

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. H. Wagner, Ph.D. (Melbourne))

# **Funktionelle Bedeutung der NKG2D-Liganden- Interaktion auf antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Einar Friedemann Gebhardt

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. D. H. Busch  
2. Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker  
3. Univ.-Prof. Dr. M. W. Ollert

Die Dissertation wurde am 23.01.2006. bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin  
am 17.05.2006 angenommen.



## II Inhaltsverzeichnis

<i>I Titel</i> .....	<i>1</i>
<i>II Inhaltsverzeichnis</i> .....	<i>3</i>
<i>III Verzeichnis der Abkürzungen</i> .....	<i>7</i>
<i>IV Material- und Geräteliste</i> .....	<i>10</i>
<i>V Reagenzienliste</i> .....	<i>12</i>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1 Angeborenes und erworbenes Immunsystem</b> .....	<b>14</b>
<b>1.2 NK-Zellen</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3 T-Zellen</b> .....	<b>16</b>
<b>1.4 CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort</b> .....	<b>17</b>
<b>1.5 Regulation einer T-Zellantwort</b> .....	<b>18</b>
1.5.1 T-Helferzellen.....	18
1.5.2 $\gamma\delta$ -T-Zellen und NKT-Zellen.....	19
1.5.3 Regulatorische T-Zellen.....	19
1.5.4 Immunmodulatorische Rezeptoren.....	20
<b>1.6 NKG2D</b> .....	<b>22</b>
<b>1.7 Ziele der Arbeit</b> .....	<b>25</b>
<b>2 Methoden</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1 Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>26</b>
2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
2.1.2 Taq-Step.....	27
2.1.3 Restriktionsendonuklease-Verdau.....	27
2.1.4 TA-Klonierung.....	28
2.1.5 Ligation von Restriktionsfragmenten.....	29

2.1.6	Agarosegel-Elektrophorese .....	29
2.1.7	DNA-Konzentration .....	29
2.1.8	DNA-Sequenzierung .....	30
2.1.9	Plasmid Mini Präparation .....	30
2.1.10	Gel-Extraktion .....	30
2.1.11	Bakterientransformation .....	30
2.1.12	Bakterienstocks .....	31
<b>2.2</b>	<b>Proteinbiochemie.....</b>	<b>31</b>
2.2.1	Proteinexpression .....	31
2.2.2	Proteinaufreinigung.....	32
2.2.3	Proteingel .....	32
2.2.4	Coomassie Färbung.....	33
2.2.5	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	33
2.2.6	<i>In vitro</i> Proteinfaltung und Konzentration .....	34
2.2.7	Biotinylierung .....	36
2.2.8	FPLC .....	36
<b>2.3</b>	<b>Multimerisierung .....</b>	<b>37</b>
<b>2.4</b>	<b>Biotinylierungskontrolle.....</b>	<b>37</b>
<b>2.5</b>	<b>Infektion von BALB/c und C57BL/6 mit <i>Listeria monocytogenes</i> .....</b>	<b>38</b>
<b>2.6</b>	<b>Milzentnahme und Isolation der Lymphozyten .....</b>	<b>38</b>
<b>2.7</b>	<b>Generierung epitop-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zelllinien.....</b>	<b>39</b>
<b>2.8</b>	<b>Multimer und Antikörperfärbung .....</b>	<b>39</b>
<b>2.9</b>	<b>Durchflusszytometrische Analyse und Auswertung .....</b>	<b>40</b>
<b>2.10</b>	<b>Anreicherung und Depletion <i>ex vivo</i> gewonnener T-Zellen .....</b>	<b>40</b>
<b>2.11</b>	<b>Magnetische Aufreinigung .....</b>	<b>41</b>
<b>2.12</b>	<b>Durchflußzytometrische Aufreinigung.....</b>	<b>41</b>
<b>2.13</b>	<b><sup>51</sup>Cr-Zytotoxizitäts-Assay .....</b>	<b>41</b>
<b>2.14</b>	<b>T-Zell-Proliferation.....</b>	<b>42</b>
2.14.1	<sup>3</sup> H-Thymidin-Proliferationsassay .....	42
2.14.2	CFSE-Proliferationsassay .....	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Generierung von NKG2D-Liganden-Multimeren .....</b>	<b>44</b>
3.1.1	Klonierung Expressionsvektoren .....	44
3.1.2	Expression, Faltung und Multimerisierung .....	46

<b>3.2</b>	<b>Nachweis der Funktionalität der H60-Multimere.....</b>	<b>49</b>
3.2.1	Färbung von CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Linien.....	49
3.2.2	Affinitätsunterschiede zwischen H60 und Rae1.....	50
3.2.3	Expression von NKG2D-Liganden auf Tumorzelllinien.....	52
<b>3.3</b>	<b>Expressionsmuster von NKG2D-Liganden und H60- bzw. Rae1<math>\gamma</math>-Rezeptoren .....</b>	<b>54</b>
3.3.1	Expressionsmuster auf Milzzellen naiver Mäuse .....	54
3.3.2	Änderung der Expression im Verlauf einer Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> .....	55
<b>3.4</b>	<b>Auswirkungen von H60 und Rae1 auf die Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen .....</b>	<b>60</b>
<b>3.5</b>	<b>Unterschiede zwischen NKG2D-Liganden in ihrer Wirkung auf T-Zell-Proliferation</b>	<b>62</b>
3.5.1	H60 hemmt Proliferation von CD8 <sup>+</sup> T-Zelllinien.....	62
3.5.2	Nachweis der Verminderten Zellteilung .....	64
3.5.3	Effekt auf die Proliferation CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	65
3.5.4	Natives H60 inhibiert ähnlich wie lösliches H60 .....	66
<b>3.6</b>	<b>Rolle der Stimulatorzellen.....</b>	<b>67</b>
<b>3.7</b>	<b>Suche nach einer regulatorischen Subpopulation.....</b>	<b>68</b>
<b>3.8</b>	<b>H60 vermittelte Inhibition ist unabhängig von DAP10 .....</b>	<b>70</b>
<b>3.9</b>	<b>MICA8 führt zu einer H60-ähnlichen Inhibition.....</b>	<b>70</b>
<b>3.10</b>	<b>MICA8 identifiziert murine Subpopulation .....</b>	<b>71</b>
<b>3.11</b>	<b>Nähere Bestimmung des Mechanismus der Inhibition .....</b>	<b>72</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>75</b>
4.1	Strukturelle Unterschiede zwischen NKG2D-Liganden.....	75
4.2	Kostimulation der T-Zell-Zytotoxizität durch NKG2D .....	77
4.3	Kostimulation und Virusinfektionen.....	78
4.4	NKG2D-Liganden und Tumorummunologie .....	79
4.5	H60 wirkt NKG2D-unabhängig.....	81
4.6	Indirekte Vermittlung der Inhibition.....	82
4.7	Einfluss von NKG2D und H60 auf die Homöostase von T-Zellen.....	84
4.8	Ausblick .....	85
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>88</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>90</b>
<b>VI</b>	<b>Dankvermerk.....</b>	<b>100</b>



### III Verzeichnis der Abkürzungen

Ab:	Antikörper ( <b>antibody</b> )
APC:	Allophycocyanin
APC:	Antigen-präsentierende Zelle ( <b>antigen-presenting cell</b> )
BCA:	Bicichonsäure ( <b>Bicinchoninic Acid</b> )
$\beta_2m$ :	Beta-2- <b>Mikroglobulin</b>
BSA:	<b>Bovines Serum Albumin</b>
CD:	<b>cluster of differentiation</b>
ConA:	<b>Concanavalin A</b>
CMT:	Zentrale Memory T-Zelle ( <b>central memory T-cell</b> )
CTL:	Zytotoxische T-Zelle ( <b>cytotoxic T-lymphocyte</b> )
DC:	Dendritische Zelle ( <b>dendritic cell</b> )
DM:	Verdaulösung ( <b>digestion mix</b> )
DMSO:	<b>Dimethylsulfoxid</b>
DNA:	Desoxyribonukleinsäure ( <b>deoxyribonucleic acid</b> )
DTT:	1.4- <b>Dithiothreitol</b>
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	<b>Ethylendiamidteracid</b>
EMA:	<b>Ethidium Monazid Bromid</b>
EMT:	<b>Effektor Memory T-Zellen</b>
ET:	<b>Effektor T-Zellen</b>
FACS:	Durchflußzytometrie ( <b>fluorescence-activated cell sorting</b> )
FCS:	Fetales Kalbserum ( <b>fetal calf serum</b> )
FITC:	<b>Fluoresceinisothiocyanat</b>
FPLC:	<b>fast protein liquid chromatography</b>
FSC:	Streuung auf der x-Achse ( <b>forward scatter</b> )

---

GPI:	<b>Phosphatidylinositolglykolipid</b>
HBSS:	<b>Hank's Balanced Salt Solution</b>
HEPES:	2-[4-(2- <b>Hydroxyethyl</b> )-1- <b>Piperazinyl</b> ]Ethanesulfonsäure+4-(HO-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )-1,4-N <sub>2</sub> C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> -1-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -SO <sub>3</sub> H
ITIM	<b>Immunrezeptor Tyrosin-basiertes inhibitorisches Motiv</b>
ITAM	<b>Immunrezeptor Tyrosin-basierendes Aktivierungs Motiv</b>
IEL:	<b>Intraepitheliale Lymphozyten</b>
IFN $\gamma$ :	<b>Interferon gamma</b>
IL7R:	<b>IL7-Rezeptor</b>
i.v.:	<b>intravenös</b>
KIR	<b>Killerzell Ig-ähnliche Rezeptoren</b>
KO:	<b>Knock-out (-/-)</b>
LAM:	<b>Leukozyten-Adhäsionsmolekül</b>
LB:	<b>Luria Bertoni Medium</b>
LD <sub>50</sub> :	<b>Letale Dosis für 50% der Versuchstiere</b>
Lk:	<b>Lymphknoten</b>
<i>L.m.</i> :	<i>Listeria monocytogenes</i>
LPL:	<b>Lamina propria Lymphozyten</b>
PCR:	<b>Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)</b>
mAb:	<b>Monoklonaler Antikörper (monoclonal antibody)</b>
MHC:	<b>Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)</b>
MACS:	<b>magnetically activated cell sorting</b>
MoFlo:	<b>Modular Flow Cytometry</b>
MTZ:	<b>Memory T-Zellen</b>
NaN <sub>3</sub> :	<b>Natriumazid</b>
OD:	<b>Optische Dichte</b>
PBS:	<b>Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate-buffered saline)</b>
PE:	<b>R-Phycoerythrin</b>
PFA:	<b>Paraformaldehyd</b>
PP:	<b>Peyersche Plaques</b>
rpm:	<b>Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)</b>
RT:	<b>Raumtemperatur</b>
SA:	<b>Streptavidin</b>
SSC:	<b>Verteilung auf der y-Achse (sideward scatter)</b>

---

TCR:	T-Zellrezeptor ( <b>T</b> cell receptor)
TNF $\alpha$ :	<b>T</b> umornekrosefaktor alpha
Tris:	<b>Tris</b> (hydroxymethyl)aminomethane+(HO-CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C-NH <sub>2</sub> +2-Amino-2-(Hydroxymethyl) 1,3-Propanediol
WT:	<b>W</b> ildtyp

## IV Material- und Geräteliste

Monoklonale Antikörper:	BD Biosciences ParMingen, San Diego, USA (für BALB/c Hintergrund), Caltag Laboratories, Burlingame, CA 94010, USA (für C57BL/6 Hintergrund)
BALB/c Mäuse:	Harlan, Blackthorn, U.K.
BirA:	Avidity, Colorado, USA
Brutschrank:	BBD 6220, Heraeus, Hanau, Deutschland
C57BL/6 Mäuse:	Harlan, Blackthorn, U.K.
CaCl <sub>2</sub> :	FW 147,0, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DMSO:	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dnase I:	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DTT:	Boehringer-Mannheim, Mannheim, Deutschland
<i>E.coli</i> :	Stratagene, La Jolla, USA
EDTA:	Dinatrium-Dihydrat, FW292,2 und FW372,2, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethidium Monazid:	EMA, Molecular Probes, Leiden, Niederlande
FACS:	FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FCS:	Fetal Calf Serum, seromed®, Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Fc-block-Reagenz:	Blockierender Antikörper für Fc-Rezeptor [CD32/CD16], BD Biosciences, ParMingen, San Diego, USA
Flow Jo V 3.4 und 4.2 Software:	Tree Star, San Carlos, USA
Fluoreszenz-markiertes SA:	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

---

Gentamycin:	Gibco™, Invitrogen Corporation, Paisley, U.K.
HBSS:	w/o Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> , Gibco™, Invitrogen Corporation, Paisley, U.K.
Heparin:	Liquemin® N 25 000, Roche, Basel, Schweiz
HEPES Puffer:	1M, Gibco™, Invitrogen Corporation, Paisley, U.K.
Kollagenase D:	1mg/ml, Roche, Mannheim, Deutschland
Kollagenase Typ IV und VIII:	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kühlzentrifuge:	Varifuge 3.0RS, Heraeus, Hanau, Deutschland
L-Glutamin:	Gibco™, Invitrogen Corporation, Paisley, U.K.
LLO91-99 (GYKDGNEYI):	Affina, Berlin, Deutschland
L.m. 10403s:	ATCC, Rockville, USA
Membran 100kD:	Millipore, Bedford, USA
MgCl <sub>2</sub> :	FW203,3, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mikroskop:	Axiovert S 100, Zeiss, Jena, Deutschland
MoFlo:	Cytomation, Freiburg, Deutschland
Nadeln 27G1/2 und 3/4:	Microlance™ 3, BD, Drogheda, Ireland
Nadeln 27G4/5:	1 Sterican®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Ova258-264 (SIINFEKL):	Affina, Berlin, Deutschland
PBS:	Instamed PBS Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin:	Gibco™, Invitrogen Corporation, Paisley, U.K.
PFA:	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Photometer:	Ultrosec 3000 pro, Biochrom Ltd., Cambridge, England
RPMI 1640:	w/o L-Glutamin, Gibco Life Technologies, Gaithersburg MD, USA
Sterilbank:	HERA safe, Heraeus, Hanau, Deutschland
Streptomycin:	Gibco™, Invitrogen Corporation, Paisley, U.K.
Tris-hydrochlorid:	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> HCl, MW 157,60, Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, Deutschland
Zellsieb 100µm:	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA

## V Reagenzienliste

DM:	2mg/10ml RPMI+SC <sup>+</sup> Kollagenase TypIV, 0,2mg/10ml RPMI Dnase I
FACS-Färbepuffer:	PBS pH 7,45, 0,5% BSA, 0,02 % NaN <sub>3</sub>
HBSS/DTT 1mM:	1mM DTT in HBSS
HBSS/EDTA 0,1mM:	0,1mM EDTA in HBSS
HBSS/EDTA 1,3mM:	HBSS mit 1,3mM EDTA
Lösungspuffer:	50 mM TrisHCl (3.94 g),p H 8.0 25% Sukrose (125 g), 1mM NaEDTA (1ml stock solution [0.5M]), 0.1% NaAzide (1.5ml stock solution [30%]), 10mM DTT (770mg)
Lysepuffer:	50 mM TrisHCl (3.94 g), pH 8.0 1% Triton X-100 (5 ml), 0.1% Na deoxycholate (5 ml stock solution [10%]), 100 mM NaCl (2.93 g), 0.1% NaAzide (1.5ml stock solution [30%]), 10mM DTT (770 mg)
NH <sub>4</sub> CL-Tris:	0,17M NH <sub>4</sub> CL in 0,3M Tris [pH 7,5]
PBS pH 8,0:	1,09g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,32g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 9g NaCl, 1l dH <sub>2</sub> O
PBS/FCS 5%:	PBS mit 5% FCS
PBS/Heparin:	75 U Heparin in 1ml PBS
PFA 4% :	400 ml PBS mit 16g PFA
PFA 2%:	10ml PBS mit 10ml PFA 4%
RP10 <sup>+</sup> :	RPMI 1640 mit 10% FCS, L-Glutamin, HEPES [pH 7,5], β- Mercaptoethanol, Penicillin [100 U/ml], Streptomycin [100 µg/ml] und Gentamycin [50 µg/ml]
RPMI mit Zusatz:	1mM MgCl <sub>2</sub> , 1mM CaCl <sub>2</sub> und 10% FCS
Tris:	Tris-hydrochlorid pH 7,5
TBE:	54g Tris, 27,5g Borsäure, 20ml 0,5M EDTA pH 8,0 auf 1l dH <sub>2</sub> O

Waschpuffer: 50 mM Tris HCl (3.94 g), +/- 0.5% Triton X-100 (2.5 ml), pH 8.0 100 mM NaCl (2.93 g), 1 mM NaEDTA (1ml stock solution [0.5M])0.1% NaAzide (1.5ml stock solution [30%]), 1 mM DTT (77mg)

# 1 Einleitung

## 1.1 Angeborenes und erworbenes Immunsystem

Ein komplexer Organismus wie der Körper von Säugern bietet Pathogenen unzählige mechanische und molekulare Möglichkeiten einzudringen, sich zu vermehren, die Funktionalität zu stören und somit Krankheiten auszulösen. Dabei unterscheiden sich die pathogenen Mikroorganismen und andere Fremdstoffe strukturell deutlich voneinander. Zudem bieten Viren, Bakterien und Parasiten oft durch eine hohe Mutationsrate immer neue Erregervariationen, auf die adäquat reagiert werden muss. Gleichzeitig herrscht jedoch mit einer großen Zahl von Bakterien ein symbiotisches Verhältnis. An den Grenzflächen des Körpers sorgen sie für ein protektives Milieu und nehmen metabolische Aufgaben wahr. Neben der Abwehr von Pathogenen sind die Abgrenzung von „selbst“ zu „fremd“ und das Erkennen maligner Entartungen wichtige Aufgaben des Immunsystems. Dabei ist eine effiziente Regulation der immunologischen Antwort erforderlich, um eine überschießende Reaktion mit fatalem Ausgang zu verhindern.

Um diesen unterschiedlichen Anforderungen gerecht zu werden, hat sich ein flexibles Immunsystem entwickelt. Funktionell lassen sich zwei Bereiche unterscheiden. Zum einen die angeborene Immunität mit Makrophagen, Granulozyten und Natürlichen Killerzellen, bei der mit genetisch festgelegten Rezeptoren gegen bestimmte pathogen-assoziierte molekulare pattern (PAMPs<sup>1</sup>), so genannte ‚pattern-recognition-molecules‘ wie TLRs, ohne klonale Vermehrung eine schnelle, „unspezifische“ Abwehr erzielt wird (Janeway, 2001). Die erworbene Immunität führt durch eine Variabilität der Rezeptoren zu einer spezifischen und über klonale Expansion zu einer zunehmend effektiveren Erkennung von Fremdantigenen. Wichtiges Charakteristikum ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, das eine schnelle Reaktion bei erneutem Antigenkontakt ermöglicht. Zellen der erworbenen

---

<sup>1</sup> PAMPs: molekulare Strukturen mit charakteristischen Eigenschaften bestimmter Pathogene wie LPS, bakterielle DNA, dsRNA, ssRNA und Lipopeptide

Immunität sind B- und T-Zellen, die die humorale, antikörpervermittelte, bzw. zelluläre Immunantwort vermitteln (Janeway, 2001).

Beide Bereiche sind stark miteinander verzahnt und unterliegen einer engen Regulation. Im Spannungsfeld zwischen mikrobieller Fremderkennung und fehlender oder veränderter Eigenstruktur bei fremdem Gewebe bzw. Tumoren müssen die Toleranz gegenüber dem eigenen Organismus gewahrt bleiben und überschießende Reaktionen vermieden werden. Dies wird über eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren, Zytokine und Chemokine, sowie spezialisierter regulatorischer Zellpopulationen erreicht.

## 1.2 NK-Zellen

Ursprünglich wurden NK-Zellen dem angeborenen Immunsystem zugerechnet, da sie keine antigen-spezifischen Rezeptoren tragen (Janeway, 2001). Sie scheinen jedoch aufgrund ihrer Verwandtschaft zu T-Zellen, ihres Rezeptorrepertoires und ihrer Effektorfunktionen eine Zwischenstellung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem einzunehmen (Lanier, 2005).

NK-Zellen entstehen aus lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark und zirkulieren im Blut. Wie T-Zellen erkennen sie hauptsächlich klassische und nicht-klassische MHC-Moleküle (s. u.). Darin unterscheiden sie sich von anderen Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen und Granulozyten, die direkt, z.B. über konservierte Strukturen eines Erregers aktiviert werden können.

Nk-Zell-Rezeptoren lassen sich in inhibitorische und stimulatorische Rezeptoren unterteilen (s. u.). Bei der Bindung von NK-Zellen an eine potentielle Zielzelle kommt es zu einer Integration von positiven und negativen Signalen, was dann letztlich über eine Aktivierung der NK-Zellen entscheidet (Lanier, 2005).

Zusätzlich reagieren NK-Zellen auf Zytokine wie  $\text{INF-}\alpha$  und  $\text{IFN-}\beta$  sowie  $\text{IL-12}$ . Dadurch kann ihre Fähigkeit Zielzellen zu lysieren deutlich gesteigert werden (Janeway, 2001). Dies wird, ähnlich wie bei  $\text{CD8}^+$  T-Zellen, z.B. über Perforin und Granzyme erreicht (Young, 1986). Außerdem sind NK-Zellen in der Lage, große Mengen an  $\text{IFN-}\gamma$  zu produzieren, wodurch manche Infektionen kontrolliert werden können bevor T-Zellen dieses Zytokin produzieren können.  $\text{IFN-}\gamma$  wird von NK-Zellen schon in Vorläuferzellen in vorproduzierter Form gespeichert (Stetson, 2003).

Viele der von NK-Zellen konstitutiv exprimierten Rezeptoren werden nach Aktivierung auch auf  $\text{CD8}^+$  und in geringerem Maße auch auf  $\text{CD4}^+$  T-Zellen exprimiert (Lanier, 2005).

### 1.3 T-Zellen

Charakteristisches Merkmal der T-Zellen ist der T-Zell-Rezeptor (TCR). Es handelt sich um ein Heterodimer aus zwei unterschiedlichen Polypeptidketten, der TCR $\alpha$ - und der TCR $\beta$ -Kette, die ähnlich der Struktur von Immunglobulinen aus einer konstanten (C) Region und einer variablen (V) Region bestehen und über die die Antigenerkennung der Zellen stattfindet (Davis, 1998). Eine kleine Gruppe CD8<sup>+</sup> T-Zellen trägt einen TCR gleicher Struktur, jedoch bestehend aus einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Kette. Dieser  $\gamma\delta$ -Rezeptor hat nur eine begrenzte Variabilität, so dass er wahrscheinlich nur ein eingeschränktes Spektrum an Antigenen wie Hitzeschock-Proteine (Maus) oder phosphorylierte bakterielle Bestandteile (Mensch) erkennt (Kabelitz, 2003).

Im Wesentlichen bestehen T-Zellen aus zwei unterschiedlichen Gruppen, den zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) und den T-Helferzellen (T<sub>h</sub>). Phänotypisch lassen sie sich anhand zweier Oberflächenmoleküle unterscheiden. CTL exprimieren CD8, das als Heterodimer ( $\alpha\beta$ ) oder als Homodimer ( $\alpha\alpha$ ) vorliegen kann, T<sub>h</sub> das aus einer einzelnen Kette bestehende Molekül CD4 (Zamoyska, 1998). Diese Moleküle stellen Korezeptoren des TCR für die Erkennung von MHC-Molekülen und des ihnen darüber präsentierten Peptid-Antigens dar.

Die Hauptaufgabe CD8<sup>+</sup> T-Zellen liegt in der Zerstörung infizierter Zielzellen. CD4<sup>+</sup> T-Zellen lassen sich noch weiter differenzieren in T<sub>h</sub>1 und T<sub>h</sub>2. T<sub>h</sub>1 erkennen präsentiertes Antigen von Makrophagen. Über ihr zentrales Zytokin IFN- $\gamma$  triggern sie hauptsächlich die Aktivierung von Makrophagen und eine zellvermittelte Immunreaktion. T<sub>h</sub>2 reagieren auf Antigenpräsentation von B-Zellen mit der Produktion u.a. von IL-4 und IL-5 und triggern vorzugsweise eine humorale Immunantwort mit Antikörperproduktion (Murphy, 2002).

T-Zellen erkennen Antigene, die ihnen über MHC-Oberflächenmoleküle präsentiert werden. Dies sind Glykoproteine, die vom Haupthistokompatibilitätskomplex kodiert werden. Strukturell und funktionell unterscheidet man MHC-Klasse-I von MHC-Klasse-II Molekülen<sup>2</sup>. MHC-Peptid-Komplexe der Klasse I werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und binden den Korezeptor CD8, die der Klasse II werden auf Makrophagen, Dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert und binden an CD4 (Janeway, 2001). MHCs sind von einem hohen Polymorphismus ihrer variablen Regionen gekennzeichnet. Neben diesen so genannten klassischen MHCs gibt es eine ganze Reihe weiterer Moleküle mit nur

---

<sup>2</sup> MHC I bestehen aus 3  $\alpha$ -Domänen sowie dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin, MHC II aus zwei Ketten mit den Domänen  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$ , bzw.  $\beta_1$  und  $\beta_2$

geringem Polymorphismus, die jedoch ebenfalls in der Nähe des MHC-Genkomplexes liegen und gewisse strukturelle Übereinstimmungen wie das Vorhandensein eines  $\beta_2$ -Mikroglobulins teilen. Zu diesen nicht-klassischen MHCs zählen u. a. das murine H2-M3, das Peptide mit N-formylierten Aminosäureresten präsentiert, HLA-E, -F und -G, CD1, das Lipidantigene präsentiert sowie viele der NKG2D-Liganden wie MICA/B.

Die T-Zellen entstehen aus Vorläuferzellen, die aus dem Knochenmark zu ihrer Reifung in den Thymus wandern. Dort finden die Umordnung des TCR sowie die Differenzierung in  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen statt (Singer, 1999). Autoreaktive T-Zellen werden dabei durch positive und negative Selektion aussortiert, so dass nur naive T-Zellen, die keine Selbstantigene erkennen, funktionell aktiv werden können (Starr, 2003). Diese T-Zellen zirkulieren dann in der Blutbahn und in peripheren lymphatischen Organen, wo ihnen von professionellen APCs Antigene präsentiert werden.

## 1.4 $CD8^+$ T-Zell-Antwort

Eine T-Zell-Antwort verläuft in drei verschiedenen Phasen, Expansion, Kontraktion und Übergang in das Gedächtniszellstadium. Dies gilt für  $CD8^+$  T-Zellen unterschiedlicher Antigenpezifität gleichermaßen (Busch, 1998).

Für die Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten aus naiven  $CD8^+$  T-Zellen sind mindestens zwei verschiedene Signale notwendig: Das primäre stimulierende Signal 1 durch die Erkennung des MHC-I-Peptid-Komplexes mit dem TCR und ein kostimulatorisches Signal 2, über die Interaktion des Rezeptors CD28 mit den auf den APCs exprimierten Molekülen B7.1 und B7.2 (Davis 2003). Es kommt zu einer gesteigerten IL-2 Produktion mit nachfolgender Proliferation und Differenzierung in Effektorzellen. Differenzierte Zellen können bei weiterer Antigenstimulation auch ohne zusätzliche kostimulatorischen Signale Zielzellen attackieren. Dies geschieht u.a. über die Freisetzung zytotoxischer Granula mit Perforin und Granzym, Apoptoseinduktion über Fas und die Sekretion von Zytokinen wie  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\beta$  und  $TNF-\alpha$  (Griffiths, 1995).

Nach erfolgter Überwindung der Infektion kommt es zu einer präzise regulierten Kontraktionsphase, bei der die große Zahl an nicht mehr benötigten Effektor T-Zellen vermindert wird. Dies geschieht über programmierten Zelltod (Badovinac, 2002). Lediglich eine kleine Population von langlebigen Gedächtniszellen bleibt zurück. Diese sind gekennzeichnet durch eine schnelle Proliferation und Ausbildung von Effektorfunktionen bei Restimulation mit dem gleichen Antigen und der Vermittlung von protektiver Immunität

(Lanzavecchia, 2005). Neben zentralen Gedächtniszellen, die sich in Lymphatischen Organen aufhalten und Charakteristika naiver T-Zellen aufweisen, gibt es Effektor-Gedächtniszellen, die vor allem in nicht-lymphatischem Gewebe lokalisiert sind und eher Effektoreigenschaften besitzen. Noch ist nicht geklärt, ob sich die Gedächtniszellen direkt aus naiven T-Zellen entwickeln oder linear aus Effektorzellen hervorgehen.

## 1.5 Regulation einer T-Zellantwort

Die Intensität der Immunantwort wird über ein komplexes System von regulatorischen Zellpopulationen und immunmodulatorischen Rezeptoren und Signalmolekülen zusätzlich stimuliert oder inhibiert. So kann optimal auf die jeweiligen Bedingungen reagiert werden. Initiation, Amplifikation und Beendigung der Immunantwort laufen in einem präzise fein regulierten Gleichgewicht ab.

### 1.5.1 T-Helferzellen

Die schon erwähnten  $CD4^+$  T-Helferzellen können nach ihrer Aktivierung durch Antigenerkennung über MHC-Klasse-II Moleküle in  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen differenzieren. Dies geschieht über das Zusammenspiel unterschiedlicher Mechanismen, wichtig ist u.a. die Zytokinproduktion von Zellen des angeborenen Immunsystems und deren unterschiedliche Erkennung, sowie die Menge und Beschaffenheit des präsentierten Peptids (Wang, 1996). Während die  $T_H2$ -Helferzellen die humorale Antwort beeinflussen, spielen die  $T_H1$ -Helferzellen eine wichtige Rolle bei der Verstärkung zellulärer Immunantworten und der Fähigkeit effizientes Gedächtnis auszubilden. Helfer- und zytotoxische T-Zellen müssen die gleiche Antigenpräsentierende Zelle binden. Für die Aktivierung der Helferzellen wird die Bindung des membranständigen CD40-Liganden an CD40, einem Molekül der TNF-Familie benötigt, woraufhin makrophagenaktivierende Effektormoleküle wie  $IFN-\gamma$  ausgeschüttet werden. Dies führt zu einer gesteigerten Antigenpräsentation der Makrophagen und somit zu einer Aktivierung der T-Zellantwort (Behrens, 2004).

## 1.5.2 $\gamma\delta$ -T-Zellen und NKT-Zellen

Aufgrund der geringen Variabilität ihres TCR und der Beteiligung in der frühen Phase einer Immunantwort werden diese Zelltypen zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem angesiedelt.

Die TCR $\gamma$  und TCR $\delta$  Loci weisen weitaus weniger V-Segmente auf als die entsprechenden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Loci, so dass der TCR der  $\gamma\delta$ -T-Zellen nur eine begrenzte Vielfalt besitzt (Bendelac, 2001). Die genauen Liganden des TCR von  $\gamma\delta$ -T-Zellen sind noch nicht bekannt. Es scheint jedoch keine Antigenprozessierung nötig zu sein, sondern eine direkte Erkennung von Pathogenen zu erfolgen (Chien, 1996). Darüber hinaus können  $\gamma\delta$ -T-Zellen auch direkt über NKG2D (s.u.) aktiviert werden (Bauer, 1999). Ihr Vorkommen ist hauptsächlich auf Epithelien wie die Epidermis oder den Gastrointestinaltrakt beschränkt (Jameson, 2003). Sie sind dort direkt an Immunreaktionen beteiligt. So spielen sie eine Rolle bei der Wundheilung der Haut (Jameson, 2002) und des Darms (Chen, 2002). Weiterhin sind sie in der Lage, Entzündungsreaktionen der Haut zu regulieren. Sie können zu einer Inhibition von  $\alpha\beta$ -T-Zellen führen, die unabhängig von CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist (Guan, 2002; Giardi, 2002).

NKT-Zellen exprimieren sowohl typische NK-Zellmarker wie CD161/Nk1.1, als auch einen  $\alpha\beta$ -TCR mit eingeschränkter Variabilität. Mit ihm binden sie an CD1, ein nicht-klassisches MHC Molekül, das hauptsächlich mikrobielle Glykopeptide präsentiert. (Brossay, 1999) Auf CTL können sie entweder stimulierend über APC Aktivierung, als auch inhibitorisch wirken (Godfrey, 2004)

## 1.5.3 Regulatorische T-Zellen

Zu den klassischen regulatorischen T-Zellen gehören die natürlich vorkommenden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen und antigen-induzierte IL-10-produzierende TR1 Zellen.

Die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen repräsentieren ca. 5-10% der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten und exprimieren konstitutiv die IL-2 $\alpha$ -Kette (CD25) (Sakaguchi, 1995). Charakteristisches Merkmal ist das spezifische Vorhandensein des Transkriptionsfaktors FoxP3 (Hori, 2003). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* sind sie in der Lage, die Proliferation und Expansion von naiven T-Zellen zu inhibieren (Thornton, 1998). Dabei spielen immunosuppressive Zytokine wie IL-10 (Annacker, 2001) oder TGF $\beta$  eine wichtige Rolle. TGF $\beta$  scheint zudem in der Lage zu sein, durch eine FoxP3-Induktion CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T-Zellen in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen zu konvertieren (Chen, 2003)

Regulatorische T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn, Gastritis (Coombes, 2005), und Diabetes (Salomon, 2004) und können Transplantatabstoßung verringern (Kingsley, 2002), sowie die Immunantwort gegen Tumore unterdrücken.

IL-10 produzierende TR1 können aus naiven  $CD4^+$  T-Zellen durch chronische Antigenexposition hervorgehen (Barrat, 2002). Im Gegensatz zu den  $CD4^+CD25^+$  -  $T_{reg}$  scheint die Mehrzahl der TR1 kein FoxP3 zu exprimieren (Vieira, 2004). Sie sind ebenfalls in der Lage, die Proliferation von naiven T-Zellen zu inhibieren und verhindern experimentelle Autoimmunenzephalitis.

## 1.5.4 Immunmodulatorische Rezeptoren

Neben dem eingangs erwähnten kostimulatorischen Molekül CD28, welches das zusätzlich zum TCR-Signal benötigte Signal 2 zur Aktivierung von CTL liefert, besitzen  $CD8^+$  T-Zellen eine Reihe weiterer Rezeptoren, die ihre Aktivität beeinflussen. Diese besitzen sowohl kostimulatorische wie inhibitorische Eigenschaften. Interessanterweise werden viele dieser Moleküle auch von Zellen des angeborenen Immunsystems und hier besonders auf NK-Zellen exprimiert, wo sie oft auch initial beschrieben wurden. Während sie dort meist direkt stimulierende oder inhibierende Effekte ausüben, bzw. die relative Stärke dieser Signale die letztliche Aktivität bestimmt, wirken sie auf  $CD8^+$  T-Zellen eher im Sinne einer Feinmodulation.

### 1.5.4.1 Inhibierende Rezeptoren

Viele Inhibitorische Rezeptoren besitzen ein „Immunrezeptor Tyrosin-basiertes inhibitorisches Motiv“ (ITIM). Bei Ligandenbindung führt dies häufig zu einer Phosphorylierung durch Src-Kinasen und zu nachfolgender Aktivierung inhibitorischer Signalkaskaden.

Zu den am besten charakterisierten inhibitorischen Rezeptoren gehören die Immunglobulin G Fc Rezeptoren  $Fc\gamma RIIB$  und  $Fc\gamma RIIC$ , die auf B-Zellen, Makrophagen, Neutrophilen und Mastzellen, jedoch nicht auf T- und NK-Zellen exprimiert werden. Die letztgenannten Zelltypen besitzen dagegen eine Reihe unterschiedlicher Rezeptoren, die MHC-Klasse-I

Moleküle erkennen (Karre, 1986). Sie lassen sich in drei Familien einordnen: Ly49, KIR und CD94/NKG2 (Long, 1997).

Die murinen Ly49 Rezeptoren bilden eine Gruppe aus acht Mitgliedern (A-I), die bis auf Ly49H und Ly49D polymorphe Epitope auf H-2D und H-2K Klasse-I Molekülen erkennen. Sie werden unabhängig voneinander reguliert, was eine monoallele Expression auf NK- und T-Zellen erlaubt.

Die Killerzell Ig-ähnlichen Rezeptoren (KIR) werden hauptsächlich auf humanen Zellen exprimiert. Sie erkennen humane Leukozytenantigene der Klassen HLA-A, HLA-B und HLA-C. Einige der KIR sind ebenfalls aktivierende Rezeptoren und assoziieren mit dem Adapterprotein DAP12 (Bakker, 1998). Auf murinen NK-Zellen wurden bislang zwei KIR-ähnliche Moleküle gefunden, deren genaue Funktion bislang jedoch noch unbekannt ist (Hoelbrekken, 2003; Welch, 2003)

CD94/NKG2A Rezeptoren werden sowohl von humanen als auch von murinen Zellen exprimiert. Sie erkennen HLA-E (human) und Qa1 (murin). Über die zwei ITIMs des NKG2A wird die inhibitorische Signalkaskade übermittelt.

NK- und T-Zellen können somit den Expressionsgrad von MHC-Molekülen auf Geweben erkennen. Bei normaler Expression werden sie inhibiert (Karre, 1986), was zur Formulierung der so genannten „Missing-self-Hypothese“ führte (Ljunggren, 1990). Kommt es jedoch bei Virusinfektion oder Tumortransformation zu einer verminderten oder fehlenden Expression von MHC, fällt die Inhibition weg, und die Ziellzellen können lysiert werden. Mit der Identifizierung von weiteren inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren (s. u.) wurde diese Hypothese modifiziert, im Sinne einer Integration der verschiedenen Signale, die letztlich die NK-Zell-Aktivität bestimmen (Lanier, 2005).

Ein weiterer inhibitorischer Rezeptor auf T-Zellen ist CTLA4. Er bindet die gleichen Liganden wie CD28 (B7.1 und B7.2). Die Suppression der T-Zellaktivität durch dieses Molekül spielt eine wichtige Rolle in der Verhinderung von Autoimmunität (Tivol, 1995).

#### **1.5.4.2 Aktivierende Rezeptoren**

Neben CD28 gibt es weitere Rezeptoren der Immunglobulin-Familie, z.B. ICOS (induzierbarer T-Zell Kostimulator) (Hutloff, 1999). Er bindet an ICOS-Ligand, einem Molekül aus der B7 Familie (Subudhi, 2005). ICOS-Ligand wird auf aktivierten Dendritischen Zellen, Monozyten und B Zellen exprimiert.

Eine große Gruppe von kostimulatorischen Rezeptoren bildet die Tumor-Nekrosefaktor Rezeptor (TNFR) Familie (Croft, 2003). Sie besteht aus fünf Mitgliedern, die Liganden auf APCs erkennen. Es kann jedoch auch zu Ligandenexpression durch die T-Zellen selbst kommen. Das Expressionsmuster der Rezeptoren auf T-Zellen variiert in Abhängigkeit ihres Aktivierungszustandes. So lassen sich charakteristische Änderungen in der jeweiligen Expression auf Naiven-, Effektor-, und Gedächtnis-T-Zellen finden. Die Aktivierung der Rezeptoren kann zu gesteigerter Proliferation und Effektorfunktion sowie Survival-Signalen führen.

Charakteristisches Merkmal vieler stimulatorischer Rezeptoren ist ein Immunrezeptor Tyrosin-basierendes Aktivierungsmotiv (ITAM) am zytoplasmatischen Teil der Transmembrandomäne, das nach Phosphorylierung von zytoplasmatischen Signalmolekülen erkannt wird und zur Aktivierung der Zellen führt (Janeway, 2001). Zu diesem Rezeptortyp gehören u.a. NKG2D, Ly49H und TREM. TREMs (triggering receptors expressed by myeloid cells) sind eine Gruppe von Rezeptoren, die ausschließlich von myeloiden Zellen exprimiert werden und u.a. zytokinantworten auf bakterielle Produkte amplifizieren (Bouchon, 2000).

Ly49H wird von etwa der Hälfte aller NK-Zellen exprimiert. Er ist neben Ly49D der einzige bisher bekannte stimulatorische Rezeptor der Ly49 Familie und bindet direkt an ein Produkt von m157 des murinen Cytomegalovirus (Arase, 2002). Beide Moleküle assoziieren mit dem Signalmolekül DAP12, welches das ITAM enthält.

## 1.6 NKG2D

NKG2D ist ein C-Typ lektinartiger Rezeptor<sup>3</sup>, der im Natürlichen Killerzell Genkomplex auf dem humanen Chromosom 12 und auf dem murinen Chromosom 6 kodiert wird (Raulet, 2003). Aufgrund der gemeinsamen Typ-2 Transmembran-Struktur mit weiteren Rezeptoren in unmittelbarer Nachbarschaft erfolgte deren Zusammenfassung in die Gruppe der NKG2-Rezeptoren. Bei näherer Betrachtung handelt es sich bei NKG2D jedoch um einen eigenständiger Rezeptor mit nur geringer Ähnlichkeit zu den anderen Mitgliedern. NKG2A, NKG2C und NKG2E zeigen sowohl in ihrer Sequenz und ihrer Struktur als Heterodimer mit CD94 große Übereinstimmung und erkennen die nicht-klassischen MHC Klasse I Moleküle HLA-E (human) und Qa1b (murin) (Braud, 1999).

---

<sup>3</sup> C-Typ lektinartige Rezeptoren besitzen eine Domäne, die ursprünglich als kohlenhydratbindend beschrieben wurde und Ca<sup>+</sup>-abhängig (C-Typ) sind

Der homodimere NKG2D-Rezeptor wird auf einer Reihe unterschiedlicher Immunzellen exprimiert. Er findet sich konstitutiv auf nahezu allen humanen und murinen NK-Zellen (Jamieson, 2002). Während naive murine CD8<sup>+</sup> T-Zellen keine NKG2D-Expression zeigen, wird diese durch Aktivierung auf Subpopulationen antigen-spezifischer Zellen hochreguliert und bleibt auch auf CD8<sup>+</sup> Gedächtnis T-Zellen bestehen (Jamieson, 2002). Murine CD4<sup>+</sup> T-Zellen bleiben dagegen auch unter Aktivierung NKG2D negativ. Nur auf einem Teil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Patienten mit Rheumatischer Polyarthritits konnte bislang NKG2D nachgewiesen werden (Groh, 2003). Weiterhin findet sich NKG2D auf  $\gamma\delta$  T-Zellen, auf nahezu allen humanen peripheren und intestinalen intraepithelialen, sowie murinen epidermalen, jedoch nicht auf murinen intestinalen intraepithelialen  $\gamma\delta$  T-Zellen (Bauer, 1999). Auch ein Teil muriner NK1.1<sup>+</sup> T-Zellen sowie aktivierte murine Makrophagen exprimiert NKG2D (Pende, 2001).

Die Signaltransduktion von NKG2D erfolgt über die Assoziation mit zwei transmembranen Adaptermolekülen, DAP10 und DAP12. Dabei ist in der Maus das Vorliegen bestimmter Splice-Varianten von NKG2D, NKG2D-L (lang) und NKG2D-S (kurz) ausschlaggebend (Diefenbach, 2002; Gilfillan, 2002). Im Menschen gibt es bislang keinen Hinweis auf das Vorhandensein der kurzen Variante. Die um 13 Aminosäuren in der zytoplasmatischen Region längere Variante NKG2D-L assoziiert nur mit DAP10, während NKG2D-S sowohl mit DAP10 als auch mit DAP12 interagieren kann. Beide Splice-Varianten kommen in aktivierten NK Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Makrophagen vor, in Makrophagen allerdings bevorzugt NKG2D-S und in naiven NK Zellen nur NKG2D-L. Während NK Zellen und Makrophagen sowohl DAP10 als auch DAP12 exprimieren, liegt in CD8<sup>+</sup> T-Zellen nur DAP10 vor. Dabei führt die unterschiedliche Expression und Assoziation in den verschiedenen Zellen bei NKG2D-Aktivierung zu differentiellen Auswirkungen, entweder zu direkter Stimulation oder zu kostimulatorischen Effekten. NK Zellen können über NKG2D direkt aktiviert werden, was zu erhöhter Zytotoxizität und gesteigerter Ca<sup>++</sup> Mobilisierung, Produktion von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , sowie verschiedener weiterer Chemokine führt (Jamieson, 2002; Sutherland, 2002). NKG2D ist hier auch in der Lage inhibitorische Signale durch MHC spezifische Rezeptoren zu dominieren (Pende, 2001). In CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist ein alleiniges Signal über NKG2D-L/DAP10 jedoch nicht zur Aktivierung ausreichend (Groh, 2001). Vielmehr wird ein primäres Signal über den TCR benötigt. NKG2D kann dann zu einer Kostimulation mit gesteigerter Zelllyse und IFN- $\gamma$ , IL-2 und IL-4 Produktion führen (Groh, 2001; Das, 2001).

Über die weitere Signalkaskade von NKG2D herrscht noch einige Unklarheit. Die zytoplasmatische Domäne von DAP10 enthält wie CD28 ein Tyrosinmotiv, YxNM, das bei Phosphorylierung die p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3 K) bindet (Sutherland, 2001; Wu, 1999). Daneben konnte auch Phosphorylierung von JAK2 und STAT5 beobachtet werden. Im Gegensatz zu DAP10 enthält DAP12 ein Immunrezeptor Tyrosinbasiertes Aktivierungs-Motiv (ITAM). Nach Tyrosinphosphorylierung können SYK und ZAP70 aktiviert werden.

Für NKG2D sind bislang eine Reihe unterschiedlicher Liganden bekannt. So bindet humanes NKG2D die MHC-Klasse I verwandten Proteine A und B (MICA/B) (Bauer, 1999) sowie Moleküle der UL 16-bindenden Proteine (ULBP) (Cosman, 2001), die das UL 16 Protein humanen CMVs erkennen. Während für MICA und MICB bislang keine murinen Entsprechungen bekannt sind, bildet die Rae1/H60/MULT1 Genfamilie das murine Homolog zu den ULBPs. Die durch die Behandlung von F9 Embryokarzinomzellen mit Retinoider Säure induzierbaren Rae1-Proteine (retinoic acid early transcript 1) bestehen bislang aus fünf eng verwandten Molekülen (Rae1 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) (Nomura, 1994; Cerwenka, 2000). Es handelt sich um GPI-verankerte Proteine. H60 wurde zuerst als dominantes Minorhistokompatibilitätsantigen (minor histocompatibility antigen) in der Abstoßungsreaktion von zytotoxischen T-Zellen von C57BL/6 Mäusen gegen BALB/b Zellen beschrieben (Malarkannan, 1998; Diefenbach, 2001). Als dritter Ligand wurde Mult1 (murine UL 16-binding protein like transcript 1) identifiziert (Carayannopoulos, 2002). Die murinen Liganden zeigen nur eine niedrige (ca. 20%) Übereinstimmung in ihrer Sequenz und weisen eine gewisse Ähnlichkeit zur  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2 Domäne MHC-I-Moleküle auf, besitzen jedoch im Gegensatz zu MICA/B keine  $\alpha$ 3-ähnliche Domäne. Neben ihrer Struktur unterscheiden sich die Liganden auch in ihrer Affinität zu NKG2D. Im Vergleich zu vielen anderen Immunrezeptor-Liganden Interaktionen handelt es sich insgesamt um relativ hohe Affinitäten. Dabei zeigen Mult1, H60 und Rae1 $\epsilon$  deutlich stärkere Affinitäten zu NKG2D als MICA/B und die restlichen Rae1-Proteine (O'Callaghan, 2001; Carayannopoulos, 2002).

Das Expressionsmuster der verschiedenen NKG2D-Liganden ist erst lückenhaft bekannt. Es gibt jedoch Hinweise auf eine typische Verteilung bestimmter Liganden, eine fehlende Expression der meisten Liganden in gesundem Gewebe, sowie eine Hochregulierung durch bestimmte pathologische Prozesse. Normalerweise werden MICA/B nur auf humanen intestinalen Epithelien exprimiert (Groh, 1996). Für Rae1 ist außer einer Expression vor allem im Gehirn während einer frühen embryonalen Phase keine Expression in adultem Gewebe bekannt (Nomura, 1996). Ebenso wenig für Mult1, auch wenn in vielen Zellen mRNA

nachzuweisen ist (Diefenbach, 2003). H60 wird besonders in Thymuszellen auf hohem Niveau exprimiert (Diefenbach, 2001). Ein molekularer Mechanismus, über den die Expression von NKG2D-Liganden getriggert werden kann, wurde erst kürzlich beschrieben. So führt die Beschädigung von DNA über die Beteiligung der Proteinkinasen ATM (ataxia telangiectasia, mutated) und ATR (ATM- und Rad3 verwand) zu einer gesteigerten Liganden-Expression sowohl in der Maus als auch im Menschen (Gasser, 2005)

## 1.7 Ziele der Arbeit

Bisherige Versuche zur Charakterisierung von NKG2D beruhen im Wesentlichen auf Studien, die mit blockierenden oder aktivierenden monoklonalen Antikörpern gegen NKG2D und NKG2D-Fusionsproteinen durchgeführt wurden. Diese wurden zur Untersuchung des Expressionsmusters von NKG2D auf verschiedenen Zelltypen und von funktionellen Aspekten, v.a. der Zytotoxizität und der Zytokinsekretion, verwendet. Ein wesentliches Defizit dieses Ansatzes liegt jedoch in der fehlenden Differenzierung zwischen unterschiedlichen NKG2D-Liganden.

Der erste Teil dieser Arbeit bestand darin, die murinen NKG2D-Liganden H60, Rae und den humanen NKG2D-Liganden MICA8 rekombinant herzustellen und ähnlich der MHC-Tetramere zu multimerisieren. Durch die Verwendung dieser Multimere sollte eine wesentlich genauere Annäherung an die physiologische Funktion der Liganden-Rezeptor-Interaktion erreicht und eine spezifische Untersuchung der jeweiligen Liganden ermöglicht werden.

Im zweiten Teil sollte das Bindungsmuster dieser Liganden-Multimere analysiert, NKG2D exprimierende Zelltypen klassifiziert und mögliche Bindungsunterschiede zwischen den Liganden-Multimeren festgestellt werden. Um neben der konstitutiven Expression von NKG2D mögliche Änderungen unter Infektionsbedingungen nachweisen zu können, sollten Infektionskinetiken mit *L. monocytogenes* durchgeführt werden.

Im dritten Teil wurden die Auswirkungen der unterschiedlichen Liganden-Multimere auf die Funktion und Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen untersucht.

## 2 Methoden

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht die starke Amplifizierung eines gewünschten DNA-Abschnitts mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide (Primer), Desoxynukleotiden und temperaturstabiler DNA-Polymerasen. Abhängig vom Primeraufbau lassen sich hierbei auch gezielt Mutationen (wie z.B. Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen) in die DNA einbringen. Verwendet wurde eine Pfu DNA Polymerase (Stratagene), die eine 3'-5' Exonuklease Korrekturlesefunktion besitzt, mit der sie falsch eingebaute Nukleotide erkennt und korrigiert. Dadurch wird die Fehlerrate sehr gering gehalten und die DNA-Sequenz kann exakt reproduziert werden.

Standardansatz:

2 µl	DNA H60
2,5 µl	Primer NdeI (100 ng/µl)
2,5 µl	Primer BamHI (100ng/µl)
5 µl	10x Puffer (Stratagene)
5 µl	dNTPs (Roche; je 5 µl ATP/TTP/GTP/CTP + 180 µl ddH <sub>2</sub> O, 100mM)
1 µl	Pfu-Turbo-Polymerase (Stratagene)
ad 50 µl	ddH <sub>2</sub> O

In einem Thermoblock wurde die PCR dann mit folgendem Programm durchgeführt:

1. 94 °C      5 min
2. 80 °C      2 min

3. 94 °C      2 min
4. 56 °C      2 min
5. 72 °C      2 min 30 sec
6. 72 °C      5 min

Die Schritte drei bis fünf wurden in 30 Zyklen wiederholt, das Produkt nach Schritt 6 bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C gekühlt.

Die Zugabe der Polymerase erfolgte verzögert nach Aufheizen der Probe auf 94 °C (hot start). Dadurch wird verhindert, dass die Polymerase schon bei niedrigen Temperaturen, bei denen die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Anlagerung der Primer an die DNA relativ erhöht ist, Aktivität entfaltet und somit die DNA fehlerhaft amplifiziert wird.

### 2.1.2 Taq-Step

Als Voraussetzung für die TA-Klonierung (s. u.) wurde mittels einer Taq-Polymerase ein Adenin-Nukleotid an die 3'-Enden des PCR-Produkts angefügt:

- 50 µl PCR-Produkt
- 5µl dATPs (Roche; 5µl ATP + 45 µl ddH<sub>2</sub>O, 100mM)
- 1 µl Taq-Polymerase (eigene Herstellung)

wurden für 10 min bei 72 °C im Heizblock inkubiert.

### 2.1.3 Restriktionsendonuklease-Verdau

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die spezifische Nukleotidsequenzen erkennen und dort DNA an definierten Stellen schneiden. Sie wurden zu analytischem und präparativem Verdau eingesetzt. Puffer (ReACT3, Invitrogen) und Enzymkonzentrationen (NdeI, BamHI, beide Invitrogen) erfolgten nach Herstellerangaben.

Analytischer Kurzverdau:		präparativer Verdau:	
6 $\mu$ l	dH <sub>2</sub> O	14 $\mu$ l	ddH <sub>2</sub> O
1 $\mu$ l	ReACT 3	2 $\mu$ l	ReACT 3
2 $\mu$ l	DNA	3 $\mu$ l	DNA
0,5 $\mu$ l	NdeI (5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	NdeI (5 U/ $\mu$ Liganden)
0,5 $\mu$ l	BamHI (10 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	BamHI (10 U/ $\mu$ l)
2 h bei 37°C		Ü/N bei 37°C	

### 2.1.4 TA-Klonierung

Der Zwischenschritt der TA-Klonierung eines PCR-Produktes dient der Effizienzsteigerung der Klonierung. Die Vektoren des TA-Klonierungssystems (Invitrogen) liegen linearisiert vor und besitzen am 5'-Ende einen zum 3'-Anfang des PCR-Produktes komplementären Desoxythymidinüberhang. Damit wird eine direkte Basenpaarung ermöglicht und die Klonierung vereinfacht, ohne dass weitere Modifikationen wie Dephosphorylierung nach der PCR oder Aufreinigungen des PCR-Produktes erforderlich sind.

Zudem können erfolgreich klonierte Plasmide nach Transformation in kompetente Bakterien anhand der Kolonienfarbe erkannt werden. Der TA-Vektor besitzt ein  $\beta$ -Galaktosidase-Gen (*lacZ*), das durch die Linearisierung des Vektors unterbrochen wird. Bei erfolgter Klonierung bleibt das Gen durch den eingefügten Abschnitt weiterhin funktionslos, ohne Einbau setzt es sich dagegen wieder zusammen, so dass die  $\beta$ -Galaktosidase transkribiert und produziert werden kann. Diese kann nun das farblose X-Gal der Agarplatten in blaues 5-Brom-4-Chlor-Indigo umsetzen. Bakterien mit leerem Vektor stellen sich dadurch blau dar, erfolgreich ligierte bleiben weiß.

Ligationsansatz mit Verwendung des TA-Klonierungskit (Invitrogen):

2 $\mu$ l	PCR 2.1-Vektor
2 $\mu$ l	PCR-Produkt
1 $\mu$ l	10x Ligationspuffer
1 $\mu$ l	T4-Ligase
ad 10 $\mu$ l	ddH <sub>2</sub> O

## 2.1.5 Ligation von Restriktionsfragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor wurde mit einem Ligations-Kit (Rapid DNA Ligation, Roche) folgendermaßen durchgeführt:

5 $\mu$ l	DNA-Fragment
3 $\mu$ l	Vektor (pET 27b)
2 $\mu$ l	5x Puffer
10 $\mu$ l	2x Puffer
1 $\mu$ l	T4-Ligase

Der Ansatz wurde für 15 min bei RT inkubiert.

## 2.1.6 Agarosegel-Elektrophorese

Aufgrund der DNA-Größe wurden 1%ige Agarosegele verwendet. 0,45 g Agarose wurden durch Aufkochen in 40 ml TBE-Puffer gelöst, mit 1  $\mu$ l Ethidiumbromid versetzt und ein Gel mit acht Kammertaschen gegossen. Nach dem Aushärten wurde es in eine mit TBE als Leiter gefüllte Gelkammer gesetzt. 56  $\mu$ l DNA-Probe wurden mit 8  $\mu$ l 6x Orange G gemischt und auf zwei Taschen verteilt. Als Größenstandard wurden 4  $\mu$ l 1 kb DNA Marker (10  $\mu$ l 1 kb DNA ladder, Biolabs + 50  $\mu$ l Orange G) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für ca. 40 min bei 100 mV.

Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaare doppelsträngiger DNA. Bei Anregung durch UV-Licht leuchtet er und macht so die DNA im Gel sichtbar.

## 2.1.7 DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurden 3  $\mu$ l DNA in 597  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O gelöst und photometrisch bei 260 nm und 280 nm die optische Dichte gemessen, aus der das Photometer die Konzentration errechnet.

### 2.1.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wurde einem externen Labor (SEQ LAB, Göttingen) durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden je 600 µg DNA mit 2 µl Primern (T7 bzw. T7term) versetzt und mit dH<sub>2</sub>O auf 7 µl aufgefüllt.

### 2.1.9 Plasmid Mini Präparation

Plasmid-DNA wurde je aus sechs verschiedenen Übernachtskulturen (je 6 ml LB-Medium und 6 µl Ampicillin, angeimpft mit einer Kolonie, Ü/N bei 37°C, Abnahme 1 ml für Bakterienstocks (s. 2.2.1.4.2)) nach Zentrifugation für 20 min bei 4°C und 2000 U/min mit Hilfe eines Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Hierbei werden die Zellen lysiert, RNA und chromosomale DNA, sowie Proteine und Zelltrümmer von der Plasmid-DNA getrennt. Diese kann dann durch Zentrifugation an Silicagelmembranen kleiner Zentrifugationssäulen gebunden und weiter gereinigt werden, bevor sie in 50 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen wird.

### 2.1.10 Gel-Extraktion

Für die Isolierung der DNA aus Agarosegelen nach elektrophoretischer Auftrennung wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht sichtbar gemacht, mit einem Skalpell ausgeschnitten und unter Verwendung eines Gel-Extraktionskits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Die DNA wird dabei nach Schmelzen der Agarose über die Silicagelmembranen der oben erwähnte Zentrifugationssäulen gereinigt und in 30 µl dH<sub>2</sub>O gelöst.

### 2.1.11 Bakterientransformation

Verschiedene kompetente *E. coli*-Stämme wurden durch Hitzeschock transformiert. „one shot“-Zellen wurden nach TA-Ligation verwendet, XL-10 gold nach Ligation in den Expressionsvektor verwendet bzw. für die Proteinexpression BL21(DE3). Dabei wurden je nach Stamm 5 µl bzw. 3 µl Ligationsansatz pro Aliquot Bakterien hinzugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 30 sec bei 42°C, erneute Abkühlung für 2

min auf Eis, sowie nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium eine 30 minütige Inkubation unter Schütteln bei 37°C, bevor davon zweimal 100 µl und einmal 50 µl auf Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert wurden. Nach TA-Ligation wurden die Agarplatten zuvor mit je 100 µl X-Gal bedeckt, um die Farbselektion zu ermöglichen. Aufgrund des Resistenzgens für das entsprechende Antibiotikum wachsen nach Inkubation bei 37 °C Ü/N nur erfolgreich transformierte Bakterien auf den Platten.

### **2.1.12 Bakterienstocks**

Zur Aufbewahrung wurden aus den Bakterienkulturen für Mini-Preps vor Präparation je 1 ml abgenommen, 1ml steriles LB-Medium, versetzt mit 20% Glycerin zugegeben und bei -80°C eingefroren. Die Bakterien können nach Entnahme einiger µl der angetauten Proben in LB-Medium überführt und weiterverwendet werden.

## **2.2 Proteinbiochemie**

### **2.2.1 Proteinexpression**

Die Expression des Proteins erfolgte in 6 l Kulturen bei 37 °C im Schüttler. Zu 6 x 1 l LB Medium wurden je 10 ml 40% Glukose sowie Kanamycin in einer Konzentration von 100 mg/ml zugegeben. Aus Bakterienstocks wurden 20 µl entnommen, in 7 ml LB-Medium gelöst und davon je 1 ml pro Flasche zugegeben. Die Kulturen wurden bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Bei einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,7-0,75 wurde aus jeder Flasche 1 ml als Nullwert der späteren Expressionskontrolle entnommen und durch Zugabe von 0,4 mM IPTG die Expression in den BL21(DE3) Zellen induziert. BL21 (DE3) Zellen sind für die Expression von Fremdprotein optimiert. Sie besitzen eine RNA-Polymerase T7 unter Kontrolle des Promotors Plac, der durch IPTG induzierbar ist. Bei IPTG-Zugabe wird somit nahezu ausschließlich mit der T7 Polymerase das hinter dem T7 Promoter stehende klonierte Gen des Plasmidvektors transkribiert. Weiterhin enthalten sie keine Proteasen mehr, die das exprimierte Protein zerstören könnten. Nach weiteren 3 h Inkubation wurde erneut je 1 ml für eine Expressionskontrolle entnommen.

## 2.2.2 Proteinaufreinigung

Das in so genannten Einschlusskörpern vorliegende Protein wurde mechanisch, chemisch und enzymatisch aufgereinigt und wieder in Lösung gebracht. Die einzelnen Kulturansätze wurden jeweils separat behandelt.

Nach Proteinexpression wurden die Kulturen für 20 min bei 2000g und 4 °C pelletiert, in 13 ml Lysepuffer aufgenommen und mit Ultraschall homogenisiert, bevor 100 ml Lysozym, 250 ml DNase I und 50 ml MgCl<sub>2</sub> hinzugegeben wurden. Mit 12,5 ml Lysepuffer wurden die Ansätze bei RT für ca. 1h inkubiert, bis die Viskosität abnimmt. Thermisch wurden die Bakterienmembranen zerstört durch 20 minütiges Einfrieren bei -80 °C und Wiedererwärmen für 30 min bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend wurden erneut 50 ml MgCl<sub>2</sub> hinzugegeben und nach weiteren 30 min 350 ml NaEDTA.

Die weitere Verarbeitung geschah durchgehend auf Eis bzw. bei 4 °C. Zuerst wurden die Ansätze für 20 min bei 11.000xg pelletiert und die Pellets in 10 ml Triton x-100-haltigem Waschpuffer resuspendiert, sowie mit Ultraschall homogenisiert. Dies wurde wiederholt, allerdings mit Resuspendierung in 10 ml Waschpuffer ohne Triton x-100. Nach letzter Pelletierung wurde das rekombinante Protein in 2-4 ml 8 M Urea bei RT gelöst, eine 1 ml Probe für die Qualitätskontrolle entnommen und in 2 ml Aliquots bei -80 °C gelagert.

## 2.2.3 Proteingel

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Das anionische Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich an die durch Hitzebehandlung denaturierten Proteine proportional zum Molekulargewicht an. Durch die starke Ladung des SDS kann die der Aminosäurereste der Proteine vernachlässigt werden. Aufgrund der Größe der Moleküle wurde ein 10 % SDS-Gel verwendet:

7 ml	dH <sub>2</sub> O
4,38 ml	1,5 M Tris pH 8,8
5,8 ml	30% Acryl 1% bis

170 µl	10% SDS
8,8 µl	Temed
170 µl	10% APS

Um ein gleichmäßiges Laufen der Proteine zu gewährleisten wurde über das Laufgel ein Stockinggel gegossen:

6,2 ml	dH <sub>2</sub> O
2,5 ml	0,5 M Tris pH 6,8
1,2 ml	30% Acryl 1% bis
100 µl	SDS
5 µl	Temed
100 µl	10% APS

Nach Auspolymerisierung wurde das Gel mit Laufpuffer umgeben und in die Kammertaschen die Proben aufgetragen.

### 2.2.4 Coomassie Färbung

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R250 bindet Protein unspezifisch, so dass Proteinbanden sichtbar gemacht werden können. Der Vorteil gegenüber anderen Färbemethoden wie der Silberfärbung liegen in der relativ einfachen Durchführbarkeit. Dafür ist die Sensitivität mit 0,1-0,5 µg Protein deutlich geringer.

Das SDS-Polyacrylamid-Gel wird für eine Stunde in einer Färbelösung geschüttelt und anschließend für einige Stunden entfärbt. Die hierfür verwendete Entfärbelösung kann zwischendurch gewechselt werden, um den Vorgang zu beschleunigen.

### 2.2.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Mittels BCA-Test wurde die Proteinkonzentration der Proben bestimmt. Bei der hier stattfindenden Biuret-Reaktion werden hinzugegebene Cu<sup>2+</sup>-Ionen von den reduktiven Gruppen des Proteins zu Cu<sup>+</sup>-Ionen reduziert. Diese wiederum binden je zwei Moleküle BCA und ergeben einen wasserlöslichen lilafarbenen Komplex. Die Absorption dieses Chelats wird bei 562nm gemessen. Sie ist direkt proportional zur Proteinkonzentration, die dann im Vergleich zu einer Standardproteinreihe mit BSA errechnet werden kann.

Zunächst wurde die BCA-Lösung hergestellt:

12,25 ml Protein Assay Reagent A

250 µl Protein Assay Reagent B

Standardproteinreihe:

1ml BCA-Lösung mit Konzentrationen

je 20 µl Standardprotein in Urea

ergibt eine Standardreihe von 1,5 mg/ml bis 100 mg/ml

Testlösung:

1ml BCA-Lösung

20 µl Testprotein

Inkubation der Ansätze für 30 min bei 37 C° zur Beschleunigung der Reaktion. Anschließend Messung der Extinktion bei 562 nm.

Da es sich im Bereich zwischen 1 µg/ml bis 100 mg/ml um einen linearen Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration und Extinktion handelt, lässt sich die Probenkonzentration  $c$  als Verhältnis von Proben- ( $E_p$ ) zur Standardextinktion ( $E_s$ ) bezogen auf die Standardkonzentration ( $c_s$ ) berechnen.

$$C = E_p / E_s \times c_s$$

### **2.2.6 *In vitro* Proteinfaltung und Konzentration**

Die Rückfaltung der denaturierten, in 8M Urea gelagerten Proteine in ihre physiologische Konformation erfolgt in einem speziellen argininreichen Entfaltungspuffer mit einem pH von 8,0:

100 mM TrisHCL

400 mM L-Arginin-HCL

2 mM NaEDTA

0,5 mM oxidiertes Glutathion

5 mM reduziertes Glutathion

500 mL ddH<sub>2</sub>O

Unerwünschte Aggregation wird zum einen durch die Zugabe von Arginin, das zwischenmolekulare hydrophobe Interaktionen reduziert, vermindert; zum anderen durch die Verwendung eines Redoxsystems mit oxidiertem und reduziertem Glutathion, das die Bildung von Disulfidbrücken verhindert.

Der Entfaltungspuffer wird zu je 200 ml auf Erlenmeyerkolben verteilt auf Eis gekühlt, bevor jeweils Proteaseinhibitoren zugegeben werden:

2 ml PMSF

100 µl Pepstatin

100 µl Leupeptin

Kurz vor der eigentlichen Entfaltung wird zum zu entfaltenden Protein zunächst 0,5 ml Guanidin-Lösung (3M Guanidin-HCL, 10mM Natriumacid, 10mM NaEDTA) gegeben. Guanidin fungiert hier als weiterer Denaturant, der die Löslichkeit des Proteins erhöht und ebenfalls ungewollte Aggregation verringert.

Der Entfaltungsvorgang findet unter permanentem leichtem Rühren bei 10 °C im Kühlraum statt. Die Zugabe geschieht im Abstand von ca. acht Stunden. Hierfür wird kurzzeitig die Rührfrequenz erhöht und das Protein mit einer 1ml Spritze injiziert, um eine schnelle und effiziente Verteilung zu erreichen. Nach der letzten Injektion wird für weitere 24 Stunden unter leichtem Rühren bei 10 °C inkubiert.

Die Entfaltungslösung wird nun durch Zentrifugation für 15 min bei 2500 x g und 4 °C von größeren Präzipitaten gereinigt.

Der Überstand wird anschließend in Rührzellen über 10.000 D MWCO Membranen unter einem N<sub>2</sub>-Druck von 55 psi konzentriert und gleichzeitig ein Pufferaustausch durchgeführt. Der Vorgang findet bei 4 °C im Kühlraum statt. Nach einem ersten Konzentrationsgang auf 10 ml werden 90 ml Austauschpuffer (20 mM TrisHCL, 50 mM NaCl, filtriert, pH 8,0) hinzugegeben. Dies wird zweimal wiederholt. Nach der letzten Konzentration auf 10 ml wird die Probe über eine 0,22 µm Membran in Zentrifugationsfilter mit 10.000 D MWCO-Membranen überführt und bei 4 °C mit 2000 x g auf ein Endvolumen von 700 µl gebracht.

### 2.2.7 Biotinylierung

Das Anhängen eines Biotin-Moleküls an das C-terminale Ende der Proteine geschieht enzymatisch mittels der Biotin-Protein-Ligase BirA unter Anwesenheit von d-Biotin und ATP. Diese fügt an einen Lysinrest innerhalb der Biotinbindungssequenz ein Biotinmolekül an.

- 700 µl konzentriertes Protein
- 100 µl Lösung A (0,5 M Bicine pH 8,3)
- 100 µl Lösung B (100 mM ATP, 100 mM MgOAc, 200 mM Biotin)
- 100 µl Extra d-Biotin (500 mM Biotin)
- 10 µl BirA Enzym
- 0,5 µl Pepstatin
- 0,5 µl Leupeptin

Der Ansatz wird bei Raumtemperatur Ü/N inkubiert.

### 2.2.8 FPLC

Die Aufreinigung der biotinylierten Proteine geschieht mittels Gelfiltration und Größenseparation über ein FPLC-System. Dadurch lassen sich unerwünschte Aggregate wie Dimere, sowie überschüssiges ATP, BirA und vor allem Biotin, das bei der nachfolgenden Multimerisierung störend beeinflussen könnte, entfernen.

Zunächst wird die Säule (Superdex 200 HR, Pharmacia) mit FPLC-Puffer (20 mM TrisHCL, 50 mM NaCl, pH 8,0, filtriert) bei einer Flussrate von 0,2 ml/min gespült. Vor dem Auftragen der Probe wird diese nochmals über eine 0,22 µm Membran filtriert. Während des Separationsvorgangs beträgt die Flussrate 0,5 ml/min, das Volumen der Fraktionen 500 ml. Die Proteine werden bei 280nm detektiert.

Nach erfolgter Auftrennung werden die Fraktionen entsprechender Molekülgröße gesammelt und durch Zentrifugation über eine 10.000 D MWCO Membran auf 550 µl konzentriert, bei gleichzeitigem Pufferaustausch zu PBS pH 8,0 (2 µl 0,5 M NaEDTA, 1 µl 30% NaN<sub>3</sub>, sowie Zugabe von 0,5 µl Leupeptin (2 µg/ml), 0,5 µl Pepstatin (2 µg/ml) pro ml Protein-Lösung.

## 2.3 Multimerisierung

Über die vier Biotinbindungsstellen des Streptavidins können die aufgereinigten und biotinylierten Rezeptor- und Ligandenmoleküle multimerisiert werden. Um alle Bindungsstellen erfolgreich zu besetzen, muss ein ständiger Überschuss an Protein vorliegen, weshalb Streptavidin in kleinen Mengen zugegeben wird. Da H60- und RAE-Multimere relativ instabil sind, wurden sie vor Gebrauch neu angesetzt. Fluoreszenzkonjugiertes Streptavidin wurde im molaren Verhältnis von 4:1 zugegeben und der Ansatz für mindestens eine Stunde lichtgeschützt auf Eis oder bei 4 °C inkubiert. Im Gegensatz dazu sind MICA-, NKG2D- und MULT1-Multimere über längere Zeit stabil und können bei 4 °C aufbewahrt werden. Fluoreszenzkonjugiertes Streptavidin wird ebenfalls im molekularen Verhältnis von 4:1 hinzugegeben. Die Ansätze wurden lichtgeschützt bei 4 °C Ü/N inkubiert und anschließend viermal mit 4 ml PBS pH8,0 über eine 100.000 D-Membran gewaschen (2000 x g, 4 °C,) und auf eine Endkonzentration von 2mg/ml konzentriert. Vor dem letzten Zentrifugationsschritt erneute Inhibitorenzugabe:

8 µl NaEDTA

4 µl NaEDTA

2 µl Leupeptin

2 µl Pepstatin

Die Multimere wurden lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

## 2.4 Biotinylierungskontrolle

Der Grad der Biotinylierung der Moleküle kann im so genannten „Shift-Assay“ dargestellt werden. Hierfür wird ein Teil der Probe mit einem Überschuss an Streptavidin inkubiert. Die biotinylierten Proteine binden die Biotinbindungsstellen des Streptavidins, so dass größere Multimere entstehen. Da die Biotin-Streptavidin-Verbindung auch unter den Bedingungen eines SDS-Gels stabil bleibt, kann deren Laufverhalten zum nicht-multimerisiertem Protein verglichen werden.

Zu je 20 µl Probe werden 5 µl PBS, bzw. 5 µl Streptavidin gegeben. Als Kontrolle dienen 20 µl PBS mit 5 µl Streptavidin. Die Ansätze werden für 2h auf Eis oder bei 4 °C Ü/N inkubiert. Anschließend werden sie über ein SDS-Gel aufgetrennt und über eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

## 2.5 Infektion von BALB/c und C57BL/6 mit *Listeria monocytogenes*

Für Infektionsexperimente wurden die Isolate *L.m.* 10403s (ATCC, Rockville, USA) und rekombinant das Modellantigen Ovalbumin sezernierende *L.m.* (zur Verfügung gestellt von Hao Shen, Philadelphia, USA) verwendet. Naiven C57BL/6 Mäusen (Harlan, Blackthorn, U.K.) wurde zur Primärinfektion im Alter von 6-8 Wochen eine sublethale Dosis von  $2 \times 10^3$  *L.m. Ova* (ca.  $0.1 \times LD_{50}$ ) in 200  $\mu$ l physiologischer Kochsalzlösung direkt in die Schwanzvene injiziert. 5 Wochen nach der Primärinfektion erfolgte die Reimmunisierung mit  $2 \times 10^5$  *L.m.-Ova* (ca.  $10 \times LD_{50}$ ) i.v. Die Infektion von BALB/c- Mäusen (Harlan, Blackthorn, U.K.) erfolgte entsprechend mit *L.m.* 10403s. Allerdings wurden aufgrund der erhöhten Empfindlichkeit gegenüber *L.m.* reduzierte Dosen verwendet,  $1 \times 10^3$  zur Primärinfektion, bzw.  $1 \times 10^5$  zur Reimmunisierung.

## 2.6 Milzentnahme und Isolation der Lymphozyten

Milzlymphozyten wurden von naiven bzw. zu verschiedenen Zeitpunkten von primär- und reinfizierten BALB/c- und C57BL/6-Mäuse gewonnen. Hiefür wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Milzen mit sterilem Präparationsbesteck entnommen. Je nach Verwendungszweck erfolgte die weitere Verarbeitung der Milzen steril oder unsteril mit drei zusätzlichen Waschschritten in RP10<sup>+</sup> (RPMI 1640 mit 10 % FCS, L-Glutamin, HEPES [pH 7,5],  $\beta$ -Mercaptoethanol, Penicillin [100 U/ml], Streptomycin [100  $\mu$ g/ml] und Gentamycin [50  $\mu$ g/ml]). Zunächst wurden die Milzen durch ein Stahlnetz homogenisiert und in 10 ml RP10<sup>+</sup> aufgenommen. Die Milzzellen wurden anschließend pelletiert (1500 rpm, 7 min, RT) und die Erythrozyten in 5 ml NH<sub>4</sub>CL-Tris (0,17 M NH<sub>4</sub>CL in 0,3 M Tris [pH 7,5]) für 7 min bei RT lysiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal gewaschen, über ein feines Nylonnetz gefiltert, in 10 ml RP10<sup>+</sup> aufgenommen und ausgezählt.

## 2.7 Generierung epitop-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zelllinien

Die Herstellung der T-Zelllinien erfolgte durch *in vitro* Restimulation mit synthetischen Peptiden (Busch et al., 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *L.m.*-Peptide LLO 91-99 sowie SIINFEKL verwendet. Bestrahlte und somit nicht proliferierfähige Lymphozyten naiver Mäuse dienen als Stimulatoren und präsentieren das entsprechende Peptid den zu expandierenden T-Zellen. Um von vornherein eine größere Zahl peptid-spezifischer T-Zellen einsetzen zu können, werden diese aus *L.m.*-infizierten Mäusen an Tag 7 bzw. 5 von Primär- bzw. Reininfektion gewonnen (s. 2.2.4).  $3 \times 10^7$  Milzzellen wurden in 5 ml RP10<sup>+</sup> aufgenommen und in T 25 Zellkulturflaschen überführt. Die Stimulatorzellen wurden mit 25 Gy bestrahlt und mit dem gewählten Peptid-Epitop (LLO 91-99 in  $10^{-9}$  M, SIINFEKL in  $10^{-6}$  M, filtriert über 0,22 µm-Membran) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden je  $3 \times 10^7$  Zellen in 5 ml RP10<sup>+</sup> pro Kulturflasche zu den Respondern gegeben. Alle sieben Tage erfolgten eine Restimulation durch erneute Zugabe von Stimulatorzellen, sowie ein Mediumwechsel. Ab der zweiten Restimulation wurde das Medium mit 5 % T-Stim (Überstand mit ConA stimulierter Rattenmilzzellen, Becton-Dickinson; Inaktivierung des ConA durch 5 % 1 M Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid) ergänzt.

## 2.8 Multimer und Antikörperfärbung

Die Färbungen *in vitro* expandierter T-Zelllinien, *ex vivo* gewonnener Milzzellen sowie Lymphozyten aus Proliferations-Assays wurden in 96-Loch Platten mit Rundboden durchgeführt, bei *ex vivo* Milzzellen in der Regel mit  $1-2 \times 10^6$  Zellen pro Loch. Um unspezifische Bindung von fluoreszenz-markierten mAbs zu verhindern, wurden die Proben vor der Färbung mit Fc-block-Reagenz (blockierender Antikörper für Fc-Rezeptor [CD32/CD16], BD Biosciences, PharMingen, San Diego, USA) behandelt. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurde die Fc-block-Behandlung mit einer Ethidium Monazid-Färbung (EMA, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) kombiniert. Diese hat den Vorteil gegenüber einer Propidiumjodid-Färbung, dass die Zellen nach der Färbung fixiert werden können, da EMA durch Lichtexposition kovalent an die DNA toter Zellen gebunden werden kann. Die Zellen wurden zunächst im Dunkeln für 20-30 min mit 2 µg/ml EMA inkubiert und anschließend für 10 min Licht ausgesetzt (40 W Lampe, ca. 30 cm Abstand). Danach wurden die Proben gewaschen und die Färbung mit fluoreszenz-

konjugierten mAbs für 20 min oder MHC-Multimerreagenzien für 45 min in 50 µl auf Eis und in Dunkelheit durchgeführt. Bei gleichzeitiger Verwendung von mAbs und MHC-Multimeren wurde immer für 45 min inkubiert. Alle mAbs und Multimerreagenzien wurden exakt austitriert und in sättigenden Konzentrationen verwendet. Abschließend wurden die Zellen gewaschen, in 1 % PFA fixiert und durchflußzytometrisch analysiert. Alle Färbe- und Waschschrte wurden ausschließlich in FACS-Färbepuffer (PBS pH 7.45, 0,5 % BSA, 0,02 % NaN<sub>3</sub>) durchgeführt.

## 2.9 Durchflußzytometrische Analyse und Auswertung

Alle Proben wurden an einem FACSCalibur (FACSCalibur, BECTON DICKINSON, Heidelberg, Deutschland) eingelesen.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Flow Jo Software (Tree Star, San Carlos, USA).

## 2.10 Anreicherung und Depletion *ex vivo* gewonnener T-Zellen

Um selektiv einzelne Zellpopulationen innerhalb der Milzzellen untersuchen zu können bzw. gezielt bestimmte Populationen aus experimentellen Ansätzen auszuschließen, wurden zwei unterschiedliche Techniken gewählt. Zum einen die magnetische Zelltrennung MACS (magnetically activated cell sorting), bei der die unerwünschten Zellen durch magnetische Markierung beim Durchfluß durch eine magnetische Säule zurückgehalten werden (negative Selektion) oder magnetisch-markierte Zellen nach dem Trennvorgang aus der Säule eluiert und weiterverwendet werden können (positive Selektion). Als Alternative dazu diente die durchflußzytometrische Sortierung der Milzzellen am MoFlo (Cytomation, Fort Collins, USA). Hier werden die Zellen mit fluoreszenz-konjugierten monoklonalen Antikörpern markiert und die zu sortierenden Zellen können anhand ihres Färbemusters ausgewählt werden. Dadurch kann eine genauere und über Mehrfachfärbung detailliertere Auswahl getroffen werden.

## 2.11 Magnetische Aufreinigung

Milzzellen von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen wurden präpariert (s. 2.2.4) und anschließend  $1 \times 10^7$  Zellen/ml RP10<sup>+</sup> mit 2  $\mu$ l der gewünschten fluoreszenz-konjugierten (FITC oder PE) mAb lichtgeschützt für 30 min bei 4 °C unter Rotation gefärbt. Nach zwei Waschschrritten mit RP10<sup>+</sup> (1500 rpm, 4 °C, 7 min) wurden die Zellen in 80  $\mu$ l RP10<sup>+</sup> resuspendiert und entsprechend der Menge der Primärantikörper mit MACS-beads (anti-FITC oder anti-PE, Miltenyi Biotec) wiederum unter Lichtschutz für 20 min bei 10 °C gefärbt. Es folgten zwei vorsichtige Waschschrritte (1100 rpm, 4 °C, 7 min), bevor die Zellen in 2-3 ml RP10<sup>+</sup> resuspendiert wurden. Nach Äquilibration der magnetischen Säule mit 3 ml RP10<sup>+</sup> wurden sie auf diese aufgetragen. Die Säule wurde anschließend mindestens zweimal gewaschen. Entweder wurde der Durchfluss weiterverwendet, oder die zurückgehaltenen Zellen mit einem Stempel eluiert. Die Effizienz der Aufreinigungen wurde nach erneuter Färbung mit einem FACSCalibur überprüft und mit einer Probe vor der Trennung verglichen. Die Reinheiten lagen zwischen 83% und 98%.

## 2.12 Durchflußzytometrische Aufreinigung

Die Präparation der Milzzellen von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen erfolgte wie beschrieben.  $1 \times 10^7$  Zellen/100  $\mu$ l wurden anschließend mit fluoreszenz-konjugierten mAb unter Lichtschutz für 25 min bei 4 °C gefärbt, dreimal mit RP10<sup>+</sup> gewaschen und in einer Konzentration von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml in RP10<sup>+</sup> aufgenommen. Unmittelbar vor dem Sortiervorgang wurde verdünntes Propidiumjodid (PI, Sigma-Aldrich; 4  $\mu$ l PI (2 mg/ml) + 1 ml RP10<sup>+</sup>) im gleichen Volumen für die lebend-tot Unterscheidung hinzugegeben und die Zellen über den MoFlo sortiert. Die Fraktionen wurden getrennt in kaltem FCS (1mM DNA-Biotin) aufgefangen und nach dem Sortieren mit RP10<sup>+</sup> gewaschen. Analog zur MACS-Aufreinigung erfolgte eine Reinheitskontrolle nach erneuter Färbung am FACSCalibur.

## 2.13 <sup>51</sup>Cr-Zytotoxizitäts-Assay

In Standard-<sup>51</sup>Cr-Zytotoxizitäts-Assays wurde die Lysefähigkeit antigen-spezifischer T-Zelllinien getestet. Dabei werden Zielzellen mit radioaktivem <sup>51</sup>Cr markiert. Über die Höhe

des durch Lyse freigesetzten Chroms kann indirekt auf die Zytotoxizität der T-Zellen geschlossen werden.

Als Zielzellen wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen der Tumorlinien P815 oder EL-4 in 100  $\mu\text{l}$  RP10+ aufgenommen und mit 100  $\mu\text{l}$   $^{51}\text{Cr}$ -Natriumchromat für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in 10 ml RP10+ gewaschen und jeweils  $1 \times 10^4$  Zellen in 50  $\mu\text{l}$  RP10+ pro well einer 96-Loch Rundbodenplatte gegeben. Die getesteten Effektorzellen der SIINFEKL oder LLO91-99 spezifischen  $\text{CD8}^+$  T-Zelllinien wurden in einem Verhältnis von 20:1 ( $2 \times 10^5$  Zellen/well) ebenfalls in 50  $\mu\text{l}$  RP10+ hinzugefügt und mit dem jeweiligen Peptid in Konzentrationen von  $10^{-7}$  bis  $10^{-12}$  M und 10  $\mu\text{g/ml}$  Rae1 oder H60 bei einem Endvolumen von 200  $\mu\text{l}$  bei 37 °C inkubiert. Die Spontanlyse der Zellen wurde durch alleinige Zugabe von PBS statt Peptid und Multimeren gemessen, die maximale Lyse durch Zugabe des Detergens Triton X-100 (100  $\mu\text{l}$  0,5%). Nach 4,5 h wurde der Ansatz bei 400 x g für 5 min zentrifugiert und 100  $\mu\text{l}$  Überstand abgenommen. Das freigesetzte  $^{51}\text{Cr}$  wurde mit einem  $\gamma$ -Zähler gemessen und die spezifische Lyse über spontane Freisetzung (SF) und maximale Freisetzung (MF) errechnet:

$$\% \text{ Spezifische Lyse} = \frac{100 \times \text{cpm Probe} - \text{cpm SF}}{\text{cpm MF} - \text{cpm SF}}$$

## 2.14 T-Zell-Proliferation

Die Proliferation von  $\text{CD8}^+$ - und  $\text{CD4}^+$ -T-Zellen wurde sowohl radioaktiv über den Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin als auch durchflußzytometrisch über die Intensität des proteingebundenen fluoreszierenden Esters CFSE gemessen.

### 2.14.1 $^3\text{H}$ -Thymidin-Proliferationsassay

Zur Untersuchung der Proliferationsfähigkeit von SIINFEKL oder LLO 91-99 spezifischen T-Zelllinien wurden  $^3\text{H}$ -Thymidin-Proliferationsassays durchgeführt. Jeweils  $1 \times 10^4$  antigenspezifische T-Zellen in 50  $\mu\text{l}$  RP10+ wurden zusammen mit  $4 \times 10^5$  Stimulatorzellen in 50  $\mu\text{l}$  RP10+ mit  $\alpha\text{CD3}$ -mAb stimuliert, entweder in einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  bis 10 ng/ml bei Multimertitration oder in Konzentrationen von 10  $\mu\text{g/ml}$  bei konstanter Multimerkonzentration. Als Stimulatoren wurden bestrahlte (25 Gy) Milzzellen von BALB/c und C57Bl6 Mäusen verwendet. Rae- und H60-Multimere sowie SA-PE als Negativkontrolle

wurden in einer konstanten Konzentration von 10 µg/well oder als Titration von 5 µg/well – 30 ng/well zugegeben. Nach 48h bei 37 °C wurden pro well jeweils 1 µl <sup>3</sup>H-Thymidin (37 MBq/ml; Amersham) in 25 µl RP10+ hinzugefügt und die Zellen für weitere 17h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mithilfe eines Cell Harvesters auf Glasfiberfilter übertragen und fixiert und die DNA-gebundene Radioaktivität über einen β-Counter gemessen. Der Proliferationsindex errechnet sich als Quotient aus gemessener Strahlung bezogen auf die Hintergrundstrahlung unstimulierter T-Zellen.

### 2.14.2 CFSE-Proliferationsassay

Zur Messung der Proliferation lienaler CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus BALB/c- oder C57BL/6 Mäusen wurden Milzzellen entweder als Pool (bulk) verwendet oder isolierte CD8<sup>+</sup> bzw. CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach positiver oder negativer Anreicherung der Milzzellen über MACS bzw. FACS untersucht. Die Zellen wurden dazu mit Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidylester (Invitrogen) markiert und je 5 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml CFSE-Lösung (10 µM in PBS) für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des 5-fachen Volumens RP10+ (4°C) gestoppt und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit RP10+ gewaschen (1500 rpm, 7 min), um ungebundenes CFSE zu entfernen.

Nun wurden für die Bulk-Experimente je 2 x 10<sup>6</sup> Zellen/well einer 24 Multiwellplatte in 1 ml RP10+ mit 0,2 µg/ml αCD3 mAb stimuliert. Für die angereicherten Zellen wurden nur 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/well einer 48 Multiwellplatte in 500 µl RP10+ verwendet. Die Multiwellplatten wurden im Falle der angereicherten Zellen zuvor mit αCD3 mAb überzogen, um trotz fehlender APCs effektives Crosslinking der TCRs zu erreichen. Pro Well wurden dafür 500 µl PBS mit 5 µl αCD3 Ü/N bei 10 °C inkubiert. Zuletzt erfolgte die Multimerzugabe (10 µg/ml Rae1, H60 oder SA-PE), bevor der Assay bei 37°C inkubiert wurde.

Nach 24h erfolgte eine erneute Multimerzugabe; nach 64h wurden die Zellen entnommen, mit αCD4-APC und αCD8-PE gefärbt und die CFSE-Intensität der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Generierung von NKG2D-Liganden-Multimeren

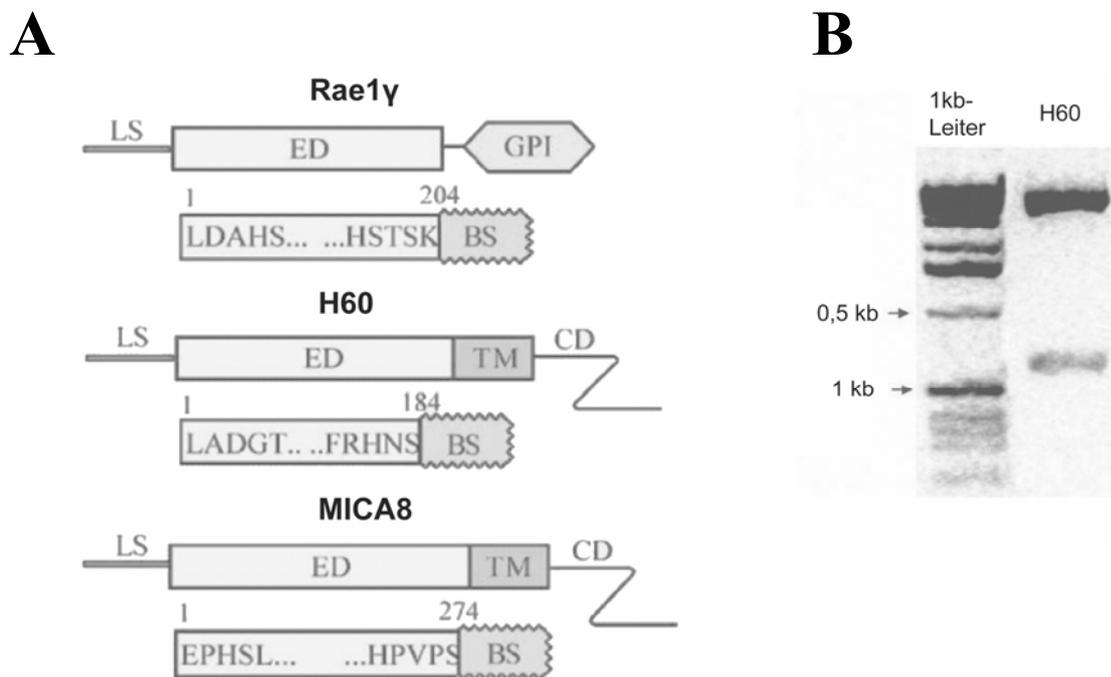
Für die Herstellung der H60-, Rae1 $\gamma$ - und MICA8-Multimere wurde der extrazelluläre Anteil der Moleküle mit einer Erkennungssequenz des biotinylierenden Enzyms BirA fusioniert, in Bakterien rekombinant exprimiert und *in vitro* gefaltet. Nach erfolgter Biotinylierung kann es die vier Biotinbindungsstellen eines Streptavidinmoleküls besetzen und liegt somit in Form eines Tetramers vor.

#### 3.1.1 Klonierung Expressionsvektoren

In einem ersten Schritt wurden die extrazellulären Domänen in einen Expressionsvektor kloniert. Der verwendete Vektor pET 27b wurde im Rahmen der Laborroutine schon mit einer Biotinylierungssequenz versehen, an die sich Schnittstellen für die Restriktionsenzyme NdeI und BamHI anschließen.

Zunächst wurden entsprechende Primer entworfen, um nur die benötigten extrazellulären Abschnitte der cDNS der NKG2D-Liganden, bestehend aus Startsequenz (LS), extrazellulärer Domäne (ED), transmembraner Domäne (TD), sowie der intrazellulären Domäne (CD) (Abb. 1a) zu amplifizieren und die nötigen Restriktionsschnittstellen einzufügen: 5'-GGAGATATACATATGCTAGATGATGCACACTCTCTTAGG-3' und 5'-CCTAAGAGAGTGTGCATCATCTAGCATATGTATATCTCC-3' für Rae1; 5'-GGCATATGCTGAGCTATCTGGGGACC-3' und 5'-GGATCCAGAATTATGTCGGAAGTTATTC-3' für H60 und 5'-GGCATATGGAGCCCCACAGTCTTCG-3' und 5'-GGGGATCCAGAGGGCACAGGG-3' für MICA8. Die DNS wurde mittels PCR

amplifiziert und über ein Agarosegel aufgetrennt. Nach Gelextraktion wurde das PCR-Produkt durch eine T<sub>4</sub>-Ligase mit dem PCR 2.1 Vektor ligiert und in one-shot kompetente *E. coli* transformiert. Von mehreren erfolgreich transformierten Kolonien wurden nach kultureller Vermehrung die Plasmid-DNS mit einem Miniprep-Kit isoliert, durch Verdau mit NdeI und BamHI die Inserts wieder ausgeschnitten, über ein Agarosegel aufgetrennt und nach Gelextraktion in den Expressionsvektor pET 27b ligiert. Die erfolgreiche Ligation wurde nach Transformation in XL10-gold kompetente *E. coli* und Verdau der isolierten Plasmid-DNS mit NdeI und BamHI bestätigt (Abb. 1b), sowie die korrekte Sequenz der Liganden-DNS durch Sequenzierung in einem externen Labor überprüft.



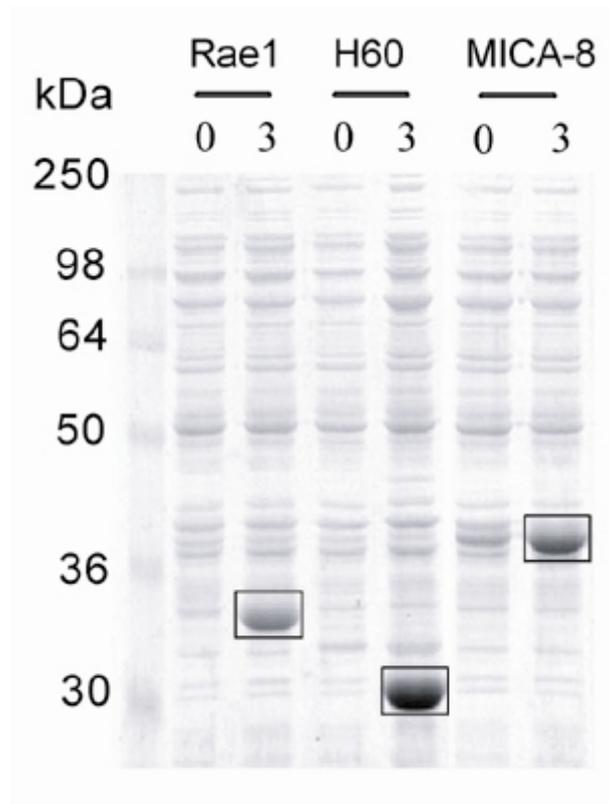
**Abb.: 1**

(A) Schematische Darstellung der Struktur von H60, Rae1 $\gamma$  und MICA8 von N- zu C-Terminus mit Startsequenz (LS), extrazellulärer Domäne (ED), Transmembranregion (TM) und cytosolischer Domäne (CD), bzw. GPI-Anker (GPI). Die cDNA wurde an den angegebenen Aminosäurestellen mutiert und eine Biotinylierungssequenz (BS) angefügt.

(B) Beispielafter Verdau des Expressionsvektor pET27b mit NdeI und BamHI. Die H60 cDNS läuft als sichtbare Bande entsprechend des Molekulargewichts.

### 3.1.2 Expression, Faltung und Multimerisierung

Zur Expression der NKG2D-Liganden wurde der Vektor in kompetente BL21 (DE3) *E. coli* Bakterien transformiert und nach IPTG-Zugabe exprimiert. Zur Kontrolle der Expression wurden vor und 3h nach IPTG-Zugabe aus dem Expressionsansatz Proben entnommen und auf ein SDS-Page-Gel aufgetragen (Abb. 2).



**Abb.: 2**

*Expressionskontrolle der rekombinanten Proteine Rae1, H60 und MICA-8 nach Transformation des Expressionsvektors in BL21(DE3). Proben von jeder Kultur wurden vor (0) und 3h nach (3) IPTG Induktion entnommen und über ein 10% SDS-Gel aufgetrennt. Die markierten Banden entsprechen der Größe der jeweiligen NKG2D-Liganden.*

Das exprimierte Protein reichert sich intrazellulär in unlöslichen Aggregaten an. Aus diesen so genannten Einschlusskörpern muss es isoliert und wieder in Lösung gebracht werden.

Dafür wurden die Zellen physikalisch sowie mit Lysozym und Detergenzien lysiert. Nach mehreren Waschschrinen wurden die Einschlusskörper angereichert und Verunreinigungen wie DNA und unerwünschte Proteine entfernt. Anschließend wurde eine Probe zur Reinheitskontrolle entnommen, das denaturierte Protein in Harnstoff aufgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt. Bis zur weiteren Verarbeitung wird das Protein in flüssigem Stickstoff gelagert.

Um die Funktionalität des Moleküls zu gewährleisten, muss das nun in denaturierter Form vorliegende Protein in seine physiologische Konformation gebracht werden. Bei der hierfür durchgeführten *in vitro* Entfaltung werden zur Verringerung des Verlusts durch unerwünschte Aggregation bei 4 °C mehrmals kleine Proteinmengen, die zuvor in Guanidin gelöst wurden unter fortlaufendem Rühren einem Entfaltungspuffer bei pH 8,0 zugegeben. Der Puffer enthält neben Arginin zur Reduzierung zwischenmolekularer hydrophober Interaktionen ein Redoxsystem mit reduziertem und oxidiertem Glutathion, das die zu schnelle Bildung von Disulfidbrücken verhindert, sowie die Proteaseinhibitoren Leupeptin und Pepstatin. Das gefaltete Protein wurde über eine 10.000 MWCO Membran in einer Druckkammer gefiltert, um größere Proteinaggregate zu entfernen und bei gleichzeitigem Pufferaustausch konzentriert.

Zum Andocken an die Biotinbindungsstellen des Streptavidins müssen die Moleküle noch biotinyliert werden. Dies geschah enzymatisch mit Hilfe der Biotin-Protein-Ligase BirA. Sie erkennt die C-terminale Biotinylierungssequenz und fügt jeweils ein Biotinmolekül an einen darin enthaltenen Lysinrest an.

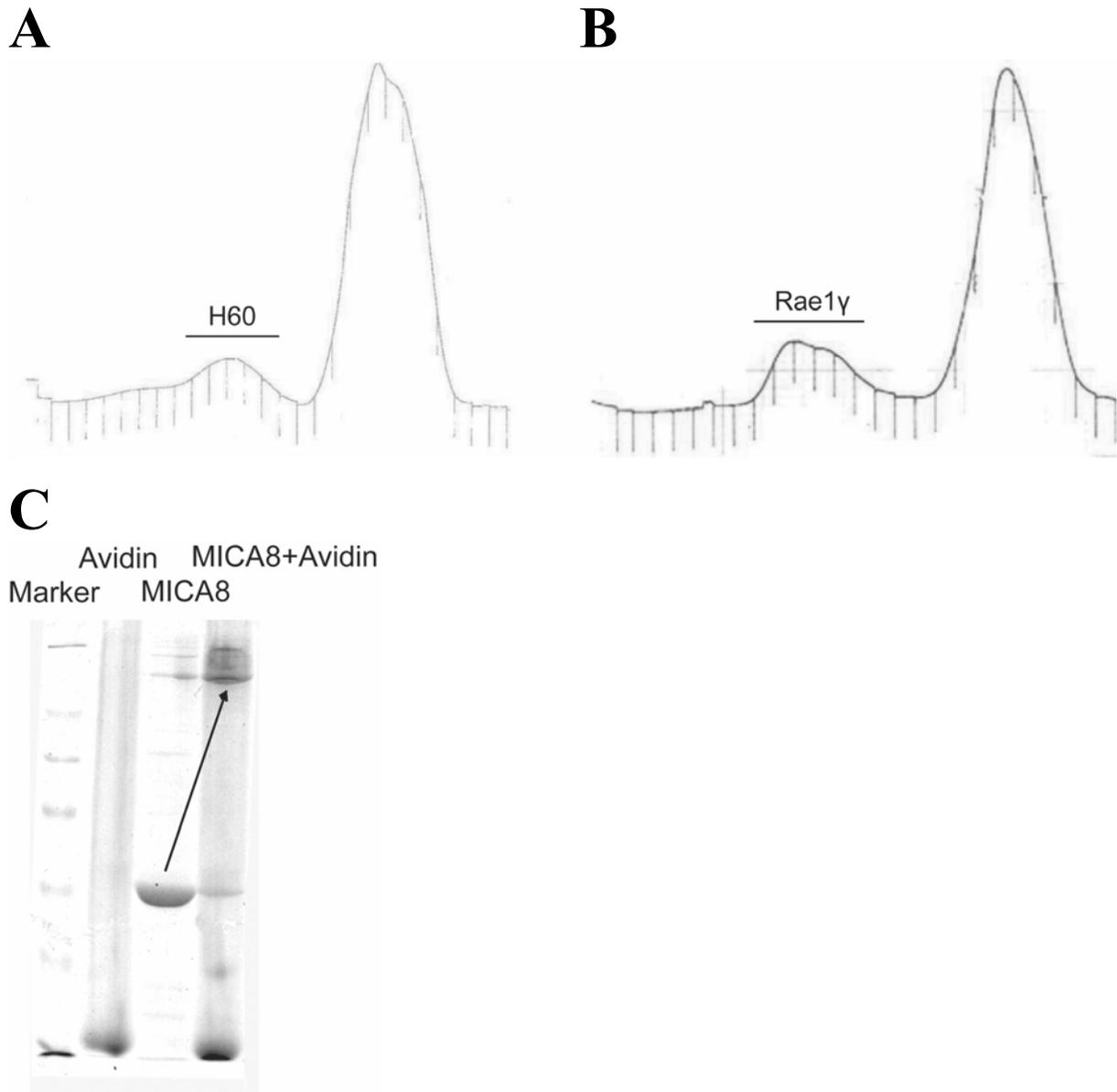
In einem letzten Schritt wurde das biotinylierte Protein über eine FPLC-Säule aufgetrennt und Verunreinigungen wie überschüssiges freies Biotin, ATP oder aggregierte Moleküle entfernt. Die Fraktionen, die der Größe des als Monomer vorliegenden Moleküls entsprechen, wurden gesammelt und gepoolt (Abb.: 3A+B).

Zur Überprüfung der erfolgreichen Biotinylierung wurde eine kleine Probe mit Avidin multimerisiert. Im Vergleich zu nicht-multimerisierten Molekülen läuft es im Proteingel durch die Größenzunahme deutlich langsamer (Abb.: 3C).

Die gefalteten und biotinylierten Moleküle werden bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff in 1 ml Aliquots zu 200 mg/ml gelagert und können nun im Verhältnis 1:4 mit Streptavidin oder fluoreszenz-konjugiertem Streptavidin multimerisiert werden. Die Multimere wurden zuletzt dreimal mit PBS pH 8,0 über eine 100.000 MWCO Membran unter Zentrifugation gewaschen und konzentriert. Zur Lagerung wurden Leupeptin, Pepstatin, NaEDTA und NaN<sub>3</sub> zugegeben.

Auf die gleiche Weise wurden humane bzw. murine NKG2D-Multimere und von Anja Kriegeskorte der murine NKG2D-Ligand MULT1 hergestellt.

Aufgrund einer im Vergleich zu konventionellen MHC-Tetrameren jedoch deutlich eingeschränkten Stabilität vor allem von H60 und Rae1 $\gamma$ , wodurch es schon nach einigen Tagen zum Funktionsverlust der Multimere kam, wurden die NKG2D-Ligande, vor jedem Experiment „frisch“ multimerisiert.



**Abb.: 3**

(A+B) *Profile der FPLC-Aufreinigung von H60 und Rae1 $\gamma$  nach erfolgter Biotinylierung. Entsprechend der Molekülgrößen befinden sich die H60- und Rae1 $\gamma$ -Monomere in den angegebenen Fraktionen.*

(C) *Beispielhafter Shift-Assay von MICA8 zur Kontrolle der Biotinylierungseffizienz. Aufgetragen wurden ein Größenmarker, die alleinige Probe, sowie die Probe nach Inkubation mit Avidin. Die Pfeile indizieren das veränderte Laufverhalten der Multimere im Vergleich zur monomeren Fraktion*

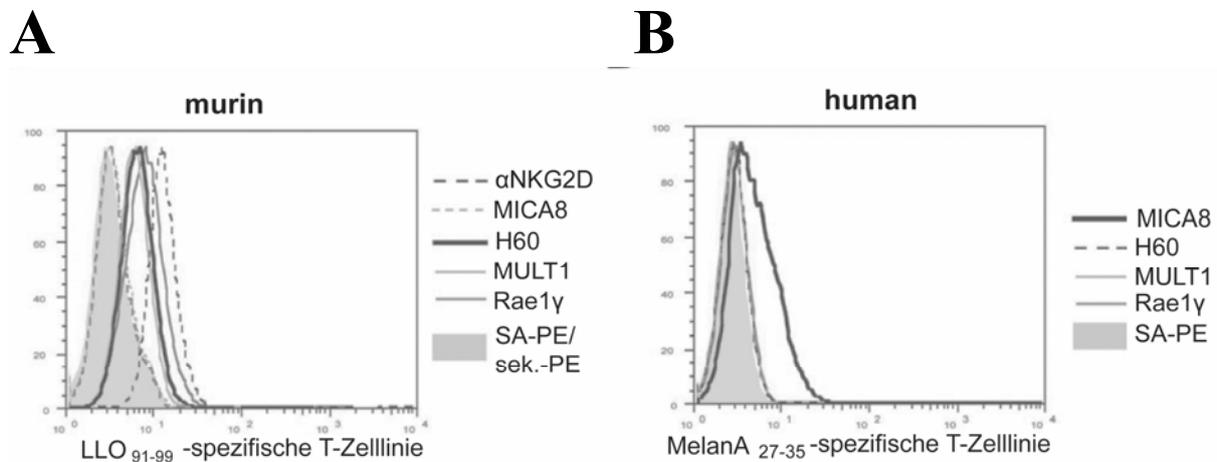
## 3.2 Nachweis der Funktionalität der H60-Multimere

### 3.2.1 Färbung von CD8<sup>+</sup> T-Zell-Linien

Um die korrekte Faltung und die Funktionalität der fluoreszenz-konjugierten Multimere zu überprüfen, wurden erste Färbungen auf murinen polyklonalen antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Linien durchgeführt.

Aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimieren NKG2D auf der Zelloberfläche. Dies wurde durch die Bindung des  $\alpha$ NKG2D-mAb C7 bestätigt (Abb. 4A). Die richtig gefalteten und multimerisierten NKG2D-Liganden sollten demnach an NKG2D-Rezeptoren der T-Zellen binden. Während die murinen Zellen mit den murinen Liganden H60, Rae1 $\gamma$  und MULT1 mit ähnlicher Intensität gefärbt werden konnten, zeigte humanes MICA8 keine Bindung (Abb. 4A).

Ein gegenteiliges Ergebnis wurde bei der Färbung einer humanen antigen-spezifischen T-Zelllinie erreicht. Nun färbte ausschließlich das humane MICA8, nicht aber die murinen Liganden (Abb. 4B). Es liegt also eine Speziespezifität bei der Bindung der NKG2D-Liganden an ihren Rezeptor vor.



**Abb.: 4**

Murine (A) und humane (B) antigen-spezifische  $CD8^+$  T-Zellen wurden mit den in der Legende angegebenen NKG2D-Liganden-Multimeren gefärbt. Die gefüllten Histogramme zeigen die Hintergrundfärbung mit SA-PE. Die grau gepunkteten Linien repräsentiert die Kontrollfärbung mit PE-konjugiertem isotyp-spezifischen mAb der anti-NKG2D-Färbung (mAb C7)

### 3.2.2 Affinitätsunterschiede zwischen H60 und Rae1

In zwei kürzlich veröffentlichten Studien wurde das Bindungsverhalten von H60 und Rae zu NKG2D in so genannten surface plasmon resonance (SPR) Experimenten untersucht (O'Callaghan, 2001; Carayannopoulos, 2002). Beide Liganden konkurrieren hierbei um die Bindung zu ihrem Rezeptor, allerdings besteht ein deutlicher Unterschied in der Affinität der unterschiedlichen Liganden. So bindet H60 mit ca. 25-fach höherer Affinität an NKG2D als Rae1.

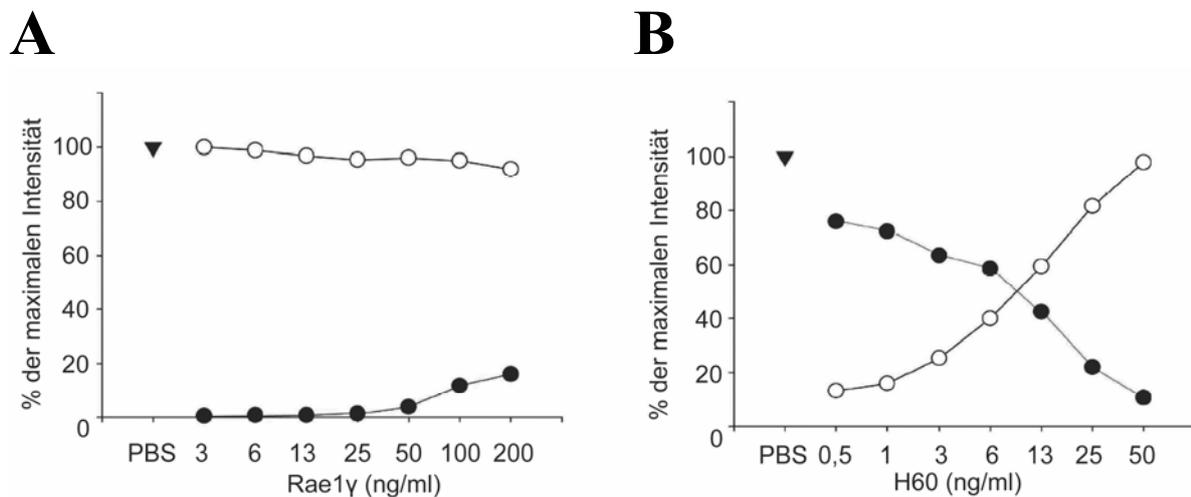
Ein Nachvollziehen dieser Ergebnisse wäre eine weitere Bestätigung der korrekten Funktionalität der rekombinanten Liganden-Multimere.

Anstatt jedoch wie bei SPR Rezeptoren bzw. Liganden an künstlichen Oberflächen zu fixieren, wurde die Bindung der Multimere an physiologisch auf der Zelloberfläche exprimiertem Rezeptor von  $CD8^+$  T-Zellen getestet. Hierfür wurden H60 und Rae1γ mit unterschiedlich fluoreszenz-markiertem SA (SA-PE und SA-APC) multimerisiert. In einem ersten Färbeschritt wurden dann die T-Zellen mit konstanten Konzentrationen des einen Multimers gefärbt und nach drei Waschsritten das zweite Multimer mit ansteigenden

Konzentrationen eintitriert. Nach FACS-Analyse wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten ins Verhältnis zur jeweiligen maximalen Intensität bei alleiniger Färbung gesetzt.

Bei Titration von H60 ist dies in der Lage, Rae1 $\gamma$  komplett aus seiner Bindung zu NKG2D zu verdrängen (Abb. 5A). Im umgekehrten Ansatz dagegen ist Rae1 $\gamma$  selbst in hohen Konzentrationen nicht in der Lage, H60 aus der Bindung zu NKG2D zu lösen. Allerdings kommt es bei hohen Rae1 $\gamma$  Konzentrationen zu einer Färbung ohne entsprechender Abnahme der H60 Intensität (Abb. 5B). Beide Liganden binden somit die gleichen Rezeptoren und konkurrieren in ihrer Bindung um die Bindungsstellen. Dabei besitzt H60 eine deutlich höhere Affinität als Rae1 $\gamma$ . Die fehlende Abnahme der H60-Intensität bei hohen Rae1 $\gamma$  Konzentrationen lässt sich eventuell durch einen weiteren Rezeptor erklären, an den H60, nicht aber Rae1 $\gamma$  binden kann.

Die Ergebnisse liegen in Übereinstimmung mit den bisher bekannten Daten und übertragen diese auf die Liganden-Rezeptor-Interaktion auf der Zelloberfläche. Zusätzlich bestätigt sich die volle Funktionalität der rekombinanten Liganden, die NKG2D binden und ihre liganden-spezifischen Bindungseigenschaften besitzen.



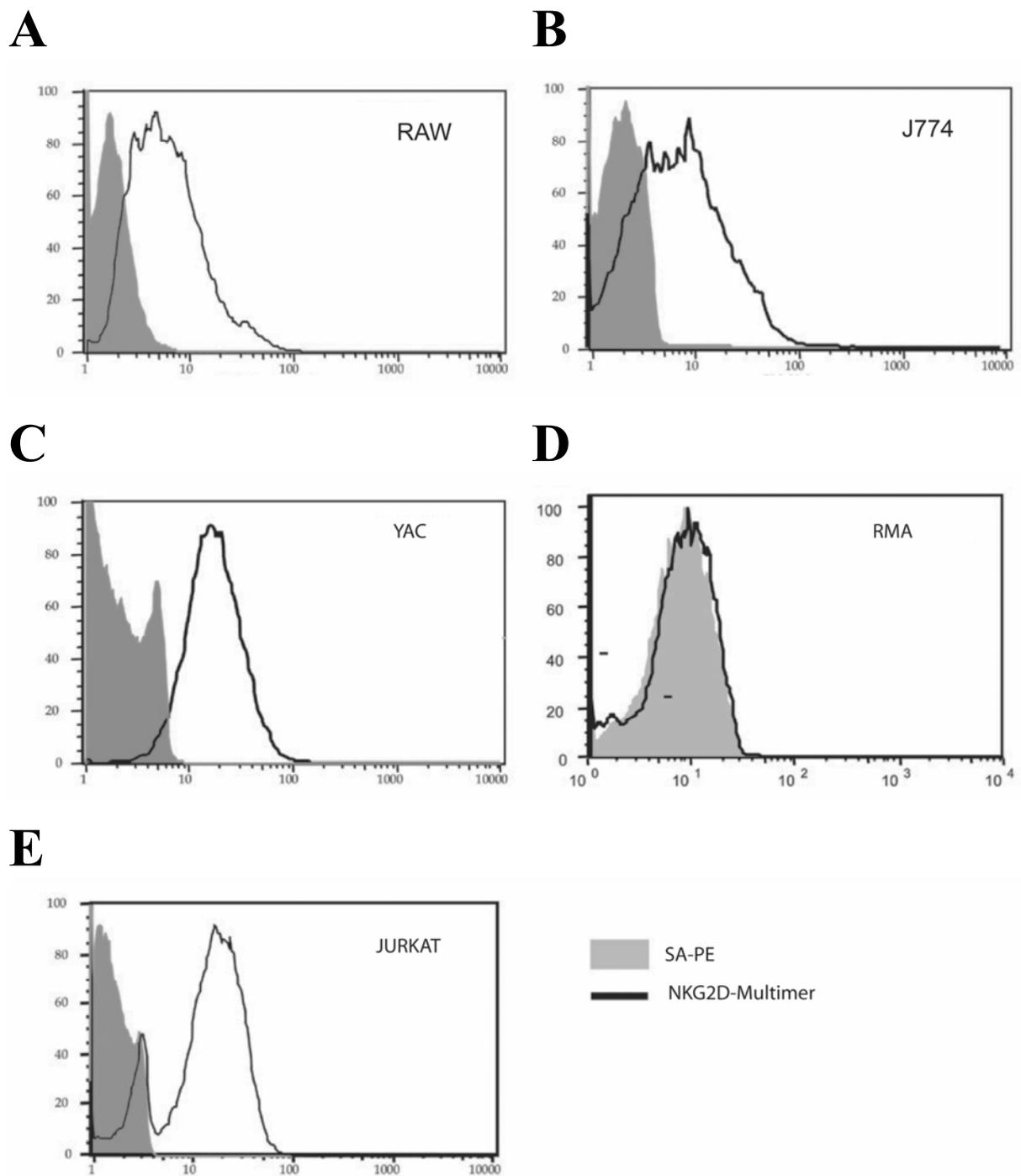
**Abb.: 5**

*Darstellung der Konkurrenz von H60 und Rae1 $\gamma$  um NKG2D. Antigen-spezifische T-Zellen wurden mit 10ng/ml H60- (A) bzw. Rae1-Multimeren (B) gefärbt (entspricht maximaler Färbintensität, gefülltes Dreieck). Anschließend wurden aufsteigende Mengen (x-Achse) des zweiten Multimers (Rae1 in A, H60 in B) mit einer unterschiedlichen Fluoreszenz eintitriert. Dargestellt ist die gemessene Intensität von Rae1 (gefüllte Kreise) und H60 (offene Kreise) im Verhältnis zur jeweiligen Maximalintensität*

### 3.2.3 Expression von NKG2D-Liganden auf Tumorzelllinien

Eine Reihe unterschiedlicher (meist epithelialer) Tumoren exprimiert NKG2D-Liganden (Diefenbach, 2000; Cerwenka, 2000). Zelllinien dieser Tumoren bieten sich somit zum Test der NKG2D-Multimere an. Eine positive Färbung der Tumorzellen weist auf die korrekte Faltung und Funktionalität der Multimere hin. Obwohl durch NKG2D-Multimer-Färbung eine NKG2D-Liganden-Expression nachgewiesen werden kann, gestattet dies keine weitere differenzierte Darstellung der jeweiligen Liganden.

Mit murinen NKG2D-Multimeren wurden die murinen Makrophagen-Linien RAW und J774, die murine Lymphom-Linie YAC-1 sowie die Lymphom-Linie RMA gefärbt, mit humanen NKG2D-Multimeren die humane leukämische T-Zelllinie JURKAT. In Übereinstimmung mit dem Nachweis von NKG2D-Liganden-mRNA aus RAW-, J774-, YAC-1- und JURKAT- Zellen ließen sich diese Tumorlinien auch mit den jeweiligen NKG2D-Multimeren anfärben (Abb. 6 A-C+E). Für RMA-Zellen ließ sich keine Bindung mit NKG2D-Multimeren nachweisen (Abb. 6 D).

**Abb.: 6**

*Färbung verschiedener muriner (RAW (A), J774 (B), YAC-1 (C), RMA (D)) und humaner (JURKAT (E)) Tumorzelllinien mit murinem bzw. humanem NKG2D-Multimer. Die gefüllten Histogramme repräsentieren die Hintergrundfärbung mit SA-PE, offene Histogramme stehen für die Färbung des NKG2D-Multimers.*

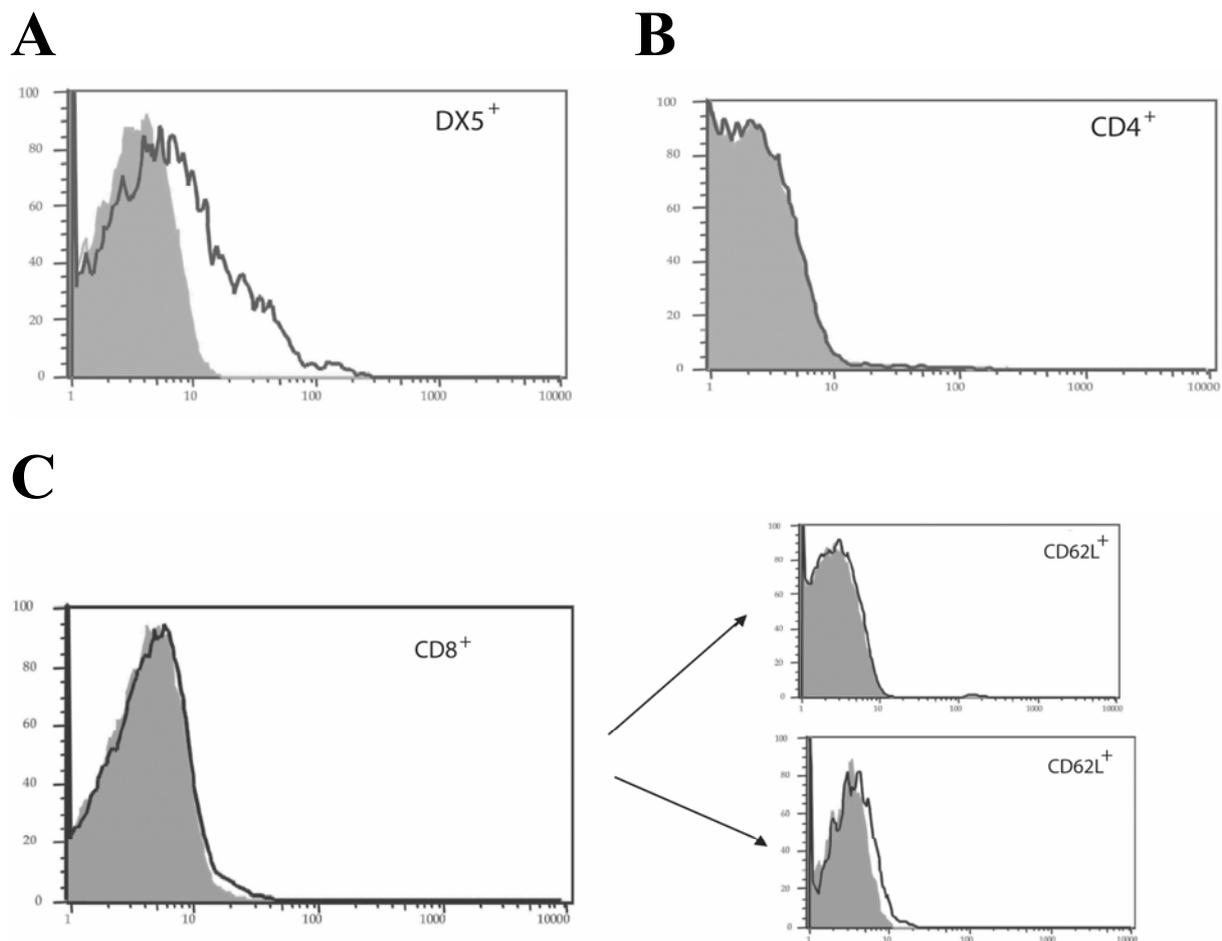
### **3.3 Expressionsmuster von NKG2D-Liganden und H60- bzw. Rae1 $\gamma$ -Rezeptoren**

Die bisherigen Ansätze zur Bestimmung NKG2D exprimierender Zelltypen wurden mit mAb untersucht (Diefenbach, 2000). Allerdings gab es noch keine Studie zu möglichen Unterschieden in der Bindung der beiden NKG2D-Liganden. Dies wurde nun mit der Anwendung der Rezeptor- und Liganden-Multimere und durchflußzytometrischer Analyse von verschiedenen Zelltypen ermöglicht.

#### **3.3.1 Expressionsmuster auf Milzzellen naiver Mäuse**

Die konstitutive Expression von NKG2D bzw. NKG2D-Liganden wurde zunächst auf Milzzellen naiver C57BL6 Mäuse untersucht. Getrennt betrachtet wurden NK-, CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen, B-Zellen, Dendritische Zellen sowie Makrophagen. Die homogenisierten Milzzellen wurden zur Unterscheidung lebender und toter Zellen mit EMA behandelt und mit den entsprechenden Antikörpern, sowie NKG2D- und H60- bzw. Rae1 $\gamma$ -Multimeren gefärbt. DX5<sup>+</sup> NK-Zellen naiver Mäuse binden H60 und Rae1 $\gamma$ . Mit beiden Multimeren wurde eine deutliche Färbung nahezu gleicher Intensität erzielt, die Färbungen beider Multimere überlappen sich weitestgehend (offene Histogramme) (Abb. 7A).

Dagegen war weder auf CD4<sup>+</sup> (Abb. 7B) noch auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 7C) eine Liganden-Bindung sichtbar. Bei weiterer Differenzierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen über den Aktivierungsmarker CD62L zeigten sich jedoch die CD62L-niedrigen Zellen leicht anfärbbar, die CD62L-hohen blieben negativ (Abb. 7C rechts). Weder naive CD4<sup>+</sup>- noch CD8<sup>+</sup>- T-Zellen scheinen demnach Rezeptoren für H60 oder Rae1 $\gamma$  zu exprimieren.



**Abb.: 7**

*Bindungsmuster von Rael1- und H60-Multimeren auf Milzzellen naiver BALB/c Mäuse.*

*Analysiert wurden DX5 exprimierende NK-Zellen (A), CD4<sup>+</sup> T-Zellen (B) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (C). Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden noch näher anhand der Expression des Aktivierungsmarkers CD62L charakterisiert (C rechts). Hintergrund mit SA-PE in gefüllten Histogrammen, offene Histogramme repräsentieren Rael1/H60-Multimer*

### 3.3.2 Änderung der Expression im Verlauf einer Infektion mit *L. monocytogenes*

NKG2D-Liganden können von tumor- und virusinfizierten Zellen exprimiert werden (Cerwenka, 2000) Die Expression wird durch „Zellstress“ wie Hitzeschock oder durch Beschädigung der DNA (Gasser, 2005) induziert oder hochreguliert.

*L. monocytogenes* ist ein fakultativ intrazelluläres Bakterium. Während einer Listerieninfektion könnte es somit durch Irritation der infizierten Zellen zu einer vermehrten

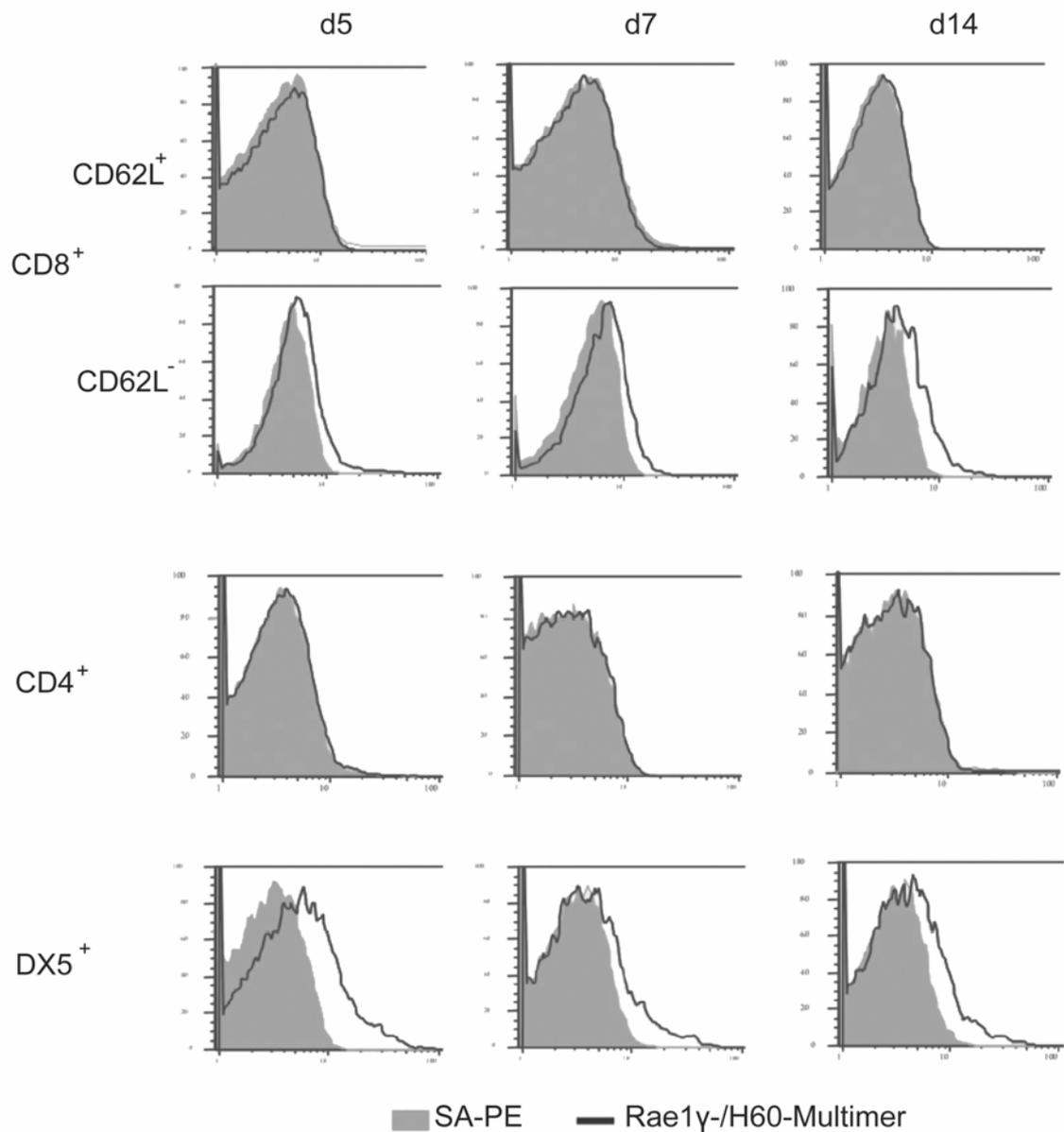
Expression von NKG2D-Liganden kommen. Um eine Änderung der NKG2D- bzw. NKG2D-Liganden-Expression auf verschiedenen Zelltypen im Verlauf einer Infektion zu untersuchen, wurden Mäuse mit Listerien infiziert und Milzzellen an unterschiedlichen Zeitpunkten mit NKG2D-Liganden- und NKG2D-Multimeren gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert.

### 3.3.2.1 Primärinfektion mit *L. monocytogenes*

Naive C57BL6 Mäuse wurden mit 10.000 Listerien i.v. infiziert und die Milzzellen an den Tagen 5, 7 und 14 nach Infektion analysiert.

DX5<sup>+</sup> NK-Zellen zeigten an allen drei Tagen eine nahezu gleiche Färbung der NKG2D-Liganden (Abb. 8). Demgegenüber zeigten aktivierte CD62L-niedrig-exprimierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit der Zeit eine Zunahme der Intensität (Abb. 8). CD62L-hohe/CD8<sup>+</sup> T-Zellen waren an allen drei Zeitpunkten negativ. Ebenso CD4<sup>+</sup> T-Zellen, sie ließen sich an keinem der Tage anfärben (Abb. 8). Die zusätzlich in die Kinetik aufgenommenen CD45R(B220)<sup>+</sup> B-Zellen waren im gesamten Zeitraum sowohl für die Liganden-Multimere als auch für NKG2D negativ.

Während einer Primärinfektion mit *L. monocytogenes* lässt sich somit keine wesentliche Änderung der NKG2D-Expression auf NK-Zellen feststellen. Es kommt aber zu einer Hochregulierung des Rezeptors auf aktivierten CD62L-niedrigen CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die anderen untersuchten Zelltypen blieben über den gesamten Untersuchungszeitraum negativ.

**Abb.: 8**

*Ex vivo-Färbung mit Rae1- und H60-Multimeren auf Milzzellen von BALB/c Mäuse an Tag 5, 7 und 14 einer Primärinfektion mit *L. monocytogenes*.*

*Dargestellt sind CD62L hoch und niedrig exprimierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen und DX5<sup>+</sup> NK-Zellen. Gefüllte Histogramme stellen den SA-PE Hintergrund dar, offene Histogramme Färbung von Rae1-/H60-Multimer*

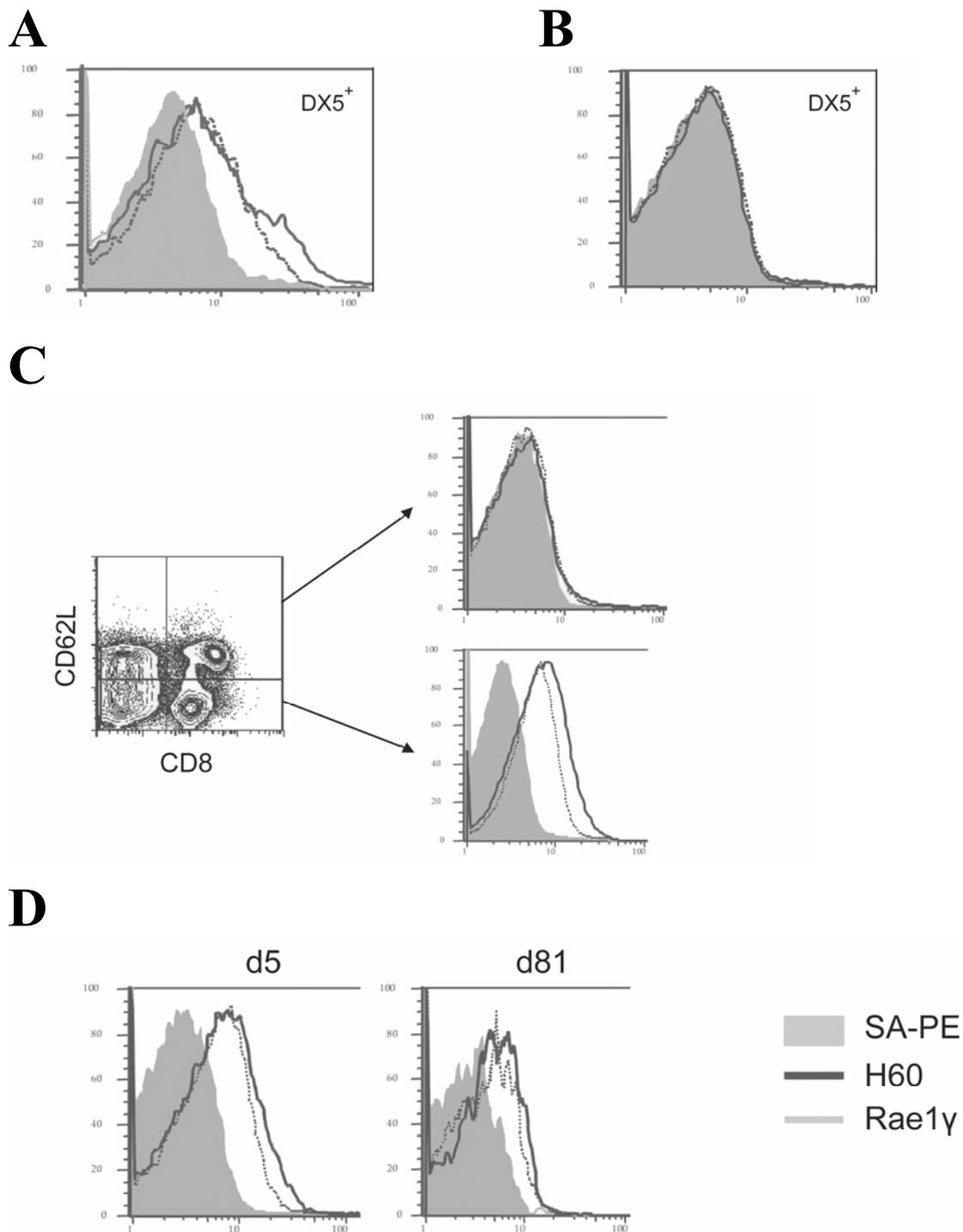
### 3.3.2.2 Sekundärinfektion mit *L. monocytogenes*

Eine überstandene Listerieninfektion führt zu einem sehr effektiven Schutz gegenüber Neuinfektionen, in deren Verlauf listerien-spezifische zytotoxische T-Zellen in sehr hoher

Zahl gebildet werden. Eine Sekundärinfektion eignet sich deshalb sehr gut zur Beobachtung antigen-spezifischer Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen. Die Milzzellen wurden an zwei Zeitpunkten auf Multimerfärbung analysiert; an Tag fünf, dem Höhepunkt der Expansionsphase und zu einem späten Zeitpunkt zur Darstellung von Gedächtnis-T-Zellen (Tag 81).

DX5<sup>+</sup> NK-Zellen exprimierten wie bei der Primärantwort auch während der Sekundärantwort konstant NKG2D (Abb. 9A) und behielten dies auch an Tag 81 bei. CD4<sup>+</sup> T-Zellen banden auch bei der Sekundärinfektion keine Multimere (Abb. 8B). Auf SIINFEKL-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen fand sich an Tag 5 nun eine deutliche Färbung mit H60 und Rae1 $\gamma$  (Abb. 9D). Auf Gedächtnis-T-Zellen blieb sie weiterhin bestehen, schwächte sich jedoch leicht ab (Abb. 9D). Dies bestätigte sich auch bei Differenzierung zwischen aktivierten und nicht aktivierten T-Zellen: Nur CD62L-niedrige/CD8<sup>+</sup> Zellen sind positiv (Abb. 9C).

Diese Befunde bestätigen im Wesentlichen bislang veröffentlichte Beobachtungen mit monoklonalen Antikörpern gegen NKG2D. NK-Zellen exprimieren konstitutiv NKG2D ohne Änderung der Expressionsintensität während oder nach Aktivierung. Naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen tragen kein NKG2D. Unter Aktivierung kommt es allerdings zu einer vermehrten Expression, die auch auf Gedächtniszellen bestehen bleibt. Im Gegensatz dazu findet sich auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen weder im naiven Zustand noch unter Infektionsbedingungen mit *L. monocytogenes* nachweisbare NKG2D-Expression

**Abb.: 9**

*Ex vivo-Färbung mit Rae1- und H60-Multimeren auf Milzzellen von sekundär mit *L. monocytogenes* infizierten BALB/c Mäusen. Gefüllte Histogramme stellen den SA-PE Hintergrund dar, offene Histogramme Färbung von Rae1-/H60-Multimer*

*Dargestellt sind DX5<sup>+</sup> NK-Zellen (A), CD4<sup>+</sup> T-Zellen (B) sowie CD62L hoch und niedrig exprimierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen (C). (D) Bindung von NKG2D-Liganden-Multimeren auf antigenspezifische Gedächtniszellen. Histogramme wurden auf LLO 91-99-spezifische Zellen nach Tetramerfärbung gated.*

### 3.4 Auswirkungen von H60 und Rae1 auf die Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen

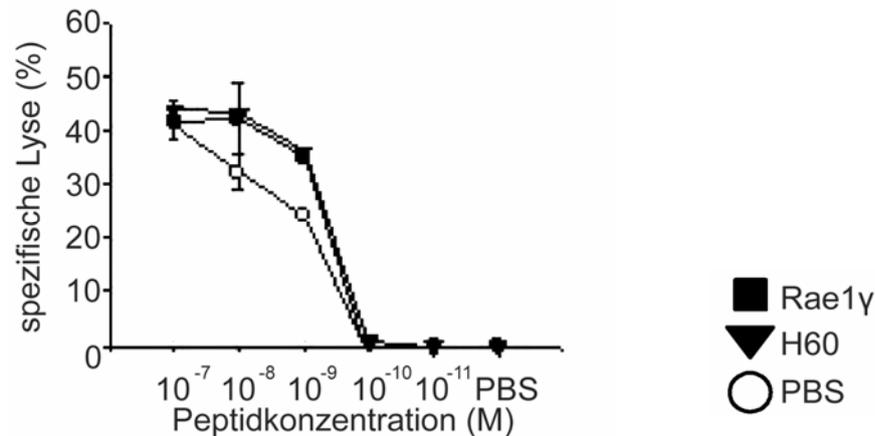
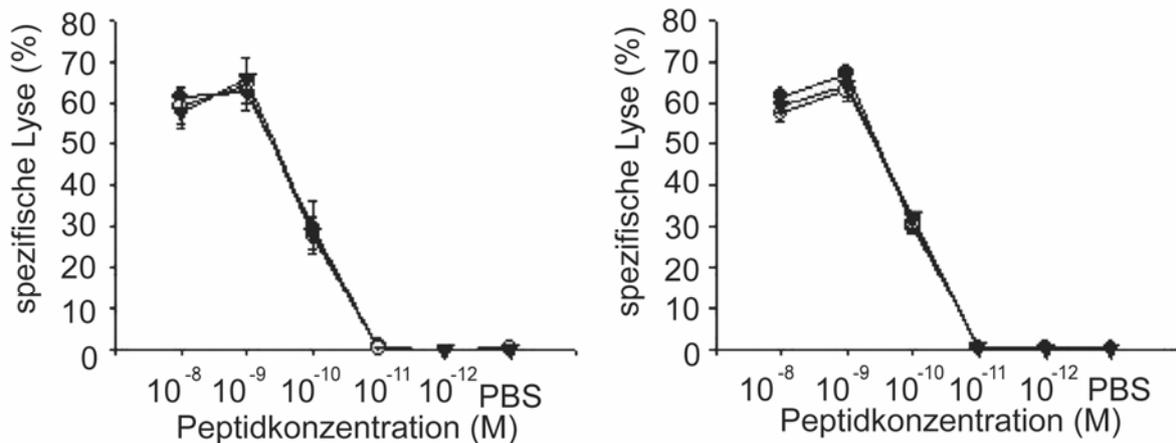
Nachdem nun sowohl *in vitro* auf antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen als auch *ex vivo* auf aktivierten CD8<sup>+</sup> Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen NKG2D-Expression nachgewiesen werden konnte, wurde nachfolgend die funktionelle Bedeutung der Rezeptor-Liganden-Interaktion auf T-Zellen untersucht.

Die bisher in der Literatur beschriebenen funktionellen Aspekte von NKG2D beziehen sich hauptsächlich auf die Zytotoxizität (Bauer, 1999). Aktivierung von NKG2D führte dabei auf NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu jeweils unterschiedlich stark ausgeprägten Effekten. Während für NK-Zellen NKG2D-vermittelte Signale als alleiniger Stimulus zur vollständigen Aktivierung ausreichend sind (Diefenbach, 2002; Gilfillan, 2002), wurden für CD8<sup>+</sup> T-Zellen modulatorische Effekte beschrieben. Diese wirken nur im Zusammenhang mit primären TCR-Signalen im Sinne einer Kostimulation. Es kommt zu einer erhöhten Zytotoxizität mit gesteigerter Zelllyse und vermehrter Sekretion von Effektorzytokinen. Allerdings gibt es hierbei widersprüchliche Beobachtungen (Ehrlich, 2005), so dass die exakte Rolle von NKG2D auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen weiterhin unklar bleibt. Da diese Experimente mit stimulierenden mAb gegen NKG2D durchgeführt wurden, konnten mögliche Unterschiede durch die verschiedenen NKG2D-Liganden allerdings nicht untersucht werden. Diese Fragestellung lässt sich aber mit Hilfe der von uns generierten löslichen NKG2D Liganden direkt adressieren.

Hierfür wurden Standard <sup>51</sup>Cr-Cytotoxizitätsassays durchgeführt. Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit abnehmenden Mengen Peptid stimuliert und konstante Mengen (10 µg/ml) der löslichen Liganden-Multimere H60 und Rae1γ hinzugegeben. Beide NKG2D-Liganden führten zu einer leicht gesteigerten Lyse der Zielzellen bei suboptimaler Peptidstimulation. Im Bereich von 10<sup>-7</sup> M bis 10<sup>-13</sup> M wurde die relative spezifische Lyse um ca. 15-20% Prozent im Vergleich zur Negativkontrolle gesteigert, in gleichem Maß durch H60 wie durch Rae1γ. Es sind also keine Unterschiede zwischen den Liganden zu erkennen (Abb. 10A).

Bei den verwendeten Zielzellen handelt es sich um P815 und EL-4, die von sich aus schon NKG2D-Liganden exprimieren. Diese könnten die NKG2D-Bindungsstellen der T-Zellen schon weitgehend besetzen, so dass sich eine weitere Zugabe von Liganden-Multimeren ohne weitergehende Wirkung bleiben würde. Um ausschließlich Effekte der zugegebenen Multimere zu überprüfen, wurden in weiteren Experimenten die Zielzellen vor ihrer

Verwendung mit NKG2D-Multimeren präinkubiert. Diese können nun an die entsprechenden Liganden auf der Oberfläche der Tumorzellen binden, die dann keine Konkurrenz mehr um die Rezeptoren der T-Zellen darstellen sollten. Das weitere Vorgehen entsprach dem vorigen Experiment. Allerdings war auch trotz dieser Maßnahme keine Steigerung der Zytotoxizität durch Zugabe der NKG2D-Liganden zu beobachten, genauso wenig wie Unterschiede zwischen H60 und Rae1 $\gamma$  (Abb. 10B).

**A****B****Abb.: 10**

(A) Die Zytotoxizität einer CD8<sup>+</sup> T-Zellen einer SIINFEKL-spezifischen Zelllinie wird als Spezifische Lyse von EL-4 Zielzellen ( $y$ -Achse) in Abhängigkeit der zur Stimulation verwendeten Peptidkonzentration ( $x$ -Achse) dargestellt. Zugabe von Liganden-Multimeren (10 $\mu$ g/ml, s.Legende), bzw. PBS.

(B) Zytotoxizität einer LLO 91-99 spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zelllinie in Abhängigkeit der stimulierenden Peptidkonzentration ( $x$ -Achse). P815 Zielzellen wurden entweder nicht vorbehandelt (linkes Diagramm) oder mit NKG2D-Multimeren vorinkubiert (rechtes Diagramm). Liganden-Multimere wie in A.

Bei alleiniger Zugabe der Liganden-Multimere ohne spezifisches Peptid sind diese nicht in der Lage, signifikante Effekte auszulösen (Abb. 10A+B). Ihre Wirkung auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen kommt also nur im Zusammenhang mit einem primären Signal zum Tragen.

Dieser kostimulatorische Effekt der NKG2D-Liganden stimmt weitgehend mit den bislang bekannten Daten überein, zeigt allerdings nicht die oftmals beschriebene starke Zunahme der Zytotoxizität. Darüber hinaus ließ sich aber kein Unterschied in der niedrigen kostimulatorischen Aktivität auf Zellyse zwischen H60 und Rae1 $\gamma$  erkennen.

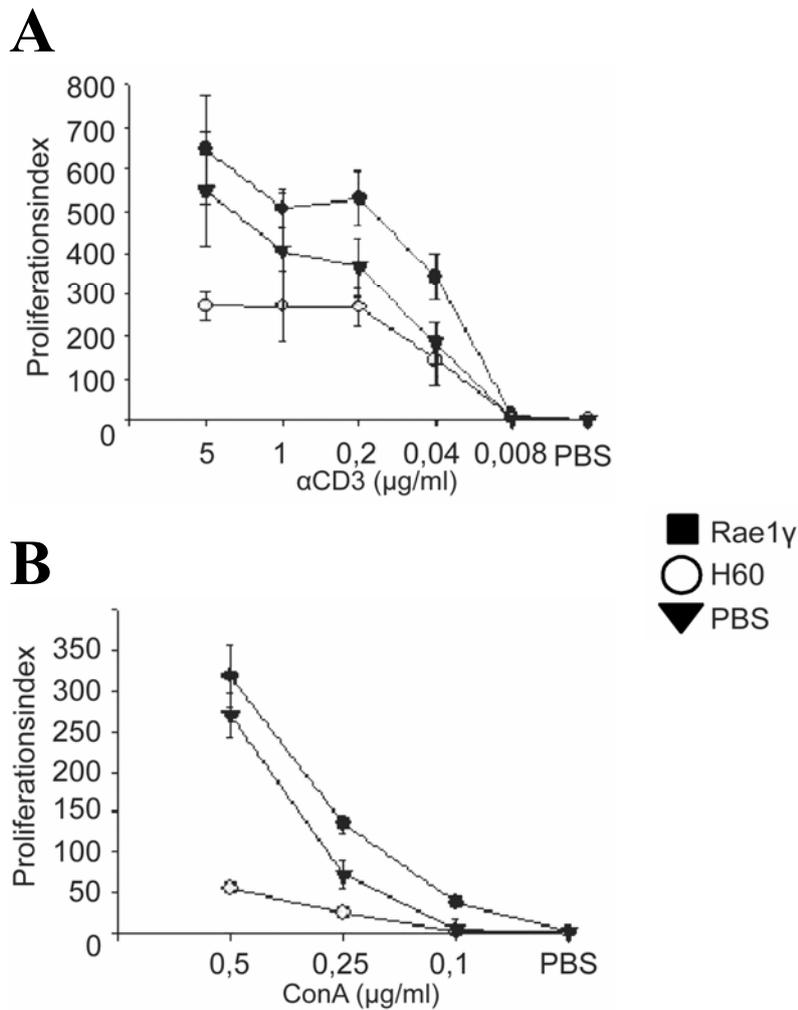
## **3.5 Unterschiede zwischen NKG2D-Liganden in ihrer Wirkung auf T-Zell-Proliferation**

### **3.5.1 H60 hemmt Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zelllinien**

Um den Einfluss der einzelnen NKG2D-Liganden auf die Proliferation von Lymphozyten zu untersuchen, wurden in ersten Versuchen <sup>3</sup>H-Thymidin-Proliferations-Assays mit polyklonalen listerien-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Linien durchgeführt. Zusammen mit bestrahlten Milzzellen wurden die T-Zellen mit abnehmenden Konzentrationen eines  $\alpha$ CD3 mAb stimuliert. H60- und Rae1 $\gamma$  -Multimere sowie ein Kontrollmultimer wurden in einer konstanten Konzentration (2,5 $\mu$ g/ml) hinzu gegeben. Nach drei Tagen wurde mit radioaktivem Thymidin gepulst und der Assay nach weiteren 65h ausgelesen (Abb. 11A). Dabei erwirkte Rae1 im Vergleich zur Kontrolle eine geringe Steigerung der Thymidinaufnahme, was im Sinne der bekannten kostimulatorischen Aktivität interpretiert werden könnte. Überraschenderweise unterschied sich H60 vollkommen davon und führte zu einer deutlichen Reduzierung der Proliferationsindices, also einer Inhibition der Proliferation (Abb. 11A). Zum ersten Mal wurde somit ein wesentlicher Unterschied zwischen verschiedenen NKG2D- Liganden offensichtlich.

Dieser Effekt ist abhängig von der Konzentration der zugegebenen Liganden. In einer Wiederholung des Experiments wurden die CD8<sup>+</sup> T-Zellen konstant mit  $\alpha$ CD3 stimuliert. H60 und Rae1 $\gamma$  wurden nun mit abnehmenden Konzentrationen austitriert. Erneut fand sich der deutliche Unterschied zwischen beiden Liganden. In hohen Konzentrationen führte H60 zu einem nahezu vollständigen Sistieren der T-Zell-Proliferation. Umgekehrt war bei Rae1 $\gamma$

ein diesmal relativ deutlicher stimulierender Effekt zu beobachten. Beide Wirkungen ließen sich titrieren und nahmen bei geringeren Konzentrationen der Multimere ab.



**Abb.: 11**

(A) SIINFEKL-spezifische  $CD8^+$  T-Zellen wurden mit C57BL/6 Milzzellen und verschiedenen  $\alpha$ CD3-Konzentrationen (x-Achse) inkubiert. Proliferationsindices (y-Achse) stellen die jeweilige Thymidinaufnahme in Bezug zur Spontanaufnahme dar.

(B) Ähnlicher Ansatz einer SIINFEKL-spezifischen T-Zelllinie, aber Stimulation mit absteigenden ConA-Konzentrationen (x-Achse)

Ob die Inhibition der Proliferation nur im Zusammenhang mit einer spezifischen Stimulation des TCR möglich ist oder ob eine unspezifischere Aktivierung ausreicht, wurde durch Stimulation der T-Zellen mit dem Lectin ConA untersucht, das T-Zellen durch Quervernetzung zuckerhaltiger Oberflächenmoleküle aktiviert. Erneut zeigte sich die deutliche Hemmung der Proliferation durch H60 und die leichte Anregung der Proliferation von Rae1 $\gamma$ , so dass der Effekt nicht von einer spezifischen Stimulation abzuhängen scheint (Abb. 11B).

### 3.5.2 Nachweis der Verminderten Zellteilung

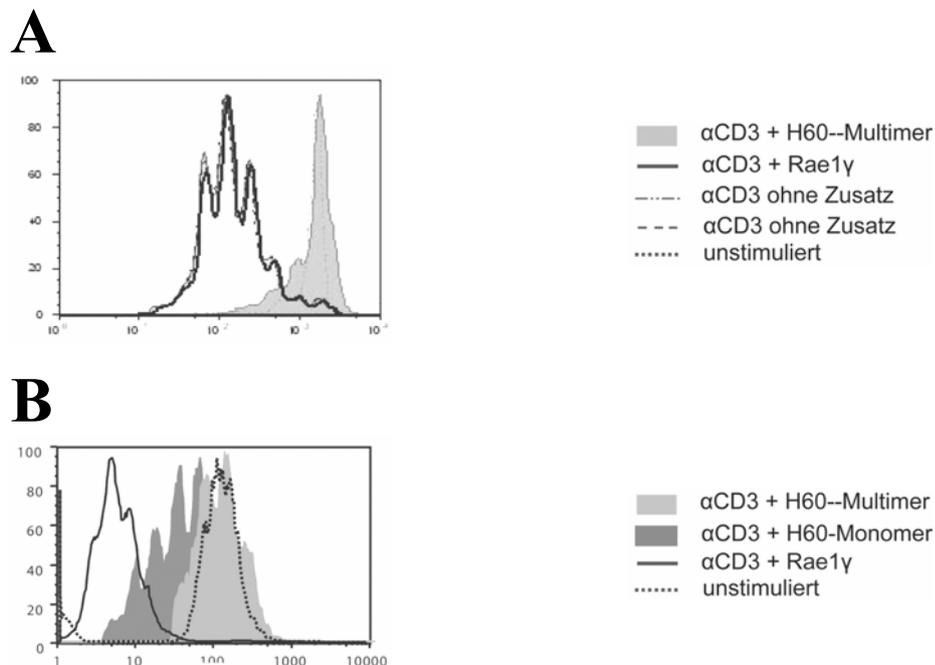
Durch die bei jeder Zellteilung gleichmäßige Verteilung des an Proteine gebundenen fluoreszierenden Esters CFSE auf die Tochterzellen, kann über die Abnahme der Fluoreszenzintensität durchflußzytometrisch die Zahl der Teilungen einzelner Zellen dargestellt werden. Dies wird als weiterer experimenteller Ansatz zur Untersuchung der Einflüsse der NKG2D-Liganden auf die Proliferation von T-Zellen genutzt.

Anstatt wie zuvor CD8<sup>+</sup> T-Zelllinien zu verwenden, wurden nun Experimente mit über MACS negativ angereicherten CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchgeführt. Diese wurden mit CFSE markiert und anschließend unter Zugabe (2,5 $\mu$ g/ml) der Liganden-Multimere H60 und Rae1 $\gamma$ , bzw. SA-PE als Kontrolle mit bestrahlten Milzzellen und  $\alpha$ CD3 mAb stimuliert. Für die selektive Darstellung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden die Zellen nach 65h mit einem entsprechenden CD8 mAb gefärbt.

Auch bei den angereicherten Zellen zeigte sich wieder das differentielle Bild der beiden NKG2D-Liganden. So kam es unter H60-Zugabe zu einer deutlichen Hemmung der Proliferation, fast bis auf das Niveau der unstimulierten Zellen. Zellteilungen wurden nur vereinzelt beobachtet (Abb. 12A). Dagegen proliferierten die Zellen, die Rae1 $\gamma$ -Multimere erhalten hatten in gleichem Maße wie die SA-PE-Kontrollen. Der Unterschied betrug in etwa vier Zellteilungen (Abb. 12A).

Bisher wurden die Effekte der NKG2D-Liganden immer durch Multimere erzielt. Zur Beantwortung der Frage ob die Hemmung der Proliferation durch H60 so genanntes „cross-linking“ des Rezeptors erfordert, oder ob auch der alleinige Rezeptor-Liganden-Kontakt ausreichend für die Signaltransduktion ist, wurde dieses Experiment wiederholt und statt der Liganden-Multimeren nun die monomere Form hinzu gegeben. Auch in Gegenwart von Monomeren wird die Zellteilung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen gehemmt, allerdings deutlich abgeschwächt im Vergleich zur multimeren Form (Abb. 12B). Cross-linking scheint demnach

eine gewisse Rolle zu spielen, aber auch durch Monomere lässt sich eine deutliche inhibitorische Wirkung erzielen.



**Abb.: 12**

(A) MACS-angereicherte CFSE-markierte  $CD8^+$  T-Zellen wurden in Präsenz von Milzzellen und Rae1- bzw. H60-Multimeren mit  $\alpha CD3$  stimuliert. Dargestellt ist die CFSE-Intensität bezogen auf  $CD8^+$  Zellen nach 65h

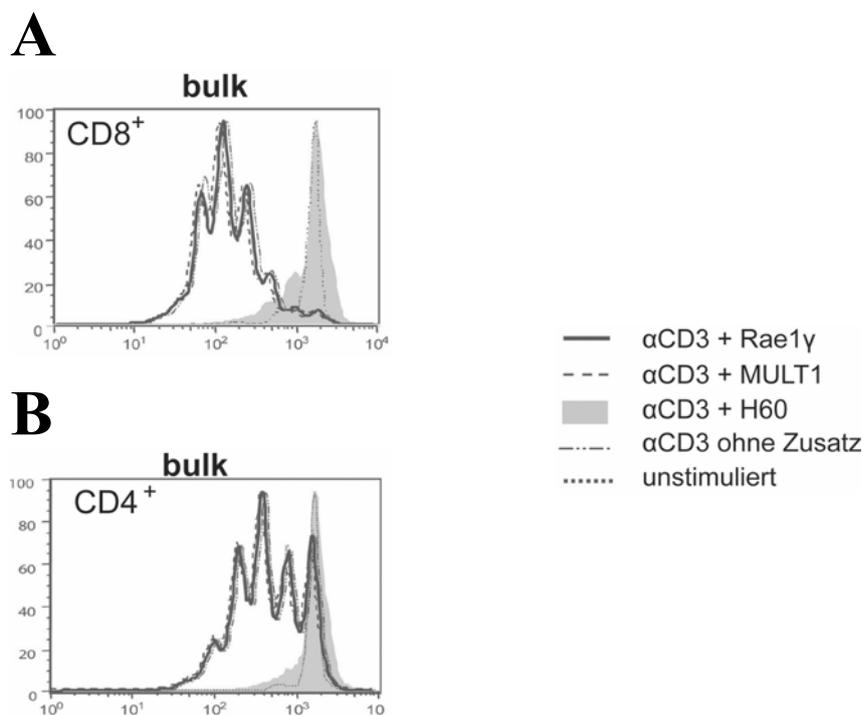
(B) Vergleich der Effekte von Rae1- und H60-Multimeren bzw. Monomeren auf Proliferation: Gepunktetes Histogramm für unstimulierte Zellen, offenes Histogramm für Zugabe von Rae1, gefülltes hellgraues Histogramm H60-Multimer, gefülltes dunkelgraues Histogramm H60-Monomer.

### 3.5.3 Effekt auf die Proliferation $CD4^+$ T-Zellen

Um neben den  $CD8^+$  T-Zellen auch mögliche Effekte der NKG2D-Liganden auf  $CD4^+$  T-Zellen zu untersuchen, wurden CFSE-Assays mit kompletten Milzzellpopulationen durchgeführt. Nach 65h wurden die Zellen mit CD8- und CD4- mAb gefärbt und getrennt dargestellt. Die Proliferation der  $CD8^+$  T-Zellen zeigte das gewohnte Bild mit deutlich herabgesetzter Proliferation durch H60 (Abb. 13A). Umso erstaunlicher war allerdings, dass

CD4<sup>+</sup> T-Zellen in gleicher Weise durch die NKG2D-Liganden-Multimere beeinflusst werden und die Proliferation nach H60-Zugabe ebenso reduziert war. Weder in der Literatur, noch in den hier vorgestellten Daten wurden bislang Hinweise auf NKG2D-Expression auf diesen Zellen gefunden. Auch weiterführende Experimente mit NKG2D-spezifischen mAbs konnten keine Subpopulation innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen identifizieren.

Diese Befunde sollen an dieser Stelle jedoch nur kurz angerissen werden, da sie im Rahmen der Doktorarbeit von Anja Kriegeskorte derzeit näher untersucht werden.



**Abb.: 13**

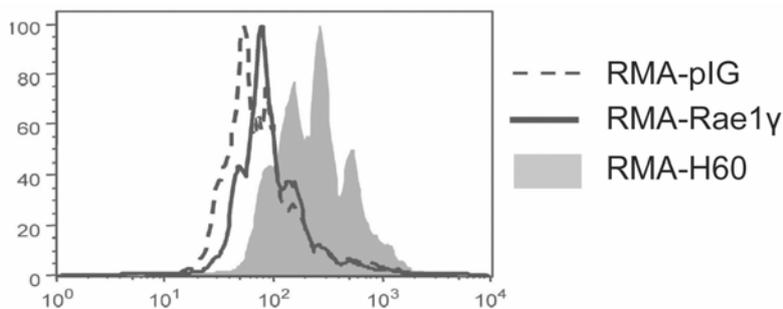
*CFSE Proliferations-Assay mit vollständigen Milzzellkulturen. Getrennte Darstellung der CFSE-Intensität nach 65h für CD8<sup>+</sup> - (A) und CD4<sup>+</sup> - T-Zellen (B). Gefüllte Histogramme repräsentieren H60.*

### 3.5.4 Natives H60 inhibiert ähnlich wie lösliches H60

Die bisherigen Experimente wurden stets mit löslichen, rekombinant hergestellten NKG2D-Liganden-Multimeren durchgeführt. Um die Befunde auch mit der nativen Form der Moleküle zu bestätigen, wurden CFSE-Assays mit NKG2D-Liganden-exprimierenden Tumorzellen wiederholt. Über eine Kollaboration wurden von Leon Carayanopoulos (St.

Louis, MA) verschiedene mit den NKG2D-Liganden (Rae1-delta, H60 und MULT1) transfizierte RMA-Tumor-Zelllinien zu Verfügung gestellt. Die Expression der Liganden auf den Lymphomzellen konnte über Färbung mit NKG2D-Multimer bestätigt werden.

Für den Assay wurden CFSE markierte Milzzellen in Anwesenheit der unterschiedlich transfizierten RMA-Zellen mit  $\alpha$ CD3 stimuliert und nach 64h  $CD8^+$  und  $CD4^+$  T-Zellen dargestellt. Bei beiden Zelltypen ließ sich wiederum eine Inhibition der Proliferation feststellen (Abb. 14). Dadurch bestätigt sich der Befund auch mit nativem Protein. Zudem wird nun indirekt ein unspezifischer Effekt durch Kontamination der löslichen Multimere durch bakterielle Bestandteile bei der Herstellung ausgeschlossen, ebenso ein Effekt durch nichtphysiologische Sekundär- oder Tertiärstrukturen.



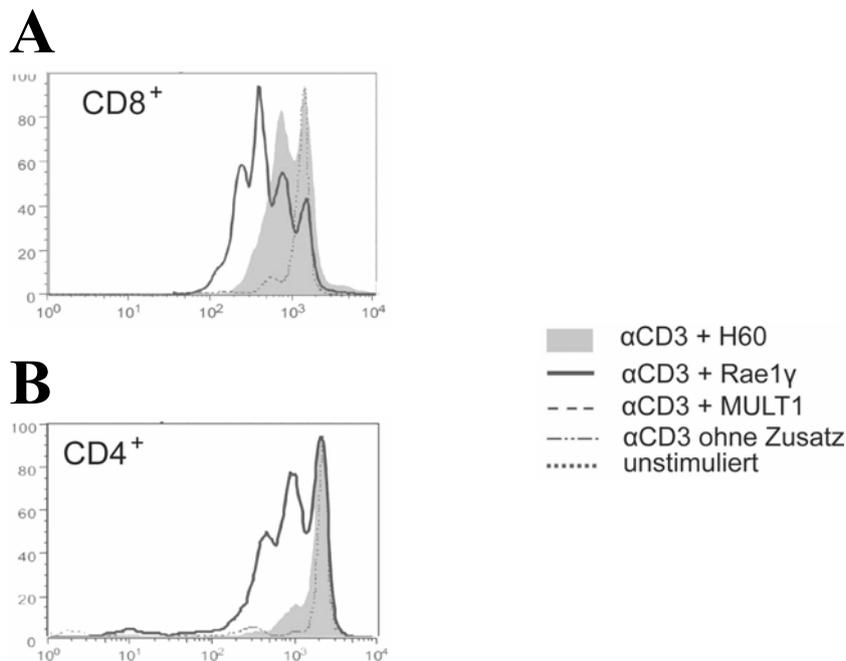
**Abb.: 14**

*Bestrahlte, mit Rae1 (offenes Histogramm) oder H60 (gefülltes Histogramm) transfizierte RMA-Zellen wurden zu mit anti-CD3 stimulierten Milzzellen gegeben. Darstellung des CFSE-Profiles der  $CD8^+$  T-Zellen.*

### 3.6 Rolle der Stimulatorzellen

Die Hemmung auch von  $CD4^+$  T-Zellen trotz nicht nachweisbarer Liganden-Bindung warf die Frage auf, ob eventuell ein indirekter Effekt, vermittelt durch eine Zellpopulation innerhalb der bei den bisherigen Versuchen immer vorhandenen Stimulatorzellen zu den beschriebenen Phänomenen führen könnte. Deswegen wurden CFSE-Assays unter Ausschluss von Stimulatoren durchgeführt, bei denen aufgereinigte  $CD8^+$  T-Zellen direkt über an den Versuchsplatten gebundenes  $\alpha$ CD3 stimuliert wurden. Die Aufreinigung erfolgte über MACS durch negative Depletion. Allerdings zeigte sich auch bei diesen hoch aufgereinigten T-Zellen die durch H60 hervorgerufene Hemmung der Proliferation (Abb. 15A). In einem von Anja

Kriegeskorte durchgeführten Experiment mit aufgereinigten  $CD4^+$  T-Zellen ergab sich das gleiche Bild (Abb. 15B). Beide T-Zell-Kompartimente müssten somit zumindest Subpopulationen aufweisen, die diesen inhibitorischen Effekt vermitteln können.



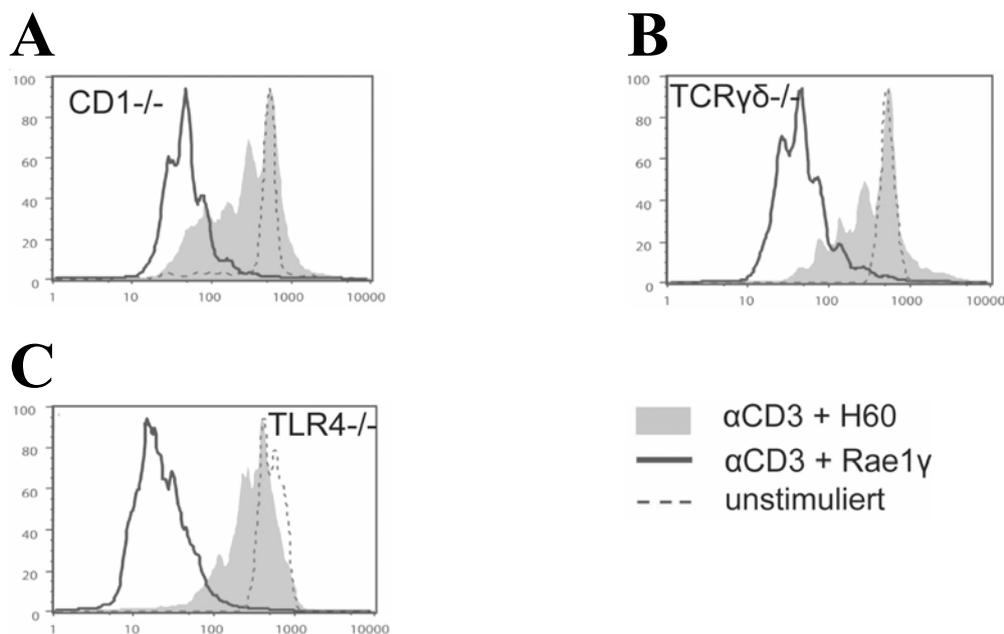
**Abb.: 15**

$CD8^+$  (A) und  $CD4^+$  (B) aufgereinigte T-Zellen wurden über am Plattenboden gebundenes anti-CD3 stimuliert. Histogramme wie in der Legende indiziert, H60 wird durch gefüllte Histogramme repräsentiert.

### 3.7 Suche nach einer regulatorischen Subpopulation

Die bisherigen Beobachtungen zur Wirkung der NKG2D-Liganden auf die Proliferation von T-Zellen lassen auf einen Effekt schließen, der nicht direkt über die Bindung von H60 auf  $CD8^+$  und  $CD4^+$  T-Zellen zustande kommt, sondern indirekt über eine regulatorische Zellpopulation vermittelt zu sein scheint. Um diese zu identifizieren wurde die Beteiligung verschiedener bekannter regulatorischer Lymphozytenpopulationen untersucht.

Zuvor sollte jedoch ein unspezifischer Effekt bedingt durch eine mögliche LPS-Kontamination bei der Herstellung der Multimere ausgeschlossen werden. LPS kann über TLR-4-vermittelte Aktivierung regulatorischer T-Zellen zu einer Proliferationsinhibition führen (Caramalho, 2003). In Bulk-CFSE-Proliferationsassays mit TLR-4 defizienten Mäusen blieb die Inhibition allerdings erhalten, ein LPS-Effekt ist also wenig wahrscheinlich (Abb. 16C). Zusätzlich wurde die LPS-Konzentration der Multimere gemessen, die jedoch stets unter der Nachweisgrenze lag. Auch die aktive Zugabe von LPS zu den Zellkulturen in Konzentrationen, die eine mögliche Kontamination um ein 100- bis 1000-faches überschritten, zeigte keinen Effekt auf das Proliferationsverhalten der T-Zellen.



**Abb.: 16**

*H60-vermittelte T-Zell-Inhibition ist unabhängig von natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen bzw. NKT-Zellen. CFSE-Profile von  $CD8^+$  T-Zellen nach anti-CD3 mAB Stimulation und H60-Zugabe wurden wie beschrieben erstellt. Dargestellt sind Versuche mit Milzzellen der angegebenen Knockout-Mäuse (A-C)*

Bislang sind eine Reihe unterschiedlicher regulatorischer Zellpopulationen bekannt. Neben natürlich vorkommenden  $CD25^+/CD4^+$  T-Zellen (Sakaguchi, 1985) wurden NK T-Zellen (Jameson, 2003) und  $\gamma\delta$ -T-Zellen (Hayday, 2003) mit inhibitorischer Aktivität auf T-Zellen identifiziert. In Bulk-CFSE Proliferations-Assays mit Milzzellen der Knockoutmäuse  $CD1^{-/-}$ ,

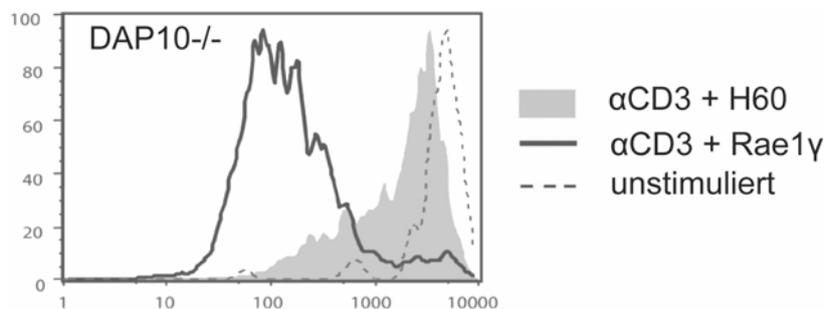
TCR $\gamma\delta$   $-/-$  und MHCII $-/-$ , die durch eine Fehlfunktion in diesen regulatorischen Subpopulationen gekennzeichnet sind, zeigte sich jedoch durchgehend die Inhibition mit H60. (Abb. 16A+B). Damit sind diese klassischen regulatorischen Populationen als Vermittler der Inhibition weitestgehend ausgeschlossen.

### 3.8 H60 vermittelte Inhibition ist unabhängig von DAP10

Der kostimulatorische Effekt von NKG2D auf CD8 $^+$  T-Zellen kann nur im Zusammenhang mit dem Adaptermolekül DAP10 vermittelt werden. DAP10 Knockoutmäuse zeigen auf ihren CD8 $^+$  T-Zellen weder eine NKG2D-Expression noch die entsprechenden Effekte auf die Zytotoxizität (Diefenbach, 2002; Gilfillan, 2002).

Umso überraschender war es, als die Gegenwart von H60 in Bulk-CFSE-Assays auch die Proliferation von T-Zellen dieser Mäuse inhibiert wurde (Abb. 17).

Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass die Inhibition von H60 nicht über NKG2D sondern einen weiteren Rezeptor verursacht wird.



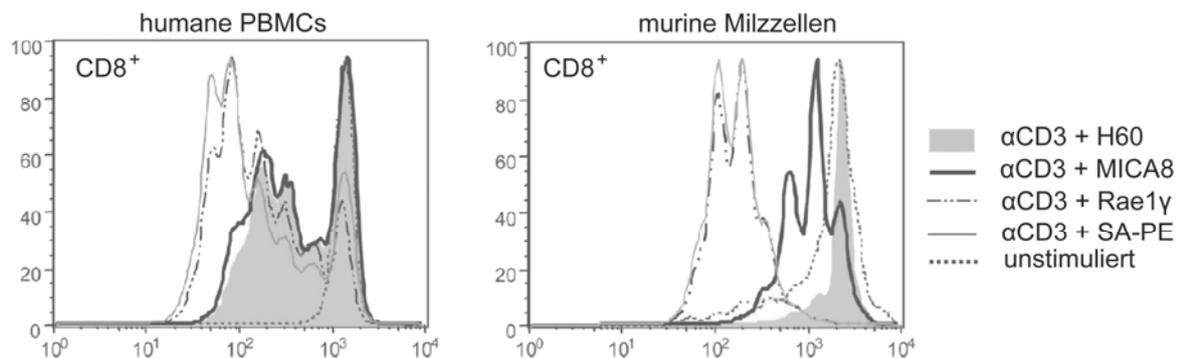
**Abb.: 17**

*H60 wirkt unabhängig von DAP10. Proliferations-Profil von CD8 $^+$  T-Zellen einer DAP-10 defizienten Maus mit und ohne H60. Darstellung der Histogramme entsprechend der Legende*

### 3.9 MICA8 führt zu einer H60-ähnlichen Inhibition

Um zu klären, ob es auch auf humanen T-Zellen eine Beeinflussung der Proliferation durch NKG2D-Liganden gibt, wurden humane MICA8-Multimere an humanen PBMCs getestet. Interessanterweise wurde dabei die Proliferation der  $\alpha$ CD3-stimulierten Zellen durch die MICA8-Multimere gemindert (Abb. 18A).

Die Zugabe der inhibierenden Liganden-Multimere zu Zellen der jeweilig anderen Spezies führte darüber hinaus ebenfalls zu einer Inhibition der Proliferation (Abb. 18B). Dieser Effekt ist umso erstaunlicher, als weder die murinen Liganden Rae und H60 humanes NKG2D noch humanes MICA8 murines NKG2D binden (siehe Abb. 2). Dies ist ein weiterer Hinweis, dass die Inhibition über einen bislang unbekanntem Rezeptor vermittelt werden könnte.



**Abb.: 18**

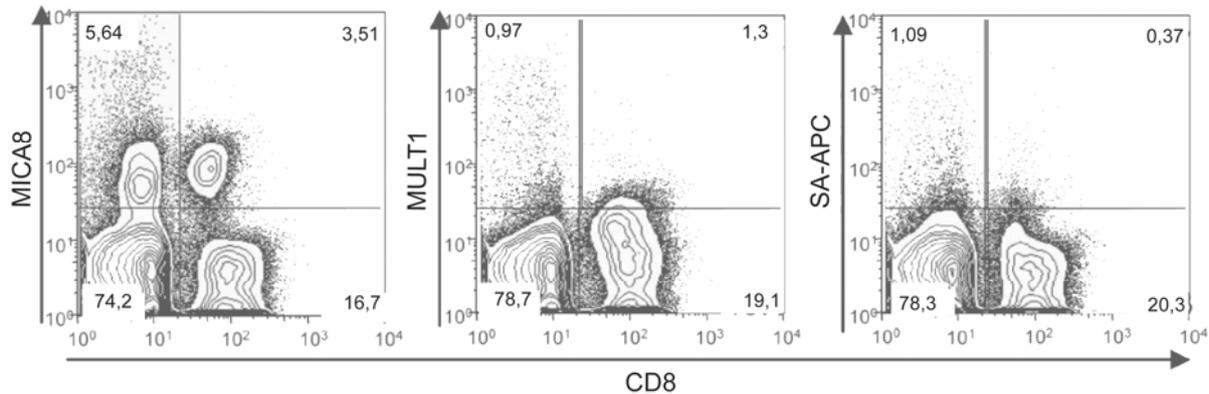
*Speziesübergreifende Inhibition von H60 und MICA8. Frisch isolierte CFSE-markierte humane PBMC (A) oder murine Milzzellen (B) wurden mit anti-CD3 stimuliert unter An- oder Abwesenheit von MICA8-Multimeren (fettes Histogramm) oder H60-Multimeren (geschlossene Histogramme).*

### 3.10 MICA8 identifiziert murine Subpopulation

Humane MICA8-Multimere verursachen eine Inhibition muriner T-Zellen, ohne dass eine Bindung an murines NKG2D nachgewiesen werden konnte. Somit sollten sie ausschließlich den von NKG2D unterschiedlichen Rezeptor der regulatorischen Subpopulation anfärben und somit zu deren Identifizierung beitragen können.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden nur kurz mit  $\alpha$ CD3 mAb stimulierte murine T-Zellen mit MICA8-, H60- und MULT1-Multimeren gefärbt. In der Tat ließ sich mit MICA8 im Gegensatz zu MULT1 eine substantielle Fraktion der CD8+ und CD4+ T-Zellen anfärben (Abb. 19). Somit ergab sich ein erster Hinweis auf eine potentielle Subpopulation, die

möglicherweise in der Lage sein könnte, über einen von NKG2D unabhängigen Rezeptor die Inhibition zu vermitteln.



**Abb.: 19**

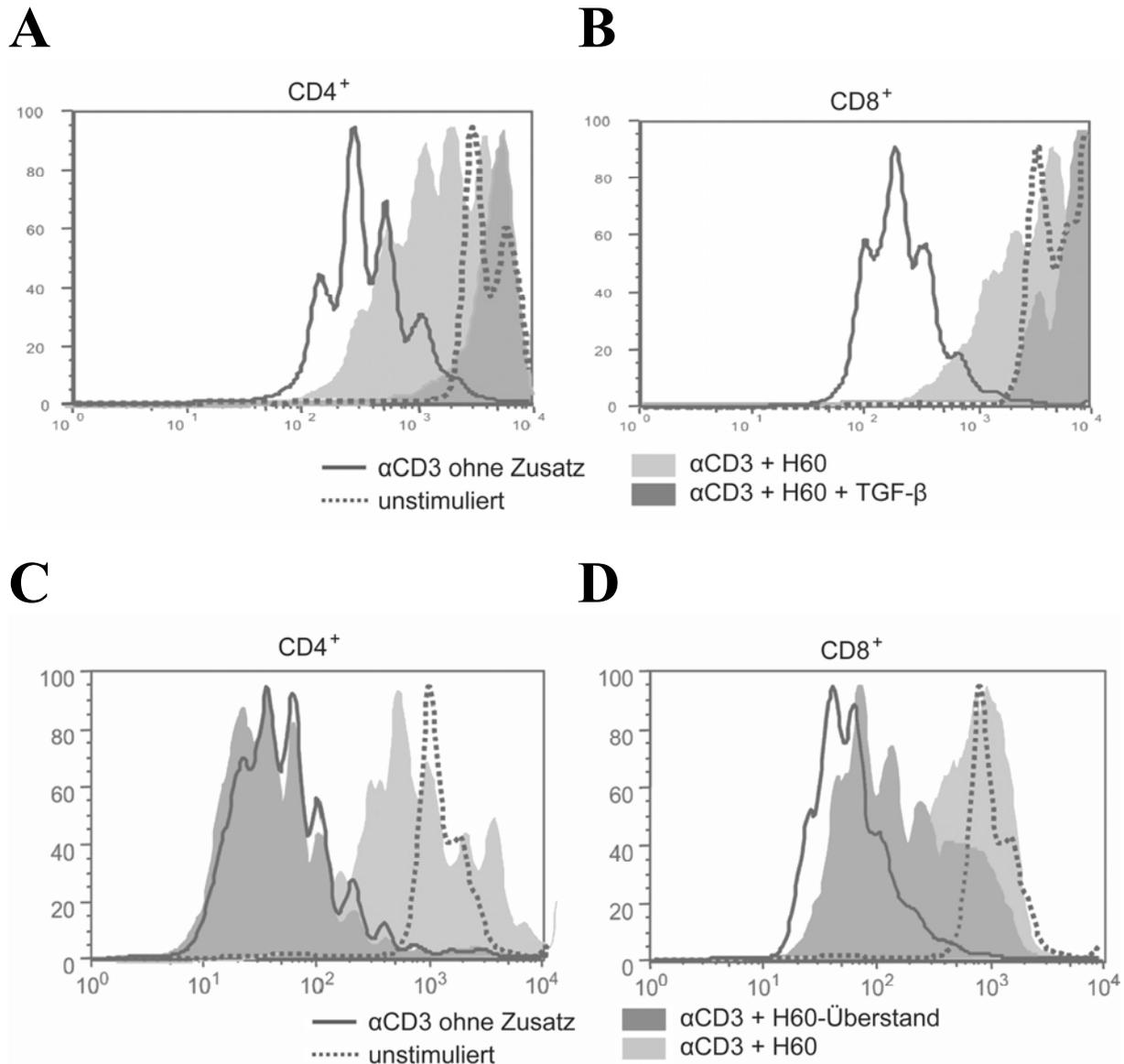
*MICA8 färbt murine T-Zell-Subpopulation. Milzzellen von BALB/c-Mäusen wurden nach kurzzeitiger Stimulation mit anti-CD3 analysiert. Dargestellt sind Dot plots der lebenden Lymphozyten mit Färbung für CD8 (x-Achse) und NKG2D-Liganden/Streptavidin-APC (y-Achse). Als Kontrolle dient Färbung mit Streptavidin-APC alleine.*

### 3.11 Nähere Bestimmung des Mechanismus der Inhibition

Regulatorische T-Zellen vermitteln ihre inhibitorische Funktion über bislang erst wenig verstandene Mechanismen. Daran beteiligt sind sowohl Zell-Zell-Kontakt abhängige Prozesse, als auch die Sekretion unterschiedlicher inhibitorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  (Vieria, 2004; Fahlen, 2005).

Die mögliche Beteiligung von TGF- $\beta$  bei der H60-vermittelten Inhibition wurde untersucht. Zugabe von blockierenden anti-TGF- $\beta$  mAb zu CFSE-Assays führte sowohl bei CD4+ (Abb. 20A) als auch bei CD8+ (Abb. 20B) T-Zellen zu einer leichten Abschwächung der Inhibition, war jedoch nie in der Lage, den H60-Effekt vollständig zu blockieren.

Ob Zell-Zell-Kontakte eine Rolle spielen würden oder ob andere lösliche Faktoren beteiligt sind, wurde ebenfalls adressiert. Dazu wurden Überstände von mit H60-Monomeren versetzten Stimulationskulturen abgenommen. Um möglicherweise noch vorhandene Liganden-Monomere zu entfernen, wurde die Überstände anschließend mit biotinylierten Beads behandelt, die dann magnetisch gefällt wurden. Der Transfer des Überstandes auf eine

**Abb.: 20***Mechanismus der Inhibition*

(A) + (B) Milzzellen wurden mit anti-CD3 stimuliert. Neben H60-Multimeren wurde blockierender anti-TGF- $\beta$  mAb zugegeben. Darstellung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Alleinige H60-Zugabe wird repräsentiert durch hell-gefüllte Histogramme, H60- und gleichzeitige anti-TGF- $\beta$ -Zugabe durch dunkel-gefüllte Histogramme.

(C) + (D) Milzzellen wurden mit und ohne H60 durch anti-CD3 stimuliert. Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Zugabe von H60-Überstand (dunkle Histogramme) im Vergleich zu direkter H60-Zugabe (helle Histogramme). Als Kontrolle dienen alleinige anti-CD3 Stimulation und unstimulierte Zellen.

zweite Kultur führte niemals zu einem Transfer des inhibitorischen Effektes, weder auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 20C) noch auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 20D).

In einem von Anja Kriegeskorte durchgeführten Experiment mit IL-10-defizienten Mäusen zeigte sich der H60-Effekt deutlich abgeschwächt. Allerdings war die Zugabe von blockierendem anti-IL10 mAb nicht in der Lage, ebenfalls die Inhibition aufzuheben.

Zusammengenommen ergaben sich damit Hinweise, dass die eigentliche Proliferationsinhibition von H60 primär über einen Zell-Zell-Kontakt-abhängigen Prozess abzulaufen scheint. Die inhibitorischen Zytokine TGF- $\beta$  und IL-10 könnten ebenfalls beteiligt sein, im Falle von IL-10 jedoch eher an der Generierung von H60-getriggerten TR, weniger an der direkten Vermittlung der Inhibition.

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der NKG2D-Liganden-Interaktion auf antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und dabei besonders die Untersuchung möglicher Unterschiede zwischen den verschiedenen Liganden. Hierfür wurden die NKG2D-Liganden Rae1 $\gamma$ , H60, MULT1 und MICA8 rekombinant exprimiert und multimerisiert, um sowohl eine durchflußzytometrische Analyse der NKG2D-Expression auf Immunzellen, als auch eine gezielte Untersuchung der Wirkung einzelner Liganden auf T-Zellen zu ermöglichen.

Es konnte eine konstitutive Expression von NKG2D auf NK-Zellen nachgewiesen werden. Ebenso eine Hochregulierung von NKG2D auf in naivem Zustand negativen CD8<sup>+</sup> T-Zellen während einer Listerieninfektion, die auch auf Gedächtniszellen bestehen blieb. CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie B-Zellen exprimierten kein NKG2D.

Weder Rae1 $\gamma$  noch H60 führen zu einer besonders gesteigerten Zytotoxizität antigen-spezifischer T-Zellen. Allerdings zeigt sich sowohl im <sup>3</sup>H-Thymidin-Assay als auch im CFSE-Assay eine deutliche Inhibition der T-Zell-Proliferation durch H60 und MICA8. Die Inhibition der Proliferation scheint unabhängig von NKG2D zu sein und ist kreuzreaktiv zwischen Mensch und Maus.

### 4.1 Strukturelle Unterschiede zwischen NKG2D-Liganden

Warum es eine derart große Vielfalt an Liganden für NKG2D gibt ist nicht abschließend geklärt, zumal bislang keine funktionellen Unterschiede beschrieben wurden. Diese Arbeit weißt zum ersten Mal mit H60 und MICA8 bestimmten Liganden eine eigenständige Rolle zu. Im Gegensatz zu anderen murinen NKG2D-Liganden führt H60 zu einer Inhibition der T-Zell-Proliferation. Abgesehen von funktionellen Aspekten gibt es jedoch eine Reihe von Merkmalen, die für einzelne Liganden deutlich von einander abweichen. Die murinen Liganden stimmen nur zu einem geringen Grad in ihrer Sequenz überein. Dennoch haben sie

eine relativ ähnliche Tertiärstruktur. Ihnen gemeinsam sind zwei Ektodomänen, die entfernt mit den  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Domänen von MHC-Klasse-I Molekülen verwandt sind sowie das Fehlen einer  $\alpha 3$ -Domäne (Raulet, 2003). Die humanen Liganden MICA und MICB dagegen besitzen eine  $\alpha 3$ -Domäne (Bahram, 1994, Groh, 1996). Diese strukturellen Unterschiede beeinflussen auch die Affinität der Liganden zu NKG2D. In Standard SPR-Analysen stellte sich MULT1 als der NKG2D mit der höchsten Affinität mit einer  $K_D$  von ungefähr 6 nM dar (Carayannopoulos, 2002). Eine etwas geringere Affinität besitzt H60, die damit aber ca. 25-fach höher liegt, als die Affinität von Rae1 zu NKG2D (O'Callaghan, 2001, Caryannopoulos, 2002). MICA hat nur eine gering höhere Affinität als Rae1 (Li, 2001). In dieser Arbeit konnten diese Befunde bestätigt werden. In Kompetitionsfärbungen mit Rae1- und H60-Multimeren zeigte sich eine eindeutige Dominanz von H60 über Rae1. Im Gegensatz zu den Einzelanalysen von Rezeptor und Liganden der bisherigen Veröffentlichungen, konnten nun diese Ergebnisse auf lebenden Zellen übertragen werden. Mit der gleichen Methode wurde nachfolgend auch die Bindungsfähigkeit von MULT1 im Vergleich zu Rae1 und H60 untersucht (Kriegeskorte, 2005). Im Vergleich zu anderen Rezeptor-Liganden-Interaktionen sind die für NKG2D beschriebenen Affinitäten sehr hoch. So liegen beispielsweise die Affinitäten für NKG2A/CD94-HLA-E (Vales-Gomez, 1999) oder für MHC-Klasse-I-TCR (Davis, 1998) bei deutlich niedrigeren Werten. Es ist jedoch nicht ungewöhnlich, dass unterschiedliche Liganden, die den gleichen Rezeptor binden, derart hohe Unterschiede in ihrer Affinität aufweisen. Andere Beispiele hierfür sind CD80 und die Interaktion mit CD28 und CTLA-4 (van der Merwe, 1997) bzw. CD2 und die Interaktion mit CD48 und CD58 (Davis, 1998). Interessanterweise führen in diesen Beispielen die unterschiedlichen Liganden zu völlig divergenten Effekten.

Für unterschiedliche Funktionen der NKG2D-Liganden könnte auch das bisher bekannte Expressionsmuster der Liganden sprechen. Auch wenn hierfür noch weitere vergleichende Studien durchzuführen sind, lässt die aktuelle Datenlage einige Differenzen erkennen, angefangen vom Vorkommen in natürlichem Gewebe über die Expression in bestimmten Tumoren. So stellt H60 den einzigen murinen Liganden dar, der in höherem Maße von normalen adulten Zellen, v.a. von Thymuszellen von BALB/c Mäusen exprimiert wird (Diefenbach, 2001). MULT1 konnte in einigen Geweben wie Thymus, Milz, Lymphknoten sowie geringer in Leber, Herz und Lunge auf RNA-Ebene nachgewiesen werden, ohne jedoch an der Zelloberfläche exprimiert zu werden (Diefenbach, 2003). Für bestimmte Tumorklinien wie WEHI7.1-, S49.1- und BW5147 T-Zell-Lymphomlinien stellt MULT1 den einzig bekannten Liganden dar (Diefenbach 2003). Andere Linien wie YAC-1 und DC2.4

exprimieren dagegen selektiv Rae1, oder im Falle von A20 B-Zell Lymphom und TRAMP-C1 Prostatacarcinomzellen sowohl Rae1 als auch MULT1. J774 zeigen Koexpression von Rae1 und H60 (Diefenbach, 2003). Ob es sich jedoch bei der Vielfalt NKG2D-Liganden um ein redundantes System handelt oder ob deren Expression spezifische Effekte nach sich zieht, muss noch weiter untersucht werden.

Auch ist es nicht unwahrscheinlich, dass in Zukunft noch weitere NKG2D-Liganden gefunden werden. So gibt es bisher keine direkten murinen Analoga für MIC-Allele. Allerdings wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie mit Mill ein weiteres Molekül vorgestellt, das zumindest zu ca. 25% in der Sequenz mit MIC übereinstimmt (Watanabe, 2004). Der Nachweis jedoch, ob Mill auch als NKG2D-Ligande fungiert, steht noch aus. Auch die murinen Liganden H60 und MULT1 haben keine direkten humanen Entsprechungen (Bahram, 2005).

Interessanterweise haben Träger des HLA-B\*4801 den MICA-locus verloren (Bahram, 2000). Dies kann ein Hinweis auf eine redundante Rolle der Liganden gewertet werden, so dass es zu einem Ersatz der MIC-Funktion kommt.

## 4.2 Kostimulation der T-Zell-Zytotoxizität durch NKG2D

Bislang sind für NKG2D ausschließlich stimulierende Eigenschaften, vor allem eine gesteigerte Zytotoxizität, beschrieben worden. Je nach Zelltyp variiert dieser Aspekt. So führt bei NK-Zellen die Liganden-Bindung zu einer direkten Stimulation mit gesteigerter Lyse von Zielzellen (Raulet, 2003). Dies konnte über Experimente mit transformierten Tumorzelllinien, die einen bestimmten Liganden exprimieren, nachgewiesen werden. Sowohl die humanen Liganden MICA (Bauer, 1999) und ULBPs (Cosman, 2001) wie auch die murinen Liganden Rae1 und H60 (Cerwenka, 2000) zeigen diesen Effekt. Andere Studien mit quervernetzenden Antikörpern führten zu einer unspezifischen Aktivierung von NKG2D, ebenfalls mit gesteigerter Zytotoxizität (Jamieson, 2002).

Statt einer direkten Stimulation kann die Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen über NKG2D zwar weiter gesteigert werden, ist als alleiniger Stimulus jedoch nicht ausreichend (Raulet, 2003). Dies konnte ebenfalls über die Transfektion von potentiellen Zielzellen mit unterschiedlichen Liganden gezeigt werden. So wurden mit MIC transfizierte virusinfizierte Zellen besser von CD8<sup>+</sup> αβ T-Zellen lysiert (Groh, 2001). Auch die Überexpression von Rae1 und H60 auf Tumorzellen führte zu deren gesteigerter Lyse (Diefenbach, 2001). Dieser kostimulatorische

Effekt von NKG2D kann auch als Ersatz für das klassische CD28 vermittelte Signale dienen (Groh, 2001).

Insofern fügt sich die hier gezeigte leichte Erhöhung der Zytotoxizität von 15-20% durch die beiden Liganden Rae1 und H60 in das bekannte Bild. Sowohl die relativ geringe zusätzliche Lyse, als auch das Auftreten des Effektes bei suboptimaler Peptidstimulation liegen mit bisher veröffentlichten Daten in Einklang (Groh, 2001, Diefenbach 2001). Darüber hinaus konnte mit der Anwendung der Liganden-Multimere erstmals eindeutig gezeigt werden, dass es zwischen diesen Liganden keine Unterschiede in Bezug auf die Zytotoxizität gibt. Während bei der Transfektion von Zellen und der damit verbundenen Liganden-Überexpression nicht ausgeschlossen werden kann, dass möglicherweise noch andere Moleküle induziert werden, die an der Vermittlung des Effektes beteiligt sein könnten, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von NKG2D-Liganden durch die Vorbehandlung der Zielzellen mit NKG2D-Multimeren ausgeschlossen. Diese binden an eventuell schon exprimierte Liganden, so dass nur die nachträglich hinzugefügten Multimere zur Geltung kommen sollten. Die Hoffnung, dadurch die Spontanlyse der Zellen zu verringern, konnte allerdings nicht bestätigt werden.

In einer neueren Publikation wurde die allgemeine Ansicht einer kostimulatorischen Funktion von NKG2D auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen jedoch weiter relativiert (Ehrlich, 2005). Hier war die Bindung an NKG2D nicht ausreichend, um die Zytotoxizität CD8<sup>+</sup> T-Zellen signifikant zu steigern.

Dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Gegensatz zu NK-Zellen mit ihrer direkten Stimulation von NKG2D nur einen zusätzlichen Impuls erhalten, ist vor allem in Hinblick auf die Spezifität der T-Zellen zu betrachten. Nur so kann gewährleistet werden, dass dieses herausragende Merkmal als essentieller Aktivierungspfad erhalten bleibt und es nicht zu einer unspezifischen Aktivierung kommen kann. Es bietet sich jedoch mit NKG2D ein zusätzlicher Mechanismus, um geschädigte, infizierte oder transformierte Zellen leichter erkennen und lysieren zu können.

### **4.3 Kostimulation und Virusinfektionen**

Hinweise auf die Beteiligung von NKG2D bei der Bekämpfung von Virusinfektionen ergaben sich aus den schon erwähnten Transfektionsexperimenten (Groh, 2001). Hier konnte gezeigt werden, dass die Infektion von Fibroblasten mit CMV zu einer Induktion der MICA/B-Expression führt, die wiederum eine gesteigerte Zelllyse durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach sich zog. Auch die Identifikation neuer humaner NKG2D-Liganden aus der ULBP-Familie

deuten in diese Richtung (Cosman 2001). ULBPs binden ein HCMV-kodiertes Glykoprotein, UL-16. Bindung von ULBP an NKG2D stimuliert wiederum NK-Zellen. Um diese Aktivierung zu verhindern führt UL-16 über verschiedene Mechanismen zu einer Verhinderung der NKG2D-ULBP-Interaktion. UL-16 scheint direkt die Bindung von ULBP an NKG2D zu verhindern zu können (Cosman, 2001). Weiterhin führt UL-16 zu einer Retention von virusinduzierten NKG2D-Liganden (Welte, 2003). Obwohl HCMV die Expression aller bekannter Liganden in infizierten Fibroblasten induziert, gelangen nur MICA und ULBP3 an die Zelloberfläche, alle anderen werden durch UL-16 im Endoplasmatischen Reticulum zurückgehalten (Welte, 2003, Wu, 2003, Dunn, 2003, Rolle, 2003).

In Mäusen wurden ähnliche Beobachtungen für MCMV beschrieben. Verschiedene Genprodukte verhindern selektiv die Expression bestimmter NKG2D-Liganden. Das von m152 kodierte Glykoprotein gp40 inhibiert die Expression von Rae1 (Krpmotic, 2002, Lodoen, 2003), ein von m155 kodierte Produkt reduziert die Expression für H60 (Lodoen, 2004). Auch für MULT1 konnte vor kurzem das entsprechende interferierende MCMV Protein identifiziert werden (Krpmotic, 2005). Ein von m145 kodierte Glykoprotein verhindert dessen Expression auf infizierten Zellen. Bei der Immunabwehr gegen CMV sind sowohl NK-Zellen als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen beteiligt. Über die Herabregulation der NKG2D-Liganden wird ein zusätzliches stimulierendes Signal unterdrückt und die Aktivierung der Effektorzellen verhindert. Warum allerdings mehrere Liganden an NKG2D binden können, ist nicht abschließend geklärt. Möglicherweise spielen gewebespezifische Expressionsmuster eine Rolle, so dass die verschiedenen Liganden in unterschiedlichen Geweben eine Rolle spielen. Eine weitere Möglichkeit bestünde in einer evolutionären Vervielfältigung von Abwehrmechanismen, auf die das Virus dann entsprechend reagiert und Möglichkeiten, sich dem Immunsystem zu entziehen, entwickelt hat.

## 4.4 NKG2D-Liganden und Tumorummunologie

Viele Tumoren exprimieren NKG2D-Liganden. So findet sich der humane Ligand MICA auf einem Teil verschiedener epithelialer Tumoren wie Lungen-, Ovar-, Prostata-, Nierenzell-, und Kolon-Karzinom (Groh, 1999). Ähnliches gilt auch für murine Liganden (Diefenbach, 2003). Während für MICA direkt humane Tumoren *ex vivo* untersucht wurden, wurden für Rae1 und H60 murine Tumorklinien analysiert. So wird Rae1 auf LL/2 Lungen-Karzinom Zellen, MLg Lungenfibroblasten und in niedrigen Mengen auf CMT Rektumkarzinomzellen sowie YAC Lymphomzellen (Cerwenka, 2000) und J774 Makrophagen exprimiert

(Diefenbach 2000). H60 konnte ebenfalls auf MLg und YAC J774 nachgewiesen werden (Cerwenka, Diefenbach). Außerdem ist für beide Liganden eine Induzierbarkeit auf Hautzellen durch Karzinogene beschrieben (Girardi 2001). Gleichzeitig deuten alle bislang bekannten Auswirkungen der Liganden auf eine Stimulation sowohl von NK-Zellen, als auch von T-Zellen. So führen sowohl *in vitro* NKG2D-Liganden auf Tumorzellen zu einer gesteigerten Lyse durch NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Jamieson 2002), als auch *in vivo* (Diefenbach 2001). Bei den *in vivo* Experimenten wurden B16-BL6 Melanomzellen und RMA-Zellen mit den Liganden transfiziert und diese den Mäusen subkutan implantiert (Diefenbach 2001). Es kam zu einer effizienten Abstoßung des transfizierten Tumors. Zusätzlich konnte dadurch in einigen Studien eine Immunität gegen die erneute Gabe der diesmal nicht transfizierten Tumorzellen erzeugt werden (Diefenbach 2001, Hayakawa 2002, Diefenbach 2003).

Es stellt sich deshalb die Frage, warum Tumorzellen überhaupt diese potenten Immunaktivatoren exprimieren, wenn dies zur Abstoßung führen würde. Vielmehr würde man eine Selektion hin zu einer fehlenden Ligandenexpression vermuten. Bislang wurden zwei Erklärungsansätze gezeigt. Zum einen könnte der Grad der Ligandenexpression nicht für eine Tumorabstoßung ausreichen. Hinweise hierfür wurden ebenfalls in Transfektionsexperimenten mit niedrig-exprimierenden Tumorzellen erbracht (Diefenbach 2001). Ein zweiter Mechanismus stellt die Beeinflussung der Effektorzellen durch lösliche Liganden dar. So kann MICA von einigen humanen Tumoren freigesetzt werden und in löslicher Form im Serum nachgewiesen werden, u.a. von Patienten mit gastrointestinalen Tumoren (Salih 2002), Brust- und Lungen-Karzinomen (Groh 2002), sowie Melanomen (Salih 2003). Dies führt zu einer Herabregulation der NKG2D-Expression von T-Zellen und somit zu einer verminderten Tumorlyse.

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit zeigen nun, dass bestimmte NKG2D-Liganden auch direkt zu einer Induktion von immunsuppressiven Mechanismen führen können. Dies könnte ein zusätzlicher möglicher Weg sein, dem Immunsystem zu entkommen und einen Selektionsvorteil für diese Tumoren bedeuten.

Die oben beschriebenen Transfektionsexperimente haben zudem den Nachteil, dass zum einen die Transfektion selbst zur Induktion anderer z.B. Stressinduzierter Moleküle führen könnte, die für die beschriebenen Beobachtungen verantwortlich sein könnten. Zum anderen lässt sich der Grad der Ligandenexpression nur schlecht steuern, was möglicherweise zu sehr hohen, nichtphysiologischen Expressionsgraden führen könnte.

Jedoch bietet auch das hier gezeigte Modell nur einen Erklärungsansatz, da durch die Inhibition über H60 eine Verschiebung des Ligandenpatterns zu diesem Liganden stattfinden müsste. Erste Anhalte für eine bevorzugte Expression von Rae1 und MULT1 im Vergleich zu H60 scheinen jedoch gegeben zu sein (Diefenbach, 2003). Zur genaueren Klärung sind allerdings detailliertere Analysen des tatsächlichen Expressionsmusters der NKG2D-Liganden mit mAb erforderlich.

Eine wichtige Bedeutung für den klinischen Aspekt dieses Befundes stellt die Charakterisierung weiterer NKG2D-Liganden und deren Einteilung in supprimierende und nicht-supprimierende Rezeptoren dar. Ein Zusammenhang mit bestimmten malignen Erkrankungen und deren Entstehen oder Fortschreiten könnte neue therapeutische Ansätze aufzeigen, zumal die Liganden in gesundem adulten Gewebe meist nicht anzutreffen sind.

## 4.5 H60 wirkt NKG2D-unabhängig

In dieser Arbeit zeigte sich ein inhibitorischer Effekt von H60 und MICA8 auf die Proliferation von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Dies unterscheidet sich von der bislang einzigen Untersuchung des Einflusses von NKG2D auf die Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, bei der eine gesteigerte Proliferation  $\alpha$ CD3-stimulierter Zellen nachgewiesen wurde (Jamieson, 2002). Allerdings wurde dies über einen quervernetzenden mAb gegen NKG2D erreicht, wodurch keine differenzierte Betrachtung der verschiedenen Liganden möglich war.

Es gibt jedoch mehrere Hinweise, dass der inhibitorische Effekt dieser beiden NKG2D-Liganden nicht über NKG2D, sondern einen bislang unbekanntem Rezeptor vermittelt wird.

So wurde die Proliferation von aufgereinigten CD4<sup>+</sup> T-Zellen inhibiert, obwohl bislang auf diesem Zelltyp in der Maus keine NKG2D-Expression nachgewiesen werden konnte (Bauer, 1999, Jamieson 2002). Auch unter Aktivierung kommt es dort nicht zu einer Hochregulierung der NKG2D-Expression wie auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Dies konnte sowohl über eine direkte Färbung mit mAb gegen NKG2D, als auch über die Bindung mit NKG2D-Liganden gezeigt werden und wurde auf mRNA-Ebene bestätigt, da keine Transkription von NKG2D nachgewiesen werden konnte (Kriegeskorte, 2005). Die Abwesenheit von NKG2D zeigt sich auch auf humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Lediglich in Patienten mit Rheumatoider Arthritis weist eine substantielle Population der humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen NKG2D-Expression auf (Groh 2003). Der größte Teil gehört zu CD28<sup>-</sup>, möglicherweise autoreaktiven T-Zellen, was eine Beteiligung an Gewebeerstörungen nahe legt, zumal im Synovialgewebe hohe MIC-Expression nachgewiesen werden konnte.

Die in dieser Arbeit erstmals beschriebene Inhibition war spezifisch für die NKG2D-Liganden H60 und MICA8 und ließ sich nicht mit anderen mNKG2D-Liganden hervorrufen. Auch der ebenfalls hochaffine Ligand MULT1, der ähnliche Bindungseigenschaften zu NKG2D aufweist wie H60, beeinflusste die T-Zell-Proliferation nicht.

Trotz Zugabe blockierender  $\alpha$ NKG2D-mAb (Kriegeskorte, 2005) bestand nach wie vor die durch H60 vermittelte Proliferationsinhibition.

Weiterhin lassen sich  $CD8^+$  T-Zellen aus DAP10<sup>-/-</sup> Mäusen durch H60 inhibieren. Ein Fehlen des Adaptermoleküls DAP10 führt in diesen T-Zellen zu einem Unvermögen, NKG2D an der Zelloberfläche zu exprimieren (Gilfillan, 2002). Die Abwesenheit des Rezeptors hat weiterhin den Wegfall der NKG2D-vermittelten kostimulatorischen Effekte zur Folge (Gilfillan, 2002). Trotzdem bestand nach wie vor die Inhibition durch den NKG2D-Liganden H60.

Zuletzt löst humanes MICA8, das nicht nachweisbar an murines NKG2D binden kann, die Inhibition auf murine T-Zellen in gleicher Weise aus wie der murine Ligand H60. Umgekehrt ist H60 in der Lage, humane T-Zellen zu inhibieren. All diese Befunde weisen darauf hin, dass die Inhibition durch H60 und MICA8 durch einen anderen Rezeptor als NKG2D vermittelt wird.

Trotz dieser Hinweise ist der zusätzliche potentielle Rezeptor von H60 und MICA8 noch unbekannt. In einer kürzlich veröffentlichten Studie über die Funktion von NKG2D auf humanen NK Zellen wird jedoch ebenfalls die Möglichkeit eines weiteren Rezeptors für die NKG2D-Liganden MICA und ULBP1 erwähnt (André, 2004). Zumindest deutet die beschriebene Kreuzreaktivität zwischen Maus und Mensch darauf hin, dass die Struktur des Rezeptors zwischen den Spezies relativ stark konserviert sein müsste.

## 4.6 Indirekte Vermittlung der Inhibition

Neben der Beteiligung eines von NKG2D verschiedenen Rezeptors scheint die Inhibition indirekt über eine weitere Zellpopulation vermittelt zu sein.

Der Versuch, diese Zellgruppe einer klassischen regulatorischen Subpopulation zuzuordnen, gelang nicht. Diese eingangs erwähnten Zelltypen, natürlich vorkommende  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen, IL-10-produzierende T-Zellen,  $\gamma\delta$  T-Zellen und NKT-Zellen sind spezialisierte Zellen, die Immunantworten regulieren und dabei auch die Proliferation von Effektor-T-Zellen inhibieren können (O'Garra, 2004). Eine Stimulation dieser Populationen durch H60 über einen unbekanntem Rezeptor und einer damit verbundenen induzierten Inhibition der

Proliferation der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen hätte den von uns erstmals beschriebenen Effekt von H60 erklären können.

Verschiedene Knockoutmäuse, die diese regulatorischen Populationen nicht mehr besitzen, wurden in Proliferations-Assays analysiert. Allerdings wurden T-Zellen sowohl von CD1<sup>-/-</sup>, die ein Defizit für NKT-Zellen aufweisen, als auch TCR $\gamma\delta$ <sup>-/-</sup> und MHCII<sup>-/-</sup> durch die Zugabe von H60 inhibiert.

In einem von K. Huster durchgeführten Experiment mit CD4<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen, die *in vitro* durch ektope Foxp3 Expression generiert wurden (Hori, 2003) zeigte auch diese regulatorische Population keine Bindung für H60. Auch konnte die inhibitorische Eigenschaft dieses Zelltyps durch H60 nicht gesteigert werden.

Erste Färbungen mit MICA8-Multimeren auf murinen Milzzellen identifizierten eine DX5 niedrig exprimierende Population. Unter *in vitro* Stimulation kommt es zu einer Induktion der MICA bindenden CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Zudem scheinen diese Zellen mehrfache Zellteilungen durchlaufen zu haben, was Hinweise auf eine Generierung dieser Population während der TCR-vermittelten T-Zellexpansion gibt.

Als möglicher Mechanismus, über den die Inhibition vermittelt wird, wurde die Rolle von IL-10 genauer untersucht (Kriegeskorte, 2005). T-Zellen von IL-10<sup>-/-</sup> Mäusen mit fehlender Produktion von IL-10 werden von H60 nur noch sehr geringfügig inhibiert. Allerdings konnte die Zugabe von  $\alpha$ IL-10 mAb den H60-Effekt nicht aufheben. Möglicherweise spielt IL-10 also eher eine Rolle bei der Generierung der vermittelnden Zellpopulation, als dass es direkt an der Inhibition beteiligt wäre.

Ob für die Inhibition der T-Zellen primär direkter Zell-Zell-Kontakt mit der regulatorischen Zellpopulation erforderlich ist oder ob lösliche Faktoren wie Zytokine eine Rolle spielen, konnte bislang nicht geklärt werden. Um dies näher zu untersuchen, bieten sich so genannte Transwell-Experimente an. Hierbei werden Ziel- und Effektorzellen durch eine poröse Membran getrennt, so dass nur kleine Moleküle hindurch diffundieren können. Die Durchmesser der Poren sind jedoch mit 0,4  $\mu$ m zu groß, um die Liganden-Multimere zurückzuhalten. Versuche, die Liganden an größere, biotin-ummantelte Partikel zu binden, die die Membran nicht passieren können, scheiterten allerdings. Der Transfer von Überständen aus Proliferations-Assays, aus denen mögliche noch vorhandene Monomere über MACSbeads entfernt wurden, führte bei Zugabe zu Empfänger-Assays nicht zu einer Inhibition, was einen direkten Zellkontakt als primären Mechanismus nahe legt.

Ein besseres Verständnis des genauen Mechanismus, über den die Inhibition vermittelt wird, verlangt aber noch weitere Untersuchungen.

## 4.7 Einfluss von NKG2D und H60 auf die Homöostase von T-Zellen

Im Gegensatz zu NK-Zellen exprimieren naive  $CD8^+$  T-Zellen kein NKG2D. In dieser Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass es unter Infektionsbedingungen mit *L. monocytogenes* auf aktivierten antigen-spezifischen  $CD8^+$  T-Zellen zu einer gesteigerten NKG2D Expression kommt. Diese bleibt auch auf  $CD8^+$  Gedächtnis T-Zellen bestehen. Dabei binden sowohl Rael $\gamma$  als auch H60 mit annähernd gleicher Intensität. Dies steht im Einklang mit frühen Studien mit mAb gegen NKG2D (Jamieson, 2002). Dort wurde NKG2D auf  $CD8^+$  T-Zellen bei Infektion mit LCMV induziert und war ebenfalls auf Gedächtniszellen nachweisbar. Je nach Phase der  $CD8^+$  T-Zellantwort, Proliferation, Kontraktion und Gedächtnis, ist eine unterschiedliche Bedeutung der NKG2D-Liganden-Interaktion denkbar.

NKG2D führt auf  $CD8^+$  T-Zellen zu einem kostimulatorischen Signal mit gesteigerter Zytotoxizität. Wenn T-Zellen erst im Verlauf einer Immunantwort NKG2D exprimieren, könnte dies ein Beitrag zu einer effektiveren Antigenerkennung liefern. Gleichzeitig könnte so eine unspezifische Stimulation mit möglicherweise autoreaktiven Zügen durch die Abwesenheit auf naiven T-Zellen verhindert werden.

Eine wesentliche Beteiligung von NKG2D an der Expansion antigen-spezifischer T-Zellen scheint dagegen eher unwahrscheinlich zu sein. Die Reaktion naiver T-Zellen auf Antigene ist abhängig von der Affinität des jeweiligen TCRs zum MHC-Peptid-Komplex (Rosette, 2001). Für die klonale Expansion von naiven und Gedächtnis-T-Zellen ist dabei ein kurzzeitiges Vorhandensein von Antigen ausreichend (van Stidponk, 2001; Kaech, 2001). Trotzdem scheinen andere Faktoren als Antigenprävalenz die Dauer der T-Zell-Expansion zu bestimmen (Busch, 1998). Für NKG2D ist zwar eine Zunahme der Proliferation bei Quervernetzung mit einem mAb gegen NKG2D beschrieben (Jamieson, 2002) und eine geringe stimulatorische Komponente konnte zumindest für Rael $\gamma$  auch von uns in [ $^3$ H]-Thymidin-Proliferationsassays beobachtet werden. Allerdings waren diese Effekte ausgesprochen gering und in CFSE-basierenden Proliferationsassays nicht bestätigbar.

Nach erfolgter Überwindung einer Infektion gehen die antigen-spezifischen T-Zellen in eine rapide Kontraktionsphase über, bei der ihre Zellzahl um bis zu 95% reduziert wird. Wie dieser Mechanismus genau abläuft ist noch nicht im Einzelnen geklärt. Es gibt Hinweise, dass die Abwesenheit von Pathogenen dazu beiträgt (Ahmed, 1996) oder dass die frühe Infektionsphase bei der Kontrolle der Kontraktion beteiligt ist (Badovinac, 2004). Über eine

regulatorische Population könnte H60 an der Induktion der Kontraktionsphase bzw. an der Eindämmung überschießender Reaktionen beteiligt sein. Vor allem für  $CD4^+CD25^+$  regulatorische T-Zellen ist eine derartige Funktion für eine Reihe unterschiedlicher Infektionen nachgewiesen worden. So führen sie in *L. m.* infizierten Mäusen zu einer Begrenzung der Stärke von Sekundärinfektionen (Kursar, 2002). In leishmanien-infizierten Mäusen führen regulatorische T-Zellen zu einer persistierenden chronischen Infektion, schützen jedoch gleichzeitig den Wirt vor erneuter starker Entzündungsreaktion (Belkaid, 2002; Xu, 2003; Aseffa, 2002). Regulatorische T-Zellen übernehmen somit eine wichtige Funktion durch Wahrung der feinen Balance zwischen einer effektiven Pathogenkontrolle und einer überschießenden Immunantwort mit schweren Gewebeschäden. Eine ähnliche Rolle wäre auch für H60 denkbar. So könnten Gewebe wie Darmepithelien, die eine chronische Konfrontation mit Pathogenen oder „zellstressenden“ Substanzen erfahren, inhibitorische Liganden exprimieren, um eine permanente und sinnlose Immunantwort zu unterdrücken. Interessanterweise findet sich auf  $\gamma\delta$  T-Zellen in Darmepithelien kein NKG2D während ansonsten ca. 25% diesen Rezeptor konstitutiv exprimieren (Jamieson, 2002). Möglicherweise soll so die Bindung an stressinduzierte NKG2D-Liganden verhindert werden, was die Doppelrolle von H60 als Stimulator der Zytotoxizität und als Inhibitor der Proliferation plausibler machen könnte.

Die Langzeiterhaltung von Gedächtnis-T-Zellen ist unabhängig von Antigenpräsenz oder MHC-Klasse-I Molekülen (Murali-Krishna, 1999). Wichtig ist das Vorhandensein von IL-15 (Ma, 2000) und IL-7 (Prlic, 2002; Huster, 2004). Zudem scheinen  $CD4^+$  T-Zellen zur Erhaltung von Gedächtnis- $CD8^+$  T-Zellen benötigt zu werden (Sun, 2004). Die Tatsache, dass Gedächtnis-T-Zellen NKG2D exprimieren, könnte entweder ebenfalls auf einen Erhaltungsmechanismus für diese Zellen hindeuten oder die schnellere Ausbildung von Effektorfunktionen bei Reaktivierung begünstigen.

Für ein genaueres Bild der Rolle von H60 sind jedoch weitere Untersuchungen nötig, nicht zuletzt die Identifizierung der vermittelnden Subpopulation wie des Rezeptors.

## 4.8 Ausblick

Das exakte Expressionsmuster der NKG2D-Liganden, insbesondere des Liganden H60, ist *in vivo* noch weitgehend unbekannt. Neben einigen Hinweisen auf eine konstitutive Expression beziehen sich die bisherigen Untersuchungen meist auf *In vitro*-Versuche mit Zelllinien. Die

in dieser Arbeit verwendete Multimertechnik kann zwar über die Bindung mit NKG2D-Multimer das Vorhandensein von NKG2D-Liganden nachweisen, lässt jedoch keine differenzierte Bestimmung des Ligandentyps zu. Für die darüber hinaus gehende Bestimmung, wann und wo welcher Ligand exprimiert wird, müssten als nächstes Färbungen unterschiedlicher Gewebe mit mAbs gegen die einzelnen Liganden durchgeführt werden. In Frage kommen insbesondere Darmepithel, wo es Hinweise auf MICA-Expression gibt (Groh, 1996), sowie andere potentiell mit NKG2D-exprimierenden Zellen interagierende Zelltypen. Auch eine mögliche Induktion von Liganden-Expression durch verschiedene Pathogene wie CMV oder *L. monocytogenes*, bei denen ebenfalls NKG2D an der Immunantwort beteiligt ist, bedarf weiterer Untersuchungen. Auch hier ist vor allem die *in vivo*-Situation weitestgehend unbekannt.

Daran anschließend lassen sich die molekularen Mechanismen, die zu einer Induktion der Liganden führen näher charakterisieren. Während bei der Induktion auf Tumoren erste Hinweise vorliegen, dass eine direkte Beschädigung der DNA daran beteiligt ist (Gasser, 2005), ist dies unter Infektionsbedingungen noch völlig unklar.

Ein weiterer offener Punkt stellt die Zahl der NKG2D-Liganden dar. Auch wenn in dieser Arbeit erstmalig für einen bestimmten Liganden eine eigenständige Funktion gezeigt werden konnte, bleibt die Frage, ob die meisten Liganden ein redundantes System darstellen oder selektiv bei unterschiedlichen Prozessen beteiligt sind.

Während die Funktion von NKG2D auf NK-Zellen im Sinne eines stimulierenden Rezeptors gedeutet werden kann, gibt es für CD8<sup>+</sup> T-Zellen widersprüchliche Studien. Neben mehreren Studien, die von einer kostimulierenden Rolle ausgehen, relativiert unter anderem die hier vorgelegte Arbeit diese Ansicht. Weitere Klarheit würden Experimente mit NKG2D-defizienten Mäusen bringen. Insbesondere das spezifische Ausschalten des Gens auf bestimmten Zelltypen bietet sich hier an. Um die Funktion des Rezeptors zu bestimmten Phasen einer Immunantwort untersuchen zu können, wäre eine zusätzliche Kombination mit einem induzierbaren System wünschenswert. Vor allem zur Bestimmung der Rolle von NKG2D auf CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen ist die Möglichkeit, den Zeitpunkt der Genausschaltung wählen zu können, unabdingbar.

In der hier vorgelegten Arbeit scheinen die NKG2D-Liganden H60 und MICA8 eine Inhibition der T-Zell-Proliferation nicht über NKG2D, sondern einen unbekanntem Rezeptor auszulösen. Die Suche nach diesem Rezeptor liegt auf der Hand. Zum einen können hierfür mAb gegen das unbekanntem Molekül generiert werden. Mit diesen kann dann untersucht werden, auf welchen Zelltypen der Rezeptor physiologisch exprimiert wird bzw. unter

welchen Bedingungen, z.B. während einer Immunantwort, der Rezeptor eine Änderung der Expression erfährt. Zum anderen kann über eine Expressionsklonierung versucht werden, den Rezeptor direkt zu identifizieren.

Die hier vorgelegten Ansätze, den Mechanismus der Inhibition zu erklären, beschränken sich auf eine mögliche Beteiligung von IL-10 bei der Generierung einer vermittelnden regulatorischen Zellpopulation. Weitere Untersuchungen der genauen Signaltransduktion und der daran beteiligten molekularen Prozesse stehen noch aus. Voraussetzung dafür ist auch die nähere Charakterisierung der Inhibition an sich, so z.B. die Analyse des Stadiums, in welchem der Zellzyklus möglicherweise arretiert wird.

Insbesondere die Beteiligung von NKG2D im Zusammenhang mit Gedächtniszellen, sowie bei der Immunantwort gegen maligne Prozesse sowie virale Infektionen, lässt abschließend eine klinische Anwendung der Erkenntnisse über NKG2D möglich erscheinen. Denkbar wäre die Entwicklung effizienterer Impfstoffe unter Einbeziehung NKG2D-vermittelter Effekte. Auch die Weiterentwicklung von Tumorstimmungen wie sie bereits in Mäusen versucht wurde (Diefenbach, 2001) stellt eine mögliche Strategie dar. Eine Interferenz mit der von manchen Viren verursachten Unterdrückung von NKG2D-Liganden-Expression könnte einen Ansatz zur antiviralen Therapie liefern.

## 5 Zusammenfassung

Der aktivierende Rezeptor NKG2D erkennt eine Reihe unterschiedlicher Liganden, die zumeist von gestressten Geweben und Tumoren überexprimiert werden. Bislang sind für alle Liganden gleichermaßen immunstimulatorische Effekte beschrieben worden. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der NKG2D-Liganden-Interaktion auf antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Hierfür wurden die NKG2D-Liganden Rae1, H60 und MICA8 rekombinant exprimiert und ähnlich der MHC-Klasse-I Tetramere multimerisiert, um zum einen die durchflußzytometrische Analyse der Liganden-Bindung zu ermöglichen und zum anderen den funktionellen Aspekt dieser Liganden-Interaktion getrennt für die einzelnen Liganden bei einer möglichst genauen Annäherung an die physiologische Relevanz beobachten zu können. Die erfolgreiche Herstellung der Multimere konnte über die spezie-spezifische Färbung verschiedener antigen-spezifischer T-Zellen sowie das Nachvollziehen der Affinitätsunterschiede von Rae1 und H60 nachgewiesen werden.

Die Analyse verschiedener Lymphozytenpopulationen naiver Mäuse zeigte eine konstitutive Expression von NKG2D nur auf NK-Zellen. Weder CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimieren in nicht-aktiviertem Zustand NKG2D. Unter Infektion mit *Listeria monocytogenes* kam es jedoch auf antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu einer Induktion der NKG2D-Expression. Diese verstärkte sich bei Sekundärinfektion und blieb auch auf Gedächtniszellen bestehen. Im Gegensatz dazu war die NKG2D-Expression auf NK-Zellen weiterhin unverändert hoch und auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen durchgehend negativ.

Beide Liganden führten auf peptid-stimulierten antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu einer geringfügig gesteigerten Zelllyse bei suboptimalen Peptidkonzentrationen. Dabei spielte eine mögliche Beeinflussung der Experimente durch die schon vorhandene NKG2D-Liganden-Expression der Tumorzielzellen anscheinend keine Rolle.

Erstmals konnte für verschiedene Liganden ein spezifischer Effekt nachgewiesen werden. In unterschiedlichen Untersuchungsansätzen, <sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme-Assays und CFSE-Assays,

fürte H60 aber nicht Rae1 zu einer Inhibition von CD8<sup>+</sup> und interessanterweise trotz fehlender NKG2D-Expression auch von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Da auch aufgereinigte CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen von H60 inhibiert werden, deutete dies auf einen indirekten Mechanismus und die Vermittlung über eine weitere Zellpopulation hin.

Da sich durch Transfer von Überständen aus H60-versetzten Kulturen der Effekt nicht auf andere Kulturen übertragen ließ, schienen Zell-Zell-Kontakt-abhängige Mechanismen eine Rolle zu spielen. Weiterhin sind inhibitorische Zytokine beteiligt. So konnte die Zugabe von  $\alpha$ TGF- $\beta$  mAb die Inhibition leicht abschwächen. In IL-10 defizienten Mäusen war die H60-induzierte Inhibition ebenfalls reduziert. Der Versuch, bekannte regulatorische Zellpopulationen wie klassische CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen,  $\gamma\delta$  T-Zellen oder NKT-Zellen mit dem inhibitorischen Effekt in Verbindung zu bringen, gelang jedoch nicht. Über die Verwendung des humanen Liganden MICA, der zwar nicht an murines NKG2D bindet, bei murinen T-Zellen jedoch ähnlich wie H60 die Proliferation unterdrückt, ließ sich eine Subpopulation CD8 bzw. CD4<sup>+</sup> T-Zellen identifizieren, über die möglicherweise der suppressive Effekt vermittelt wird.

Die Inhibition von T-Zellen aus DAP10<sup>-/-</sup> defizienten Mäusen, die kein NKG2D exprimieren, ließ zudem die Beteiligung eines neuen, von NKG2D verschiedenen Rezeptors vermuten. Diese neuen Ergebnisse bezüglich heterogener Effektorfunktionen unterschiedlicher NKG2D-Liganden, die ggf. auch stark immunsuppressive Wirkungen ausüben können, spielen möglicherweise eine wichtige Rolle bei der physiologischen homöostatischen Regulation von T Zell Antworten.

Weiterhin bieten die hier beschriebenen Befunde neue Erklärungsmöglichkeiten, warum die Überexpression bestimmter NKG2D-Liganden einen selektiven *in vivo* Vorteil für Tumorzellen bedeutet. Wenn sich diese Zusammenhänge bestätigen, könnte das NKG2D-Liganden/Rezeptor System eine attraktive neue Zielstruktur für die Immuntherapie maligner Erkrankungen bedeuten.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Ahmed, R., and D. Gray. 1996. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272:54-60.
2. Andre, P., R. Castriconi, M. Espeli, N. Anfossi, T. Juarez, S. Hue, H. Conway, F. Romagne, A. Dondero, M. Nanni, S. Caillat-Zucman, D.H. Raulet, C. Bottino, E. Vivier, A. Moretta, and P. Paul. 2004. Comparative analysis of human NK cell activation induced by NKG2D and natural cytotoxicity receptors. *Eur J Immunol* 34:961-971.
3. Annacker, O., R. Pimenta-Araujo, O. Burlen-Defranoux, T.C. Barbosa, A. Cumano, and A. Bandeira. 2001. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol* 166:3008-3018.
4. Arase, H., E.S. Mocarski, A.E. Campbell, A.B. Hill, and L.L. Lanier. 2002. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 296:1323-1326.
5. Aseffa, A., A. Gumy, P. Launois, H.R. MacDonald, J.A. Louis, and F. Tacchini-Cottier. 2002. The early IL-4 response to *Leishmania major* and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 169:3232-3241.
6. Badovinac, V.P., B.B. Porter, and J.T. Harty. 2002. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol* 3:619-626.
7. Badovinac, V.P., B.B. Porter, and J.T. Harty. 2004. CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nat Immunol* 5:809-817.
8. Bahram, S. 2000. MIC genes: from genetics to biology. *Adv Immunol* 76:1-60.
9. Bahram, S., M. Bresnahan, D.E. Geraghty, and T. Spies. 1994. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6259-6263.
10. Bahram, S., H. Inoko, T. Shiina, and M. Radosavljevic. 2005. MIC and other NKG2D ligands: from none to too many. *Curr Opin Immunol* 17:505-509.

11. Bakker, A.B., J.H. Phillips, C.G. Figdor, and L.L. Lanier. 1998. Killer cell inhibitory receptors for MHC class I molecules regulate lysis of melanoma cells mediated by NK cells, gamma delta T cells, and antigen-specific CTL. *J Immunol* 160:5239-5245.
12. Barrat, F.J., D.J. Cua, A. Boonstra, D.F. Richards, C. Crain, H.F. Savelkoul, R. de Waal-Malefyt, R.L. Coffman, C.M. Hawrylowicz, and A. O'Garra. 2002. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 195:603-616.
13. Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J.H. Phillips, L.L. Lanier, and T. Spies. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285:727-729.
14. Behrens, G., M. Li, C.M. Smith, G.T. Belz, J. Mintern, F.R. Carbone, and W.R. Heath. 2004. Helper T cells, dendritic cells and CTL Immunity. *Immunol Cell Biol* 82:84-90.
15. Belkaid, Y., C.A. Piccirillo, S. Mendez, E.M. Shevach, and D.L. Sacks. 2002. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420:502-507.
16. Bendelac, A., M. Bonneville, and J.F. Kearney. 2001. Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 1:177-186.
17. Bouchon, A., J. Dietrich, and M. Colonna. 2000. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol* 164:4991-4995.
18. Braud, V.M., D.S. Allan, and A.J. McMichael. 1999. Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules. *Curr Opin Immunol* 11:100-108.
19. Brossay, L., and M. Kronenberg. 1999. Highly conserved antigen-presenting function of CD1d molecules. *Immunogenetics* 50:146-151.
20. Busch, D.H., and E.G. Pamer. 1998. MHC class I/peptide stability: implications for immunodominance, in vitro proliferation, and diversity of responding CTL. *J Immunol* 160:4441-4448.
21. Busch, D.H., I.M. Pilip, S. Vijn, and E.G. Pamer. 1998. Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity* 8:353-362.
22. Caramalho, I., T. Lopes-Carvalho, D. Ostler, S. Zelenay, M. Haury, and J. Demengeot. 2003. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 197:403-411.
23. Carayannopoulos, L.N., O.V. Naidenko, D.H. Fremont, and W.M. Yokoyama. 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.

24. Carayannopoulos, L.N., O.V. Naidenko, J. Kinder, E.L. Ho, D.H. Fremont, and W.M. Yokoyama. 2002. Ligands for murine NKG2D display heterogeneous binding behavior. *Eur J Immunol* 32:597-605.
25. Cerwenka, A., A.B. Bakker, T. McClanahan, J. Wagner, J. Wu, J.H. Phillips, and L.L. Lanier. 2000. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* 12:721-727.
26. Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K.J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S.M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198:1875-1886.
27. Chen, Y., K. Chou, E. Fuchs, W.L. Havran, and R. Boismenu. 2002. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14338-14343.
28. Chien, Y.H., R. Jores, and M.P. Crowley. 1996. Recognition by gamma/delta T cells. *Annu Rev Immunol* 14:511-532.
29. Constant, S.L., and K. Bottomly. 1997. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 15:297-322.
30. Coombes, J.L., N.J. Robinson, K.J. Maloy, H.H. Uhlig, and F. Powrie. 2005. Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunol Rev* 204:184-194.
31. Cosman, D., J. Mullberg, C.L. Sutherland, W. Chin, R. Armitage, W. Fanslow, M. Kubin, and N.J. Chalupny. 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.
32. Croft, M. 2003. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* 3:609-620.
33. Das, H., V. Groh, C. Kuijl, M. Sugita, C.T. Morita, T. Spies, and J.F. Bukowski. 2001. MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity* 15:83-93.
34. Davis, M.M., J.J. Boniface, Z. Reich, D. Lyons, J. Hampl, B. Arden, and Y. Chien. 1998. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16:523-544.
35. Davis, S.J., S. Ikemizu, E.J. Evans, L. Fugger, T.R. Bakker, and P.A. van der Merwe. 2003. The nature of molecular recognition by T cells. *Nat Immunol* 4:217-224.
36. Davis, S.J., S. Ikemizu, M.K. Wild, and P.A. van der Merwe. 1998. CD2 and the nature of protein interactions mediating cell-cell recognition. *Immunol Rev* 163:217-236.

37. Diefenbach, A., J.K. Hsia, M.Y. Hsiung, and D.H. Raulet. 2003. A novel ligand for the NKG2D receptor activates NK cells and macrophages and induces tumor immunity. *Eur J Immunol* 33:381-391.
38. Diefenbach, A., E.R. Jensen, A.M. Jamieson, and D.H. Raulet. 2001. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 413:165-171.
39. Diefenbach, A., and D.H. Raulet. 2001. Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunol Rev* 181:170-184.
40. Diefenbach, A., E. Tomasello, M. Lucas, A.M. Jamieson, J.K. Hsia, E. Vivier, and D.H. Raulet. 2002. Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol* 3:1142-1149.
41. Dunn, C., N.J. Chalupny, C.L. Sutherland, S. Dosch, P.V. Sivakumar, D.C. Johnson, and D. Cosman. 2003. Human cytomegalovirus glycoprotein UL16 causes intracellular sequestration of NKG2D ligands, protecting against natural killer cell cytotoxicity. *J Exp Med* 197:1427-1439.
42. Ehrlich, L.I., K. Ogasawara, J.A. Hamerman, R. Takaki, A. Zingoni, J.P. Allison, and L.L. Lanier. 2005. Engagement of NKG2D by cognate ligand or antibody alone is insufficient to mediate costimulation of human and mouse CD8+ T cells. *J Immunol* 174:1922-1931.
43. Gasser, S., S. Orsulic, E.J. Brown, and D.H. Raulet. 2005. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 436:1186-1190.
44. Gilfillan, S., E.L. Ho, M. Cella, W.M. Yokoyama, and M. Colonna. 2002. NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol* 3:1150-1155.
45. Girardi, M., J. Lewis, E. Glusac, R.B. Filler, L. Geng, A.C. Hayday, and R.E. Tigelaar. 2002. Resident skin-specific gammadelta T cells provide local, nonredundant regulation of cutaneous inflammation. *J Exp Med* 195:855-867.
46. Girardi, M., D.E. Oppenheim, C.R. Steele, J.M. Lewis, E. Glusac, R. Filler, P. Hobby, B. Sutton, R.E. Tigelaar, and A.C. Hayday. 2001. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 294:605-609.
47. Godfrey, D.I., and M. Kronenberg. 2004. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest* 114:1379-1388.
48. Griffiths, G.M. 1995. The cell biology of CTL killing. *Curr Opin Immunol* 7:343-348.
49. Groh, V., S. Bahram, S. Bauer, A. Herman, M. Beauchamp, and T. Spies. 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.

50. Groh, V., A. Bruhl, H. El-Gabalawy, J.L. Nelson, and T. Spies. 2003. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9452-9457.
51. Groh, V., R. Rhinehart, J. Randolph-Habecker, M.S. Topp, S.R. Riddell, and T. Spies. 2001. Costimulation of CD8 $\alpha$  T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2:255-260.
52. Groh, V., R. Rhinehart, H. Secrist, S. Bauer, K.H. Grabstein, and T. Spies. 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.
53. Groh, V., J. Wu, C. Yee, and T. Spies. 2002. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419:734-738.
54. Guan, H., G. Zu, M. Slater, C. Elmets, and H. Xu. 2002. Gammadelta T cells regulate the development of hapten-specific CD8 $^{+}$  effector T cells in contact hypersensitivity responses. *J Invest Dermatol* 119:137-142.
55. Hayakawa, Y., J.M. Kelly, J.A. Westwood, P.K. Darcy, A. Diefenbach, D. Raulet, and M.J. Smyth. 2002. Cutting edge: tumor rejection mediated by NKG2D receptor-ligand interaction is dependent upon perforin. *J Immunol* 169:5377-5381.
56. Hoelsbrekken, S.E., O. Nylenna, P.C. Saether, I.O. Slettedal, J.C. Ryan, S. Fossum, and E. Dissen. 2003. Cutting edge: molecular cloning of a killer cell Ig-like receptor in the mouse and rat. *J Immunol* 170:2259-2263.
57. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
58. Huster, K.M., V. Busch, M. Schiemann, K. Linkemann, K.M. Kerksiek, H. Wagner, and D.H. Busch. 2004. Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8 $^{+}$  memory T cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5610-5615.
59. Hutloff, A., A.M. Dittrich, K.C. Beier, B. Eljaschewitsch, R. Kraft, I. Anagnostopoulos, and R.A. Kroccek. 1999. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397:263-266.
60. Jameson, J., K. Ugarte, N. Chen, P. Yachi, E. Fuchs, R. Boismenu, and W.L. Havran. 2002. A role for skin gammadelta T cells in wound repair. *Science* 296:747-749.
61. Jameson, J., D. Witherden, and W.L. Havran. 2003. T-cell effector mechanisms: gammadelta and CD1d-restricted subsets. *Curr Opin Immunol* 15:349-353.
62. Jamieson, A.M., A. Diefenbach, C.W. McMahon, N. Xiong, J.R. Carlyle, and D.H. Raulet. 2002. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* 17:19-29.
63. Kabelitz, D., and D. Wesch. 2003. Features and functions of gamma delta T lymphocytes: focus on chemokines and their receptors. *Crit Rev Immunol* 23:339-370.

64. Kaech, S.M., and R. Ahmed. 2001. Memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* 2:415-422.
65. Karre, K., H.G. Ljunggren, G. Piontek, and R. Kiessling. 1986. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319:675-678.
66. Kingsley, C.I., M. Karim, A.R. Bushell, and K.J. Wood. 2002. CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4<sup>-</sup> and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 168:1080-1086.
67. Krmpotic, A., M. Hasan, A. Loewendorf, T. Saulig, A. Halenius, T. Lenac, B. Polic, I. Bubic, A. Kriegeskorte, E. Pernjak-Pugel, M. Messerle, H. Hengel, D.H. Busch, U.H. Koszinowski, and S. Jonjic. 2005. NK cell activation through the NKG2D ligand MULT-1 is selectively prevented by the glycoprotein encoded by mouse cytomegalovirus gene m145. *J Exp Med* 201:211-220.
68. Kursar, M., K. Bonhagen, J. Fensterle, A. Kohler, R. Hurwitz, T. Kamradt, S.H. Kaufmann, and H.W. Mittrucker. 2002. Regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells restrict memory CD8<sup>+</sup> T cell responses. *J Exp Med* 196:1585-1592.
69. Lanier, L.L. 2005. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23:225-274.
70. Lanzavecchia, A., and F. Sallusto. 2005. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol* 17:326-332.
71. Li, P., D.L. Morris, B.E. Willcox, A. Steinle, T. Spies, and R.K. Strong. 2001. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat Immunol* 2:443-451.
72. Ljunggren, H.G., and K. Karre. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11:237-244.
73. Lodoen, M., K. Ogasawara, J.A. Hamerman, H. Arase, J.P. Houchins, E.S. Mocarski, and L.L. Lanier. 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.
74. Lodoen, M.B., G. Abenes, S. Umamoto, J.P. Houchins, F. Liu, and L.L. Lanier. 2004. The cytomegalovirus m155 gene product subverts natural killer cell antiviral protection by disruption of H60-NKG2D interactions. *J Exp Med* 200:1075-1081.
75. Long, E.O., and N. Wagtmann. 1997. Natural killer cell receptors. *Curr Opin Immunol* 9:344-350.
76. Ma, A., D.L. Boone, and J.P. Lodolce. 2000. The pleiotropic functions of interleukin 15: not so interleukin 2-like after all. *J Exp Med* 191:753-756.

77. Malarkannan, S., P.P. Shih, P.A. Eden, T. Horng, A.R. Zuberi, G. Christianson, D. Roopenian, and N. Shastri. 1998. The molecular and functional characterization of a dominant minor H antigen, H60. *J Immunol* 161:3501-3509.
78. Mercado, R., S. Vijh, S.E. Allen, K. Kerksiek, I.M. Pilip, and E.G. Pamer. 2000. Early programming of T cell populations responding to bacterial infection. *J Immunol* 165:6833-6839.
79. Murali-Krishna, K., L.L. Lau, S. Sambhara, F. Lemonnier, J. Altman, and R. Ahmed. 1999. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* 286:1377-1381.
80. Murphy, K.M., and S.L. Reiner. 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2:933-944.
81. Nomura, M., Y. Takihara, T. Yasunaga, and K. Shimada. 1994. One of the retinoic acid-inducible cDNA clones in mouse embryonal carcinoma F9 cells encodes a novel isoenzyme of fructose 1,6-bisphosphatase. *FEBS Lett* 348:201-205.
82. O'Callaghan, C.A., A. Cerwenka, B.E. Willcox, L.L. Lanier, and P.J. Bjorkman. 2001. Molecular competition for NKG2D: H60 and RAE1 compete unequally for NKG2D with dominance of H60. *Immunity* 15:201-211.
83. O'Garra, A., and N. Arai. 2000. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol* 10:542-550.
84. O'Garra, A., and P. Vieira. 2004. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 10:801-805.
85. Pende, D., C. Cantoni, P. Rivera, M. Vitale, R. Castriconi, S. Marcenaro, M. Nanni, R. Biassoni, C. Bottino, A. Moretta, and L. Moretta. 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.
86. Prlic, M., L. Lefrancois, and S.C. Jameson. 2002. Multiple choices: regulation of memory CD8 T cell generation and homeostasis by interleukin (IL)-7 and IL-15. *J Exp Med* 195:F49-52.
87. Raulat, D.H. 2003. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 3:781-790.
88. Rosette, C., G. Werlen, M.A. Daniels, P.O. Holman, S.M. Alam, P.J. Travers, N.R. Gascoigne, E. Palmer, and S.C. Jameson. 2001. The impact of duration versus extent of TCR occupancy on T cell activation: a revision of the kinetic proofreading model. *Immunity* 15:59-70.
89. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164.

90. Salih, H.R., H. Antropius, F. Gieseke, S.Z. Lutz, L. Kanz, H.G. Rammensee, and A. Steinle. 2003. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 102:1389-1396.
91. Salih, H.R., H.G. Rammensee, and A. Steinle. 2002. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 169:4098-4102.
92. Salomon, B., D.J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, and J.A. Bluestone. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12:431-440.
93. Singer, A., R. Bosselut, and A. Bhandoola. 1999. Signals involved in CD4/CD8 lineage commitment: current concepts and potential mechanisms. *Semin Immunol* 11:273-281.
94. Starr, T.K., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist. 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21:139-176.
95. Stetson, D.B., M. Mohrs, R.L. Reinhardt, J.L. Baron, Z.E. Wang, L. Gapin, M. Kronenberg, and R.M. Locksley. 2003. Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *J Exp Med* 198:1069-1076.
96. Subudhi, S.K., M.L. Alegre, and Y.X. Fu. 2005. The balance of immune responses: costimulation verse coinhibition. *J Mol Med* 83:193-202.
97. Sun, J.C., M.A. Williams, and M.J. Bevan. 2004. CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. *Nat Immunol* 5:927-933.
98. Takeda, K., and S. Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17:1-14.
99. Thornton, A.M., and E.M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188:287-296.
100. Tivol, E.A., F. Borriello, A.N. Schweitzer, W.P. Lynch, J.A. Bluestone, and A.H. Sharpe. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3:541-547.
101. Vales-Gomez, M., H.T. Reyburn, R.A. Erskine, M. Lopez-Botet, and J.L. Strominger. 1999. Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *Embo J* 18:4250-4260.

102. van der Merwe, P.A., D.L. Bodian, S. Daenke, P. Linsley, and S.J. Davis. 1997. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med* 185:393-403.
103. van Stipdonk, M.J., E.E. Lemmens, and S.P. Schoenberger. 2001. Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat Immunol* 2:423-429.
104. Vieira, P.L., J.R. Christensen, S. Minaee, E.J. O'Neill, F.J. Barrat, A. Boonstra, T. Barthlott, B. Stockinger, D.C. Wraith, and A. O'Garra. 2004. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 172:5986-5993.
105. Wang, L.F., J.Y. Lin, K.H. Hsieh, and R.H. Lin. 1996. Epicutaneous exposure of protein antigen induces a predominant Th2-like response with high IgE production in mice. *J Immunol* 156:4077-4082.
106. Wang, S., G. Zhu, A.I. Chapoval, H. Dong, K. Tamada, J. Ni, and L. Chen. 2000. Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS. *Blood* 96:2808-2813.
107. Watanabe, Y., T. Maruoka, L. Walter, and M. Kasahara. 2004. Comparative genomics of the Mill family: a rapidly evolving MHC class I gene family. *Eur J Immunol* 34:1597-1607.
108. Welch, A.Y., M. Kasahara, and L.M. Spain. 2003. Identification of the mouse killer immunoglobulin-like receptor-like (Kirl) gene family mapping to chromosome X. *Immunogenetics* 54:782-790.
109. Welte, S.A., C. Sinzger, S.Z. Lutz, H. Singh-Jasuja, K.L. Sampaio, U. Eknigk, H.G. Rammensee, and A. Steinle. 2003. Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *Eur J Immunol* 33:194-203.
110. Wong, P., and E.G. Pamer. 2001. Cutting edge: antigen-independent CD8 T cell proliferation. *J Immunol* 166:5864-5868.
111. Wu, J., N.J. Chalupny, T.J. Manley, S.R. Riddell, D. Cosman, and T. Spies. 2003. Intracellular retention of the MHC class I-related chain B ligand of NKG2D by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *J Immunol* 170:4196-4200.
112. Wu, J., Y. Song, A.B. Bakker, S. Bauer, T. Spies, L.L. Lanier, and J.H. Phillips. 1999. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285:730-732.
113. Xu, D., H. Liu, M. Komai-Koma, C. Campbell, C. McSharry, J. Alexander, and F.Y. Liew. 2003. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, Leishmania major infection, and colitis in mice. *J Immunol* 170:394-399.

- 
114. Young, J.D., H. Hengartner, E.R. Podack, and Z.A. Cohn. 1986. Purification and characterization of a cytolytic pore-forming protein from granules of cloned lymphocytes with natural killer activity. *Cell* 44:849-859.
  115. Zamoyska, R. 1998. CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses? *Curr Opin Immunol* 10:82-87.

## VI Dankvermerk

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Zuerst geht mein herzlicher Dank an Prof. Dr. Dirk Busch. Er hatte immer Zeit für Diskussionen, brachte neue Ideen und hat mit seiner exzellenten Betreuung und Begeisterungsfähigkeit die Arbeit in der vorliegenden Form erst möglich gemacht.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Hermann Wagner für die Unterstützung.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei Anja Kriegeskorte bedanken, die die Rolle von NKG2D auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen und den Mechanismus der Inhibition untersucht hat, und deren Ergebnisse zum Teil hier zitiert werden.

Für die hervorragende technische Unterstützung bedanke ich mich bei Anna Hochholzer und Brigitte Wilmow.

Mein Dank geht an das gesamte Labor für die freundschaftliche Atmosphäre und Hilfsbereitschaft, insbesondere an Katharina Huster, Tobias Franz, Verena Busch und Robert Knall für die fruchtbaren Diskussionen.

Bedanken möchte ich mich bei Marco Colonna für die DAP10<sup>-/-</sup> Maus sowie bei Leon Carayanopoulos für die transfizierten RMA-Zelllinien

Mein besonderer Dank geht an mein privates Umfeld und an meine Eltern, die mir mein Studium ermöglichten und mich über die gesamte Zeit unterstützt haben.