

Untersuchungen zur Rolle der KIR2DS1- Expression in NK-Zell-vermittelten Graft-versus- Leukämie-Reaktionen

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Karla Baltner
aus Arad/Rumänien

Tübingen
2017

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

19.02.2018

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

PD Dr. Dr. Maya André

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dominik Hartl

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Summary	2
3. Einleitung	3
3.1 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) als Brücke zwischen angeborener und adaptiver Immunität.....	3
3.2 NK-Zellentwicklung und Subpopulationen	4
3.3 Rezeptorvermittelte Effektorfunktion von NK-Zellen	5
3.3.1 NK-Zell-Aktivierung	5
3.3.2 NK-Zellen und der Lernprozess zur Selbsttoleranz.....	8
3.3.2.1 NK-Zellrezeptoren	11
3.3.2.2 Die Signalübertragung in NK-Zellen	15
3.4 Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIRs) und ihre Liganden.....	16
3.4.1 KIR-Haplotypen.....	18
3.4.2 KIR-Liganden (KIRL)	19
3.4.3 Regulation der KIR-Expression	21
3.4.4 aKIRs und ihr Schutz vor Viren.....	22
3.4.5 KIR2DS1 - aktueller Stand der Forschung.....	23
3.5 Alloreaktive NK-Zellen bei der hämatologischen Leukämietherapie	24
3.5.1 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation und Graft-versus-Leukämie-Effekt	25
3.5.2 Alloreaktive NK-Zellen.....	26
3.5.3 Spenderauswahl und aKIR-Funktionalität im Rahmen der HSZT	27
4. Ziele der Arbeit	29
5. Material und Methoden	30
5.1 Zellkultur	30
5.1.1 Zelllinien.....	30
5.1.2 Zellkulturmedien und Puffer.....	30
5.1.3 Reagenzien und Equipment für die Zellkultur	31
5.1.4 Versuchsdurchführungen-Zellkultur	32
5.1.4.1 Mykoplasmentest.....	32
5.1.4.2 Bestimmung der Zellzahl	32
5.1.4.3 Einfrieren von Zellen.....	33
5.1.4.4 Auftauen von Zellen.....	33
5.1.4.5 Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs).....	33
5.1.4.6 Magnetische NK-Zellisolation	34

5.1.4.7 NKAES	34
5.1.4.8 Depletion von T-Zellen	34
5.2 Durchflusszytometrie und Ko-Kultur-Experimente	35
5.2.1 Reagenzien und Equipment für die Durchflusszytometrie.....	35
5.2.2 Puffer für die Durchflusszytometrie.....	35
5.2.3 Antikörper.....	35
5.2.3.1 Konjugierte Antikörper	36
5.2.3.2 Unkonjugierte Antikörper und Sekundärantikörper.....	37
5.2.3.3 Isotypkontrollen	37
5.2.3.4 Antikörperpanels	38
5.2.4 Versuchsdurchführungen-Durchflusszytometrie und Ko-Kulturversuche	40
5.2.4.1 Bestimmung der NK-Zell-Frequenz/ Reinheitsmessung	40
5.2.4.2 Färbungen von Oberflächenantigenen mit Primärantikörpern.....	40
5.2.4.3 Färbungen von Oberflächenantigenen mit Sekundärantikörpern	41
5.2.4.4 Färbungen mittels ARD Lebend-/Tot-Farbstoffen	41
5.2.4.5 FACS-basierter <i>in vitro</i> Zytotoxizitätsassay (<i>in vitro</i> kill, ivk)	41
5.2.4.6 Intrazellulärfärbung- funktionelle Subsetanalyse mittels Boolean-Gating	42
5.2.4.7 Generierung von Zellkulturüberständen und LEGENDplex™-Assay.....	43
5.2.4.8 viSNE-Analysen	44
5.3 Q-RT-PCR	45
5.3.1 Reagenzien und Equipment für die Q-RT-PCR	45
5.3.2 Oligonukleotide	45
5.3.3 Versuchsdurchführungen-PCR.....	46
5.3.3.1 Isolation von DNA und RNA und reverse Transkription	46
5.3.3.2 Protokoll zur Q-PCR und KIR-Genotypisierung	47
5.3.3.3 HLA-Typisierung.....	48
5.4 Statistiken	48
6. Ergebnisse.....	49
6.1 Identifizierung und Charakterisierung von Haplotyp A und B Spendern sowie der L721.221* <i>cw0602</i> -Targetzelllinie	49
6.1.1 Selektion HLA-C1/C2 heterozygoter KIR-Haplotyp A und B Spender.....	49
6.1.2 NKAES Haplotyp A und B Spender unterscheiden sich nicht in ihrer Expression verschiedener NK-Zellrezeptoren.....	50
6.1.3 Auswahl der L721.221* <i>cw0602</i> -Targetzelllinie und phänotypische Charakterisierung ihres NK-Zell-Ligandenrepertoires.....	51
6.2 Haplotyp A und B Spender unterscheiden sich nicht in ihrer zytotoxischen Aktivität <i>in vitro</i>	52

6.3 Bestimmung des alloreaktiven NK-Zell-Subsets.....	53
6.4 Die Größe des alloreaktiven NK-Zell-Subsets ist in Haplotyp A und B Spendern vergleichbar	56
6.5 viSNE-Analysen zeigen ein ähnliches Clustering von CD107a ⁺ NKG2A ⁻ -und Perforin ⁺ NKG2A ⁻ -NK-Zellen der Haplotyp A und B Spender	57
6.6 Die Expression von KIR2DS1 trägt nicht signifikant zur Gesamt-NK-Zell-Zytotoxizität HLA-C1/C2 heterozygoter Haplotyp B Spender bei.....	59
6.7 Haplotyp A und B Spender unterscheiden sich nicht in der Sekretion zytolytischer Proteine nach L721.221* <i>cw0602</i> -Stimulation.....	61
7. Diskussion.....	63
7.1 Der Einfluss von KIR2DS1 bei der HSZT	63
7.1.1 Die Expression von KIR2DS1 trägt nicht signifikant zur NK-Zell-Zytotoxizität HLA-C1/C2 heterozygoter Haplotyp B Spender bei.....	64
7.2 Die Rolle von KIR2DS1 bei der Lyse alloreaktiver DCs und T-Zellen	67
7.3 aKIRs tragen zur Verhinderung einer CMV-Reaktivierung bei.....	68
7.4 KIR2DS1 und KIR2DL1 interagieren mit HLA-C nicht auf dieselbe Art und Weise.....	70
7.5 Der zukünftige Nutzen alloreaktiver NK-Zellen bei der HSZT	71
7.6 Fazit und Ausblick.....	73
8. Literaturverzeichnis	75
9. Anhang	106
9.1 Abkürzungsverzeichnis	106
9.2 verwendete SI-Einheiten, Präfixe und abgeleitete SI-Einheiten mit besonderem Namen	108
10. Erklärung.....	109
11. Danksagung	110

1. Zusammenfassung

Die Charakterisierung aktivierender und inhibitorischer NK-Zellrezeptoren, die Identifizierung ihrer Liganden sowie die Untersuchung ihrer Funktion bei der Regulation der NK-Zell-Aktivierung waren und sind immer noch wichtige Themen der NK-Zell-Forschung. NK-Zellen werden funktionell u.a. von Vertretern der Killerzell-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptor-Familie (KIRs) kontrolliert, welche sowohl inhibitorische (iKIRs) als auch aktivierende (aKIRs) Mitglieder umfasst. Genetische Assoziationsstudien weisen darauf hin, dass zur optimalen Behandlung von Patienten mit Leukämie bei der Hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) solche Spender gewählt werden sollten, welche neben iKIRs auch aKIRs exprimieren. Allerdings finden sich auch gegenteilige Daten zur Irrelevanz oder gar nachteiliger aKIR-Expression.

Mittels komplexer Methodik aus KIR-Q-PCR, „double fluorescence“-FACS- und viSNE-Analysen, sollte die aKIR-Expression sowie Funktionalität einzelner alloreaktiver aKIR-positiver NK-Zell-Subsets in Haplotyp A und B Spender charakterisiert werden. Nur Haplotyp B Spender besitzen neben iKIRs auch aKIRs. Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das alloreaktive KIR2DS1⁺-NK-Zell-Subset HLA-C1/C2 heterozygoter Spender in Bezug auf C2-exprimierende L721.221**cw0602*-Targetzellen hoch reaktiv, aber quantitativ sehr klein ist und daher nicht signifikant zur Gesamtzytotoxizität beiträgt. Somit lässt sich keine direkte Verbindung zwischen Haplotyp-Status und NK-Zell-Zytotoxizität HLA-C1/C2 heterozygoter Spender erkennen. Diese Daten sind mit der Hypothese vereinbar, dass der vorteilhafte Ausgang von HSZTs mit Haplotyp B Spendern möglicherweise nicht durch einen direkten KIR2DS1-vermittelten Graft-versus-Leukämie-Effekt entsteht, sondern eventuell ein indirektes Resultat aus einem Kopplungs-Ungleichgewicht anderer KIRs oder der Reduzierung von Rezidiv-freier Mortalität (NRM, non-relapse mortality) ist. Ferner ließe sich die reduzierte NRM durch eine alloreaktive aKIR-vermittelte Prävention von Graft-versus-Host-Erkrankung, Abstoßungsreaktionen und durch den Schutz vor Virusinfektionen erklären.

2. Summary

Characterizing activating and inhibitory receptors expressed on NK cells, identifying their ligands, and the exploration of their roles in regulating NK cell activation are important subjects of both past and current research. NK cells are functionally controlled by the killer immunoglobulin-like receptor (KIR) family that comprises inhibitory (iKIR) and activating (aKIR) members. Genetic association studies suggest that donors expressing not only iKIRs but also aKIRs will be superior donors in the setting of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) of patients with leukemia. However, contrary evidence states that aKIR expression may be irrelevant or even detrimental.

Using a complex methodology incorporating KIR-Q-PCR, double fluorescence and viSNE analysis, aKIR expression including subset distribution patterns and functionality in haplotype A donors which lack aKIRs, and haplotype B donors that express a variety of B-specific genes should be characterized. Substantial findings in the present work demonstrate that the alloreactive KIR2DS1⁺ NK cell subset in HLA-C1/C2 donors is highly responsive towards C2-expressing targets but quantitatively small and as such does not significantly contribute to cytotoxicity. Thus, it was not possible to find a direct link between haplotype allocation status and NK cell cytotoxicity, at least in HLA-C1/C2 heterozygous donors. The data are compatible with the hypothesis that the beneficial outcome of HSCTs performed with haplotype B donors might not be a direct result of KIR2DS1-mediated Graft-versus-Leukemia effects but rather an indirect result of the linkage disequilibrium to other KIRs or of a reduction in non-relapse mortality due to alloreactive aKIR-mediated prevention of Graft-versus-Host-Disease, graft-rejection and protection against virus infections.

3. Einleitung

3.1 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) als Brücke zwischen angeborener und adaptiver Immunität

Neben T- und B-Zellen, welche durch ihre klonale Expression eines schier unendlichen Rezeptor-Repertoires das adaptive Immunsystem charakterisieren, gelten die erstmals 1975 beschriebenen Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) als wichtige dritte Untergruppe der Lymphozyten. Durch ihre Vielzahl an keimbahnkodierten aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren werden NK-Zellen jedoch klassischerweise als Effektoren im angeborenen Immunsystem eingeordnet. NK-Zellen sind große granuläre Zellen, entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und machen schließlich ca. 5-15% der peripheren Lymphozyten im Blut aus (Herberman *et al.*, 1975; Kiessling *et al.*, 1975; Trinchieri, 1989; Caligiuri, 2008). Ihre Fähigkeit der schnellen, direkten und antigenunabhängigen Zytotoxizität sowie der Unterscheidung von gesunden körpereigenen und gestressten bzw. geschädigten Zellen (u.a. Tumorzellen und virusinfizierten Zellen) zeichnet sie als Mediatoren der frühen Abwehr aus (Mark J Smyth *et al.*, 2002; S.-H. Lee *et al.*, 2007). NK-Zellen töten infizierte oder transformierte Zellen ab, indem sie zytolytische Granula freisetzen, welche Perforin und Granzyme enthalten oder über die Bindung an Apoptose-induzierenden Rezeptoren (Krzewski und Coligan, 2012). Darüber hinaus teilen NK-Zellen mit zytotoxischen T-Zellen viele Merkmale in ihrer Entwicklung und Morphologie, aber vor allem Merkmale im Zielzell-Lysierungs- bzw. Killing-Mechanismus, welcher u.a. vermittelt wird durch die Produktion von Interferon- γ (IFN- γ) und einer Bandbreite an pro-inflammatorischen Zytokinen sowie Chemokinen. Sie steuern somit maßgeblich den adaptiven Immunreaktionen bei (L. Moretta *et al.*, 1993; Warren und Smyth, 1999; Colucci *et al.*, 2003; Stetson *et al.*, 2003; Vivier *et al.*, 2008). Lange galten NK-Zellen als kurzlebig, wobei neuere Erkenntnisse langlebigen NK-Zellpopulationen ein antigenspezifisches immunologisches Gedächtnis zusprechen, was eindeutig eine charakteristische Eigenschaft des adaptiven Immunsystems darstellt (O'Leary *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2009). Durch die Merkmale der angeborenen sowie adaptiven Immunität sind NK-Zellen neben der sofortigen Lyse von Zielzellen als zentrale Regulatoren im Wechselspiel mit u.a. dendritischen Zellen (DCs) und Neutrophilen somit auch in der Lage, auf die Reaktionen nachfolgender antigenspezifischer T- und B-Zellen Einfluss zu nehmen und schließlich Immunreaktionen zu fördern oder zu hemmen (A. Moretta, 2002; Wehner *et al.*, 2011; Jaeger *et al.*, 2012).

3.2 NK-Zellentwicklung und Subpopulationen

NK-Zellen sind üblicherweise durch die Abwesenheit von CD3 (typischer T-Zellmarker) und der Anwesenheit von CD56, einer 140 kDa großen Isoform des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (N-CAM) und CD16 charakterisiert (Ritz *et al.*, 1988; Lanier *et al.*, 1989). Speziesübergreifend wird der natürliche Zytotoxizitätsrezeptor (natural cytotoxicity receptor, NCR) Nkp46 (NCR1) zusätzlich als NK-Zellmarker eingesetzt (Sivori *et al.*, 1997). Im peripheren Blut finden sich zwei funktionell unterschiedliche NK-Zellpopulationen (sog. NK-Zell-Subsets), welche auch mengenmäßig unterschiedlich vertreten sind: CD56^{dim}CD16⁺, also Zellen mit niedriger CD56-Expression und gleichzeitiger CD16-Expression, stellen ca. 90% der im Blut zirkulierenden Zellen dar, wohingegen NK-Zellen mit hoher Expression von CD56 aber keiner von CD16, den CD56^{bright}CD16⁻-NK-Zellen, überwiegend in Lymphknoten zu finden sind (Lanier *et al.*, 1986; Cooper *et al.*, 2001; Jacobs *et al.*, 2001; Fehniger *et al.*, 2003). Während CD56^{dim}CD16⁺-NK-Zellen zytotoxisch sind und sowohl Perforin als auch IFN- γ produzieren, fehlt CD56^{bright}CD16⁻-NK-Zellen Perforin, produzieren aber nach Stimulation mit Interleukin (IL) -12, -15 und -18 Zytokine wie IFN- γ (Cooper *et al.*, 2001; Anfossi *et al.*, 2006). Zusätzlich exprimieren letztere konstitutiv den Hochaffinitäts-Rezeptor für IL-2, wodurch sie infolge einer IL-2-Stimulation stärker als CD56^{dim}-NK-Zellen proliferieren und annähernd die gleiche Zytotoxizität besitzen (Fehniger *et al.*, 2003). Darüber hinaus entfalten CD56^{dim}-NK-Zellen im Vergleich zu CD56^{bright}-NK-Zellen aufgrund der CD16-Expression eine gesteigerte antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) (Nagler *et al.*, 1989). Man geht davon aus, dass CD56^{bright}-NK-Zellen weniger reif sind als die NK-Zellen des CD56^{dim}-Subsets und die Aktivierung von CD56^{bright}-NK-Zellen aus sekundären lymphatischen Geweben (secondary lymphoid tissue, SLT) in einer erhöhten Expression von NK-Zellrezeptoren (Abb. 1) wie u.a. KIR2DL1 (CD158a) ähnlich dem des charakteristischen CD56^{dim}-NK-Zell-Subsets resultiert (Lanier *et al.*, 1986; Ferlazzo *et al.*, 2004).

NK-Zellen entstammen wie alle Lymphozyten aus hämatopoetischen CD34⁺-Stammzellen (hematopoietic stem cell, HSC), wobei der/die Orte ihrer Reifung (im Knochenmark und/oder Thymus) sowie der Reifungsprozess im Einzelnen noch nicht vollständig geklärt sind (Shibuya *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1994; Galy *et al.*, 1995; Colucci *et al.*, 2003). So ließen sich CD56^{bright}-NK-Zellen beispielsweise aus Lymphknoten und sekundären lymphatischen Geweben isolieren wohingegen CD56^{dim}-NK-Zellen zahlreicher in Knochenmark, Blut und Milz zu finden waren (Fehniger *et al.*, 2003). Die Differenzierung der NK-Zellen ist verbunden mit der festgelegten und geordneten

Präsentation von NK-Zellrezeptoren, wobei CD161, NKp44 und CD171 (c-Kit oder Stammzellfaktor-Rezeptor) auf unreifen NK-Zellen (immature NK-cells, iNK) zu finden ist (Abb. 1). Mit fortschreitender Differenzierung zu reifen, zytotoxischen NK-Zellen (mature NK-cells, mNK), zu denen CD56^{bright}- und CD56^{dim}-NK-Zellen gehören, sinkt die Expression von CD117; dafür erscheinen die Rezeptoren NKp46, CD94/NKG2A und NKG2D auf der Zelloberfläche (siehe auch 3.3.2.1). NKG2C, KIRs, und CD16 kommen erst relativ spät in der Entwicklung CD56-positiver NK-Zellen hinzu (Cooper *et al.*, 2001; Freud und Caligiuri, 2006; Grzywacz *et al.*, 2006; Caligiuri, 2008; Montaldo *et al.*, 2013).

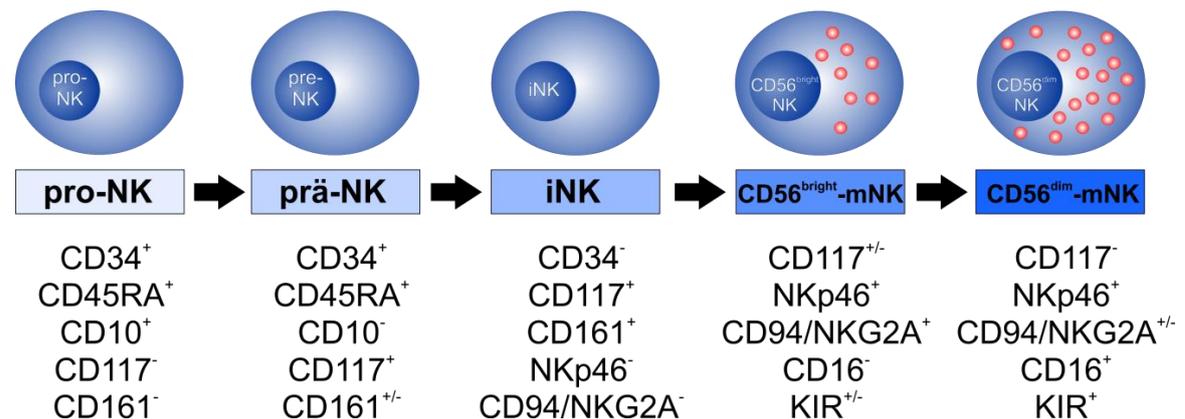


Abbildung 1: Die Entwicklungsstadien von Natürlichen Killerzellen. NK-Zellvorläufer (von pro- zu prä-) entwickeln sich über unreife NK-Zellen (immature NK-cells, iNK) zu reifen zytotoxischen CD56^{bright}- und CD56^{dim}-NK-Zellen (mature NK-cells, mNK), welche zytotoxische Granula (hier rot dargestellt) besitzen. Modifiziert nach Caligiuri, 2008.

3.3 Rezeptorvermittelte Effektorfunktion von NK-Zellen

3.3.1 NK-Zell-Aktivierung

Da NK-Zellen zur schnellen und effizienten Zellyse fähig sind, bedarf ihre Aktivierung zum Schutz gesunder Zellen einer strengen Regulation. Zur Unterscheidung von malignen oder infizierten Zielzellen und gesunden Zellen, hängt die NK-Zell-Aktivierung maßgeblich von einer Balance aus aktivierenden und inhibitorischen Signalen ab, welche durch eine Vielzahl an Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche geliefert werden (Abb. 2). Zwei Hypothesen zur NK-Zell-Aktivierung sind zum einen die „missing-self“- und zum anderen die „induced-self“-Theorie. Laut „missing-self“-Hypothese (Abb. 2b) lysieren NK-Zellen solche Zielzellen am besten, die eine reduzierte oder keine Leukozyten-Antigen-Moleküle Klasse I (Human Leukocyte Antigen, HLA) des auf Chromosom 6 kodierten Haupthistokompatibilitätskomplexes (major histocompatibility complex, MHC) auf ihrer Oberfläche exprimieren (Harel-Bellan *et al.*, 1986; Karre *et al.*, 1986; Ljunggren und Karre, 1990). HLA-Klasse-I-Moleküle sind hochpolymorph und

werden von allen kernhaltigen, gesunden Zellen exprimiert; aufgrund einer Regulation über inhibierende Rezeptoren erkennt die NK-Zelle diese als „körpereigen“ und verhält sich ihr gegenüber tolerant; die NK-Zell-Aktivität ist gehemmt (Abb. 2a). Die Aktivität der NK-Zelle wird zusätzlich bestimmt durch aktivierende NK-Zellrezeptoren (Lanier *et al.*, 1997; A. Moretta *et al.*, 2001; Bottino *et al.*, 2006). Die „induced-self“-Theorie (Abb. 2c) beschreibt dabei die Erkennung stressinduzierter Liganden, welche bedingt durch maligne Zellveränderungen oder viralem Übergriff exprimiert werden; aktivierende Signale „überwiegen“ die inhibitorischen Signale; die Effektorfunktion der NK-Zelle ist aktiviert (Bauer *et al.*, 1999; Raulet und Guerra, 2009). Nichtsdestotrotz scheint nach dem heutigen Verständnis der Übergang einer ruhenden NK-Zelle in ihren aktiven Zustand durch ein breites Netzwerk aus aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren vermittelt zu werden. Die Zusammenführung der von diesen Rezeptoren weitergeleiteten aktivierenden und inhibierenden Signalen bestimmt letztlich, ob die NK-Zelle zytotoxisch wird oder nicht (Chester *et al.*, 2015).

Der erste Mechanismus der Zytotoxizität basiert auf die kalziumabhängige granuläre Exozytose (Degranulation) nach Bildung einer immunologischen Synapse (IS) infolge der Adhäsion von NK- und Targetzelle (Konjugatbildung) (Orange, 2008). NK-Zellen beinhalten zytoplasmatische Granula ähnlich sekretorischer Lysosome, die lytische Proteine wie Perforin, Granulysin und Granzyme enthalten (Clark und Griffiths, 2003; Clayberger und Krensky, 2003). Perforin perforiert die Zellmembran der Ziel- oder Targetzelle, während Granzyme als Mitglieder der Serinproteasen-Familie zusammen mit Granulysin den gerichteten Zelltod (Apoptose) triggern (M. J. Smyth und Trapani, 1995; Lieberman, 2003; Thiery *et al.*, 2011; Lopez *et al.*, 2013). Im Gegensatz zu T-Zellen sind NK-Zellen in der Lage, Perforin und Granzyme konstitutiv zu exprimieren und zu speichern (Trapani, 2001; Voskoboinik *et al.*, 2015). Nach der rezeptorvermittelten NK-Zell-Aktivierung erfolgt eine rasche Polarisierung der Zelle samt zytotoxischen Granula und die Positionierung des Mikrotubuli-organisierenden Zentrums (microtubule organizing center, MTOC) in Richtung der Synapse bzw. der Zielzelle (Mentlik *et al.*, 2010). Die Membran der Granula fusioniert mit der Plasmamembran, externalisiert und gibt den zytotoxischen Inhalt (Granulysin und Granzyme) der Granula frei, wodurch die Apoptose der Zielzelle ausgelöst wird (Pardo *et al.*, 2009; Afonina *et al.*, 2010). Der Vorgang der Degranulation kann über die Expression von CD107a, einem lysosomalen Membranglykoprotein-1 (LAMP-1), welches umgehend nach der Exozytose auf der NK-Zelloberfläche erscheint, nachgewiesen werden. CD107a ist mit Perforin in den sekretorischen Lysosomen kolokalisiert und gelangt bei der Fusion der Granula mit der Zellmembran an die NK-Zelloberfläche und wird später wieder internalisiert (Bryceson *et al.*, 2005).

Wie eingangs erwähnt, tragen NK-Zellen infolge ihrer Aktivierung durch die Produktion vieler Chemokine und pro-inflammatorischen Zytokinen wie beispielsweise Interferon- γ (IFN γ), Tumornekrosefaktor (TNF), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) Interleukin-6 (IL-6) und den CC-Chemokin-Liganden 3-5 (CCL3, CCL4 und CCL5) adaptiven Immunreaktionen bei, da die Sekretion dieser Zytokine weitere Immunzellen zum Entzündungsherd rekrutiert und die Aktivierung und Proliferation dieser Zellen induziert (Cooper *et al.*, 2001; Bruserud und Kittang, 2010; Vivier *et al.*, 2011).

Ein weiterer Killing-Mechanismus, welcher über Granula vermittelt wird, stellt die sogenannte antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) dar (Abb. 2d). ADCC wurde initial als Freisetzung von Perforin und Granzymen durch NK-Zellen in Folge der Ligation ihres Fc-Rezeptors CD16 (Fc γ RIIIA) an Immunglobulin-G-(IgG)-präsentierenden Zielzellen beschrieben (Perussia *et al.*, 1984). Vielmehr gilt ADCC als mehrstufiger Prozess, welcher ein Netzwerk koordinierender Immunzellen und adaptive Immunreaktion umfasst (Rajasekaran *et al.*, 2015). Dieser Mechanismus der Zytotoxizität spielt zudem eine wichtige Rolle in der Vermittlung von Antitumor-Effekten vieler monoklonale Antikörper (mAb) basierender Therapien, welche sich diese als Behandlungsstandard sowohl für hämatologische als auch solide Tumore zu Nutzen macht (Kohrt *et al.*, 2012).

Ein Perforin-unabhängiger Mechanismus von NK-Zellen ist die Lyse infolge einer Apoptose-induzierenden Ligation an sogenannte Todesrezeptoren (death receptors) auf Targetzelloberflächen (Wallin *et al.*, 2003). Der zytotoxische Signalweg ist auf die Rezeptorexpression von Mitgliedern der TNF-Superfamilie angewiesen. Fas (CD95) und TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) sind hierbei die beiden primären TNF-Rezeptoren (Zamai *et al.*, 1998). Während Fas von einer Vielzahl von Geweben exprimiert wird, ist die Expression seines Liganden FasL (CD95L) auf aktivierte NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen beschränkt (M. J. Smyth *et al.*, 2005). Die Bindung von Fas an FasL bzw. TRAIL-Rezeptor R1 (DR4) oder R2 (DR5) an TRAIL führt u.a. durch proapoptotische Signale zur Aktivierung von Caspasen, einer Familie von Proteasen, wodurch die Zielzelle schließlich in die Apoptose getrieben wird (Kerr *et al.*, 1972; Itoh und Nagata, 1993; Nagata und Golstein, 1995; MacFarlane *et al.*, 1997; M. J. Smyth *et al.*, 2005).

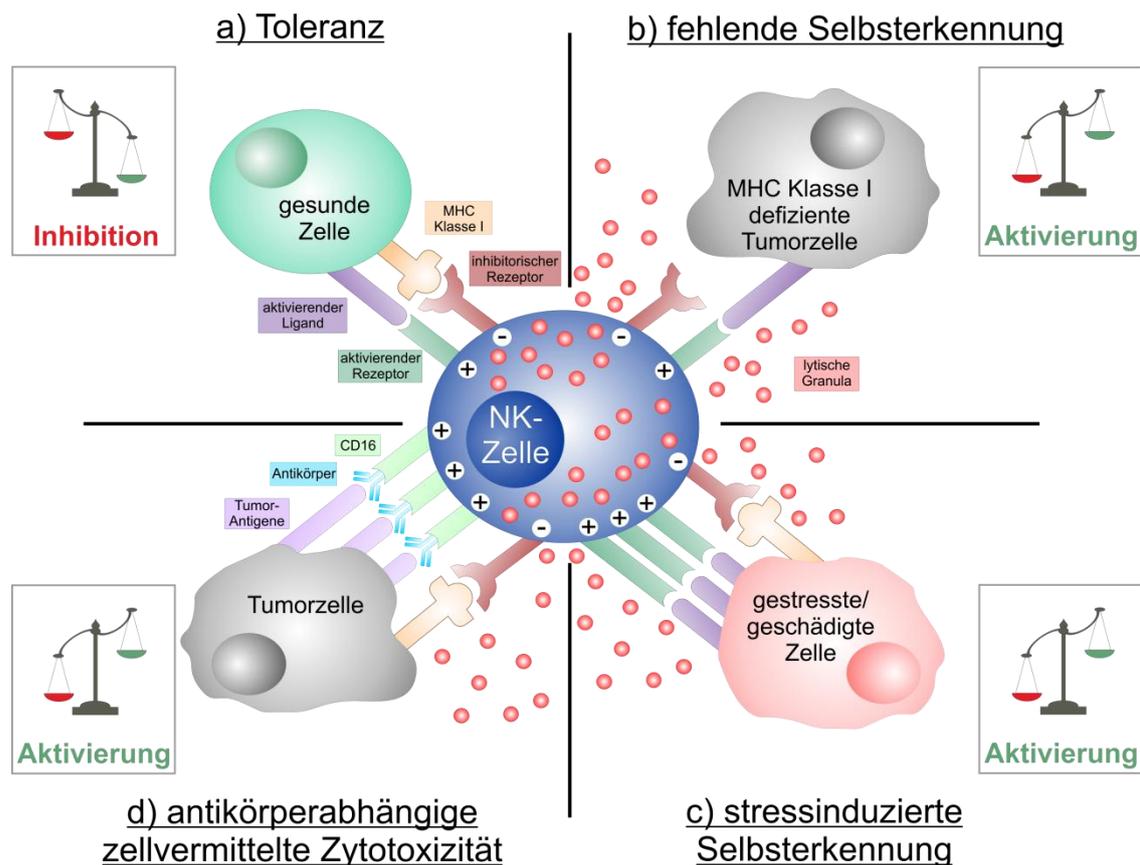


Abbildung 2: Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) in ihrer Effektorfunktion. Die Balance aus inhibitorischen und aktivierenden Signalen bestimmt, ob sich eine NK-Zelle ruhend oder zytotoxisch gegenüber Zielzellen verhält. **a) Toleranz.** Anhand der Bindung inhibitorischer Rezeptoren an ihre Liganden werden aktivierende Signale abgeschwächt; NK-Zellen verhalten sich tolerant gegenüber körpereigenen/gesunden Zellen. **b) Fehlende Selbsterkennung.** Tumor-zellen können die Expression ihrer Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse I-Moleküle (major histocompatibility complex, MHC) herunterregulieren und werden von NK-Zellen direkt oder indirekt über die Freisetzung lytischer Granula lysiert. **c) Stressinduzierte Selbsterkennung.** Die stressbedingte Überexpression von aktivierenden Liganden führt zur Überstimmung inhibitorischer Signale und letztlich zur NK-Zell-Aktivierung. **d) Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität** (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC). Tumorantigen-spezifische Antikörper binden CD16 und rufen dadurch die antikörperabhängige NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität hervor. Modifiziert nach Vivier *et al.*, 2012; M. G. Morvan und Lanier, 2016.

3.3.2 NK-Zellen und der Lernprozess zur Selbsttoleranz

Die Fähigkeit zur Zellerkennung wird NK-Zellen u.a. durch die Expression unterschiedlicher Familien MHC-Klasse-I-bindender inhibitorischer bzw. stimulatorischer Rezeptoren ermöglicht (Tab. 1). Dabei ist wichtig zu erwähnen, dass NK-Zellen in der Regel eine kleine, zufällige Auswahl dieser Rezeptoren (etwa drei bis fünf) exprimieren; es entstehen NK-Zellsubpopulationen mit unterschiedlichem Rezeptorrepertoire und unterschiedlicher MHC-Klasse-I-Spezifität (Manser *et al.*, 2015). So exprimieren manche

NK-Zellen aktivierende Rezeptoren für Selbst-Liganden aber keine inhibitorischen Rezeptoren für eigene MHC-Klasse-I-Moleküle (Valiante *et al.*, 1997; Kubota *et al.*, 1999; Raulet *et al.*, 2001; Parham, 2005). Ähnlich zu B- und T-Zellen besitzen NK-Zellen einen ausgefeilten Mechanismus, in welchem sie ihre funktionale Kompetenz erwerben und sich an ihre Umgebung anpassen bzw. mögliche Autoreaktivität gegenüber körpereigenen gesunden Zellen abwenden. Dieser Mechanismus, bei welchem NK-Zellen eine Selbsttoleranz erwerben, wird als „Education“ bezeichnet (S. Kim *et al.*, 2005; Anfossi *et al.*, 2006; Raulet und Vance, 2006).

Mit der „missing-self“-Hypothese wurde auch das „at least one“-Model aufgestellt, bei welchem angenommen wird, dass NK-Zellen mindestens einen inhibitorischen Rezeptor spezifisch für Selbst-MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren müssen, um eine Autoreaktivität beispielsweise gegenüber MHC-Klasse-I-defizienten Erythrozyten oder Neuronen mit sehr geringer MHC-Klasse-I-Oberflächenpräsentation zu verhindern (Raulet *et al.*, 1997). Diese Hypothese mit Ursprung aus Maus-Experimenten wurde durch Beobachtungen mit humanen NK-Zellklonen unterstützt (Valiante *et al.*, 1997). Allerdings war ebenfalls bekannt, dass NK-Zellen aus MHC-Klasse-I-defizienter Herkunft ungeachtet fehlender Liganden für inhibitorische Rezeptoren nicht autoreaktiv waren (Hoglund *et al.*, 1991). Zudem konnten sowohl in der Maus als auch im Menschen Populationen von NK-Zellen identifiziert werden, welche keine „eigen-spezifischen“ inhibitorischen Rezeptoren aufweisen und es somit noch einen weiteren Mechanismus zur Unterbindung von NK-Zell-Autoreaktivität bedingt durch fehlende inhibitorische Signale geben musste. Diese NK-Zellen waren nicht autoreaktiv, jedoch auch nicht vollständig funktionell, sondern verhielten sich mit verminderter Reaktivität, also hyporesponsiv (Raulet *et al.*, 2001; Fernandez *et al.*, 2005; S. Kim *et al.*, 2005; Anfossi *et al.*, 2006).

Ursprünglich gelten zwei Mechanismen, wie NK-Zellen zur Selbsttoleranz „erzogen“ werden: Im „arming“ („Bewaffnung“) oder „licensing“ („Lizenzierung“) Model sollen NK-Zellen standardmäßig unreif und inaktiv sein und ihre vollständige Funktionalität erst nach Bindung bzw. Signalisierung durch einen inhibitorischen Rezeptor erlangen (Raulet und Vance, 2006; Yokoyama und Kim, 2006). Im „disarming“ („Entwaffnung“) Model hingegen, wären NK-Zellen standardmäßig aktiv jedoch hyporesponsiv oder anergisch durch die Bindung verschiedener endogener Liganden an aktivierende Rezeptoren. Diese NK-Zellen können nur ihre Funktionalität aufrechterhalten, wenn inhibitorische Rezeptoren dieser stetigen Stimulation entgegenwirken (Raulet und Vance, 2006).

Während inhibitorische Rezeptoren in beiden Modellen entgegengesetzte Funktionen zugeschrieben würden, wäre das Ergebnis zumindest dasselbe: Nur NK-

Zellen mit einem inhibitorischen Rezeptor für Selbst-MHC-Klasse-I-Moleküle erlangen eine vollständige Funktionalität. Zudem folgt die NK-Zell-Education keinem Alles-oder-Nichts-Prinzip und ist quantitativ beeinflussbar: Je stärker die inhibitorische Wechselwirkung, desto stärker reagiert die NK-Zelle auf die Aktivierung von Rezeptorsignalen. Das „rheostat“ („Regler“) Model ergänzt die Modelle „arming“ und „disarming“ und beschreibt die Education von NK-Zellen somit weniger als An-Aus-Zustand, sondern vielmehr als dynamischen Prozess; NK-Zellen mit beispielsweise drei Rezeptoren für MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche besitzen eine zwei- bis dreifach höhere Aktivität als NK-Zellen mit nur einem Rezeptor (Brodin *et al.*, 2009; Joncker *et al.*, 2009).

Der genaue funktionelle Mechanismus, wie NK-Zellen letztlich die Selbsttoleranz erlernen, bleibt aktuell noch unklar. Aktuelle Studien hingegen zeigen zumindest, dass die Education nicht endgültig zu sein scheint: Veränderungen in aktivierten/funktionellen und hyporeaktiven NK-Zellen sind jeweils reversibel, was darauf hindeutet, dass es eine Umformbarkeit im Prozess der Education gibt. Wohingegen zuvor funktionell inkompetente (uneducated) NK-Zellen nach Transfer in einer MHC-I-suffizienten Umgebung funktionelle Kompetenz erlangten, verhielten sich zuvor funktionell kompetente (educated) NK-Zellen in einer MHC-I-defizienten Umgebung hyporesponsiv (Elliott *et al.*, 2010; Joncker *et al.*, 2010). Eine „re-education“ („Umerziehung“) von reifen NK-Zellen ist sogar beobachtet worden, bei welchem nicht-kompetente (non-educated) NK-Zellen binnen weniger Tage die Expression funktionaler inhibitorischer Rezeptoren nach Stimulation mit proinflammatorischer Zytokine erwarben und letztlich einen kompetenten (educated) Phänotyp zeigten (Juelke *et al.*, 2009). Beobachtungen von hämatopoetischen Stammzelltransplantationen weisen jedoch darauf hin, dass die Education von Spender-NK-Zellen selbst in einer fremden MHC-Klasse-I-Umgebung des Empfängers bestehen bleibt (Haas *et al.*, 2011).

Eine Tatsache, die den ganzen Prozess der Selbsttoleranz noch komplexer wirken lässt, zeigen Daten aus der Maus; hier interagieren inhibitorische Rezeptoren (Ly49) mit MHC-Klasse-I-Liganden nicht nur in *trans* (Rezeptor und Ligand werden auf verschiedenen Zellen exprimiert), sondern auch in *cis*, also auf derselben NK-Zelle (Held und Mariuzza, 2008). Für einige inhibitorische Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass die Ligandenbindung in *cis* zu ihrer Education beiträgt (Chalifour *et al.*, 2009; Bessoles *et al.*, 2013). Andere Studien hingegen beobachteten lediglich nach der Interaktion in *trans* eine erfolgreiche NK-Zell-Education (Ebihara *et al.*, 2013). Darüber hinaus unterstützt der Umstand, dass NK-Zellen ihre Reaktivität durch Veränderungen ihrer MHC-Klasse-I-Umgebung anpassen können, die Relevanz der Interaktionen in *trans* für die „re-education“ (Elliott *et al.*, 2010; Joncker *et al.*, 2010).

Es stellt sich die Frage, wieso hyporeaktive NK-Zellen anders als beispielsweise autoreaktive T-Zellen nicht einfach entfernt werden? Es zeigte sich, dass funktionell nichtkompetente NK-Zellen unter bestimmten Umständen (wie beispielsweise einer akuten Virusinfektion) für den Organismus von Vorteil sind; diese NK-Zellen waren unter Einfluss proinflammatorischer Zytokine sogar effektiver als funktionell kompetente (educated) NK-Zellen (Orr *et al.*, 2010). Ein weiteres Beispiel liefern Daten nach der Behandlung von Neuroblastom-Patienten mit einem anti-CD2-Antikörper; hier zeigten nichtkompetente NK-Zellen sogar eine verstärkte ADCC (Tarek *et al.*, 2012). Unter bestimmten Umständen geben nichtkompetente (non-educated) NK-Zellen durch das Fehlen einer Inhibition scheinbar die besseren Effektorzellen ab.

Obwohl die genauen molekularen Mechanismen zur Hyporeaktivität von funktionell nichtkompetenten NK-Zellen nicht vollständig bekannt sind, fällt die unterschiedliche Organisation der Rezeptoren in der Zellmembran von kompetenten und nichtkompetenten NK-Zellen auf. Bei NK-Zellen nach Education sind aktivierende Rezeptoren in Nanodomänen lokalisiert, während die Rezeptoren hyporeaktiver Zellen ohne Education in einer Aktin-Netzwerk-Struktur miteinander verbunden zu sein scheinen (Guia *et al.*, 2011). Dazu passen auch Beobachtungen, dass das Auslösen von aktivierenden Rezeptoren in funktionell kompetenten NK-Zellen in einer erfolgreichen Aktivierung des Adhäsionsmoleküls LFA-1 (Lymphozytenfunktion-assoziierte Antigen-1) via Umstülpung („inside-out signaling“) resultiert; dies fördert somit die Adhäsion funktionell kompetenter NK-Zellen an Targetzellen (Konjugatbildung) (Thomas *et al.*, 2013).

3.3.2.1 NK-Zellrezeptoren

Wie eingangs erwähnt (siehe 3.3.1), hängt die NK-Zell-Aktivierung von einem dynamischen Gleichgewicht aus positiven und negativen Signalisierungsereignissen ab, welche nach Zellkontakt durch aktivierende und inhibitorische Rezeptoren auf der NK-Zelloberfläche vermittelt werden (Billadeau und Leibson, 2002; Vivier *et al.*, 2004; Zompi und Colucci, 2005; Bryceson *et al.*, 2006a; Pegram *et al.*, 2011). Die inhibierenden und aktivierenden Rezeptor-Gene der NK-Zellen (Tab. 1) sind zum größten Teil innerhalb zweier Cluster organisiert: dem Leukozyten-Rezeptor-Komplex (leukocyte receptor complex, LRC) auf Chromosom 19q13.4 und dem Natürlichen-Killerzell-Komplex (natural killer cell complex, NKC) auf Chromosom 12p13.1. Die Gene im LRC kodieren für Rezeptoren der Immunglobulin-(Ig)-Superfamilie, während die des NKC zur C-Typ-Lektin-Rezeptorfamilie gehören (Kelley *et al.*, 2005).

Tabelle 1: Überblick über die gängigsten NK-Zellrezeptoren und ihre Liganden. Aktivierungs-induziertes C-Typ Lektin (AICL); HLA-B-assoziiertes Transkript 3 (BAT-3); DNAX-assoziiertes Molekül 1 (DNAM-1); Hämagglutinin (HA); humanes Leukozytenantigen (HLA); Heparin- und Heparansulfate (HS); Immunglobulin G (IgG); Killerzell-Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor (KIR); Killerzell-Lectin-ähnlicher Rezeptor G-1 (KLRG-1); Leukozyten-Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor, Subfamilie B, Mitglied 1 (LILRB1); Lymphozytenfunktion-assoziierte Antigen-3 (LFA-3); MHC-Klasse-I-verwandte Polypeptidsequenz (MIC); Natürlicher Zytotoxizitätsrezeptor (NCR); Natürliche Killerzellgruppe 2 (NKG2); Natürliches Killerzellprotein (NKp); Poliovirus-Rezeptor (PVR); UL16-Bindeprotein (ULBP). Modifiziert nach Raulet und Vance, 2006; Pegram *et al.*, 2011.

	Rezeptor	inhibitorisch	aktivierend	Liganden
	2B4 (CD244)	X	X	CD48
	CD2		X	LFA-3 (CD58)
	DNAM-1 (CD226)		X	PVR (CD112, CD155)
	FcγRIIIA (CD16)		X	Fc-Domäne von IgG-Antikörper
	KIR	X	X	MHC-Klasse-I (HLA-A/-B/-C)
	KLRG-1	X		Cadherine
	LILRB1	X		MHC-Klasse-I, HLA-G, UL18
CD94/ NKG2	NKG2A	X		
	NKG2C		X	HLA-E
	NKG2E		X	
	NKG2D		X	ULBP1-6, MICA, MICB
NCRs	NKp30		X	B7-H6, BAT-3, virales HA, HS
	NKp44		X	virales HA, HS, NKp44-L
	NKp46		X	virales HA, HS
	NKp80		X	AICL

Diese Rezeptoren spielen ebenso eine entscheidende Rolle bei dem Prozess zur Selbsttoleranz (siehe 3.3.2). Eine wichtige und große MHC-Klasse-I-Molekül-bindende Rezeptorgruppe stellen im Menschen die Killerzell-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (KIRs) dar (näher beschrieben in Abschnitt 3.4). KIRs entstammen einer multigenetischen Familie polymorpher Gene, die sowohl inhibitorische als auch aktivierende Rezeptoren kodieren (Campbell und Purdy, 2011). Anders als KIRs sind die Vertreter der CD94/NKG2-Rezeptorfamilie (NKG2A, NKG2C und NKG2E) invariant und erkennen das nicht-polymorphe MHC-Klasse-I Leukozytenantigen-E (HLA-E). In dieser Familie formt der CD94-Rezeptor Disulfid-gekoppelte Heterodimere mit dem inhibitorischen NKG2A- oder mit den aktivierenden NKG2C- bzw. NKG2E-Rezeptoren (Lazetic *et al.*, 1996; Braud *et al.*, 1998; N. Lee *et al.*, 1998; Wada *et al.*, 2004). Die inhibitorischen KIRs bzw. NKG2A verhindern durch ihre Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle (beispielsweise auf gesunden Zellen) die NK-Zell-Aktivierung und somit ihre Lyse.

Darüber hinaus besitzen NK-Zellen zahlreiche Rezeptoren, mit derer - allein oder in Kombination - ihre Effektorfunktionen ausgelöst werden können (Vivier *et al.*, 2011). NKG2D, die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (NCRs), DNAM-1 (CD266) und der Fc-

Rezeptor (FcγRIIIA, CD16) zählen zu den bestcharakterisierten aktivierenden NK-Zellrezeptoren, welche an den Immunantworten gegen maligne Tumore beteiligt sind. Neben NK-Zellen exprimieren auch CD8⁺-T-Zellen und γδ-T-Zellen den NKG2D-Rezeptor (Bauer *et al.*, 1999). NKG2D ist ein C-Typ-Lektin-Transmembran-Homodimer und bindet an die MHC-Klasse-I-verwandte Polypeptid-sequenz A und B (MICA und MICB), und den UL16-Bindeproteinen 1-6 (ULBP1-ULBP6) (Lanier, 2015). Diese NKG2D-Liganden (NKG2D-L) werden üblicherweise nicht auf gesunden Geweben präsentiert, können aber von schnell-proliferierenden, infizierten, transformierten und Tumorzellen exprimiert werden. Dabei ist die Regulation der NKG2D-Ls sehr komplex und beteiligt transkriptionelle, translationale und posttranslationale Kontrollen (Raulet *et al.*, 2013).

Zu den NCRs zählen die Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren NKp30, NKp44, NKp46 und das homodimere C-Typ-Lektin-ähnliche NKp80 (Koch *et al.*, 2013; Kruse *et al.*, 2014). Während NKp30 und NKp46 von allen NK-Zellen exprimiert werden, wird NKp44 ausschließlich von aktivierten NK-Zellen präsentiert (Raulet und Guerra, 2009; Hudspeth *et al.*, 2013). Eine verringerte Expression von NKp30, NKp44 und NKp46 korreliert mit einer sinkenden zytotoxischen NK-Zellaktivität (A. Moretta *et al.*, 2001). NKp80 wird ähnlich zu NKp30 und NKp46 nahezu von allen frisch-isolierten NK-Zellen exprimiert; eine antikörpervermittelte Verlinkung mit NKp80 resultiert in der Induktion der zytotoxischen Aktivität (Vitale *et al.*, 2001). NCRs interagieren mit einer großen Bandbreite an Liganden bakteriellen, parasitären, viralen oder zellulären Ursprungs, wobei viele Aspekte noch unklar sind (Kruse *et al.*, 2014). Trotz ihrer strukturellen Unterschiede binden NKp30, NKp44 und NKp46 dieselben viralen Strukturen, beispielsweise virale Hämagglutinine (HA) und unterschiedliche Heparin- und Heparansulfate (HS) (Arnon *et al.*, 2001; Mandelboim *et al.*, 2001; Bloushtain *et al.*, 2004; Hershkovitz *et al.*, 2008; Hecht *et al.*, 2009; Jarahian *et al.*, 2011). Letztere finden sich auf allen tierischen Zellen, wobei Gewebe- und auch Tumorzellen diese Strukturen in unterschiedlichen Mustern exprimieren. Weitere Liganden von NKp30 sind Nuklearfaktor HLA-B-assoziiertes Transkript 3 (BAT-3), welches von Tumorzellen freigesetzt werden kann und dem Transmembranprotein B7-H6 (Pogge von Strandmann *et al.*, 2007; Brandt *et al.*, 2009). Der Ligand von NKp44 (NKp44-L) wird zum einen von verschiedenen Tumorzelllinien, aber zum anderen auch von Zellen nach einer Virusinfektion exprimiert (Vieillard *et al.*, 2005; Baychelier *et al.*, 2013). Als Ligand von NKp80 konnte bisher aktivierungs-induziertes-C-Typ-Lektin (activation-induced C-type lectin, AICL), welches auf Tumorzelllinien hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Ursprungs exprimiert wird, identifiziert werden (Vitale *et al.*, 2001; Welte *et al.*, 2006).

Der aktivierende Rezeptor CD2 ist ein Transmembranprotein, welches neben NK-Zellen auch auf der Oberfläche von T-Lymphozyten vorkommt. Sein Hauptligand ist Lymphozytenfunktion-assoziierte Antigen-3 (LFA-3, CD58); einem Molekül, welches sowohl auf vielen hämatopoetischen, aber auch nicht-hämatopoetischen Geweben vorkommt (Dustin *et al.*, 1987; Davis und van der Merwe, 1996).

Ein weiterer sehr gut charakterisierter aktivierender Rezeptor ist 2B4 (CD244); ein Mitglied aus der SLAM-Rezeptorfamilie (signaling lymphocytic activation molecule, SLAM). Der 2B4-Rezeptor ist auf allen NK-Zellen präsent und bindet an CD48, einem Liganden, welcher seinerseits von allen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (Garni-Wagner *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1998; Latchman *et al.*, 1998; Veillette, 2010). Da 2B4 sowohl aktivierende als auch inhibitorische Eigenschaften durch die Rekrutierung von Adaptorproteinen aufweist, wird er als möglicher multifunktionaler Rezeptor beschrieben (Garni-Wagner *et al.*, 1993; McNerney *et al.*, 2005). Darüber hinaus schien der zytotoxische Effekt nach 2B4-Ligation mit Beteiligung von DNAM-1 (CD226) signifikant erhöht zu sein (Bryceson *et al.*, 2006). DNAM-1 ist ein Glykoprotein und wird von den meisten NK-Zellen exprimiert. Die Liganden dieses kostimulatorischen, aktivierenden Rezeptors sind CD112 und CD155, zwei Proteine aus der Nektinfamilie, die auch als Poliovirus-Rezeptoren (PVRs) bezeichnet werden (Bottino *et al.*, 2003; de Andrade *et al.*, 2014). CD112 und CD115 werden dabei von einer Vielzahl solider und hämatologischer Tumore exprimiert (Tahara-Hanaoka *et al.*, 2006).

Leukozyten-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (z.B. Leukozyten-Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor Subfamilie B, Mitglied 1; LILRB1) sind inhibitorische Rezeptoren, welche wie KIRs zur Immunglobulin-Superfamilie gehören und an MHC-Klasse-I-Moleküle binden (Cosman *et al.*, 1997). Ein spezifischer LILR bindet UL18 (humanes zytomegalovirus-kodierendes Protein) im Vergleich zu MHC-Klasse-I-Moleküle mit weit größerer Affinität (Chapman *et al.*, 1999). Ein weiterer Vertreter der inhibitorischen Rezeptoren ist der Killerzellen-Lektin-ähnliche Rezeptor G-1 (KLRG-1), der an Cadherine bindet, welche sowohl von gesunden als auch soliden Geweben exprimiert werden und eine schützende Rolle durch die Lyse-Prävention gesunder Gewebe einzunehmen scheint (Ito *et al.*, 2006).

3.3.2.2 Die Signalübertragung in NK-Zellen

Ausgenommen von CD16, sind andere aktivierende Rezeptoren wie beispielsweise NKG2D und NKp46 nicht in der Lage, eine NK-Zell-Aktivierung selbstständig auszulösen. Die Aktivierung von NK-Zellen durch aktivierende Rezeptoren benötigt eine Komplementierung mit anderen Rezeptoren, um synergetische aktivierende Signale zu erzielen, wobei auch nicht alle Rezeptorkombinationen in einer synergetischen Aktivierung resultieren. Dies wird am Beispiel von NKp46 deutlich: nur in Kombination mit Signalen von einem der Rezeptoren wie 2B4, DNAM-1, NKG2D oder CD2, induziert NKp46 die NK-Zelldegranulation- sie gelten somit als kostimulatorische Rezeptoren. Die Voraussetzung einer synergetischen Kombination aktivierender Rezeptoren stellt man sich als eine Art Absicherung vor, bei welcher eine uneingeschränkte NK-Zell-Aktivierung verhindert werden soll (Bryceson *et al.*, 2006a).

Als dominante aktivierende Rezeptoren gelten solche, welche mit Immunrezeptor-Tyrosin-enthaltende-Aktivierungsmotiven (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) assoziierenden Adaptermolekülen verknüpft sind. Nach der Phosphorylierung eines der Tyrosine werden Kinasen (Syk oder ZAP70) rekrutiert, was eine Signalkaskade auslöst, die letztlich in der Degranulation und der Transkription von Zytokin- und Chemokingenen resultiert (Tomasello *et al.*, 2000). Die Aktivierung infolge von NCR-Bindung wird beispielsweise durch die Assoziation mit Adaptermolekülen vermittelt; NKp30- und NKp46 sind mit FcεRIγ und CD3ζ, NKp44 wohingegen mit dem Signalisierungsadapter DAP12 assoziiert (Pessino *et al.*, 1998; Cantoni *et al.*, 1999; Pende *et al.*, 1999). FcεRIγ und CD3ζ bilden Homo- und Heterodimere, welche mit CD16 assoziieren. DAP12 trägt ein einzelnes ITAM und bildet Homodimere (Lanier *et al.*, 1998). Der NKG2D-Rezeptor hingegen nutzt einen alternativen Signalisierungsmechanismus, welcher mit DAP12 oder DAP10 assoziiert wird. DAP-10 führt schließlich über eine Phosphatidylinositol-3-Kinase zu anderen Signalwegen (Lanier *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999; L. Moretta und Moretta, 2004). Ein weiterer Signalweg in NK-Zellen resultiert aus der Stimulation des 2B4-Rezeptors. Das zytoplasmatische Ende dieses Rezeptors trägt vier Immunrezeptor-Tyrosin-enthaltende-Schaltermotive (immunoreceptor tyrosine-based switch motif, ITSM), welche die Adapterproteine SAP (SLAM-assoziiertes Adapterprotein) oder ERT (EAT-2-related transducer) rekrutieren. Während die Rekrutierung von SAP zur NK-Zell-Aktivierung führt, inhibiert die Rekrutierung von ERT die NK-Zellfunktion (Garni-Wagner *et al.*, 1993; Veillette, 2006).

Eine negative Kontrolle der NK-Zell-Aktivierung erfolgt an mehreren Stufen und nicht nur durch die Inhibition MHC-Klasse-I-erkennender Rezeptoren. Inhibitorische Signale blockieren die Aktivierung zeitnah, oberhalb durch LFA-1 und oberhalb Aktin-abhängiger Signale, welche zur Rekrutierung und Phosphorylierung von aktivierenden Rezeptoren notwendig sind. So werden die meisten nachgeschalteten Signale von Beginn an blockiert, anstelle später wieder abgeschaltet werden zu müssen (Long, 2008; Abeyweera *et al.*, 2011). Die Signalweiterleitung inhibitorischer Rezeptoren erfolgt intrazellulär über Immunrezeptor-Tyrosin-enthaltende-inhibierende Motive (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs, ITIMs) am zytoplasmatischen Ende der Rezeptoren. Die Mehrheit der inhibitorischen Rezeptoren, welche ITIMs tragen, rekrutieren nach der Phosphorylierung eines Tyrosins durch eine Kinase aus der Src-Familie die Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 oder SHP-2 (Burshtyn *et al.*, 1996; Tomasello *et al.*, 2000). SHP-1 und SHP-2 unterdrücken schließlich die Dephosphorylierung der Proteinsubstrate von Tyrosinkinase, welche mit aktivierenden Rezeptoren verbunden sind. Indem sie in unmittelbarer Nähe zu aktivierenden Rezeptoren agieren, führen diese Phosphatasen -wenn auch vorübergehend und nur lokal- letztlich dazu, dass NK-Zellen weder degranulieren, Zytokine produzieren oder proliferieren. Da die ITIM-basierte Inhibition über Signale aktivierender Rezeptoren dominiert, geht man mittlerweile davon aus, dass sich die NK-Zellantwort nicht nur aus einer einfachen Balance aktivierender und inhibitorischer Signale zusammensetzt, sondern eine komplexe Einbindung und Hierarchie der Signale beinhaltet (Long, 2008).

3.4 Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIRs) und ihre Liganden

Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIRs) stellen als Mitglieder der Immunglobulin-(Ig)-Superfamilie die größte und wichtigste Rezeptorgruppe dar, welche an der NK-Zell-vermittelten Erkennung von HLA-Klasse-I-Molekülen (HLA-A, HLA-B und HLA-C (Klasse Ia); sowie HLA-G (Klasse Ib)) beteiligt ist (A. M. Martin *et al.*, 2000). Die KIR-Genfamilie umfasst 15 Loci mit hoher Sequenzhomologie: KIR2DL1, KIR2DL2/L3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1/S1, KIR3DL2, KIR3DL3 inklusive der beiden Pseudogene KIR2DP1 und KIR3DP1 (Marsh *et al.*, 2003). Jedes KIR-Gen besitzt dabei eine Vielzahl von Allelen; momentan sind 753 KIR Allele bekannt (EMBL-EBI Immuno Polymorphism Database, Release 2.5.0; <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir>), wobei manche KIR-Gene eine extreme Allel-Variabilität zeigen (z.B. KIR3DL2 mit über 100 Allelen) und andere hoch konserviert zu sein scheinen, da nur wenige Allele existieren (z.B. KIR2DS3 mit 15 Allelen).

Die Genprodukte sind Typ-1-Transmembran-Glykoproteine, die von der Mehrheit von NK-Zellen und manchen T-Zell-Subsets auf der Oberfläche exprimiert werden. Anhand ihrer strukturellen und funktionellen Charakteristika unterscheidet man inhibitorische (iKIRs) und aktivierende (aKIRs) KIRs; worauf schließlich auch ihre Nomenklatur basiert. KIRs weisen entweder zwei (2D) oder drei (3D) extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen (D0, D1 oder D2) auf und variieren in der Länge ihres zytoplasmatischen Endes, nämlich lang (long, L) oder kurz (short, S), welches letztlich (mit einigen Ausnahmen wie KIR2DL4) ihre Funktion bestimmt (Abb. 3, Tab. 2) (Marsh *et al.*, 2003). Inhibitorische KIRs tragen eine oder zwei ITIMs an ihrem langen zytoplasmatischen Ende, welche infolge einer KIR-KIR-Liganden (KIR-KIRL)-Interaktion phosphoryliert werden und darauffolgend die Rekrutierung von Phosphatasen (SHP) schließlich eine Transduktion inhibitorischer Signale erlaubt. Rezeptoren mit einem kurzen zytoplasmatischen Ende besitzen keine ITIMs, allerdings tragen sie einen positiv geladenen Aminosäurerest (Lysin) in der Transmembrandomäne, welcher ihnen eine Assoziation mit aktivierenden Adapterproteinen (DAP12) erlaubt, die ihrerseits ITAMs tragen (Colonna, 1997; Lanier *et al.*, 1998). KIR2DL4 besitzt zwar ein ITIM in seinem langen zytoplasmatischen Ende, wodurch er schließlich der inhibitorischen KIR-Gruppe zugeordnet wurde, bindet allerdings auch an das aktivierende Motiv von FcεRI-γ und scheint somit ebenso in der Lage zu sein, aktivierende Signale zu übermitteln (Rajagopalan *et al.*, 2001; Kikuchi-Maki *et al.*, 2005).

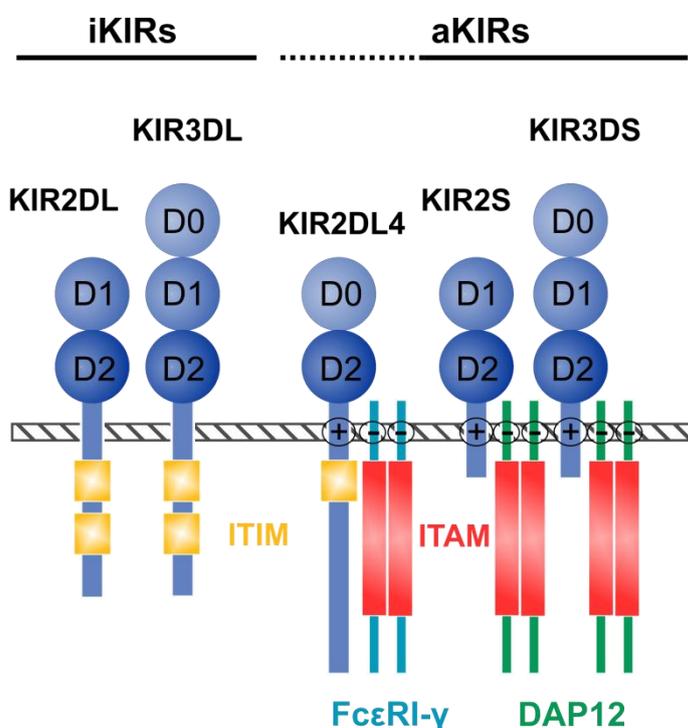


Abbildung 3: Strukturelle Unterschiede verschiedener KIRs. Inhibitorische (iKIRs) und aktivierende (aKIRs) unterscheiden sich in ihrer Anzahl an extrazellulären Ig-Domänen (blau, D0, D1, D2) und in der Länge des zytoplasmatischen Endes (L für lang und S für kurz). Rezeptoren mit einem langen zytoplasmatischen Ende tragen ITIMs (gelb) und besitzen somit eine inhibitorische Funktion. Die kurzen zytoplasmatischen KIRs und der langschwänzige KIR2DL4 sind aktivierende Rezeptoren, welche eine basische Aminosäure (+) besitzen, die mit der sauren (-) Aminosäure innerhalb der Transmembrandomäne der Adapterproteine DAP12 (grün) oder FcεRI-γ (blau) interagieren. Letztere tragen ITAMs (rot). Modifiziert nach Campbell und Purdy, 2011.

3.4.1 KIR-Haplotypen

Zusätzlich zum Allel-Polymorphismus gibt es eine starke Haplotyp-Variabilität bedingt durch die Anzahl der im LRC kodierten KIR-Gene. Grundsätzlich unterscheidet man aufgrund der Anzahl und Art der KIR-Gene zwei KIR-Haplotypen: KIR Haplotyp A (homozygoter (A/A) Genotyp) und B (B/x (heterozygoter (A/B) oder homozygoter (B/B) Genotyp)) (Uhrberg *et al.*, 1997). Individuen des Haplotypen A besitzen (mit Ausnahme von KIR2DL4) außer KIR2DS4 keine stimulatorischen KIR-Gene. Interessanterweise hat man auch bei Haplotyp A-Individuen ermitteln können, welche Null-Varianten von KIR2DS4 und KIR2DL4 tragen, diese somit nicht auf der Zelloberfläche exprimieren und letztlich funktionell keinerlei aktivierende KIRs besitzen (Steffens *et al.*, 1998; Rajagopalan *et al.*, 2001). B-Haplotypen hingegen definieren sich durch die Anwesenheit von mindestens einem der folgenden KIR-Gene: KIR2DL5, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5 und KIR3DS1 (Abb. 4, Tab. 2). Allelische Assoziationsstudien der KIR-Loci zeigten, dass ein sog. Kopplungsungleichgewicht (Linkage disequilibrium, LD) zwischen einigen KIR-Genen vorherrscht: so werden KIR2DL2 und KIR2DS2 stets gemeinsam vererbt; KIR2DL5 kommt ebenfalls nur in Verbindung mit KIR2DS3 oder KIR2DS5 vor (Hsu *et al.*, 2002).

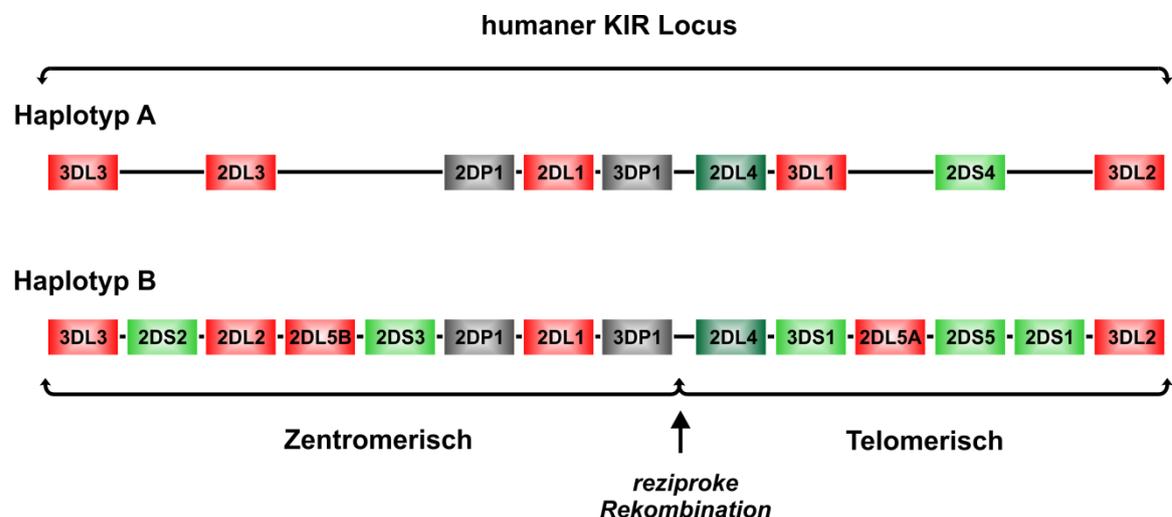


Abbildung 4: Organisation des humanen KIR-Locus im LCR auf Chromosom 19q13.4. Der KIR Locus umfasst neben Pseudogenen (grau) auch Gene, welche für inhibitorische (rot) als auch aktivierende (grün) Rezeptoren kodieren. KIR3DL3 und KIR3DL2 flankieren den Locus, welcher nochmals unterteilt werden kann in einen zentromerischen (KIR3DL3 bis KIR3DP1) und einen telomerischen Teil (KIR2DL4 bis KIR3DL2). Der Bereich zwischen KIR3DP1 und KIR2DL4 gilt als Stelle möglicher reziproker Rekombination, bei welchem durch die Neusortierung zentromerischer und telomerischer Gen-Motive neue Haplotypen entstehen können. Während die Gruppe der Haplotyp A-Individuen in ihren KIR-Genen nicht variieren (zeigen dafür eine umfangreiche Variabilität auf Allel-Ebene), zeigen Haplotyp B-Individuen durch die zusätzliche Anwesenheit stimulierender KIR-Gene (grün) erhebliche Variationen (jedoch einen moderaten Allel-Polymorphismus). Modifiziert nach Parham, 2005.

Die Variabilität des B-Haplotyps ist daher hauptsächlich auf die An- oder Abwesenheit der Gene und weniger auf Allel-Polymorphismus zurückzuführen, während innerhalb des A-Haplotyps eine große Allel-Variabilität herrscht. Dies ist mit der Tatsache konform, dass inhibitorische im Gegensatz zu den aktivierenden Genen sehr viel mehr Allele besitzen (Middleton und Gonzelez, 2010). Allen Haplotypen gemein ist das Vorkommen sogenannter Framework- oder Rahmen-Gene; KIR3DL3 und KIR3DL2 am zentromerischen und telomerischen Ende und KIR3DP1 sowie KIR2DL4 in der zentralen Region des KIR-Locus (Wilson *et al.*, 2000). Immungenetische Analysen verschiedener ethnischer Populationen unterscheiden sich maßgeblich in der Verteilung der Haplotypen. So gehört beispielsweise nur jeder Dritte der kaukasischen Bevölkerung zur Gruppe der A-Haplotypen (Parham, 2003). Es wird allgemein angenommen, dass Populationen mit höherem B-Haplotyp-Aufkommen einem stärkeren Selektionsdruck durch beispielsweise Infektionskrankheiten ausgesetzt sind (Middleton und Gonzelez, 2010).

Kombinationen aus KIR- und HLA-Klasse-I-Variationen beeinflussen Infektionsresistenzen, die Anfälligkeit für Autoimmunkrankheiten, Schwangerschaftskomplikationen sowie den Ausgang nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT). Diese Korrelationen weisen womöglich darauf hin, dass das Zusammenspiel von KIR- und HLA-Klasse-I-Polymorphismus das menschliche Überleben im Hinblick auf epidemische Infektionen ermöglicht und sowohl die Reproduktion als auch das Bevölkerungswachstum beeinflusst hat (Parham, 2005).

3.4.2 KIR-Liganden (KIRL)

Die meisten KIRs interagieren mit spezifischen Allotypen von HLA-Klasse-I-Molekülen (Boyington und Sun, 2002; Carrington und Norman, 2003). Im Allgemeinen interagieren Rezeptoren der KIR3D-Gruppe mit HLA-A- und HLA-B-; KIR2D-Rezeptoren hingegen mit HLA-C-Molekülen. Letztere stellen die Haupt-MHC-Klasse-I-Liganden dar, welche die NK-Zellaktivität durch die Bindung inhibitorischer Rezeptoren mit zwei IgG-Domänen (KIR2D) beeinflusst (Tab. 2). Die Erkennung des HLA-C kann dabei auf zwei Epitope in dem Molekül -einem Dimorphismus an den Positionen 77 und 80 der $\alpha 1$ Helix der schweren Kette des MHC-Klasse-1- eingegrenzt werden. HLA-C-Liganden der Gruppe 1 (C1) beinhalten allel-kodierte Moleküle mit einem Serin und Asparagin (Ser77 und Asn80), während die HLA-C-Liganden der 2. Gruppe (C2) von allel-kodierten Molekülen geprägt sind, welche an diesen Aminosäurepositionen ein Asparagin und ein Lysin (Asn77 und Lys80) aufweisen (Mandelboim *et al.*, 1996). Die Epitope der 1. Gruppe binden spezifisch an KIR2DL2/2DL3; C2-Moleküle hingegen sind Liganden von KIR2DL1

(Colonna und Samaridis, 1995; Winter und Long, 1997). Daten aus jüngeren *in vitro* Studien weisen jedoch darauf hin, dass KIR2DL2/2DL3 ebenfalls eine schwache Affinität zu bestimmten HLA-C2-Epitopen (C*05:01, C*02:02, C*04:01) und HLA-B-Allotypen (HLA-B*46:01, B*73:01) besitzen (Moesta *et al.*, 2008; David *et al.*, 2013) und KIR2DL1 eine breitere HLA-C-Liganden-Spezifität aufweist, als bisher angenommen (Chapel *et al.*, 2017).

Tabelle 2: KIR-Genprodukte und ihre HLA-Liganden. iKIRs mit inhibitorischer Funktion (rot unterlegt) binden dieselben HLA-Moleküle im Vergleich zu aKIRs mit stimulierender Funktion (grün unterlegt) in einer höheren Affinität. Die HLA-C-Allele als KIR-Liganden der Gruppe C1 und C2 sind am Tabellenende aufgeführt. Modifiziert nach Campbell und Purdy, 2011; Kusnierczyk, 2013.

Funktion	KIR	Haplotyp	KIR Ligand
inhibitorisch	2DL1 (CD158a)	A+B	HLA-C2, geringe Affinität zu C1, HLA-B
	2DL2 (CD158b1)	B	HLA-C1, geringe Affinität zu C2, HLA-B
	2DL3 (CD158b2)	A+B	HLA-C1, geringe Affinität zu C2, HLA-B
	2DL5A, B (CD158f)	B	<i>unbekannt</i>
	3DL1 (CD158e1)	A+B	HLA-B Bw4 (z.B. HLA-B*27) und HLA-A Bw4 (z.B. HLA-A*32)
	3DL2 (CD158k)	A+B	HLA-A*3, A*11
	3DL3 (CD158z)	A+B	<i>unbekannt</i>
	2DL4 (CD158d)	A+B	HLA-G
aktivierend	2DS1 (CD158h)	B	HLA-C2
	2DS2 (CD158j)	B	HLA-C1 und HLA-A*11
	2DS3 (-)	B	HLA-C1
	2DS4 (CD158i)	A+B	HLA-A*11, und Allotypen von HLA-C1 (C*16:01, C*14:02) und HLA-C2 (C*05:02, C*02:02)
	2DS5 (CD158g)	B	<i>unbekannt</i>
	3DS1 (CD158e2)	B	HLA-Bw4

HLA-C Allele:

C1 (Ser77, Asn80) – C*01,03,07,08,12,13,14:02,15:07,16:01; HLA-B*46.

C2 (Asn77, Lys80) – C*02,04,05,06,07:07,14:01,15 (ohne 15:07),16:02,17.

Zudem herrscht eine Hierarchie in der Stärke der durch die Interaktion inhibitorischer KIRs mit ihren entsprechenden Liganden vermittelten Signale: die Bindung von C2-Liganden an KIR2DL1 resultiert beispielsweise in einer starken Inhibition, während C1-Interaktionen mit KIR2DL2/2DL3 nur mittel und schwache inhibitorische Signale generieren (Ahlenstiel *et al.*, 2008; Moesta *et al.*, 2008). HLA-B-Allotypen mit einem Bw4-Motiv (Pos. 77-83) sind ebenso wie manche HLA-A-Allele mit einem Bw4-Motiv die Liganden des KIR3DL1-Rezeptors (Thananchai *et al.*, 2007). KIR3DL2 bindet spezifisch

HLA-A*3 und -A*11 (Dohring *et al.*, 1996; Pende *et al.*, 1996), während die Datenlage zum löslichen, nichtklassischen MHC-Klasse-I-Molekül HLA-G als Ligand von KIR2DL4 noch kontrovers ist. Aufgrund der resultierenden Zytokinfreisetzung nach KIR2DL4-Bindung gilt dieser Rezeptor trotz seiner langen zytoplasmatischen Domäne als aktivierender KIR (Rajagopalan und Long, 1999; Rajagopalan *et al.*, 2006; Le Page *et al.*, 2014).

Über aKIR-Liganden und Ligandenspezifität ist im Gegensatz zu ihren iKIR-„Gegenspielern“ (bedingt durch die hohe aKIR/iKIR-Sequenzhomologie) weitaus weniger bekannt. Im Allgemeinen besitzen sie jedoch im Vergleich zu den iKIRs für dieselben HLA-Liganden eine geringere Affinität (Vales-Gomez *et al.*, 1998): so bindet KIR2DS1 wie KIR2DL1 an das C2-Epitop (A. Moretta *et al.*, 1995; Biassoni *et al.*, 1997; Stewart *et al.*, 2005; Chewning *et al.*, 2007; Foley *et al.*, 2008; Pende *et al.*, 2009; Chapel *et al.*, 2017). Die Bindung von KIR2DS2 an wenige C1-Allotypen und HLA-A*11 ist vergleichsweise ebenfalls sehr schwach (Moesta und Parham, 2012; David *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014). KIR2DS4 bindet sowohl an Allele der C1- als auch der C2-Gruppe und HLA-A*11 (Graef *et al.*, 2009). Durch die hohe Sequenzhomologie in der extrazellulären Domäne von KIR3DL1 und KIR3DS1 wird trotz fehlender Beweise für eine direkte Interaktion angenommen, dass KIR3DS1 ebenso wie KIR3DL1 Bw4-Motive bindet (Alter *et al.*, 2007; Carr *et al.*, 2007; Norman *et al.*, 2007; O'Connor *et al.*, 2007). Es ist möglich, dass HLA-Klasse-I-Moleküle die Haupt-Liganden der aKIRs darstellen. Nichtsdestotrotz sind veränderte HLA-Komplexe, beispielsweise HLA/Peptid-Komplexe, Komplexe mit viralen Proteinen oder auch nicht-HLA-Klasse-I-Liganden vorstellbar (Rajagopalan und Long, 1997). Unterstützt wird diese These durch Daten über KIR2DS4, welcher HLA-Klasse-I-unabhängig mit Proteinen auf Melanomzellen interagiert (Katz *et al.*, 2004). Liganden von KIR2DL5, KIR3DL3 und KIR2DS5 sind bisher unbekannt (Vales-Gomez *et al.*, 1998; Vilches und Parham, 2002; Della Chiesa *et al.*, 2008; VandenBussche *et al.*, 2009).

3.4.3 Regulation der KIR-Expression

Die KIR-Haplotypzygotität bestimmt die Anzahl inhibitorischer und aktivierender Gene eines jeden Individuums. Die KIR-Genexpression unterliegt dabei einem komplexen Prozess, welcher mit verschiedenen Faktoren einhergeht: zum einen hängt die Expression vom ererbten KIR-Gengehalt und vom Haplotyp ab. Zum anderen wird das Verhältnis an KIR-positiven NK-Zellen und die Rezeptordichte auf der Zelloberfläche durch allelischen KIR-Polymorphismus bestimmt (Gumperz *et al.*, 1996). Beispielsweise führen Einzelbasen-Polymorphismen in der extrazellulären Domäne mancher Allele von

KIR3DL1, KIR2DL2 und KIR3DS3 dazu, dass sie nicht an der Zelloberfläche präsentiert werden (Pando *et al.*, 2003; VandenBussche *et al.*, 2006; VandenBussche *et al.*, 2009). Deletionen im Leseraster können zu Stopcodons führen, welche wiederum trunkierte KIR-Proteine mit fehlenden Transmembran- oder zytoplasmatischen Domänen und letztlich lösliche anstelle von membran-verankerten Proteinen zur Folge haben (Goodridge *et al.*, 2007; Middleton *et al.*, 2007). Beispiele hierfür sind die relativ häufig vorkommenden Allele KIR2DS4*003 und KIR3DL1*004.

Die Expression der KIRs wird ebenfalls von den vorkommenden HLA-Liganden beeinflusst: Individuen mit KIR2DL1 oder KIR3DL1 haben eine größere Population an NK-Zellen, welche diese KIRs exprimieren, wenn in diesen Individuen gleichzeitig HLA-C2 oder HLA-Bw4-Liganden vorkommen. Umgekehrt, ist die Frequenz an NK-Zellen, welche KIRs ohne den passenden KIRL (mismatch) exprimieren, reduziert (Shilling *et al.*, 2002; Yawata *et al.*, 2006).

Die KIR-Transkription beginnt mit KIR2DL4, dem einzigen KIR, welcher von allen NK-Zellen exprimiert wird. Der KIR-Lokus ist nun geöffnet, was der Transkriptionsmaschine den Zugang zu weiteren KIR-Genen erlaubt (Belkin *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 2003; Trompeter *et al.*, 2005). Durch diesen stochastischen aber mechanistisch noch nicht weiter erklärten Prozess, exprimieren NK-Zellen verschiedene KIR-Gen-Kombinationen (Valiante *et al.*, 1997). Promotor-Polymorphismen stellen ebenfalls Modulatoren der Transkription dar und können im Falle der KIR-Gene die Methylierungsmuster ändern (Uhrberg, 2005). So ergibt sich also die gesamtheitliche Expression von KIR2DL4, während andere KIRs durch Gen-Methylierung („Stilllegung“) nur von bestimmten NK-Zellen exprimiert werden können (Valiante *et al.*, 1997; Santourlidis *et al.*, 2002). NK-Zellklone eines einzelnen Individuums können sich so wesentlich in ihrer KIR-Expression unterscheiden. Eine wichtige Eigenschaft der KIR-Verteilungsweise ist ihre stabile Expression während der Expansion reifer NK-Zellklone: das KIR-Expressionsmuster wird während der Zellteilung an die Tochterzelle weitergegeben (Santourlidis *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2003). Interessant ist auch, dass NK-Zellen nach der Expansion unter Einsatz der HLA-null-Mutante K562-mbIL15-41BBL ihren *in vivo* über KIR-KIRL-Interaktionen festgelegten „Lizensierungs-Status“ und somit ihre ursprüngliche Funktionalität beibehalten (Wang *et al.*, 2016).

3.4.4 aKIRs und ihr Schutz vor Viren

KIR3DS1 ist bis dato der bestuntersuchtete aKIR im Hinblick ihrer Rolle bei infektiösen Krankheiten (Körner und Altfeld, 2012). Erste Beweise eines Einflusses von KIR3DS1

lieferten genetische Studien HIV- (humanes Immundefizienz-Virus) infizierter Patienten: Individuen, welche homozygot für *KIR3DS1* und HLA-Bw4-positiv mit einem Isoleucin an Position 80 waren, zeigten ein langsames Fortschreiten von AIDS (M. P. Martin, Gao, et al., 2002). Außerdem konnte während einer akuten sowie chronischen HIV-1-Infektion eine Expansion *KIR3DS1*-positiver NK-Zellen (Alter et al., 2009), die Lyse HIV-1-infizierter Zellen sowie die Inhibition viraler Replikation beobachtet werden (Alter et al., 2007). *KIR3DS1* wird nicht nur bei HIV, sondern auch mit einem positiven Effekt bei der Virusbekämpfung von HCV (Hepatitis-C-Virus)-Patienten in Verbindung gebracht (Rivero-Juarez et al., 2013). Betrachtet man ebenfalls die Rolle der aKIRs bei durch Virusinfektion-verursachten Tumorerkrankungen, konnte dieser schützende Einfluss von *KIR3DS1* in Kombination mit *HLA-Bw4-I80* bei Leberzellkarzinomen chronischer HCV-Patienten festgestellt werden (Lopez-Vazquez et al., 2005). Darüber hinaus wird *KIR3DS1* ein verbesserter Infektionsverlauf bei einer H1N1-Influenza zugesprochen (Aranda-Romo et al., 2012). Zusammen mit *KIR2DS1* und *KIR2DS5* wurde *KIR3DS1* auch mit einem Schutz vor HPV (humanes Papillomavirus) assoziiert (Bonagura et al., 2010).

Herpesviren wie HSV (Herpes Simplex Virus) oder CMV (Cytomegalovirus) verursachen bei der Mehrheit der Betroffenen asymptomatische Infektionen. *KIR2DL2* und *KIR2DS2*, welche wie bereits erwähnt durch ein sehr enges Kopplungs-Ungleichgewicht stets zusammen vererbt werden, gehen mit einer asymptomatischen HSV-Infektion einher (Estefania et al., 2007), wobei hier nicht völlig geklärt werden konnte, ob dies durch den aktivierenden oder den inhibitorischen Rezeptor vermittelt wird.

Nichtsdestotrotz wurde in all diesen Studien stets der KIR-Genotyp bzw. KIR-Transkripte bei der HSZT verschiedener Spender/Empfänger-Konstellationen betrachtet und nicht die Größe der aKIR-exprimierenden NK-Zell-Subsets oder aber ihre Funktionalität untersucht.

3.4.5 *KIR2DS1* - aktueller Stand der Forschung

Die biologische Funktion der aKIRs ist mitunter aufgrund fehlender Liganden aber auch durch die Problematik, welche mit dem Linkage Disequilibrium (z.T. gleichzeitige Vererbung des entsprechenden bzw. verschiedener iKIRs) einhergeht, immer noch nicht vollständig geklärt. *KIR2DS1* stellt als aktiver Gegenspieler zu *KIR2DL1* den wohl prominentesten und bestuntersuchteten aKIR dar. Die Erkennung seines Ligand HLA-C2 spielt nicht nur bei der anti-leukämischen Aktivität alloreaktiver NK-Zellen eine Rolle (Chewning et al., 2007; M. Morvan et al., 2008; Pende et al., 2009; siehe auch 3.5.3),

ferner gibt es zahlreiche Studien, die KIR2DS1 mit Autoimmunerkrankungen (M. P. Martin *et al.*, 2002; Luszczyk *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2004), der Kontrolle viraler Infektionen (Wauquier *et al.*, 2010; Pydi *et al.*, 2013; Crespo *et al.*, 2016), dem Krankheitsverlauf maligner Tumorerkrankungen (Naumova *et al.*, 2005; Marin *et al.*, 2012; La Nasa *et al.*, 2013) und dem Reproduktionserfolg (Faridi und Agrawal, 2011; Shiqiu Xiong *et al.*, 2013) in Verbindung bringen (Tab. 3).

Tabelle 3: KIR2DS1-Assoziationen mit Erkrankungen bzw. aktueller Forschungsstand.

Erkrankung/Begebenheit	Konsequenz von KIR2DS1-Anwesenheit	Referenz
maligne Tumorerkrankungen		
• Brustkrebs	Gen-Frequenz in Patienten höher; fördert Tumorprogression	(Ozturk <i>et al.</i> , 2012)
• Behandlung von CML	geringeres Ansprechen auf Imatinib, geringeres progressionsfreie Überleben	(Marin <i>et al.</i> , 2012)
• HSZT	verringertes Rezidiv und geringere Mortalität bei HSZTs von AML-Patienten mit KIR2DS1 ⁺ -Spendern anti-leukämische Aktivität alloreaktiver KIR2DS1 ⁺ -NK-Zellen gegen HLA-C2 ⁺ -Blasten	(Venstrom <i>et al.</i> , 2012) (Pende <i>et al.</i> , 2009)
Autoimmunerkrankungen		
• atopische Dermatitis (Neurodermitis)	Gen-Frequenz in Patienten geringer; protektiver Effekt	(Niepieklo-Miniewska <i>et al.</i> , 2013)
• Lupus Erythematodes	Gen-Frequenz zusammen mit HLA-C2 in Patienten höher; tragen zur Pathogenese bei	(Hou <i>et al.</i> , 2015)
• Psoriasis Vulgaris (Schuppenflechte)	Gen-Frequenz zusammen mit HLA-Cw6 in Patienten höher; tragen zur Pathogenese bei	(Gudjonsson <i>et al.</i> , 2002; Luszczyk <i>et al.</i> , 2004; Suzuki <i>et al.</i> , 2004; Williams <i>et al.</i> , 2005)
• Psoriasis Arthritis	Anfälligkeit in Verbindung mit fehlendem HLA-Liganden erhöht	(M. P. Martin <i>et al.</i> , 2002)
virale Infektionen		
• Ebola	tödlicher Ausgang der Infektion	(Wauquier <i>et al.</i> , 2010)
• HPV (humanes Papillomavirus)	Assoziation mit Infektionsschutz (zusammen mit KIR2DS5 und KIR3DS1)	(Bonagura <i>et al.</i> , 2010)
Reproduktion	geringere Fehlgeburtenrate	(Hiby <i>et al.</i> , 2010; Shiqiu Xiong <i>et al.</i> , 2013)

3.5 Alloreaktive NK-Zellen bei der hämatologischen Leukämietherapie

Ihre T-Zell-unabhängige Antitumor-Aktivität gegen die verschiedensten Tumortypen machen NK-Zellen neben ihrer Fähigkeit, die durch onkogene Prozesse bedingten Änderungen im zellulären Metabolismus und der Genexpression zu erkennen, zu einem der vielversprechendsten therapeutischen Werkzeuge in der Immuntherapie (L. Moretta *et al.*, 1992; Terme *et al.*, 2008).

Mit etwa 30% der diagnostizierten bösartigen Tumorerkrankungen stellt die Leukämie bei Kindern unter 15 Jahren die häufigste maligne Form im Kindes- und Jugendalter dar. Leukämien sind bösartige Erkrankungen des blutbildenden Systems, haben ihren Ursprung also im Knochenmark und werden nach akuten und chronischen Verlaufsformen sowie dem Befall unterschiedlicher Zellarten klassifiziert. Die malignen, hämatopoetischen Vorläuferzellen werden als Blasten bezeichnet, die unkontrolliert proliferieren und somit gesunde Zellen im Knochenmark verdrängen. Dabei lassen sich Blasten auch in lymphatischen Organen wie den Lymphknoten oder der Milz und im peripheren Blut nachweisen. Leukämiepatienten leiden infolge fehlender, ausgereifter und funktioneller Blutzellen an Blutarmut und einer Immunschwäche. Die Hauptkrankheitsbilder – Akute lymphatische Leukämie (ALL), Akute myeloische Leukämie (AML), Chronisch myeloische Leukämie (CML) und Chronisch lymphatische Leukämie (CLL) – unterscheiden sich in Epidemiologie, Erkrankungsbiologie und Prognose. Chronische Leukämieformen treten nur im Erwachsenenalter auf, während die ALL die häufigste Form im Kindesalter ausmacht. Dabei tritt diese etwa fünfmal häufiger auf als die AML und macht ca. dreiviertel aller kindlichen Leukämien aus (Redaelli *et al.*, 2003; Belson *et al.*, 2007; Vardiman *et al.*, 2009).

3.5.1 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation und Graft-versus-Leukämie-Effekt

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation ist als eine Form von Immuntherapie eine etablierte Behandlungsstrategie vieler hämatologischer Krankheiten. Die Patienten werden nicht nur durch eine intensive Chemotherapie vor Transplantation behandelt, sondern auch durch die Einführung des Immunsystems eines entsprechenden Spenders und dem daraus resultierenden Graft-versus-Tumor-Effekt (graft-versus-tumor, GvT) (Ljunggren und Malmberg, 2007). Der erste Beweis für die klinischen Vorteile durch den Einsatz von NK-Zellen lieferte 2002 die Gruppe um Velardi, welche zeigen konnte, dass ein signifikanter, langfristiger Nutzen bei der Behandlung von AML-Patienten besteht, wenn diese mit T-Zell-depletierten Stammzelltransplantaten aus haploidentischen/HLA-fehlangepassten (mismatch) Spendern (beispielsweise der Fall, wenn Eltern als Spender für ihr erkranktes Kind fungieren) behandelt wurden (Ruggeri *et al.*, 2002). Unter einem HLA-mismatch wird eine HLA-Disparität verstanden. Nach der HSZT wurden also alloreaktive NK-Zellen mit einem KIR-Repertoire generiert, welche nicht an die MHC-Klasse-I-Moleküle des Empfängers binden können bzw. nicht durch sie inhibiert werden. Diese NK-Zellen sind nun in der Lage, verbliebene Blasten im

Empfänger als fremd zu erkennen und zu lysieren (Abb. 5A). Dabei wird ein Graft-versus-Leukämie-Effekt (graft-versus-leukemia, GvL) ohne die Verursachung einer Graft-versus-Host-Erkrankung (graft-versus-host disease, GvHD) hervorgerufen. Bestenfalls wird ein Rezidiv (Krankheitsrückfall) verhindert (Handgretinger *et al.*, 2001; Farag *et al.*, 2002; Ruggeri *et al.*, 2002; Velardi *et al.*, 2002; Parham und McQueen, 2003). Daten über eine erfolgreiche Behandlung von ALL-Patienten mittels KIR-KIRL-mismatch-HSZT fehlen bislang; adulte ALL-Blasten scheinen gegenüber einem NK-Zell-vermittelten-GvL-Effekt nicht sensitiv zu sein (Ruggeri *et al.*, 2002; Kröger *et al.*, 2006) während Daten von anderen Arbeitsgruppen darauf hindeuten, dass die kindliche ALL ein mögliches Target von alloreaktiven NK-Zellen darstellt (Pfeiffer *et al.*, 2007; Pende *et al.*, 2009; Kübler *et al.*, 2014).

3.5.2 Alloreaktive NK-Zellen

Der erste klinische Einsatz von NK-Zellen bei der Tumorthherapie erfolgte in den 1980er Jahren in Form einer Infusion autologer, durch IL-2 aktivierter NK-Zellen (Rosenberg *et al.*, 1985). Die klinische Wirksamkeit dieser Therapieform war jedoch auch durch die Toxizität des IL-2 und der vermutlich dadurch verursachten Expansion regulatorischer T-Zellen (T_{regs}) gering. Zudem können inhibitorische NK-Zellrezeptoren wie NKG2A und iKIRs das Antitumor-Potenzial eingrenzen. Deshalb, und auch weil vielversprechende Effekte in der haploidentischen T-Zell-depletierten Stammzelltransplantation (Ruggeri *et al.*, 2002) beobachtet werden konnten, verschob sich der Fokus in der Therapie maligner Erkrankungen in Richtung Behandlung mit allogener NK-Zellen bei adoptiver Zelltherapie. Der adoptive Transfer, bei welchem große Mengen *ex vivo* expandierter, aktivierter und haploidenter NK-Zellen generiert und in Patienten infundiert werden, ist ebenfalls ein vielversprechender Ansatz der Immuntherapie bei der Behandlung von malignen Tumorerkrankungen (Abb. 5B) (Miller *et al.*, 2005; Curti *et al.*, 2011).

Die Arbeitsgruppe um Campana etablierte für den adoptiven Transfer ein Protokoll zur Generierung expandierter und aktivierter NK-Zellen (NK cell activation and expansion system, NKAES). Dabei werden NK-Zellen in Ko-Kultur mit K562 "Feeder-Zellen" gehalten, welche membrangebundenes IL-15 und den 41BB-Liganden auf ihrer Oberfläche exprimieren. Kombiniert mit der Gabe von IL-2 führt dies zu einer sehr effizienten Expansion und Aktivierung der NK-Zellen *in vitro* und stellt eine Möglichkeit dar, alloreaktive NK-Zellen für den klinischen Einsatz zu generieren (Imai *et al.*, 2005; Fujisaki *et al.*, 2009).

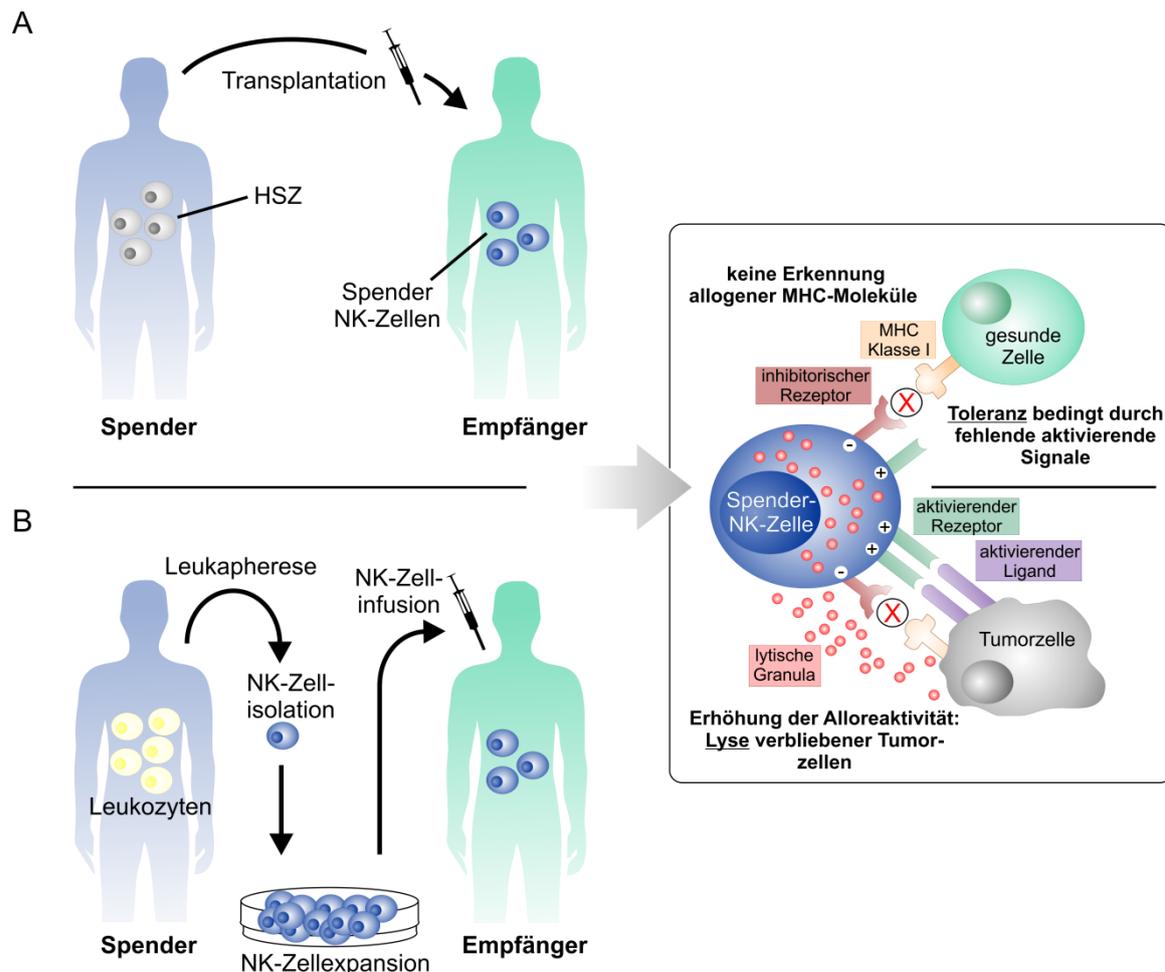


Abbildung 5: NK-Zell-basierte Tumorthherapie. a) Allogene HSZT. Nach haploidenter oder HLA-angepasster (MHC-matched) hämatopoetischer Stammzelltransplantation entwickeln sich die Spender-NK-Zellen im Empfänger. **b) Adoptiver NK-Zelltransfer.** Alternativ können NK-Zellpopulationen vom Spender isoliert (Leukapherese) und *ex vivo* aktiviert bzw. expandiert werden, bevor diese in den Empfänger gelangen. Ziel beider Verfahren ist die Verbesserung der Antitumor-Funktion von Spender-NK-Zellen im Empfänger. Einige Spender-NK-Zellen werden im Empfänger nicht durch MHC-Klasse-I-Moleküle inhibiert (KIR/KIRL-mismatch), was die Lyse verbliebener Blasten zur Folge hat. Im Gegensatz hierzu werden die meisten gesunden Zellen des Empfängers von den Spender-NK-Zellen aufgrund ungenügender Dichte aktivierender Liganden auf der Zelloberfläche toleriert. Modifiziert nach Vivier *et al.*, 2012.

3.5.3 Spenderauswahl und aKIR-Funktionalität im Rahmen der HSZT

Zur Bestimmung der NK-Zell-Alloreaktivität ist eine Bestimmung des HLA-Status sowie des KIR-Genotyps von Spender und Empfänger unabdingbar. Wie bereits erwähnt, ist die Grundvoraussetzung für die NK-Zell-Alloreaktivität, dass der Spender inhibitorische Rezeptoren exprimiert, welche nicht durch die Bindung an entsprechende Liganden des Empfängers zur Inhibition führen (Valiante *et al.*, 1997). Diese sog. KIR-KIRL-mismatched-Spender ermöglichen demnach die besten Chancen eines klinischen

Erfolgs (Davies *et al.*, 2002; Ruggeri *et al.*, 2002; Giebel *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2005; Ruggeri *et al.*, 2005; Beksac und Dalva, 2012). Die Arbeitsgruppe um Cooley war eine der ersten, welche die Spenderauswahl basierend auf der KIR-Genotypisierung postulierte: demnach lieferte die Wahl von KIR-Haplotyp-B-Spendern den größten Schutz eines Rezidivs und Überlebensvorteile für AML-Patienten bei der HLA-matched oder mismatched HSZT (Cooley *et al.*, 2009; Cooley *et al.*, 2010).

Zusätzlich sollten phänotypische Analysen der iKIR- und CD94/NKG2A-Expression auf Spender-NK-Zellen erfolgen, welche letztlich die Größe des alloreaktiven NK-Zell-Subsets bestimmt (Chewning *et al.*, 2007; Pende *et al.*, 2009). Dies kann durchflusszytometrisch durch den kombinierten Einsatz von entsprechenden mAbs bestimmt werden (Pende *et al.*, 2005; Pende *et al.*, 2009). Ferner liefern funktionelle Untersuchungen basierend auf der Fähigkeit der Lyse entsprechender Zielzellen präzise Informationen über das Maß der Alloreaktivität dieser NK-Zellpopulationen bzw. der NK-Zellklone (Ruggeri *et al.*, 2002; Ruggeri *et al.*, 2006; Pende *et al.*, 2009). Ein HLA-Klasse-I-mismatch zwischen NK- und Targetzelle muss nicht zwingend zu einer NK-Zell-vermittelten Lyse führen. Alloreaktive NK-Zellen sind per Definition von der Arbeitsgruppe um Moretta auch CD94/NGK2A-negativ, da der Ligand dieses inhibitorischen Rezeptors, HLA-E, auf allen HLA-Klasse-I-Zellen zu finden ist (A. Moretta *et al.*, 1990; A. Moretta *et al.*, 1993; L. Moretta *et al.*, 2011). Andere Faktoren wie die Oberflächendichte aktivierender Rezeptoren (beispielsweise NCRs) auf NK-Zellen, aber auch die Expression ihrer Liganden auf den Targetzellen tragen ebenso zur NK-Zell-Alloreaktivität bei (Costello *et al.*, 2002; Bottino *et al.*, 2005).

Bis Dato basieren die Hinweise einer positiven Wirkung der aKIR-Expression bzw. einer noch besseren bei der Expression multipler aKIRs ausschließlich auf Assoziationsstudien und beschränken sich somit weitestgehend auf genetischer Ebene (Ivarsson *et al.*, 2014). In Bezug auf Daten einzelner aKIRs hinsichtlich relevanter Antitumoreigenschaften und Alloreaktivität, konnte dies lediglich für KIR2DS1 nachgewiesen werden: so vermitteln KIR2DS1⁺ NK-Zellen HLA-C1-positiver Spender durch die Erkennung des C2-Allels eine spezifische Zytotoxizität gegenüber adulter AML-Blasten (Chewning *et al.*, 2007; Venstrom *et al.*, 2012) aber auch pädiatrischer BCP-ALL-Blasten (Pende *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu KIR2DS1 konnten keine weiteren funktionellen Effekte zwischen interagierenden aKIRs und HLA-Klasse-I-Molekülen gezeigt werden (Nowak *et al.*, 2015).

4. Ziele der Arbeit

Laut genetischen Assoziationsstudien liefern NK-Zellen solcher Spender den größten NK-Zellvermittelten GvL-Effekt, welche neben einem iKIR-KIRL-mismatch gegenüber dem Empfänger auch einen oder mehrere aKIRs exprimieren. Es wird postuliert, dass Spender, welche diese Anforderungen erfüllen, als die „optimalen“ Stammzellspender bei der HSZT von Leukämiepatienten gelten. Allerdings wird bei einer derartigen genotypisch-bestimmten Spenderauswahl die Bestimmung der alloreaktiven Subsetgröße vernachlässigt. Diese kann spenderabhängig sehr variabel sein, da sich der KIR-Genotyp durch fehlende Expression bzw. Oberflächenpräsentation vom funktionalen Phänotyp unterscheiden kann. Erschwerend kommt hinzu, dass die durchflusszytometrische Analyse von aKIRs bislang nur sehr eingeschränkt möglich ist. Das liegt darin, dass die kommerziell erhältlichen KIR-Antikörper hauptsächlich für iKIRs erhältlich sind und durch die hohe Sequenzhomologie nicht jeder einzelne KIR spezifisch detektiert werden kann. KIR2DS1 ist zum jetzigen Stand der Forschung der einzige aKIR, welcher im Hinblick auf Alloreaktivität und Toleranz eine klinisch relevante Rolle spielt. Trotz der Beobachtungen klinischer Vorteile durch die Wahl Haplotyp B Spender mit multipler aKIR-Expression, fehlen hierzu bislang fundierte wissenschaftliche Grundlagen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher funktionell untersucht werden, in wie fern die Expression multipler aKIRs bzw. die ermittelte Größe des alloreaktiven KIR2DS1⁺-Subsets für die NK-Zell-Zytotoxizität eine Rolle spielt. Unter Berücksichtigung der NK-Zell-Education sollten hierzu heterozygote HLA-C1/C2 Haplotyp A und B-Spender identifiziert, *in vitro* expandiert und die NKAES schließlich analysiert werden. Unter Zuhilfenahme von L721.221**cw0602*-Targetzellen; einer EBV-transformierten B-LCL, welche HLA-C2 auf der Oberfläche präsentiert, sollte in einer sog. „double-fluorescence“ Analyse in Verbindung mit einem CD107a-Degranulation-Assay auf das Vorhandensein bzw. die Größe eines funktionellen alloreaktiven KIR2DS1-positiven Subsets und dessen Beitrag zur Zytotoxizität der Spender-NKAES geschlossen werden.

5. Material und Methoden

Die Versuchsdurchführung aller Experimente erfolgte mit allgemeinem Laborequipment in einem Standardlabor mit der biologischen Sicherheitsstufe 1. Wenn nicht anders vermerkt, wurde Standardlaborausrüstung bzw. -material verwendet.

5.1 Zellkultur

5.1.1 Zelllinien

Zelllinie	Merkmale/Beschreibung	Medium
K562-mbIL15-4-1BBL	Genetische Abwandlung der humanen myelotischen Zelllinie K562 durch retrovirale Transduktion; erlaubt nun die Präsentation einer membrangebundenen Form von IL-15 (IL-15 + CD8 α Transmembrandomäne) und humanem 41BB Liganden auf der Oberfläche. Hauptsächliche Verwendung als „Feeder-Zelllinie“ bei der NK-Zell-Expansion (Imai <i>et al.</i> , 2005; Fujisaki <i>et al.</i> , 2009)	Komplettes RPMI 1640 Medium
L721.221	Epstein-Barr-Virus (EBV) transformierte, humane B-lymphoblastoide Zelllinie (B-LCL); exprimiert durch Gammastrahlen-induzierte Mutationen innerhalb des HLA-Komplexes keine HLA-Klasse I-Moleküle (Shimizu <i>et al.</i> , 1988; Shimizu und DeMars, 1989; Falk <i>et al.</i> , 1995)	Komplettes RPMI 1640 Medium +1 mM Natriumpyruvat
L721.221*cw0602 (C2)	Mittels Elektroporation genomischer DNA des HLA-Gens im eukaryotischen Expressionsvektor erzeugte Transfektante der Zelllinie L721.221; exprimiert nun HLA-C2 (*cw0602) auf der Zelloberfläche (Shimizu und DeMars, 1989; Falk <i>et al.</i> , 1995; Falk <i>et al.</i> , 2000)	Komplettes RPMI 1640 Medium +1 mM Natriumpyruvat + 0,4 mg/ml Hygromycin B

5.1.2 Zellkulturmedien und Puffer

Medium/Puffer	Zusammensetzung
EasySep™-Puffer	2 % FCS 0,4 % 250 mM EDTA in PBS
Einfriermedium	20 % DMSO 80 % Humanalbumin 50 g/l 1:1 mit Zellen in komplettem RPMI 1640 Medium
Komplettes RPMI 1640 Medium	10 % FCS 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin in RPMI 1640 Medium

MACS-Puffer	2,5 % FCS 0,8 % EDTA (0,25 M) in PBS
NKAES-Medium	10 % FFP 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin in RPMI 1640 Medium

5.1.3 Reagenzien und Equipment für die Zellkultur

Reagenz/Produkt	Bezugsquelle
Alburex5, Humanalbumin 50 g/l	CSL Behring GmbH, Marburg, Deutschland
Bicoll Trennlösung (Ficoll)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Einfrierbox „Mr. Frosty“	Thermo Fischer Scientific GmbH, Ulm, Deutschland
EasySep™ Human CD3 Positive Selection Kit I	STEMCELL Technologies, Grenoble, Frankreich
EasySep™ Violet Magnet	STEMCELL Technologies, Grenoble, Frankreich
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco/Life Technologies GmbH, Ober-Ulm, Deutschland
Gefrorenes Frischplasma (FFP)	Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin (ZKT), Tübingen, Deutschland
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf AG , Hamburg, Deutschland
Humanserum “Off the Clot” AB (HuS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Hygromycin-B Solution	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Inkubator HERACell	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Inversmikroskop Olympus IX50	Olympus Europa SE & Co. KG , Hamburg, Deutschland
Kryoröhrchen	Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
Kühlzentrifuge Hettich Rotina 420R	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Kühlzentrifuge Hettich Rotixa 50RS	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
MACS-Separator (MiniMACS™, QuadroMACS™+Säulen (MS oder LS) oder autoMACS® Pro Separator)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Natriumpyruvat	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Neubauer Zählkammer	Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim, Deutschland
NK cell isolation kit human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Polystyrol FACS Röhrchen	Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
Rekombinates humanes IL-2 (Proleukin®S)	Novartis Pharma, Basel, Schweiz
RPMI-Medium1640	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge Hettich Mikro 22R	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Trypanblau-Lösung 0,4 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Venor® GeM classic Kit	Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland
Wasserbad Modell 1002	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Zell-Bestrahlungsgerät GammaCell 1000 Elite	MDS-Nordion Inc., Ottawa, Kanada
Zellkulturflaschen und -platten	Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15/ 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

5.1.4 Versuchsdurchführungen-Zellkultur

5.1.4.1 Mykoplasmentest

Alle verwendeten Zelllinien dieser Arbeit wurden mit dem Venor® GeM classic Kit nach Herstellerangaben negativ für Mykoplasmen getestet.

5.1.4.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl bzw. Vitalität wurde mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Hierzu wurde Volumen der Zellsuspension steril entnommen, mit Trypanblau-Lösung verdünnt und in die Zählkammer transferiert. Unter dem Lichtmikroskop wurden nur die lebenden, kernhaltigen Zellen (d.h. die nicht mit Trypanblau gefärbten Zellen) innerhalb der vier Hauptquadrate gezählt. Die Zellzahl pro ml Suspension ergibt sich schließlich aus der

Formel:
$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{Anzahl gezählter Quadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

5.1.4.3 Einfrieren von Zellen

Je Kryoröhrchen wurden bis zu 50×10^6 Zellen in 0,5 ml komplettem RPMI 1640 Medium überführt und 1:1 mit vorgekühltem Einfriermedium gemischt. Direkt nach Zugabe des Einfriermediums, wurden die Kryoröhrchen in eine ebenfalls vorgekühlte Einfrierbox („Mr. Frosty“) mit einer definierten Kühlungsrate von -1 °C/min transferiert und üN bei -80 °C gelagert. Zur Langzeitlagerung wurden die Proben jedoch in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

5.1.4.4 Auftauen von Zellen

Die Proben wurden bei 37 °C in einem Wasserbad so lange erwärmt, bis im Kryoröhrchen nur noch ein kleiner Eiskristall vorhanden war. Danach wurde der Kryoröhrchen-Inhalt von 1 ml Zellsuspension langsam mit 10 ml des RT-warmen, kompletten RPMI 1640 Mediums vermischt und für 10 min bei 350 g abzentrifugiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in ihrem entsprechenden Medium ausgesät und standardmäßig bei 37 °C im Brutschrank und 5 \% CO_2 kultiviert.

5.1.4.5 Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs)

Humane Vollblutspenden von gesunden, freiwilligen Blutspendern wurden durch das Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen bereitgestellt. Die Isolation erfolgte mittels einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation, bei welchem mit PBS verdünntes Vollblut vorsichtig auf das Trennmedium (Ficoll; synthetische Polymere aus Saccharose) geschichtet und für 25 min bei 500 g ohne Bremse zentrifugiert wird. Die Dichte des Trennmediums ist so eingestellt, dass Erythrozytenaggregate und tote Zellen die Ficollschicht passieren, während Granulozyten in die Ficollphase eindringen. Durch die Zentrifugation können die PBMCs (Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten), welche die Interphase bilden, also von Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen getrennt werden. Die obere Schicht enthält das Blutplasma und wird vor der Entnahme der Interphase zuerst abgenommen. Die Interphase wird nun in PBS aufgenommen, gewaschen und die Zellzahl der mononukleären Zellen ermittelt (siehe 5.1.4.2). Wahlweise wird die NK-Zell-Frequenz bestimmt (siehe 5.2.4.1) und die Zellen schließlich entweder bis zur Weiterverarbeitung eingefroren (siehe 5.1.4.3) oder die NK-Zellen direkt im Anschluss isoliert (siehe 5.1.4.6).

5.1.4.6 Magnetische NK-Zellisolation

Zur Gewinnung der NK-Zellen aus frisch isolierten oder aufgetauten PBMCs, wurde über eine Negativ-Selektion unter Verwendung des human NK cell isolation Kits, dem MACS Separator inkl. der MACS-Säulen nach Herstellerangaben isoliert. Gearbeitet wurde überwiegend auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen bzw. Puffern. Dabei wurden je 10^7 PBMCs in 40 μ l MACS-Puffer aufgenommen und mit 10 μ l des NK Cell Biotin-Antibody Cocktails resuspendiert und 5 min bei 4 °C inkubiert. Nach weiterer Zugabe von 30 μ l MACS-Puffer, wurden 20 μ l NK Cell MicroBeads hinzupipettiert und für weitere 10 min bei 4 °C inkubiert, bevor die Zellen nach dem waschen in mindestens 500 μ l MACS-Puffer aufgenommen und entsprechend ihrer Zellzahl manuell mittels MS- oder LS-Säule im MiniMACS™ bzw. QuadroMACS™ oder automatisch im autoMACS® Pro Separator („Depletes“-Programm) isoliert. Die isolierten NK-Zellen wurden abschließend mit PBS gewaschen, gezählt und ihre Reinheit/ NK-Zell-Frequenz (siehe 5.2.4.1) bestimmt, bevor sie im weiteren Versuchsablauf verwendet wurden.

5.1.4.7 NKAES

Angelehnt an das bereits in der Literatur beschriebene Protokoll „NK cell activation and expansion system“ zur Expansion und Aktivierung von NK-Zellen (Imai *et al.*, 2005; Fujisaki *et al.*, 2009), wurden isolierte NK-Zellen (Reinheit ≥ 90 % $CD56^+CD3^-$) mit 100 Gy-bestrahlten K562-mbIL15-4-1BBL „Feeder-Zellen“ im Verhältnis 1:1,5 und 100 U/ml IL-2 in NKAES-Medium 14 Tage ko-kultiviert. Die NKAES-Zellen wurden dabei alle 2 bis 3 Tage gesplittet und 1:1 mit frischem 100 U/ml IL-2-versetztem Medium versorgt. Nach der Ernte der NKAES-Zellen wurden sie mit PBS gewaschen, gezählt und nach der Überprüfung ihrer Reinheit vor weiteren Experimenten eingefroren.

5.1.4.8 Depletion von T-Zellen

Nach der Ernte der NKAES an Tag 14, wurde ihre Reinheit (NK-Zell-Frequenz-Färbung) bestimmt: Lag die T-Zell-Population bei ≥ 3 %, wurden die T-Zellen ($CD3^+$) über eine Positiv-Selektion mit Hilfe des EasySep™ Human CD3 Positive Selection Kits I und dem EasySep™ Violet Magneten entsprechend der Herstellerangaben depletiert. Hierbei werden die Zellen mit EasySep™-Puffer auf 1×10^8 Zellen/ml eingestellt, der Positive Selection Cocktail sowie die Magnetic Particles zugegeben und das Polystyrol-Röhrchen nach einer kurzen Inkubation in den Violet Magneten platziert. Der Überstand, welcher die ungebundenen NK-Zellen ($CD56^+$ -Fraktion) enthält, wird mit FACS-Puffer gewaschen, gezählt und ihre Reinheit (siehe 5.2.4.1) bestimmt.

5.2 Durchflusszytometrie und Ko-Kultur-Experimente

5.2.1 Reagenzien und Equipment für die Durchflusszytometrie

Reagenz/Produkt	Bezugsquelle
Polystyrol FACS Röhren	Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
ARD Succinimidyl Ester AF350	Thermo Fischer Scientific GmbH, Ulm, Deutschland
ARD Succinimidyl Ester Pacific Blue	Thermo Fischer Scientific GmbH, Ulm, Deutschland
Durchflusszytometer BD FACSCanto™ II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Durchflusszytometer BD LSR II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Clean®/ Flow®/ Rinse®	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Fix&Perm® Permeabilisierungs-Kit	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland
sGolgi-Plug™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
LEGENDplex™ Human Th Cytokine Panel (13-plex)	BioLegend GmbH, Fell, Deutschland
Leukocyte Activation Cocktail, with GolgiPlug™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Normales IgG vom Menschen (100 mg/ml)	CSL Behring GmbH, Marburg, Deutschland
Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit®	Thermo Fischer Scientific GmbH, Ulm, Deutschland

5.2.2 Puffer für die Durchflusszytometrie

Puffer	Zusammensetzung
Blockierpuffer	Humanes IgG in FACS-Puffer (Endkonzentration 10 µg/ml)
FACS-Puffer	2 % FCS 0,84 % 250 mM EDTA in PBS

5.2.3 Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper und Farbstoffe wurden nach Herstellerangaben eingesetzt oder die eingesetzte Verdünnung vorab mittels einer Antikörper-Titration überprüft.

5.2.3.1 Konjugierte Antikörper

Antikörper (anti-human-)	Klon	Verdünnung	Bezugsquelle
CD3 PerCP	SK7	1:100	BD Biosciences
CD3 PE CF594	UCHT1	1:50	BD Biosciences
CD16 AF700	3G8	1:50	BD Biosciences
CD25 FITC	2A3	1:10	BD Biosciences
CD54 (ICAM-1) FITC	84H10	1:5	Beckman Coulter
CD56 Brilliant Violet 421	HCD56	1:50	BioLegend
CD56 Brilliant Violet 711	HCD56	1:25	BioLegend
CD56 BUV395	NCAM16.2	1:50	BD Biosciences
CD69 PerCP	L78	1:10	BD Biosciences
CD94/NKG2A AF700	#131411	1:20	R&D Systems
CD107a Brilliant Violet 605	H4A3	1:20	BioLegend
CD112 PE	TX31	1:50	BioLegend
CD155 PE	SKII.4	1:20	BioLegend
CD158a AF488 KIR2DL1	#143211	1:50	R&D Systems
CD158a,h PE KIR2DL1/S1	EB6B	1:20	Beckman Coulter
CD158b1,b2,j-PE Cy5.5 KIR2DL2/L3/S2	GL183	1:50	Beckman Coulter
CD158b2 AF750 KIR2DL3	#180701	1:50	Novus Biologicals
CD158e1 Brilliant Violet 421 KIR3DL1	DX9	1:20	BioLegend
CD158i PEVio770 KIR2DS4	JJC11.6	1:20	Miltenyi Biotec
HLA-A,B,C PE	W6/32	1:50	BioLegend
HLA-E	MEM-E/08	1:25	abcam
NKG2A (CD159a) PECy7	Z199	1:25	Beckman Coulter
NKG2D (CD314) APC	#134591	1:25	Miltenyi Biotec
NKp30 (CD337) PE	Z25	1:50	Beckman Coulter

NKp44 (CD336) PE	Z231	1:25	Beckman Coulter
NKp46 (CD335) APC	9-E2	1:10	BD Biosciences
Perforin Brilliant Violet 510	dG9	1:20	BioLegend

5.2.3.2 Unkonjugierte Antikörper und Sekundärantikörper

Antikörper (anti-human-) pan-NKG2D-L:	Klon	Verdünnung	Bezugsquelle
MICA	AMO1	1:100	Prof. Steinle, Frankfurt
MICB	BMO1	1:50	
ULBP1	AUMO3	1:100	
ULBP2	BUMO1	1:100	
ULBP3	CUMO3	1:100	

Antikörper (anti-human-)	Klon	Verdünnung	Bezugsquelle
CD158k KIR3DL2	Q66	1:5	Daniela Pende, Genoa, Italien

Sekundärantikörper (anti-mouse-)	Klon	Verdünnung	Bezugsquelle
sheep F(ab') ₂ anti-mouse IgG PE	Polyklonal	1:50	Sigma-Aldrich
goat F(ab') ₂ anti-mouse IgM APC	Polyklonal	1:40	Thermo Fisher Scientific

5.2.3.3 Isotypkontrollen

Isotyp Kontrollen (anti-human-)	Klon	Verdünnung	Bezugsquelle
IgG1 κ AF488	MOPC-21	1:500	BioLegend
IgG1 κ Brilliant Violet 421	MOPC-21	1:40	BioLegend
IgG1 κ Brilliant Violet 605	MOPC-21	1:10	BioLegend
IgG1 κ PE	MOPC-21	1:80 bzw. 1:10	BD Biosciences
IgG2a κ PE	PPV-04	1:50	Immuno Tools
IgG1 κ PE Cy5.5	MOPC-21	1:200	BioLegend

IgG1 κ PEVio770	IS5-21F5	1:20	Miltenyi Biotec
IgG2a κ AF700	MOPC-173	1:100	BioLegend
IgG2a κ AF750	20102	1:200	Novus Biologicals
IgG2b κ Brilliant Violet 510	MPC-11	1:20	BioLegend
IgM κ unlabeled	MM-30	1:5	BioLegend

5.2.3.4 Antikörperpanals

Die Messung der Antikörper innerhalb eines jeden Antikörperpanals erfolgte in zuvor kompensierten und wenn nötig per Hand nachkompensierten Experimente am BD LSR II (siehe dazu auch 5.2.4).

Intrazellulärfärbung-funktionelle Subsetanalyse; Lebend-/Tot ARD-AF350

Antikörper (anti-human-)	Klon	Isotyp
CD3 PE CF594	UCHT1	-
CD56 BUV395	HCD56	-
CD94/NKG2A AF700	#131411	IgG2a κ
CD107a Brilliant Violet 605	H4A3	IgG1 κ
CD158a AF488 KIR2DL1	#143211	IgG1 κ
CD158a,h PE KIR2DL1/S1	EB6B	IgG1 κ
CD158b1,b2,j-PE Cy5.5 KIR2DL2/L3/S2	GL183	IgG1 κ
CD158b2 AF750 KIR2DL3	#180701	IgG2a κ
CD158e1 Brilliant Violet 421 KIR3DL1	DX9	IgG1 κ
CD158i PEVio770 KIR2DS4	JJC11.6	IgG1 κ
CD158k KIR3DL2	Q66	IgM κ unlabeled
Perforin Brilliant Violet 510	dG9	IgG2b κ

Aktivierungscocktail I; Lebend-/Tot ARD-AF350

Antikörper (anti-human-)	Klon	FMO*
CD3 PE CF594	UCHT1	-
CD25 FITC	2A3	-
CD56 Brilliant Violet 711	HCD56	-
CD69 PerCP	L78	-
NKG2D (CD314) APC	#134591	-
NKp44 (CD336) PE	Z231	-

*Durchflusszytometrischer Kontrollansatz (Fluorescence minus one) anstatt Isotypen

Aktivierungscocktail II; Lebend-/Tot ARD-AF350

Antikörper (anti-human-)	Klon	FMO*
CD3 PE CF594	UCHT1	-
CD16 AF700	2A3	-
CD56 Brilliant Violet 421	HCD56	-
NKG2A (CD159a) PECy7	Z199	-
NKp30 (CD337) PE	Z25	-
NKp46 (CD335) APC	9-E2	-

*Durchflusszytometrischer Kontrollansatz (Fluorescence minus one) anstatt Isotypen

Phänotypisierung der L721.221*cw0602; Lebend-/Tot Pacific blue

Antikörper (anti-human-)	Klon	Isotyp
CD54 (ICAM-1) FITC	84H10	IgG1 κ
CD112 PE	TX31	IgG1 κ
CD155 PE	SKII.4	IgG1 κ
HLA-A,B,C PE	W6/32	IgG2a κ
HLA-E	MEM-E/08	IgG1 κ
pan-NKG2D-L	siehe 5.2.3.2	IgG1 κ (hier 1:10)

Die Antikörperfärbungen erfolgten in diesem Fall einzeln.

5.2.4 Versuchsdurchführungen-Durchflusszytometrie und Ko-Kulturversuche

Die Durchflusszytometrie ist eine Technik, welche oft als „FACS“ (Fluorescence Activated Cell Scanning) bezeichnet wird und erlaubt die gleichzeitige Messung verschiedener physikalischer Parameter einzelner Partikel bzw. Zellen in Lösung. Dabei werden diese mit einem Laserstrahl beleuchtet und aus dem resultierenden Streulicht und den Fluoreszenzemissionen können Parameter gemessen werden. Trifft der Laserstrahl auf die Zellen, wird das Streu-/Fluoreszenzlicht über das optische System mittels verschiedener Spiegel und Filter in einzelne Wellenlängenpakete unterteilt und das Licht schließlich in elektronische Signale umgewandelt, welche über einen Computer ausgewertet werden können. Da die Filter nicht alle spektralen Überschneidungen der einzelnen Fluorochrome beseitigen können, ist eine Kompensation (elektrische Subtraktion) nötig, um diese Fluoreszenzen zu beseitigen.

5.2.4.1 Bestimmung der NK-Zell-Frequenz/ Reinheitsmessung

Zur schnellen Bestimmung der Spender-NK-Zell-Frequenz bzw. Überprüfung der NK-Zell-Reinheit nach Isolation oder Expansion, wurden je $0,5-1 \times 10^6$ Zellen mit den Antikörpern gegen CD3 und CD56 für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die NK-Zellen einmal in FACS-Puffer gewaschen, der Überstand abgekippt und diese schließlich im Rücklauf am Durchflusszytometer BD LSR II oder BD FACSCanto™ II gemessen. Die prozentuale NK-Zell-Frequenz ergibt sich aus der gegateten CD3⁺CD56⁺ Zellpopulation.

5.2.4.2 Färbungen von Oberflächenantigenen mit Primärantikörpern

Zur Bestimmung der Oberflächenmarker wurden bis zu 1×10^6 Zellen in 50 µl FACS-Puffer samt der jeweiligen Antikörper in den entsprechenden Verdünnungen aufgenommen und entweder 10 min bei RT oder 20 min bei 4 °C inkubiert. Die Inkubation erfolgte bedingt durch die Lichtempfindlichkeit der Fluorochrom-gekoppelten Antikörper stets im Dunkeln. Zur Gewährleistung der Untersuchung von ausschließlich lebenden Zellen, erfolgte dies anschließend durch eine weitere Inkubation mit einem Lebend-/Tot-Farbstoff (siehe 5.2.4.3).

5.2.4.3 Färbungen von Oberflächenantigenen mit Sekundärantikörpern

Da für manche Oberflächenantigene nur unkonjugierte Primärantikörper verfügbar sind, erfolgt die Detektion dieser Antikörper mittels zusätzlichem Inkubationsschritt mit entsprechendem fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper. Zur Blockierung von unspezifischen Bindestellen, wurden bis zu 1×10^6 Zellen in 100 μ l Blockierpuffer resuspendiert und das nach einer Zentrifugation von 5 min bei 400 g erhaltene Zellpellet mit 50 μ l Blockierpuffer samt entsprechend verdünntem Primärantikörper für 20 min bei RT inkubiert. Nach einem mehrmaligen Waschschrift mit FACS-Puffer, erfolgte die Inkubation in 50 μ l FACS-Puffer samt fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper für weitere 20 min bei RT im Dunkeln. Optional konnte anschließend noch eine wie zuvor beschriebene Oberflächenfärbung mit direktmarkierten Primärantikörpern (siehe 5.2.4.1) angeschlossen werden.

5.2.4.4 Färbungen mittels ARD Lebend-/Tot-Farbstoffen

Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen, wurde nach Färbungen von Oberflächenantigenen ein Inkubationsschritt dieser Zellen mit einem Lebend-/Tot-Farbstoff (z.B. ARD Succinimidyl Ester AF350) nach Herstellerangaben für 10 min bei RT im Dunkeln durchgeführt. Die reaktiven Farbstoffe können nicht die Zellmembran lebender Zellen passieren und reagieren somit nur mit Aminen toter Zellen. Nach mehreren Waschschriften mit FACS-Puffer, wurden die Zellen schließlich in FACS-Puffer sofort gemessen oder für spätere Analysen mit 0,5 % PFA in FACS-Puffer fixiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten für 5 min bei 400 g. Die prozentuale Frequenz lebender Zellen ergibt sich aus der gegateten Farbstoff-negativen Zellpopulation. Zelldoubletten wurden zuvor anhand ihres charakteristischen Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts (Forward- und Side Scatter, FSC und SSC) ausgeschlossen. Der FSC entsteht, wenn das Licht an der Zelloberfläche abgelenkt wird, während der SSC z.B. durch Beugung an inneren Zellmembranen, Vesikeln oder am Zellkern entsteht.

5.2.4.5 FACS-basierter *in vitro* Zytotoxizitätsassay (*in vitro* kill, ivk)

Die Zytotoxizität der Spender-NK-Zellen gegen Targetzellen (L721.221*cw0602) wurde in einem FACS-basierten Assay *in vitro* bestimmt. Die Targetzellen wurden einen Tag zuvor mit 0,5 μ M CFDA-SE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) für 15 min bei 37 °C im Brutschrank gelabelt. Die Färbung wurde durch eine 2-minütige Inkubation bei RT mit 3-5 ml FCS abgestoppt, mit PBS gewaschen und \times N in komplettem RPMI

1640 Medium (inkl. 1 mM Natriumpyruvat und 0,4 mg/ml Hygromycin B) ausgesät. CFDA-SE wird über Diffusion von den Zellen aufgenommen und durch intrazelluläre Esterasen in CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) umgewandelt, welches kovalent an Amin-haltige Strukturen innerhalb der Zellen bindet. Die Überprüfung einer erfolgreichen CFSE-Markierung der Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. NKAES-Zellen (Effektoren) wurden am selben Tag aufgetaut (siehe 5.1.4.4) und üN in NK-Medium mit 100 U/ml IL-2 in einer Dichte von 2 Mio/ml ausgesät.

Am Tag des ivks, wurden die CFSE-markierten Targetzellen vor ihrem Einsatz über eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt, mit PBS gewaschen, gezählt und auf 1×10^6 Zellen/ml in komplettem RPMI 1640 Medium eingestellt. Die NKAES-Zellen wurden mit PBS gewaschen und unter Berücksichtigung der NK-Zell-Frequenz ebenfalls auf 1×10^6 Zellen/ml in komplettem RPMI 1640 Medium eingestellt. Nun wurde die Ko-Inkubation im Effektor:Target-Verhältnis von 3:1 und 1:1 (150 000:50 000 bzw. 100 000:100 000) mit einem Endvolumen von 200 µl und in Triplikaten angesetzt. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Targetzellen, wurden die Ko-Kulturen mit PBS gewaschen und mit dem Lebend-/Tot-Farbstoff Succinimidyl Ester Pacific Blue für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 400 g für 5 min. Um den Spontantod der Targetzellen während der Inkubationszeit zu evaluieren, wurden zusätzlich fünf Monokulturkontrollen miteinbezogen. Die Messung der Proben erfolgte am Durchflusszytometer BD LSR II. Die spezifische Lyse der Targetzellen

errechnete sich wie folgt:
$$\frac{\% \text{ CFSE}^+ \text{ PB}^+ \text{ tote Targets} - \% \text{ CFSE}^+ \text{ PB}^+ \text{ spontan tote Targets}}{100 - \% \text{ CFSE}^+ \text{ PB}^+ \text{ spontan tote Targets}} \times 100 \%$$

5.2.4.6 Intrazellulärfärbung- funktionelle Subsetanalyse mittels Boolean-Gating

Zur Analyse der funktionellen NK-Zellantwort bestimmter Subsets, wurden NKAES-Zellen am Vortag aufgetaut (siehe 5.1.4.4) und in komplettem RPMI 1640 Medium inkl. 10 % Humanserum mit 200 U/ml IL-2 in einer Dichte von 2 Mio/ml ausgesät. Am Analysetag wurden die Ansätze gezählt und unter Berücksichtigung ihrer NK-Zell-Frequenz auf $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml in 100 µl komplettem, jedoch FCS-freien RPMI 1640 Medium inkl. 10 % Humanserum eingestellt. Anschließend wurde der CD107a-Antikörper in entsprechender Verdünnung zugegeben und die Zellen darin für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubation, wurde zu den Ansätzen Golgi-Plug (1:250) und die Targetzellen (L721.221**cw0602*) im Effektor:Target-Verhältnis 1:3 zugegeben. Nach einer Ko-Kultur von 6 h bei 37 °C, erfolgten alle weiteren Arbeitsschritte auf Eis. Vor der Oberflächenfärbung wurden die Ansätze mehrmals mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend in 50 µl FACS-Puffer inkl. der entsprechenden Oberflä-

chen-Antikörper (Antikörperpanel siehe 5.2.3.4) in entsprechender Verdünnung für 30 min bei 4 °C inkubiert. Wichtig ist hierbei zu erwähnen, dass zur Detektion von einzelpositiven KIR2DS1-Zellen der CD158a, h KIR2DL1/S1 (EB6B) in entsprechender Verdünnung erst 15 min nach Zugabe der anderen Antikörper zugegeben werden durfte (Fauriat *et al.*, 2010; S. Xiong *et al.*, 2013). Da einer der Oberflächenmarker mit einem unkonjugierten Primärantikörper (CD158k KIR3DL2, Q66) detektiert wurde, erfolgte vor der Oberflächenfärbung eine 30-minütige Inkubation der Ansätze in Blockierpuffer mit einer anschließenden 20-minütigen Inkubation des konjugierten Sekundärantikörpers (goat F(ab')₂ anti-mouse IgM APC) in entsprechender Verdünnung bei 4 °C im Dunkeln. Nun wurden die Ansätze mehrmals mit PBS gewaschen, bevor eine Lebend-/Tot-Färbung mit ARD Succinimidyl Ester AF350 in PBS nach Herstellerangaben für 10 min bei RT im Dunkeln erfolgte. Nach erneutem mehrmaligen Waschen mit FACS-Puffer, wurde das intrazelluläre Perforin mittels des Fix&Perm® Permeabilisierungs-Kits gefärbt. Hierzu wurden die gewaschenen Zellen in 100 µl Caltac A resuspendiert und somit innerhalb der Inkubation von 20 min bei 4 °C im Dunkeln fixiert. Die Permeabilisierung und Färbung des intrazellulären Perforins erfolgte nach nochmaligem Waschen der Zellen mit FACS-Puffer schließlich durch die Inkubation des anti-Perforin-Antikörpers in entsprechender Verdünnung in 100 µl Caltac B für 45 min bei 4 °C. Abschließend wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und sofort analysiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten auch hier bei 400 g für 5 min. Für die intrazelluläre Färbung wurden neben Isotypkontrollen auch „Baseline“-Ansätze miteinbezogen, welche keine Targetzellen sondern nur Medium enthielten und auf welche die Ko-Kultur-Ansätze normalisiert wurden.

Zur Ermittlung des alloreaktiven Subsets wurde eine Kombination aus dem Hierarchischen Gating und dem sog. Boolean Gating verwendet. Letzteres ist auch als „logisches Gating“ bekannt und wurde nach dem Mathematiker George Boole des 19. Jahrhunderts benannt, welcher an algebraischen Logiksystemen arbeitete. Mittels Boolean Gating können multiple fluoreszenzmarkierte Zellpopulationen ermittelt werden, welche auf einer „AND“, „OR“ und „NOT“ (UND, ODER, NICHT-Befehle) Logik basieren: so lassen sich beispielsweise Zellen ermitteln, die das Antigen a und b, aber nicht c exprimieren.

5.2.4.7 Generierung von Zellkulturüberständen und LEGENDplex™-Assay

Das LEGENDplex™ Human CD8/NK Panel ist ein Immunassay, welcher durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Beads eine gleichzeitige Quantifizierung verschiedener Proteine (IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, IL-17A, TNF, sFas, sFasL, IFN-γ, Granzym A, Granzym

B, Perforin und Granulysin) in einer Probe erlaubt. Die Messung erfolgt an einem Durchflusszytometer und die Auswertung mittels der hierfür vorgesehenen herstellereigenen Software (LEGENDplex™ Data Analysis Software Version 7.0). Zur Bestimmung dieser Proteine wurden Ko-Kulturen aufgetauter NKAES und Targetzellen (L721.221*cw0602) in komplettem RPMI 1640 Medium im Effektor:Target-Verhältnis 1:3 für 18 h angesetzt. Am Folgetag wurden die Zellkulturüberstände abgenommen, für 2 min bei 1000 g zentrifugiert und diese nach der Überführung in ein frisches Reaktionsgefäß bei -80 °C bis zur Durchführung des Assays nach herstellerangaben gelagert. Jede Bead-Gruppe ist mit einem spezifischen Antikörper konjugiert und erlaubt die spezifische Bindung an ein jeweiliges Protein. Nach der Inkubation und einem Waschschrift erfolgt die Zugabe eines biotinylierten Detektions-Antikörpers, welcher ebenfalls an die jeweiligen Proteine bindet: es entsteht ein Bead-Protein-Detektions-Antikörper-Sandwich. Der Detektions-Antikörper wird schließlich durch die Zugabe von Streptavidin-PE nachgewiesen und liefert Fluoreszenzsignalintensitäten proportional zur Menge an gebundenen Proteinen. Da die Beads im Durchflusszytometer nach Größe und internen Fluoreszenzintensitäten unterschieden werden können, lassen sich die proteinspezifischen Populationen voneinander trennen und das PE-Fluoreszenzsignal quantifizieren. Unter Verwendung einer mitgeführten Standardkurve, lässt sich die Proteinkonzentration ermitteln.

5.2.4.8 viSNE-Analysen

viSNE ist ein Hilfsmittel für die nichtlineare Dimensionsreduktion und 2D-Visualisierung von hochdimensionalen Zytometriedaten, welches ursprünglich für die Analyse und Darstellung massenspektrometrischer Daten von menschlichen Blutzellen zur qualitativen Unterscheidung verschiedener veränderter Blutzelltypen entwickelt wurde (Amir el *et al.*, 2013). Als Interpretationshilfe und Analysemöglichkeit komplexer Experimente stellt viSNE eine Alternative zur „klassischen“ FACS-Auswertung dar, indem einzelne Zellen in einem visuellen Bild ähnlich einem Streudiagramm (Scatter plot) dargestellt werden. Die Position der Zellen innerhalb des Bildes entsteht, indem alle paarweisen Abstände in hoher Dimension verwendet werden.

Die viSNE-Abbildungen dieser Arbeit (bh-SNE1/bh-SNE2) wurden mittels Standardstellungen (Barnes-Hut-Algorithmus, no_dims= 2, perplexity= 30.000000 und theta= 0.500000) des interaktiven Visualisierungswerkzeuges *CYT* (Dana Pe'er Lab of Computational Systems Biology, <http://www.c2b2.columbia.edu/danapeerlab/html/cyt-download.html>) in Matlab (9.0.0.341360) errechnet. Exportierte FSC 2.0-Dateien der zu

analysierenden Population (CD56⁺CD3⁻NKG2A⁻CD107a⁺ oder Perforin⁺ Zellen) wurden in CYT analysiert und ~10 000 oder 4881 Events je Spender in den viSNE-Analysen einbezogen. Alle Spender wurden in derselben viSNE-Analyse einbezogen und erlaubt somit einen direkten Vergleich folgender Parameter der beiden Spendergruppen: KIR2DL1/S5, KIR2DL1/S1, KIR2DL2/L3/S2, KIR2DS3/S4, KIR3DL1, KIR3DL2, Perforin und CD107a. Die Skala der X- und Y-Achse wurde eingestellt auf -40 zu 40 oder -50 zu 50; die Farbskala reicht von 0 (blau) bis 600 (rot).

5.3 Q-RT-PCR

5.3.1 Reagenzien und Equipment für die Q-RT-PCR

Reagenz/Produkt	Bezugsquelle
DNase I	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
KAPA SYBR FAST Biorad iCycler 2x qPCR Mastermix	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
NanoDrop 2000	Thermo Fischer Scientific GmbH, Ulm, Deutschland
PCR System GeneAmp 9700	Applied Biosystems Deutschland GmbH
PCR-Streifen mit 8 Gefäßen und Deckel	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Proteinase K	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Stockach, Deutschland
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen GmbH, Stockach, Deutschland
Real-Time PCR Detection System CFX96	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Stockach, Deutschland

5.3.2 Oligonukleotide

Zur Bestimmung des KIR-Genotyps wurden die entsprechenden Primersequenzen der Literatur (Vilches *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2009) entnommen. Aufgrund des KIR-Polymorphismus wurden zur Detektion aller KIR-Allele für manche KIRs zwei Primer im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Primer wurden von der Eurofins MWG GmbH (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Gen	Sequenz Forward 5'- 3'	Sequenz Reverse 3'- 5'
<i>KIR2DL1</i>	GTT GGT CAG ATG TCA TGT TTG AA	CCT GCC AGG TCT TGC G
<i>KIR2DL2</i>	AAA CCT TCT CTC TCA GCC CA	GCC CTG CAG AGA ACC TAC A
<i>KIR2DL3</i>	AGA CCC TCA GGA GGT GA	CAG GAG ACA ACT TTG GAT CA
<i>KIR2DL4</i>	TCA GGA CAA GCC CTT CTG C	GGA CAG GGA CCC CAT CTT TC
<i>KIR2DL5</i>	ATC TAT CCA GGG AGG GGA G	CAT AGG GTG AGT CAT GGA G
<i>KIR3DL1</i>	CCA TYG GTC CCA TGA TGC T TCC ATC GGT CCC ATG ATG TT	CCA CGA TGT CCA GGG GA
<i>KIR3DL2</i>	CAT GAA CGT AGG CTC CG	GAC CAC ACG CAG GGC AG
<i>KIR3DL3</i>	AAT GTT GGT CAG ATG TCA G	GCY GAC AAC TCA TAG GGT A
<i>KIR2DS1</i>	TCT CCA TCA GTC GCA TGA G TCT CCA TCA GTC GCA TGA A	GGT CAC TGG GAG CTG AC
<i>KIR2DS2</i>	TGC ACA GAG AGG GGA AGT A	CCC TGC AAG GTC TTG CA
<i>KIR2DS3</i>	CTT GTC CTG CAG CTC CT	GCA TCT GTA GGT TCC TCC T
<i>KIR2DS4</i>	GGT TCA GGC AGG AGA GAA T	CTG GAA TGT TCC GTK GAT G
<i>KIR2DS5</i>	AGA GAG GGG ACG TTT AAC C	CTG ATA GGG GGA GTG AGT
<i>KIR3DS1</i>	CAT CGG TTC CAT GAT GCG CAT CAG TTC CAT GAT GCG	CCA CGA TGT CCA GGG GA
<i>GalC</i> (Kontrolle 1)	TTA CCC AGA GCC CTA TCG TTC T	GTC TGC CCA TCA CCA CCT ATT
<i>Necdin</i> (Kontrolle 2)	GGC TGC ACC TGA GGC TAA	GCC CCA AAA GAA CTC GTA TTC

5.3.3 Versuchsdurchführungen-PCR

5.3.3.1 Isolation von DNA und RNA und reverse Transkription

Die Isolation von DNA bzw. RNA erfolgte mittels der Kits QIAamp DNA Mini Kit bzw. RNeasy Mini Kit gemäß der Herstellerangaben aus $3\text{-}5 \times 10^6$ Zellen. Die Bestimmung der isolierten DNA- und RNA-Konzentrationen erfolgte am NanoDrop 2000.

Für die reverse Transkription wurden $0,5 \mu\text{g}$ der isolierten RNA mittels des QuantiTect Reverse Transcription Kits nach Herstellerangaben inklusive einem 10-minütigen Inkubationsschritt zum Verdau genomischer DNA (gDNA) umgeschrieben. Für spätere Analysen wurden DNA und cDNA bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ und RNA bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

5.3.3.2 Protokoll zur Q-PCR und KIR-Genotypisierung

Für einen Reaktionsansatz wurden folgende Komponenten mit Nuklease-freiem Wasser zu einem Endvolumen von 10 µl zusammenpipettiert:

- 5 µl KAPA SYBR Fast QPCR Master Mix
- 1 µl KIR-Primer (je 0,5 µl Forward- und Reverse-Primer in der Endkonzentration von 0,25 µM bzw. 0,125 µM im Falle der Verwendung zweier Primer derselben Richtung (siehe 5.3.2))
- x µl Template cDNA (gemäß 25 ng RNA) oder 10 ng gDNA

Die RT-PCR erfolgte im Bio-Rad Real-time cycler CFX -96 unter folgenden Laufbedingungen:

- | | | |
|---------------------------|------------------|----------------|
| - Initiale Denaturierung: | 20 sec bei 95 °C | |
| - Denaturierung: | 3 sec bei 95 °C | } 32-40 Zyklen |
| - Primerhybridisierung: | 20 sec bei 64 °C | |

Eine Schmelzkurvenbestimmung der RT-PCR-Produkte zur Überprüfung der Produktspezifität erfolgte bei 76 °C bis 95 °C mit einem Temperaturanstieg von 0,1 °C pro Sekunde. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit DNase-freiem Wasser anstatt dem Template. Necdin und Galactosylceramidase (GalC) wurden als Positivkontrollen eingesetzt.

Die quantitative real-time PCR erlaubt die Analyse der KIR-Genexpression, wodurch sich jeweils der KIR-Status und somit der Haplotyp der NK-Zellspender bestimmen lässt (Alves *et al.*, 2009). Hierbei diente GalC als interne Kontrolle innerhalb der Ansätze. Die Analysen der Schmelzkurven erlaubt die Unterscheidung zwischen spezifisch vorhandenem KIR (Schmelzpunkt 81-88 °C) und der internen GalC-Kontrolle (Schmelzpunkt bei 75 °C). Bei der Produktspezifität von KIR2DL2 wurde darauf geachtet, dass der Schwellenwert-Zyklus (threshold cycle, C_t) ≤ 32 war (Oevermann *et al.*, 2014). Die Unterteilung des KIR-Genotyps anhand des B-content scores (0-4) entsprechend zentromerischer und telomerischer Genmotive erfolgte nach Vorgaben der Arbeitsgruppe um Cooley (Cooley *et al.*, 2010).

5.3.3.3 HLA-Typisierung

Die HLA-Typisierung erfolgte mittels direkter, hochauflösender (4-digit allele level/ high resolution) Sequenzierung der HLA-Gene (sequence based typing, SBT) gemäß der Erklärung von Helsinki der World Medical Association innerhalb des HLA-Labors unter der Leitung von Prof. Dr. Reinhild Klein (Universität Tübingen).

5.4 Statistiken

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism Version 6 (La Jolla California, USA). Zum Vergleich der ungepaarten Daten beider Haplogruppen wurde ein zweiseitiger Mann-Whitney Test durchgeführt.

6. Ergebnisse

6.1 Identifizierung und Charakterisierung von Haplotyp A und B Spendern sowie der L721.221**cw0602*-Targetzelllinie

Zur Feststellung, in wie weit aKIRs zur NK-Zell-Zytotoxizität beitragen, sollten zunächst gesunde NK-Zell-Spender hinsichtlich ihres KIR- und HLA-Status analysiert und selektiert werden. Da der aktivierende KIR2DS1 C2-Epitope erkennt, wurde in allen Analysen die B-LCL Transfektante L721.221**cw0602* als Zielzelle gewählt, da hier das C2-Epitop auf der Oberfläche präsentiert wird. Letztere sollte des Weiteren noch auf die Expression weiterer NK-Zell-Liganden untersucht werden.

6.1.1 Selektion HLA-C1/C2 heterozygoter KIR-Haplotyp A und B Spender

Der Mechanismus, bei welchem NK-Zellen eine Selbsttoleranz und ihre funktionale Kompetenz erwerben, wird als „Education“ bezeichnet (siehe 3.3.2). Unter Berücksichtigung der NK-Zell-Education wurden lediglich HLA-C1/C2 heterozygote Haplotyp A und B-Spender in den Analysen eingeschlossen (Tab. 4), da sich NK-Zellen mit KIR2DS1 nur in HLA-C2 homozygoten aber nicht heterozygoten Spendern hyporesponsiv verhalten (Fauriat *et al.*, 2010; Pittari *et al.*, 2013).

Tabelle 4: HLA-Typisierung der in dieser Arbeit verwendeten Haplotyp A und B Spender. Die Daten zeigen die hochauflösende (4-digit), Sequenz-basierte Typisierung und die sich daraus ergebenden KIR-Liganden (KIRL) der 6 Haplotyp A (obere Gruppe) und B Spender (untere Gruppe). Modifiziert nach Baltner *et al.*, 2017.

Spender	HLA-A Allele		KIRL		HLA-B Allele		Spezifität/KIRL		HLA-C Allele		KIRL	
SNK18U	23:01	34:02	Bw4	-	44:03	44:03	Bw4	Bw4	07:01	04:01	C1	C2
SNK24B	02:01	33:03	-	-	44:02	58:01	Bw4	Bw4	03:02	05:01	C1	C2
SNK49S	03:01	24:02	A3	Bw4	27:05	44:02	Bw4	Bw4	03:03	02:07	C1	C2
SNK65W	01:01	02:01	-	-	08:01	27:05	Bw6	Bw4	07:02	02:02	C1	C2
SNK86W	02:01	24:02	-	Bw4	15:01	35:02	Bw6	Bw6	03:04	04:01	C1	C2
SNK87J	26:01	68:01	-	-	08:01	13:02	Bw6	Bw4	07:02	06:02	C1	C2
SNK17K	02:01	02:01	-	-	18:01	44:02	Bw6	Bw4	07:01	05:01	C1	C2
SNK22B	01:01	26:01	-	-	08:01	45:01	Bw6	Bw6	07:01	06:02	C1	C2
SNK32R	01:01	03:01	-	A3	08:01	35:01	Bw6	Bw6	07:01	04:01	C1	C2
SNK33S	23:01	33:01	Bw4	-	14:02	50:01	Bw6	Bw6	08:02	06:02	C1	C2
SNK41K	01:01	02:01	-	-	44:05	55:01	Bw4	Bw6	03:03	02:02	C1	C2
SNK94B	01:01	02:01	-	-	44:02	58:01	Bw4	Bw4	07:01	05:01	C1	C2

Neben dem heterozygoten HLA-C-Status galt es, ausschließlich die KIR-Haplotyp B Spender miteinzubeziehen, welche geno- (Tab. 5) als auch phänotypisch (Abb. 9) KIR2DS1 exprimieren. Insgesamt erfüllten jeweils 6 Haplotyp A und B Spender diese Kriterien und wurden somit in Analysen innerhalb dieser Arbeit eingeschlossen. Während sich genotypisch innerhalb der Haplotyp A Spender erwartungsgemäß keine Variation der vorkommenden KIRs zeigt (siehe auch 3.4.1), unterscheiden sich die Haplotyp B Spender in ihrem KIR-Vorkommen: so besitzt SNK22B beispielsweise als einziger Spender KIR2DL2 und KIR2DS2 und dafür kein KIR3DS1 (Tab. 5).

Tabelle 5: KIR-Status der in dieser Arbeit verwendeten Haplotyp A (obere Gruppe) und Haplotyp B Spender (untere Gruppe). Die Unterteilung des KIR-Genotyps erfolgt anhand des B-content scores (0-4) entsprechend aus der Zahl der zentromerisch (Cen) oder telomerisch (Tel) gelegenen KIR-Genmotive. A/A = homozygoter Genotyp A, B/x = heterozygoter Genotyp B. ■ = anwesender KIR, □ = abwesender KIR. Modifiziert nach Baltner *et al.*, 2017.

Spender	B-content score	KIR-Genotyp	Cen	Tel	Inhibitorische KIRs						Aktivierende KIRs						
					2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	3DL1	3DL2	3DL3	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5
SNK18U	0	AA	AA	AA	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
SNK24B	0	AA	AA	AA	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
SNK49S	0	AA	AA	AA	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
SNK65W	0	AA	AA	AA	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
SNK86W	0	AA	AA	AA	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
SNK87J	0	AA	AA	AA	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
SNK17K	1	Bx	AA	AB	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
SNK22B	2	Bx	AB	AB	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
SNK32R	2	Bx	AB	BB	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
SNK33S	1	Bx	AA	AB	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
SNK41K	1	Bx	AA	AB	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
SNK94B	2	Bx	AA	AB	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

6.1.2 NKAES Haplotyp A und B Spender unterscheiden sich nicht in ihrer Expression verschiedener NK-Zellrezeptoren

Nach Auswahl der Haplotyp A und B Spender wurden die NK-Zellen aus PBMCs isoliert und zur Steigerung ihrer Anzahl sowie der Erhöhung ihres antileukämischen Effekts nach dem modifizierten GMP-Protokoll (Good Manufacturing Practice) zur Generierung expandierter und aktivierter NK-Zellen (NK cell activation and expansion system,

NKAES) der Arbeitsgruppe um Fujisaki unter Zuhilfenahme von K562-mbIL15-4-1BBL „Feeder-Zellen“ und IL-2 für 14 Tage expandiert (siehe 5.1.4.7). Zur phänotypischen Detektion weiterer für die Toxizität maßgeblich entscheidender NK-Zellrezeptoren wurden aufgetaute und über Nacht in IL-2 kultivierte NKAES der Haplotyp A und B Spender durchflusszytometrisch auf die Anwesenheit weiterer aktivierender und inhibitorischer NK-Zellrezeptoren analysiert und die jeweiligen Populationsgrößen miteinander verglichen (Abb. 6). Demnach ergaben sich zwischen Haplotyp A und B Spender keine signifikanten Expressionsunterschiede von CD16, CD25, CD69, NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D sowie NKG2A.

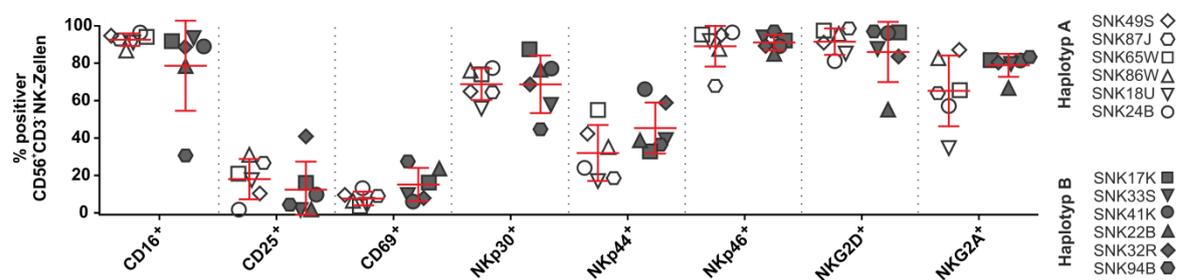


Abbildung 6: Haplotyp A und B Spender unterscheiden sich nicht in der Expression verschiedener NK-Zellrezeptoren. Dargestellt ist der durchflusszytometrisch bestimmte Rezeptorstatus von NKAES der Haplotyp A (Symbole ungefüllt) und B (Symbole gefüllt) Spender. Der prozentuale Anteil des NK-Zell-Subsets der entsprechenden aktivierenden Rezeptoren bzw. NKG2A ist dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung. Modifiziert nach Baltner *et al.*, 2017.

6.1.3 Auswahl der L721.221**cw0602*-Targetzelllinie und phänotypische Charakterisierung ihres NK-Zell-Ligandenrepertoires

Durchflusszytometrische Analysen zum Phänotypen der in dieser Arbeit verwendeten Targetzelllinie L721.221**cw0602* ergaben neben der zu erwartenden HLA-C2-Expression (HLA-ABC) noch weitere Expressionen wichtiger NK-Zellrezeptor-Liganden wie ICAM-1, NKG2D-L sowie HLA-E (siehe auch 3.3.2.1). Die Zelllinie zeigt jedoch phänotypisch keine Expression der DNAM-1-Liganden CD112 und CD155 (Abb. 7A). Die genotypische Überprüfung der Anwesenheit des B7-H6 (Ligand für NKp30) erfolgte mittels RT-PCR und lässt sich auf L721.221**cw0602*-Zellen nicht nachweisen (Abb. 7B).

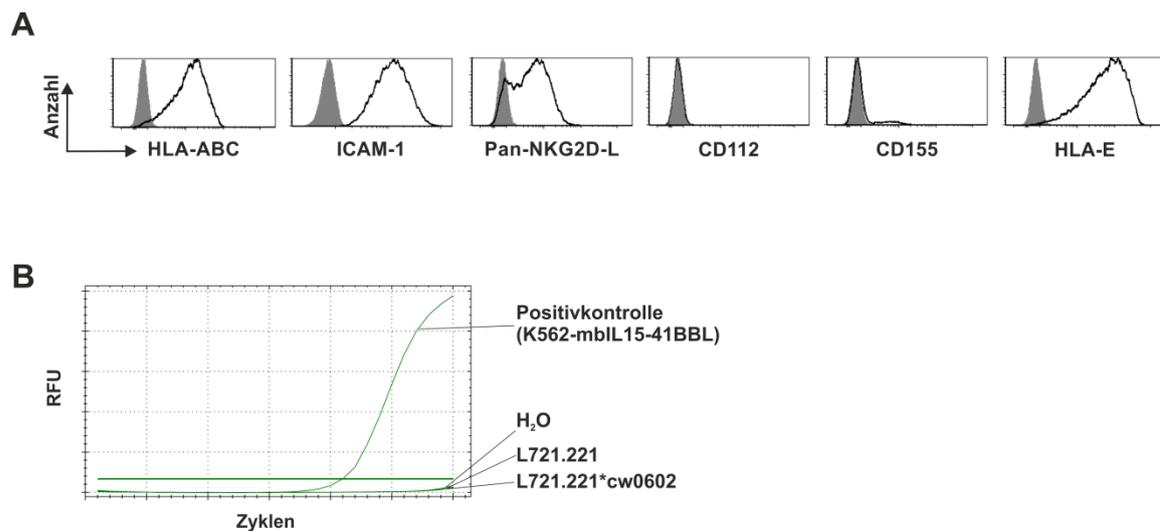


Abbildung 7: Phänotypische Charakterisierung des NK-Zell-Ligandenrepertoires der L721.221*cw0602-Targetzellen. A) Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von HLA-Klasse-I, ICAM-1, Pan-NKG2D-Liganden (NKG2D-L), DNAM-1-Liganden (CD112 und CD155) sowie HLA-E. Dargestellt sind die mit dem jeweiligen antigenspezifischen Antikörper gefärbten Proben (schwarzes Histogramm, ungefüllt) sowie die der jeweiligen Isotypkontrollen (graues Histogramm, gefüllt). Pan-NKG2D-L entspricht der Analyse der NKG2D-Liganden aus einem Cocktail bestehend aus den Antikörpern anti-MICA, anti-MICB und anti-ULBP1-3. **B) B7-H6 RT-PCR.** Genotypische Überprüfung der Anwesenheit des B7-H6-Liganden des NK-Zellrezeptors NKp30. Dargestellt sind die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) der Amplifikationskurven. Als Positivkontrolle diente hierbei die cDNA von K562-mbIL15-41BBL-Feederzellen. Modifiziert nach Baltner *et al.*, 2017.

6.2 Haplotyp A und B Spender unterscheiden sich nicht in ihrer zytotoxischen Aktivität *in vitro*

Um zu klären, ob Haplotyp B Spender im Gegensatz zu Haplotyp A Spender durch das Vorhandensein von aKIRs -insbesondere KIR2DS1- eine erhöhte NK-Zell-Zytotoxizität gegenüber den HLA-C2-präsentierenden L721.221-cw*0602-Targetzellen aufweisen, wurden die NKAES beider Spendergruppen in einem *in vitro* Zytotoxizitätstest funktionell getestet (siehe 5.2.4.5). Trotz aKIR-Expression, hier insbesondere KIR2DS1, zeigen Haplotyp B Spender ($59,13 \pm 17,56$ % im E:T-Verhältnis 3:1 bzw. $36,10 \pm 12,26$ % im E:T-Verhältnis 1:1) im Vergleich zu Haplotyp A Spender ($64,51 \pm 18,06$ % im Verhältnis 3:1 bzw. $40,84 \pm 14,54$ % im Verhältnis 1:1) keine erhöhte spezifische Lyse gegenüber L721.221-cw*0602-Targetzellen (Abb. 8).

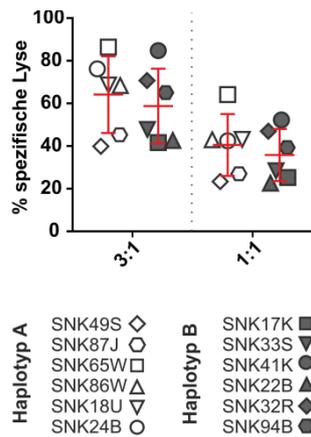


Abbildung 8: Haplotyp A und B Spender zeigen eine vergleichbare Zytotoxizität *in vitro*. Gezeigt ist die spezifische Lyse von NKAES 6 Haplotyp A (Symbole ungefüllt) und B Spender (Symbole gefüllt), welche paarweise in unabhängigen Zytotoxizitätstests gegen L721.221-cw*0602 im Verhältnis von 3:1 und 1:1 eingesetzt wurden. Jeder Spenderwert errechnete sich aus technischen Triplikaten; dargestellt sind jeweils auch der Mittelwert ± Standardabweichung innerhalb der Spendergruppen. Trotz der Anwesenheit von aKIRs in Haplotyp B Spender ergab die statistische Auswertung (zweiseitiger Mann-Whitney U-Test) keinen signifikanten Unterschied in der NK-Zell-vermittelten antileukämischen Aktivität. Modifiziert nach Baltner *et al.*, 2017.

6.3 Bestimmung des alloreaktiven NK-Zell-Subsets

Von alloreaktiven NK-Zellen spricht man, wenn die Spender-NK-Zellen einen iKIR für denjenigen Liganden besitzen, welcher auf den Leukämiezellen des Empfängers fehlt und zudem keine Expression von CD94/NKG2A aufweisen (siehe 3.5). Diese sind somit für die Lyse der Zielzellen verantwortlich, da ihre Bindung letztlich zur Aktivierung der NK-Zell-Zytotoxizität führt. Durch die Bestimmung des HLA- sowie KIR-Status lässt sich die NK-Zell-Alloreaktivität inklusive der Größe des alloreaktiven Subsets ermitteln. Tabelle 6 zeigt die Konstellation des KIR-KIRL-Repertoires der Haplotyp A und B Spender in Bezug auf L721.221*cw0602-Targetzellen. Da KIR3DL1 und KIR3DL2 nicht an HLA-C2 binden, werden die mit diesen Rezeptoren ausgestatteten NK-Zellen auch nicht inhibiert und sollten wie die Bindung von KIR2DS1 an C2 zur NK-Zell-Aktivierung führen (siehe auch 3.4.2): demnach setzt sich das alloreaktive Subset in Bezug auf die C2-Transfektante in allen Spendern aus NKG2A⁻KIR2DL1⁻KIR3DL1⁺ und/oder KIR3DL2⁺ und in Haplotyp B Spendern zusätzlich aus KIR2DS1⁺ NK-Zellen zusammen (Tab. 6, letzte Spalte). Da KIR2DL1 als inhibitorischer „Gegenspieler“ von KIR2DS1 ebenfalls direkt an HLA-C2 bindet und NK-Zellen, welche diesen iKIR tragen somit in ihrer Aktivität inhibiert würden, definiert sich das alloreaktive Subset in Bezug auf L721.221*cw0602-Targetzellen nicht nur als NKG2A-negativ sondern zwingend auch als KIR2DL1-negativ.

Tabelle 6: Konstellationen des KIR-KIRL-Repertoires der Haplotyp A und B Spender in Bezug auf L721.221cw0602*-Targetzellen.** Die NK-Zellspender wurden intern gekennzeichnet/ anonymisiert (SNK); entsprechend ihres HLA-Status bzw. ihres KIR-Genotyps und der daraus ermittelten KIR-Education, wurde das alloreaktive NK-Zell-Subset nach A. Moretta *et al.*, 1990 und L. Moretta *et al.*, 2011 bestimmt, welches die Zytotoxizität aufgrund des KIR-Liganden-Repertoires der L721.221**cw0602* Zielzellen vermittelt. Folgende KIRs wurden aus der Tabelle ausgeschlossen: KIR2DL4 (wird von allen Spendern exprimiert (siehe Tab. 5) und erkennt HLA-G), KIR3DS1 (gilt im klassischen Sinne nicht als alloreaktiver KIR) und KIR2DS4 (ist zum größten Teil ein löslicher Rezeptor, welcher das *cw*0602*-Allel nicht erkennt). Modifiziert nach Baltner *et al.*, 2017.

Haplotyp	Spender-ID	KIRL	Spender-Education der KIRs		voraussichtliches alloreaktives NK-Zell-Subset in Bezug auf L721.221- <i>cw*0602</i> (C2)**
			educated	nicht educated	
A	SNK18U	ABw4 Bw4/Bw4 C1/C2	2DL1, 2DL3, 3DL1	3DL2, 3DL3*	3DL1
	SNK24B	Bw4/Bw4 C1/C2	2DL1, 2DL3, 3DL1	3DL2, 3DL3*	3DL1
	SNK49S	A3 ABw4 Bw4/Bw4 C1/C2	2DL1, 2DL3, 3DL1, 3DL2	3DL3*	3DL1, 3DL2
	SNK65W	Bw6/Bw4 C1/C2	2DL1, 2DL3, 3DL1	3DL2, 3DL3*	3DL1
	SNK86W	ABw4 Bw6/Bw6 C1/C2	2DL1, 2DL3, 3DL1	3DL2, 3DL3*	3DL1
	SNK87J	Bw6/Bw4 C1/C2	2DL1, 2DL3, 3DL1	3DL2, 3DL3*	3DL1
B	SNK17K	Bw4/Bw6 C1/C2	2DL1, 2DL3, 3DL1, 2DS1	2DL5*, 3DL2, 3DL3*, 2DS3*	3DL1, 2DS1
	SNK22B	Bw6/Bw6 C1/C2	2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DS1	2DL5*, 3DL1, 3DL2, 3DL3*, 2DS2*, 2DS5*	3DL1, 2DS1
	SNK32R	A3 Bw6/Bw6 C1/C2	2DL1, 2DL3, 3DL2, 2DS1	2DL5*, 3DL3*, 2DS5*	3DL2, 2DS1
	SNK33S	ABw4 Bw6/Bw6 C1/C2	2DL1, 2DL3, 3DL1, 2DS1	3DL2, 3DL3*, 2DL5*, 2DS5*	3DL1, 2DS1
	SNK41K	Bw4/Bw6 C1/C2	2DL1, 2DL3, 3DL1, 2DS1	2DL5*, 3DL2, 3DL3*, 2DS5*	3DL1, 2DS1
	SNK94B	Bw4/Bw4 C1/C2	2DL1, 2DL3, 3DL1, 2DS1	2DL3*, 2DL5*, 3DL2, 3DL3*, 2DS5*	3DL1, 2DS1

* aufgrund fehlender Liganden als "nicht educated" eingeordnet (A. Moretta *et al.*, 1990; Pende *et al.*, 2009; L. Moretta *et al.*, 2011).

** C2 (*cw*0602*) wird nur direkt von KIR2DL1 und KIR2DS1 erkannt (Stewart *et al.*, 2005; Chewning *et al.*, 2007; Pende *et al.*, 2009; Chapel *et al.*, 2017). Die schwache Bindung durch KIR2DL2 und KIR2DL3 an das HLA-C2 *cw*0602*-Allel (Moesta *et al.*, 2008; Pende *et al.*, 2009; Schönberg *et al.*, 2011) wurde hierbei vernachlässigt.

Die Ermittlung des alloreaktiven NK-Zell-Subsets erfolgte in einer „double-fluorescence“ Analyse mittels hierfür konzipiertem Antikörper-Panel (siehe 5.2.3.4) in Verbindung mit einem CD107a-Degranulations-Assay und durch eine Kombination aus dem Hierarchischen Gating und dem sog. Boolean Gating (siehe 5.2.4.6). So konnte auf das Vorhandensein bzw. die Größe eines funktionellen alloreaktiven KIR2DS1-positiven Subsets und dessen Beitrag zur Zytotoxizität der Spender-NKAES in Bezug auf die L721.221**cw0602*-Targets geschlossen werden. In Abbildung 9 ist die exemplarische durchflusszytometrische Gating-Strategie zur Identifizierung des alloreaktiven Subsets dargestellt.

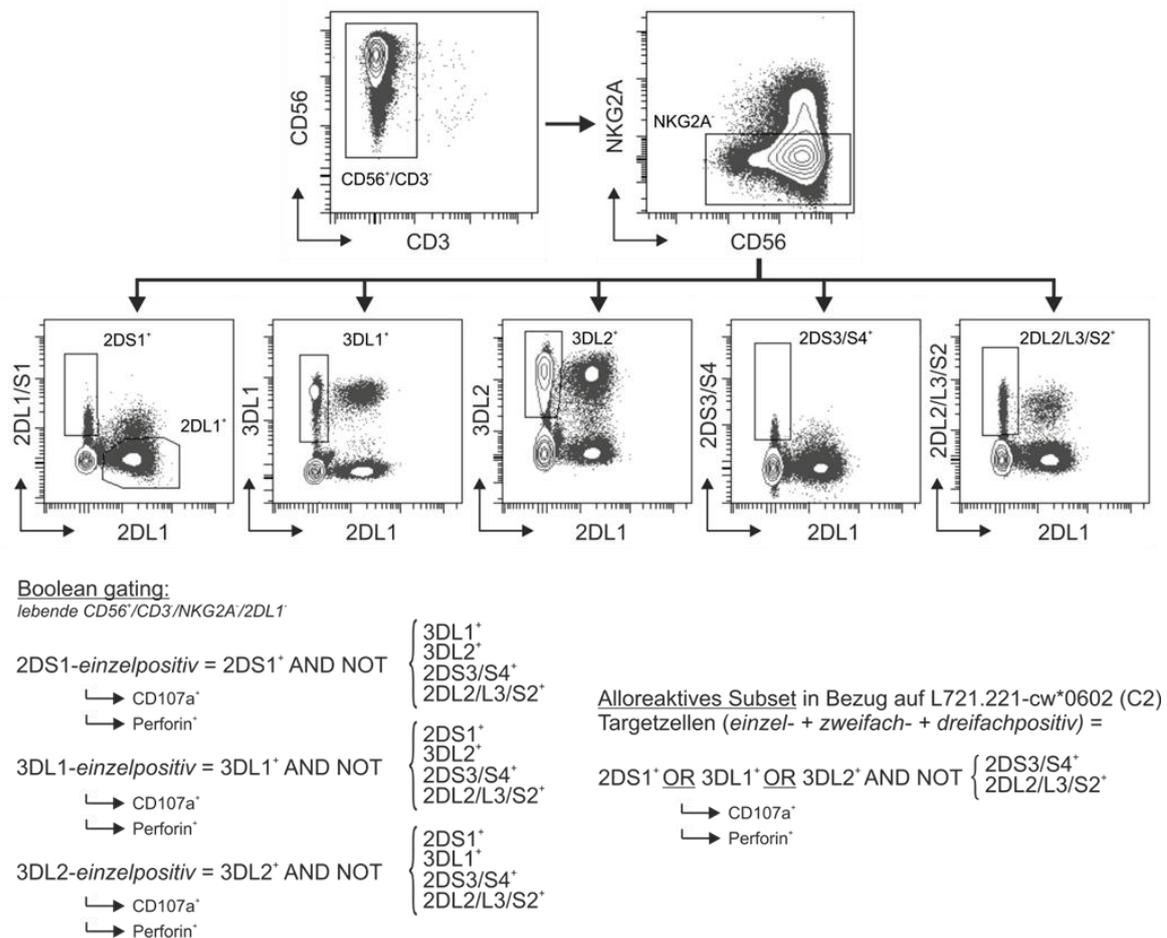


Abbildung 9: Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Gating-Strategie zur Identifizierung des alloreaktiven NK-Zell-Subsets (angelehnt an Pende *et al.*, 2009; Fauriat *et al.*, 2010). Die Färbung von CD94/NKG2A (#131411) und der anti-KIR mAbs KIR2DL1 (#143211), KIR2DL2/L3/S2 (GL183), KIR2DL1/S1 (EB6B), KIR2DS3/S4 (JJC11.6), KIR3DL1 (DX9) und KIR3DL2 (Q66) in Kombination mit CD107a (H4A3) und Perforin (dG9) in unterschiedlichen Fluorochromen ermöglicht die Bestimmung des alloreaktiven aKIR-Subsets im Kontext der C2-Targetzell-Erkennung. Exemplarisch werden die Daten eines Haplotyp B Spenders (SNK33S) gezeigt. Unter Verwendung des Boolean Gatings konnten alloreaktive NK-Zellen (in Abwesenheit von NKG2A und KIR2DL1) identifiziert werden, welche nur einen oder mehrere KIRs in Kombination exprimieren. Modifiziert nach Baltner *et al.*, 2017.

Ein grundlegendes Problem, welches sich auch in der KIR-Literatur zeigt, besteht in der Tatsache, dass die durchflusszytometrische Analyse von aktivierenden KIRs -inklusive KIR2DS1- bislang nur sehr eingeschränkt möglich ist. Das liegt daran, dass die kommerziell erhältlichen KIR-Antikörper hauptsächlich für iKIRs erhältlich sind und durch die hohe Sequenzhomologie nicht jeder einzelne KIR spezifisch detektiert werden kann. Mittels der bereits erwähnten „double-fluorescence“ Analyse (Moretta *et al.*, 2011; Pende *et al.*, 2009), in welcher der gleiche KIR mit zwei verschiedenen Antikörpern detektiert wird, kann durch die geschickte Kombination zweier Antikörper dann auf das Vorhandensein einer Population von NK-Zellen mit aktivierenden KIRs geschlossen werden, für die es keine Antikörper gibt. So war es in dieser Arbeit durch den Einsatz von anti-KIR2DL1 (#143211) und anti-KIR2DL1/S1 (EB6B) schließlich möglich, KIR2DL1⁻KIR2DS1⁺-NK-Zellen darzustellen (Abb. 9, untere Gating-Zeile, erstes Bild von links).

Die Verbindung der Darstellung einzelner KIRs mit einem CD107a-Degranulations-Assay (Alter *et al.*, 2004) und dem Sekretionsnachweis von Perforin nach Inkubation der NK-Zellen mit bestimmten Zielzellen erlaubt hier die Identifikation jener NK-Zell-Subsets, welche funktionell aktiv sind und somit für die Lyse der Zielzellen verantwortlich sein müssten. Unter Einbezug entsprechender anti-CD107a- und anti-Perforin-Antikörper gelang die funktionelle Untersuchung des alloreaktiven Subsets in Bezug auf L721.221**cw0602*-Targetzellen.

6.4 Die Größe des alloreaktiven NK-Zell-Subsets ist in Haplotyp A und B Spendern vergleichbar

Analysen zur alloreaktiven Subsetgröße der Haplotyp A und B Spender ergaben, dass Haplotyp B Spender ($16,11 \pm 7,1$ %) im Vergleich zu Haplotyp A Spendern ($16,76 \pm 7,2$ %) trotz der zusätzlichen KIR2DS1-Expression keinen signifikanten Unterschied in der Populationsgröße der KIR3DL1⁺, KIR3DL2⁺ und/oder KIR2DS1⁺ NKG2A⁻KIR2DL1⁻ (KIR2DL2/L3/S2⁻KIR2DS3/S4⁻)-NK-Zellen zeigen (Abb. 10A). Das alloreaktive Subset setzt sich hierbei nicht nur aus der Summe der KIR2DS1⁻, KIR3DL1⁻, und KIR3DL2⁻ Einzelpositiven, sondern auch aus allen Kombinationen dieser KIRs als doppel- und dreifachpositive NK-Zellen zusammen (siehe auch Abb. 9 Boolean Gating).

Betrachtet man die Populationsgröße der einzelpositiven alloreaktiven KIRs, so zeigt sich, dass das KIR2DS1-einzelpositive NKG2A⁻KIR2DL1⁻(KIR3DL1⁻KIR3DL2⁻KIR2DL2/L3/S2⁻KIR2DS3/S4⁻)-NK-Zellsubset der Haplotyp B Spender mit 1,41 % ($\pm 0,85$ %) sehr klein ausfällt (Abb. 10B). Die Größe der KIR3DL1- sowie KIR3DL2-

einzelpositiven Populationen der Haplotyp A ($4,22 \pm 3,32$ % KIR3DL1-Einzelpositive und $10,83 \pm 7,26$ % KIR3DL2-Einzelpositive) und B Spender ($2,64 \pm 2,49$ % KIR3DL1-Einzelpositive und $11,08 \pm 6,99$ % KIR3DL2-Einzelpositive) ist dabei vergleichbar und unterscheidet sich nicht signifikant. Die Größe der KIR2DS1⁺KIR3DL1⁻ bzw. KIR2DS1⁺KIR3DL2⁺-doppelpositiven NK-Zellpopulationen war vernachlässigbar (Mittelwert < 1 %; Daten nicht gezeigt).

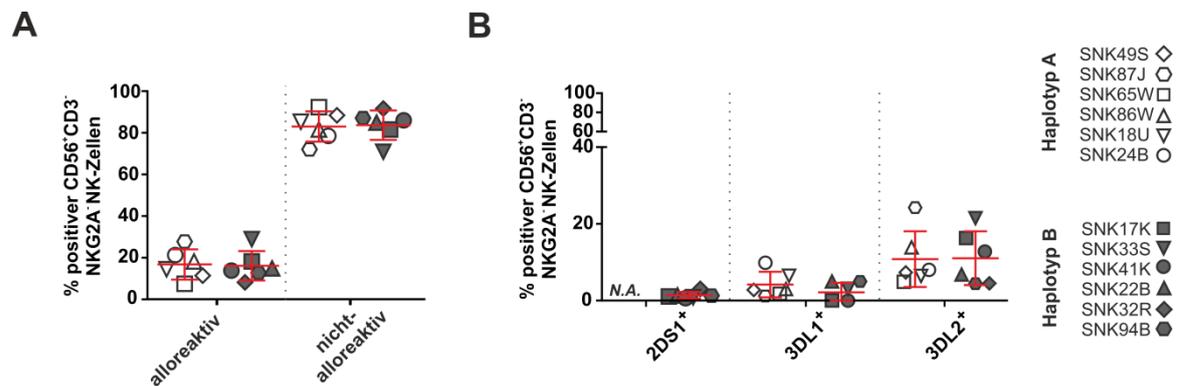


Abbildung 10: Die Größe des alloreaktiven Subsets ist in HLA-C1/C2 heterozygoten Haplotyp A und B Spendern vergleichbar. Gezeigt ist die Größe des alloreaktiven Subsets (A) sowie die Größe des 2DS1⁺, 3DL1⁺- oder 3DL1⁺-einzelpositiven NK-Zell-Subsets (B), inkl. des jeweiligen Mittelwerts \pm Standardabweichung nach Ermittlung durch „double-fluorescence“ Analysen (unter Ausschluss von NKG2A und KIR2DL1) der jeweiligen Spender-NKAES. Das fehlende Symbol (Raute gefüllt) des Spenders SNK32R für KIR3DL1 erklärt sich aus seiner fehlenden KIR3DL1-Expression (siehe auch Tab. 5). N.A. nicht anwendbar. Die statistische Auswertung (zweiseitiger Mann-Whitney U-Test) ergab keine signifikanten Unterschiede in der Größe des alloreaktiven Subsets. Modifiziert nach Baltner *et al.*, 2017.

6.5 viSNE-Analysen zeigen ein ähnliches Clustering von CD107a⁺NKG2A⁻ und Perforin⁺NKG2A⁻-NK-Zellen der Haplotyp A und B Spender

Um den relativen Beitrag der KIR2DS1-Expression zur Gesamt-NK-Funktionalität darzustellen, wurden aus den durchflusszytometrischen Daten auch viSNE-Analysen durchgeführt (siehe 5.2.4.8). Dabei stellt viSNE eine Alternative zur „klassischen“ FACS-Auswertung dar und ermöglicht eine visuelle Darstellung der einzelnen Parameter/Antikörper. Indem alle 12 Spender in derselben Analyse eingeschlossen wurden, ergibt sich durch das Verrechnen der eingeschlossenen Parameter ein ähnliches Muster, welches nun einen direkten Vergleich zwischen den Spendergruppen ermöglicht (Abb. 11A). Hierzu wurde auf das CD107a⁺NKG2A⁻- und auf das Perforin⁺NKG2A⁻-NK-Zell-Subset gegatet. Die einzelnen KIR-Parameter innerhalb des sich ähnelndem Muster, welche CD107a⁻ (Abb. 11B) bzw. Perforin-positiv (Abb. 11C) sind, werden als gelblich bis rötliche Cluster aufgezeigt.

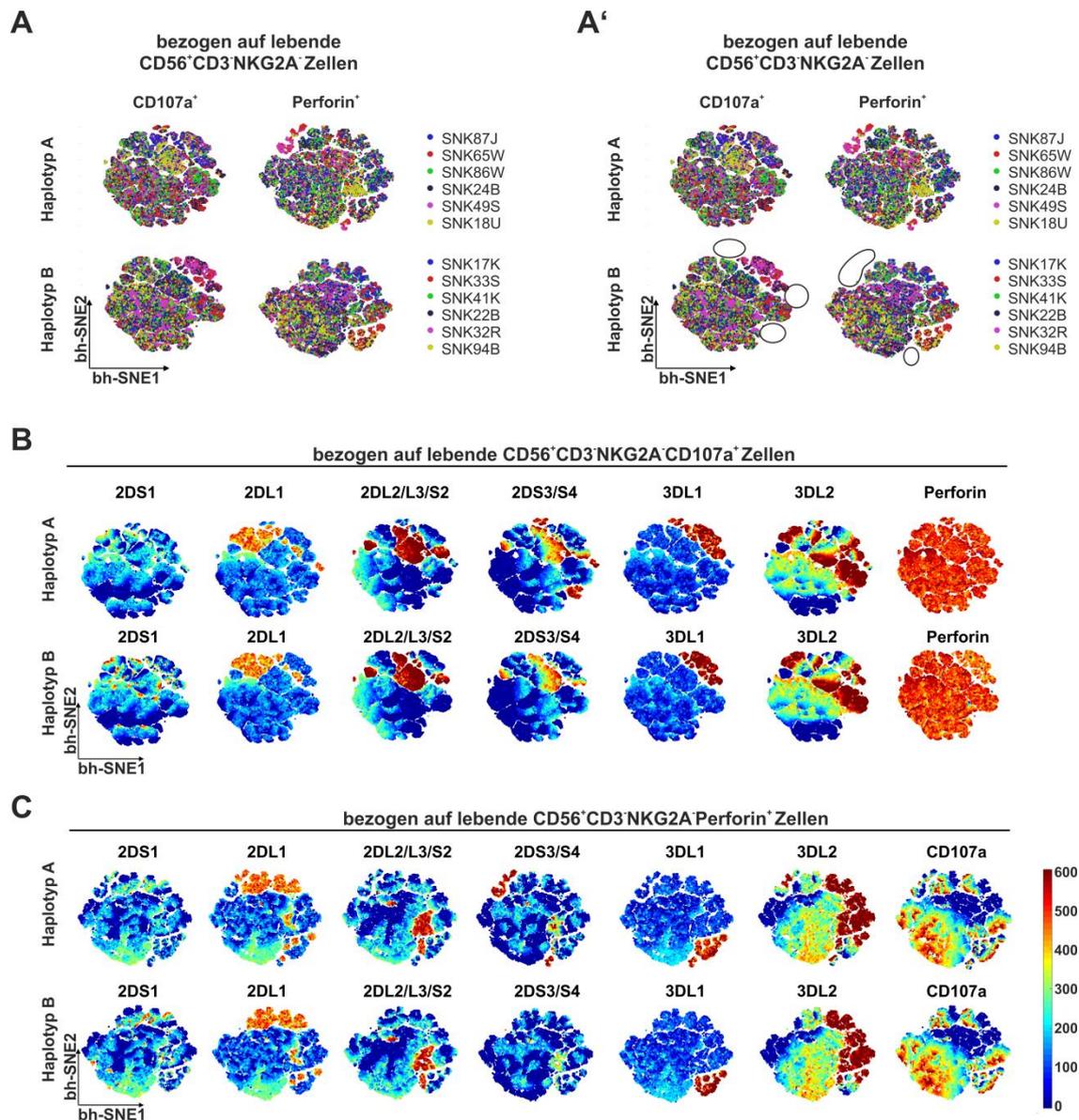


Abbildung 11: viSNE-Analysen zeigen ein ähnliches Clustering von CD107a⁺NKG2A⁻- und Perforin⁺NKG2A⁻-NK-Zellen der Haplotyp A und B Spender. Dargestellt sind viSNE Abbildungen (bh-SNE1/bh-SNE2) der 6 Haplotyp A (obere Reihe) und B Spender (untere Reihe). In der dritten Dimension (Farbskala) ist die relative Expression des entsprechenden Antigens gezeigt. **A)** Identifizierung jedes Spenders durch individuelle Farbcodierung. **A')** Identifizierung fehlender „Inseln“ im Muster der Haplotyp B Spender. **B, C)** viSNE Analysen CD107a-positiver (**B**) und Perforin-positiver (**C**) NK-Zellen nach Ko-Kultur mit L721.221-cw*0602-Zellen. Im Vergleich zu Haplotyp A Spender exprimieren Haplotyp B Spender ein kleines KIR2DS1⁺NKG2A⁻-NK-Zell-Subset, welches deutlich CD107a- und Perforin-positiv ist. Modifiziert nach Baltner *et al.*, 2017.

Vergleicht man jeweils das Muster von Haplotyp A und B Spender, welches sich aus der gegateten CD107a- bzw. Perforin-positiven Population ergibt, so fällt auf, dass es nicht völlig identisch ist, sondern bei dem der Haplotyp B Spender ganze „Inseln“ fehlen (im CD107a-Muster fehlt jeweils eine Insel auf 12, 3 und 5 Uhr; im Perforin-Muster auf 6 und 11 Uhr; Abb. A'). Vergleicht man diese Inseln nun mit denen des Musters der jeweiligen darüber liegenden Haplotyp A-Zeile, so gehören alle fehlenden CD107a- bzw. Perforin-

positiven Inseln der Haplotyp B Spender zum KIR2DS3/S4-positiven Cluster bzw. die Zellen sind z.T. auch KIR2DL1-, KIR3DL1 und KIR3DL2-mehrfach positiv (Abb. 11B, C). Ferner stammen diese CD107a- und KIR2DS3/S4-positiven Zellen überwiegend von den Haplotyp A Spendern SNK65W (rot), SNK18U (gelb) und SNK24B (blau), während die Perforin- und KIR2DS3/S4-positiven Zellen überwiegend die Inseln der Haplotyp A Spender SNK65W (rot), SNK18U (gelb) und SNK49S (magenta) bilden (Abb. 11A). Grundsätzlich kann festgestellt werden, dass alle KIRs bei beiden Spendergruppen ähnlich clustern und sich die roten KIR-positiven Bereiche bei Haplotyp A und B in Größe sowie dem Bereich innerhalb des Musters ähneln. Eine Ausnahme stellt KIR2DS1 dar, welches sich erwartungsgemäß nur im Muster der Haplotyp B Spender als vereinzelt kleineres Cluster vorfinden lässt. Dadurch, dass die über das ganze Muster verstreuten KIR2DS1-Cluster innerhalb der Haplotyp B Spender z.T. deckungsgleich mit den Positionen der anderen KIRs sind, lässt sich auch feststellen, dass es mehrere funktionelle KIR2DS1-positive NK-Zell-Subsets gibt.

6.6 Die Expression von KIR2DS1 trägt nicht signifikant zur Gesamt-NK-Zell-Zytotoxizität HLA-C1/C2 heterozygoter Haplotyp B Spender bei

Funktionelle Untersuchungen der NK-Zellantwort des alloreaktiven Subsets in Bezug auf L721.221**cw0602*-Stimulation belegen, dass das kleine KIR2DS1-einzelpositive NK-Zell-Subset im hohen Maße degranuliert bzw. positiv für CD107a ($41,4 \pm 16,74$ %) und ebenso für Perforin ($\Delta -40,25 \pm 23,13$ %) ist (Abb. 12A). Somit zeigen KIR2DS1-einzelpositive NK-Zellen innerhalb der Haplotyp B Spender funktionell die größte L721.221**cw0602*-bedingte NK-Zellantwort im Vergleich zu jenen Zellen, welche die beiden anderen alloreaktiven KIRs KIR3DL1 ($19,34 \pm 18,63$ % bzw. $\Delta -41,96 \pm 12,14$ %) oder KIR3DL2 ($27,67 \pm 17,37$ % bzw. $\Delta -37,68 \pm 17,61$ %) exprimieren. Hier unterscheidet sich die funktionelle Antwort zwischen Haplotyp A und B Spendern sowohl bei der Degranulation ($35,97 \pm 13,04$ % KIR3DL1⁺-einzelpositive-CD107a⁺ bzw. $28,92 \pm 13,26$ % KIR3DL2⁺-einzelpositive-CD107a⁺) als auch bei der Perforin-Sekretion ($\Delta -30,53 \pm 17,16$ % KIR3DL1⁺-einzelpositive-Perforin⁺ bzw. $\Delta -32,81 \pm 17,64$ % KIR3DL2⁺-einzelpositive-Perforin⁺) nicht signifikant.

Nach funktioneller Analyse des gesamten alloreaktiven NK-Zell-Subsets (KIR3DL1⁺, KIR3DL2⁺ und/oder KIR2DS1⁺ NKG2A⁺KIR2DL1⁻(KIR2DL2/L3/S2⁻KIR2DS3/S4⁻)) der Haplotyp A und B Spender, lässt sich trotz KIR2DS1-Expression der B Spender kein Unterschied in der Degranulation (Haplotyp A vers. B: $34,32 \pm 11,96$ % vers. $34,58 \pm 14,05$ %) oder Perforin-Sekretion feststellen (Haplotyp A vers. B: $\Delta -30,99 \pm 18,03$ % vers. $\Delta -36,98 \pm 17,74$ %) (Abb. 12B).

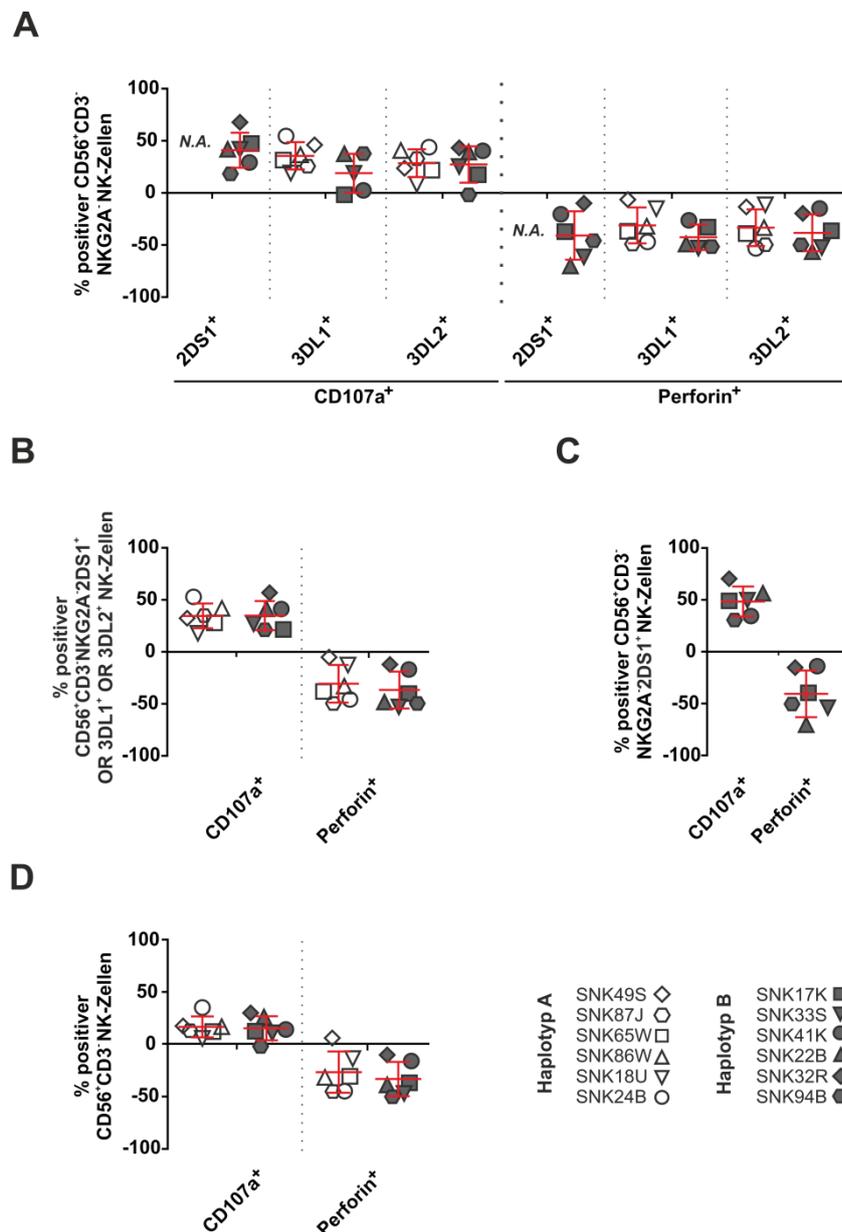


Abbildung 12: Das alloreaktive KIR2DS1⁺NKG2A⁻KIR2DL1⁻ NK-Zell-Subset in HLA-C1/C2 Spender ist funktionell höchst responsiv aber quantitativ zu klein um zur Gesamt-Zytotoxizität beizutragen. Gezeigt ist die mittels funktioneller „double-fluorescence“ Subsetanalyse ermittelte CD107a- oder Perforin-Expression unterschiedlicher NKAES-Zellpopulationen Haplotyp A (Symbole ungefüllt) und B (Symbole gefüllt) Spender nach Ko-Kultur mit L721.221**cw0602* Targetzellen inkl. des jeweiligen Mittelwerts ± Standardabweichung. Die hier dargestellten Werte wurden entsprechend auf separat nur in Medium kultivierten NK-Zellen (Baseline-Level) normiert, sodass die Degranulation mit einer Abnahme des Perforin-Gehaltes einhergeht. N.A. nicht anwendbar. **A)** Die Frequenzen der CD107a- oder Perforin-exprimierenden einzelpositiven 2DS1⁺-, 3DL1⁺- oder 3DL2⁺-NKG2A⁻KIR2DL1⁻-NK-Zellpopulationen. Das 2DS1⁺-einzelpositive NK-Zell-Subset ist zum großen Teil CD107a-positiv bzw. sekretiert Perforin. **B)** Die Größe des CD107a- oder Perforin-exprimierenden gesamten alloreaktiven NK-Zell-Subsets und **(C)** des alloreaktiven KIR2DS1⁺(NKG2A⁻KIR2DL1⁻)-Subsets der Haplotyp B Spender, welches neben KIR2DS1 auch andere KIRs exprimieren kann. **D)** Die Größe der CD107a- oder Perforin-exprimierenden CD56⁺CD3⁻-Gesamt-NK-Zellpopulation. Die statistische Auswertung (zweiseitiger Mann-Whitney U-Test) ergab trotz der hohen CD107a-Expression des alloreaktiven 2DS1-positiven Subsets, keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtdegranulation und Perforin-Synthese zwischen Haplotyp A und B Spender. Modifiziert nach Baltner *et al.*, 2017.

Auch wenn die alloreaktive KIR2DS1-exprimierende NK-Zellpopulation der Haplotyp B Spender (Abb. 12C), welche neben KIR2DS1 auch noch andere KIRs exprimieren kann (KIR2DS1⁺NKG2A⁻KIR2DL1⁻(„xKIR⁺“)), sogar in Bezug auf L721.221*cw0602-Targetzellen noch funktioneller (34,58 ± 14,05 % CD107a⁺ bzw. Δ -36,98 ± 17,74 % Perforin⁺) zu sein scheint als die Gesamtheit des alloreaktiven NK-Zell-Subsets (KIR3DL1⁺, KIR3DL2⁺ und/oder KIR2DS1⁺ NKG2A⁻KIR2DL1⁻(KIR2DL2/L3/S2⁻KIR2DS3/S4⁻); 48,43 ± 14,57 % CD107a⁺ bzw. Δ -40,61 ± 22,46 % Perforin⁺) (Abb. 12B), spiegelt sich dies (ähnlich der Daten des *in vitro* Zytotoxizitätstests, Abb. 8) nicht in einer signifikanten Erhöhung der NK-Zell-Funktionalität im Vergleich zu Haplotyp A Spendern wieder (CD107a⁺ und Perforin⁺ Haplotyp A vers. B: 16,30 ± 10,00 % und Δ -27,05 ± 19,75 % vers. 14,85 ± 11,49 % und Δ -33,60 ± 16,43 %) (Abb. 12D).

6.7 Haplotyp A und B Spender unterscheiden sich nicht in der Sekretion zytolytischer Proteine nach L721.221*cw0602-Stimulation

NK-Zellen lysieren Zielzellen durch die gerichtete Freisetzung zytoplasmatischer Granula ähnlich sekretorischer Lysosome, welche lytische Proteine wie Perforin, Granulysin und Granzyme enthalten (siehe auch 3.3.1). Mit Hilfe des LEGENDplex-Assays ist es möglich, Zellüberstände von NKAES Haplotyp A und B Spender nach L721.221*cw0602-Target-Ko-Kultur quantitativ auf diese zytolytischen Proteine und IFN-γ zu untersuchen (siehe 5.2.4.7). Abbildung 13 zeigt die Auswertung der durchflusszytometrisch ermittelten Konzentrationen von IFN-γ, Granzym A und B, Perforin und Granulysin als Balkendiagramm (Abb. 13A) und zur Visualisierung der einzelnen Spenderwerte auch als Heatmap (Abb. 13B) veranschaulicht. Wie bereits die Daten der Subsetanalysen darlegen, unterscheiden sich die NKAES der Haplotyp A und B Spender in Bezug auf die Target-Stimulation auch nicht in der Freisetzung von IFN-γ und der zytolytischer Proteine nicht signifikant. Dabei fanden sich in den Überständen beider Spendergruppen vernachlässigbare Konzentrationen an IFN-γ aber sehr hohe Konzentrationen von Granzym A und Granulysin (Abb. 13A).

Betrachtet man die Heatmap, welche steigende Konzentrationen einzelner Spender hier als Farbskala von grün (wenig) über gelb (mäßig) bis rot (viel) aufzeigt, lässt sich feststellen, dass die Spendervarianz innerhalb der Haplotypen vergleichbar ist: So sekretieren beispielsweise SNK65W und SNK86W (Haplotyp A Spender) und SNK17K und SNK32R (Haplotyp B Spender) in beiden Gruppen sehr viel Granzym A und Granulysin.

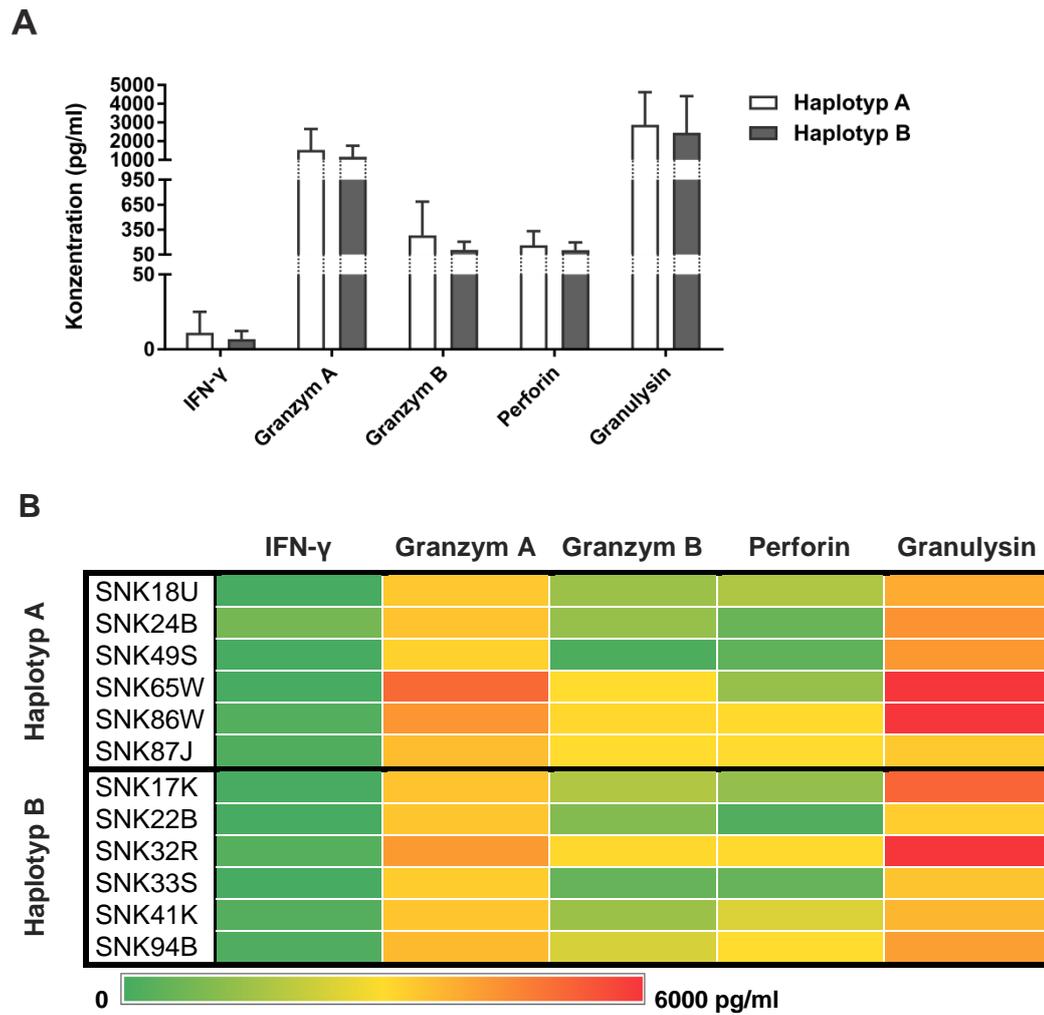


Abbildung 13: Haplotyp A und B Spender unterscheiden sich nicht in der Sekretion zytolytischer Proteine nach Ko-Kultur mit L721.221cw0602*-Targetzellen.** Gezeigt sind die im Zellüberstand gemessenen Konzentrationen (pg/ml) an IFN- γ , Granzym A und B, Perforin und Granulysin von NKAES Haplotyp A und B Spender nach 18 h Ko-Kultur mit L721.221**cw0602*-Targetzellen im Effektor:Target-Verhältnis von 1:3. **A)** Darstellung der LEGENDplex-Daten als Mittelwerte inkl. Standardabweichung im Balkendiagramm bzw. **(B)** als Heatmap (von 0 (grün) bis 6000 pg/ml (rot)). Die statistische Auswertung (zweiseitiger Mann-Whitney U-Test) ergab keine signifikanten Unterschiede in der Sekretion zytolytischer Proteine und IFN- γ .

7. Diskussion

7.1 Der Einfluss von KIR2DS1 bei der HSZT

Nachdem erste Erkenntnisse die Bedeutung der iKIRs für den Ausgang der HSZT darlegten, konzentrierten sich spätere Studien auch auf den Einfluss der aKIRs. Die Diversität der KIR-Genfamilie und der Einfluss des KIR/KIRL-mismatch auf den Ausgang der HSZT wurden dabei vielfach untersucht. Zweifellos existieren fundierte epidemiologische Belege aus großen Kohortenstudien zur idealen Spenderauswahl bei der Behandlung von Leukämie, nach denen Spender mit aKIR-Expression zu einem verbesserten Ausgang nach HSZT beitragen (Cooley *et al.*, 2009; Cooley *et al.*, 2010; Venstrom *et al.*, 2012; Oevermann *et al.*, 2014). Die Gruppe um Venstrom konnte beispielsweise zeigen, dass AML-Patienten, welche mit hämatopoetischen Stammzellen von Spendern mit alloreaktiven, KIR2DS1-positiven NK-Zellen transplantiert wurden, eine niedrigere Rückfallquote im Vergleich zu KIR2DS1-negativen Spendern aufweisen (Venstrom *et al.*, 2012). Ähnlich berichteten beispielsweise Mancusi und Kollegen, dass Transplantationen von Spender mit KIR2DS1 und/oder KIR3DS1 zu reduzierter Rezidivfreier Mortalität und verbessertem Überleben führen (Mancusi *et al.*, 2015). Ebenso assoziierte die Gruppe um Demanet die Anwesenheit von KIR2DS1 auf Spender-Zellen mit einer signifikant verringerten Rezidivquote für Empfänger nach Transplantation (Verheyden *et al.*, 2005). Zusammen mit *KIR2DS1* werden auch die KIR-Gene *KIR2DL5A* und *KIR3DS1* innerhalb der Haplotyp B Spender mit einem verbesserten Überleben von AML-Patienten assoziiert (Stringaris *et al.*, 2010).

Allerdings finden sich auch gegenteilige Studien, in denen die Expression der aKIRs vernachlässigbar oder sogar nachteilig zu sein scheint (Kröger *et al.*, 2006; H. J. Kim *et al.*, 2007; McQueen *et al.*, 2007; Giebel *et al.*, 2009; Nowak *et al.*, 2015). Kröger *et al.* untersuchten beispielsweise KIR-Haplotypen AML-erkrankter Patienten nach T-Zell-depletierter nicht-verwandter HSZT. Dabei konnten sie beobachten, dass nur jene Patienten, welche Transplantate von Haplotyp A Spendern bzw. nur wenige aKIR-Gene trugen, ein verbessertes Krankheits- und Rezidiv-freies Überleben zeigten (Kröger *et al.*, 2006). Der Einfluss des KIR-Genotyps von Spender und Empfänger und der Ausgang nach HSZT unter HLA-übereinstimmenden Geschwistern wurden von der Arbeitsgruppe um McQueen untersucht. Hier wurde eine höhere Überlebenschance für KIR-B-Empfänger assoziiert, welche Transplantate von KIR-A-Spendern erhielten. Umgekehrt konnte bei der Kombination aus KIR-Haplotyp B Spendern an Haplotyp A Empfänger ein

erhöhtes Rezidiv und akute GvHD ohne GvL-Effekt verzeichnet werden (McQueen *et al.*, 2007).

Daten von pädiatrischen ALL-Patienten zeigten, dass KIR2DS1 bei der Lyse von C2/C2-Blasten nach KIR-KIRL-mismatched haplo-HSZT beteiligt ist (Pende *et al.*, 2009). In diesen Patienten konnten also die sich entwickelten alloreaktiven, KIR2DS1-positiven NK-Zellen eine Zytotoxizität vermitteln. Dies weist auch darauf hin, dass die Education dieser NK-Zellen nicht durch die Empfänger-Mikroumgebung erfolgt haben muss, da nach Ergebnissen von der Arbeitsgruppe um Fauriat festgestellt wurde, dass sich KIR2DS1-positive NK-Zellen via Education hyporesponsiv verhalten, wenn sie ausschließlich aus einer HLA-C2-Umgebung stammen (Fauriat *et al.*, 2010). Unterstützend hierzu liefern Daten einer weiteren Arbeit, welche besagt, dass die Education von NK-Zellen von den Liganden der Spender und nicht von denen der Empfänger abhängig ist; zudem soll diese für einige Jahre stabil bleiben (Haas *et al.*, 2011). Die Tatsache, dass diese KIR2DS1-positiven NK-Zellen die Spender-Education aufwiesen, kann durch die große Menge der verabreichten Stammzellen erklärt werden (A. Moretta *et al.*, 2008; L. Moretta *et al.*, 2011; Vivier *et al.*, 2011).

Bei der Haplo-HSZT spielt allerdings zur optimalen Spenderauswahl auch die Information über die Größe der alloreaktiven NK-Zell-Population und die Beurteilung seiner Zytotoxizität gegenüber Blasten eine entscheidende Rolle (Pende *et al.*, 2005; Pende *et al.*, 2009). Die Größe des alloreaktiven Subsets schwankt dabei Spenderabhängig zwischen 1-50 % (Ljunggren und Malmberg, 2007), was die Wichtigkeit ihrer Bestimmung deutlich macht, da nur solche Spender gewählt werden sollten, welche über das größte und somit effektivste Subset verfügen (Chewning *et al.*, 2007; Pende *et al.*, 2009).

7.1.1 Die Expression von KIR2DS1 trägt nicht signifikant zur NK-Zell-Zytotoxizität HLA-C1/C2 heterozygoter Haplotyp B Spender bei

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Untersuchung der aKIR-Expression bzw. die Bestimmung der Größe des alloreaktiven Subsets -insbesondere von KIR2DS1- und die Auswirkungen in Bezug auf die Lyse von L721.221*cw0602-Targetzellen; einer EBV-transformierten B-LCL, welche HLA-C2 auf der Oberfläche präsentiert. Hierzu erfolgte die Identifikation HLA-C1/C2 heterozygoter KIR-Haplotyp A und B Spender, ihre *in vitro* Expansion und Aktivierung zu NKAES sowie schließlich die funktionelle Untersuchung

zur Beantwortung der Frage, ob „mehr“ (KIRs) wirklich „besser“ ist. Aus der Literatur war bereits bekannt, dass KIR2DS1 bei der NK-Zell-vermittelten Lyse EBV-transformierter Zelllinien involviert ist (A. Moretta *et al.*, 1995; Stewart *et al.*, 2005; Cheuning *et al.*, 2007; Foley *et al.*, 2008).

Epstein-Barr-Virus (EBV) transformierte, humane B-lymphoblastoide Zelllinien werden alternativ für Bindungsstudien und der Evaluierung der NK-Zellzytotoxizität zu Patienten-Blasten eingesetzt (Cheuning *et al.*, 2007; Pende *et al.*, 2009; Schönberg *et al.*, 2011; Sivori *et al.*, 2011; Chapel *et al.*, 2017). Da wie bereits erwähnt u.a. von der Arbeitsgruppe um Fauriat schon bekannt war, dass KIR2DS1⁺-NK-Zellen sich aus HLA-C1/C2 heterozygoten Spendern (im Gegensatz von Zellen aus einem HLA-C2-homozygoten Background) nicht hyporesponsiv verhalten (Fauriat *et al.*, 2010), wurden nur solche Spender in Analysen zu dieser Arbeit eingeschlossen.

Funktionelle Unterschiede zwischen NKAES Haplotyp A und B Spender mittels *in vitro* Zytotoxizitätstests konnten trotz geno- als auch phänotypischer Anwesenheit von KIR2DS1, welcher als aKIR direkt an das HLA-C2-Epitop bindet, nicht festgestellt werden; die Zytotoxizität zwischen den Spendergruppen in Bezug auf L721.221*cw0602-Targetzellen war vergleichbar (Abb. 8). Eine quantitative Bestimmung sekretierter zytolytischer Proteine wie Granzym A und B, Perforin oder Granulysin der Spender nach Targetstimulation war ebenfalls ohne signifikanten Unterschied (Abb. 13). Auch wenn noch nicht alle Liganden von aKIRs identifiziert werden konnten, so liegt im Falle von KIR2DS1 eine direkte Bindung an C2 vor, sodass eine erhöhte Zytotoxizität der Haplotyp B Spender schon zu erwarten gewesen wäre, zumal auch gezeigt werden konnte, dass sich die aus der KIR2DS1-C2-Interaktion resultierenden aktivierenden Signale nicht nur über die der CD94/NKG2A- (bindet an HLA-E, welcher ebenfalls von den Targetzellen präsentiert wird, Abb. 7A), sondern auch über die der HLA-C2-Erkennung durch KIR2DL2/L3 bedingten inhibitorischen Signale hinwegsetzen (Pende *et al.*, 2009). Da KIR2DS1 C2 mit einer sehr viel schwächeren Affinität bindet als sein inhibitorischer Gegenspieler KIR2DL1 (Stewart *et al.*, 2005), ist anzunehmen, dass die ähnliche Zytotoxizität der beiden Spendergruppen mit einer Maskierung der aktivierenden KIR2DS1-Signale durch KIR2DL1 einhergeht. Natürlich wäre auch denkbar, dass die NKAES der Haplotyp A Spender vergleichsweise ein größeres NK-Zell-Rezeptorrepertoire aufweisen; dem ist aber nicht so (Abb. 6): Haplotyp A und B Spender unterscheiden sich nicht in ihrer Expression wichtiger aktivierender Rezeptoren wie beispielsweise CD16, den NCRs (NKp30, NKp44 und NKp46) oder NKG2D.

Durch Mehrfarben-FACS und der gleichzeitigen Kombination monoklonaler Antikörper (mAbs) für denselben KIR, lässt sich die Größe des alloreaktiven NK-Zell-Subsets entsprechend des HLA-Status, KIR-Genotyps und der daraus ermittelten KIR-Education ermitteln, welches sich bei diesen Spendern in Bezug auf die C2-Transfektante aus den KIRs KIR3DL1, KIR3DL2 und/oder KIR2DS1 mit Ausschluss von KIR2DL1 und CD94/NKG2A zusammensetzt (Tab. 6, Abb. 9). Durch erhebliche Fortschritte in der Generierung von mAbs, welche eine Unterscheidung zwischen Sequenzhomologen iKIR und aKIR ermöglichen (David *et al.*, 2009; Pende *et al.*, 2009; Czaja *et al.*, 2014), gelang auch hier die Abgrenzung der KIR2DS1-positiven von der KIR2DL1-positiven NK-Zellpopulation (Abb. 9). Hiermit ließen sich im Gegensatz zum Zytotoxizitätstest durch den Einsatz eines CD107a-Degranulations-Assays (inklusive der intrazellulären Färbung von Perforin) und dem Hierarchischen- bzw. Boolean-Gating einzelne funktionelle Subsets in Bezug auf L721.221**cw0602*-Targets darstellen. Die Größe des alloreaktiven Subsets unterscheidet sich zwischen den Haplotypen trotz der zusätzlichen KIR2DS1-Expression der Haplotyp B Spender und der möglichen Kombinationen doppel- und dreifachpositiver KIR3DL1-, KIR3DL2 und/oder KIR2DS1-Zellen nicht (Abb. 10A); eine Darstellung der KIR3DL1-, KIR3DL2 und KIR2DS1-einzelpositiven Populationsgrößen legt offen, dass das alloreaktive KIR2DS1-Subset einen sehr kleinen Beitrag zur gesamten alloreaktiven Subsetgröße beiträgt (Abb. 10B). Da in diesem Setting zur Alloreaktivität gegen die C2-Transfektante ein Ausschluss der inhibitorischen Rezeptoren CD94/NKG2A und KIR2DL1 unabdingbar ist und diese Rezeptoren maßgebend in der NK-Zell-Regulation durch MHC-Klasse-I-Moleküle sind (A. Moretta *et al.*, 1996; Cheent und Khakoo, 2009), wurde ähnlich den Daten von der Arbeitsgruppe um Schönberg (Schönberg *et al.*, 2011) auch keine große KIR2DS1-einzelpositive Population erwartet (zumal auch die inhibitorischen KIRs KIR2DL2/L3 im Gating ausgeschlossen wurden; Abb. 9). Grundsätzlich wird die Expression von KIR2DS1 nicht von dem HLA-C-Status beeinflusst (Cognet *et al.*, 2010; Fauriat *et al.*, 2010).

Dass das kleine alloreaktive KIR2DS1-einzelpositive (oder in Kombination mit anderen KIRs (Abb. 12C)) Subset HLA-C1/C2 heterozygoter Spender durchaus funktionell in Bezug auf die C2-Targetzelllinie ist, dies sich allerdings nicht in einer höheren Funktionalität des alloreaktiven Subsets (bestehend aus KIR3DL1, KIR3DL2 und/oder KIR2DS1) widerspiegelt, lieferten Daten des CD107a-Degranulations-Assays im Kombination mit der intrazellulären Färbung von Perforin (Abb. 12A, B) bzw. die visuelle Darstellung mittels viSNE-Analysen CD107a- bzw. Perforin-positiver Zellen (Abb. 11B, C). Betrachtet man die Funktionalität der gesamten NK-Zell-Population ohne Ausschluss von NKG2A und KIR2DL1 beider Spendergruppen (Abb. 12D), so zeigen sich auch hier ähnlich den

Daten der Zytotoxizitätstests *in vitro* oder der LEGENDplex-Analyse zur quantitativen Bestimmung sekretierter zytolytischer Proteine nach Targetstimulation keine Unterschiede, was zur abschließenden Erkenntnis führt, dass das kleine aber hoch funktionelle KIR2DS1-Subset anders als erwartet nicht zur Gesamtfunktionalität der hier analysierten HLA-C1/C2 heterozygoten Haplotyp B Spender beiträgt. Diese Ergebnisse machen die Problematik bei der Ableitung von Genassoziationsstudien auf biologische Auswirkungen deutlich.

7.2 Die Rolle von KIR2DS1 bei der Lyse alloreaktiver DCs und T-Zellen

Im Gegensatz zu T-Zellen vermitteln alloreaktive NK-Zellen keine GvHD. Die GvHD stellt als immunologische Störung vieler Organe wie Leber, Haut und Lunge betreffend, die größte Komplikation nach der allogenen HSZT dar, welche dann auftritt, wenn die T-Zellen des Donors auf Oberflächenmarker der Empfängerzelle reagieren (Ferrara *et al.*, 2009). Kommt es umgekehrt nach einer Transplantation von Seiten des Empfängerorganismus zu einer Abstoßungsreaktion, spricht man von einer Host-versus-Graft-Reaktion (HvG). Wie Daten aus der Maus belegen, vermitteln alloreaktive NK-Zellen einen GvL-Effekt in der Abwesenheit einer GvHD (Asai *et al.*, 1998; Ruggeri *et al.*, 2002). Diese NK-Zellen supprimieren die Entwicklung der GvHD, indem die antigenpräsentierenden Zellen (APCs) wie dendritische Zellen (DCs) des Empfängers, welche ausschlaggebend für die Induktion der T-Zellaktivierung sind, lysiert werden (Asai *et al.*, 1998; Shlomchik *et al.*, 1999). Wie ein weiterer Mechanismus der NK-Zell-vermittelten Reduktion der GvHD im murinen Modell zeigte auch, dass autologe Spender-T-Zellen, die während der Initiation der GvHD aktiv waren, von NK-Zellen inhibiert und lysiert werden können (Olson *et al.*, 2010). *In vitro* Daten mit humanen alloreaktiven KIR-mismatched NK-Zellen unterstützen die Ergebnisse des murinen Modells, da auch hier ein Killing von reifen (mDCs) und unreifen DCs (iDCs) beobachtet werden konnte (Della Chiesa *et al.*, 2003). Die Arbeitsgruppe um Sivori konnte sogar belegen, dass sich KIR2DS1 sowohl bei der Erkennung als auch bei der Lyse von mDCs und iDCs einbringen (Sivori *et al.*, 2011). Auch wenn das Killing der iDCs überwiegend von einer Signalvermittlung via NKp30 und DNAM-1 abhängig ist (Ferlazzo *et al.*, 2002; Pende *et al.*, 2006), wird die Lyse der mDCs stark von KIR2DS1 beeinflusst. So wären KIR2DS1⁺-NK-Zellen wichtige Effektoren in der Beseitigung von Empfänger-mDCs, da diese als Hauptkomponenten der APCs alloreaktive T-Zellen beeinflussen (Abb. 14).

Lange war unklar, wie KIR⁺-NK-Zellen zur Lyse der Empfänger-DCs in die Lymphknoten migrieren, da diesen NK-Zellen der für die Migration notwendigen

Chemokinrezeptor CCR7 fehlt (Vitale *et al.*, 2004; Mailliard *et al.*, 2005). Die Arbeitsgruppe um Marcenaro lieferte hierzu Daten welche belegen, dass KIR⁺-NK-Zellen nach Kontakt mit CCR7-positiven Zellen selber zu einer schnellen CCR7-Expression sowie Oberflächenpräsentation fähig sind und somit die Fähigkeit zur Migration in die Lymphknoten als Antwort auf CCL19 und CCL21 erwerben (Marcenaro *et al.*, 2009). Die Aufnahme des CCR7-Moleküls unterliegt einer negativen Interaktion zwischen KIR und HLA-Ligand: Im Falle einer Infektion interagieren KIR⁺-NK-Zellen mit HLA-Klasse-I-defizienten CCR7⁺-Zellen (beispielsweise Virus-infizierter Zellen). Anders verhält es sich in einem allogenen KIR/HLA-mismatched Setting (Haplo-HSZT); hier erwerben alloreaktive KIR⁺-NK-Zellen durch die Interaktion mit jeder CCR7-positiven Zelle den Rezeptor zur Migration, inklusive den DCs, welche eine hohe HLA-Klasse-I-Expression aufweisen. Auf diese Weise könnten alloreaktive NK-Zellen, welche die neu erworbene Fähigkeit zur Migration in Lymphknoten erhalten, an Stellen gelangen, an welche ihre Wahrscheinlichkeit einer Interaktion mit DCs und T-Zellen erhöht ist (Marcenaro *et al.*, 2009). Alloreaktive NK-Zellen sind wie bereits erwähnt auch zur T-Zelllyse fähig. KIR2DS1 trägt im Vergleich zur Lyse von mDCs sogar zu einer stärkeren NK-Zell-vermittelten Lyse von T-Zell-Blasten bei (Giebel *et al.*, 2009; Sivori *et al.*, 2011). Eine Ko-Inkubation von KIR2DS1-positiven NK-Zellen und HLA-C2⁺CCR7⁺-Zellen resultierte in einer verstärkten Aufnahme von CCR7, sodass daraus geschlossen werden kann, dass eine Expression von KIR2DS1 einen enormen Vorteil bei der CCR7-Aufnahme von allogenen HLA-C2-positiven DCs sowie T-Zell-Blasten darstellt (Marcenaro *et al.*, 2013). So könnten funktionelle alloreaktive KIR2DS1⁺-NK-Zellklone und ihre Fähigkeit der Migration nach CCR7-Aufnahme eine wichtige Rolle durch die Prävention und/oder GvHD-Therapie (durch die Lyse der Empfänger-DCs) und der HvG (durch die Lyse der Empfänger-T-Zellen) bei der T-Zell-depletierten Haplo-HSZT einnehmen, wenn der Empfänger das HLA-C2-Epitop trägt.

7.3 aKIRs tragen zur Verhinderung einer CMV-Reaktivierung bei

Studien schreiben aKIR-positiven NK-Zellen eine mögliche wichtige Rolle bei einigen Virusinfektionen zu. Ferner wird ihre Anwesenheit (meistens auf genetischer Ebene) mit einem positiven Einfluss auf den Ausgang verschiedener Infektionen assoziiert (Khakoo und Carrington, 2006). Das starke Kopplungs-Ungleichgewicht (Linkage disequilibrium) verschiedener KIR-Gene wie *KIR2DL2* und *KIR2DS2* bzw. *KIR2DS1* und *KIR3DS1* erschwert hierbei die Eingrenzung einer bestimmten KIR/HLA-Interaktion (Estefania *et al.*, 2007; Bonagura *et al.*, 2010). Zudem erschweren nicht-ausreichend charakterisierte

Liganden für einige aKIRs wie KIR3DS1, KIR2DS1 und KIR2DS3 zusammen mit fehlenden spezifischen Antikörpern ihre Erforschung bei Infektionen.

Die Infektion bzw. Reaktivierung des humanen Cytomegalovirus (HCMV) ist eine häufige Komplikation nach Transplantation immunsuppressiver Patienten, sodass sich viele Studien mit einem möglichen Zusammenhang von aKIRs und HCMV-Infektion auseinandergesetzt haben. Dabei ist die Mehrheit der Bevölkerung mit CMV infiziert und verbleibt -ähnlich anderer Herpesviren- ein Leben lang latent und oft asymptomatisch, wobei eine schwere Erkrankung bei immunsupprimierten Individuen verursacht werden kann (Ho, 1990). Ein geringeres Risiko einer HCMV-Reaktivierung wurde bei Haplotyp B-Empfängern von Organtransplantationen festgestellt, welche mehr als einen aKIR besitzen (Stern *et al.*, 2008). Ähnliche Beobachtungen konnten bei Patienten nach HSZT mit Haplotyp B Spendern gemacht werden (Cook *et al.*, 2006; Sobecks *et al.*, 2011). Der höchste schützende Effekt wurde bei Patienten festgestellt, bei welchen die Spender einen KIR-Genotyp mit mehr als fünf aKIR-Genen aufwiesen oder gleichzeitig die Gene *KIR2DS2* und *KIR2DS4* besaßen (Zaia *et al.*, 2009; Di Bona *et al.*, 2014). Von Bedeutung scheint auch die Position der aKIR-Gene zu sein: demnach besitzen aKIR-Gene in der telomerischen Region einen förderlichen Effekt gegen eine HCMV-Infektion (Stern *et al.*, 2011; Gonzalez *et al.*, 2014; Mancusi *et al.*, 2015).

Bestimmte Virusinfektionen (überwiegend durch HCMV) können im hohen Maße sowohl die NK-Zell-Entwicklung als auch ihre Funktion beeinflussen. Womöglich ist die stete Wirts-HCMV-Interaktion für den hohen Grad der Virus-Adaptation von NK-Zellen verantwortlich. Die Arbeitsgruppe um Gumá konnte zeigen, dass die HCMV-Infektion eine anhaltende Umverteilung des NK-Zell-Rezeptorrepertoires zur Folge hat, sodass eine große oligoklonale Expansion von NK-Zellen mit hoher Oberflächenpräsentation von CD94/NKG2C und reifen KIR⁺NKG2A⁻-Phänotyp favorisiert wird (Gumá *et al.*, 2004). Diese Prägung, welche auch als Imprinting bezeichnet wird, variiert jedoch innerhalb der Individuen und wird stark von der jeweiligen Gesamtanzahl an *NKG2C*-Genen beeinflusst (Muntasell *et al.*, 2013). Auch die Tatsache, dass NKG2C⁺-NK-Zellen aus gesunden, seropositiven Spendern nach Stimulation mit HCMV-infizierten Fibroblasten eine erhöhte Proliferation aufzeigten, legt nahe, dass der NKG2C-Rezeptor eine wichtige Funktion bei der NK-Zell-Expansion bzw. Reifung durch HCMV-Infektion besitzt (Gumá *et al.*, 2006). Die Arbeitsgruppe um Beziat postuliert, dass nicht nur NKG2C, sondern auch aKIRs bei der HCMV-induzierten NK-Zell-Differenzierung beteiligt sein können (Beziat *et al.*, 2013). Dabei konnten sie zeigen, dass zur NK-Zell-Education durch iKIRs unterstützend auch aKIRs (*KIR2DS4*, *KIR2DS2* oder *KIR3DS1*) in Verbindung mit NKG2C bei der Expansion beteiligt waren. Spender, welche eine homozygote Deletion des *NKG2C*-Gens trugen, führten in transplantierten Patienten zu einer schnellen

Expansion reifer NK-Zellen mit funktionaler aKIR-Expression (Della Chiesa *et al.*, 2014). Es ist also denkbar, dass aKIRs in Anwesenheit von NKG2C bei der HCMV-induzierten NK-Zell-Reifung und der Kontrolle der Infektion nach Transplantation beteiligt sind. In Anlehnung hierzu finden sich auch Studien, welche den aKIRs eine Schutzfunktion gegen Virusinfektionen in unterschiedlichen Kontexten zusprechen (Ivarsson *et al.*, 2014). Die geringere Mortalität bei Transplantationen KIR2DS1-positiver Spender beispielsweise, wird zum Großteil auch mit einer reduzierten Infektionsrate in Verbindung gebracht (Mancusi *et al.*, 2015).

7.4 KIR2DS1 und KIR2DL1 interagieren mit HLA-C nicht auf dieselbe Art und Weise

Die extrazellulären Enden der iKIRs und aKIRs sind hoch homolog und teilen dieselben konservierten Aminosäuresequenzen (Biassoni *et al.*, 1996; Hilton *et al.*, 2015). Letztlich bestimmt die Balance inhibitorischer und aktivierender Signale dieser Rezeptoren über die NK-Zell-Regulation, sodass eine Fehlregulation dieser Balance zu Autoimmun- oder Infektionskrankheiten führen kann (Akkaya und Barclay, 2013; Ivarsson *et al.*, 2014, Tab. 3). Wie die Signalisierung der NK-Zelle allerdings kontrolliert wird, ist bis dato auch aufgrund fehlender aKIR-Liganden und -Funktionalität noch nicht vollständig geklärt.

Aus entwicklungsbiologischer Sicht wird davon ausgegangen, dass sich aKIRs aufgrund Pathogen-verursachtem Selektionsdruck schneller als ihre inhibitorischen Gegenspieler entwickelten (Abi-Rached und Parham, 2005; Barclay und Hatherley, 2008): In Schimpansen besitzen KIR2DS1 und KIR2DS2 beispielsweise im Vergleich zu ihren iKIR-Gegenspielern eine höhere HLA-C-Bindeaffinität (Moesta *et al.*, 2010). Umgekehrt scheint die fehlende Bindung von KIR2DS2 bzw. die stark reduzierte Bindung von KIR2DS1 an HLA-C eine Folge der human-spezifischen Evolution zu sein. KIR2DS1 und KIR2DL1 binden beide an HLA-C2. Während die Rolle des inhibitorischen KIR2DL1 durch die Bindung an HLA-C2 darin besteht, die NK-Zell-Education (und somit die Selbst-Erkennung) zu fördern, ist die Rolle von KIR2DS1 noch nicht ganz klar. Anders als bei KIR2DL1 sollen KIR2DS1⁺-NK-Zellen (möglicherweise auch in einem synergetischen Effekt durch die Beteiligung weiterer aktivierender Rezeptoren (Bryceson *et al.*, 2006b)) nicht durch die Bindung an „normale“ HLA-Klasse-I-Moleküle aktiviert werden (A. Moretta *et al.*, 1995; Biassoni *et al.*, 1997; Stewart *et al.*, 2005; Chewing *et al.*, 2007; Foley *et al.*, 2008; M. Morvan *et al.*, 2008; Pende *et al.*, 2009; Fauriat *et al.*, 2010; Sivori *et al.*, 2011; David *et al.*, 2013; Pittari *et al.*, 2013; Shiqiu Xiong *et al.*, 2013; Hilton *et al.*, 2015; van der Ploeg *et al.*, 2017); vielmehr stellen Targetzellen beispiels-

weise zuvor aktivierte primäre Zellen oder EBV-positive Zellen (u.a. die auch hier verwendete L721.221-Transfektante) bzw. Blasten dar. Womöglich reagieren aKIRs sensitiver gegenüber strukturellen Veränderungen im HLA-Molekül oder binden an alternative Moleküle, welche durch virale Infektion induziert wurden (Stewart *et al.*, 2005; Cassidy *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014). Hierzu konnte bereits gezeigt werden, dass eine Modulation von HLA-C durch HCMV entscheidend für die starke KIR2DS1-vermittelte NK-Zell-Aktivierung ist (van der Ploeg *et al.*, 2017). Doch wie kann sich der HLA-C-Ligand nach einer Virusinfektion derart verändern, dass die Bindung von KIR2DS1 beeinflusst wird? Ein möglicher Prozess stellt die modifizierte Glykosylierung dar: aus der Interaktion von KIR3DL1 an seinen Liganden HLA-B57 ist bekannt, dass diese vom N-Glykan des HLA-Moleküls abhängig ist (Salzberger *et al.*, 2015). Da die Stelle der N-Glykosylierung innerhalb der HLA-C-Moleküle stark konserviert ist und die Glykan-Strukturen zwischen den HLA-C-Allotypen relativ uniform sind (Barber *et al.*, 1996), könnten die Glykosylierungsmuster nach einer Virusinfektion (für HIV- und HCV-Infektionen gezeigt (Lanteri *et al.*, 2003; Tardif und Siddiqui, 2003)) verändert und die Uniformität aufgehoben sein, was in einer Erkennung von KIR2DS1 resultieren könnte.

Abschließend könnte die Regulation der NK-Zelle durch KIR2DL1/KIR2DS1 wie folgt aussehen: während die NK-Zelle über die KIR2DL1/HLA-C-Interaktion gesunde körpereigene Zellen erkennt, ermöglicht eine KIR2DS1-Bindung die Erkennung kleiner struktureller Veränderungen von HLA-C beispielsweise infolge einer Pathogeninfektion. Dabei könnte KIR2DS1 mit KIR2DL1 zwar auch um dieselben HLA-C-Liganden konkurrieren, allerdings im Vergleich zu KIR2DL1 nur schwach an diese binden; die Toleranz wäre gewährleistet. Die Bindung von KIR2DS1 an ein verändertes HLA-C-Molekül könnte jedoch diese Toleranz überwinden, was letztlich zur NK-Zellaktivierung führt (van der Ploeg *et al.*, 2017).

7.5 Der zukünftige Nutzen alloreaktiver NK-Zellen bei der HSZT

Die Identifizierung der NK-Zell-Alloreaktivität und dessen Anwendung bei der Haplo-HSZT machen deutlich, dass nicht nur das adaptive sondern auch das angeborene Immunsystem von entscheidender Bedeutung für einen erfolgreichen Ausgang für den Patienten ist (A. Moretta *et al.*, 2008; L. Moretta *et al.*, 2011; Vivier *et al.*, 2011). Das kurative Potential der allogenen HSZT entstammt vornehmlich von dem immunvermittelten GvL-Effekt, in welcher die Effektoren im Gegensatz zu Ganzkörper-Bestrahlung und Chemotherapie auch maligne Stammzellen lysieren können, sodass die

Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs reduziert wird (Kanakry *et al.*, 2016). Nichtsdestotrotz stellt die GvHD die größtmögliche Komplikation dar (Copelan, 2006).

Der Umstand, dass sich alloreaktive NK-Zellen im Patienten nach Allotransplantation entwickeln und sich ihr Einsatz auf den Transplantationsausgang auswirkt, wurde erstmals von der Arbeitsgruppe um Ruggeri beobachtet (Ruggeri *et al.*, 2002). Spätere Beobachtungen bestätigten, dass die alloreaktive Spenderpopulation auch nach 5 Jahren der Transplantation phänotypisch als auch funktional in Patienten nachgewiesen werden konnten. Außerdem ließ sich sowohl in verschiedenen Spendern als auch in Patienten nach Transplantation eine enorme Variabilität in der Größe der alloreaktiven NK-Zell-Population verzeichnen (A. Moretta *et al.*, 2008; L. Moretta *et al.*, 2011). Dabei korrelierte die Subsetgröße mit dem klinischen Ausgang: Patienten mit großen Anteilen an alloreaktiven NK-Zellen waren über einen längeren Zeitraum ohne Erkrankung (Pende *et al.*, 2009). Nach der Transplantation von CD34⁺-Stammzellen, ließen sich erst nach 6-8 Wochen alloreaktive KIR⁺-NK-Zellen detektieren; interessanterweise ähnelte das KIR-Expressionsmuster auch dem des Spenders (A. Moretta *et al.*, 2008; Pende *et al.*, 2009; L. Moretta *et al.*, 2011). Verabreicht man jedoch nach der HSZT zusätzlich reife alloreaktive NK-Zellen, ließe sich die GvL-freie Zeitspanne mit hoher Gefahr eines Rezidivs hingegen überbrücken (Abb. 14).

Die Fähigkeit alloreaktiver NK-Zellen zur Lyse von DCs des Empfängers, welche durch die Präsentation von Alloantigenen die T-Zell-vermittelte GvHD initiieren können, macht diese auch zur Prävention oder Behandlung einer GvHD und einer HvG attraktiv, da Empfänger-T-Zellen ebenfalls lysiert werden (Olson *et al.*, 2010; Marcenaro *et al.*, 2013). Die antileukämische Wirkung alloreaktiver NK-Zellen bei gleichzeitiger Verhinderung einer HvG und GvHD machen diese Zellen zusammen mit der Fähigkeit der Suppression viraler Infektionen sehr wertvoll für einen erfolgreichen Einsatz bei der HSZT (Ljunggren und Malmberg, 2007).

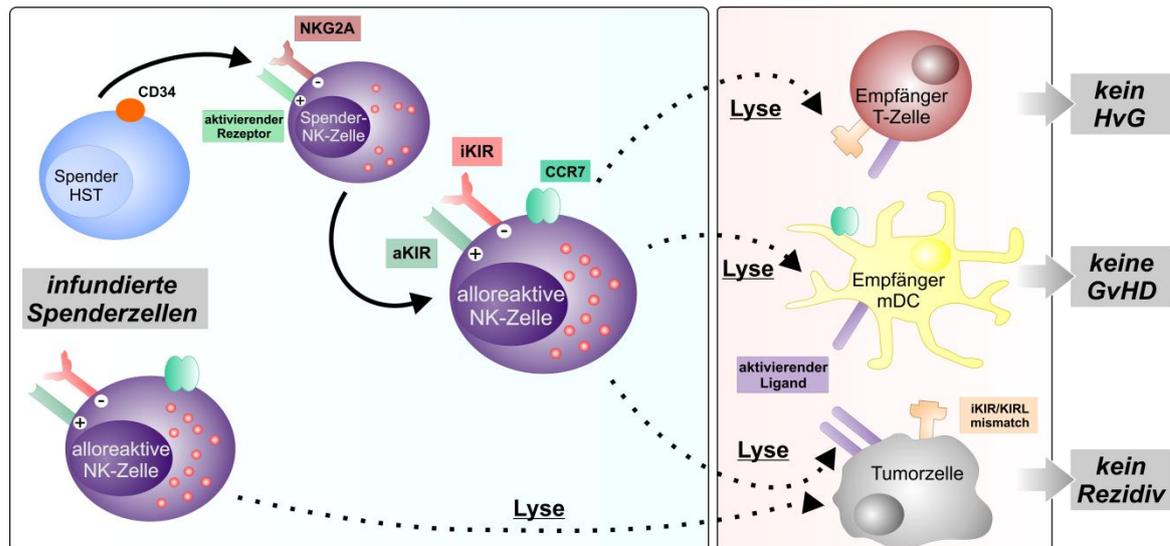


Abbildung 14: Nutzen aus alloreaktiven KIR⁺-NK-Zellen bei der HSZT. Alloreaktive NK-Zellen aus zwei verschiedenen Quellen (sich aus CD34⁺-Stammzellen entwickelnde und direkt infundierte Spenderzellen) führen nach Verabreichung zu einem antileukämischen Effekt bei gleichzeitiger Prävention einer GvHD bzw. HvG durch ihre Fähigkeit der Lyse von DCs und T-Zellen des Empfängers. Modifiziert nach Locatelli *et al.*, 2013.

7.6 Fazit und Ausblick

Ogleich einige Fortschritte im Verständnis der aKIRs und ihren HLA-Klasse-I-Liganden erzielt werden konnten, verbleibt die Rolle der aKIRs in Gesundheit als auch Krankheit weitestgehend unerforscht. Assoziationsstudien von aKIR/HLA-Klasse-I-Molekülen zeigen, dass aKIRs bei einer Reihe von verschiedenen Krankheiten, wie Infektionen, Krebs und Autoimmunität von Bedeutung sind. KIR2DS1 vermittelt nicht nur einen GvL-Effekt, sondern wird ebenfalls mit einem Schutz vor einer CMV-Reaktivierung in Verbindung gebracht und reduziert die Inzidenz der GvHD. Daraus lässt sich auch vermuten, dass die Möglichkeit besteht, dass die mit den Haplotyp B Spendern assoziierten Vorteile nicht zwingend den aKIR-vermittelten GvL-Effekten geschuldet sind: da das KIR-Repertoire als solches durch eine CMV-Infektion stabil geprägt und die klonale Expansion des NKG2C⁺aKIR⁺-NK-Zell-Subsets fördert wird, ist vorstellbar, dass eine solche alloreaktive NK-Zellpopulation tatsächlich klinisch relevante „sekundäre“ oder induzierte GvL-Effekte ausübt. Unterstützend hierzu konnten Transplantationen von KIR2DS1-exprimierenden Spendern mit einem reduzierten Risiko einer Rezidiv-freien Mortalität assoziiert werden, welche überwiegend Infektionsbezogen war. Zudem könnten die verbesserten klinischen Ergebnisse beim Einsatz KIR2DS1-exprimierender Spender bei der Haplo-HSZT weniger mit einer verbesserten NK-Zell-Zytotoxizität, sondern eher mit einer erhöhten NK-DC-vermittelten Lyse allogener T-Zellen und der daraus resultierenden Reduktion/Prävention einer GvHD zusammenhängen.

Aus den Daten dieser Arbeit konnte keine direkte Verbindung aus KIR2DS1-Expression und NK-Zell-vermitteltem GvL-Effekt in HLA-C1/C2 heterozygoten Spendern hergestellt werden. Da KIR2DS1 und KIR2DL1 dieselben Liganden in unterschiedlicher Affinität erkennen, spricht dies auch dafür, dass aKIRs womöglich sehr wichtig für die Feinabstimmung der NK-Zellaktivierung sind. So ist also denkbar, dass die Spezifität und die Aktivierungsschwelle von NK-Zellen einer Feinabstimmung durch die Koexpression stimulierender KIRs unterliegt. Eine Erklärung hierfür wären Beobachtungen von KIR2DL2/L3-positiven NK-Zellen, welche ohne eine Koexpression von KIR2DS1 C2-präsentierende Blasten sehr viel schlechter lysieren (Pende *et al.*, 2009). Die Entwicklung spezifischer Antikörper sowie die Identifikation möglicher aKIR-Liganden (inklusive nicht-HLA-Klasse-I-Molekülen) würden ein Verständnis über die Biologie der aKIRs stark vorantreiben.

Zur Identifikation bestmöglicher Spender bei der HSZT, ist die Bestimmung der alloreaktiven Subsetgröße sowie ihrer Funktionalität notwendig, um den maximalen Nutzen aus den angewandten NK-Zellen zu erhalten. Denn selbst wenn zwei Spender desselben KIR- und HLA-Status aufweisen, können sie sich dennoch qualitativ und quantitativ in ihrem alloreaktiven NK-Zellrepertoire unterscheiden, zumal viele häufig vorkommenden KIR-Allele wie KIR2DS4*003 und KIR3DL1*004 trunkiert sind und/oder nicht auf der Zelloberfläche erscheinen (Parham, 2005; Gardiner, 2008).

Die aKIR/HLA-Klasse-I-Interaktionen werden zum einen festgelegt durch variable Gewebe-spezifische HLA-Expression, zum anderen durch Variationen von KIR-Affinitäten zu ihren verwandten HLA-Liganden (bleibt teilweise undefiniert) und durch Variation der Peptid-Expression der HLA-Klasse-I-Moleküle (welche zu einem Großteil bislang noch nicht identifiziert werden konnten). Erst wenn diese vielfältigen Variationen berücksichtigt werden, können die genetischen Studien, welche bestimmte KIR/HLA-Allel-Kombinationen mit Krankheitsrisiken assoziieren, vollständig interpretiert und die Auswirkungen bestimmter Spender/Empfänger-Konstellationen auf den Transplantationsausgang genau vorhergesagt werden.

8. Literaturverzeichnis

- Abeyweera, T. P., Merino, E., & Huse, M. (2011). Inhibitory signaling blocks activating receptor clustering and induces cytoskeletal retraction in natural killer cells. *J Cell Biol*, *192*(4), 675-690. doi:10.1083/jcb.201009135
- Abi-Rached, L., & Parham, P. (2005). Natural selection drives recurrent formation of activating killer cell immunoglobulin-like receptor and Ly49 from inhibitory homologues. *J Exp Med*, *201*(8), 1319-1332. doi:10.1084/jem.20042558
- Afonina, I. S., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2010). Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B. *Immunol Rev*, *235*(1), 105-116. doi:10.1111/j.0105-2896.2010.00908.x
- Ahlenstiel, G., Martin, M. P., Gao, X., Carrington, M., & Rehermann, B. (2008). Distinct KIR/HLA compound genotypes affect the kinetics of human antiviral natural killer cell responses. *J Clin Invest*, *118*(3), 1017-1026. doi:10.1172/jci32400
- Akkaya, M., & Barclay, A. N. (2013). How do pathogens drive the evolution of paired receptors? *Eur J Immunol*, *43*(2), 303-313. doi:10.1002/eji.201242896
- Alter, G., Malenfant, J. M., & Altfeld, M. (2004). CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*, *294*(1-2), 15-22. doi:10.1016/j.jim.2004.08.008
- Alter, G., Martin, M. P., Teigen, N., Carr, W. H., Suscovich, T. J., Schneidewind, A., et al. (2007). Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J Exp Med*, *204*(12), 3027-3036. doi:10.1084/jem.20070695
- Alter, G., Rihn, S., Walter, K., Nolting, A., Martin, M., Rosenberg, E. S., et al. (2009). HLA class I subtype-dependent expansion of KIR3DS1+ and KIR3DL1+ NK cells during acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*, *83*(13), 6798-6805. doi:10.1128/jvi.00256-09
- Alves, L. G., Rajalingam, R., & Canavez, F. (2009). A novel real-time PCR method for KIR genotyping. *Tissue Antigens*, *73*(2), 188-191. doi:10.1111/j.1399-0039.2008.01184.x
- Amir el, A. D., Davis, K. L., Tadmor, M. D., Simonds, E. F., Levine, J. H., Bendall, S. C., et al. (2013). viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. *Nat Biotechnol*, *31*(6), 545-552. doi:10.1038/nbt.2594

- Anfossi, N., Andre, P., Guia, S., Falk, C. S., Roetyncck, S., Stewart, C. A., et al. (2006). Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*, 25(2), 331-342. doi:10.1016/j.immuni.2006.06.013
- Aranda-Romo, S., Garcia-Sepulveda, C. A., Comas-Garcia, A., Lovato-Salas, F., Salgado-Bustamante, M., Gomez-Gomez, A., et al. (2012). Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) in severe A (H1N1) 2009 influenza infections. *Immunogenetics*, 64(9), 653-662. doi:10.1007/s00251-012-0623-3
- Arnon, T. I., Lev, M., Katz, G., Chernobrov, Y., Porgador, A., & Mandelboim, O. (2001). Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol*, 31(9), 2680-2689. doi:10.1002/1521-4141(200109)31:9<2680::aid-immu2680>3.0.co;2-a
- Asai, O., Longo, D. L., Tian, Z. G., Hornung, R. L., Taub, D. D., Ruscetti, F. W., et al. (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(9), 1835-1842. doi:10.1172/jci1268
- Baltner, K., Kübler, A., Pal, M., Balvočiūte, M., Mezger, M., Handgretinger, R., et al. (2017). Expression of KIR2DS1 does not significantly contribute to NK cell cytotoxicity in HLA-C1/C2 heterozygous haplotype B donors. *International Immunology*, dxx052-dxx052. doi:10.1093/intimm/dxx052
- Barber, L. D., Patel, T. P., Percival, L., Gumperz, J. E., Lanier, L. L., Phillips, J. H., et al. (1996). Unusual uniformity of the N-linked oligosaccharides of HLA-A, -B, and -C glycoproteins. *J Immunol*, 156(9), 3275-3284.
- Barclay, A. N., & Hatherley, D. (2008). The counterbalance theory for evolution and function of paired receptors. *Immunity*, 29(5), 675-678. doi:10.1016/j.immuni.2008.10.004
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., et al. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, 285(5428), 727-729.
- Baychelier, F., Sennepin, A., Ermonval, M., Dorgham, K., Debre, P., & Vieillard, V. (2013). Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Blood*, 122(17), 2935-2942. doi:10.1182/blood-2013-03-489054
- Beksac, M., & Dalva, K. (2012). Role of killer immunoglobulin-like receptor and ligand matching in donor selection. *Bone Marrow Res*, 2012, 271695. doi:10.1155/2012/271695
- Belkin, D., Torkar, M., Chang, C., Barten, R., Tolaini, M., Haude, A., et al. (2003). Killer cell Ig-like receptor and leukocyte Ig-like receptor transgenic mice exhibit tissue- and cell-specific transgene expression. *J Immunol*, 171(6), 3056-3063.

- Belson, M., Kingsley, B., & Holmes, A. (2007). Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environ Health Perspect*, *115*(1), 138-145.
- Bessoles, S., Angelov, G. S., Back, J., Leclercq, G., Vivier, E., & Held, W. (2013). Education of murine NK cells requires both cis and trans recognition of MHC class I molecules. *J Immunol*, *191*(10), 5044-5051. doi:10.4049/jimmunol.1301971
- Beziat, V., Liu, L. L., Malmberg, J. A., Ivarsson, M. A., Sohlberg, E., Bjorklund, A. T., et al. (2013). NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood*, *121*(14), 2678-2688. doi:10.1182/blood-2012-10-459545
- Biassoni, R., Cantoni, C., Falco, M., Verdiani, S., Bottino, C., Vitale, M., et al. (1996). The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions. *J Exp Med*, *183*(2), 645-650.
- Biassoni, R., Pessino, A., Malaspina, A., Cantoni, C., Bottino, C., Sivori, S., et al. (1997). Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50.1 and p58.1 receptors for HLA-Cw4 molecules. *Eur J Immunol*, *27*(12), 3095-3099. doi:10.1002/eji.1830271203
- Billadeau, D. D., & Leibson, P. J. (2002). ITAMs versus ITIMs: striking a balance during cell regulation. *J Clin Invest*, *109*(2), 161-168. doi:10.1172/jci14843
- Bloushtain, N., Qimron, U., Bar-Ilan, A., Hershkovitz, O., Gazit, R., Fima, E., et al. (2004). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46. *J Immunol*, *173*(4), 2392-2401.
- Bonagura, V. R., Du, Z., Ashouri, E., Luo, L., Hatam, L. J., DeVoti, J. A., et al. (2010). Activating killer cell immunoglobulin-like receptors 3DS1 and 2DS1 protect against developing the severe form of recurrent respiratory papillomatosis. *Hum Immunol*, *71*(2), 212-219. doi:10.1016/j.humimm.2009.10.009
- Bottino, C., Castriconi, R., Moretta, L., & Moretta, A. (2005). Cellular ligands of activating NK receptors. *Trends Immunol*, *26*(4), 221-226. doi:10.1016/j.it.2005.02.007
- Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., et al. (2003). Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med*, *198*(4), 557-567. doi:10.1084/jem.20030788
- Bottino, C., Moretta, L., & Moretta, A. (2006). NK cell activating receptors and tumor recognition in humans. *Curr Top Microbiol Immunol*, *298*, 175-182.

- Boyington, J. C., & Sun, P. D. (2002). A structural perspective on MHC class I recognition by killer cell immunoglobulin-like receptors. *Mol Immunol*, *38*(14), 1007-1021.
- Brandt, C. S., Baratin, M., Yi, E. C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., et al. (2009). The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med*, *206*(7), 1495-1503. doi:10.1084/jem.20090681
- Braud, V. M., Allan, D. S., O'Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., et al. (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*, *391*(6669), 795-799. doi:10.1038/35869
- Brodin, P., Lakshmikanth, T., Johansson, S., Karre, K., & Hoglund, P. (2009). The strength of inhibitory input during education quantitatively tunes the functional responsiveness of individual natural killer cells. *Blood*, *113*(11), 2434-2441. doi:10.1182/blood-2008-05-156836
- Brown, M. H., Boles, K., van der Merwe, P. A., Kumar, V., Mathew, P. A., & Barclay, A. N. (1998). 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J Exp Med*, *188*(11), 2083-2090.
- Bruserud, O., & Kittang, A. O. (2010). The chemokine system in experimental and clinical hematology. *Curr Top Microbiol Immunol*, *341*, 3-12. doi:10.1007/82_2010_18
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Barber, D. F., Ljunggren, H. G., & Long, E. O. (2005). Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J Exp Med*, *202*(7), 1001-1012. doi:10.1084/jem.20051143
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G., & Long, E. O. (2006a). Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev*, *214*, 73-91. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00457.x
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G., & Long, E. O. (2006b). Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*, *107*(1), 159-166. doi:10.1182/blood-2005-04-1351
- Burshtyn, D. N., Scharenberg, A. M., Wagtmann, N., Rajagopalan, S., Berrada, K., Yi, T., et al. (1996). Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor. *Immunity*, *4*(1), 77-85.
- Caligiuri, M. A. (2008). Human natural killer cells. *Blood*, *112*(3), 461-469. doi:10.1182/blood-2007-09-077438
- Campbell, K. S., & Purdy, A. K. (2011). Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal

- structures and mutations. *Immunology*, 132(3), 315-325. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03398.x
- Cantoni, C., Bottino, C., Vitale, M., Pessino, A., Augugliaro, R., Malaspina, A., et al. (1999). NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med*, 189(5), 787-796.
- Carr, W. H., Rosen, D. B., Arase, H., Nixon, D. F., Michaelsson, J., & Lanier, L. L. (2007). Cutting Edge: KIR3DS1, a gene implicated in resistance to progression to AIDS, encodes a DAP12-associated receptor expressed on NK cells that triggers NK cell activation. *J Immunol*, 178(2), 647-651.
- Carrington, M., & Norman, P. (2003). The KIR Gene Cluster. [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2003 May 28. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10135/?report=classic>.
- Cassidy, S. A., Cheent, K. S., & Khakoo, S. I. (2014). Effects of Peptide on NK cell-mediated MHC I recognition. *Front Immunol*, 5, 133. doi:10.3389/fimmu.2014.00133
- Chalifour, A., Scarpellino, L., Back, J., Brodin, P., Devevre, E., Gros, F., et al. (2009). A Role for cis Interaction between the Inhibitory Ly49A receptor and MHC class I for natural killer cell education. *Immunity*, 30(3), 337-347. doi:10.1016/j.immuni.2008.12.019
- Chan, H. W., Kurago, Z. B., Stewart, C. A., Wilson, M. J., Martin, M. P., Mace, B. E., et al. (2003). DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. *J Exp Med*, 197(2), 245-255.
- Chapel, A., Garcia-Beltran, W. F., Hölzemer, A., Ziegler, M., Lunemann, S., Martus, G., et al. (2017). Peptide-specific engagement of the activating NK cell receptor KIR2DS1. *Scientific Reports*, 7(1), 2414. doi:10.1038/s41598-017-02449-x
- Chapman, T. L., Heikeman, A. P., & Bjorkman, P. J. (1999). The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity*, 11(5), 603-613.
- Cheent, K., & Khakoo, S. I. (2009). Natural killer cells: integrating diversity with function. *Immunology*, 126(4), 449-457. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03045.x
- Chester, C., Fritsch, K., & Kohrt, H. E. (2015). Natural Killer Cell Immunomodulation: Targeting Activating, Inhibitory, and Co-stimulatory Receptor Signaling for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 6(601). doi:10.3389/fimmu.2015.00601
- Chewning, J. H., Gudme, C. N., Hsu, K. C., Selvakumar, A., & Dupont, B. (2007). KIR2DS1-positive NK cells mediate alloresponse against the C2 HLA-KIR ligand group in vitro. *J Immunol*, 179(2), 854-868.

- Clark, R., & Griffiths, G. M. (2003). Lytic granules, secretory lysosomes and disease. *Curr Opin Immunol*, 15(5), 516-521.
- Clayberger, C., & Krensky, A. M. (2003). Granulysin. *Curr Opin Immunol*, 15(5), 560-565.
- Cognet, C., Farnarier, C., Gauthier, L., Frassati, C., Andre, P., Magerus-Chatinet, A., et al. (2010). Expression of the HLA-C2-specific activating killer-cell Ig-like receptor KIR2DS1 on NK and T cells. *Clin Immunol*, 135(1), 26-32. doi:10.1016/j.clim.2009.12.009
- Colonna, M. (1997). Specificity and function of immunoglobulin superfamily NK cell inhibitory and stimulatory receptors. *Immunol Rev*, 155, 127-133.
- Colonna, M., & Samaridis, J. (1995). Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science*, 268(5209), 405-408.
- Colucci, F., Caligiuri, M. A., & Di Santo, J. P. (2003). What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol*, 3(5), 413-425. doi:10.1038/nri1088
- Cook, M., Briggs, D., Craddock, C., Mahendra, P., Milligan, D., Fegan, C., et al. (2006). Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation. *Blood*, 107(3), 1230-1232. doi:10.1182/blood-2005-03-1039
- Cooley, S., Trachtenberg, E., Bergemann, T. L., Saeteurn, K., Klein, J., Le, C. T., et al. (2009). Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*, 113(3), 726-732. doi:10.1182/blood-2008-07-171926
- Cooley, S., Weisdorf, D. J., Guethlein, L. A., Klein, J. P., Wang, T., Le, C. T., et al. (2010). Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*, 116(14), 2411-2419. doi:10.1182/blood-2010-05-283051
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Turner, S. C., Chen, K. S., Ghaeheri, B. A., Ghayur, T., et al. (2001). Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood*, 97(10), 3146-3151.
- Copelan, E. A. (2006). Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*, 354(17), 1813-1826. doi:10.1056/NEJMra052638
- Cosman, D., Fanger, N., Borges, L., Kubin, M., Chin, W., Peterson, L., et al. (1997). A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity*, 7(2), 273-282.

- Costello, R. T., Sivori, S., Marcenaro, E., Lafage-Pochitaloff, M., Mozziconacci, M. J., Reviron, D., et al. (2002). Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, *99*(10), 3661-3667.
- Crespo, A. C., Strominger, J. L., & Tilburgs, T. (2016). Expression of KIR2DS1 by decidual natural killer cells increases their ability to control placental HCMV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(52), 15072-15077. doi:10.1073/pnas.1617927114
- Curti, A., Ruggeri, L., D'Addio, A., Bontadini, A., Dan, E., Motta, M. R., et al. (2011). Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients. *Blood*, *118*(12), 3273-3279. doi:10.1182/blood-2011-01-329508
- Czaja, K., Borer, A. S., Schmied, L., Terszowski, G., Stern, M., & Gonzalez, A. (2014). A comprehensive analysis of the binding of anti-KIR antibodies to activating KIRs. *Genes Immun*, *15*(1), 33-37. doi:10.1038/gene.2013.58
- David, G., Djaoud, Z., Willem, C., Legrand, N., Rettman, P., Gagne, K., et al. (2013). Large spectrum of HLA-C recognition by killer Ig-like receptor (KIR)2DL2 and KIR2DL3 and restricted C1 SPECIFICITY of KIR2DS2: dominant impact of KIR2DL2/KIR2DS2 on KIR2D NK cell repertoire formation. *J Immunol*, *191*(9), 4778-4788. doi:10.4049/jimmunol.1301580
- David, G., Morvan, M., Gagne, K., Kerdudou, N., Willem, C., Devys, A., et al. (2009). Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized monoclonal antibodies. *Immunology*, *128*(2), 172-184. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03085.x
- Davies, S. M., Ruggieri, L., DeFor, T., Wagner, J. E., Weisdorf, D. J., Miller, J. S., et al. (2002). Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor. *Blood*, *100*(10), 3825-3827. doi:10.1182/blood-2002-04-1197
- Davis, S. J., & van der Merwe, P. A. (1996). The structure and ligand interactions of CD2: implications for T-cell function. *Immunol Today*, *17*(4), 177-187.
- de Andrade, L. F., Smyth, M. J., & Martinet, L. (2014). DNAM-1 control of natural killer cells functions through nectin and nectin-like proteins. *Immunol Cell Biol*, *92*(3), 237-244. doi:10.1038/icb.2013.95
- Della Chiesa, M., Falco, M., Bertaina, A., Muccio, L., Alicata, C., Frassoni, F., et al. (2014). Human cytomegalovirus infection promotes rapid maturation of NK cells expressing activating killer Ig-like receptor in patients transplanted with NKG2C-/- umbilical cord blood. *J Immunol*, *192*(4), 1471-1479. doi:10.4049/jimmunol.1302053

- Della Chiesa, M., Romeo, E., Falco, M., Balsamo, M., Augugliaro, R., Moretta, L., et al. (2008). Evidence that the KIR2DS5 gene codes for a surface receptor triggering natural killer cell function. *Eur J Immunol*, 38(8), 2284-2289. doi:10.1002/eji.200838434
- Della Chiesa, M., Vitale, M., Carlomagno, S., Ferlazzo, G., Moretta, L., & Moretta, A. (2003). The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors. *Eur J Immunol*, 33(6), 1657-1666. doi:10.1002/eji.200323986
- Di Bona, D., Scafidi, V., Plaia, A., Colomba, C., Nuzzo, D., Occhino, C., et al. (2014). HLA and killer cell immunoglobulin-like receptors influence the natural course of CMV infection. *J Infect Dis*, 210(7), 1083-1089. doi:10.1093/infdis/jiu226
- Dohring, C., Scheidegger, D., Samaridis, J., Cella, M., & Colonna, M. (1996). A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J Immunol*, 156(9), 3098-3101.
- Dustin, M. L., Sanders, M. E., Shaw, S., & Springer, T. A. (1987). Purified lymphocyte function-associated antigen 3 binds to CD2 and mediates T lymphocyte adhesion. *J Exp Med*, 165(3), 677-692.
- Ebihara, T., Jonsson, A. H., & Yokoyama, W. M. (2013). Natural killer cell licensing in mice with inducible expression of MHC class I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(45), E4232-4237. doi:10.1073/pnas.1318255110
- Elliott, J. M., Wahle, J. A., & Yokoyama, W. M. (2010). MHC class I-deficient natural killer cells acquire a licensed phenotype after transfer into an MHC class I-sufficient environment. *J Exp Med*, 207(10), 2073-2079. doi:10.1084/jem.20100986
- Estefania, E., Gomez-Lozano, N., Portero, F., de Pablo, R., Solis, R., Sepulveda, S., et al. (2007). Influence of KIR gene diversity on the course of HSV-1 infection: resistance to the disease is associated with the absence of KIR2DL2 and KIR2DS2. *Tissue Antigens*, 70(1), 34-41. doi:10.1111/j.1399-0039.2007.00844.x
- Falk, C. S., Nossner, E., Frankenberger, B., & Schendel, D. J. (2000). Non-MHC-restricted CD4+ T lymphocytes are regulated by HLA-Cw7-mediated inhibition. *Hum Immunol*, 61(12), 1219-1232.
- Falk, C. S., Steinle, A., & Schendel, D. J. (1995). Expression of HLA-C molecules confers target cell resistance to some non-major histocompatibility complex-restricted T cells in a manner analogous to allospecific natural killer cells. *J Exp Med*, 182(4), 1005-1018.
- Farag, S. S., Fehniger, T., Ruggeri, L., Velardi, A., & Caligiuri, M. A. (2002). Natural killer cells: biology and application in stem-cell transplantation. *Cytotherapy*, 4(5), 445-446. doi:10.1080/146532402320776134

- Faridi, R. M., & Agrawal, S. (2011). Killer immunoglobulin-like receptors (KIRs) and HLA-C allorecognition patterns implicative of dominant activation of natural killer cells contribute to recurrent miscarriages. *Hum Reprod*, 26(2), 491-497. doi:10.1093/humrep/deq341
- Fauriat, C., Ivarsson, M. A., Ljunggren, H. G., Malmberg, K. J., & Michaelsson, J. (2010). Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors. *Blood*, 115(6), 1166-1174. doi:10.1182/blood-2009-09-245746
- Fehniger, T. A., Cooper, M. A., Nuovo, G. J., Cella, M., Facchetti, F., Colonna, M., et al. (2003). CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*, 101(8), 3052-3057. doi:10.1182/blood-2002-09-2876
- Ferlazzo, G., Thomas, D., Lin, S. L., Goodman, K., Morandi, B., Muller, W. A., et al. (2004). The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol*, 172(3), 1455-1462.
- Ferlazzo, G., Tsang, M. L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R. M., & Munz, C. (2002). Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKG2D receptor by activated NK cells. *J Exp Med*, 195(3), 343-351.
- Fernandez, N. C., Treiner, E., Vance, R. E., Jamieson, A. M., Lemieux, S., & Raulet, D. H. (2005). A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood*, 105(11), 4416-4423. doi:10.1182/blood-2004-08-3156
- Ferrara, J. L. M., Levine, J. E., Reddy, P., & Holler, E. (2009). Graft-versus-Host Disease. *Lancet*, 373(9674), 1550-1561. doi:10.1016/S0140-6736(09)60237-3
- Foley, B., De Santis, D., Lathbury, L., Christiansen, F., & Witt, C. (2008). KIR2DS1-mediated activation overrides NKG2A-mediated inhibition in HLA-C C2-negative individuals. *Int Immunol*, 20(4), 555-563. doi:10.1093/intimm/dxn013
- Freud, A. G., & Caligiuri, M. A. (2006). Human natural killer cell development. *Immunol Rev*, 214, 56-72. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00451.x
- Fujisaki, H., Kakuda, H., Shimasaki, N., Imai, C., Ma, J., Lockey, T., et al. (2009). Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res*, 69(9), 4010-4017. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3712
- Galy, A., Travis, M., Cen, D., & Chen, B. (1995). Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity*, 3(4), 459-473.

- Gardiner, C. M. (2008). Killer cell immunoglobulin-like receptors on NK cells: the how, where and why. *Int J Immunogenet*, 35(1), 1-8. doi:10.1111/j.1744-313X.2007.00739.x
- Garni-Wagner, B. A., Purohit, A., Mathew, P. A., Bennett, M., & Kumar, V. (1993). A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells. *J Immunol*, 151(1), 60-70.
- Giebel, S., Locatelli, F., Lamparelli, T., Velardi, A., Davies, S., Frumento, G., et al. (2003). Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood*, 102(3), 814-819. doi:10.1182/blood-2003-01-0091
- Giebel, S., Nowak, I., Dziaczkowska, J., Czerw, T., Wojnar, J., Krawczyk-Kulis, M., et al. (2009). Activating killer immunoglobulin-like receptor incompatibilities enhance graft-versus-host disease and affect survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol*, 83(4), 343-356. doi:10.1111/j.1600-0609.2009.01280.x
- Gonzalez, A., Schmitter, K., Hirsch, H. H., Garzoni, C., van Delden, C., Boggian, K., et al. (2014). KIR-associated protection from CMV replication requires pre-existing immunity: a prospective study in solid organ transplant recipients. *Genes Immun*, 15(7), 495-499. doi:10.1038/gene.2014.39
- Goodridge, J. P., Lathbury, L. J., Steiner, N. K., Shulse, C. N., Pullikotil, P., Seidah, N. G., et al. (2007). Three common alleles of KIR2DL4 (CD158d) encode constitutively expressed, inducible and secreted receptors in NK cells. *Eur J Immunol*, 37(1), 199-211. doi:10.1002/eji.200636316
- Graef, T., Moesta, A. K., Norman, P. J., Abi-Rached, L., Vago, L., Older Aguilar, A. M., et al. (2009). KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced specificity for HLA-A*11 while diminishing avidity for HLA-C. *J Exp Med*, 206(11), 2557-2572. doi:10.1084/jem.20091010
- Grzywacz, B., Kataria, N., Sikora, M., Oostendorp, R. A., Dzierzak, E. A., Blazar, B. R., et al. (2006). Coordinated acquisition of inhibitory and activating receptors and functional properties by developing human natural killer cells. *Blood*, 108(12), 3824-3833. doi:10.1182/blood-2006-04-020198
- Gudjonsson, J. E., Karason, A., Antonsdottir, A. A., Runarsdottir, E. H., Gulcher, J. R., Stefansson, K., et al. (2002). HLA-Cw6-positive and HLA-Cw6-negative patients with Psoriasis vulgaris have distinct clinical features. *J Invest Dermatol*, 118(2), 362-365. doi:10.1046/j.0022-202x.2001.01656.x
- Guia, S., Jaeger, B. N., Piatek, S., Mailfert, S., Trombik, T., Fenis, A., et al. (2011). Confinement of activating receptors at the plasma membrane controls natural killer cell tolerance. *Sci Signal*, 4(167), ra21. doi:10.1126/scisignal.2001608

- Gumá, M., Angulo, A., Vilches, C., Gomez-Lozano, N., Malats, N., & Lopez-Botet, M. (2004). Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood*, *104*(12), 3664-3671. doi:10.1182/blood-2004-05-2058
- Gumá, M., Budt, M., Saez, A., Brckalo, T., Hengel, H., Angulo, A., et al. (2006). Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood*, *107*(9), 3624-3631. doi:10.1182/blood-2005-09-3682
- Gumperz, J. E., Valiante, N. M., Parham, P., Lanier, L. L., & Tyan, D. (1996). Heterogeneous phenotypes of expression of the NKB1 natural killer cell class I receptor among individuals of different human histocompatibility leukocyte antigens types appear genetically regulated, but not linked to major histocompatibility complex haplotype. *J Exp Med*, *183*(4), 1817-1827.
- Haas, P., Loiseau, P., Tamouza, R., Cayuela, J. M., Moins-Teisserenc, H., Busson, M., et al. (2011). NK-cell education is shaped by donor HLA genotype after unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, *117*(3), 1021-1029. doi:10.1182/blood-2010-02-269381
- Handgretinger, R., Klingebiel, T., Lang, P., Schumm, M., Neu, S., Geiselhart, A., et al. (2001). Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplant*, *27*(8), 777-783. doi:10.1038/sj.bmt.1702996
- Harel-Bellan, A., Quillet, A., Marchiol, C., DeMars, R., Tursz, T., & Fradelizi, D. (1986). Natural killer susceptibility of human cells may be regulated by genes in the HLA region on chromosome 6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *83*(15), 5688-5692.
- Hecht, M. L., Rosental, B., Horlacher, T., Hershkovitz, O., De Paz, J. L., Noti, C., et al. (2009). Natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 bind to different heparan sulfate/heparin sequences. *J Proteome Res*, *8*(2), 712-720. doi:10.1021/pr800747c
- Held, W., & Mariuzza, R. A. (2008). Cis interactions of immunoreceptors with MHC and non-MHC ligands. *Nat Rev Immunol*, *8*(4), 269-278. doi:10.1038/nri2278
- Herberman, R. B., Nunn, M. E., Holden, H. T., & Lavrin, D. H. (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer*, *16*(2), 230-239.
- Hershkovitz, O., Jarahian, M., Zilka, A., Bar-Ilan, A., Landau, G., Jivov, S., et al. (2008). Altered glycosylation of recombinant NKp30 hampers binding to heparan sulfate: a lesson for the use of recombinant immunoreceptors as an immunological tool. *Glycobiology*, *18*(1), 28-41. doi:10.1093/glycob/cwm125
- Hiby, S. E., Apps, R., Sharkey, A. M., Farrell, L. E., Gardner, L., Mulder, A., et al. (2010). Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J Clin Invest*, *120*(11), 4102-4110. doi:10.1172/jci43998

- Hilton, H. G., Guethlein, L. A., Goyos, A., Nemat-Gorgani, N., Bushnell, D. A., Norman, P. J., et al. (2015). Polymorphic HLA-C Receptors Balance the Functional Characteristics of KIR Haplotypes. *J Immunol*, *195*(7), 3160-3170. doi:10.4049/jimmunol.1501358
- Ho, M. (1990). Epidemiology of cytomegalovirus infections. *Rev Infect Dis*, *12 Suppl 7*, S701-710.
- Hoglund, P., Ohlen, C., Carbone, E., Franksson, L., Ljunggren, H. G., Latour, A., et al. (1991). Recognition of beta 2-microglobulin-negative (beta 2m-) T-cell blasts by natural killer cells from normal but not from beta 2m- mice: nonresponsiveness controlled by beta 2m- bone marrow in chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *88*(22), 10332-10336.
- Hou, Y., Zhang, C., Xu, D., & Sun, H. (2015). Association of killer cell immunoglobulin-like receptor and human leucocyte antigen-Cw gene combinations with systemic lupus erythematosus. *Clinical and Experimental Immunology*, *180*(2), 250-254. doi:10.1111/cei.12582
- Hsu, K. C., Liu, X. R., Selvakumar, A., Mickelson, E., O'Reilly, R. J., & Dupont, B. (2002). Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol*, *169*(9), 5118-5129.
- Hudspeth, K., Silva-Santos, B., & Mavilio, D. (2013). Natural cytotoxicity receptors: broader expression patterns and functions in innate and adaptive immune cells. *Front Immunol*, *4*, 69. doi:10.3389/fimmu.2013.00069
- Imai, C., Iwamoto, S., & Campana, D. (2005). Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood*, *106*(1), 376-383. doi:10.1182/blood-2004-12-4797
- Ito, M., Maruyama, T., Saito, N., Koganei, S., Yamamoto, K., & Matsumoto, N. (2006). Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *J Exp Med*, *203*(2), 289-295. doi:10.1084/jem.20051986
- Itoh, N., & Nagata, S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem*, *268*(15), 10932-10937.
- Ivarsson, M. A., Michaëlsson, J., & Fauriat, C. (2014). Activating Killer Cell Ig-Like Receptors in Health and Disease. *Frontiers in Immunology*, *5*(184). doi:10.3389/fimmu.2014.00184
- Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., et al. (2001). CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from

- CD56dim NK cells. *Eur J Immunol*, 31(10), 3121-3127. doi:10.1002/1521-4141(200110)31:10<3121::aid-immu3121>3.0.co;2-4
- Jaeger, B. N., Donadieu, J., Cognet, C., Bernat, C., Ordonez-Rueda, D., Barlogis, V., et al. (2012). Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis. *J Exp Med*, 209(3), 565-580. doi:10.1084/jem.20111908
- Jarahian, M., Fiedler, M., Cohnen, A., Djandji, D., Hammerling, G. J., Gati, C., et al. (2011). Modulation of NKp30- and NKp46-mediated natural killer cell responses by poxviral hemagglutinin. *PLoS Pathog*, 7(8), e1002195. doi:10.1371/journal.ppat.1002195
- Joncker, N. T., Fernandez, N. C., Treiner, E., Vivier, E., & Raulet, D. H. (2009). NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model. *J Immunol*, 182(8), 4572-4580. doi:10.4049/jimmunol.0803900
- Joncker, N. T., Shifrin, N., Delebecque, F., & Raulet, D. H. (2010). Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment. *J Exp Med*, 207(10), 2065-2072. doi:10.1084/jem.20100570
- Juelke, K., Killig, M., Thiel, A., Dong, J., & Romagnani, C. (2009). Education of hyporesponsive NK cells by cytokines. *Eur J Immunol*, 39(9), 2548-2555. doi:10.1002/eji.200939307
- Kanakry, C. G., Fuchs, E. J., & Luznik, L. (2016). Modern approaches to HLA-haploidentical blood or marrow transplantation. *Nat Rev Clin Oncol*, 13(2), 132. doi:10.1038/nrclinonc.2015.234
- Karre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G., & Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*, 319(6055), 675-678. doi:10.1038/319675a0
- Katz, G., Gazit, R., Arnon, T. I., Gonen-Gross, T., Tarcic, G., Markel, G., et al. (2004). MHC class I-independent recognition of NK-activating receptor KIR2DS4. *J Immunol*, 173(3), 1819-1825.
- Kelley, J., Walter, L., & Trowsdale, J. (2005). Comparative genomics of natural killer cell receptor gene clusters. *PLoS Genet*, 1(2), 129-139. doi:10.1371/journal.pgen.0010027
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4), 239-257.
- Khakoo, S. I., & Carrington, M. (2006). KIR and disease: a model system or system of models? *Immunol Rev*, 214, 186-201. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00459.x

- Kiessling, R., Klein, E., & Wigzell, H. (1975). "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*, 5(2), 112-117. doi:10.1002/eji.1830050208
- Kikuchi-Maki, A., Catina, T. L., & Campbell, K. S. (2005). Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK cells through association with the Fc receptor gamma protein. *J Immunol*, 174(7), 3859-3863.
- Kim, H. J., Choi, Y., Min, W. S., Kim, T. G., Cho, B. S., Kim, S. Y., et al. (2007). The activating killer cell immunoglobulin-like receptors as important determinants of acute graft-versus host disease in hematopoietic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Transplantation*, 84(9), 1082-1091. doi:10.1097/01.tp.0000285918.72930.35
- Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S. M., Lybarger, L., Song, Y. J., Yang, L., et al. (2005). Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*, 436(7051), 709-713. doi:10.1038/nature03847
- Koch, J., Steinle, A., Watzl, C., & Mandelboim, O. (2013). Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends Immunol*, 34(4), 182-191. doi:10.1016/j.it.2013.01.003
- Kohrt, H. E., Houot, R., Marabelle, A., Cho, H. J., Osman, K., Goldstein, M., et al. (2012). Combination strategies to enhance antitumor ADCC. *Immunotherapy*, 4(5), 511-527. doi:10.2217/imt.12.38
- Körner, C., & Altfeld, M. (2012). Role of KIR3DS1 in human diseases. *Frontiers in Immunology*, 3, 326. doi:10.3389/fimmu.2012.00326
- Kröger, N., Binder, T., Zabelina, T., Wolschke, C., Schieder, H., Renges, H., et al. (2006). Low number of donor activating killer immunoglobulin-like receptors (KIR) genes but not KIR-ligand mismatch prevents relapse and improves disease-free survival in leukemia patients after in vivo T-cell depleted unrelated stem cell transplantation. *Transplantation*, 82(8), 1024-1030. doi:10.1097/01.tp.0000235859.24513.43
- Kruse, P. H., Matta, J., Ugolini, S., & Vivier, E. (2014). Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunol Cell Biol*, 92(3), 221-229. doi:10.1038/icb.2013.98
- Krzewski, K., & Coligan, J. E. (2012). Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Front Immunol*, 3, 335. doi:10.3389/fimmu.2012.00335
- Kubota, A., Kubota, S., Lohwasser, S., Mager, D. L., & Takei, F. (1999). Diversity of NK cell receptor repertoire in adult and neonatal mice. *J Immunol*, 163(1), 212-216.
- Kübler, A., Woiterski, J., Witte, K. E., Bühring, H. J., Hartwig, U. F., Ebinger, M., et al. (2014). Both mature KIR+ and immature KIR- NK cells control pediatric acute B-

- cell precursor leukemia in NOD.Cg-Prkdcscid IL2rgtmWjl/Sz mice. *Blood*, 124(26), 3914-3923. doi:10.1182/blood-2014-05-572743
- Kusnierczyk, P. (2013). Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Gene Associations with Autoimmune and Allergic Diseases, Recurrent Spontaneous Abortion, and Neoplasms. *Frontiers in Immunology*, 4(8). doi:10.3389/fimmu.2013.00008
- La Nasa, G., Caocci, G., Littera, R., Atzeni, S., Vacca, A., Mulas, O., et al. (2013). Homozygosity for killer immunoglobulin-like receptor haplotype A predicts complete molecular response to treatment with tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia patients. *Exp Hematol*, 41(5), 424-431. doi:10.1016/j.exphem.2013.01.008
- Lanier, L. L. (2015). NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol Res*, 3(6), 575-582. doi:10.1158/2326-6066.cir-15-0098
- Lanier, L. L., Corliss, B., & Phillips, J. H. (1997). Arousal and inhibition of human NK cells. *Immunol Rev*, 155, 145-154.
- Lanier, L. L., Corliss, B. C., Wu, J., Leong, C., & Phillips, J. H. (1998). Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature*, 391(6668), 703-707. doi:10.1038/35642
- Lanier, L. L., Le, A. M., Civin, C. I., Loken, M. R., & Phillips, J. H. (1986). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*, 136(12), 4480-4486.
- Lanier, L. L., Testi, R., Bindl, J., & Phillips, J. H. (1989). Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med*, 169(6), 2233-2238.
- Lanteri, M., Giordanengo, V., Hiraoka, N., Fuzibet, J. G., Auburger, P., Fukuda, M., et al. (2003). Altered T cell surface glycosylation in HIV-1 infection results in increased susceptibility to galectin-1-induced cell death. *Glycobiology*, 13(12), 909-918. doi:10.1093/glycob/cwg110
- Latchman, Y., McKay, P. F., & Reiser, H. (1998). Identification of the 2B4 molecule as a counter-receptor for CD48. *J Immunol*, 161(11), 5809-5812.
- Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J. P., Lanier, L. L., & Phillips, J. H. (1996). Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol*, 157(11), 4741-4745.
- Le Page, M. E., Goodridge, J. P., John, E., Christiansen, F. T., & Witt, C. S. (2014). Killer Ig-like receptor 2DL4 does not mediate NK cell IFN-gamma responses to soluble HLA-G preparations. *J Immunol*, 192(2), 732-740. doi:10.4049/jimmunol.1301748

- Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Ishitani, A., Navarro, F., Lopez-Botet, M., et al. (1998). HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(9), 5199-5204.
- Lee, S.-H., Miyagi, T., & Biron, C. A. (2007). Keeping NK cells in highly regulated antiviral warfare. *Trends in immunology*, 28(6), 252-259.
- Lieberman, J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol*, 3(5), 361-370. doi:10.1038/nri1083
- Liu, J., Xiao, Z., Ko, H. L., Shen, M., & Ren, E. C. (2014). Activating killer cell immunoglobulin-like receptor 2DS2 binds to HLA-A*11. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(7), 2662-2667. doi:10.1073/pnas.1322052111
- Ljunggren, H. G., & Karre, K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*, 11(7), 237-244.
- Ljunggren, H. G., & Malmberg, K. J. (2007). Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol*, 7(5), 329-339. doi:10.1038/nri2073
- Locatelli, F., Pende, D., Mingari, M., Bertaina, A., Falco, M., Moretta, A., et al. (2013). Cellular and molecular basis of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in the successful treatment of high-risk leukemias: role of alloreactive NK cells. *Frontiers in Immunology*, 4(15). doi:10.3389/fimmu.2013.00015
- Long, E. O. (2008). Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. *Immunol Rev*, 224, 70-84. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00660.x
- Lopez-Vazquez, A., Rodrigo, L., Martinez-Borra, J., Perez, R., Rodriguez, M., Fdez-Morera, J. L., et al. (2005). Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the killer cell immunoglobulin-like receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. *J Infect Dis*, 192(1), 162-165. doi:10.1086/430351
- Lopez, J. A., Susanto, O., Jenkins, M. R., Lukoyanova, N., Sutton, V. R., Law, R. H., et al. (2013). Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood*, 121(14), 2659-2668. doi:10.1182/blood-2012-07-446146
- Luszczek, W., Manczak, M., Cislo, M., Nockowski, P., Wisniewski, A., Jasek, M., et al. (2004). Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *Hum Immunol*, 65(7), 758-766. doi:10.1016/j.humimm.2004.05.008

- MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Fernandes-Alnemri, T., Cohen, G. M., & Alnemri, E. S. (1997). Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem*, *272*(41), 25417-25420.
- Mailliard, R. B., Alber, S. M., Shen, H., Watkins, S. C., Kirkwood, J. M., Herberman, R. B., et al. (2005). IL-18-induced CD83(+)CCR7(+) NK helper cells. *J Exp Med*, *202*(7), 941-953. doi:10.1084/jem.20050128
- Mancusi, A., Ruggeri, L., Urbani, E., Pierini, A., Massei, M. S., Carotti, A., et al. (2015). Haploidentical hematopoietic transplantation from KIR ligand-mismatched donors with activating KIRs reduces nonrelapse mortality. *Blood*, *125*(20), 3173-3182. doi:10.1182/blood-2014-09-599993
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T. I., Bushkin, Y., et al. (2001). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature*, *409*(6823), 1055-1060. doi:10.1038/35059110
- Mandelboim, O., Reyburn, H. T., Vales-Gomez, M., Pazmany, L., Colonna, M., Borsellino, G., et al. (1996). Protection from lysis by natural killer cells of group 1 and 2 specificity is mediated by residue 80 in human histocompatibility leukocyte antigen C alleles and also occurs with empty major histocompatibility complex molecules. *J Exp Med*, *184*(3), 913-922.
- Manser, A. R., Weinhold, S., & Uhrberg, M. (2015). Human KIR repertoires: shaped by genetic diversity and evolution. *Immunol Rev*, *267*(1), 178-196. doi:10.1111/imr.12316
- Marcenaro, E., Cantoni, C., Pesce, S., Prato, C., Pende, D., Agaoglu, S., et al. (2009). Uptake of CCR7 and acquisition of migratory properties by human KIR+ NK cells interacting with monocyte-derived DC or EBV cell lines: regulation by KIR/HLA-class I interaction. *Blood*, *114*(19), 4108-4116. doi:10.1182/blood-2009-05-222265
- Marcenaro, E., Pesce, S., Sivori, S., Carlomagno, S., Moretta, L., & Moretta, A. (2013). KIR2DS1-dependent acquisition of CCR7 and migratory properties by human NK cells interacting with allogeneic HLA-C2+ DCs or T-cell blasts. *Blood*, *121*(17), 3396-3401. doi:10.1182/blood-2012-09-458752
- Marin, D., Gabriel, I. H., Ahmad, S., Foroni, L., de Lavallade, H., Clark, R., et al. (2012). KIR2DS1 genotype predicts for complete cytogenetic response and survival in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Leukemia*, *26*(2), 296-302. doi:10.1038/leu.2011.180
- Marsh, S. G., Parham, P., Dupont, B., Geraghty, D. E., Trowsdale, J., Middleton, D., et al. (2003). Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Hum Immunol*, *64*(6), 648-654.

- Martin, A. M., Freitas, E. M., Witt, C. S., & Christiansen, F. T. (2000). The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster. *Immunogenetics*, 51(4-5), 268-280.
- Martin, M. P., Gao, X., Lee, J. H., Nelson, G. W., Detels, R., Goedert, J. J., et al. (2002). Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet*, 31(4), 429-434. doi:10.1038/ng934
- Martin, M. P., Nelson, G., Lee, J. H., Pellett, F., Gao, X., Wade, J., et al. (2002). Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *J Immunol*, 169(6), 2818-2822.
- McNerney, M. E., Lee, K. M., & Kumar, V. (2005). 2B4 (CD244) is a non-MHC binding receptor with multiple functions on natural killer cells and CD8+ T cells. *Mol Immunol*, 42(4), 489-494. doi:10.1016/j.molimm.2004.07.032
- McQueen, K. L., Dorigi, K. M., Guethlein, L. A., Wong, R., Sanjanwala, B., & Parham, P. (2007). Donor-recipient combinations of group A and B KIR haplotypes and HLA class I ligand affect the outcome of HLA-matched, sibling donor hematopoietic cell transplantation. *Hum Immunol*, 68(5), 309-323. doi:10.1016/j.humimm.2007.01.019
- Mentlik, A. N., Sanborn, K. B., Holzbaur, E. L., & Orange, J. S. (2010). Rapid lytic granule convergence to the MTOC in natural killer cells is dependent on dynein but not cytolytic commitment. *Mol Biol Cell*, 21(13), 2241-2256. doi:10.1091/mbc.E09-11-0930
- Middleton, D., Gonzalez, A., & Gilmore, P. M. (2007). Studies on the expression of the deleted KIR2DS4*003 gene product and distribution of KIR2DS4 deleted and nondeleted versions in different populations. *Hum Immunol*, 68(2), 128-134. doi:10.1016/j.humimm.2006.12.007
- Middleton, D., & Gonzalez, F. (2010). The extensive polymorphism of KIR genes. *Immunology*, 129(1), 8-19. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03208.x
- Miller, J. S., Alley, K. A., & McGlave, P. (1994). Differentiation of natural killer (NK) cells from human primitive marrow progenitors in a stroma-based long-term culture system: identification of a CD34+7+ NK progenitor. *Blood*, 83(9), 2594-2601.
- Miller, J. S., Soignier, Y., Panoskaltsis-Mortari, A., McNearney, S. A., Yun, G. H., Fautsch, S. K., et al. (2005). Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*, 105(8), 3051-3057. doi:10.1182/blood-2004-07-2974
- Moesta, A. K., Graef, T., Abi-Rached, L., Older Aguilar, A. M., Guethlein, L. A., & Parham, P. (2010). Humans differ from other hominids in lacking an activating NK

- cell receptor that recognizes the C1 epitope of MHC class I. *J Immunol*, 185(7), 4233-4237. doi:10.4049/jimmunol.1001951
- Moesta, A. K., Norman, P. J., Yawata, M., Yawata, N., Gleimer, M., & Parham, P. (2008). Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J Immunol*, 180(6), 3969-3979.
- Moesta, A. K., & Parham, P. (2012). Diverse functionality among human NK cell receptors for the C1 epitope of HLA-C: KIR2DS2, KIR2DL2, and KIR2DL3. *Front Immunol*, 3, 336. doi:10.3389/fimmu.2012.00336
- Montaldo, E., Del Zotto, G., Della Chiesa, M., Mingari, M. C., Moretta, A., De Maria, A., et al. (2013). Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry A*, 83(8), 702-713. doi:10.1002/cyto.a.22302
- Moretta, A. (2002). Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol*, 2(12), 957-964. doi:10.1038/nri956
- Moretta, A., Bottino, C., Pende, D., Tripodi, G., Tambussi, G., Viale, O., et al. (1990). Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J Exp Med*, 172(6), 1589-1598.
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Biassoni, R., Mingari, M. C., et al. (1996). Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol*, 14, 619-648. doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.619
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M. C., et al. (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*, 19, 197-223. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.197
- Moretta, A., Locatelli, F., & Moretta, L. (2008). Human NK cells: from HLA class I-specific killer Ig-like receptors to the therapy of acute leukemias. *Immunol Rev*, 224, 58-69. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00651.x
- Moretta, A., Sivori, S., Vitale, M., Pende, D., Morelli, L., Augugliaro, R., et al. (1995). Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med*, 182(3), 875-884.
- Moretta, A., Vitale, M., Bottino, C., Orengo, A. M., Morelli, L., Augugliaro, R., et al. (1993). P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med*, 178(2), 597-604.

- Moretta, L., Ciccone, E., Mingari, M. C., Biassoni, R., & Moretta, A. (1993). Human natural killer cells: origin, clonality, specificity, and receptors. *Advances in immunology*, *55*, 341-380.
- Moretta, L., Ciccone, E., Moretta, A., Hoglund, P., Ohlen, C., & Karre, K. (1992). Alloreognition by NK cells: nonself or no self? *Immunol Today*, *13*(8), 300-306. doi:10.1016/0167-5699(92)90042-6
- Moretta, L., Locatelli, F., Pende, D., Marcenaro, E., Mingari, M. C., & Moretta, A. (2011). Killer Ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, *117*(3), 764-771. doi:10.1182/blood-2010-08-264085
- Moretta, L., & Moretta, A. (2004). Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *Embo j*, *23*(2), 255-259. doi:10.1038/sj.emboj.7600019
- Morvan, M., David, G., Sebille, V., Perrin, A., Gagne, K., Willem, C., et al. (2008). Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions. *Eur J Immunol*, *38*(12), 3474-3486. doi:10.1002/eji.200838407
- Morvan, M. G., & Lanier, L. L. (2016). NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer*, *16*(1), 7-19. doi:10.1038/nrc.2015.5
- Muntasell, A., Lopez-Montanes, M., Vera, A., Heredia, G., Romo, N., Penafiel, J., et al. (2013). NKG2C zygosity influences CD94/NKG2C receptor function and the NK-cell compartment redistribution in response to human cytomegalovirus. *Eur J Immunol*, *43*(12), 3268-3278. doi:10.1002/eji.201343773
- Nagata, S., & Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science*, *267*(5203), 1449-1456.
- Nagler, A., Lanier, L. L., Cwirla, S., & Phillips, J. H. (1989). Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol*, *143*(10), 3183-3191.
- Naumova, E., Mihaylova, A., Stoitchkov, K., Ivanova, M., Quin, L., & Toneva, M. (2005). Genetic polymorphism of NK receptors and their ligands in melanoma patients: prevalence of inhibitory over activating signals. *Cancer Immunol Immunother*, *54*(2), 172-178. doi:10.1007/s00262-004-0575-z
- Niepieklo-Miniewska, W., Majorczyk, E., Matusiak, L., Gendzekhadze, K., Nowak, I., Narbutt, J., et al. (2013). Protective effect of the KIR2DS1 gene in atopic dermatitis. *Gene*, *527*(2), 594-600. doi:10.1016/j.gene.2013.06.015

- Norman, P. J., Abi-Rached, L., Gendzekhadze, K., Korb, D., Gleimer, M., Rowley, D., et al. (2007). Unusual selection on the KIR3DL1/S1 natural killer cell receptor in Africans. *Nat Genet*, 39(9), 1092-1099. doi:10.1038/ng2111
- Nowak, J., Koscinska, K., Mika-Witkowska, R., Rogatko-Koros, M., Mizia, S., Jaskula, E., et al. (2015). Role of Donor Activating KIR-HLA Ligand-Mediated NK Cell Education Status in Control of Malignancy in Hematopoietic Cell Transplant Recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*, 21(5), 829-839. doi:10.1016/j.bbmt.2015.01.018
- O'Connor, G. M., Guinan, K. J., Cunningham, R. T., Middleton, D., Parham, P., & Gardiner, C. M. (2007). Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells. *J Immunol*, 178(1), 235-241.
- O'Leary, J. G., Goodarzi, M., Drayton, D. L., & von Andrian, U. H. (2006). T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol*, 7(5), 507-516. doi:10.1038/ni1332
- Oevermann, L., Michaelis, S. U., Mezger, M., Lang, P., Toporski, J., Bertaina, A., et al. (2014). KIR B haplotype donors confer a reduced risk for relapse after haploidentical transplantation in children with ALL. *Blood*, 124(17), 2744-2747. doi:10.1182/blood-2014-03-565069
- Olson, J. A., Leveson-Gower, D. B., Gill, S., Baker, J., Beilhack, A., & Negrin, R. S. (2010). NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood*, 115(21), 4293-4301. doi:10.1182/blood-2009-05-222190
- Orange, J. S. (2008). Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol*, 8(9), 713-725. doi:10.1038/nri2381
- Orr, M. T., Murphy, W. J., & Lanier, L. L. (2010). 'Unlicensed' natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection. *Nat Immunol*, 11(4), 321-327. doi:10.1038/ni.1849
- Ozturk, O. G., Gun, F. D., & Polat, G. (2012). Killer cell immunoglobulin-like receptor genes in patients with breast cancer. *Med Oncol*, 29(2), 511-515. doi:10.1007/s12032-011-9932-x
- Pando, M. J., Gardiner, C. M., Gleimer, M., McQueen, K. L., & Parham, P. (2003). The protein made from a common allele of KIR3DL1 (3DL1*004) is poorly expressed at cell surfaces due to substitution at positions 86 in Ig domain 0 and 182 in Ig domain 1. *J Immunol*, 171(12), 6640-6649.
- Pardo, J., Aguilo, J. I., Anel, A., Martin, P., Joeckel, L., Borner, C., et al. (2009). The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation. *Microbes Infect*, 11(4), 452-459. doi:10.1016/j.micinf.2009.02.004

- Parham, P. (2003). Immunogenetics of killer-cell immunoglobulin-like receptors. *Tissue Antigens*, 62(3), 194-200.
- Parham, P. (2005). MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol*, 5(3), 201-214. doi:10.1038/nri1570
- Parham, P., & McQueen, K. L. (2003). Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nat Rev Immunol*, 3(2), 108-122. doi:10.1038/nri999
- Pegram, H. J., Andrews, D. M., Smyth, M. J., Darcy, P. K., & Kershaw, M. H. (2011). Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol*, 89(2), 216-224. doi:10.1038/icb.2010.78
- Pende, D., Biassoni, R., Cantoni, C., Verdiani, S., Falco, M., di Donato, C., et al. (1996). The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J Exp Med*, 184(2), 505-518.
- Pende, D., Castriconi, R., Romagnani, P., Spaggiari, G. M., Marcenaro, S., Dondero, A., et al. (2006). Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction. *Blood*, 107(5), 2030-2036. doi:10.1182/blood-2005-07-2696
- Pende, D., Marcenaro, S., Falco, M., Martini, S., Bernardo, M. E., Montagna, D., et al. (2009). Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood*, 113(13), 3119-3129. doi:10.1182/blood-2008-06-164103
- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., et al. (1999). Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med*, 190(10), 1505-1516.
- Pende, D., Spaggiari, G. M., Marcenaro, S., Martini, S., Rivera, P., Capobianco, A., et al. (2005). Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood*, 105(5), 2066-2073. doi:10.1182/blood-2004-09-3548
- Perussia, B., Trinchieri, G., Jackson, A., Warner, N. L., Faust, J., Rumpold, H., et al. (1984). The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies. *J Immunol*, 133(1), 180-189.

- Pessino, A., Sivori, S., Bottino, C., Malaspina, A., Morelli, L., Moretta, L., et al. (1998). Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med*, *188*(5), 953-960.
- Pfeiffer, M., Schumm, M., Feuchtinger, T., Dietz, K., Handgretinger, R., & Lang, P. (2007). Intensity of HLA class I expression and KIR-mismatch determine NK-cell mediated lysis of leukaemic blasts from children with acute lymphatic leukaemia. *Br J Haematol*, *138*(1), 97-100. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06631.x
- Pittari, G., Liu, X. R., Selvakumar, A., Zhao, Z., Merino, E., Huse, M., et al. (2013). NK cell tolerance of self-specific activating receptor KIR2DS1 in individuals with cognate HLA-C2 ligand. *J Immunol*, *190*(9), 4650-4660. doi:10.4049/jimmunol.1202120
- Pogge von Strandmann, E., Simhadri, V. R., von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K. S., Hansen, H. P., et al. (2007). Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity*, *27*(6), 965-974. doi:10.1016/j.immuni.2007.10.010
- Pydi, S. S., Sunder, S. R., Venkatasubramanian, S., Kovvali, S., Jonnalagada, S., & Valluri, V. L. (2013). Killer cell immunoglobulin like receptor gene association with tuberculosis. *Hum Immunol*, *74*(1), 85-92. doi:10.1016/j.humimm.2012.10.006
- Rajagopalan, S., Bryceson, Y. T., Kuppusamy, S. P., Geraghty, D. E., van der Meer, A., Joosten, I., et al. (2006). Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. *PLoS Biol*, *4*(1), e9. doi:10.1371/journal.pbio.0040009
- Rajagopalan, S., Fu, J., & Long, E. O. (2001). Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J Immunol*, *167*(4), 1877-1881.
- Rajagopalan, S., & Long, E. O. (1997). The direct binding of a p58 killer cell inhibitory receptor to human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-Cw4 exhibits peptide selectivity. *J Exp Med*, *185*(8), 1523-1528.
- Rajagopalan, S., & Long, E. O. (1999). A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med*, *189*(7), 1093-1100.
- Rajasekaran, N., Chester, C., Yonezawa, A., Zhao, X., & Kohrt, H. E. (2015). Enhancement of antibody-dependent cell mediated cytotoxicity: a new era in cancer treatment. *Immunotargets Ther*, *4*, 91-100. doi:10.2147/itt.s61292
- Raulet, D. H., Gasser, S., Gowen, B. G., Deng, W., & Jung, H. (2013). Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol*, *31*, 413-441. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095951

- Raulet, D. H., & Guerra, N. (2009). Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. *Nat Rev Immunol*, 9(8), 568-580. doi:10.1038/nri2604
- Raulet, D. H., Held, W., Correa, I., Dorfman, J. R., Wu, M. F., & Corral, L. (1997). Specificity, tolerance and developmental regulation of natural killer cells defined by expression of class I-specific Ly49 receptors. *Immunol Rev*, 155, 41-52.
- Raulet, D. H., & Vance, R. E. (2006). Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol*, 6(7), 520-531. doi:10.1038/nri1863
- Raulet, D. H., Vance, R. E., & McMahon, C. W. (2001). Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol*, 19, 291-330. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.291
- Redaelli, A., Stephens, J. M., Laskin, B. L., Pashos, C. L., & Botteman, M. F. (2003). The burden and outcomes associated with four leukemias: AML, ALL, CLL and CML. *Expert Rev Anticancer Ther*, 3(3), 311-329. doi:10.1586/14737140.3.3.311
- Ritz, J., Schmidt, R. E., Michon, J., Hercend, T., & Schlossman, S. F. (1988). Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv Immunol*, 42, 181-211.
- Rivero-Juarez, A., Gonzalez, R., Camacho, A., Manzanares-Martin, B., Caruz, A., Martinez-Peinado, A., et al. (2013). Natural killer KIR3DS1 is closely associated with HCV viral clearance and sustained virological response in HIV/HCV patients. *PLoS One*, 8(4), e61992. doi:10.1371/journal.pone.0061992
- Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Leitman, S., Chang, A. E., Ettinghausen, S. E., et al. (1985). Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med*, 313(23), 1485-1492. doi:10.1056/nejm198512053132327
- Ruggeri, L., Aversa, F., Martelli, M. F., & Velardi, A. (2006). Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self. *Immunol Rev*, 214, 202-218. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00455.x
- Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., et al. (2002). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*, 295(5562), 2097-2100. doi:10.1126/science.1068440
- Ruggeri, L., Mancusi, A., Capanni, M., Martelli, M. F., & Velardi, A. (2005). Exploitation of alloreactive NK cells in adoptive immunotherapy of cancer. *Curr Opin Immunol*, 17(2), 211-217. doi:10.1016/j.coi.2005.01.007

- Salzberger, W., Garcia-Beltran, W. F., Dugan, H., Gubbala, S., Simoneau, C., Gressens, S. B., et al. (2015). Influence of Glycosylation Inhibition on the Binding of KIR3DL1 to HLA-B*57:01. *PLoS One*, *10*(12), e0145324. doi:10.1371/journal.pone.0145324
- Santourlidis, S., Trompeter, H. I., Weinhold, S., Eisermann, B., Meyer, K. L., Wernet, P., et al. (2002). Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *J Immunol*, *169*(8), 4253-4261.
- Schönberg, K., Sribar, M., Enczmann, J., Fischer, J. C., & Uhrberg, M. (2011). Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood*, *117*(1), 98-107. doi:10.1182/blood-2010-03-273656
- Shibuya, A., Kojima, H., Shibuya, K., Nagayoshi, K., Nagasawa, T., & Nakauchi, H. (1993). Enrichment of interleukin-2-responsive natural killer progenitors in human bone marrow. *Blood*, *81*(7), 1819-1826.
- Shilling, H. G., Young, N., Guethlein, L. A., Cheng, N. W., Gardiner, C. M., Tyan, D., et al. (2002). Genetic control of human NK cell repertoire. *J Immunol*, *169*(1), 239-247.
- Shimizu, Y., & DeMars, R. (1989). Production of human cells expressing individual transferred HLA-A,-B,-C genes using an HLA-A,-B,-C null human cell line. *J Immunol*, *142*(9), 3320-3328.
- Shimizu, Y., Geraghty, D. E., Koller, B. H., Orr, H. T., & DeMars, R. (1988). Transfer and expression of three cloned human non-HLA-A,B,C class I major histocompatibility complex genes in mutant lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *85*(1), 227-231.
- Shlomchik, W. D., Couzens, M. S., Tang, C. B., McNiff, J., Robert, M. E., Liu, J., et al. (1999). Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science*, *285*(5426), 412-415.
- Sivori, S., Carlomagno, S., Falco, M., Romeo, E., Moretta, L., & Moretta, A. (2011). Natural killer cells expressing the KIR2DS1-activating receptor efficiently kill T-cell blasts and dendritic cells: implications in haploidentical HSCT. *Blood*, *117*(16), 4284-4292. doi:10.1182/blood-2010-10-316125
- Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C., et al. (1997). p46, a Novel Natural Killer Cell-specific Surface Molecule That Mediates Cell Activation. *J Exp Med*, *186*(7), 1129-1136.
- Smyth, M. J., Cretney, E., Kelly, J. M., Westwood, J. A., Street, S. E., Yagita, H., et al. (2005). Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol*, *42*(4), 501-510. doi:10.1016/j.molimm.2004.07.034

- Smyth, M. J., Hayakawa, Y., Takeda, K., & Yagita, H. (2002). New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2(11), 850-861.
- Smyth, M. J., & Trapani, J. A. (1995). Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol Today*, 16(4), 202-206.
- Sobecks, R. M., Askar, M., Thomas, D., Rybicki, L., Kalaycio, M., Dean, R., et al. (2011). Cytomegalovirus reactivation after matched sibling donor reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic stem cell transplant correlates with donor killer immunoglobulin-like receptor genotype. *Exp Clin Transplant*, 9(1), 7-13.
- Steffens, U., Vyas, Y., Dupont, B., & Selvakumar, A. (1998). Nucleotide and amino acid sequence alignment for human killer cell inhibitory receptors (KIR), 1998. *Tissue Antigens*, 51(4 Pt 1), 398-413.
- Stern, M., Elsasser, H., Honger, G., Steiger, J., Schaub, S., & Hess, C. (2008). The number of activating KIR genes inversely correlates with the rate of CMV infection/reactivation in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*, 8(6), 1312-1317. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02242.x
- Stern, M., Hadaya, K., Honger, G., Martin, P. Y., Steiger, J., Hess, C., et al. (2011). Telomeric rather than centromeric activating KIR genes protect from cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Am J Transplant*, 11(6), 1302-1307. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03516.x
- Stetson, D. B., Mohrs, M., Reinhardt, R. L., Baron, J. L., Wang, Z. E., Gapin, L., et al. (2003). Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *J Exp Med*, 198(7), 1069-1076. doi:10.1084/jem.20030630
- Stewart, C. A., Laugier-Anfossi, F., Vely, F., Saulquin, X., Riedmuller, J., Tisserant, A., et al. (2005). Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(37), 13224-13229. doi:10.1073/pnas.0503594102
- Stewart, C. A., Van Bergen, J., & Trowsdale, J. (2003). Different and divergent regulation of the KIR2DL4 and KIR3DL1 promoters. *J Immunol*, 170(12), 6073-6081.
- Stringaris, K., Adams, S., Uribe, M., Eniafe, R., Wu, C. O., Savani, B. N., et al. (2010). Donor KIR Genes 2DL5A, 2DS1 and 3DS1 are associated with a reduced rate of leukemia relapse after HLA-identical sibling stem cell transplantation for acute myeloid leukemia but not other hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*, 16(9), 1257-1264. doi:10.1016/j.bbmt.2010.03.004
- Sun, J. C., Beilke, J. N., & Lanier, L. L. (2009). Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*, 457(7229), 557-561. doi:10.1038/nature07665

- Suzuki, Y., Hamamoto, Y., Ogasawara, Y., Ishikawa, K., Yoshikawa, Y., Sasazuki, T., et al. (2004). Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol*, *122*(5), 1133-1136. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.22517.x
- Tahara-Hanaoka, S., Shibuya, K., Kai, H., Miyamoto, A., Morikawa, Y., Ohkochi, N., et al. (2006). Tumor rejection by the poliovirus receptor family ligands of the DNAM-1 (CD226) receptor. *Blood*, *107*(4), 1491-1496. doi:10.1182/blood-2005-04-1684
- Tardif, K. D., & Siddiqui, A. (2003). Cell surface expression of major histocompatibility complex class I molecules is reduced in hepatitis C virus subgenomic replicon-expressing cells. *J Virol*, *77*(21), 11644-11650.
- Tarek, N., Le Ludec, J. B., Gallagher, M. M., Zheng, J., Venstrom, J. M., Chamberlain, E., et al. (2012). Unlicensed NK cells target neuroblastoma following anti-GD2 antibody treatment. *J Clin Invest*, *122*(9), 3260-3270. doi:10.1172/jci62749
- Terme, M., Ullrich, E., Delahaye, N. F., Chaput, N., & Zitvogel, L. (2008). Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat Immunol*, *9*(5), 486-494. doi:10.1038/ni1580
- Thananchai, H., Gillespie, G., Martin, M. P., Bashirova, A., Yawata, N., Yawata, M., et al. (2007). Cutting Edge: Allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B. *J Immunol*, *178*(1), 33-37.
- Thiery, J., Keefe, D., Boulant, S., Boucrot, E., Walch, M., Martinvalet, D., et al. (2011). Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nat Immunol*, *12*(8), 770-777. doi:10.1038/ni.2050
- Thomas, L. M., Peterson, M. E., & Long, E. O. (2013). Cutting edge: NK cell licensing modulates adhesion to target cells. *J Immunol*, *191*(8), 3981-3985. doi:10.4049/jimmunol.1301159
- Tomasello, E., Blery, M., Vely, F., & Vivier, E. (2000). Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells. *Semin Immunol*, *12*(2), 139-147. doi:10.1006/smim.2000.0216
- Trapani, J. A. (2001). Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biol*, *2*(12), Reviews3014.
- Trinchieri, G. (1989). Biology of natural killer cells. *Adv Immunol*, *47*, 187-376.
- Trompeter, H. I., Gomez-Lozano, N., Santourlidis, S., Eisermann, B., Wernet, P., Vilches, C., et al. (2005). Three structurally and functionally divergent kinds of promoters regulate expression of clonally distributed killer cell Ig-like receptors (KIR), of KIR2DL4, and of KIR3DL3. *J Immunol*, *174*(7), 4135-4143.

- Uhrberg, M. (2005). Shaping the human NK cell repertoire: an epigenetic glance at KIR gene regulation. *Mol Immunol*, 42(4), 471-475. doi:10.1016/j.molimm.2004.07.029
- Uhrberg, M., Valiante, N. M., Shum, B. P., Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., et al. (1997). Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*, 7(6), 753-763.
- Vales-Gomez, M., Reyburn, H. T., Erskine, R. A., & Strominger, J. (1998). Differential binding to HLA-C of p50-activating and p58-inhibitory natural killer cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(24), 14326-14331.
- Valiante, N. M., Uhrberg, M., Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Arnett, K. L., D'Andrea, A., et al. (1997). Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity*, 7(6), 739-751.
- van der Ploeg, K., Chang, C., Ivarsson, M. A., Moffett, A., Wills, M. R., & Trowsdale, J. (2017). Modulation of Human Leukocyte Antigen-C by Human Cytomegalovirus Stimulates KIR2DS1 Recognition by Natural Killer Cells. *Front Immunol*, 8, 298. doi:10.3389/fimmu.2017.00298
- VandenBussche, C. J., Dakshanamurthy, S., Posch, P. E., & Hurley, C. K. (2006). A single polymorphism disrupts the killer Ig-like receptor 2DL2/2DL3 D1 domain. *J Immunol*, 177(8), 5347-5357.
- VandenBussche, C. J., Mulrooney, T. J., Frazier, W. R., Dakshanamurthy, S., & Hurley, C. K. (2009). Dramatically reduced surface expression of NK cell receptor KIR2DS3 is attributed to multiple residues throughout the molecule. *Genes Immun*, 10(2), 162-173. doi:10.1038/gene.2008.91
- Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D. A., Brunning, R. D., Borowitz, M. J., Porwit, A., et al. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114(5), 937-951. doi:10.1182/blood-2009-03-209262
- Veillette, A. (2006). NK cell regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Immunol Rev*, 214, 22-34. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00453.x
- Veillette, A. (2010). SLAM-family receptors: immune regulators with or without SAP-family adaptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(3), a002469. doi:10.1101/cshperspect.a002469
- Velardi, A., Ruggeri, L., Alessandro, Moretta, & Moretta, L. (2002). NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation. *Trends Immunol*, 23(9), 438-444.

- Venstrom, J. M., Pittari, G., Gooley, T. A., Chewning, J. H., Spellman, S., Haagenson, M., et al. (2012). HLA-C-dependent prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1. *N Engl J Med*, 367(9), 805-816. doi:10.1056/NEJMoa1200503
- Verheyden, S., Schots, R., Duquet, W., & Demanet, C. (2005). A defined donor activating natural killer cell receptor genotype protects against leukemic relapse after related HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*, 19(8), 1446-1451. doi:10.1038/sj.leu.2403839
- Vieillard, V., Strominger, J. L., & Debre, P. (2005). NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(31), 10981-10986. doi:10.1073/pnas.0504315102
- Vilches, C., Castano, J., Gomez-Lozano, N., & Estefania, E. (2007). Facilitation of KIR genotyping by a PCR-SSP method that amplifies short DNA fragments. *Tissue Antigens*, 70(5), 415-422. doi:10.1111/j.1399-0039.2007.00923.x
- Vilches, C., & Parham, P. (2002). KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*, 20, 217-251. doi:10.1146/annurev.immunol.20.092501.134942
- Vitale, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Romagnani, C., Thiel, A., Moretta, L., et al. (2004). The small subset of CD56brightCD16- natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon-gamma production upon interaction with dendritic cells. *Eur J Immunol*, 34(6), 1715-1722. doi:10.1002/eji.200425100
- Vitale, M., Falco, M., Castriconi, R., Parolini, S., Zambello, R., Semenzato, G., et al. (2001). Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells. *Eur J Immunol*, 31(1), 233-242. doi:10.1002/1521-4141(200101)31:1<233::aid-immu233>3.0.co;2-4
- Vivier, E., Nunes, J. A., & Vely, F. (2004). Natural killer cell signaling pathways. *Science*, 306(5701), 1517-1519. doi:10.1126/science.1103478
- Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., et al. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*, 331(6013), 44-49. doi:10.1126/science.1198687
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*, 9(5), 503-510. doi:10.1038/ni1582
- Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., & Brossay, L. (2012). Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol*, 12(4), 239-252. doi:10.1038/nri3174

- Voskoboinik, I., Whisstock, J. C., & Trapani, J. A. (2015). Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol*, 15(6), 388-400. doi:10.1038/nri3839
- Wada, H., Matsumoto, N., Maenaka, K., Suzuki, K., & Yamamoto, K. (2004). The inhibitory NK cell receptor CD94/NKG2A and the activating receptor CD94/NKG2C bind the top of HLA-E through mostly shared but partly distinct sets of HLA-E residues. *Eur J Immunol*, 34(1), 81-90. doi:10.1002/eji.200324432
- Wallin, R. P., Screpanti, V., Michaelsson, J., Grandien, A., & Ljunggren, H. G. (2003). Regulation of perforin-independent NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol*, 33(10), 2727-2735. doi:10.1002/eji.200324070
- Wang, W., Erbe, A. K., Alderson, K. A., Phillips, E., Gallenberger, M., Gan, J., et al. (2016). Human NK cells maintain licensing status and are subject to killer immunoglobulin-like receptor (KIR) and KIR-ligand inhibition following ex vivo expansion. *Cancer Immunol Immunother*, 65(9), 1047-1059. doi:10.1007/s00262-016-1864-z
- Warren, H. S., & Smyth, M. J. (1999). NK cells and apoptosis. *Immunol Cell Biol*, 77(1), 64-75.
- Wauquier, N., Padilla, C., Becquart, P., Leroy, E., & Vieillard, V. (2010). Association of KIR2DS1 and KIR2DS3 with fatal outcome in Ebola virus infection. *Immunogenetics*, 62(11-12), 767-771. doi:10.1007/s00251-010-0480-x
- Wehner, R., Dietze, K., Bachmann, M., & Schmitz, M. (2011). The bidirectional crosstalk between human dendritic cells and natural killer cells. *J Innate Immun*, 3(3), 258-263. doi:10.1159/000323923
- Welte, S., Kuttruff, S., Waldhauer, I., & Steinle, A. (2006). Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nat Immunol*, 7(12), 1334-1342. doi:10.1038/ni1402
- Williams, F., Meenagh, A., Sleator, C., Cook, D., Fernandez-Vina, M., Bowcock, A. M., et al. (2005). Activating Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Gene KIR2DS1 Is Associated With Psoriatic Arthritis. *Hum Immunol*, 66(7), 836-841. doi:https://doi.org/10.1016/j.humimm.2005.04.005
- Wilson, M. J., Torkar, M., Haude, A., Milne, S., Jones, T., Sheer, D., et al. (2000). Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(9), 4778-4783. doi:10.1073/pnas.080588597
- Winter, C. C., & Long, E. O. (1997). A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. *J Immunol*, 158(9), 4026-4028.

- Wu, J., Song, Y., Bakker, A. B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L. L., et al. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*, 285(5428), 730-732.
- Xiong, S., Sharkey, A. M., Kennedy, P. R., Gardner, L., Farrell, L. E., Chazara, O., et al. (2013). Maternal uterine NK cell-activating receptor KIR2DS1 enhances placentation. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(10), 4264-4272. doi:10.1172/JCI68991
- Yawata, M., Yawata, N., Draghi, M., Little, A. M., Partheniou, F., & Parham, P. (2006). Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med*, 203(3), 633-645. doi:10.1084/jem.20051884
- Yokoyama, W. M., & Kim, S. (2006). Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol Rev*, 214, 143-154. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00458.x
- Zaia, J. A., Sun, J. Y., Gallez-Hawkins, G. M., Thao, L., Oki, A., Lacey, S. F., et al. (2009). The effect of single and combined activating killer immunoglobulin-like receptor genotypes on cytomegalovirus infection and immunity after hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 15(3), 315-325. doi:10.1016/j.bbmt.2008.11.030
- Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I. M., Azzoni, L., Alnemri, E. S., & Perussia, B. (1998). Natural Killer (NK) Cell-mediated Cytotoxicity: Differential Use of TRAIL and Fas Ligand by Immature and Mature Primary Human NK Cells. *J Exp Med*, 188(12), 2375-2380.
- Zompi, S., & Colucci, F. (2005). Anatomy of a murder--signal transduction pathways leading to activation of natural killer cells. *Immunol Lett*, 97(1), 31-39. doi:10.1016/j.imlet.2004.10.006

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
AF	Alexa Fluor
AICL	Aktivierungs-induziertes C-Typ Lektin
aKIR	aktivierender Killerzell-Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myelische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APCs	Antigenpräsentierende Zellen (<i>antigen-presenting cells</i>)
ARD	Amin-reaktiver Farbstoff (<i>Amine reactive dye</i>)
BAT-3	HLA-B-assoziiertes Transkript 3
B-LCL	lymphoblastoide (EBV-transformierte) B-Zelllinie
Buv	Brilliant Ultraviolet
Bv	Brilliant Violet
bzw.	beziehungsweise
ca.	ungefähr
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CD	Differenzierungsantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
Cen	centromerisch
cDNA	zur mRNA komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
CF	Cyanin basierter fluoreszenter Farbstoff
CFDA-SE	<i>Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CXCR	CXC-Chemokin-Rezeptor
Cy	Cyacin-Farbstoff
DCs	Dendritische Zellen (<i>Dendritic cells</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DNAM-1	DNAX-assoziiertes Molekül 1
E:T	Effektor-Target-Verhältnis
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Di-Natriummethylenediamintetraacetat
ERT	EAT-2-related transducer
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Scanning</i> , Methode der Durchflusszytometrie
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	Fetales Kälberserum
FFP	Gefrorenes Frischplasma (<i>Fresh frozen plasma</i>)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FMO	Durchflusszytometrischer Kontrollansatz (<i>Fluorescence minus one</i>)

FSC	Vorwärts-Streulicht (<i>forward scatter</i>)
g	Gravitationsfeldstärke/ Erdbeschleunigung
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GMP	Gute Herstellungspraxis (<i>Good Manufacturing Practice</i>)
GvHD	Graft-versus-Host-Erkrankung (<i>graft-versus-host disease</i>)
GvL	Graft-versus-Leukämie-Effekt (<i>graft-versus-leukemia effect</i>)
GvT	Graft-versus-Tumor-Effekt (<i>graft-versus-tumor</i>)
h	human
HA	Hämagglutinin
HCMV	humanes Cytomegalovirus
HLA	humanes Leukozytenantigen (<i>Human Leukocyte Antigen</i>)
HS	Heparin- und Heparansulfate
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation, (<i>Hematopoietic stem cell transplantation, HSCT</i>)
HuS	Humanserum
HvG	Host -versus-Graft-Erkrankung (<i>host -versus-graft</i>)
ID	Identität, Kennung
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
inkl.	inklusive
iKIR	inhibitorischer Killerzell-Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor
IL	Interleukin
iNK	unreife NK-Zelle (<i>immature NK-cell</i>)
IS	immunologische Synapse
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-enthaltendes aktivierendes Motiv, (<i>immunoreceptor tyrosin-based activating motif</i>)
ITIM	Immunrezeptor Tyrosin-enthaltendes inhibierendes Motiv, (<i>immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif</i>)
ITSM	Immunrezeptor-Tyrosin-enthaltendes-Schaltermotiv, (<i>immunoreceptor tyrosine-based switch motif</i>)
KIR	Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren
KLRG-1	Killerzell-Lectin-ähnlicher Rezeptor G-1
L	Liganden
LAMP-1	lysosomalen Membranglykoprotein-1
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
LFA-1	Lymphozytenfunktion-assoziiertes Antigen-1)
LILRB1	Leukozyten-Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor, Subfamilie B, Mitglied 1
LRC	Leukozyten-Rezeptor-Komplex (<i>leukocyte receptor complex</i>)
mAb	monoklonale Antikörper (<i>monoclonal antibody</i>)
MACS	<i>Magnetic Cell Separation</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplexes (<i>major histocompatibility complex</i>)
MIC	MHC-Klasse-I-verwandte Polypeptidsequenz
mNK	reife NK-Zelle (<i>mature NK-cell</i>)
mRNA	Boten-RNA (messenger-RNA)
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum (<i>microtubule organizing center</i>)
NCR	natürliche Zytotoxizitätsrezeptor (<i>natural cytotoxicity receptor</i>)
NK	Natürliche Killerzelle

NKAES	expandierte und aktivierte NK-Zellen (<i>NK cell activation and expansion system</i>)
NKC	Natürlichen-Killerzell-Komplex (<i>natural killer cell complex</i>)
NKG	Natürliche Killerzellgruppe
NKp	Natürliches Killerzellprotein
Pan	Alle
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll
PFA	Paraformaldehyd
PVR	Poliovirus-Rezeptor
q	Quantitativ
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Medium (Rosewell Park Memorial Institut)
RT	Raumtemperatur
SAP	SLAM-assoziiertes Adapterprotein
SBT	<i>sequence based typing</i>
SHP-1/2	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1/2</i>
SLAM	<i>signaling lymphocytic activation molecule</i>
SLT	sekundäres lymphatisches Gewebe (<i>secondary lymphoid tissue</i>)
sog.	sogenannte
Src, c-Src	<i>Cellular and sarcoma</i>
SSC	Seitwärts-Streulicht (<i>side scatter</i>)
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
Strep	Streptavidin
Tab.	Tabelle
Tel	telomerisch
TNF	Tumornekrosefaktor (<i>Tumor necrosis factor</i>)
T_{regs}	regulatorische T-Zellen
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
ULBP	UL16-Bindeprotein (UL16-binding protein)
z.B.	zum Beispiel

9.2 verwendete SI-Einheiten, Präfixe und abgeleitete SI-Einheiten mit besonderem Namen

°C	Grad Celsius	M	Molar
μ	Mikro-	n	Nano-
Da	Dalton	min	Minute
Gy	Gray	mol	Mol
h	Stunde	p	Piko-
k	Kilo-	s	Sekunde
l	Liter	U	Units
m	Milli-		

10. Erklärung

Die Konzeption dieser Arbeit sowie die Interpretation der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau *PD Dr. Dr. Maya Caroline André*, Leiterin der AG André an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen.

Die Daten in der vorliegenden Dissertation entstammen bis auf die Erstellung der viSNE-Analysen, welche von Frau *Dr. Ayline Kübler*, Postdoc der AG André durchgeführt wurden, meiner alleinigen experimentellen Arbeit.

Die Durchführung der vorliegenden Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen unter Betreuung von Herrn *Prof. Dr. Rupert Handgretinger* und Herrn *Prof. Dr. Dominik Hartl* durchgeführt.

11. Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlichst bei Frau *PD Dr. Dr. Maya Caroline André* für die Möglichkeit dieser Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe bedanken. Ebenso für ihre stetige und umfassende wissenschaftliche und moralische Begleitung; welche als “Doktor-Mutter“ und trotz physischer Distanz an den richtigen Stellen „getadelt“, beratschlagt und v.a. unterstützt hat! Ich danke dir, Maya!

Bei Herrn *Prof. Dr. Rupert Handgretinger* möchte ich mich für die wissenschaftliche Begleitung sowie der Bereitstellung der Labore und des Arbeitsplatzes an der Universitätskinderklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen bedanken.

Prof. Dr. Dominik Hartl danke ich für die bereitwillige Übernahme der Berichterstattung.

Der *Jürgen-Manchot-Stiftung* sowie Frau *Elvira Thormann* danke ich außerordentlich für die Förderung innerhalb eines Doktoranden-Stipendiums, ohne welches es nicht zu dieser Arbeit gekommen wäre!

Meinen Kollegen aus unserem Labor sowie der ganzen Forschungsebene, welche letztlich nicht nur Kollegen, sondern vielmehr Freunde geworden sind und z.T. mit Sicherheit bleiben; welche tagtäglich auch die stressigsten und frustrierendsten Labormomente einen haben überstehen und weitermachen lassen! Ich möchte mich für die Zusammenarbeit bedanken bei: *Marina Pal, Katharina Reinhardt-Heller, Karin Cabanillas-Stanchi, Aylina Kübler, Lisa Schwab, Franziska Wiese, Anne Krahl, Darina Siegmund, Sarah Bühler, Insa Hirschberger, Dr. Manon Queudeville, Jenny Rottenberger, Caroline Baden, Prof. Dr. Karin Schilbach, Katja Sonntag, Jenny Bauer, Evi Schmid, Matias Stagno, Dr. Dr. Markus Mezger, Andres Lamsfus Calle, Sabine Schleicher und allen hier nicht namentlich genannten, die mich begleitet haben!* Man konnte mit Euch fachsimpeln und über Probleme des Laboralltags diskutieren, aber wenn es gefordert war auch genauso über private Belange reden und den ein oder anderen lustigen Moment genießen! ☺ Danke für die gute Zeit!

Mein größter Dank gilt allerdings meiner *Familie*, welcher ich diese Arbeit widmen möchte: auch wenn Ihr den Inhalt meiner Monologe und Erzählungen bzgl. meiner Arbeit nicht immer verstehen konntet, wart Ihr immer für mich da und habt mich in allen Belangen bedingungslos unterstützt! Ohne Euch wär es nicht gegangen!!