

Die Regulation von humanen Natürlichen Killerzellen: Regulierte SAP-Expression und die Rolle der Lipid Rafts

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

Vorgelegt von
Diplom-Biologin
Johanna Endt
aus Darmstadt

Erstgutachterin Prof. Dr. C. Clayton

Zweitgutachter PD Dr. C. Watzl

Tag der mündlichen Prüfung:

In Gedenken an meine Mutter

Man entdeckt keine
neuen Erdteile, ohne
den Mut zu haben,
alle Küsten aus den
Augen zu verlieren.

Andre Gide

Danksagung

Ich möchte die vorliegende Arbeit zum Anlass nehmen, mich bei einigen Personen für ihre Unterstützung zu bedanken.

An erster Stelle möchte ich Priv. Doz. Dr. Carsten Watzl danken, der durch sein Engagement und seine Kompetenz die erfolgreiche Durchführung dieser Arbeit ermöglichte. Seine Begeisterung für die Forschung und Wissenschaft und sein fröhliches Wesen haben mich bei der Entwicklung und Umsetzung neuer Ideen sehr motiviert. Die immer offene Bürotür und die gute Laborausstattung trugen zu der tollen Laboratmosphäre bei. Danken möchte ich ihm vor allem für sein Verständnis in schwierigen Zeiten.

Bei Frau Prof. Dr. Christine Clayton möchte ich mich ganz herzlich für die offizielle Betreuung meiner Dissertation bedanken.

Ich möchte mich weiterhin bei der gesamten Arbeitsgruppe für ihre freundliche Zusammenarbeit und die nette Atmosphäre im Labor bedanken, insbesondere bei Philipp Eißmann, Sabrina Hoffmann, Sebastian Stark, Andreina Byrd, Birgitta Messmer, Mina Sandusky und Dr. Rauf Bhat.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Instituts für Immunologie der Universität Heidelberg für ihre Unterstützung bedanken, besonders bei Guido Wabnitz für die stetige Hilfsbereitschaft und innovativen Gedankenaustausch.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund Thomas bedanken. Ihre liebevolle Unterstützung, Geduld und Motivation gaben mir besonders in den schwierigen Phasen den nötigen Rückhalt und trugen zu dem Gelingen dieser Arbeit maßgeblich bei.

Während dieser Arbeit wurden folgende Publikationen erstellt:

McCann FE, Endt J, Almeida CR, Pende D, Davis DM, Watzl C. NKG2D-mediated activation of human Natural Killer cells is regulated by inhibitory receptor signals controlling its recruitment to GM1-rich membrane domains, 2005, *zur Publikation eingereicht*

Endt J, Eissmann P, Giese T, Watzl C. Modulation of 2B4 (CD244) Activity by regulated SAP Expression in Human NK cells, 2005, *zur Publikation eingereicht*

Bhat R, Eissmann P, Endt J, Hoffmann S, Watzl C. Fine tuning of immune responses by SLAM-related receptors, *J. of Leukocyte Biology*, 2005, in press

Eissmann P, Endt J, Flaig RM, Watzl C. Regulation of Natural Killer cells by SLAM-related receptors (SRR), *Rec Devel. Cell Res.*, 2 (2005): 1-18 ISBN: 81-308-0008-X

1. Zusammenfassung	1
1.1 Deutsche Zusammenfassung	1
1.2 English summary	3
2. Einleitung	5
2.1 Das humane Immunsystem	5
2.2 Die Rolle der Natürlichen Killerzellen im humanen Immunsystem	7
2.2.1 Die Regulation von Natürlichen Killerzellen	9
2.2.2 Die Inhibition der Natürlichen Killerzellen	11
2.2.3 Die Aktivierung der Natürlichen Killerzellen	14
2.2.3.1 Der NKG2D Rezeptor	16
2.2.3.2 Der 2B4 Rezeptor	19
2.2.3.3 Die Rolle des Adapterproteins SAP für die 2B4 Signaltransduktion und XLP	21
2.2.4 Die Rolle der Lipid Rafts bei der Integration von positiven und negativen Signalen	23
2.3 Zielsetzung der Arbeit	29
3. Material und Methoden	30
3.1 Material	30
3.1.1 Zellkultur	30
3.1.2 Antikörper	31
3.1.3 Bakterien	33
3.1.4 Konstrukte	33
3.1.5 Häufig verwendete Puffer und Lösungen	33
3.1.6 Molekulargewichtsmarker	35
3.1.7 Enzyme	36
3.1.8 Oligonukleotide	36
3.1.9a Molekularbiologische und biochemische Reagenzien	37
3.1.9b Kommerzielle Reagenziensysteme	37
3.2 Methoden	38
3.2.1 Molekularbiologische Methoden	38
3.2.1.1 Isolierung von Plasmid DNA	38
3.2.1.2 Isolierung der SAP-DNA aus eukaryontischen Zellen	38
3.2.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	39

3.2.1.4 Agarose-Gel-Elektrophorese	40
3.2.1.5 DNA-Restriktion	40
3.2.1.6 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	40
3.2.1.7 Ligation von DNA	40
3.2.1.8 Transformation von Bakterien	40
3.2.1.9 Transfektion von eukaryontischen Zellen	41
3.2.2 Zellbiologische Methoden	42
3.2.2.1 Zellkultur	42
3.2.2.2 Isolierung primärer humaner NK Zellen	42
3.2.2.3 Zellyse	43
3.2.2.4 Zellstimulation	43
3.2.2.5 Zytotoxizitäts-Test	44
3.2.2.6 Entwicklung eines murinen monoklonalen Antikörpers	44
3.2.3 Protein-Biochemie	45
3.2.3.1 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	45
3.2.3.2 Immunpräzipitation	46
3.2.3.3 Lipid Raft-Isolation	46
3.2.3.4 Produktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine	46
3.2.3.5 Coomassie-Färbung	47
3.2.3.6 SDS-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	47
3.2.3.7 Western-Blot	47
4. Ergebnisse	48
4.1 Die Rolle der Transmembranregion des 2B4 Rezeptors für die Rekrutierung in die Lipid Raft-Domänen	48
4.2 Die Regulation der SAP Expression führt zu einer Modulation der 2B4-vermittelten NK Zell Aktivität	52
4.2.1 Die Stimulation humaner NK Zellen mit IL-2 führt zu einer Hochregulation der SAP-Genexpression	52
4.2.2 Verschiedene Varianten des SAP-Proteins sowie eine unterschiedliche Genexpression von SAP und EAT-2	53
4.2.3 2B4 assoziiert mit beiden SAP-Varianten	55
4.2.4 Eine Stimulation über IL-12, IFN- α und polyI:C führt zu einer Verstärkung der SAP-Expression in humanen NK Zellen	57

4.2.5 Die Regulation der SAP Expression führt zu einer Modulation der 2B4-vermittelten NK Zell Aktivität	58
4.3. Inhibierende Rezeptoren verhindern die NKG2D-vermittelte NK Zell Aktivierung über die Blockade der NKG2D-Raft Rekrutierung	61
4.3.1 Die Rolle der Lipid Rafts in der NK Zell Aktivität	61
4.3.1.1 Die Signalweiterleitung aktivierender NK Zell Rezeptoren ist abhängig von Lipid Rafts	61
4.3.1.2 Herstellung eines monoklonalen NKG2D Antikörpers	62
4.3.1.3 Die Aktivierung des NKG2D Rezeptors über eine Antikörper-Kreuzvernetzung oder die Bindung seines natürlichen Liganden induzieren eine Rekrutierung von NKG2D in die Lipid Raft-Domänen	64
4.3.1.4 Lipid Rafts sind für die NKG2D-vermittelte NK Zell Aktivierung essentiell	66
4.3.2 Inhibierende NK Zell Rezeptoren kontrollieren die NKG2D-vermittelte NK Zell Aktivierung	67
4.3.2.1 Die Aktivität des NKG2D-Rezeptors kann durch inhibierende NK Zell Rezeptoren blockiert werden	67
4.3.2.2 Inhibierende NK Zell Rezeptoren verhindern die Rekrutierung des NKG2D Rezeptors in die Lipid Raft-Domänen	69
4.3.2.3 Ein starkes inhibierendes Signal verhindert die Polarisierung von NKG2D an der Immunologischen Synapse und die NKG2D-vermittelte NK Zell Aktivierung	70
4.3.2.4 Die NKG2D-vermittelte Aktivierung benötigt filamentöses Aktin	73
4.3.2.5 Die Rolle des Vav1-Proteins in der NKG2D-Signalkaskade	74
4.3.2.6 Inhibierende Rezeptoren blockieren die Phosphorylierung von Vav1	75
5. Diskussion	77
6. Abkürzungen	98
7. Literaturverzeichnis	100

1. Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Die Aktivität Natürlicher Killerzellen wird durch eine Vielzahl aktivierender und inhibierender NK Zell Oberflächenrezeptoren reguliert. Die Signaltransduktion der einzelnen Rezeptoren und die Interaktion zwischen den verschiedenen Rezeptoren untereinander sind noch weitgehend unverstanden. Körper eigene Zellen sind durch die Zelloberflächenexpression von MHC Klasse I Molekülen vor einem Angriff der NK Zellen geschützt. Einige Studien lieferten jedoch Daten, die zu der Vermutung führten, dass der aktivierende NKG2D-Rezeptor die Signale der MHC Klasse I-bindenden, inhibierenden Rezeptoren übergehen könnte und trotz der MHC-Klasse I Expression der Zielzellen deren Lyse durch die NK Zellen induziert. In dieser Arbeit wurde zum einen das Wechselspiel zwischen aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren am Beispiel des NKG2D-Rezeptors untersucht. So konnte ein Modell über die molekularen Mechanismen der NK Zell Regulation aufgestellt werden. Dabei spielen spezielle Membranbereiche, die sog. Lipid Rafts, eine essentielle Rolle. NKG2D wurde nach Ligandenbindung in diese Membranbereiche rekrutiert. Nach biochemischer Zerstörung der Lipid Rafts war die NKG2D-vermittelte NK Zell Aktivierung blockiert. Es konnte gezeigt werden, dass inhibierende Rezeptoren in die NKG2D Signalkaskade eingreifen, indem sie gezielt die Raft-Rekrutierung des Rezeptors blockieren. Angriffspunkt ist dabei das intrazelluläre Signalprotein Vav1, welches die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts vermittelt. Durch die Stimulation inhibierender Rezeptoren wird Vav1 dephosphoryliert und somit inaktiviert, wodurch die Aktinpolymerisation und die daran gekoppelte Raft-Rekrutierung von NKG2D und die Raft-Akkumulation an der Immunologischen NK Zell Synapse verhindert wird.

Die Aktivität der NK Zelle wird nicht nur durch das Zusammenspiel aktivierender und inhibierender Rezeptoren reguliert, sondern auch durch die Modulation der Aktivität von stimulierenden Rezeptoren, wie dem 2B4 Rezeptor. Der 2B4 Rezeptor ist einer der am besten charakterisierten NK Zell Rezeptoren. Er kann NK Zellen direkt aktivieren oder nur als kostimulierendes Molekül fungieren. In unreifen NK Zellen oder in NK Zellen von Patienten mit dem X-linked lymphoproliferative disease (XLP) scheint er sogar inhibierende Signale zu induzieren. Diese Vielseitigkeit der transduzierten Signale könnte durch die vielen verschiedenen intrazellulären Signalmoleküle vermittelt werden, die an

den 2B4-Rezeptor binden können. Das kleine SH2 Domänen-haltige Adapterprotein SAP spielt für die Funktion von 2B4 eine essentielle Rolle. XLP Patienten besitzen durch ein mutiertes SAP Gen kein funktionelles SAP Protein und leiden unter einem starken Immundefekt. NK Zellen dieser Patienten können nicht über 2B4 aktiviert werden. Über die Regulation von SAP existieren eine Reihe gegensätzlicher Daten im humanen und murinen System und in unterschiedlichen Zelltypen. In dieser Arbeit wurde deshalb die Regulation von SAP in humanen NK Zellen untersucht und dessen mögliche Auswirkungen auf die Aktivität des 2B4-Rezeptors. Alle Versuche wurden dabei in primären humanen NK Zellen aus gesunden Spendern durchgeführt. Unstimulierte NK Zellen exprimieren kein oder kaum detektierbare Mengen an SAP Protein. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation humaner NK Zellen mit IL-2, IL-12, IFN- α und polyI:C eine deutliche Hochregulation der SAP-Genexpression induzierte. Interessanterweise konnten unterschiedliche Varianten des SAP Proteins detektiert werden. Desweiteren konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal auch eine, im Vergleich zu SAP gegenläufige, Regulation des Adapterproteins EAT-2 gezeigt werden. Die Regulation der SAP-Expression führte zu einer Modulation der 2B4-vermittelten NK Zell Aktivität. So konnte eine klare Korrelation zwischen den exprimierten SAP-Mengen in ruhenden und IL-2 aktivierten NK Zellen und der Aktivität des 2B4 Rezeptors festgestellt werden. Dabei stellte sich heraus, dass 2B4 bei geringen SAP-Mengen eine kostimulatorische Rolle zu übernehmen scheint und in aktivierten NK Zellen die Rolle eines eigenständigen, aktivierenden Rezeptor übernimmt.

1.2 English summary

NK cells are regulated by a variety of activating and inhibitory NK cell receptors. The signal transduction of the individual receptors and the interaction among different receptors are not fully understood. Cells expressing MHC class I molecules are protected against NK cell attacks. In some studies it was suggested that the activating NKG2D receptor can overcome signals from MHC class I binding inhibitory receptors and induces their lysis through NK cells despite the expression of MHC class I. In this thesis the interplay between activating and inhibitory receptors was studied and a model for the molecular mechanism of NK cell regulation was developed. Special membrane regions, the so-called lipid rafts, play an essential role in NK cell regulation. The activating NK cell receptor NKG2D was shown to be recruited into this membrane areas after ligand binding. Biochemical destruction of lipid rafts led to the blocking of NKG2D-mediated NK cell activation. It could be shown that inhibitory receptors could interfere with NKG2D signaling cascade by blocking the raft-recruitment of this receptor. The target of the inhibitory receptors is the intracellular signaling protein vav1 which is important for mediating actin-rearrangement. The stimulation of inhibitory receptors induces a de-phosphorylation of vav1, leading to an inhibition of actin-polymerisation and NKG2D raft-recruitment as well as the blockade of the lipid raft accumulation on the NK cell immunological synapse.

NK cells are not only regulated by the interplay between activating and inhibitory receptors but also by the modulation of the activity of stimulating receptors such as 2B4. 2B4 is one of the best characterized activating NK cell receptors. Engagement of 2B4 stimulates NK cells directly but it can also act as a co-stimulatory receptor. In immature NK cells or in NK cells from patients with X-linked lymphoproliferative disease (XLP) 2B4 is also able to transmit inhibitory signals. This variety of transduced signals could be mediated by the binding of different intracellular signaling molecules. The small SH2 domain containing adapter protein SAP plays an essential role for the 2B4 function. XLP patients are characterized by a mutant SAP gene leading to a non-functional SAP protein and resulting in a severe immune defect. NK cells from this patients cannot be activated by 2B4 stimulation. Several conflicting reports in the murine and human system have described a regulated SAP expression in different cell types. Therefore, in this thesis the regulation of SAP expression in human NK cells was examined as well its influence on 2B4 activity. All experiments were done in primary human NK cells. Unstimulated NK

cells express little or no SAP protein. Stimulation of human NK cells with IL-2, IL-12, IFN- α and polyI:C induced a strong upregulation of SAP expression. Interestingly, different variants of SAP protein could be detected. Furthermore, a regulation of EAT-2, a SAP-related adapter, could be shown for the first time. The regulated SAP expression induced a modulation of the 2B4-mediated NK cell activity. 2B4 acts as a co-stimulatory receptor in case of low SAP levels whereas it mediates signaling solely in case of high SAP levels. Thus, a clear correlation between the SAP levels in resting and IL-2 activated NK cells and the activity of 2B4 could be detected.

2. Einleitung

2.1 Das humane Immunsystem

Der menschliche Organismus ist in seiner Umwelt einer Vielzahl von krankheitsauslösenden Mikroorganismen wie Bakterien, Viren oder Pilzen ausgesetzt. Das Immunsystem schützt den Körper vor Infektionen und sorgt für eine zeitliche Begrenzung, um dauerhafte Schäden zu verhindern. Eine weitere wichtige Rolle spielt das Immunsystem bei der Tumorabwehr, indem es entartete, körpereigene Zellen bekämpft. Das Immunsystem setzt sich zusammen aus lymphatischen Organen, Leukozyten und löslichen Bestandteilen wie den Antikörpern. Zu den lymphatischen Organen gehören u.a. das Knochenmark, der Thymus, die Milz und die Lymphknoten. Dort werden Immunzellen gebildet, ausgereift und aktiviert. Zu den Leukozyten zählen zum einen Lymphozyten wie die B- und T-Zellen sowie die Natürlichen Killerzellen und Monozyten, die später zu Makrophagen ausreifen, zum anderen polymorphkernige Leukozyten wie basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten. Die eigentliche Immunabwehr wird durch diese Zellen und humoralen, d.h. löslichen Bestandteilen wie den Antikörpern, vermittelt. Krankheitsauslösende Mikroorganismen unterscheiden sich in ihrer Lebensweise und den Mechanismen, durch die sie Krankheiten auslösen können. Die Immunabwehr benötigt daher eine ganze Reihe unterschiedlicher Erkennungssysteme und verschiedener Effektormechanismen um Krankheitserreger, die in großer Vielfalt überall im Körper und an dessen Oberfläche vorkommen können, aufzufinden und zu zerstören.

Man unterscheidet prinzipiell das angeborene (innate) Immunsystem und das erworbene (adaptive) Immunsystem. Angeborene Abwehrmechanismen dienen der ersten Abwehr von Infektionen, indem sie zunächst das Eindringen der Erreger verhindern oder sie bereits beim ersten Kontakt abtöten. Zu diesem sog. angeborenen Immunsystems werden Monozyten/Makrophagen, Granulozyten und Natürliche Killerzellen gezählt. Sie umfassen eine ganze Reihe verschiedener Effektormechanismen, die gegen bestimmte Klassen von Krankheitserregern gerichtet sind. Zellen des angeborenen Immunsystems reagieren sehr schnell, d.h. innerhalb von Minuten oder Stunden. Die Erkennung der Krankheitserreger erfolgt dabei über konservierte Oberflächenstrukturen der Pathogene, die von Rezeptoren der innaten Zellen erkannt und gebunden werden. Hierzu gehören z.B. die Mannoserezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen, die an Komponenten der Bakterienzellwand binden und dadurch Phagozytose induzieren. Dabei werden die

Bakterien in Phagolysosomen aufgenommen und durch Azidifizierung, lytische Granula und reaktive Sauerstoffradikale abgetötet. Eine wichtige Aufgabe der angeborenen Immunantwort ist es, weitere Effektorzellen des innate Immunsystems zum Infektionsherd zu locken, wie die Natürlichen Killerzellen oder andere phagozytierende Zellen wie z.B. neutrophile Granulozyten. Dies geschieht über die Freisetzung von einer Reihe an Zytokinen. Somit wird die Infektion weiter unter Kontrolle gehalten. Zudem werden auch die Zellen des adaptiven Immunsystems rekrutiert. Zellen des innate Immunsystems können Krankheitserreger nicht spezifisch erkennen; sie können zudem keine lang anhaltende Immunität gewährleisten und bieten auch keinen gezielten Schutz gegen eine erneute Infektion, führen also nicht zur Bildung eines immunologischen Gedächtnisses. Entgeht den angeborenen Abwehrmechanismen also eine Infektion und eine bestimmte Menge an fremden Antigenen wird überschritten, wird eine adaptive Immunantwort ausgelöst.

Die schützende Immunität gegen eine erneute Infektion ist eine der wichtigsten Konsequenzen der adaptiven Immunität, die auf einer klonalen Selektion von B und T Zellen beruht. Diese besitzen eine Vielzahl hochspezifischer Rezeptoren, die es dem Immunsystem ermöglichen, jedes beliebige fremde Antigen spezifisch zu erkennen. Die spezifische Erkennung von Antigenen erfolgt bei B-Zellen durch membrangebundene Antikörper, die als B Zell Rezeptor (BZR) bezeichnet werden und bei T-Zellen durch den T Zell Rezeptor (TZR). Beide Rezeptortypen besitzen hoch variable Anteile, die bestimmte Epitope eines Moleküls erkennen. Durch die somatische Rekombination besitzt jede B und T Zelle individuelle, Antigen-spezifische Rezeptoren. B und T Zellen werden über die Bindung „ihrer“ spezifischen Antigene aktiviert. Diese Antigene werden über spezielle Antigen-präsentierende Zellen wie die dendritischen Zellen (DC von engl. dendritic cells), Makrophagen oder auch B Zellen auf ihrer Oberfläche präsentiert. So nehmen dendritische Zellen antigene Strukturen auf, prozessieren sie und präsentieren sie auf speziellen Oberflächenstrukturen, den MHC (engl. Major Histocompatibility Complex) - Molekülen. Nach der Phagozytose der Antigene wandern die dendritischen Zellen in die lymphatischen Gewebe wie die Lymphknoten, ein. Dort werden die Antigene naiven B und T Zellen präsentiert, die kontinuierlich durch die lymphatischen Organe zirkulieren. Finden die B oder T Zellen die passenden Antigene für ihre Rezeptoren auf der Oberfläche der dendritischen Zellen, werden sie aktiviert und beginnen zu proliferieren. Diese klonale Expansion ist für eine ausreichend starke Immunantwort gegen eine Infektion notwendig.

B Zellen differenzieren weiterhin zu sog. Plasmazellen, die sezernierende Formen ihrer B Zell-Rezeptoren, die Antikörper, produzieren. Diese binden spezifisch an Pathogene, die passende Antigene auf ihrer Oberfläche besitzen und markieren sie somit für phagozytierende Zellen wie die NK Zellen und zur Lyse durch das Komplementsystem. Zudem kann eine Antikörperbindung Toxine inaktivieren oder zu einer Blockade von Oberflächenstrukturen pathogener Mikroorganismen führen, die notwendig für deren Eindringen in Körperzellen sind. T Zellen differenzieren nach ihrer Aktivierung in den lymphatischen Organen zu T Effektorzellen und wandern entweder an den Infektionsort oder aktivieren antigenbindende B Zellen in den lymphatischen Geweben. T Zellen bestehen aus verschiedenen Subpopulationen. So lassen sich $CD8^+$ T Zellen und $CD4^+$ T Zellen unterscheiden. $CD8^+$ T Zellen sind zytotoxische T Zellen, die den Korezeptor CD8 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Sie bilden lytische Granula, mit denen sie infizierte Zellen gezielt abtöten können. Auch Tumorzellen werden über diesen Zelltyp eliminiert. $CD4^+$ T Zellen exprimieren den Korezeptor CD4 auf ihrer Oberfläche. Sie werden auch als T Helferzellen (TH) bezeichnet und lassen sich in TH1 und TH2 Zellen untergliedern. TH1 Zellen produzieren vor allem Interferon (IFN)- γ und IL-2 und führen damit zur Aktivierung von Monozyten/Makrophagen und $CD8^+$ T Zellen. TH2 Zellen hingegen sezernieren IL-2, IL-6, IL-4 und IL-13 und aktivieren damit vor allem B Zellen. Die T Helferzellen können weiterhin Granulozyten zur Differenzierung anleiten und NK Zellen koaktivieren. Die adaptive Immunantwort kann nicht nur Krankheitserreger spezifisch beseitigen, sie erzeugt zudem durch klonale Selektion eine erhöhte Zahl ausdifferenzierter Gedächtniszellen, was bei einer erneuten Infektion eine schnellere und wirksamere Abwehrreaktion erlaubt. Die Stimulation der adaptiven Immunantwort benötigt einige Tage, da die antigenspezifischen B und T Zellen proliferieren und zu Effektorzellen differenzieren müssen. Währenddessen vermehren sich die Erreger im Wirt weiter, wobei sie vor allem durch angeborene Mechanismen in Schach gehalten werden. Nur das Zusammenspiel aller Immunzellen gewährleistet die Abwehr von Infekten und die Aufrechterhaltung der Gesundheit des Organismus (Janeway, 2001).

2.2 Die Rolle der Natürlichen Killerzellen im humanen Immunsystem

Eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem übernehmen die Natürlichen Killerzellen (NK Zellen), indem sie eine erste Abwehr gegen gestresste, virusinfizierte und maligne Zellen bilden (Cerwenka and Lanier, 2001). NK Zellen stellen neben T Zellen und

B Zellen die dritte Subpopulation von Lymphozyten dar (Moretta et al., 2002) und werden dem angeborenen Immunsystem zugerechnet. Ursprünglich wurden NK Zellen über ihre Fähigkeit, bestimmte Tumorzelllinien abtöten zu können, definiert. Der Begriff "Natürliche Zytotoxizität" wurde dabei durch die Beobachtung geprägt, dass die Aktivität der NK Zellen unabhängig von einer vorherigen Sensibilisierung stattfindet (Herberman, 1982; Lanier et al., 1986). Die heutige Charakterisierung von NK Zellen wird über die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle durchgeführt. Humane NK Zellen sind demnach CD3-negativ und CD56-positiv (Cooper et al., 2001).

NK Zellen entwickeln sich, wie T und B Zellen, im Knochenmark (Colucci et al., 2003). Sie weisen einige Gemeinsamkeiten zu T Zellen auf, mit denen sie auch eine gemeinsame Vorläuferzelle teilen. So werden viele Oberflächenmoleküle sowohl auf NK als auch auf T Zellen exprimiert und beide Zellpopulationen weisen ähnliche Effektormechanismen gegenüber Zielzellen auf. Sowohl CD8⁺ zytotoxische T Zellen (CTLs) als auch NK Zellen töten die Zielzellen über Perforin und Granzyme. Weiterhin sezernieren beide Zelltypen (T und NK Zellen) IFN- γ . Im Gegensatz zu T oder B Zellen findet jedoch bei NK Zellen keine Rekombination der Rezeptorgene statt und ihre Entwicklung ist nicht, wie die der T Zellen, vom Thymus abhängig (Colucci et al., 2003).

NK Zellen machen 10-15% der peripheren Blutlymphozyten (PBL) aus. Trotz dieser kleinen Zellpopulation sind NK Zellen fähig, sehr schnell auf Infektionen zu reagieren. Dies ist einmal darauf zurückzuführen, dass einzelne NK Zellen eine ganze Reihe von verschiedenen aktivierenden Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren. Somit ist eine einzelne Zelle in der Lage auf multiple Aktivierungssignale zu reagieren. Eine weitere Erklärung liegt darin begründet, dass NK Zellen konstitutiv Zytokinrezeptoren exprimieren wodurch sie über proinflammatorische Zytokine stimuliert werden können, welche in der frühen Phase der Immunantwort produziert werden (Yokoyama et al., 2004).

Reife NK Zellen sind hauptsächlich beschränkt auf das periphere Blut, Knochenmark, Niere, Lunge und Leber (Colucci et al., 2003). Sie sind jedoch auch in geringeren Mengen in Lymphknoten und lymphatischen Geweben aufzufinden. In der frühen Phase von inflammatorischen Prozessen oder bei Tumoren wandern sie vermehrt in diese Gewebe ein (Salazar-Mather et al., 1998; Smyth et al., 2000) und proliferieren (Dokun et al., 2001). NK Zellen spielen besonders bei der Bekämpfung von Virusinfektionen, speziell von Herpesviren (wie Cytomegalovirus, Herpes simplex, Varicella Zoster) eine essentielle Rolle (Biron et al., 1999). Ihre Aktivität ist weiterhin wichtig bei der Bekämpfung von Bakterien (z.B. *Listeria monocytogenes* und *Mycobacterien*), Parasiten (z.B. *Leishmania*

und Toxoplasma) und Pilzen (z.B. Cryptococcus). Zudem wurde in murinen Tumormodellen gezeigt, dass sie auch bei der Tumorbekämpfung und der Prävention der Metastasierung eine essentielle Rolle spielen (Kim et al., 2000).

Die Bedeutung der NK Zellen im humanen Immunsystem wurde in Patienten mit einer seltenen NK Zell-Defizienz deutlich. Trotz einer normalen Anzahl an funktionellen B und T Zellen zeigten diese Patienten häufige Infektionen mit Bakterien und Herpesviren (Biron et al., 1989).

Die Aktivität der NK Zellen zeichnet sich durch ihre Zytotoxizität und die Produktion von Zytokinen aus. Die Zytotoxizität wird hauptsächlich über die Freisetzung von zytotoxischen Granula vermittelt, die das porenbildende Perforin und Mitglieder aus der Proteasefamilie der Granzyme enthalten. Diese werden nach der NK Zell Aktivierung zielgerichtet freigesetzt und führen zur Lyse der Zielzellen (Lieberman, 2003). Für die Kontrolle von bestimmten bakteriellen, parasitären oder viralen Infektionen sind zudem die Sekretion von Zytokinen wie IFN- γ , TGF- β , IL-1 β , IL-10, Tumornekrosefaktor (TNF)- α und Granulozyten-Makrophagen colony stimulating factor (GM-CSF) sowie Metalloproteinasen (MMPs) essentiell (Biron, 1997; Chuang et al., 2000; Kitson et al., 1998; Naume and Espevik, 1994).

NK Zellen stellen weiterhin eine wichtige Verbindung zwischen dem innaten und adaptiven Immunsystem dar, indem sie das adaptive Immunsystem über die Sekretion von Zytokinen wie IFN- γ und TNF- α (Cooper et al., 2001; Ferlazzo and Munz, 2004) regulieren und mit dendritischen Zellen interagieren (Degli-Esposti and Smyth, 2005; Moretta et al., 2002).

2.2.1 Die Regulation von Natürlichen Killerzellen

Die Aktivität von NK Zellen wird über eine Reihe von positiven und negativen Signalen reguliert, die über verschiedene, aktivierende oder inhibierende NK Zell Oberflächenrezeptoren vermittelt werden (Lanier, 2003). Diese bestimmen, ob sich die NK Zelle von der potentiellen Zielzelle ablöst und sie somit am Leben lässt oder sie abtötet. Hierbei spielt die Balance zwischen den positiven und negativen Signalen eine essentielle Rolle.

Zu Faktoren, die verantwortlich für die Aktivierung und Inhibition von NK Zellen sind, gehören eine ganze Reihe von verschiedenen, membrangebundenen Molekülen auf unterschiedlichen Geweben, die an die aktivierenden NK Zell Rezeptoren binden und

somit eine Signalkaskade induzieren. NK Zellen können jedoch auch über verschiedene lösliche Faktoren beeinflusst werden. Hierzu gehören Zytokine wie IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, TNF- α , TGF- β oder Typ I Interferone wie IFN- α und - β . Letztere werden hauptsächlich von dendritischen Zellen nach einer Virusinfektion produziert (Cella et al., 2000) und führen einerseits zu einer Verstärkung der NK Zell Zytotoxizität, zum anderen induzieren sie die Produktion von IL-15, welches für die Proliferation und das Überleben der NK und T Zellen wichtig ist. IL-12 wird von Monozyten /Makrophagen und dendritischen Zellen sezerniert und induziert eine starke IFN- γ Produktion (Chan et al., 2006). IL-2 wird von aktivierten TH Zellen sezerniert und wird für die Proliferation und Zytotoxizität der NK Zellen benötigt. TGF- β hingegen kann die Runterregulation von aktivierenden NK Zell Rezeptoren induzieren (Castriconi et al., 2003; Ghiringhelli et al., 2005; Lee et al., 2004a).

NK Zellen können weiterhin durch Stimuli wie beispielsweise virale, doppelsträngige RNA aktiviert werden (Akira and Hemmi, 2003; Alexopoulou et al., 2001; Ritter et al., 2005). Diese binden an die Toll-like Rezeptoren, die eine hoch konservierte Rezeptorfamilie mit bisher 10 identifizierten Mitgliedern im humanen Organismus bilden (Takeda, 2005). Sie werden insbesondere durch spezifische bakterielle oder virale Produkte aktiviert. So bindet polyI:C, welches virale, doppelsträngige RNA nachahmt, an den Toll-like Rezeptor 3 (TLR3) der NK Zellen (de Bouteiller et al., 2005; Okahira et al., 2005; Schroder and Bowie, 2005; Sen and Sarkar, 2005). Durch die Kultivierung der NK Zellen mit polyI:C wird eine Hochregulation der TLR3-mRNA, eine verstärkte NK Zell Zytotoxizität und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-8 und IFN- γ induziert (Cella et al., 2000; Schmidt et al., 2004).

Für das Verständnis der NK Zell Regulation war die sog. „Missing Self-Hypothese“ (Kärre, 1985) von Bedeutung. Diese basiert auf der Beobachtung, dass Lymphozyten von gesunden Spendern allogene Tumorzellen lysierten und auf dem Phänomen der NK Zell-vermittelten F1 Hybrid-Resistenz (Herberman et al., 1975a; Herberman et al., 1975b; Johnson et al., 2000). Die Idee der Hypothese war die Annahme, dass der zentrale Erkennungsmechanismus der NK Zellen darauf basiert, Informationen zu detektieren, die nicht auf fremden oder infizierten Zellen, wohl aber auf den Wirtszellen vorhanden waren. Dies stand im Gegensatz zu den Erkennungsmechanismen der T Zellen. Weitere Studien zeigten, dass die Expression der MHC Klasse I Moleküle die eigentliche Informationsquelle für die NK Zellen darstellte, ob eine Zelle lysiert oder am Leben gelassen wurde (Karre et al., 1986; Ljunggren and Karre, 1985). Die Entdeckung der inhibierenden, MHC Klasse I-

bindenden NK Zell Rezeptoren bestätigten dies (Karlhofer et al., 1992; Moretta et al., 1993). Virus-infizierte oder maligne Zellen exprimieren oft keine oder nur eine verminderte Zahl an MHC-Klasse I-Moleküle auf ihrer Oberfläche, während Transplantate fremde MHC Klasse I-Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen. Dadurch werden keine inhibierenden Signale an die NK Zellen vermittelt und es kommt zur NK Zell-vermittelten Lyse der Zellen.

Heute weiß man, dass die Regulation der NK Zell Aktivität wesentlich komplexer ist. Neben dem Modell der „Missing Self-Hypothese“ existiert seit kurzem eine neue „Induced-self-Hypothese“. Diese geht von der Beobachtung aus, dass bestimmte NK Zell Liganden auf Zielzellen nach Stimulation hochreguliert werden können. Diese erhöhte Expression kann dazu führen, dass die inhibierenden Signale übergangen werden, so dass trotz der Expression von MHC Klasse I-Molekülen die Lyse der Zielzellen induziert wird (Watzl, 2003).

2.2.2 Die Inhibition der Natürlichen Killerzellen

Die zytolytische Aktivität und die Zytokinsekretion der NK Zellen werden streng reguliert durch inhibierende Rezeptoren. Die meisten dieser Rezeptoren binden an MHC-Klasse-I Moleküle und übernehmen damit eine essentielle Rolle bei der Selbsttoleranz gegenüber körpereigenen Zellen.

Die zuerst entdeckte Klasse dieser inhibierenden NK Zell Rezeptoren wurde in der Maus beschrieben. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von C-Typ Lektin-ähnlichen Typ II Transmembranrezeptoren, die Ly49 genannt werden und die als Homodimere exprimiert werden. Humane NK Zellen exprimieren kein Ly-49 sondern zwei Klassen von inhibierenden Rezeptoren, die sog. KIR Rezeptoren (engl: Killer cell Ig-like receptors) und die Familie der CD94/NKG2 Rezeptoren (Long, 1999) (Abb.2.2.2). Die KIR Rezeptoren gehören zur Familie der Typ I Transmembranrezeptoren der Ig-Superfamilie. Die humane KIR Genfamilie beinhaltet 15 Gene und 2 Pseudogene. Sie werden als Monomere exprimiert und enthalten entweder 2 (KIR2D) oder 3 (KIR3D) Ig-ähnliche Domänen in ihrem extrazellulären Teil. Sie werden weiter unterteilt durch das Vorhandensein eines langen zytoplasmatischen Teils (KIR2DL, KIR3DL) oder eines kurzen zytoplasmatischen Teils (KIR2DS, KIR3DS). Erstere führen zu einer Inhibition der NK Zell Aktivität. Der Inhibitionsmechanismus der MHC Klasse I bindenden NK Zell Rezeptoren beruht dabei auf einer oder mehreren Kopien eines konservierten Tyrosinmotivs im zytoplasmatischen

Teil der Rezeptoren, die sog. ITIM-Sequenz (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) (Ile/Val/Leu/Ser-x-Tyr-x-x-Leu/Val; x = beliebige AS). KIR Rezeptoren mit einem kurzen zytoplasmatischen Schwanz besitzen dieses ITIM Motiv nicht. Sie assoziieren stattdessen mit einem Transmembranmolekül DAP-12 (DNAX-aktivierendes Protein von 12 kD, KARAP), das die für die Übertragung aktivierender Signale wichtigen, konservierten Tyrosinmotive (ITAMS, immunoreceptor tyrosine-based activation motif) (YxxLx₈YxxL) (Cerwenka and Lanier, 2001; Humphrey et al., 2005; Wilson et al., 2000) enthält und somit zu einer Aktivierung der NK Zelle beiträgt.

KIR Rezeptoren erkennen spezifisch bestimmte HLA-B und HLA-C Allotypen der MHC Klasse I Moleküle. Gesunde, körpereigene Zellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche eine Vielzahl von MHC Klasse I Molekülen. Die Bindung dieser Oberflächenmoleküle an die KIRs der NK Zelle induziert eine Signalkaskade, die zu der Inhibition der NK Zelle und dem Überleben der gesunden Zelle führt. Virus-infizierte oder transformierte Zellen tragen häufig keine oder nur eine verminderte Anzahl an MHC Molekülen auf ihrer Oberfläche, was zu einer verminderten Inhibition der NK Zelle und somit zur Lyse der abnormalen Zellen führt.

Die verschiedenen KIR-Moleküle werden nur auf einer Subpopulation der NK Zellen exprimiert (Litwin et al., 1994; Moretta et al., 1990). Auf einer NK Zelle können jedoch mehrere verschiedene KIR Rezeptoren exprimiert werden. Analysen von NK Zell Klonen zeigten, dass einzelne NK Zellen im Durchschnitt drei bis vier verschiedene inhibierende Rezeptoren exprimieren (Valiante et al., 1997). Jede NK Zelle besitzt jedoch mindestens einen inhibierenden Rezeptor für körpereigenes MHC Klasse I (Valiante et al., 1997).

Die zweite Klasse an inhibierenden Rezeptoren, die auf humanen NK Zellen identifiziert wurde, ist die Familie der CD94/NKG2 Rezeptoren. Sie setzt sich zusammen aus dem CD94 Rezeptor und den Mitgliedern der NKG2 Familie. Beide gehören zu den C-Typ Lektin-ähnlichen Typ II Transmembranglykoproteinen. CD94 kann auf der Zelloberfläche nur als ein disulfidverbundenes Homodimer oder als disulfidverbundenes Heterodimer mit Mitgliedern der NKG2-Familie exprimiert werden (Brooks et al., 1997; Lazetic et al., 1996; Vance et al., 1999). CD94 besitzt keinen zytoplasmatischen Teil, die Signalübertragung erfolgt über den zytoplasmatischen Teil der NKG2 Mitglieder. NKG2A besitzt eine ITIM-Sequenz im zytoplasmatischen Teil und vermittelt dadurch inhibierende Signale (Carretero et al., 1997; Houchins et al., 1997). CD94/NKG2C hingegen ist ein aktivierender Rezeptor, der ebenfalls über die Assoziation mit DAP12 Signale induziert (Houchins et al., 1997; Lanier, 1998). CD94 bindet an das nicht-klassische MHC Klasse I

Molekül HLA-E, welches nur an die Zelloberfläche gelangen kann, indem es an Signalpeptide anderer klassischer MHC Klasse I Moleküle bindet. Die Zelloberflächenexpression von HLA-E zeigt somit auch gleichzeitig die Expression von anderen MHC Klasse I Molekülen auf.

Die Bindung von MHC Klasse I Molekülen an die inhibierenden Rezeptoren führt zu einer Tyrosinphosphorylierung der ITIM Sequenz und im Folgenden, abhängig vom Rezeptor, zu einer Rekrutierung und Aktivierung der SH2-Domänen enthaltenden Tyrosinphosphatasen SHP (SH2-containing protein tyrosine phosphatase)-1 und SHP-2 (Long et al., 2001) oder der Phospholipid-spezifischen Phosphatase SHIP (SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase). Diese induzieren eine weitere Signalkaskade, die zu einer Inhibition der NK Zelle führt (Chen et al., 2004; Chua et al., 2004). Der genaue Mechanismus der Signalweiterleitung und Inhibition durch die Tyrosinphosphatasen ist noch unbekannt. SHIP degradiert PIP₃ (Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat) zu PIP₂ und verhindert dadurch Ca²⁺-abhängige Signalkaskaden während SHP-1 und -2 zu einer Dephosphorylierung verschiedener intrazellulärer Signalproteine führen, wie z.B. Vav-1, LAT, Syk, FcεRIγ, ZAP-70, PLCγ1 und 2 oder SLP-76 (Binstadt et al., 1998; Binstadt et al., 1996; Palmieri et al., 1999; Stebbins et al., 2003; Valiante et al., 1996). Es ist jedoch unklar ob all diese Signalproteine direkte Substrate der Phosphatasen sind oder ob sie auch über andere intrazelluläre Proteine dephosphoryliert werden.

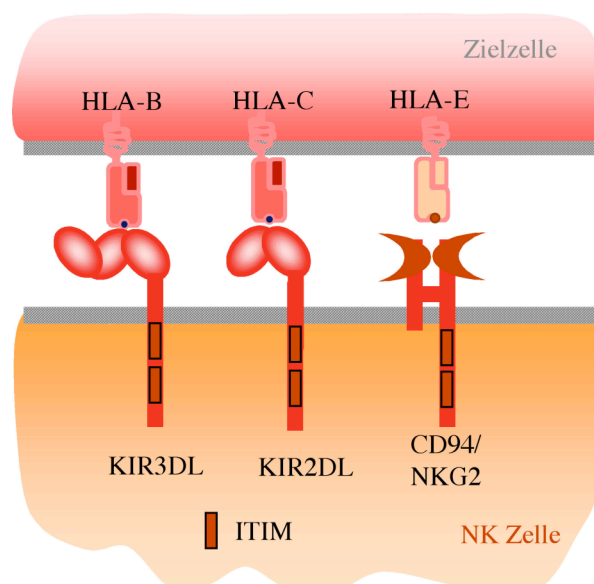


Abb 2.2.2 Humane inhibierende NK Zell Rezeptoren und ihre Liganden

2.2.3 Die Aktivierung der Natürlichen Killerzellen

Werden keine oder zu geringe Mengen an MHC Klasse I Moleküle auf der Oberfläche von Zellen exprimiert, kommt es zur Aktivierung der NK Zelle. Die Aktivierung wird über eine ganze Reihe unterschiedlicher Zelloberflächenrezeptoren der NK Zelle vermittelt (Colucci et al., 2002; Moretta et al., 2001) (Abb.2.2.3). Zu dieser Gruppe gehören 2B4 (CD244), NKG2D, NKp80, CS-1 (CRACC, CD319), NTB-A (Ly-108, SF2000) und die sog. NCRs (Natural Killer Cell Receptors) NKp30, NKp44, NKp46 (Lanier, 2005; Moretta et al., 2001). Eine weitere Gruppe an NK Zell Rezeptoren, die zeigen, dass sie zur Aktivierung beitragen, setzt sich zusammen aus LFA-1, CD-2, CD44, CD69 und DNAM-1 (CD226). Diese wurden zu Beginn als Adhäsionsmoleküle oder als Moleküle, die zur Kostimulation beitragen, identifiziert. Die Signaltransduktion der verschiedenen Rezeptoren ist bisher jedoch nur teilweise aufgeklärt. Bezogen auf die Weiterleitung der Signale lassen sich die aktivierenden NK Zell Rezeptoren in zwei Klassen unterteilen: NKp30, NKp44, NKp46 und NKG2D vermitteln ihre Signale über die Bindung an signaltransduzierende Partnerketten wie CD3 ζ , Fc ϵ RI γ , DAP12 und DAP10. Diese enthalten, mit Ausnahme von DAP10, die für die aktivierenden Signale notwendigen ITAM-haltigen Domänen im zytoplasmatischen Teil. 2B4, CS1, NTB-A, DNAM-1 und NKp80 hingegen tragen selber Tyrosin-enhaltende, aktivierende Domänen und induzieren somit selbständig aktivierende Signale.

Die Erforschung der Signalwege wurde bisher dadurch erschwert, dass nicht alle Liganden der genannten Rezeptoren bekannt sind. NTB-A und CS1 wurden als homophile Moleküle charakterisiert (Flaig et al., 2004; Kumaresan et al., 2002). Beide Moleküle werden auf NK Zellen, B und T-Zellen exprimiert (Boles et al., 2001; Bottino et al., 2001; Bouchon et al., 2001; Fraser et al., 2002; Peck and Ruley, 2000; Tovar et al., 2002). CS1 ist weiterhin auf reifen dendritischen Zellen zu finden (Boles et al., 2001). Die NCRs werden hauptsächlich auf NK Zellen exprimiert. Sie gehören zur Ig-Superfamilie (Moretta et al., 2001). Ihre Liganden sind bisher unbekannt, es gibt jedoch Hinweise, dass virales Hämagglutinin als Ligand für NKp44 und NKp46 dienen könnte (Arnon et al., 2001; Mandelboim et al., 2001). NCRs spielen eine besondere Rolle in der NK Zell Abwehr von einer Vielfalt an Tumoren (Moretta et al., 2002). DNAM-1 (CD226) wird in T Zellen, NK Zellen, Monozyten/Makrophagen und einigen B Zellen exprimiert (Tahara-Hanaoka et al., 2004) und bindet an Mitglieder der humanen PRR (Poliovirus receptor related)-Familie Nectin-2 (CD112) und PVR (CD155) (Bottino et al., 2003). Er spielt eine wichtige Rolle in der

Tumorabwehr (Pende et al., 2005). 2B4 bindet an CD48 (Brown et al., 1998; Latchman et al., 1998), ein GPI-verankertes Oberflächenmolekül welches im hämatopoietischen System weit verbreitet ist. Es wird, wie der 2B4 Rezeptor selbst, zu der CD2-Familie der Ig-ähnlichen Proteine gezählt. Humanes NKG2D erkennt Zelloberflächen-Glykoproteine, die strukturell homolog zu den MHC Klasse I Molekülen sind (Radaev and Sun, 2003) (siehe unten).

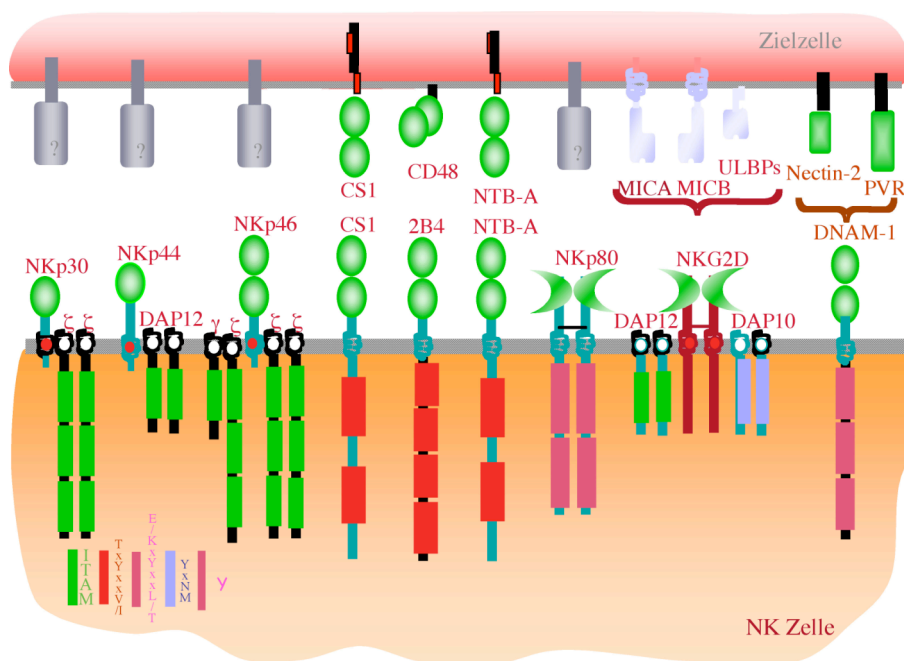


Abb. 2.2.3 Humane aktivierende NK Zell Rezeptoren und ihre Liganden

Ein gut charakterisiertes Oberflächenmolekül, das ebenfalls zur Aktivierung von NK Zellen beiträgt, ist CD16 (Fc γ RIII), ein niedrigaffiner Rezeptor für IgG. CD16 vermittelt die Antikörper-vermittelte Zytotoxizität (ADCC, antibody dependent cellular cytotoxicity). Er ist Teil eines Rezeptorkomplexes, der sich aus der ζ -Untereinheit des T Zell Rezeptors und der nicht kovalent assoziierten γ -Untereinheit des hochaffinen IgE-Rezeptors zusammensetzt. Für die Signaltransduktion sind ITAMs in den ζ - und γ -Untereinheiten wichtig. Die Aktivierung von CD16 über Antikörper-markierte Zellen induziert die Sekretion von Zytokinen und die Exozytose von granulären Vesikeln und führt somit zu der Lyse der Antikörper-markierten Zellen. NK Zellen sind also nicht nur beschränkt auf die innate Immunantwort sondern sie spielen auch in der adaptiven, Antikörper-vermittelten Immunantwort eine Rolle.

2.2.3.1 Der NKG2D Rezeptor

Der aktivierende NKG2D-Rezeptor ist ein Typ II Transmembran-verankertes Glykoprotein und wurde erstmals auf humanen NK Zellen, als ein Mitglied der NKG2-Familie, identifiziert (Houchins et al., 1991). Sequenzanalysen ergaben jedoch eine Homologie von nur 21% zu den anderen Mitgliedern der NKG2-Familie. NKG2D wird als disulfidverbundenes Homodimer exprimiert und bildet keine Dimere mit CD94 (Wu et al., 1999). Sowohl in murinen als auch in humanen NK Zellen wird der Rezeptor konstitutiv exprimiert. In humanen NK Zellen kann die Expression des Rezeptors jedoch durch Zytokine beeinflusst werden. Sowohl IL-15 als auch IL-10, IL-12 und IFN- α induzieren eine Hochregulation der NKG2D-Expression (Sutherland et al., 2002), während TGF- β zu einer Runterregulation des Rezeptors führt (Castriconi et al., 2003; Ghiringhelli et al., 2005; Lee et al., 2004a). Zytokine wie IL-2, IL-12 oder IFN- α/β haben hingegen keinen Einfluss auf die NKG2D-Expression in murinen NK Zellen (Diefenbach et al., 2000). NKG2D wird weiterhin konstitutiv auf humanen CD8 T Zellen exprimiert (Bauer et al., 1999), in murinen CD8 T Zellen jedoch erst nach Stimulation über den T Zell Rezeptor (Diefenbach et al., 2000; Jamieson et al., 2002). Die NKG2D-vermittelte Signalkaskade wird über die intrazellulären Adapterproteine DAP10 (DNAX-aktivierendes Protein von 10 kD) und DAP12 induziert. Hierbei gibt es Unterschiede zwischen Maus und Mensch. In der Maus existieren 2 Isoformen von NKG2D, die durch alternatives Spleißen entstehen. Die Unterschiede liegen in der Länge der zytoplasmatischen Domäne. Das längere Protein NKG2D-L besitzt 13 AS mehr am N-Terminus in der zytoplasmatischen Domäne (Diefenbach et al., 2002). Diese 13 AS verhindern die Bindung von NKG2D-L an das Adapterprotein DAP12 (Rosen et al., 2004). Es assoziiert nur mit DAP-10, während NKG2D-S sowohl über DAP10 als auch über DAP12 Signale weiterleitet (Diefenbach et al., 2002; Gilfillan et al., 2002). Im Menschen wird nur NKG2D-L exprimiert, welches nur mit DAP10 assoziieren kann (Andre et al., 2004; Billadeau et al., 2003; Wu et al., 2000a; Wu et al., 1999).

DAP10 ist ein Typ I Membranprotein. Seine Transmembranregion beinhaltet einen negativ geladenen, konservierten Aminosäurerest, der auch in den DAP12- und CD3-Untereinheiten aufzufinden ist und eine Oligomerbildung erlaubt. Der kurze zytoplasmatische Schwanz von DAP10 besitzt ein Tyr-x-N-Met (YxNM) Motiv (Chang et al., 1999; Wu et al., 1999). DAP 12 hingegen besitzt ein ITAM-Motiv (Wilson et al., 2000). Die Bindung von NKG2D an DAP10 oder DAP12 induziert damit unterschiedliche

Signaltransduktionswege. Das ITAM-haltige DAP12 Protein aktiviert in NK Zellen die Tyrosinkinase Syk und ZAP70 (Lanier et al., 1998). DAP10 hingegen bindet nach der Phosphorylierung des (YxNM)-Motivs an die p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) (Wu et al., 1999). Die Aktivierung von PI3K induziert im Folgenden die Phosphorylierung von Akt, die Aktivierung des ERK1/2 MAPK-Signalwegs und die Mobilisierung von Ca^{2+} (Chang et al., 1999; Sutherland et al., 2002; Wu et al., 1999). DAP10 kann auch an Grb2 binden (Chang et al., 1999). Die Stimulation mit löslichen NKG2D Liganden bewirkt zudem eine Phosphorylierung der Janus Kinase 2 (JAK2) und STAT5 (Schroder and Bowie, 2005), unabhängig von der PI3K-Aktivität (Sutherland et al., 2002). Die Expression von humanem NKG2D auf der Zelloberfläche benötigt die Koassoziation mit DAP10. Ohne die Bindung an das Adapterprotein verbleibt NKG2D im Zytoplasma und wird degradiert (Rosen et al., 2004; Wu et al., 2000b; Wu et al., 1999).

Humanes NKG2D erkennt Zelloberflächen-Glykoproteine, die strukturell homolog zu den MHC Klasse I Molekülen sind (Radaev and Sun, 2003). Hierzu gehören die humanen NKG2D-Liganden MICA und MICB (MHC class I related molecules A und B) und die ULBP1-4 (UL-16 binding proteins 1-4) (Bauer et al., 1999; Cosman et al., 2001; Jan Chalupny et al., 2003). Zu den NKG2D-Liganden der Maus gehören Rae-1 α - ϵ , H60 und MULT-1 (Carayannopoulos et al., 2002; Cerwenka et al., 2000; Diefenbach et al., 2003; Diefenbach et al., 2001). Die meisten dieser Liganden werden jedoch nicht durch Gene kodiert, die im MHC-Komplex liegen (Raulet, 2003). MICA und MICB sind die einzigen NKG2D-Liganden, deren Gene innerhalb des humanen MHC-Komplexes lokalisiert sind (Bahram et al., 1994). Vergleiche von ULBPs und den MIC-Proteinen wiesen eine Homologie von unter 20% auf. Die humanen ULBP Gene sind Orthologe des Maus Rae-1 Gens. ULBP-1,-2,-3 und Rae-1 Glykoproteine sind über Phosphatidylinositolglykane (GPI) in der Membran verankert, während humanes ULBP-4, MICA, MICB und murines H60 und MULT-1 über ein transmembranspannendes Segment verankert sind. Alle Liganden haben α 1 und α 2-Domänen, die ein MHC Klasse I ähnliches Gerüst bilden. MICA und MICB haben zudem eine α 3 Domäne (Li et al., 1999a). Kristallstrukturanalysen zeigten jedoch, dass diese Moleküle nicht fähig sind, Peptide zu binden (Holmes et al., 2002; Li et al., 2002; Li et al., 2001; Radaev et al., 2001).

MIC Gene sind sehr polymorph. Für MICA wurden 54 Allele identifiziert, für MICB 18 Allele (<http://mhc-x.u-strasb.fr/human.htm>). Es gibt ebenfalls Hinweise, dass auch ULBP-Gene Polymorphismen aufzeigen. NKG2D weist also eine hohe Variabilität in der Ligandenbindung auf. Kristallographische Analysen ergaben, dass die verschiedenen

Liganden-Varianten mit unterschiedlicher Affinität an NKG2D binden (Li et al., 2000; Steinle et al., 2001).

Über die Regulation der Transkription der NKG2D-Liganden ist bisher wenig bekannt. Die Expression einiger NKG2D Liganden ist allerdings durch Stress, Infektion oder Transformation induzierbar. So konnte in Zellen, die unter Stressbedingungen kultiviert wurden, ein „heat shock response element“ in den MIC Genen identifiziert werden, welches zu einer Induktion der MICA- und MICB-Transkripte führte (Groh et al., 1996). Infektionen mit Cytomegalovirus (Groh et al., 2001), *E. coli* (Tieng et al., 2002) oder mit *Mycobacterium tuberculosis* (Das et al., 2001) induzierten zudem eine Hochregulation der MIC-Gene. Normalerweise werden MICA und MICB hauptsächlich im Gastrointestinal-Epithel exprimiert (Groh et al., 1996), sie wurden aber auch in einer Reihe von Tumoren wie Lungen-, Brust-, Darm-, Nieren- und Epithel-Tumoren detektiert (Groh et al., 1999). ULBPs werden auf einer Vielzahl an normalen Geweben und einigen Tumoren exprimiert (Cosman et al., 2001). In Mäusen wurde nachgewiesen, dass das Rae-1-Gen in Folge einer Aktivierung von Toll like Rezeptoren (TLRs) auf Makrophagen (Hamerman et al., 2004) und durch Virusinfektionen (Lodoen et al., 2003) angeschaltet wird. Weiterhin konnte eine Hochregulation von murinen und humanen NKG2D-Liganden durch genotoxischen Stress oder der Inhibition der DNA-Replikation nachgewiesen werden, wodurch die DNA Reparatur-Maschinerie aktiviert wird (Gasser et al., 2005). Die stressinduzierbare Expression der NKG2D-Liganden ist eine Besonderheit, da Liganden anderer aktivierender NK Zell Rezeptoren eher konstitutiv auf vielen Geweben exprimiert werden (Pende et al., 1999; Yokoyama et al., 1991). So werden gestresste, kranke Zellen spezifisch als solche markiert. NKG2D spielt dadurch eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von Virusinfektionen und Tumoren. Eine Stimulation von NK Zellen durch NKG2D triggert die NK Zell Zytotoxizität und in einigen Fällen die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen.

Bisher wurde vermutet, dass dieser Rezeptor unter bestimmten Konditionen eine Sonderrolle zu spielen scheint. MHC Klasse I exprimierende NK Zellen sind normalerweise vor der Lyse durch NK Zellen geschützt („Missing Self-Hypothese“) (Kärre, 1985). MHC Klasse I exprimierende Tumorzellen, die mit NKG2D-Liganden transfiziert wurden und somit sowohl MHC Klasse I als auch NKG2D-Liganden auf ihrer Oberfläche exprimieren, wurden jedoch trotz der Expression der MHC Moleküle durch NK Zellen lysiert (Cerwenka et al., 2000; Cerwenka et al., 2001; Diefenbach et al., 2001). Dies führte zu der Vermutung, dass die NKG2D-vermittelten Signale unabhängig von

denen der MHC Klasse I spezifischen inhibierenden Rezeptoren seien. Eine weitere Studie zeigte hingegen, dass die Aktivierung der inhibierenden Rezeptoren sehr wohl zu einer Blockade der NKG2D-vermittelten Zytotoxizität führt (Pende et al., 2001). Die genauen Umstände und der mögliche Mechanismus der inhibierenden Rezeptoren, die NKG2D-vermittelten Signale zu blockieren, blieb weiterhin unklar.

2.2.3.2 Der 2B4 Rezeptor

Der 2B4 Rezeptor ist einer der am besten charakterisierten, aktivierenden NK Zell Rezeptoren. Dies ist dadurch bedingt, dass er, im Gegensatz zu den meisten anderen aktivierenden Rezeptoren, die nur auf Subpopulationen von NK Zellen exprimiert werden, auf allen NK Zellen detektierbar ist. Zudem ist sein Ligand CD48 bereits identifiziert, wodurch es möglich wurde, die 2B4-Signaltransduktion nicht nur nach Antikörperstimulation sondern auch nach Bindung des natürlichen Liganden zu untersuchen. Weiterhin vermittelt der 2B4-Rezeptor seine Signale direkt und benötigt kein Adapterprotein für die Signaltransduktion, was die Untersuchung dieses Oberflächenrezeptors wesentlich vereinfacht.

2B4 wurde erstmals 1993 auf Maus-Lymphozyten identifiziert, die NK Zell-ähnliche Zytotoxizität, d.h. unabhängig von MHC-Molekülen (non-MHC-restricted), vermittelten (Garni-Wagner et al., 1993). Molekulare Analysen zeigten, dass in Nagetieren, bedingt durch unterschiedliche Spleiß-Varianten, zwei unterschiedliche 2B4-Isoformen existieren (Mathew et al., 1993). Beide Isoformen unterscheiden sich in der Länge ihrer zytoplasmatischen Domäne (Schatzle et al., 1999; Stepp et al., 1999), was zu unterschiedlichen Funktionen führt. So induziert 2B4-L (Lang, engl. Long) eine inhibierende Signaltransduktion während 2B4-S (Kurz, engl. Short) eine aktivierende Funktion übernimmt (Lee et al., 2004b; Mooney et al., 2004; Schatzle et al., 1999; Vaidya et al., 2005). In Ratten wurde zusätzlich noch eine sezernierte Form von 2B4 gefunden (Kumaresan et al., 2000).

Humanes 2B4 wurde 1999 identifiziert (Kubin et al., 1999; Nakajima et al., 1999; Tangye et al., 1999). Murines und humanes 2B4 weisen eine 70%ige Homologie auf, wobei das humane 2B4 strukturell mit dem murinen 2B4-L-Molekül korrespondiert. Humanes 2B4 ist sogar fähig, murines CD48 zu erkennen und zu binden (Kubin et al., 1999). CD48 gehört zu der CD2-Familie und ist weit verbreitet im hämatopoietischen System (Brown et al., 1998; Latchman et al., 1998).

Im Menschen wird 2B4 auf allen NK Zellen, einer Subpopulation von CD8-positiven T Zellen, $\gamma\delta$ T Zellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten und auf Monozyten exprimiert (Boles et al., 2001; Munitz et al., 2005). In humanen NK Zellen induziert 2B4 sowohl die zytolytische Aktivität als auch die Zytokinsekretion. Allerdings sind hierbei unterschiedliche Signaltransduktionswege von 2B4 involviert (Chuang et al., 2001). Unter bestimmten Konditionen kann auch nur die Zytotoxizität, nicht aber die IFN- γ -Sekretion induziert werden (Rajagopalan et al., 2001). Eine 2B4-vermittelte Aktivierung von NK Zellen kann weiterhin die Expression von Metalloproteinasen (MMP) induzieren, was über den Abbau von Matrices zu einer Einwanderung von NK Zellen ins Gewebe führen kann (Chuang et al., 2000). In Mäusen wurde eine Rolle von 2B4 in der Tumorabstoßung gezeigt (Johnson et al., 2003).

2B4 kann NK Zellen direkt aktivieren oder nur als kostimulierendes Molekül fungieren. So konnte gezeigt werden, dass suboptimale Signale von Nkp46 durch gleichzeitige Aktivierung von 2B4 verstärkt werden konnten (Bryceson et al., 2006; Sivori et al., 2000). In unreifen NK Zellen scheint 2B4 sogar inhibierende Signale zu induzieren. In frühen Phasen der NK Zell Entwicklung werden aktivierende Rezeptoren vor den inhibierenden exprimiert, was eine Selbst-Toleranz der NK Zellen gefährden könnte. 2B4 wird bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt exprimiert und scheint in diesen unreifen NK Zellen zunächst inhibierende Signale zu vermitteln (Sivori et al., 2002). Eine Erklärung wäre, dass es die Rolle der inhibierenden Rezeptoren während der NK Zell Ontogenese übernimmt und somit die Selbsttoleranz der NK Zellen gewährleistet. Auch in NK Zellen aus XLP-Patienten (X-linked lymphoproliferative disease) scheint 2B4 inhibierende Signale zu induzieren (Parolini et al., 2000).

Der 2B4 Rezeptor besitzt sechs Tyrosinreste im zytoplasmatischen Teil. Vier davon sind in spezielle Signalmotive eingebettet, die als Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motifs (ITSM) (Thr-x-Tyr-x-x-Leu/Ile, x = beliebige AS) bezeichnet werden (Shlapatska et al., 2001). Durch diese wird die 2B4-Signalweiterleitung induziert. ITSM sind charakteristisch für die Mitglieder einer relativ neu definierten Rezeptorfamilie, der sog. SLAM-Related Receptors (SRR) (Bhat et al., 2005; Veillette and Latour, 2003). Der Prototyp ist der auf T Zellen exprimierte Signaling Lymphocyte Activation Motif (SLAM)-Rezeptor (CD150). Diese Gruppe von Ig-ähnlichen Rezeptoren schließt neben 2B4 und SLAM auch CD84, Ly-9 (CD229), NTB-A (Ly-108) and CRACC (CS-1, CD319) mit ein. Nach der Bindung von CD48 an 2B4 werden die Tyrosine im ITSM-Motiv phosphoryliert (Watzl et al., 2000) und Signalmoleküle wie SAP (SLAM-associated protein, SH2D1A), SHP-1, SHP-2, SHIP,

EAT-2, PI3K, 3BP2 und Csk können daran binden (Aoukaty and Tan, 2002; Eissmann et al., 2005; Li et al., 2003; Morra et al., 2001a; Parolini et al., 2000; Roncagalli et al., 2005; Tangye et al., 1999), wodurch die Vielfalt der 2B4-vermittelten Signale zu erklären sein könnte.

2.2.3.3 Die Rolle des Adapterproteins SAP für die 2B4 Signaltransduktion und XLP

Die Bindung des SAP-Moleküls ist für die Signaltransduktion von 2B4 von besonderer Bedeutung. SAP ist ein kleines intrazelluläres Src homology 2 (SH2) Domänen-haltiges Signalmolekül. Es wird in NK Zellen, T Zellen und einigen B Zellen exprimiert (Kambayashi et al., 2001; Lee et al., 2003; Veillette and Latour, 2003) und bindet ebenfalls an andere Mitglieder der SRR-Familie wie SLAM, NTB-A, Ly-9 und CD84. Nach der Bindung an die ITSM von 2B4, rekrutiert und aktiviert SAP die Src-Kinase Fyn (Chan et al., 2003; Eissmann et al., 2005) und induziert damit eine positive Signalkaskade. Die Bindung erfolgt dabei über eine ungewöhnliche Interaktion zwischen der SH2-Domäne von SAP und der SH3-Domäne von Fyn (Latour et al., 2003; Veillette and Latour, 2003). Dabei ist die Assoziation von SAP an die ITSM von 2B4 und die nachfolgende Rekrutierung von Fyn abhängig von der 2B4-Phosphorylierung.

In die 2B4-Signalkaskade sind weiterhin Vav1, PLC γ , LAT, SHIP-1/2, EAT-2 und c-Cbl involviert (Bottino et al., 2000; Chen et al., 2004; Roncagalli et al., 2005; Watzl et al., 2000), die unterschiedliche Signale transduzieren. So zeigten Transfektionsmodelle, dass SAP und die Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 nicht simultan an 2B4 binden können (Chen et al., 2004; Eissmann et al., 2005; Tangye et al., 1999), was zu der Vermutung führte, dass SAP mit den Phosphatasen um die Bindungsstelle an 2B4 konkurriert und als ein natürlicher Blocker der SH2 Domänen-haltigen Moleküle wirkt. Dies könnte erklären, warum 2B4 in der Abwesenheit von funktionellem SAP inhibierende Signale vermitteln kann, indem es nämlich die Phosphatasen bindet und somit eine negative Signalweiterleitung induziert. Bei der Bindung der unterschiedlichen Signalmoleküle scheinen die ITSM eine essentielle Rolle zu spielen. So zeigten Mutationsanalysen der 4 ITSM im zytoplasmatischen Teil von 2B4 unterschiedliche Bindungskapazitäten der verschiedenen Signalmoleküle auf (Eissmann et al., 2005). SAP kann alle vier ITSM Motive binden, während SHP-1 nur an das dritte Motiv bindet. Hier erwies sich die Bindungskapazität des SAP Moleküls als dominant gegenüber der Phosphatase (Eissmann

et al., 2005), was erklärt, warum 2B4 bei Vorhandensein von SAP aktivierende Signale vermittelt.

Die essentielle Rolle von SAP für die Signaltransduktion von 2B4 wurde deutlich in NK Zellen von Patienten mit XLP-Syndrom (X-linked lymphoproliferative disease). Diese Patienten weisen Mutationen unterschiedlichster Art im SAP Gen auf (Coffey et al., 1998; Nichols et al., 1998; Sayos et al., 1998) und leiden unter einem Immundefekt, der meistens mit einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen mit dem Epstein-Barr Virus einhergeht (Purtilo et al., 1975). 50% der Patienten entwickeln eine fatale infektiöse Mononukleose mit einer unkontrollierten T und B Zell-Proliferation, die zu Lebernekrose und Knochenmarksveränderungen führt. Weiterhin sind NK Zell und T Zellfunktion und deren Proliferation beeinflusst (Engel et al., 2003). 20% der Patienten entwickeln maligne B Zell-Lymphome. Weitere Symptome sind u.a. aplastische Anämie, Vasculitis und Dysgammaglobulinämien. Ein Patient kann mehrere Phänotypen aufweisen. 70% der XLP-Patienten sterben vor Erreichen des 10. Lebensjahres (Engel et al., 2003). Unter den bisher 50 identifizierten Mutationen zeigen sich größere oder kleinere Deletionen, Nonsense-Mutationen oder Mutationen an Spleißstellen, die zu einem Abbruch der SAP-Synthese oder zur Synthese nicht-funktioneller SAP-Moleküle führen. Manchen Patienten fehlt sogar das komplette SAP-Gen. Interessanterweise ist CD48, der Ligand für 2B4, einer der am stärksten hochregulierten Rezeptoren auf B Zellen nach einer EBV-Infektion (Fisher and Thorley-Lawson, 1991). Die Interaktion zwischen CD48 und 2B4 scheint also eine wichtige Rolle in der Kontrolle von EBV-infizierten B Zellen zu übernehmen.

NK Zellen von XLP-Patienten können nicht über 2B4 aktiviert werden (Benoit et al., 2000; Nakajima and Colonna, 2000; Tangye et al., 2000). Eine Gruppe zeigte sogar, daß 2B4 in SAP-defizienten Zellen eine Inhibition der NK Zelle induziert (Parolini et al., 2000). Da SAP aber auch noch an SLAM, NTB-A, Ly-9 und CD84 bindet, ist die Pathologie von XLP nicht alleine durch den defekten 2B4-Signaltransduktionsweg zu erklären. Vielmehr scheint eine kombinierte Dysfunktion verschiedener SRRs dabei eine Rolle zu spielen. SAP-defiziente NK Zellen sind jedoch ein gutes Modell für die Untersuchung der Rolle von SAP in der 2B4-vermittelten Signaltransduktion.

Die Expression des SAP Gens wird über eine Kombination von transkriptionalen und posttranskriptionalen Mechanismen reguliert. Bisher wurden zwei Transkriptionsfaktoren, Ets-1 und Ets-2, identifiziert. Diese binden an den Kern-Promoter von SAP, wobei sich die Ets Konsensusstelle als essentiell für die Aktivität des Basalpromoters zeigte (Okamoto et al., 2004). Während der posttranskriptionalen Regulation binden die RNA-

destabilisierenden Proteine AUF1 and HuR an die 3'UTR der SAP-mRNA, was zu einer schnellen mRNA-Degradation führt (Okamoto et al., 2004). Weiterhin ist bekannt, daß verschiedene Methylierungsmuster des SAP-Gens mit der gewebespezifischen Gentranskription korrelieren (Parolini et al., 2003).

Für die Signalweiterleitung von humanem 2B4 scheint auch das Adaptermolekül EAT-2 eine wichtige Rolle zu spielen. EAT-2 (EWS-activated transcript 2 oder auch SH2D1B) ist dem SAP-Molekül sehr ähnlich. Es ist ebenfalls ein SH2-Domänen haltiges Protein und wird in Immunzellen des angeborenen Immunsystems wie NK Zellen, CD8⁺ T Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert (Bouchon et al., 2001; Roncagalli et al., 2005; Tassi and Colonna, 2005). Wie das SAP-Molekül kann EAT-2 mit 2B4 assoziieren (Roncagalli et al., 2005; Tassi and Colonna, 2005 und unsere Beobachtung). In Mäusen führt die Bindung von EAT-2 an den 2B4-Rezeptor, im Gegensatz zu der Bindung an SAP, jedoch zu einer Inhibition der NK Zell Aktivität (Roncagalli et al., 2005). Dabei wurde sowohl die Natürliche NK Zell Zytotoxizität gegen verschiedene Zielzellen verhindert, als auch die Fähigkeit verschiedener stimulatorischer NK Zell Rezeptoren, die Zytokinproduktion zu induzieren. Die beobachtete inhibierende Funktion des 2B4 Rezeptors könnte also, neben der Bindung mit SHP-1 und-2, durch die Assoziation mit EAT-2 zu erklären sein.

2.2.4 Die Rolle der Lipid Rafts bei der Integration von positiven und negativen Signalen

Eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion von NK Zellen spielen die sog. Lipid Rafts (Davis et al., 1999; Fassett et al., 2001; Lou et al., 2000; Watzl and Long, 2003). Lipid Rafts sind Subdomänen der Plasmamembran. Der größte Teil eukaryontischer Membranen ist in einem flüssigen, ungeordneten Zustand, bedingt durch den hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren der Glycerophospholipide, die eine niedrige Schmelztemperatur bewirken. Lipid Rafts hingegen enthalten hohe Konzentrationen an Sphingolipiden wie Sphingomyelin und Glykosphingolipide, deren Fettsäureketten hoch gesättigt sind, was eine höhere Komprimierung der Säurereste erlaubt und somit zu einer Phasenseparation führt. Zudem enthalten sie hohe Konzentrationen an Cholesterol, welches über Wasserstoffbrückenbindungen an die Sphingolipide bindet und sie dadurch verdichtet, indem es die Lücken zwischen den gesättigten Hydrocarbonketten der Sphingolipide auffüllt. Dies führt zur Bildung einer Membrandomäne, die weniger fluid ist als die sie

umgebende Zellmembran (Brown and London, 2000). Lipid Rafts zeichnen sich durch ihre Unlöslichkeit gegenüber Detergenzien aus. Sie werden auch als Detergenzien-resistente Membranen (engl, Detergent-Resistant Membranes, DRM) oder als Glykolipid-angereicherte Mikrodomänen (engl, glycolipid-enriched microdomains, GEMs) bezeichnet. Durch ihre Unlöslichkeit in Detergenzien können sie über eine Dichtegradientenzentrifugation von anderen zellulären Komponenten separiert werden. Dabei werden sie in Sukrose-Gradienten in den Fraktionen niedrigerer Dichte angereichert (Simons and Ikonen, 1997).

Neben Sphingolipiden und Cholesterol enthalten Lipid Rafts eine Reihe von verschiedenen Proteinen. Dazu gehören Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine, zweifach azylierte periphere Membranproteine, Cholesterol-verknüpfte Proteine und Transmembranproteine (Brown and London, 1998). So wurden Proteintyrosinkinasen (PTKs), heterotrimere und kleine G-Proteine, Adapterproteine und Phosphoinositide (Hope and Pike, 1996; Simons and Ikonen, 1997; Zhang et al., 1998) in den Rafts detektiert. Beispiel für Raft-assoziierte, GPI-verankerte Immunrezeptoren sind der Fc-Receptor CD16 oder der 2B4-Ligand CD48.

Eine zentrale Aufgabe der Lipid Rafts ist die laterale Segregation von Proteinen innerhalb der Plasmamembran (Simons and Toomre, 2000). Sie dienen als Signalplattformen, indem sie bestimmte Komponenten der Signaltransduktion kolokalisieren und andere, wie Phosphatasen, ausschließen (Brown and London, 1998). Lipid Rafts übernehmen so eine wichtige Rolle in der Regulation von Immunzellen. Eine Vielzahl von Proteinen sind in Lipid Rafts lokalisiert, einige konstitutiv, andere nur transient. Insbesondere Proteine, die an der Aktivierung von Immunzellen beteiligt sind, wurden in diesen Membrandomänen detektiert. Dabei zeigten sich posttranslationale Modifikationen durch das Anhängen von Lipiden als wichtiges Kriterium für die Lokalisation von Proteinen in den Lipid Rafts (Zhang et al., 1998). So sind Proteine, die durch gesättigte Fettsäuren (N-Myristoylierung, S-Palmitoylierung) zweifach azyliert sind, in Raft-Domänen zu finden, während Proteine, die durch ungesättigte Fettsäuren oder Prenylgruppen modifiziert sind, ausgeschlossen werden (Brown and London, 1998; Melkonian et al., 1999). Die meisten der Src-Kinasen sind zweifach azyliert und somit Raft-assoziiert (Koegl et al., 1994; Rodgers et al., 1994; Shenoy-Scaria et al., 1993). Auch die S-Azylierung von Proteinen mit verschiedenen ungesättigten Fettsäuren scheint ein weitverbreiteter Mechanismus zu sein, durch den Zellen ihre Signaltransduktion regulieren, indem sie die Assoziation von Proteinen mit den Lipid Rafts verändern (Liang et al., 2001; Webb et al., 2000). Modifikationen wie

Palmitoylierungen erwiesen sich als labil. Der Prozess der Raft-Rekrutierung ist also reversibel. Dadurch kann die Zelle die Raft-Assoziation und somit die Signalweiterleitung kontrollieren.

Die meisten Transmembranproteine sind konstitutiv von Rafts ausgeschlossen. Eine kleine Anzahl an Transmembranproteinen hingegen ist konstitutiv in den Rafts lokalisiert. Diese sind meist S-palmitoyliert (Brown and London, 1998). Zu den konstitutiv in den Lipid Rafts lokalisierten und palmitoylierten Transmembranproteinen gehören z.B. der Linker for Activation of T cells (LAT) (Zhang et al., 1998) und die T Zell-Korezeptoren CD4 und CD8 (Arcaro et al., 2000; Parolini et al., 1999).

LAT ist ein 36-38 kD Phosphoprotein und wurde als ein in Lipid Raft-Domänen von T Zellen konstitutiv lokalisiertes Transmembranprotein detektiert (Finco et al., 1998; Zhang et al., 1998). Es spielt nicht nur eine essentielle Rolle für die T Zell Aktivierung (Finco et al., 1998), sondern ist auch in die FcR-Aktivierungskaskade in NK Zellen involviert (Jevremovic et al., 1999). In humanen NK Zellen wurde zudem gezeigt, dass 2B4 mit LAT assoziiert ist (Bottino et al., 2000; Klem et al., 2002). Experimente mit mutanten LAT-Molekülen in T-Zellen, die nicht palmitoyliert werden konnten, zeigten keine Lokalisation in den Rafts, was darauf hin deutet, dass die Palmitoylierung dieses Proteins für seine Raft-Assoziation verantwortlich ist (Zhang et al., 1998). Diese Mutanten waren auch nicht fähig, ausserhalb der Rafts Signale zu transduzieren, was die Bedeutung der Lipid Rafts in der Signaltransduktion von Zellen unterstreicht (Lin et al., 1999; Zhang et al., 1998).

Lipid Raft-Analysen einzelner Zellen demonstrierten, dass die Zusammensetzung an Proteinen und Lipiden in Rafts nicht immer gleich ist (Brown and London, 2000), was darauf hin weist, dass unterschiedliche Raft-Populationen in Zellen existieren. Dies lässt vermuten, daß Signale verschiedener Art durch die Rafts vermittelt werden. In ruhenden Zellen erscheinen Rafts als hoch dynamische submikroskopische Strukturen ($d=50\text{nm}$). Meist sind sie mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert (Harder et al., 1998; Janes et al., 1999; Simons and Toomre, 2000).

Bisher existieren zwei Modelle für die Raft-Organisation. Das erste (Modell 1) setzt voraus, dass die Proteine bereits in kleineren Raft-Einheiten lokalisiert sind und nach Kreuzvernetzung der Raft-assoziierten Signalrezeptoren akkumulieren, so dass größere und stabilere Lipid Rafts entstehen (Pralle et al., 2000; Simons and Ikonen, 1997; Simons and Toomre, 2000; Varma and Mayor, 1998). Das zweite Modell (Modell 2) nimmt an, dass sich in ruhenden Immunzellen nur wenige, konstitutiv in den Rafts lokalisierte Rezeptoren befinden. Die Ligandenbindung induziert die Akkumulation der Proteine

wodurch deren Affinität für die Lipid Rafts erhöht wird und sie in diese Membranbereiche rekrutiert werden. Mehrere Rafts klustern, wodurch es zur weiteren Akkumulation von Immunrezeptoren kommt, was zu einer Verstärkung des Signals führen kann. Das Klustern von Proteinen könnte sogar die Bildung der Lipid Rafts induzieren (Brown and London, 1998; Harder et al., 1998). So konnte in T-Zellen eine komplette Reorganisation des T Zell Rezeptors, der Adhäsionsmoleküle und der assoziierten Signalmolekülen gezeigt werden, die zur Bildung einer Immunologischen Synapse führt (Dykstra et al., 2003).

Auch für NK Zellen wurde eine Immunologische Synapse (NKIS) identifiziert, die sich an der Kontaktzone zwischen NK Zelle und potentieller Zielzelle formiert. In diese werden Adhäsionsmoleküle, Zelloberflächenrezeptoren und zytoplasmatische Signalmoleküle rekrutiert (Davis et al., 1999; Eriksson et al., 1999; Vyas et al., 2001). Dabei akkumulieren u.a. Adhäsionsmoleküle wie LFA-1, aktivierende oder inhibierende NK Zell Rezeptoren, F-Aktin, Perforin und intrazelluläre Signalmoleküle an der Kontaktzone zwischen NK und Zielzelle. Welche Moleküle sich zuletzt dort ansammeln, hängt davon ab welche Signalmoleküle die potentielle Zielzelle auf ihrer Oberfläche trägt. Sind dies Liganden für aktivierende NK Zell Rezeptoren, führt dies zur Bildung einer aktivierenden NKIS, während Liganden für die inhibierenden NK Zell Rezeptoren eine inhibierende NKIS bilden. Die Bildung einer aktivierenden Immunologischen Synapse in NK Zellen wird begleitet von einer Polarisierung der Lipid Rafts an der Kontaktzone (Fassett et al., 2001; Lou et al., 2000). Diese Raft-Reorganisation ist von Src- oder Syk-Proteintyrosinkinasen abhängig. Für die Stabilität der Lipid Rafts spielt dabei das Zytoskelett eine Rolle (Moran and Miceli, 1998). Zudem ist die Interaktion zwischen Zytoskelett und den Lipid Rafts ebenfalls abhängig von Tyrosinkinasen (Harder and Simons, 1999). Die enorme Bedeutung der Lipid Rafts für die Aktivität von NK Zellen wird am Beispiel des 2B4-Rezeptors deutlich (Abb 2.2.4):

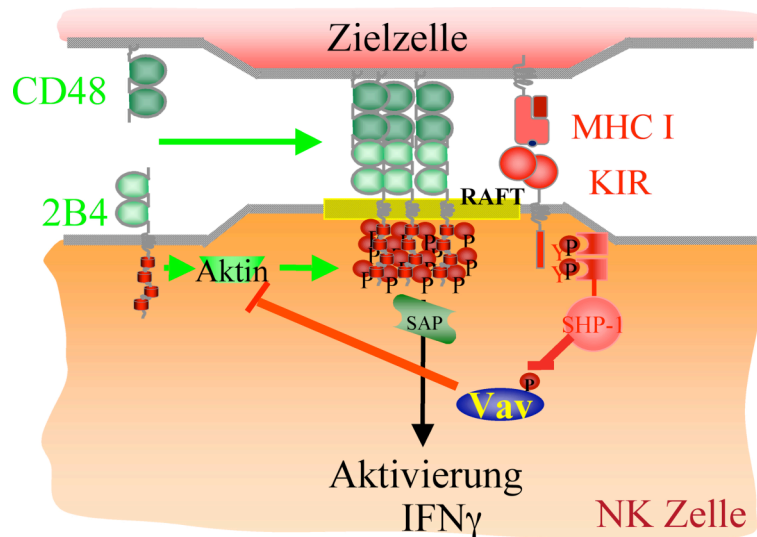


Abb. 2.2.4 KIR kontrolliert die 2B4-vermittelte NK Zell Aktivierung durch die Blockade der 2B4 Raft Rekrutierung

Die Bindung von 2B4 an seinen Liganden CD48 führt zu der Rekrutierung des Rezeptors in die Lipid Raft-Domänen. Dabei findet eine Phosphorylierung der ITSM durch Src-Kinasen statt und die Induktion einer Signalkaskade über das Adaptermolekül SAP, welche zu einer Aktivierung der NK Zelle führt (Bhat et al., 2005). Die Rekrutierung in die Lipid Rafts erfolgt dabei in Abhängigkeit des Aktin-Zytoskeletts (Watzl and Long, 2003). Für die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts werden der Guanin-Austausch Faktor Vav1 und die Rho GTPase Rac1 benötigt (Billadeau et al., 1998; Villalba et al., 2001). Phosphoryliertes und somit aktiviertes Vav1 induziert einen Austausch von GDP zu GTP bei Rac1 und führt somit zu dessen Aktivierung. Rac1 wiederum induziert eine Aktin-Reorganisation, die sowohl für die Rekrutierung des Rezeptors in die Raft-Domänen als auch für das Klustern der Rafts notwendig ist (Fassett et al., 2001; Villalba et al., 2001). In Experimenten, in denen die Lipid Rafts biochemisch zerstört wurden, war sowohl die 2B4-Phosphorylierung als auch die Funktion des Rezeptors blockiert (Watzl and Long, 2003), was die essentielle Rolle der Raft-Domänen aufzeigt.

Auch die Identifikation der Mechanismen, durch welche inhibierende Rezeptoren sowohl die 2B4 Phosphorylierung als auch die NK Zell Aktivierung kontrollieren, gaben weitere Einblicke in die essentielle Rolle der Lipid Rafts für die Aktivität des 2B4-Rezeptors (Tangye et al., 2000; Watzl et al., 2000). Die Stimulation der KIR Rezeptoren über die Bindung an MHC Klasse I-Moleküle induzierte eine Inhibition der 2B4-Phosphorylierung und -Funktion über die Blockade der Raft-Rekrutierung des Rezeptors (Watzl and Long, 2003; Watzl et al., 2000). Die Phosphatase SHP-1 spielt dabei eine essentielle Rolle

(Fassett et al., 2001; Stebbins et al., 2003). Die Stimulation der inhibierenden KIR Familie führt zu einer Tyrosin-Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne des KIR Rezeptors. Dies ermöglicht es der Phosphatase SHP-1 an die phosphorylierten KIR-Domänen zu binden, SHP-1 wird aktiviert und dephosphoryliert den Guanin-Nukleotid-Austausch Faktor Vav-1, wodurch dieser inaktiviert wird (Stebbins et al., 2003). Das kleine G-Protein Rac1 bleibt inaktiv und die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts bleibt aus, wodurch sowohl die 2B4-Raft-Rekrutierung, als auch die Akkumulation der Lipid Rafts verhindert wird (Fassett et al., 2001; Lou et al., 2000; Watzl and Long, 2003).

2.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Aktivität Natürlicher Killerzellen wird durch eine Vielzahl aktivierender und inhibierender NK Zell Oberflächenrezeptoren reguliert. Die Signaltransduktion der einzelnen Rezeptoren und die Interaktion zwischen den verschiedenen Rezeptoren untereinander sind noch weitgehend unverstanden. Eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion von NK Zellen spielen die Lipid Rafts. Die molekularen Mechanismen der Raft-Rekrutierung von Proteinen sind noch nicht vollständig verstanden. Der aktivierende 2B4-Rezeptor weist in seiner Transmembrandomäne ein ähnliches konserviertes Motiv auf wie der in den Rafts konstitutiv lokalisierte Linker for Activation of T cells (LAT). Ein Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob dieses Transmembran-Motiv für die 2B4-Raft Rekrutierung verantwortlich ist.

Das kleine Adapterprotein SAP spielt für die Funktion des 2B4-Rezeptors eine essentielle Rolle. Über die Regulation dieses intrazellulären Signalproteins existieren eine Reihe gegensätzlicher Daten im humanen und murinen System und in unterschiedlichen Zelltypen. In dieser Arbeit sollte daher die Regulation von SAP in humanen NK Zellen untersucht werden und die möglichen Auswirkungen auf die Aktivität des 2B4-Rezeptors.

Die unterschiedlichen Signale der aktivierenden und inhibierenden NK Zell Rezeptoren sind für die Aktivität der NK Zelle ausschlaggebend. Bis vor kurzem ging man davon aus, dass die negativen Signale über die positiven dominieren. Zellen sind durch die Zelloberflächenexpression von MHC Klasse I Molekülen vor einem Angriff der NK Zellen geschützt. Einige Studien lieferten jedoch Daten, die zu der Vermutung führten, dass der aktivierende NKG2D-Rezeptor die Signale der inhibierenden Rezeptoren zu übergehen schien und trotz der MHC-Klasse I Expression der Zielzellen deren Lyse durch die NK Zellen induzierte, während weitere Daten dies widerlegten. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher die Aufklärung dieses Konflikts im humanen NK Zell System und die Untersuchung der molekularen Mechanismen der inhibierenden Rezeptoren in der NKG2D-vermittelten NK Zell Aktivierung.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellkultur

Eukaryontischer Zelltyp	Kulturmedium
Humane NK Zelllinie YTS eco	IMDM, 12,5% FCS
Humane Primäre NK Zellen , isoliert von peripheren Blutlymphozyten	IMDM, 10% humanes Serum, 100U/ml IL-2
Humane, EBV-transformierte B Zelllinie 721.221 721.221-Transfektanten	IMDM, 10% FCS IMDM, 10% FCS, 800µg/ml Hygromycin oder 1,6mg/ml Geneticin
Humane NK Zelllinie NK92C1	Alpha Medium, 12,5% FCS, 12,5% Pferdeserum, Glutamin, 50µM 2-ME
Humane embryonische Nierenzelllinie 293 T	DMEM, 10% FCS
Murine prä-B Zelllinie Baf/3 Baf/3-Transfektanten	RPMI, 10% FCS, 2-ME RPMI, 10% FCS, 2-ME, 0,5µg/ml Puromycin
Humane chronisch myeloische Leukämie K562	IMDM, 10% FCS
Murine Mastozytom Zelllinie P815	IMDM, 10% FCS
Humane embryonische Nierenzelllinie Phönix amphi/eco	DMEM, 10% FCS
Murine Myelomzelllinie Ag8 Hybridomzellen nach Fusion von murinen Ag8 und B Zellen	RPMI, 10% FCS, 2-ME RPMI, 10% FCS, 2-ME

Alle Medien wurden zusätzlich mit 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin versetzt (Sigma, München, Deutschland).

3.1.2 Antikörper

Murine monoklonale Antikörper

Name	Antigen	Bezugsquelle
MOPC21 (IgG1κ)	unbekannt	Sigma, Deutschland
Anti-HA (262K,IgG1)	Hämagglutinin Epitop	Cell Signaling, Deutschland
Anti-Vav	Vav	Sigma,St.Louis,MO
Anti-Fyn	Fyn	Upstate cell signaling solutions, Charlottesville,VA, USA
Anti-SHP-1	SHP-1 (AS 492-597)	BD Transduction Labs, Deutschland
Anti-SHP-2	SHP-2 (AS 1-177)	
Anti-CD45 (Klon 69,IgG1)	CD45 (AS 535-730)	BD Transduction Labs, Deutschland
Anti-SAP (Klon 23.1.5)	SAP	Eismann et al., 2005*
Anti-2B4 (C1.7, IgGκ)	2B4	Immunotech, Frankreich
Anti-NKG2D (IgG1)	NKG2D	Ru.D Systems
Anti-NKG2D (IgG1, Klon 3.1.1.1)	NKG2D (AS 85-216)	Endt et al, 2004*
Anti-CD94 (HP3B1)	CD94	Beckmann Coulter, Frankreich
Anti-CD16 (IgG, Klon 3G8)	CD16	Beckmann Coulter, Frankreich
NKp30 (IgG1, KlonZ25)	NKp30	Beckmann Coulter, Frankreich
NKp44 (IgG1,Klon Z231112)	NKp44	Beckmann Coulter, Frankreich
NKp46 (IgG1, Klon BAB281)	NKp46	Beckmann Coulter, Frankreich
Anti-CD158a (EB6)	KIR2DL-1	Serotec, Deutschland
Anti-CD158b (190IIC311)	KIR2DL2/3	Serotec, Deutschland
Anti-CD56 (My31)	CD56	BD Transduction Labs

* Labor Dr. C. Watzl, Institut für Immunologie, Heidelberg, Deutschland

Kaninchen polyklonale Antikörper

Name	Antigen	Bezugsquelle
Anti-Aktin	C-terminales Peptid	Sigma-Aldrich, Deutschland
Anti-EAT-2	DLPYYHGRLTKQDC ETLC	Pineda Antikörperservice, Berlin
Anti-Phospho Vav	pY160	Biosource, Camarillo, CA
Anti-2B4	RLSRKELENFDVYS	Watzl et al 2000*

* Labor Dr. C. Watzl, Institut für Immunologie, Heidelberg, Deutschland

Zweit-Antikörper und direkt markierte Antikörper

Name	Antigen	Bezugsquelle
Ziege-Anti-Maus IgG, HRPO	Maus-IgG	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA
Ziege-anti-Kaninchen IgG, HRPO	Kaninchen-IgG	Santa-Cruz Biotech, Deutschland
Choleratoxin, UntereinheitB, HRPO	GM1	Sigma-Aldrich, Deutschland
Maus- IgG1, Alexa-FluorR647	Maus-IgG	Molecular Probes, Invitrogen, Deutschland
Ziege-Anti-Maus IgG, Alexa Fluor R 568	Maus-IgG	Molecular Probes, Invitrogen, Deutschland
Choleratoxin UntereinheitB Alexa Fluor R 647	GM1	Molecular Probes, Invitrogen, Deutschland

3.1.3 Bakterien

<i>E. coli</i> -Stamm	Gebrauch	Bezugsquelle
TOP10	Plasmid-Amplifikation	Invitrogen, Deutschland
BL21(DE3) pLys	Proteinexpression	Invitrogen, Deutschland

3.1.4 Konstrukte

Name	Bemerkung
pBABE-HA-2B4-Wildtyp, -CA, -LAT	2B4-Transmembran-Mutanten wurden generiert durch Mutagenese-PCR
pBABE-NKG2D	
pCDNA3-SAP	

3.1.5 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Lysepuffer für eukaryontische Zellen	150 mMol/l NaCl 20 mMol/l Tris-HCL, pH 7,4 10%(v/v) Glyzerol 0,5% (v/v) Triton X-100 2 mMol/l EDTA 10 mMol/l NaF 1mMol/l PMSF (bei Experimenten zur Proteinphosphorylierung) 1 mMol/l Na-Orthovanadate
--------------------------------------	---

Lysepuffer für Bakterien	500 mMol/l NaCl 20 mMol/l Tris-HCL, pH 8 10% (v/v) Glyzerol 1% (v/v) TritonX-100 1 mMol/l Na-Orthovanadate
85% Sukroslösung mit 0,5% TritonX-100	85g (w/v) Sukrose 0,5% (v/v) TritonX-100 Aqua bidest
DNA Probenpuffer (6x)	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol FF 30% (v/v) Glyzerol
PBS	137 mMol/l NaCl 8,1 mMol/l Na ₂ HPO ₄ 2,7 mMol/l KCL 1,5 mMol/l KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBST	1x PBS 0,05% (v/v) Tween 20
PBST/NaCl	1x PBS 0,05% (v/v) Tween 20 0,5 Mol/l NaCl
Reduzierender Probenpuffer (5x)	10% (w/v) SDS 50% (v/v) Glyzerol 25% (v/v) 2-Mercaptoethanol 0,1% (w/v) Bromphenolblau 0,312mMol/l Tris-HCL, pH 6,8

Nicht-reduzierender Probenpuffer (5x)	siehe reduzierender Probenpuffer, jedoch ohne SDS
Western Blot Transfer-Puffer	24 mMol/l Tris-HCL 129 mMol/l Glyzin 20% (v/v) Methanol
HBSS (2x)	13g/l (w/v) HEPES 16g/l (w/v) NaCl 3 mMol/l Na ₂ HPO ₄ pH 7
Blockierlösung	5% (w/v) Milchpulver in PBST
TAE (10x) Puffer	Invitrogen, Carlsbad, CA
MOPS Puffer (20x)	Invitrogen, Carlsbad, CA
FACS-Puffer	PBS (1x) 2% FCS

3.1.6 Molekulargewichtsmarker

DNA-Marker

100 bp (bp): 1,517/1,2/1,0/900/800/700/600/500/

400/300/200/100

Invitrogen, Carlsbad, CA

1kb (kb): 10,0/8,0/6,0/5,0/4,0/3,0/2,0/1,5/1/0,5

Invitrogen, Carlsbad, CA

Proteinmarker

Proteinmarker(kD): 250/150/100/75/50/37/25/

Biorad, CA

20/15/10

3.1.7 Enzyme

Name	Gebrauch	Bezugsquelle
T4 DNA Ligase	DNA Ligation	New England Biolabs, Deutschland
AMV Reverse Transkriptase	RT-PCR	Einzelstrang cDNA Synthese-Kit, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN
Fast Start Taq DNA Polymerase	PCR	Roche Diagnostics, Deutschland
Restriktionsenzyme	Schneiden von DNA	New England Biolabs, Deutschland

3.1.8 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')
h2B4Ala/R	TCT CCT CCA CAC AGC GAA GGC GGC AAG GGT GCC
H2B4Ala/F	CTT GGC ACC CTT GCC GCC TTC GCT GTG TGG AGGAG
H2B4Xho/F	GTG TGG AGG AGA AAG AGG CTC GAG AAG CAG TCA GAG ACC
HLAT/F	GAA TTC GCC ATC CTG GTC CCC TGC
HLAT/R	CTC GAG GGA GCC TGG CAG TCT GTG GC
SAP RT-PCR f	GGC AAA ATC AGC AGG GAA ACC G
SAP RT-PCR r	TTC ATG GGG CTT TCA GGC AGA C

Alle Primer wurden von Thermo Hybaid, Deutschland, geliefert

3.1.9a Molekularbiologische und biochemische Reagenzien

Agarose	Gibco, Schottland
Ampicillin	Roth, Deutschland
Antikörper-Verstärker, komplett/inkomplett	Linaris, Deutschland
BSA	Serva, Deutschland
⁵¹ Chrom	Hartmann Analytik, Deutschland
Interleukin-2	NIH, Bethesda, USA
IL-12	Ru.D Systems, Deutschland
IFN- α	Sigma-Aldrich, Deutschland
PolyI:C	Pharmacia, Peapack, NJ
Cytochalasin D	Biomol, Deutschland
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Carlsbad, CA
ProteinA-Agarose	Sigma, München, Deutschland
ProteinG-Agarose	Invitrogen Carlsbad, CA
Hygromycin	Invitrogen, Carlsbad, CA
Penicillin	Invitrogen, Carlsbad, CA
Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad, CA
Puromycin	Sigma-Aldrich, Germany
FCS	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA
Geneticin	Invitrogen, Carlsbad, CA
PBS	Invitrogen, Carlsbad, CA
Trypsin	Invitrogen, Carlsbad, CA

3.1.9b Kommerzielle Reagenziensysteme

Qiaprep Miniprep	Qiagen, Deutschland
Qiaprep Maxiprep	Qiagen, Deutschland
RNeasyKit	Qiagen, Deutschland
LSM Lymphozyten Separations-Kit	ICN Cappel, Aurora ,OH
Dynal NK Zell Negativ-Isolationskit	Dynal Biotech, Norwegen
MACS Zellisolations-Kit	Miltenyi Biotec, Deutschland
AMV Amplifikations-Kit	Roche Diagnostics, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Isolierung von Plasmid DNA

Die zur Transfektion von eukaryontischen Zellen verwendete Plasmid DNA wurde in *E.coli* transformiert. Zur Plasmidproduktion wurden 300ml Bakterienkultur in 1x LB-Medium hergestellt. Dem Kulturmedium wurde entsprechend der auf dem Plasmid kodierten Resistenz ein Antibiotikum zugesetzt (Ampicillin). Die Bakteriensuspension wurde über Nacht bei 37°C und 200 UpM geschüttelt. Die Isolierung der Plasmid DNA erfolgte mittels des Plasmid Mini oder MaxiPrep DNA-Isolations-Kits von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die Plasmid DNA wurde anschließend in 10 mM Tris Puffer aufgenommen und die Konzentration mit Hilfe eines Photometers bei 260 nm bestimmt. Anschließend wurde die Plasmid DNA zu 1µg/ml in 10 mM Tris-Puffer verdünnt und bei -20°C gelagert. Die Ausbeute lag meist zwischen 300-500 µg DNA.

3.2.1.2 Isolierung der SAP-DNA aus eukaryontischen Zellen

Zuerst wurde die gesamte RNA mittels RNeasy Kit von Qiagen aus humanen primären NK Zellen nach Angaben des Herstellers isoliert. Über RT-PCR (s.u.) erhielt man die gesamte cDNA. Das SAP-Gen wurde mittels PCR (s.u.) und spezifischer Primer amplifiziert. Das PCR Produkt wurde im Anschluß durch Agarose-Gelelektrophorese separiert, aufgereinigt und nach Angaben des Herstellers in den pCR2.1 Vektor des TOPO-Klonierungs-Kits (Invitrogen) kloniert.

3.2.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

RT-PCR der cDNA humaner NK Zellen

Nach Isolation der gesamten RNA aus humanen NK Zellen (s.o.) wurde eine RT-PCR mit 1 µg RNA mittels Reverser Transkriptase (AMV) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

PCR-Bedingungen:

25° C 10 min

42° C 60 min.

99° C 5 min.

Quantitative RT-PCR

2×10^6 Zellen wurden in 300µl MagnaPure-Lysepuffer (Roche, Deutschland) lysiert und auf -70°C weggefroren. Nach dem Auftauen wurde die mRNA entsprechend den Herstellerangaben von MagnaPure isoliert. Das Elutionsvolumen betrug 50µl. Von 8,2µl RNA wurde mittels RT-PCR entsprechend den Angaben des Einzelstrang cDNA-Synthese Kit (Roche, Deutschland) die cDNA synthetisiert. Im Anschluß erfolgte eine Anreicherung der gewünschten Gene über PCR (FastStart DNA Sybr green kit I, Roche, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben. Die RNA-Menge wurde auf die durchschnittliche Expression von den Haushaltsgenen Aktin und Cyclophilin B, normalisiert. Die Anzahl der Kopien wurde mittels einer virtuellen Standardkurve berechnet.

PCR zur Amplifikation der SAP DNA

Im Anschluss an die RT-PCR wurde eine PCR mit spezifischen Primern für das SAP-Gen mittels Taq DNA-Polymerase unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung	95°C	3 min	
Denaturierung	95°C	1 min	← 30 Zyklen
Annealing	55°C	30 sek	
Elongation	72°C	1 min	
Elongation	72°C	5 min	

Mutagenese-PCR der 2B4 Mutanten

Zur Herstellung der 2B4-Mutanten wurde eine Mutagenese-PCR mittels des QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.1.4 Agarose-Gel-Elektrophorese

Vor Beladung des Agarosegels wurde die DNA mit DNA-Probenpuffer versetzt.

Die DNA-Fragmente wurden auf einem 1% Agarosegel (+0,00001% Ethidiumbromid) in 1x TAE-Puffer bei 10 V aufgetrennt. Die korrekte Größe des DNA-Fragments wurde über eine DNA-Leiter kontrolliert.

3.2.1.5 DNA-Restriktion

1-2 µg DNA wurden mit 2 Units der entsprechenden Restriktionsendonuklease für 1h bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden laut Herstellerangaben für die entsprechenden Enzyme angesetzt. Die DNA-Fragmente wurden anschließend über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

3.2.1.6 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die gewünschten DNA-Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mittels dem Qiagen Gelextraktions-Kit nach Herstellerangaben isoliert. Die DNA wurde nach der Extraktion in 10 mM Tris Puffer aufgenommen.

3.2.1.7 Ligation von DNA

Die Vektor-DNA und das zu inserierende DNA-Fragment wurden in einem Verhältnis von 3:1 in Ligationspuffer gemischt und mit 2 Units T4-Ligase für 1h bei RT inkubiert.

3.2.1.8 Transformation von Bakterien

Die chemische Transformation von kompetenten Bakterien wurde den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt (TOPO-Klonierungs-Kit, Invitrogen). Die Bakterien wurden im Anschluß auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

3.2.1.9 Transfektion von eukaryontischen Zellen

Um Zellen zu transfizieren wurden verschiedene Transfektionsmethoden angewandt.

Kalziumphosphat-Transfektion

293 T Zellen wurden mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen ausplattiert auf 6-Lochplatten und für 24h unter Zellkulturbedingungen kultiviert. Im Anschluß wurden sie mittels Kalziumphosphat und einer DNA-Konzentration bis zu $10 \mu\text{g}$ transfiziert. Hierzu wurden $438 \mu\text{l}$ sterilem H_2O mit $61 \mu\text{l}$ 2Mol/l Kalziumchlorid-Lösung und $10 \mu\text{g}$ der DNA gemischt. $500 \mu\text{l}$ $2 \times \text{HBSS}$ wurde zu dieser Lösung dazu pipettiert und vorsichtig vermischt. Dieses Lösungsgemisch wurde danach tröpfchenweise zu den 293 T Zellen zu gegeben und die Zellen erneut für 12-24h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Medium gewechselt. Nach weiteren 24h wurden die Zellen geerntet, abzentrifugiert (1500 UpM , 5 min.) und lysiert.

Retroviraler Gentransfer

Der retrovirale Gentransfer wird über die Verpackungszelllinien Phönix amphi oder Phönix eco vermittelt. Zunächst wurden diese Zellen mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen ausplattiert und für 24h unter Zellkulturbedingungen kultiviert. Mittels Lipofektamin 2000 wurden die Zellen danach mit dem gewünschten Plasmid transfiziert. Dafür wurden zwei unterschiedliche Lösungen zunächst angesetzt: Lösung 1 beinhaltet $237,5 \mu\text{l}$ OPTI-MEM Medium und $12,5 \mu\text{l}$ Lipofektamin 2000, Lösung 2 beinhaltet $240 \mu\text{l}$ OPTI-MEM und $10 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA. Beide Lösungen wurden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, im Anschluß zusammengemischt und für weitere 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mischung wurde dann zu den Phönix-Zellen gegeben, und diese für 12 bis 18h unter Zellkulturbedingungen kultiviert. Das Phönix-Medium wurde abgesaugt, mit frischem Medium von den zu transfizierenden Zellen versetzt und die Zellen erneut für 24h inkubiert. Die Überstände wurden geerntet und zur Absonderung von Zellresten nochmals abzentrifugiert (1500 UpM , 5 min.). $0,5 \times 10^6$ der zu transfizierenden Zellen wurden in 12-Lochplatten mit dem Überstand und $5 \mu\text{g/ml}$ Polybrene resuspendiert und für 1,5h bei 2500 UpM und 30°C zentrifugiert, um die Infektionseffizienz zu steigern. Es folgte eine Inkubation über Nacht unter Zellkulturbedingungen. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, indem die nun transfizierten Zellen abzentrifugiert wurden (1500 UpM , 5 min.) und in frischem Medium resuspendiert wurden. Nach 1 Tag wurde Pyromycin ($0,5-$

2µg/ml) als Selektionsmarker zugegeben. Nach ca. 1 Woche konnten die Transfektanten für Experimente verwendet werden.

Amaxa Nukleofektion

Die Transfektion der NK Zellen mittels Amaxa Nukleofektions-Kit wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt (amaxa biosystems).

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Zellkultur

Alle verwendeten Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ unter sterilen Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage 1:3 verdünnt und mit frischem Medium neu kultiviert. FCS und Humanes Serum wurden vor Gebrauch bei 56°C für 30 min. hitzeinaktiviert.

3.2.2.2 Isolierung primärer humaner NK Zellen

Zunächst wurden periphere Blutlymphozyten (PBLs) (Monozyten, T, B und NK Zellen) durch Dichtegradientenzentrifugation von Buffy Coats gesunder Spender gewonnen. Das Blut wurde in Aliquots zu 20 ml in je 50 ml Greiner-Röhrchen mit 10 ml PBS(1x) verdünnt. Zur Dichtegradientenbildung wurde mit 15 ml Ficoll-Hypaque unterschichtet und bei 2200UpmM (Bremse und Beschleunigung 1) für 25 min. bei Raumtemperatur zentrifugiert. PBLs erscheinen als weißer Ring auf dem Ficoll-Gradienten, während Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte am Boden des Röhrchens sedimentieren. Die PBLs wurden in ein neues Greiner-Röhrchen überführt, dieses mit PBS (1x) aufgefüllt und die PBLs mit 1500UpM für 5 min. sedimentiert. Anschließend wurden sie weitere dreimal mit PBS durch Zentrifugation gewaschen, um Ficoll-Reste und Blutplättchen zu entfernen. In der Regel wurden auf diese Weise 200-400 Mio. PBLs isoliert. Humane polyklonale NK Zellen wurden im Anschluß von den PBLs entweder über den MACS-NK Zell Isolations-Kit von Myltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach, Deutschland) oder über den Isolations-Kit von Dynal Biotech (Oslo, Norwegen) entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Beide Kits basieren auf Antikörpern, die mit magnetischen Kügelchen markiert sind und gegen spezifische Zelloberflächenrezeptoren verschiedener Zelltypen gerichtet sind. Antikörper gegen NK Zell Rezeptoren sind nicht

enthalten. Werden die Zellen über einen Magneten gegeben, bleiben alle Antikörpermarkierten Zelltypen daran hängen, während die unmarkierten NK Zellen durchlaufen. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde über FACS-Analysen mit Fluoreszenz-markierten spezifischen Antikörpern gegen NK Zell, T Zell und Monozyten Oberflächenrezeptoren überprüft. Die isolierten NK Zellen waren zwischen 90% und 99% CD3⁻ und CD56⁺.

3.2.2.3 Zellyse

Zellen wurden über Zentrifugation (1500 UpM, 5 min) in 0,5% TritonX-100 Lysepuffer, versetzt mit 1 mMol/l PMSF und 1 mMol/l Na₃VO₄ resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen für 10 min auf 13000 UpM bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand geerntet.

3.2.2.4 Zellstimulation

Die NK Zellen wurden entweder mit Antikörpern stimuliert oder über Inkubation mit Zellen, die spezifische Liganden für die NK Zell Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimierten.

Antikörperstimulation

Die Zellen wurden in ihrem Medium auf Eis zunächst vorgekühlt. Im Anschluß wurden 10µg/ml entsprechender Antikörper zugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden im Folgenden mit Medium gewaschen, zentrifugiert (1500 UrM, 5 min, 4°C) und erneut in frischem Medium resuspendiert. Dann wurde entsprechender Zweitantikörper zugegeben und erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Die Stimulation erfolgte bei 37°C für x min oder sek, abhängig von dem jeweiligen Experiment. Im Anschluß wurden die Zellen für weitere 5 min. auf Eis inkubiert und danach zentrifugiert (1500 UpM, 4°C, 5 min) und lysiert.

Stimulation über Zell-Zell Kontakt

Die Zellen wurden in Medium resuspendiert und auf Eis vorgekühlt. Die Zielzellen und NK Zellen wurden gemischt, für 1 min. bei 1500 UpM bei 4°C zentrifugiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden im Anschluß bei 37° C für x min oder sek, abhängig vom Experiment, stimuliert. Danach wurden die Zellen erneut für 5 min. auf Eis inkubiert, zentrifugiert (1500 UpM, 4°C, 5 min) und lysiert.

3.2.2.5 Zytotoxizitäts-Test

Das Prinzip des Zytotoxizitäts-Test basiert darauf, dass Zellen, die von NK Zellen erkannt und lysiert werden, mit radioaktivem Chrom inkubiert werden, was diese unspezifisch internalisieren. Werden diese Zielzellen nun zu verschiedenen Mengen an NK Zellen gegeben, werden sie spezifisch lysiert und das Chrom freigesetzt. Die Radioaktivität kann dann im Zellüberstand detektiert werden. $0,5 \times 10^6$ Zielzellen, die Liganden für NK Zell Rezeptoren exprimierten, wurden in 100 μ l zelleigenem Medium mit 100 μ Ci radioaktivem 51 Chrom für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen, zentrifugiert (1500 UpM, 5 min) und in 5×10^4 Zellen/ml in Medium primärer NK Zellen (IMDM, 10% humanes Serum, Pen/Strep) resuspendiert. Die Zielzellen wurden auf einer 96-Loch-Platte in einer Konzentration von 5000 Zellen pro Vertiefung ausplattiert. Im Anschluß wurden die NK Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen dazu pipettiert. Die maximale Chrom-Freisetzung der Zielzellen wurde durch die Zugabe von 2% TritonX-100 gemessen. Für die Messung der spontanen Freisetzungsmenge an Chrom wurden die Zielzellen in Medium ohne NK Zellen inkubiert. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. Im Anschluß wurde die 96-Loch-Platte für 4h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde der Zellüberstand mittels Filtersystemen geerntet und die Chrom-Freisetzung in einem Gammastrahlen-Messgerät detektiert. Die spezifische Lyse der Zielzellen wurde in Prozent berechnet:

$$\frac{(\text{Experimentelle } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{Spontanen } ^{51}\text{Cr-Freisetzung})}{(\text{Maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{Spontanen } ^{51}\text{Cr-Freisetzung})} \times 100.$$

Die Zytotoxizität kann weiterhin über Antikörperstimulation der NK Zellen gemessen werden. Hierbei wird die murine Zelllinie P815 als Zielzelle verwendet, die durch die Expression eines Fc-Rezeptors Antikörper, die gegen bestimmte NK Zell Rezeptoren gerichtet sind, binden können. Die P815 Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD16, Nkp30, NKp44, NKp46, NKG2D und 2B4 in einer Konzentration von 0,5 μ g/ml inkubiert und aktivierten über diese spezifisch die NK Zell Rezeptoren.

Bei Verwendung von Cytochalasin D wurden die NK Zellen 30 min. bei 37°C und 5% CO₂ mit dem Inhibitor vor-inkubiert.

3.2.2.6 Entwicklung eines murinen monoklonalen Antikörpers

Für die Entwicklung muriner Antikörper wurden weibliche Balb/c-Mäuse mit 75 μ g rekombinantem HIS-markierten Protein in kompletter Antikörperverstärkungs-Lösung (ABM) immunisiert. Die erste Immunisierung wurde subkutan durchgeführt, während die

folgenden Injektionen intraperitoneal an Tag 21, 35 und 49 erfolgten. Die Immunisierung ab Tag 35 wurde mit inkomplettem ABM durchgeführt. An Tag 63 wurde der Antikörpertiter mittels ELISA bestimmt. Normales Maus-Serum diente als Kontrolle. An Tag 67 wurde eine letzte Immunisierung mit 50µg Antigen in PBS zur Auffrischung durchgeführt und 3 Tage später wurde die Maus getötet. Die Milz wurde präpariert und die Zellen isoliert, dreimal gewaschen in DPBS und mit 4×10^7 gewaschenen Ag8-Zellen gemischt. Die Zellmischung wurde durch Zentrifugation (1500 UpM, 5min.) pelletiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen für 1 min. auf 37°C inkubiert. 1 ml vorgewärmtes PEG1500 wurde langsam zu den Zellen gegeben und die Zellen erneut 1 min auf 37°C inkubiert. 10 ml vorgewärmtes DPBS wurden tröpfchenweise, innerhalb von 5 min. zu den Zellen gegeben. 50 ml HAT-Medium wurde addiert und die Zellen wurden auf fünf 96-Lochplatten ausplattiert (100µl/Vertiefung). 1 Woche später wurden zu den Zellen jeweils noch 100µl/Vertiefung HAT-Medium zugegeben. Eine weitere Woche später wurden die Überstände auf sezernierte Antikörper mittels ELISA hin getestet. Positive Klone wurden subkloniert, erneut getestet und wieder subkloniert. Dieser Vorgang wiederholte sich so lange, bis ein monoklonales Hybridom selektiert werden konnte (Klon 3.1.1.1).

Dieser Klon wurde in großen Mengen kultiviert. Der monoklonale Antikörper wurde im Anschluß vom Zellüberstand über ProteinA-Säulen unter hohen Salzkonzentrationen aufgereinigt. Dabei wurden die Zellkulturüberstände auf 3,3 Mol/l NaCl eingestellt und 1/10 Volumen einer 1Mol/l Natriumborat-Lösung (pH 8,9) dazu gegeben. Dieser Überstand wurde dann über eine Protein A-Säule gegeben. Die Säule wurde zunächst mit einem 3 Mol/l NaCl, 50mMol/l Na-Borat pH 8,9-Puffer gewaschen und im Anschluß mit einem 3 Mol/l NaCl, 10 mMol/l Na-Borat pH8,9-Puffer. Der Antikörper wurde über Glyzin-Lösung (100mMol/l pH 3) eluiert. Es folgte eine Dialyse gegen 1x PBS und die Konzentration wurde auf 1mg/ml eingestellt. Der Antikörper wurde mit 50% Glycerol versetzt, aliquotiert und bei -20°C gespeichert.

3.2.3 Protein-Biochemie

3.2.3.1 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

96-Lochplatten wurden mit 50 µl einer 0,5µg/ml Lösung des jeweiligen Antikörpers in 1xPBS inkubiert. Die Platte wurde mit Parafilm eingepackt, um der Verdunstung vorzubeugen und für 24h bei 4°C inkubiert. Die Vertiefungen wurden dreimal gewaschen

mit jeweils 200µl PBST und inkubiert mit 50µl der zu untersuchenden Proteinlösung (z.B. Hybridomüberstand) für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Vertiefungen wurden erneut gewaschen und jeweils 50µl einer 1:2000 Verdünnung des HRP-gekoppelten Zweitantikörpers in PBST zugegeben und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem erneuten Waschen wurden pro Vertiefung jeweils 50µl frisch angesetzte OPD-Lösung zugegeben. OPD wurde entsprechend den Herstellerangaben angesetzt. Nach Verfärbung der Lösung in den Vertiefungen wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 50µl 3 Mol/l H₂SO₄ abgestoppt. Die Absorption wurde anschließend im ELISA-Meßgerät bei 490 nm detektiert.

3.2.3.2 Immunpräzipitation

Je 2µg IgG1-Kontrollantikörper und spezifische Antikörper wurden an rekombinante ProteinG-Agarose in PBS gekoppelt und für 1h bei 4°C auf Zellysate nacheinander gegeben. Die Proben wurden dreimal in eiskaltem Lysepuffer gewaschen, die Agarosekügelchen wurden getrocknet und bei -20°C eingefroren oder direkt in 20 µl 5xRSB 5 min bei 95°C gekocht und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Im Anschluß erfolgte eine Western-Blot Analyse.

3.2.3.3 Lipid Raft-Isolation

100x10⁶ Zellen wurden in 1 ml TNE-Lysepuffer mit 0,5% Triton X-100 für 20 min auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden mit 10 langsamen Stößen in einem Dounce Homogenisator homogenisiert und anschließend mit 1 ml 85% Sukroslösung in TNE versetzt. Die Proben wurden in ein Ultrazentrifugenröhrchen transferriert und mit 6 ml 35%iger Sukroslösung in TNE und 3,5 ml 5%iger Sukroslösung überschichtet. Die Proben wurden bei 200,000 g für 16h bei 4°C in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Im Anschluß wurden 1ml-Fractionen abgenommen (oberste Schicht ist Fraktion1) und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

3.2.3.4 Produktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Das NKG2D-Konstrukt wurde als HIS-NKG2D Protein in E.coli BL21 Star (DE) entsprechend den Herstellerangaben exprimiert. Die Bakterien wurden pelletiert und in eiskaltem Bakterien-Lysepuffer für 20 min. auf Eis lysiert. Die Lysate wurden für 2x30 sek. sonifiziert, abzentrifugiert und mit 50% Nickel-Kügelchen in PBS für 1h bei 4°C inkubiert. Die Kügelchen wurden durch Zentrifugation isoliert und mehrmals mit

Waschpuffer (50mMol/l Na₂HPO₄, 300 mMol/l NaCl, 20mMol/l Imidazol und 0,05% Tween-20 pH 8) gewaschen. Im Anschluß erfolgte die Elution des Proteins von den Nickel-Kügelchen mittels Elutionspuffer (50mMol/l Na₂HPO₄, 300 mMol/l NaCl, 250mMol/l Imidazol, 0,05% Tween-20 pH8). Dabei wurden mehrere 1 ml-Fractionen gesammelt und die Konzentration des eluierten Proteins über SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft. Die Protein-enthaltenden Fraktionen wurden kombiniert und gegen 1xPBS dialysiert. Die Protein-Konzentration wurde mittels Photometer bei 280nm bestimmt und anschließend auf 1mg/ml eingestellt. Die Stock-Lösung wurde auf -20°C eingefroren oder auf 4°C aufbewahrt.

3.2.3.5 Coomassie-Färbung

SDS-Gele wurden 3x für 5 min. mit de-ionisiertem H₂O gewaschen, anschließend 1h mit SimplyBlue Safe-Lösung (Invitrogen, Carlsbad, CA) auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde es erneut mehrmals mit H₂O gewaschen bis Banden deutlich sichtbar wurden und getrocknet.

3.2.3.6 SDS-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zu den Proben wurde 5x reduzierender Probenpuffer (RSB) gegeben, für 5 min. bei 95°C aufgeköcht, abzentrifugiert und auf einem NuPAGE Gel (Invitrogen, Carlsbad, CA) in 1x MOPS-Puffer aufgetrennt.

3.2.3.7 Western-Blot

Die Proteine auf dem SDS-Gel wurden im Anschluß auf eine Polyvinyliden-Difluorid (PVDF) Membran (Millipore, Bedford, MA) für 1,5h bei 200 mA in 1x Transferpuffer transferriert. Die PVDF-Membran musste zunächst über Methanol aktiviert werden und mehrmals mit PBST gewaschen werden. Nach dem Western-Blot wurde die Membran für 1h bei Raumtemperatur in Blockierlösung (5%ige Milchlösung) gelegt. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem Erst-Antikörper inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran dreimal für 10 min. mit PBST/NaCl gewaschen und mit einem HRPO-markierten Zweitantikörper für 1-3h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Zweitantikörper wurde 1:20000 in 2,5% Milchlösung in PBST/NaCl frisch angesetzt. Nach dieser Inkubation wurde die Membran erneut dreimal für 10 min. mit PBST/NaCl gewaschen und mit Super Signal West Pico oder Dura-Lösung entwickelt.

4. Ergebnisse

4.1 Die Rolle der Transmembranregion des 2B4 Rezeptors für die Rekrutierung in die Lipid Raft-Domänen

Lipid Rafts spielen eine wichtige Rolle in der NK Zell Aktivierung und Inhibition (Fassett et al., 2001; Lou et al., 2000; Watzl and Long, 2003). Sie dienen als Signalplattformen, indem sie bestimmte Komponenten der Signaltransduktion kolokalisieren und andere, wie Phosphatasen, ausschließen. Einige zytoplasmatische Proteine sind konstitutiv in Rafts lokalisiert, andere werden erst nach der Bindung ihrer Liganden in die Raft-Domänen rekrutiert. Proteine können auf drei verschiedenen Wegen mit Lipid Rafts assoziiert sein: Über die Bindung über GPI-Anker, über Azylierungen oder über nicht-kovalente Assoziationen mit anderen residenten Proteinen (Melkonian et al., 1999). Posttranslationale Modifikationen erwiesen sich als entscheidendes Merkmal, ob ein Protein von den Raft-Domänen ausgeschlossen wird, ob es konstitutiv in den Lipid Rafts lokalisiert ist oder ob es die Möglichkeit hat, in diese Membranbereiche rekrutiert zu werden (Zhang et al., 1998). Die meisten der in den Lipid Rafts konstitutiv lokalisierten Proteine erwiesen sich als S-palmitoyliert (Brown and London, 1998). Dazu gehört auch der Linker for Activation of T cells (LAT) (Zhang et al., 1998).

Die Palmitoylierung von LAT wird durch zwei konservierte Cysteinreste (C26 und C29) in der Juxtamembranregion des Proteins ermöglicht. Bei vielen Integralproteinen und membranassoziierten Proteinen, die ebenfalls in Lipid Rafts detektiert wurden, erwiesen sich solche Cysteinreste als Stellen für posttranslationale Palmitoylierungen. Hierzu gehören z.B. die α -Untereinheit vieler G-Proteine, Ras oder Proteintyrosinkinasen der Src-Kinasen Lck und Fyn (Alland et al., 1994; Shenoy-Scaria et al., 1994; Zhang et al., 1998). Mutationsanalysen mit mutanten LAT-Molekülen zeigten, dass diese zwei Cysteinreste sowohl für die Palmitoylierung von LAT als auch für dessen konstitutive Lokalisation in den Lipid Rafts essentiell sind (Zhang et al., 1998). So waren die mutanten LAT-Moleküle in T Zellen, die nicht palmitoyliert werden konnten, einerseits nicht mehr in den Raft-Domänen detektierbar und zudem nicht fähig, ausserhalb der Rafts Signale zu transduzieren, was die Bedeutung der Lipid Rafts in der Signaltransduktion von Zellen unterstreicht (Lin et al., 1999; Zhang et al., 1998).

Für den aktivierenden 2B4 Rezeptor wurde gezeigt, dass er nach Bindung seines Liganden in die Lipid Rafts rekrutiert wird und somit in diesen Membranbereichen nur transient

lokalisiert ist. Werden Lipid Rafts biochemisch zerstört, sind sowohl die Phosphorylierung als auch die Funktion von 2B4 blockiert, was darauf hinweist, dass die Raft Rekrutierung essentiell für die Aktivität von 2B4 ist (Watzl and Long, 2003). Die molekulare Basis für die Assoziation von phosphoryliertem 2B4 mit den Lipid Rafts ist weiterhin unbekannt. Interessanterweise enthalten sowohl murines als auch humanes 2B4 ein konserviertes Cystein-Motiv (Cys-Phe-Cys) am zytoplasmatischen Ende der Transmembrandomäne, was dem Motiv des LAT-Moleküls sehr ähnlich ist. In Maus-2B4 scheint dieses Cystein-Motif für die Raft-Rekrutierung wichtig zu sein (Klem et al., 2002). Daher sollte untersucht werden, ob dieser Teil der 2B4-Transmembranregion auch eine Rolle bei der Rekrutierung des humanen 2B4-Rezeptors in die Lipid Rafts spielt. Hierzu wurden verschiedene 2B4-Moleküle mit veränderten Transmembrandomänen mittels einer Mutagenese-PCR kreiert (Abb 4.1.1). So wurden bei der “CA-Mutante” die zwei Cysteinreste gegen zwei Alanin-Reste ausgetauscht, während bei der “LAT-Mutante” der gesamte 2B4-Transmembranbereich gegen den des LAT-Moleküls ausgetauscht wurde. Sowohl die mutierten Konstrukte (“CA” und “LAT”) als auch der Wildtyp (“WT”) wurden zudem mit einem HA-tag versehen, um sie in späteren Analysen detektieren zu können und sie von den endogenen 2B4-Molekülen, die auf den NK Zellen exprimiert werden, unterscheiden zu können.

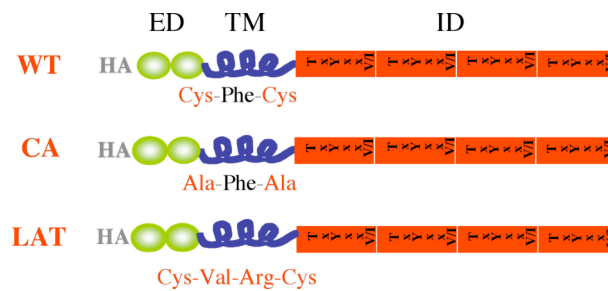


Abb 4.1.1 2B4 Transmembran-Mutanten

Wt (Wildtyp, Cys-Phe-Cys), CA (Aminosäureaustausch Alanin gegen Cystein im 2B4 Transmembranbereich, Ala-Phe-Ala), LAT (Austausch der gesamten 2B4 Transmembranregion gegen die des Linker for Activation of T cells (LAT), Cys-Val-Arg-Cys), HA (Hämagglutinin-tag), ED (Extrazelluläre Domäne), TM (Transmembranregion), ID (Intrazelluläre Domäne)

Die 2B4-Moleküle wurden in den pBABE-Vektor kloniert und es wurde versucht, diese über das retrovirale Phönix-System stabil in die NK Zelllinie YTS eco zu transfizieren. Sowohl NK Zelllinien als auch primäre NK Zellen erwiesen sich bisher als resistent gegenüber konventionellen Transfektionsmethoden. So konnten, abhängig von der NK

Zelllinie, bisher nur eine Transfektionseffizienz von 5-20 % erreicht werden (Nagashima et al., 1998; Tam et al., 1999; Tarazona et al., 2002; Trompeter et al., 2003). Auch bei der Transfektion der YTS eco Zellen mittels retroviralem Gentransfer blieb ein Großteil der Zellen untransfiziert und starben nach Zugabe des Selektionsmarkers Puromycin. Einige wenige Zellen konnten unter Puromycin-Selektion kultiviert werden. Die transfizierten Zellen wurden mittels FACS-Analyse auf die Expression der 2B4-Mutanten überprüft (Abb 4.1.2A). Zu Beginn waren zwischen 40-80% positiv. Allerdings stellte sich heraus, dass die Transfektanten trotz der Selektion über Puromycin, die Expression über die Zeit verloren. Die Transfektanten wurden mehrmals mittels FACS sortiert, trotzdem war es nicht möglich, die Expression zu erhalten. In einigen Fällen reichte jedoch die Zellmenge aus, die Transfektanten in einem Zytotoxizitäts-Tests auf ihre Fähigkeit zu testen, Antikörper-beladene Zielzellen (P815) zu lysieren (Abb 4.1.2B). P815 Zellen zeichnen sich durch die Expression eines Fc-Rezeptors aus, welcher Antikörper binden kann. Dadurch wird eine Aktivierung der NK Zellen über spezifische Oberflächenrezeptoren ermöglicht. Gibt man zu diesen Zellen Antikörper, die gegen NK Zell Rezeptoren gerichtet sind, kann man somit die NK Zellen über spezifische Rezeptoren aktivieren.

Die P815 Zellen wurden mit Antikörpern gegen HA inkubiert und aktivierten über diese spezifisch die HA-markierten 2B4-Mutanten. Als Negativkontrolle dienten ein anti-IgG-Antikörper. Die Lyse war sehr schlecht, zudem konnte kein Unterschied in der Lyse der Zielzellen zwischen den unterschiedlichen Mutanten detektiert werden. Dies könnte auf den Zustand der YTS-Mutanten zurückzuführen sein.

Im Folgenden wurde die humane B-Zelllinie 721.221 als Zielzelle verwendet (Abb 4.1.2C). Diese exprimiert den natürlichen Liganden für 2B4, CD48, und weitere NK Zell Liganden auf ihrer Oberfläche und dient somit als gute Zielzelllinie. Das Experiment ergab eine Lyse von 45% unter Verwendung von untransfizierten YTS-Zellen. Die transfizierten YTS-Zellen hingegen zeigten per se eine schlechtere Lyse der Zielzellen. Es konnten keine Unterschiede zwischen 2B4-CA und 2B4-LAT detektiert werden, YTS transfiziert mit 2B4-wt zeigten sogar die schlechteste Lysekapazität. Die schlechtere Lysekapazität der transfizierten YTS Zellen weist darauf hin, dass die Transfektion der YTS-Zellen die Funktion dieser NK Zelllinie beeinflusst. Zudem scheint das CxC-Motiv in der Transmembrandomäne des 2B4-Moleküls keinen Einfluss auf die Funktion des Rezeptors auszuüben, da es keine Unterschiede in der Lyse der Zielzellen zwischen der YTS-LAT und der YTS-CA Mutante zu geben scheint.

Zur weiteren Überprüfung dieser Vermutung sollten biochemische Analysen durchgeführt werden, die die 2B4 Raft-Rekrutierung der mutanten Moleküle sowie deren Phosphorylierungsstatus klären sollten. Hierzu wurden allerdings große Zellmengen an Transfektanten benötigt. Da die transfizierten 2B4-Konstrukte nicht stabil exprimiert wurden, konnten diese Untersuchungen nicht durchgeführt werden. Im Folgenden wurde eine damals neu publizierte Transfektionsmethode für Natürliche Killerzellen ausprobiert (Maasho et al., 2004). Diese basiert auf einer speziellen Elektroporationsmethode, die sich aus einer Kombination aus optimalen elektrischen Parametern und spezifischen Nucleofector™-Lösungen zusammensetzt. Hierzu wurden sowohl NKL Zellen als auch primäre humane NK Zellen verwendet. NKL-Zellen stammen von einer CD3⁻, CD16⁺, CD56⁺ Großen Granulozyten-Leukämie ab und zeichnen sich dadurch aus, dass sie den Charakter von NK Zellen unter allen NK Zelllinien am besten bewahrt haben. Die Morphologie dieser Zellen ähnelt denen von normalen, aktivierten NK Zellen und sie weisen eine vergleichbare Proliferation sowie eine vergleichbare Natürliche Zytotoxizität auf. Aber auch diese Transfektionsmethode erwies sich als ineffizient. Aufgrund der zahlreichen oben genannten Probleme scheiterte dieses Projekt.

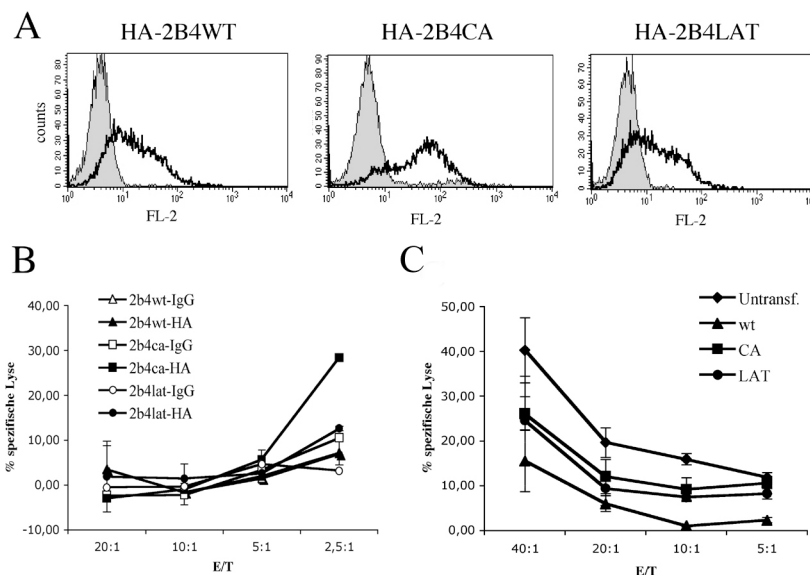


Abb. 4.1.2 Zytotoxizitäts-Test der 2B4-Mutanten

(A) YTS-Zellen wurden mit den 2B4-Mutanten transfiziert und mittels FACS-Analyse und einem anti-HA Antikörper auf die Oberflächenexpression von HA-2B4 getestet. Als Kontrolle diente IgG1.
 (B) Die YTS-Transfektanten wurden in einem Zytotoxizitäts-Test gegen P815 Zellen unter Verwendung von anti-HA oder IgG-Kontroll-Antikörper in verschiedenen Verhältnissen von NK zu Zielzelle (E/T) auf ihre Funktionalität untersucht. 2B4wt (2B4Wildtyp), 2B4CA (Aminosäureaustausch Alanin gegen Cystein im 2B4 Transmembranbereich), 2B4LAT (Austausch der gesamten 2B4 Transmembranregion gegen die des Linker for Activation of T cells (LAT))
 (C) Untransfizierte und die in (A) verwendeten YTS-Transfektanten wurden in einem Zytotoxizitäts-Test gegen 721.221 Zellen in verschiedenen Verhältnissen von NK zu Zielzelle (E/T) auf ihre Funktionalität untersucht.

4.2 Die Regulation der SAP Expression führt zu einer Modulation der 2B4-vermittelten NK Zell Aktivität

4.2.1 Die Stimulation humaner NK Zellen mit IL-2 führt zu einer Hochregulation der SAP-Genexpression

Es existieren eine ganze Reihe an gegensätzlichen Daten über die Expression des SAP-Moleküls. Studien in Mäusen zeigten, dass eine Infektion mit MCMV (Maus Cytomegalovirus) oder LCMV (Lymphozytischen Choriomeningitis Virus) zu einer Hochregulation der SAP mRNA in Splenozyten führt (Sayos et al., 2000). Für isolierte Maus T Zellen scheint das Gegenteil zuzutreffen. Eine Anti-CD3 Stimulation dieser Zellen resultierte in einer verringerten SAP Expression und somit verminderten Protein-Menge (Wu et al., 2000a; Okamoto et al., 2004). Widersprüchliche Daten existieren bei der Regulation von SAP in humanen T Zellen. Während zwei Publikationen eine Hochregulation von SAP (Nagy et al., 2000; Shinozaki et al., 2002) beschreiben, zeigt eine weitere Arbeitsgruppe eine Runterregulation des SAP-Proteins nach der Aktivierung der T Zellen (Dupre et al., 2005).

Die Expression des SAP Gens wird durch eine Kombination von transkriptionalen und posttranskriptionalen Mechanismen reguliert. Über die Regulation des SAP Gens in humanen NK Zellen gab es bisher keine Studien. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Expression des SAP Gens nach der Aktivierung von humanen NK Zellen ebenfalls beeinflusst wird. Hierzu wurden primäre NK Zellen isoliert und mit IL-2 kultiviert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und durch quantitative RT-PCR auf die SAP mRNA analysiert (Abb. 4.2.1A). Während die SAP-Expression in unstimulierten humanen NK Zellen eher niedrig war (4 Transkripte SAP mRNA verglichen zu 102 Transkripten Fyn mRNA und 41 Transkripten LAT mRNA), konnte nach 24h IL-2 Stimulation eine starke Hochregulation der SAP mRNA beobachtet werden. Nach einer Woche wurde das Maximum der SAP Expression erreicht. Im Vergleich dazu konnte keine verstärkte Expression der Signalmoleküle Fyn und LAT detektiert werden.

Im Folgenden wurde untersucht, ob dieser Effekt auch auf der Protein-Ebene nachzuweisen ist (Abb. 4.2.1B). Dazu wurde die SAP Protein Expression von frisch isolierten oder IL-2 stimulierten NK Zellen durch Immunblotten des gesamten Zelllysates mit einem monoklonalen anti-SAP Antikörper (Eissmann et al., 2005) detektiert. In frisch isolierten NK Zellen konnte, analog zu den RT-PCR Daten, nur wenig SAP Protein

detektiert werden. Die IL-2 Stimulation führte sogar zunächst zu einem Ausfall der SAP Expression während der ersten 24 h. Danach stieg die Menge an SAP über 5 Tage stetig an. Interessanterweise schien sich die Größe der SAP Bande über den untersuchten Zeitraum zu verändern. In unstimulierten NK Zellen zeichnete sich eine Bande mit niedrigerem Molekulargewicht ab, in IL-2 stimulierten NK Zellen wies SAP eine Bande mit höherem Molekulargewicht auf.

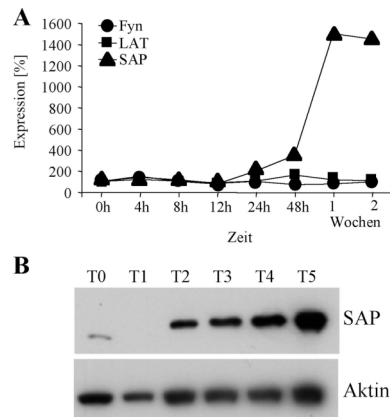


Abb. 4.2.1 Die Stimulation humaner NK Zellen mit IL-2 führt zu einer Hochregulation der SAP-Genexpression

Primäre humane NK Zellen wurden in 100 U/ml rekombinatem IL-2 für die beschriebenen Zeiten kultiviert. (A) Die Zellen wurden nach den entsprechenden IL-2 Kultivierungszeiten geerntet und die Expression der mRNA von SAP, Fyn und LAT mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die Expression wurde dabei auf zwei „Haushaltsgene“ normalisiert. Die Expression von SAP, Fyn und LAT in ruhenden NK Zellen wurde auf 100 % gesetzt. (B) Um zu bestimmen, ob die Hochregulation der SAP-mRNA auch auf der Proteinebene detektierbar ist, wurden primäre NK Zellen frisch isoliert (Tag 0, T0) und bis zum Tag 5 mit 100 U/ml IL-2 stimuliert (Tag 1-5, T1-T5). Die Expression des SAP Proteins wurde mittels Western Blot Analysen der Zellysate (je $0,5 \times 10^6$ Zellen) mit einem monoklonalen anti-SAP Antikörper analysiert. Als Kontrolle für eine gleiche Beladung des SDS-Gels wurde Aktin mittels eines anti-Aktin Antikörpers detektiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für (A) 3 und für (B) 5 voneinander unabhängige Experimente.

4.2.2 Verschiedene Varianten des SAP-Proteins sowie eine unterschiedliche Genexpression von SAP und EAT-2

Der in Abb. 4.2.1B beobachtete Banden-Shift des SAP Proteins wurde durch NK Zellen von anderen Spendern bestätigt (Abb 4.2.2). Die Stimulation mit IL-2 für 24 h induzierte hier eine Doppelbande des SAP Proteins. Nach 48 h IL-2 Stimulation verschob sich die Doppelbande zu der bereits beobachteten Bande höheren Molekulargewichts (Abb 4.2.2 A). Dies lässt vermuten, dass die IL-2 Stimulation in humanen NK Zellen nicht nur zu

einer Hochregulation der SAP Proteinexpression führt, sondern auch zu der Expression eines SAP Proteins mit einem höherem Molekulargewicht.

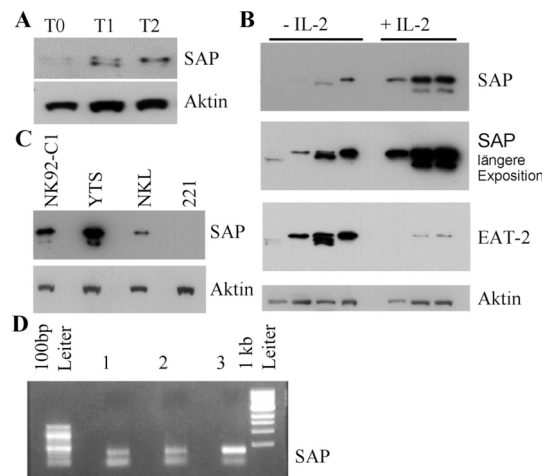


Abb 4.2.2 Verschiedene Varianten des SAP-Proteins sowie eine unterschiedliche Genexpression von SAP und EAT-2

Die SAP Protein Expression wurde von frisch isolierten (Tag 0, T0) oder IL-2- (100 U/ml) stimulierten NK Zellen (Tag 1-2, T1-2) mittels Western Blot Analyse der Zellysate mit einem monoklonalen anti-SAP-Antikörper detektiert. (B) Frisch isolierte (-IL-2) oder IL-2 stimulierte (+IL-2) primäre NK Zellen von verschiedenen Blutspendern wurden auf die verschiedenen SAP-Expressionsmuster mittels Western Blot analysiert. Die Zellysate wurden zudem auf die Expression von EAT-2 und, als Kontrolle, auf Aktin analysiert. (C) Verschiedene NK Zelllinien und die B Zelllinie 721.221 als Negativkontrolle wurden auf die SAP Expression mittels Western Blot analysiert. (D) Die komplette mRNA von SAP wurde sowohl aus ruhenden (1+2: Spender 1 und 2) als auch aus IL-2 stimulierten (3:Spender 1) humanen NK Zellen isoliert und die unterschiedlichen SAP Expressionsmuster mittels PCR Analysen der SAP cDNA untersucht. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Um diese Beobachtung zu verifizieren, wurde eine Analyse der SAP Protein Expression in NK Zellen vor und nach der IL-2 Stimulation von vier verschiedenen Blutspendern durchgeführt. In allen Spendern wurde in unstimulierten NK Zellen nur geringe Mengen an SAP exprimiert während die IL-2 Stimulation zu einem Anstieg der SAP Expression führte (Abb 4.2.2 B). Interessanterweise unterscheidet sich das Molekulargewicht von SAP selbst unter den unstimulierten NK Zellen der verschiedenen Spender. In allen Fällen ist jedoch immer eine Verschiebung zu der Bande höheren Molekulargewichts nach IL-2 Zugabe zu beobachten. In den meisten Fällen ist auch die untere Bande, die das SAP Protein mit niedrigerem Molekulargewicht repräsentiert, detektierbar. Dieses Muster der SAP Proteinexpression wurde auch in unterschiedlichen humanen NK Zelllinien wie NK92, YTS oder NKL beobachtet (Abb 4.2.2 C).

Das mit SAP nahe verwandte Adaptermolekül EAT-2 kann ebenfalls mit dem 2B4 Rezeptor in NK Zellen assoziieren (Roncagalli et al., 2005; Tassi and Colonna, 2005 und

unsere unpublizierten Daten). In Mäusen wurde es als ein Protein identifiziert, was nach Bindung an den 2B4 Rezeptor eine Inhibition der NK Zell Aktivität induziert (Roncagalli et al., 2005).

Um die Rolle von EAT-2 in der 2B4 vermittelten NK Zell Zytotoxizität zu untersuchen, wurde parallel zur Untersuchung der SAP-Regulation auch die Regulation von EAT-2 überprüft (Abb 4.2.2 B). Bemerkenswert hierbei ist die Beobachtung, dass in ruhenden, unstimulierten NK Zellen, im Gegensatz zu der niedrigen SAP Expression, eine hohe EAT-2 Expressionsrate detektierbar ist; in IL-2 stimulierten NK Zellen hingegen ist die EAT-2 Expression stark reduziert während die SAP Expression hochreguliert wurde (Abb 4.2.2B). Dies lässt darauf schließen, dass SAP und EAT-2 nach einer IL-2 Stimulation der humanen NK Zellen unterschiedlich reguliert werden. Die Existenz der beiden SAP-Varianten mit unterschiedlichem Molekulargewicht könnten entweder durch die Expression verschiedener SAP mRNA-Isoformen herrühren oder durch posttranslationale Modifikationen zustande kommen.

Um dies herauszufinden wurde zunächst die komplette cDNA von SAP sowohl aus ruhenden als auch aus IL-2 stimulierten humanen NK Zellen isoliert. PCR Analysen des SAP Gens zeigten das selbe Bandenmuster wie die Western Blot Analysen mit einer Bande höheren Molekulargewichts und einer Bande niedrigeren Molekulargewichts (Abb 4.2.2 D). Es waren keine Unterschiede im Bandenmuster zwischen stimulierten und unstimulierten NK Zellen zu verzeichnen; interessanterweise zeichnete sich jedoch die Bande höheren Molekulargewichts der stimulierten NK Zellen durch eine verstärkte Bandenintensität aus. Dieses Bandenmuster entspricht dem Muster der Proteinbanden. Es war jedoch nicht möglich, Sequenzinformationen zu erhalten, so dass nicht geklärt werden konnte, ob es sich um unterschiedliche Spleißvarianten handelt.

4.2.3 2B4 assoziiert mit beiden SAP-Varianten

Die verschiedenen Expressionsmuster des SAP Proteins könnten auch durch posttranslationale Modifikationen zustande kommen. Um dies herauszufinden, wurden SAP-negative 293 T Zellen transient mit der cDNA von SAP transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und die SAP Expression durch Immunblotten mit dem monoklonalen SAP Antikörper detektiert. Auch in den 293 T Zellen wurden beide Formen des SAP Proteins exprimiert (Abb 4.2.3A). Dies lässt darauf schließen, dass die verschiedenen

Expressionsmuster des SAP Proteins durch posttranslationale Modifikationen zustande kommen.

Nach der Rezeptorphosphorylierung wird SAP an die Mitglieder der SRRs rekrutiert.

Um herauszufinden, ob beide SAP-Varianten fähig sind, an den 2B4 Rezeptor zu binden, wurden im Folgenden 293 T Zellen sowohl mit SAP als auch mit 2B4 kotransfiziert. Western-Blot Analysen zeigten, dass das Expressionsmuster des 2B4-assoziierten SAP Proteins dem Expressionsmuster aus den Zell Lysaten humaner NK Zellen entspricht (Abb 4.2.3B), wodurch gezeigt werden konnte, dass beide SAP-Varianten mit 2B4 assoziieren können.

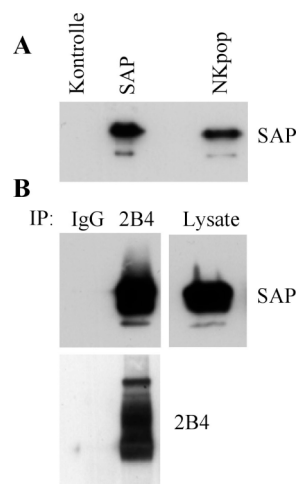


Abb. 4.2.3 2B4 assoziiert mit beiden SAP-Varianten

293 T Zellen wurden mit einem SAP-Expressionsplasmid (SAP) oder einem leeren Plasmid (Kontrolle) transfiziert. Die Zellysate wurden mittels Western Blot mit einem monoklonalen anti-SAP Antikörper analysiert und mit dem Zellysate von IL-2 (100 U/ml) stimulierten humanen NK Zellen (NKpop) verglichen. (B) 293 T Zellen wurden mit 2B4 und SAP transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und mit einem IgG-Kontrollantikörper (IgG) oder einem Antikörper gegen 2B4 immunpräzipitiert (2B4). Die Ko-Immunpräzipitation von SAP und die SAP Expression in Zellysaten wurde mittels Western Blot Analyse mit einem monoklonalen anti-SAP Antikörper detektiert. Die Immunpräzipitation von 2B4 wurde mittels Western Blot Analyse mit einem anti-2B4 Antikörper kontrolliert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

4.2.4 Eine Stimulation über IL-12, IFN- α und polyI:C führt zu einer Verstärkung der SAP-Expression in humanen NK Zellen

Die Funktion und Aktivität der NK Zellen wird durch eine Vielzahl an unterschiedlichen Zytokinen wie z.B. IL-2, IL-12 und IL-15 reguliert. NK Zellen können weiterhin durch TypI-Interferone wie IFN- α stimuliert werden, welches hauptsächlich von dendritischen Zellen nach einer viralen Infektion produziert wird (Cella et al., 2000). Die Oberflächenexpression von Toll like Rezeptoren wie TLR3 induzieren zudem über die Bindung von polyI:C eine Verstärkung der NK Zell Zytotoxizität und Zytokinproduktion (Cella et al., 2000; Schmidt et al., 2004).

Um herauszufinden, ob weitere Stimuli außer IL-2 die Expression des SAP Proteins in humanen NK Zellen beeinflussen können, wurde eine Analyse der SAP Expression nach Kultivierung primärer humaner NK Zellen in Medium mit IL-12, IFN- α oder polyI:C durchgeführt (Abb 4.2.4). Primäre NK Zellen überleben nur kurze Zeit in Medium ohne IL-2. Aufgründdessen wurden die frisch isolierten NK Zellen mit niedrigen Konzentrationen an IL-2 (10U/ml) alleine oder zusammen mit IL-12, IFN- α oder polyI:C über mehrere Tage kultiviert. Die SAP Expression wurde erneut durch Western Blot Analysen detektiert. Hierbei zeigte sich, dass selbst geringe Mengen an IL-2 bereits einen nachweislichen Anstieg der SAP-Expression induzieren (Abb 4.2.4). Die zusätzliche Kultivierung mit IL-12, IFN- α oder polyI:C bewirkte einen starken Anstieg der SAP Expression, verglichen mit der Expression unter IL-2 Stimulation alleine. Interessanterweise führte die Kostimulation mit IL-12 und IFN- α oder die Aktivierung des TLR3 nicht nur zu einer Erhöhung der exprimierten SAP Protein-Menge proportional zur Zeit, sondern verhinderte auch den beobachteten transienten Verlust des SAP Proteins 24h nach der IL-2 Stimulation (Abb 4.2.4 B, C, D linke Seite). Dies wird auch deutlich unter Betrachtung der densitometrischen Analysen (Abb 4.2.4 B, C, D rechte Seite).

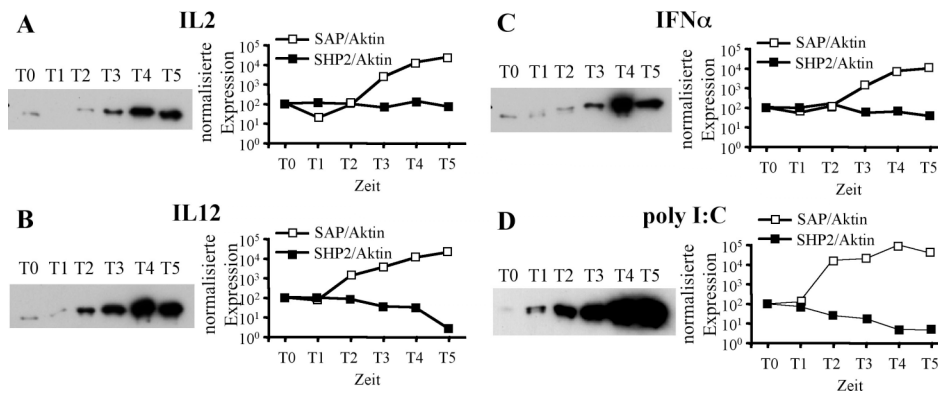


Abb 4.2.4 Die Stimulation über IL-12, IFN- α und polyI:C führt zu einer Verstärkung der SAP-Expression in humanen NK Zellen

Frisch isolierte, humane NK Zellen wurden entweder mit IL-2 allein (10 U/ml) (A) oder zusammen mit IL-12 (1 ng/ml) (B), IFN- α (1000 U/ml) (C) oder polyI:C (50 mg/ml) (D) für die beschriebenen Zeiten stimuliert. Links: Die Zellen wurden nach den verschiedenen Kultivierungszeiten (Tag0-Tag5, T0-T5) geerntet und die SAP-Expression mittels Western Blot Analyse mit einem monoklonalen anti-SAP Antikörper detektiert. Rechts: Die Menge an SAP und SHP-2 Protein wurde über densitometrische Analysen der Western Blots bestimmt. Die Expression wurde auf Aktin normalisiert. Die Proteinmengen von unstimulierten primären NK Zellen wurden auf 100% gesetzt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

4.2.5 Die Regulation der SAP Expression führt zu einer Modulation der 2B4-vermittelten NK Zell Aktivität

SAP spielt für die Signaltransduktion des 2B4 Rezeptors eine essentielle Rolle. Sowohl die 2B4-vermittelte Proteintyrosinphosphorylierung als auch die 2B4-vermittelte NK Zell Zytotoxizität sind abhängig von der Expression des SAP Proteins und dessen Rekrutierung der Src-Kinase Fyn (Chan et al., 2003; Latour et al., 2003). NK Zellen von XLP Patienten sind nicht in der Lage, über den 2B4-Rezeptor aktiviert zu werden (Benoit et al., 2000; Nakajima and Colonna, 2000; Tangye et al., 2000). Eine Arbeitsgruppe demonstrierte sogar, dass 2B4 im Falle einer SAP-Defizienz inhibierende Signale vermittelt und damit die NK Zell Aktivierung verhindert (Parolini et al., 2000). Die Hochregulation der SAP-Expressionslevel nach Stimulation der NK Zellen leitete zu der Fragestellung über, wie diese unterschiedlichen SAP-Level die Aktivität des 2B4-Rezeptors und somit die 2B4-vermittelte NK Zell-Aktivität beeinflussen. Zunächst wurde erneut die SAP Expression von frisch isolierten NK Zellen verschiedener Blutspender detektiert (Abb 4.2.5 A).

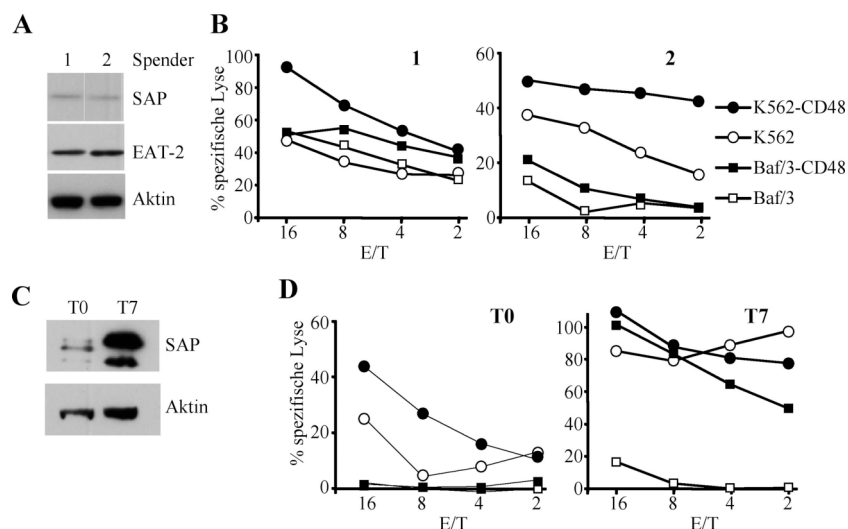


Abb 4.2.5 Die Regulation der SAP Expression führt zu einer Modulation der 2B4-vermittelten NK Zell Aktivität

(A) In frisch isolierten, humanen NK Zellen von 2 verschiedenen Blutspendern (1-2) wurde die Expression von SAP, EAT-2 und Aktin mittels Western Blot Analysen detektiert. (B) die NK Zellen aus (A) wurden auf ihre zytolytische Aktivität gegen CD48-transfizierte oder untransfizierte Baf/3 und K562 Zellen in einem Zytotoxizitätstest getestet. (C) Die Expression von SAP und Aktin wurde in frisch isolierten (Tag 0, T0) humanen NK Zellen oder in Zellen, die 7 Tage lang mit IL-2 (100 U/ml) stimuliert wurden (Tag7, T7) mittels Western Blot Analyse detektiert. (D) Um herauszufinden, ob die SAP-Hochregulation einen funktionellen Effekt auf die 2B4-vermittelte NK Zell Aktivität hat, wurden die NK Zellen aus (C) auf ihre Zytotoxizität gegen CD48-transfizierte oder untransfizierte Baf/3 und K562 Zellen in einem Zytotoxizitätstest getestet. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 2 (A, B) und 3 (C, D) unabhängige Experimente.

Um herauszufinden, ob diese niedrigen Mengen an exprimiertem SAP in diesen Zellen Konsequenzen für die 2B4-vermittelte NK Zell Zytotoxizität haben, wurde die 2B4-Funktion in diesen unstimulierten primären NK Zellen in einem Zytotoxizitätstest untersucht. Für die physiologische Stimulation des 2B4 Rezeptors wurden Baf/3 als Zielzellen genutzt, die mit dem natürlichen Liganden von 2B4, CD48, transfiziert sind. Die unstimulierten NK Zellen zeigten keine oder nur geringe Unterschiede zwischen der Lyse der CD48-transfizierten Baf/3 und der Lyse der untransfizierten Baf/3 Zellen (Abb 4.2.5 B). Untransfizierte Baf/3 Zellen werden durch humane NK Zellen kaum lysiert. Dies erschwert es, festzustellen, ob eine 2B4-Aktivierung in NK Zellen mit niedriger SAP Expression zu einer Inhibition der NK Zell Zytotoxizität führt. Deshalb wurden im Folgenden K562 Zellen als Zielzellen genutzt, die bekanntlich gut von NK Zellen lysiert werden, da sie Liganden für mehrere aktivierende NK Zell Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren. Diese Zielzellen wurden ebenfalls mit CD48 transfiziert.

Die unstimulierten NK Zellen, die wenig SAP exprimierten, zeigten bereits eine erhöhte Lysekapazität der CD48-transfizierten K562 Zellen im Vergleich zu den untransfizierten K562 (Abb 4.2.5 B), was daraufhin deutet, dass der 2B4-Rezeptor die NK Zell Zytotoxizität sogar schon mit sehr gering vorhandenen SAP-Mengen verstärken kann. Eine

Inhibition der NK Zell Zytotoxizität durch die Aktivierung von 2B4 in unstimulierten NK Zellen wurde nicht detektiert, selbst in NK Zellen mit geringen oder nicht-detektierbaren Mengen an SAP. Weiterhin konnte eine klare Korrelation zwischen den exprimierten SAP-Mengen in ruhenden und IL-2 aktivierten NK Zellen und der Aktivität des 2B4 Rezeptors festgestellt werden (Abb 4.2.5 C-D). Wie zuvor bereits gezeigt, wurden weder die Baf/3 noch die Baf/3-CD48 Zellen von den unstimulierten NK Zellen lysiert. Allerdings kann man eine verstärkte Lyse der K562-CD48 Zellen beobachten. Die starke Hochregulation des SAP Proteins nach einer Woche IL-2 Stimulation führte zu einer eindeutigen 2B4-vermittelten Lyse der Baf/3-CD48 Zellen (Abb 4.2.5 C-D). Dies impliziert, dass hohe Mengen an SAP Protein gebraucht werden, damit NK Zellen über die Aktivität des 2B4-Rezeptors alleine stimuliert werden. Sowohl die K562 als auch die K562-CD48 Zellen wurden beide maximal durch die IL-2 aktivierten NK Zellen lysiert (Abb 4.2.5 D). Dies führt zu der Annahme, dass die Stimulation von anderen aktivierenden NK Zell Rezeptoren durch die Liganden, die auf der Oberfläche der K562 Zellen exprimiert werden, ausreichen, um eine optimale NK Zell Aktivierung zu induzieren.

Diese Daten demonstrieren eine klare Korrelation zwischen der Menge an exprimiertem SAP Protein und der Aktivität des 2B4-Rezeptors. Selbst geringe Mengen an SAP sind für 2B4 ausreichend, um die durch andere aktivierende Rezeptoren vermittelte NK Zell Aktivierung zu verstärken, wie es bei den K562 Zellen demonstriert wurde. Trotzdem werden größere Mengen des SAP-Proteins benötigt, um die NK Zelle zur Lyse der Baf/3 Zellen zu aktivieren, welche keine bekannten Liganden für andere aktivierende NK Zell Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren.

4.3. Inhibierende Rezeptoren verhindern die NKG2D-vermittelte NK Zell Aktivierung über die Blockade der NKG2D-Raft Rekrutierung

4.3.1 Die Rolle der Lipid Rafts in der NK Zell Aktivität

4.3.1.1 Die Signalweiterleitung aktivierender NK Zell Rezeptoren ist abhängig von Lipid Rafts

Lipid Rafts spielen für die Aktivierung von NK Zellen eine essentielle Rolle. Treffen NK Zelle und potentielle Zielzelle aufeinander, kommt es durch die Polarisierung von Adhäsionsmolekülen, Oberflächenrezeptoren und zytoplasmatischen Signalmolekülen zur Bildung einer Immunologischen Synapse (Davis et al., 1999; Eriksson et al., 1999; Vyas et al., 2001). Bei der inhibierenden Immunologischen Synapse sammeln sich inhibierende Rezeptoren an während bei der aktivierenden Immunologischen Synapse aktivierende Rezeptoren rekrutiert werden. Die Bildung der NK Zell Immunologischen Synapse (NKIS) wird begleitet von einer Polarisierung der Lipid Rafts (Fassett et al., 2001; Lou et al., 2000). Werden Lipid Rafts biochemisch zerstört, führt dies zu einer Inhibition der NK Zell Zytotoxizität (Lou et al., 2000). Der Prozess der NK Zell Aktivierung und die Rolle der Lipid Rafts für die einzelnen aktivierenden NK Zell Rezeptoren ist noch nicht vollständig verstanden. Für den aktivierenden Rezeptor 2B4 wurde gezeigt, dass er nach Ligandenbindung in die Lipid Rafts rekrutiert wird und dass diese Raft Rekrutierung essentiell für die Aktivität des 2B4 Rezeptors ist (Watzl and Long, 2003).

Um zu untersuchen ob Lipid Rafts auch für die Funktion anderer aktivierender NK Zell Rezeptoren von Bedeutung sind, wurden primäre NK Zellen 10 min. bei 37°C mit 10 mM Methylcyclodextran behandelt, welches zu einer Cholesteroldepletion und somit einer Instabilität und Zerstörung der Lipid Rafts führt (Abb. 4.3.1.1). Im Anschluß wurde die NK Zell Zytotoxizität in einem Zytotoxizitäts-Test untersucht. Hierbei wurden P815 Zellen als Zielzellen verwendet. Die P815 Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD16, Nkp30, NKp44 und NKp46 inkubiert und aktivierten über diese spezifisch die NK Zell Rezeptoren. Die Analysen zeigen eine eindeutige Abhängigkeit der Rezeptoren von den Lipid Rafts. Dies weist darauf hin, dass aktivierende NK Zell Rezeptoren generell Lipid Rafts für die Signaltransduktion nutzen. Als Kontrolle dienten MCD-behandelte NK Zellen, die über Nacht in normalem Medium kultiviert wurden, um zu zeigen, dass diese Zellen nicht durch die MCD-Behandlung irreversibel beeinträchtigt wurden und dadurch keine NK Zell Aktivität zu verzeichnen war. Diese zeigten wieder die volle Lysekapazität.

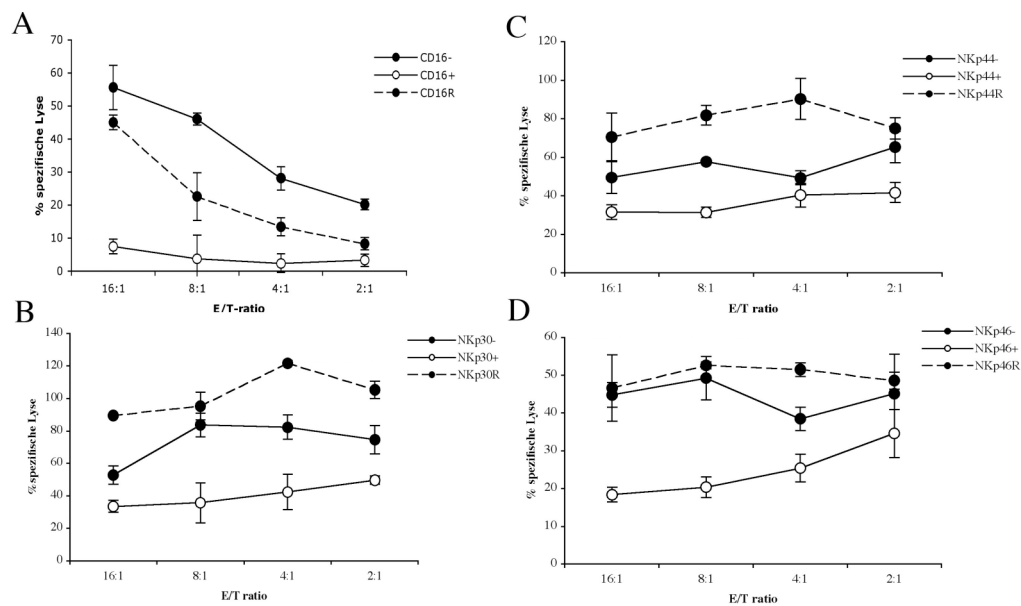


Abb. 4.3.1.1 Die Signalweiterleitung aktivierender NK Zell Rezeptoren ist abhängig von Lipid Rafts

Polyklonale humane NK Zellen wurden 10 min bei 37°C mit 10 mM MCD (+) behandelt oder unbehandelt gelassen (-) und in einem Zytotoxizitäts-Test gegen P815 Zielzellen, unter Verwendung von anti-CD16 (A), anti-NKp30 (B), -44 (C), oder -46 (D) Antikörper in verschiedenen Verhältnissen von NK zu Zielzelle (E/T) getestet. Als Kontrolle dienen MCD-behandelte NK Zellen, die über Nacht in normalem Medium kultiviert wurden (R).

4.3.1.2 Herstellung eines monoklonalen NKG2D Antikörpers

Im Folgenden sollte die Rolle der Lipid Rafts in der Aktivierung des humanen NKG2D Rezeptors untersucht werden. Dieser aktivierende NK Zell Rezeptor schien von besonderer Bedeutung zu sein, da vermutet wurde, dass er die Signale der inhibierenden Rezeptoren übergehen kann (Bauer et al., 1999; Cerwenka et al., 2001). Es gab jedoch auch klare Hinweise, dass die Aktivierung von NKG2D durch inhibierende Rezeptoren verhindert werden kann (Pende et al., 2001). Um die Funktionsweise dieses Rezeptors besser zu charakterisieren, wurden die molekularen Mechanismen der NKG2D-Aktivierung näher untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass kein kommerzieller anti-NKG2D Antikörper in der Western Blot Analyse funktionierte. Daher wurde zunächst ein monoklonaler Antikörper gegen diesen NK Zell-Oberflächenrezeptor kreiert. Hierzu wurde der extrazelluläre Teil des humanen NKG2D Rezeptors mittels PCR amplifiziert, mit einem HIS-Tag versehen und in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert. Das exprimierte Protein wurde über Nickel beads aufgereinigt und Mäuse in regelmässigen Abständen

immunisiert (siehe auch 3.2.3.4 und 3.2.2.6). Dabei werden B-Zellen zur Produktion von Antikörpern stimuliert, die spezifisch gegen das applizierte Antigen, die extrazelluläre Domäne des humanen NKG2D-Proteins, gerichtet sind. Drei Tage nach der letzten Immunisierung befinden sich besonders viele stimulierte B-Zellen in der Milz. Da diese B-Zellen jedoch in der Zellkultur nicht proliferieren und nach relativ kurzer Zeit absterben, werden sie zunächst durch eine Fusion mit Myelomzellen immortalisiert. Durch die Fusion beider Zelltypen entstehen Hybridomzellen. Für die Selektion macht man sich zunutze, dass den Myelomzellen das Enzym **Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase** (HGPRT) fehlt. Normalerweise synthetisieren Zellen ihre Nukleotide aus kleineren Vorstufen, wofür sie Folsäure als Coenzym benötigen. Aminopterin ist ein Folsäure-Antagonist und blockiert diesen Syntheseweg. Normale, gesunde Zellen verfügen jedoch zusätzlich über das Enzym HGPRT, mittels dessen sie Purine aus Hypoxanthin, einem Purinvorläufer, bilden können. Gibt man ihnen zusätzlich Thymidin, können sie auch unter Aminopterin-Einwirkung durch die Verwertung dieser unmittelbaren Vorläufer ihre Nukleinsäure-Synthese aufrechterhalten (salvage-pathway). HGPRT-defekte Zellen, wie die Myelomzellen, überleben unter Aminopterin-Einfluss nicht; sie können jedoch durch die Fusion mit einer HGPRT-positiven Zelle überleben. Trotz des Aminopterin-Blocks vermögen die Hybridomzellen DNA zu produzieren. Sie können also proliferieren, während die Myelomzellen absterben. Diese HAT-(Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin) Selektion ermöglicht die Selektion der Hybridomzellen. Nach 2-3 Wochen wurden die Zellüberstände mittels ELISA auf die Produktion von relevanten Antikörpern getestet.

Um zu verhindern, dass positive Hybridomzellen von Zellen überwachsen werden, die die Fähigkeit zur Antikörperproduktion verloren haben, müssen die Zellen kloniert werden. Dazu wurden Zellen suspendiert und in starker Verdünnung in Mikrotiter-Platten ausgesät. Diese wurden erneut im ELISA getestet. Von den positiven Kulturen wurden jene ausgewertet, die den höchsten Antikörpertiter produzierten. Die Subklonierung und Überprüfung im ELISA wurde einige Male wiederholt um sicherzustellen, dass nicht einzelne Zellen instabil geworden sind und den interessanten Klon überwachsen. Dieser Vorgang wiederholte sich so lange, bis ein monoklonales Hybridom selektiert werden konnte (Klon 3.1.1.1). Dieser Klon wurde in großen Mengen kultiviert und der Antikörper anschließend aufgereinigt, wie in Abschnitt 3.2.2.6 erklärt.

NKG2D ist ein Transmembranprotein von ca. 42 kDa. Western Blot Analysen von Lysaten der humanen NK Zelllinie NKL (Abb 4.3.1.2 A) und primärer NK Zellen zeigten unter nicht-reduzierenden Bedingungen mehrere Banden. Die Bande mit ca. 42 kD repräsentiert

dabei das NKG2D-Monomer. Die zwei Banden in Höhe von ca. 75 und 84 kD könnten die NKG2D-Dimere darstellen, die unterschiedlich glykolysiert wurden, während die oberste Bande mit ca. 168 kD wahrscheinlich das Quartär kennzeichnet. Unter reduzierenden Bedingungen hingegen konnte eine klare Bande in der Größe des Monomers in Höhe von ca. 42 kD detektiert werden (Abb 4.3.1.2 B). Als Kontrolle diente die NKG2D-negative B-Zelllinie 721.221. Zukünftige Western Blot Analysen von NKG2D wurden im Folgenden immer unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt.

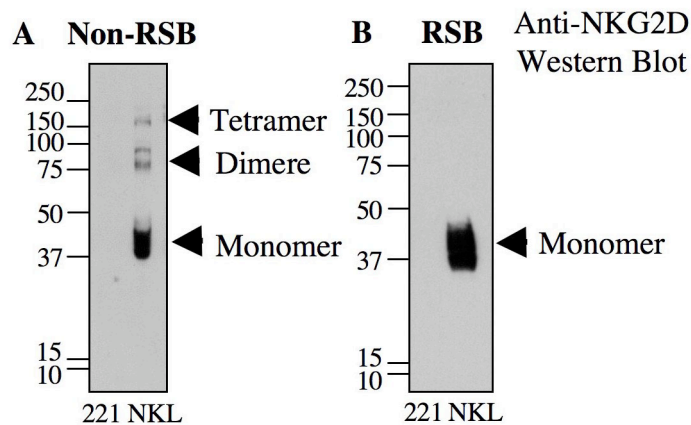
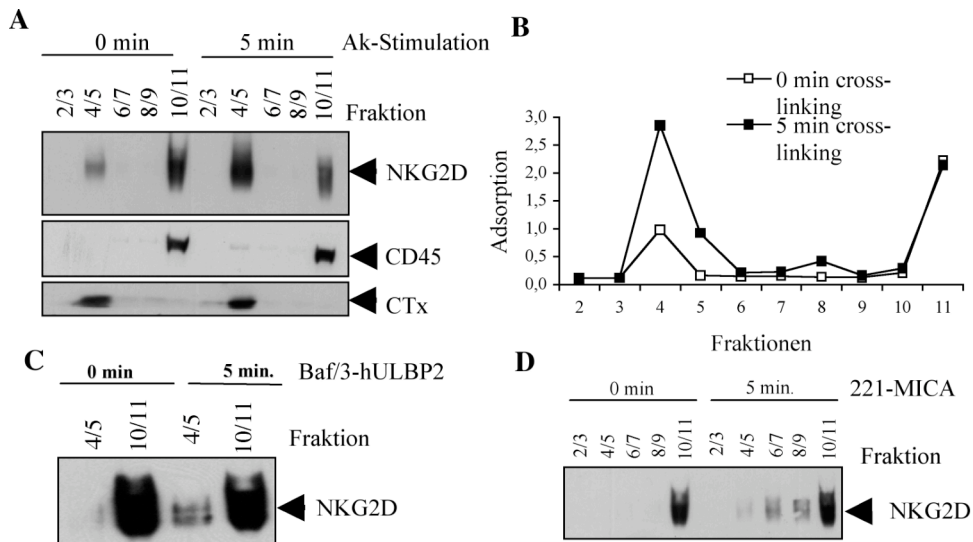


Abb 4.3.1.2 Charakterisierung eines monoklonalen anti-NKG2D Antikörpers

(A) Je $0,5 \times 10^6$ von NKL Zellen und von der NKG2D-neg.Zelllinie 721.221 als Kontrolle wurden lysiert, in nicht-reduzierendem Puffer (Non-RSB) aufgekocht, mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit dem neu synthetisierten anti-NKG2D Antikörper (mAb 3.1.1.1) gefärbt. Die unterste Bande stellt mit ca. 42 kD das NKG2D Monomer dar, die mittleren Banden mit ca. 75 und 84 kD die NKG2D-Dimere, die unterschiedlich glykosyliert wurden, und die oberste Bande mit ca. 120 kD das Tetramer dar. (B) Je $0,5 \times 10^6$ von NKL Zellen und von 771.221 Zellen wurden lysiert, in reduzierendem Puffer (RSB) aufgekocht, mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit dem neu synthetisierten anti-NKG2D Antikörper gefärbt. Unter reduzierenden Bedingungen ist nur das Monomer zu detektieren.

4.3.1.3 Die Aktivierung des NKG2D Rezeptors über eine Antikörper-Kreuzvernetzung oder die Bindung seines natürlichen Liganden induzieren eine Rekrutierung von NKG2D in die Lipid Raft-Domänen

Nach der erfolgreichen Herstellung des monoklonalen anti-NKG2D Antikörpers wurde zunächst untersucht, ob Lipid Rafts auch in der Signalweiterleitung des NKG2D Rezeptors involviert sind. Hierzu wurden die DRM-Fractionen (engl. Detergent resistant cell membranes) mittels einer Sukrose-Gradienten Zentrifugation isoliert. Zur Detektion der Lipid Rafts werden generell große Zellmengen benötigt. Aus diesem Grund wurde für diese Experimente die NKG2D-positive NK Zelllinie NKL genutzt (Abb 4.3.1.3).



4.3.1.3 Die Aktivierung des NKG2D Rezeptors über eine Antikörper-Kreuzvernetzung oder die Bindung seines natürlichen Liganden induzieren eine Rekrutierung von NKG2D in die Lipid Raft-Domänen

(A) NKL Zellen wurden mit einem anti-NKG2D Antikörper (10µg/ml, RuD Systems) stimuliert, mit einem Zweitantikörper für 5 min. bei 37°C kreuzvernetzt, anschließend in 0,5% Triton X-100 Lysepuffer lysiert und die DRM-Fraktionen durch Sukrosegradienten-Zentrifugation isoliert. Benachbarte Fraktionen wurden kombiniert und durch Western Blot-Analysen unter Verwendung von anti-NKG2D Ak (mAb3.1.1.1) (oben), anti-CD45 Ak (Mitte) oder HRP-konjugiertem Cholera toxin B-Untereinheit (CTxB, unten) analysiert. CD45 ist ein Marker für die lösliche Fraktion (10/11), während CTx die DRM-Fraktionen (4/5) markiert. (B) NKL Zellen wurden mit einem anti-NKG2D Antikörper (10µg/ml, RuD Systems) stimuliert und anschließend kreuzvernetzt mit einem Mix aus unmarkiertem und HRP-konjugiertem Zweitantikörper für 0 und 5 min auf 37°C. Nach der DRM-Isolation wurden die einzelnen Fraktionen auf ihre Präsenz an HRP-Aktivität durch ELISA analysiert. (C)+(D) NKL Zellen und Baf/3-hULBP2 (C) oder 721.221-MICA (D) transfizierte Zellen wurden entweder separat (0 min.) oder für 5 min. (5 min.) bei 37°C gemischt. Nach der Lyse der Zellen wurden die DRM isoliert, benachbarte Fraktionen kombiniert und durch Western Blot-Analysen wie in (A) analysiert.

Die Zellen wurden mit einem anti-NKG2D Antikörper für 5 min. bei 37°C inkubiert, mit einem Zweitantikörper kreuzvernetzt, anschließend in 0,5% Triton X-100 lysiert und auf einen Sukrose-Gradienten geladen. Im Folgenden wurden 1ml-Fraktionen des Gradienten geerntet und ein Teil auf ein SDS-Gel geladen. Die anschließende Western Blot Analyse mit dem anti-NKG2D Antikörper (mAb 3.1.1.1) zeigte, dass die Stimulation von NKG2D über die Kreuzvernetzung durch den anti-NKG2D Antikörper (5 min.) in eine Rekrutierung von NKG2D in die Lipid Raft-Domänen resultierte (Abb 4.3.1.3A). Unstimulierte Zellen hingegen (0 min.) zeigten im Vergleich nur eine sehr geringe Menge an NKG2D in den Raft-Fraktionen. Dies könnte auf eine Vorstimulation der NKL Zellen zurückzuführen sein. Die DRM-Fraktionen werden durch Cholera toxin B (CTxB) nachgewiesen. Dieses bindet das Transmembranprotein GM1, welches konstitutiv in den

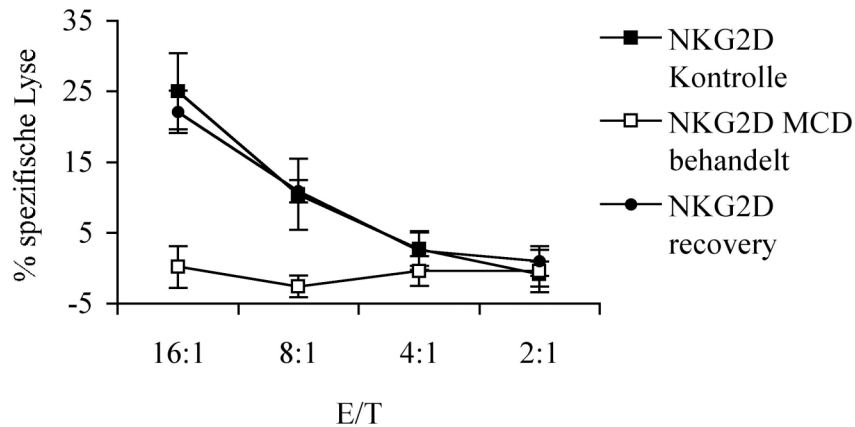
Rafts lokalisiert ist (Schon and Freire, 1989). Aufgrund ihrer Dichte sammeln sich Lipid Rafts in der 4. und 5. Fraktion des Sukrose-Gradienten an. Als Kontrolle diente das Transmembranprotein CD45, welches nachweislich nicht in Lipid Rafts rekrutiert wird und somit die löslichen Fraktionen 10 und 11 markiert.

Pipettierte man zu den Zellen zusätzlich einen Peroxidase-gekoppelten Zweit-Antikörper, konnten die geernteten Fraktionen des Sukrose-Gradienten zusätzlich durch ELISA auf die NKG2D-Raft-Rekrutierung hin analysiert werden (Abb 4.3.1.3 B). Stimulierte Zellen verzeichneten in der 4. Fraktion einen eindeutigen Peak, während in der Raft-Fraktion der unstimulierten Zellen ein wesentlich kleinerer Peak zu detektieren war. Diese Daten bestätigen die Western Blot Analysen.

Die Raft-Rekrutierung von NKG2D konnte ebenfalls nach Bindung des Rezeptors an seinen natürlichen Liganden MICA oder ULBP2 beobachtet werden (Abb 4.3.1.3). Hierbei wurden die NKL Zellen mit ULBP2-transfizierten Baf/3-Zellen (Abb 4.3.1.3 C) oder MICA-transfizierten 721.221 Zellen (Abb 4.3.1.3 D) gemischt, lysiert und ebenfalls auf einen Sukrose-Gradienten aufgetragen. Auch hier zeigten die Western Blot Analysen eine geringe, aber klare Verschiebung der NKG2D-Lokalisation von der löslichen 10/11-Fraktion zu der Raft-Fraktion 4/5. Die gezeigten Daten demonstrieren deutlich, dass Lipid Rafts auch für die NKG2D-vermittelte NK Zell Aktivierung von Bedeutung sind.

4.3.1.4 Lipid Rafts sind für die NKG2D-vermittelte NK Zell Aktivierung essentiell

Im Folgenden sollte herausgefunden werden, welche Rolle die Lipid Rafts für die Funktionalität des NKG2D-Rezeptors spielen (Abb. 4.3.1.4). Hierfür wurden primäre NK Zellen mit 10 mM MCD behandelt, mit einem anti-NKG2D-Antikörper stimuliert und die NKG2D-vermittelte NK Zell Aktivität in einem Zytotoxizitäts-Test gegen P815 Zellen bestimmt. Die Fähigkeit der NK Zellen, Zielzellen abzutöten, wurde fast vollständig durch die MCD-Behandlung blockiert. MCD-behandelte Zellen, die über Nacht in normalem Medium kultiviert wurden, zeigten hingegen wieder die volle Lysekapazität. Diese Daten weisen darauf hin, dass Lipid Rafts für die Funktion des NKG2D-Rezeptors eine essentielle Rolle spielen.



4.3.1.4 Lipid Rafts sind für die NKG2D-vermittelte NK Zell Aktivierung essentiell

Polyklonale humane NK Zellen wurden 10 min bei 37°C mit 10 mM MCD behandelt und in einem Zytotoxizitäts-Test gegen P815 Zielzellen, unter Verwendung von anti-NKG2D Antikörper (0,5µg/ml, RuD Systems) in verschiedenen Verhältnissen von NK zu Zielzelle (E/T) getestet. Als Kontrolle dienten MCD-behandelte NK Zellen, die über Nacht in normalem Medium kultiviert wurden.

4.3.2 Inhibierende NK Zell Rezeptoren kontrollieren die NKG2D-vermittelte NK Zell Aktivierung

4.3.2.1 Die Aktivität des NKG2D-Rezeptors kann durch inhibierende NK Zell Rezeptoren blockiert werden

Verschiedene Studien über NKG2D implizierten zwei unterschiedliche Aussagen. Auf der einen Seite gab es Hinweise, dass die NKG2D-induzierte Signalkaskade sowohl in murinen als auch in humanen Tumormodellen die Signale der inhibierenden Rezeptoren zu umgehen schien und es trotz der Stimulation der inhibierenden Rezeptoren über die Bindung von MHC Klasse I Molekülen zu einer Aktivierung der NK Zelle kam (Bauer et al., 1999; Cerwenka et al., 2001). Eine weitere Studie hingegen zeigte auf, dass NKG2D sehr wohl durch inhibierende Signale blockiert werden kann (Pende et al., 2001).

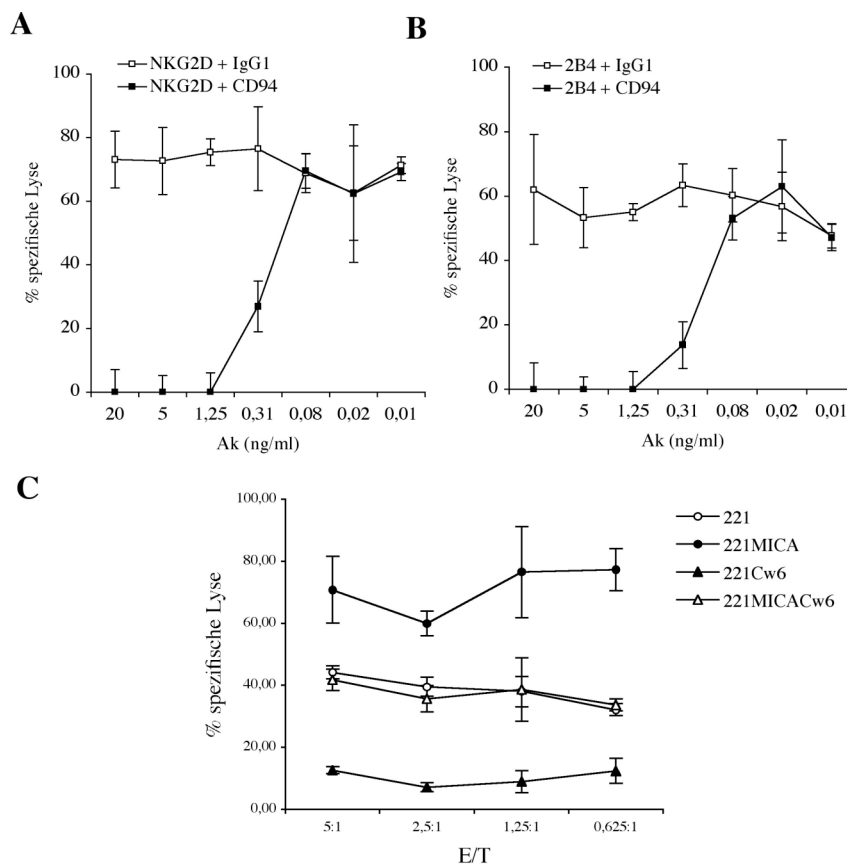
Zur Überprüfung dieser Daten in unserem humanen System, wurde zunächst eine Konzentration an anti-NKG2D-Antikörper bzw. anti-2B4-Antikörper ermittelt (20ng/ml), die gerade so hoch war, um eine optimale NK Zell Aktivierung zu induzieren.

Anschließend wurden P815 Zellen mit den ermittelten Antikörperkonzentrationen von anti-NKG2D bzw. anti-2B4 Antikörper (20ng/ml) inkubiert. Zu dem Versuchsansatz wurden dann noch unterschiedliche Konzentrationen an anti-CD94 Antikörper oder IgG-Kontrollantikörper zugegeben (Abb 4.3.2.1A,B). Anti-CD94 bindet an den inhibierenden NK Zell Rezeptor CD94/NKG2A und induziert dessen Aktivierung. Im Anschluß wurde die Lyse der Antikörper-markierten P815 Zellen durch die NK Zelllinie NKL erneut in einem Zytotoxizitäts-Test analysiert. Die NKG2D vermittelte Lyse der P815 Zellen konnte in Abhängigkeit der Konzentration an CD94-Antikörper vermindert werden (Abb 4.3.2.1A). Höhere Konzentrationen des CD94 Antikörpers führten zu einer kompletten Inhibition der P815-Lyse während niedrigere Konzentrationen keinen Effekt hatten. Analoge Ergebnisse konnten für den 2B4 Rezeptor gezeigt werden (Abb 4.3.2.1B). Gleiche Konzentrationen an CD94 Antikörper induzierten eine fast identische Inhibitionskurve wie die des NKG2D. Interessanterweise war die Schwelle für die Inhibition des 2B4 Rezeptors analog zu der von NKG2D.

Die Daten weisen darauf hin, dass erst nach Überschreiten einer bestimmten Schwelle die inhibierenden Signale Oberhand über die aktivierenden Signale gewinnen. Ein starkes inhibierendes Signal scheint also die NKG2D-vermittelte NK Zell Aktivierung übergehen zu können.

Die Blockade durch die inhibierenden Rezeptoren konnte auch durch die Bindung von NK Zellen an Zielzellen, die den Liganden für den inhibierenden Rezeptor KIR2DL1 auf der Oberfläche exprimieren, gezeigt werden (Abb 4.3.2.1C). Erneut wurde in einem Zytotoxizitäts-Test die NKG2D-vermittelte NK Zell Aktivität gegen 721.221 Zellen getestet, die entweder mit dem humanen NKG2D-Liganden MICA transfiziert waren oder mit dem KIR2DL1-Liganden Cw6 oder mit beiden Molekülen. 721.221 Zellen exprimieren weitere Liganden für NK Zell Rezeptoren wie CD48 und NTB-A (unsere unpublizierten Daten) und werden daher gut von NK Zellen lysiert. MICA-transfizierte 221 Zellen wurden fast doppelt so stark lysiert wie die untransfizierten Zellen, während die Bindung der NK Zellen an die Cw6-transfizierten 721.221 Zellen zu einer fast kompletten Inhibition der NK Zell Lyse führte. Die Doppeltransfektanten induzierten eine Lyse, die analog zu den untransfizierten 721.221-Zielzellen war.

Diese Daten implizieren, dass hingegen der bisherigen Vermutungen, auch der NKG2D Rezeptor von inhibierenden Rezeptoren blockiert werden kann. Vielmehr scheint also das Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren eine Rolle zu spielen, was die oben genannten Vermutungen bestätigt.



4.3.2.1 Die Aktivität des NKG2D-Rezeptors kann durch inhibierende NK Zell Rezeptoren blockiert werden

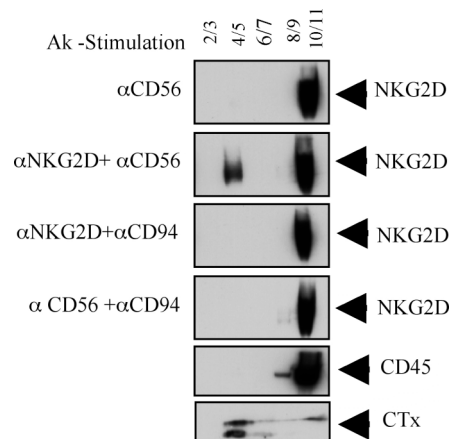
NKL Zellen wurden in einem Zytotoxizitäts-Test gegen P815 Zellen getestet, unter Verwendung der gerade optimalen Konzentration an (A) NKG2D-Antikörper (20ng/ml) oder (B) anti-2B4-Antikörper (20ng/ml), kombiniert mit ansteigenden Konzentrationen an CD94-Antikörper (20-0,01 ng/ml) oder IgG1-Kontrollantikörper in einem festen Verhältnis von NK zu Zielzelle (5:1). (C) NKL Zellen wurden in einem Zytotoxizitäts-Test gegen untransfizierte 721.221 Zielzellen getestet, oder gegen 721.221, die mit MICA, Cw6 oder MICA+Cw6 transfiziert waren.

4.3.2.2 Inhibierende NK Zell Rezeptoren verhindern die Rekrutierung des NKG2D Rezeptors in die Lipid Raft-Domänen

Im Folgenden stellte sich nun die Frage der molekularen Mechanismen, durch welche die NKG2D-vermittelte NK Zell Aktivierung inhibiert wurde. Lipid Rafts spielen eine essentielle Rolle für die Signalweiterleitung des 2B4 und NKG2D Rezeptors. Für den 2B4 Rezeptor wurde bereits gezeigt, dass die Inhibition seiner Signalkaskade durch die Blockade der Raft-Rekrutierung induziert wurde (Watzl and Long, 2003).

Um zu überprüfen, ob dies ein genereller Mechanismus sein könnte, wie inhibierende Rezeptoren die Signaltransduktion aktivierender NK Zell Rezeptoren unterbrechen, wurde die Raft-Assoziation von NKG2D nach Stimulation des inhibierenden CD94/NKG2A-

Rezeptors mittels eines anti-CD94 Antikörpers, untersucht (Abb 4.3.2.2). NKL Zellen wurden erneut mit anti-NKG2D Antikörper stimuliert und mit anti-CD94 Antikörper oder CD56-Kontrollantikörper kokreuzvernetzt. Das Zellysate wurde im Anschluss auf einen Sukrose-Gradienten geladen, die 1ml-Fractionen geerntet und auf ein SDS-Gel geladen. Die anschließende Western Blot Analyse zeigte eine komplette Inhibition der NKG2D-Raft Rekrutierung nach der Kokreuzvernetzung mit dem anti-CD94 Antikörper, nicht aber nach der Kokreuzvernetzung mit dem CD56-Kontrollantikörper. Inhibitorische Rezeptoren interferieren also mit der NKG2D-vermittelten NK Zell Aktivierung, indem sie die Raft-Assoziation von NKG2D blockieren und somit zu einer Unterbrechung der NKG2D-Signalkaskade führen.



4.3.2.2 Inhibierende NK Zell Rezeptoren verhindern die Rekrutierung des NKG2D Rezeptors in die Lipid Raft-Domänen

NKL Zellen wurden kreuzvernetzt mit anti-NKG2D Antikörper (10µg/ml, RuD Systems) unter gleichzeitiger Zugabe von CD94 Antikörper oder CD56-Kontrollantikörper. Der Versuchsablauf entsprach dem in Abb.4.3.1.3A. Repräsentative anti-CD45 und Choleratoxin (Ctx) Western Blot-Analysen werden gezeigt.

4.3.2.3 Ein starkes inhibierendes Signal verhindert die Polarisierung von NKG2D an der Immunologischen Synapse und die NKG2D-vermittelte NK Zell Aktivierung

Die bisherigen Daten, die hauptsächlich in NK Zelllinien durchgeführt wurden, konnten über eine Kooperation in humanen, primären NK Zell Klonen bestätigt werden. Hierbei wurden Klone verwendet, die auf die Präsenz der inhibierenden Rezeptoren KIR2DL1 (EB6) oder KIR2DL2/3 selektiert wurden (Abb. 4.3.2.3A). Die Koinkubation von KIR2DL1-exprimierenden NK Zell-Klonen mit 721.221-Cw6/MICA-Transfektanten induziert die Bildung einer inhibierenden Immunologischen Synapse, die eine NK Zell Aktivierung verhindert. Eine Koinkubation von KIR2DL2/3-exprimierenden NK Zellen

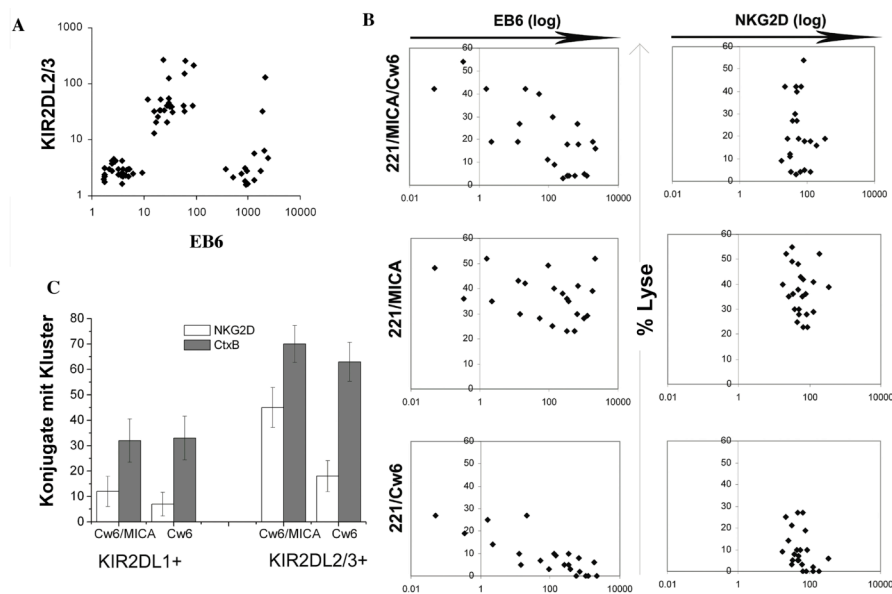
mit den genannten Transfektanten führt hingegen zu der Bildung einer aktivierenden Immunologische Synapse und somit zu einer Aktivierung der NK Zelle, da Cw6 ein Ligand für KIR2DL1, nicht aber für KIR2DL2/3 ist.

Zur Überprüfung, inwieweit das Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen eine Rolle bei der NKG2D-vermittelten NK Zell Aktivierung spielt, wurde in einem Zytotoxizitäts-Test untersucht, ob eine Korrelation zwischen der Expression von KIR2DL1 und NKG2D und der Lyse der 721.221-Cw6/MICA, -Cw6 und der -MICA-Transfektanten existiert (Abb 4.3.2.3B). Die NK Zell Klone wurden in einem festen Verhältnis von 5:1 mit den 221-Transfektanten koinkubiert. Die Menge an exprimiertem NKG2D war immer konstant, so dass es keine Korrelation zwischen der Menge an exprimiertem NKG2D und der Lyse der Transfektanten gab. Einen klaren Zusammenhang konnte man jedoch zwischen der Menge an exprimierten KIR2DL1-Molekülen und der Stärke der Inhibition durch die 221-Cw6/MICA beobachten. NK Zell Klone, die größere Mengen an KIR2DL1 auf der Oberfläche aufwiesen wurden komplett inhibiert trotz der Expression von MICA auf den Zielzellen. Klone mit geringeren Mengen an KIR2DL1 zeigten hingegen eine hohe lytischen Kapazität gegen die Doppeltransfektanten. Hier reichten die Signale der inhibierenden Rezeptoren also nicht aus, um die NK Zell Aktivität zu verhindern. Die durch die Bindung an MICA vermittelten aktivierenden Signale überwogen in diesem Fall die Signale der inhibierenden Rezeptoren.

Diese Daten zeigen eindrücklich, dass eine Aktivierung oder Inhibition der NK Zelle über ein feines Gleichgewicht der aktivierenden und inhibierenden Signale reguliert wird. Überwiegen die Signale der inhibierenden Rezeptoren, bleibt die NK Zelle inaktiv, überwiegen die positiven Signale kommt es zur Aktivierung der NK Zelle. Diese Daten unterstützen zudem die Beobachtungen, dass die Aktivität des NKG2D-Rezeptors sehr wohl von inhibierenden Rezeptoren blockiert werden kann.

Ein weiteres Experiment unterstützte die biochemischen Daten der NKG2D-Raft-Rekrutierung. Hierzu wurden die NK Zell Klone mit den 721.221-Cw6/MICA-Transfektanten koinkubiert, fixiert und anschließend mit fluoreszent-markierten Antikörpern gegen NKG2D und die Lipid Rafts markiert. Danach erfolgte die Analyse der Konjugate im Fluoreszenzmikroskop (Abb. 4.3.2.3C). Die Prozentigkeit von aktivierenden und inhibierenden Immunologischen Synapsen, in denen NKG2D und die Lipid Raft-Domänen polarisierten, wurde errechnet. In 70% der KIR2DL2/3 Klone, die 721.221-Cw6/MICA Zellen lysierten, klusterten Lipid Rafts und in 40% der Klone akkumulierten die NKG2D-Rezeptoren. Im Gegensatz dazu akkumulierten die NKG2D-Rezeptoren nur in

10% der KIR2DL1-Klone nach Bindung an 721.221-Cw6/MICA und in 30% der Klone klusterten die Lipid Rafts. Bei der Bildung einer aktivierenden Immunologischen Synapse (KIR2DL2/3 + 721.221-MICA/Cw6) klustern also sowohl NKG2D als auch die Lipid Rafts, nicht aber in inhibierenden Immunologischen Synapsen (KIR2DL1 + 721.221-MICA/Cw6).



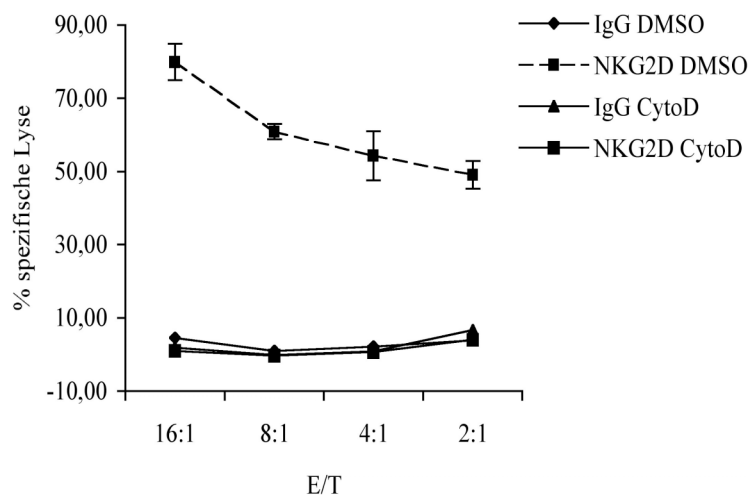
4.3.2.3 Ein starkes inhibierendes Signal verhindert die Polarisation von NKG2D an der Immunologischen Synapse und die NKG2D-vermittelte NK Zell Aktivierung

(A) 69 primäre NK Zell Klone von 3 Blutspendern wurden Antikörpern gegen anti-KIR2DL1 (EB6) und anti-KIR2DL2/3 Antikörpern gefärbt und mittels FACS-Analyse auf die Zelloberflächenexpression von KIR2DL1 oder KIR2DL2/3 selektiert. (B) Die Korrelation zwischen der Expression von KIR2DL1 und NKG2D und der Lyse der 721.221-Cw6/MICA, -MICA und -Cw6 Zielzellen wurde dargestellt. Die NK Zell Klone wurden in einem festen Verhältnis von 5:1 mit den 721.221-Transfektanten koinkubiert. (C) KIR2DL1 oder KIR2DL2/3-NK Zell Klone wurden mit 721.221-Cw6/MICA Zellen 10 min. koinkubiert, fixiert und anschließend mit fluoreszent-markiertem anti-NKG2D Antikörper und, zur Identifikation der GM1-reichen Lipid Rafts, mit Alexa 647-konjugiertem Cholera Toxin B Antikörper, angefärbt. Die Anzahl der zytolytischen und nicht-zytolytischen Konjugate, die eine Ansammlung der NKG2D Rezeptoren und der Lipid Rafts an der Immunologischen Synapse zeigen, wurden mittels konfokaler Mikroskopie gezählt und in Prozent wiedergegeben.

4.3.2.4 Die NKG2D-vermittelte Aktivierung benötigt filamentöses Aktin

Neuere Studien zeigten, dass inhibierende Rezeptoren mit der lokalen Aktin-Reorganisation interferieren, indem sie die Phosphorylierung des Guanin-Austauschfaktors Vav1 blockieren (Stebbins et al., 2003). Die Vav1-regulierte Aktinpolymerization ist zudem essentiell für die Gruppierung der Lipid Rafts (Lou et al., 2000) sowie für die Raft-Rekrutierung und Funktion des aktivierenden 2B4 Rezeptors (Watzl and Long, 2003). Dies führte zu der Frage, ob inhibierende Rezeptoren die NKG2D-vermittelte Aktivierung über einen ähnlichen Mechanismus kontrollieren.

Zunächst wurde überprüft, ob für die Aktivierung von NKG2D ein intaktes Aktin-Zytoskelett benötigt wird (Abb 4.3.2.4). NKL Zellen wurden hierfür mit Cytochalasin D oder mit DMSO inkubiert (30 min 37°C 10µM). Cytochalasin D lagert sich an die Aktinfilamente und unterbricht somit die weitere Polymerisation der Aktinfilamente. P815 Zellen wurden mit anti-NKG2D Antikörper inkubiert und zu den NKL Zellen gegeben, um die NKG2D-vermittelte Lyse der Zielzellen in einem Zytotoxizitäts-Test zu bestimmen. Während die DMSO-behandelten NK Zellen eine normale Lysekapazität zeigten, wurde die NKG2D-vermittelte Aktivierung der Cytochalasin D-behandelten NK Zellen komplett inhibiert, was darauf schließen lässt, dass NKG2D für seine Aktivierungskaskade ein intaktes Aktin-Zytoskelett benötigt.



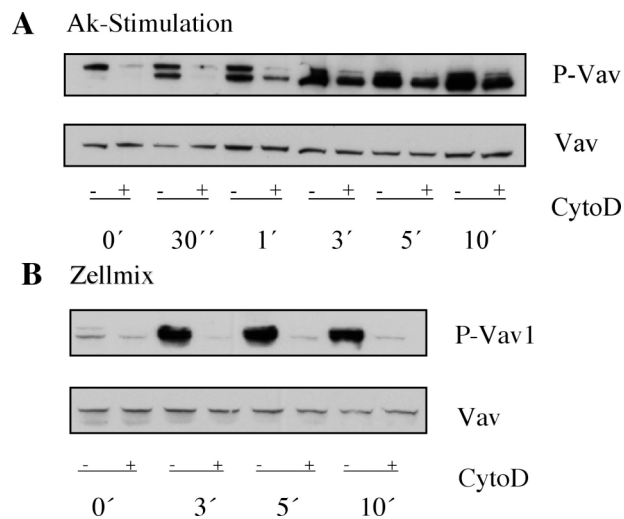
4.3.2.4 Die NKG2D-vermittelte Aktivierung benötigt filamentöses Aktin

NKL Zellen wurden für 30 min. bei 37°C mit 10µM Cytochalasin D oder DMSO inkubiert, mit anti-NKG2D Antikörper (10µg/ml, RuD Systems) stimuliert und die NKG2D-vermittelte Lyse von P815 Zellen wurde in einem Zytotoxizitäts-Test bestimmt.

4.3.2.5 Die Rolle des Vav1-Proteins in der NKG2D-Signalkaskade

Als nächstes sollte die Rolle des Vav1-Proteins in der Signalkaskade des NKG2D-Rezeptors untersucht werden. Da bisher schon gezeigt wurde, dass Vav1 eine Rolle in der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts spielt, wurden NKL Zellen erneut mit Cytochalasin D oder DMSO inkubiert und anschließend mit anti-NKG2D-Antikörper stimuliert (Abb 4.3.2.5 A). Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und das Zellysate auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die folgende Western Blot Analyse mit einem Antikörper, der gezielt phosphoryliertes Vav1 detektiert, zeigte auf, dass in den kontrollbehandelten NKL Zellen bereits nach 30 sek. (30'') NKG2D-Stimulation über die Bindung des Antikörpers eine starke Phosphorylierung des Vav1-Proteins induziert wurde, die nach 3 min. (3') noch etwas anstieg und damit die maximale Phosphorylierung des Vav1-Proteins erreichte. Die Cytochalasin D-Behandlung der NK Zellen hingegen führte schon zu Beginn zu einer fast vollständigen Blockade der NKG2D-vermittelten Vav1-Phosphorylierung, nach 3 min ist jedoch eine Phosphorylierung des Vav1-Proteins detektierbar. Diese war jedoch im Vergleich zu den Zellen, die nicht mit DMSO behandelt wurden, vermindert.

Um den Versuch in einem physiologischeren Umfeld zu wiederholen, wurden NKL Zellen erneut mit Cytochalasin D oder DMSO inkubiert und anschließend mit 721.221 Zellen gemischt, die mit dem humanen NKG2D-Liganden MICA transfiziert waren (Abb 4.3.2.5 B). Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und das Zellysate auf ein SDS-Gel geladen. Die folgende Western Blot Analyse mit dem anti-phospho-Vav1 Antikörper zeigte, analog zu dem Experiment, in dem anti-NKG2D Antikörper verwendet wurde, dass in den kontrollbehandelten NKL Zellen nach 3 min. NKG2D-Stimulation über die Bindung seines Liganden, eine starke Phosphorylierung des Vav1-Proteins induziert wurde, die zu späteren Zeitpunkten nicht mehr anstieg. Die Cytochalasin D-Behandlung der NK Zellen hingegen führte erneut zu einer fast vollständigen Blockade der NKG2D-vermittelten Vav1-Phosphorylierung, die auch über die Zeit konstant blieb. Die durch die NKG2D-Stimulation induzierte Phosphorylierung des Vav1-Proteins und die Blockade durch die Cytochalasin D-Behandlung demonstrieren, dass die NKG2D-vermittelten Signale von der Aktinpolymerisation abhängig sind.



4.3.2.5 Die Rolle des Vav1-Proteins in der NKG2D-Signalkaskade

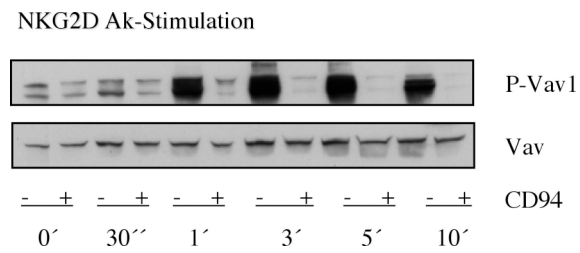
(A) NKL Zellen wurden für 30 min. bei 37°C mit 10µM Cytochalasin D oder DMSO inkubiert, mit (A) anti-NKG2D Antikörper (10µg/ml, RuD Systems) stimuliert oder (B) mit 721.221-MICA Transfektanten gemischt und nach verschiedenen Zeitpunkten lysiert. Das Zellysat wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mit einem anti-phospho-Vav1 Antikörper gefärbt. Im Anschluss wurde mit einem anti-Vav1 Antikörper gefärbt.

4.3.2.6 Inhibierende Rezeptoren blockieren die Phosphorylierung von Vav1

Die bisherigen Daten wiesen darauf hin, dass Vav1 und das Aktinzytoskelett eine zentrale Rolle bei der Aktivierungskaskade von NKG2D spielen. Es wäre also vorstellbar, dass inhibierende Rezeptoren über die Blockade der Aktin-Reorganisation, durch die Dephosphorylierung von Vav1, mit der NKG2D-Signalkaskade interferieren könnten.

Um dies zu überprüfen, wurde der Einfluss des inhibierenden Rezeptors CD94/NKG2A auf die NKG2D-vermittelte Vav1-Phosphorylierung getestet (Abb 4.3.2.6). NKL Zellen wurden mit anti-NKG2D Antikörper und anti-CD94 Antikörper oder IgG-Kontrollantikörper kostimuliert, lysiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die anschließende Western Blot Analyse mit dem phospho-spezifischen anti-Vav1-Antikörper zeigte bereits nach 1 min. Stimulation des NKG2D Rezeptors eine starke Vav1-Phosphorylierung. Diese Phosphorylierung wurde durch die Kokreuzvernetzung mit dem CD94 Antikörper komplett blockiert. Die NKG2D-vermittelte Signalkaskade kann also durch inhibierende Rezeptoren blockiert werden, indem Signale der inhibierenden Rezeptoren zu einer Dephosphorylierung und somit Inaktivierung des Vav1-Proteins führen, wodurch die Reorgansiation des Aktin-Zytoskeletts verhindert wird. Es wurde bereits gezeigt, dass inhibierende Rezeptoren über die Aktivierung der Phosphatase SHP-1

eine Dephosphorylierung des Vav1-Signalmoleküls induzieren (Stebbins et al., 2003; Watzl and Long, 2003).



4.3.2.6 Inhibierende Rezeptoren blockieren die Phosphorylierung von Vav1

NKL Zellen wurden mit anti-NKG2D Antikörper (RuD Systems) und anti-CD94 Antikörper oder IgG-Kontrollantikörper für verschiedene Zeiten kostimuliert, lysiert und mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit dem anti-phospho-Vav1 Antikörper analysiert. Im Anschluss wurde mit einem anti-Vav1 Antikörper gefärbt.

5. Diskussion

Natürliche Killerzellen sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Sie übernehmen eine essentielle Rolle in der frühen Immunabwehr von einer Vielzahl pathogener Mikroorganismen. Die Aktivität der NK Zellen wird über die verschiedenen aktivierenden und inhibierenden Zelloberflächenrezeptoren reguliert. Das Zusammenspiel der positiven und negativen Signale in den NK Zellen und die Rolle der Lipid Raft-Domänen sind noch nicht vollständig verstanden, bedingt durch die Vielzahl der Oberflächenrezeptoren und deren Interaktion über multiple intrazelluläre Signalmoleküle. Bis vor kurzem herrschte die Vorstellung, dass die Signale der inhibierenden Rezeptoren über die Signale der aktivierenden Rezeptoren dominieren. Eine NK Zell Aktivierung konnte demzufolge nur dann stattfinden, wenn die negativen Signale reduziert wurden. Nach Identifizierung der natürlichen Liganden des NKG2D Rezeptors demonstrierten verschiedene Studien, dass Zellen, die MHC Klasse I auf ihrer Zelloberfläche exprimierten und somit vor der Lyse der NK Zellen geschützt sein sollten, durch die zusätzliche Expression von NKG2D-Liganden von NK Zellen lysiert wurden (Bauer et al., 1999; Cerwenka et al., 2001; Diefenbach et al., 2001). Dies führte zu der Vorstellung, dass der NKG2D-Rezeptor die Signale der inhibierenden Rezeptoren übergehen kann und somit, trotz der Expression von MHC-KlasseI-Molekülen, die Lyse dieser Zellen ermöglicht. Eine weitere Studie zeigte hingegen, dass inhibierende Rezeptoren sehr wohl zu einer Blockade der NKG2D-vermittelten Zytotoxizität führten (Pende et al., 2001). Das Ziel dieser Arbeit war daher die Aufklärung dieses Konflikts im humanen NK Zell-System und die Untersuchung der molekularen Mechanismen der inhibierenden Rezeptoren in der NKG2D-vermittelten NK Zell Aktivierung.

Mit der Herstellung eines spezifischen monoklonalen anti-NKG2D Antikörpers (Abb 4.3.1.2) konnten eine ganze Reihe von biochemischen Studien wie Western Blot Analysen durchgeführt werden, die vorher nicht möglich waren. In dieser Arbeit konnte zum einen eindeutig nachgewiesen werden, dass eine Aktivierung des NKG2D Rezeptors durch inhibierende NK Zell Rezeptoren verhindert werden kann (Abb 4.3.2.1A,C). Dabei erwies sich das Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen als entscheidender Faktor. Mit Hilfe von NK Zell Klonen, die unterschiedliche Expressionslevel an inhibierenden Rezeptoren (Abb 4.3.2.3A und B) auf ihrer Oberfläche exprimieren, war es möglich, dieses Phänomen nachzuweisen.

NK Zell Klone, die kein oder nur sehr geringe Mengen an KIR2DL1 auf der Oberfläche aufwiesen, zeigten eine hohe Lysekapazität der 721.221-MICA/Cw6-Transfektanten (Abb. 4.3.2.3B, oberste Reihe). Je höher der Expressionslevel an KIR2DL1 hingegen war, desto niedriger war die Lyse der Zielzellen. NK Zell Klone mit hohem KIR2DL1-Expressionslevel waren nicht mehr fähig, die 721.221-Doppeltransfektanten zu lysieren, trotz der Expression von MICA auf den Zielzellen. Diese Daten zeigen deutlich, welche Rolle das Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen spielt. Überwiegen die Signale der aktivierenden Rezeptoren, kommt es zur Aktivierung der NK Zelle, überwiegen die Signale der inhibierenden Rezeptoren, kommt es zur Blockade der NK Zell Aktivität. Auch die Daten der Antikörper Stimulation stützen die Beobachtung, dass erst nach Überschreiten einer bestimmten Schwelle die inhibierenden Signale Oberhand über die NKG2D-vermittelten Signale gewinnen (Abb 4.3.2.1A, B). Nach Kreuzvernetzung einer bestimmten Menge an inhibierenden CD94/NKG2A Rezeptoren wurde die Lysekapazität der NK Zellen komplett blockiert. Interessanterweise war die Schwelle für die Inhibition des NKG2D Rezeptors analog zu der des 2B4 Rezeptors, was darauf hinweist, dass für die NK Zell Aktivierung die Quantität des Signals und nicht die Qualität ausschlaggebend ist und dass die Regulation der NK Zelle über das Gleichgewicht zwischen positiven und negativen Signalen ein allgemeiner Mechanismus zu sein scheint. Die Daten zeigen zudem, dass sowohl der Expressionslevel der inhibierenden und aktivierenden NK Zell Rezeptoren als auch der Expressionslevel der Liganden im Endeffekt entscheidet, ob eine Aktivierung oder Inhibition der NK Zelle induziert wird. Für die Liganden des NKG2D Rezeptors ist bekannt, dass ihre Zelloberflächenexpression nach zellulärem Stress, Infektion oder Transformation hochreguliert wird. Auch dies kann ein Ungleichgewicht der vermittelten Signale bewirken oder sogar zu einer Verstärkung der Lyse führen (Abb 4.3.2.1C). 721.221 Zellen stellen durch ihre Oberflächenexpression verschiedener Liganden für aktivierende NK Zell Rezeptoren, wie CD48 und NTB-A eine gute Zielzelle für NK Zellen dar. Eine zusätzliche Expression von transfiziertem MICA erhöhte die spezifische NK Zell-vermittelte Lyse nochmals um ca. 30%. Durch die Expression des KIR2DL1-Liganden Cw6 wurden die NK Zellen komplett inhibiert. Die Lyse der 721.221-MICA/Cw6-Doppeltransfektanten entsprach hingegen exakt der spezifischen Lyse der untransfizierten 721.221 Zellen, was zeigt, dass sich die Signale in diesem Fall gegenseitig aufhoben. Durch die Fähigkeit der NKG2D Liganden, gestresste Zellen spezifisch zu markieren, entsteht ein weiterer Aspekt der NK Zell Regulation: Die

NK Zell Aktivität kann also nicht nur durch die Signale der NK Zell Rezeptoren reguliert werden, sondern auch durch die regulierte Expression der aktivierenden Liganden.

In dieser Arbeit konnte somit in zwei unterschiedlichen Systemen, einmal über die Stimulation durch Antikörperbindung zum anderen durch die physiologischere Stimulation über die natürlichen Liganden, die feine Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen in einer Zelle dargestellt werden. Die hier präsentierten Daten führen zu der Vermutung, dass die Studien, in denen kein Effekt der inhibierenden Rezeptoren auf die NKG2D-vermittelte NK Zell Aktivierung detektiert werden konnte (Bauer et al., 1999; Cerwenka et al., 2001; Diefenbach et al., 2001) darauf zurückzuführen ist, dass eine verstärkte Zelloberflächenexpression der NKG2D-Liganden auf den Tumorzellen die Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen verschob und die NKG2D-vermittelte Signalkaskade die Oberhand gewann, so dass die Tumorzellen trotz der MHC Klasse I Expression lysiert wurden.

In dieser Arbeit konnten weiterhin Einblicke in die molekularen Mechanismen gewonnen werden, mittels derer inhibierende Rezeptoren in die NKG2D-vermittelte NK Zell Aktivierung eingreifen. Diese basieren auf der Blockade der NKG2D Raft-Rekrutierung (Abb 4.3.2.2) und der Blockade der NKG2D und Lipid Raft-Polymerisation an der NKIS (Abb 4.3.2.3C). Durch diese Ergebnisse wird die Bedeutung dieser Plasmamembran-Domänen für den NKG2D Rezeptor deutlich. Nach der Aktivierung von NKG2D über Antikörper-Bindung oder über die Bindung seiner natürlichen Liganden MICA oder ULBP2 wird der Rezeptor in die Lipid Raft-Domänen rekrutiert (Abb.4.3.1.3 A, C, D). Sowohl Western Blot als auch photometrische Analysen über ELISA zeigten, dass NKG2D nach der Aktivierung verstärkt in diesen Membranbereichen lokalisierte (Abb 4.3.1.3A und B). Über die Assoziation der Lipid Rafts mit Zelloberflächenrezeptoren existieren bisher zwei Modelle: In Modell 1 sind die Proteine entweder bereits in kleineren, mikroskopisch nicht sichtbaren Raft-Einheiten lokalisiert und klustern erst durch die Ligandenbindung zu größeren Raft-Domänen (Pralle et al., 2000; Simons and Ikonen, 1997; Simons and Toomre, 2000; Varma and Mayor, 1998), in Modell 2 sind die Proteine zu Beginn ausserhalb der Rafts lokalisiert, durch die Ligandenbindung erhöht sich jedoch ihre Affinität für die Lipid Rafts und sie werden in diese Membranbereiche rekrutiert (Brown and London, 1998; Harder et al., 1998). Die Western Blot Analysen lassen beide Modelle zu: Modell 2 wird bestätigt durch die Beobachtung, dass NKG2D erst nach Stimulation in den Rafts detektierbar ist. Allerdings wäre es auch möglich, wie in Modell 1 vorgeschlagen, dass NKG2D in kleineren Raft-Einheiten bereits lokalisiert ist, diese

Assoziation jedoch sehr labil ist und durch die harsche Behandlung mit Detergenz aufgelöst wird, wodurch in unstimulierten Zellen kein NKG2D in den Raft-Fraktionen detektierbar ist. Das Klustern der Rafts könnte eine Stabilisierung der Raft-Assoziation bewirken, wodurch in stimulierten Zellen die NKG2D Raft-Lokalisation nachweisbar wird. Die geringen Mengen des Rezeptors in den Raft-Fraktionen unstimulierter Zellen könnten auf eine Vorstimulation zurückzuführen sein, bei der entweder schon geringe Mengen an Rezeptoren in die Rafts rekrutiert wurden oder die kleinen Raft Einheiten mit den Rezeptoren bereits zu klustern begannen, dadurch stabilisiert wurden und daher in der Raft-Fraktion nachweisbar waren.

Die Bedeutung der Lipid Rafts für die Funktion des NKG2D Rezeptors konnte durch die Depletion von Cholesterol und der damit verbundenen Zerstörung der Lipid Rafts demonstriert werden (Abb 4.3.1.4). Nach MCD-Behandlung waren die NK Zellen nicht mehr in der Lage, eine NKG2D-vermittelte Lyse der Zielzellen zu induzieren. Auch für die Funktion weiterer aktivierender NK Zell Rezeptoren wie NKp30, NKp44, NKp46 und CD16 erwiesen sich intakte Lipid Rafts als essentiell (Abb. 4.3.1.1). Der Nachteil dieses Testsystems der Cholesteroldepletion liegt darin, dass nicht nur die Zerstörung der Lipid Rafts in der Zellmembran induziert wird, sondern auch intrazelluläre Membranen durch die MCD-Behandlung angegriffen werden. Lipid Rafts sind sowohl in der Plasmamembran als auch in intrazellulären Membranen vorhanden (Brown and London, 1998; Pike, 2003). Die detektierte Inhibition der Rezeptor-vermittelten NK Zell Zytotoxizität könnte also auch darauf basieren, dass die intrazellulären, zytotoxischen Granula durch die MCD-Behandlung zerstört oder beeinflusst werden und dadurch keine Freisetzung von Perforin oder Granzym erfolgen kann. Es gab auch Hinweise, dass MCD einen allgemeinen zytotoxischen Effekt auf die Zellen ausübt und bereits die Bindung der Rezeptoren an die Liganden verhindern würde (Munro, 2003). Bis heute ist kein besseres Testsystem verfügbar, um die Rolle der Rafts für einzelne Moleküle zu untersuchen. Kontrollansätze, in denen MCD-behandelten Zellen erneut Cholesterol zugeführt wurde, indem sie über Nacht in serumhaltigem Medium kultiviert wurden, zeigten jedoch, dass die Zellen nur kurzfristig beeinflusst waren.

Analoge Daten konnten in früheren Studien für den 2B4 Rezeptor gezeigt werden. Hier konnte zudem demonstriert werden, dass durch die MCD Behandlung nicht nur die 2B4-vermittelte NK Zell Aktivierung inhibiert wurde sondern auch die natürliche Zytotoxizität, die von verschiedenen NK Zell Rezeptoren abhängt (Watzl and Long, 2003). Auch Studien anderer Arbeitsgruppen bestätigten, dass die MCD Behandlung von NK Zellen zu

der Inhibition der NK Zell Zytotoxizität führte und zudem zu einem Verlust der Raft-Polarisation an der NKIS (Lou et al., 2000). Dies unterstreicht die Annahme, dass Lipid Rafts eine essentielle Rolle für die Funktion verschiedener Rezeptoren übernehmen.

Die Assoziation von NKG2D mit den Lipid Rafts wird zudem durch den Befund verdeutlicht, dass inhibierende Rezeptoren die Lokalisation von NKG2D in den Raft-Domänen komplett verhindern kann (Abb 4.3.2.2). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sowohl NKG2D als auch die Lipid Rafts, nach NKG2D-Aktivierung über die Bindung an MICA, an der NKIS akkumulieren (Abb 4.3.2.3C). Diese Akkumulation wurde durch die Stimulation inhibierender Rezeptoren verhindert, was ebenfalls darauf hin deutet, dass NKG2D mit den Rafts assoziiert ist.

30% der Klone mit inhibierenden Synapsen zeigten eine Polymerisation der Lipid Rafts an der Immunologischen Synapse. Frühere Studien, die u.a. das Klustern von F-Aktin an der Immunologischen Synapse untersuchten, detektierten ebenfalls in 30% der Zellen eine Akkumulation des F-Aktins in der inhibierenden NK Zell Synapse, während in 70-80% der Zellen das F-Aktin in aktivierenden Immunologischen Synapse akkumulierten (McCann et al., 2003). Die Polarisation der Lipid Rafts an der IS ist abhängig von der Reorganisation des Aktin Zytoskeletts (Fassett et al., 2001). Es wäre interessant, herauszufinden, ob auch andere Moleküle wie z.B Adhäsionsmoleküle in Lipid Rafts an der NKIS klustern und warum eine gewisse Menge an Rafts auch in der inhibierenden Synapse lokalisiert ist.

Für die Regulation der Aktinpolymerisation ist der Guanin-Austauschfaktor Vav1 verantwortlich. Zudem scheint er eine Schlüsselrolle in der Signalkaskade der inhibierenden Rezeptoren zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass inhibierende Rezeptoren mit der lokalen Aktinreorganisation interferieren, indem sie die Phosphorylierung und somit Aktivierung von Vav1 aufheben (Stebbins et al., 2003). Die Vav1-regulierte Aktinpolymerisation erwies sich sowohl für das Klustern der Rafts (Lou et al., 2000; Villalba et al., 2001) als auch für die Raft-Rekrutierung und Funktion des 2B4 Rezeptors als essentiell (Watzl and Long, 2003). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl das Aktin-Zytoskelett (Abb.4.3.2.4) als auch Vav1 (Abb 4.3.2.5) in die NKG2D-vermittelte Signalkaskade involviert sind, was zu der Vermutung führt, dass die Aktivierung von NKG2D über einen ähnlichen Mechanismus induziert wird.

Die Aktinpolymerisation erwies sich als Voraussetzung für die NKG2D-vermittelte NK Zell Aktivierung (Abb.4.3.2.4). So induzierte die Behandlung mit Cytochalasin D, welches sich an filamentöses Aktin anlagert und somit den weiteren Aufbau des Aktinstranges verhindert, eine komplette Blockade der NKG2D-Signalkaskade.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Vav1 auch in die Signalkaskade des NKG2D Rezeptors involviert ist (Abb 4.3.2.5). Dabei stellte sich heraus, dass die NKG2D-vermittelte Vav1-Phosphorylierung ebenfalls von der Aktinpolymerisation abhängt, da die Cytochalasin D Behandlung sowohl nach Antikörperstimulation als auch nach Bindung des natürlichen Liganden 721.221-MICA eine Blockade der Vav1-Phosphorylierung (Abb 4.3.2.5A,B) induzierte. Die Cytochalasin D vermittelte Inhibition der Vav1-Phosphorylierung konnte durch die Stimulation über Antikörper jedoch nur kurzfristig aufrechterhalten werden (Abb 4.3.2.5A). Im Gegensatz dazu wurde die Inhibition der Vav1-Phosphorylierung, nach Stimulation des NKG2D Rezeptors über die Bindung an MICA, über den gesamten Zeitraum des Versuchs detektiert (Abb 4.3.2.5B). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass eine Stimulation über Antikörper wesentlich stärker und unabhängig vom Zytoskelett ist. Nach Kreuzvernetzung werden die Rezeptoren von außen durch die Antikörper zusammengezogen und induzieren somit ein stabileres und stärkeres Signal. Die physiologischere Bindung des Liganden benötigt hingegen die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und ist zudem wesentlich labiler. Zudem werden bei der Antikörperstimulation, bedingt durch die Kreuzvernetzung, mehr Rezeptoren gebunden und aktiviert als bei Zell-Zell-Kontakten.

Die Stimulation des inhibierenden Rezeptors CD94/NKG2A führte zu einer kompletten Blockade der NKG2D-vermittelten Vav1-Phosphorylierung (Abb 4.3.2.6), was zu der Schlussfolgerung führte, dass inhibierende Rezeptoren die NKG2D-vermittelte Signalkaskade blockieren, indem sie die Reorganisation des Aktinzytoskeletts über die Dephosphorylierung von Vav1 verhindern.

Die in dieser Arbeit zusammengetragenen Ergebnisse zum Mechanismus der Regulation der NKG2D-vermittelten NK Zell Aktivierung durch inhibierende Rezeptoren lassen folgendes Modell erstellen (Abb 5):

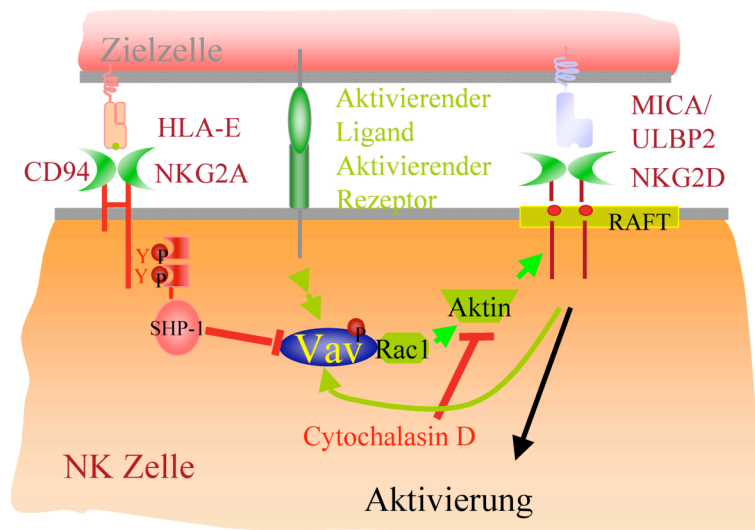


Abb. 5 Modell für die Kontrolle der NK Zell-Aktivität durch inaktive Rezeptoren

Der Zielzellkontakt von NK Zellen induziert eine frühe Vav1-Phosphorylierung. Diese Phosphorylierung könnte über aktivierende NK Zell Rezeptoren vermittelt werden oder aber über Adhäsionsmoleküle, wie z.B. LFA-1 nach Bindung an ICAM-1 (Barber et al., 2004; Riteau et al., 2003). So konnte gezeigt werden, dass die über LFA-1 induzierte Vav1-Phosphorylierung nicht durch Inhibitoren der Aktinpolymerisation blockiert werden konnte, woraus sich schlussfolgern lässt, dass die durch LFA-1 vermittelte Vav1-Phosphorylierung vor der Aktinpolymerisation stattfinden muss.

Die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 ist einer der ersten Schritte während der Adhäsion an die Zielzelle. Die Phosphorylierung von Vav1 führt zur Aktivierung der Rho-GTPase Rac1. Dabei tauscht aktiviertes Vav1 von Rac1 gebundenes GDP gegen GTP aus und induziert somit dessen Aktivierung. Über Rac1 wird dann die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts eingeleitet (Billadeau et al., 1998). Die Reorganisation von Aktin erlaubt die Rekrutierung von NKG2D in die Lipid Rafts und deren Akkumulation an der NKIS. Über das aktivierte NKG2D wird weiteres Vav1 phosphoryliert, was zu einer verstärkten Reorganisation von Aktin führt. Dies wiederum führt zu einer Polarisierung der NK Zelle und weitere Rezeptoren und Lipid Rafts werden in die NKIS rekrutiert. Somit wird eine positive Rückkopplungsschleife induziert, so dass es zu einer Signalverstärkung kommt, die schließlich in eine Aktivierung der NK Zelle münden kann.

Für die inhibierenden Rezeptoren wurde gezeigt, dass sie über die Phosphatase SHP-1 eine Dephosphorylierung von Vav1 induzieren (Stebbins et al., 2003; Watzl and Long, 2003). Findet also parallel zu der Stimulation aktivierender Rezeptoren eine Stimulation von inhibierenden Rezeptoren über deren Bindung an MHC-Klasse-I Moleküle statt, führt dies

zu der Phosphorylierung der ITIMs im zytoplasmatischen Teil und der Bindung der Phosphatase SHP-1. Die Phosphorylierung der ITIMs ist unabhängig von einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts (Faure et al., 2003), was zeigt, dass die inhibierenden Rezeptoren noch oberhalb der Vav1-induzierten Aktinreorganisation eingreifen können und die NK Zell Aktivierung bereits in ihren Anfängen unterbricht. Die aktivierte SHP-1 Phosphatase dephosphoryliert im Anschluss das Vav1-Molekül, wodurch schon die frühen Signale zur Aktin-Reorganisation blockiert werden und somit die Anreicherung von Lipid Rafts und die Rekrutierung von NKG2D in diese Membranbereiche verhindert oder reduziert wird. Die NK Zelle wird nicht aktiviert.

Dieses Modell versucht, die molekularen Mechanismen der NK Zell Aktivierung über den NKG2D-Rezeptor und dessen Inhibition zu erklären. Da bis vor kurzem noch angenommen wurde, dass NKG2D resistent gegenüber der Inhibition von ITIM-enthaltenden Rezeptoren sei, wurde spekuliert, ob dies über einen Vav1-unabhängigen Signalweg erklärbar sei. In dieser Arbeit konnte eindeutig demonstriert werden, dass NKG2D eine Vav1-Phosphorylierung induziert und über dieses Molekül auch blockierbar ist.

Für 2B4 wurde ein analoger Regulationsmechanismus gezeigt (Stebbins et al., 2003; Watzl and Long, 2003). Die Beeinflussung der Funktion weiterer aktivierender NK Zell Rezeptoren durch die Zerstörung der Lipid Rafts (Abb 4.3.1.1), deutet darauf hin, dass auch andere aktivierende NK Zell Rezeptoren von diesen spezifischen Membrandomänen abhängig sind. Daher ist es wahrscheinlich, dass das hier präsentierte Modell die molekulare Basis für die Regulation der meisten aktivierenden NK Zell Rezeptoren darstellt. Man sollte jedoch nicht ausschließen, dass die Phosphatase SHP-1 neben Vav1, auch andere Signalmoleküle dephosphoryliert und dadurch andere Signaltransduktionswege beeinflusst. So konnte in NK und T Zellen nach Aktivierung der inhibierenden Rezeptoren eine reduzierte Tyrosin-Phosphorylierung von Syk und ZAP70 detektiert werden (Brumbaugh et al., 1997; Carena et al., 1997). Auch die Phosphorylierung von LAT in NK Zellen war teilweise nach der Aktivierung von KIR reduziert (Valiante et al., 1996). Diese Vorgänge könnten jedoch auch unterhalb von der Vav1-Signalkaskade liegen.

Studien an Lipid Rafts werfen von Beginn an bis heute immer wieder Diskussionpunkte auf. So wird über die Existenz und Zusammensetzung von Lipid Rafts weiterhin gestritten. Diese Subdomänen der Plasmamembran sind hoch dynamische submikroskopische

Strukturen, die mikroskopisch nur im akkumulierten Zustand detektierbar sind (Simons and Ikonen, 1997). Lipid Raft Analysen einzelner Zellen zeigten, dass die Zusammensetzung an Proteinen und Lipiden nicht immer gleich ist, und dass diese unterschiedlichen Lipid Rafts innerhalb einer Zelle koexistieren (Brown and London, 2000). Auch die Isolationsmethoden scheinen eine Rolle zu spielen, da verschiedene Isolationsmethoden zur Detektion unterschiedlicher Rafts mit unterschiedlicher Zusammensetzung führten (Pike, 2003). Eine vor kurzem veröffentlichte Studie an T Zellen vermutete, unter Betrachtung einzelner Moleküle durch konfokale Lasermikroskopie, dass die T Zell Rezeptor Aktivierung zwar die Bildung von Membran-Subdomänen induziert, diese jedoch auf Protein-Interaktionen basieren und nicht durch Interaktionen mit Lipid Rafts oder dem Aktinzytoskelett aufrechterhalten werden (Douglass and Vale, 2005). Diese Mikrodomänen können ebenfalls, wie die Lipid Rafts, als Signalplattformen dienen, indem sie mit bestimmten Molekülen assoziieren und andere Moleküle ausschließen. Die Bestätigung dieser Studie würde die gesamte Raft-Forschung revolutionieren.

Die derzeit am weitesten verbreitete und akzeptierteste Raft-Isolationsmethode ist der Gebrauch von Triton-X. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden alle unter diesen Bedingungen durchgeführt. Die Annahme, dass die Signaltransduktion über Mikrodomänen, bestehend aus Proteinkomplexen, induziert wird, könnte man auch auf das in dieser Arbeit präsentierte Inhibitionsmodell von NKG2D übertragen. So konnte nach Aktivierung der NK Zelle eine eindeutige Verlagerung von NKG2D in eine andere Fraktion des Sukrosegradienten detektiert werden, was auf ein Klustern der NKG2D-Moleküle hinweist (Abb 4.3.1.3A). Dieser Shift wurde durch die gleichzeitige Stimulation des inhibierenden CD94/NKG2A Rezeptors komplett inhibiert (Abb 4.3.2.2). Selbst wenn die Signalweiterleitung durch die Bildung von Proteinkomplexen zustande käme, würden inhibierende Rezeptoren die Bildung dieser Komplexe blockieren.

Die Entwicklung von Techniken, die einzelne Fluophore *in vitro* und in lebenden Zellen sichtbar macht, erweitert die Möglichkeiten, die Proteindynamik in Zellmembranen zu untersuchen, so dass dadurch vielleicht auch weitere Einsichten für die Erforschung der Lipid Rafts gewonnen werden können.

Die Rolle der Lipid Rafts für die Signaltransduktion von Rezeptoren wurde in einer ganzen Reihe von Studien festgestellt (Bodin et al., 2001; Pike, 2003; Ushio-Fukai et al., 2001). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass, analog zu dem aktivierenden 2B4 Rezeptor, auch der NKG2D Rezeptor nach Bindung seines spezifischen Liganden in die Lipid Rafts

rekrutiert wird und somit in diesen Membranbereichen nur transient lokalisiert ist. Die molekulare Basis für die Assoziation von NKG2D und phosphoryliertem 2B4 mit den Lipid Rafts als auch der Zusammenhang zwischen der Stabilisierung von NKG2D und 2B4 in den Lipid Rafts und der Aktinpolymerisation ist noch unklar. Es ist jedoch bekannt, dass die Aktivierung von Lymphozyten zu einer Akkumulation der Lipid Rafts führt (Pizzo and Viola, 2003), ein Vorgang, der vom Aktinzytoskelett abhängig ist (Villalba et al., 2001). Die Assoziation der Rezeptoren könnte also durch die Akkumulation der Lipid Rafts stabilisiert werden. Proteine können durch unterschiedliche Umstände mit den Lipid Rafts assoziieren. Die Assoziation kann über die Bindung an GPI-Anker erfolgen, über Azylierungen oder über nicht-kovalente Assoziationen mit anderen residenten Proteinen (Melkonian et al., 1999). Eine Vielzahl von Mechanismen scheinen dabei für die Lokalisation von Proteinen in den Lipid Rafts verantwortlich zu sein. So konnte gezeigt werden, dass die Assoziation von Proteinen mit Cholesterol-reichen Membrandomänen durch die Länge ihrer Transmembrandomäne beeinflusst wird (Bretscher and Munro, 1993). Posttranslationale Modifikationen erwiesen sich als entscheidendes Merkmal, ob ein Protein von den Raft-Domänen ausgeschlossen wird, ob es konstitutiv in den Lipid Rafts lokalisiert ist oder ob es die Möglichkeit hat, in diese Membranbereiche rekrutiert zu werden (Zhang et al., 1998). So scheinen z.B. extrazelluläre Karbohydrat-enthaltende Motive in die Lipid Raft Assoziation involviert zu sein (Kundu et al., 1996; Scheiffele et al., 1995). Die meisten der in den Lipid Rafts konstitutiv lokalisierten Proteine erwiesen sich als S-palmitoyliert (Brown and London, 1998). Dazu gehört auch der Linker for the Activation of T cells (LAT). Die Lokalisation in den Lipid Rafts wird über die Palmitoylierung von zwei konservierten Cysteinresten (C26 und C29) in der Juxtamembranregion des Proteins ermöglicht. Sowohl murines als auch humanes 2B4 enthalten ein ähnliches konserviertes Cystein-Motiv (Cys-Phe-Cys) am zytoplasmatischen Ende der Transmembrandomäne. In der Maus konnte bereits gezeigt werden, dass dieses Cystein-Motif für die Raft-Rekrutierung von 2B4 von Bedeutung ist (Klem et al., 2002). In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Mutationen in diesem Cysteinmotiv auf die Funktion von 2B4 in unterschiedlichen Zytotoxizitäts-Tests untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Transfektion der YTS NK Zelllinie mit zusätzlichem 2B4 im Vergleich zu untransfizierten Zellen zu einer starken Verminderung der NK Zell Zytotoxizität führte (Abb 4.1.2 B, C). Eine Überexpression von 2B4 scheint also einen negativen Effekt auf die Funktionalität der NK Zelle auszuüben.

NK Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche neben 2B4 auch CD48, den Liganden für 2B4. Studien in Mäusen ergaben, dass die 2B4-CD48 Interaktion zwischen NK Zellen zu einer Verstärkung der NK Zell Proliferation nach IL-2 Zugabe führte (Assarsson et al., 2004). Dieser Effekt könnte wichtig sein, damit an Infektionsorten schnell größere Mengen an aktivierten NK Zellen vorhanden sind. Zudem scheint die 2B4-CD48 Interaktion für die Aktivierung von murinen NK Zellen notwendig zu sein (Lee et al., 2005). Die Abwesenheit von funktionellen 2B4-CD48 Interaktionen zwischen NK Zellen bewirkten eine Beeinträchtigung in der NK Zell Zytotoxizität und IFN- γ -Sekretion (Lee et al., 2005). Eine Überexpression von 2B4 durch die Transfektion zusätzlicher 2B4 Moleküle könnte das Gleichgewicht innerhalb der Zelle stören und dazu führen, dass die Zellen einen Selbstschutzmechanismus induzieren, indem sie sowohl die Proliferation als auch ihre Zytotoxizität vermindern. Die Transfektanten mit dem natürlichen 2B4 zeigten die schlechteste Lysekapazität während die 2B4-Transfektanten 2B4-CA und 2B4-LAT eine erhöhte Lysekapazität aufzeigten. Da hier allerdings keine Unterschiede zwischen den Mutanten detektierbar waren, scheint das CxC-Motif auf den ersten Blick keine Rolle zu spielen (Abb 4.1.2 C). Es könnte auch daraufhin deuten, dass die mutanten Moleküle weniger aktiv sind und somit die NK Zelle weniger negativ beeinflussen. Die detektierte Lyse der 721.221 Zellen wird hierbei wahrscheinlich durch die endogenen 2B4 Moleküle der YTS Zellen vermittelt, so dass man keine Aussage über die Beeinflussung der 2B4-vermittelten Lyse durch das CxC-Motiv machen kann. Im Vergleich zu der natürlichen Zytotoxizität gegen 721.221-Zellen, war die Lysekapazität gegen Antikörper-markierte P815 Zellen noch schlechter. Durch die Antikörper wurde hier eine Lyse spezifisch über den transfizierten 2B4-Rezeptor induziert, während in dem Test gegen 721.221 Zellen auch andere NK Zell Rezeptoren aktiviert wurden, da diese Zielzellen nicht nur CD48, sondern auch andere NK Zell Liganden auf ihrer Oberfläche exprimieren. Dies könnte den Unterschied der NK Zell Lysekapazitäten zwischen den beiden Testsystemen erklären.

Neuere Studien in humanen NK Zelllinien zeigten mit Hilfe von 2B4-Chimären, deren Transmembrandomänen mit denen des IL-2 Rezeptors ausgetauscht wurden, dass das fehlende CxC-Motif keinen Einfluss auf die 2B4-vermittelte Proteintyrosin-Phosphorylierung hat (Chen et al., 2004). Phosphorylierte 2B4-Moleküle wurden jedoch nur in Lipid Rafts detektiert (Watzl et al., 2000), so dass man daraus schließen könnte, dass die zwei Cysteine in der Transmembranregion des Rezeptors auch keine Bedeutung für die 2B4-Raft Rekrutierung haben. Frühere Studien in humanen NK Zellen demonstrierten eine konstitutive Assoziation von 2B4 und LAT (Bottino et al., 2000; Chuang et al., 2001).

Experimente in Mäusen zeigten hingegen, dass Mutationen in dem CxC Cystein-Motiv in der Transmembranregion beider murinen 2B4-Formen sowohl die Lokalisation in die Lipid Rafts als auch die Assoziation mit LAT verhinderten. Hier könnten auch Unterschiede zwischen murinem und humanem 2B4 eine Erklärung liefern. Es wäre interessant, herauszufinden, welche Rolle die Assoziation mit LAT bei der 2B4 Raft-Rekrutierung spielt. In humanen NK Zellen wurde demonstriert, dass LAT nach der Aktivierung des 2B4-Rezeptors phosphoryliert wird (Bottino et al., 2000). Analysen in Mäusen zeigten weiterhin, dass der 2B4-Signalweg in der Abwesenheit von LAT defekt ist (Klem et al., 2002). Es wäre weiterhin interessant, herauszufinden, ob dieses CxC-Motif in der Transmembranregion des 2B4 Rezeptors einer posttranslationalen Modifikation unterliegt. Zur näheren Überprüfung der Rolle des CxC Motifs wären jedoch weitere Untersuchungen in anderen Testsystemen erforderlich.

Sowohl primäre NK Zellen als auch NK Zelllinien lassen sich sehr schlecht transfizieren, was die Erforschung der NK Zell Biologie erschwert. Sie erwiesen sich als relativ resistent gegenüber den gängigen Transfektionsmethoden, wie elektrischer, chemischer oder Lipid-vermittelter DNA-Transfer. Die virale Transfektion erwies sich als effektivstes Transfektionsmodell für die schwer zu transfizierenden primären Zellen. Weiterhin zeigte sich eine Nukleofektionsmethode, die die zu transfizierende DNA direkt in den Zellkern einbringt (Amaxa Nucleofection), als geeignet für primäre Immunzellen, wie T, B und NK Zellen. Allerdings erwies sich die in dieser Arbeit verwendeten Transfektionsmethoden über Retroviren und Nukleofektion als nicht ausreichend für spezifische Analysen, da die Transfektionseffizienz zu gering war und die Zellen nicht überlebten oder die Expression mit der Zeit verloren gingen. Eine stabile Transfektion wäre allerdings zur biochemischen Analyse der Fragestellung notwendig gewesen.

Bei Untersuchungen zur Raft-Rekrutierung von Molekülen ist zu beachten, dass Lipid Rafts Doppelmembran-Strukturen sind. Es konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der zytoplasmatischen Seite nicht der extrazellulären Seite entspricht. Die meisten der typischen Raft-Lipide wie Cholesterol, Sphingomyelin und Glykosphingolipide sind in der äußeren Seite der Zellmembran zu finden, während sich die Lipid Rafts der intrazellulären Zellmembran bevorzugt aus Ethanolamin-enthaltenden Glycerophospholipiden zusammensetzen (Pike et al., 2002). Auch die Isolationsmethode führt dazu, dass Lipid Rafts unterschiedlicher Zusammensetzung detektiert werden. So weisen Detergenz-resistente Membranen wesentlich weniger Glycerophospholipide auf als die Rafts, welche mit anderen Isolationsmethoden isoliert wurden (Non-Detergenz Rafts).

In den Detergenz-resistenten Membranen sind zudem kaum Lipide der intrazellulären Rafts wie anionische Phospholipide und Phosphatidyletanolamine, lokalisiert. Diese Unterschiede in der Lipid Zusammensetzung von Detergenz-resistenten und nicht-resistenten Rafts lassen vermuten, dass die Detergenz Behandlung der Membranen selektiv die extrazellulären Lipid Rafts entfernt, so dass nur die Lipide der intrazellulären Rafts übrig bleiben (Pike, 2003; Pike et al., 2002). Zudem wiesen nur die Detergenz-resistenten Rafts einen erhöhten Level an gesättigten Fettsäureketten auf, nicht aber die non-Detergenz Rafts. Diese Daten könnten also die Analyse der Raft-Rekrutierung beeinflussen und zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

2B4 ist einer der am besten charakterisierten, aktivierenden NK Zell Rezeptoren. An die phosphorylierten ITSM Motive von 2B4 können mehrere Moleküle, u.a. SHP-1, SHP-2, SAP und EAT-2 binden (Bhat et al., 2005). Dadurch ist dieser Rezeptor in der Lage, unterschiedliche Signale zu vermitteln. So konnten für 2B4 sowohl aktivierende, als auch kostimulatorische oder sogar inhibierende Fähigkeiten demonstriert werden (Sivori et al., 2002; Sivori et al., 2000). Für die Signalweiterleitung des 2B4 Rezeptors erwies sich das kleine Adaptermolekül SAP als essentielles Signalprotein. Es wird sowohl für die 2B4-vermittelte Proteintyrosinphosphorylierung als auch für die 2B4-vermittelte NK Zell Zytotoxizität benötigt. Durch Studien in NK Zellen von XLP Patienten, denen ein funktionelles SAP Molekül fehlt, konnte gezeigt werden, dass 2B4 nicht in der Lage ist, die NK Zelle zu aktivieren (Benoit et al., 2000; Nakajima et al., 2000; Tangye et al., 2000). Eine weitere Studie wies sogar nach, dass 2B4 auch in SAP defizienten NK Zellen eine inhibierende Signalkaskade induzieren kann und somit die NK Zell Aktivierung verhindert (Parolini et al., 2000).

In dieser Arbeit sollte die Rolle von SAP für die Funktion des 2B4 Rezeptors in humanen NK Zellen näher untersucht werden. Ausgangspunkt hierfür waren widersprüchliche Daten über die Regulation der SAP Expression. Zwei Studien mit humanen T Zellen demonstrierten eine Hochregulation der SAP-Expression nach der T Zell Aktivierung (Nagy et al., 2000; Shinozaki et al., 2002), andere Studien hingegen zeigten eine Runterregulation der SAP Expression nach der Aktivierung der T Zellen, sowohl im humanen als auch im murinen Organismus (Dupre et al., 2005; Okamoto et al., 2004; Wu et al., 2000a). In dieser Arbeit sollte herausgefunden werden, ob die Expression von SAP in humanen NK Zellen ebenfalls einer Regulation unterliegt.

Es konnte zum einen gezeigt werden, dass die SAP-Expression nach einer IL-2 Stimulation in primären humanen NK Zellen hochreguliert wird (Abb 4.2.1). Dies könnte auf den Transkriptionsfaktor Ets-1 zurückzuführen sein. Die Expression von SAP wird durch eine Kombination von transkriptionalen und posttranskriptionalen Mechanismen reguliert. Dabei spielen die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und Ets-2 eine essentielle Rolle, indem sie, sowohl im menschlichen als auch im murinen Organismus, an den Kernpromoter des SAP-Gens binden (Okamoto et al., 2004). Die Nukleotidsequenz der humanen und murinen cDNA sind zu 80% identisch und die Aminosäuresequenz beider Spezies weist sogar eine 87%ige Homologie auf. Die Ets-Konsensusstelle ist für die Aktivität des Basalpromotors entscheidend. In humanen NK Zellen konnte gezeigt werden, dass IL-2 die Expression von Ets-1 posttranskriptional über die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs (MEK>ERK1/2) positiv reguliert. Dadurch lässt sich folgendes Modell aufstellen:

Das von T Zellen und dendritischen Zellen sezernierte IL-2 induziert über die Bindung an den IL-2 Rezeptor der NK Zellen eine Signalkaskade über MEK, die zu der Translation der Ets-1 mRNA führt, Ets-1 wiederum induziert die Expression des SAP-Gens und der SAP Protein-Level steigt an. Ets-1-defiziente Mäuse weisen einen starken Defekt in der NK Zell Entwicklung und der zytolytischen NK Zell Aktivität auf, die IFN- γ Sekretion ist reduziert und Tumore entwickeln sich (Grund et al., 2005). Auch die T Zell Rezeptor vermittelte Aktivierung von T Zellen dieser Mäuse sowie deren Proliferation sind stark beeinträchtigt (Bories et al., 1995). In B Zellen wird Ets1 für den Isotypwechsel bei der Antikörperproduktion benötigt. Ets-1 spielt also nicht nur für die NK Zell Entwicklung und Funktion eine essentielle Rolle, sondern es scheint auch eine wichtige Rolle in anderen Zelllinien zu übernehmen. Knock-out Studien zeigten, dass kein anderes Mitglied der Ets-Familie die Ets-1 Aktivität in NK Zellen kompensieren kann. Dies lässt vermuten, dass der Phänotyp der Ets-1 defizienten Mäuse zumindest teilweise auf die fehlende SAP Expression zurückzuführen sein könnte. Eine Studie zeigte nach der Aktivierung humaner peripherer T Zellen einen Rückgang von Ets-1 (Bhat et al., 1990), was die Runterregulation von SAP nach der T Zell Aktivierung erklären könnte. Es wäre interessant, herauszufinden, ob die Ets Transkriptionsfaktoren in T und NK Zellen unterschiedlich reguliert werden.

Sequenzanalysen der SAP cDNA zeigten mehrere AU-reiche Elemente (ARE) in der 3'UTR Region des SAP Gens auf. ARE sind Signalerkennungsstellen für die Degradation von mRNA. Die beiden RNA-bindenden Proteine AUF1 und HuR erwiesen sich als essentiell in der posttranskriptionalen Regulation des SAP Gens, indem sie an die 3'UTR

Region der SAP mRNA binden und somit eine schnelle mRNA-Degradation induzieren (Okamoto et al., 2004). Eine weitere Regulation der SAP Expression scheint über verschiedene Methylierungsmuster des SAP Gens stattzufinden. Das Methylierungsmuster der CpG-reichen Region in der 5`Region und dem angrenzenden Exon 1 des SAP Gens korrelieren mit der gewebespezifischen Gentranskription (Parolini et al., 2003). In T und NK Zellen sind diese spezifischen Regionen im SAP Gen demethyliert. In B Zellen, Neutrophilen und EBV-transformierten Zellen, die kein SAP exprimieren, sind die in dieser Region lokalisierten CpGs hingegen komplett methyliert (Parolini et al., 2003). Diese Region scheint demnach für die Regulation der SAP Expression essentiell zu sein. Es wäre interessant, herauszufinden, ob sich diese unterschiedlichen Methylierungsmuster von SAP während der Aktivierung von NK oder T Zellen verändern und dadurch die unterschiedliche Regulation der SAP Expression bewirken.

Die Hochregulation der SAP Expression nach der NK Zell Aktivierung war mit dem Auftreten verschiedener Varianten des SAP Proteins verbunden (Abb 4.2.2). Es wurden zwei unterschiedliche Transkripte von humanem SAP identifiziert. Diese unterscheiden sich nur in der Länge ihrer 3`UTR Region (Okamoto et al., 2004). In dieser Arbeit konnten keine Sequenzinformationen erhalten werden, so dass keine Aussage über differentielle Spleißprodukte der SAP Transkripte in ruhenden und IL-2 aktivierten NK Zellen getroffen werden konnten (Abb 4.2.2. D).

Interessanterweise ist jedoch, unter Betrachtung des SAP DNA- und Protein-Musters, zu beobachten, dass sich die Bandenmuster der SAP DNA und des SAP Proteins entsprechen. Beide weisen eine Bande höheren Molekulargewichts und eine Bande niedrigeren Molekulargewichts auf. Die SAP DNA-Banden höheren Molekulargewichts in den IL-2 stimulierten NK Zellen scheinen stärker transkribiert zu werden als die Bande niedrigeren Molekulargewichts, während in unstimulierten NK Zellen beide Banden gleiche Intensität aufweisen. Auf der Proteinebene kann man ebenfalls eine Verschiebung von einer Bande niedrigeren Molekulargewichts zu einer Bande höheren Molekulargewichts in IL-2 stimulierten NK Zellen beobachten. Durch die fehlenden Sequenzinformationen konnte keine Aussage darüber gemacht werden, ob die untere DNA-Bande der unteren Proteinbande entspricht. Die Daten zeigen jedoch, dass nicht nur die Translation des SAP Gens hochreguliert wird, sondern dass es auch schon zu einer verstärkten Transkription des SAP Gens kommt. Dadurch werden die Analysen der SAP mRNA, in der ebenfalls eine Hochregulation gezeigt wurde, bestätigt (Abb 4.2.1.A). Die Tatsache, dass beide SAP-Varianten, die in aktivierten humanen NK Zellen detektiert wurden, von der selben cDNA

nach Transfektion in 293 T Zellen exprimiert werden können, weist darauf hin, dass die unterschiedlichen Migrationsmuster des SAP Proteins in stimulierten NK Zellen durch post-translationale Modifikationen zustande kommen (Abb 4.2.3A). Neuere Studien demonstrierten, dass SAP nach der Bindung an die SRRs nicht Tyrosinphosphoryliert wird (Roncagalli et al., 2005 und unsere unpublizierten Daten), was eine Modifikation durch verschiedene Tyrosinphosphorylierungsmuster des SAP Proteins unwahrscheinlich macht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide Varianten, die in aktivierten NK Zellen gefunden wurden, an den 2B4-Rezeptor binden können (Abb 4.2.3B). Da SAP auch an andere Mitglieder der SRRs binden kann, wäre es interessant zu bestimmen, ob die verschiedenen SAP-Varianten an unterschiedliche Signalmoleküle binden und somit die Signalweiterleitung von 2B4 und die der anderen SRR-Mitglieder beeinflussen, indem sie alternative Signalkaskaden induzieren. Dies würde bedeuten, dass während der NK Zell Aktivierung sich nicht nur die Quantität, sondern auch die Qualität der SAP-vermittelten SRR-Signale ändern könnte.

Nach 24 h IL-2 Stimulation konnte ein temporärer Verlust des SAP Proteins detektiert werden (Abb 4.2.1B und Abb 4.2.4A). Durch die Zirkulation im Blut sind NK Zellen im Körper weit verbreitet und befinden sich sowohl in lymphoiden Organen als auch in nicht-lymphoiden peripheren Geweben. Sie sind somit ununterbrochen mit einer Vielzahl von Zytokinen und weiteren sezernierten Faktoren in Kontakt, die von anderen Zelltypen freigesetzt werden. Diese können die NK Zell Funktion über die Aktivierung verschiedener Signalwege, wie die MAP Kinase Signalwege über ERK1/2, p38, c-Jun oder den PI3 Kinase Signalweg regulieren (Colucci et al., 2003). Diese Signalwege leiten externe Signale zum Zellkern weiter und aktivieren eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren, die die für die Zellproliferation, Zytokinsekretion oder Zytotoxizität benötigte Genexpression induzieren (Gaffen, 2001). Nach der Isolation der NK Zellen und der Kultivierung *in vitro* sind diese Faktoren nicht mehr vorhanden. Dies könnte zu einer Unterbrechung der SAP Expression führen. Es ist bekannt, dass IL-2 die Translation des SAP-Transkriptionsfaktors Ets-1 induziert. Wird jetzt nach Isolation der NK Zellen IL-2 zugegeben, führt dies zunächst zur Translation von Ets-1 und dann zur erneuten Expression des SAP Proteins. Das veränderte Laufverhalten von SAP nach Tag 2 könnte wiederum auf die veränderte posttranslationale Modifikation in aktivierten NK Zellen zurückzuführen sein. Durch die zusätzliche Stimulation der NK Zellen mit IFN- α , IL-12 oder polyI:C wurde der temporäre Verlust der SAP-Expression wieder aufgehoben (Abb 4.2.4). Zudem konnte eine verstärkte Expression des SAP Proteins im Vergleich zu

der Stimulation über IL-2 alleine, detektiert werden (Abb 4.2.4). Für all diese Faktoren wurde gezeigt, dass sie zu der NK Zell Funktion beitragen (Biron, 2001; Ortaldo and Young, 2003; Sivori et al., 2004).

Bisher gibt es wenig Daten über die Zielgene von IFN- α , IL-12 und polyI:C, die in die immunstimulatorischen Effekte dieser Zytokine involviert sind. Für IL-12 und IFN α wurde gezeigt, dass sie eine Hochregulation der mRNA und Proteinexpression von Mitgliedern der Interferon Regulatory Factor-Familie (IRF) in NK und T Zellen induzieren (Lehtonen et al., 2003). Diese Transkriptionsfaktoren sind in die Kontrolle der Lymphozytendifferenzierung und –funktion involviert. PolyI:C hingegen bewirkt in NK Zellen eine Hochregulation der 2B4 Expression *in vivo* (Sivori et al., 2004). Der in dieser Arbeit beschriebene Einfluss von IFN- α , IL-12 und polyI:C auf die SAP Expression weist darauf hin, dass diese Faktoren ebenfalls die SAP-Expression positiv beeinflussen. Es wäre interessant herauszufinden, ob die Signale ebenfalls über die Expression des Ets-1 Transkriptionsfaktors induziert werden. Die Aufhebung des temporären Verlusts an SAP sowie die erhöhte SAP Expression könnte durch das Zusammenspiel von IL-2 mit den einzelnen Faktoren zu erklären sein, indem sie zusammen eine verstärkte Ets-1 Expression induzieren und somit die daran gekoppelte SAP Expression verstärken. In die Signalkaskade von IL-12, IFN- α oder polyI:C könnten auch andere SAP-Transkriptionsfaktoren als Ets-1 involviert sein, die nicht erst exprimiert werden, sondern nur noch aktiviert werden müssen und somit frühzeitiger die SAP Expression induzieren. Die Bedeutung des Zusammenspiels zwischen bestimmten Zytokinen wurde bereits demonstriert. So konnte gezeigt werden, dass erst die koordinierte Interaktion zwischen Zytokinen wie IFN- α/β , IL-12 und IL-15 zu einer Aktivierung der NK Zellen nach viraler Infektion führte (Nguyen et al., 2002).

In dieser Arbeit wurde mittels Zytotoxizitäts-Tests weiterhin untersucht, ob der beobachtete Einfluss der genannten Stimuli auf die SAP Expression auch einen Effekt auf die Funktionalität des 2B4 Rezeptors hat. Um den Einfluss der einzelnen Stimuli auf die SAP-Expression zu untersuchen, wurde den primären Zellen nur geringste Mengen an IL-2 zugegeben. Unter diesen Bedingungen waren die Zellen schwierig zu kultivieren, so dass ein möglicher Effekt experimentell nicht gezeigt werden konnte. Theoretisch wäre es jedoch möglich, dass diese Stimuli die 2B4-Aktivität beeinflussen.

Die 2B4-vermittelte Proteinphosphorylierung ist vollkommen vom SAP-Protein und dessen Rekrutierung der Src-Kinase FynT abhängig (Chan et al., 2003; Latour et al., 2003). NK Zellen von XLP Patienten, die kein SAP exprimieren oder nur mutierte SAP

Moleküle, können nicht über den 2B4 Rezeptor aktiviert werden. In dieser Arbeit wurde eine klare Korrelation zwischen der Menge an exprimiertem SAP Protein und der Funktion des 2B4-Rezeptors detektiert. Ruhende NK Zellen, die wenig SAP exprimierten, zeigten keine oder nur geringfügige Unterschiede in der Lyse der Baf/3 und Baf/3-CD48 Zellen. Baf/3 Zellen exprimieren keine bekannten aktivierenden Liganden für humane NK Zellen. Dies weist darauf hin, dass die Aktivierung des 2B4 Rezeptors alleine nicht ausreicht, um ruhende NK Zellen zu aktivieren, was durch neuere Studien bestätigt wurde (Bryceson et al., 2006). Die verstärkte Lyse der K562-CD48 Transfektanten, im Vergleich zu den untransfizierten K562 Zellen, zeigt jedoch deutlich, dass 2B4 selbst bei Vorhandensein geringer Mengen an SAP, funktionell ist. K562 Zellen exprimieren einige Liganden für aktivierende NK Zell Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, wodurch die erhöhte Lyse der untransfizierten K562 zu erklären ist. Diese Daten zeigen, bestätigt von neueren Studien (Bryceson et al., 2006), dass 2B4 in ruhenden NK Zellen erst in Synergie mit anderen aktivierenden Rezeptoren die Aktivierung der NK Zelle induziert. In aktivierten NK Zellen hingegen, die hohe Mengen an SAP exprimieren, reichen die Signale des 2B4 Rezeptors alleine aus, um die NK Zelle zu aktivieren, was durch die verstärkte Lyse der Baf/3-CD48 Zellen ersichtlich wird. Diese Daten führen zu der Vermutung, dass die Regulation der SAP Expression während der NK Zell Aktivierung eine veränderte 2B4-Funktion zur Folge hat, und zwar von einem kostimulatorischen Molekül in ruhenden NK Zellen zu einem eigenständigen, aktivierenden Rezeptor in stimulierten NK Zellen.

Die Funktionalität von 2B4 in ruhenden NK Zellen mit geringer SAP-Expression könnte jedoch auch durch EAT-2 zu erklären sein: In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass auch die Expression von EAT-2 während der NK Zell Aktivierung reguliert wird. In ruhenden NK Zellen werden große Mengen an EAT-2 exprimiert, während SAP in diesen Zellen nur einen schwachen Expressionslevel aufweist. In aktivierten NK Zellen ist das Verhältnis entgegengesetzt. Hier sind große Mengen an SAP Protein und niedrige Mengen an EAT-2 detektierbar. EAT-2 kann ebenfalls mit 2B4 assoziieren (Morra et al., 2001b; Roncagalli et al., 2005; Tassi and Colonna, 2005 und unsere unpublizierten Daten). Dadurch wäre es auch vorstellbar, dass EAT-2 in ruhenden NK Zellen die Signalweiterleitung des 2B4-Rezeptors übernimmt, indem es die Signale des SAP Proteins durch Kompensation ersetzt oder ergänzt. EAT-2 fehlt jedoch ein bestimmter Argininrest, durch den SAP an Fyn bindet und ist somit nicht in der Lage, die Src-Kinase Fyn an die SRR zu rekrutieren. Demnach müsste es eine andere Signalkaskade induzieren. Dies würde

bedeuten, dass 2B4 durch EAT-2 Signale in ruhenden NK Zellen induziert und SAP für die Signalweiterleitung in aktivierten NK Zellen verwendet.

Neuere Studien zeigten, dass EAT-2 in Mäusen inhibierende Signale vermittelt. Dies ist abhängig von der Phosphorylierung von zwei Tyrosinresten im C-terminalen Bereich von EAT-2 (Roncagalli et al., 2005). In dieser Arbeit wurde keine inhibierende Funktion von 2B4 in ruhenden NK Zellen, die nur geringe oder keine detektierbaren SAP-Mengen, jedoch große Mengen an EAT-2 exprimierten, beobachtet. Eine neue Publikation zeigte, dass EAT-2 positive Signale über den CRACC (CS1, CD319) Rezeptor induzieren kann (Tassi and Colonna, 2005). Es wurde auch eine Assoziation von EAT-2 an NTB-A, einem weiteren SRR, gefunden sowie der Nachweis, dass EAT-2 die NTB-A abhängige NK Zell Aktivierung vermitteln kann (unsere unpublizierten Daten). Diese Daten weisen eindeutig darauf hin, dass EAT-2 in humanen NK Zellen aktivierende Signale vermittelt. Dieser Unterschied in der Funktion von EAT-2 in Maus und Mensch könnte auf die Unterschiede zwischen humanem und murinem EAT-2 zurückzuführen sein. Humanem EAT-2 fehlt eines der C-terminalen Tyrosine, die für die inhibierende Funktion in der Maus benötigt werden. Da EAT-2 durch den fehlenden Argininrest nicht in der Lage ist, die Src-Kinase Fyn an die SRR zu rekrutieren (s.o.), bleibt es weiterhin unklar, wie dieses Adapterprotein eine aktivierende Signalkaskade initiieren kann.

Es konnte gezeigt werden, dass EAT-2 die Assoziation von SH2-haltigen Phosphatasen an SLAM blockiert (Morra et al., 2001b). Allerdings kann die aktivierende Funktion von EAT-2 nicht alleine durch die Blockade der Assoziation anderer Moleküle an die ITSM der SRR erklärt werden. Es wäre interessant herauszufinden, wie sich die EAT-2 vermittelten Signale von denen des SAP Proteins unterscheiden. Um die Rolle von EAT-2 und SAP für die 2B4 Funktion näher zu beleuchten, wären SAP- und EAT-2-defiziente Zellen interessante Ansätze. Ein gutes Modell wären NK Zellen aus XLP-Patienten. Es gibt jedoch auch die Möglichkeit, die SAP-mRNA mittels siRNA herunter zu regulieren.

Die Signaltransduktion von 2B4 ist nicht nur für das Verständnis von NK Zellen von Bedeutung. Sowohl der 2B4-Rezeptor als auch SAP werden in NK Zellen und in CD8⁺ T Zellen exprimiert und kann zu deren Proliferation als auch zu der Verstärkung der Zytotoxizität dieser Zellen führen (Kambayashi et al., 2001; Lee et al., 2003). EAT-2 wurde ebenfalls in CD8⁺ T Zellen detektiert (Tassi and Colonna, 2005), so dass ein interessanter Ansatz wäre, zu überprüfen ob die unterschiedliche Regulation von SAP und EAT-2 auch in diesen Immunzellen existiert.

Studien mit SAP und EAT-2 zeigten, dass beide Adaptoren an ein bestimmtes Sequenzmotiv binden (TIpYxxV/I, T Threonin, pY Phosphotyrosin, V Valin, I Isoleucin, x=beliebiger Rest). Dieses Motiv existiert in einer oder mehreren Kopien in fast allen SRRs außer CRACC (CS1, CD319) (Li et al., 2003; Li et al., 1999b; Poy et al., 1999; Sayos et al., 1998) und ermöglicht somit die Assoziation der SRRs mit SAP und EAT-2 (Chen et al., 2004; Latour et al., 2001; Sayos et al., 2001; Sayos et al., 2000; Sayos et al., 1998). Dabei ist die Beobachtung in humanen NK Zellen interessant, dass CRACC anscheinend EAT-2, nicht aber SAP binden kann (Bouchon et al., 2001; Tassi and Colonna, 2005), was darauf hin deutet, dass EAT-2 und SAP an weitere, unterschiedliche Sequenzmotive binden können und dadurch möglicherweise unterschiedliche Signalwege induzieren. Es wäre interessant herauszufinden, welche Rolle EAT-2 bei der Signaltransduktion dieser SRRs spielt. Besonders interessant zu überprüfen wäre die Expression von EAT-2 in den Studien mit NK Zellen aus XLP Patienten oder unreifen NK Zellen, in denen eine inhibierende Funktion von 2B4 beobachtet wurde (Parolini et al., 2000; Sivori et al., 2002). Im Gegensatz zu der Phosphatase SHP-1, die bereits in den NK-Vorläuferzellen exprimiert wird, konnte SAP nicht in unreifen NK Zellen detektiert werden (Sivori et al., 2002). Bisher wird vermutet, dass die inhibitorische Funktion über die Bindung von SHP-1 an 2B4 induziert wird (Chen et al., 2004; Eissmann et al., 2005; Tangye et al., 1999). Da EAT-2 in humanen NK Zellen aktivierende Signale zu induzieren scheint, wäre es zu erwarten, dass es in unreifen NK Zellen ebenfalls noch nicht exprimiert ist. Allerdings ist hier auch die Bindungsaffinität der unterschiedlichen Signalmoleküle an die verschiedenen ITSM von Bedeutung. SAP dominiert über SHP-1 bei der Bindung an das dritte ITSM des 2B4 Rezeptors (Eissmann et al., 2005). Es wäre interessant herauszufinden, an welches ITSM EAT-2 bindet und welche Bindungsaffinität es besitzt, d.h., ob es ebenfalls mit SHP-1 konkurriert und welchen Einfluss SAP dabei hat.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die Regulation der SAP Expression in humanen NK Zellen für die Funktion des 2B4 Rezeptors von großer Bedeutung zu sein scheinen. Dadurch könnte eventuell die Vielseitigkeit der von 2B4 vermittelten Signale zu erklären sein. Bei niedriger SAP-Expression in ruhenden NK Zellen induziert 2B4 nur kostimulatorische Signale während bei einer hohen SAP-Expressionsrate die 2B4-vermittelten Signale stark genug sind, unabhängig die NK Zell Aktivierung zu induzieren. Die Rolle von EAT-2 als möglicher Ko-Stimulator bedarf dabei eingehenderer Analysen.

Die molekularen Mechanismen der NK Zell Regulation zu verstehen, ist für mögliche Therapieansätze von immenser Bedeutung. So zeigten Studien mit humanen Lungenkarzinomen, dass eine induzierte Überexpression des NKG2D-Liganden MICA über adenovirale Transduktion oder Transfektion von MICA-Expressionsplasmiden, als NK Zell vermittelte Immuntherapie eingesetzt werden kann (Busche et al., 2005). Weitere klinische Ansätze in der Tumorthherapie nutzen die über CD16 vermittelte Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) der NK Zellen, indem sie spezifisch Antikörper applizieren (Watson et al., 2005).

Therapien des Non-Hodgkin-Lymphoms verwenden monoklonale Antikörper, die gegen CD20 (Rituximab) auf den Lymphomzellen gerichtet sind, um damit die Lyse der Rituximab-markierten Tumorzellen über NK Zellen zu induzieren (Smith, 2003). Ein anderer interessanter Therapieansatz, der bei der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) eingesetzt wird, basiert auf einer fehlenden Inhibition der NK Zellen. AML-Patienten erhalten eine Knochenmarkstransplantation. Dabei ist es wichtig, dass die Spender-NK Zellen keine inhibierenden Rezeptoren exprimieren, die an die MHC Klasse I Moleküle des Empfängers binden können. Durch die fehlende Inhibition kommt es zur Aktivierung der Spender NK Zellen und einer Graft-versus-Leukemia Reaktion, wodurch die Bildung einer neuen Leukämie vermindert wird (Ruggeri et al., 2002). All diese Therapien fördern entweder die Aktivierung der NK Zellen durch zusätzliche Stimuli oder verhindern die NK Zell Inhibition, was die Bedeutung der Balance zwischen positiven und negativen Signalen in NK Zellen unterstreicht und eine guter Ansatz für NK Zell-basierende Therapien sein könnte.

6. Abkürzungen

ABB.	Abbildung
AS	Aminosäure
ADCC	engl. Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
BZR	B Zell Rezeptor
CD	engl. Cluster of Differentiation
DAP 10/12	DNAX-aktivierendes Protein von 10/12 kD
DC	engl. Dendritic cells
EAT-2	engl. Ewing's sarcoma-associated transcript-2
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ELISA	engl. Enzyme-linked immunoabsorbent assay
E/T	engl. Effector cell (E)/ Target cell (T)
FACS	engl. Fluorescence-activated cell separation
GEM	engl. Glycosphingolipid-enriched microdomains
GPI	Glykosylphosphatidyl-Inositol
GM-CSF	engl. Granulocyte makrophage colony stimulating factor
HA	Hämagglutinin
HIS	Histidin
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IS	Immunologische Synapse
ITAM	engl. Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	engl. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
ITSM	engl. Immunoreceptor tyrosine-based switch motif
JAK2	Janus Kinase 2
kDa	Kilo Dalton
KIR	engl. Killer cell immunglobulin-like receptor
LAT	engl. Linker for activation of T cells
LFA-1	engl. Lymphocyte function-associated antigen-1
Mab	engl. Monoclonal antibody
MHC	engl. Major histocompatibility complex
MICA/B	engl. MHC class I related molecules A und B
MMP	Matrix Metalloproteinasen
NKIS	Natürliche Killerzell Synapse
NKZ	Natürliche Killerzelle
NTB-A	NK, T, B Zell Antigen
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PLC	Phospholipase
SAP	engl. SLAM-associated protein
SDS	engl. Sodium dodecyl sulfate
SH2	engl. Src homolgy 2
SLAM	engl. Signaling lymphocyte activation molecule
SRR	engl. SLAM-related receptors

Abkürzungen

SH2D1A	engl. SH2-domain binding protein 1A
SHIP	engl. SH2-domain containing inositol-phosphatase
SHP1/2	engl. SH2-domain containing phosphatase 1/2
TGF- β	engl. Transforming growth factor- β
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T Zell Rezeptor
ULBP	engl. UL-16 binding protein
UpM	Umdrehungen pro Minute
XLP	engl. X-linked lymphoproliferative disease
ZAP-70	engl. ζ -associated protein of 70 kDa

7. Literaturverzeichnis

- Akira, S., and Hemmi, H. (2003). Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 85, 85-95.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738.
- Alland, L., Peseckis, S. M., Atherton, R. E., Berthiaume, L., and Resh, M. D. (1994). Dual myristylation and palmitoylation of Src family member p59fyn affects subcellular localization. *J Biol Chem* 269, 16701-16705.
- Andre, P., Castriconi, R., Espeli, M., Anfossi, N., Juarez, T., Hue, S., Conway, H., Romagne, F., Dondero, A., Nanni, M., *et al.* (2004). Comparative analysis of human NK cell activation induced by NKG2D and natural cytotoxicity receptors. *Eur J Immunol* 34, 961-971.
- Aoukaty, A., and Tan, R. (2002). Association of the X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP/SH2D1A with 2B4, a natural killer cell-activating molecule, is dependent on phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 277, 13331-13337.
- Arcaro, A., Gregoire, C., Boucheron, N., Stotz, S., Palmer, E., Malissen, B., and Luescher, I. F. (2000). Essential role of CD8 palmitoylation in CD8 coreceptor function. *J Immunol* 165, 2068-2076.
- Arnon, T. I., Lev, M., Katz, G., Chernobrov, Y., Porgador, A., and Mandelboim, O. (2001). Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol* 31, 2680-2689.
- Assarsson, E., Kambayashi, T., Schatzle, J. D., Cramer, S. O., von Bonin, A., Jensen, P. E., Ljunggren, H. G., and Chambers, B. J. (2004). NK cells stimulate proliferation of T and NK cells through 2B4/CD48 interactions. *J Immunol* 173, 174-180.
- Bahram, S., Bresnahan, M., Geraghty, D. E., and Spies, T. (1994). A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6259-6263.
- Barber, D. F., Faure, M., and Long, E. O. (2004). LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity. *J Immunol* 173, 3653-3659.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727-729.
- Benoit, L., Wang, X., Pabst, H. F., Dutz, J., and Tan, R. (2000). Defective NK cell activation in X-linked lymphoproliferative disease. *J Immunol* 165, 3549-3553.
- Bhat, N. K., Thompson, C. B., Lindsten, T., June, C. H., Fujiwara, S., Koizumi, S., Fisher, R. J., and Papas, T. S. (1990). Reciprocal expression of human ETS1 and ETS2 genes during T-cell activation: regulatory role for the protooncogene ETS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3723-3727.
- Bhat, R., Eissmann, P., Endt, J., Hoffmann, S., and Watzl, C. (2005). Fine-tuning of immune responses by SLAM-related receptors. *J Leukoc Biol*.
- Billadeau, D. D., Brumbaugh, K. M., Dick, C. J., Schoon, R. A., Bustelo, X. R., and Leibson, P. J. (1998). The Vav-Rac1 pathway in cytotoxic lymphocytes regulates the generation of cell-mediated killing. *J Exp Med* 188, 549-559.
- Billadeau, D. D., Upshaw, J. L., Schoon, R. A., Dick, C. J., and Leibson, P. J. (2003). NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nat Immunol* 4, 557-564.

- Binstadt, B. A., Billadeau, D. D., Jevremovic, D., Williams, B. L., Fang, N., Yi, T., Koretzky, G. A., Abraham, R. T., and Leibson, P. J. (1998). SLP-76 is a direct substrate of SHP-1 recruited to killer cell inhibitory receptors. *J Biol Chem* *273*, 27518-27523.
- Binstadt, B. A., Brumbaugh, K. M., Dick, C. J., Scharenberg, A. M., Williams, B. L., Colonna, M., Lanier, L. L., Kinet, J. P., Abraham, R. T., and Leibson, P. J. (1996). Sequential involvement of Lck and SHP-1 with MHC-recognizing receptors on NK cells inhibits FcR-initiated tyrosine kinase activation. *Immunity* *5*, 629-638.
- Biron, C. A. (1997). Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr Opin Immunol* *9*, 24-34.
- Biron, C. A. (2001). Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. *Immunity* *14*, 661-664.
- Biron, C. A., Byron, K. S., and Sullivan, J. L. (1989). Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* *320*, 1731-1735.
- Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P., and Salazar-Mather, T. P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* *17*, 189-220.
- Bodin, S., Giuriato, S., Ragab, J., Humbel, B. M., Viala, C., Vieu, C., Chap, H., and Payrastre, B. (2001). Production of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and phosphatidic acid in platelet rafts: evidence for a critical role of cholesterol-enriched domains in human platelet activation. *Biochemistry* *40*, 15290-15299.
- Boles, K. S., Stepp, S. E., Bennett, M., Kumar, V., and Mathew, P. A. (2001). 2B4 (CD244) and CS1: novel members of the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily molecules expressed on natural killer cells and other leukocytes. *Immunol Rev* *181*, 234-249.
- Bories, J. C., Willerford, D. M., Grevin, D., Davidson, L., Camus, A., Martin, P., Stehelin, D., and Alt, F. W. (1995). Increased T-cell apoptosis and terminal B-cell differentiation induced by inactivation of the Ets-1 proto-oncogene. *Nature* *377*, 635-638.
- Bottino, C., Augugliaro, R., Castriconi, R., Nanni, M., Biassoni, R., Moretta, L., and Moretta, A. (2000). Analysis of the molecular mechanism involved in 2B4-mediated NK cell activation: evidence that human 2B4 is physically and functionally associated with the linker for activation of T cells. *Eur J Immunol* *30*, 3718-3722.
- Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., Cantoni, C., Grassi, J., Marcenaro, S., Reymond, N., *et al.* (2003). Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med* *198*, 557-567.
- Bottino, C., Falco, M., Parolini, S., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Sivori, S., Landi, E., Biassoni, R., Notarangelo, L. D., Moretta, L., and Moretta, A. (2001). NTB-A [correction of GNTB-A], a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J Exp Med* *194*, 235-246.
- Bouchon, A., Cella, M., Grierson, H. L., Cohen, J. I., and Colonna, M. (2001). Activation of NK cell-mediated cytotoxicity by a SAP-independent receptor of the CD2 family. *J Immunol* *167*, 5517-5521.
- Bretscher, M. S., and Munro, S. (1993). Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science* *261*, 1280-1281.
- Brooks, A. G., Posch, P. E., Scorzelli, C. J., Borrego, F., and Coligan, J. E. (1997). NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor. *J Exp Med* *185*, 795-800.
- Brown, D. A., and London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* *14*, 111-136.

- Brown, D. A., and London, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 275, 17221-17224.
- Brown, M. H., Boles, K., van der Merwe, P. A., Kumar, V., Mathew, P. A., and Barclay, A. N. (1998). 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J Exp Med* 188, 2083-2090.
- Brumbaugh, K. M., Binstadt, B. A., Billadeau, D. D., Schoon, R. A., Dick, C. J., Ten, R. M., and Leibson, P. J. (1997). Functional role for Syk tyrosine kinase in natural killer cell-mediated natural cytotoxicity. *J Exp Med* 186, 1965-1974.
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G., and Long, E. O. (2006). Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107, 159-166.
- Busche, A., Goldmann, T., Naumann, U., Steinle, A., and Brandau, S. (2005). Natural Killer Cell-Mediated Rejection of Experimental Human Lung Cancer by Genetic Overexpression of Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related Gene A. *Hum Gene Ther*.
- Carayannopoulos, L. N., Naidenko, O. V., Fremont, D. H., and Yokoyama, W. M. (2002). Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J Immunol* 169, 4079-4083.
- Carena, I., Shamshiev, A., Donda, A., Colonna, M., and Libero, G. D. (1997). Major histocompatibility complex class I molecules modulate activation threshold and early signaling of T cell antigen receptor-gamma/delta stimulated by nonpeptidic ligands. *J Exp Med* 186, 1769-1774.
- Carretero, M., Cantoni, C., Bellon, T., Bottino, C., Biassoni, R., Rodriguez, A., Perez-Villar, J. J., Moretta, L., Moretta, A., and Lopez-Botet, M. (1997). The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *Eur J Immunol* 27, 563-567.
- Castriconi, R., Cantoni, C., Della Chiesa, M., Vitale, M., Marcenaro, E., Conte, R., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (2003). Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4120-4125.
- Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (2000). Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol* 1, 305-310.
- Cerwenka, A., Bakker, A. B., McClanahan, T., Wagner, J., Wu, J., Phillips, J. H., and Lanier, L. L. (2000). Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* 12, 721-727.
- Cerwenka, A., Baron, J. L., and Lanier, L. L. (2001). Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11521-11526.
- Cerwenka, A., and Lanier, L. L. (2001). Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol* 1, 41-49.
- Chan, B., Lanyi, A., Song, H. K., Griesbach, J., Simarro-Grande, M., Poy, F., Howie, D., Sumegi, J., Terhorst, C., and Eck, M. J. (2003). SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nat Cell Biol* 5, 155-160.
- Chan, C. W., Crafton, E., Fan, H. N., Flook, J., Yoshimura, K., Skarica, M., Brockstedt, D., Dubensky, T. W., Stins, M. F., Lanier, L. L., *et al.* (2006). Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med* 12, 207-213.
- Chang, C., Dietrich, J., Harpur, A. G., Lindquist, J. A., Haude, A., Loke, Y. W., King, A., Colonna, M., Trowsdale, J., and Wilson, M. J. (1999). Cutting edge: KAP10, a novel

- transmembrane adapter protein genetically linked to DAP12 but with unique signaling properties. *J Immunol* *163*, 4651-4654.
- Chen, R., Relouzat, F., Roncagalli, R., Aoukaty, A., Tan, R., Latour, S., and Veillette, A. (2004). Molecular dissection of 2B4 signaling: implications for signal transduction by SLAM-related receptors. *Mol Cell Biol* *24*, 5144-5156.
- Chua, H. L., Serov, Y., and Brahmi, Z. (2004). Regulation of FasL expression in natural killer cells. *Hum Immunol* *65*, 317-327.
- Chuang, S. S., Kim, M. H., Johnson, L. A., Albertsson, P., Kitson, R. P., Nannmark, U., Goldfarb, R. H., and Mathew, P. A. (2000). 2B4 stimulation of YT cells induces natural killer cell cytolytic function and invasiveness. *Immunology* *100*, 378-383.
- Chuang, S. S., Kumaresan, P. R., and Mathew, P. A. (2001). 2B4 (CD244)-mediated activation of cytotoxicity and IFN-gamma release in human NK cells involves distinct pathways. *J Immunol* *167*, 6210-6216.
- Coffey, A. J., Brooksbank, R. A., Brandau, O., Oohashi, T., Howell, G. R., Bye, J. M., Cahn, A. P., Durham, J., Heath, P., Wray, P., *et al.* (1998). Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat Genet* *20*, 129-135.
- Colucci, F., Caligiuri, M. A., and Di Santo, J. P. (2003). What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol* *3*, 413-425.
- Colucci, F., Di Santo, J. P., and Leibson, P. J. (2002). Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons? *Nat Immunol* *3*, 807-813.
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., and Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* *22*, 633-640.
- Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C. L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., and Chalupny, N. J. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* *14*, 123-133.
- Das, H., Groh, V., Kuijl, C., Sugita, M., Morita, C. T., Spies, T., and Bukowski, J. F. (2001). MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity* *15*, 83-93.
- Davis, D. M., Chiu, I., Fassett, M., Cohen, G. B., Mandelboim, O., and Strominger, J. L. (1999). The human natural killer cell immune synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 15062-15067.
- de Bouteiller, O., Merck, E., Hasan, U. A., Hubac, S., Benguigui, B., Trinchieri, G., Bates, E. E., and Caux, C. (2005). Recognition of double-stranded RNA by human toll-like receptor 3 and downstream receptor signaling requires multimerization and an acidic pH. *J Biol Chem* *280*, 38133-38145.
- Degli-Esposti, M. A., and Smyth, M. J. (2005). Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat Rev Immunol* *5*, 112-124.
- Diefenbach, A., Hsia, J. K., Hsiung, M. Y., and Raulet, D. H. (2003). A novel ligand for the NKG2D receptor activates NK cells and macrophages and induces tumor immunity. *Eur J Immunol* *33*, 381-391.
- Diefenbach, A., Jamieson, A. M., Liu, S. D., Shastri, N., and Raulet, D. H. (2000). Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* *1*, 119-126.
- Diefenbach, A., Jensen, E. R., Jamieson, A. M., and Raulet, D. H. (2001). Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* *413*, 165-171.
- Diefenbach, A., Tomasello, E., Lucas, M., Jamieson, A. M., Hsia, J. K., Vivier, E., and Raulet, D. H. (2002). Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol* *3*, 1142-1149.

- Dokun, A. O., Kim, S., Smith, H. R., Kang, H. S., Chu, D. T., and Yokoyama, W. M. (2001). Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nat Immunol* 2, 951-956.
- Douglass, A. D., and Vale, R. D. (2005). Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells. *Cell* 121, 937-950.
- Dupre, L., Andolfi, G., Tangye, S. G., Clementi, R., Locatelli, F., Arico, M., Aiuti, A., and Roncarolo, M. G. (2005). SAP controls the cytolytic activity of CD8+ T cells against EBV-infected cells. *Blood* 105, 4383-4389.
- Dykstra, M., Cherukuri, A., Sohn, H. W., Tzeng, S. J., and Pierce, S. K. (2003). Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu Rev Immunol* 21, 457-481.
- Eissmann, P., Beauchamp, L., Wooters, J., Tilton, J. C., Long, E. O., and Watzl, C. (2005). Molecular basis for positive and negative signaling by the natural killer cell receptor 2B4 (CD244). *Blood* 105, 4722-4729.
- Engel, P., Eck, M. J., and Terhorst, C. (2003). The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat Rev Immunol* 3, 813-821.
- Eriksson, M., Ryan, J. C., Nakamura, M. C., and Sentman, C. L. (1999). Ly49A inhibitory receptors redistribute on natural killer cells during target cell interaction. *Immunology* 97, 341-347.
- Fassett, M. S., Davis, D. M., Valter, M. M., Cohen, G. B., and Strominger, J. L. (2001). Signaling at the inhibitory natural killer cell immune synapse regulates lipid raft polarization but not class I MHC clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14547-14552.
- Faure, M., Barber, D. F., Takahashi, S. M., Jin, T., and Long, E. O. (2003). Spontaneous clustering and tyrosine phosphorylation of NK cell inhibitory receptor induced by ligand binding. *J Immunol* 170, 6107-6114.
- Ferlazzo, G., and Munz, C. (2004). NK cell compartments and their activation by dendritic cells. *J Immunol* 172, 1333-1339.
- Finco, T. S., Kadlecsek, T., Zhang, W., Samelson, L. E., and Weiss, A. (1998). LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* 9, 617-626.
- Fisher, R. C., and Thorley-Lawson, D. A. (1991). Characterization of the Epstein-Barr virus-inducible gene encoding the human leukocyte adhesion and activation antigen BLAST-1 (CD48). *Mol Cell Biol* 11, 1614-1623.
- Flaig, R. M., Stark, S., and Watzl, C. (2004). Cutting edge: NTB-A activates NK cells via homophilic interaction. *J Immunol* 172, 6524-6527.
- Fraser, C. C., Howie, D., Morra, M., Qiu, Y., Murphy, C., Shen, Q., Gutierrez-Ramos, J. C., Coyle, A., Kingsbury, G. A., and Terhorst, C. (2002). Identification and characterization of SF2000 and SF2001, two new members of the immune receptor SLAM/CD2 family. *Immunogenetics* 53, 843-850.
- Gaffen, S. L. (2001). Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine* 14, 63-77.
- Garni-Wagner, B. A., Purohit, A., Mathew, P. A., Bennett, M., and Kumar, V. (1993). A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells. *J Immunol* 151, 60-70.
- Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E. J., and Raulet, D. H. (2005). The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 436, 1186-1190.
- Ghiringhelli, F., Menard, C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., Chaput, N., Puig, P. E., Novault, S., Escudier, B., Vivier, E., *et al.* (2005). CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 202, 1075-1085.

- Gilfillan, S., Ho, E. L., Cella, M., Yokoyama, W. M., and Colonna, M. (2002). NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol* 3, 1150-1155.
- 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, M. S., Riddell, S. R., 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.
- Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K. H., and Spies, T. (1999). Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6879-6884.
- Grund, E. M., Spyropoulos, D. D., Watson, D. K., and Muise-Helmericks, R. C. (2005). Interleukins 2 and 15 regulate Ets1 expression via ERK1/2 and MNK1 in human natural killer cells. *J Biol Chem* 280, 4772-4778.
- Hamerman, J. A., Ogasawara, K., and Lanier, L. L. (2004). Cutting edge: Toll-like receptor signaling in macrophages induces ligands for the NKG2D receptor. *J Immunol* 172, 2001-2005.
- Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., and Simons, K. (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* 141, 929-942.
- Harder, T., and Simons, K. (1999). Clusters of glycolipid and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in lymphoid cells: accumulation of actin regulated by local tyrosine phosphorylation. *Eur J Immunol* 29, 556-562.
- Herberman, R. B. (1982). Immunoregulation and natural killer cells. *Mol Immunol* 19, 1313-1321.
- Herberman, R. B., Nunn, M. E., Holden, H. T., and Lavrin, D. H. (1975a). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer* 16, 230-239.
- Herberman, R. B., Nunn, M. E., and Lavrin, D. H. (1975b). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer* 16, 216-229.
- Holmes, M. A., Li, P., Petersdorf, E. W., and Strong, R. K. (2002). Structural studies of allelic diversity of the MHC class I homolog MIC-B, a stress-inducible ligand for the activating immunoreceptor NKG2D. *J Immunol* 169, 1395-1400.
- Hope, H. R., and Pike, L. J. (1996). Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. *Mol Biol Cell* 7, 843-851.
- Houchins, J. P., Lanier, L. L., Niemi, E. C., Phillips, J. H., and Ryan, J. C. (1997). Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C. *J Immunol* 158, 3603-3609.
- Houchins, J. P., Yabe, T., McSherry, C., and Bach, F. H. (1991). DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* 173, 1017-1020.
- Humphrey, M. B., Lanier, L. L., and Nakamura, M. C. (2005). Role of ITAM-containing adapter proteins and their receptors in the immune system and bone. *Immunol Rev* 208, 50-65.
- Jamieson, A. M., Diefenbach, A., McMahon, C. W., Xiong, N., Carlyle, J. R., and Raulet, D. H. (2002). The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* 17, 19-29.

- Jan Chalupny, N., Sutherland, C. L., Lawrence, W. A., Rein-Weston, A., and Cosman, D. (2003). ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. *Biochem Biophys Res Commun* 305, 129-135.
- Janes, P. W., Ley, S. C., and Magee, A. I. (1999). Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J Cell Biol* 147, 447-461.
- Janeway, C. (2001). *Immunologie*.
- Jevremovic, D., Billadeau, D. D., Schoon, R. A., Dick, C. J., Irvin, B. J., Zhang, W., Samelson, L. E., Abraham, R. T., and Leibson, P. J. (1999). Cutting edge: a role for the adaptor protein LAT in human NK cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 162, 2453-2456.
- Johnson, L. A., Goldfarb, R. H., and Mathew, P. A. (2000). Regulation of IFN-gamma production following 2B4 activation in human NK cells. *In Vivo* 14, 625-629.
- Johnson, L. A., Vaidya, S. V., Goldfarb, R. H., and Mathew, P. A. (2003). 2B4(CD244)-mediated activation of NK cells reduces metastases of B16F10 melanoma in mice. *Anticancer Res* 23, 3651-3655.
- Kambayashi, T., Assarsson, E., Chambers, B. J., and Ljunggren, H. G. (2001). Cutting edge: Regulation of CD8(+) T cell proliferation by 2B4/CD48 interactions. *J Immunol* 167, 6706-6710.
- Karlhofer, F. M., Ribaud, R. K., and Yokoyama, W. M. (1992). MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells. *Nature* 358, 66-70.
- Karre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G., and Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319, 675-678.
- Kim, S., Iizuka, K., Aguila, H. L., Weissman, I. L., and Yokoyama, W. M. (2000). In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2731-2736.
- Kitson, R. P., Appasamy, P. M., Nannmark, U., Albertsson, P., Gabauer, M. K., and Goldfarb, R. H. (1998). Matrix metalloproteinases produced by rat IL-2-activated NK cells. *J Immunol* 160, 4248-4253.
- Klem, J., Verrett, P. C., Kumar, V., and Schatzle, J. D. (2002). 2B4 is constitutively associated with linker for the activation of T cells in glycolipid-enriched microdomains: properties required for 2B4 lytic function. *J Immunol* 169, 55-62.
- Koegl, M., Zlatkine, P., Ley, S. C., Courtneidge, S. A., and Magee, A. I. (1994). Palmitoylation of multiple Src-family kinases at a homologous N-terminal motif. *Biochem J* 303 (Pt 3), 749-753.
- Kubin, M. Z., Parshley, D. L., Din, W., Waugh, J. Y., Davis-Smith, T., Smith, C. A., Macduff, B. M., Armitage, R. J., Chin, W., Cassiano, L., *et al.* (1999). Molecular cloning and biological characterization of NK cell activation-inducing ligand, a counterstructure for CD48. *Eur J Immunol* 29, 3466-3477.
- Kumaresan, P. R., Huynh, V. T., and Mathew, P. A. (2000). Polymorphism in the 2B4 gene of inbred mouse strains. *Immunogenetics* 51, 758-761.
- Kumaresan, P. R., Lai, W. C., Chuang, S. S., Bennett, M., and Mathew, P. A. (2002). CS1, a novel member of the CD2 family, is homophilic and regulates NK cell function. *Mol Immunol* 39, 1-8.
- Kundu, A., Avalos, R. T., Sanderson, C. M., and Nayak, D. P. (1996). Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J Virol* 70, 6508-6515.
- Kärre, K. (1985). *Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity: a reevaluation and hypothesis*, Academic Press edn (San Diego).
- Lanier, L. L. (1998). NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16, 359-393.

- Lanier, L. L. (2003). Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol* *15*, 308-314.
- Lanier, L. L. (2005). NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* *23*, 225-274.
- Lanier, L. L., Corliss, B. C., Wu, J., Leong, C., and Phillips, J. H. (1998). Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* *391*, 703-707.
- Lanier, L. L., Phillips, J. H., Hackett, J., Jr., Tutt, M., and Kumar, V. (1986). Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol* *137*, 2735-2739.
- Latchman, Y., McKay, P. F., and Reiser, H. (1998). Identification of the 2B4 molecule as a counter-receptor for CD48. *J Immunol* *161*, 5809-5812.
- Latour, S., Gish, G., Helgason, C. D., Humphries, R. K., Pawson, T., and Veillette, A. (2001). Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product. *Nat Immunol* *2*, 681-690.
- Latour, S., Roncagalli, R., Chen, R., Bakinowski, M., Shi, X., Schwartzberg, P. L., Davidson, D., and Veillette, A. (2003). Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. *Nat Cell Biol* *5*, 149-154.
- Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J. P., Lanier, L. L., and Phillips, J. H. (1996). Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol* *157*, 4741-4745.
- Lee, J. K., Boles, K. S., and Mathew, P. A. (2004a). Molecular and functional characterization of a CS1 (CRACC) splice variant expressed in human NK cells that does not contain immunoreceptor tyrosine-based switch motifs. *Eur J Immunol* *34*, 2791-2799.
- Lee, K. M., Bhawan, S., Majima, T., Wei, H., Nishimura, M. I., Yagita, H., and Kumar, V. (2003). Cutting Edge: The NK Cell Receptor 2B4 Augments Antigen-Specific T Cell Cytotoxicity Through CD48 Ligation on Neighboring T Cells. *J Immunol* *170*, 4881-4885.
- Lee, K. M., Forman, J. P., McNerney, M. E., Stepp, S., Kuppireddi, S., Guzior, D., Latchman, Y. E., Sayegh, M. H., Yagita, H., Park, C. K., *et al.* (2005). Requirement of homotypic NK cell interactions through 2B4(CD244)/CD48 in the generation of NK effector functions. *Blood*.
- Lee, K. M., McNerney, M. E., Stepp, S. E., Mathew, P. A., Schatzle, J. D., Bennett, M., and Kumar, V. (2004b). 2B4 acts as a non-major histocompatibility complex binding inhibitory receptor on mouse natural killer cells. *J Exp Med* *199*, 1245-1254.
- Lehtonen, A., Lund, R., Lahesmaa, R., Julkunen, I., Sareneva, T., and Matikainen, S. (2003). IFN-alpha and IL-12 activate IFN regulatory factor 1 (IRF-1), IRF-4, and IRF-8 gene expression in human NK and T cells. *Cytokine* *24*, 81-90.
- Li, C., Iosef, C., Jia, C. Y., Han, V. K., and Li, S. S. (2003). Dual functional roles for the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP/SH2D1A in signaling through the signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) family of immune receptors. *J Biol Chem* *278*, 3852-3859.
- Li, P., McDermott, G., and Strong, R. K. (2002). Crystal structures of RAE-1beta and its complex with the activating immunoreceptor NKG2D. *Immunity* *16*, 77-86.
- Li, P., Morris, D. L., Willcox, B. E., Steinle, A., Spies, T., and Strong, R. K. (2001). Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat Immunol* *2*, 443-451.
- Li, P., Willie, S. T., Bauer, S., Morris, D. L., Spies, T., and Strong, R. K. (1999a). Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a gammadelta T cell ligand. *Immunity* *10*, 577-584.

- Li, S. C., Gish, G., Yang, D., Coffey, A. J., Forman-Kay, J. D., Ernberg, I., Kay, L. E., and Pawson, T. (1999b). Novel mode of ligand binding by the SH2 domain of the human XLP disease gene product SAP/SH2D1A. *Curr Biol* 9, 1355-1362.
- Li, Z., Groh, V., Strong, R. K., and Spies, T. (2000). A single amino acid substitution causes loss of expression of a MICA allele. *Immunogenetics* 51, 246-248.
- Liang, X., Nazarian, A., Erdjument-Bromage, H., Bornmann, W., Tempst, P., and Resh, M. D. (2001). Heterogeneous fatty acylation of Src family kinases with polyunsaturated fatty acids regulates raft localization and signal transduction. *J Biol Chem* 276, 30987-30994.
- Lieberman, J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 3, 361-370.
- Lin, J., Weiss, A., and Finco, T. S. (1999). Localization of LAT in glycolipid-enriched microdomains is required for T cell activation. *J Biol Chem* 274, 28861-28864.
- Litwin, V., Gumperz, J., Parham, P., Phillips, J. H., and Lanier, L. L. (1994). NKB1: a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *J Exp Med* 180, 537-543.
- Ljunggren, H. G., and Karre, K. (1985). Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Med* 162, 1745-1759.
- Lodoen, M., Ogasawara, K., Hamerman, J. A., Arase, H., Houchins, J. P., Mocarski, E. S., and Lanier, L. L. (2003). NKG2D-mediated natural killer cell protection against cytomegalovirus is impaired by viral gp40 modulation of retinoic acid early inducible 1 gene molecules. *J Exp Med* 197, 1245-1253.
- Long, E. O. (1999). Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol* 17, 875-904.
- Long, E. O., Barber, D. F., Burshtyn, D. N., Faure, M., Peterson, M., Rajagopalan, S., Renard, V., Sandusky, M., Stebbins, C. C., Wagtmann, N., and Watzl, C. (2001). Inhibition of natural killer cell activation signals by killer cell immunoglobulin-like receptors (CD158). *Immunol Rev* 181, 223-233.
- Lou, Z., Jevremovic, D., Billadeau, D. D., and Leibson, P. J. (2000). A balance between positive and negative signals in cytotoxic lymphocytes regulates the polarization of lipid rafts during the development of cell-mediated killing. *J Exp Med* 191, 347-354.
- Maasho, K., Marusina, A., Reynolds, N. M., Coligan, J. E., and Borrego, F. (2004). Efficient gene transfer into the human natural killer cell line, NKL, using the Amaxa nucleofection system. *J Immunol Methods* 284, 133-140.
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T. I., Bushkin, Y., Davis, D. M., Strominger, J. L., Yewdell, J. W., and Porgador, A. (2001). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by Nkp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409, 1055-1060.
- Mathew, P. A., Garni-Wagner, B. A., Land, K., Takashima, A., Stoneman, E., Bennett, M., and Kumar, V. (1993). Cloning and characterization of the 2B4 gene encoding a molecule associated with non-MHC-restricted killing mediated by activated natural killer cells and T cells. *J Immunol* 151, 5328-5337.
- McCann, F. E., Vanherberghen, B., Eleme, K., Carlin, L. M., Newsam, R. J., Goulding, D., and Davis, D. M. (2003). The size of the synaptic cleft and distinct distributions of filamentous actin, ezrin, CD43, and CD45 at activating and inhibitory human NK cell immune synapses. *J Immunol* 170, 2862-2870.
- Melkonian, K. A., Ostermeyer, A. G., Chen, J. Z., Roth, M. G., and Brown, D. A. (1999). Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem* 274, 3910-3917.
- Mooney, J. M., Klem, J., Wulfing, C., Mijares, L. A., Schwartzberg, P. L., Bennett, M., and Schatzle, J. D. (2004). The murine NK receptor 2B4 (CD244) exhibits inhibitory

- function independent of signaling lymphocytic activation molecule-associated protein expression. *J Immunol* *173*, 3953-3961.
- Moran, M., and Miceli, M. C. (1998). Engagement of GPI-linked CD48 contributes to TCR signals and cytoskeletal reorganization: a role for lipid rafts in T cell activation. *Immunity* *9*, 787-796.
- Moretta, A., Bottino, C., Pende, D., Tripodi, G., Tambussi, G., Viale, O., Orengo, A., Barbaresi, M., Merli, A., Ciccone, E., and et al. (1990). Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J Exp Med* *172*, 1589-1598.
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M. C., Biassoni, R., and Moretta, L. (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* *19*, 197-223.
- Moretta, A., Vitale, M., Bottino, C., Orengo, A. M., Morelli, L., Augugliaro, R., Barbaresi, M., Ciccone, E., and Moretta, L. (1993). P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med* *178*, 597-604.
- Moretta, L., Bottino, C., Pende, D., Mingari, M. C., Biassoni, R., and Moretta, A. (2002). Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol* *32*, 1205-1211.
- Morra, M., Howie, D., Grande, M. S., Sayos, J., Wang, N., Wu, C., Engel, P., and Terhorst, C. (2001a). X-linked lymphoproliferative disease: a progressive immunodeficiency. *Annu Rev Immunol* *19*, 657-682.
- Morra, M., Lu, J., Poy, F., Martin, M., Sayos, J., Calpe, S., Gullo, C., Howie, D., Rietdijk, S., Thompson, A., et al. (2001b). Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *Embo J* *20*, 5840-5852.
- Munitz, A., Bachelet, I., Fraenkel, S., Katz, G., Mandelboim, O., Simon, H. U., Moretta, L., Colonna, M., and Levi-Schaffer, F. (2005). 2B4 (CD244) is expressed and functional on human eosinophils. *J Immunol* *174*, 110-118.
- Munro, S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* *115*, 377-388.
- Nagashima, S., Mailliard, R., Kashii, Y., Reichert, T. E., Herberman, R. B., Robbins, P., and Whiteside, T. L. (1998). Stable transduction of the interleukin-2 gene into human natural killer cell lines and their phenotypic and functional characterization in vitro and in vivo. *Blood* *91*, 3850-3861.
- Nagy, N., Cerboni, C., Mattsson, K., Maeda, A., Gogolak, P., Sumegi, J., Lanyi, A., Szekely, L., Carbone, E., Klein, G., and Klein, E. (2000). SH2D1A and SLAM protein expression in human lymphocytes and derived cell lines. *Int J Cancer* *88*, 439-447.
- Nakajima, H., Cella, M., Bouchon, A., Grierson, H. L., Lewis, J., Duckett, C. S., Cohen, J. I., and Colonna, M. (2000). Patients with X-linked lymphoproliferative disease have a defect in 2B4 receptor-mediated NK cell cytotoxicity. *Eur J Immunol* *30*, 3309-3318.
- Nakajima, H., Cella, M., Langen, H., Friedlein, A., and Colonna, M. (1999). Activating interactions in human NK cell recognition: the role of 2B4-CD48. *Eur J Immunol* *29*, 1676-1683.
- Nakajima, H., and Colonna, M. (2000). 2B4: an NK cell activating receptor with unique specificity and signal transduction mechanism. *Hum Immunol* *61*, 39-43.
- Naume, B., and Espevik, T. (1994). Immunoregulatory effects of cytokines on natural killer cells. *Scand J Immunol* *40*, 128-134.
- Nguyen, K. B., Salazar-Mather, T. P., Dalod, M. Y., Van Deusen, J. B., Wei, X. Q., Liew, F. Y., Caligiuri, M. A., Durbin, J. E., and Biron, C. A. (2002). Coordinated and distinct

- roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol* *169*, 4279-4287.
- Nichols, K. E., Harkin, D. P., Levitz, S., Krainer, M., Kolquist, K. A., Genovese, C., Bernard, A., Ferguson, M., Zuo, L., Snyder, E., *et al.* (1998). Inactivating mutations in an SH2 domain-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 13765-13770.
- Okahira, S., Nishikawa, F., Nishikawa, S., Akazawa, T., Seya, T., and Matsumoto, M. (2005). Interferon-beta induction through toll-like receptor 3 depends on double-stranded RNA structure. *DNA Cell Biol* *24*, 614-623.
- Okamoto, S., Ji, H., Howie, D., Clarke, K., Gullo, C., Manning, S., Coyle, A. J., and Terhorst, C. (2004). Expression of the SH2D1A gene is regulated by a combination of transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Eur J Immunol* *34*, 3176-3186.
- Ortaldo, J. R., and Young, H. A. (2003). Expression of IFN-gamma upon triggering of activating Ly49D NK receptors in vitro and in vivo: costimulation with IL-12 or IL-18 overrides inhibitory receptors. *J Immunol* *170*, 1763-1769.
- Palmieri, G., Tullio, V., Zingoni, A., Piccoli, M., Frati, L., Lopez-Botet, M., and Santoni, A. (1999). CD94/NKG2-A inhibitory complex blocks CD16-triggered Syk and extracellular regulated kinase activation, leading to cytotoxic function of human NK cells. *J Immunol* *162*, 7181-7188.
- Parolini, I., Topa, S., Sorice, M., Pace, A., Ceddia, P., Montesoro, E., Pavan, A., Lisanti, M. P., Peschle, C., and Sargiacomo, M. (1999). Phorbol ester-induced disruption of the CD4-Lck complex occurs within a detergent-resistant microdomain of the plasma membrane. Involvement of the translocation of activated protein kinase C isoforms. *J Biol Chem* *274*, 14176-14187.
- Parolini, O., Weinhausel, A., Kagerbauer, B., Sassmann, J., Holter, W., Gadner, H., Haas, O. A., and Knapp, W. (2003). Differential methylation pattern of the X-linked lymphoproliferative (XLP) disease gene SH2D1A correlates with the cell lineage-specific transcription. *Immunogenetics* *55*, 116-121.
- Parolini, S., Bottino, C., Falco, M., Augugliaro, R., Giliani, S., Franceschini, R., Ochs, H. D., Wolf, H., Bonnefoy, J. Y., Biassoni, R., *et al.* (2000). X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *J Exp Med* *192*, 337-346.
- Peck, S. R., and Ruley, H. E. (2000). Ly108: a new member of the mouse CD2 family of cell surface proteins. *Immunogenetics* *52*, 63-72.
- Pende, D., Bottino, C., Castriconi, R., Cantoni, C., Marcenaro, S., Rivera, P., Spaggiari, G. M., Dondero, A., Carnemolla, B., Reymond, N., *et al.* (2005). PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: involvement in tumor cell lysis. *Mol Immunol* *42*, 463-469.
- 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.
- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., *et al.* (1999). Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* *190*, 1505-1516.
- Pike, L. J. (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* *44*, 655-667.
- Pike, L. J., Han, X., Chung, K. N., and Gross, R. W. (2002). Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmenylethanolamine and their composition is independent of

- caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis. *Biochemistry* *41*, 2075-2088.
- Pizzo, P., and Viola, A. (2003). Lymphocyte lipid rafts: structure and function. *Curr Opin Immunol* *15*, 255-260.
- Poy, F., Yaffe, M. B., Sayos, J., Saxena, K., Morra, M., Sumegi, J., Cantley, L. C., Terhorst, C., and Eck, M. J. (1999). Crystal structures of the XLP protein SAP reveal a class of SH2 domains with extended, phosphotyrosine-independent sequence recognition. *Mol Cell* *4*, 555-561.
- Pralle, A., Keller, P., Florin, E. L., Simons, K., and Horber, J. K. (2000). Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* *148*, 997-1008.
- Purtilo, D. T., Cassel, C. K., Yang, J. P., and Harper, R. (1975). X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet* *1*, 935-940.
- Radaev, S., Rostro, B., Brooks, A. G., Colonna, M., and Sun, P. D. (2001). Conformational plasticity revealed by the cocrystal structure of NKG2D and its class I MHC-like ligand ULBP3. *Immunity* *15*, 1039-1049.
- Radaev, S., and Sun, P. D. (2003). Structure and function of natural killer cell surface receptors. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* *32*, 93-114.
- Rajagopalan, S., Fu, J., and Long, E. O. (2001). Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J Immunol* *167*, 1877-1881.
- Raulet, D. H. (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* *3*, 781-790.
- Riteau, B., Barber, D. F., and Long, E. O. (2003). Vav1 phosphorylation is induced by beta2 integrin engagement on natural killer cells upstream of actin cytoskeleton and lipid raft reorganization. *J Exp Med* *198*, 469-474.
- Ritter, M., Mennerich, D., Weith, A., and Seither, P. (2005). Characterization of Toll-like receptors in primary lung epithelial cells: strong impact of the TLR3 ligand poly(I:C) on the regulation of Toll-like receptors, adaptor proteins and inflammatory response. *J Inflamm (Lond)* *2*, 16.
- Rodgers, W. H., Matrisian, L. M., Giudice, L. C., Dsupin, B., Cannon, P., Svitek, C., Gorstein, F., and Osteen, K. G. (1994). Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J Clin Invest* *94*, 946-953.
- Roncagalli, R., Taylor, J. E., Zhang, S., Shi, X., Chen, R., Cruz-Munoz, M. E., Yin, L., Latour, S., and Veillette, A. (2005). Negative regulation of natural killer cell function by EAT-2, a SAP-related adaptor. *Nat Immunol* *6*, 1002-1010.
- Rosen, D. B., Araki, M., Hamerman, J. A., Chen, T., Yamamura, T., and Lanier, L. L. (2004). A Structural basis for the association of DAP12 with mouse, but not human, NKG2D. *J Immunol* *173*, 2470-2478.
- Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., *et al.* (2002). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* *295*, 2097-2100.
- Salazar-Mather, T. P., Orange, J. S., and Biron, C. A. (1998). Early murine cytomegalovirus (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha)-dependent pathways. *J Exp Med* *187*, 1-14.

- Sayos, J., Martin, M., Chen, A., Simarro, M., Howie, D., Morra, M., Engel, P., and Terhorst, C. (2001). Cell surface receptors Ly-9 and CD84 recruit the X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP. *Blood* 97, 3867-3874.
- Sayos, J., Nguyen, K. B., Wu, C., Stepp, S. E., Howie, D., Schatzle, J. D., Kumar, V., Biron, C. A., and Terhorst, C. (2000). Potential pathways for regulation of NK and T cell responses: differential X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP interactions with SLAM and 2B4. *Int Immunol* 12, 1749-1757.
- Sayos, J., Wu, C., Morra, M., Wang, N., Zhang, X., Allen, D., van Schaik, S., Notarangelo, L., Geha, R., Roncarolo, M. G., *et al.* (1998). The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 395, 462-469.
- Schatzle, J. D., Sheu, S., Stepp, S. E., Mathew, P. A., Bennett, M., and Kumar, V. (1999). Characterization of inhibitory and stimulatory forms of the murine natural killer cell receptor 2B4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3870-3875.
- Scheiffele, P., Peranen, J., and Simons, K. (1995). N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature* 378, 96-98.
- Schmidt, K. N., Leung, B., Kwong, M., Zarembek, K. A., Satyal, S., Navas, T. A., Wang, F., and Godowski, P. J. (2004). APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA. *J Immunol* 172, 138-143.
- Schon, A., and Freire, E. (1989). Thermodynamics of intersubunit interactions in cholera toxin upon binding to the oligosaccharide portion of its cell surface receptor, ganglioside GM1. *Biochemistry* 28, 5019-5024.
- Schroder, M., and Bowie, A. G. (2005). TLR3 in antiviral immunity: key player or bystander? *Trends Immunol* 26, 462-468.
- Sen, G. C., and Sarkar, S. N. (2005). Transcriptional signaling by double-stranded RNA: role of TLR3. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 1-14.
- Shenoy-Scaria, A. M., Dietzen, D. J., Kwong, J., Link, D. C., and Lublin, D. M. (1994). Cysteine3 of Src family protein tyrosine kinase determines palmitoylation and localization in caveolae. *J Cell Biol* 126, 353-363.
- Shenoy-Scaria, A. M., Gauhen, L. K., Kwong, J., Shaw, A. S., and Lublin, D. M. (1993). Palmitoylation of an amino-terminal cysteine motif of protein tyrosine kinases p56lck and p59fyn mediates interaction with glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins. *Mol Cell Biol* 13, 6385-6392.
- Shinozaki, K., Kanegane, H., Matsukura, H., Sumazaki, R., Tsuchida, M., Makita, M., Kimoto, Y., Kanai, R., Tsumura, K., Kondoh, T., *et al.* (2002). Activation-dependent T cell expression of the X-linked lymphoproliferative disease gene product SLAM-associated protein and its assessment for patient detection. *Int Immunol* 14, 1215-1223.
- Shlapatska, L. M., Mikhalap, S. V., Berdova, A. G., Zelensky, O. M., Yun, T. J., Nichols, K. E., Clark, E. A., and Sidorenko, S. P. (2001). CD150 association with either the SH2-containing inositol phosphatase or the SH2-containing protein tyrosine phosphatase is regulated by the adaptor protein SH2D1A. *J Immunol* 166, 5480-5487.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-39.
- Sivori, S., Falco, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Vitale, M., Moretta, L., and Moretta, A. (2004). CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10116-10121.
- Sivori, S., Falco, M., Marcenaro, E., Parolini, S., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (2002). Early expression of triggering receptors and regulatory role of 2B4

- in human natural killer cell precursors undergoing in vitro differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 4526-4531.
- Sivori, S., Parolini, S., Falco, M., Marcenaro, E., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (2000). 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation. *Eur J Immunol* *30*, 787-793.
- Smith, M. R. (2003). Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* *22*, 7359-7368.
- Smyth, M. J., Thia, K. Y., Street, S. E., Cretney, E., Trapani, J. A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S. B., Crowe, N. Y., and Godfrey, D. I. (2000). Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* *191*, 661-668.
- Stebbins, C. C., Watzl, C., Billadeau, D. D., Leibson, P. J., Burshtyn, D. N., and Long, E. O. (2003). Vav1 Dephosphorylation by the Tyrosine Phosphatase SHP-1 as a Mechanism for Inhibition of Cellular Cytotoxicity. *Mol Cell Biol* *23*, 6291-6299.
- Steinle, A., Li, P., Morris, D. L., Groh, V., Lanier, L. L., Strong, R. K., and Spies, T. (2001). Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* *53*, 279-287.
- Stepp, S. E., Schatzle, J. D., Bennett, M., Kumar, V., and Mathew, P. A. (1999). Gene structure of the murine NK cell receptor 2B4: presence of two alternatively spliced isoforms with distinct cytoplasmic domains. *Eur J Immunol* *29*, 2392-2399.
- Sutherland, C. L., Chalupny, N. J., Schooley, K., VandenBos, T., Kubin, M., and Cosman, D. (2002). UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol* *168*, 671-679.
- Tahara-Hanaoka, S., Shibuya, K., Onoda, Y., Zhang, H., Yamazaki, S., Miyamoto, A., Honda, S., Lanier, L. L., and Shibuya, A. (2004). Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112). *Int Immunol* *16*, 533-538.
- Takeda, K. (2005). Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* *11*, 51-55.
- Tam, Y. K., Maki, G., Miyagawa, B., Hennemann, B., Tonn, T., and Klingemann, H. G. (1999). Characterization of genetically altered, interleukin 2-independent natural killer cell lines suitable for adoptive cellular immunotherapy. *Hum Gene Ther* *10*, 1359-1373.
- Tangye, S. G., Lazetic, S., Woollatt, E., Sutherland, G. R., Lanier, L. L., and Phillips, J. H. (1999). Cutting edge: human 2B4, an activating NK cell receptor, recruits the protein tyrosine phosphatase SHP-2 and the adaptor signaling protein SAP. *J Immunol* *162*, 6981-6985.
- Tangye, S. G., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and Nichols, K. E. (2000). Functional requirement for SAP in 2B4-mediated activation of human natural killer cells as revealed by the X-linked lymphoproliferative syndrome. *J Immunol* *165*, 2932-2936.
- Tarazona, R., Borrego, F., Galiani, M. D., Aguado, E., Pena, J., Coligan, J. E., and Solana, R. (2002). Inhibition of CD28-mediated natural cytotoxicity by KIR2DL2 does not require p56(lck) in the NK cell line YT-Indy. *Mol Immunol* *38*, 495-503.
- Tassi, I., and Colonna, M. (2005). The cytotoxicity receptor CRACC (CS-1) recruits EAT-2 and activates the PI3K and phospholipase Cgamma signaling pathways in human NK cells. *J Immunol* *175*, 7996-8002.
- Tieng, V., Le Bouguenec, C., du Merle, L., Bertheau, P., Desreumaux, P., Janin, A., Charron, D., and Toubert, A. (2002). Binding of Escherichia coli adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 2977-2982.
- Tovar, V., del Valle, J., Zapater, N., Martin, M., Romero, X., Pizcueta, P., Bosch, J., Terhorst, C., and Engel, P. (2002). Mouse novel Ly9: a new member of the expanding

- CD150 (SLAM) family of leukocyte cell-surface receptors. *Immunogenetics* 54, 394-402.
- Trompeter, H. I., Weinhold, S., Thiel, C., Wernet, P., and Uhrberg, M. (2003). Rapid and highly efficient gene transfer into natural killer cells by nucleofection. *J Immunol Methods* 274, 245-256.
- Ushio-Fukai, M., Hilenski, L., Santanam, N., Becker, P. L., Ma, Y., Griendling, K. K., and Alexander, R. W. (2001). Cholesterol depletion inhibits epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II in vascular smooth muscle cells: role of cholesterol-rich microdomains and focal adhesions in angiotensin II signaling. *J Biol Chem* 276, 48269-48275.
- Vaidya, S. V., Stepp, S. E., McNerney, M. E., Lee, J. K., Bennett, M., Lee, K. M., Stewart, C. L., Kumar, V., and Mathew, P. A. (2005). Targeted disruption of the 2B4 gene in mice reveals an in vivo role of 2B4 (CD244) in the rejection of B16 melanoma cells. *J Immunol* 174, 800-807.
- Valiante, N. M., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and Parham, P. (1996). Killer cell inhibitory receptor recognition of human leukocyte antigen (HLA) class I blocks formation of a pp36/PLC-gamma signaling complex in human natural killer (NK) cells. *J Exp Med* 184, 2243-2250.
- Valiante, N. M., Uhrberg, M., Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Arnett, K. L., D'Andrea, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and Parham, P. (1997). Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 7, 739-751.
- Vance, R. E., Jamieson, A. M., and Raulet, D. H. (1999). Recognition of the class Ib molecule Qa-1(b) by putative activating receptors CD94/NKG2C and CD94/NKG2E on mouse natural killer cells. *J Exp Med* 190, 1801-1812.
- Varma, R., and Mayor, S. (1998). GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* 394, 798-801.
- Veillette, A., and Latour, S. (2003). The SLAM family of immune-cell receptors. *Curr Opin Immunol* 15, 277-285.
- Villalba, M., Bi, K., Rodriguez, F., Tanaka, Y., Schoenberger, S., and Altman, A. (2001). Vav1/Rac-dependent actin cytoskeleton reorganization is required for lipid raft clustering in T cells. *J Cell Biol* 155, 331-338.
- Vyas, Y. M., Mehta, K. M., Morgan, M., Maniar, H., Butros, L., Jung, S., Burkhardt, J. K., and Dupont, B. (2001). Spatial organization of signal transduction molecules in the NK cell immune synapses during MHC class I-regulated noncytolytic and cytolytic interactions. *J Immunol* 167, 4358-4367.
- Watson, N. F., Madjd, Z., Scrimgeour, D., Spendlove, I., Ellis, I. O., Scholefield, J. H., and Durrant, L. G. (2005). Evidence that the p53 negative / Bcl-2 positive phenotype is an independent indicator of good prognosis in colorectal cancer: a tissue microarray study of 460 patients. *World J Surg Oncol* 3, 47.
- Watzl, C. (2003). The NKG2D receptor and its ligands-recognition beyond the "missing self"? *Microbes Infect* 5, 31-37.
- Watzl, C., and Long, E. O. (2003). Natural killer cell inhibitory receptors block actin cytoskeleton-dependent recruitment of 2B4 (CD244) to lipid rafts. *J Exp Med* 197, 77-85.
- Watzl, C., Stebbins, C. C., and Long, E. O. (2000). NK cell inhibitory receptors prevent tyrosine phosphorylation of the activation receptor 2B4 (CD244). *J Immunol* 165, 3545-3548.
- Webb, Y., Hermida-Matsumoto, L., and Resh, M. D. (2000). Inhibition of protein palmitoylation, raft localization, and T cell signaling by 2-bromopalmitate and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 275, 261-270.

- Wilson, M. J., Lindquist, J. A., and Trowsdale, J. (2000). DAP12 and KAP10 (DAP10)-novel transmembrane adapter proteins of the CD3zeta family. *Immunol Res* 22, 21-42.
- Wu, C., Sayos, J., Wang, N., Howie, D., Coyle, A., and Terhorst, C. (2000a). Genomic organization and characterization of mouse SAP, the gene that is altered in X-linked lymphoproliferative disease. *Immunogenetics* 51, 805-815.
- Wu, J., Cherwinski, H., Spies, T., Phillips, J. H., and Lanier, L. L. (2000b). DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells. *J Exp Med* 192, 1059-1068.
- Wu, J., Song, Y., Bakker, A. B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L. L., and Phillips, J. H. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285, 730-732.
- Yokoyama, S., Staunton, D., Fisher, R., Amiot, M., Fortin, J. J., and Thorley-Lawson, D. A. (1991). Expression of the Blast-1 activation/adhesion molecule and its identification as CD48. *J Immunol* 146, 2192-2200.
- Yokoyama, W. M., Kim, S., and French, A. R. (2004). The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 22, 405-429.
- Zhang, W., Tribble, R. P., and Samelson, L. E. (1998). LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* 9, 239-246.