

Einfluss von HLA-G1s auf die Proliferation und Zytotoxizität von NK92-Zellen und NK-Zellen

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

2003

von Andreas Schaumann
geboren am 24.09.1976 in Frankfurt am Main

Inhaltsverzeichnis

<u>Inhaltsverzeichnis.....</u>	<u>II</u>
<u>Abbildungsverzeichnis</u>	<u>IV</u>
<u>1. Verzeichnis der Abkürzungen</u>	<u>1</u>
<u>2. Zusammenfassung</u>	<u>3</u>
<u>3. Zielstellung</u>	<u>5</u>
<u>4. Einleitung</u>	<u>6</u>
4.1 Die MHC-Moleküle	8
4.1.1 MHC-Klasse II und III	8
4.1.2 MHC-Klasse I	8
4.1.2.1 Genomstruktur HLA-G und HLA-G1s	10
4.1.2.2 Struktur der HLA-G und HLA-G1s	10
4.1.2.3 3D-Struktur des HLA-G und HLA-G1s	12
4.1.2.4 Polymorphismus des HLA-G	13
4.1.2.5 Expressionsregulation von HLA-G und HLA-G1s	14
4.1.2.6 Zelluläre Expression des HLA-G und HLA-G1s	20
4.2 Natürliche Killerzellen	22
4.2.1 Entwicklung Natürlicher Killerzellen	22
4.2.2 NK-Zellaufgabe	23
4.2.3 NK-Zellsubtypen	24
4.2.4 Erkennung von Targetzellen durch NK-Rezeptoren	24
4.2.4.1 NK-Zell Immunoglobulin Rezeptoren	26
4.2.4.2 NK-Rezeptoren der C-type Lectin Familie	27
4.2.4.3 Natural Cytotoxicity Receptors	29
4.2.4.4 Sonderfall NKG2D-Rezeptor	29
4.2.4.5 Rolle der NCR und NKG2D in NK-zellvermittelter Tumorbekämpfung	31
4.2.4.6 Weitere Membranrezeptoren zur Modulation der NK-Zellfunktion	31
<u>5. Material und Methoden</u>	<u>32</u>
5.1 Antikörperproduktion W6/32	32
5.2 W6/32 beschichtete Sepharosekügelchen	33
5.3 Produktion des HLA-G1s	34
5.4 HLA-G1s Reinigung aus 221.G1s Zellkulturüberständen	35
5.5 NK-Zellkultur	36
5.6 K562-Zellkultur	37
5.7 NK-Zellseparation aus peripherem Blut	38
5.8 Biotinylierung von Proteinen	39
5.9 HLA-G1s-ELISA	40
5.10 Gelelektrophorese und Westernblot	42
5.11 ⁵¹ Cr-Release Cytotoxicity Assay	44
5.12 Sulforhodamin B Proliferations Test	45
5.14 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	47
5.15 FACS-Analyse	47
<u>6. Ergebnisse</u>	<u>50</u>
6.1 Ergebnisteil I	50
6.1.1 Das Vorkommen von HLA-G1s in Blutproben von Mutter und Foetus	50
6.2 Ergebnisteil II	51

6.2.1 Sulforhodamin B Proliferationstest.....	51
6.3 Ergebnisteil III.....	58
6.3.1 CellTiter Proliferationstest.....	58
6.3.2 FACS Analyse CD71, CD25, CD56.....	60
7. Diskussion.....	67
7.1 HLA-G1s in Mutter und Foetus.....	67
7.2 Kritische Betrachtung der eigenen Ergebnisse.....	68
7.2.1 Sulforhodamin B Proliferationstest.....	68
7.2.2 MTT Proliferationstest.....	68
7.2.3 ⁵¹ *Cr Zytotoxizitätstest.....	68
7.2.4 Celltiter 96 Proliferationstest.....	69
7.2.5 FACS Analyse des Vorkommens von CD71, CD25 und CD56.....	69
7.3 Interpretation der Ergebnisse anhand publizierter Studien.....	70
7.3.1 NK-Zell Immunoglobulin Rezeptoren.....	70
7.3.2 Rezeptoren der Immunoglobulin Superfamilie.....	71
7.3.3 NKG2A Rezeptoren.....	71
7.3.4 Sonderfall NKG2D Rezeptor und sein Ligand MIC.....	72
7.4 Die Rolle des HLA-G1s während Schwangerschaft.....	72
7.5 Die Rolle des HLA-G1s in pathophysiologischen Vorgängen.....	73
8. Schlussfolgerungen.....	75
9. Anhang.....	76
9. Anhang.....	76
Literaturverzeichnis.....	76
Publikation.....	87
Danksagung.....	88
Ehrenwörtliche Erklärung.....	89
Lebenslauf.....	90

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Die MHC-Klasse I im Überblick	9
Abbildung 2	Transkriptionelle und Proteinisoformen des HLA-G	11
Abbildung 3	Transkriptionelle und Proteinisoformen des HLA-G1s	12
Abbildung 4	Kristallographische Darstellung von HLA-A2	13
Abbildung 5	Fixation der Transkriptionsfaktoren an die Promotoren der HLA-Klasse I	16
Abbildung 6	Modell der HLA-G1 sowie HLA-G1s- β 2m-Protein Synthese	19
Abbildung 7	Interaktion inhibierender und aktivierender Rezeptoren auf NK-Zellen	25
Abbildung 8	KIR2DL und KIR2DS	26
Abbildung 9	CD94/NKG2A und CD94/NKG2C	28
Abbildung 10	CD94/NKG2D	30
Abbildung 11	HLA-G1s-ELISA Ergebnis	50
Abbildung 12	Sulforhodamin-B-Test 24h Ergebnis	51
Abbildung 13	Sulforhodamin-B-Test 48h Ergebnis	52
Abbildung 14	Sulforhodamin-B-Test 72h Ergebnis	53
Abbildung 15	MTT-Test 24h Ergebnis	54
Abbildung 16	MTT-Test 48h Ergebnis	55
Abbildung 17	MTT-Test 72h Ergebnis	56
Abbildung 18	^{51}Cr Zytotoxizitätstest Ergebnis	57
Abbildung 19	CellTiter-Test 24h Ergebnis	58
Abbildung 20	CellTiter-Test 48h Ergebnis	59
Abbildung 21	CellTiter-Test 72h Ergebnis	60
Abbildung 22	FACS-Analyse CD71/CD25 24h Ergebnis	61
Abbildung 23	FACS-Analyse CD71/CD25 48h Ergebnis	62
Abbildung 24	FACS-Analyse CD71/CD25 72h Ergebnis	63
Abbildung 25	FACS-Analyse CD71/CD56 24h Ergebnis	64
Abbildung 26	FACS-Analyse CD71/CD56 48h Ergebnis	65
Abbildung 27	FACS-Analyse CD71/CD56 72h Ergebnis	66

1. Verzeichnis der Abkürzungen

µg/ml	Mikrogramm/Milliliter
3`UT	3`nicht translatierte Region
51*Cr	51* Chrom
AP1	Activator Proteins 1
AP2	Activator Proteins 2
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
CD	Cluster of differentiation
CpG	5`-Cytosinphosphat-Guanin-3`
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Falcons	Plastikreagenzgefäße
GAS	Gamma-Interferon-Activated-Sequenz-Motif
HLA	Human-Leukocyte-Antigene
HLA-G1s	Human-Leukocyte-Antigene G1 soluble
HSE	Heat-Shock-Element
HSF1	Heat-Shock-Factor1
HSP	Heat-Shock-Protein
ICS-BP	Interferon-Consensus-Factor-Binding-Protein
IFN-α, -β, -γ	Interferon-α, -β, -γ
IL-15	Interleukin-15
IL-2	Interleukin-2
ILT	Immunoglobulin-Like-Transcripts
IRF	Interferon-Regulatory-Factor
ISRE	Interferon-Stimulated-Response-Element
ITAM	Immunoreceptor Tyrosin-Based Activatory Motifs
ITIM	Immunoreceptor Tyrosin-Based Inhibitory Motifs
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KIR2DL	Killercell Immunoglobulinlike Receptor mit kurzem zytoplasmatischem Schwanz
KIR2DS	Killercell Immunoglobulinlike Receptor mit langem zytoplasmatischem Schwanz
L	Leaderpeptide
LCR	Locus-Control-Region
LIF	Leukemia-Inhibitory-Factor
LIR	Leukocyte-Immunoglobulinlike-Receptor
MBP1	MHC Enhancer Binding Factor 1
MHC-Klasse Ia	Major-Histocompatibility Complex Klasse I
MIC	MHC-Klasse I Chain-related Antigene

mMolar	millimolar
NCR	Natural Cytotoxicity Receptor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NRE	Negative-Response-Element
OPD	O-phenyldiamine-Peroxidase
PI-3 Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PRDII B F1	IFN- β second positive regulatory domain binding factor 1
	messenger-RNA-Reverse-Transkriptase-
RNAm-RT-PCR	Polymeraseketten-Reaktion
RPMI	Rockwell Park Memorial Institute
TM	transmembranär
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
UL16	CMV Protein UL16
ULBP	UL-16 Binding Proteins
UPE	Upstream Element
ZMV	Zytomegalievirus
β 2m	β 2-Mikroglobulin

2. Zusammenfassung

Ziel In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen der Natürlichen Killerzelllinie 92 (NK92-Zelllinie) und Natürliche Killerzellen des peripheren Blutes (Blut-NK-Zellen) unter dem Einfluss von Human Leukocyte Antigene G1 soluble (HLA-G1s) in verschiedenen Konzentrationen (0,2µg/ml-2,0µg/ml) auf ihre Proliferationsaktivität zu verschiedenen Zeitpunkten (24, 48 und 72 Stunden nach Versuchsbeginn) und Zytotoxizität gegenüber der K562-Zelllinie untersucht. Es sollte geprüft werden, inwieweit HLA-G1s die Proliferation und Zytotoxizität der NK-Zellen moduliert.

Grundlagen HLA-G1s ist ein oligomorphes, lösliches Protein, der MHC-Klasse Ib, welches immunmodulatorische Fähigkeiten besitzt. Es wird von extravillösen Zytotrophoblasten, fetalen Endothelzellen der Chorionzotten, dem Amnionepithel sowie Zellen des Thymus exprimiert. Es ist in verschiedensten Konzentrationen in Blutseren von Mutter und Foetus nachweisbar. Dies ist auf den Genotyp des HLA-G zurückzuführen.

Methoden HLA-G1s wurde von transfizierten Lymphoblasten in das Kulturmedium sezerniert und aus diesem heraus mit Hilfe des zuvor produzierten Antikörper W6/32 aufgereinigt. Die Proliferation wurde mit drei verschiedenen quantitativen, colorimetrischen Proliferationstests (Sulforhodamin-B-Test, MTT-Test und CellTiter-Test) gemessen, wobei diese sich im Ansatzpunkt der Bestimmung und dem systematischen Fehler unterscheiden. Die Zytotoxizität wurde mit dem quantitativen ^{51}Cr Zytotoxizitätsassay untersucht. Die Expression der Proliferationsmarker CD71 und CD25 sowie CD56 wurde mit Hilfe von spezifischen FACS-Antikörpern im Durchflusszytometer bestimmt. CD71 ist der ubiquitär vorkommende Transferrin Rezeptor, der die proliferierenden Zellen mit Eisen versorgt. CD25 ist die IL-2R α -Kette des IL-2 Rezeptors und wird von den NK-Zellen zur Proliferation benötigt. CD56 ist das N-CAM, ein Zelladhäsionsmolekül, welches neben den Nervenzellen noch auf den NK-Zellen vorkommt und hier als Differenzierungsmerkmal dient. Von der im Labor kultivierten NK92-Zelllinie wurde NK92-Zellen zur Versuchsdurchführung benutzt. Die nativen NK-Zellen wurden mittels MACS (Magnet Activated Cell Separation) negativ aus dem peripher-venösen Blut gesunder Erwachsener selektiert und mit CD3, CD16 und CD45 Antikörpermarkierung auf ihre Reinheit überprüft (jeweils >80%).

Ergebnisse Die verschiedenen getesteten HLA-G1s Konzentrationen (0,2µg/ml-2,0µg/ml) wirken im Sulforhodamin-B-Proliferationstest und MTT-Proliferationstest zu keinem Zeitpunkt der Versuche (24, 48 und 72 Stunden nach Versuchsbeginn) inhibierend auf die Proliferation der NK92-Zelllinie, die sich aufgrund der Proliferationsstimulation der Erhaltungskultur mit IL-2 fast ausschließlich aus CD56^{bright} NK-Zellen zusammensetzt. Ebenso wirkt HLA-G1s im ^{51}Cr -Zytotoxizitätstest in keiner Konzentration (0,5µg/ml-2,0µg/ml) inhibierend auf die Zytotoxizität

der NK92-Zellen den K562-Zellen gegenüber. HLA-G1s hat in der Konzentration von 0,25µg/ml einen protektiven Einfluss auf K562-Zellen und scheint deren spontane Apoptose zu hemmen. Die verschiedenen getesteten HLA-G1s Konzentrationen (0,2µg/ml-2,0µg/ml) wirken zu allen Zeitpunkten der Versuche (24, 48 und 72 Stunden nach Versuchsbeginn) inhibierend auf die Proliferation der peripheren Blut-NK-Zellen, die sich zu mehr als 80% aus CD56^{dim} NK-Zellen und weniger als 20% aus CD56^{bright} Zellen zusammensetzen. Aus den Durchflusszytometeranalysen geht hervor, dass HLA-G1s in der Konzentration von 1µg/ml die Expression von CD71, CD25 und CD56 in ruhenden NK-Zellen nicht beeinflusst, jedoch bei IL-2 stimulierten NK-Zellen die Expression von CD71, CD25 und CD56 auf das Niveau der Kontrollgruppe drückt.

Diskussion HLA-G1s hat inhibitorischen Einfluss auf native Blut-NK-Zellen, was sich in einer verminderten Proliferationsmarkerexpression und Proliferation von aktivierten NK-Zellen bemerkbar macht. Auf die Zellen der ruhende und aktivierte NK92-Zellen hat HLA-G1s keinen Einfluss. Dies kann in der pathologische Transformation oder der langfristige Kultivierung der NK92-Zellen mit IL-2, welches zu Rezeptorveränderungen führt, begründet sein. Neben dem Vorkommen in der Plazenta und dem Thymus wurde HLA-G1s auch bei verschiedenen pathologischen Vorgängen nachgewiesen. Im Zuge der Tumorgenese kommt es zu Demethylierungen, die eine HLA-G1s Expression nach sich ziehen. Die HLA-G1s Produktion dient dem „Immune Escape“ durch Inhibition der aktivierten NK-Zellen und Apoptoseeinleitung der CD8⁺ T-Lymphozyten. Zu diesen Tumoren gehören Gliome, Mammacarcinome, Non-Hodgkin-Lymphome sowie Melanome. Auf den Monozyten HIV-1 infizierter Patienten wurde es ebenfalls nachgewiesen. Auch kommt es in ausgedehnten Entzündungsherden zur Expression von HLA-G1s, was der Gewebeprotektion dienen soll.

Schlussfolgerung Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass HLA-G1s einen signifikanten immunmodulatorischen Einfluss auf das Immunsystem des Menschen ausübt. Es führt zu einer Inhibition der Proliferation und Differenzierung von aktivierten CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zellen und löst Apoptose bei CD8⁺ T-Lymphozyten aus. HLA-G1s scheint einen wichtigen Einfluss auf die immunologische Akzeptanz des semiallogenen Schwangerschaftsproduktes zu nehmen, wenn auch gleich der Stellenwert des HLA-G1s in der Schwangerschaft noch genauer zu untersuchen ist. Die physiologische Funktion des HLA-G1s scheint sich auch pathophysiologisch auszuwirken: verschiedene Erkrankungen nutzen die Möglichkeit des Immune Escapes durch Expression des immunmodulatorisch wirksamen HLA-G1s. Der genaue Stellenwert des HLA-G1s im Immunsystem ist Gegenstand weiterer Forschung mit dem Ziel der therapeutischen Anwendung z.B. bei Infertilität, Infektionen und Tumorerkrankungen.

3. Zielstellung

Ziel dieser Studie war die Untersuchung des Einflusses des zur MHC-Klasse Ib gehörenden HLA-G1s in physiologischen sowie bis 100x stärker konzentrierten Dosierungen auf die NK-Zelllinie NK92 und NK-Zellen des peripheren Blutes gesunder Erwachsener.

Die NK-Zellen sollten mittels MACS auf eine Konzentration von über 80% aufgereinigt werden. Die Reinheit wurde dann durchflusszytometrisch überprüft. Es sollte untersucht werden, ob HLA-G1s die Proliferation und Zytotoxizität sowie die Expression verschiedener Oberflächenrezeptoren der NK-Zellen über Inkubationsverläufe von 24, 48 und 72 Stunden moduliert.

Zunächst wurden die Versuche an der überwiegend CD56^{bright} NK92 Zellkultur, die sich durch stabiles Wachstum auszeichnet, durchgeführt. Nach ersten Ergebnissen wurden die Versuche auf periphere Blut-NK-Zellen ausgeweitet, die zu mehr als 80% als CD56^{dim} klassifiziert werden.

Zur Bestimmung der Proliferation wurden drei verschiedene Proliferationstest (Sulforhodamin B, MTT und CellTiter) mit jeweils unterschiedlichen Enzymaktivitätsmesspunkten gewählt.

Die Zytotoxizität wurde mit Hilfe des ⁵¹Cr Zytotoxizitätsassay bestimmt, bei dem zerstörte K562 Zielzellen zur Erhöhung der Radioaktivität im Überstand führen.

Die Expression der CD71 (Transferrinrezeptor, Proliferationsmarker), CD25 (IL-2R α , Aktivierungsmarker) und CD56 (N-CAM, Differenzierungsmarker) wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

Folgende Hypothesen sollten überprüft werden:

HLA-G1s inhibiert

- die Proliferation der CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zellen,
- die Zytotoxizität der CD56^{bright} NK-Zellen gegenüber Zielzellen,
- die Expression des Transferrin- und des IL-2-Rezeptoren auf der CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zelloberfläche

4. Einleitung

Eine Vielzahl verschiedener Pathogene (Viren, Bakterien, Parasiten, etc...) bedroht permanent die Unversehrtheit unseres Organismus. Das Immunsystem spielt bei der Erkennung und Bekämpfung pathologischer Besiedlungen neben physiologischen Barrieren die Hauptrolle. Major-Histocompatibility-Rezeptoren (MHC-Rezeptoren), erstmals entdeckt in Zusammenhang mit Transplantatabstoßungen (Dausset, 1958), tragen hauptsächlich zu dem Schutz des Organismus bei. Sie werden auf der Zelloberfläche exprimiert, wo sie mit T-Lymphozyten in Interaktion treten. $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten vermitteln dann zusammen mit den Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) die Immunantwort, welche bei Inkompatibilität der Gewebe in der Lyse der fremden Zellen mündet. Das Prinzip der Restriktion der Immunantwort wurde erstmals 1974 von Zinkernagel und Doherty (Zinkernagel und Doherty, 1974) erforscht.

Die MHC-Moleküle des Menschen, auch HLA (Human-Leukocyte-Antigene) genannt, werden in 2 Typen eingeteilt: MHC-Klasse I und MHC-Klasse II. MHC-Klasse I Moleküle werden auf der Oberfläche fast aller somatischen Zellen exprimiert und spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Bekämpfung viral infizierter, tumorös veränderter Zellen sowie allogen- oder xenogen-transplantiertes Gewebe durch das Immunsystem. NK-Zellen erkennen diese Moleküle über inhibitorische oder aktivierende Rezeptoren und erhalten somit positive oder negative Signale, die zu einer Stimulation oder Inhibition der lytischen NK-Zellaktivität führen.

Erstaunlicherweise sind während der Schwangerschaft diese „Grundgesetze“ der Immunologie, welche die sofortige Vernichtung eingedrungener fremder Zellen postulieren, außer Kraft gesetzt. Während der Schwangerschaft, in der das eingenistete Kind als semi-allogenes (50% maternales und 50 % paternales Erbgut) Transplantat angesehen werden kann, befinden sich maternale und fötale Zellen in regem Austausch.

Dieses Phänomen stellt wichtige Fragen an die momentan gültige Vorstellung des humanen Immunsystems.

1953 postulierte Medawar verschiedene Hypothesen, die dieses Paradoxon erklären könnten:

1. Unreife der Antigeneigenschaften fötaler Zellen,
2. Toleranz durch das maternale Immunsystem,
3. räumliche Trennung des Fötus und der Mutter durch die Plazenta.

Im Laufe der letzten Jahre stellte sich durch die weitere Erforschung der foetal-maternalen Grenzschicht ein Zusammenspiel unterschiedlicher Mechanismen als sehr wahrscheinlich heraus. Ein spezielles Zytokinprofil (Raghupathy, 1997), die Anergie der $CD8^+$ T-Lymphozyten gegen paternale Alloantigene (Tafari et al., 1995) und der Einfluss des lokalen Tryptophankatabolismus (Munn et al., 1998) stellen dabei wichtige Determinanten dar. Desweiteren ist die restringierte

Expression der nicht klassischen MHC-Klasse I in der Plazenta ebenso von großer Bedeutung. Mit der neuerdings möglichen Produktion von klassischen und nicht klassischen HLA-Klasse Molekülen ist nun die Erforschung ihrer direkten Einflüsse auf NK-Zellen möglich geworden.

4.1 Die MHC-Moleküle

Das MHC Genom ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 an Position 6p21.3 lokalisiert. Es besteht aus ungefähr 4000 Kilobasen (kB) (Dunham et al., 1987), einer sehr dichten Ansammlung von Genen, denen vielfältige immunologische Funktionen zugeschrieben werden. Forbes und Trowsdale (Forbes und Trowsdale, 1999) erstellten eine Karte der ungefähr 200 Gene, Pseudogene und Fragmente der MHC-Moleküle.

Sie werden folgendermaßen klassifiziert:

Region MHC-Klasse I, liegt in telomerer Position und ist mit 2000 kB die größte Region. HLA-G und HLA-G1s als MHC-Klasse I Molekül liegen hier kodiert vor.

Region MHC-Klasse II, liegt an centromerer Position und besteht aus 900 kB.

Region MHC-Klasse III, liegt an intermediärer Position und wird von 1100 kB repräsentiert.

4.1.1 MHC-Klasse II und III

Die Region MHC-Klasse II setzt sich aus ca. 40 Genen und Pseudogenen (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) zusammen, die die MHC-Klasse II kodieren. Diese polymorphen Moleküle bestehen aus jeweils 2 Ketten, einer α -Kette (31-34 kDa) und einer β -Kette (26-29 kDa). Sie formen ein Heterodimer auf der Zelloberfläche und präsentieren den $CD4^+$ T-Lymphozyten exogene Proteinstücke.

In der MHC-Klasse III sind ca. 70 Gene lokalisiert, zu denen die Komplementfaktoren C2, C4a, C4b (Campbell, 1988), der TNF (Spies et al., 1986) sowie die Heat-Shock-Proteins HSP 70-1 und HSP 70-2 gehören.

4.1.2 MHC-Klasse I

Die Region MHC-Klasse I: In der Telomerregion des Chromosoms 6 findet sich alle 20 kB ein Gen (Forbes und Trowsdale, 1999), was einer äußerst hohen Dichte entspricht.

Schematisch gesehen findet man dort 3 Kategorien von Genen:

1. Gene der MHC-Klasse I
2. Pseudogene
3. HLA-Klasse 1 assoziierte Gene

Gene der MHC-Klasse I

Die Gene der MHC-Klasse I werden in zwei Unterklassen aufgeteilt:

1. Gene der klassischen MHC-Klasse I (auch genannt MHC-Klasse Ia) und
2. Gene der nicht-klassischen MHC-Klasse I (auch genannt MHC-Klasse Ib).

(siehe ABBILDUNG 1)



Abbildung 1 Die MHC-Klasse I im Überblick

Die Gene der MHC-Klasse Ia kodieren HLA-A, HLA-B sowie HLA-C. Strukturell bestehen die HLAs aus jeweils einer schweren Kette (45 kDa) und einer leichten Kette (12 kDa). Das mit Ihnen nicht-kovalent verbundene β 2-Mikroglobulin ist auf Chromosom 15 kodiert. Sie sind polymorph und kommen

auf allen somatischen Zellen, mit Ausnahme von Germinalzellen und bestimmten Subpopulationen der Plazenta, vor. Die Aufgabe der HLAs ist die Fixierung und Präsentation endogener sowie exogener Peptidstücke (Rock, 1996) gegenüber NK-Zellen und CD8⁺ T-Lymphozyten. Sie induzieren dadurch den Erhalt oder die Lyse der Zelle durch NK-Zellaktivierung oder NK-Zellinaktivierung.

Die Gene der MHC-Klasse Ib kodieren HLA-G, HLA-E sowie HLA-F. Sie sind denen der MHC-Klasse Ia strukturell sehr ähnlich. Das Vorkommen im Gewebe ist jedoch restringiert und es besteht kein Polymorphismus. Ihre Funktion ist noch nicht umfassend geklärt. Dennoch weiß man, dass HLA-G und HLA-E die Zytotoxizitätsaktivität der NK-Zellen modulieren. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Einfluss des HLA-G1soluble auf NK-Zellen.

Pseudogene

Aus vielfältigen Mutationen in der Promotorregion des Strukturgens gingen verschiedene Pseudogene hervor. Hierzu gehören unter anderem HLA-J, HLA-K und HLA-L in der Nähe von HLA-A, vier weitere (HLA-16, HLA-75, HLA-80 HLA-90) sowie drei Genfragmente HLA-17, HLA-21 und HLA-30.

MHC-Klasse I assoziierte Gene

HLA-H (HFE) ist auf Chromosom 6 lokalisiert, auch mit β 2-Mikroglobulin assoziiert, führt aber keine immunologische Funktion aus, sondern ist für den Eisentransport in Zusammenarbeit mit Transferrin von Bedeutung (Feder et al., 1998). Eine Mutation des HFE-Gens in der

Assoziationsstelle mit β 2-Mikroglobulin ist verantwortlich für die hereditäre Hämochromatose (Feder et al., 1996).

4.1.2.1 Genomstruktur HLA-G und HLA-G1s

Das Genom des HLA-G besitzt die gleiche Struktur wie die Gene der MHC-Klasse Ia: acht Exons, getrennt durch sieben Introns, kodieren die Leadersequence (Exon 1), drei extrazelluläre Domänen α 1, α 2 und α 3 (Exon 2, Exon 3 und Exon 4), eine transmembranäre Domäne (Exon 5), eine zytoplasmatische Domäne (Exon 6 und Exon 7) und eine nicht translatierte 3' Region (Exon 8). Ebenso besteht eine nicht-kovalente Bindung mit β 2-Mikroglobulin (Geraghty et al., 1987). (siehe ABBILDUNG 2)

HLA-G1s und HLA-G2s haben in Intron 4 ein Stopcodon, welches nicht herausgeschnitten wird. (siehe ABBILDUNG 3)

Die meisten strukturellen Merkmale der MHC-Klasse Ia finden sich auch bei der MHC-Klasse Ib. Dazu gehören die Cystinwiederholungen (Position 101-164 und 203-259), die die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen der α 2 und α 3 Domäne zulassen; ebenso die N-Glykosylierung von Asparagin (Pos. 86) am Übergang der α 1 Domäne in die α 2 Domäne. Desweiteren bestehen die notwendigen Basenwiederholungen zur Interaktion mit dem CD8-Rezeptor, das Alanin an Pos. 245 und eine negativ geladene Bindungstasche an Pos. 223-229 (Norment et al., 1988). Der einzige Unterschied dieser Domäne liegt in dem Austausch von Threonin gegen Valin an Pos. 228, welches normalerweise bei allen HLA-A, HLA-B und HLA-C vorliegt. HLA-G kann mit CD8 α/α eine Bindung eingehen (Sanders et al., 1991). Ihre Bindungsaffinität liegt im mittleren Bereich, der für die Bindungsaffinität der MHC-Klasse Ia angegeben wird (Gao et al., 2000). HLA-G hat eine aus 27 Aminosäuren bestehende hydrophobe transmembranäre Domäne. Aus den Domänen α 1 und α 2 sind insgesamt 19 Aminosäuren für die Fixierung und Präsentation von Peptidstücken den T-Zellrezeptoren gegenüber verantwortlich. Im Gesamtüberblick bestehen zu 86% Homologien mit der MHC-Klasse Ia. Im Einzelnen liegen die Übereinstimmungen bei 81% für α 1, bei 85% für α 2 und sogar bei 91% für α 3.

4.1.2.2 Struktur der HLA-G und HLA-G1s

HLA-G und HLA-G1s unterscheidet sich in Genomstruktur und Proteinstruktur nur durch das Vorhandensein eines Stopcodons in Intron 4.

HLA-G-Struktur

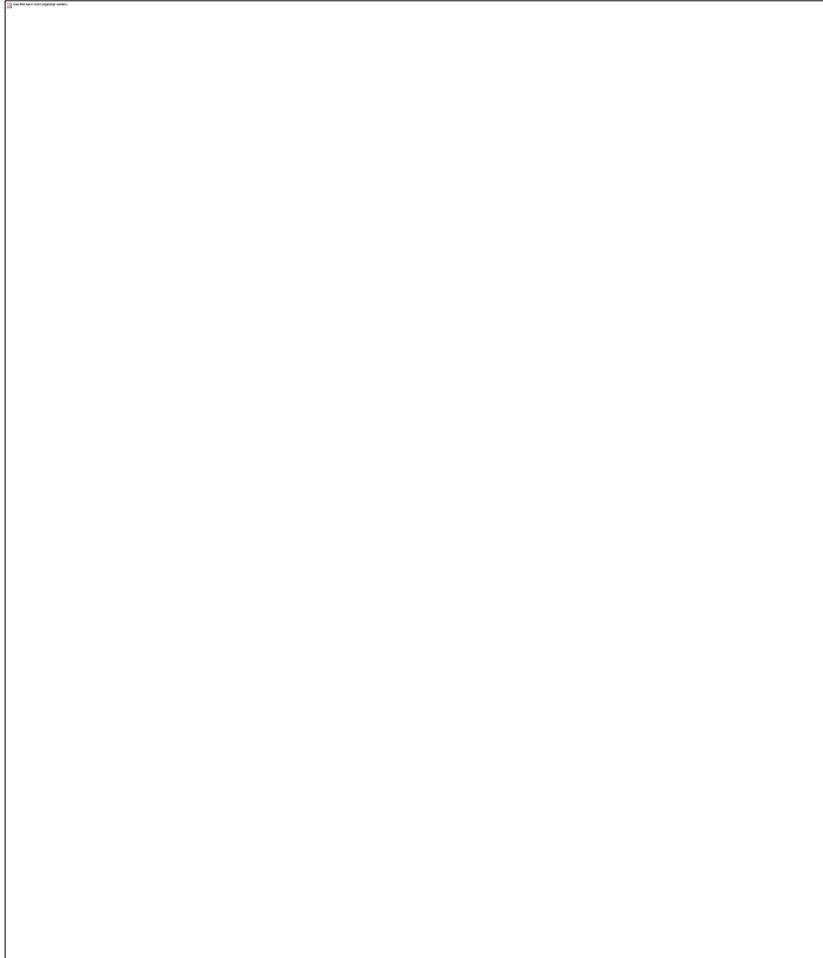


Abbildung 2 Transkriptionelle und Proteinisoformen des HLA-G
(nach Ishitany et Geraghty, 1992; Kirzenbaum et al., 1994)

L – Leadersequenz, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ - Extrazelluläre Domänen,

Tm - Transmembranäre Domänen, C - Cytoplasmatische Domäne,

* - Stopcodon, 3'UT - not translated region, $\beta 2m$ – $\beta 2$ -Mikroglobulin

ER = Endoplasmatisches Retikulum
Substrat der Tyrosinkinase (Guild et al., 1983). Dadurch kommt es zu Unterschieden in der Signaltransduktion (Geraghty et al., 1987) sowie zu einer verminderten Re-internalisierung des HLA-G (Davis et al., 1997) im Vergleich zur MHC-Klasse Ia. Aufgrund dieser Deletion hat HLA-G auch ein geringeres Gewicht als die HLA der MHC-Klasse Ia.

Von HLA-G existieren verschiedene transkriptionelle Isoformen, die aus alternativen Splicevorgängen einer oder zweier Exons der extramembranären Domäne hervorgehen (Ishitani und Geraghty, 1992). (siehe ABBILDUNG 2)

Man unterscheidet die Isoformen HLA-G1 (größte Isoform, alle drei extrazellulären Domänen beinhaltend) sowie HLA-G2, HLA-G3 und HLA-G4, bei denen die Domäne $\alpha 2$ (Exon 3), die Domänen $\alpha 2$ und $\alpha 3$ (Exon 3 und Exon 4) sowie die Domäne $\alpha 3$ (Exon 4) fehlen (Le Bouteiller et al., 1999).

Strukturell bestehen zwischen den beiden MHC-Klassen Ia und Ib einige Unterschiede. Der erhebliche Unterschied liegt in der Gegenwart eines Stopcodons in der zyttoplasmatischen Domäne des HLA-G (Exon 6); es resultiert ein nur 6 AS langer zyttoplasmatischer Schwanz im Vergleich zu ca. 30 AS bei der MHC-Klasse Ia. Dabei fehlen die Phosphorylierungsstelle (Serin Pos. 336), bedeutend im Prozess der Internalisierung von Molekülen der MHC-Klasse Ia (Guild und Strominger, 1984), und das Tyrosin (codiert in Exon 6), das

HLA-G1s Struktur

Durch alternatives Splicen der Isoform HLA-G1, ausgelöst durch ein Stopcodon in Intron 4, welches nicht herausgeschnitten wird, kommt es zu einem 21 AS langen Anhang an die $\alpha 3$ Domäne, aber auch zum kompletten Fehlen der membranären und zytoplasmatischen Domäne. Diese Isoform heißt HLA-G5, besser bekannt als HLA-G1soluble (HLA-G1s). Durch einen identischen Vorgang bei der Isoform HLA-G2, kommt es zur Entstehung von HLA-G6 - besser bekannt als HLA-G2s (Le Bouteiller et al., 1999). (siehe ABBILDUNG 3)

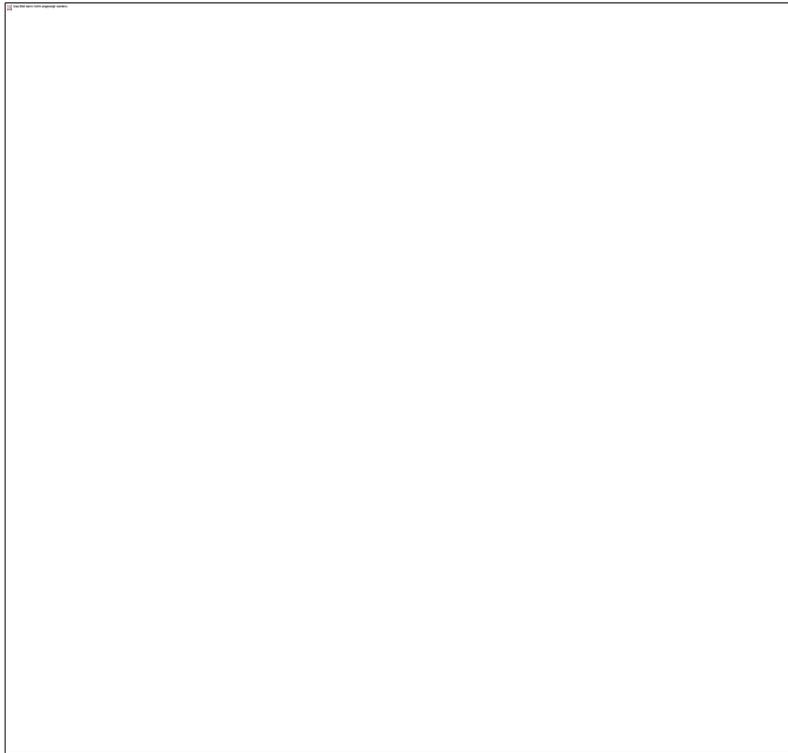


Abbildung **Fehler! Textmarke nicht definiert.** Transkriptionelle und Protein-Isoformen HLA-Gs

(nach Fuji et al., 1994)

L – Leadersequenz, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ - Extrazelluläre Domänen,

Tm - Transmembranäre Domänen, C - Cytoplasmatische Domäne,

* - Stopcodon, 3'UT - not translated region, $\beta 2m$ – $\beta 2$ -Mikroglobulin

<!--[if !vml]--><!--[endif]-->

Noch eine dritte lösliche Form wurde beschrieben (HLA-G7), sie ist charakterisiert durch das Vorhandensein von Intron 2 neben Intron 4 und jeweils darin vorkommenden Stopcodons. Es besteht deshalb nur aus der Domäne $\alpha 1$ und einem 2 AS langen Anhang aus Intron 2 (Paul et al., 2000a).

Auch bei der MHC-Klasse Ia (HLA-A und HLA-B) gibt es alternative Splicevorgänge, hier jedoch in Exon 5, also der transmembranären Domäne (Kragel, 1985).

4.1.2.3 3D-Struktur des HLA-G und HLA-G1s

Bisher wurde noch keine kristallographischen Untersuchungen von HLA-G und HLA-G1s durchgeführt

Die extrazellulären Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ stellen mit acht β -Faltblattstrukturen und zwei α -Helices die Peptidfixationstasche dar (Madden, 1995). Weitergehende Untersuchungen der Bindungstasche beschreiben sechs Abschnitte (A-F), die die Bindung mit den Seitengruppen des Peptids ermöglichen (Barber und Parham, 1993). Die Abschnitte A und F an den jeweiligen Enden sind bei den verschiedenen Allelen monomorph, ganz im Gegensatz zu den Abschnitten B bis E. Diese

determinieren die Spezifität der Bindungstasche. Die Bindungstasche ist an beiden Enden geschlossen und erlaubt die Fixierung von Peptiden mit acht bis zehn AS. Diese Struktur wird

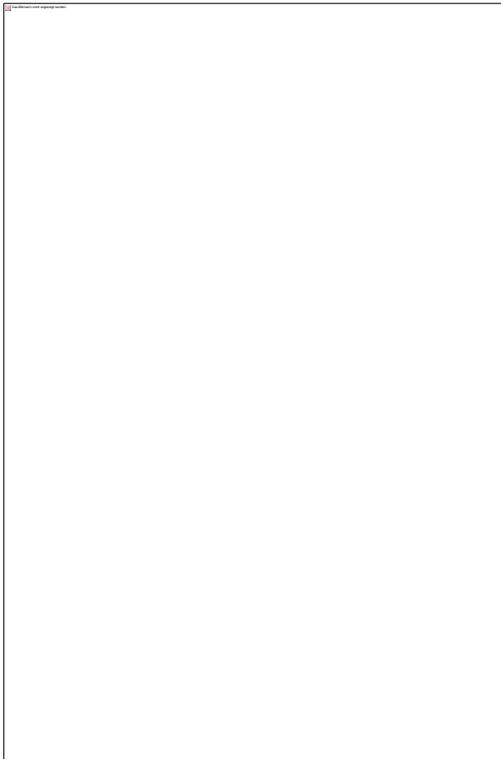


Abbildung 4 Kristallographische Darstellung von HLA-A2

(A) Es sind die $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ Domäne, das $\beta 2$ -Mikroglobulin sowie die schwere Kette zu sehen.

(B) Aufsicht auf Fixationstasche zwischen α -helices und β -Faltblatt der $\alpha 1$ und $\alpha 2$ -Domäne

durch drei AS charakterisiert: Tryptophan und Tyrosin an Position 167 und 171 in Abschnitt A, sowie Tyrosin an Position 84 in Abschnitt F. $\beta 2$ -Mikroglobulin interagiert mit allen drei Domänen, die Bindung mit $\alpha 3$ ist jedoch die Stärkste. Untersuchungen des HLA-G zeigen eine komplette Konservierung des Abschnittes A, Abschnitt B hingegen ist negativer geladen als in der MHC-Klasse Ia.

Vielfältigen Analogien mit den Molekülen der MHC-Klasse Ia legen eine sehr ähnliche 3D-Struktur nahe. Dies gilt besonders für die Ähnlichkeit mit HLA-A2 (Bjorkman et al., 1987). (siehe ABBILDUNG 4)

4.1.2.4 Polymorphismus des HLA-G

Die Gene der MHC-Klasse Ia weisen einen sehr hohen Polymorphismus auf: Es werden 414 Allele für

Locus B, 209 Allele für Locus A und 101 Allele für Locus C beschrieben, wobei die untersuchten Individuen meistens heterozygot waren (Marsh et al., 2001) (Robinson et al., 2001) Dieser Polymorphismus betrifft hauptsächlich die Exone der Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$, die die Proteinbindungstasche und die Andockungsregion mit den T-Zellen (TcR) kodieren (Parham, 1988).

HLA-G wurde nur ein sehr geringer Polymorphismus nachgewiesen, welcher sich in einzelnen Nukleotidsubstitution ausdrückt (Geraghty et al., 1987). Bis jetzt wurden insgesamt 15 Allele gefunden, acht synonyme Allele sowie sieben Allele mit jeweils einer ausgetauschten AS. All diese wurden in verschiedenen Populationen detektiert (Robinson et al., 2001). Van der Ven veröffentlichte 1998 (van der Ven et al., 1998) weitere 26 synonyme Allele, vornehmlich der $\alpha 1$ Domäne und $\alpha 2$ Domäne. Diese Arbeit konnte aber sogar unter Zuhilfenahme speziellerer Techniken (RNAm-RT-PCR) (Ishitani et al., 1999) nicht reproduziert werden und wird deshalb sehr kontrovers diskutiert.

Zusammenfassend gibt es nur einen sehr limitierten Polymorphismus des HLA-G, welcher keinesfalls die Peptidbindungsstelle oder die CD8-Fixierungsstelle betrifft. Dieses spiegelt einen hohen Selektionsdruck bezüglich der Beibehaltung der Funktion und des genauen Aufbaus des Proteins wider.

Auch in der nicht translatierten 3`Region wurden verschiedene Mutationen nachgewiesen (Alizadeh et al., 1993). So fand sich bei der australischen Urbevölkerung eine Insertion/Deletion von 14 Basenpaaren in Exon 8. Andere Studien belegen mit Hilfe der DNA-PCR zwei Polymorphismen von drei und 51 Basenpaaren in der nicht translatierten 3`Region (Castro et al., 2000). Der Einfluss dieser Polymorphismen wird aber als sehr limitiert angesehen. Für HLA-G1s wurden bislang noch keine Polymorphismen nachgewiesen.

4.1.2.5 Expressionsregulation von HLA-G und HLA-G1s

Die Expression der MHC-Klasse I kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden. Regulationsmöglichkeiten bestehen während der Transkription sowie der Translation und posttranslational bis zur Expression auf der Zelloberfläche.

Die Regulation während der Transkription erfolgt über nukleäre Regulationsfaktoren (cis bezeichnet die Seite der DNA und trans die komplementäre Seite der Regulationsfaktoren) und über den Methylierungsgrad der DNA.

Die Regulation der Translation erfolgt während der Biosynthese, die posttranslationale Regulation erfolgt zwischen Antigenprozessierung und Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche.

Cis-Regulation

Mit Hilfe der Histone ist die DNA in Form von Nukleosomen aufgerollt und stellt so die uns bekannten Chromosomen dar. Die Erkennung der DNA (cis) durch die Transkriptionsfaktoren (trans) setzt eine bestimmte Zugänglichkeit der DNA voraus. Diese ist jedoch nur in nicht-histonassoziierter DNA vorhanden. Diese offenen Regionen stellen meistens die Regionen der Promotoren dar (Gross und Garrard, 1988). Ist jedoch eine Promotorsequenz histonassoziert, kann es nicht zu einer Ablesung der kodierten Information kommen.

Als weitere cis-Regulationsmöglichkeit spielt die Methylierung der CpG-Inseln (5`-Cytosinphosphat-Guanin-3`) eine große Rolle. CpG-Inseln sind finden sich normalerweise bei Wirbeltieren am 5`-Anfang der jeweiligen Gene, welche häufig die Promotorregion und die ersten Exons sowie Introns darstellen. Sie sind aufgrund ihrer Funktion nur in den seltensten Fällen methyliert. Hinzukommt, dass Gene in Gewebe mit spezifischen Aufgaben im Allgemeinen keine CpG-Inseln in sich tragen.

Die Gene der MHC-Klasse I und hier besonders HLA-G tragen vermehrt CpG-Inseln in ihren 5' Regionen (Pontarotti et al., 1988). Die Korrelation zwischen Methylierung und Repression der HLA-G Expression wurde eindeutig durch eine Arbeit mit der Trophoblastenzelllinie JAR (Boucraut et al., 1993) hergestellt. In dieser Zelllinie wurde bei bestehender Methylierung kein HLA-G transkribiert, die Behandlung der Zelllinie mit einem Demethylanz (5-Azacytidin) restaurierte die HLA-G Produktion. Im Zytotrophoblasten sowie im villösen Synzytiotrophoblasten am Ende der Schwangerschaft wurde eine partielle Methylierung festgestellt, die die HLA-G Expression mindert (Guillaudeux et al., 1995). Die Rolle der Methylierung scheint aber in verschiedenen Geweben unterschiedlich starken Einfluss nehmen zu können, so dass offensichtlich weitere Regulationsmechanismen bestehen (Onno et al., 1997). Das Genome-imprinting (unterschiedliche Methylierungsstadien der maternalen und paternalen Gene) lässt sich hier jedoch ausschließen (Franklin et al., 1996). Auch für die transkriptionelle Expression der maternalen und paternalen HLA-A, HLA-B und HLA-C Gene im villösen Synzytiotrophoblast am Ende der Schwangerschaft spielt das genome-imprinting keine Rolle (Lenfant et al., 1998). Das Vorhandensein von nicht methylierten HLA-G Genen wurde in der DNA menschlicher Spermatozyten im Vergleich zur DNA von Lymphozyten aus dem peripheren Blut desselben Individuums nachgewiesen, was eine spezifische Aktivität des HLA-G für die Fortpflanzung nahelegt.

Promotorregion des HLA-G und Trans-Regulationsfaktoren

Die Transkription eukaryoter Gene wird durch die Fixierung transkriptioneller Faktoren an die Nukleotidsequenz an dem nicht translatierten 5' Ende reguliert. Dies geschieht ca. 200 Basenpaare vor der Initiatorstelle und formt somit die Promotorregion. Eine Untersuchung dieser Region zeigte für HLA-G das Vorhandensein gewöhnlicher Promotoren, wie sie auch bei den anderen Genen der MHC-Klasse I, sowie allen anderen RNA-Polymerase II transkribierten Genen vorkommen (Geraghty et al., 1987). (siehe ABBILDUNG 5)

Die erste der insgesamt zwei Regulationsboxen ist die TATA-Box, eine Thymin und Adenin reiche Struktur. Bei HLA-G liegt sie ca. 50 Basenpaare vor der Initiatorregion der Transkription liegt und weist wie alle MHC-Klasse I Loci eine leicht modifizierte Sequenz (TCTAAA) auf. Ihre Aufgabe besteht in der korrekten Steuerung der RNA-Polymerase II in Richtung der Initiationsstelle.

Die zweite Regulationsbox ist das Up-Stream-Element (UPE); dieses Element liegt mit 75 Basenpaaren vor der Initiatorstelle direkt vor der TATA-Box (CCAAT-Box) und regelt die Häufigkeit der Transkription.

Es bestehen noch eine Reihe anderer Regulationssequenzen (Enhancer oder Silencer) für die MHC-Klasse I, im Fall von HLA-G sind diese jedoch deletiert oder modifiziert.

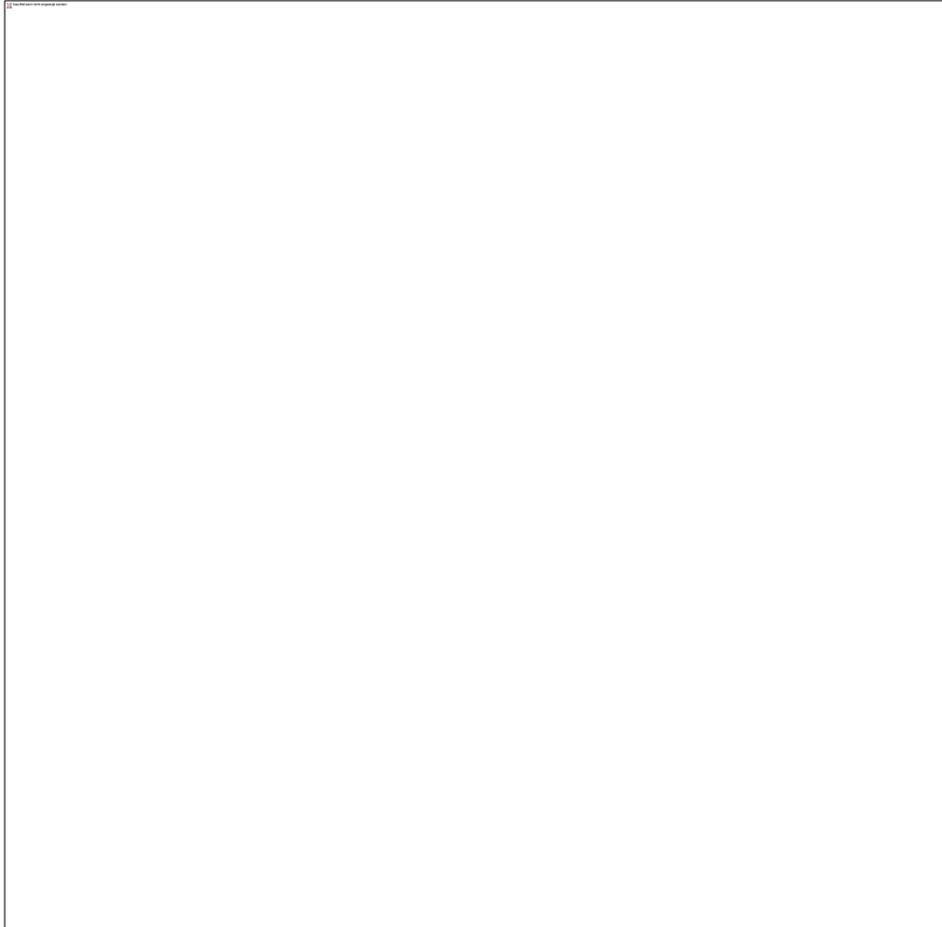


Abbildung 5 Fixation der Transkriptionsfaktoren an die Promotoren der HLA-Klasse I
(nach Gobin, 1999; Rousseau, 2000; Lefebvre, 2000; Ibrahim, 2000)

Cis-Regulations Elemente: LCR: Locus Control Region, ISRE: Interferon-Stimulated-Responsive-Element,
GAS: Gamma Activated Sequence, HSE: Heat-Shock-Element

Trans-Regulations Elemente: IRF 1: Interferon Regulatory Factor 1, HSF 1: Heat-Shock-Factor 1

+1: Repräsentiert den Initiationsplatz der Transkription

<!--[if

!vml]--><!--[endif]-->

Die Ineffektivität der Faktoren der NF κ B-Familie sind wahrscheinlich auf eine ausschließliche Bindungsfähigkeit des Homodimers p50/p50 ihrer Familie mit dem Enhancer A (200 Basenpaare vor der Initiatorregion) zurückzuführen (Gobin et al., 1998). Dieselben schwachen Interaktionen gelten auch für andere Faktoren, die mit dem Palindrom in der κ B Region des Enhancer A interagieren. Dazu gehören die Activatorproteins 1 und 2 (AP1 und AP2), das Zinc-Finger-Protein und der MHC Enhancer Binding Factor (MBP1) sowie der IFN- γ Second Positive Regulatory Domain Binding Factor 1 (PRDII B F1) (Baldwin et al., 1990) (L'Haridon et al., 1996) (Mansky et al., 1994).

Heat-Shock-Elements, in Form zweier inverser Repetitionen, wurden zwischen -487 Basenpaaren und -475 Basenpaaren im Genom des HLA-G, jedoch nicht bei anderen MHC-Klasse I Molekülen, gefunden. Durch einen thermischen Schock oder eine Arsenbehandlung wird die Aktivierung und

Fixierung des Trimeres Heat-Shock-Factor 1 (HSF1) an dem HSE Motiv induziert und somit für eine vorübergehende Aktivierung der HLA-G-Transkription gesorgt (Ibrahim et al., 2000).

Das Interferon-Stimulated-Response-Element (ISRE) mit der Basenfolge AGTTTCNNTTCT liegt 180 Basenpaare vor dem Initiator der Transkription und ist das Ziel der Interferone (IFN- α , IFN- β und IFN- γ), welche eine wichtige Rolle bei der Expressionsinduktion der MHC-Klasse I Moleküle spielen (Gobin et al., 1999). Die Interferone werden an die ISRE-Region des Interferon Regulatory Factor (IRF) gebunden und aktivieren (IRF-1) oder inhibieren (IRF2, Interferon Consensus Factor Binding Protein (ICS-BP)) die HLA-Transkription (Hobart et al., 1997). Insbesondere die IFN- γ Stimulation ist für die Basalexpression und Induzierbarkeit der Gene der MHC-Klasse I wichtig. Die Stimulierbarkeit der HLA-G-Transkription durch Interferone ist momentan ein diskutiertes Thema, da ein normales ISRE nicht vorhanden zu sein scheint, sondern nur eine weit nach vorne verlagerte Form. An Position -746 befindet sich ein ISRE gefolgt von einem Gamma-Interferon-Activated-Sequence-Motiv (GAS). Dieses ISRE scheint jedoch nur durch IFN- β in Erst-Trimester-Plazenten stimulierbar zu sein (Lefebvre et al., 2001).

Ebenso wird eine weit vorangestellte Locus-Control-Region (LCR) diskutiert, die an Position -1500 Basenpaare bis -1250 Basenpaare vor der Initiationsstelle der Transkription liegt. Es wurde ihre Existenz nur im HLA-G Genom gefunden, auch passende interagierende Proteinkomplexe; die Existenz wird jedoch durch eine Arbeit angezweifelt (Gobin und van den Elsen, 1999).

Neben den transkriptionsstimulierenden Sequenzen gibt es auch transkriptionsinhibierende Strukturen, die Negative-Response-Elements (NRE), welche mit der ISRE und der GAS-Region überlappen (Chiang und Main, 1994). Sie galten lange als nicht existent im HLA-G Genom, werden aber seit 1999 in der Region -450 Basenpaare bis -220 Basenpaare vermutet (Gobin und van den Elsen, 1999).

Die vorangehend beschriebenen Transkriptionsregulatoren gelten für HLA-G1s ebenso. Auffallend jedoch ist eine Anzahl von Mutationen und Deletionen in der Regulationsbox für HLA-G1s, auf der NF κ B Fixationsstelle, in dem Interferon-Stimulated-Response-Element und dem SXY-Motiv, welches für die IFN γ Induktion zuständig ist (Gobin et al., 1998).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Transkription von HLA-G und HLA-G1s nicht durch die wichtigsten Aktivationsmechanismen (NF- κ B und CIITA) der MHC-Klasse I reguliert wird, sondern durch Interferone über das ISRE. Diese binden an ein spezielles ISRE. Im Gegensatz zu den anderen MHC-Klasse I Molekülen ist die Stimulation über ein HSE durch thermischen Schock möglich. Die vorwiegende Expression von HLA-G und HLA-G1s in der Plazenta macht es gut vorstellbar, dass die Transkription der Gene von anderen Zytokinen oder Hormonen, zum Beispiel

IL-10 (Moreau et al., 1999) oder dem Leukemia Inhibitory Factor (LIF) (Bamberger et al., 2000), über noch zu identifizierende Faktoren stimuliert wird.

Post-Transkriptionelle Regulation des HLA-G und -G1s

Die posttranskriptionelle Regulation des Trimeres HLA/Peptid/ β 2-Mikroglobulin geschieht während der Biosynthese und des Zusammenbaus sowie auf dem Weg zur Zelloberfläche.

Die Präsentation von Molekülen durch MHC-Klasse I setzt drei wichtige Entwicklungsschritte voraus: als erstes die Herstellung von Antigenpeptiden aus endogenen Proteinen, zweitens den Transport ins Endoplasmatische Reticulum und drittens der Zusammenbau des Heterotrimeres HLA/Peptid/ β 2-Mikroglobulin sowie den Transport an die Zelloberfläche. (siehe ABBILDUNG 6). Im Gegensatz zu den MHC-Klasse II Molekülen präsentieren die MHC-Klasse I Antigenpeptide, die aus endogenen Peptiden hergestellt werden. Das Zytosol ist die Quelle aus der, mit Hilfe von Proteasomen, endogene Antigenpeptide produziert werden (Fruh und Yang, 1999). Verschiedene Untereinheiten des Proteasoms können durch IFN- γ stimuliert werden. Es entsteht dadurch ein leicht verändertes Proteasom mit MHC-Klasse I spezifischeren Proteindegradierungseigenschaften. Dieses heißt dann Immunoproteasom (Rammensee, 1995). Interessanterweise verfügen die IFN- γ stimulierten Immunoproteasomen über die Fähigkeit der Virus-Epitop-Präsentation (Schwarz et al., 2000) (van Hall et al., 2000). Vielfältigste Viren induzieren einen IFN- γ Anstieg, wodurch es zur Virus-Epitop-Präsentation durch die MHC-Klasse I Moleküle kommt und in Folge dessen zu einer Lyse der Zelle durch Zytotoxische T-Zellen. Ebenso kann eine im Trans-Golgi-Apparat vorkommende Protease, das Furin, virale Peptidstücke herstellen. Diese Peptidstücke werden in das Heterotrimer HLA/Peptid/ β 2-Mikroglobulin eingebaut und somit auf der Zelloberfläche präsentiert (Gil-Torregrosa et al., 2000).

Die im Zytosol hergestellten Peptide werden mit Hilfe des TAP-Transporters in das Endoplasmatische Reticulum transportiert. HSP-70 ist eines der Chaperone, die die Antigenpeptide vor den Proteasen des Cytosol schützt. Gleichzeitig erleichtert es durch nötige Konformationsänderungen die Bindung an den TAP-Transporter (Chen und Androlewicz, 2001). Desweiteren könnte eine kurzfristige Bindung des Immunoproteasomes an den TAP-Transporter den Zerfall der Peptidantigene verhindern (Brooks et al., 2000).

Noch nicht veröffentlichte Daten aus TAP-1^{dull} Lymphoblasten Versuchen legen nahe, dass HLA-G und insbesondere HLA-G1s TAP-unabhängig endogene Peptide präsentieren können (Moreau et al., 2002). Copeman zeigte hingegen zuvor, dass im ersten Stadium der Zytotrophoblastendifferenzierung TAP-1, TAP-2, Tapasine und β 2-Mikroglobulin vermehrt transkribiert werden, ebenso kommt es zu einer Anreicherung des extravillösen Zytotrophoblasten mit HLA-G (Copeman et al., 2000). Dies würde eine Rolle der TAP-1 und TAP-2 bei der

plazentären

Expression

von

HLA-G

zulassen.

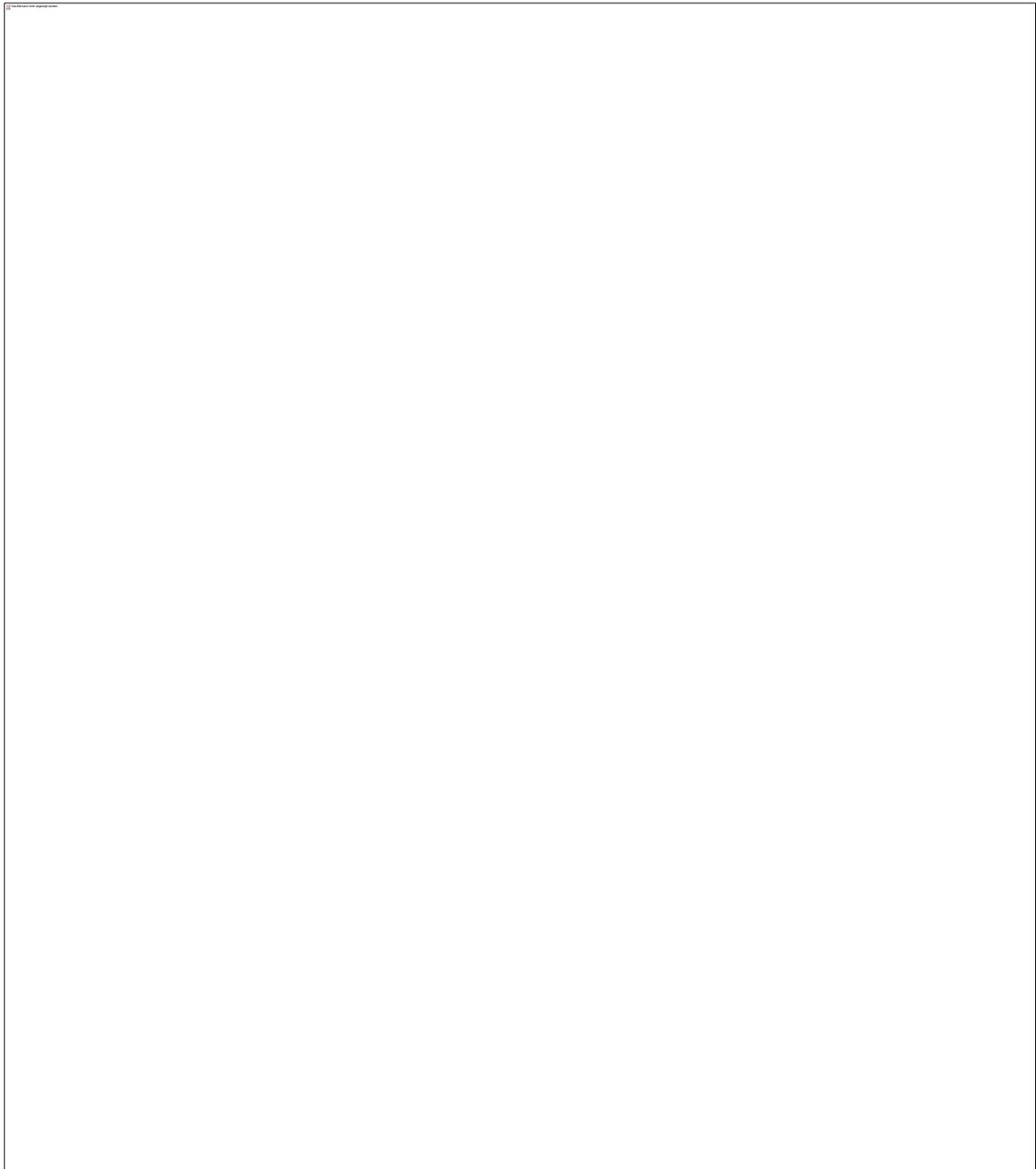


Abbildung 6 Modell der HLA-G1- sowie HLA-G1s- β 2m-Protein Synthese
(nach Lee et al., 1995; Diehl et al., 1996; Wainwright et al., 1998)

<!--[if !vml]--><!--[endif]-->

Die Bindung des HLA-G an den TAP Transporter legt einen dem MHC-Klasse Ia gleichenden Aufbauprozess nahe. Die Chaperone scheinen von identischer Wichtigkeit zu sein, sodass man von einem identischen Vorgang sprechen kann (Wainwright et al., 1998) (Copeman et al., 2000). Verschiedene Viren haben Mechanismen des Immunescapings entwickelt, zu denen auch eine Störung des HLA-G Aufbaus auf verschiedenen Stufen gehört (Tortorella et al., 2000). Durch das Protein ICP 47 des Herpes simplex Virus wird die Fixierungsstelle des Transport Proteins TAP blockiert und die HLA-G Expression inhibiert (Easterfield et al., 2001). Dasselbe gilt für Cytomegalievirus-Infektionen, hier wird die TAP-abhängige Protein-Translokation durch das Glycoprotein US6 blockiert (Jun et al., 2000). Diese Mechanismen scheinen auch auf HLA-G1s zuzutreffen. Das Nef-Protein des HIV-1 (206 AS an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran gelegen) beschleunigt hingegen die Endocytose der MHC-Klasse I. Dies geschieht durch Interaktion mit dem 31 AS langen zytoplasmatischen Schwanz der MHC-Klasse Ia. Dabei kommt es zu einer Verhinderung der Erkennung der Zellen durch CD8+ T-Lymphozyten (Piguet et al., 1999) (Cohen et al., 1999). Für HLA-G scheint dies aber nicht zuzutreffen, da das Nef mit dem verkürzten AS-Schwanz nicht interagieren kann und somit HLA-G weiterhin virale Proteine präsentieren und die Lyse der Zelle durch CD8+ T-Lymphozyten auslösen kann (Pizzato, 2000).

4.1.2.6 Zelluläre Expression des HLA-G und HLA-G1s

HLA-G wird von allen extravillösen Populationen (interstitieller endovasculärer Zytotrophoblast, Placentariesenzellen) zumindest auf der transkriptionellen Ebene exprimiert (Goldman-Wohl et al., 2000). Desweiteren wurde die HLA-G-Produktion im Verlauf der Schwangerschaft anhand der Transkriptionsrate beschrieben, wobei proximale Zellen im Vergleich zu distal gelegenen Zellen in Bezug auf den Implantationsort eine höhere Rate aufweisen (Copeman et al., 2000). HLA-G Transkriptionen wurden gleichermaßen für den villösen Zytotrophoblasten (Copeman et al., 2000) und extravillösen Zytotrophoblasten zu Beginn der Schwangerschaft (Paul et al., 2000b) (Proll et al., 2000), sowie für das Chorion und Amnionepithelzellen am Ende der Schwangerschaft, nachgewiesen (Hammer et al., 1997). Auch Makrophagen des villösen Chorions exprimieren HLA-G (Blaschitz et al., 1997). Interessanterweise nimmt die Transkriptionsrate mit zunehmender Schwangerschaft ab (Fan et al., 1999) (Kovats et al., 1990).

Mit Hilfe der sehr sensiblen RT-PCR konnten sechs Isoformen des HLA-G in der Plazenta nachgewiesen werden. Die HLA-G1 Isoform ist prädominant, wohingegen die anderen Isoformen in nur sehr geringem Ausmaß transkribiert werden (Hviid et al., 1998).

HLA-G1s wird vor allem von proliferierenden Zellen des villösen und extravillösen Zytotrophoblasten des ersten Trimesters sowie von den fötalen Endothelzellen des Chorions

produziert (Blaschitz et al., 1997). Weiterhin wurde eine Expression von HLA-G1s in Makrophagen des villösen Chorions, den Hofbauerzellen, festgestellt (Chu et al., 1998). HLA-G1s wurde ebenso in der Amnionflüssigkeit in Konzentrationen bis zu 275ng/ml nachgewiesen (Fournel et al., 1999) (Hamai et al., 1999).

IFN- γ steigert nicht nur das Expressionsniveau der MHC-Klasse Ia, sondern auch von HLA-G auf der Amnionepithelzelloberfläche (Lefebvre et al., 2001). Die Produktion des HLA-G ist antiproportional zum Durchmesser des Blutgefäßes (Blaschitz et al., 1997)

Abschließend lässt sich also feststellen, dass HLA-G im Zytotrophoblasten exprimiert wird und die Expressionsrate von dem Stadium der Differenzierung der Zelle sowie dem Stadium der Schwangerschaft abhängt. Zu Beginn der Schwangerschaft besteht eine höhere Expression von HLA-G, welche mit zunehmender Dauer der Schwangerschaft abnimmt (Copeman et al., 2000) (McMaster et al., 1995). Desweiteren wird HLA-G1s an mehreren Stellen der Plazenta exprimiert (Trophoblasten, villöse Zytotrophoblasten, foetale Endothelzellen). Dieses legt einen wichtigen Stellenwert des HLA-G1s im Verlauf der Schwangerschaft nahe.

HLA-G wird aber nicht nur in den oben genannten Geweben gefunden, sondern auch in Tumoren verschiedenster Gewebe und Histopathologie. Transkriptionen von HLA-G werden bei allen Lymphomen, bei chronischen lymphatischen Leukämien sowie einigen Fällen von akuten myeloischen Leukämien beschrieben, allerdings nicht bei Myelomen (Amiot et al., 1998). Ebenso wird HLA-G in Melanomen exprimiert (Paul et al., 1998).

Diese Ergebnisse sind kritisch zu betrachten, da sie allesamt die RT-PCR zur Detektion nutzten, nicht jedoch den Northern-Blot. Durch die viel sensiblere RT-PCR kann eine Basalexpression detektiert werden, die keinerlei physiologischen Wert hat. Zu Vorkommen von HLA-G1s bei Tumoren gibt es nach unseren Erkenntnissen bis jetzt noch keine Veröffentlichung. HLA-G wird nicht von den CD34+ Stammzellen exprimiert, ebenso wenig von NK-Zellen (Amiot et al., 1998) (Kirszenbaum et al., 1995).

Die Expression des HLA-G in Embryo und Oozyte

Die Expression von HLA-G kann in allen präimplantatorischen Stadien gemessen werden, sie hängt in hohem Maße von der Entwicklung des Embryos und damit der Effektivität der Implantation ab (Jurisicova et al., 1996). Die lymphozytäre Proliferation wird durch Mitogene, die aus dem umgebenden Milieu des Embryonen stammen, gehemmt (Daya und Clark, 1986). Diese Hemmung korreliert mit dem Implantationsstadium und wird mit der Sekretion von HLA-G1s in Verbindung gebracht (Jurisicova et al., 1996). Es bleibt jedoch zu erwähnen, dass eine neuere Arbeit von Hiby (Hiby et al., 1999) diese Resultate anzweifelt, da die Präsenz von HLA-G mRNA im 2- bis 8-Zellen Stadium und dem Stadium der Blastocyste nicht nachgewiesen werden konnte.

Die Expression des HLA-G von Monocyten des peripheren Blutes und im Thymus

HLA-G wurde in Monocyten und IFN- γ stimulierten Makrophagen nachgewiesen (Amiot et al., 1998). ZMV-Erkrankte exprimieren auf ihren Makrophagen sowohl HLA-G als auch HLA-G1s. Das gleiche gilt für bronchiale Makrophagen bei pulmonal erkrankten Patienten (Onno et al., 1997). In diesem Zusammenhang wird der Auslöser der Präsentation der HLA-G Moleküle diskutiert. Ein Grund könnte die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine oder die reguläre Folge einer viralen Infektion sein, was wiederum die Rolle des HLA-G1s in der Abwehr viraler Infektionen stärken würde.

Auch in nativen bzw. kultivierten medullären Thymozyten wurden HLA-G und HLA-G1s nachgewiesen (Mallet et al., 1999a) (Mallet et al., 1999b).

Dass HLA-G und HLA-G1s nicht nur auf das System Plazenta beschränkt sind, zeigt, dass sie neben Aufgaben während der Schwangerschaft weitere wichtige Funktionen erfüllen, wie z.B. die Abwehr viraler Infektionen oder die Mitwirkung an der T-Zell-Selektion im Thymus (Mallet et al., 1999a).

4.2 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) stellen aufgrund vielfältiger Funktionen und Rezeptorfamilien ein interessantes Ziel immunologischer Forschung dar. Diese zeigen bedeutende Unterschiede in der Herkunft und Aktivierung ihrer Rezeptoren und werfen somit Fragen zur Bedeutung bei Schwangerschaft, autoimmunologischen Reaktionen sowie Tumoren im Vergleich zu den im Blut wesentlich häufiger vorkommenden T- und B-Lymphozyten auf. NK-Zellen sind Lymphozyten des angeborenen Immunsystems und erfüllen wichtige Aufgaben bei der Produktion von Zytokinen und der Zytotoxizität zur Verteidigung gegen maligne entartete Zellen sowie infektiösen Pathogenen (Robertson und Ritz, 1990).

4.2.1 Entwicklung Natürlicher Killerzellen

Die Leukozyten des peripheren Blutes setzen sich aus ca. 59% Neutrophilen, 3% Eosinophilen, 0,3% Basophilen und 4% Monocyten sowie 34% Lymphozyten zusammen. Die Lymphozyten teilen sich wiederum in ca. 78% T-Lymphozyten (53% zytotoxischer T-Zellen CD8⁺, 25% T-Helferzellen CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ \approx 1,5-2,5/1), 12% B-Lymphozyten und 10% NK-Zellen auf.

Dies entspricht ca. 180.000 NK-Zellen pro ml peripheren Blutes. Diese Werte beziehen sich jeweils auf gesunde Erwachsene, können sich aber durch Erkrankung um 10er Potenzen verändern.

Natürliche Killerzellen stammen von den Lymphoiden Stammzellen (CD10+, CD34+), welche aus den pluripotenten Stammzellen (CD34+, CD234+) hervorgehen, ab. Sie zeichnen sich durch Expression von CD16 (FcγRIII) und CD56 (N-CAM) sowie durch das Fehlen von CD3 aus. Diese Entwicklung setzt die Knochenmarkumgebung mit ihrer Physiologie und den vielfältigen Zytokinen voraus. Das Zusammenwirken der aus dem Knochenmarkstroma stammenden c-kit Ligand (KL) und flt-3 Ligand (FL) mit Interleukin 15 (IL-15) sind wichtige Schritte für die NK-Zellmaturation (Fehniger und Caligiuri, 2001).

Die NK-Zellentwicklung kann in eine frühe und eine späte Phase eingeteilt werden. Die Frühphase ist durch die Interaktion der Stromawachstumsfaktoren, KL und FL, mit den lymphoiden Stammzellen gekennzeichnet. Über intermediäre NK-Zellvorläuferzellen (CD34⁺IL-2/IL-15Rβ⁺CD56⁻) entstehen mit Hilfe von IL-15 die endgültigen CD56⁺ NK-Zellen. Stromafrei kultivierte lymphoide Stammzellen entwickeln sich unter Zugabe von IL-15 immer zu CD56^{bright} NK-Zellen (stark CD56 positive NK-Zellen) mit dem ihnen typischen Rezeptorrepertoire. Dies zeigt, dass zur CD56^{dim} NK-Zellentwicklung (schwach CD56 positive NK-Zellen) mit ihren typischen Rezeptoren, weitere stromale Wachstumsfaktoren benötigt werden oder dass die CD56^{dim} NK-Zellen von anderen Vorläufern abstammen (Miller und McCullar, 2001) (Raulet et al., 2001).

NK-Zellen finden sich normalerweise im peripheren Blut, in der Milz und dem Knochenmark, sie können jedoch auf verschiedene chemotaktische Reize reagieren und in das entzündete Gewebe migrieren. Interessanterweise findet sich während der Schwangerschaft eine erhebliche Anzahl von NK-Zellen in der Plazenta (Markert et al., 2002).

4.2.2 NK-Zellaufgabe

NK-Zellen sind essentieller Bestandteil des angeborenen Immunsystems zur Verteidigung des Organismus gegenüber eingedrungenen Pathogenen und mutierten körpereigenen Zellen. Sie exocytieren immunregulatorische Zytokine, die die frühe Immunantwort co-stimulieren und zur verzögerten T-Zellantwort beitragen. Hierzu gehören unter anderem die Zytokine Interferon-γ (IFN-γ), Tumor Nekrose Faktor-α (TNF-α) und Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) (Cooper et al., 2001a). NK-Zellen haben eine natürliche zytolytische Aktivität gegenüber virusinfizierten Zellen (z.B. Herpesviren der α, β, und γ-Subklassen) und vermitteln die Antikörper-Abhängige-Zellvermittelte-Zytotoxizität (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC) von Zielzellen durch den CD16 (Allavena et al., 1989) (Lotzova et al., 1987).

4.2.3 NK-Zellsubtypen

Es sind 2 Subtypen von NK-Zellen bekannt, die sich in der Stärke der CD56 Expression auf der Zelloberfläche unterscheiden (Cooper et al., 2001a).

- Die Mehrheit der humanen NK-Zellen (80%) sind nur leicht CD56⁺ (CD56^{dim}) und exprimieren hohe Konzentrationen von CD16 (CD16^{bright}) auf ihrer Zelloberfläche.
- Nur 20% der NK-Zellen exprimieren hohe Konzentrationen von CD56 (CD56^{bright}), gleichzeitig sind sie nur schwach CD16⁺ (CD16^{dim}), teilweise sogar CD16⁻.

Diesen Subtypen werden unterschiedliche Aufgaben zugeschrieben: CD56^{bright} Zellen produzieren vielfältige Zytokine, während die CD56^{dim} die natürliche und die Antibody-Dependent Target Cell Lysis effizient vermitteln (Cooper et al., 2001b). CD56^{bright} Zellen exprimieren IL-2-Rezeptoren mit hoher Affinität und proliferieren *in vitro* als auch *in vivo* schon bei nanomolaren Dosen von IL-2 (Caligiuri et al., 1993). CD56^{dim} NK-Zellen besitzen ausschließlich IL2-Rezeptoren mit niedriger Affinität und proliferieren somit nur zögerlich selbst bei hohen IL2-Gaben mit vorheriger IL-Rezeptorstimulation (Caligiuri et al., 1990). Zusätzlich zeigen ruhende CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zellen Unterschiede in ihrem Rezeptorrepertoire auf (Voss et al., 1998). Ruhende CD56^{bright} NK-Zellen sind große agranuläre Zellen, sie exprimieren hohe Konzentrationen der C-type lectin CD94/NKG2 Rezeptorfamilie neben nur einem sehr geringen Anteil von Rezeptoren der Killer-Cell Immunglobulin-like Rezeptorfamilie (KIR). Ruhende CD56^{dim} NK-Zellen jedoch exprimieren KIR und C-type Lectin Rezeptoren in hoher Konzentration auf der Zelloberfläche und erscheinen durch zahlreiche zytolytische Vesikel im Zellplasma stark granuliert (Nagler et al., 1989).

4.2.4 Erkennung von Targetzellen durch NK-Rezeptoren

Im Gegensatz zu T- und B-Lymphozyten können NK-Zellen ihre rezeptorkodierenden Gene nicht re-arrangieren. Sie erkennen die MHC-Klasse I sowie verwandte Moleküle (class I like molecules) über die nur auf NK-Zellen vorkommenden NK-Zell-Rezeptoren (NKR). Diese Rezeptoren können die zytolytische Aktivität der NK-Zellen aktivieren oder inhibieren. Die „missing-self“ Hypothese von Ljunggren und Karre (Ljunggren und Karre, 1990) besagt, dass NK-Zellen verminderte oder veränderte MHC-Klasse I Expression auf autologen Zellen erkennen und diese Zellen lysieren. Dies trifft auch auf virusinfizierte Zellen zu, bei denen die MHC-Klasse I

Expression marginal gemindert ist. NK-Zellen lysieren Epstein-Barr-Virus infizierte, MHC-Klasse I defiziente B-Lymphoblasten. Eine Transfektion mit MHC-Klasse I Allelen schützt diese B-Lymphoblasten jedoch vor der Lyse durch NK-Zellen (Storkus et al., 1989). In den letzten Jahren wurde eine Reihe von inhibitorischen NK-Rezeptoren gefunden, die spezifisch die MHC-Klasse Ia (HLA-A, -B, -C) und die MHC-Klasse Ib (HLA-E, -G) erkennen.

Dennoch scheint eine Expression von MHC-Klasse I Molekülen nicht immer zum Schutz vor der Lyse durch NK-Zellen nötig zu sein, ebenso ist der Schutz durch MHC-Klasse I Moleküle nicht immer ausreichend vor Zelllyse durch NK-Zellen. Nicht-hämatopoetische MHC-Klasse I defiziente Gewebe wie z.B. Hauttransplantate, können durch NK-Zellen nicht lysiert werden, ebenso die Fibroblasten von β 2-Mikroglobulin-null Mäusen, bei denen keine Expression von MHC-Klasse I Molekülen vorliegt (Zijlstra et al., 1992). Einige virusinfizierte Zellen (mit aufrechterhaltener MHC-Klasse I Expression) hingegen werden von autologen NK-Zellen lysiert (Routes, 1992). IL-2 aktivierte NK-Zellen zeigen eine erhöhte lytische Aktivität und können somit NK-Zell-resistente Zielzellen lysieren (Caligiuri et al., 1990). Daraus geht hervor, dass weitere aktivierende Rezeptoren in die Regulation der NK-Zellaktivität eingebunden sein müssen. Die Bindung membranärer Rezeptoren der Zielzellen mit aktivierenden NK-Zellrezeptoren führt zu Blastogenese, Zytokinsekretion, erhöhter Zytotoxizität und Steigerung der Migrationsneigung. Demnach scheint jede einzelne NK-Zelle ihr ganz spezifisches, inhibitorisches und aktivierendes Rezeptorrepertoire zu exprimieren. Die Zytotoxizität wird durch die Balance der inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren, welche mit MHC-Klasse I Molekülen der Zielzelloberfläche reagieren, reguliert. (siehe ABBILDUNG 7)

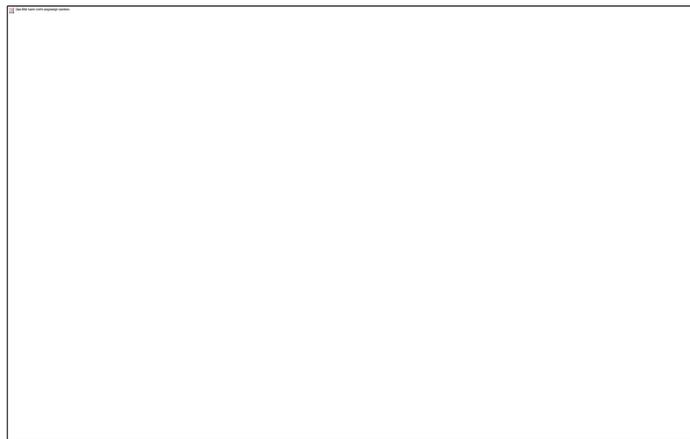


Abbildung 7 Interaktion inhibitorischer und aktivierender
Rezeptoren auf NK-Zellen

<!--[if !vml]--><!--

[endif]-->

4.2.4.1 NK-Zell Immunoglobulin Rezeptoren

Die aus der Immunoglobulin Superfamilie stammenden Killerzell Immunoglobulin Receptors (KIR) bestehen aus zwei oder drei extrazellulär immunoglobulinähnlichen Domänen. Sie sind als CD158 in der Cluster-of-differentiation Nomenklatur aufgeführt und erkennen MHC-Klasse I Allele (HLA-A, -B, -C) spezifisch (Dohring et al., 1996) (Wagtmann et al., 1995). Man unterscheidet zwei unterschiedliche Gruppen der KIR-Rezeptoren, zum einen die aktivierenden und zum anderen die inhibierenden KIR-Rezeptoren. Beide haben identische extrazelluläre Domänen und binden demnach identische Liganden. Unterschiede in der transmembranären und der zytoplasmatischen Domäne jedoch verursachen die Inhibition oder Steigerung der zytotoxischen Aktivität obwohl die Rezeptoren an identische MHC-Klasse I Allele gebunden haben (Biassoni et al., 1996). (siehe ABBILDUNG 8)

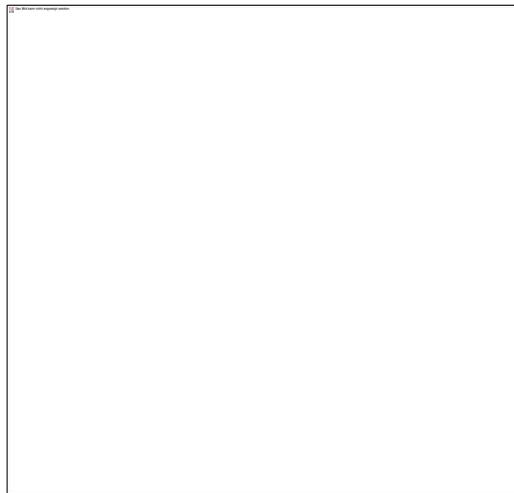


Abbildung 8 KIR2DL und KIR2DS

Beide KIR verfügen über 2 Immunoglobulin Domänen (2D). Der inhibierende KIR2DL verfügt über einen langen zytoplasmatischen Schwanz und vermittelt sein Signal über ein phosphoryliertes ITIM an die Tyrosinphosphatase SHP-1. SHP-1 dephosphoryliert verschiedene Proteine der ITAM Signaltransduktion und vermittelt so sein inhibierendes Signal. KIR2DS hingegen aktiviert über eine transmembranäre Domäne das ITAM, welches phosphoryliert mit der SYK (Tyrosinkinase) die weitere Signaltransduktion triggert.

<!--[if !vml]--><!--

[endif]-->

Auf dem Chromosom 19p13.4 sind zwölf verschiedenen KIR und einige Allelvarianten kodiert. sechs der KIR sind inhibitorischer Natur und sechs vermitteln ein aktivierendes Signal (Wilson et al., 1997). Es sind monomere (Single Chain) Rezeptoren mit zwei (KIR2D) oder drei (KIR3D) immunoglobulinähnlichen Ketten. Diese können weiter in Rezeptoren mit langem (L) zytoplasmatischen Schwanz (KIR2DL, KIR3DL) und in Rezeptoren mit kurzem (S)

zytoplasmatischen Schwanz (KIR2DS, KIR3DS) unterteilt werden. Von diesen vier Grundtypen gibt es insgesamt 12 verschiedene Formen, die unterschiedliche Liganden erkennen.

KIR2DL und KIR3DL, mit langen zytoplasmatischen Schwänzen also, wirken inhibierend auf die NK-Zellen. Dies geschieht über Immunoreceptor Tyrosin-Based Inhibition Motifs (ITIMs) auf dem zytoplasmatischen Ende. (siehe ABBILDUNG 8)

KIR2DS und KIR3DS hingegen, mit kurzen zytoplasmatischen Schwänzen, aktivieren die Zytotoxizität. Die Anlagerung von Proteinen mit Immunoreceptor Tyrosin-Based Activating Motifs (ITAMs) wird dafür verantwortlich gemacht. (siehe ABBILDUNG 8)

KIRs sind spezifisch für eine Reihe von MHC-Klasse I Molekülen. HLA-C ist der dominierende Isotyp der MHC-Klasse I, der sowohl Inhibition als auch Aktivierung vermitteln kann. Vales-Gomez beobachtete, dass aufgrund minimal unterschiedlicher Determinantenerkennung inhibitorische KIRs eine größere Affinität für HLA-C Allele besitzt als aktivierende KIRs (Vales-Gomez et al., 1998). Daher wird eine NK-Zelle, die inhibitorische und aktivierende KIRs exprimiert, die dasselbe Allel erkennen, nicht zur zytotoxischen Aktivität angeregt. Wenn auch nicht für jedes MHC-Klasse Ia Molekül ein inhibitorischer KIR existiert, so nimmt die Bedeutung der inhibitorischen KIRs in immunologischen Theorien zu.

Für die MHC-Klasse Ib wurde ein spezifischer inhibitorischer KIR entdeckt. Der inhibitorische KIR wird KIR2DL4 und erkennt HLA-G und wahrscheinlich HLA-G1s. Dieser KIR2DL4 unterscheidet sich von den anderen Rezeptoren durch sein restringiertes Auftreten: man findet ihn nur auf den NK-Zellen (Rajagopalan und Long, 1999).

Eine zweite Gruppe von inhibitorischen Immunoglobulin Rezeptoren gehört ebenfalls zur Immunoglobulin Superfamilie, es sind die Immunoglobulinlike Transcripts (ILTs) oder auch Leukocyte Immunoglobulinlike Receptors (LIRs) (Colonna et al., 1997). Diese Rezeptoren sind auf Chromosom 19 kodiert und liegen nahe der KIR Region. ILTs werden neben Expressionen auf Zellen der myeloiden Reihe, den dendritischen Zellen und den B-Zellen als Untergruppe ILT-2 (LIR-1) auf den NK-Zellen gefunden (Cosman et al., 1997).

4.2.4.2 NK-Rezeptoren der C-type Lectin Familie

Durch C-Typ Lectin extrazelluläre Domänen charakterisiert sich eine zweite Familie von NK-Zellrezeptoren, die MHC-Klasse I Moleküle erkennen können. Diese Heterodimere setzen sich aus einer CD94 Untereinheit und einer kovalent gebundenen Kette zusammen. Sie sind auf den Genen des C-Typ Lectin der NKG2D Familie kodiert (Lanier, 1998). CD94 geht aus einem monomorphen Gen hervor, für eine intrinsische Signaltransduktionskapazität fehlt jedoch die zytoplasmatische Domäne (Chang et al., 1995). Die extrazellulären und zytoplasmatischen

Domänen sind strukturell verschieden, was sich auch in Unterschieden der Ligandenerkennung und der Signaltransduktion bemerkbar macht (Plougastel et al., 1996). CD94 Homodimere wurden beschrieben, ihre physiologische Funktion ist jedoch nicht definiert (Lopez-Botet et al., 1998).

Vier eng verwandte Transkriptionen der NKG2-Familie mit zugehörigen Genen wurden charakterisiert: NKG2A (mit Splicevariante NKG2B), NKG2C, NKG2E (mit Splicevariante NKG2H) und NKG2F. CD94 und NKG2 Gene sind nebeneinander auf dem Chromosom 12p12.3-p13.1 im NK-Gen Komplex kodiert (Sobanov et al., 1999).

CD94/NKG2 Heterodimere werden ausschließlich von NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten exprimiert, sie erkennen HLA-E, welches Leaderpeptide der MHC-Klasse I gebunden hat (Aramburu et al., 1990). Von den C-Typ Lectin NK-Zellrezeptoren wirkt nur der CD94/NKG2A inhibitorisch, alle anderen Heterodimere wirken aktivierend. NK-Zellklone exprimieren laut RT-PCR Untersuchungen nur inhibierende oder aktivierende CD94/NKG2 Rezeptoren, eine Co-expression beider Heterodimerarten wurde jedoch indirekt, anhand von funktionellen Daten, postuliert (Lopez-Botet et al., 1998). (siehe ABBILDUNG 9)

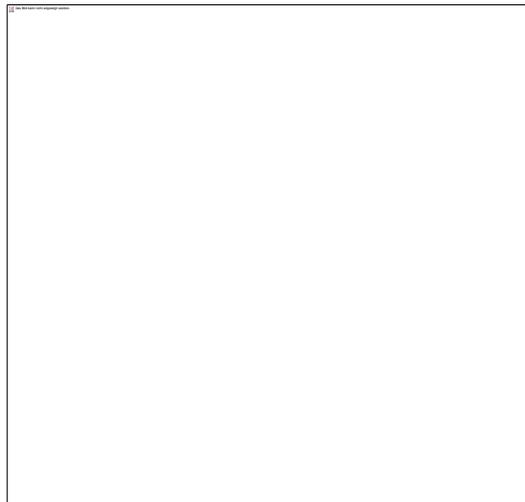


Abbildung 9 CD94/NKG2A und CD94/NKG2C

Die C-type Lectin Rezeptoren sind disulfidverbundene Heterodimere von CD94 und NKG2-Rezeptoren. Der inhibierende und der aktivierende Rezeptor erkennen jeweils HLA-E, welches zur MHC-Klasse Ib gehört. Gleich den KIR, vermittelt der inhibierende Rezeptor (NKG2A) sein Signal über ITIM und die dephosphorylierende Interaktion des SHP-1 mit Proteinen der ITAM-Signaltransduktion. Somit kommt es zu einem inhibitorischen Signal in der NK-Zelle. Der aktivierende NKG2C bedient sich ebenfalls gleich den KIRs des phosphorylierten ITAM-SYK Weges.

<!--[if !vml]--><!--

[endif]-->

4.2.4.3 Natural Cytotoxicity Receptors

Aktivierende KIRs und CD94/NKG2 Rezeptoren sind essentiell für die Vermittlung der Zytotoxizität gegenüber MHC-Klasse I tragenden Zellen; die Vermittlung der Zytotoxizität gegenüber MHC-Klasse I negativen Zielzellen hingegen erfolgt über andere aktivierende Rezeptoren. Eine Reihe MHC-Klasse I unspezifischer, aktivierender Rezeptoren ist bekannt, wobei diese eher co-stimulatorisch wirken als direkt stimulierend. Diese Rezeptoren stellen die Gruppe der Natural Cytotoxicity Receptors (NCRs) dar (Sivori et al., 1997). Drei NCRs (NKp46, NKp44 sowie NKp30) wurden bis heute spezifiziert. NKp46 und NKp30 werden nur von NK-Zellen des peripheren Blutes exprimiert (Pende et al., 1999). Diese Rezeptoren vermitteln ihr Signal über Bindung an ein ITAM beinhaltendes Adapterprotein.

4.2.4.4 Sonderfall NKG2D-Rezeptor

NKG2D ist der am besten beschriebene, aktivierende NK-Zell Rezeptor. Dieser C-Typ Lectin Oberflächen Rezeptor, der fälschlicherweise der NKG2 Familie zugeordnet wurde, ist innerhalb des NK Gen Komplexes auf Chromosom 12 kodiert (Sobanov et al., 1999).

NKG2D, ein Homodimer, weist kleine Sequenzhomologien auf und ist, im Gegensatz zu den anderen NKG2 Rezeptoren, nicht mit CD94 assoziiert (Wu et al., 1999). Die Oberflächenexpression von NKG2D setzt eine Bindung mit den transmembranären Adapterproteinen DAP10 und KAP10 voraus (Chang et al., 1999). NKG2D besitzt kein intrazelluläres Motiv zur Signaltransduktion. Die Signaltransduktion geschieht ausschließlich über DAP10 mit Hilfe der Phosphatidylinositol (PI)-3 Kinase, welche dann die Zytotoxizität induziert. NKG2D ist somit weniger durch inhibierende Signale beeinflussbar als die aktivierenden KIRs und C-Typ Lectin NKRs. NKG2D wird von allen NK-Zellen exprimiert, ebenso von fast allen $\gamma\delta$ T-Lymphozyten und CD8⁺ T-Lymphozyten.

Die Liganden des NKG2D Rezeptors werden als Reaktion auf Stress oder Mutationen exprimiert und sind zwei Familien zugeordnet. Dies sind die MHC-Klasse I Chain-Related (MIC) Antigene (Bahram, 2000) und die UL-16 bindenden Proteine (ULBPs) (Cosman et al., 2001).

Die MIC Antigene werden von Genen innerhalb der MHC-Klasse I Region auf dem Chromosom 6 kodiert. Sie weisen hinsichtlich der Transkriptionskontrollelemente und bestimmter Polymorphismenmuster hohe Ähnlichkeit mit den MHC-Klasse I Genen auf. Von den insgesamt sieben MIC-loci werden jedoch nur zwei, MICA und MICB, transkribiert. Die restlichen fünf sind Pseudogene (Bahram, 2000). Die MIC Glykoproteine bestehen, ähnlich den MHC-Klasse I Molekülen, aus 3 α Domänen, benötigen zur stabilen Oberflächenpräsentation jedoch keine β 2-

Mikroglobulin Assoziation (Li et al., 1999). MICA und MICB sind spezifische Liganden des NKG2D (Bauer et al., 1999). (siehe ABBILDUNG 10)

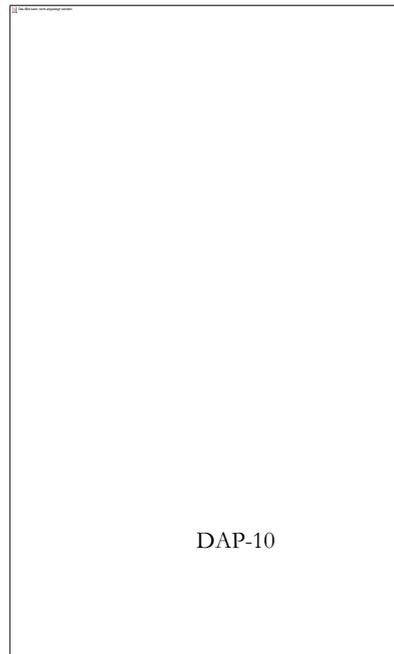


Abbildung 10 CD94/NKG2D

Der NKG2D-Rezeptor ist nur weit entfernt verwandt mit den anderen NKG-Rezeptoren. Er ist nicht CD94 assoziiert und bindet MHC-ähnliche Ligande, wie MICA und MICB sowie ULBP. Durch die transmembranäre Domäne ist NKG2D mit DAP-10 assoziiert. Dieses bindet wiederum an die PI-3kinase (FISK) und aktiviert über verschiedene Pfade die NK-Zelle.

<!--[if !vml]--><!--[endif]-->

Für MICA sind 47 Allele und für MICB 16 Allele bekannt, die sich durch Nukleotidsubstitutionen in den $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$ Domänen unterscheiden (Bahram, 2000). MIC Gene finden sich nicht ubiquitär, sie werden z.B. in Fibroblasten und Epithelzelllinien exprimiert, jedoch nicht in der Milz und den lymphohämatopoetischen Zelllinien.

Die zweite Familie der NKG2D Liganden wurden erstmals durch ihre Fähigkeit der CMV-Protein UL16 Bindung gefunden. Es sind drei verschiedene UL bindende Proteine (ULBPs) bekannt, die fast ubiquitär exprimiert werden (Herz, Lunge, Testes, Gehirn, Lymphknoten, Plazenta, etc...) (Cosman et al., 2001) (Pende et al., 2001). Sie haben keinerlei Beziehung zur Interaktion der MHC-Klasse I Moleküle mit NK-Zellen, weshalb sie auch hier nicht weiter beschrieben werden.

4.2.4.5 Rolle der NCR und NKG2D in NK-zellvermittelter Tumorbekämpfung

Bestimmte Tumorzelllinien werden allein durch NCR erkannt und lysiert, Melanome und Leukämien hingegen bedürfen einer Interaktion von NCR und NKG2D. Mit Hilfe eines NCR^{dull} NK-Zellklones wurde nachgewiesen, dass NKG2D der einzige, triggernde Rezeptor der Tumorzelllyse ist, wobei die Oberflächenexpression von NKG2D auf NCR^{dull} und NCR^{bright} NK-Zellen gleich hoch war (Pende et al., 2001). NCR und NKG2D agieren demnach komplementär, in Abhängigkeit von dem jeweiligen Rezeptorrepertoire der Tumorzelle.

Die Affinität der inhibitorischen KIR und CD94/NKG2 Rezeptoren für MHC-Klasse I Moleküle ist höher als die der aktivierenden Rezeptoren. Dies hat eine Dominanz des inhibitorischen Signals zur Folge. NKG2D scheint im Gegensatz dazu aber die Signale inhibitorischer Rezeptoren zu überdecken und löst somit trotz der inhibitorischen Signale eine Zellyse aus (Cerwenka und Lanier, 2001). Der genaue Mechanismus dieses Vorganges ist nicht bekannt, scheint aber durch eine höhere Affinität des NKG2D für die Liganden hervorgerufen zu werden (Li et al., 2001). Pende et al konnten dies jedoch nicht durch Arbeiten an Ovarialtumorzellen nachweisen. Diese Tumoren exprimieren äußerst zahlreich MHC-Klasse I Moleküle und verschiedene MHC-Klasse I ähnliche Moleküle, so dass die höhere NKG2D Affinität in der Integration der verschiedenen inhibitorischen und aktivierenden Signale unterzugehen scheint (Pende et al., 2001).

4.2.4.6 Weitere Membranrezeptoren zur Modulation der NK-Zellfunktion

Eine Vielzahl von Rezeptormolekülen ist bekannt, die an der Triggerung und Modulation der NK-Zellaktivität beteiligt ist. Zu diesen Molekülen gehören unter anderem CD2 (LFA-2) (Siliciano et al., 1985), CD16 (FcγRIII) (Lanier et al., 1988), LFA-1 (Timonen et al., 1988), CD40 Ligand (Carbone et al., 1997), CD69 (Activation Inducer Molecules) (Borrego et al., 1999), 2B4 (Tangye et al., 2000) sowie NKp80 (Vitale et al., 2001). Zum Beispiel können monoklonale Antikörper zur Stimulation von 2B4 und NKp80 in NKp46^{bright} Zellen eine starke zytotoxische Reaktion hervorrufen, wohingegen dieses in NKp46^{dull} Zellen nicht funktioniert. Diese Vielzahl von Rezeptoren agiert zumindest als Co-Rezeptoren, benötigt aber einen der vorher beschriebenen Rezeptoren als Haupttrigger. Die Rolle dieser Co-Rezeptoren der Aktivierung und Inhibition gilt es noch vollständig aufzuklären.

5. Material und Methoden

5.1 Antikörperproduktion W6/32

Hintergrund

Dieser von einer humanen, B-lymphozytären Hybridomzelllinie sezernierte, monoklonale anti-MHC-Klasse I Antikörper erkennt die β 2-Mikroglobulin assoziierte, schwere Kette der MHC-Klasse I Moleküle. Der Antikörper wurde benutzt, um HLA-G1s in dem Überstand einer HLA-G1s sezernierenden Lymphoblastzelllinie zu detektieren.

Zellkulturführung

Der Hybridom W6/32 wurde mit ca. 500.000 Zellen/ml „Medium Compleat“ als Erhaltungskultur in 75cm² Zellkulturflaschen im Inkubator bei 37°C geführt. Bei normalem Zellzyklus war eine Aufteilung der Zellen nach mikroskopischer Kontrolle in zwei 75cm² Zellkulturflaschen alle 2-3 Tage nötig.

Zur Produktion des W6/32 wurden die Zellen nach mikroskopischer Kontrolle und Abzentrifugation des Medium Compleat (550 g, 5 min, +18-20°C) in proteinfreies Hybridom Medium umgesetzt. Die Zellkultur wurde bis zu 7 Tagen in der Zellkulturflasche unter Zugabe von frischem Hybridom Medium weitergeführt.

Reinigung des W6/32 aus der Zellkultur

Nach Abzentrifugation der Zellen (550g, 5 min, +18-20°C) wurde der Überstand gesammelt und bei +4°C über 12h mit 81,8 ml gesättigter (NH₄)₂SO₄ Lösung pro 100ml Überstand versetzt. Die leicht trübe Lösung wurde mit 2000 g für 10 min bei +4°C zentrifugiert und das Präzipitat in 1 ml PBS pro 100ml Ausgangsüberstand wieder gelöst. Dieses gelöste Präzipitat wurde für 72 Stunden bei 4°Celsius gegen PBS dialysiert (Dialyseschlauch mit MW 6000).

Bestimmung der W6/32 Konzentration und Spezifität

Durch den Vergleich mit bekannten Proteinkonzentrationen im Bradford-Test (Messung der optischen Dichte mit Hilfe der Coomassie Brilliant Blue G250 Umsetzung im Absorptionsspektrum 595nm) wurde der Gehalt an W6/32 bestimmt. Die Spezifität des W6/32 wurde in Westernblots nachgewiesen.

Material

Zellkultur
Medium complet 500ml RPMI 1640 mit 5ml Natrium Pyruvat, 50ml Kälberserum, 50.000
Einheiten Penicillin und 50mg Streptomycin

Reagenzien
RPMI 1640 GibcoBRL, 61870-010
Natrium Pyruvat GibcoBRL, 11360-039
Penicillin-Streptomycin GibcoBRL, 14192-094
Medium Hybridoma GibcoBRL, 12040-051
PBS steril GibcoBRL, 14190-094
Foetales Kälberserum GibcoBRL, 10270-106
(NH₄)₂SO₄ Prolabo France

5.2 W6/32 beschichtete Sepharosekügelchen

Hintergrund

Die mit Hilfe des Hybridoms hergestellten W6/32 Antikörper werden über eine Esterbindung an die terminale Carboxylgruppe der Sepharose gebunden. Dieses dient der Gewichtserhöhung und ermöglicht somit die Abzentrifugation der W6/32 Antikörper und ihrer Liganden aus Lösungen.

Beschichtungsprotokoll der Sepharosekügelchen mit W6/32

Der selbsthergestellte Antikörper W6/32 wurde auf 4mg/ml PBS konzentriert. 1ml der Sepharosekügelchen wurde zweimal mit 30ml 1mMolarer HCL Lösung bei +4°C gewaschen und jeweils mit 300g 10 min lang bei +4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die verbleibenden Kügelchen in 2ml Reagenzgefäße nach Eppendorf transferiert. Hier erfolgte nochmals 2 min lang eine Zentrifugation mit 50g bei +4°C. Nach der Zentrifugation wurden die Reagenzgefäße nach Eppendorf aus der Zentrifuge genommen und der Überstand erst nach 2-3 min abgenommen. Durch diese Wartezeit wird der unbeabsichtigte Verlust von Sepharosekügelchen minimiert. Bei einem pH-Wert von 6-8 wurden 1ml der Sepharosekügelchen mit 1ml des Antikörpers W6/32 inkubiert. Für 12-18 Stunden wurden diese bei +18-20°C mit Hilfe eines Rotators gemischt und danach einer Zentrifugation von 50g für 2 min bei +4°C unterzogen. Nach erneuter 2-3 minütiger Wartezeit wurde der Überstand verworfen und die unbesetzten Stellen der Sepharosekügelchen mit 100mMolarem Ethanolamin blockiert. Dann folgte zweimaliges Waschen mit PBS bei +4°C. Die Zentrifugation erfolgte erneut mit 50g für 2 min bei +4°C. Nach dem Waschschritt wurden die W6/32-Sepharosekügelchen in 1ml PBS bei +4°C aufgehoben.

Bestimmung der Funktionsfähigkeit der W6/32-Sepharosekügelchen

Die Funktionalität der Sepharosekügelchen wurde anhand der HLA-G1s-Konzentrationsfähigkeit überprüft. Hierbei war zu beobachten, dass die Konzentrationsfähigkeit mit fortschreitender Benutzung zunahm!

Material

Reagenzien

HCl	Prolabo France
PBS steril	GibcoBRL, 21300-074
Sepharosekügelchen	Amersham, 170906
W6/32	Eigenproduktion
Ethanolamin	Prolabo France

5.3 Produktion des HLA-G1s

Hintergrund

Das MHC-Klasse Ib zugehörige HLA-G1s wird von der transfizierten B-Lymphoblastzelllinie 221.G1s in das Zellkulturmedium sezerniert, aus dem es mit Hilfe des Antikörpers W6/32 aufgereinigt wird.

Zellkulturführung

Die transfizierte Lymphoblastzelllinie wurde mit ca. 500.000 Zellen/ml Medium Complet in 75cm² Zellkulturflaschen geführt. Bei normalem Zellzyklus war eine Aufteilung in zwei 75cm² alle 2-3 Tage nötig. Nach einer mikroskopischen Kontrolle des Zellzustandes wurden sie für 5 min mit 550g bei +18-20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt zur HLA-G1s Reinigung mit W6/32-Sepharosekügelchen weiterverwendet oder bei -20°C in 50ml Falcons eingefroren. Die Kulturdauer der 221.G1s war auf max. 3 Wochen begrenzt.

Kontrolle einer möglichen Mykoplasmeninfektion

Die 221.G1s Zellkultur wurde routinemäßig auf Mykoplasmeninfektion untersucht. Das Ergebnis des Mykoplasmen-ELISA war negativ.

Material

Zellkultur

RPMI complet	GibcoBRL, 61870-010
Natrium Pyruvat	GibcoBRL, 11360-039
Penicillin-Streptomycin	GibcoBRL, 14192-094
PBS steril	GibcoBRL, 14190-094
Foetales Kälberserum	GibcoBRL, 10270-106

5.4 HLA-G1s Reinigung aus 221.G1s Zellkulturüberständen

Hintergrund

Mit Hilfe der W6/32-Sepharosekügelchen wird HLA-G1s in den 221.G1s Zellkulturüberständen detektiert und nicht-kovalent über Salzbrücken (Ionenbeziehungen), hydrophobe Wechselwirkungen an W6/32 gebunden. Nach Abzentrifugation der Kügelchen wird die Bindung über eine pH-Wert-Gradienten-Elution wieder gelöst und das HLA-G1s in Fraktionen aufgefangen.

Aufreinigung des HLA-G1s

50ml des frischen oder unter Protease-Inhibitor-Schutz (10µl pro 50ml) aufgetauten 221.G1s Zellkulturüberstand wurden mit 0,5ml W6/32-Sepharosekügelchen bei +4°C für 12-18 Stunden auf einem Rotator inkubiert. Nun folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei +4°C mit 300g. Erst 2-3 Minuten nach der Herausnahme aus der Zentrifuge wurde der Überstand abpipetiert und bei +4°C für eine mögliche 2. Passage verwahrt. Die HLA-G1s-W6/32-Sepharosekügelchen wurden nun zweimal mit 30 ml PBS gewaschen. Am Ende eines jeden Waschschruttes wurde mit 300g bei +4°C für 10 min zentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen. Nun erfolgte der Transfer der 0,5ml HLA-G1s-W6/32-Sepharosekügelchen in ein 2ml Reagenzgefäß nach Eppendorf. Hieran schloss sich nochmals eine 2 minütige Zentrifugation bei +4°C mit 50 g an. Der Überstand wurde verworfen und jeweils 2 Reagenzgefäße nach Eppendorf mit den HLA-G1s-W6/32-Sepharosekügelchen (sofern vorhanden) gepoolt. 1ml eines 0,1Molaren, pH-Wert 11,5, Glycinpuffers wurde den Reagenzgefäßen nach Eppendorf nun bei +4°C zugesetzt. Es schloss sich eine 2 minütige Zentrifugation bei +4°C und 50g an. Nach einer Wartezeit von 2-3 Minuten wurde der Überstand abgezogen und einem anderen 2ml Reagenzgefäß nach Eppendorf mit 1ml 1Molaren, pH-Wert 7,5 TRIS-Puffer zugefügt. Das HLA-G1s-W6/32-Sepharosekügelchen-gefüllte Reagenzgefäß nach Eppendorf wurden erneut mit 1 ml des 0,1 Molaren, pH-Wert 11,5, Glycinpuffers bei +4°C versetzt. Nach 2 minütiger Zentrifugation wurde der Überstand wieder in TRIS-Puffer gegeben. So entstanden insgesamt 10 Fraktionen mit TRIS-Glycin Puffergemisch und heruntergewaschenem HLA-G1s. Die W6/32-Sepharosekügelchen wurden zweimal mit PBS gewaschen und bei +4°C bis zum nächsten Einsatz aufbewahrt. Die 10 Fraktionen wurden nun gepoolt und mit Hilfe eines 5K NMWL Millipore Filter bei 1800g und +4°C bis zu einem Endvolumen von ca. 500µl aufkonzentriert. Das TRIS-Glycin Puffergemisch des Konzentrates wurde nun in 4 Waschschrutten gegen PBS ausgetauscht. Jeweils 4 ml PBS auf das Konzentrat in dem Filter gegeben und bis zu einem Endvolumen von ca. 500µl bei 1800g und +4°C zentrifugiert. Bestimmung der Konzentration und Reinheit sowie Lagerung des HLA-G1s

Nachdem vierten Waschen wurde mit Hilfe der Spektrometrie bei 280nm und bei 595nm (Bradford-Assay) die Konzentration des HLA-G1s bestimmt. Durch Westernblot wurde die Reinheit und Spezifität des HLA-G1s getestet. Nach diesen Tests erfolgte die Aliquotierung in an die Versuchsreihen angepasste Konzentrationen, um mehrmaliges Einfrieren und Auftauen zu vermeiden. Die Lagerung des aliquotierten HLA-G1s erfolgte bei -80°C.

Material

Reagenzien

Proteaseinhibitor	Sigma, P8340
PBS steril	GibcoBRL, 21300-074
Glycin	GibcoBRL, 15527-013
TRIS	Quantum Appligene
Bradfordstammlösung	BIORAD

5.5 NK-Zellkultur

Hintergründe

Die Natürliche Killerzelllinie NK92 stammt von mononukleären Zellen des peripheren Blutes eines 50 Jahre alten Kaukasier, der an einem progressiven Non-Hodgkin Lymphom erkrankt war. Sie verfügen aufgrund eines stabilen, aber langsamen Stoffwechsel über eine niedrige Proliferationsrate. Dieses ändert sich jedoch unter Zugabe von IL-2, einem Lymphokin der Th1_c Gruppe. Diese Interleukin-Stimulierung löst aber auch eine abweichende Rezeptorexpression aus, weshalb nur die Erhaltungskultur mit IL-2 geführt wird und NK-Zellen zur Versuchsdurchführung 4 Tage ohne IL-2 in Medium Compleet gehalten werden.

NK-Zellkultur

Die NK-Zellkultur wurde mit ca. 200.000 Zellen/ml Medium Compleet in 75cm² Zellkulturflaschen im Brutschrank geführt. Der Erhaltungskultur wurden nach mikroskopischer Kontrolle alle 2 Tage 100 Einheiten IL-2 /ml Zellkulturmedium zugeführt. Alle 4 Tage wurden die NK-Zellen abzentrifugiert (550g, 5min, +18-20°C) und in zwei 75cm² Zellkulturflaschen aufgeteilt und wiederum IL-2 mit 100 Einheiten/ml Zellkultur hinzugesetzt. NK-Zellen zur Versuchsdurchführung wurden für vier Tage mit 500.000 Zellen/ml Medium Compleet in 75cm² Zellkulturflaschen ohne IL-2 Zugabe kultiviert.

Verschiebung des CD56^{bright}-CD56^{dim} Gleichgewichtes in der Kultur

Durch die IL-2 Stimulation bildet sich im Laufe der Proliferation eine Selektion zugunsten der CD56^{bright} NK-Zellen mit ihrem speziellen Rezeptormuster aus, da CD56^{dim} NK-Zellen keine erhöhte Proliferationsneigung auf IL-2 Stimulation zeigen.

Material

Reagenzien

RPMI complet	GibcoBRL, 61870-010
Natrium Pyruvat	GibcoBRL, 11360-039
Penicillin-Streptomycin	GibcoBRL, 14192-094
PBS steril	GibcoBRL, 14190-094
Foetales Kälberserum	GibcoBRL, 10270-106
IL-2	GibcoBRL,14193-093

5.6 K562-Zellkultur

Hintergründe

Die K562-Zelllinie wurde aus dem Pleurapunktat einer 53 Jahre alten, an chronischer myeloischer Leukämie im terminalen Blastenschub erkrankten Kaukasierin gewonnen.

K562-Zellkultur

Die K562-Zellkultur wurde mit ca. 500.000 Zellen/ml Medium Complet in 75cm² Zellkulturflaschen im Brutschrank geführt. Alle 2 Tage wurden die K562-Zellen nach mikroskopischer Kontrolle abzentrifugiert (550g, 5min, +18-20°C) und in zwei 75cm² Zellkulturflaschen überführt.

Eignung der K562-Zellen

Die Zellen wurden als äußerst entdifferenziert charakterisiert, sind pluripotent, mit Differenzierungsmöglichkeit in die Vorläuferstufen der erythrozytären, granulozytären und monozytären Linien. Sie gelten als ideale Zielzellen für NK-Zellzytotoxizitätsversuche.

Material

Reagenzien

RPMI complet	GibcoBRL, 61870-010
Natrium Pyruvat	GibcoBRL, 11360-039
Penicillin-Streptomycin	GibcoBRL, 14192-094
PBS steril	GibcoBRL, 14190-094
Foetales Kälberserum	GibcoBRL, 10270-106

5.7 NK-Zellseparation aus peripherem Blut

Hintergrund

Da die NK-Zellen sich von den anderen Lymphozyten durch ein spezifisches Rezeptorrepertoire unterscheiden, ist eine Separation mit Hilfe der MACS (Magnetism-Assisted-Cyto-Selection) möglich. Ausgehend von peripherem Blut werden die Lymphozyten per Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert. Nun werden bestimmte Oberflächenmoleküle (Cluster of Differentiation, CD) auf den Lymphozyten mit Eisenpartikeln beladenen spezifischen Antikörpern markiert und in einer Säule mit Hilfe eines starken magnetischen Feldes aufkonzentriert. Hierbei gibt es zwei Verfahren, die positive und die negative Selektion. Bei der positiven Selektion wird der gewünschte CD direkt markiert, die gewünschten Zellen werden also im magnetischen Feld zurückgehalten. Sie können nach Ausschaltung des magnetischen Feldes von der Kolonne gewaschen werden. Die negative Selektion beruht auf der Markierung aller nicht gewünschten Zellen der Suspension. Die gewünschten Zellen werden somit im magnetischen Feld nicht aufgehalten, sondern durchlaufen sie ungehindert. Der Nachteil der positiven Selektion gegenüber der negativen Selektion ist die mögliche Interferenz der magnetischen Antikörper auf den Zielzellen mit anderen Antikörpern sowie die geringere Reinheit der Zellsuspension.

Die NK-Zellen des peripheren Blutes setzen sich zu mehr als 80% aus CD56^{dim} NK-Zellen und nur zu 20% aus CD56^{bright} NK-Zellen zusammen (Cooper et al., 2001b).

Negativ Selektion der NK-Zellen aus dem peripheren Blut

Gesunden weiblichen sowie männlichen Probanden wurden mit dem Monovettensystem von Sarstedt (Li-Heparin Monovetten) jeweils 50ml Blut abgenommen. Das abgenommene Blut wurde mit 50 ml PBS verdünnt und eine Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation in 15ml Falcons mit jeweils 3ml Ficoll-Lösung und 11,5ml Blut durchgeführt. Nach 20 minütiger Zentrifugation mit 2000g bei +18-20°C wurden die Lymphozytenringe der verschiedenen Falcons gepoolt und erneut für 10 Minuten bei +18-20°C mit 550g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und nun zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation 550g, 5 min, +18-20°C). Der Überstand wurde ebenfalls verworfen und das Zellsediment auf 0,5ml Gesamtvolumen mit Medium Complet aufgefüllt und suspendiert. Nun wurde die MACS-Antikörperlösung laut Gebrauchsanweisung hinzugegeben und für 20 min bei +4°C inkubiert. Danach folgte eine 5 minütige Zentrifugation bei 550g und +4°C. Dann wurde das magnetische Hapten laut Gebrauchsanweisung addiert. Nach 20 Minuten Inkubationszeit bei +4°C wurde der Überstand mit 550g, 5 min, +4°C abzentrifugiert. Es folgten nun 2 Waschschrte mit PBS (Zentrifugation 550g, 5min bei +4°C) Die NK-Zellen

wurden bis zu den jeweiligen Versuchen bei 37°C im Inkubator mit 500.000 Zellen pro ml Medium Complet kultiviert.

Kontrolle der NK-Zellextraktion

Von den 1,5 ml NK-Zellsuspension wurden 25µl abgenommen und mit 25µl Trypanblau versetzt. Das Trypanblau dringt in Zellen mit Membranschäden ein und zeigt somit tote Zellen auf. Die Zahl der vitalen Zellen der Suspension wurde dementsprechend mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wurden jeweils 100.000 vitale Zellen aus der NK-Zellsuspension entnommen und mit Durchflusszytometer-Antikörpern (CD3-FITC, CD16-RPE, CD45-RPE-Cy5, neg. AK) markiert. Die sich anschließende Durchflusszytometer-Analyse ließ Aussagen zur Reinheit der NK-Zellsuspension zu.

Material

Reagenzien

Ficoll	Biocoll
PBS steril	GibcoBRL, 14190-094
RPMI complet	GibcoBRL, 61870-010
Natrium Pyruvat	GibcoBRL, 11360-039
Penicillin-Streptomycin	GibcoBRL, 14192-094
Foetales Kälberserum	GibcoBRL, 10270-106
MACS NK-Depletion	Miltenyi, NK-Cell depl.
Magnetische Kolonne	Miltenyi, Minimacs

5.8 Biotinylierung von Proteinen

Hintergrund

Die Biotinylierung des W6/32 ist eine essentielle Voraussetzung für den HLA-G1s-ELISA. W6/32 detektiert als Nachweis-Antikörper das an den Fänger-Antikörper gebundene HLA-G1s auf der Matrix der ELISA-Platte. Das Biotin des W6/32 interagiert mit dem Avidin der Avidinperoxidase und bindet dieses fest an den Nachweis-Antikörper. Durch Zugabe eines geeigneten Reduktionsmittels entsteht durch die Peroxidase ein Farbumschlag der Lösung, welcher ohne eine Bindung des Biotins an W6/32 nicht zustande kommen kann.

Biotinylierung des W6/32

Das zu biotinylierende Protein wurde auf 1mg/ml konzentriert und mit 20µl/ml Proteinlösung Biotinylierungsreagenz bei +18-20°C auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluß daran wurde das Protein mit dem Reagenz mit Hilfe einer Sepharosesäule eluiert. Nach der Passage der Säule, in der

das Biotinylierungsreagenz gebunden wurde, wurde das Protein mit PBS eluiert, in Fraktionen aufgefangen und die Konzentration des Eluates mit Hilfe des Spektrometers bei 280nm bestimmt.

Material

Reagenzien

Biotinylierungsset Perbio, 21420

5.9 HLA-G1s-ELISA

Hintergrund

Der Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay ist ein Testverfahren, welches Proteine im Nanogrammbereich detektieren kann. In mehreren Arbeitsschritten werden verschiedene Lagen nach einem Sandwich-Prinzip aufgetragen. Die erste Lage ist der Primärantikörper, der spezifisch die Bindung zwischen Reaktionsgefäß und dem zu detektierenden Stoff herstellt. Nun folgt der zu detektierende Stoff. Die nächste Schicht besteht aus dem Sekundärantikörper, der die Bindung des zu detektierenden Stoffes mit einem Enzym vermittelt. Bei Zugabe eines geeigneten Reduktionsmittels (Chromphor) reduziert das gebundene Enzym dieses und es entsteht dabei ein Farbumschlag, der mit dem Spektrometer gemessen werden kann.

HLA-G1s-ELISA

In den speziellen ELISA-Platten mit 96 Flachboden-Löchern wurden 50µl des Primärantikörper pro Vertiefung aufgetragen und für 1h bei +37°C im Brutschrank und dann 12-18h bei +4°C inkubiert. Als Primärantikörper wurden MEM-G9, 87-G und IgG1 jeweils in der Konzentration von 2µg/ml Beschichtungspuffer verwendet. Der Überstand wurde mit einer schnellen Handbewegung ausgegossen und die Platten auf einer Zellstoffunterlage trocken geklopft. Dann erfolgte dreimaliges Waschen mit 100µl Waschpuffer pro Vertiefung. Nach dem Trockenklopfen wurden 100µl Blockpuffer pro Vertiefung aufgetragen und für 12-18h bei +4°C inkubiert. Hierauf folgten wiederum drei Waschschrte mit jeweils 100µl Waschpuffer pro Vertiefung. Nach dem Trockenklopfen wurden die Proben aufgetragen. Pro Vertiefung wurden 50µl der Proben aufgetragen, bei geringeren Volumina wurden die Proben mit Verdünnungspuffer verdünnt. Es erfolgte nun eine zweistündige Inkubation im Inkubator bei +37°C. Hierauf folgten wiederum drei Waschschrte mit 100µl Waschpuffer pro Vertiefung und anschließendem Trockenklopfen. Der Sekundär-Antikörper wurde dann mit 50µl pro Vertiefung aufgebracht. Es wurde das biotinylierte W6/32 mit 5µg/ml Verdünnungspuffer mit 0,05% tween 20 sowie 1% Mausserum verwendet. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde im Inkubator bei +37°C folgten 5 Waschschrte mit

jeweils 100µl Waschpuffer pro Vertiefung. Nach dem Trockenklopfen folgte pro Vertiefung die Zugabe von 50µl Verdünnungspuffer mit 0,05% Tween 20, 1% Mausserum sowie 1:4000 verdünnter Avidinperoxidase. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten bei +37°C im Inkubator. Nun erfolgten nochmals 5 Waschschrte mit 100µl Waschpuffer pro Vertiefung. Nach dem Trockenklopfen wurden 50µl OPD-Substratlösung pro Vertiefung hinzugefügt. Nach ungefähr 10-15 Minuten Inkubation unter Ausschluss von Licht wurde die Reaktion bei ausreichender Umsetzung des OPD-Substrates durch die Zugabe von 50µl H₂SO₄ 2N gestoppt. Nun folgte die Analyse mit dem ELISA-Platten-Spektrometer bei 492nm.

Blutproben von Mutter und Kind

Die benötigten Blutproben für den HLA-G1s-ELISA wurden vom betreuenden Personal des Kreissaals gewonnen und dem Labor zur sofortigen Verarbeitung bereitgestellt. Das villöse Blut der Plazenta wurde nach der Austreibung der Plazenta von der maternalen Seite der Plazenta gewonnen, das Nabelschnurarterienblut und Nabelschnurvenenblut wurde aus den Nabelschnurgefäßen abpunktiert, das venöse Blut des Foeten wurde im Rahmen der Routineuntersuchungen direkt nach der Geburt des Neonaten abgenommen. Die Menge betrug zwischen 300µl und 500µl Blut. Nach einer Zentrifugation mit 500g für 5 min bei 18-20°C wurde das Zellsediment verworfen und der Überstand direkt im HLA-G1s-ELISA getestet oder bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Antikörper

Der monoklonale Antikörper MEM-G9 ist ein Maus-IgG1-Antikörper, der HLA-G und HLA-G1s in β₂-Mikroglobulin assoziierter Form erkennt.

Der monoklonale Antikörper 87G gehört zur Gruppe der IgG2a Antikörper und erkennt HLA-G sowie HLA-G1s in β₂-Mikroglobulin assoziierter Form.

Der Antikörper anti-IgG1 erkennt generell MHC-Klasse I Moleküle und stellt somit eine Kontrolle der spezifischen Bindung des MEM-G9 dar.

Material

Zusammensetzung der Puffer:

Beschichtungspuffer	55 ml 0,1M Na ₂ CO ₃ pH 11 und 50 ml 0,1M NaHCO ₃ 0,1M pH 8,15 mischen auf pH-Wert 9,6 einstellen
Waschpuffer	50µl Tween 20 in 100 ml PBS
Blockpuffer	4g elektrophoretisch aufgetrenntes BSA in 100 ml PBS
Verdünnungspuffer	1g elektrophoretisch aufgetrenntes BSA in 100ml PBS

OPD-Substrat 1 Tablette Sigma OPD (O-phenyldiamin-peroxidase) in Zitrat-Phosphat-Puffer

Reagenzien

Na ₂ CO ₃	Prolabo France
NaHCO ₃	Prolabo France
PBS	GibcoBRL, 21300-074
Tween	Sigma, P7949
BSA	Sigma, A3803
Zitrat-Phosphat-Puffer	Sigma, P4922
OPD	Sigma, P3804
MEM-G9	Exbio Praha
IgG1	DAKO X0931
W6/32 biot.	Eigenproduktion
Mausserum	Eigenproduktion
MEM-G1	Exbio Praha
Avidin Peroxidase	Sigma, P0347

5.10 Gelelektrophorese und Westernblot

Hintergrund

Der Westernblot stellt eine Methode zur Detektion von Proteinen im Nanogrammbereich dar. Mit Hilfe einer Gelelektrophorese in Acrylamidgel werden nach Hitzebehandlung Bestandteile der einzelnen Proben gemäß ihrer Größe und Ladung aufgetrennt. Es erfolgt der Transfer auf eine Zellulosemembran, die das Elektrophoreseergebnis sichert und es für verschiedene Proteinmarkierungsverfahren zugänglich macht.

Gelelektrophorese und Westernblotprotokoll

Das Gel wurde nach der Anweisung des Herstellers mit (NH₄)₂SO₄ gegossen. Die zu untersuchenden Proben wurden 1:16 mit Laemmlipuffer mit 10% β-Mercaptoethanol und 0,05% Trypanblau gemischt. Es erfolgte eine Erhitzung auf 100°C für 5 Minuten. Nun wurden die Geltaschen mit den jeweiligen Proben beladen und in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die Laufkammer wurde mit Laufpuffer gefüllt und die Gelelektrophorese mit 110 Volt gestartet. Nachdem die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten, wurde die Spannung auf 160 Volt hochgesetzt. Kurz bevor das Trypanblau das Gel auf der Unterseite verlässt, wurde die Elektrophorese gestoppt und der Transfer auf die Nitrozellulosemembran durchgeführt. Nach der Einlage des Gels und der Membran in die Transfervorrichtung laut Gebrauchsanweisung und dem Auffüllen der Transferkammer mit Transferpuffer wurden 350mA für 2 Stunden angelegt. Danach wurde die Membran für 12-18h bei +4°C mit Blockpuffer auf einem Schüttler abgesättigt. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 30ml Waschpuffer wurde der Primärantikörper aufgetragen (10ml des Primärantikörperpuffers für 2h bei +18-20°C auf einem Schüttler). Nun wurde noch

dreimal mit jeweils 30ml Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss daran wurde die Membran für 45 Minuten bei +18-20°C mit dem Sekundärantikörper (Sekundärantikörperpuffer) inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit jeweils 30ml Waschpuffer wurde die Membran mit destilliertem Wasser kurz abgespült und die Detektion der Proteine mit dem ECL-Revelation-kit von Amersham laut Gebrauchsanweisung durchgeführt. Die Belichtungszeiten der Filme lagen je nach Versuch zwischen 30 Sekunden und 15 Minuten.

Antikörper

MEM-G1 ist ein Maus-IgG1-Antikörper, der spezifisch die freie, denaturierte schwere Kette von HLA-G und HLA-G1s detektiert. Zellgebundenes HLA-G wird nicht erkannt.

Anti-Maus IgG1-Peroxidase ist ein polyklonaler IgG-Schaf-Antikörper, der mit Peroxidase konjugiert ist. Die Peroxidase katalysiert in Gegenwart von H₂O₂ die Oxidation des Luminols der ECL-Lösung. Luminol emittiert Licht, welches auf dem Film sichtbar gemacht wird.

Material

Zusammensetzung der Puffer:

Laemmli-puffer	0,2M TRIS HCl, pH 6,8, 8%SDS, 40% Glycerol, 0,004 Bromphenolblau
Laufpuffer	14,25g Glycin, 2,9g TRIS und 1g SDS in 1l dest. H ₂ O
Transferpuffer	1,45g TRIS, 7,2g Glycine, 200ml Methanol in 800ml dest. H ₂ O
Blockpuffer	3g BSA, 5g Trockenmilch, 100µl Tween 20 in 100ml PBS
Waschpuffer	100µl Tween 20 in 100ml PBS
Primärantikörperpuffer	0,3g BSA, 0,5g Trockenmilch, 10µl Tween 20, 20µl MEM-G1 in 10ml PBS
Sekundärantikörperpuffer	0,3g BSA, 0,5g Trockenmilch, 10µl Tween 20, 5µl anti-Maus IgG1-Peroxidase in 10ml PBS

Reagenzien

(NH ₄) ₂ SO ₄	Prolabo France
SDS-Gel-System	GibcoBRL, 15574-015
Trypanblau	GibcoBRL, 15250-061
β-Mercaptoethanol	Sigma, M7522
Butanol	Prolabo France
Ethanol	Prolabo France
PBS	GibcoBRL, 21300-074
Trockenmilchpulver	Regilait France
BSA	Sigma, A3803
Tween	Sigma P7949
Ponceau-Rot	Sigma, P7170
Regenbogenmarker	Amersham, RPN756
MEM-G1	Exbio Praha
Anti-Maus IgGM-	

Peroxidase	Amersham, NA931
ECL Kit	Amersham, RPN2209
Chemiluminesz.-Film	Amersham, RPN3103
Entwickler	Guilleminot France
Fixateur	Guilleminot France
Nitrozellulosemembran	Amersham, RPN68D

5.11 ⁵¹Cr-Release Cytotoxicity Assay

Hintergrund

In diesem Zytotoxizitätsassay werden Zielzellen mit schwach radioaktivem ⁵¹Chrom inkubiert. Die Zellen nehmen das ⁵¹Chrom in ihr Zytoplasma auf. Nach einer bestimmten Inkubationszeit mit NK-Zellen werden alle Zellen abzentrifugiert und der Überstand behalten. Aus diesem kann nun der Anteil der zerstörten Zielzellen über die Aktivität des radioaktiven Chroms in dem Überstand mit Hilfe eines γ -Zählers bestimmt werden.

⁵¹CR-Zytotoxizitätsassay

In einem 1ml Falcon wurden 1×10^6 K562 Zielzellen in 10 μ l ⁵¹Chrom suspendiert und für 1h bei +37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit RPMI (Zentrifugation für 2 Minuten mit 550g bei +18-20°C) wurden jeweils 60.000 K562 Zielzellen zu NK-Zellen mit einem Effektor/Target Ration von 30/1, 10/1, 3/1 und 1/1 in 96 Loch Mikrotiterplatten mit rundem Boden gegeben. Die einzelnen Vertiefungen wurden bis auf 100 μ l mit RPMI aufgefüllt und für 2 Minuten mit 350g bei +18-20°C zentrifugiert. Nun folgte eine Inkubationszeit von 4h bei +37°C im Inkubator. Daran schloss sich eine erneute Zentrifugation mit 400g, bei +18-20°C und für 5 Minuten an. 100 μ l des Überstandes wurden jeweils abgenommen und in einem γ -Zähler gemessen.

Spezielle Infos

⁵¹Chrom hat eine Halbwertszeit von 27,7 Tagen und setzt sich zu ⁵¹Vanadium um, unter Emission von elektromagnetischer Strahlung.

Material

Reagenzien	
RPMI complet	GibcoBRL, 61870-010
Trypanblau	GibcoBRL, 15250-061
⁵¹ Cr-Lösung	Prolabo France

5.12 Sulforhodamin B Proliferations Test

Hintergrund

Der Sulforhodamin B Proliferationstest stellt eine empfindliche und einfach durchzuführende colorimetrische Methode dar, um den Gesamtproteingehalt einer Lösung zu ermitteln. Zwischen der Extinktion bei 550nm und der Proteinkonzentration besteht über großen Bereich eine lineare Beziehung.

Sulforhodamin B Proliferationstest

Die NK-Zellen wurden 24h vor Versuchsbeginn in 96 Loch Flachboden Mikrotiterplatten mit 150µl Medium Complet umgesetzt (ca. 50% Bedeckung des Bodens). Direkt vor dem Versuch wurde der Überstand nach Zentrifugation (300g, 6 Minuten, +18-20°C) abgenommen und durch 150µl des zu testenden Mediums ersetzt. Die Inkubation erfolgte nun im Inkubator bei +37°C (entsprechend der Versuchsdauer zwischen 24 und 72 Stunden). Dann erfolgte eine Zentrifugation mit 300g für 6 Minuten bei +18-20°C. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 50µl Trichloressigsäurelösung für 1h bei +4°C inkubiert, was zur Präzipitation der Zellen führt. Nach erneuter Zentrifugation (300g, 6 Minuten, +18-20°C) wurde der Überstand verworfen und 5 Waschschrirte mit PBS durchgeführt (Zentrifugation 300g, 3 Minuten +18-20°C). Nun wurden die Mikrotiterplatten komplett getrocknet und die Löcher mit 50µl Sulforhodamin Lösung gefüllt. Die Inkubationsdauer betrug 4h im Inkubator bei +37°C. Nach einer Zentrifugation (300g, 6 Minuten, +18-20°C) wurde der Überstand abgenommen und viermal mit Eisessiglösung gewaschen (Zentrifugation jeweils 300g, 6 Minuten, +18-20°C). Nach dem Waschen wurden die Platten wieder komplett getrocknet und die Löcher dann mit 150µl TRIS Puffer aufgefüllt. Nach 5 Minuten Inkubationszeit bei +18-20°C auf einem Schüttler wurden die Platten mit Hilfe eines ELISA-Platten-Spektrometer bei 540nm ausgelesen.

Material

Trichloressigsäurelösung	50ml 99,9% Trichloressigsäure in 100ml H2O dest.
Sulforhodamin B Lösung	0,4g Sulforhodamin B in 100ml H2O dest.
Eisessiglösung	1ml 99,9% Eisessig in 100ml H2O dest.
TRIS-Puffer	10mM TRIS Base, pH-Wert 10,5

Reagenzien

Trichloressigsäure	Prolabo France
Sulforhodamin B	Prolabo France
Eisessig	Prolabo France
TRIS	Quantum Appligene
HLA-G1s	Eigenproduktion

5.13 MTT Proliferationstest

Hintergrund

Beim MTT-Assay nehmen die Zellen das gelbe Tetrazoliumsalz (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) auf und reduzieren es durch die mitochondriale Succinatdehydrogenase zu blauem MTT-Formazan. Formazan hat ein Absorptionsmaximum bei 540nm, so ändert sich die optische Dichte der Zellsuspension und kann in einem Spektrometer gemessen werden.

MTT Proliferationstest

Die NK-Zellen wurden 24h vor Versuchsbeginn in 96 Loch Flachboden Mikrotiterplatten mit 150µl Medium Complet umgesetzt (ca. 30% Bedeckung des Bodens). Vor Versuchsbeginn wurde eine Zentrifugation mit 300g für 6 Minuten bei +18-20°C durchgeführt und der Überstand abgenommen. Nun wurde das zu testende Medium hinzugefügt. Nach der entsprechenden Inkubationszeit im Inkubator bei +37°C wurde 30µl MTT-Lösung pro Vertiefung hinzugefügt und erneut für 4h im Inkubator bei +37°C inkubiert. Der Überstand wurde nach einer Zentrifugation (300g, 6 Minuten, +18-20°C) verworfen und 150µl DMSO pro Vertiefung hinzugefügt. Die Mikrotiterplatte wurde nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei +37°C in einem ELISA-Platten-Spektrometer (Wellenlänge 540nm) ausgelesen.

Sonderinfos

Der MTT-Test eignet sich zur Durchführung eines Proliferationstests, weil er nur sehr wenige Waschschriffe zur Durchführung benötigt und damit einen verminderten Zellverlust bedeutet.

Material

MTT-Lösung 50mg MTT in 10ml H₂O dest.

Reagenzien

MTT	Prolabo France
PBS steril	GibcoBRL, 14190-094
RPMI complet	GibcoBRL, 61870-010
Natrium Pyruvat	GibcoBRL, 11360-039
Penicillin-Streptomycin	GibcoBRL, 14192-094
Foetales Kälberserum	GibcoBRL, 10270-106
DMSO	Prolabo France

5.14 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

Hintergrund

Der AQueous One Solution Cell Proliferation Assay ist ein colorimetrischer Test zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in einem Reaktionsgefäß. Owens Reagenz wird von Dehydrogenasen metabolisch aktiver Zellen in Formazan umgesetzt. Formazan wird durch eine erhöhte Absorption bei 490nm Wellenlänge nachgewiesen.

AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

100.000 NK-Zellen wurden 24h vor Versuchsbeginn in 96 Loch Flachboden Mikrotiterplatten mit 100µl Medium Complet umgesetzt. Zu Versuchsbeginn wurde zentrifugiert (300g, 6 Minuten, +18-20°C), der Überstand verworfen und das zu testende Medium hinzugefügt. Nach entsprechender Inkubationszeit wurden 20µl des AQueous One Solution Reagenz hinzugeführt und für 4h im Inkubator bei +37°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Absorption bei 490nm in einem ELISA-Platten-Spektrometer gemessen.

Material

Reagenzien

Aqueous One Solution	Promega
RPMI complet	GibcoBRL, 61870-010
Natrium Pyruvat	GibcoBRL, 11360-039
Penicillin-Streptomycin	GibcoBRL, 14192-094
Foetales Kälberserum	GibcoBRL, 10270-106

5.15 FACS-Analyse

Hintergrund

Die Fluorescens-Assisted-Cytometry (FACS) bestimmt mit Hilfe eines Laser die Größe (forward scatter) und Menge der Granula (sideward scatter) jeder einzelnen Zelle in der Lösung. So kann über die Werte für forward scatter und sideward scatter auf die Art der Zelle zurückgeschlossen werden. Zellen können zusätzlich mit Fluoreszenz-markierten spezifischen Antikörpern gefärbt werden. Photosensoren können mehrere Fluoreszenzen pro Zelle ermitteln und somit mehrere markierte Proteine pro Zelle detektieren. Die Ergebnisse werden digital verarbeitet und gespeichert. Für zuverlässige Ergebnisse benötigt das Durchflusszytometer mindestens 10.000 Zellen.

FACS-Analyse

100.000 der zu bestimmenden Zellen wurden mit 50µl PBS in kleine Reagenzgefäße nach Eppendorf transferiert und mit 2,5µl der gewünschten FACS-Antikörper für 20 Minuten bei +4°C inkubiert. Dann wurde die Lösung auf insgesamt 200µl mit PBS aufgefüllt und direkt die Messung am Durchflusszytometer durchgeführt. War die Messung nicht innerhalb von 4 Stunden möglich, wurden die Zellen mit 550g bei +4°C für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und ein Waschgang mit 200µl PBS durchgeführt. Nach der erneuten Zentrifugation mit 550g bei +4°C für 5 Minuten und dem Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen mit 200µl einer 0,05% Formalin-HBSS-Lösung fixiert. Die Lagerung erfolgte unter Ausschluss von Licht bei +4°C.

Material

ReagenzienPBS steril	GibcoBRL, 14190-094
FACS-Antikörper	DAKO
Formalin	Prolabo France
HBSS	ProlaboFrance

GESAMTAUFSTELLUNG der verwendeten Materialien und Maschinen

Materialien

Zellkulturflaschen	Advantage, 3170
Falcon 50ml	Advantage, 2098
Falcon 15ml	Advantage, 2097
Pipetten 2, 5, 10, 25ml	Advantage, 6502-6525
Saran	Dowchemicals, Saran
Desinfektionsmittel	Amiolab, Amiospray
ELISA-96 Platten	Costar USA, 3690
pH-Teststreifen	Whatman, 1628
Parafilm	Am. Nat. Can
Chemilumineszenzfilm	Amersham, 3103K
Westernblotmembran	Amersham, 68D

Maschinen

Elektrische Pipette	bioblock, pipetboy,
Inkubator	Heraeus, HeraCell
Zentrifuge	Hettich , Hettich
Mikroskop	Zeiss, Axioscop
Waage	Bel engineering, Mark
Rotator	bioblock, rotomix 9240
Vortex	bioblock, topmix 94323
Wasserbad	bioblock, polystat
ELISA-Spektrometer	MRX Dynatech Lab, 27
pH-Meter	WTW, Multical pH526
Spektrometer	UNICAM UV 300
Ultraschall	bioblock, Vibracell 724
Rotator	amilabo, apelex

Migrationseinheit	BIORAD
Transfereinheit	BIORAD
Spannungsgenerator	amilabo, ST304
Multiblockheater	Labline, multiblock 3
Durchflusszytometer	DAKO, Galaxy
γ -Zähler	Packard, Autogamma

6. Ergebnisse

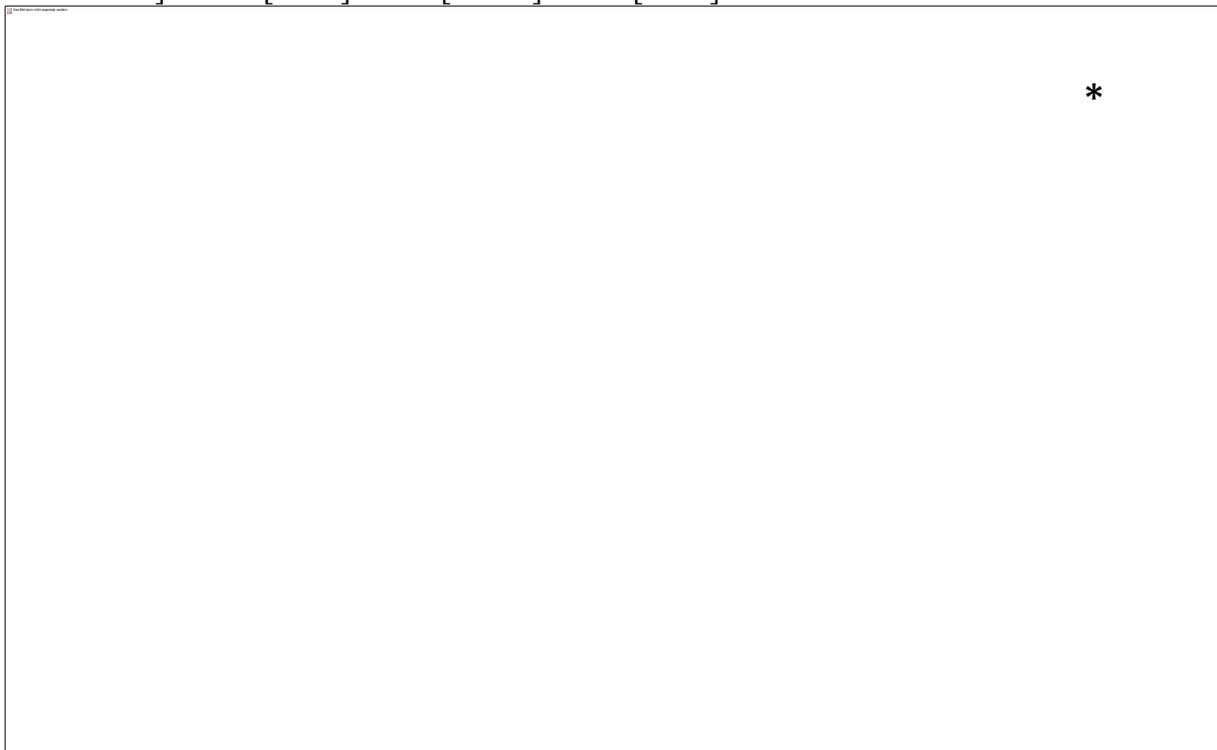
Diese Doktorarbeit besteht aus drei Ergebnisteilen, die untereinander in Beziehung stehen. Zuerst wurde das Vorkommen von HLA-G1s an verschiedenen Punkten des Blutkreislaufes von Mutter und Foetus mit Hilfe des HLA-G1s-ELISA getestet. In dem zweiten Teil wurde der Einfluss von HLA-G1s auf die Proliferation und Zytotoxizität der NK-Zellkultur NK92 untersucht. Der dritte Ergebnisteil beschäftigt sich mit dem Einfluss von HLA-G1s auf die Proliferation humaner NK-Zellen des peripheren Blutes.

6.1 Ergebnisteil I

6.1.1 Das Vorkommen von HLA-G1s in Blutproben von Mutter und Foetus

Um die Präsenz des HLA-G1s in der Plazenta nachzuweisen, wurden HLA-G1s-ELISAs durchgeführt, die HLA-G1s in den jeweils vier verschiedenen Blutproben (Nabelschnurvenenblut, Nabelschnurarterienblut, villöses Blut, gemischt venöses Blut des Foeten) pro Plazenta-Kind-Einheit detektierten.

<!--[if !vml]--><!--[endif]--><!--[if !mso]--><!--[endif]--><!--[if!mso]--><!--[endif]--><!--[if !mso&!vml]--> <!--[endif]--><!--[if!vml]--><!--[endif]-->



<!--[if !vml]--><!--[endif]-->Abbildung 11 HLA-G1s-ELISA. Relative Konzentration des HLA-G1s. Die mittlere Absorption des HLA-G1s-ELISA stellt semiquantitativ die Konzentration des HLA-G1s im Blut von Mutter und Foetus dar. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. * signifikant höhere Konzentration als Cuv, Cua und Vp ($p < 0,05$). $n=15$

Cuv	Nabelschnurvenenblut	Cua	Nabelschnurarterienblut
Vp	villöses Blut	Vf	peripher-venöses Blut des Foeten



Abbildung 12 Sulforhodamin-B-Test. Mittlere Absorption des 24h Sulforhodamin-B-Proliferationstests von NK92 unter Einfluss von 100 Einheiten IL-2/ml und HLA-G1s in verschiedenen Konzentrationen (jeweils $\mu\text{g}/\text{ml}$) sowie $10\mu\text{l}$ Überstand einer HLA-G1s exprimierenden Zellkultur). Die mittlere Absorption des Sulforhodamin-B-Tests stellt semiquantitativ die Proliferationsaktivität der Zellen dar. Die linken fünf Ergebnisse zeigen IL-2 behandelte NK92-Zellen, die rechten fünf Ergebnisse zeigen nicht mit IL-2 behandelte Zellen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. * signifikant höhere Proliferation als vergleichbare nicht mit IL-2 stimulierte NK92-Zellen ($p < 0,01$). $n=5$

Die Ergebnisse des 24h Sulforhodamin-B-Proliferationstests zeigen für NK92-Zellen eine signifikante positive Korrelation von IL-2 Gabe und NK92-Zellproliferation. HLA-G1s hat hingegen weder einen positiven noch negativen Effekt auf die NK92-Zellproliferation in HLA-G1s-Konzentrationen zwischen $0,5\mu\text{g}/\text{ml}$ und $2,0\mu\text{g}/\text{ml}$. (siehe ABBILDUNG 12)

Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse des 24h Sulforhodamin-B-Proliferationstests. Die mittlere Absorption des Sulforhodamin-B-Tests stellt semiquantitativ die Proliferationsaktivität der Zellen dar. Die linken fünf Ergebnisse zeigen IL-2 behandelte NK92-Zellen, die rechten fünf Ergebnisse zeigen nicht mit IL-2 behandelte Zellen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. * signifikant höhere Proliferation als vergleichbare nicht mit IL-2 stimulierte NK92-Zellen ($p < 0,01$). $n=5$

*

*

!mso&!vml]--> <!--[endif]--><!--[if!vml]--><!--[endif]-->



<!--[if !vml]--><!--[endif]-->

Abbildung 13 Sulforhodamin-B-Test. Mittlere Absorption des 48h Sulforhodamin-B-Proliferationstests von NK92 unter Einfluss von 100 Einheiten IL-2/ml und HLA-G1s in verschiedenen Konzentrationen (jeweils $\mu\text{g/ml}$) sowie 10 μl Überstand einer HLA-G1s exprimierenden Zellkultur. Die mittlere Absorption des Sulforhodamin-B-Tests stellt semiquantitativ die Proliferationsaktivität der Zellen dar. Die linken fünf Ergebnisse zeigen IL-2 behandelte NK92-Zellen, die rechten fünf Ergebnisse zeigen nicht mit IL-2 behandelte Zellen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. * signifikant höhere Proliferation als vergleichbare nicht mit IL-2 stimulierte NK92-Zellen ($p < 0,01$). n=5

Die Ergebnisse des 48h Sulforhodamin-B-Proliferationstests gleichen den Ergebnissen der 24h Messung. Die IL-2 Stimulation der NK92-Zellen ergibt eine signifikant verstärkte Proliferationstätigkeit, wohingegen HLA-G1s in verschiedenen Konzentration keinen Einfluss auf die Proliferationstätigkeit der NK92-Zellen hat. (siehe ABBILDUNG 13)

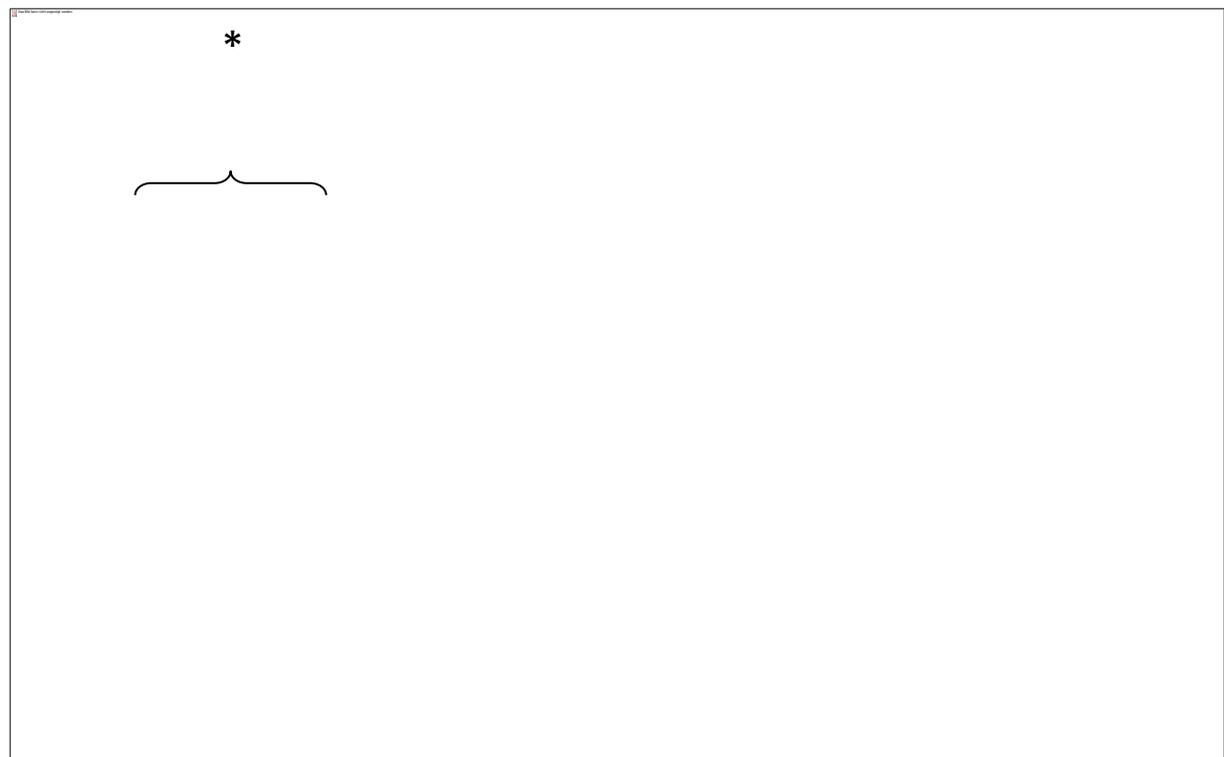
Zwischen den beiden Gruppen mit und ohne IL-2 Behandlung gibt also zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden nach Versuchsbeginn signifikante Unterschiede in der Proliferation.

Die Proliferation der mit IL-2 behandelten Zellkultur nimmt von der 24h Messung bis zum zweiten Zeitpunkt (48 Stunden Proliferationstätigkeit) zu und fällt dann bis zum dritten Zeitpunkt der Messung (72 Stunden Proliferationstätigkeit) rapide ab. Die Proliferationsaktivität der nicht mit IL-2 behandelten NK92-Zellkultur bleibt über die ersten beiden Messungen gleich, fällt aber auch bis zum dritten Zeitpunkt ab.

6.2.2 MTT-Proliferationstest

Dieser Proliferationstest misst die Enzymaktivität der mitochondrialen Succinatdehydrogenase und verfügt, aufgrund eines kürzeren Protokolls, über einen geringeren systematischen Fehler als der Sulforhodamin-B-Test. Somit können geringere, möglicherweise im Sulforhodamin-B-Test maskierte Effekte von HLA-G1s auf die NK92-Zellproliferation detektiert werden.

<!--[if !vml]--><!--[endif]--><!--[if !mso]--><!--[endif]--><!--[if!mso]--><!--[endif]--><!--[if
 !mso&!vml]--> <!--[endif]--><!--[if!vml]--><!--[endif]--><!--[if !vml]--><!--[endif]--><!--[if
 !mso]--><!--[endif]--><!--[if!mso]--><!--[endif]--><!--[if !mso&!vml]--> <!--[endif]--><!--
 [if!vml]--><!--[endif]--><!--[if !vml]--><!--[endif]--><!--[if !mso]--><!--[endif]--><!--
 [if!mso]--><!--[endif]--><!--[if !mso&!vml]--> <!--[endif]--><!--[if!vml]--><!--[endif]--><!--
 [if !vml]--><!--[endif]--><!--[if !mso]--><!--[endif]--><!--[if!mso]--><!--[endif]--><!--[if
 !mso&!vml]--> <!--[endif]--><!--[if!vml]--><!--[endif]--><!--[if !vml]--><!--[endif]--><!--[if
 !mso]--><!--[endif]--><!--[if!mso]--><!--[endif]--><!--[if !mso&!vml]--> <!--[endif]--><!--
 [if!vml]--><!--[endif]--><!--[if !vml]--><!--[endif]--><!--[if !vml]--><!--[endif]--><!--[if
 !mso]--><!--[endif]--><!--[if!mso]--><!--[endif]--><!--[if !mso&!vml]--> <!--[endif]--><!--
 [if!vml]--><!--[endif]--><!--[if $\underbrace{\hspace{1cm}}$!vml]--><!--[endif]-->



<!--[if !vml]--><!--[endif]-->

Abbildung 15 MTT-Test. Mittlere Absorption des 24h MTT-Test von 8.000 und 16.000 NK-Zellen unter Einfluss von 100 Einheiten IL-2/ml, HLA-G1s in verschiedenen Konzentrationen (jeweils $\mu\text{g/ml}$), 221.G1s(10 μl): 10 μl Überstand der 221.G1s Zellkultur, Medium: Kontrollgruppe ohne Zusätze. Die mittlere Absorption des MTT-Tests



<!--[if !vml]--><!--[endif]-->

Abbildung 16 MTT-Test. Mittlere Absorption des 48h MTT-Test von 8.000 und 16.000 NK-Zellen unter Einfluss von 100 Einheiten IL-2/ml, HLA-G1s in verschiedenen Konzentrationen (jeweils $\mu\text{g/ml}$), 221.G1s(10 μl): 10 μl Überstand der 221.G1s Zellkultur, Medium: Kontrollgruppe ohne Zusätze. Die mittlere Absorption des MTT-Tests stellt semiquantitativ die Proliferationsaktivität der Zellen dar. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. * signifikant höhere Proliferation als vergleichbare nicht mit IL-2 stimulierte NK92-Zellen ($p < 0,01$). n=6

Das Vorgenannte gilt auch für den zweiten Messzeitpunkt nach 48 Stunden. IL-2 stimuliert signifikant die Proliferation, HLA-G1s hat auch hier keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation. (siehe ABBILDUNG 16)

<!--[if !vml]--><!--[endif]--><!--[if !mso]--><!--[endif]--><!--[if!mso]--><!--[endif]--><!--[if
 !mso&!vml]--> <!--[endif]--><!--[if!vml]--><!--[endif]-->
 <!--[if !vml]--><!--[endif]--><!--[if !mso]--><!--[endif]--><!--[if!mso]--><!--[endif]--><!--[if
 !mso&!vml]--><!--[endif]--><!--[if!vml]--><!--[endif]--><!--[if !vml]--><!--[endif]--><!--[if
 !mso]--><!--[endif]--><!--[if!mso]--><!--[endif]--><!--[if!mso&!vml]--> <!--[endif]--><!--
 [if!vml]--><!--[endif]--><!--[if !vml]--><!--[endif]--><!--[if !mso]--><!--[endif]--><!--
 [if!mso]--><!--[endif]--><!--[if !mso&!vml]--> <!--[endif]--><!--[if!vml]--><!--[endif]--><!--
 [if !vml]--><!--[endif]--><!--[if !mso]--><!--[endif]--><!--[if!mso]--><!--[endif]--><!--[if
 !mso&!vml]--> <!--[endif]--><!--[if!vml]--><!--[endif]--><!--[if !vml]--><!--[endif]--><!--[if
 !vml]--><!--[endif]--><!--[if !mso]--><!--[endif]--><!--[if!mso]--><!--[endif]--><!--[if
 !mso&!vml]--> <!--[endif]--><!--[if!vml]--><!--[endif]--><!--[if !vml]--><!--[endif]-->



<!--[if !vml]--><!--[endif]-->

Abbildung 17 MTT-Test. Mittlere Absorption des 72h MTT-Test von 8.000 und 16.000 NK-Zellen unter Einfluss von 100 Einheiten IL-2/ml, HLA-G1s in verschiedenen Konzentrationen (jeweils µg/ml), 221.G1s(10µl): 10µl Überstand der 221.G1s Zellkultur, Medium: Kontrollgruppe ohne Zusätze. Die mittlere Absorption des MTT-Tests stellt semiquantitativ die Proliferationsaktivität der Zellen dar. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. * signifikant höhere Proliferation als vergleichbare nicht mit IL-2 stimulierte NK92-Zellen (p<0,01). n=6

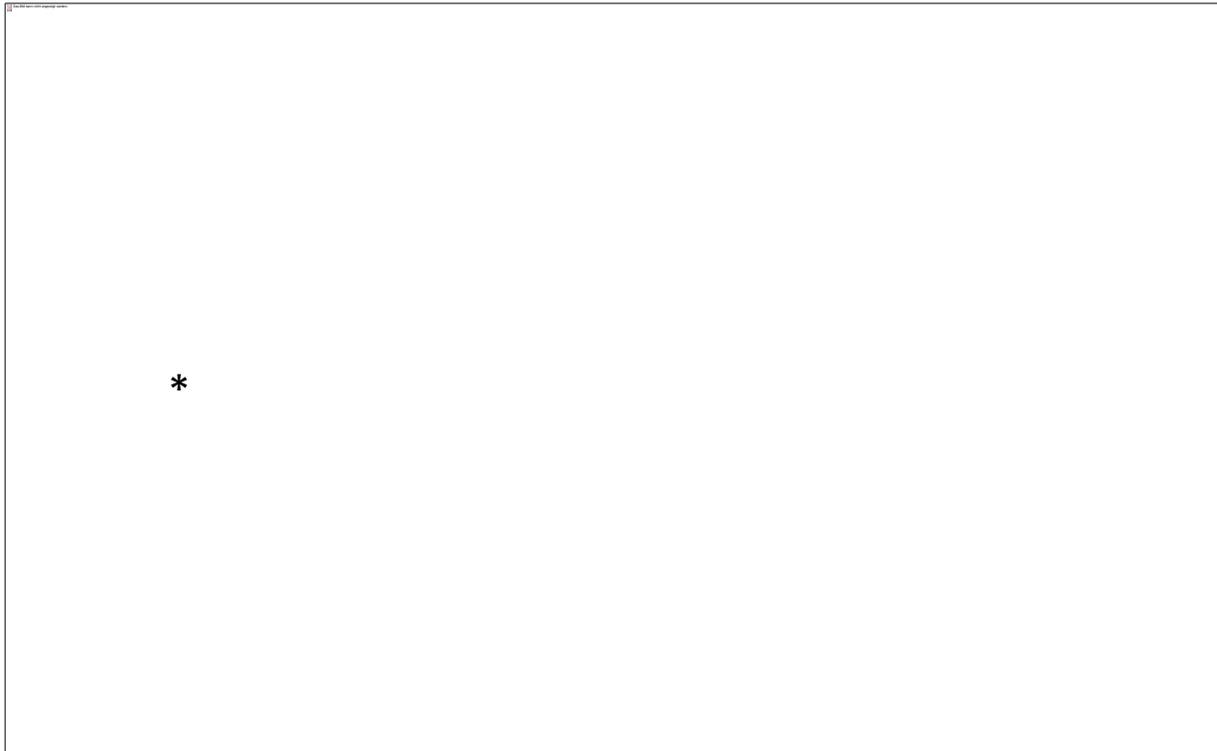
Auch nach 72 Stunden Proliferation ergibt sich dasselbe Bild, IL-2 stimuliert signifikant die Proliferation, HLA-G1s jedoch hat keinerlei Einfluss auf die Proliferation der NK92-Zellen. (siehe ABBILDUNG 17)

Die relativen Proliferationswerte des MTT-Proliferationstests stiegen insgesamt genommen wiederum von der 24 Stundenmessung zur 48 Stundenmessung an, fielen dann aber ebenso bis zur 72 Stundenmessung nach Versuchsbeginn ab.

6.2.3 ^{51}Cr -Zytotoxizitätstest

Diese ^{51}Cr -Zytotoxizitätsversuche wurden mit ^{51}Cr markierten K562-Zellen und HLA-G1s behandelten CD56^{bright} NK-Zellen sowie Kontrollgruppen durchgeführt.

<!--[if !vml]--><!--[endif]--><!--[if !mso]--><!--[endif]--><!--[if!mso]--><!--[endif]--><!--[if !mso&!vml]--> <!--[endif]--><!--[if!vml]--><!--[endif]-->



<!--[if !vml]--><!--[endif]-->

Abbildung 18 ^{51}Cr Zytotoxizitätstest. Mittlere spezifische Zytotoxizität in Prozent von NK92 gegenüber K562-Zellen unter Einfluss von HLA-G1s in verschiedenen Konzentrationen (jeweils $\mu\text{g}/\text{ml}$). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. * signifikant niedrigere Apoptoserate als Spontanapoptose der K562-Zellen („eingenußt“). n=4

In Abbildung 18 sind die Ergebnisse dokumentiert. Es wurden drei Gruppen gebildet, die in der Abbildung durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet sind. Die erste Gruppe bestand nur aus K562-Zellen ohne NK92-Zellen (gelb). In der zweiten Gruppe (blau) wurden K562-Zellen und NK92-Zellen 1 zu 1 gemischt (jeweils 60.000). Der Effektor/Zielzell Ratio lag somit bei $1/1$. Die dritte Gruppe (rot) bestand aus 600.000 NK92-Zellen und 60.000 K562-Zellen. Der Effektor/Zielzell Ratio lag bei $10/1$. Nach Abzug der Hintergrund-Radioaktivität, ausgelöst durch den normalen Zellzerfall, kann für HLA-G1s ein leichter aber dennoch signifikanter protektiver Effekt auf reine K562-Zellen (gelb) nachgewiesen werden. Hingegen kann bei sämtlichen

getesteten HLA-G1s Konzentrationen in den verschiedenen Effektor-/Targetcell Ratios kein signifikanter Unterschied zu den HLA-G1s unbehandelten Kontrollgruppen festgestellt werden. HLA-G1s hat also in keiner Konzentration von 0,2µg/ml bis 2,0µg/ml in der Kombination von K562-Zellen und CD56^{bright} NK92-Zellen einen nachweisbaren protektiven Effekt.

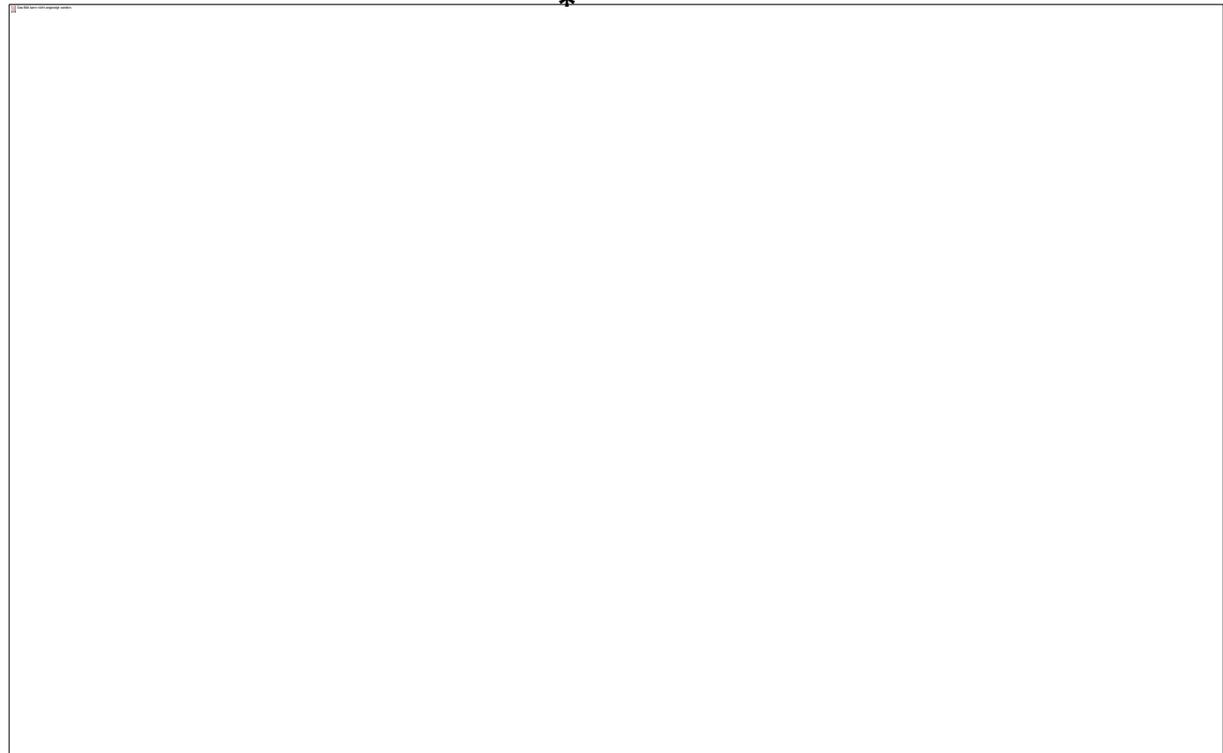
6.3 Ergebnisteil III

6.3.1 CellTiter Proliferationstest

Es wurden CellTiter Proliferationstests über 24, 48 und 72 Stunden mit jeweils 100.000 NK-Zellen, isoliert aus dem peripher-venösen Blut gesunder Erwachsener, durchgeführt (siehe ABBILDUNGEN 19-21). Die Zellen wurden mit MACS-Antikörpern negativ selektiert, gruppiert und verschiedenen Behandlungen mit 100 Einheiten IL-2/ml sowie 1µg HLA-G1s/ml Versuchsansatz unterzogen.

<!--[if !vml]--><!--[endif]--><!--[if !mso]--><!--[endif]--><!--[if!mso]--><!--[endif]--><!--[if !mso&!vml]--> <!--[endif]--><!--[if!vml]--><!--[endif]-->

*



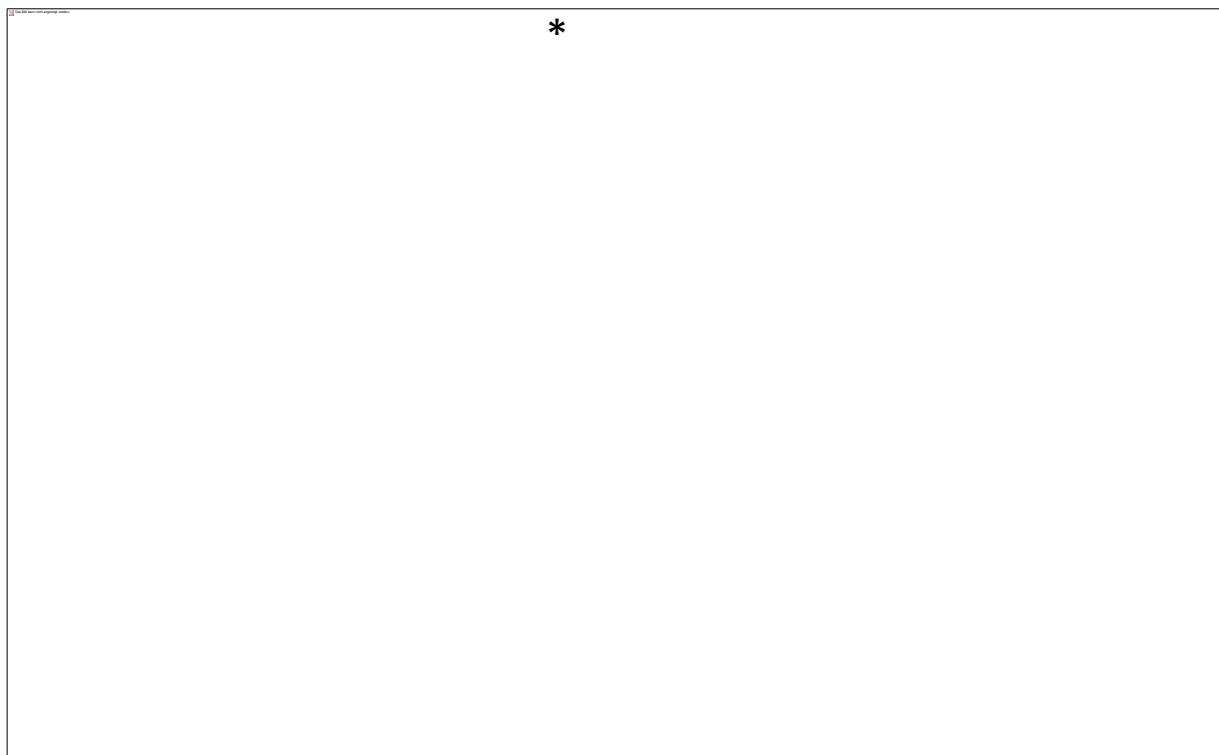
<!--[if !vml]--><!--[endif]-->

Abbildung 19 CellTiter-Test. mittlere Absorption des 24h CellTiter-Proliferationstest von Blut-NK-Zellen unter Einfluss von 100 Einheiten IL-2/ml und 1µg HLA-G1s/ml. Die mittlere Absorption des CellTiter-Tests stellt semiquantitativ die Proliferationsaktivität der Zellen dar. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. * signifikant höhere Proliferation als alle anderen getesteten Gruppen ($p < 0,05$). $n=6$

Die erste Gruppe bestand allein aus NK-Zellen des peripheren Blutes und stellt die Kontrollgruppe dar. Die zweite Gruppe wurde mit 100 Einheiten IL-2/ml Versuchsansatz stimuliert. Der dritten Gruppe wurde neben 100 Einheiten IL-2/ml Versuchsansatz auch noch 1µg HLA-G1s/ml Versuchsansatz hinzugegeben. Die vierte Gruppe bestand aus NK-Zellen mit 1µg HLA-G1s/ml

Versuchsansatz. In der Messung zum ersten Zeitpunkt (24 Stunden) zeigt sich eine gesteigerte Proliferationsfähigkeit der mit IL-2 behandelten Blut-NK-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die mit IL-2 und HLA-G1s behandelte Gruppe unterscheidet sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Die nur mit HLA-G1s behandelten Blut-NK-Zellen zeigen eine leicht gesteigerte Proliferationsaktivität. (siehe ABBILDUNG 19)

<!--[if !vml]--><!--[endif]--><!--[if !mso]--><!--[endif]--><!--[if!mso]--><!--[endif]--><!--[if !mso&!vml]--> <!--[endif]--><!--[if!vml]--><!--[endif]-->



<!--[if !vml]--><!--[endif]-->

Abbildung 20 CellTiter-Test. mittlere Absorption des 48h CellTiter-Proliferationstest von Blut-NK-Zellen unter Einfluss von 100 Einheiten IL-2/ml und 1µg HLA-G1s/ml. Die mittlere Absorption des CellTiter-Tests stellt semiquantitativ die Proliferationsaktivität der Zellen dar. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. * signifikant höhere Proliferation als alle anderen getesteten Gruppen ($p < 0,05$). $n=6$

Die Proliferationssteigerung durch IL-2 Stimulation (zweite Gruppe) ist nach 48 Stunden im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ausgeprägt. Die dritte Gruppe zeigt keinen Unterschied zur Kontrollgruppe, es findet sich keine gesteigerte Proliferation. Dasselbe gilt für die, nur mit HLA-G1s behandelte Gruppe. Auch hier ist keine gesteigerte Proliferation festzustellen. (siehe ABBILDUNG 20)

<!--[if !vml]--><!--[endif]--><!--[if !mso]--><!--[endif]--><!--[if !mso]--><!--[endif]--><!--[if !mso&!vml]--><!--[endif]--><!--[if !vml]--><!--[endif]-->



<!--[if !vml]--><!--[endif]-->

Abbildung 21 CellTiter-Test. mittlere Absorption des 72h CellTiter-Proliferationstest von Blut-NK-Zellen unter Einfluss von 100 Einheiten IL-2/ml und 1µg HLA-G1s/ml. Die mittlere Absorption des CellTiter-Tests stellt semiquantitativ die Proliferationsaktivität der Zellen dar. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. * signifikant höhere Proliferation als alle anderen getesteten Gruppen ($p < 0,05$). $n=6$

Nach 72 Stunden ist die Proliferation der zweiten Gruppe weiterhin signifikant erhöht, wohingegen die Werte der ersten, dritten und vierten Gruppe weiterhin stagnieren. (siehe ABBILDUNG 21)

Man erkennt zu allen drei Zeitpunkten eine charakteristische Erhöhung der Proliferation der NK-Zellen in der zweiten Gruppe, der allein mit IL-2 behandelten Gruppe. Die Gruppen drei und vier zeigen hingegen keine erhöhte Proliferationsaktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe.

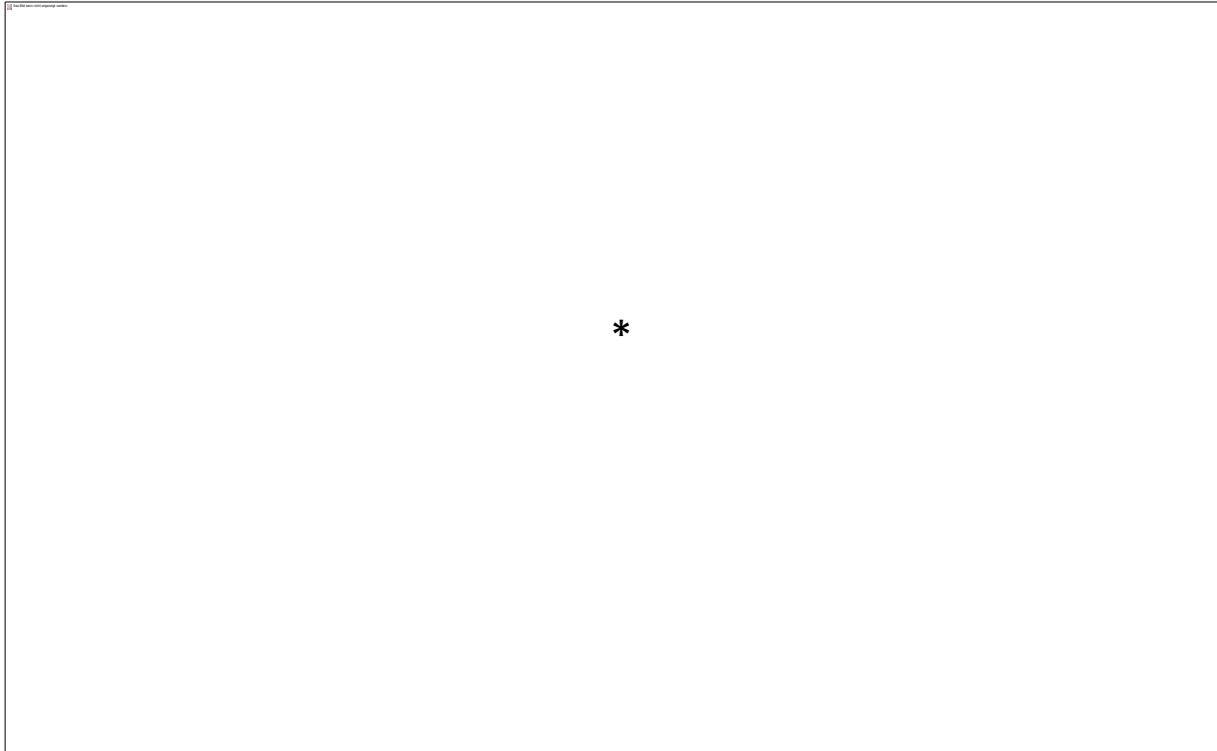
6.3.2 FACS Analyse CD71, CD25, CD56

Es wurden durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt, die zu den drei Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden nach Versuchsbeginn die Expression von CD71, CD25 und CD56 durch Antikörpermarkierung bestimmten. Jeweils 100.000 periphere Blut-NK-Zellen wurden zu den drei Zeitpunkten mit entsprechenden Antikörpern versetzt und pro Probe mindestens 10.000 Zellen

HLA-G1s/ml Versuchsansatz hinzugefügt. Die vierte Gruppe (grün) wurde alleine mit 1µg HLA-G1s/ml Versuchsansatz behandelt.

Nach 24 Stunden Inkubationszeit ist für die alleine mit IL-2 behandelte Gruppe ein signifikantes Ansteigen der CD71 Expression zu bemerken, wohingegen die anderen drei Gruppen sich nicht signifikant von einander unterscheiden. Auch die CD25 Expression steigt nur bei der allein mit IL-2 behandelten Gruppe an. Das Verhältnis von CD71/CD25 steigt dementsprechend auch nur bei dieser Gruppe an. (siehe ABBILDUNG 22)

<!--[if !vml]--><!--[endif]--><!--[if !mso]--><!--[endif]--><!--[if!mso]--><!--[endif]--><!--[if !mso&!vml]--> <!--[endif]--><!--[if!vml]--><!--[endif]--><!--[if !vml]--><!--[endif]--><!--[if !mso]--><!--[endif]--><!--[if!mso]--><!--[endif]--><!--[if !mso&!vml]--> <!--[endif]--><!--[if!vml]--><!--[endif]**-->



<!--[if !vml]--><!--[endif]-->

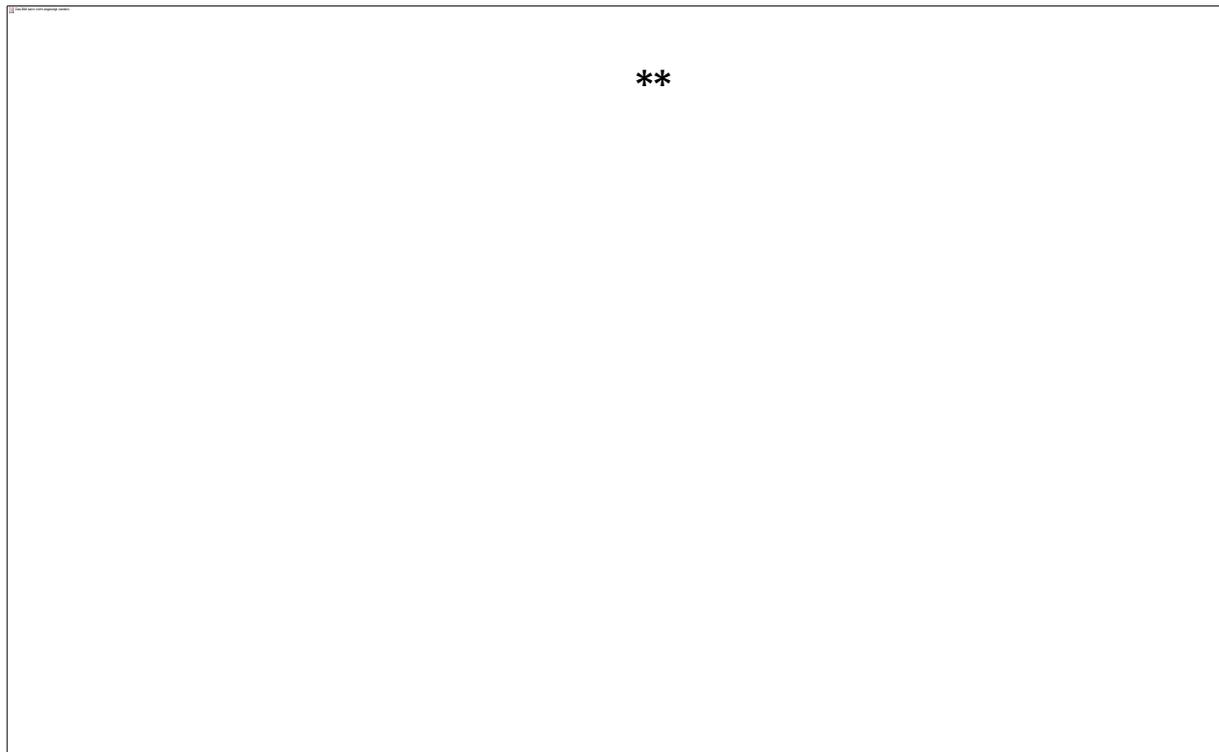
Abbildung 23 FACS-Analyse. Mittlerer prozentualer Anteil CD71/CD25 positiver Blut-NK-Zellen nach 48h Inkubationszeit mit 100 Einheiten IL-2/ml und 1,0µg HLA-G1s/ml. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. ** signifikant höhere Expression des markierten CDs als die anderen Gruppen mit gleicher Antikörpermarkierung ($p < 0,01$), * signifikant höhere Expression des markierten CDs als die anderen Gruppen mit gleicher Antikörpermarkierung ($p < 0,05$). $n=7$

Zum zweiten Zeitpunkt der Messung (48 Stunden) ergibt sich das gleiche Bild wie bei der 24 Stundenmessung. Die Expression von CD71 und CD25 steigt nur bei der mit IL-2 behandelten Gruppe an, die anderen drei Gruppen exprimieren die CD71 und CD25 in gleichem Maße. Der Koeffizient von CD71 und CD25 ergibt jedoch keinen korrelierten Anstieg für die alleine mit IL-2 behandelte Gruppe. (siehe ABBILDUNG 23)

Versuchsreihe II CD71/CD56

Die zweite Versuchsreihe verglich die CD71 und CD56 Expression auf den, über 24, 48 oder 72 Stunden mit HLA-G1s und/oder IL-2 inkubierten NK-Zellen. Das Versuchsaufbau glich dem der ersten Versuchsreihe.

<!--[if !vml]--><!--[endif]--><!--[if !mso]--><!--[endif]--><!--[if !mso]--><!--[endif]--><!--[if !mso&!vml]--><!--[endif]--><!--[if !vml]--><!--[endif]--><!--[if !vml]--><!--[endif]-->

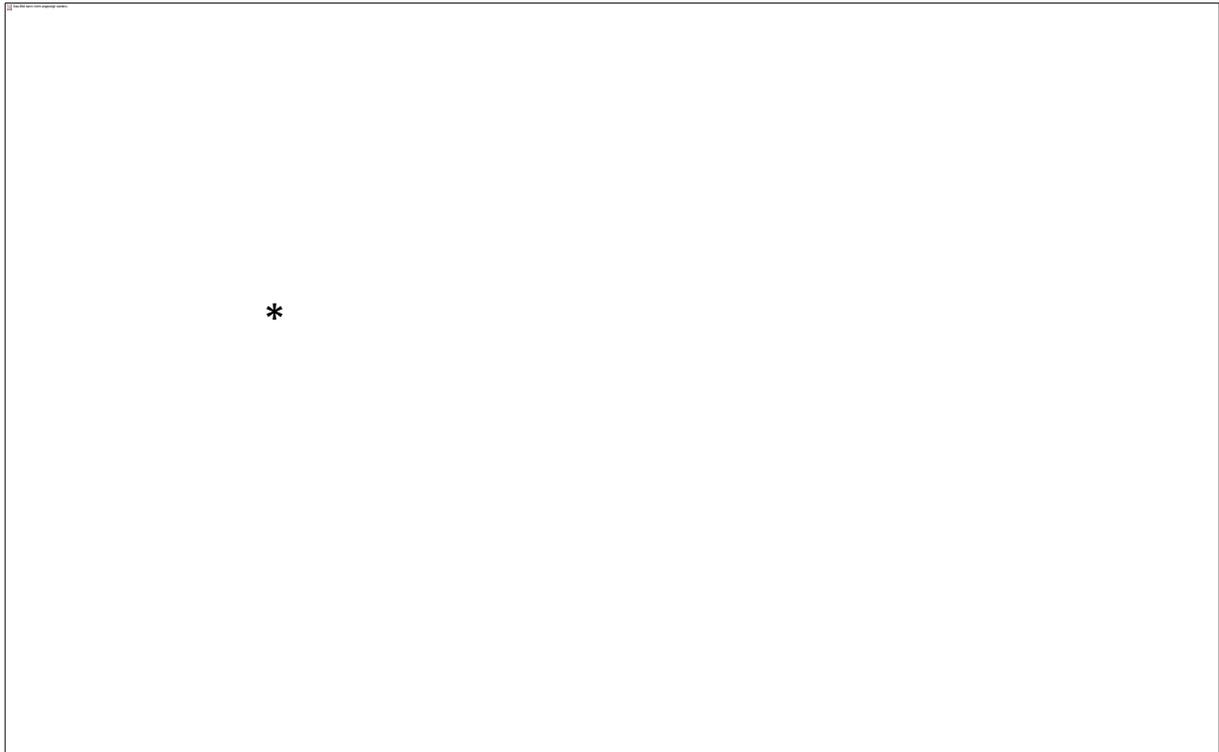


<!--[if !vml]--><!--[endif]-->

Abbildung 25 FACS-Analyse. Mittlerer prozentualer Anteil CD71/CD56 positiver Blut-NK-Zellen nach 24h Inkubationszeit mit 100 Einheiten IL-2/ml und 1,0µg HLA-G1s/ml. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. ** signifikant höhere Expression des markierten CDs als die anderen Gruppen mit gleicher Antikörpermarkierung ($p < 0,01$). $n=7$

Schon zum ersten Messzeitpunkt ist eine signifikante Steigerung der CD56 Expression der nur mit IL-2 behandelten Gruppe erkenntlich, ebenso kommt es in dieser Gruppe zu einer leicht gesteigerten CD71 Expression. Dies führt zu einer gesteigerten Korrelation der CD71 und CD56 Expression auf den IL-2 stimulierten Blut-NK-Zellen. Die anderen Gruppen heben sich weder in der CD71 oder CD56 Expression, noch in dem CD71/CD56 Koeffizienten von der Kontrollgruppe ab. (siehe ABBILDUNG 25)

<!--[if !vml]--><!--[endif]--><!--[if !mso]--><!--[endif]--><!--[if!mso]--><!--[endif]--><!--[if
 !mso&!vml]--> <!--[endif]--><!--[if!vml]--><!--[endif]--><!--[if !vml]--><!--[endif]--><!--[if
 !mso]--><!--[endif]--><!--[if!mso]--><!--[endif]--><!--[if !mso&!vml]--> <!--[endif]--><!--
 [if!vml]--><!--[endif]--><!--[if !vml]--><!--[endif]--><!--[if !mso]--><!--[endif]--><!--
 [if!mso]--><!--[endif]--><!--[if !mso&!vml]--> <!--[endif]--><!--[if!vml]--><!--[endif]--><!--
 [if !vml]--><!--[endif]--><!--[if !mso]--><!--[endif]--><!--[endif]--><!--[if!mso]--><!--[endif]--><!--[if
 !mso&!vml]--> <!--[endif]--><!--[if!vml]--><!--[endif]--><!--[endif]-->



<!--[if !vml]--><!--[endif]-->

Abbildung 26 FACS-Analyse. Mittlerer prozentualer Anteil CD71/CD56 positiver Blut-NK-Zellen nach 48h Inkubationszeit mit 100 Einheiten IL-2/ml und 1,0µg HLA-G1s/ml. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. ** signifikant höhere Expression des markierten CDs als die anderen Gruppen mit gleicher Antikörpermarkierung (p<0,01), * signifikant höhere Expression des markierten CDs als die anderen Gruppen mit gleicher Antikörpermarkierung (p<0,05). n=7

Nach 48 Stunden Versuchsdauer ist die CD71 und CD56 Expression der IL-2 stimulierten Zellen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Auch der CD71/CD56 Koeffizient ist leicht gestiegen. In der mit IL-2 und HLA-G1s behandelten Gruppe wie auch in der nur mit HLA-G1s behandelten Gruppe findet sich gleichfalls eine signifikante Erhöhung der CD56 Expression, jedoch nicht der CD71 Expression, weshalb der CD71/CD56 Koeffizient nicht signifikant erhöht ist. (siehe ABBILDUNG 26)

IL-2 nachgewiesen. Die Erhöhung der CD56 Expression tritt ebenso bei den HLA-G1s behandelten Gruppen auf, jedoch in geringerem Maße als bei den rein IL-2 behandelten Gruppen.

7. Diskussion

7.1 HLA-G1s in Mutter und Foetus

Das Vorhandensein von HLA-G1s in der Plazenta und dem dazugehörigen Blutkreislauf sowie der Amnionflüssigkeit (Fournel et al., 1999) legt eine Bedeutung für die foeto-maternale Grenzschicht und damit die Entwicklung des Kindes nahe. HLA-G1s könnte ebenso wie HLA-G in die Regulation des Immunsystems und damit in das Überleben des implantierten semi-allogenen Organismus eingebunden sein.

Die im HLA-G1s-ELISA gemessenen Konzentrationen der Plazenta-Kind-Einheiten untereinander zeigten grosse Unterschiede. Dieses ist nach Rebmann auf die verschiedenen HLA-G Allele zurückzuführen (Rebmann et al., 2001). Träger des häufigsten HLA-G Allel (G*01011) zeichnen sich durch hohe HLA-G1s Sekretion aus (27ng/ml), wohingegen bei Trägern des HLA-G Allel (G*01013) nur 66% niedrigere Konzentrationen nachweisbar waren. Desweiteren gibt es ein „Null-Allel“ (HLA-G*0105N), welches ein non-sense-Protein erzeugt. Aufgrund einer Cytosindeletion im Nukleotid 1597 des HLA-G*0105N kommt es zu einer Leserahmenverschiebung des Dreierbasenrhythmus und somit zu einer veränderten Aminosäurenabfolge; es resultiert ein Stopcodon am Anfang des Exons 4 (Domäne $\alpha 3$) (Ober et al., 1998). Man könnte annehmen, dass es in diesen Individuen zu manifesten Störungen des Immunsystems oder der Fertilität kommt, dies ist jedoch nicht der Fall. 6,14% der spanischen Bevölkerung (Suarez et al., 1997), 7,4% der schwarzen nordamerikanischen Bevölkerung und 2,3% der kaukasischen Bevölkerung (van der Ven et al., 1998), hingegen 0% der japanischen Bevölkerung sind zumindest heterozygot für dieses Allel. Ober beschrieb sogar eine Patientin, die homozygot für das Allel G*-0105N war und sechs Kinder ohne jegliche Komplikation während Schwangerschaft oder Geburt zur Welt brachte. Diese Kinder zeigten auch später keinerlei Immundefizienz oder Autoimmunprozesse (Ober et al., 1998).

Die Existenz von „Stark-“ und „Schwach-Sezernierern“ von HLA-G1s könnte auf die unterschiedliche Einbindung des HLA-G1s in die spezifische Immunregulation jedes einzelnen Individuums zurückzuführen sein. HLA-G1s hängt nicht von der Expression des HLA-G1 ab (Moreau et al., 2002).

7.2 Kritische Betrachtung der eigenen Ergebnisse

7.2.1 Sulforhodamin B Proliferationstest

An der NK-Zellkultur NK92, die sich fast ausschließlich aus CD56^{bright} NK-Zellen aufgrund der langfristigen IL-2 Stimulation zur Erhaltung der Zellkultur (Caligiuri et al., 1993) zusammensetzt, wurden zwei verschiedene Proliferationstests und ein Zytotoxizitätstest durchgeführt.

Wie aus den Ergebnissen des Sulforhodamin-B-Proliferationstests hervorgeht, proliferieren NK92-Zellen nur unter IL-2 Einfluss. Ohne IL-2 Behandlung kommt es lediglich zu einer schwachen Proliferation der NK92-Zellen. Das Vorhandensein von HLA-G1s ergibt keine Unterschiede in der Proliferationsaktivität der verschiedenen Versuchsansätze.

Die Tendenz der Proliferationsaktivität der NK92-Zellkulturen ist bis zum zweiten Messzeitpunkt (48 Stunden) zunehmend, danach fällt sie jedoch rapide ab. Dieses kann einerseits auf ein Nachlassen der IL-2 Aktivität in den IL-2 behandelten Gruppen und andererseits auf die Qualitätsabnahme der nicht gewechselten Nährstoffmedien aller Gruppen zurückgeführt werden.

7.2.2 MTT Proliferationstest

Auch im MTT-Proliferationstest konnten trotz einer höheren Sensitivität und eines geringeren systematischen Fehler als im Sulforhodamin-B-Test keine signifikanten Unterschiede in der Proliferationsaktivität der CD56^{bright} NK-Zellen bei den verschiedenen HLA-G1s Konzentrationen und Kontrollproben festgestellt werden.

Eine basale Proliferation der Proben wurde auch hier festgestellt, jedoch nicht der Abfall der Proliferationsaktivität nach 72 Stunden. Dies ist wahrscheinlich auf die um die Hälfte reduzierte Zellanzahl pro Versuchsgruppe und damit den langsameren Ressourcenverbrauch im Vergleich zu dem Sulforhodamin-B-Proliferationstest zurückzuführen.

7.2.3 ⁵¹Cr Zytotoxizitätstest

Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, hat die HLA-G1s-Konzentration keinerlei Einfluss auf die Zytotoxizität der NK92-Zellen. Es ist bekannt, dass ruhende CD56^{dim} NK-Zellen stärker zytotoxisch gegenüber K562-Zellen wirken als ruhende CD56^{bright} NK-Zellen (Nagler et al., 1989). Nach Aktivierung mit IL-2 oder IL-12 nimmt jedoch die zytotoxische Aktivität der CD56^{bright} NK-Zellen stark zu, sodass es zu vergleichbaren Werten mit den CD56^{dim} NK-Zellen kommt

(Robertson et al., 1992). Dies schließt also einen möglicherweise entscheidenden Unterschied in der zytotoxischen Aktivität der CD56^{bright} NK92-Zellen und den vorwiegend im Blut vorkommenden CD56^{dim} NK-Zellen aus.

Nach IL-2 Stimulation kommt es auch zu einer Expression des Natural Cytotoxicity Receptors NKp44. Dieser Rezeptor scheint eine wichtige Funktion in der IL-2 aktivierten NK-Zell Zytotoxizität zu übernehmen (Vitale et al., 1998). Er vermittelt sein Signal über Bindung an ein ITAM beinhaltendes CD3 ζ und Fc ϵ RI γ Adapterprotein, welches in die Erkennung zahlreicher Tumorzellen eingebunden ist (Moretta et al., 2000). HLA-G1s scheint also auch auf diesen Rezeptor und dessen Signaltransduktion keinen inhibitorischen Einfluss auszuüben.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass HLA-G1s in verschiedenen Konzentrationen weder proliferationsinhibitorische noch zytotoxizitätsinhibitorische Wirkung auf die Zellen der NK92-Zelllinie ausübt. Dies ist wahrscheinlich auf eine akquirierte Unempfindlichkeit der NK92-Zellen gegenüber HLA-G1s zurückzuführen. Der Auslöser könnte eine Veränderung der normalen Zellfunktion aufgrund der pathologischen Transformation der NK92-Zellen oder die bekannte CD56^{bright}-Selektion unter der IL-2 Behandlung in NK-Zellkulturen sein (Caligiuri et al., 1993).

7.2.4 Celltiter 96 Proliferationstest

HLA-G1s zeigt in den verschiedenen Konzentrationen (0,2 μ g/ml-2,0 μ g/ml) eine signifikante proliferationsinhibitorische Wirkung auf periphere Blut-NK-Zellen. Selbst der starke Proliferationsaktivator IL-2 kann unter HLA-G1s Einfluss keine erhöhte Proliferationsaktivität hervorrufen.

Die optische Dichte aller Gruppen nimmt bis 72 Stunden nach Versuchsanfang zu, dies ist wahrscheinlich auf eine Adaptation der nativen Zellen an die optimalen Kulturbedingungen zurückzuführen.

7.2.5 FACS Analyse des Vorkommens von CD71, CD25 und CD56

Zur durchflusszytometrischen Analyse der Proliferation der Blut-NK-Zellen unter Einfluss HLA-G1s wurden proliferationsstypische Cluster of differentiation (CD) der NK-Zellen ausgewählt.

CD71 ist der Transferrin Rezeptor, der ubiquitär auf proliferierenden Zellen vorkommt. Transferrin versorgt proliferierende Zellen mit benötigtem Eisen, die Dichte des

Transferrinrezeptors auf der Zelloberfläche lässt sich in Korrelation mit der Proliferationsrate der Zellen setzen (Kawabata et al., 2001)

CD25 ist die IL-2R α Kette des IL-2 Rezeptors. IL-2 ist ein Th1 $_c$ Zytokin und wird von den NK-Zellen zur Proliferation benötigt. NK-Zellerhaltungskulturen werden wie beschrieben mit IL-2 versetzt, um die Proliferationstätigkeit aufrechtzuerhalten.

CD56 ist auch als N-CAM bekannt. Es ist das ursprünglich nur auf neuronalen Zellen nachgewiesenes Neuronal-Cell Adhesion Molecule, kommt aber auch auf den NK-Zellen vor. Es dient hier als Differenzierungsmerkmal der CD56 NK-Zellen, die, wie vorher beschrieben, unterschiedliche Rezeptorexpressionen aufzeigen.

Unter Einfluss von IL-2 stiegen die Expressionen von CD71, CD25 und CD56 signifikant an. Dies spricht für eine Stimulation der Proliferation und Differenzierung durch IL-2.

Unter Zugabe von HLA-G1s stiegen die Expressionen von CD71, CD25 und CD56 jedoch nicht an. Das heißt HLA-G1s wirkt proliferations- und differenzierungshemmend.

7.3 Interpretation der Ergebnisse anhand publizierter Studien

7.3.1 NK-Zell Immunoglobulin Rezeptoren

Aus der Familie der KIR kommt einzig KIR2DL4 nur auf NK-Zellen vor, darüber hinaus interagiert KIR2DL4 als einziger KIR mit der MHC-Klasse Ib. Dies lässt eine besondere Funktion des KIR2DL4 vermuten. Ponte schränkte das Auftreten des KIR2DL4 in einem viel diskutierten Artikel noch weiter ein und wies ihn nur auf CD56^{bright} NK-Zellen der Plazenta nach (Ponte et al., 1999). KIR2DL4 wurde als inhibitorischer Rezeptor klassifiziert, was unsere Versuche anhand der Proliferationsinhibition durch HLA.G1s bestätigen. Neuere Versuche zeigen, dass es bei einer Rezeptoraktivierung durch HLA-G sowie HLA-G1s zu einer erhöhten IFN- γ Produktion kommt, ohne eine lytische Aktivität der NK-Zelle zu induzieren (Rajagopalan et al., 2001). IFN- γ ist ein Typ II Interferon, welches von T-Lymphozyten und NK-Zellen exprimiert wird. Es liegt auf Chromosom 12 (12q24) kodiert vor und hemmt phasenunspezifisch die Zellteilung; dies geschieht wahrscheinlich über die Förderung der Zelldifferenzierung. Es interagiert mit verschiedenen Wachstumsfaktoren und fördert die Endothelentwicklung, zusätzlich führt es zur Induktion von Immunglobulin- und IL-2-Rezeptorbildung. Es ist umstritten, ob dadurch eine Toleranz dem semi-allogenen Foetus gegenüber entwickelt wird; vielleicht ermöglicht IFN- γ eine bessere Vaskularisation der Implantationsstelle (Ashkar et al., 2000).

7.3.2 Rezeptoren der Immunoglobulin Superfamilie

Imunoglobulinlike Transcripts (ILT), auch Leukocyte Immunoglobulinlike Receptors (LIR) genannt, liegen nahe der KIR Region auf Chromosom 19 und repräsentieren ebenfalls inhibitorische Rezeptoren. Das auf NK-Zellen exprimierte ILT-2 (LIR-1), welches mit einem breiten Spektrum von MHC-Klasse Ia reagiert, erkennt ebenso HLA-G (Cosman et al., 1997). Die Erkennung resultiert in einem inhibitorischen Signal für die NK-Zelle. Dies ist ein weiterer Hinweis auf das immunregulatorische Zusammenwirken von HLA-G und NK-Zellen (Navarro et al., 1999). Die Ergebnisse unserer Versuche könnten ein Beweis auf die vermutete Erkennung von HLA-G1s durch die ILT (LIR) sein.

7.3.3 NKG2A Rezeptoren

Der inhibitorische CD94/NKG2A Rezeptor erkennt weder HLA-G noch HLA-G1s direkt, sondern das MHC-Klasse Ib HLA-E (Braud et al., 1998). HLA-E wiederum bindet Leaderpeptide der MHC-Klasse Ia, sowie von HLA-G und HLA-G1s. Das HLA-E Molekül kann nur an die Zelloberfläche transportiert werden, wenn es die passenden Signalsequenzen der MHC-Klasse I Moleküle gebunden hat. Daraus ergibt sich ein sensibler Mechanismus, der die regelrechte Biosynthese der HLA-Klasse I Moleküle überwacht. Die Biosynthese der HLA-Klasse I Moleküle kann leicht durch Infektion oder Mutation der Zelle gestört werden (Borrego et al., 1998). Die Diskriminationsfähigkeit des CD94/NKG2 Rezeptor bezüglich der verschiedenen Peptide, die an HLA-E gebunden sein können, ist noch nicht näher beschrieben worden.

KIRs und CD94/NKG2-Rezeptoren decken nur partiell das gleiche Spektrum von MHC-Klasse I Molekülen ab, so dass man von einer komplementären Aufgabenteilung der Überwachung von Biosynthese und Expression der meisten HLA-Klasse I Moleküle ausgehen kann (Lopez-Botet et al., 2000). In beiden Rezeptorsystemen ist die jeweilige Bindungsaffinität des inhibitorischen Rezeptors (CD94/NKG2A) höher als die des aktivierenden Rezeptors (CD94/NKG2C). Dies stellt die Dominanz des inhibitorischen Signals sicher (Vales-Gomez et al., 1999). Dennoch exprimieren NK-Zellen nur in den seltensten Fällen aktivierende und inhibierende Isoformen, welche exakt die gleichen MHC-Klasse I Allele erkennen können (Uhrberg et al., 1997). NK-Zellen exprimieren neben einem aktivierenden Rezeptor auch noch einen spezifischen inhibierenden Rezeptor für ein anderes MHC-Klasse I Allel. Dieses lässt bei Bindung mit dem passenden MHC

Alle die Inhibition überwiegen. So kann der aktivierende Rezeptor sein Potential nur ausschöpfen, wenn der inhibierende Rezeptor kein Allel erkennt und somit kein inhibitorisches Signal induziert. Virus-infizierte oder transformierte Zellen vermindern oftmals ihre HLA-A und HLA-B Expression bei erhaltener HLA-C und HLA-E Expression, wodurch es bei der Erkennung durch NK-Zellen zu einem zytotoxischen Signal in diesen kommt (Marincola et al., 1994). Somit ergibt sich eine wichtige Überwachungsfunktion der NK-Zellen bei Minderung oder Verlust der MHC-Klasse I Expression der Zellen (Bakker et al., 2000).

Aktivierende Rezeptoren können also in Gegenspieler inhibitorischer MHC-Klasse I Moleküle und in Rezeptoren für induzierbare, nicht der MHC-Klasse zugehörige Moleküle auf Zielzellen ohne inhibitorische Gegenspieler unterschieden werden.

7.3.4 Sonderfall NKG2D Rezeptor und sein Ligand MIC

Die MHC-Klasse I Chain-Related Antigene (MIC) ähneln den MHC-Klasse I Molekülen in Genomaufbau und Proteinaufbau sehr. Sie sind aber Liganden des aktivierenden NKG2D Rezeptors. Durch Hitze-Schock-Versuche mit MIC-exprimierenden Epithelzelllinien stellte Groh fest, dass MICA und MICB, ebenso wie MHC-Klasse Ib Moleküle unter Kontrolle eines Heat-Shock-Elements stehen (Groh et al., 1996). Eine Infektion mit Cytomegalieviren (CMV) erhöht die Expression der MIC in diesen Epithelzelllinien ebenso (Groh et al., 2001). Eine hohe MICA und MICB Expression wurde aber auch auf verschiedenen Epithelzelltumoren, sowie auf Blasten der akuten myeloischen Leukämie nachgewiesen (Pende et al., 2001). All dies spricht für eine die Immunabwehr induzierende MIC-Expression durch zellulären Stress, virale Infektionen oder neoplastische Transformationen, die die Immunabwehr induziert. MIC ruft also trotz hoher Ähnlichkeit mit HLA-G und HLA-G1s eine dem HLA-G entgegengesetzte Antwort hervor. Dies wirft weitere Fragen auf.

7.4 Die Rolle des HLA-G1s während Schwangerschaft

HLA-G1s wird in der unreifen Plazenta von Trophoblasten und villösen Mesenchymzellen, welche die Eigenschaft von Makrophagen besitzen, produziert. Plazentare Fibroblasten produzieren kein HLA-G1s, es ist auch nicht gelungen, die HLA-G1s-Produktion zu induzieren. Wahrscheinlich induzieren Trophoblastzellen die HLA-G1s Expression der Plazentamakrophagen (Chu et al., 1998). Diese Ergebnisse werden durch Untersuchungen der villösen Zytotrophoblastzellen von Solier gestützt, die sowohl HLA-G1s als auch HLA-G2s in der Kultur nachweisen konnten. Das

von den Zytotrophoblastzellen exprimierte HLA-G1s triggerte die Apoptose in aktivierten CD8⁺ T-Lymphozyten. HLA-G1s schützt somit wahrscheinlich die kindlichen Chorionzotten, die von mütterlichem Blut und den dazugehörigen CD8⁺ T-Lymphozyten umspült werden (Solier et al., 2002) (Contini et al., 2003). Emmer wies bei Patientinnen mit wiederholten frühgeburtlichen Schwangerschaften eine erhöhte CD56 und CD16 Expression auf plazentaren NK-Zellen bei erniedrigter HLA-G Expression der fetalen Trophoblasten nach (Emmer et al., 2002). Die Expression von HLA-G1s scheint eine Bedingung der Implantation der Blastozyste in den Uterus zu sein, Schwangere mit Frühaborten zeigten eine signifikante Verminderung der HLA-G1s Serumkonzentration im Vergleich zu Schwangeren mit intakter Schwangerschaft. Besonders Frauen mit präovulatorisch niedrigen HLA-G1s Spiegeln scheinen häufiger einen Frühabort nach IVF zu erleiden (Pfeiffer et al., 2000). Fuzzi bestätigt diese Ergebnisse und nennt die Expression von MHC-Klasse Ib Molekülen eine nötige, aber nicht umfassende Voraussetzung für die Entwicklung einer Schwangerschaft. Dies steht im Widerspruch zu der von Ober beschriebenen „Nullallel HLA-G*0105N“ Schwangerschaft (Ober et al., 1998). Ein Konsens könnte in der unterschiedlichen Bedeutung der Funktion des HLA-G1 des individual-spezifischen Immunsystems liegen (Fuzzi et al., 2002), sowie der abnehmenden Bedeutung des HLA-G1s mit zunehmender Schwangerschaftsdauer und der Plazentaausreifung (Solier et al., 2001). Neben den vorher genannten komplikationslosen „Nullallel HLA-G*0105N“ Schwangerschaften sind auch „Nullallel-Schwangerschaften“ für den KIR2DL4-Rezeptor beschrieben worden. Sie verlaufen ebenfalls komplikationslos (Gomez-Lozano et al., 2003), was von einer hohen Anpassungsfähigkeit des Immunsystems zumindest während der Schwangerschaft zeugt.

7.5 Die Rolle des HLA-G1s in pathophysiologischen Vorgängen

HLA-G und HLA-G1s scheinen ebenfalls in Tumoren eine wichtige immunologische Rolle zu übernehmen. Moreau stellt einen Zusammenhang zwischen Demethylierungen in der Tumorgenese und MHC-Klasse Ib Expression her (Moreau et al., 2003). Durch Methylierung der Promotorregion des MHC-Klasse Ib Genoms ist eine Transkription des Bereiches nicht möglich. Durch Demethylierung wird diese Blockade jedoch aufgehoben und die Expression des immunsuppressiven HLA-G erfolgt. Die Demethylierung kann durch Tumorgenese, Entzündung oder allogene Reaktionen hervorgerufen werden. In der Umgebung der meisten Tumoren, die eine veränderte MHC Expression aufweisen, finden sich lokal hohe Ansammlungen von immunkompetenten Zellen, die jedoch von MHC-Klasse Ib Molekülen inhibiert werden können. Seliger bestätigt den Einfluss von HLA-G und HLA-G1s auf die Balance der aktivierenden und

inhibierenden Signale der immunkompetenten Zellen. Dies hat Auswirkungen auf die Effektivität der Immunantwort und somit auf die Tumorprogression. (Seliger et al., 2003). Carosella sieht eine gewebsschutzprotektive Aufgabe der MHC-Klasse Ib Moleküle bei Entzündungen (Carosella et al., 2001). Ugurel untersuchte das Blutserum von Melanompatienten auf die HLA-G1s-Konzentration und fand um das Zweifache erhöhte Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es zeigte sich eine Korrelation des Erkrankungsstadiums und der Tumorausbreitung mit der HLA-G1s Serumkonzentration. Jedoch hing die gemessene HLA-G1s Konzentration nicht mit der Dauer der rückfallsfreien Zeit oder der Überlebenszeit zusammen (Ugurel et al., 2001). Menier führte Untersuchungen an MICA und HLA-G/HLA-G1s exprimierenden Melanomzelllinien durch. MICA stimuliert die NK-Zellen über den NKG2D-Rezeptor, wohingegen HLA-G1s die NK-Zellen über den ILT2-Rezeptor inhibiert. Die Inhibition überwiegt, so dass es zu keiner zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen kommt. (Menier et al., 2002). HLA-G1s wird ebenso in Gliomen gefunden, schon wenige HLA-G1s positive Zellen rufen eine signifikante Inhibition der umgebenden immunkompetenten Zellen hervor (Wiendl et al., 2002). In Mammacarcinombiopsien werden hohe Konzentrationen von MHC-Klasse Ib Molekülen gefunden, sie sind in der Nähe von Immunzellinfiltraten am höchsten (Lefebvre et al., 2002). Drenou beschrieb HLA-G Expressionen in Non-Hodgkin-Lymphomen, die mit der Transformation der Tumorzellen zeitlich zusammenhängen. Dies macht einen direkten Einfluss der MHC-Klasse Ib in der Lymphomgenese wahrscheinlich. (Drenou et al., 2002).

Auch wurde eine erhöhte Expression von HLA-G auf Monozyten von HIV-1 positiven Patienten festgestellt, die Bedeutung und möglicher Einsatz der Entdeckung zur HIV-Bekämpfung ist aber noch nicht klar (Lozano et al., 2002).

8. Schlussfolgerungen

Die MHC-Klasse I b Moleküle und hiervon ganz besonders HLA-G und HLA-G1s stellen auch weiterhin ein interessantes und wichtiges Ziel immunologischer Forschung dar.

HLA-G1s, dessen physiologische Funktionen erst teilweise geklärt sind, moduliert das Immunsystem des Menschen und scheint von wichtiger Bedeutung an der foeto-maternalem Grenzschicht zu sein. Es inhibiert die Expression des Proliferationsmarker CD71, des Aktivierungsmarkers CD25 sowie des Differenzierungsmarkers CD56 und führt zur Hemmung der Proliferation und Zytotoxizität aktivierter NK-Zellen. In CD8⁺ T-Lymphozyten induziert es ein apoptotisches Signal. Durch diese Einflüsse auf angreifende immunkompetente Zellen der Mutter schützt HLA-G1s das semiallogene Schwangerschaftsprodukt vor dem maternalen Immunsystem (Solier et al., 2002). Die Infertilität einiger Paare könnte auf Unstimmigkeiten in der Immunmodulation durch HLA-G1s am Implantationsort der Blastozyste zurückzuführen sein. Da die Funktion der NK-Zellen in der Dezidua sehr vielfältig ist, könnten Einflüsse auf ihre Regulation verschiedenartige Störungen der Invasion und Plazentation zur Folge haben, durch welche Schwangerschaftsprobleme ausgelöst werden könnten.

HLA-G1s wird auch von verschiedenen Tumoren (Melanome und Gliome zum Beispiel) exprimiert, die so die Erkennung und Bekämpfung durch das Immunsystem inhibieren (Ugurel et al., 2001) (Wiendl et al., 2002).

Die Rolle des HLA-G sowie HLA-G1s im Rahmen der HI-Infektion gilt es noch weiter aufzuklären. Monozyten von HIV-infizierten Patienten zeigen eine ungewöhnliche Expression von HLA-G (Lozano et al., 2002). HLA-G1s könnte sich mittelfristig bei einigen der genannten Situationen als diagnostischer Marker bewähren und auch einen Ansatz für neue Therapien liefern.

9. Anhang

Literaturverzeichnis

- Alizadeh M, Legras C, Semana G, Le Bouteiller P, Genetet B and Fauchet R. (1993). Evidence for a polymorphism of HLA-G gene. *Hum Immunol* 38:206-212.
- Allavena P, Damia G, Colombo T, Maggioni D, D'Incalci M and Mantovani A. (1989). Lymphokine-activated killer (LAK) and monocyte-mediated cytotoxicity on tumor cell lines resistant to antitumor agents. *Cell Immunol* 120:250-258.
- Amiot L, Onno M, Drenou B, Monvoisin C and Fauchet R. (1998). HLA-G class I gene expression in normal and malignant hematopoietic cells. *Hum Immunol* 59:524-528.
- Aramburu J, Balboa MA, Ramirez A, Silva A, Acevedo A, Sanchez-Madrid F, De Landazuri MO and Lopez-Botet M. (1990). A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor-gamma/delta+ T lymphocytes. I. Inhibition of the IL-2-dependent proliferation by anti-Kp43 monoclonal antibody. *J Immunol* 144:3238-3247.
- Ashkar AA, Di Santo JP and Croy BA. (2000). Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med* 192:259-270.
- Bahram S. (2000). MIC genes: from genetics to biology. *Adv Immunol* 76:1-60.
- Bakker AB, Wu J, Phillips JH and Lanier LL. (2000). NK cell activation: distinct stimulatory pathways counterbalancing inhibitory signals. *Hum Immunol* 61:18-27.
- Baldwin AS, Jr., LeClair KP, Singh H and Sharp PA. (1990). A large protein containing zinc finger domains binds to related sequence elements in the enhancers of the class I major histocompatibility complex and kappa immunoglobulin genes. *Mol Cell Biol* 10:1406-1414.
- Bamberger AM, Jenatschke S, Schulte HM, Loning T and Bamberger MC. (2000). Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates the human HLA-G promoter in JEG3 choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3932-3936.
- Barber LD and Parham P. (1993). Peptide binding to major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Cell Biol* 9:163-206.
- Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL and Spies T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285:727-729.
- Biassoni R, Cantoni C, Falco M, Verdiani S, Bottino C, Vitale M, Conte R, Poggi A, Moretta A and Moretta L. (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* 183:645-650.
- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL and Wiley DC. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329:506-512.
- Blaschitz A, Lenfant F, Mallet V, Hartmann M, Bensussan A, Geraghty DE, Le Bouteiller P and Dohr G. (1997). Endothelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express HLA-G. *Eur J Immunol* 27:3380-3388.
- Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE and Brooks AG. (1998). Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med* 187:813-818.

- Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Pena J and Solana R. (1999). CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology* 97:159-165.
- Boucraut J, Guillaudeux T, Alizadeh M, Boretto J, Chimini G, Malecaze F, Semana G, Fauchet R, Pontarotti P and Le Bouteiller P. (1993). HLA-E is the only class I gene that escapes CpG methylation and is transcriptionally active in the trophoblast-derived human cell line JAR. *Immunogenetics* 38:117-130.
- Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, Lanier LL and McMichael AJ. (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391:795-799.
- Brooks P, Murray RZ, Mason GG, Hendil KB and Rivett AJ. (2000). Association of immunoproteasomes with the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 352 Pt 3:611-615.
- Caligiuri MA, Zmuidzinas A, Manley TJ, Levine H, Smith KA and Ritz J. (1990). Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med* 171:1509-1526.
- Caligiuri MA, Murray C, Robertson MJ, Wang E, Cochran K, Cameron C, Schow P, Ross ME, Klumpp TR, Soiffer RJ and et al. (1993). Selective modulation of human natural killer cells in vivo after prolonged infusion of low dose recombinant interleukin 2. *J Clin Invest* 91:123-132.
- Campbell RD. (1988). The molecular genetics of components of the complement system. *Baillieres Clin Rheumatol* 2:547-575.
- Carbone E, Ruggiero G, Terrazzano G, Palomba C, Manzo C, Fontana S, Spits H, Karre K and Zappacosta S. (1997). A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction. *J Exp Med* 185:2053-2060.
- Carosella ED, Moreau P, Aractingi S and Rouas-Freiss N. (2001). HLA-G: a shield against inflammatory aggression. *Trends Immunol* 22:553-555.
- Castro MJ, Morales P, Martinez-Laso J, Allende L, Rojo-Amigo R, Gonzalez-Hevilla M, Varela P, Moreno A, Garcia-Berciano M and Arnaiz-Villena A. (2000). Evolution of MHC-G in humans and primates based on three new 3'UT polymorphisms. *Hum Immunol* 61:1157-1163.
- Cerwenka A and Lanier LL. (2001). Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunol Rev* 181:158-169.
- Chang C, Rodriguez A, Carretero M, Lopez-Botet M, Phillips JH and Lanier LL. (1995). Molecular characterization of human CD94: a type II membrane glycoprotein related to the C-type lectin superfamily. *Eur J Immunol* 25:2433-2437.
- Chang C, Dietrich J, Harpur AG, Lindquist JA, Haude A, Loke YW, King A, Colonna M, Trowsdale J and Wilson MJ. (1999). Cutting edge: KAP10, a novel transmembrane adapter protein genetically linked to DAP12 but with unique signaling properties. *J Immunol* 163:4651-4654.
- Chen D and Androlewicz MJ. (2001). Heat shock protein 70 moderately enhances peptide binding and transport by the transporter associated with antigen processing. *Immunol Lett* 75:143-148.
- Chiang MH and Main EK. (1994). Nuclear regulation of HLA class I genes in human trophoblasts. *Am J Reprod Immunol* 32:167-172.
- Chu W, Fant ME, Geraghty DE and Hunt JS. (1998). Soluble HLA-G in human placentas: synthesis in trophoblasts and interferon-gamma-activated macrophages but not placental fibroblasts. *Hum Immunol* 59:435-442.
- Cohen GB, Gandhi RT, Davis DM, Mandelboim O, Chen BK, Strominger JL and Baltimore D. (1999). The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* 10:661-671.

- Colonna M, Navarro F, Bellon T, Llano M, Garcia P, Samaridis J, Angman L, Cella M and Lopez-Botet M. (1997). A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* 186:1809-1818.
- Contini P, Ghio M, Poggi A, Filaci G, Indiveri F, Ferrone S and Puppo F. (2003). Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur J Immunol* 33:125-134.
- Cooper MA, Fehniger TA and Caligiuri MA. (2001)a. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22:633-640.
- Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, Carson WE and Caligiuri MA. (2001)b. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 97:3146-3151.
- Copeman J, Han RN, Caniggia I, McMaster M, Fisher SJ and Cross JC. (2000). Posttranscriptional regulation of human leukocyte antigen G during human extravillous cytotrophoblast differentiation. *Biol Reprod* 62:1543-1550.
- Cosman D, Fanger N, Borges L, Kubin M, Chin W, Peterson L and Hsu ML. (1997). A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 7:273-282.
- Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M and Chalupny NJ. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14:123-133.
- Dausset J. (1958). Iso-Leuco-anticorps. *Acta Haemat* 20:156-166.
- Davis DM, Reyburn HT, Pazmany L, Chiu I, Mandelboim O and Strominger JL. (1997). Impaired spontaneous endocytosis of HLA-G. *Eur J Immunol* 27:2714-2719.
- Daya S and Clark DA. (1986). Production of immunosuppressor factor(s) by preimplantation human embryos. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 11:98-101.
- Dohring C, Scheidegger D, Samaridis J, Cella M and Colonna M. (1996). A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J Immunol* 156:3098-3101.
- Drenou B, Le Friec G, Bernard M, Pangault C, Grosset JM, Lamy T, Fauchet R and Amiot L. (2002). Major histocompatibility complex abnormalities in non-Hodgkin lymphomas. *Br J Haematol* 119:417-424.
- Dunham I, Sargent CA, Trowsdale J and Campbell RD. (1987). Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7237-7241.
- Easterfield AJ, Austen BM and Westwood OM. (2001). Inhibition of antigen transport by expression of infected cell peptide 47 (ICP47) prevents cell surface expression of HLA in choriocarcinoma cell lines. *J Reprod Immunol* 50:19-40.
- Emmer PM, Steegers EA, Kerstens HM, Bulten J, Nelen WL, Boer K and Joosten I. (2002). Altered phenotype of HLA-G expressing trophoblast and decidual natural killer cells in pathological pregnancies. *Hum Reprod* 17:1072-1080.
- Fan L, Zhang X, Xu L, Yang J, Li W and Liu B. (1999). Preliminary study on the expression of HLA-G mRNA in normal placenta and placenta with RSA after immunotherapy. *Transplant Proc* 31:1854-1856.
- Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R, Jr., Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Wolff RK and et al. (1996). A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 13:399-408.
- Feder JN, Penny DM, Irrinki A, Lee VK, Lebron JA, Watson N, Tsuchihashi Z, Sigal E, Bjorkman PJ and Schatzman RC. (1998). The hemochromatosis gene product

- complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1472-1477.
- Fehniger TA and Caligiuri MA. (2001). Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 97:14-32.
- Forbes SA and Trowsdale J. (1999). The MHC quarterly report. *Immunogenetics* 50:152-159.
- Fournel S, Aguerre-Girr M, Campan A, Salauze L, Berrebi A, Lone YC, Lenfant F and Le Bouteiller P. (1999). Soluble HLA-G: purification from eukaryotic transfected cells and detection by a specific ELISA. *Am J Reprod Immunol* 42:22-29.
- Franklin GC, Adam GI and Ohlsson R. (1996). Genomic imprinting and mammalian development. *Placenta* 17:3-14.
- Fruh K and Yang Y. (1999). Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma. *Curr Opin Immunol* 11:76-81.
- Fuzzi B, Rizzo R, Criscuoli L, Noci I, Melchiorri L, Scarselli B, Bencini E, Menicucci A and Baricordi OR. (2002). HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunol* 32:311-315.
- Gao GF, Willcox BE, Wyer JR, Boulter JM, O'Callaghan CA, Maenaka K, Stuart DI, Jones EY, Van Der Merwe PA, Bell JI and Jakobsen BK. (2000). Classical and nonclassical class I major histocompatibility complex molecules exhibit subtle conformational differences that affect binding to CD8 α chain. *J Biol Chem* 275:15232-15238.
- Geraghty DE, Koller BH and Orr HT. (1987). A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:9145-9149.
- Gil-Torregrosa BC, Castano AR, Lopez D and Del Val M. (2000). Generation of MHC class I peptide antigens by protein processing in the secretory route by furin. *Traffic* 1:641-651.
- Gobin SJ, Keijsers V, van Zutphen M and van den Elsen PJ. (1998). The role of enhancer A in the locus-specific transactivation of classical and nonclassical HLA class I genes by nuclear factor kappa B. *J Immunol* 161:2276-2283.
- Gobin SJ and van den Elsen PJ. (1999). The regulation of HLA class I expression: is HLA-G the odd one out? *Semin Cancer Biol* 9:55-59.
- Gobin SJ, van Zutphen M, Woltman AM and van den Elsen PJ. (1999). Transactivation of classical and nonclassical HLA class I genes through the IFN-stimulated response element. *J Immunol* 163:1428-1434.
- Goldman-Wohl DS, Ariel I, Greenfield C, Hanoch J and Yagel S. (2000). HLA-G expression in extravillous trophoblasts is an intrinsic property of cell differentiation: a lesson learned from ectopic pregnancies. *Mol Hum Reprod* 6:535-540.
- Gomez-Lozano N, de Pablo R, Puente S and Vilches C. (2003). Recognition of HLA-G by the NK cell receptor KIR2DL4 is not essential for human reproduction. *Eur J Immunol* 33:639-644.
- Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M and Spies T. (1996). Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12445-12450.
- Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR and Spies T. (2001). Costimulation of CD8 α T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2:255-260.
- Gross DS and Garrard WT. (1988). Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annu Rev Biochem* 57:159-197.
- Guild BC, Erikson RL and Strominger JL. (1983). HLA-A2 and HLA-B7 antigens are phosphorylated in vitro by rous sarcoma virus kinase (pp60v-src) at a tyrosine residue encoded in a highly conserved exon of the intracellular domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:2894-2898.

- Guild BC and Strominger JL. (1984). Human and murine class I MHC antigens share conserved serine 335, the site of HLA phosphorylation in vivo. *J Biol Chem* 259:9235-9240.
- Guillaudeux T, Rodriguez AM, Girr M, Mallet V, Ellis SA, Sargent IL, Fauchet R, Alsat E and Le Bouteiller P. (1995). Methylation status and transcriptional expression of the MHC class I loci in human trophoblast cells from term placenta. *J Immunol* 154:3283-3299.
- Hamai Y, Fujii T, Miki A, Geraghty DE, Harada I, Takai Y, Kozuma S, Tsutsumi O and Taketani Y. (1999). Quantitative assessment of human leukocyte antigen-G protein in amniotic fluid by a double-determinant enzyme-linked immunosorbent assay using anti-human leukocyte antigen-G-specific antibody '87G'. *Am J Reprod Immunol* 41:293-295.
- Hammer A, Hutter H, Blaschitz A, Mahnert W, Hartmann M, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A and Dohr G. (1997). Amnion epithelial cells, in contrast to trophoblast cells, express all classical HLA class I molecules together with HLA-G. *Am J Reprod Immunol* 37:161-171.
- Hiby SE, King A, Sharkey A and Loke YW. (1999). Molecular studies of trophoblast HLA-G: polymorphism, isoforms, imprinting and expression in preimplantation embryo. *Tissue Antigens* 53:1-13.
- Hobart M, Ramassar V, Goes N, Urmson J and Halloran PF. (1997). IFN regulatory factor-1 plays a central role in the regulation of the expression of class I and II MHC genes in vivo. *J Immunol* 158:4260-4269.
- Hviid TV, Moller C, Sorensen S and Morling N. (1998). Co-dominant expression of the HLA-G gene and various forms of alternatively spliced HLA-G mRNA in human first trimester trophoblast. *Hum Immunol* 59:87-98.
- Ibrahim EC, Morange M, Dausset J, Carosella ED and Paul P. (2000). Heat shock and arsenite induce expression of the nonclassical class I histocompatibility HLA-G gene in tumor cell lines. *Cell Stress Chaperones* 5:207-218.
- Ishitani A and Geraghty DE. (1992). Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3947-3951.
- Ishitani A, Kishida M, Sageshima N, Yashiki S, Sonoda S, Hayami M, Smith AG and Hatake K. (1999). Re-examination of HLA-G polymorphism in African Americans. *Immunogenetics* 49:808-811.
- Jun Y, Kim E, Jin M, Sung HC, Han H, Geraghty DE and Ahn K. (2000). Human cytomegalovirus gene products US3 and US6 down-regulate trophoblast class I MHC molecules. *J Immunol* 164:805-811.
- Juriscova A, Casper RF, MacLusky NJ and Librach CL. (1996). Embryonic human leukocyte antigen-G expression: possible implications for human preimplantation development. *Fertil Steril* 65:997-1002.
- Kawabata H, Nakamaki T, Ikonomi P, Smith RD, Germain RS and Koeffler HP. (2001). Expression of transferrin receptor 2 in normal and neoplastic hematopoietic cells. *Blood* 98:2714-2719.
- Kirszenbaum M, Moreau P, Teyssier M, Lafon C, Gluckman E, Dausset J and Carosella E. (1995). Evidence for the presence of the alternatively spliced HLA-G mRNA forms in human mononuclear cells from peripheral blood and umbilical cord blood. *Hum Immunol* 43:237-241.
- Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ and DeMars R. (1990). A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 248:220-223.
- Krangel MS. (1985). Unusual RNA splicing generates a secreted form of HLA-A2 in a mutagenized B lymphoblastoid cell line. *Embo J* 4:1205-1210.
- Lanier LL, Ruitenberg JJ and Phillips JH. (1988). Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *J Immunol* 141:3478-3485.

- Lanier LL. (1998). Activating and inhibitory NK cell receptors. *Adv Exp Med Biol* 452:13-18.
- Le Bouteiller P, Solier C, Proll J, Aguerre-Girr M, Fournel S and Lenfant F. (1999). Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for? *Hum Reprod Update* 5:223-233.
- Lefebvre S, Berrih-Aknin S, Adrian F, Moreau P, Poëa S, Gourand L, Dausset J, Carosella ED and Paul P. (2001). A specific interferon (IFN)-stimulated response element of the distal HLA-G promoter binds IFN-regulatory factor 1 and mediates enhancement of this nonclassical class I gene by IFN-beta. *J Biol Chem* 276:6133-6139.
- Lefebvre S, Antoine M, Uzan S, McMaster M, Dausset J, Carosella ED and Paul P. (2002). Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer. *J Pathol* 196:266-274.
- Lenfant F, Fort M, Rodriguez AM, Campan A, Aguerre-Girr M, Sommer E, Abbal M, Ohayon E and Le Bouteiller P. (1998). Absence of imprinting of HLA class Ia genes leads to co-expression of biparental alleles on term human trophoblast cells upon IFN-gamma induction. *Immunogenetics* 47:297-304.
- L'Haridon M, Paul P, Xerri JG, Dastot H, Dolliger C, Schmid M, de Angelis N, Grollet L, Sigaux F, Degos L and Gazin C. (1996). Transcriptional regulation of the MHC class I HLA-A11 promoter by the zinc finger protein ZFX. *Nucleic Acids Res* 24:1928-1935.
- Li P, Willie ST, Bauer S, Morris DL, Spies T and Strong RK. (1999). Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a gammadelta T cell ligand. *Immunity* 10:577-584.
- Li P, Morris DL, Willcox BE, Steinle A, Spies T and Strong RK. (2001). Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat Immunol* 2:443-451.
- Ljunggren HG and Karre K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11:237-244.
- Lopez-Botet M, Carretero M, Bellon T, Perez-Villar JJ, Llano M and Navarro F. (1998). The CD94/NKG2 C-type lectin receptor complex. *Curr Top Microbiol Immunol* 230:41-52.
- Lopez-Botet M, Bellon T, Llano M, Navarro F, Garcia P and de Miguel M. (2000). Paired inhibitory and triggering NK cell receptors for HLA class I molecules. *Hum Immunol* 61:7-17.
- Lotzova E, Savary CA and Herberman RB. (1987). Induction of NK cell activity against fresh human leukemia in culture with interleukin 2. *J Immunol* 138:2718-2727.
- Lozano JM, Gonzalez R, Kindelan JM, Rouas-Freiss N, Caballos R, Dausset J, Carosella ED and Pena J. (2002). Monocytes and T lymphocytes in HIV-1-positive patients express HLA-G molecule. *Aids* 16:347-351.
- Madden DR. (1995). The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol* 13:587-622.
- Mallet V, Blaschitz A, Crisa L, Schmitt C, Fournel S, King A, Loke YW, Dohr G and Le Bouteiller P. (1999)a. HLA-G in the human thymus: a subpopulation of medullary epithelial but not CD83(+) dendritic cells expresses HLA-G as a membrane-bound and soluble protein. *Int Immunol* 11:889-898.
- Mallet V, Fournel S, Schmitt C, Campan A, Lenfant F and Le Bouteiller P. (1999)b. Primary cultured human thymic epithelial cells express both membrane-bound and soluble HLA-G translated products. *J Reprod Immunol* 43:225-234.
- Mansky P, Brown WM, Park JH, Choi JW and Yang SY. (1994). The second kappa B element, kappa B2, of the HLA-A class I regulatory complex is an essential part of the promoter. *J Immunol* 153:5082-5090.
- Marincola FM, Shamamian P, Alexander RB, Gnarr JR, Turetskaya RL, Nedospasov SA, Simonis TB, Taubenberger JK, Yannelli J, Mixon A and et al. (1994). Loss of HLA

- haplotype and B locus down-regulation in melanoma cell lines. *J Immunol* 153:1225-1237.
- Markert UR, Arck PC, Peiker G and Mock BA. (2002). Might wasp venom desensitization induced Th2 to Th1 shift cause pregnancy failure? *Am J Reprod Immunol* 47:193-195.
- Marsh SG, Bodmer JG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Hansen JA, Mac HB, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A and Terasaki PI. (2001). Nomenclature for factors of the HLA system, (2000). *Eur J Immunogenet* 28:377-424.
- McMaster MT, Librach CL, Zhou Y, Lim KH, Janatpour MJ, DeMars R, Kovats S, Damsky C and Fisher SJ. (1995). Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J Immunol* 154:3771-3778.
- Menier C, Riteau B, Carosella ED and Rouas-Freiss N. (2002). MICA triggering signal for NK cell tumor lysis is counteracted by HLA-G1-mediated inhibitory signal. *Int J Cancer* 100:63-70.
- Miller JS and McCullar V. (2001). Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2. *Blood* 98:705-713.
- Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, Carosella ED and Paul P. (1999). IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* 11:803-811.
- Moreau P, Rousseau P, Rouas-Freiss N, Le Discorde M, Dausset J and Carosella ED. (2002). HLA-G protein processing and transport to the cell surface. *Cell Mol Life Sci* 59:1460-1466.
- Moreau P, Mouillot G, Rousseau P, Marcou C, Dausset J and Carosella ED. (2003). HLA-G gene repression is reversed by demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1191-1196.
- Moretta A, Biassoni R, Bottino C and Moretta L. (2000). Surface receptors delivering opposite signals regulate the function of human NK cells. *Semin Immunol* 12:129-138.
- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C and Mellor AL. (1998). Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281:1191-1193.
- Nagler A, Lanier LL, Cwirla S and Phillips JH. (1989). Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 143:3183-3191.
- Navarro F, Llano M, Bellon T, Colonna M, Geraghty DE and Lopez-Botet M. (1999). The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur J Immunol* 29:277-283.
- Norment AM, Salter RD, Parham P, Engelhard VH and Littman DR. (1988). Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature* 336:79-81.
- Ober C, Aldrich C, Rosinsky B, Robertson A, Walker MA, Willadsen S, Verp MS, Geraghty DE and Hunt JS. (1998). HLA-G1 protein expression is not essential for fetal survival. *Placenta* 19:127-132.
- Onno M, Amiot L, Bertho N, Drenou B and Fauchet R. (1997). CpG methylation patterns in the 5' part of the nonclassical HLA-G gene in peripheral blood CD34+ cells and CD2+ lymphocytes. *Tissue Antigens* 49:356-364.
- Parham P. (1988). Function and polymorphism of human leukocyte antigen-A,B,C molecules. *Am J Med* 85:2-5.
- Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Moreau P, Riteau B, Le Gal FA, Avril MF, Dausset J, Guillet JG and Carosella ED. (1998). HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4510-4515.
- Paul P, Cabestre FA, Ibrahim EC, Lefebvre S, Khalil-Daher I, Vazeux G, Quiles RM, Bermond F, Dausset J and Carosella ED. (2000)a. Identification of HLA-G7 as a new splice

- variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. *Hum Immunol* 61:1138-1149.
- Paul P, Rouas-Freiss N, Moreau P, Cabestre FA, Menier C, Khalil-Daher I, Pangault C, Onno M, Fauchet R, Martinez-Laso J, Morales P, Villena AA, Giacomini P, Natali PG, Frumento G, Ferrara GB, McMaster M, Fisher S, Schust D, Ferrone S, Dausset J, Geraghty D and Carosella ED. (2000)b. HLA-G, -E, -F preworkshop: tools and protocols for analysis of non-classical class I genes transcription and protein expression. *Hum Immunol* 61:1177-1195.
- Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, Marcenaro E, Accame L, Malaspina A, Biassoni R, Bottino C, Moretta L and Moretta A. (1999). Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 190:1505-1516.
- Pende D, Cantoni C, Rivera P, Vitale M, Castriconi R, Marcenaro S, Nanni M, Biassoni R, Bottino C, Moretta A and Moretta L. (2001). Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur J Immunol* 31:1076-1086.
- Pfeiffer KA, Rebmann V, Passler M, van der Ven K, van der Ven H, Krebs D and Grosse-Wilde H. (2000). Soluble HLA levels in early pregnancy after in vitro fertilization. *Hum Immunol* 61:559-564.
- Piguet V, Schwartz O, Le Gall S and Trono D. (1999). The downregulation of CD4 and MHC-I by primate lentiviruses: a paradigm for the modulation of cell surface receptors. *Immunol Rev* 168:51-63.
- Pizzato N. (2000). Modulation de l'expression membranaire de HLA-G par le Cytomegalovirus humain et la proteine NEF du VIH-1. In: INSERM U395 Toulouse. Toulouse: Université Paul Sabatier, Toulouse III, Ecole doctorale Biologie-Santé-Biotechnologies. p 8.
- Plougastel B, Jones T and Trowsdale J. (1996). Genomic structure, chromosome location, and alternative splicing of the human NKG2A gene. *Immunogenetics* 44:286-291.
- Pontarotti P, Chimini G, Nguyen C, Boretto J and Jordan BR. (1988). CpG islands and HTF islands in the HLA class I region: investigation of the methylation status of class I genes leads to precise physical mapping of the HLA-B and -C genes. *Nucleic Acids Res* 16:6767-6778.
- Ponte M, Cantoni C, Biassoni R, Tradori-Cappai A, Bentivoglio G, Vitale C, Bertone S, Moretta A, Moretta L and Mingari MC. (1999). Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5674-5679.
- Proll J, Bensussan A, Goffin F, Foidart JM, Berrebi A and Le Bouteiller P. (2000). Tubal versus uterine placentation: similar HLA-G expressing extravillous cytotrophoblast invasion but different maternal leukocyte recruitment. *Tissue Antigens* 56:479-491.
- Raghupathy R. (1997). Maternal anti-placental cell-mediated reactivity and spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 37:478-484.
- Rajagopalan S and Long EO. (1999). A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med* 189:1093-1100.
- Rajagopalan S, Fu J and Long EO. (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* 167:1877-1881.
- Rammensee HG. (1995). Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol* 7:85-96.
- Raulet DH, Vance RE and McMahon CW. (2001). Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol* 19:291-330.

- Rebmann V, van der Ven K, Passler M, Pfeiffer K, Krebs D and Grosse-Wilde H. (2001). Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens* 57:15-21.
- Robertson MJ and Ritz J. (1990). Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76:2421-2438.
- Robertson MJ, Soiffer RJ, Wolf SF, Manley TJ, Donahue C, Young D, Herrmann SH and Ritz J. (1992). Response of human natural killer (NK) cells to NK cell stimulatory factor (NKSF): cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF. *J Exp Med* 175:779-788.
- Robinson J, Waller MJ, Parham P, Bodmer JG and Marsh SG. (2001). IMGT/HLA Database-- a sequence database for the human major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Res* 29:210-213.
- Rock KL. (1996). A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol Today* 17:131-137.
- Routes JM. (1992). IFN increases class I MHC antigen expression on adenovirus-infected human cells without inducing resistance to natural killer cell killing. *J Immunol* 149:2372-2377.
- Sanders SK, Giblin PA and Kavathas P. ((1991)). Cell-cell adhesion mediated by CD8 and human histocompatibility leukocyte antigen G, a nonclassical major histocompatibility complex class I molecule on cytotrophoblasts. *J Exp Med* 174:737-740.
- Schwarz K, van Den Broek M, Kostka S, Kraft R, Soza A, Schmidtke G, Kloetzel PM and Groettrup M. (2000). Overexpression of the proteasome subunits LMP2, LMP7, and MECL-1, but not PA28 alpha/beta, enhances the presentation of an immunodominant lymphocytic choriomeningitis virus T cell epitope. *J Immunol* 165:768-778.
- Seliger B, Abken H and Ferrone S. (2003). HLA-G and MIC expression in tumors and their role in anti-tumor immunity. *Trends Immunol* 24:82-87.
- Siliciano RF, Pratt JC, Schmidt RE, Ritz J and Reinherz EL. (1985). Activation of cytolytic T lymphocyte and natural killer cell function through the T11 sheep erythrocyte binding protein. *Nature* 317:428-430.
- Sivori S, Vitale M, Morelli L, Sanseverino L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L and Moretta A. (1997). p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med* 186:1129-1136.
- Sobanov Y, Glienke J, Brostjan C, Lehrach H, Francis F and Hofer E. (1999). Linkage of the NKG2 and CD94 receptor genes to D12S77 in the human natural killer gene complex. *Immunogenetics* 49:99-105.
- Solier C, Mallet V, Lenfant F, Bertrand A, Huchenq A and Le Bouteiller P. (2001). HLA-G unique promoter region: functional implications. *Immunogenetics* 53:617-625.
- Solier C, Aguerre-Girr M, Lenfant F, Campan A, Berrebi A, Rebmann V, Grosse-Wilde H and Le Bouteiller P. (2002). Secretion of pro-apoptotic intron 4-retaining soluble HLA-G1 by human villous trophoblast. *Eur J Immunol* 32:3576-3586.
- Spies T, Morton CC, Nedospasov SA, Fiers W, Pious D and Strominger JL. (1986). Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:8699-8702.
- Storkus WJ, Alexander J, Payne JA, Dawson JR and Cresswell P. (1989). Reversal of natural killing susceptibility in target cells expressing transfected class I HLA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2361-2364.
- Suarez MB, Morales P, Castro MJ, Fernandez V, Varela P, Alvarez M, Martinez-Laso J and Arnaiz-Villena A. (1997). A new HLA-G allele (HLA-G*0105N) and its distribution in the Spanish population. *Immunogenetics* 45:464-465.
- Tafari A, Alferink J, Moller P, Hammerling GJ and Arnold B. (1995). T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science* 270:630-633.

- Tangye SG, Cherwinski H, Lanier LL and Phillips JH. (2000). 2B4-mediated activation of human natural killer cells. *Mol Immunol* 37:493-501.
- Timonen T, Patarroyo M and Gahmberg CG. (1988). CD11a-c/CD18 and GP84 (LB-2) adhesion molecules on human large granular lymphocytes and their participation in natural killing. *J Immunol* 141:1041-1046.
- Tortorella D, Gewurz BE, Furman MH, Schust DJ and Ploegh HL. (2000). Viral subversion of the immune system. *Annu Rev Immunol* 18:861-926.
- Ugurel S, Rebmann V, Ferrone S, Tilgen W, Grosse-Wilde H and Reinhold U. (2001). Soluble human leukocyte antigen-G serum level is elevated in melanoma patients and is further increased by interferon-alpha immunotherapy. *Cancer* 92:369-376.
- Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, Tyan D, Lanier LL and Parham P. (1997). Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 7:753-763.
- Vales-Gomez M, Reyburn HT, Mandelboim M and Strominger JL. (1998). Kinetics of interaction of HLA-C ligands with natural killer cell inhibitory receptors. *Immunity* 9:337-344.
- Vales-Gomez M, Reyburn HT, Erskine RA, Lopez-Botet M and Strominger JL. (1999). Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *Embo J* 18:4250-4260.
- van der Ven K, Skrablin S, Engels G and Krebs D. (1998). HLA-G polymorphisms and allele frequencies in Caucasians. *Hum Immunol* 59:302-312.
- van Hall T, Sijts A, Camps M, Offringa R, Melief C, Kloetzel PM and Ossendorp F. (2000). Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28. *J Exp Med* 192:483-494.
- Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, Augugliaro R, Moretta L and Moretta A. (1998). NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 187:2065-2072.
- Vitale M, Falco M, Castriconi R, Parolini S, Zambello R, Semenzato G, Biassoni R, Bottino C, Moretta L and Moretta A. (2001). Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells. *Eur J Immunol* 31:233-242.
- Voss SD, Daley J, Ritz J and Robertson MJ. (1998). Participation of the CD94 receptor complex in costimulation of human natural killer cells. *J Immunol* 160:1618-1626.
- Wagtmann N, Rajagopalan S, Winter CC, Peruzzi M and Long EO. (1995). Killer cell inhibitory receptors specific for HLA-C and HLA-B identified by direct binding and by functional transfer. *Immunity* 3:801-809.
- Wainwright SD, Simpson KL and Holmes CH. (1998). Calreticulin associates with non-HLA-A,-B class I proteins in the human choriocarcinoma cell lines JEG-3 and BeWo. *Immunology* 93:437-445.
- Wiendl H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V, Wischhusen J, Bornemann A, Meyermann R, Weiss EH, Melms A and Weller M. (2002). A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J Immunol* 168:4772-4780.
- Wilson MJ, Torkar M and Trowsdale J. (1997). Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene. *Tissue Antigens* 49:574-579.
- Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL and Phillips JH. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285:730-732.
- Zijlstra M, Auchincloss H, Jr., Loring JM, Chase CM, Russell PS and Jaenisch R. (1992). Skin graft rejection by beta 2-microglobulin-deficient mice. *J Exp Med* 175:885-893.

Zinkernagel RM and Doherty PC. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248:701-702.

Publikation

Artikel

Schaumann A, Markert UR.
HLA-G und HLA-G1s – ein kurzer Überblick.
Immunologie Aktuell 2002; 2 (4): 176-178.

Poster Präsentation

Schaumann A, Aguerre-Girr M, Markert UR, Le Bouteiller P.
Influence of soluble HLA-G1 on the proliferation and cytotoxicity of NK-cells. 8th
Congress of the Alps Adria Society for Immunology of Reproduction, September
2002, Weimar, Germany, Am. J. Reprod. Immunol, 2002, 48: 157.
2. Posterpreis

Danksagung

Für die fachliche Hilfe bei der Durchführung der Arbeit und seine Beratung bei aufgetretenen Fragen sowie der Vermittlung des Forschungsaufenthaltes am INSERM U395 in Toulouse danke ich Herrn Dr. med. U. R. Markert herzlich.

Dr. P. Le Bouteiller und seinen Mitarbeitern des INSERM U395 allen voran Dr. med. A. Barakonyi und M. Aguerre-Girr möchte ich für die freundliche Aufnahme und fachliche Unterstützung während meines Forschungsaufenthaltes danken.

Für die Hilfe bei der praktischen Durchführung der Arbeit möchte ich den Mitarbeitern des Plazentalabores, allen voran Dipl. biol. T. Pöhlmann und Dr. rer. nat. L. Seyfarth sowie R. Neundorf danken.

Mein Dank gilt Herrn Dr. L. Leistritz für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit sowie Dr. A. Kaufmann und seinen Mitarbeitern für die fachliche Unterstützung.

Mein herzlicher Dank gilt meiner Familie für so vieles.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Prüfungsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich Herr Dr. med. U. R. Markert bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt hat,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die in Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Lebenslauf

Geburtsdatum	24. September 1976
Geburtsort	Frankfurt am Main
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Schulische Ausbildung	
Juli 1983 - Juni 1987	Diesterwegschule in Frankfurt am Main
Juli 1987 – Mai 1996	Liebiggymnasium der Stadt Frankfurt am Main, Abitur
Zivildienst	
August 1996 – Sept. 1997	Arbeiter-Samariter-Bund Rettungsdienst OV Eschborn
Studium	
WS 1997/1998 - jetzt	Immatrikulation an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Medizinische Fakultät Physikum September 1999 Erstes Staatsexamen September 2000 Zweites Staatsexamen September 2002 Praktisches Jahr ab April 2003
Februar – September 2001	Forschungsaufenthalt bei Dr. P. Le Bouteiller am INSERM U395 in Toulouse/Frankreich mit freundlicher Unterstützung durch den Boehringer-Ingelheim- Fonds