebrauch wieder verwendet werden, indem die Hybridisierungen der auf der Membran aufgetragenen Gene mit den cDNA gelöst und die cDNA abgespült wird (stripping). Ein Erfolg des „stripings“ wird durch die Exposition der gestrippten Membran mit einem Röntgenfilm dargestellt, der bei erfolgreichem Stripping keine Markierungen durch radioaktive Strahlen mehr aufweist (max. 5 X Strippen ist möglich).

Nach der Entwicklung der Gene-Arrays als Instrument zur Untersuchung der Genexpression im Jahre 1995 wurde deutlich, dass die Ergebnisse verschiedener Versuchsreihen mit unterschiedlichen Zellpopulationen nur bedingt miteinander vergleichbar sind und auch innerhalb einer Versuchsreihe die Ergebnisse deutlich divergieren können (dies gilt hauptsächlich für Fluoreszenz-basierte Arrays und nur in eingeschränktem Maße für radioaktive Arrays). Daher wurden Kriterien gesucht, deren Einhaltung die Ergebnisse verschiedener Versuchsreihen miteinander vergleichbar machen und die Genexpressions-Experimente als verlässliche Untersuchung in der

Methoden

Forschung etablieren. Dies führte zu den MIAME-Kriterien (*Minimal Information about Microarray Experiments*, [11]) die im Jahre 2001 in Miami formuliert und publiziert wurden. Darin wird neben den technischen Anforderungen an die kommerziellen Anbieter von Tests für Gen-Expressions-Analysen auch eine fünfmalige Reproduktion jedes einzelnen Ergebnisses von den Anwendern verlangt, bis deren Daten als verlässlich gelten und veröffentlicht werden dürfen.

3.12: Auswertung der Ergebnisse

Die dargestellten Ergebnisse basieren auf der Auswertung einer Reihe von Einzelerperimenten. Um den Ergebnisteil besser überschaubar und anschaulicher zu gestalten, sind die Ergebnisse als Mittelwerte \pm Standardabweichung (*standard deviation*, SD) bzw. \pm Standardfehler (*standard error*, SE) aus mehreren Einzelresultaten dargestellt.

Mit Hilfe des *Kolmogorow-Smirnov Goodness of Fit Tests* wurden die Stichproben hinsichtlich ihrer Normalverteilung untersucht. Die Unterschiede für den verteilungsunabhängigen Vergleich zweier verbundener Stichproben in der Mediatorproduktion bzw. in der mRNA- und Gen-Aktivierung wurden im Falle einer Normalverteilung mittels des *Student's T-Tests* auf Signifikanz überprüft (** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$). Im Falle einer Nicht-Normalverteilung der Datensätze wurde der „*Vorzeichen-Rang-Test von Wilcoxon*“ (*Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Ranks Test*) verwendet. Die Korrelationen zwischen den biologischen Daten wurden unter Anwendung des *Pearson-Tests* (normalverteilte Daten) bzw. des *Spearman-Tests* (nicht-normalverteilte Daten) analysiert. Sämtliche oben aufgeführten statistischen Testverfahren wurden mit dem Programm *SPSS for windows* durchgeführt. Wurde aufgrund eines zu geringen Stichprobenumfanges keine ausführliche statistische Auswertung vollzogen, so wurde der Standardfehler angegeben.

4. Ergebnisse

4.1: Transkriptionsfaktoren aus NK-Zellen und T-Zellen differieren in ihren elektrophoretischen Eigenschaften

T-Zellen und NK-Zellen, beides Zellen der lymphozytären Zellreihe, haben gemeinsame immunologischen Eigenschaften, wie die zytotoxische Aktivität gegen Tumorzellen oder die Sekretion von Zytokinen. Auch im Zytoplasma der Zellen gibt es Gemeinsamkeiten: in beiden Zellen wird die Aktivierung der Zelle primär durch dieselben Signaltransduktionsmoleküle und durch Transkriptionsfaktoren wie NF-AT und NF- κ B vermittelt. Doch besitzen T-Zellen nicht die Möglichkeit zur antikörperunabhängigen zytotoxischen Aktivität, und der zeitliche Verlauf der Aktivierung nach Kontakt mit den Zielzellen ist unterschiedlich zu dem in NK-Zellen. Diese Unterschiede führten zur Arbeitshypothese, dass die physiologischen Unterschiede auch auf der molekularen Ebene der Transkriptionsfaktoren ihren Niederschlag finden sollten, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit genauer herausgearbeitet werden sollte. Die Beschreibung und damit das Verständnis dieser Aktivierungsmuster von NK-Zellen auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren bei der natürlichen Zytotoxizität und der antikörperabhängigen Zytotoxizität (ADCC) können zu einem besseren Verständnis der Funktion von NK-Zellen führen. Möglicherweise lassen sich diese Erkenntnisse einmal in einem zielgerichteten Einsatz von NK-Zellen im Kampf gegen Tumorerkrankungen nutzen.

Zur Überprüfung der Arbeitshypothese wurden zunächst Gelshiftanalysen (EMSA) angefertigt. Dazu wurden NK-Zellen zur Induktion der natürlichen Zytotoxizität mit lymphozytären Zelllinien inkubiert. Aus diesen stimulierten NK-Zellen wurden im Anschluss an die Inkubation Kernextrakte gewonnen, die mit den P1, P2 und P3-Motiven des IFN- γ -Genes als relevante Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF-AT sowie den κ 1, κ 2 und κ 3-Motiven des TNF- α -Genes als Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF- κ B zusammen gegeben wurden. Die entstandenen Komplexe aus Transkriptionsfaktor und Promotor-DNA wurden im nächsten Schritt elektrophoretisch getrennt. Im EMSA-Experiment erscheint bei Komplexbildung eine Bande. Diese Bande ist ein Maß für die Aktivität der Transkriptionsfaktoren und damit die Genaktivität der durch die Faktoren beeinflussten Gene. Die Ergebnisse wurden verglichen mit den Gelshiftanalysen mit Kernextrakten aus T-Zellen und anderen aus PBMC gewonnenen Lymphozyten.

Ergebnisse

Wie in Abbildung 1A und 1B dargestellt zeigen die Kernextrakte in NK-Zellen und PBMC ein unterschiedliches Laufverhalten, was die angenommenen Unterschiede der Transkriptionsfaktoren unterstreicht. Kernproteine mit den darin enthaltenen Transkriptionsfaktoren aus NK-Zellen zeigen eine deutlich langsamere Laufgeschwindigkeit und damit höher liegende Banden im Gelshift als diese aus T-Zellen, in der Abbildung 1 in Spur 8 und 9 zu sehen, oder PBMC (Spuren 2,3).

Monozyten und Makrophagen, in den Abbildungen 1A und 1B in den Spuren 4 und 5 zu sehen (adhärente Zellen), zeigen keine deutliche Bande vor Aktivierung, auch nach Aktivierung mit IL-2 ist nur eine schwache Bande zu sehen. Daraus kann geschlossen werden, dass NF-AT und NF- κ B nicht wesentlich zur Aktivierung in Monozyten/Makrophagen beitragen.

Die nukleären Proteine aus aufgereinigten T-Zellen (Spuren 6 und 7) am P2-Motif des IFN- γ -Promotors (Abbildung 1A) und der Konsensus-Sequenz des TNF- α -Promotors (Abbildung 1B) zeigen ein identisches Lauf- und Bindeverhalten im EMSA wie die nukleären Proteine aus PBMC (Spuren 2/3). Ebenso vergleichbar sind die Bindungseigenschaften von Kernextrakten aus PBMC und T-Zellen beim P1 und P3-Motif des IFN- γ -Promotors sowie bei dem κ 1, κ 2 und κ 3-Motif des TNF- α Promotors (nicht dargestellt).

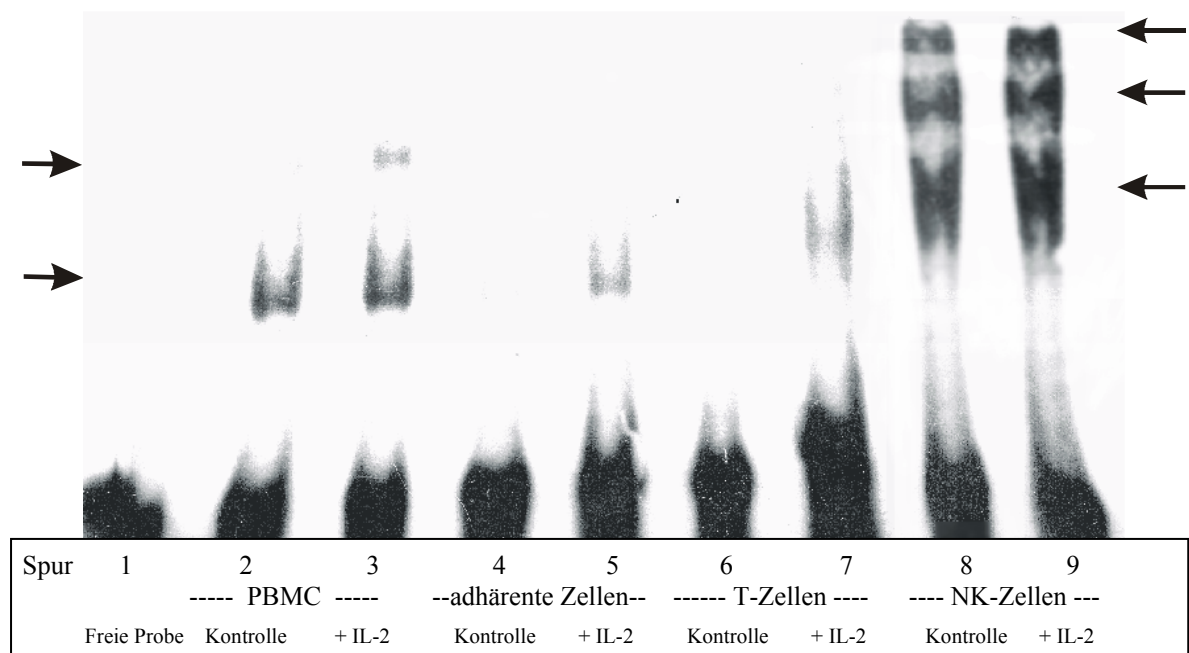
Es konnte somit gezeigt werden, dass die Bindungseigenschaften von NF-AT und NF- κ B in PBMC identisch sind mit denen in T-Zellen, die etwa 75% der gesamten Zellen der PBMC darstellen, sowie mit adhärenen Zellen, die vor allem aus Monozyten bestehen und etwa 10% der PBMC ausmachen. Kernextrakte aus der T-Zell-Linie Jurkat erbrachten gleiche Banden im Gelshift wie Kernextrakte von aus PBMC isolierten T-Zellen.

Mit den Kernextrakten aus PBMC tritt eine schwache Bande aus NF-AT/DNA-Komplex mit einem hohen molekularen Gewicht auf (Abbildung 1A, Spur 3). Diese Bande erscheint in Höhe der bei NK-Zellen prädominanten Bande und kann daher den NK-Zellen aus den PBMC zugeschrieben werden, die etwa 10 % der Zellen in PBMC ausmachen.

Daher repräsentieren die Kernextrakte von PBMC nahezu die der T-Zellen, so dass bei allen weiteren Experimenten auf eine Aufreinigung von T-Zellen verzichtet und stattdessen PBMCs gesamt eingesetzt werden konnte.

Ergebnisse

Abbildung 1A: NF-AT / IFN- γ -Promoter



1B: NF- κ B / TNF- α -Promoter

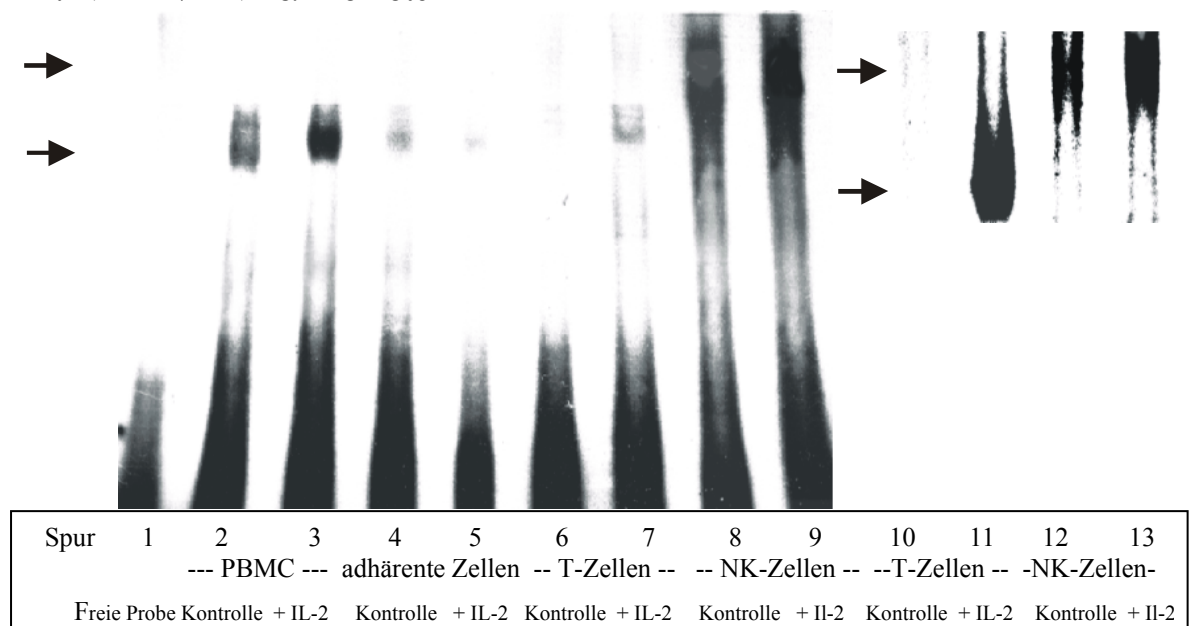


Abbildung 1:

Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF-AT und NF- κ B nach IL-2-Stimulierung aus den Kernextrakten verschiedener Lymphozyten wurde im EMSA mit der P2-Sequenz des Interferon- γ -Promotors (A) und der Konsensus-Sequenz für NF- κ B des TNF- α -Promotors (B) dargestellt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Gel mit unterschiedlichem elektrophoretischem Laufverhalten von NF-AT und NF- κ B in PBMC (Spur 2 und 3), adhären Zellen (Spur 4, 5), T-Zellen (6, 7) und NK-Zellen (8, 9). Unstimulierte NK-Zellen besitzen eine im Vergleich zu den anderen Zellen starke basale Bindungsaktivität (Spur 8), die in allen PBMC durch Interleukin-2 noch verstärkt werden kann (Spur 9). Der in Abbildung B gezeigte Ausschnitt zeigt den weiter aufgetrennten Bereich der Banden der Spuren 6 bis 9 und verdeutlicht die unterschiedliche Laufhöhe der Proteine aus NK-Zellen und T-Zellen.

4.2: Höhere basale NF-AT und NF- κ B-Aktivität in NK-Zellen als in PBMC

Eine basale Aktivität im EMSA-Experiment, d. h. in Kernextrakten von unstimulierten Zellen, deutet auf eine konstitutive Transkriptionsfaktor-Aktivität hin, die direkt und schnell in die Genexpression eingreifen können. Dieses ist Voraussetzung für eine schnelle Zellantwort auf einen Stimulus.

Der Ausschnitt aus Abbildung 1B zeigt sehr deutlich, dass PBMC ohne Stimulierung mit IL-2 eine nur schwache Bande im Gelshift zeigen, woraus auf eine geringe basale Aktivität der Transkriptionsfaktoren geschlossen werden kann. Eine Stimulierung mit IL-2 induziert eine deutliche Steigerung der Bindungsaktivität (Spuren 10 und 11). Im Gegensatz dazu zeigen NK-Zellen auch ohne IL-2-Stimulierung eine starke Bande im Gelshift, die durch IL-2-Stimulierung weiter gesteigert werden kann (Spuren 12 und 13). Mittels Phosphoimager konnte die Steigerung bei NK-Zellen auf einen IL-2-Stimulus quantifiziert werden auf das 1,5- bis 2-fache der basalen Aktivität.

Zum Ausschluss einer Artifizierung der Ergebnisse durch eine potentielle Prä-Aktivierung der NK-Zellen durch die aufwendige Isolationsprozedur mittels MACS wurde die Expression von CD62L (L-Selektin) durch FACS-Analysen gemessen. L-Selektin ist ein bekannter Marker für die Aktivität von Lymphozyten; eine Aktivierung von NK-Zellen geht mit einer verminderten Expression von CD62L einher. Bei unseren Messungen konnten keine Änderungen der CD62L-Expression durch die MACS-Isolierung festgestellt werden. Dadurch ist eine vorzeitige Aktivierung ausgeschlossen; die nicht experimentell stimulierten NK-Zellen können somit mit ruhenden NK-Zellen gleichgesetzt werden.

Ein stimuluspezifischer Effekt des IL-2 auf PBMC wurde ausgeschlossen durch Verwendung des Superantigens TSST-1 als alternativen Aktivierungsstimulus. Dabei zeigte sich ein identisches Laufverhalten im Gelshift wie bei Verwendung von IL-2.

Diese Ergebnisse zeigen zusammengenommen, dass ein unterschiedliches Repertoire an Transkriptionsfaktoren in NK-Zellen verglichen mit T-Zellen vorhanden ist. Aufgrund der langsameren Laufeigenschaften der Kernextrakte aus NK-Zellen kann auf höhermolekulare Transkriptionsfaktoren oder die Bildung von Oligomeren zurückgeschlossen werden, die in weiteren Versuchen genauer analysiert wurden (siehe 4.7).

Ergebnisse

Die basale Aktivität der Transkriptionsfaktoren in NK-Zellen ist deutlich höher als in PBMC, kann aber durch Stimulierung noch gesteigert werden. NK-Zellen sind somit im Ruhezustand schon biologisch aktiv und können ohne vorherige Präsentivierung schnell aktiviert werden und zytotoxisch wirken. Durch Aktivierung mit Zytokinen ist noch eine weitere deutliche Steigerung der zytotoxischen Aktivität zu erreichen.

4.3: Verlängerte NF-AT und NF- κ B-Aktivierung in NK-Zellen im Vergleich zu PBMC

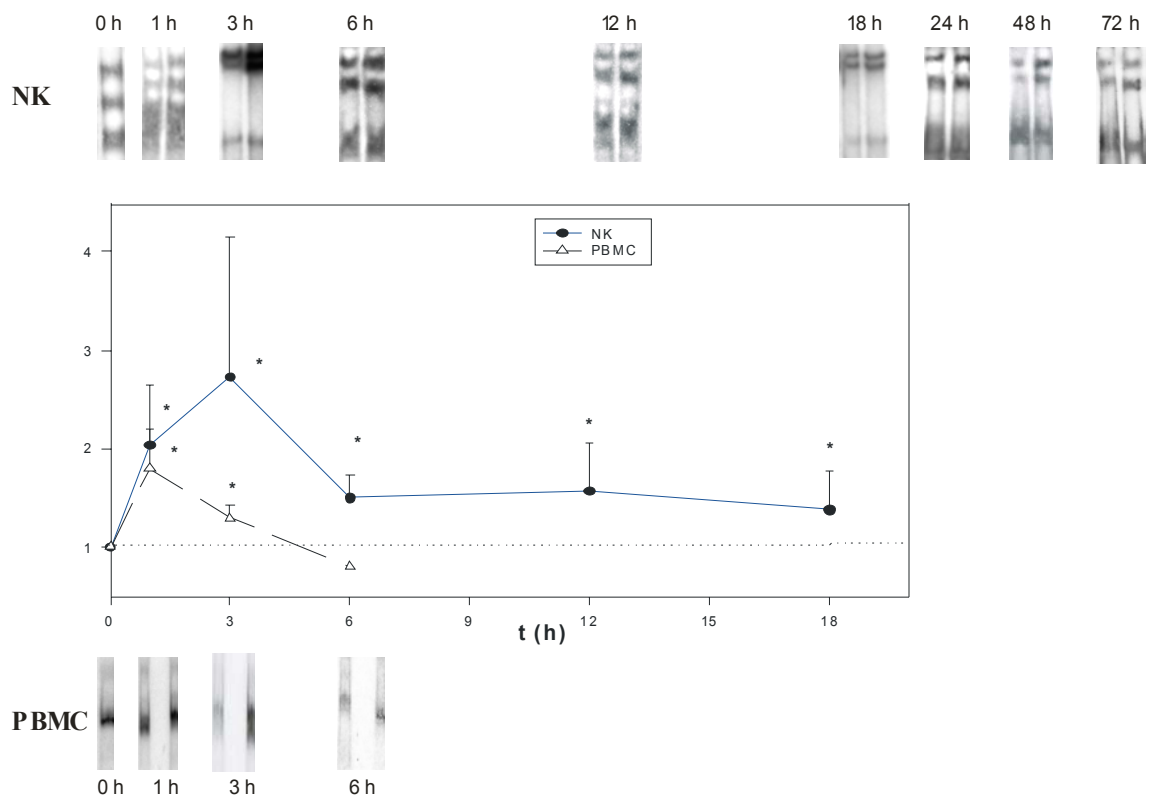
Bezüglich der Kinetik der mRNA der Zytokine IFN- γ und TNF- α in stimulierten NK-Zellen sind verschiedene Daten publiziert worden. Von Trede und Mitarbeitern wurde ein im Vergleich zu PBMC früherer Maximalwert mit der größten Konzentration der mRNA nach ein bis drei Stunden beschrieben [78], während Fehniger von erhöhten Werten an IFN- γ - und TNF- α -mRNA bis zu 12 Stunden nach Stimulierung von NK-Zellen berichtet [26]. Die Diskrepanz dieser Daten kann nur teilweise durch unterschiedliche Quantifizierungsmethoden bei der mRNA-Isolierung und verschiedene Stimulierungstechniken erklärt werden. Zur Untersuchung dieser Differenzen in der Literatur und Klärung der Kinetik der Aktivierung von NK-Zellen führten wir EMSA durch. Dazu stimulierten wir NK-Zellen und PBMC mit IL-2 und bestimmten über 72 Stunden den Aktivierungsstatus der Transkriptionsfaktoren.

Das zeitliche Auftreten des Maximalwertes lässt sich objektivieren durch die autoradiographische Messung der radioaktiven Zerfälle, die durch die radioaktiv markierte Promotor-DNA bei den Banden im EMSA entstehen. Dabei werden die über der spezifischen Bande gemessenen Zerfälle pro Minute (cpm) in ein Verhältnis gesetzt zur Summe der Radioaktivität aus der gesamten Spur (hauptsächlich nicht von Transkriptionsfaktor gebundener, im Überschuss vorhandener „freier“ Promotor-DNA, d.h. der „freien Radioaktivität“ am unteren Rand des Gels). Dieses Verhältnis von gebundener zur insgesamt eingesetzten Promotor-DNA ist ein Maß für die Konzentration an Promotor-bindenden Transkriptionsfaktoren und damit für die mutmaßlichen Transkriptionsfaktor-Aktivität.

Die Expression des Transkriptionsfaktors NF- κ B als Bindungsprotein des TNF- α -Promotors erreicht in den Extrakten von IL-2-stimulierten PBMC einen Maximalwert nach 60 Minuten (Abbildung 2B).

Ergebnisse

Abbildung 2A: Radioaktivität der NF-AT(P1)/IFN- γ -Banden
Vielfaches der unstimulierten Kontrollen



2B: Radioaktivität der NF- κ B/TNF- α -Banden
Vielfaches der unstimulierten Kontrollen

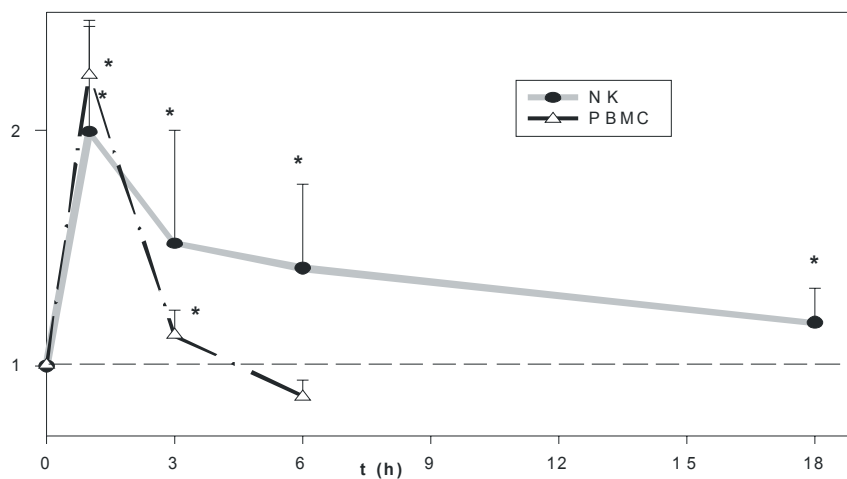


Abbildung 2:

Kernextrakte aus IL-2-stimulierten NK-Zellen und PBMC wurden im EMSA untersucht hinsichtlich der Aktivierung von NF-AT und NF- κ B mit der P1-Sequenz des IFN- γ -Promotors (A) und der Konsensus-Sequenz des TNF- α -Promotors (B). Die Stärke der Banden (Mittelwert \pm SE aus n=5 Experimenten) wurden digital ausgewertet und im Verlauf der Zeit graphisch dargestellt. Die zeitlich korrespondierenden Banden wurden in den Graphen (A) hinzugefügt.

Ergebnisse

Nach einer Stunde Aktivierung von PBMC mit Zielzellen konnten wir eine im Mittel 2,2-fache Aktivierung im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen messen. Im Anschluss daran verringert sich die Aktivierung, bis sie die Stärke der basalen Aktivierung der Transkriptionsfaktoren nach sechs Stunden erreicht. Der maximale Wert der Aktivierung in NK-Zellen ist ebenfalls nach einer Stunde erreicht; im Gegensatz zu PBMC ist die NF- κ B-Aktivierung in NK-Zellen jedoch signifikant verlängert auf bis zu 18 Stunden. Diese lange Aktivierung findet unabhängig von einer IL-2-Stimulierung statt. Eine weitere Verstärkung der Bande und damit eine stärkere NF- κ B-Aktivierung kann durch Zugabe von IL-2 erreicht werden. Im Mittel wird die Bande durch IL-2 auf das 2,1-fache verstärkt.

In Abbildung 2A ist die Kinetik der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-AT dargestellt. Diese erreicht in PBMC nach einer Stunde ihren Maximalwert, anschließend sinkt der Wert der Aktivierung, bis nach sechs Stunden das Kontrollniveau erreicht wird. In NK-Zellen dagegen ist die maximale Aktivierung nach drei Stunden erreicht, wobei eine durchschnittlich 2,1-fach stärkeren Bande im EMSA errechnet werden kann. Wie bei der NF- κ B-Aktivierung zeigte sich dort ebenfalls eine signifikant verlängerte NF-AT-Aktivierung, die nach 72 Stunden noch nachweisbar ist. Auch diese NF-AT-Aktivierung lässt sich durch IL-2-Gabe weiter steigern. In Abbildung 2A sind zu den im DAR gemessenen Aktivitäten und den daraus errechneten Aktivierungssteigerungen der Transkriptionsfaktoren die im korrelierenden EMSA erscheinenden Banden exakt abgebildet.

Die Aktivierung beider Transkriptionsfaktoren in PBMC ist unabhängig vom untersuchten Stimulus; eine Stimulierung mit TSST ergab ähnliche Untersuchungsergebnisse.

4.4: Die Bindung der NF- κ 1- κ 3-Motive ist spezifisch und durch IL-2 verstärkbar

Die unter 4.2 und 4.3 dargestellten Daten legen die Mutmaßung nahe, dass NK-Zellen ihr „eigenes“ Repertoire an NF-AT und NF- κ B-Faktoren besitzen oder mit – im Vergleich zu T-Zellen und Monozyten/Makrophagen - unterschiedlichen Kombinationen der Faktoren ausgestattet sind. In weiteren Experimenten sollte zunächst verifiziert werden, ob es sich tatsächlich um NF- κ B- und NF-AT-Proteine handelt. Dazu wurde die Spezifität der

Ergebnisse

Bindung der Transkriptionsfaktoren an die entsprechenden Binderegionen der Promotoren in NK-Zellen und T-Zellen untersucht.

Der humane TNF- α -Promotor besteht aus drei unterschiedlichen Binderegionen für die Transkriptionsfaktoren, die $\kappa 1$, $\kappa 2$ und $\kappa 3$ genannt werden [77]. Von diesen drei Motiven werden nur $\kappa 1$ und $\kappa 3$ von nukleären Proteinen aus NK- und T-Zellen gebunden. Mit der $\kappa 2$ -Binderegion wird nur eine schwache Bindung der Faktoren erreicht.

Durch Modifikation der Konzentrationsverhältnisse und einen absichtlichen Basenaustausch bei der Synthese dieser Promotoren (gezielte Mutation G-> C, siehe Tabelle 3) kann die Bindungsaffinität der Transkriptionsfaktoren an den Promotor beeinflusst und so die Spezifität der Bindungen der Transkriptionsfaktoren an die DNA nachgewiesen werden.

In Vorexperimenten schlossen wir zuerst unspezifische Bindungen aus. Dazu verwendeten wir in EMSA-Versuchen Oct-1-DNA, die zu keiner Bindung der Faktoren und damit keiner Bande führte.

Ein fünffacher Überschuss an nicht radioaktiv markiertem (nicht gelabeltem) Oligonukleotid führte erwartungsgemäß zu einem Verschwinden der Bande (Abbildung 3B1, Spur 3). Dabei wird das gelabelte Oligonukleotid kompetitiv verdrängt. Bei 50-fachem Überschuss an nicht gelabeltem, aber mutiertem Oligonukleotid resultiert kaum eine substanzielle Veränderung der Bande (Abbildung 3B1, Spur 4). Dadurch konnte die Spezifität der Bindung von NF- κ B an den TNF- α -Promotor belegt werden.

Zum Nachweis, dass die Bindung der κ -Motive durch Proteine der NF- κ B-Familie stattfindet, wurden Antikörper gegen NF- κ B (p50/p65) den Kernextrakten zugefügt (Super shift, siehe 3.6.4). Der dabei geformte trimolekulare Komplex aus Oligonukleotid, Transkriptionsfaktor und Antikörper zeigt typischerweise eine reduzierte elektrophoretische Mobilität und führt daher zu einer höher stehenden Bande, dem so genannten „Super-Shift“. Dies gelang nur bei Kernextrakten aus PBMC (Abbildung 3A), während bei NK-Zellen kein Supershift möglich war. Auch dies spricht für ein unterschiedliches Repertoire an Transkriptionsfaktoren in NK-Zellen und PBMC.

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte in der Spezifität der Supershift-Antikörper liegen. Diese erkennen als Antigen die dreidimensionale Struktur des Transkriptionsfaktors im Komplex mit der DNA. Kommerziell erhältliche NF-AT- und NF- κ B-Supershift-Antikörper sind für die Identifizierung der klassischen Untereinheiten von NF- κ B bzw. Proteinen der NF-AT-Familie ausgelegt und erkennen somit gut alle

Ergebnisse

bislang in T-Zellen und Monozyten/Makrophagen identifizierten Transkriptionsfaktoren, vermutlich aber nicht die in NK-Zellen. Vor diesem Hintergrund unterstützt ein nicht erfolgreich durchführbares Super-Shift-Experiment sogar unsere Hypothese eigener Arten von Transkriptionsfaktoren in NK-Zellen. Ein Nachweis der Existenz von NF- κ B-Proteinen in NK-Zellen gelingt aber über Western-Blot-Antikörper. Diese erkennen auch verschiedene Splice-Formen ihrer Antigene.

Die reduzierte Mobilität der Kernextrakte aus NK-Zellen beim EMSA lassen sich auch im Western-Blot nachweisen (Abbildung 5), unabhängig von einer Inkubation der Zellen mit IL-2. Eine elektrophoretische Auftrennung im Western Blot unter reduzierenden Bedingungen bei Zugabe von Me-OH führt zu keiner Änderung der Laufeigenschaften. Dabei werden durch Spaltung eventueller Disulfid-Brücke eine Dimerisierung oder Polymerbildung verhindert.

Abbildung 3:

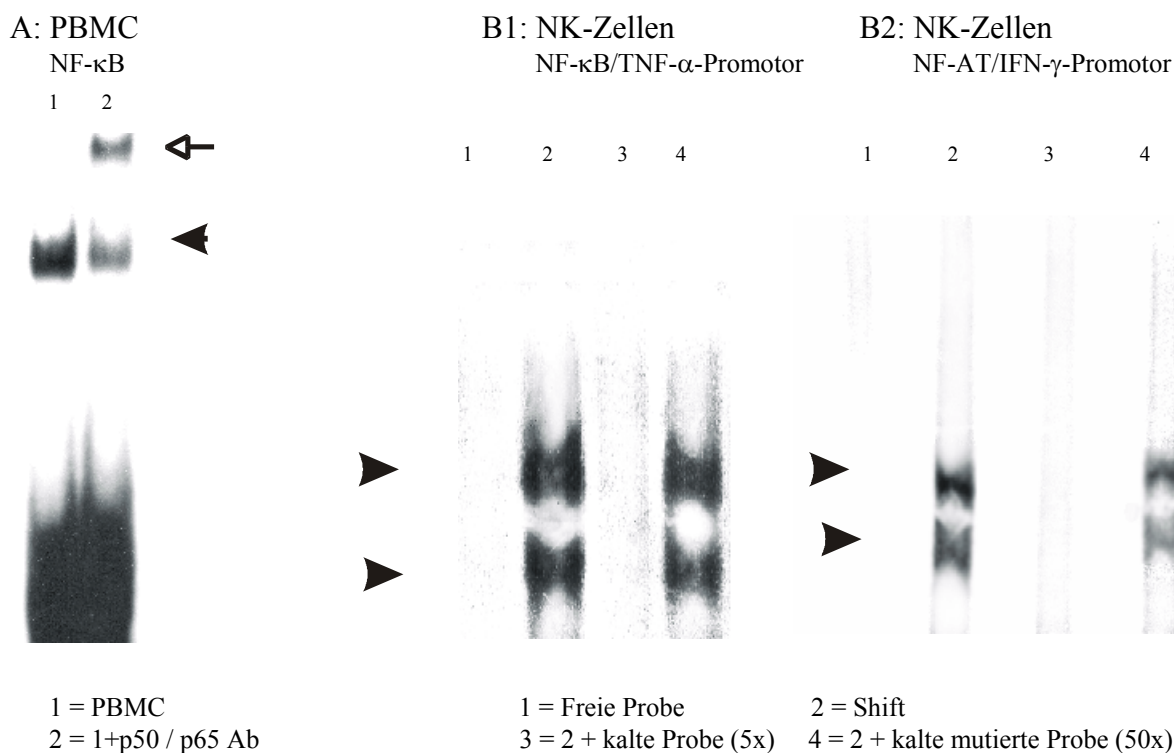


Abbildung 3:

A zeigt einen Supershift, erhalten durch Präinkubation von Kernextrakten aus PBMC und Oligonukleotid des TNF- α -Promotors mit NF- κ B-Antiserum. Die zusätzlich erhaltene Bande ist durch einen offenen Pfeil gekennzeichnet. Für NK-Zellen war kein Supershift zu erzielen.

B1 und **B2** zeigen die Spezifität der Bindung. Eine Verdrängung des 32 P-markierten Oligonukleotids aus der Bindung mit dem Transkriptionsfaktor und damit eine Abschwächung der Bande ist durch einen 5-fachen Überschuss an unmarkiertem Oligonukleotid möglich (Spur 3). Ein 50-facher Überschuss an mutiertem, nicht markiertem Oligonukleotid vermag den unmutierten Promotor nicht aus der Bindung mit dem Transkriptionsfaktor zu verdrängen und zeigt somit die Spezifität der Bindung an (Repräsentatives Gel von 3 individuellen Experimenten).

Ergebnisse

Diese Daten legen den Schluss eines unterschiedlichen NF- κ B-Repertoires mit verschiedenen Splice- und Isoformen in NK-Zellen im Vergleich zu T-Zellen und anderen PBMC nahe.

4.5: Die Bindung der NF-AT-P1-P3 Motive des IFN- γ -Promotors durch NF-AT- Faktoren ist spezifisch und durch IL-2 verstärkbar

Analog zu den im vorigen Abschnitt beschriebenen Experimenten wurde die Spezifität der Bindung der NF-AT-Transkriptionsfaktoren an die Motive P1, P2 und P3 des IFN- γ -Promotor untersucht. Dabei konnte durch EMSA-Untersuchungen mit einem 5-fachen Überschuss an nicht radioaktiv markierter, unmutierter Oligonukleotid-Probe des NF-AT-P1-Promotors und einem 50-fachen Überschuss an nicht radioaktiv markierter, mutierter Oligonukleotid-Probe eine Spezifität der Bindung von Transkriptionsfaktor und Promotor nachgewiesen werden (Abbildung 3 B2).

Ferner wurde die Hypothese, dass es sich um NFAT-Proteine handelt, durch den Nachweis einer spezifischen Bindung des Transkriptionsfaktor-Gemisches aus NK-Zellen an die NFAT-Binding site des Promotors des IL-2-Genes und des IL-4 Genes bestätigt. Auch im Falle von NF-AT konnte - wie unter 4.4 beschrieben - kein Super shift erzielt werden. Die NF-AT-Transkriptionsfaktoren der NK-Zellen sind somit nicht mit den gebräuchlichen Super shift-Antikörpern zu detektieren und scheinen Splicevarianten oder Isoformen der Transkriptionsfaktoren zu sein.

4.6: Unterschiedliche Affinität zu den P1/P2/P3-Motiven des IFN- γ -Promotors in NK- und T-Zellen

Die bisher nachgewiesenen Besonderheiten der Transkriptionsfaktoren aus NK-Zellen im elektrophoretischen Laufverhalten wie auch in der Kinetik im Vergleich zu T-Zellen führten zu der Frage, ob die für T-Zellen beschriebene Bindungspräferenz zum P2-Motiv des IFN- γ -Promotor auch für NK-Zellen gilt oder ob auch in diesem Bereich Unterschiede bestehen. Der IFN- γ -Promotor besitzt drei hintereinander gelegene Binderegionen für NF-AT-Transkriptionsfaktoren, die mit P1, P2 und P3 bezeichnet werden. Für T-Zellen ist eine Bindungspräferenz an den IFN- γ -Promotor mit einem Bindungsverhältnis von

Ergebnisse

P2:P1:P3 = 4:3:1 beschrieben [13]. Wir konnten mit unseren Untersuchungen zeigen, dass in NK-Zellen die Bindung an P1 um im Mittel 70% signifikant stärker ist als zum P2-Motiv. Dem entsprechend konnte durch Zugabe von unmarkierter P1-DNA in 5-fachem Überschuss eine Bindung zwischen NF-AT in NK-Zellen und radioaktiv markiertem P1-DNA deutlich vermindert werden, (Abbildung 4, Spuren 1 und 2). Bei Zugabe von unmarkierter P2-DNA wurde eine 10-fach höhere Konzentration als die P1-DNA zur Reduktion der Bindung benötigt (Abbildung 4, Spuren 3 und 4). Diese Ergebnisse finden in einem 1,7-fach höheren P1/P2-Bindungs-Verhältnis in NK-Zellen im Vergleich zu PBMC ihren Niederschlag.

Abbildung 4: Bindungspräferenz zum Interferon- γ -Promoter

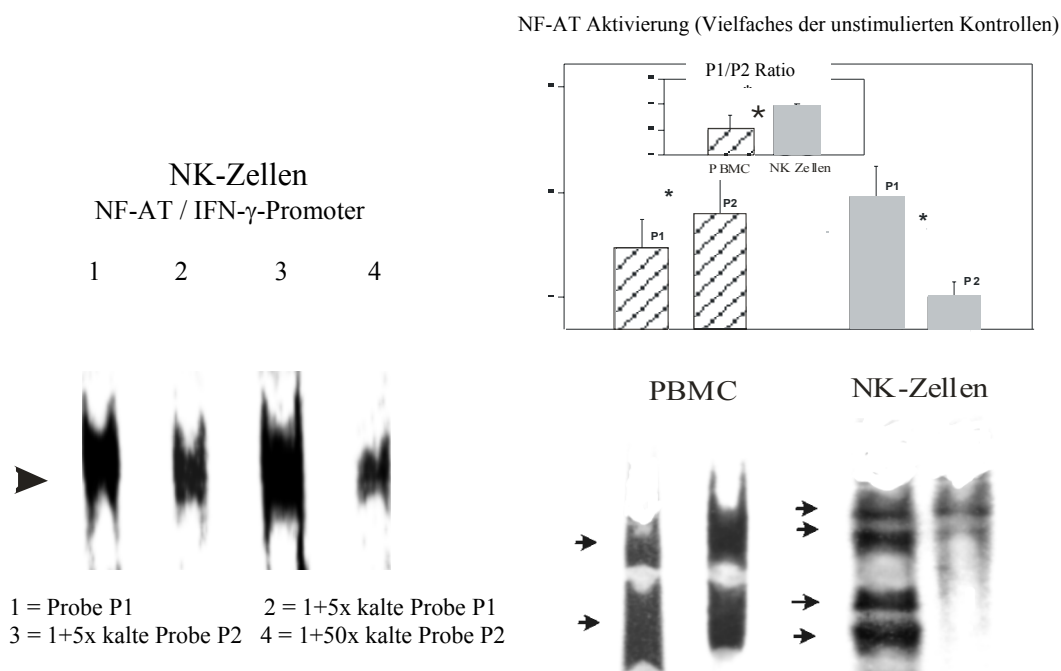


Abbildung 4:

NF-AT aus NK-Zellen binden im EMSA präferentiell an die P1-Sequenz des IFN- γ -Promotors, während PBMC eine stärkere Bindung an die P2-Sequenz zeigen. Dementsprechend verdrängt ein 5-facher Überschuss an unmarkierter (kalter) P1-Sequenz die 32 P-markierte P1-Sequenz aus der Bindung mit NF-AT (Spur 1 und 2), während eine vergleichbare Abschwächung der Bande nur durch einen 10-fach höheren Überschuss an unmarkierter P2-Sequenz erzielt werden kann (Spur 3 und 4). Dadurch kann auf eine zweifach höhere P1/P2-Ratio in NK-Zellen im Vergleich zu PBMC geschlossen werden. (n=5, Bindeaktivität +/- SE, *:p=0.05).

Die unter 4.1 beschriebenen unterschiedlichen elektrophoretischen Eigenschaften der Transkriptionsfaktoren mit deutlich höher liegenden Banden spiegeln sich also auch in der Bindungspräferenz der Transkriptionsfaktoren aus NK-Zellen an die Promotor-Regionen des IFN- γ Genes wider. Das unterschiedliche Laufverhalten und die unterschiedliche Bindungspräferenz sprechen für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren in NK-Zellen und T-Zellen.

4.7: Identifikation von NF-AT- und NF- κ B-Proteinen bei der Aktivierung von NK-Zellen

Zum Nachweis, dass es sich bei den die NF-AT-P1/P2-Bindungsstellen des IFN- γ -Promotors und die κ 1- κ 3 Motive des TNF- α -Promotors bindenden Transkriptionsfaktoren wirklich um Mitglieder der NF-AT- und NF- κ B-Familie handelt, wurden Super shift-Analysen mit Anti-NF-AT-Antikörpern und Anti-NF- κ B-Antikörpern durchgeführt. Diese Experimente führten - wie unter 4.4 und 4.5 beschrieben - nicht zu einem Supershift. Dadurch war kein direkter Nachweis des Proteins durch einen spezifisch bindenden Antikörper möglich. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens von NF-AT- und NF- κ B-Transkriptionsfaktoren und ihrer besonderen Rolle im Immunsystem als auch der Tatsache, dass in T- und NK-Zellen die gleichen Adaptermoleküle wie ZAP 70 und Syk gefunden werden [1], liegt aber die Annahme nahe, dass auch in NK-Zellen die Signaltransduktion wesentlich durch NF-AT- und NF- κ B bestimmt wird [46].

Daher wurden im Rahmen dieser Untersuchungen zum Nachweis der Beteiligung von NF-AT- und NF- κ B-Proteinen Dot-blot-Analysen mit Western-blot-Antikörpern durchgeführt sowie eine neue Technik entwickelt, die eine eindeutige Zuordnung der Antikörper-Markierungen beim Western blot zu den Banden im EMSA erlaubt (Combi Blot, siehe auch 3.9 und folgender Abschnitt). Western blot-Antikörper erkennen - im Unterschied zu Super shift-Antikörpern - das elongierte Protein und sind somit in der Lage, auch unterschiedliche Splicevarianten und Isoformen zu binden.

Bei der elektrophoretischen Auftrennung der Kernproteine aus NK-Zellen und T-Zellen im Western blot zeigten sich - wie auch im EMSA - unterschiedliche Laufcharakteristika. Zur Darstellung möglichst der Gesamtheit der Kernproteine wurden bei diesen Versuchen eine Kombination der Antikörper gegen NF-AT-1 und NF-AT-2 sowie NF- κ B-p50 und NF- κ B-p65 eingesetzt (Abbildung 5, rechte Spalte).

Durch Zugabe von Mercapto-Ethanol (MeOH) zu den Proben vor deren elektrophoretischen Auftrennung konnte eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch Bildung von Disulfidbrücken unter den Transkriptionsfaktoren ausgeschlossen werden: MeOH, das durch reduzierende Wirkung etwaige Disulfidbrücken spaltet, führte bei unseren Versuchen zu keiner Veränderung der Laufverhalten.

Die nach den EMSA-Ergebnissen naheliegende Vermutung, dass bei NK-Zellen unterschiedliche Proteine der NF-AT- und NF- κ B-Familie aktiviert werden, wurde dadurch weiter erhärtet.

Ergebnisse

Abbildung 5:

Dot blot

Western blot

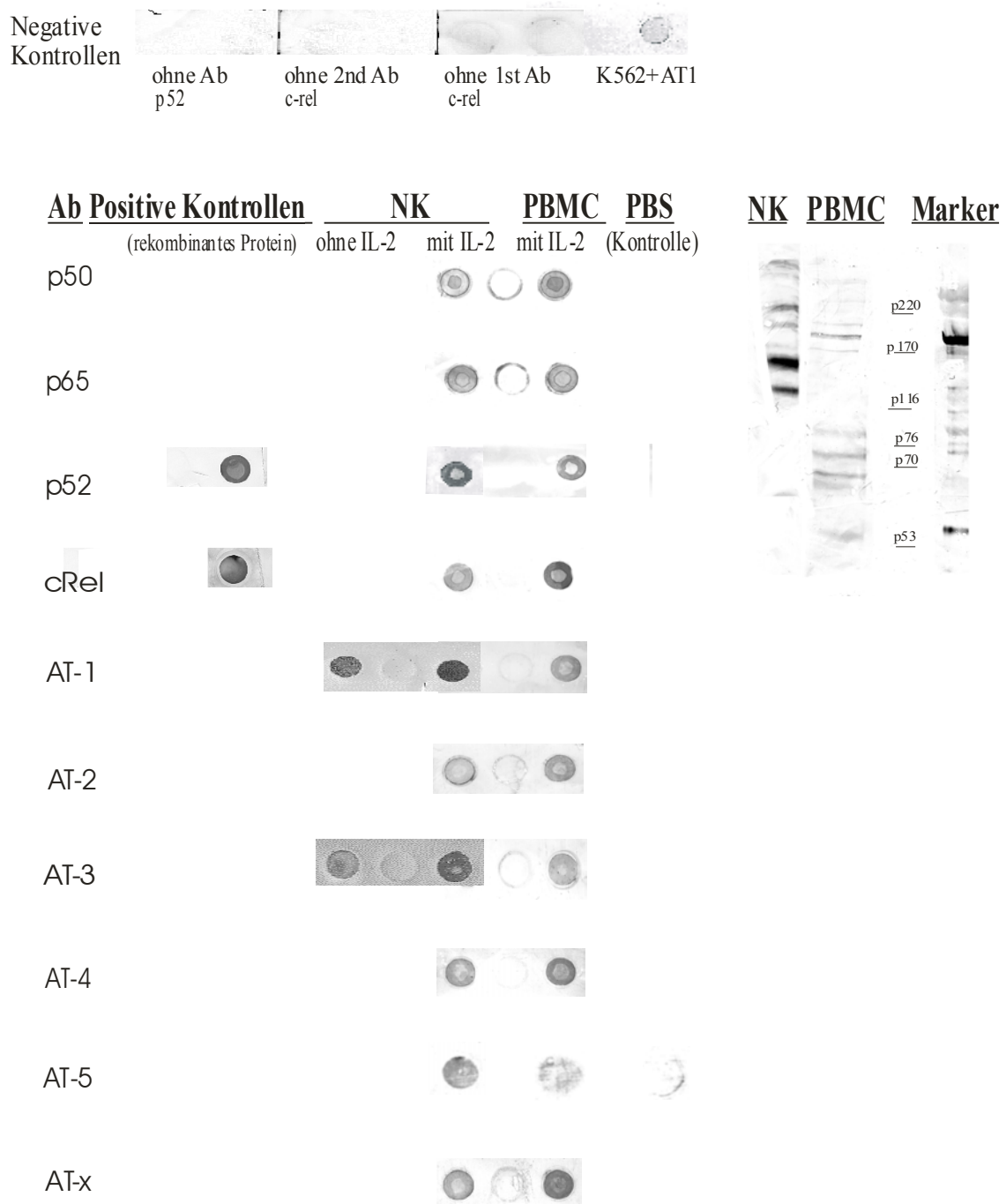


Abbildung 5:

Kernextrakte aus NK-Zellen wurden überführt auf eine Blotting-Membran und mit spezifischen Western blot-Antikörpern inkubiert. (links: Dot blot, rechts: Western blot). Als negative Kontrollen dienten PBS und Kernextrakte aus K562. Positivkontrollen waren rekombinante Proteine (p52 und c-rel). Zwei Mitglieder aus der NF- κ B-Familie wurden in NK-Zellen identifiziert (NF- κ B p50 und p65) sowie sechs NF-AT-Proteine (NF-AT1, 2, 3, 4, 5 und NF-ATx). Vergleichbare Ergebnisse wurden erzielt mit Kernextrakten aus PBMC und Jurkat-Zellen. Ausnahme bildet NF-AT5, das sich nur in NK-Zellen nachweisen lies. Stimulierte

NK-Zellen oder PBMC (nicht gezeigt) zeigen eine leichte, aber nachweisbare Induktion der Expression der NF-AT-Proteine, wiederum mit Ausnahme von NF-AT5. Das leichte Signal von NF-AT5 in PBMC kann auf die Existenz von residuellen NK-Zellen zurückgeführt werden, die etwa 10 % der PBMC ausmachen. Nach deren Entfernung erscheint das Signal in Stärke der Negativkontrolle. Deutlich sichtbar sind die unterschiedliche Laufeigenschaften der Kernextrakte aus NK-Zellen und PBMC im Western blot (rechts). (n=5 Experimente).

Ergebnisse

Bei der Zugabe von spezifischen Antikörpern für Western blots im Dot blot wurden in den Kernproteinen von NK-Zellen und T-Zellen die Transkriptionsfaktoren NF-AT-1, 2, 3 und 4 sowie NF-AT-x nachgewiesen. Aus der Familie der NF- κ B wurden jeweils NF- κ B p50, p52 und p65 detektiert. Diese Transkriptionsfaktoren sind demnach sowohl in der Aktivierung von NK-Zellen als auch in T-Zellen beteiligt. Bei diesen Experimenten gelang auch der Nachweis von NF-AT-5 in NK-Zellen. Dieses Protein lässt sich in T-Zellen nicht anfärben

In den Dot-blot-Versuchen ließen sich die gleichen Familienmitglieder der Transkriptionsfaktoren in NK-Zellen und T-Zellen nachweisen. Die bisher festgestellten Unterschiede müssen somit mit dem Vorhandensein von unterschiedlichen Iso-Formen und/oder Splice-Varianten erklärt werden. Durch die von Rao diskutierte mindestens drei Splice-Varianten von NF-AT-Molekülen wird diese Hypothese unterstützt [62].

Mit den vorliegenden Ergebnissen lassen sich jedoch nicht nachweisen, dass die beim EMSA prävalenten Band-Shift-Banden durch die im Western blot und Dot blot nachgewiesenen NF-AT und NF- κ B-Moleküle hervorgerufen werden.

Zur weiteren Klarstellung der Identität der bei der NK-Zell-Aktivierung beteiligten Transkriptionsfaktoren entwickelten wir daher eine neue Technik („Combi blot“) aus der Kombination von Western blot und EMSA, die eine eindeutige Zuordnung der Banden im EMSA zu den spezifischen Nachweisen von Proteinen im Western blot möglich macht. Dies wird erreicht, indem, wie unter 3.9 beschrieben, nach der elektrophoretischen Auftrennung der Kernproteine im Acrylamidgel und der radiographischen Darstellung der Banden das Gel wie im Western blot auf eine Membran aufgebracht wird und mit spezifischen Western blot-Antikörpern die Proteine an ihrem Ort im Gel nachgewiesen werden. Damit ist eine eindeutige Identifikation der bindenden Transkriptionsfaktoren beim EMSA möglich. Jeder Bande im EMSA kann mit diesem Versuchsaufbau die auslösenden Transkriptionsfaktoren zugeordnet und so die Beteiligung der NF-AT und NF- κ B-Proteine an der Entstehung der Banden gezeigt werden.

Beim Combi blot führten wir Verdünnungsreihen durch mit dem Ziel der Optimierung der Konzentrationsverhältnisse und der Möglichkeit, die Banden im EMSA denen im Western blot zuzuordnen zu können. Die Konzentration des radioaktiv markierten Oligonukleotids wurde reduziert und gleichzeitig die Konzentration der Kernextrakte und der darin enthaltenen Transkriptionsfaktoren erhöht (Abbildung 6A).

Abbildung 6A:

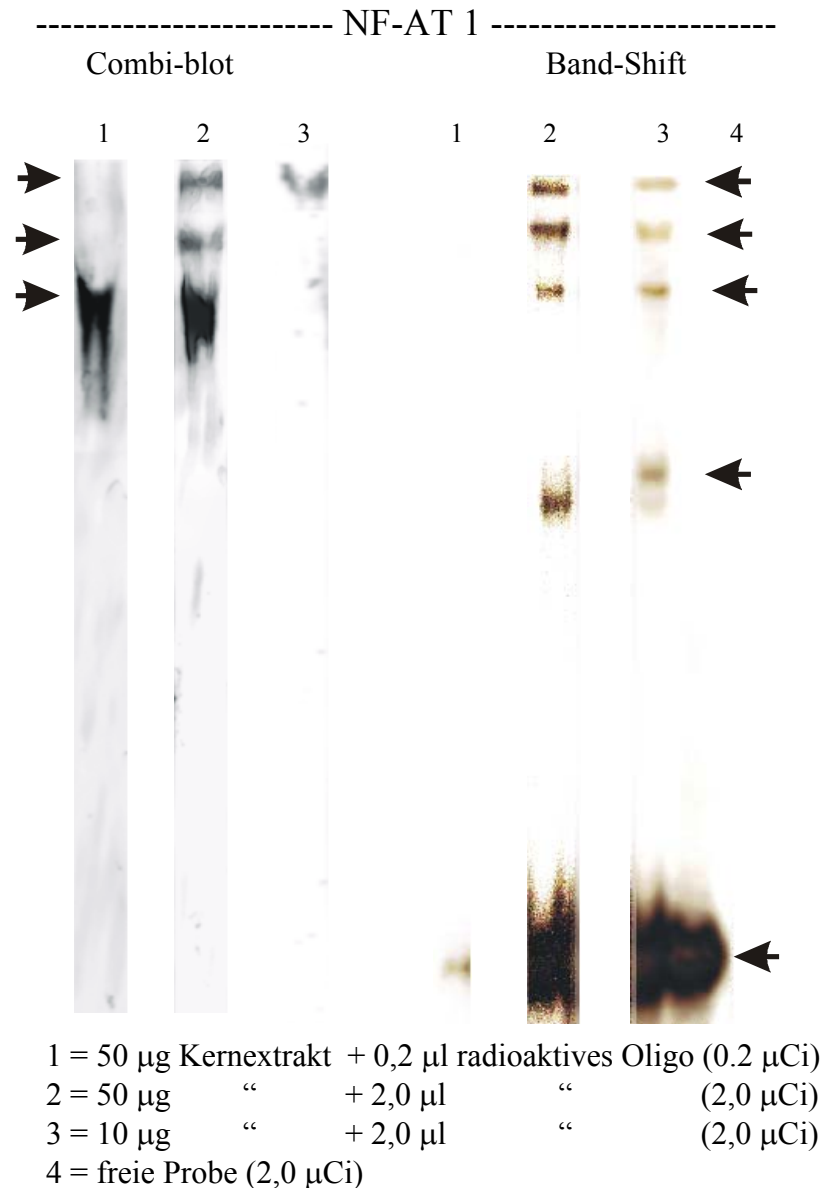


Abbildung 6 A: Identifikation der Banden als NF-AT und NF-κB durch Combi blot

Mit der Kombination von EMSA und Western blot konnten die Transkriptionsfaktoren, die die verschiedenen Banden im EMSA verursachen, identifiziert werden. In A zu sehen ist eine repräsentative (von n=3) Verdünnungsreihe für NF-AT-1 (Banden mit Pfeilen markiert). Die starke Bande in Spur 1 des Combi blot ist verursacht durch ungebundenes NF-AT-1-Protein. Eine Erhöhung der Konzentration des ³²P-markierten Oligonukleotids verändert nicht merklich die Stärke dieser Bande, führt jedoch zu zwei anderen Banden, die offensichtlich durch Komplexe von NF-AT-1 mit dem Oligonukleotid verursacht sind (Spur 2). Eine Verringerung der Konzentration der Kernextrakte zugunsten eines höheren Protein-Oligonukleotid-Verhältnisses führt zu einem Verschwinden der NF-AT-1-Bande (Spur3). Daher lassen sich die drei geshifteten Banden im EMSA und Western Blot, die sich in der gleichen Höhe nachweisen lassen, auf verschiedene Splice-Varianten, Isomere oder Oligomere von NF-AT untereinander oder mit anderen Proteinen zurückführen. Die Verdünnungsreihen für NF-AT-2, NF-κB p65 und p50 erbrachten vergleichbare Ergebnisse (repräsentatives Experiment aus n=3).

Ergebnisse

Dadurch liegen in den unterschiedlichen Spuren des Geles und auch der Membran verschiedene Konzentrationen an Proteinen vor. In der ersten Spur des Geles mit einem großen Kernextrakt/Oligonukleotid-Verhältnis liegen die meisten Proteine ungebunden vor. Mit diesen ungebundenen Proteinen gelingt die Übertragung auf die Membran (blotting) besser und somit ist der Nachweis durch die Antikörper deutlicher. In den folgenden Spuren mit einer in Relation zum Oligonukleotid geringen Proteinmenge überwiegt der an das Oligonukleotid gebundene Anteil an Proteinen.

Dabei konnte gezeigt werden, dass die schon im Western Blot nachgewiesenen Transkriptionsfaktoren NF-AT-1, NF-AT-2, 3, 4 und 5 sowie NF-AT-x aus der NF-AT-Familie und NF- κ B-p50, p52 und p65 der NF- κ B-Familie an den im EMSA detektierten Shifts beteiligt sind (Abbildung 6B).

Abbildung 6B:

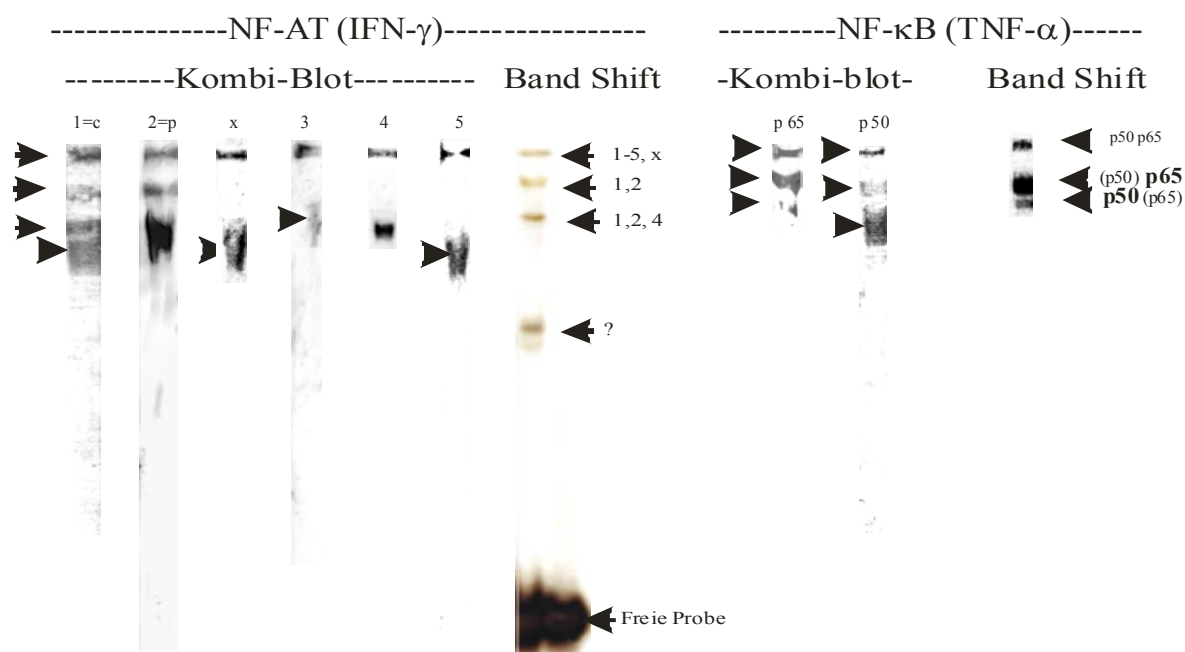


Abbildung 6B: Combi blot mit Nachweis der NF-AT- und NF- κ B-Proteinen

Die im Dot blot nachgewiesenen Transkriptionsfaktoren können im Combi blot mit den Bands im EMSA korreliert werden. Dabei gelingt der Nachweis der Beteiligung von NF-AT 1, 2, 3, 4 und 5 sowie NF-AT x aus der NF-AT-Familie und NF- κ B p50 und p65 an den Bands im EMSA und damit der Aktivierung von NK-Zellen. Gezeigt sind repräsentative Experimente aus n=3 Versuchen.

Ergebnisse

Für NF-AT-1 sowie für NF-AT-2 und NF- κ B-p50 und -p65 konnten drei Banden im EMSA-Teil wie auch im Western blot-Teil des Combi blot nachgewiesen werden. Diese drei Banden könnten durch verschiedene Splice-Varianten und Isoformen desselben Proteins verursacht sein oder durch (nicht durch Disulfidbrücken zustandekommende) Oligomere mit den gleichen oder verschiedenen NF-AT- bzw. NF- κ B-Familienmitgliedern, was allerdings weniger wahrscheinlich ist

Im Detail scheint der höchste Shift im EMSA durch oligomere NF-AT-1-Proteine oder durch NF-AT-1-Isoformen mit besonders hohem Molekulargewicht zu entstehen. Der darunter liegende Shift könnte einem Dimer aus NF-AT-1 oder anderen NF-AT-1-Isoformen zuzuschreiben sein. Der dritte Shift im EMSA ist in der gleichen Höhe wie die stärkste Markierung im Western blot-Teil mit hohem Überschuss an Kernproteinen. Diese Bande scheint daher aus dem ungebundenen monomeren NF-AT-1 Protein oder einer dritten NF-AT-1-Isoform zu bestehen.

Sämtliche Mitglieder der NF-AT-Familie lassen sich durch Stimulation mit IL-2 deutlich stärker aktivieren. Ausnahme dabei bildet wiederum NF-AT-5, das nach IL-2-Stimulierung nicht stärker aktiviert erscheint. Der schwache Nachweis von NF-AT-5 in PBMC ist auf die in PBMC zu etwa 10 % enthaltenen NK-Zellen zurückzuführen.

4.8: Interferon- γ -Sekretion in NK-Zellen ist zeitversetzt und verlängert im Vergleich zu PBMC

Die - wie in 4.3 beschrieben - deutlich zeitversetzte und verlängerte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-AT- und NF- κ B in NK-Zellen müsste auch korrelieren mit der unterschiedlichen Effektorfunktion von NK-Zellen gegenüber T-Zellen und die spezifischen Besonderheiten von NK-Zellen im Vergleich zu T-Zellen erklären. Daher wurde die IFN- γ -Sekretion in NK-Zellen sowie in T-Zellen nach Aktivierung mittels ELISA gemessen. Wiederum diente das Superantigen TSST-1 als positive Kontrolle für eine typische Stimulierung von PBMC.

Es konnte festgestellt werden, dass die Sekretion von Interferon- γ nach Aktivierung von NK-Zellen mit IL-2 zeitversetzt und verlängert ist gegenüber der Sekretion aus stimulierten PBMC nach Stimulierung mit IL-2- oder TSST-1 (Abbildung 7).

Ergebnisse

In stimulierten PBMC lässt sich eine IFN- γ -Sekretion bereits nach drei Stunden messen. Nach kurzer Zeit ist bereits eine deutliche Abnahme der Sekretion aus PBMC festzustellen; schon nach 36 Stunden ist die Sekretion in IL-2-stimulierten PBMC deutlich rückläufig.

NK-Zellen dagegen produzieren auf einen aktivierenden Stimulus wie IL-2 erst nach 18 Stunden nachweisbare Mengen an IFN- γ . Die Sekretion hält jedoch länger als 72 Stunden lang an.

Die Zytokin-Sekretion als Teil der Effektorfunktion von NK-Zellen ist also zeitversetzt und prolongiert gegenüber anderen PBMC und in der Menge erhöht und korreliert mit der Aktivität der Transkriptionsfaktoren.

Abbildung 7:

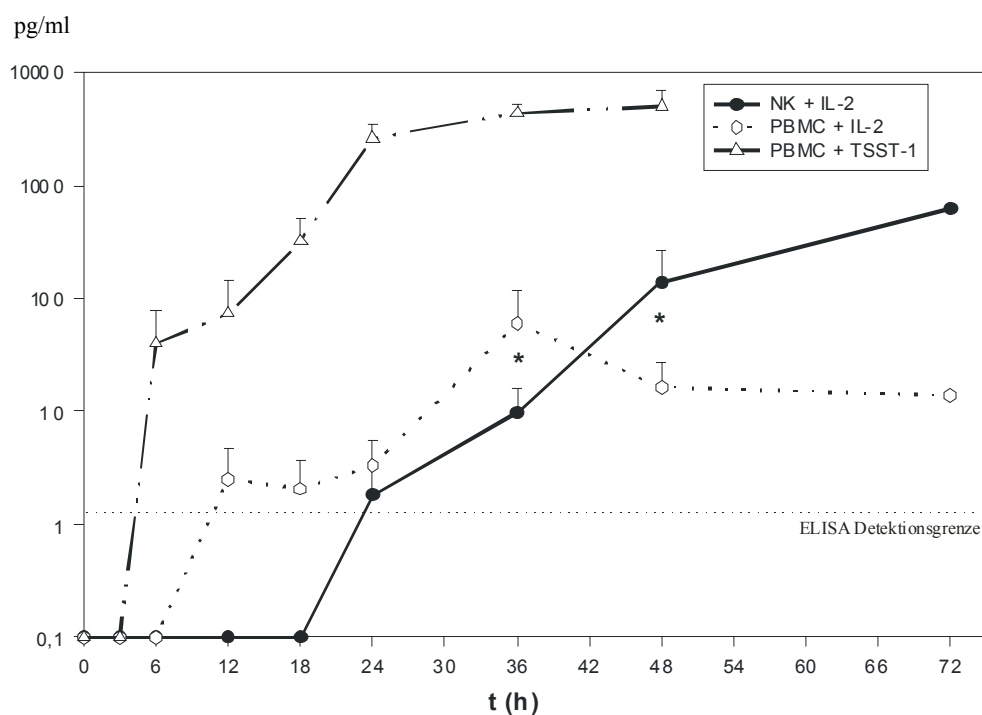


Abbildung 7: Kinetik der Interferon- γ -Sekretion

NK-Zellen und PBMC wurden stimuliert mit IL-2 und TSST und für 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48 und 72 Stunden kultiviert. Die IFN- γ -Sekretion der Zellen wurde im Überstand mittels ELISA gemessen. Dabei zeigt sich die zeitversetzte Sekretion aus NK-Zellen gegenüber PBMC (Mittelwert \pm SE aus n=5 Experimenten).

4.9: Ermittlung der Genexpressionsmuster in NK-Zellen während der Aktivierung durch Gene-Arrays

Die im EMSA durch Kernextrakte aus NK-Zellen hervorgerufenen Shifts zeigen eine Bindung von Transkriptionsfaktoren aus NK-Zellen *in vitro* an Promotoren der Gene für TNF- α und IFN- γ an. Eine solche Bindung führt *in vivo* im Normalfall zur Expression des entsprechenden Genes bzw. mehrerer durch NF- κ B und NF-AT aktivierbarer Gene und dadurch zur Synthese der Zytokin-Polypeptidkette. Dieser Vorgang konnte im vorliegenden Fall am Beispiel für die Induktion von IFN- γ auch durch die Messung mittels ELISA verifiziert werden (4.8).

Im EMSA wird die bei der Aktivierung der Zelle resultierende Aktivierung des Transkriptionsfaktors gemessen. Die daraus resultierende Beeinflussung der Genexpression und die entstehende mRNA wird durch die Gen-Expressionsanalyse (GEA) quantitativ und qualitativ dargestellt. Als Folge der Aktivierung der Zellen entstehendes und sekretiertes IFN- γ wird dann im ELISA detektierbar. Somit lässt sich die gesamte Aktivierungsreaktion der NK-Zelle untersuchen.

Zur genauen qualitativen Feststellung, welche Gene beim Vorgang der Aktivierung von NK-Zellen beteiligt sind sowie zur Quantifizierung der Änderungen der Expression dieser Gene wurden Gen-Expressionsanalysen eingesetzt und für die speziellen Anforderungen angepasst und verfeinert. Untersucht wurden dabei NK-Zellen, die durch Zielzellen zur zytotoxischen Aktivierung angeregt wurden. Als Zielzellen dienten Zellen der K562 Zelllinie, eine aus einer myeloleukämische Blastenkrise stammende erythrozytäre Zellart, die als Standardstimulans zur Aktivierung der zytotoxischen Funktionen bei Immunzellen eingesetzt wird [49].

Bei der Untersuchung eines Aktivierungsmusters empfiehlt sich folgendes Vorgehen: Mit Hilfe von Pathfinder-Arrays werden die vielen hunderte Gene, die aufgrund ihrer Aktivierung in anderen Zellen oder aufgrund ihres Genproduktes in der untersuchten Zellart beteiligt sein könnten, durch Messung von Gengruppen oder eines Vertreters einer Genfamilie (z.B TNF-Rezeptor 1 als Vertreter der verschiedenen TNF-Rezeptoren) untersucht. Dazu werden große Membranen benutzt, auf denen viele Gene zur Untersuchung aufgebracht sind. Sie dienen somit zur Detektion und Eingrenzung der bei der Aktivierung von Zellen beteiligten Gene.

Ergebnisse

Nach der Eingrenzung auf einige, nachweisbar aktivierte Gene durch den Pathfinder werden diese Gene und solche, die eine enge Verwandtschaft mit ihnen besitzen, genau hinsichtlich ihrer quantitativen Veränderung mit Hilfe von Positiv- und Negativkontrollen gemessen.

Die Gen-Expressionsanalysen wurden auf der Basis einer radioaktiven Markierung der cDNA durchgeführt für eine Gruppe von 56 Genen, von denen bekannt ist, dass deren Promotoren bei einer Aktivierung des NF- κ B-Transkriptionsfaktors von diesem gebunden werden und damit in ihrer Expression reguliert werden (Human NF- κ B Pathway-2-GEArray Kit, http://www.superarray.com/gene_array_product/HTML/HS-016.2.html). Auch die Gene, die im Zusammenhang mit dem Ablauf der Apoptose und der Fas-Aktivierung eine entscheidende Rolle spielen sowie die durch die Zytokine TNF- α - und IFN- γ beeinflussten Gene wurden untersucht (HumanApoptosis-5/TNF & Fas Network GEArray Kit, http://www.superarray.com/gene_array_product/HTML/OHS-012.html).

Abbildung 8: Choice Array

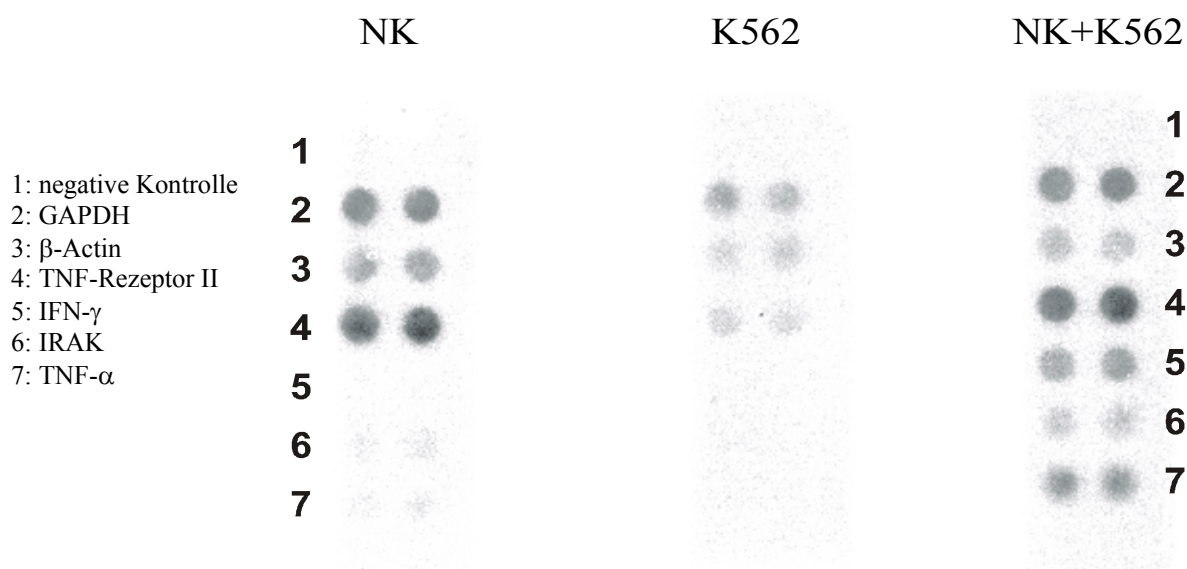


Abbildung 8: GEA Choice Array

NK-Zellen wurden mit K652-Zellen für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die RNA von NK-Zellen, von K562 und NK-Zellen aus der Kultur mit K562 entnommen, die cDNA revers transkribiert, mit 32 P markiert und auf die GEA-Membran hybridisiert. Die in der Abbildung gezeigte repräsentative Untersuchung von n=7 unabhängigen Experimenten zeigt eine Hybridisierung und damit eine Genexpression des untersuchten Genes an. In nativen NK-Zellen und K562 lässt sich eine Ruheexpression von TNF-RII nachweisen. Stimulierte NK-Zellen weisen dagegen eine Expression von TNF-RII, IFN- α , TNF- γ und IRAK auf.

Ergebnisse

In einer weiteren Gen-Expressions-Analyse wurden Gene untersucht, deren Beteiligung bei der Aktivierung von NK-Zellen möglicherweise wichtige Rollen spielen. Deren Gen-Sequenzen wurden aus Gen-Datenbanken ermittelt, die dazugehörige cDNA wurde durch den Anbieter der kommerziellen Gen-Expressions-Analysen zu einem Untersuchungs-Kit zusammengestellt (Customer-Array). Einen solchen repräsentativen Customer-Array von sieben individuellen Experimenten zeigt beispielhaft Abbildung 8.

Bei diesen Versuchen wurden folgende als wichtige, in den Prozess der Aktivierung von NK-Zellen durch Tumorzellen involvierte Gene identifiziert:

TNF- α , IFN- γ , TNF-Rezeptor-II sowie IRAK.

Abbildung 9: Gene Array

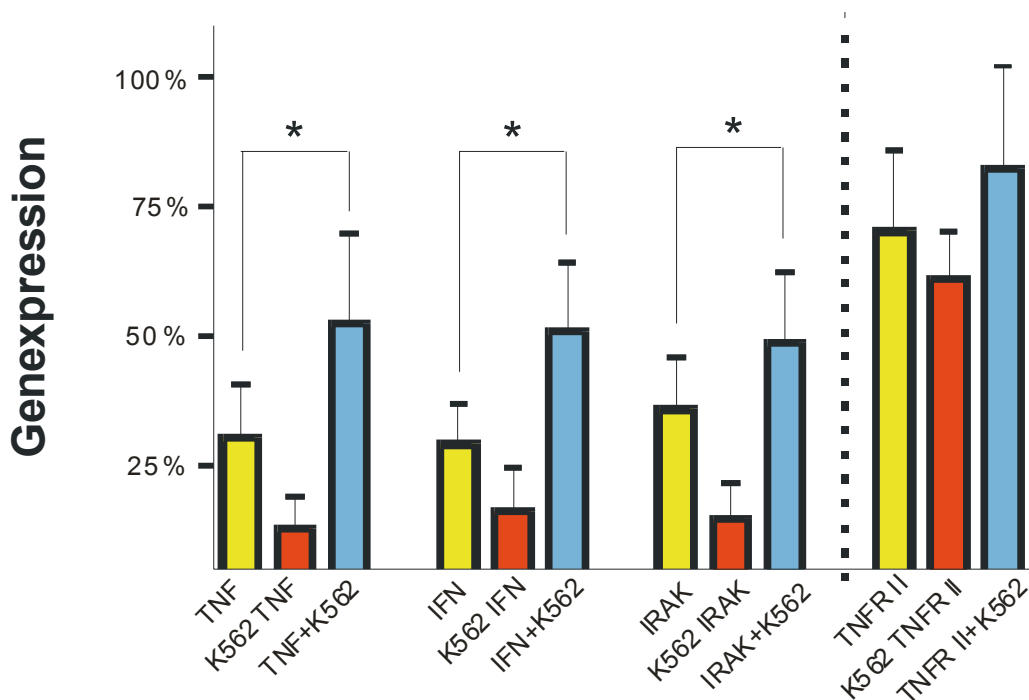


Abbildung 9:

Im Genexpressionsarray wurde die Expression der Gene von TNF- α (1. Gruppe), IFN- γ (2. Gruppe), IRAK (3. Gruppe) und TNF-Rezeptor II (4. Gruppe) in NK-Zellen (gelber Balken), K562-Zielzellen (roter Balken) und mit K562 stimulierten NK-Zellen (blauer Balken) bestimmt. Dargestellt ist die Stärke der Genexpression in Prozent der GAPDH-Expression als Positivkontrolle. Es zeigt sich in stimulierten NK-Zellen eine statistisch signifikante Steigerung der Expression der Gene von TNF- α (von 30 % auf 52 % der GAPDH-Expression), IFN- γ (von 29 % auf 52 %) und IRAK (von 35 % auf 49 %). Die schon in nativen NK-Zellen und auch in K562 nachweisbare Genexpression des TNF-Rezeptors II (70 % bzw. 65 %) ist dagegen in der Summe in stimulierten NK-Zellen verringert (82 %).

In diesen Genen konnten wir eine deutlich nachweisbare Expression detektieren. Diese war im Falle von TNF- α bereits bei unstimulierten NK-Zellen mit 30 % der Expression

Ergebnisse

der Positivkontrolle (GAPDH) vorhanden (Abbildung 9). Eine Stimulierung der NK-Zellen mit K562-Zielzellen sorgte für eine deutliche Steigerung der Expression von TNF- α auf 52 % der Positivkontrolle (Abbildung 9), was einer signifikanten Steigerung gegenüber der Ruheexpression entspricht. IFN- γ liegt in unstimulierten NK-Zellen mit einer Expression von 29 % der Positivkontrolle vor. In stimulierten NK-Zellen lies sich die Expression auf 52 % erhöhen (Abbildung 9). Auch IRAK (Ruheexpression 35 %, nach Stimulierung: 49 %) zeigte eine signifikante Steigerung der Expression nach Stimulierung. Bei dem TNF-Rezeptor-II lies sich eine Steigerung der Expression nachweisen (Ruhe: 70 %, Stimulierung: 82 %), die allerdings nicht signifikant ist. Die Werte entsprechen n=7 Paaren von Experimenten, bestehend jeweils aus Gene-Arrays nativer NK-Zellen, den K562-Zielzellen alleine und mit K562 stimulierten NK-Zellen.

4.10: Die Expression von IRAK, IFN- γ und TNF- α in den Zielzellen ist vernachlässigbar gering

Die auch in den Zielzellen K562 gemessene Genexpression ergab für IRAK, IFN- γ und TNF- α vernachlässigbar geringe Werte von jeweils unter 10 % der Positivkontrollen. Dem gegenüber zeigten die K562-Zellen eine deutliche Genexpression des TNF-Rezeptors-II mit 65 % der Positivkontrolle. Bei der Inkubation von K562 mit NK-Zellen zu deren Stimulierung und anschließender Genexpressionsanalyse kann dabei nicht zwischen RNA von NK-Zellen oder Zielzellen unterschieden werden. Daher kann der Wert der TNF-Rezeptor-II-Expression von 82 % in stimulierten NK-Zellen auch zum Teil den K562-Zellen zugerechnet werden. Allerdings entspricht der in stimulierten NK-Zellen gemessene Wert von 82 % nicht der Summe der in NK-Zellen in Ruhe und K562 gemessenen Expression (70 % bzw. 65 % der Positivkontrolle). Insgesamt scheint die Genexpression des TNF-Rezeptors-II demnach bei Stimulierung reduziert zu werden.

5. Diskussion

Die Produktion und Sekretion von endogenen Mediatoren in NK-Zellen, darunter vor allem die der Zytokine IFN- γ und TNF- α und anderer apoptotisch wirkenden und zur Nekrose führenden Faktoren, stellt eine Schlüsselfunktion von NK-Zellen dar. Mit diesen Faktoren beeinflussen und steuern NK-Zellen parakrin die Immunantwort vieler Immunzellen wie T- und B-Zellen, aber auch Makrophagen und nehmen Teil an der Regulation der Hämatopoese durch Beeinflussung der Differenzierung und Proliferation von Stammzellen im Knochenmark. Nicht zuletzt nutzen NK-Zellen Zytokine zur autokrinen Stimulierung und bestimmen daher über deren zytotoxischen Funktionen gegenüber Tumoren. Das Verständnis der Regulation der Gene dieser Zytokine im Zusammenhang mit einer Aktivierung von NK-Zellen spielt daher eine entscheidende Rolle bei der Untersuchung der Bedeutung von NK-Zellen bei der Immunantwort sowie bei der Konzeption des therapeutischen Einsatzes dieser Zellen im Rahmen der Immuntherapie von Krebserkrankungen.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der Signaltransduktionskette mit dem Schwerpunkt auf den beiden Transkriptionsfaktoren NF-AT und NF- κ B bei der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen von der Ligandenbindung an den Rezeptor bis zur Genexpression als Antwort der Zelle auf den Stimulus. Weiterhin wurde mit der Messung der Zytokinsekretion und der Untersuchung der Genexpression die Folgen der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren eingehend untersucht. Dabei kamen mehrere immunserologische Methoden wie Western blots, Dot blots und ELISA sowie verschiedene molekularbiologische Methoden wie Band shifts (EMSA), Combi blots - eine eigene Weiterentwicklung aus Western blot und Band shift - und Gene Expression Arrays (GEA) zum Einsatz.

Die Transkriptionsfaktoren NF-AT und NF- κ B spielen als ubiquitäre Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle bei sehr vielen physiologischen Prozessen und sind von ganz besonderer Bedeutung bei fast allen Regulationsvorgängen im Immunsystem. Ausgehend vom heutigen Stand der Fachliteratur liegt die Vermutung nahe, dass auch in NK-Zellen bei der natürlichen Zytotoxizität gegen Tumoren diese beiden Transkriptionsfaktoren maßgeblich beteiligt sind. Dabei ist jedoch davon auszugehen, dass die funktionellen Unterschiede zwischen den Zellen des Immunsystems, vor allem zwischen den zytotoxisch wirkenden T- und NK-Zellen, auch auf der Ebene der Signaltransduktion ihren

Diskussion

Niederschlag finden. Daher wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass sich die NF-AT und NF- κ B der NK-Zellen von denen der T-Zellen unterscheiden.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Untersuchungen zeigen, dass die Transkriptionsfaktoren in NK-Zellen bei der Aktivierung der natürlichen Zytotoxizität deutliche Unterschiede zu denen in T-Zellen aufweisen und dass unterschiedliche Genaktivierungsmuster vorhanden sind.

Im Einzelnen legen die Ergebnisse der EMSA-Untersuchungen nahe, dass die Faktoren der NF- κ B-Familie deutlich länger aktiviert im Karyoplasma von NK-Zellen vorliegen und mehr als 18 Stunden aktiviert nachgewiesen werden können (Abbildung 2B). In Experimenten mit den NF-AT-Transkriptionsfaktoren konnte eine gegenüber T-Zellen verzögert einsetzende Aktivierung festgestellt werden. Diese Aktivierung hält in NK-Zellen über bis zu 72 Stunden an, während in T-Zellen bereits nach sechs Stunden bereits der Ruhewert wieder erreicht ist (Abbildung 2A).

Diese zeitliche Verzögerung lässt sich korrelieren mit der verzögerten Sekretion von IFN- γ in NK-Zellen im Vergleich zu T-Zellen (4.8) und könnte diese erklären. Weiter unterstützt werden diese Untersuchungsergebnisse von der beschriebenen Kinetik der mRNA des IFN- γ in NK-Zellen, der zufolge die mRNA des IFN- γ nach Exposition mit verschiedenen Zytokinen nur verzögert im Zytoplasma zu messen ist [21].

In weiteren Untersuchungen wurden die basale Aktivität der Transkriptionsfaktoren in NK-Zellen verglichen mit der in anderen PBMC. Dabei konnte – als ein zentrales Ergebnis der vorliegenden Arbeit - in den nukleären Extrakten unstimulierter NK-Zellen bereits eine hohe basale Bindungsaktivität der Transduktionsfaktoren NF-AT und NF- κ B im Vergleich zu kultivierten NK-Zellen [1], PBMC (Abbildung 1 und 2) und NK-Zell-Linien [85] gemessen werden. Eine potentielle Präaktivierung der NK-Zellen bei der Isolierung der Zellen durch MACS konnte durch CD62L-Messung ausgeschlossen werden. In nativen NK-Zellen muss daher eine hohe konstitutive Expression von NF-AT und NF- κ B vorliegen, was sich gut mit der Fähigkeit von NK-Zellen zur schnellen Lyse von Zielzellen ohne vorherige Sensibilisierung in Einklang bringen lässt [4]. Die von Ye in der NK-Zell-Linie NK3.3 beschriebenen niedrigen Konzentrationen an IFN- γ -mRNA lassen sich möglicherweise auf die längere Kultivierung zurückführen [85]. Kultivierte NK-Zellen verlieren somit vermutlich die hohe basale Expression aktivierter Transkriptionsfaktoren. Neben Unterschieden in der Kinetik der Aktivierung konnten unterschiedliche elektrophoretische Laufeigenschaften der Transkriptionsfaktoren in

Diskussion

NK-Zellen bei den EMSA-Experimenten im Vergleich zu anderen PBMC festgestellt werden. Diese Tatsache lässt sich durch das Vorkommen von unterschiedlichen Varianten der Transkriptionsfaktoren in NK- und T-Zellen erklären. Trotzdem scheinen die unterschiedlichen Signalkaskaden, die bei der zytotoxischen Aktivierung in T-Zellen und NK-Zellen beteiligt sind, in einer gemeinsamen finalen Aktivierung von NF-AT und NF- κ B zu münden. Die Tatsache, dass in beiden Zellarten die Adaptermoleküle ZAP-70 und SYK bei der Aktivierung beteiligt sind [1, 41, 46], erhärtet diese Theorie. Weiterhin exprimieren reife NK-Zellen wie auch T-Zellen mit der CD3 ζ -Kette den Anteil des T-Zell-Rezeptors, der das Aktivierungssignal nach Rezeptorbindung in die Zelle weiterleitet [4]. Ebenso lassen sich weitere vergleichbare Signalmoleküle wie DAP-12 in T- und NK-Zellen finden, die ITAM in ihrem zytoplasmatischen Anteil tragen [46].

Die Ergebnisse der Dot blot-Experimente und Combi blot-Versuche legen die Vermutung nahe, dass mindestens sechs Mitglieder der NF-AT-Familie bei der Aktivierung von NK-Zellen beteiligt sind. Diese unterscheiden sich in ihren Bindeeigenschaften zu den Promotoren der Gene. Die unterschiedlichen Mitglieder wurden als NF-AT-1, 2, 3, 4 und 5 sowie NF-AT-x identifiziert (Abbildung 5 und 6). NF-AT-1-4 spielen im Rahmen der T-Zell-Regulation eine wichtige Rolle, vor allem bei deren Differenzierung. Bei NK-Zellen sind NF-AT-1 und NF-AT-2 in die ADCC involviert [1], während NF-AT-3, 4, 5 und x bislang nicht im Zusammenhang mit der ADCC beschrieben wurden. Diese Transkriptionsfaktoren könnten somit exklusiv in die natürliche Zytotoxizität involviert sein. Die von Serfling nachgewiesenen proapoptotischen Eigenschaften aller bekannter NF-AT-Proteine unterstützen diese Erkenntnis [70].

Die verschiedenen Bindungsaktivitäten und elektrophoretischen Laufeigenschaften in NK-Zellen verglichen mit T-Zellen legen zudem die Schlussfolgerung nahe, dass unterschiedliche Isoformen und/oder Oligomere der NF-AT- und NF- κ B-Proteine bei NK-Zellen und T-Zellen beteiligt sind. Diese Überlegungen werden unterstützt durch die bekannte Eigenschaft der NF-AT-Proteine, Isoformen zu bilden. Bevorzugt entstehen diese Isoformen durch alternatives Splicen am C-Terminus [63]. Weiterhin ist bekannt, dass sich die verschiedenen NF-AT-Moleküle zu Oligomeren zusammenschließen können; dies bevorzugt untereinander, mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 und mit NF- κ B [48]. Insbesondere bei der Bindung der κ 3-Site des TNF- α -Promotors werden solche Oligomere beobachtet [63].

Diskussion

Vermutlich besitzen diese verschiedenen Varianten von Transkriptionsfaktoren auch funktionell unterschiedliche Eigenschaften [62]. Besondere Relevanz hat in diesem Zusammenhang die Frage, ob die Bildung von Isomeren und Isoformen Auswirkungen haben in Bezug auf ihre Beeinflussung der Transkription der Gene verschiedener Cytokine. Aus den vorliegenden Daten und dem elektrophoretischen Laufverhalten bei unseren Versuchen, insbesondere durch die Ergebnisse des Combi blots, lässt sich schließen, dass die oberste Bande im Band shift durch eine Splicevariante des NF-AT-Proteins mit sehr hohem Molekulargewicht hervorgerufen wird (Abbildung 6A). Diese Bande ist durch eine Stimulation der NK-Zellen durch IL-2 induzierbar. Währenddessen scheinen die tiefer liegenden Banden durch NF-AT-Proteine entstehen, die nicht durch IL-2 stimulierbar sind, die also möglicherweise regulatorische und keine zytotoxischen NF-AT-Proteine repräsentieren.

In weiteren Versuchen mit IL-2-stimulierten NK-Zellen binden die NF-AT-Faktoren stärker an das P1-Bindemotiv des IFN- γ -Promotors als an das P2-Bindemotiv, während das Gegenteil in T-Zellen der Fall ist (Abbildung 4). Daraus lässt sich auf unterschiedliche funktionelle Rollen der verschiedenen Bindemotive auf dem IFN- γ -Promotor zurückschließen. Das unterschiedliche Bindungsverhalten kann möglicherweise auch die zeitlich versetzte IFN- γ -Sekretion in NK-Zellen im Vergleich zu T-Zellen auf der molekularen Ebene erklären (Abbildung 7).

Überaus interessant ist darüber hinaus der exklusive Nachweis der Expression von NF-AT-5 in NK-Zellen im Western blot, nicht aber in anderen PBMC (Abbildung 5). Dieser Faktor aus der NF-AT-Familie ist in T-Zellen nicht beschrieben, er scheint daher im Zusammenhang der Zytotoxizität nur in NK-Zellen beteiligt zu sein. NF-AT-5 ist erst vor wenigen Jahren identifiziert worden und unterscheidet sich von den anderen NF-AT-Proteinen durch sein Vorkommen auch außerhalb des Immunsystems, durch Besonderheiten in der Struktur, den Eigenschaften der DNA-Bindung, der Regulation und der Funktion [48, 76]. Eine genauere Untersuchung des Faktors NF-AT-5 in NK-Zellen, insbesondere dessen Beteiligung in der Signalkaskade bei der natürlichen Zytotoxizität, ist daher in weiteren Experimenten der Arbeitsgruppe geplant.

Aus der Familie der NF- κ B-Transkriptionsfaktoren konnten p50, p52 und p65 in NK-Zellen identifiziert und als Produkt nativer NK-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 5). Diese Faktoren sind typischerweise in PBMC aktiviert [32]. Auch für die Mitglieder der NF- κ B-Familie konnten in unseren Experimenten unterschiedliche

Diskussion

elektrophoretische Laufeigenschaften in T-Zellen und NK-Zellen gezeigt werden (Abbildung 1B). Diese können wiederum durch das Vorhandensein verschiedener Splicevarianten und Oligomere erklärt werden. Möglicherweise sind jedoch auch andere als die bisher typischerweise in T-Zellen nachgewiesenen Mitglieder der NF- κ B-Familie beteiligt. Mittlerweile konnten weitere Familienmitglieder dieser Transkriptionsfaktoren beschrieben werden [87]. Ein möglicherweise in NK-Zellen beteiligtes Protein der NF- κ B-Familie wäre c-Rel, dem eine proapoptotische Wirkung nachgewiesen werden konnte [2]. Die Untersuchung und Charakterisierung dieses Faktors stellt einen weiteren wichtigen Schwerpunkt bei den weiteren Forschungsvorhaben in der Arbeitsgruppe dar.

Die beschriebenen unterschiedlichen Verhalten und Eigenschaften der Transkriptionsfaktoren in NK-Zellen und T-Zellen legen die Schlussfolgerung nahe, dass native, unstimulierte NK-Zellen besondere Signaltransduktionswege bei ihrer Aktivierung beschreiten und damit besondere Eigenschaften auf dem Niveau der Transkription haben. Diese Besonderheiten der für die Zellen spezifischen Transkriptionsfaktoren und das Vorhandensein verschiedener Varianten der gleichen Transkriptionsfaktor-Familie können für die unterschiedlichen Sekretionsverhalten von Zytokinen in T- und NK-Zellen verantwortlich gemacht werden. Dabei ist vermutlich insbesondere die verzögert einsetzende, dafür aber verlängert andauernde Sekretion von IFN- γ bedeutend (Abbildung 7). Diesem Zytokin wird eine entscheidende Rolle bei der autokrinen und parakrinen Stimulierung von NK-Zellen [50] und weiteren Zellen des Immunsystems zur Lyse von Zielzellen und weiteren Effektorfunktionen zugesprochen [24].

Zum Erhalt der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen gegenüber Tumorzellen ist NF-AT notwendig, da dieses über einen von NF-AT regulierten Mechanismus verläuft [29]. Weiterhin konnte von Lawrence ein proapoptotischer Effekt nachgewiesen werden [43]. Untersuchungen mit NK-Zellen in Kontakt mit Tumorzellen ergaben ebenfalls eine Korrelation zwischen der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen und dem Aktivierungsstatus von NF-AT: Weiterführende Experimente in unserer Arbeitsgruppe nach Beendigung des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass eine Hemmung von NF-AT durch Cyclosporin A zu einer Hemmung der Bindeaktivität von NF-AT im EMSA führt, und damit zu abnehmender Bandenstärke. Gleichzeitig findet sich unter Cyclosporin A-Gabe eine abnehmende Zytotoxizität der NK-Zellen im Zytotoxizitätstest mit K562-Tumorzelllinien. IL-2 erhöht gleichzeitig mit der Bindungsaktivität von NF-AT auch die Lyserate im Zytotoxizitätstest. Darüber hinaus sind sowohl der IL-2-Effekt als auch der Cyclosporin A-Einfluss unabhängig von dem

Diskussion

Verhältnis der Anzahl von NK-Zellen zu Zielzellen (Effektor-Target-Ratio), wobei die Lyse mit zunehmendem NK-Zell-Überschuss naturgemäß steigt. Diese Untersuchungen belegen erstmalig eindeutig die besondere Bedeutung von NF-AT bei der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen (Publikation wird derzeit angefertigt).

Es liegt daher die Schlussfolgerung nahe, dass mit NF-AT und NF- κ B beide Transkriptionsfaktorfamilien bei der Signaltransduktion in NK-Zellen einen gemeinsamen zytotoxischen Signalweg „formen“. Ein genaueres Verständnis dieser Signalwege stellt möglicherweise eine wichtige Voraussetzung dar für die Modifizierung und erfolgreiche Optimierung des Einsatzes von NK-Zellen als Immuntherapie bei diversen Tumorerkrankungen [27, 28].

Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren führt unmittelbar zur Regulierung verschiedener, in die zytotoxische Aktivität und die Immunregulation involvierter Gene. Die zugrundeliegende Beeinflussung der Genexpression wurde in dieser Arbeit mittels radioaktiver Gen-Expressionsanalysen untersucht. Die bei der natürlichen Zytotoxizität aktivierten Gene konnten auf 4 wichtige Schlüsselgene eingegrenzt werden. Dabei spielt die Expression von TNF- α eine wichtige Rolle. Dieses Zytokin kann mit seinen pro-inflammatorischen und pro-nekrotischen Eigenschaften entscheidend in die auto- und parakrine Regulation der Immunantwort auf Tumorzellen eingreifen und das Tumorstadium wirksam verhindern [61]. Dabei ist NF- κ B als Transkriptionsfaktor beschrieben worden, der den humanen TNF- α -Promotor bindet [77]. Dem entsprechend passt die gemessene Expression des TNF- α -Genes in aktivierten NK-Zellen von 52 % der Positivkontrolle gegenüber einer Ruheexpression von 30 % der Positivkontrolle zu der Wirkung dieses Zytokines. Diese Untersuchung unterstreicht auch die Bedeutung der nachgewiesenen Aktivierung von NF-AT und NF- κ B, die maßgeblich zur Genexpression von TNF- α beitragen.

Weiterhin stark im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen in der Expression gesteigert wurde IFN- γ (29 % in unstimulierten NK-Zellen, nach Stimulation 52 % der Positivkontrolle). Diese Steigerung lässt sich gut mit der zentralen Rolle von IFN- γ im Immunsystem vereinbaren, da dieses Zytokin – neben seinen sonstigen immunregulatorischen Effekten – einen entscheidenden Beitrag zur Kontrolle der Tumorstadium leistet [24, 44]. Dabei lässt sich auch die im ELISA gemessene IFN- γ -Sekretion in NK-Zellen mit den Ergebnissen des EMSA und des Gene-Arrays korrelieren. Somit liegt eine de-novo-Synthese von IFN- γ in stimulierten NK-Zellen vor.

Diskussion

Die Aktivierung der oben genannten Gene erfolgt durch die Transkriptionsfaktoren NF-AT und NF- κ B, die nach Aktivierung an die entsprechenden Promotoren binden können. Somit lässt sich durch unsere Untersuchungen die Kette der Signaltransduktion von der Aktivierung von NF-AT und NF- κ B bis zur Genexpression nachvollziehen.

Die in stimulierten NK-Zellen gesteigerte Genexpression von IRAK (49 % der Positivkontrolle gegenüber 35 % in unstimulierten NK-Zellen) lässt sich einordnen in die Bedeutung der Zytokine bei der autokrinen Stimulation von NK-Zellen, aber auch bei der parakrinen Aktivierung, beispielsweise durch Monozyten und von ihnen sezerniertes IL-1. IRAK als rezeptorassoziiertes Protein des Interleukinrezeptors trägt somit zur Aktivierung von NK-Zellen durch Interleukine bei (Bild 1).

Der nicht signifikanten Steigerung der Expression des TNF-Rezeptors-II kommt möglicherweise eine Bedeutung zu bei dem Schutz der NK-Zellen vor apoptotisch wirkenden Zytokinen bei der Immunantwort. TNF-Rezeptor-II lässt sich eine schützende Wirkung vor oxidativem Stress nachweisen.

Die bei der Genexpressions-Analyse untersuchte RNA entstammt den lysierten Zellen aus der Inkubation von NK-Zellen und K562. Es kann bei dem Versuchsansatz nicht zwischen der RNA aus NK-Zellen und Zielzellen unterschieden werden. Daher dienen Untersuchungen der Genexpression in ruhenden NK-Zellen und reinen K562-Zellen als Vergleich. Der bei den bisher untersuchten Genen vernachlässigbare Anteil der Genexpression durch die K562-Zielzellen (IFN- γ , TNF- α und IRAK jeweils <10 % der Positivkontrollen) spielt bei TNF-Rezeptor-II eine deutlichere Rolle. So konnte auch in K562 eine deutliche Expression von TNF-Rezeptor-II nachgewiesen werden (65 %). Diese dient wahrscheinlich ebenfalls dem Schutz der Tumorzellen vor deren Lyse. Bemerkenswert ist daher, dass die Ruheexpression in NK-Zellen von 70 % und die der K562 bei einer Inkubation und Untersuchung beider Zellen zusammen mit 82 % zwar recht stark ist, nicht aber der Summe der Werte aus unstimulierten Zellen entspricht. Es findet also per Saldo ein Rückgang der TNF-Rezeptor-II-Expression statt. Mit diesem Rückgang der Expression kann möglicherweise die Lyse der Tumorzellen gesteigert werden.

Die hier vorgestellten Ergebnisse, die im November 2002 in Strasbourg auf dem jährlichen Treffen der französisch-japanischen Gesellschaft für Immunologie in Posterform und mündlich vorgestellt wurden sowie als Veröffentlichung im Journal of Leukocyte Biology eingereicht sind, lassen sich insgesamt sehr gut in die bisherigen Erkenntnisse über NK-Zellen einordnen, erweitern die Kenntnisse über deren zytotoxischen Eigenschaften

Diskussion

und ermöglichen ein genaueres Bild über die Regulation der Abwehr von Tumoren durch NK-Zellen. Dies ist notwendig, um das Verständnis der Biologie dieses wichtigen Trägers der Immunabwehr gegen Tumorzellen und virusinfizierte Zellen zu erweitern. Die weitere Entwicklung des experimentellen Einsatzes von NK-Zellen in Form von isolierten und proliferierten Zellen aus Fremd- oder Eigenblut, oder auch in Form der endogenen Stimulierung körpereigener NK-Zellen durch Gabe von hochdosiertem IL-2 zur Anregung der zytotoxischen Aktivität ist abhängig von einem besseren Verständnis der NK-Zell-Biologie und lässt sich dadurch möglicherweise weiter optimieren.

6. Zusammenfassung

NK-Zellen sind aufgrund ihrer Fähigkeit, maligne entartete Zellen gezielt zu erkennen und mit Hilfe der zytotoxischen Aktivität zu zerstören, eine vielversprechende Option bei der experimentellen Therapie von Krebserkrankungen und werden am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin im Rahmen eines therapeutischen Heilversuches in aufgereinigter und expandierter Form zur Therapie verschiedener maligner Erkrankungen, insbesondere beim Nierenzellkarzinom, transfundiert.

Eine genaue Beschreibung und vertiefte Betrachtung der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen stellt dabei eine Notwendigkeit bei der Optimierung der Immuntherapie dar. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Signaltransduktion in NK-Zellen, die zur Initiierung der natürlichen Zytotoxizität führt, untersucht. Im Zentrum der Untersuchungen standen die beiden ubiquitären, für das Immunsystem wichtigsten Transkriptionsfaktoren NF-AT und NF- κ B, die auch in NK-Zellen eine entscheidende Rolle spielen sollten. Dabei kamen folgende, größtenteils am Campus Lübeck neu etablierte Methoden zum Einsatz: EMSA, Western blot, ELISA, Combi blot und Gene Expression Arrays.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen ein spezielles Repertoire von NF-AT und NF- κ B im Vergleich zu T-Zellen besitzen. Vermutlich bilden die mit Hilfe der Combi blot-Technik eindeutig identifizierten Mitglieder der NF-AT und NF- κ B-Familie besondere Splice-Varianten und/oder Oligomere aus, die eine Schlüsselfunktion bei der Zytotoxizität spielen könnten. Darüber hinaus wurde ein im Vergleich zu T-Zellen diskrepantes Bindungsmuster im IFN- γ -Promotor nachgewiesen, das für die zeitlich verlängerte Sekretion dieses für die NK-Zell-Funktion wichtigsten Zytokins im Vergleich zu PBMC verantwortliche sein könnte. Weiterhin wurde die Änderung der Genexpression in stimulierten NK-Zellen als Resultat der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-AT und NF- κ B untersucht. Dazu dienten Gene Expression Arrays, mit deren Hilfe mehrere, bei der Aktivierung von NK-Zellen regulierte Gene nachgewiesen werden konnten. Dazu gehören insbesondere die Gene von TNF- α , IRAK, IFN- γ und TNF-RII.

Insgesamt gelang es, die an der zytotoxischen Aktivität gegenüber Tumorzellen beteiligten Transkriptionsfaktoren in NK-Zellen detailliert zu charakterisieren. Aus diesem vertieften Verständnis können möglicherweise Rückschlüsse zur Optimierung der Immuntherapie maligner Erkrankungen gewonnen werden.

7. Literatur

- (1) Aramburu J, Azzoni L, Rao A, Perussia B: Activation and expression of the nuclear factors of activated T cells, NFATp and NFATc, in human natural killer cells: regulation upon CD16 ligand binding. *J Exp Med* 1995; 182:801-810.
- (2) Baeuerle PA, Baltimore D: NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996; 87:13-20.
- (3) Ballester OF, Fang T, Raptis A, Ballester G, Wilcox P, Hiemenz J, Tan B: Adoptive immunotherapy with donor lymphocyte infusions and interleukin-2 after high-dose therapy and autologous stem cell rescue for multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34:419-423.
- (4) Barao I, Ascensao JL: Human natural killer cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1998; 46:213-229.
- (5) Barnes PJ, Karin M: Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336:1066-1071.
- (6) Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T: Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999; 285:727-729.
- (7) Biassoni R, Cantoni C, Falco M, Verdiani S, Bottino C, Vitale M, Conte R, Poggi A, Moretta A, Moretta L: The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions. *J Exp Med* 1996; 183:645-650.
- (8) Blery M, Olcese L, Vivier E: Early signaling via inhibitory and activating NK receptors. *Hum Immunol* 2000; 61:51-64.
- (9) Bottino C, Sivori S, Vitale M, Cantoni C, Falco M, Pende D, Morelli L, Augugliaro R, Semenzato G, Biassoni R, Moretta L, Moretta A: A novel surface molecule homologous to the p58/p50 family of receptors is selectively expressed on a subset of human natural killer cells and induces both triggering of cell functions and proliferation. *Eur J Immunol* 1996; 26:1816-1824.
- (10) Brand JM, Meller B, Von Hof K, Luhm J, Bahre M, Kirchner H, Frohn C: Kinetics and organ distribution of allogeneic natural killer lymphocytes transfused into patients suffering from renal cell carcinoma. *Stem Cells Dev* 2004; 13:307-314.
- (11) Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FC, Kim IF, Markowitz V, Matese JC, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Schulze-Kremer S, Stewart J, Taylor R, Vilo J, Vingron M: Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* 2001; 29: 365-371.
- (12) Bubenik J: MHC class I down-regulation: tumour escape from immune surveillance? (review). *Int J Oncol* 2004; 25:487-491.

Literaturverzeichnis

- (13) Campbell PM, Pimm J, Ramassar V, Halloran PF: Identification of a calcium-inducible, cyclosporine sensitive element in the IFN-gamma promoter that is a potential NFAT binding site. *Transplantation* 1996; 61:933-939.
- (14) Cantoni C, Bottino C, Vitale M, Pessino A, Augugliaro R, Malaspina A, Parolini S, Moretta L, Moretta A, Biassoni R: NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med* 1999; 189:787-796.
- (15) Carson WE, Parihar R, Lindemann MJ, Personeni N, Dierksheide J, Meropol NJ, Baselga J, Caligiuri MA: Interleukin-2 enhances the natural killer cell response to Herceptin-coated Her2/neu-positive breast cancer cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 3016-3025.
- (16) Chakraborty NG, Chattopadhyay S, Mehrotra S, Chhabra A, Mukherji B: Regulatory T-cell response and tumor vaccine-induced cytotoxic T lymphocytes in human melanoma. *Hum Immunol* 2004; 65:794-802.
- (17) Cockerill GW, Bert AG, Ryan GR, Gamble JR, Vadas MA, Cockerill PN: Regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and E-selectin expression in endothelial cells by cyclosporin A and the T-cell transcription factor NFAT. *Blood* 1995; 86:2689-2698.
- (18) Colonna M, Navarro F, Bellon T, Llano M, Garcia P, Samaridis J, Angman L, Cella M, Lopez-Botet M: A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* 1997; 186:1809-1818.
- (19) Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA: The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; 22:633-640.
- (20) Corthesy B, Kao PN: Purification by DNA affinity chromatography of two polypeptides that contact the NF-AT DNA binding site in the interleukin 2 promoter. *J Biol Chem* 1994; 269:20682-20690.
- (21) de Wit H, Hoogstraten D, Halie RM, Vellenga E: Interferon-gamma modulates the lipopolysaccharide-induced expression of AP-1 and NF-kappa B at the mRNA and protein level in human monocytes. *Exp Hematol* 1996; 24:228-235.
- (22) Demczuk S, Harbers M, Vennstrom B: Identification and analysis of all components of a gel retardation assay by combination with immunoblotting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:2574-2578.
- (23) Drouet C, Arvieux C, Devouassoux G, Csopaki F, Chavanon O, Brichon PY, Letoublon C, Zarski JP, Barnoud D, Pison C: EBV-B cells as antigen presenting cells in characterization of the self/donor context of allorecognition by T lymphocytes. *Transpl Immunol* 1998; 6:209-215.
- (24) Fantuzzi G, Dinarello CA: Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J Clin Immunol* 1999; 19:1-11.

Literaturverzeichnis

- (25) Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA: Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002; 100:1935-1947.
- (26) Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ, VanDeusen JB, Whitman SP, Cooper MA, Suzuki K, Wechsler M, Goodsaid F, Caligiuri MA: Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol* 1999; 162:4511-4520.
- (27) Frohn C, Doehn C, Durek C, Bohle A, Schlenke P, Jocham D, Kirchner H: Feasibility of the adoptive transfusion of allogenic human leukocyte antigen-matched natural killer cells in patients with renal cell carcinoma. *J Immunother* 2000; 23:499-504.
- (28) Frohn C, Hoppner M, Schlenke P, Kirchner H, Koritke P, Luhm J: Anti-myeloma activity of natural killer lymphocytes. *Br J Haematol* 2002; 119:660-664.
- (29) Furunke K, Burd PR, Horvath AJ, Hori K, Mostowski H, Bloom ET: Human NK cells express endothelial nitric oxide synthase, and nitric oxide protects them from activation-induced cell death by regulating expression of TNF-alpha. *J Immunol* 1999; 163:1473-1480.
- (30) Gobin SJ, van den Elsen PJ: Transcriptional regulation of the MHC class Ib genes HLA-E, HLA-F, and HLA-G. *Hum Immunol* 2000; 61:1102-1107.
- (31) Graziano RF, Fanger MW: Fc gamma RI and Fc gamma RII on monocytes and granulocytes are cytotoxic trigger molecules for tumor cells. *J Immunol* 1987; 139:3536-3541.
- (32) Hatada EN, Krappmann D, Scheidereit C: NF-kappaB and the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:52-58.
- (33) Ho AM, Jain J, Rao A, Hogan PG: Expression of the transcription factor NFATp in a neuronal cell line and in the murine nervous system. *J Biol Chem* 1994; 269:28181-28186.
- (34) Hoey T, Sun YL, Williamson K, Xu X: Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins. *Immunity* 1995; 2:461-472.
- (35) Houchins JP, Lanier LL, Niemi EC, Phillips JH, Ryan JC: Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C. *J Immunol* 1997; 158:3603-3609.
- (36) Jain J, Burgeon E, Badalian TM, Hogan PG, Rao A: A similar DNA-binding motif in NFAT family proteins and the Rel homology region. *J Biol Chem* 1995; 270:4138-4145.
- (37) Kashii Y, Giorda R, Herberman RB, Whiteside TL, Vujanovic NL: Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J Immunol* 1999; 163:5358-5366.

Literaturverzeichnis

- (38) Kelly K, Siebenlist U: Immediate-early genes induced by antigen receptor stimulation. *Curr Opin Immunol* 1995; 7:327-332.
- (39) Kim KB, Eton O, East MJ, Hodges C, Papadopoulos NE, Grimm EA, Bedikian AY: Pilot study of high-dose, concurrent biochemotherapy for advanced melanoma. *Cancer* 2004; 101:596-603.
- (40) Langland JO, Kao PN, Jacobs BL: Nuclear factor-90 of activated T-cells: A double-stranded RNA-binding protein and substrate for the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *Biochemistry* 1999; 38:6361-6368.
- (41) Lanier LL: Turning on natural killer cells. *J Exp Med* 2000; 191:1259-1262.
- (42) Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH: The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1986; 136:4480-4486.
- (43) Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA: Possible new role for NF- κ B in the resolution of inflammation. *Nature Medicine* 2001; 7:1291-1297.
- (44) Lee JK, Sayers TJ, Brooks AD, Back TC, Young HA, Komschlies KL, Wigginton JM, Wiltout RH: IFN-gamma-dependent delay of in vivo tumor progression by Fas overexpression on murine renal cancer cells. *J Immunol* 2000; 164:231-239.
- (45) Lee MO, Kang HJ, Kim YM, Oum JH, Park J: Repression of FasL expression by retinoic acid involves a novel mechanism of inhibition of transactivation function of the nuclear factors of activated T-cells. *Eur J Biochem* 2002; 269:1162-1170.
- (46) Leibson PJ: Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity* 1997; 6:655-661.
- (47) Ljunggren HG, Karre K: Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Med* 1985; 162:1745-1759.
- (48) Lopez-Rodriguez C, Aramburu J, Rakeman AS, Rao A: NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:7214-7219.
- (49) Lozzio CB, Lozzio BB: Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 1975; 45:321-334.
- (50) Luhm J, Kirchner H, Rink L: One-way synergistic effect of low superantigen concentrations on lipopolysaccharide-induced cytokine production. *J Interferon Cytokine Res* 1997; 17:229-238.
- (51) Luhm J: Untersuchungen zur biologischen Aktivität und Wechselwirkungen von Lipopolysacchariden und Superantigenen. Dissertation aus der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Lübeck, 1999.
- (52) Luhm J, Brand JM, Koritke P, Hoppner M, Kirchner H, Frohn C: Large-scale generation of natural killer lymphocytes for clinical application. *J Hematother Stem Cell Res* 2002; 11:651-657.

Literaturverzeichnis

- (53) Luhm J, Schromm AB, Seydel U, Brandenburg K, Wellinghausen N, Riedel E, Schumann RR, Rink L: Hypothermia enhances the biological activity of lipopolysaccharide by altering its fluidity state. *Eur J Biochem* 1998; 256:325-333.
- (54) Luo C, Shaw KT, Raghavan A, Aramburu J, Garcia-Cozar F, Perrino BA, Hogan PG, Rao A: Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:8907-8912.
- (55) Malewicz M, Zeller N, Yilmaz ZB, Weih F: NF kappa B controls the balance between Fas and tumor necrosis factor cell death pathways during T cell receptor-induced apoptosis via the expression of its target gene A20. *J Biol Chem* 2003; 278:32825-32833.
- (56) Matsuda M, Hashimoto Y, Muroya K, Hasegawa H, Kurata T, Tanaka S, Nakamura S, Hattori S: CRK protein binds to two guanine nucleotide-releasing proteins for the Ras family and modulates nerve growth factor-induced activation of Ras in PC12 cells. *Mol Cell Biol* 1994; 14:5495-5500.
- (57) Meller B, Frohn C, Brand JM, Lauer I, Schelper LF, Von Hof K, Kirchner H, Richter E, Baehre M: Monitoring of a new approach of immunotherapy with allogenic (111)In-labelled NK cells in patients with renal cell carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004; 31:403-407.
- (58) Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L: Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:197-223.
- (59) Olcese L, Cambiaggi A, Semenzato G, Bottino C, Moretta A, Vivier E: Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells. *J Immunol* 1997; 158:5083-5086.
- (60) Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, Marcenaro E, Accame L, Malaspina A, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A: Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 1999; 190:1505-1516.
- (61) Prevost-Blondel A, Roth E, Rosenthal FM, Pircher H: Crucial role of TNF-alpha in CD8 T cell-mediated elimination of 3LL-A9 Lewis lung carcinoma cells in vivo. *J Immunol* 2000; 164:3645-3651.
- (62) Rao A: NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today* 1994; 15:274-281.
- (63) Rao A, Luo C, Hogan PG: Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:707-747.
- (64) Robertson MJ, Ritz J: Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990; 76:2421-2438.

Literaturverzeichnis

- (65) Rolle A, Mousavi-Jazi M, Eriksson M, Odeberg J, Soderberg-Naucler C, Cosman D, Karre K, Cerboni C: Effects of human cytomegalovirus infection on ligands for the activating NKG2D receptor of NK cells: up-regulation of UL16-binding protein (ULBP)1 and ULBP2 is counteracted by the viral UL16 protein. *J Immunol* 2003; 171:902-908.
- (66) Schober I, Braun R, Reiser H, Munk K, Leroux M, Kirchner H: Ia-positive T lymphocytes are the producer cells of interferon gamma. *Exp Cell Res* 1984; 152:348-356.
- (67) Selvakumar A, Steffens U, Dupont B: NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains. *Tissue Antigens* 1996; 48:285-294.
- (68) Semino C, Martini L, Queirolo P, Cangemi G, Costa R, Alloisio A, Ferlazzo G, Sertoli MR, Reali UM, Ratto GB, Melioli G: Adoptive immunotherapy of advanced solid tumors: an eight year clinical experience. *Anticancer Res* 1999; 19:5645-5649.
- (69) Sen R, Baltimore D: Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986; 47:921-928.
- (70) Serfling E, Berberich-Siebelt F, Chuvpilo S, Jankevics E, Klein-Hessling S, Twardzik T, Avots A: The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim Biophys Acta* 2000;1498:1-18.
- (71) Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR: Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 1988; 241:202-205.
- (72) Shibuya H, Taniguchi T: Identification of multiple cis-elements and trans-acting factors involved in the induced expression of human IL-2 gene. *Nucleic Acids Res* 1989; 17:9173-9184.
- (73) Sica A, Dorman L, Viggiano V, Cippitelli M, Ghosh P, Rice N, Young HA: Interaction of NF-kappaB and NFAT with the interferon-gamma promoter. *J Biol Chem* 1997; 272:30412-30420.
- (74) Sivori S, Pende D, Bottino C, Marcenaro E, Pessino A, Biassoni R, Moretta L, Moretta A: NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol* 1999; 29:1656-1666.
- (75) Torgerson TR, Colosia AD, Donahue JP, Lin YZ, Hawiger J: Regulation of NF-kappa B, AP-1, NFAT, and STAT1 nuclear import in T lymphocytes by noninvasive delivery of peptide carrying the nuclear localization sequence of NF-kappa B p50. *J Immunol* 1998; 161:6084-6092.
- (76) Trama J, Lu Q, Hawley RG, Ho SN: The NFAT-related protein NFATL1 (TonEBP/NFAT5) is induced upon T cell activation in a calcineurin-dependent manner. *J Immunol* 2000; 165:4884-4894.

Literaturverzeichnis

- (77) Trede N, Tsytsykova A, Chatila T, Goldfeld A, Geha R: Transkriptional activation of the human TNF- α promoter by superantigen in human monocytic cells. *J Immunol* 1995; 155:902-908.
- (78) Trede NS, Castigli E, Geha RS, Chatila T: Microbial superantigens induce NF-kappa B in the human monocytic cell line THP-1. *J Immunol* 1993; 150:5604-5613.
- (79) Trinchieri G: Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989; 47:187-376.
- (80) Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, Augugliaro R, Moretta L, Moretta A: NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 1998; 187:2065-2072.
- (81) Wada H, Matsumoto N, Maenaka K, Suzuki K, Yamamoto K: The inhibitory NK cell receptor CD94/NKG2A and the activating receptor CD94/NKG2C bind the top of HLA-E through mostly shared but partly distinct sets of HLA-E residues. *Eur J Immunol* 2004; 34:81-90.
- (82) Wellinghausen N, Martin M, Rink L: Zinc inhibits interleukin-1-dependent T cell stimulation. *Eur J Immunol* 1997; 27:2529-2535.
- (83) Wu J, Lanier LL: Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res* 2003; 90:127-156.
- (84) Yao L, Sgadari C, Furuke K, Bloom ET, Teruya-Feldstein J, Tosato G: Contribution of natural killer cells to inhibition of angiogenesis by interleukin-12. *Blood* 1999; 93:1612-1621.
- (85) Ye J, Ortaldo JR, Conlon K, Winkler-Pickett R, Young HA: Cellular and molecular mechanisms of IFN-gamma production induced by IL-2 and IL-12 in a human NK cell line. *J Leukoc Biol* 1995; 58:225-233.
- (86) Yoon SJ, Heo DS, Kang JO, Lee SG, Kim CD, Sung MW, Kim NK: Synergistic anti-tumor effects with co-expression of GM-CSF and IFN-gamma in murine tumors. *Int J Cancer* 1998; 77:907-912.
- (87) Ziegler HH: Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide. *J Inflamm* 1995; 45:13-26.

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Holger Kirchner möchte ich danken für die Möglichkeit, am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin eine Dissertation anfertigen zu dürfen. Die außerordentlich guten Bedingungen in diesem Institut, die freundliche Atmosphäre, die exzellenten Mitarbeiter und die wohlwollende Unterstützung haben die Arbeit dort sehr fruchtbar und angenehm gestaltet.

Dr. Jürgen Luhm gebührt der größte Dank für die mit ihm verbrachten Jahre am Institut, seine durchgehend gute Laune, seine Einführung in die Forschung und die Bereitschaft, die Arbeit auch auf die Entfernung zu finalisieren.

Petra Koritke und Petra Glessing haben mir durch ihren Einsatz und die Weitergabe ihrer beeindruckenden Kenntnisse und Fähigkeiten im Umgang mit NK-Zellen und anderen Techniken die Arbeit deutlich erleichtert bzw erst ermöglicht. Katharina Cziupka sowie allen weiteren Doktoranden und Laboranten am Institut danke ich für ihre Hilfe und die freundschaftliche Stimmung im Labor.

Zita danke ich für die guten Jahre in Lübeck, ihre Besuche und Telefonate aus dem Gastrolabor, die Ablenkung nach getaner Arbeit und vieles weitere.

Danken möchte ich natürlich auch meinen Eltern und Freunden für Ihre Unterstützung und Ermunterung.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Langenkamp
Vorname: Ulrich
Geburtsdatum, -ort: 29.01.1976 in Trier

Schul- und Hochschulbildung:

1982-1986: Grundschule Heiligkreuz, Trier
1986-1994: Auguste-Victoria-Gymnasium Trier
1994-1995: Annette-von-Droste-Hülshoff-Gymnasium, Münster
1996-1997: Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1997-1999: Humanmedizin an der Semmelweis medizinischen Universität in Budapest/Ungarn, vorklinischer Abschnitt
1999-2000: Studium an der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung 08.2000
2000-2004: Studium an der Universität zu Lübeck
2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung 10.2002
3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung 04.2004

Praktisches Studienjahr:

02.2003-05.2003: Chirurgisches Tertial am Kantonsspital Luzern
06.2002-09.2003: Medizinisches Tertial in Hämatologie/Onkologie in Louisville, USA und Kardiologie in St. John's, Kanada
10.2003-02.2004: Wahltertial Neurochirurgie in Aarau und Hangzhou, China

Zivildienst:

09.1995-10.1996: Kardiochirurgische Klinik „Links der Weser“, Bremen
Kardiologische Klinik im Deutschen Herzzentrum München

Promotion:

Seit 10.2000: Dissertation im Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin (Direktor: Prof. Dr. Holger Kirchner) über die Signaltransduktion in NK-Zellen während der natürlichen Zytotoxizität

Aktuelle Tätigkeit:

Seit 07.2004: Institut für experimentelle Hämatologie der Universität Basel