

**Aus dem Interfakultären Institut für Zellbiologie der Universität
Tübingen
Abteilung Immunologie
Abteilungsleiter: Professor Dr. H.-G. Rammensee**

**Zelloberflächenexpression und Freisetzung von
Liganden des Immunrezeptors NKG2D bei verschiedenen
hämatologischen Tumoren**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Holger Antropius
aus Stuttgart**

2006

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Professor Dr. H.-G. Rammensee

2. Berichterstatter:

Professor Dr. K. Jaschonek

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Das Immunsystem	4
1.2	Komponenten der angeborenen Immunität	6
1.3	Natürliche Killerzellen	9
1.3.1	NK-Zellen: Molekulare Mechanismen und Funktion	9
1.3.2	Cytotoxizität von NK-Zellen	9
1.3.3	NK-Zell-Erkennung von Selbst und Nicht-Selbst	10
1.3.4	NKG2D und seine Liganden bei Mensch und Maus	11
1.3.5	Die Rolle von NKG2D	14
1.4	Leukämien	15
1.4.1	Akute myeloische Leukämie (AML)	16
1.4.2	Akute lymphoblastische Leukämie (ALL)	18
1.4.3	Chronisch myeloische Leukämie (CML)	19
1.4.4	Chronisch lymphatische Leukämie (CLL)	21
2	Ziele der vorliegenden Arbeit.....	22
3	Material und Methoden	23
3.1	Patientenproben und Zellkulturen	23
3.1.1	Patientenproben	23
3.1.2	Isolierung von PBMC von Patienten	23
3.1.3	Gewinnung von Patientenserum	24
3.1.4	Leukämiezelllinien	24
3.1.5	Auftauen und Einfrieren von Zellen	24
3.2	Durchflußcytometrie	24
3.2.1	Verwendete Antikörper	24
3.3	ELISA	25
4	Ergebnisse	27
4.1	Charakteristika der untersuchten Patienten	27
4.2	Spezifität der NKG2DL mAb und ELISA	28
4.3	Expression der NKG2DL auf Leukämiezelllinien	31
4.4	Expression von NKG2DL auf Patientenleukämiezellen	32
4.5	NK-Erkennung von Leukämiezellen via NKG2D	33
4.6	Serumspiegel von löslichem MICA und MICB	34
5	Diskussion.....	38
6	Zusammenfassung	42
7	Literatur	43
8	Abkürzungen.....	51
9	Danksagung.....	53
10	Curriculum Vitae.....	54

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein Organsystem, das die Körperstofflichkeit unentwegt wahrnimmt und zwischen fremd und eigen unterscheidet. Es ist ein vielfältig differenziertes System, angefangen mit der Haut, die eine physische, chemische und mikrobiologische Grenze zwischen dem Körperinneren und der Umwelt bildet, den Schleimhautepithelien und dem Komplementsystem, bis hin zu sehr spezialisierten Zellen und Mechanismen. Die verschiedenen Funktionen können in zwei große Gruppen unterteilt werden, in die angeborene und in die erworbene Immunität. Wichtige Organe des Immunsystems sind das Knochenmark, in dem alle Vorläuferzellen des Immunsystems aus Stammzellen entstehen, der Thymus, als Ort der T-Zellreifung, und das periphere, lymphatische Gewebe bestehend aus: Milz und Lymphknoten.

Die angeborene Immunität basiert auf Wirkmechanismen, die die Krankheitserreger sofort nach Kontakt an Wachstum und Ausbreitung hindern und für das Immunsystem markieren. Phagozyten können über verschiedene Rezeptoren, die allgemein vorkommende Bausteine von Pathogenen erkennen, Krankheitserreger identifizieren und eliminieren. Häufig gelingt es so, das Pathogen zu beseitigen, ohne dass es überhaupt zu einer Infektion kommt. Werden neue oder stark veränderte Pathogenstrukturen ausgebildet, reicht das angeborene Immunsystem alleine oft nicht aus, um diese zu erkennen und zu beseitigen.

Die Aktivierung des spezifischen Immunsystems ist eine weitere Aufgabe der angeborenen Immunität. Zur angeborenen Immunität gehören das Komplementsystem, die Natürlichen Killerzellen und die Granulozyten.

Träger der erworbenen Immunität sind B- und T-Zellen. Diese sind durch die Ausbildung von hochvariablen Rezeptoren in der Lage spezifische Epitope von Fremdantigenen zu erkennen und darauf zu reagieren. Ein weiteres Charakteristikum derselben ist das immunologische Gedächtnis, welches es bei erneutem Kontakt mit einem bereits bekannten Antigen erlaubt, empfindlicher und vor allem schneller zu

reagieren. Dies wird durch die klonale Selektion von Lymphozyten ermöglicht, die das zentrale Prinzip der erworbenen Immunität darstellt. Man versteht darunter, dass jeder Lymphozyt einen Rezeptortyp exprimiert, der an seiner Antigenbindungsstelle *eine* ganz spezifische Molekülkonfiguration aufweist. Bindet eine dieser Zellen ihr Antigen, teilt sie sich daraufhin, und es entstehen Klone der Ursprungszelle, deren Rezeptoren alle dasselbe Antigen binden und so bekämpfen können.

Wir können weiterhin zwei Reaktionen des Wirts unterscheiden, die einen Krankheitserreger bekämpfen. Erstens: Die humorale Immunität. Sie wird durch Antikörper vermittelt. Sie werden von B-Zellen sezerniert, die nach Kontakt mit einem spezifischen Antigen zu Effektorzellen werden und dann als Plasmazellen bezeichnet werden. Diese Antikörper geben in allen extrazellulären Kompartimenten Schutz vor Pathogenen. Zweitens: Die zelluläre Immunität. Sie beruht auf der schützenden Funktion von T-Zellen und auf ihrer Fähigkeit, Zellen zu erkennen, die Krankheitserreger beherbergen oder deren Produkte aufgenommen haben. T-Zellen erkennen Peptidfragmente von Proteinen, die auf Haupthistokompatibilitätskomplex- (Major Histocompatibility Complex, MHC)-Molekülen an der Zelloberfläche von Zellen präsentiert werden. Dabei kann man zwischen $CD4^+$ -T-Zellen und zwischen $CD8^+$ -T-Zellen unterscheiden. $CD4^+$ -T-Zellen erkennen hauptsächlich extrazelluläre Antigene, die von antigenpräsentierenden Zellen phagozytiert und dann auf MHC Klasse II-Molekülen präsentiert werden, wohingegen $CD8^+$ -T-Zellen intrazelluläre Peptide in Verbindung mit MHC Klasse I-Molekülen erkennen.

Eine der wichtigsten Fähigkeiten des Immunsystems ist die Unterscheidung zwischen fremden und eigenen Strukturen. Ein sich im Thymus entwickelnder Lymphozyt wird ausgeschaltet, wenn er Selbst-Peptide auf MHC-Molekülen erkennt. Allerdings werden nicht alle körpereigenen Peptide im Thymus exprimiert. Proteine, die sich in anderen Geweben entwickeln oder in anderen Entwicklungsstadien, zum Beispiel, nach der Pubertät, exprimiert werden, treffen auch auf reife Lymphozyten, die potentiell auf sie reagieren können.

Außerdem muss das Immunsystem in der Lage sein, die Gefahr für den Organismus durch Fremdstrukturen zu beurteilen. Die meisten Proteine der Nahrung, die dem Immunsystem der Schleimhaut präsentiert werden, führen in der Regel zu einem Zustand, in dem das System nicht in einer aktiven, spezifischen Weise anspricht,

sondern eher gehemmt wird [1, 2]. Dieses Phänomen bezeichnet man als orale Toleranz. Injiziert man jedoch das gleiche Protein subkutan in die Haut, kommt es zu einer deutlichen Abwehrreaktion. Ein weiteres Beispiel hierfür spiegelt sich in der Tatsache wieder, dass wir über 400 Bakterienspezies in uns beherbergen, die im Dickdarm und Dünndarm die natürliche Bakterienflora bilden und die für den Organismus normalerweise keine Gefahr darstellen. Unter bestimmten Umständen können auch die normalen Darmbewohner zu Erkrankungen führen, wenn die Schleimhaut, die den Darm auskleidet, nicht mehr intakt ist. In solchen Fällen gelangt das „harmlose“ Bakterium *Escherichia coli* durch die Schleimhaut in den Blutstrom und kann tödliche systemische Erkrankungen verursachen [3]. Das Immunsystem gliedert sich also in verschiedene Bereiche, in denen entweder eine Symbiose mit den aus der Umwelt stammenden Organismen ermöglicht wird oder aber der Grad der Aufmerksamkeit für Antigene und deren Abwehr gesteigert ist.

1.2 Komponenten der angeborenen Immunität

Die meisten Mikroorganismen, denen der Körper täglich ausgesetzt ist, verursachen keine erkennbare Krankheit, weil sie innerhalb kurzer Zeit durch Abwehrmechanismen erkannt und zerstört werden, die keine lange Anlaufzeit benötigen und nicht auf dem Prinzip der klonalen Selektion beruhen. Dies sind die Mechanismen der angeborenen Immunität. Sie basieren bei Makrophagen und Granulozyten auf keimbahnkodierten Rezeptoren, die ubiquitär vorkommende Muster verschiedener Mikroorganismen erkennen.

Die Haut ist das größte Organ des Körpers und die Schleimhäute sind ontogenetisch aus ihr hervorgegangen. Beide zusammen bilden eine enorm große Fläche über die der Stoffaustausch mit der Umwelt erfolgt. Gleichzeitig bilden sie ein wirksames Hindernis für eindringende Pathogene. Durch feste Zellverbindungen der Epithelien, eine Hornschicht und den die Haut oberflächlich überziehenden Säuremantel können Bakterien am Eindringen gehindert werden.

Die das Bronchialsystem auskleidenden Epithelien haben sehr effiziente Mechanismen der Abwehr von Pathogenen entwickelt. Sie sind von einer wässrigen Phase und einer darüber liegenden mucinhaltigen Schleimschicht bedeckt. Die Zilien der Epithelien

führen koordinierte Bewegungen aus, die den Schleim binnen einer Stunde zum Pharynx befördern. Als weitere Komponente enthält die Epithelflüssigkeit Proteine, die Pathogene einhüllen und markieren, so dass sie von Makrophagen leichter erkannt werden können. Ein Beispiel dafür ist der Surfactant mit den Proteinen A und D [4]. Weiterhin sind die meisten Epithelien des Darms mit nicht-pathogenen Bakterien kolonisiert, welche die normale Flora darstellen und mit den pathogenen Mikroorganismen um Nahrung und Anheftungsstellen konkurrieren [5]. Werden die nicht-pathogenen Mikroorganismen im Zuge einer Antibiotikabehandlung abgetötet, kolonisieren oft viel gefährlichere Mikroorganismen das entsprechende Organ und verursachen Krankheiten [6].

Wenn es dem Krankheitserreger gelingt, die Epithelbarriere zu überwinden und sich zu vermehren, wird er in den meisten Fällen durch Makrophagen, die sich in den Geweben aufhalten, erkannt. Makrophagen sind die ersten, die am Ort der Infektion mit dem Pathogen in Kontakt kommen. Sie werden jedoch bald durch die Anlockung zahlreicher neutrophiler Granulozyten zum Infektionsherd unterstützt. Zirkulierende Monozyten verlassen den Blutkreislauf, um sich als ortständige Makrophagen im Gewebe zu verteilen. Gerade an den Eintrittspforten des Körpers, wie z. B. der Lunge, sind sie zahlreich vorhanden. Sie phagozytieren in den Alveolen Keime, Staub, Rußpartikel und zerstörtes Alveolargewebe, aber auch die Erythrozyten, die durch Stauung aus den Kapillaren ausgetreten sind und in den Alveolen den Gasaustausch stören könnten. Außerdem sind sie durch die Aufnahme der Substanzen des Oberflächenfilms an dessen ständiger Erneuerung beteiligt. Bei der Phagozytose erzeugen Makrophagen toxische Sauerstoffverbindungen, die beim Abtöten des aufgenommenen Erregers mitwirken [7, 8].

Außerdem sezernieren Makrophagen bei ihrer Aktivierung eine Reihe von inflammatorisch wirkenden Cytokinen, die lokale und systemische Wirkungen entfalten. So kann durch sie die Gefäßweite der zuführenden Arterien erweitert und die der abführenden Gefäße verengt werden. Das wiederum verstärkt den lokalen Blutfluss und verringert die Fließgeschwindigkeit des Blutes, was zur Folge hat, dass der Austritt von Leukozyten aus der Strombahn begünstigt wird. Zusätzlich wird das Endothel aktiviert, so dass Granulozyten leichter aus dem strömenden Blut zum Infektionsort gelangen und es wird die Permeabilität des Endothels erhöht, wodurch vermehrt

Plasmaproteine und Flüssigkeit den Infektionsort erreichen. Chemokinkonzentrationsgradienten am Entzündungsort locken unterschiedliche Immunzellen an und aktivieren sie. Die Cytokine TNF- α , IL-1 und IL-6 haben ein breites Spektrum an biologischen Wirkungen, die eine schnelle Steuerung des Entzündungsgeschehens ermöglichen. TNF- α , IL-1 und IL-6 stimulieren Hepatozyten zur Synthese von Akute-Phase-Proteinen, die opsonierend wirken und erzeugen darüber hinaus systemisch Fieber, welches die bakterielle und virale Vermehrung verlangsamt, während die adaptive Immunantwort wirksamer arbeitet. Cytokine dirigieren und modulieren das Entzündungsgeschehen vor Ort und global [9].

Zu den Zellen der angeborenen Immunität gehören die Granulocyten und Makrophagen, die bereits beschrieben worden sind, zusätzlich die Mastzellen und Dendritischen Zellen (DCs), sowie die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Einleitend sollen nun nur noch die beiden letzteren Zellarten besprochen werden.

Dendritische Zellen stammen von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab. Sie wandern mit dem Blut in die peripheren Gewebe und Organe, wo sie stark phagozytotisch und mikropinozytotisch aktiv sind, aber noch keine kostimulierenden Signale exprimieren. Am Infektionsfokus nehmen sie Pathogene auf und wandern über die Lymphbahnen in die Lymphknoten. Hier verlieren sie die Fähigkeit Antigene aufzunehmen. Stattdessen synthetisieren sie viele MHC-Peptid-Komplexe, die effektiv T-Zellen stimulieren können. Außerdem exprimieren sie bei der Ankunft im Lymphknoten kostimulatorische Signale, ohne die keine T-Zelle aktiviert werden kann. Sowohl die Langerhans-Zellen der Haut, als auch die antigenpräsentierenden Zellen der Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT) besitzen die Fähigkeit Präsentation bezeichnet wird [10-12].

Die Sekretion antiviraler Proteine durch Makrophagen hat drei Funktionen: Sie erzeugt eine Hemmung der viralen Replikation, eine Verstärkung der MHC Klasse I Expression auf den Körperzellen und dadurch eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber virus-spezifischen CD8 T-Zellen. Der Hauptmechanismus, durch den NK-Zellen andere Zellen abtöten, ist der gleiche wie bei den cytotoxischen T-Zellen. Sie setzen den Inhalt von cytotoxischen Granula frei, während sie im Kontakt mit der Zielzelle stehen, was zur Perforation der Zielmembran und zum Einschleusen von Proteinen führt, die bei der Zielzelle Apoptose einleiten. Ob NK-Zellen ihre Effektorfunktion ausüben, wird durch

das Zusammenspiel von aktivierenden und hemmenden Signalen entschieden, die sie über verschiedene invariante Oberflächenrezeptoren erhalten [13].

1.3 Natürliche Killerzellen

1.3.1 NK-Zellen: Molekulare Mechanismen und Funktion

Natürliche Killerzellen entwickeln sich aus einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferstammzelle mit T- und B-Zellen [14-16]. Sie sind größer als diese und enthalten viele Granula. Man findet sie gewöhnlich im peripheren Blut, in der Milz und dem Knochenmark. Sie machen 5-20% aller kernhaltigen Zellen des Blutes aus. Bei entzündlichen Prozessen im Organismus durch verschiedene Cytokine angelockt, verlassen sie die Blutbahn. Sie repräsentieren, im Gegensatz zu T- und B-Zellen, eine lymphatische Population, die keine klonal erzeugten antigenspezifischen Rezeptoren besitzt. B- und T-Zellen ordnen nach Antigenkontakt ihre Rezeptorgene neu, NK-Zellen behalten die Rezeptorkonfiguration der Keimbahn bei. Die auf ihrer Zelloberfläche vorhandene Rezeptorausstattung macht sie aber keineswegs zu "primitiven" und "unspezifischen" Zellen. Sie spielen eine Rolle bei der Kontrolle von Tumorwachstum und sollen sogar die Metastasierung von Tumoren verhindern können [17].

1.3.2 Cytotoxizität von NK-Zellen

NK-Zellen können über sekretorische Zellyse Zellen zerstören. Bei diesem Vorgang setzen sie Perforin und Granzyme frei, die in der Zielzelle Apoptose auslösen. Die cytotoxische Wirkung kann mittels ADCC (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) ausgelöst werden; dabei werden durch Antikörper markierte Zielzellen über die Erkennung durch CD16 cytotoxisch eliminiert [18]. Weitere Aktivierungsmechanismen werden später besprochen. Die Apoptoseinduktion über das CD95/Fas-Ligand-System ist von nur geringer Bedeutung bei der Lyse durch NK-Zellen. Die Aktivität von NK-Zellen wird durch Interferone und IL-12 gesteigert [19].

1.3.3 NK-Zell-Erkennung von Selbst und Nicht-Selbst

Klas Karre führte 1985 das sog. „missing self“ Modell ein [20, 21]. Die Idee war, dass ein zentraler Erkennungsmechanismus von NK-Zellen darin besteht, das Fehlen von Information auf der Zielzelle wahrzunehmen. Genauer gesagt postulierte er die Hypothese, dass die Abwesenheit oder schwache Expression von MHC Klasse I-Molekülen auf Körperzellen ausreicht, diese Zellen zu Zielen von NK-Zellen werden zu lassen, ohne dass irgendeine zusätzliche Veränderung vorliegen muss.

Natürliche Killerzellen erkennen MHC Klasse I-Moleküle via Oberflächenrezeptoren, die ein Signal liefern, das die lytische NK-Zellfunktion unterdrückt. Wenn zu wenige MHC-spezifische Rezeptoren ihre Liganden binden, führt dies eventuell schon zur Abtötung der Zielzelle. NK-Zellen töten solche Zellen, die entweder keine, oder wenige MHC Klasse I-Moleküle exprimieren, was häufig bei virusinfizierten oder maligne transformierten Zellen vorkommt. Warum sie nicht auch Erythrozyten oder Hepatozyten töten, die ebenfalls wenige MHC Klasse I-Moleküle exprimieren, ist noch unklar [22].

Man unterscheidet drei Klassen von NK-Zellrezeptoren, in denen es aktivierende und inhibierende Vertreter gibt: Zunächst die Immunglobulin (Ig) Superfamilie (Ig SF), zu der die Killer Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (KIR) gehören. Diese können HLA-A, -B und -C Moleküle auf Körperzellen erkennen [23]. Zur Ig SF gehört außerdem der humane Ig-ähnliche Transkript 2 (ILT2)/Leukozyten inhibitorischer Rezeptor 1 (LIR-1) [24, 25], der eine breite Spezifität hat und klassische und nicht-klassische MHC-Moleküle erkennt, zur zweiten Klasse gehören die CTLR (C-Typ Lektin-ähnliche Rezeptoren), und zuletzt die Natürlichen Cytotoxizitätsrezeptoren (NCR). Zu den am stärksten aktivierenden Rezeptoren von NK-Zellen zählen die Natürlichen Cytotoxizitätsrezeptoren. Man unterscheidet NKp30, NKp44 und NKp46 [26, 27]. NCR sind besonders NK-Zell-spezifisch und dienen als NK-Zellmarker [28, 29]. NKp46 und NKp30 erlauben eine genaue Unterscheidung zwischen ruhenden und aktivierten NK-Zellen [30]. Im Gegensatz dazu sind die NK-Zellmarker CD16 und CD 56 nicht ausschließlich auf NK-Zellen exprimiert [18, 31]. NCRs haben vermutlich die Aufgabe, bestimmte Tumoren und virusinfizierte Zellen zu erkennen. NKp46 erkennt Influenza-infizierte Zellen vermutlich durch direkten Kontakt mit dem Influenzahämagglutinin [30].

Die aktivierenden Rezeptoren der NK-Zellen assoziieren mit Adaptermolekülen (z. B. DAP12), die ihrerseits eine intrazytoplasmatische Aminosäuresequenz tragen, die sog. Tyrosinaktivierungssequenz ITAM (ITAM, Immunoreceptor-tyrosine-based-activating motif; YxxL/Vx7-11YxxL/V). Dabei steht Y für Tyrosin, L für Leucin, V für Valin und X für eine beliebige Aminosäure). Wenn ein Ligand, z. B. ein MHC Klasse I-Molekül an einen aktivierenden Rezeptor z. B. KIR2DS bindet, kommt es zur Rekrutierung des Adaptermoleküls DAP12, das ein ITAM trägt. Die Phosphorylierung der Tyrosine in der ITAM-Sequenz führt zur Aktivierung der Proteintyrosinkinase syk und ZAP-70 (ζ -Ketten-assoziiertes Protein). Kommt es zur Bindung eines MHC Klasse I-Moleküls an einen inaktivierenden Rezeptor, so wird über Proteindephosphorylierungen die Signalgebung gehemmt. Bindet ein inhibierender Ligand, wie z. B. KIR2DL2, so wird das Tyrosin in der ITIM-Sequenz phosphoryliert und die SHP-1 Phosphatase aktiviert, was zur Inhibition führt.

Eine NK-Zelle empfängt eine Vielzahl an Informationen über das sie umgebende zelluläre Milieu. Körperzellen, die ihre Integrität durch MHC Expression anzeigen, führen zu einer Hemmung der NK-Aktivierung über inhibitorische Signalwege, in ihrer Integrität gestörte Körperzellen dagegen lösen aktivierende Signalwege aus. Die Vorstellung ist, dass eine NK-Zelle die Summe der aktivierenden und inhibierenden Signale wahrnimmt. Bei Erreichen eines Schwellenwertes kommt es dann zur Auslösung der Effektorfunktion.

1.3.4 NKG2D und seine Liganden bei Mensch und Maus

Der NKG2D Rezeptor gehört zur Klasse der Typ II, C-Typ-Lektin-ähnlichen Rezeptoren (CTLR) und ist bei der Maus auf Chromosom 6 und beim Menschen auf Chromosom 12p12-p13 codiert [32]. Typ II bezeichnet das Vorliegen eines intrazellulären Aminoterminus. NKG2D ist ein C-Typ-Lektin-ähnliches Transmembranprotein, welches im Gegensatz zu anderen Mitgliedern seiner Familie ein Homodimer ist. NKG2D ist konstitutiv auf allen NK-Zellen der Maus und des Menschen exprimiert [33], sowie auf allen humanen $\gamma\delta$ und $CD8^+ \alpha\beta$ T-Zellen [34]. NKG2D liegt in zwei Isoformen vor, die entweder mit dem Adaptorprotein DAP10 assoziieren, oder mit DAP10 und DAP12 [35, 36]. Während DAP10 kostimulatorische Funktion vermittelt, vermag DAP12 NK-Zellen direkt zu aktivieren [37]. Durch die

Bindung von DAP10 oder DAP12 an NKG2D entsteht ein aktivierendes Signal, welches durch die Rekrutierung einer Phosphatidylinositol (PI)-3-Kinase transduziert wird [38]. Die PI-3-Kinase spielt eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung von NK-Zellen. Die Tabelle 1 enthält alle zurzeit bekannten Liganden von NKG2D und deren Charakteristika.

Tabelle 1: Eigenschaften von humanen und Maus-NKG2D-Liganden nach [39, 40].

Ligand	Affinität (K _D)	Struktur	Expression	Induktion
Humane NKG2D-Liganden				
MICA	1 μM	Transmembranproteine, MHC Klasse I Faltung, hochpolymorph α ₁ , α ₂ , α ₃ -Domäne, TAP-unabhängig, keine Peptidbindung	Darmepithel, epitheliale und nicht-epitheliale Tumoren	Hitzeschock, Oxidativer Stress, Tumortransformation, E. coli, M. tuberculosis, HCMV-Infektion
MICB	unbekannt			
ULBP1,2, 3	2>1>3	GPI-Anker MHC Klasse I-TAP-unabhängig, keine Peptidbindung	viele Zelllinien, hohe mRNA-Expression im Nierengewebe ULBP1 und 3 Expression in der Schilddrüse, nicht auf PBMC	HCMV Infektion
RAET1E, G	unbekannt		nicht in hämatopoetischem Gewebe	
Maus NKG2D-Liganden				
Rae1α	680 nM	GPI-Anker MHC Klasse I Faltung, nur α ₁ -Domäne und α ₂ -Domäne.	Embryonales Mausgewebe, Tumorzelllinien nicht in den meisten adulten Geweben	Retinolsäure, Karzinogene
Rae1β	345 nM			
Rae1γ	486 nM			
Rae1δ	726 nM			
Rae1ε	unbekannt			
Rae1-1B6	200 nM			
H60	18 nM	Transmembranprotein, MHC Klasse I Faltung nur α ₁ -und α ₂ -Domäne	Stamm-spez.-Expression, auf aktivierten PBMC und Milzzellen	Karzinogene

Der Unterschied im molekularen Bau von MICA/MICB und der ULBP-Familie (UL16-bindende Proteine) liegt in der fehlenden α_3 -Domäne. Die ULBPs sind mittels eines GPI-Ankers (Glykosylphosphatidylinositol) in der Zellmembran verankert, ebenso wie die Rae1-Moleküle der Maus. Die extrazelluläre Domäne von ULBP3 und MICA zeigen beide eine typische MHC Klasse I Faltung, doch ist die Peptidbindungsgrube zwischen den beiden α -Helices mit einem Abstand von 8 bis 14 Å neben dem der Maus-Rae1β die schmalste aller bekannten MHC Klasse I-Homologa.

Das NKG2D-Homodimer enthält zwei β -Faltblätter und zwei α -Helices mit 4 Disulfidbrücken. Die Mitglieder der MIC-Gen-Familie sind in der hochpolymorphen MHC-Klasse I Region auf Chromosom 6p21 codiert. Zur Zeit sind 54 MICA-Allele bekannt [41]. Die MICA- und MICB-Expression ist sehr eingeschränkt im Normalgewebe, jedoch kann zellulärer Stress (UV-Bestrahlung, Hitzeschock, oxidativer Stress, Infektionen mit Herpesviren, *M. tuberculosis* oder *E. coli*) zur Induktion dieser Moleküle auf der Zelloberfläche führen [34]. Die ULBP-Proteine werden von einer Multigenfamilie außerhalb der MHC Region auf Chromosom 6q25 codiert. ULBP mRNA wurde bei vielen Tumoren und Zelllinien nachgewiesen, aber auch bei manchem Normalgewebe [42]. Weiterhin finden sich ULBP auf Melanom- und Neuroblastomzelllinien [43]. Nach einer vorläufigen Nomenklatur bezeichnet man die Produkte dieser Genfamilie als RAE1TE bis RAET1N analog der Maus-NKG2DL (RAET1 für retinoic acid early inducible transcript 1). So entspricht RAET1I ULBP1, RAET1H ULBP2 und RAET1N ULBP3 [42, 44].

1.3.5 Die Rolle von NKG2D

NKG2D-Rezeptoren finden sich auf NK-Zellen, CD 8 $\alpha\beta$ T-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen im Komplex mit DAP 10. Über die nachfolgende Aktivierung von PI-3K und weiteren Signalschritten des MAP-Kinaseweges werden diese kostimuliert.

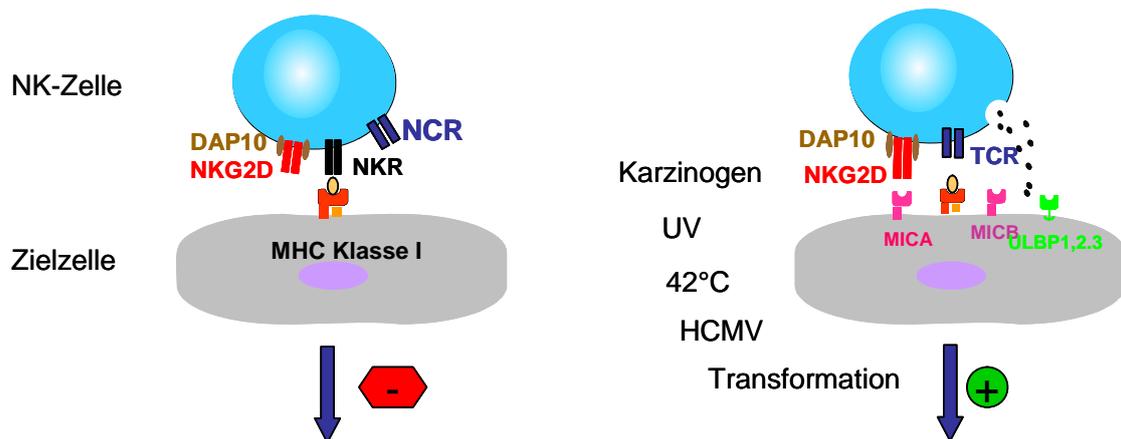


Fig. 1-1 Die Rolle von NKG2D bei NK-Zellen. Die linke Figur stellt den Zustand der Ignoranz dar. Das bedeutet, dass nur inhibierende Rezeptoren an MHC Klasse I-Moleküle binden, während keine aktivierenden NKG2DL exprimiert werden. Dagegen wird in der rechten Figur dargestellt wie durch zellulären Stress (UV-Strahlung, Karzinogene, Infektionen oder Transformation) eine Induktion von NKG2DL stattfindet. Dem aktivierenden Signal über NKG2D stehen Signale durch inaktivierende Rezeptoren (KIR, LIR und NKG2A/CD94 der Übersichtlichkeit halber hier weggelassen) gegenüber, wobei die Balance zwischen aktivierenden und inaktivierenden Signalen schließlich über die endgültige Reaktion der NK-Zelle entscheidet. Wenn es zu einer starken zahlenmäßig häufigen Bindung an NKG2D kommt, überstimmt die NKG2D-Wirkung die Wirkung inaktivierender NK-Zellrezeptoren, so dass eine NK-Zelle eine MHC Klasse I-Moleküle exprimierende Zelle lysieren kann. In diesem Fall spricht man von einer primären Erkennung durch NKG2D. Im Fall einer schwächeren Expression von NKG2DL ist noch eine weitere Stimulierung durch NCR-Liganden oder KIRs notwendig [39].

1.4 Leukämien

Unter dem von R. Virchow geprägten Begriff Leukämie (weißes Blut) versteht man eine systemische autonome Proliferation eines abnormen Zellstammes (Klones) der leukozytenbildenden Systeme, welche mit einer mehr oder weniger ausgeprägten Zellausschwemmung in das periphere Blut einhergeht. Die verschiedenen Leukämieformen werden anhand verschiedener Kriterien prognostisch beurteilt. Die normalen leukopoetischen Gewebe werden in das lymphatische und in das myeloische System eingeteilt. Dementsprechend lassen sich zwei Leukämie-Haupttypen unterscheiden: die myeloischen und die lymphatischen Leukämien. Außerdem sind der Differenzierungsgrad und der Krankheitsverlauf prognostische Kriterien, da die am neoplastischen Geschehen beteiligten Zellen unterschiedliche Reifegrade aufweisen, was in der Regel mit dem klinischen Verlauf korreliert. Dementsprechend unterscheidet man akute Leukämien, die unbehandelt früher oft innerhalb weniger Wochen zum Tode führten, sowie chronische Leukämien, deren Verlauf sich oft jahrelang hinzieht. Weiterhin stellt der Grad der Zellausschwemmung ins periphere Blut ein prognostisches Kriterium dar. Nicht jede Leukämieform geht unweigerlich mit einer Ausschwemmung von neoplastischen Zellen ins Blut einher. Demzufolge unterscheidet man leukämische Formen von aleukämischen Formen (Leukosen).

Die Ursache einer Leukämie ist nicht klar. Es müssen jedoch verschiedene ätiologische Faktoren bei ihrer Entstehung in Betracht gezogen werden.

Wie wir aufgrund zellkinetischer Untersuchungen wissen, beruht der grundlegende Defekt bei der akuten Leukämie darauf, dass leukämische Stammzellen nicht mehr in der Lage sind, zu den funktionellen Endzellen der entsprechenden Zellreihe heranzureifen. Dies hat zur Folge, dass die leukämischen Blasten ihre Teilungsfähigkeit weiterhin behalten und somit potentiell unsterblich sind. Diese Blasten verdrängen bei der akuten Leukämie die normalen Vorstufen der Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten im Knochenmark. Infolgedessen werden viele Blasten, wenige Granulozyten und keine Zwischenstufen ins periphere Blut ausgeschwemmt.

Bei der chronischen Leukämie ist in der Regel ein kleinerer Anteil der betreffenden Zellreihe proliferativ tätig. Die Vermehrung der Zellmasse kommt vielmehr durch die

Anhäufung der langlebigen, differenzierten Zellen infolge von verzögertem programmierten Zelltod zustande.

Die Pathophysiologie ist eng mit den Massen der leukämischen Zellen verknüpft. Die abnorme Zellpopulation verdrängt die Zellen der normalen Blutbildung im Knochenmark. Die Folge davon sind Anämie, Infektionsanfälligkeit und Blutungsneigung; dies bezeichnet man als sog. Knochenmarksinsuffizienz.

1.4.1 Akute myeloische Leukämie (AML)

Die akute myeloische Leukämie (AML) macht ca. 80% der akuten Leukämien der Erwachsenen aus, wobei sie bei Männern etwas häufiger als bei Frauen auftritt. Das mittlere Alter bei Diagnose einer AML ist 63 Jahre. Die altersspezifische Inzidenz beträgt jährlich 3,5 pro 100.000 Erwachsenen bis zu einem Alter von 45 Jahren, steigt auf 15 bei einem Alter von 70 Jahren und gar auf 35 bei einem Alter von 90 Jahren an [45].

Als Risikofaktoren für die Entstehung der AML gelten Stoffe, die die hämatopoetischen Vorläuferzellen schädigen, wie z. B. Benzole [46]. Chemotherapeutika, die in der Tumorthherapie verwendet werden, haben ein deutlich erhöhtes leukämogenes Potential, welches bei 10-20% liegt. Rauchen von Zigaretten ist mit einem 1,2-fach erhöhten Risiko für die Entwicklung einer AML verknüpft. Radioaktive Strahlung kann das Leukämierisiko bis auf 30% erhöhen. Dies weiß man seit den Atombombenabwürfen auf Hiroshima und Nagasaki [47, 48]. Die Latenzzeit zwischen dem Abwurf und dem Auftreten einer Leukämie bei Überlebenden lag zwischen 5 und 21 Jahren, wobei das Risiko vom Alter und der Strahlendosis abhing. Das strahlenbedingte Risiko innerhalb der verschiedenen Leukämietypen ist für die AML am höchsten. Ionisierende Strahlung als alleinige Therapie von Malignomen, wie zum Beispiel bei Morbus Hodgkin, erhöht das AML Risiko, wenn Strahlendosen über 20 Gray appliziert werden [49]. Radionuklide, wie Radiophosphor (^{32}P), welche zur myelosuppressiven Therapie bei Polycythaemia vera eingesetzt werden, führen bei bis zu 10% der behandelten Patienten zu einer sekundären AML.

Außerdem findet sich ein erhöhtes Vorkommen einer sekundären AML bei Trisomie 21, Klinefelter-Syndrom und hämatologischen Erkrankungen, wie etwa bei einem myeloproliferativen Syndrom.

Die Analyse der chromosomalen Aberrationen im Rahmen einer AML führte zur Entdeckung einer Reihe von abnormalen Fusionsproteinen. Durch die Einbeziehung von wichtigen strukturellen oder funktionellen Anteilen der Ausgangsproteine in das Fusionskonstrukt geht die Funktion des Proteins z. B. für die normale Hämatopoiese verloren. Es bleibt aber festzuhalten, dass die zelluläre Transformation ein Mehrschrittprozess ist, dementsprechend führen isolierte Veränderungen nicht zu einer Leukämie. 50% der AML weisen zytogenetische Aberrationen zum Zeitpunkt der Diagnose auf. In den übrigen Fällen bleibt die molekulare Pathogenese im Dunkeln [50-52].

Tabelle 2: Häufige Chromosomenaberrationen bei der de novo AML [53, 54].

	Genrearrangement	FAB-Subtyp	Inzidenz
t(8;21)(q22;q22)	AML1-ETO	M2/M1	8-12%
inv(16)(p13q22)	CBFB-MYH11	M4eo	8-12%
t(15;17)(q22;q12)	PML-RARA	M3/M3v	4-6%
t(9;11)(p22;q23)	AF9-MLL	M5a	1-3%
t(6;9)(p23;q34)	DEK-CAN	M1/M2	selten
Inv(3)(q21q26)			1-2%
+8 allein			5-10%
+11 allein		M1/M2	1%
Komplex aberranter Karyotyp (≥3 numerische und /strukturelle Chromosomenaberrationen)			10-20%

Ein sehr spezifisches und häufiges Chromosomenrearrangement bei AML ist die Translokation t(8;21), bei der auf molekularer Ebene das Fusionsgen AML1-ETO (Nomenklatur: AML1: nach dem ersten identifizierten AML-Gen auf Chromosom 21 und "ETO"="eigh-twent-y-one" als Abkürzung für die am Rearrangement beteiligten Chromosomen) entsteht und die der M4eo, einer Inversion/Translokation

inv.(16)/t(16;16), bei der molekular eine CBF β -MYH11-Fusion (CBF β = „core binding factor β “; „MYH11“ = schwere Kette des Muskelmyosins) vorliegt. Durch die AML1-ETO und CBF β MYH11-Fusion entstehen Veränderungen in einem einzigen DNA-bindenden Transkriptionsfaktorkomplex. Dieser reguliert eine große Anzahl von Genen, die eine entscheidende Rolle in der Hämatopoese spielen. Aufgrund der Vielfalt der Mechanismen muss auf die vorhandene Literatur verwiesen werden.

Die Symptome bei Patienten mit AML lassen sich unterscheiden in unspezifische Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit, Fieber und Nachtschweiß, sowie in Symptome, die infolge der Verdrängung der normalen Hämatopoese auftreten. Dazu gehört die Anfälligkeit für bakterielle Infekte infolge Granulozytopenie, Entzündungen der Haut und Schleimhäute durch Pilzinfektionen und Beschwerden als Folge einer Anämie (Hautblässe, Atemnot, Müdigkeit). Auch Blutungen infolge Thrombozytopenie und/oder Verbrauch von Gerinnungsfaktoren kommen vor. Weitere Symptome sind Lymphknotenschwellung (30%), Splenomegalie, seltener Lebervergrößerung und Meningeosis leukaemica. Die Leukozyten können im peripheren Blut normal, erhöht oder erniedrigt sein (40% der Patienten haben normale oder erniedrigte Leukozytenzahlen). Allein die unreifzelligen Elemente im Blut und Knochenmark (>20%) sichern die Diagnose [55].

1.4.2 Akute lymphoblastische Leukämie (ALL)

Das mittlere Erkrankungsalter von ALL Patienten liegt bei 30-40 Jahren. Die ALL ist im Erwachsenenalter seltener als die AML und macht 80% der akuten Leukämien im Kindesalter aus.

Die ALL wird heute vorrangig nach immunzytologischen Kriterien klassifiziert. Man unterscheidet Subtypen der B-Zellreihe (prä-prä-B-ALL, cALL, prä-B-ALL und B-ALL) und der T-Zellreihe (prä-T-ALL, und T-ALL) und Subklassifikationen, die sich nach dem chromosomalen Status der Zelle richten. Wichtige genetische chromosomale Aberrationen bei ALL sind: t(9;22) Philadelphia-Chromosom (Ph) bei cALL, prä-prä-B-ALL, t(4;11) bei prä-prä-B- und prä-B-ALL, t(1;19) bei prä-B-Zell ALL, t(8;14) (q24;32) bei B-ALL und t(8;14)(q24;11) bei T-ALL [56].

Als klinische Symptome treten zu den bereits unter der akuten myeloischen Leukämie genannten zusätzlich Knochen- und Gelenkschmerzen, Pneumonie, Tonsillitis und

Proktitis auf. Bei Befall des zentralen Nervensystems können Kopfschmerzen, Schwäche in den Beinen, Ausfälle von Hirnnerven im Vordergrund stehen. Atemnot kann infolge eines Mediastinaltumors oder von Pleuraergüssen auftreten [55].

1.4.3 Chronisch myeloische Leukämie (CML)

Die CML ist mit ihrer jährlichen Inzidenz von 10 Erkrankungen auf 1 Million Einwohner die häufigste myeloproliferative Erkrankung. Sie hat bei einer Geschlechtsverteilung von 3:2 (männlich/weiblich) ihren Altersgipfel bei 45 bis 50 Jahren.

Pathophysiologisch stellt die CML die erste hämatologische Erkrankung dar, bei der eine charakteristische Chromosomenaberration, das Philadelphia-Chromosom (Ph), beschrieben wurde. Diese Translokation führt bei der CML zur Bildung eines pathophysiologisch relevanten Fusionsgens, des *bcr/abl*-Gens, das in ein entsprechendes Protein, das p210 mit Tyrosinkinaseaktivität, translatiert wird. Experimente mit BCR-ABL-transfizierten murinen Knochenmarkzellen, die in bestrahlte Mäuse transplantiert wurden und CML-ähnliche Erkrankungen hervorriefen, zeigten *in vivo*, dass p210^{BCR-ABL} eine zentrale Rolle bei der Entwicklung der CML spielt [57]. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Bildung des *bcr/abl*-Gens in hämatopoietischen Stammzellen ein wesentlicher Schritt in der Veränderung des Wachstums- und Regulationsverhaltens von Stammzellen ist, der zum charakteristischen hämatologischen und klinischen Bild der CML führt.

Das Philadelphia-Chromosom (Ph) entsteht nach Brüchen im Bereich der langen Arme der Chromosomen 9 (Bande q34) und 22 (Bande q11) durch eine reziproke Translokation der telomeren Fragmente. Es entstehen das verlängerte Chromosom 9q+ und das verkürzte Chromosom 22q-, welches das eigentliche Ph darstellt [51, 52].

Auf molekularer Ebene liegen die Bruchpunkte auf Chromosom 9 im Bereich des ABL-Protoonkogens, auf Chromosom 22 im Bereich des BCR-Gens. Die Zusammenlagerung von Teilen der Gene BCR und ABL führt auf Chromosomen 22 zur Bildung eines BCR-ABL-Gens, das in eine 8,5 kb Fusions-mRNA transkribiert wird und in ein Fusionsprotein mit höherer Tyrosinkinaseaktivität translatiert wird. Die physiologischen Funktionen der beteiligten BCR und ABL Gene, sowie die Pathophysiologie des BCR-ABL-Proteins sind sehr komplex und können hier nur angedeutet werden [57-61].

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch in vitro durchgeführte Gamma- und Neutronenbestrahlung von BCR-ABL (BCR=breakpoint cluster region; ABL=humanes Abelson-Protoonkogen) negativen Zelllinien die Expression von BCR-ABL-Transkripten induziert werden konnte [50]. Bei der Mehrzahl der Erkrankten ist jedoch keine besondere Strahlen- oder Chemikalienexposition nachweisbar.

DNA-Bruchpunkte bei der t(9;22)

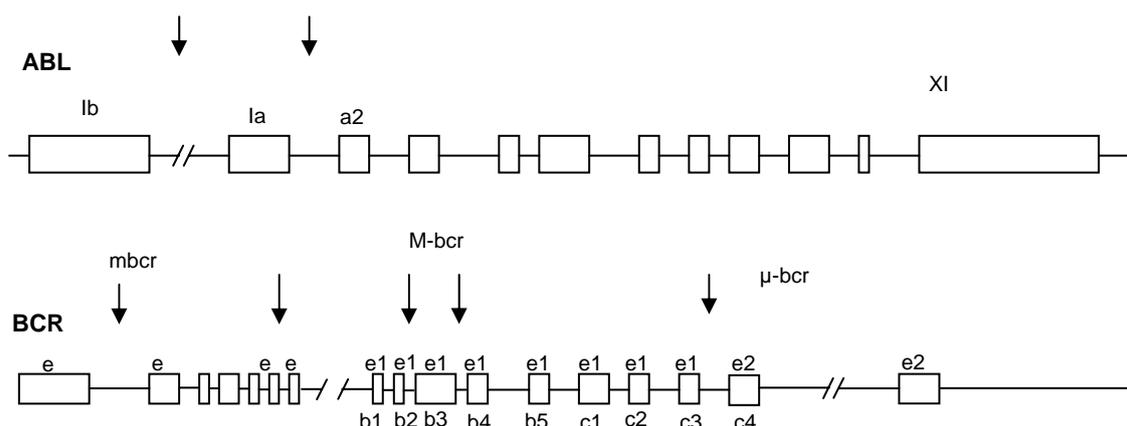


Fig. 1-2 zeigt die genomische Organisation der Gene BCR und ABL. Der Bruchpunkt liegt im abl-Gen in einer 250 kb großen Region zwischen Exon lb, la und a2. Im BCR-Gen liegen die häufigsten Bruchpunkte bei der CML in der 'Major breakpoint cluster region' (M-bcr), sehr selten innerhalb der 5'gelegenen 'minor breakpoint cluster region' (m-bcr) oder der 3'gelegenen mikro-(μ-bcr)-Region [62]. Bei der Ph-positiven akuten lymphatischen Leukämie (ALL) treten die Bruchpunkte sowohl im m-bcr als auch im M-bcr auf.

Die Mehrzahl der Patienten (>90%) befindet sich bei Diagnosestellung in der chronischen Phase der Erkrankung, bei ca. 30-40% der Patienten erfolgt heute die Diagnose als Zufallsbefund anlässlich der Abklärung einer Leukozytose mit Linksverschiebung im Differentialblutbild. Bei den übrigen Patienten führen Allgemeinsymptome (Abgeschlagenheit und Krankheitsgefühl) oder Symptome die durch die Expansion der Blutbildung in den Oberbauchorganen (Splénomegalie 70-80%, Hepatomegalie 50%) entstehen zur Diagnose. Da die chronische Phase durch eine weitgehend normale Differenzierung aller Reihen der Hämatopoiese gekennzeichnet ist, bestehen auch im Gegensatz zu den akuten Leukämien in der Regel keine Zeichen der Knochenmarksinsuffizienz. Die CML kann nach einiger Zeit in eine akzelerierte Phase

übergehen, die in der Regel im Blutbild und klinisch das Bild einer akuten Leukämie zeigt.

1.4.4 Chronisch lymphatische Leukämie (CLL)

Sie ist die häufigste Leukämieform im höheren Alter. Im 5. Lebensjahrzehnt findet man ca. 5/100.000 Einwohner pro Jahr, im 8. Lebensjahrzehnt ca. 30/100.000 Einwohnern pro Jahr; das Verhältnis zwischen Männern und Frauen ist 2:1. Die CLL verläuft meist als leukämisches B-Lymphozytom (selten T-Lymphozytom). Ursache der Erkrankung ist eine klonale Proliferation und Akkumulation immuninkompetenter B-Lymphozyten im peripheren Blut, Lymphknoten, Milz und Knochenmark.

Bei der B-CLL findet sich immunphänotypisch eine schwache Expression membranständiger Immunglobuline (IgM und IgD), sowie CD19, CD20, CD5 und CD23.

Klinisch findet sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in 70 % der Fälle ein symptomloser Zufallsbefund mit Lymphknotenschwellung, Splenomegalie, geringer Lebervergrößerung. Weniger häufig sind Infekte infolge Granulozytopenie und Antikörpermangelsyndrom, sowie eine autoimmunhämolytische Anämie (AIHA) oder Immunthrombozytopenie [55].

2 Ziele der vorliegenden Arbeit

NK-Zellen sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems und als solche an der Immunabwehr von Viren und Tumoren beteiligt [14]. Die Aktivierung von NK-Zellen wird durch die Balance von Signalen aktivierender und inhibitorischer Rezeptoren bestimmt [63]. Während die inhibitorischen Rezeptoren bereits gut charakterisiert sind [64], ist bisher nur wenig über die aktivierenden Rezeptoren von NK-Zellen und deren Liganden bekannt. Kürzlich wurde gezeigt, dass der zu den C-Typ-Lektinen gehörende NKG2D Rezeptor Effektorfunktionen von NK-Zellen trotz der Gegenwart inhibitorischer Signale aktivieren kann [65]. Die humanen MHC Klasse I-ähnlichen MICA und MICB Glykoproteine sind Liganden von NKG2D (NKG2DL) [65]. Bisher konnte eine Expression von MICA und MICB *in vivo* nur auf gastrointestinalem Epithel und auf einer Vielzahl epithelialer Tumoren detektiert werden. Dies und die breite Expression von MICA und MICB auf hämatopoetischen und epithelialen Zelllinien legt eine Rolle des NKG2D/MIC-Systems bei der Immunüberwachung von Tumoren nahe.

Die erste Fragestellung dieser Arbeit lautete mit Hilfe der im Labor von A. Steinle generierten NKG2DL-spezifischen mAb die Expression von NKG2D-Liganden bei verschiedenen Leukämieformen *ex vivo* und auf Leukämiezelllinien zu untersuchen. Die Expression sollte mit Hilfe der Durchflußzytometrie auf der Zelloberfläche analysiert werden.

Der zweite Themenkreis bestand in der Klärung der Frage, ob lösliches MICA/MICB in Seren von Gesunden und Leukämiepatienten vorliegt und ob ihm eine Funktion zugeschrieben werden kann.

3 Material und Methoden

3.1 Patientenproben und Zellkulturen

3.1.1 Patientenproben

Blutproben von Patienten mit malignen Erkrankungen des blutbildenden Systems wurden vor und während der Therapie analysiert, und ihre Seren konserviert. Dazu wurden die peripheren mononukleären Zellen durch Ficoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation isoliert. Daraufhin wurden die Zellen durchflußzytometrisch analysiert oder für die funktionelle Analyse als Zielzellen in einem Chromfreisetzungstest verwendet. Alle hier beschriebenen Patienten wurden zwischen Dezember 2001 und November 2002 in der II. Medizinischen Klinik der Abteilung für Innere Medizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen untersucht. Jeder Patient gab sein schriftliches Einverständnis. Die Studie wurde gemäß den Richtlinien der örtlichen Ethikkommission durchgeführt (Pr. Nr. 217/2001V). Die Diagnose wurde durch Zytologien und Immunphänotypisierung bei jedem Patienten gesichert (Tabelle 3).

3.1.2 Isolierung von PBMC von Patienten

16 ml humanes Blut wurden aus einer Monovette (Heparin-NH₄, Sarstedt Monovette, Dänemark) mit 16 ml PBS 1:1 verdünnt, vorsichtig auf 12,5 ml Ficoll-Hypaque-Trennmedium (Dichte 1,077 g/ml 290 nOs/H₂O*10, LINARIS) in einem 50 ml Polypropylen-Röhrchen (PP) geschichtet und bei 1200 x g mit ausgeschalteter Bremse bei 20° C für 25 min zentrifugiert. Das Trennprinzip von Ficoll beruht zum einen auf der Aggregation der Roten Blutkörperchen, die dadurch auf dem Boden des Röhrchens zusammen mit Granulozyten pelletieren, und zum anderen auf der leicht hypertonen Beschaffenheit des Ficoll-Hypaques, das Zellen, die viel Cytoplasma besitzen, stärker schrumpfen lässt als solche mit geringem Cytoplasmaanteil, was bei Ersteren zu einer höheren Dichte führt. Das überstehende gelbliche Plasma wurde abpipettiert und verworfen, ohne die milchige Schicht der mononukleären Zellen (Monozyten und Lymphozyten) aufzuwirbeln, die anschließend in ein neues Röhrchen überführt wurden.

Nach Waschen mit 15 ml PBS und Zentrifugation für 10 min bei 440 x g wurde noch zweimal mit PBS gewaschen, um Thrombozyten und Ficoll zu entfernen.

3.1.3 Gewinnung von Patientenserum

Zusätzlich wurden etwa 4 ml humanes Blut in einem Serumröhrchen (Serum-Monovette, Sarstedt, Dänemark) gesammelt, bei 4000 rpm für 4 min zentrifugiert und bei -80°C eingefroren. Vor der Analyse mittels eines ELISA wurden die Seren erneut bei 4000 rpm für 4 min zentrifugiert, um Proteinaggregate abzutrennen.

3.1.4 Leukämiezelllinien

Verschiedene Leukämiezelllinien wurden auf ihre NKG2DL-Expression untersucht. Dazu gehören CIR (B-LCL), NB4 (PML), K562 (hCML), HL60 (PML).

3.1.5 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die meisten Zellen wurden bei -80° C gelagert. Die Zellen wurden im 37°C Wasserbad aufgetaut bis nur noch ein erbsengroßes Stück gefroren war. Der Inhalt des Kryogefäßes wurde in 10 ml IMDM mit 50% FCS pipettiert, anschließend sofort für 4 min bei 380 x g und RT abzentrifugiert und nachfolgend in frischem Medium resuspendiert. Das Einfrieren der Zellen erfolgte ebenfalls in IMDM nach Zugabe von 10% DMSO als Gefrierschutz.

3.2 Durchflußcytometrie

3.2.1 Verwendete Antikörper

Zur Detektion der NKG2DL wurden monoklonale Antikörper (mAb) verwendet. Alle mAb waren in der Arbeitsgruppe von Dr. A. Steinle generiert worden und standen mir als Hybridomaüberstände oder über eine Protein A-Säule aufgereinigt zur Verfügung.

Die mAb AMO1 (anti-MICA), BMO1 (anti-MICB), BAMO1 (anti-MICA/B), AUMO1 (anti-ULBP1) und BUMO1 (anti-ULBP2) sind IgG1 Isotypen, die mAb BMO2 (anti-

MICB) und BAMO3 (anti-MICA/B) vom IgG2a Isotyp und CUMO1 (anti-ULBP3) ist ein IgM Isotyp.

Als sekundärer Antikörper wurde ein Ziege anti-Maus-IgG-PE-Konjugat (1:100) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) und als tertiärer Antikörper zur Selektion der Tumorphosphorpopulation CD33-FITC, CD34-FITC, HLA-DR-FITC, CD19-FITC oder CD117-PE-Konjugat (Becton Dickinson, Mountain View, Kalifornien) verwendet. In einer 96-Kavitäten-Rundboden-Platte wurden $1-2 \times 10^5$ Zellen/Kavität mit 50 μ l NKG2DL-spezifischen mAb (Hybridomaüberstand) oder 50 μ l der entsprechenden Isotypkontrolle IgG1, IgG2a, IgM (1:100, BD Pharmingen, Heidelberg) für 45 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (einmal 150 μ l, zweimal mit 200 μ l) mit FACS-Puffer (PBS mit 2% FCS und 0,01%NaN₃) und jeweils Zentrifugation für 4 min bei 380 x g erfolgte die Zugabe des 2° PE-konjugierten Detektionsantikörpers (10 μ g/ml). Anschließend wurde wieder dreimal mit FACS-Puffer gewaschen. Weiterhin wurde mit einem weiteren FITC-gekoppelten mAb die Tumorphosphorpopulation selektioniert. Anschließend wurden alle Proben mit FACSCalibur™ (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) analysiert und mit CellQuest™ Pro ausgewertet. Die spezifischen Fluoreszenzindizes (SFI) errechneten sich aus dem Median der spezifischen Werte für die einzelne Antikörper, geteilt durch den entsprechend Median der Isotypkontrolle. SFI Werte > 1,5 wurden als signifikant erhöht gewertet.

3.3 ELISA

Da zur Konzentrationsbestimmung von löslichem MICA und MICB im Serum eine Quantifizierung von Antigenen aus einer komplexen Mischung von Proteinen notwendig war, bot sich die Nutzung eines ELISAs an, der für MICA und MICB im Labor von A. Steinle kürzlich etabliert wurde. Stark absorbierende 96-Polystyren-Platten (Nunc-ImmunoPlate, MaxiSorp) wurden mit dem Fangantikörper anti-MICA AMO1 (2 μ g/ml in PBS, 50 μ l pro Loch) 12 h bei 4 °C beschichtet, gefolgt von einem Blockierungsschritt mit 7,5% BSA-PBS für 2 h bei 37°C und anschließendem Waschen mit PBS und Tween 20 (0,05%). Im nächsten Schritt wurde der Standard (rekombinantes MICA*04 in 7,5% BSA-PBS) wie auch die zu untersuchenden Seren

(nach einer 1:3 Verdünnung in 7,5% BSA-PBS vor der Zugabe auf die Platte) aufgetragen und für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden nicht-gebundene Proteine abgewaschen und der Detektionsantikörper BAMO3 (5µg/ml in 7,5% BSA-PBS, 50 µl pro Loch) zugegeben und wieder für 2 h bei 37°C inkubiert. Auf das Waschen der Platte folgte die Inkubation mit anti-Maus IgG2a-HRP (1:8000 in 3,75% BSA-PBS) für 1 h bei 37°C. Nach mehrmaligem Waschen wurde die Platte mit 50µl TMB Peroxidase Substrat System (KPL, Gaithersburg, Maryland) entwickelt. Die Reaktion wurde mit 1 M Phosphorsäure (H₃PO₄, 50µl pro Loch) gestoppt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm im Photometer (Spectrafluor, Tecan, Crailsheim) bestimmt. Alle Proben wurden als Triplikate analysiert.

Ein ähnlicher ELISA wurde für sMICB verwandt, wobei der anti-MICA/B mAb BAMO1 (IgG1) in einer Konzentration von 2µg/ml als Fangantikörper und der MICB-spezifische mAb BMO2 (IgG2a) zu 1µg/ml als Detektionsantikörper diente. Als Standard wurde rekombinantes lösliches MICB*02 verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristika der untersuchten Patienten

Die Diagnose aller 25 hier beschriebenen Patienten basiert auf klinischen, morphologischen und durchflußcytometrisch gemessenen Daten. Die klinischen Merkmale jedes Patienten sind in Tabelle 3 als Übersicht dargestellt.

Tabelle 3. Patientenmerkmale

UPN	age	sex	diagnosis	FAB	PBB	karyotype	WBC	Hb	Plt
1	39	f	T-NHL	/	18	46,XX	99.7	9.4	260
2	74	f	AML	M4	80	46,XX	117.8	9.9	277
3	48	m	AML	M3	96	46,XY t(15;17)	38.9	9.5	13
4	56	m	AML	M1	95	46,XY	17.4	7.4	18
5	63	m	AML	M4	58	46,XY; t(9;22;5)	87.3	9.0	28
6	43	m	AML	M4	99	46,XY	72.0	13.7	32
7	43	f	AML	M1	92	47,XX;+8	9.0	9.0	86
8	69	f	AML	M3	43	46,XX t(15;17)	0.9	8.1	55
9	69	m	AML	M3	38	46,XY t(15;17)	0.7	6.6	9
10	75	f	AML	M2	66	46, XX	94.0	11.1	64
11	25	m	AML	M4	5	46,XY	15.8	8.6	58
12	75	f	sAML	RA	42	46,XX,5q-7q-	19.6	10.7	20
13	60	f	sAML	M2	42	46, XX	34.0	8.1	75
14	67	m	sAML	M2	12	46,XY	13.1	8.4	221
15	77	f	sAML	?	4	46,XX	64.6	10.0	111
16	76	m	sAML	M4	34	46,XY	12.9	12.6	81
17	60	f	CMMML	/	22	46,XX	126.0	8.5	74
18	27	f	cALL	/	90	46,XX	12.2	7.7	41
19	73	f	ALL	/	41	46,XX	10.7	10.7	124
20	30	m	CML	/	57*	46,XY,t(9;22)(q34;11)	48.0	15.0	189
21	41	f	CML	/	47*	46,XX,der(22)t(9;22)(q34;q11)	183.1	10.5	812
22	32	m	CML	/	13*	46,XY,t(9;22)(q34;11)	125.3	11.6	122
23	43	f	CML	/	22*	46,XX t(9;22)	11.0	10.9	31
24	60	m	CLL	/	52	46,XY	20.0	14.7	775
25	53	f	CLL	/	87	ND	126.1	13.7	142

Überblick der klinischen Merkmale der untersuchten Patienten. UPN steht für „uniform patient number“, Patientenummer, „age“, Lebensalter in Jahren, f, „female“, m, „male“, die Bedeutung der Abkürzungen der Diagnosen werden im Fließtext erklärt, PBB, „peripheral blood blasts“ ist in Prozent der kernhaltigen Zellen angegeben; WBC, „white blood count“ in Giga/l gibt die Zahl der der weißen Blutzellen wieder; Hb, Hämoglobingehalt in g/dl; Plt, steht für die Zahl der Thrombozyten in Giga/l.

Zu den klinischen Merkmalen gehören: das Alter und Geschlecht, die Diagnose, die Anzahl der Tumorzellen im peripheren Blut im Verhältnis zu den kernhaltigen Zellen, der Karyotyp, die Anzahl der weißen Blutkörperchen, der Hämoglobingehalt und die Zahl der Thrombozyten. Der jeweilige Immunphänotyp eines Patienten wurde

cytometrisch bestimmt. Wir untersuchten 11 Frauen und 14 Männer (Frauen : Männer Verhältnis 1:1,3). Das mittlere Alter betrug 55,1 Jahre mit einer Standardabweichung (SD) von 1,9. Darunter fanden sich zehn Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML), fünf mit einer sekundären akuten myeloischen Leukämie, die sich aus einem myelodysplastischen Syndrom (sAML) entwickelt hatte, ein Patient hatte eine chronisch myelo-monocytische Leukämie (CMML), zwei hatten eine chronisch lymphatische Leukämie (CLL), vier eine chronisch myeloische Leukämie (CML) und ein Patient eine leukämische Form eines T-Zell-Non-Hodgkin Lymphoms (T-NHL). Adäquate cytogenetische Proben waren bei 24 von 25 Patienten (96%) vorhanden. 14 hatten zur Zeit der Diagnosestellung einen normalen Karyotyp (56%).

4.2 Spezifität der NKG2DL mAb und ELISA

Die Spezifität der generierten mAb wurde im Labor von A. Steinle durch Analyse von NKG2DL-transfizierten C1R-Zellen (Fig. 4-1) bestätigt.

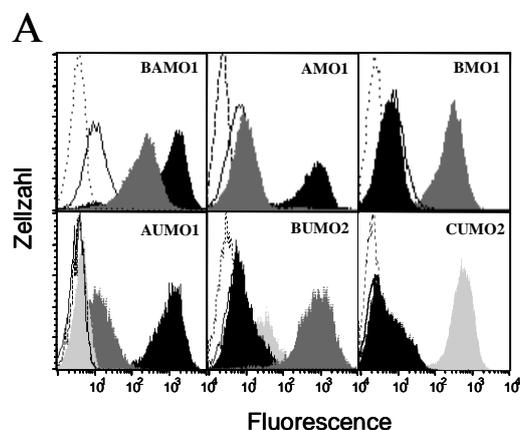


Fig. 4-1. Charakterisierung der NKG2DL mAb anhand der CIR-MICA*01 (schwarze Histogramme), CIR-MICB*02 (graue Histogramme) und CIR-neo (offene Histogramme) Transfektanten mittels Durchflusszytometrie (obere drei Schaubilder). CIR-ULBP1 (schwarze Histogramme), CIR-ULBP2 (dunkelgraue Histogramme), CIR-ULBP3 (schwach graue Histogramme) und CIR-neo Leukämiezelllinien (offene Histogramme mit durchgezogener Linie) wurden mit AUMO1, BUMO1, CUMO1 und der entsprechenden Isotypkontrolle (offene Histogramme mit gepunkteter Linie; untere drei Schaubilder) analysiert. (Das Experiment wurde von Frederike Gieseke durchgeführt).

Der mAb AMO-1 detektierte MICA*01 und MICA*04, jedoch kein MICB*02, im Gegensatz dazu detektierte der mAb BMO1 C1R-MICB*02, aber kein MICA. Die anderen der anti-MIC mAb banden jedoch sowohl MICA als auch MICB-Moleküle, da die MIC-Moleküle in den extrazellulären Domänen strukturell sehr ähnlich sind. Unter ihnen sind die mAb BAMO1 und BAMO3, die spezifisch für die α_1 - und α_2 - (BAMO1) bzw. α_3 - (BAMO3) Domänen sind und in unserer Studie verwendet wurden. Die mAb AUMO1, BUMO1 und CUMO1 zeigten jeweils eine hohe Affinität zu C1R Zelllinien, die jeweils mit ULBP1 (AUMO1), ULBP2 (BUMO1) oder ULBP3 (CUMO1) transfiziert worden waren.

Die Sensitivität des MICB ELISA wurde mittels löslichem MICB*02 bestimmt, wobei die mAb BAMO1 und BMO2 verwendet wurden. Der MICB-ELISA detektiert bis zu einer Konzentration 10pg/ml (Fig. 4-2).

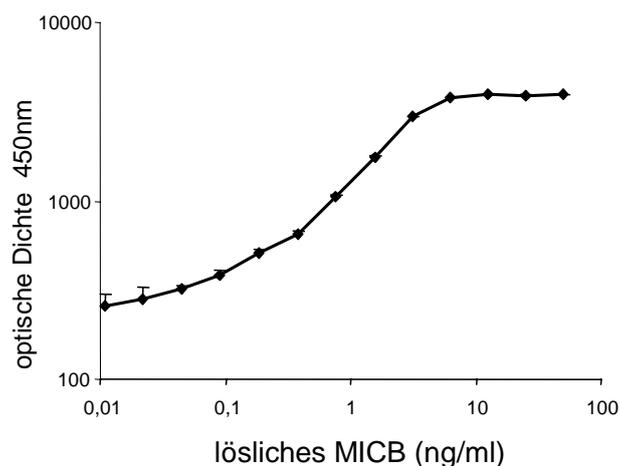


Fig. 4-2. Die Kurve zeigt die Sensitivität des MICB-ELISA: 13 Verdünnungsstufen wurden analysiert. Verwendeter Fangantikörper war BAMO1, Detektionsantikörper BMO2. Jeder Punkt auf der Kurve bildet den Mittelwert von vier Messwerten ab. Das Experiment wurde von Helmut Rainer Salih und Holger Antropius durchgeführt.

Die Spezifität des MICA und MICB ELISA wurde anhand von Überständen von C1R-MICA*01, C1R-MICA*04 und C1R-MICB*02 gezeigt (Fig. 4-3).

C

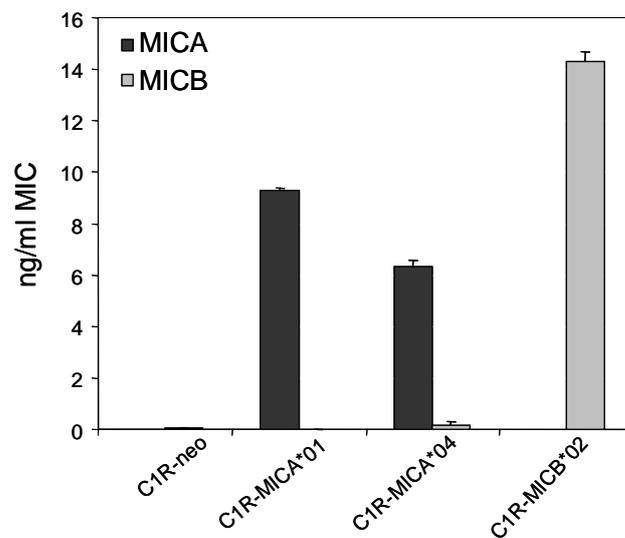


Fig. 4-3. Die Überstände von CIR-neo, CIR-MICA, CIR-MICB-Transfektanten wurden auf lösliche MIC-Moleküle durch einen MICA (schwarze Säulen) und MICB (graue Säule) Sandwich-ELISA untersucht. Bei der Analyse der Überstände von C1R-MICA Transfektanten detektierte man starke Signale in dem ELISA für MICA, jedoch nicht für MICB. MICA*01 und MICA*04 sind allelische Varianten, die jedoch beide von dem ELISA detektiert wurden, was bestätigt, dass er mit breiter Spezifität MICA Proteine erkennt. Im Vergleich dazu detektierte der MICB ELISA hohe Spiegel an löslichem MICB und nur wenige Mengen an löslichem MICA. Dies zeigt deutlich, dass beide ELISA jeweils spezifisch für die MICA und MICB Proteine sind. Das Experiment wurde von Iris Kehrer durchgeführt.

4.3 Expression der NKG2DL auf Leukämiezelllinien

Verschiedene Leukämiezelllinien (C1R, NB4, K562, HL-60) wurden mit AMO1 (anti-MICA), BMO1 (anti-MICB), BAMO1 (anti-MICA/B), AUMO1 (anti-ULBP1) und BUMO1 (anti-ULBP2), BMO2 (anti-MICB) und BMO3 (anti-MICA/B) und CUMO1 (anti-ULBP3) und Ziege anti-Maus-FITC Antikörper inkubiert und im Durchflußzytometer analysiert (Fig. 4-4).

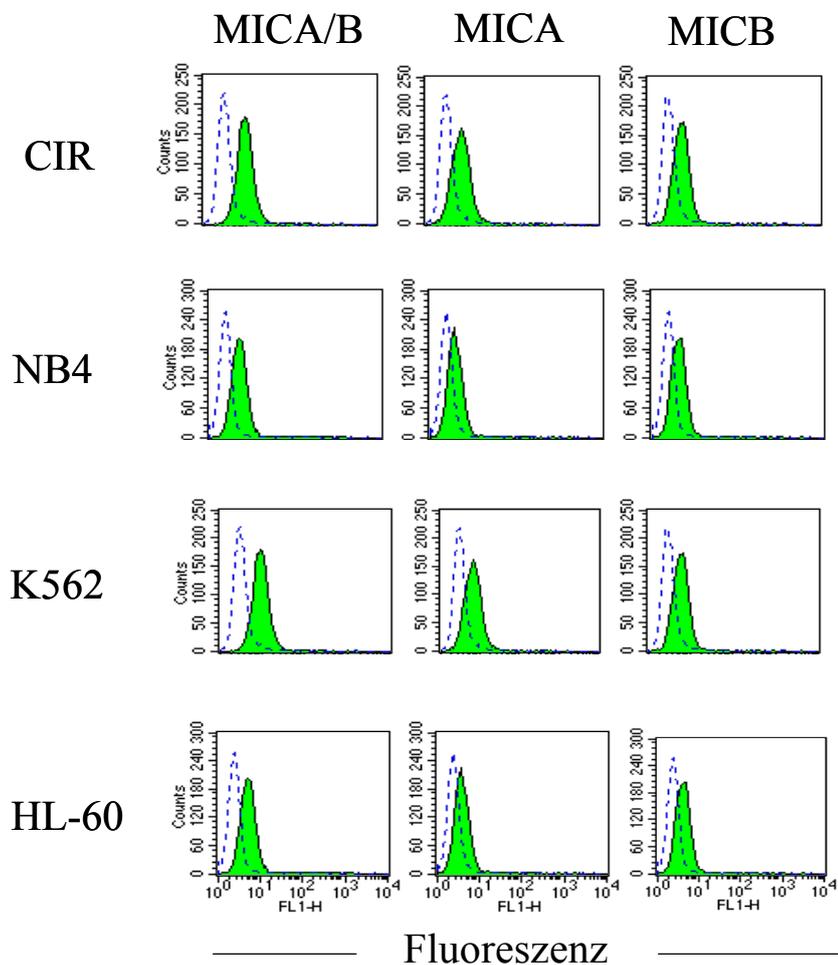


Fig. 4-4: Oberflächenexpression der NKG2DL auf Leukämiezelllinien.

C1R Zellen exprimieren wenig endogenes MICA, MICB und bedeutende Mengen an ULBP2, was im Gegensatz zu einer erst vor kurzem erschienenen Publikation steht, die einen ULBP2⁻, ULBP3⁺ Phenotyp für C1R Zelllinien beschreibt [43].

4.4 Expression von NKG2DL auf Patientenleukämiezellen

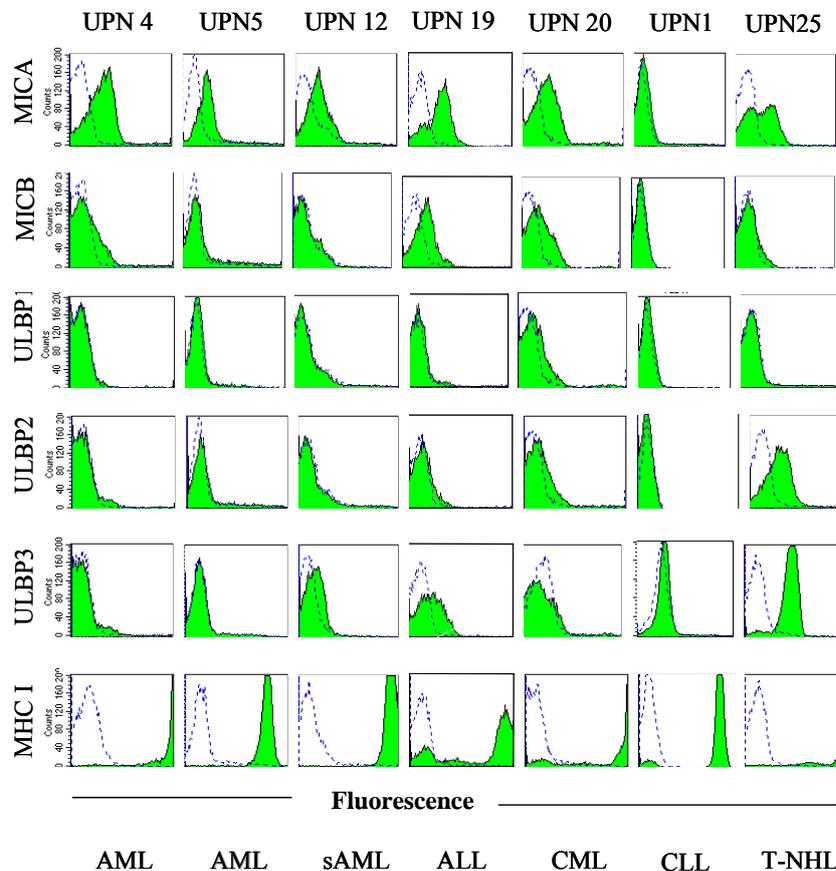


Fig. 4-5 PBMC von Leukämiepatienten wurden mit anti-NKG2DL mAb inkubiert und mittels FACS-Analyse untersucht. Je nach Leukämietyp wurden sie entweder auf CD19, CD33 oder CD34 gefärbt und selektiert. Die Histogramme zeigen CD33 und CD34 positive Leukämiezellen und ihre NKG2DL-Oberflächenexpression (graue Histogramme); die gepunktete Linie stellt die jeweilige Isotypkontrolle dar.

Von 25 Patientenblutproben verschiedener hämatopoetischer Neoplasien wurden die PBMC mittels Ficoll-Hypaque isoliert und mit verschiedenen mAb für NKG2DL markiert. Die Tumorzellpopulation wurde weiterhin, je nachdem welche Tumorart vorlag, durch einen der folgenden Antikörper selektioniert: CD33, CD34, CD19 oder HLA-DR (Tabelle 1). Einige der untersuchten Patientenproben zeigten eine starke MHC Klasse I Expression auf der Zelloberfläche (Fig. 4-5). Von den 25 untersuchten Patienten exprimierten 19 (76%) einen oder mehrere NKG2DL in signifikanter Stärke

auf der Zelloberfläche (Tab. 4). Am häufigsten wurde die MICA Oberflächenexpression registriert (14 von 25 Patienten), wohingegen die Expression von anderen NKG2DL weniger häufig vorkam. MICB wurde von 11 Patienten exprimiert, wohingegen ULBP1, ULBP2 und ULBP3 jeweils in 7 Fällen gemessen wurde. Die Expressionsmuster waren ziemlich heterogen und korrelierten nicht mit besonderen Leukämieentitäten (Tab. 4).

Tabelle 4. NKG2DL-Expression und Freisetzung durch Patientenleukämiezellen.

UPN	MICA SFI	MICB SFI	ULBP1 SFI	ULBP2 SFI	ULBP3 SFI	MHC KI. I SFI	sMICA pg/ml	nMICA pg/ml	sMICB pg/ml	nMICB pg/ml
1	5.0	1.8	1.0	8.5	8.2	9646	924	9.2	288	2.9
2	3.1	3.2	2.3	1.1	1.0	2128	885	7.5	36	0.3
3	1.5	1.0	1.0	1.1	1.0	352	267	6.9	336	8.6
4	7.3	1.2	1.0	1.0	1.0	9646	10296	591.7	27	1.6
5	3.2	1.2	1.0	1.1	1.1	1433	978	11.2	183	2.1
6	1.4	1.5	1.3	1.7	1.0	1000	54	0.8	90	1.3
7	1.1	1.0	1.0	1.1	1.1	805	75	8.3	72	8.0
8	1.1	1.3	1.0	1.0	1.0	626	99	110.0	126	140.0
9	1.2	1.6	1.7	1.7	1.0	237	318	454.3	150	214.3
10	1.1	10.0	1.3	1.0	1.1	1333	ND	ND	ND	ND
11	2.7	1.7	1.0	3.3	1.6	9646	ND	ND	ND	ND
12	2.8	1.0	1.0	1.0	2.4	5829	642	401.3	132	82.5
13	1.1	1.0	1.0	1.1	1.0	12,4	216	6.4	180	5.3
14	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1778	141	10.8	57	4.4
15	1.5	1.2	1.1	1.1	1.0	1433	114	1.8	69	1.1
16	2.2	2.1	1.1	1.0	1.1	835	174	13.5	69	5.3
17	1.4	1.2	6.4	1.9	1.0	316	159	1.3	117	0.9
18	4.7	4.8	3.9	1.0	6.7	1654	321	267.5	303	252.5
19	12.1	3.6	1.1	1.0	1.8	392	549	51.0	66	6.2
20	5.6	3.1	1.9	1.8	1.0	9830	1173	24.4	69	1.4
21	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	52.3	96	0.5	153	0.8
22	1.7	1.3	1.8	1.0	1.3	263	150	1.2	318	2.5
23	1.0	1.0	1.0	1.0	2.7	9646	216	19.6	288	26.2
24	6.9	5.2	8.1	8.1	2.3	9646	ND	ND	ND	ND
25	1.2	1.0	1.1	1.0	1.3	1980	ND	ND	ND	ND

Nach der Isolation wurden die malignen Zellen mit NKG2DL-mAb gefärbt und die CD19, CD33, CD34 positiven Zellen selektioniert. Die Oberflächenexpression wurde in spezifischen Fluoreszenz-Index-Werten quantifiziert.

4.5 NK-Erkennung von Leukämiezellen via NKG2D

Danach stellte sich die Frage nach der funktionellen Relevanz der NKG2DL Expression auf den frisch isolierten Leukämiezellen. Dazu wurden Patientenzellen (UPN5) die ausschließlich MICA, aber keinen der anderen NKG2DL exprimierten, einem Chromfreisetzungstest mit der NKL Zelllinie unterworfen. NKL exprimieren NKG2D Rezeptoren und sind deshalb gut geeignet, die NKG2D-vermittelte Zielerkennung zu

untersuchen. Die Lyse der Leukämiezellen war abhängig von der MICA/NKG2D Interaktion, da sie komplett durch die Zugabe von anti-MICA (AMO1) und anti-NKG2D mAb blockierbar war (Fig. 4-5). Dies zeigte, daß die NKG2DL Expression Leukämiezellen für die NK Zell-vermittelte Cytotoxizität anfällig macht.

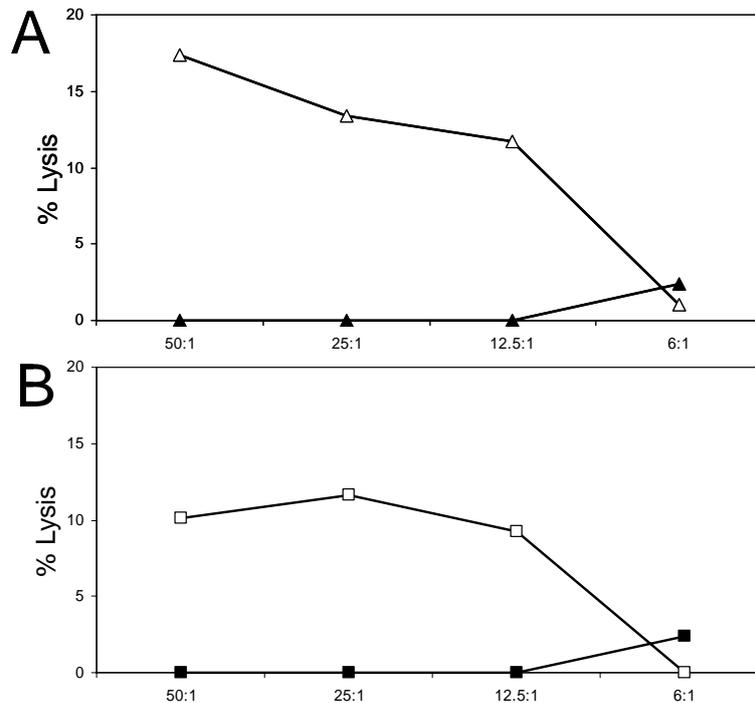


Fig. 4-6. Die Erkennung von MICA exprimierenden AML Zellen durch die NKL Zelllinie wurde mittels eines Chromfreisetzungstests analysiert. Die Lyse von AML Zellen war blockierbar mit anti-MICA mAb AMO1 (A, schwarze Dreiecke) und anti-NKG2D mAb 8G7 (B, schwarze Vierecke), aber nicht durch Zugabe der geeigneten Isotypkontrollen. Das Experiment wurde von A. Steinle durchgeführt.

4.6 Serumspiegel von löslichem MICA und MICB

MICA wird in löslicher Form von der Zelloberfläche von malignen Zellen epithelialen Ursprungs freigesetzt und ist deshalb in Seren von Patienten mit gastrointestinalen Tumoren nachweisbar [66]. Um diese Studien auf hämatopoetischen Zellen zu erweitern, untersuchten wir die Seren von Leukämiepatienten auf lösliches MICA (sMICA). Zusätzlich verwendeten wir einen neu etablierten MICB ELISA, um die Serumspiegel für MICB (sMICB) zu bestimmen (Fig. 4-7). Die als Kontrollen

verwendeten Seren von 9 gesunden freiwilligen Spendern enthielten nur niedrige MICA- sowie MICB- Spiegel nahe der Detektionsgrenze der ELISA zwischen 9pg/ml und 64pg/ ml für MICA und zwischen 6 pg/ml und 21 pg/ml für MICB mit Mittelwerten von 34 pg/ml und 10pg/ml. Seren von 14 Patienten mit AML zeigten MICA- Werte zwischen 54 pg/ml und 978 pg/ml mit einem Mittelwert von 335pg/ml. Ein AML Patient (UPN 4 in Tab. 4) zeigte wiederholt außerordentlich hohe MICA- Werte um 10ng/ml. Die MICB- Spiegel waren zwischen 27 pg/ml und 336 pg/ml mit einem Mittelwert bei 121pg/ml. Bei den beiden Patienten mit ALL waren die MICA-Serumspiegel bei 549 pg/ml und 321 pg/ml, MICB- Spiegel waren 66 pg/ml und 303 pg/ ml. Der Patient mit einem NHL hatte Serumspiegel von 924 pg/ml MICA und 288 pg /ml MICB, und die Spiegel der CML Patienten rangierten zwischen 96 pg/ml und 1173 pg/ml mit einem Mittelwert von 409 pg/ml für MICA und zwischen 69 pg/ml und 318 pg/ml mit einem Mittelwert von 207 pg/ml für MICB (Tab. 4). Von den beiden Patienten mit CLL ließ sich kein Serum erwerben. Die Unterschiede der MICA bzw. MICB- Spiegel in Seren von gesunden Spendern und Patienten (AML, ALL und CML) waren statistisch signifikant ($p < 0,03$), was durch den Student's Test bestimmt wurde. Diese starke Korrelation von Tumorerkrankung und erhöhten MICA- und MICB-Spiegeln legt nahe, dass MIC Moleküle zu beträchtlichen Mengen von der Zelloberfläche von Tumorzellen in vivo freigesetzt werden.

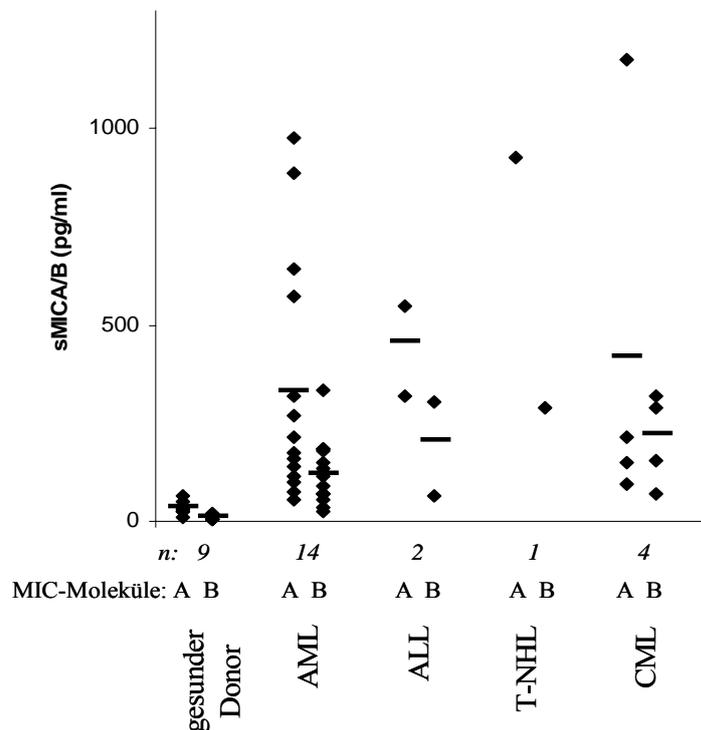


Fig. 4-7. Die Serumspiegel von sMICA und sMICB bei Leukämiepatienten mit hämatopoetischen Neoplasien. Die Seren von Patienten wurden vor Therapie mit einem ELISA auf MICA und MICB analysiert. Zur Detektion von MICA wurde der Fangantikörper AMO1 und der Detektionsantikörper BAMO3 in Verbindung mit löslichem rekombinatem MICA*04 als Standard verwendet; für MICB BAMO1 als Fangantikörper und BMO2 als Detektionsantikörper mit löslichem rekombinatem MICB*02. Zur Entwicklung wurden IgG2a-HRP (1:8000) und TMB-Substrat verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte von Triplikaten angegeben. (n =Anzahl der Spender jeder Gruppe).

Es fand sich aber keine deutliche Korrelation zwischen den Spiegeln von MICA und MICB im Serum und der Expression auf der Zelloberfläche (Tab. 5). Um herauszufinden, ob eine potentielle Korrelation durch die sehr unterschiedliche Anzahl an malignen Zellen eines Patienten maskiert wurde, normalisierten wir die Serumspiegel von MIC Molekülen, indem wir sie durch ihren entsprechenden „white blood“ count in Giga/l (nMICA und nMICB) dividierten. Wieder fand sich keine Korrelation zwischen sMIC Serumspiegeln und der Oberflächenexpression der entsprechenden NKG2DL (Tab. 4, Fig. 4-5).

Tabelle 5. Lösliches MICA und MICB.

	niedrigste Werte pg/mL	höchste Werte pg/mL	Mittelwert pg/mL	STDEV pg/mL	Spender
Gesunde					
Spender					
MICA	9	64	34	17	9
MICB	6	21	10	5	9
AML					
MICA	54	978	335	308	14
MICB	27	336	121	79	14
ALL					
MICA	321	549	435	NA	2
MICB	66	303	185	NA	2
CML					
MICA	96	1173	409	512	4
MICB	69	318	207	117	4
NHL					
MICA	NA	924	NA	NA	1
MICB	NA	288	NA	NA	1

Für jede Tumorentität sind der niedrigste und der höchste Wert von löslichem MICA und MICB, der Mittelwert und die Standardabweichung (STDEV), sowie die Zahl der Spender angegeben.

5 Diskussion

Zu den menschlichen NKG2D-Liganden (NKG2DL) zählen die stress-induzierbaren Oberflächenglykoproteine MICA und MICB, welche auf vielen epithelialen Tumoren *in vivo* exprimiert werden [65, 67-69]. Erst in letzter Zeit gelang es, die ULBPs (UL16 binding proteins) zu identifizieren [42, 67], die weitere NKG2D-Liganden darstellen. Sie sind auf zahlreichen Tumorzelllinien epithelialen und mesenchymalen Ursprungs exprimiert [43], aber über ihre Expression *in vivo* ist noch wenig bekannt. Die Analyse der NKG2DL Expression *in vivo* ist von besonderem Interesse seit jüngste Experimente gezeigt haben, dass das NKG2D/NKG2DL-System an der Immunüberwachung von Tumoren beteiligt ist [70, 72]. Bei Mäusen findet sich eine Proteinfamilie, die starke strukturelle Verwandtschaft zu den ULBPs hat, die sog. RAE-1 Moleküle (retinoic acid-early inducible molecules), die ebenfalls Liganden für NKG2D darstellen [71, 33]. Es konnte gezeigt werden, dass die RAE-1 Expression durch Karzinogene induziert wird und Rae1-markierte Tumorzellen die Aktivität von $\gamma\delta$ T-Zellen erhöhen [80]. Weitere Veröffentlichungen beschreiben, dass Rae-1 transfizierte Zelllinien *in vivo* durch NK und CD8⁺ T-Zellen eliminiert werden und die Tumorummunität gegen Parentalzelllinien in einem Mausmodell [70] induzieren. Dabei war die jeweilige Tumorantwort deutlich abhängig von der Expressiondichte der NKG2DL auf der Tumorzelloberfläche, was gut zu dem allgemeinen Konzept passt, dass die NK-Zellaktivität durch ein dynamisches Gleichgewicht von aktivierenden und inaktivierenden Signalen gesteuert wird. Ist die NK-Zelle gleichzeitig inhibitorischen und aktivierenden Signalen ausgesetzt, kann ein schwaches positives NKG2DL-Signal keine NK-Zellaktivierung auslösen. Nur eine starke NKG2DL Expression kann die Hemmung überspielen [34, 42]. Diese Ansicht wird unterstützt durch die klare Korrelation, die zwischen der NKG2DL-Expressiondichte auf NKG2DL-transfizierten Tumorzelllinien besteht und ihrer Fähigkeit Tumorummunität *in vivo* zu generieren [70].

Bis jetzt ist noch wenig über die Rolle des NKG2D/NKG2DL-Systems bei Leukämien bekannt, weil ausschließlich gesundes Gewebe und epitheliale Tumore auf MICA untersucht worden sind. Erst kürzlich konnte durch D. Pende und Mitarbeiter die Expression von NKG2DL auf hämatopoetischen Zelllinien und ihre NKG2D-vermittelte Erkennung durch NK-Zellen dargestellt werden [43]. Aber es fehlen noch

immer Ergebnisse, die die Expression und Funktionalität von NKG2DL bei Leukämiezellen *ex vivo* beschreiben. Eine andere Studie zeigte *ex vivo* Daten verschiedener mRNAs von NKG2DL bei Leukämien, ohne dabei die Oberflächenexpression und die Funktionalität zu untersuchen [74]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass frisch vom Patienten isolierte Leukämiezellen ein sehr heterogenes NKG2DL-Expressionmuster aufweisen. Pende und Mitarbeiter beschrieben für die meisten T-Zell-Leukämien einen MICA⁻ ULBP⁺ Phänotyp, während sie bei allen untersuchten AML Zelllinien und meisten B-Lymphomzellen ein MICA⁻ ULBP⁻ Phänotyp fanden [43]. Wir detektierten MICA und ULBP Moleküle bei einem T-Zell-Lymphom und den beiden untersuchten ALL Patienten. Zusätzlich detektierten wir signifikante Signale von MICA und MICB bei mehreren AML. Jedoch wurde nur MICA und kein MICB bei AML, die als Vorläuferstadium ein MDS hatten, detektiert. Die NKG2DL Expressionsmuster unterschieden sich zwischen den einzelnen Patienten und es fand sich keine signifikante Korrelation zwischen einem besonderen NKG2DL und einzelnen Leukämieentitäten, obwohl die beiden ALL Patienten hohe Fluoreszenzintensitäten an NKG2DL verglichen mit anderen Entitäten zeigten (Fig. 4.5, Tab. 4). Insgesamt exprimierten 76% der untersuchten Patienten einen oder mehrere Liganden für NKG2DL auf der Zelloberfläche. Nicht-maligne PBMC zeigten keine Expression von NKG2DL, was durch die Analyse von CD33, CD34, CD19 und CD117-negativen Populationen bestimmt wurde. Dies stimmt mit früheren Untersuchungen überein, die ebenfalls keine NKG2DL Expression auf gesunden PBMC nachweisen konnten [42, 75].

Die Patientenleukämiezellen zeigten weiterhin verschieden hohe MHC Klasse I Expressionsmuster, was nicht mit der NKG2DL-Expression korrelierte (Fig. 4-4).

Es konnte nicht nur gezeigt werden, dass NKG2DL in beträchtlichem Ausmaß auf Leukämien exprimiert werden, sondern auch Leukämiezellen dergestalt markieren, dass sie für die Lyse durch NK-Zellen trotz einer hohen MHC Klasse I Expression zugänglich werden. Dies steht im Einklang mit dem momentanen Wissensstand über die NK-Zellfunktion [65, 42] und legt die Möglichkeit nahe, dass die NKG2DL-Expression auf Leukämiezellen *in vivo* für die Immunabwehr durch NK-Zellen relevant sein könnte.

Weiterhin lassen uns die Daten von allogenen Knochenmarkstransplantationen annehmen, dass NK-Zellen eine starke antileukämische Aktivität haben [76, 77]. Zudem wurde gezeigt, dass bei AML Patienten die NK-Zellaktivität mit der verbleibenden Überlebenszeit korreliert [78]. Diese Ergebnisse könnten zum Teil über das NKG2D/NKG2DL-System erklärt werden.

Erst kürzlich wurde im Labor von A. Steinle gezeigt, dass MICA als lösliche Form von der Zelloberfläche durch die Aktivität von Metalloproteinasen freigesetzt wird [66]. Weiterhin wurde gezeigt, dass lösliches MICA NKG2D systemisch herunterreguliert und dadurch die NKG2D-Funktionalität von tumor-antigenspezifischen cytotoxischen Lymphozyten beeinträchtigt [79]. Deshalb führt die Freisetzung von löslichem MICA und MICB bei Leukämien nicht nur zu einer reduzierten Immunogenität der Leukämiezelle durch eine verminderte Ligandendichte auf der Zelloberfläche, sondern auch zu einer systemisch verminderten Ansprechbarkeit der NKG2D-Rezeptorfunktion von cytotoxischen Effektorzellen. In dieser Studie verwendeten wir den ELISA für MICA und MICB, um die Spiegel an löslichem MICA und MICB in den Seren von Leukämiepatienten und gesunden Freiwilligen zu bestimmen.

Während nur geringe Spiegel von sMICA und sMICB nahe der Detektionsgrenze bei gesunden Spendern gefunden wurden, zeigte die Mehrheit der Patientenserum signifikant erhöhte Werte von sMICA und sMICB. Dabei konnte keine Korrelation zwischen der Oberflächenexpression und den Serumspiegeln von sMICA und sMICB bestimmt werden (Tab. 4). Um zu testen, ob die MIC Serumspiegel von der Anzahl der malignen Zellen im Blut abhängig waren, teilten wir die MIC Serumwerte durch die Anzahl der Zellen des WBC (white blood count) (Tabelle 4). Wieder konnte keine Korrelation nachgewiesen werden.

Nachdem die Expression von MICA und MICB auf der Zelloberfläche maligner Zelllinien und hämatopoetischer Tumoren unterschiedlicher Entität beschrieben wurde, könnten die intrazellulären molekularen Vorgänge näher charakterisiert werden, die zu ihrer Expression auf Tumorzellen führen. Auf molekularer Ebene ist zur Induktion und Expression der NKG2DL noch sehr viel unbekannt. Offen ist z. B. der Signalweg von „Stressfaktoren“ bis zur Aktivierung der NKG2DL-Expression und ob es bei Leukämien bestimmte Modulatoren gibt, die die Bildung und Oberflächenexpression von NKGDL steuern.

Bislang wurde gezeigt, dass MICA und MICB in löslicher Form von der Zelloberfläche von frisch isolierten Leukämiezellen freigesetzt werden. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu klären, ob es dadurch auch zu einer verminderten Ansprechbarkeit der NKG2D- tragenden Effektorzellen kommt.

Weiterhin wird untersucht, ob der sMICA-Serumspiegel bei Leukämiepatienten als diagnostischer oder prognostischer Parameter von Nutzen ist. Denkbar wäre, dass hohe Spiegel an sMICA mit einer schlechteren Prognose korrelieren, wohin gegen niedrige Spiegel bei einer hohen MICA-Dichte auf der Zelloberfläche mit einer besseren Prognose einhergehen könnten. Hierzu müssten von jeder Leukämieform umfassendere Spiegelbestimmungen unternommen werden.

Ob lösliches MICA bzw. MICB im Serum nur bei malignen oder autoimmunen Prozessen oder auch unter anderen Bedingungen erhöht ist, sollte ebenfalls noch untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das NKG2D/NKG2D-Liganden-System bei der Immunüberwachung von Leukämien vermutlich eine Rolle spielt und dass Leukämiezellen mit der Freisetzung von MIC-Molekülen einen Mechanismus entwickelt haben, die Potenz des NKG2D/NKG2D-Liganden-Systems zu schwächen oder gar zu neutralisieren.

6 Zusammenfassung

Der C-Typ Lektin-ähnliche Rezeptor NKG2D stimuliert die Immunantwort durch die Aktivierung von NK-Zellen und die Kostimulation von CD8⁺-T-Zellen. NKG2D-Liganden (NKG2DL) sind die MHC Klasse I-ähnlichen, stress-induzierbaren Oberflächenglykoproteine MICA und MICB, die auf vielen epithelialen Tumoren exprimiert werden, und die ULBP, über die noch wenige Daten vorliegen.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Leukämiezellen von Patienten als auch verschiedene Leukämiezelllinien MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 und ULBP3 in unterschiedlichem Ausmaß exprimieren. Die mittels Durchflusszytometrie gewonnenen Daten zeigen auch, dass sich die Stärke der NKG2DL-Expression auf der Zelloberfläche verschiedener Leukämiezellen deutlich unterscheidet. Dabei findet man kein einheitliches NKG2DL-Muster bei einer bestimmten Tumorentität. In ELISA-Experimenten konnte für MICA und MICB gezeigt werden, dass sie bei hämatologischen Tumoren in humanem Serum in löslicher Form erhöht vorhanden sind. In Chromfreisetzungstests wurden Patientenleukämiezellen, die ausschließlich MICA exprimierten, durch NK-Zellen via NKG2D lysiert. Die Blockierung von MICA und/oder NKG2D mittels anti-MICA oder anti-NKG2D mAb führte zur kompletten Aufhebung der Lyse von Leukämiezellen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse machen deutlich, dass auf der einen Seite bei Leukämien NKG2D-Liganden *auf der Zelloberfläche* exprimiert werden, unter denen MICA nachgewiesenermaßen als NKG2D-Agonist wirkt, während auf der anderen Seite Leukämien *lösliches* MICA/B freisetzen, was der NKG2D-vermittelten Aktivierung cytotoxischer Lymphozyten entgegen wirkt. Da MICA und MICB in löslicher Form im Serum detektiert wurden, stellt die Reduktion der MIC-Oberflächenexpression vermutlich einen Mechanismus für Leukämiezellen dar, um der Überwachung des Immunsystems zu entgehen. Über die Rolle der anderen MHC-Klasse I-ähnlichen Moleküle (ULBP 1-3) kann zu diesem Zeitpunkt noch nicht viel gesagt werden.

7 Literatur

1. **Chen, Y. H., Weiner, H. L.,** 1996. Dose-dependent activation and deletion of antigen-specific T cells following oral tolerance. *Ann N Y Acad Sci.* **778:** 111-128.
2. **Strobel, S., Mowat, A. M.,** 1998. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol Today.* **19:** 173-181.
3. **Berg, R. D.,** 1999. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol.* **473:** 11-30.
4. **Gehr, P., Im Hof, V., Geiser, M., Schurch, S.,** 2000. The mucociliary system of the lung--role of the surfactants. *Schweiz Med Wochenschr.* **130:** 691-698.
5. **Berg, R. D.,** 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* **4:** 430-435.
6. **Podolsky, D. K.,** 1999. Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *Am J Physiol.* **277:** 495-499.
7. **Aderem, A., Underhill, D. M.,** 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* **17:** 593-623.
8. **Zhang, P., Summer, W. R., Bagby, G. J., Nelson, S.,** 2000. Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev.* **173:** 39-51.
9. **Svanborg, C., Godaly, G., Hedlund, M.,** 1999. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr Opin Microbiol.* **2:** 99-105.
10. **Bancherau, J., Steimann, R. M.,** 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* **392:** 245-252.
11. **Ramirez, M. C., Sigal, L. J.,** 2002. Macrophages and dendritic cells use the cytosolic pathway to rapidly cross-present antigen from live, vaccinia-infected cells. *J Immunol.* **169:** 6733-6742.
12. **Schulz, O., Reis e Sousa C.,** 2002. Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8alpha + dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells. *Immunology.* **107:** 183-189.

13. **Renard, V., Cambiaggi, A., Vely, F., Blery, M., Olcese, L., Olivero, S., Bouchet, M., Vivier, E.**, 1997. Transduction of cytotoxic signals in natural killer cells: a general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes. *Immunol Rev.* **155**: 205-221.
14. **Trinchieri G.**, 1989. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol.* **47**: 187-376.
15. **Mingari, M. C., Poggi, A., Biassoni, R., Bellomo, R., Ciccone, E., Pella, N., Morelli, L., Verdiani, S., Moretta, A., Moretta L.**, 1991. In vitro proliferation and cloning of CD3- CD16⁺ cells from human thymocyte precursors. *J Exp Med.* **174**: 21-26.
16. **Lanier, L. L., Spits, H., Phillips, J. H.**, 1992. The developmental relationship between NK cells and T cells. *Immunol Today.* **13**: 392-395.
17. **Kim, S., Iizuka, K., Aguila, H. L., Weissman I. L., Yokoyama W. M.**, 2000. *In vivo* natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA Adv Immunol.* **97**: 2731-2736.
18. **Lanier, L. L., Ruitenberg, J. J., Phillips, J. H.**, 1988. Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *J Immunol.* **141**: 3478-3485.
19. **Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P., Salazar-Mather, T. P.**, 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol.* **17**: 189-220.
20. **Karre, K.**, 2002. NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand J Immunol.* **55**: 221-228.
21. **Karre, K.**, 1985. Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity: a reevaluation and a hypothesis. *Academic Press* . 81-91.
22. **Lanier, L. L.**, 1998. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol.* **16**: 359- 393.
23. **Litwin, V., Gumperz, J., Parham, P., Phillips, L. H., Lanier L. L.**, 1993. Specificity of HLA class I antigen recognition by human NK clones: evidence for clonal heterogeneity, protection by self and non self alleles, and influence of the target cell type. *J Exp Med.* **178**: 1321-1336.
24. **Long, E. O.**, 1999. Regulation of immune response through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol.* **17**: 875-904.

25. **Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Biassoni, R., Mingari, M. C., Moretta, L.**, 1996. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol.* **14**: 619-648.
26. **Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Biassoni, R., Mingari, M. C., Moretta, L.**, 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* **19**: 197-223.
27. **Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M. C., Moretta L.**, 2000. Natural cytotoxicity receptors that trigger the human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today.* **21**: 228-234.
28. **Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T. I., Bushkin, Y., Davis, D. M., Strominger, J. L., Yewdell, J. W., Porgador, A.**, 2001. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature.* **409**: 1055-1060.
29. **Pessino, A., Sivori, S., Bottino, C., Malaspina, A., Morelli, L., Moretta, L., Biassoni, R., Moretta, A.**, 1998. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in natural cytotoxicity. *J Exp Med.* **188**: 953-960.
30. **Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L., Moretta A.**, 1997. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med.* **186**: 1129-1136.
31. **Moretta, L., Ciccone, E., Mingari, M. C., Biassoni, R., Moretta, A.**, 1994. Human natural killer cells: origin, clonality, specificity and receptors. *Adv Immunol.* **55**: 341-380.
32. **Houchins, J. P., Yabe, T., McSherry, C., Bach, F. H.**, 1991. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med.* **173**: 1017-1020.
33. **Diefenbach, A., Jamieson, A. M., Liu, S. D., Shastri, N., Raulet, D. H.**, 2000. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol.* **1**: 119-126.
34. **Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Philips, J. H., Lanier, L. L., Spies, T.**, 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science.* **285**: 727-729.

35. **Diefenbach, A., Tomasello, E., Lucas M., Jamieson A. M., Hsia J. K., Vivier E., Raulet D. H.**, 2002. Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol.* **3**: 1142-1149.
36. **Gilfillan, S., Ho, E. L., Cella M., Yokoyama, W. M., Colonna, M.**, 2002. NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol.* **3**: 1150-1155.
37. **Long, E. O.**, 2002. Versatile signaling through NKG2D. *Nat Immunol.* **3**: 1119-1120.
38. **Jiang, K., Zhong, B., Gilvary, D. L., Corliss, B. C., Hong-Geller, E., Wei, S., Djeu, J. Y.**, 2000. Pivotal role of phosphoinositol-3 kinase in regulation of cytotoxicity in natural killer cells. *Nat Immunol.* **1**: 419-425.
39. **Vivier, E., Tomasello, E., Paul, P.**, 2002. Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? *Curr Opin Immunol.* **14**: 306-311.
40. **Welte, S., Sinzger, C., Lutz, S. Z., Singh-Jasuja, H., Laib-Sampaio, K., Eknigg, U., Rammensee, H. G., Steinle A.**, 2003. Selectiv intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *Eur J Immunol.* **33**: 194-203.
41. **Marsh S. G.**, HLA-lists, HLA Informatics Group, Anthony Nolan Research Institute, Royal Free Hospital, UK (<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/index.html>).
42. **Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C. L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., Chalupny, N. J.**, 2001. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* **14**: 123-133.
43. **Pende, D., Rivera, P., Marenaro, S., Chang, C. C., Biassoni, R., Conte, R., Kubin, M., Cosman, D., Ferrone, S., Moretta, L., Moretta A.**, 2002. Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotyps: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res.* **62**: 6178-6186.
44. **Radosavljevic, M., Cuillerier, B., Wilson, M. J., Clement, O., Wicker, S., Gilfillan, S., Beck, S., Trowsdale, J. and Bahram, S.**, 2002. A cluster of ten novel MHC class I related genes on human chromosome 6q24.2-q25.3. *Genomics.* 2002. **79**: 114-123.

45. **Bernard, J.**, 1989. The epidemiology of leukemias (past, present, future). *Nouv Rev Fr Hematol.* **31**: 103-109.
46. **Cronkite, E. P.**, 1987. Chronic leukemogenesis: benzene as a model. *Semin Hämatol.* **24**: 2-11.
47. **Preston, D. L., Kusumi, S., Tomonaga, M., Izumi, S., Ron, E., Kuramoto, A., Kamada, N., Dohy, H., Matsuo, T., Matsui T.**, 1994. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1887. *Radiat Res.* **137**: 68-97.
48. **Ichimaru, M., Tomonaga, M., Amenomori, T., Matsuo, T.**, 1991. Atomic bomb and leukemia. *J Radiat Res.* **32**: 14-19.
49. **Leenhouts H. P., Brugmans M. J., Bijwaard H.**, 2002. The implications of re-analysing radiation-induced leukaemia in atomic bomb survivors: risk for acute and chronic exposures are different. *J Radiol Prot.* **22**: 163-167.
50. **Deininger, M. W., Bose, S., Gora-Tybor, J., Yan, X. H., Goldman, J. M., Melo, J. V.**, 1998. Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high-dose ionizing radiation. *Cancer Res.* **58**: 421-425.
51. **Nowell, P. C. and Hungerford, D. A.**, 1960. A minute chromosome in a human chronic granulocytic leukemia. *Science.* **132**: 1497-1501.
52. **Prakash, O., Yunis, J. J.**, 1984. High resolution chromosomes of the t(9;22) positive leukemias. *Cancer Genet Cytogenet.* **11**: 361-367.
53. **Rowley, J. D.**, 1973. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* **243**: 290-293.
54. **Kranz, B. R.**, 1989. Immunocytolytic differentiation of normal lymphoid cells. H. Begemann, J. Rastetter (Eds.): Atlas of Clinical Hematology. *Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York*, 4th english edn. 1247-1258.
55. **Herold, G. und Mitarbeiter**, 2001. Innere Medizin. *Verlag Arzt und Information.* S. 76.
56. **Bartl, Lipp, Brack, Diebhold, Funk, Thomsen**, 1997. Akute lymphoblastische Leukämie bei Erwachsenen. <http://www.krebsinfo.de/ki/empfehlung/leuko/III.html>. Teil Klassifikation und spezifische Zytogenetik.

57. Daley, G. Q., van Etten, R. A., Baltimore, D., 1990. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*. **247**: 824-830.
58. Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H., Sultan, C., Cox, C., 1994. The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-American-British Cooperative Leukaemia Group. *Br J Haematol*. **87**: 746-754.
59. Groffen, J., Stephenson, J. R., Heiterkamp, N., de Klein, A., Bartram, C. R., Grosveld, G., 1984. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*. **36**: 93-99.
60. Ben-Neriah, Y., Daley, G. Q., Mes-Masson, A. M., Witte, O. N., Baltimore, D., 1986. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science*. **233**: 212-214.
61. Melo, J. V., 1996. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **10**: 751-756.
62. Hehlmann, R., Hochhaus, A. und Mitarbeiter, 2001. Chronische myeloische Leukämie. Biologie-Diagnostik-Klinik-Therapie. 1. Auflage, Seite 23. UNI-MED Verlag, Bremen-London- Bosten.
63. Lanier, L. L., 2002. NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scan. J Immunol*. **55**: 221-228.
64. Long, E. O., 1999. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol*. **17**: 875-904.
65. Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., Spies, T., 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. **285**: 727-729.
66. Salih, H. R., Rammensee H. G., Steinle A., 2002. Down-regulation of MIC on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol*. **169**: 4098-4102.
67. Steinle, A., Li, P., Morris, D. L., Groh, V., Lanier, L. L., Strong, R. K., Spies, T., 2001. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics*. **53**: 279-287.

68. **Li, P., Morris, D. L., Willcox, B. E., Steinle, A., Spies, T., Strong, R. K.,** 2001. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat Immunol.* **2:** 443-451.
69. **Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K. H., Spies, T.,** 1999. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96:** 6879-6884.
70. **Diefenbach, A., Jensen, E. R., Jamieson, A. M., Raulet, D. H.,** 2001. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumor immunity. *Nature.* **413:** 165-171.
71. **Cerwenka, A., Bakker, A. B., McClanahan T., et al.** 2000. Retinoid acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity.* **12:** 721-727.
72. **Cerwenka, A., Baron J. L., Lanier L. L.,** 2001. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class-I bearing tumor in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98:** 11521-11526.
73. **Pende, D., Cantoni, C., Rivera, P., Vitale, M., Castriconi, R., Marcenaro, S. Nanni, M., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, A., Moretta, L.,** 2001. Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur J Immunol.* **31:** 1076-1086.
74. **Farag, S. S., George S. L., Lee, E. J., Baer, M., Dodge, R. K., Becknell, B., Fehninger, T. A., Silverman, L. R., Crawford J., Bloomfield C. D., Larson, R. A., Schiffer, C. A., Caligiuri M. A.,** 2002. Postremission therapy with low-dose interleukin 2 with or without intermediate pulse dose interleukin 2 therapy is well tolerated in elderly patients with acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B study 9420. *Clin Cancer Res.* **8:** 2812-2819.
75. **Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., Spies T.,** 1996. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Pro Natl Acad Sci U S A.* **93:** 12445-12450.
76. **Asai, O., Longo, D. L., Tian, Z. G., Hornung R. L., Taub, D. D., Ruscetti, F., W., Murphy, W. J.,** 1998. Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest.* **101:** 1835-1842.

77. **Murphy, W. J., Longo, D. L.,** 1997. The potential role of NK cells in the separation of graft-versus-tumor effects from graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation. *Immunol Rev.* **157:** 167-176.
78. **Zeis, M., Uharek, L., Glass, B., Glaska, T., Steinmann, J., Glassmann, W., Loffler, H., Muller-Ruchholz, W.,** 1995. Allogeneic NK cells as potent antileukemic effector cells after allogeneic bone marrow transplantation in mice. *Transplantation.* **59:** 1734-1736.
79. **Groh, V., Wu, J., Yee, C., Spies, T.,** 2002. Tumor-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature.* **419:** 734-738.
80. **Giradi, M., Oppenheim, D. E, Steele, C. R, Lewis, J. M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R. E, Haday, A. C.,** 2001. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science.* **19:** 294(5542): 605-9. Epub 2001 Sep 2001.

8 Abkürzungen

1°	primärer Antikörper
2°	sekundärer Antikörper
ABL	humanes Abelson-Protoonkogen
ADCC	antikörperabhängige, zellvermittelte Cytotoxizität
AIHA	Autoimmunhämolytische Anämie
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC	antigenpräsentierende Zelle
BCR	breakpoint cluster region/Bruchpunktsregion
BSA	Bovines Serum Albumin
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CML	chronisch myeloische Leukämie
DC	Dendritische Zelle
DIC	dissimulierter intravasale Gerinnung
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbend assay/enzymgekoppelter Immunabsorptionstest.
FACS	fluorescence-activated cell sorter/fluoreszenzaktivierter Zellsorter
FCS	Fötale Kälberserum
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
HRP	Horseradish Peroxidase/ Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
IL2	Interleukin 2
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
ITAM	Immunreceptor-Tyrosinaktivierungssequenz
mAb	monoclonal antibody/monoklonaler Antikörper
MALT	Mukosa assoziierte lymphatisches Gewebe
M-bcr	major breakpoint cluster region/große Bruchpunktregion
MDS	myelodysplastisches Syndrom

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIC	MHC-Klasse-I-Ketten-ähnliches Molekül
MICA	MHC-Klasse-I-Ketten-ähnliches Molekül A
μ-bcr	minor breakpoint cluster/kleine Bruchpunktregion
NCR	Natural Cytotoxicity Receptors/Natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren
NK-Zelle	Natural killer cell/Natürliche Killerzelle
NKG2DL	NKG2D Liganden (MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 und ULBP3)
NKL	NK-Zelllinie
PBMC	Peripheral Blood Mononucleocytes/mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBL	periphere Blutleukozyten
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline/
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
Ph	Philadelphia-Chromosom
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PV	Polycythaemia vera
sMICA	soluble MICA/lösliches MICA
sMICB	soluble MICB/lösliches MICB
ULBP	UL16 binding protein/UL16 bindendes Protein
ZAG	Zink-Alpha2-Glykoprotein

9 Danksagung

an Dr. Alexander Steinle für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit, der mir immer, wenn es nötig war, mit Rat und Tat zur Seite stand;

an Dr. Helmut Salih, der verantwortungsvoll die Betreuung der Arbeit lange Strecken in den Händen hatte und keine Mühe gescheut hat;

an Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für die Aufnahme an sein Institut, die zahlreichen Diskussionen und das Interesse an meiner Arbeit;

an Stefan Welte für die Hilfe bei Fragen zur Auswertung am Computer und für seine Geduld und Unterstützung;

an Iris Kehrer für die Einführung in das FACS-Verfahren, die Zellkultur und die menschliche Atmosphäre im Labor;

an meine Familie, die mich stets meinen Weg gehen ließ, mich ermutigt und jederzeit gefördert hat.

10 Curriculum Vitae

Persönliche Daten: Antropius Holger
geboren am 11.05.68
in Stuttgart
deutsche Staatsangehörigkeit
ledig, kinderlos

Schulbildung:

1975-1988 Besuch der freien Waldorfschule Stuttgart

Zivildienst:

1988-1990 Betreuer in der Heilpädagogik
(Werksiedlung St. Christoph, Kandern)

Künstlerische Ausbildung:

1990-1992 Mehrere Auftragsarbeiten im Bereich der
Malerei und Theatertourneen im süddeutschen
Raum (Stuttgart und Lörrach)

Hochschulstudium:

1992-1999 Studium der Humanmedizin
1992-1994 Vorklinischer Abschnitt an der Ruprecht-Karls-
Universität in Heidelberg
1994-1998 Klinischer Abschnitt, Universitätsklinikum
Mannheim
1998-1999 Student im Praktischen Jahr in der Inneren
Medizin, Chirurgie, Pädiatrie Universität Mannheim
3. Staatsexamen: 30.11.1999
2000-2001 Arzt im Praktikum im Bereich der allgemeinen
Pneumologie und Onkologie in der Klinik
Schillerhöhe, Stuttgart-Gerlingen

Promotion

2001-2002

Beginn einer 12 monatigen Doktorarbeit an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abt. Immunologie, Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee und II. Med. Klinik , Abt. Hämatologie Prof. Dr. med. L. Kanz, mit dem Thema: Zelloberflächenexpression und Freisetzung von Liganden des Immunrezeptors NKG2D bei verschiedenen hämatologischen Tumoren.

Auslandsaufenthalte:

1995

6-wöchige Famulatur in der Inneren Medizin, King George Hospital, London.

1996

6-wöchige Famulatur in der Inneren Medizin, Northern Province, Südafrika.

Publikation:

Salih, H. R., Antropius H., Gieseke F., Lutz Z. S., Kanz L., Rammensee H. G., Steinle A., 2003. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood*. **102**: 1389-1396.