

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinikum rechts der Isar
Institut für Molekulare Immunologie
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. Ruland)

**ITAM-gekoppelte NK-Zell Rezeptoren aktivieren über den
Carma1/Bcl10/Malt1 Komplex NF- κ B und MAP-Kinasen zur
Produktion von Zytokinen**

Christina Stephanie Grupp

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. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. J. Ruland
2. Univ.-Prof. Dr. Ch. Peschel

Die Dissertation wurde am 12.03.2012 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 26.09.2012 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	4
1. Einleitung	6
1.1 Überblick über das Immunsystem	6
1.1.1 Erworbenes Immunsystem	6
1.1.2 Angeborenes Immunsystem	7
1.2 NK-Zellen	9
1.2.1 Zuordnung zum angeborenen oder adaptiven Immunsystem?	9
1.2.2 Wirkweise von NK-Zellen	10
1.2.3 Bedeutung von NK-Zellen in der Immunabwehr	11
1.2.4 NK-Zell Rezeptoren	12
1.2.5 Einfluss von Zytokinen auf NK-Zellen	15
1.2.6 Der Signalweg von aktivierenden NK-Zell Rezeptoren	16
1.3 Problemstellung	23
2. Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.2 Methoden	30
2.2.1 Genotypisierung	30
2.2.2 Gewinnung von NK-Zellen aus der Milz	30
2.2.3 Aufreinigen von NK-Zellen mittels MACS (Magnetic Cell Sorting)	31
2.2.4 Zellkultur	32
2.2.5 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	32
2.2.6 NK-Zell Zytotoxizitäts Assay: ⁵¹ Cr-Release-Assay	32
2.2.7 Stimulation von NK-Zellen zur Zytokinproduktion	33
2.2.8 Durchflusszytometrie	34
2.2.9 Bestimmung der Zytokinproduktion mittels ELISA	35
2.2.10 Western Blot	36
2.2.11 Viruslast/NK-Zell Proliferation	36

3.	Ergebnisse	40
3.1	Normale Entwicklung und normales Überleben von NK-Zellen in Abwesenheit von Bcl10	40
3.2	Gestörte Zytokinproduktion in NK-Zellen Bcl10 defizienter Mäuse	41
3.3	Zytokinproduktion nach Vorstimulation mit IL-15	42
3.4	Auch Malt1 ist für die Zytokinproduktion essentiell	43
3.5	Bcl10 und Malt1 sind in der Signaltransduktion von NK-Zellen PKCs nachgeschaltet	43
3.6	Carma1 abhängiges, Card9 unabhängiges Signaling über Bcl10	44
3.7	ITAM-gekoppelte NK-Zell Rezeptoren aktivieren NF- κ B und MAP-Kinasen über Bcl10/Malt1	46
3.8	Untersuchung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen in Abhängigkeit von Bcl10	47
3.9	Das Fehlen der Bcl10 abhängigen Signaltransduktion hat keine Auswirkung auf die Abwehr des murinen Cytomegalievirus <i>in vivo</i>	48
4.	Diskussion	51
4.1	Bedeutung von Bcl10 für die Signalwege ITAM-haltiger bzw. ITAM-gekoppelter Immunrezeptoren	51
4.2	PKCs scheinen ihr Signal Carma1 abhängig zu vermitteln	52
4.3	Die Zytokinproduktion von NK-Zellen ist nicht entscheidend an der frühen Immunabwehr von Virusinfekten beteiligt	53
4.4	Modell des Signalweges in NK-Zellen	53
4.5	Klinische Relevanz der vorliegenden Ergebnisse	55
5.0	Zusammenfassung	56
	Literaturverzeichnis	57
	Abbildungsverzeichnis	67
	Lebenslauf	68
	Danksagung	69

Verzeichnis der Abkürzungen

ADCC	antibody-dependent cell cytotoxicity
AK	Antikörper
Bcl 10	B cell lymphoma associated protein 10
BCR	B-cell receptor
BrdU	bromodeoxyuridine
CARD	caspase recruitment domain
Carma	CARD-MAGUK protein
CD	cluster of differentiation
CLD	caspase-like domain
CMV	Cytomegalie Virus
Dap	DNAX-activation protein
DC	dendritische Zelle
DNA	desoxyribonucleic acid
Erk	extracellular signal-regulated kinases
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
Fc	crystalisable fragment
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
IL	Interleukin
Iono	ionomycin (calcium ionophore)
i.p.	intraperitoneal
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
I κ B	inhibitor of NF- κ B
IKK	I κ B-Kinase
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal kinase
KARs	killing acivatory receptors
kDa	kilo Dalton (molecular mass)
KIR	killer cell immunglobulin receptor
ko	knockout

MACS	magnetism activated cell sorter
Malt 1	mucosa-associated-lymphoid-tissue lymphoma-translocation gene 1
MAPK	mitogen activated protein kinase
MCMV	murine cytomegalovirus
MHC	mayor histocompatibility complex
MIP	macrophage-inflammatory protein
NF- κ B	nuclear factor kappa-B
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
p38	protein of 38 kDa
p58	protein of 58 kDa
PCR	Polimerasekettenreaktion
pfu	plug forming unit
PI3K	phosphoinositide-3-kinase
PLC γ 1/ 2	Phospholipase C gamma 1/ 2
PMA	phorbol myristate acetate
PRR	pattern recognition receptor
RMA	benannt nach <i>Rauscher virus-induced murine cell line RBL-5</i>
RT	Raumtemperatur
SRC-kinase	Tyrosine-Kinase, benannt nach "sarcoma"
SH-2	SRC-homology-2
Syk	splenic tyrosine kinase
TCR	T-cell receptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRAF	TNF receptor associated factors
U/ml	unit pro ml
VLE	very low endotoxine
wt	Wildtyp
ZAP 70	zeta-chain asociated protein of 70 kDa

1. Einleitung

1.1 Überblick über das Immunsystem

Im Laufe der Evolution hat sich als Antwort auf die Bedrohung durch Krankheitserreger ein komplexes Abwehrsystem entwickelt. Grundsätzlich kann dieses Abwehrsystem in zwei Kategorien eingeteilt werden: das phylogenetisch ältere angeborene oder auch unspezifisch genannte Immunsystem und das adaptive bzw. spezifische Immunsystem. Das angeborene Immunsystem ist bereits viel früher während der Evolution entstanden und auch in einfacheren Organismen, wie Pflanzen oder Insekten zu finden, während das adaptive Immunsystem nur in höheren Vertebraten ausgebildet ist (Medzhitov 2000). Dabei ist bemerkenswert, dass das neuere, also das adaptive Immunsystem in vielen Belangen vom älteren abhängig ist. So wäre es ohne die Antigenpräsentation durch die Zellen des angeborenen Immunsystems, sowie deren Zytokinproduktion in vieler Hinsicht nicht funktionsfähig (Beutler 2004).

Zur Unterscheidung zwischen fremden und körpereigenen Strukturen nutzen beide Kategorien des Immunsystems Rezeptoren, die spezifisch Fremdstoffe erkennen. Die Bindung von solchen Rezeptoren an ihre Liganden ist der erste Schritt in der Aktivierung einer Immunabwehrreaktion (Dempsey 2003, Janeway 2001).

1.1.1 Erworbenes Immunsystem

Obwohl das angeborene Immunsystem bereits in der Lage ist viele Erreger zu eliminieren, hat sich im Lauf der Zeit das komplexere adaptive System entwickelt, welches noch gezielter bestimmte Strukturen von Erregern erkennen und diese somit noch effizienter bekämpfen kann. Während im angeborenen System die Rezeptoren bereits in der Vorläuferzelle genetisch festgelegt, also keimbahnkodiert und dementsprechend bei allen Zellen identisch sind (Gordon 2002, Janeway 2002), kommt es im erworbenen Immunsystem in einem frühen Stadium der Zellreifung durch Umlagerung der Gensegmente, welche für die Rezeptoren kodieren, zu einer großen Vielzahl von unterschiedlichen, antigenspezifischen Rezeptoren bzw. Antikörpern (somatische Rekombination) (Fugmann 2000). Das heißt, jede Zelle hat einen individuellen Rezeptor, der nur an eine spezifische Struktur binden kann. Durch die

Vielzahl der Zellen des adaptiven Immunsystems entsteht dann die enorme Bandbreite der spezifischen Antigenerkennung.

Diese Zellen des adaptiven Immunsystems sind B- und T-Lymphozyten. Sie stammen von einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle im Knochenmark ab und schlagen unterschiedliche Wege zur weiteren Reifung ein. Die T-Vorläuferzellen wandern hierfür in den Thymus (daher „T“-Zelle), die B-Zellen verbleiben im Knochenmark („*bone marrow*“ daher „B“-Zelle). Sowohl B- als auch T-Lymphozyten zirkulieren ständig zwischen Blut und Lymphe. Passt im Falle einer Infektion ihr individueller Rezeptor zu einem Antigen des Erregers, so werden sie in Lymphknoten oder Milz zurückgehalten und aktiviert. Folglich kommt es zur klonalen Expansion und Differenzierung zu Effektorzellen. Die T-Zelle wird somit entweder zur zytotoxischen T-Zelle oder zur T-Helferzelle, die B-Zelle zur Plasmazelle, welche die Fähigkeit besitzt antigenspezifische Antikörper zu produzieren und sezernieren (Brack 1978, Schatz 1992). Diese nichtzelluläre Komponente wird auch als humorale Immunantwort des adaptiven Immunsystems bezeichnet.

Neben der höheren Spezifität der Erregererkennung besitzt das erworbene Immunsystem zudem ein sog. immunologisches Gedächtnis. Ist das Antigen des Erregers nach erfolgreicher Bekämpfung durch das Immunsystem aus dem Körper verschwunden, fallen nicht alle Effektorzellen der Apoptose zum Opfer, einige überleben als sogenannte Gedächtniszellen. Bei erneuter Infektion durch denselben Krankheitserreger kommt es dann dank dieser Gedächtniszellen zu einer deutlich schnelleren und effizienteren Antikörperantwort. Dies ist die Basis für eine oft lebenslange Immunität (Bosman 1970, Harty 2008).

1.1.2 Angeborenes Immunsystem

Abgesehen von den Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), welche ihren Ursprung in der lymphatischen Vorläuferzelle nehmen, entwickeln sich die Zellen des angeborenen Immunsystems aus der myeloiden Vorläuferzelle. Bei ihnen handelt es sich größtenteils um phagozytierende Zellen. So haben neutrophile Granulozyten und Monozyten die Aufgabe im Blut zirkulierende Erreger zu beseitigen, während Makrophagen und dendritische Zellen diese Funktion im Gewebe erfüllen. Dabei liegt die Bedeutung der Dendritischen Zellen vor allem darin, dass sie den T-Lymphozyten die Antigene der aufgenommenen Pathogene in den Lymphknoten präsentieren. Hierfür besitzen Dendriten die Fähigkeit in die drainierenden

Lymphknoten zu wandern, wo sie die dort anwesenden T-Lymphozyten dann zur spezifischen Immunreaktion stimulieren.

Im Gegensatz dazu sind NK-Zellen nicht zur Phagozytose befähigt, sie bewirken die Zerstörung befallener Körperzellen mittels Ausschüttung zytotoxischer Granula.

Weitere Zellen des angeborenen Immunsystems sind Mastzellen, sowie basophile und eosinophile Granulozyten. Mastzellen sind als gewebsständige Zellen mittels Ausschüttung von Zytokinen vor allem an der lokalen Entzündungsreaktion beteiligt. Die Funktion von basophilen und eosinophilen Granulozyten ist noch nicht vollständig geklärt, sie scheinen aber vor allem bei der Abwehr von Parasiten eine entscheidende Rolle zu spielen.

Ebenso wie das adaptive Immunsystem besitzt auch das angeborene Immunsystem eine humorale Komponente. Zu dieser zählen unter anderem das Komplementsystem und Zytokine. Unter dem Komplementsystem versteht man Proteine des Blutplasmas, welche vor allem für die Opsonisierung von Bakterien, welche wiederum der Phagozytose dient, entscheidend sind (Tomlinson 1993).

Zytokine sind kleine Proteine von etwa 25kD, welche von verschiedenen Zelltypen, z.B. Makrophagen und NK-Zellen, aber auch von Zellen des adaptiven Immunsystems wie T-Lymphozyten, auf einen Aktivierungsreiz hin ausgeschüttet werden und regulierende Wirkung auf angeborenes und adaptives Immunsystem besitzen. So führen pro-inflammatorische Zytokine wie z.B. Interleukin (IL)-1, -2, -6, und -12, sowie Tumor Nekrose Faktor(TNF)- α und Interferon(IFN)- α , - β und - γ auf unterschiedlichsten Wegen zu einer Aktivierung der Abwehrreaktion. Andere Mediatoren wie z.B. IL-4 und -10 dämpfen das Entzündungsgeschehen hingegen ein, um eine überschießende Immunreaktion zu verhindern.

Da die Zellen des adaptiven Immunsystems vier bis sieben Tage benötigen bis sie dank klonaler Selektion und Expansion gezielt auf Fremdkörper reagieren können, spielt besonders in dieser Anfangsphase die angeborene Immunantwort eine entscheidende Rolle.

Diese kann, auch ohne den Erreger antigenspezifisch zu erkennen, erste Abwehrmaßnahmen einleiten, indem sie sich darauf beschränkt, zwischen körpereigen und körperfremd zu unterscheiden. Dazu verwendet das angeborene Immunsystem in erster Linie Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs), welche bestimmte Oberflächenstrukturen wie z.B. Lipoproteine, Lipopolysaccharide oder bakterielle DNA-Abschnitte, sog. *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs), der Eindringlinge erkennen (Mukhopadhyay 2004). Sie entstehen im Gegensatz zu den Rezeptoren des

adaptiven Systems nicht durch somatische Rekombination, sondern sind keimbahnkodiert. Hierzu gehören z.B. die Toll-like Rezeptoren (TLRs) unter anderem auf Dendritischen Zellen (DCs) oder die aktivierenden Rezeptoren auf NK-Zellen (Kumar 2009, Medzhitov 2002, Takeda 2003). Über diese Rezeptoren können die Immunzellen Phagozytose, Zytotoxizität und Sekretion von Zytokinen und antimikrobiellen Effektormolekülen wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO) oder Sauerstoffradikalen (ROS) steuern (Kirschning 2001).

Die meisten Infektionen können somit bereits vom angeborenen Immunsystem erfolgreich bekämpft werden und es kommt gar nicht erst zum Ausbruch der Krankheit, wobei dies größtenteils Leistung des Komplementsystems ist. Gelingt es dem angeborenen Immunsystem nicht, den Erreger zu beseitigen, kommt es zur Aktivierung der adaptiven Immunität. Und auch dann übernimmt das angeborene Immunsystem in Zusammenarbeit mit dem spezifischen Immunsystem wichtige Aufgaben, wie das Präsentieren von Antigenen (z.B. durch Dendritische Zellen), die Steuerung der spezifischen Immunantwort durch Sekretion von Zytokinen oder die Phagozytose der mittels Antikörper „markierten“ Pathogene.

1.2. NK-Zellen

1.2.1 Zuordnung zum angeborenen oder adaptiven Immunsystem?

NK-Zellen sind Lymphozyten und wie B- und T-Zellen sind sie mit Rezeptoren ausgestattet, die der Erkennung der Zielzellen dienen. Aber anders als die Antigenrezeptoren von B- und T-Zellen sind die Rezeptoren von NK-Zellen keimbahnkodiert, d.h. ihre Gene unterliegen keiner somatischen Rekombination. Dementsprechend werden sie zum angeborenen Immunsystem gerechnet (Lanier 1998, Raulet 2004, Yokoyama, 2003).

Am besten bezeichnet man sie aber wohl als Grenzgänger zwischen angeborener und erworbener Immunantwort. Sie entwickeln sich ebenso wie B- und T-Lymphozyten aus den lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark, wo sie im Gegensatz zu T-Zellen auch heranreifen (Colucci 2003). Sie weisen den gleichen Tötungsmechanismus auf wie T-Lymphozyten, nämlich mittels Ausschüttung zytotoxischer Granula (Berke 1994). Außerdem ist ein Großteil der NK-Zell Rezeptoren auch auf bestimmten Untergruppen von T-Zellen, besonders auf $\gamma\delta\text{TCR}^+$ T-Zellen und aktivierten zytotoxischen (CD8^+) T-Zellen zu finden. So tragen diese Rezeptoren ihren Namen nur deshalb, weil sie auf NK-Zellen zuerst entdeckt wurden (Lanier 2003). Ebenso zeigt sich in der Komplexität ihrer Rezeptoren zur Erkennung

von MHC Molekülen eine gewisse Ähnlichkeit zu den entsprechenden Co-Rezeptoren auf T-Zellen. Auch hinsichtlich der Fähigkeit verschiedene Zytokine wie z.B. $\text{IFN}\gamma$ zu sezernieren, gibt es einige Übereinstimmungen von NK-Zellen mit zytotoxischen T-Zellen und T-Helfer-Zellen. Allerdings geht NK-Zellen die Fähigkeit IL-2 zu produzieren ab (Lanier 2005).

So wird deutlich, dass NK-Zellen eine nähere Verwandtschaft zu T-Lymphozyten aufweisen als zu den Phagozyten der angeborenen Immunantwort, deren Unterscheidung zwischen körperfremd und körpereigen allein auf den unveränderlichen *pattern recognition receptors* (PRRs) basiert.

Die wichtigste Eigenschaft, welche NK-Zellen also mit den anderen Zellen des angeborenen Immunsystems teilen, ist ihre Fähigkeit innerhalb von Minuten auf pathologisch veränderte Zellen zu reagieren, da sie eben nicht wie B- und T-Lymphozyten nach Selektion der passenden antigenspezifischen Rezeptoren zunächst klonale Expansion und Differenzierung zur Effektorzelle durchlaufen müssen (Lanier 2005, Trinchieri 1989).

1.2.2 Wirkweise von NK-Zellen

Im Blut machen NK-Zellen, welche größer als B- und T-Zellen sind, etwa 15 % der peripheren Lymphozyten aus und auch in diversen peripheren Geweben sind sie zu finden, wo sie die Lyse von Tumor- oder infizierten Zellen bewirken. Indem sie die von intrazellulären Krankheitserregern, meist Viren, befallenen Wirtszellen töten, entziehen sie den Pathogenen die Grundlage zur Replikation (Robertson 1990, Trinchieri 1989).

Um ihre Zielzellen abzutöten, setzen NK-Zellen zytotoxische Granula frei, welche Perforine und Granzyme enthalten. Erstere führen zu Defekten in der Membran der Zielzelle, durch welche die Granzyme in die Zelle eindringen können und durch ihre Funktion als Proteasen die Apoptose mittels Aktivierung von Signalkaskaden einleiten (Berke 1994, Kärre 1985, Kirwan 2007).

Aktivierte NK-Zellen sind außerdem in der Lage eine Vielzahl effektorischer (wie z.B. $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ und $\text{MIP1}\alpha$ und β) und regulatorischer (wie z.B. GM-CSF) Zytokine zu sezernieren (Bluman 1996). Die Sekretion von $\text{IFN}\gamma$ nimmt eine besonders wichtige Rolle ein. Bevor nämlich T-Zellen in einer späteren Phase der Immunantwort die Produktion dieses Zytokins übernehmen, stellen NK-Zellen die Hauptproduzenten dar. So können sie T-Helferzellen und Makrophagen aktivieren und eine Hochregulation von MHC Molekülen der Klasse I und II

auf der Oberfläche von Makrophagen bewirken, was wiederum die Antigenpräsentation verbessert.

Mittels Tumornekrosefaktor α (TNF α), den neben NK-Zellen vor allem Makrophagen sezernieren, können verschiedenste Immunfunktionen gesteuert werden, wie z.B. Proliferation anderer Abwehrzellen, Auslösen einer Fieberreaktion, Stimulierung der Phagozytose und die Regelung der Sekretion anderer Zytokine.

Der ebenfalls von NK-Zellen ausgeschüttete Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende-Faktor (GM-CSF) bewirkt die Differenzierung von Vorläuferzellen des Knochenmarks zu Makrophagen und Granulozyten und sorgt somit für eine ausreichende Anzahl an Phagozyten im Falle einer Infektion.

Auch die Chemokine *macrophage-inflammatory protein*(MIP)1 α und β , durch deren Freisetzung Immunzellen ins betroffene Gewebe angelockt werden, gehören zu den von NK-Zellen sezernierten Zytokinen (Biron 1999, Kos 1998, Martin-Fontecha 2004, Perussia 1991, Zwirner 2010).

1.2.3 Bedeutung von NK-Zellen in der Immunabwehr

Zytotoxizität und Sekretion immunmodulatorischer Zytokine durch NK-Zellen spielen also eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Immunantwort bei Infekten mit intrazellulären Krankheitserregern (Biron 1999, Haller 2002, Lanier 2005). So hat sich gezeigt, dass NK-Zellen bei Mäusen in den ersten 5 bis 6 Tagen, also bis zum Einsetzen der adaptiven Immunantwort, für die Eindämmung der Virusvermehrung verantwortlich sind (Dunn 1991). Besonders bei Infektionen durch Herpesviren (z.B. HSV, EBV und CMV), Arenaviren (z.B. LCMV) (Biron 1999), protozoische Parasiten der Gattung *Leishmania* sowie die Bakterien *Listeria monocytogenes* und *Mycobacterium tuberculosis* (Dunn 1991, Vankayalapati 2005) konnte der Stellenwert der Abwehrreaktion durch NK-Zellen gesichert werden.

Bei Mäusen kann die Bedeutung von NK-Zellen gut im Infektionsmodell mit MCMV untersucht werden. Zusammen mit Dendritischen Zellen, welche die Viren initial mit Hilfe ihrer Mustererkennungsrezeptoren identifizieren, stellen sie die wichtigsten Zelltypen in der Frühphase der Virusinfektion dar (Scalzo 2002, Yokoyama 2002). So hat sich gezeigt, dass NK-Zell Depletion bei normalerweise resistenten Mausstämmen wie C57BL/6 die Tiere empfindlicher gegenüber MCMV macht. Es konnten deutlich höhere Virustiter in Lunge,

Leber und Milz sowie gesteigerte Mortalität nachgewiesen werden (Bukowski 1984, Orange 1995, Welsh 1994).

Aber eben auch Tumorzellen werden von NK-Zellen bekämpft. Das konnte schon früh im Falle des RMA (*Rauscher virus-induced murine cell line RBL-5*)-T-Zell Lymphoms gesichert werden (Cerwenka 2001, Kärre 1986).

1.2.4 NK-Zell Rezeptoren

Um zwischen gesunden Körperzellen und pathologisch veränderten Zellen unterscheiden zu können, nutzen NK-Zellen ihre vielfältigen Oberflächenrezeptoren. Diese Oberflächenrezeptoren, welche man grob in aktivierende und inhibierende Rezeptoren unterteilen kann, regeln somit Aktivierung, Proliferation und Effektor-Funktionen der NK-Zellen (Spits 1998).

Bei Mäusen gehören die meisten bekannten NK-Zell Rezeptoren zur C-Typ-Lektin-Superfamilie und sind auf dem NK-Gen-Komplex kodiert (Brown 1997, Ho 1998).

Inhibitorische Rezeptoren

Die inhibitorischen Rezeptoren dienen der strengen Kontrolle der Aktivierung von NK-Zellen, um eine ungewollte Beschädigung von gesunden Körperzellen zu verhindern. Zu den hemmenden Rezeptoren von murinen NK-Zellen gehören einerseits inhibitorische Ly49 Rezeptoren, welche klassische MHC-I Moleküle erkennen und andererseits CD94/NKG2 Rezeptoren, welche das nicht-klassische MHC-I Molekül Qa-1 erkennen. (Braud 1998, Karlhofer 1992, Vance 1998, Yokoyama 1995).

Bei Antigenbindung wird das *immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif* (ITIM), welches sich auf der zytoplasmatischen Seite der Rezeptoren befindet, durch eine Kinase aus der Src-Familie phosphoryliert. Über Aktivierung der Tyrosin-Phosphatasen SHP-1, SHP-2 und SHIP, welche durch ihre SH-(*SRC-homology*)-2-Domänen angelockt werden, kommt es dann zur Hemmung aktivierender Kaskaden und somit zur Unterdrückung der NK-Zell Aktivität (Long 1999, Vely 1997). Fehlt nun die MHC-I Präsentation oder ist sie verändert, fällt diese Hemmung weg und die Zielzelle wird getötet.

Grund für die veränderte oder fehlende MHC Präsentation bei viral infizierten Zellen ist erstens die Tatsache, dass einige Viren die Proteinsynthese der Wirtszelle hemmen und somit

auch die Produktion von MHC Molekülen. Zweitens können bestimmte Viren den Transport der MHC Moleküle an die Zelloberfläche gezielt hemmen. Dadurch können diese Viren verhindern, dass zytotoxische T-Lymphozyten die mittels MHC-I präsentierten viralen Proteine erkennen und die infizierte Zelle beseitigen. Außerdem kommt es bei viralen Infekten zur Ausschüttung von Interferonen ($\text{IFN}\alpha$ und β), welche die gesunden Zellen zur vermehrten MHC-I Präsentation stimulieren. Dies führt dazu, dass diese Zellen gegen die NK-Zellen geschützt sind. Die infizierten Zellen hingegen reagieren nicht auf das Signal der Interferone, folglich verbleiben sie als Zielobjekte für die aktivierten NK-Zellen (Parham 2005).

Vermutlich erkennen NK-Zellen nach demselben Prinzip auch bestimmte maligne entartete Zellen, da es auch hier zu einer verminderten Expression von MHC-I oder anderen inhibierenden Oberflächenstrukturen kommt (Pardoll 2003).

Aktivierende Rezeptoren

Im Gegensatz dazu erkennen die aktivierenden NK-Zell Rezeptoren spezifische Liganden, welche bei Virusinfektion, Zellstress oder neoplastischen Veränderungen auf der Oberfläche der Zielzelle exprimiert werden (Smith 2001).

Beispiele für aktivierende Rezeptoren sind NK1.1, Ly49D, Ly49H, NKG2D und $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$.

Dabei erkennen die unterschiedlichen Rezeptorklassen verschiedene Strukturen auf der Zelloberfläche. Während Ly49H virale Proteine wie das von MCMV exprimierte Protein m157 erkennt (Arase 2002, Brown 2001, Smith 2002), bindet NKG2D zelleigene Proteine, die von gesunden Zellen nur gering, von Tumor- oder infizierten Zellen im Rahmen des Zellstresses jedoch vermehrt exprimiert werden, wie z.B. RAE-1, H60 oder MULT1 (Ho 2002, Lanier 2005, Raulet 2003, Raulet 2006, Vankayalapati 2005). Von dem Rezeptor Ly49D ist bekannt, dass er an das MHC-I Molekül H-2D^d bindet. Weist jedoch der eigene Organismus H-2D^d auf, so ist die Affinität des Rezeptors zu diesem Liganden stark herabgesetzt, so dass das Signal der inhibierenden Ly49 Rezeptoren überwiegt und eine Autoimmunreaktion vermieden werden kann (George 1999, Nakamura 1999).

Eine besondere Rolle nimmt der Rezeptor $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ (CD16/32) ein. Indem er den FC-Teil von IgGs erkennt, welche bereits an eine infizierte Zelle gebunden sind, können die NK-Zellen an der antigenspezifischen Bekämpfung des Erregers mitwirken, ohne selbst spezifische Rezeptoren für das jeweilige Antigen zu exprimieren. Dieser Vorgang wird auch *antibody dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) genannt (Perussia 1998).

Die physiologischen Liganden weiterer aktivierender NK-Zell Rezeptoren sind noch nicht vollständig erforscht. So auch die des murinen Rezeptors NK1.1, von dem man bislang primär weiß, dass er an der Aktivierung der NK-Zelle beteiligt ist (Ryan 1992).

Die Aktivierung von NK-Zellen erfolgt im komplexen Zusammenspiel von aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren

Vor über 20 Jahren fand Kärre heraus, dass Tumorzellen, die kein MHC-1 präsentieren, von NK-Zellen lysiert werden (Kärre 1986). Infolge entstand die *Missing self*-Hypothese, die besagt, dass inhibitorische NK-Zell Rezeptoren bei Erkennen von MHC-Klasse I Molekülen eine Aktivierung der NK-Zelle unterdrücken und es bei Fehlen von MHC-I zur Lyse kommt. Allein das Fehlen von MHC-I kann aber nicht auslösend für die Zytotoxizität der NK-Zellen sein, sonst würden auch Erythrozyten, welche kein MHC-I auf ihrer Oberfläche exprimieren den NK-Zellen zum Opfer fallen. Unklar ist jedoch, ob sie sich durch andere bisher unbekannte Oberflächenstrukturen als körpereigen „ausweisen“ können oder ob allein das Fehlen stimulierender Antigene ausreicht, einen Angriff durch NK-Zellen zu verhindern (Lanier 2005). Andererseits konnte in weiteren Experimenten gezeigt werden, dass auch bei Vorhandensein von MHC-I auf der Zelloberfläche, NK-Zellen die Zielzellen lysieren, wenn das Signal eines aktivierenden NK-Zell Rezeptors stark genug ist oder mehrere verschiedene aktivierende Rezeptoren gleichzeitig ein Signal erhalten (Cerwenka 2001, Diefenbach 2001, Lanier 1997).

Zusammengenommen scheint also das Gleichgewicht zwischen stimulierenden und hemmenden Reizen die NK-Zell Antwort zu regulieren. So sind normale Zellen vor der Lyse durch NK-Zellen geschützt, wenn die Signale von aktivierenden Rezeptoren in einem ausgewogenen Verhältnis zu den Signalen von inhibitorischen Rezeptoren stehen. Verliert die Zielzelle MHC-I oder andere inhibitorische Moleküle infolge einer Infektion oder Transformation, so geben nur noch die aktivierenden Rezeptoren ihr Signal weiter und es kommt zur Lyse der Zielzelle (*missing self*). Andererseits kann die Zielzelle aber aufgrund von Infektion oder Transformation vermehrt Antigene für stimulierende NK-Zell Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen. Dies hätte zur Folge, dass trotz vorhandenem MHC-I die aktivierenden Signale überwiegen und die Zielzelle lysiert wird (*induced self*) (Renard 1997).

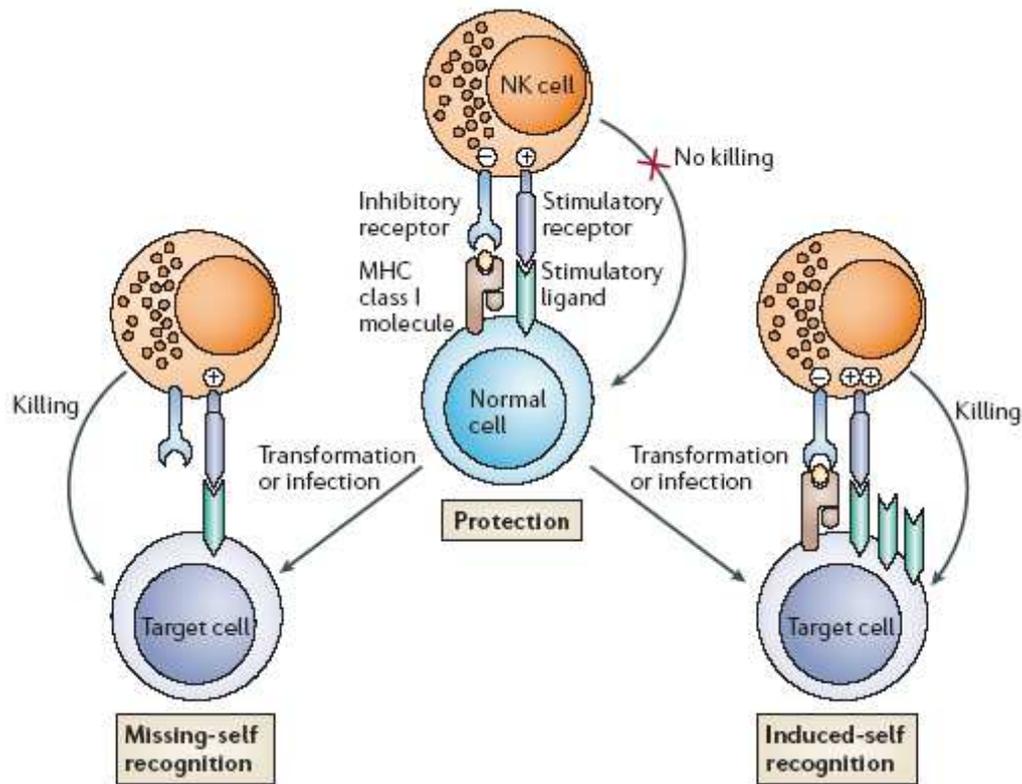


Abb. 1: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen NK- und Zielzelle aus Raulet und Vance, 2006. Das Gleichgewicht zwischen Signalen der aktivierenden und inhibitorischen NK-Zell Rezeptoren ist entscheidend dafür, ob es zur Zytolyse der Zielzelle kommt oder nicht.

1.2.5 Einfluss von Zytokinen

Wie schon erwähnt, stellen verschiedenen Zytokine wie Interferon α und β , IL2, IL12, IL15 und IL18 weitere Einflussgrößen hinsichtlich der verschiedenen Funktionen von NK-Zellen dar (Cooper 2001). Die Typ-1 Interferone α und β , werden direkt von virusinfizierten Zellen ausgeschüttet und verstärken, neben ihrer Fähigkeit die Virusreplikation in den befallenen Zellen zu hemmen, die zelluläre Immunantwort. So stimulieren sie ebenso wie IL-12 und IL-18 Zytotoxizität und Zytokinfreisetzung von NK-Zellen. Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen kann somit um ein 20- bis 100-faches erhöht werden (Biron 1999). IL-12 und IL-18 werden, anders als Interferon α und β , in erster Linie von Makrophagen und dendritischen Zellen ausgeschüttet, wenn diese in der frühen Phase einer Infektion in Kontakt zu Pathogenen gekommen sind (Miettinen 1998). Dabei ist IL-12 für NK-Zellen ein deutlich potenterer Stimulator für die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie v.a. IFN γ ,

als IL-18, das im Gegensatz dazu nur eine relativ schwache Wirkung besitzt (Chan 1991). Allerdings kommt es zur synergistischen Wirkung, treten beide Zytokine gemeinsam auf.

IL-15 ist hauptsächlich für NK-Zell Wachstum und Reifung von Bedeutung, so konnte gezeigt werden, dass IL-15 defiziente Mäuse keine NK-Zellen besitzen. Im Zusammenspiel mit IL-12 kann IL-15 aber auch die Synthese von $\text{IFN}\gamma$ und $\text{MIP}1\alpha$ anregen (Biron 1999). Auch IL-2 fördert als Wachstumsfaktor Überleben und Proliferation von NK-Zellen, vor allem in Abwesenheit von $\text{CD}8+$ T-Zellen, da diese eine deutlich höhere Affinität zu diesem Zytokin besitzen (Su 1994).

Es gibt auch Zytokine die eine negative Regulation der NK-Zell Aktivierung bewirken, hierzu gehören z.B. IL-10 und $\text{TGF}\beta$, welche ihre Wirkung v.a. indirekt über eine verminderte IL-12 Produktion vermitteln (D'Andrea 1993, Snijders 1996).

Die folgende Abbildung zeigt einen Überblick des Zusammenwirkens verschiedener Zytokine im Fall einer Virusinfektion und deren Einfluss auf die NK-Zelle.

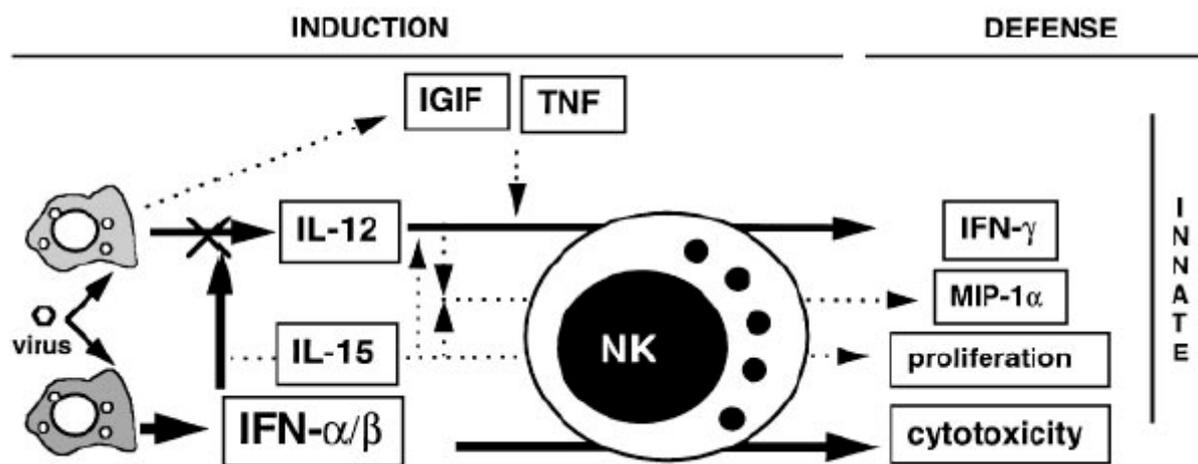


Abb. 2: Wirkung von Zytokinen auf die NK-Zell Antwort bei viralen Infekten, wobei gestrichelte Linien noch nicht gesicherte Wirkungen darstellen. Abgeändert aus Biron et al., 1999.

1.2.6 Der Signalweg von aktivierenden NK-Zell Rezeptoren

Wie die Bindung eines Liganden an einen aktivierenden NK-Zell Rezeptor zu Zytotoxizität und Zytokinausschüttung führt, ist bislang größtenteils unbekannt. Die wenigen Erkenntnisse beziehen sich vor allem auf den proximalen Abschnitt des Signalwegs. So konnte gezeigt

werden, dass die aktivierenden Rezeptoren ihre Information mittels transmembraner Domänen an ITAM(*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*)-tragende Rezeptor-assoziierte Proteine wie DAP-12, FcR γ oder CD3 weiterleiten, NKG2D kann zudem auch mit DAP-10 interagieren. Bindet also ein Ligand an einen der aktivierenden Rezeptoren, führt dies zu einer schnellen Tyrosin-Phosphorylierung des ITAMs durch Tyrosin-Kinasen aus der Familie der Src(*sarcoma*)-Kinasen. In Folge werden *spleen tyrosin kinase* (Syk) oder *zeta-chain associated protein of 70 kDa* (ZAP 70) durch das phosphorylierte ITAM „angelockt“ und aktiviert. Dies wiederum bewirkt das Rekrutieren und Aktivieren von Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3Ks) und anderen Signalmediatoren wie LAT, PLC γ 1, PLC γ 2, Vav2 und Vav3 sowie die Mobilisierung von freiem Calcium (Kirwan 2007, Lanier 1998)

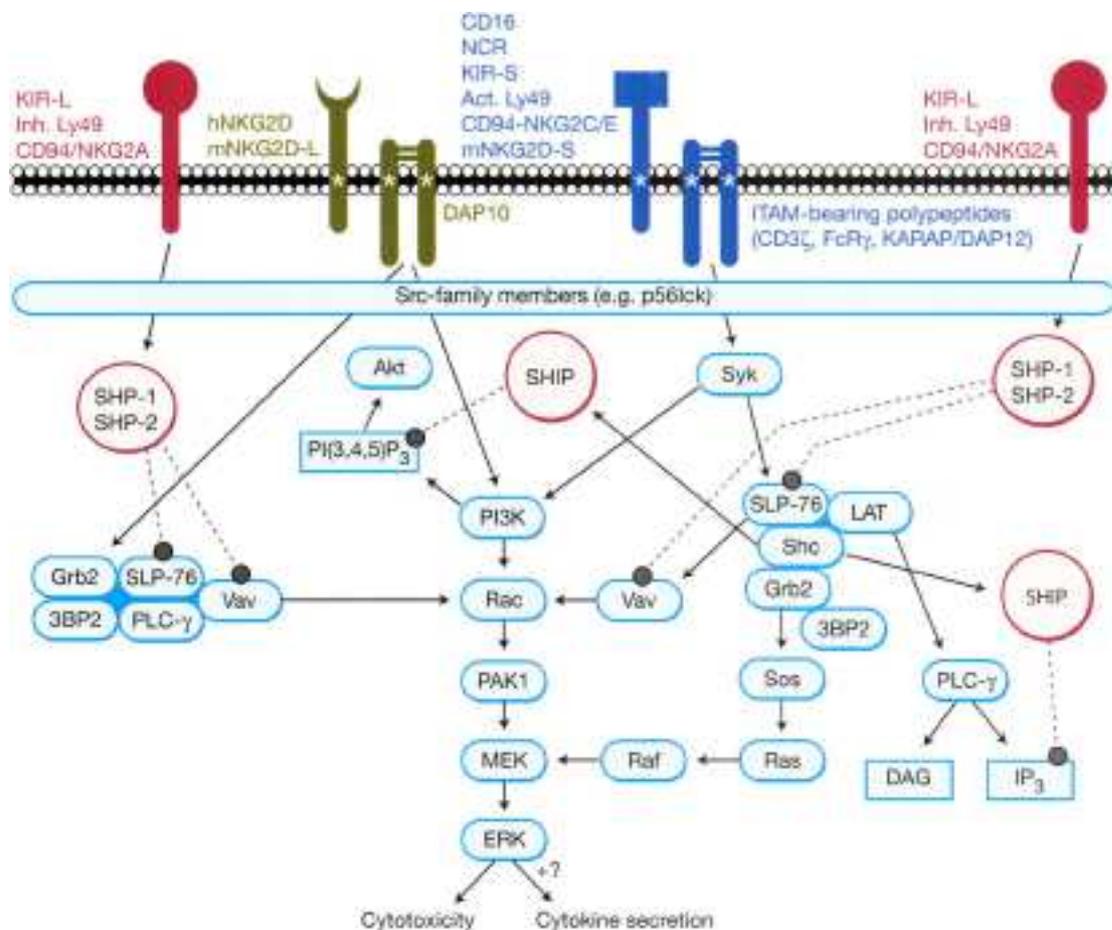


Abb. 3: Schematische Darstellung der proximalen Signaltransduktion verschiedener muriner NK-Zell Rezeptoren aus Vivier et al., 2004. Aktivierende NK-Zell Rezeptoren (blau und grün) vermitteln ihr Signal über ITAM-gekoppelte Adaptorproteine, inhibitorische Rezeptoren (rot) nutzen dafür ITIMs, welche den Rezeptoren zu eigen sind und sich auf der zytoplasmatischen Seite der Rezeptoren befinden.

Wie diese Signalwege jedoch im weiteren Verlauf zu den Veränderungen im Zytoskelett, welche eine Degranulation der NK-Zelle nach sich ziehen, und über Aktivierung der Gentranskription zur Zytokinproduktion führen, ist bislang ungeklärt.

Da aber der oben beschriebene proximale Anteil des Signalweges große Ähnlichkeit zu dem von T- und B-Lymphozyten nach Antigenrezeptoraktivierung aufweist, wäre es nicht verwunderlich auch im distalen Anteil des Signalweges Übereinstimmungen zu finden. Eine andere Möglichkeit wären Übereinstimmungen mit dem Signalweg anderer *pattern recognition receptors* (PRRs) wie dem von Dendritischen Zellen.

B- und T-Zell Signaling

T- und B-Zellen besitzen als Bestandteile des Rezeptor-Komplexes membrangebundene ITAM-haltige Proteine, bei T-Zellen handelt es sich dabei um CD3 ζ , bei B-Zellen um I α/β . Führt Antigenbindung an den T- oder B-Zell Rezeptor (TCR/BCR) zur Stimulation desselben, kommt es ebenso wie bei NK-Zellen zur Tyrosin-Phosphorylierung der ITAMs durch Kinasen aus der Src-Familie wie z.B. Lck oder Lyn. Die phosphorylierten ITAMs wiederum binden und aktivieren die rezeptornahe Tyrosin-Kinase Syk (Ruland 2003), was über Strukturveränderungen von Adaptorproteinen des Rezeptor-Komplexes unter anderem die Aktivierung von Phospholipase C-gamma (PLC γ) nach sich zieht. Diese wiederum bewirkt die Synthese von *inositol-1,4,5-triphosphate* (IP3) und von Diacylglycerol (DAG). Daraufhin kommt es zur gesteigerten Calcium-Mobilisierung. DAG und Calcium aktivieren die Phosphotyrosin-Kinase C- β (PKC β) in B-Zellen und PKC θ in T-Zellen, welche dann die *linker region* von *Caspase-recruitment-domain(CARD)-membran-associated guanylate kinase* (Carma1) phosphorylieren (Matsumoto 2005, Sommer 2005) und damit die Verknüpfung der *membrane-associated guanylate kinase* (MAGUK)-Region mit der *coiled-coil domain* zweier Carma1 Proteine bewirken. Auf diese Weise werden viele Carma1 Moleküle miteinander verbunden, es kommt zur so genannten „Oligomerisations Kaskade“ (Sun 2004). Indem Carma1 Oligomere dann *B-cell lymphoma 10* (Bcl10) und die *paracaspase mucosaassociated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1* (Malt1) in die Komplexe rekrutieren (Egawa 2003, Gaide 2002, Rawlings 2006) kommt es zur Bildung von *lipid raft*-assoziierten Signalosomen. Dieser CARMA1/ BCL10/ MALT1 Komplex lockt dann die Ubiquitin-Ligase TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*) an, die wiederum den IKK Komplex aktiviert um I κ B α Degradation und NF- κ B Translokation zu bewirken (Sun 2004, Wun 2004).

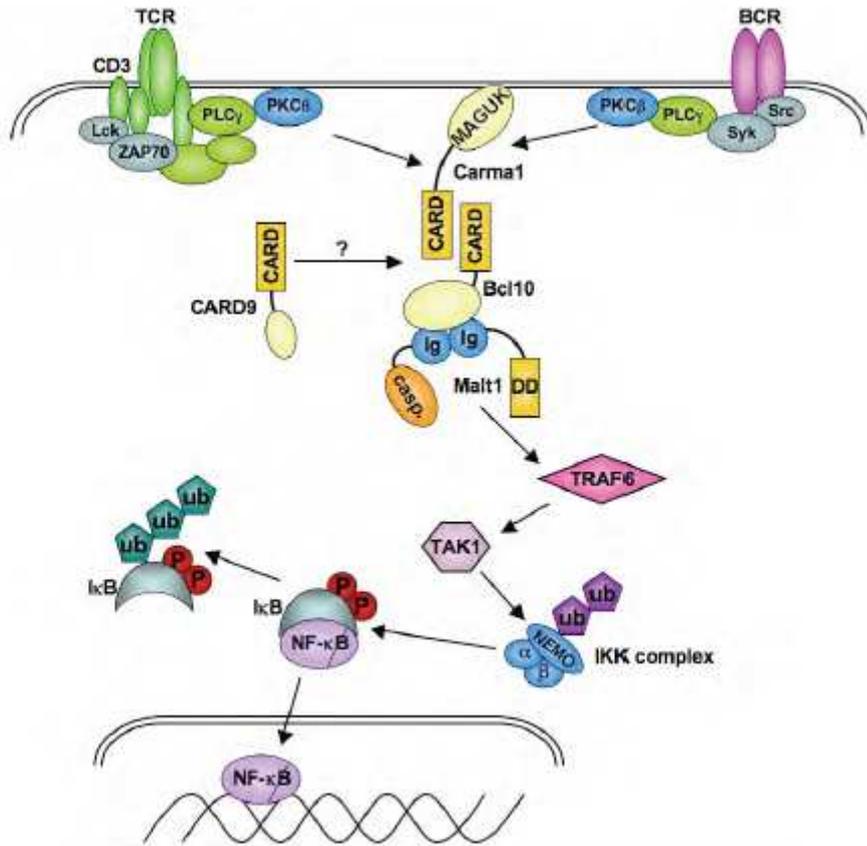


Abb. 4: Bcl10-abhängige Aktivierung von NF-κB bei Stimulation von B- und T-Zell Rezeptor. Abgeändert aus Thome und Tschopp 2003.

NF-κB

Dem Transkriptionsfaktor NF-κB (*nuclear factor κB*) kommt eine besondere Rolle bei der Regulation vieler proinflammatorischer Genprodukte in den verschiedensten Zellen des Immunsystems zu. So unterliegt auch die Expression vieler Gene, welche für proinflammatorische Zytokine in NK-Zellen wie z.B. TNFα, GM-CSF und IFNγ codieren, der Kontrolle durch NF-κB (Hayden 2004, Holloway 2003, Tato 2006).

Zu den 5 Untereinheiten von NF-κB bei Säugetieren gehören die beiden DNA-bindenden Elemente NF-κB1 (p50) und NF-κB2 (p52), sowie RelA (p65), RelB und c-Rel, welche Transaktivierungsfunktion besitzen (Karin 2000, Li 2002,). In unstimulierten Zellen findet man die Proteine des NF-κB Komplexes als Homo- und Heterodimere, welche an inhibitorische κB-Proteine (IκB) gebunden sind. Die Bindung an IκB verhindert, dass NF-κB in den Zellkern eindringen kann und hält es somit in einem inaktiven Zustand. Grundsätzlich gibt es zwei Signalwege, die zu einer Aktivierung von NF-κB führen, den klassischen und den alternativen Signalweg (Bonizzi 2004). Der klassische Signalweg wird durch

verschiedene Oberflächenrezeptoren, wie z.B. B- und T-Zell Rezeptor und den *Toll like* Rezeptor eingeleitet. Durch den I κ B-Kinase(IKK)-Komplex, welcher aus zwei katalytisch aktiven Kinasen (IKK- α und IKK- β) und einer regulatorischen Komponente IKK- γ (auch NEMO genannt) besteht, kommt es zur Phosphorylierung und nachfolgenden Ubiquitinierung und proteolytischen Degradation von I κ B α . Es kommt somit zur Aktivierung von NF- κ B1(p50)-, RelA und c-Rel-haltigen Heterodimeren (Karin 2000, Li 2002). Diese können dann in den Zellkern einzudringen und die Gentranskription aktivieren.

Der alternative Signalweg kann u.a. über bestimmte Mitglieder der *tumor necrosis family* (TNF) aktiviert werden. Hier erfolgt die Bildung von aktiven Transkriptionsfaktoren, bestehend aus NF- κ B2 (p52) und RelB, allein durch IKK α (Porterantz 2002).

MAP-Kinasen

Bei den Mitogen-aktivierten Protein(MAP)-Kinasen handelt es sich um Kinasen, welche spezifisch Serin- und Threonin-Reste phosphorylieren. Dadurch können sie verschiedene zelluläre Funktionen, wie z.B. Genexpression, Mitose, Zelldifferenzierung oder -proliferation steuern (Pearson 2001). Ihre in Reihe geschaltete Aktivierung bezeichnet man als sog. MAPK-Kaskade. Diese umfasst jeweils drei Enzyme: die MAP-Kinase (MAPK), die MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) und die MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK). So wird die MAPKKK über einen extrazellulären Stimulus aktiviert und phosphoryliert die MAPKK, welche wiederum MAPK phosphoryliert (Elion 2000).

Als von Bedeutung in der Immunologie erwiesen sich bislang vor allem die *extracellular signal-regulated kinases* (ERK1 und ERK2), welche Zellproliferation und -differenzierung regeln, die *c-Jun N-terminal kinases* (JNKs), die insbesondere bei Zellstress zum Einsatz kommen, und die p38 (Protein of 38kDa)-Isoformen, von denen bekannt ist, dass sie ebenfalls Zelldifferenzierung aber auch Apoptose regeln. Es konnte gezeigt werden, dass viele Zellrezeptoren die Aktivierung der MAP-Kinasen über die Protein-Kinase C (PKC) steuern (Ashwell 2006, Chang 2001, Chen 2000).

Bcl10

Entdeckt wurde das Adaptorprotein *B-cell lymphoma 10* (Bcl10) im Zusammenhang mit MALT Lymphomen, bei denen eine Translokation des Bcl10-Genes festgestellt wurde (Willis 1999). Die N-terminale Seite besteht aus einer *caspase recruitment domain* (CARD) und die

C-terminale Seite aus einer Ser/Thr-reichen Domäne (Malarkannan 2007). Bcl10 interagiert u.a. mit anderen CARD-Proteinen und ist sowohl in T- als auch in B-Lymphozyten entscheidend an der Signaltransduktion der ITAM-abhängigen Antigen-Rezeptoren beteiligt (Thome 2004). Dass Bcl10 auch in Mastzellen (Chen 2007, Klemm 2006) sowie Dendritischen Zellen und Makrophagen (Ferch 2007, Gross 2006, Hara 2007) von Bedeutung ist, konnte erst vor kurzem gezeigt werden. In ersteren wird das Signal von ITAM-gekoppelten FcεRI Rezeptoren an Bcl10 weitergegeben, während in Dendriten und Makrophagen das Aktivierungssignal von verschiedenen anderen, ebenfalls ITAM-gekoppelten Rezeptoren ausgeht.

Carma1

CARMA1 ist ein Strukturprotein aus der *membrane-associated guanylate kinase* (MAGUK)-Familie und spielt vor allem in Lymphozyten eine entscheidende Rolle bei der Antigenrezeptor-induzierten Aktivierung von NF-κB. Über seine CARD-Struktur kann es u.a. mit Bcl10 interagieren. Zudem besitzt Carma1 eine *coiled-coil domain* und die für MAGUK Proteine typische Anordnung von PDZ, SH3 und einer Guanylatkinase(GUK)-Domäne, welche entscheidend für die Funktion von Carma1 ist (Gaide 2002).

Card 9

Caspase recruitment domain protein 9 (Card9) gehört ebenso wie Bcl10 und Carma1 zur Familie der CARD-Proteine, welche sich durch die charakteristische *caspase-associated recruitment domain* (CARD) auszeichnen. Neben dem CARD-Element besteht es aus einer *coiled-coil* Domäne. Erstmals nachgewiesen wurde Card9 in seiner Funktion als ein mit Bcl10 interagierendes Protein (Bertin 2000). Eine entscheidende Funktion von Card9 konnte zudem für das *signaling* von ITAM-haltigen Rezeptoren wie dem C-Typ Lectin Rezeptor Dectin-1 oder anderen ITAM-gekoppelten Rezeptoren in DCs und Makrophagen gezeigt werden (Groß 2006, Hara 2007).

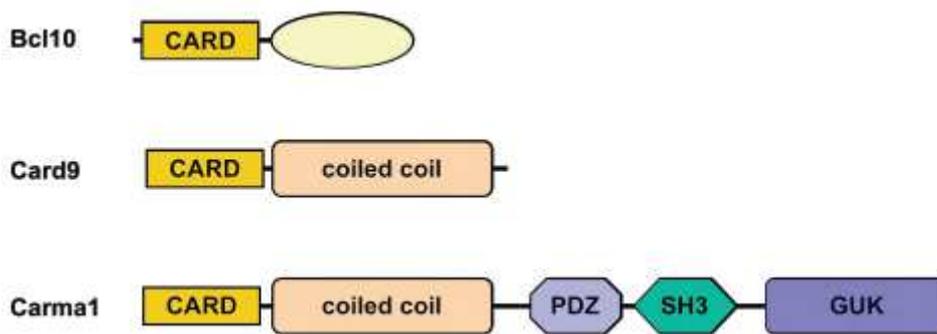


Abb. 5: Die Proteinstrukturen von Bcl10, Card9 und Carma1.

MALT1

Zugeordnet wird das *mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1* (MALT1) der Familie der Parakaspasen, welche durch ihre *caspase-like domain* (CLD) charakterisiert sind (Uren 2000). Neben seiner C-terminalen CLD Struktur, für die bislang noch keine katalytische Aktivität gezeigt werden konnte (Snipas 2004), weist MALT1 eine Amino-terminale *death-domain* (DD) und zwei *Ig-like domains* auf, welche essentiell für die Bindung an Bcl10 sind (Uren 2000).

Funktion und Wirkung von PMA in T-Zellen

Phorbol-12-myristate-13-Acetat (PMA) bewirkt zusammen mit Inomycin mittels Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) eine Stimulation der Zytokinproduktion in T-Zellen (Blumberg 1988, Castagna 1982). Diese Funktion beruht auf der strukturellen Ähnlichkeit von PMA zu Diacylglycerol, einem natürlichen Aktivator der PKC Isoformen. Somit bietet PMA in Kombination mit Iono eine Möglichkeit, die Zytokinproduktion unter Umgehung der Rezeptoraktivierung und des proximalen Signalweges zu stimulieren.

1.3. Problemstellung

Ziel der Arbeit war es, weitere Signalmechanismen in NK-Zellen zu ermitteln, welche bei Stimulation von aktivierenden ITAM-gekoppelten NK-Zell Rezeptoren zur Produktion von Zytokinen und zur Sekretion zytotoxischer Granula führen. Angesichts der engen Verwandtschaft der NK-Zellen zu B- und T-Lymphozyten, lag die Vermutung nahe, dass NK-Zellen einen ähnlichen Signalweg wie diese nutzen. Somit wurden gezielt die Proteine untersucht, welche auch bei B- und T-Lymphozyten an der Signalweitergabe beteiligt sind.

Unter Verwendung von Bcl10, Malt1, Carma1 und Card9 knockout Mäusen sollte also geklärt werden, ob und wenn ja welche Funktion Bcl10 Signalkomplexe in NK Zellen und damit in der anti-viralen Immunität haben.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Mäuse

Zum Zeitpunkt der Experimente waren die Mäuse je 8-16 Wochen alt. In den einzelnen Experimenten wurden jeweils Tiere gleichen Alters und gleichen Geschlechts verwendet. Die Experimente wurden im Einklang mit den lokalen und staatlichen Richtlinien und Gesetzen durchgeführt. Die Tiere entstammten dem Haltungsbereich des Zentrums für Präklinische Forschung am Klinikum rechts der Isar.

Bcl10, Malt1 und Card9 defiziente Mäuse waren alle mindestens in der 5. Generation mit C57B1/6J Mäusen zurückgekreuzt.

Die Card9 defiziente Mauslinie wurde von Olaf Groß (Groß 2006), die Bcl10 und Malt1 defizienten von Jürgen Ruland (Ruland 2001, 2003) generiert und waren alle in der Zucht der Arbeitsgruppe Ruland vorhanden. Knochenmark von Carma1 defizienten Mäusen (Egawa 2003) wurde uns freundlicherweise von Dan Litman, New York, zur Verfügung gestellt.

Die Genotypisierung für Bcl10, Malt1 und Card9 erfolgte jeweils über eine spezifische Polymerasekettenreaktion (siehe Methoden).

Die Expression der zu untersuchenden Rezeptoren wurde mittels FACS überprüft.

Zellen

Yac und Cho Zellen wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Krug zur Verfügung gestellt.

Murine NK-Zellen wurden selbst in Kultur genommen.

Zellkultur-/Einfríermedien

NK-Zell Medium	10 Vol-% VLE FCS 1 Vol-% L-Glutamin (200mM) 1 Vol-% Penicillin/Streptomcin (100u/ml) 0,1 Vol-% β -Mercaptoethanol (50mM) in RPMI 1640
----------------	---

YAC- und CHO-Zell Medium	10 Vol-% VLE FCS 1 Vol-% L-Glutamin (200mM) 1 Vol-% Penicillin/Streptomcin (100u/ml) 0,1 Vol-% β -Mercaptoethanol (50mM) Natriumpyruvat 1mM NEAA 1Vol-% in RPMI 1640
Einfriermedium	20 Vol.-% DMSO 20 Vol.-% FCS/FFP in RPMI/IDMM
Fresh Frozen Plasma (FFP)	Bayrisches Rotes Kreuz, Wiesentheid
Fetal Bovine Serum (FCS) mit Endotoxin/ LPS-Anteil <0,2EU	Perbio, Bonn
L-Glutamin, 200mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Liquemin N 25000	Roche, Mannheim
Penicillin/Streptomycin-Lösung 100U/ml	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium, L-Glutamine Gibco™	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Viren

Die für die *in vitro* als auch *in vivo* verwendeten Tissue Culture-Murinen Cytomegalieviren (TC-MCMV) wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Krug (Krug 2003) zur Verfügung gestellt. Sie wurden dort *in vivo* oder in NIH/3T3- bzw. BHK-Zellen vermehrt.

Chemikalien und biogene Substanzen

Acrylamid /Bisacrylamid, 30%	Bio-Rad, München
Acrylamid , linear	Ambion, Austin, USA
Agarose	Cambrex, Baltimore MD, USA
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Aqua ad iniectabilia	Delta Select, Pfullingen
Aqua Spüllösung	Delta Select, Pfullingen
Bromochloropropan	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
BSA, Fraktion V	BioLabs, Ipswich MA, USA
Calciumionophor	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Carboxyfluorescein-Diacetat- Succinimidylester	Molecular Probes, Leiden
Cyclohexamid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
dNTP-Mix 25mM	Bioline, Luckenwalde
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid 0,7mg/ml	Eurobio, Les Ulis, Frankreich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethylenglykoldiamintetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Forene	Abott GmbH&Co. KG, Wiesbaden
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
2-Mecaptoethanol, 50µM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
OVA-Peptid (323-339)	Gen Script Corp., Piscataway NJ, USA
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Phorbolmyristatsäure	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Phosphat buffered saline (PBS), 10x	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Trypanblau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

Standardlösungen und Puffer

Digestion Solution Master Mix (aus : Wizard SC Genomic DNA Purification System)	200µl Nuclei Lysis Solution 50µl 0,5M EDTA (ph 8,0) 20µl Proteinase K 20mg/ml 5µl RNase Solution 4mg/ml
DNA-Probenpuffer	50 Vol.-% Glycerol 0,05 Vol.-% Bromphenolblau in TAE (1-fach)
Enhancer Solution P (5-fach) FACS-Puffer	Peqlab, Erlangen 0,9 Vol.-% Azid 3,18 Vol.-% FCS in PBS (1-fach)

Detection Reagent1, Peroxide Solution	Amersham Biosciences, Pittsburgh, USA
Detection Reagent2, Laufpuffer (10x)	Amersham Biosciences, Pittsburgh, USA 30,2g Tris 144g Glycin 10 Vol-% SDS ad 1000ml Aqua dest.
Luminol Enhancer Solution Lumigen™ TMA-6, Solution A und B PBS (10-fach)	Amersham Biosciences, Pittsburgh, USA 1,37M NaCl 27mM KCl 81mM Na ₂ HPO ₄ 15mM KH ₂ PO ₄ in Aqua dest.
PCR-Puffer (10-fach) Probenpuffer (2-fach)	Amersham Biosciences, Pittsburgh, USA 12,5ml 0,5M Tris/Hcl, ph 6,8 10g Glycerin 20ml 10% SDS 5mg Bromphenolblau ad 50ml Aqua dest.
Reaktionspuffer (10-fach) Red Cell Lysis Buffer Saponinpuffer	Peqlab, Erlangen eBioscience, San Diego, USA 0,5% Saponin 5% FCS 0,02% Azid 10mM HEPES in PBS
TAE-Puffer (10-fach)	0,4M Tris Base 1,1% Essigsäure 2% 0,5M EDTA (ph 8) in Aqua dest.
TRI Reagent TBS (10-fach)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen 24g Tris Base 80g NaCl ad 1000ml aqua dest. (ph 7.4)

Antikörper

Die folgenden AK wurden von eBioscience, San Diego, USA bezogen:

anti-mouse B220, APC-konjugiert/ FITC-konjugiert/ PE-konjugiert/ Pe-Cy5-konjugiert
anti-mouse CD16/32, stimulierender AK
anti-mouse DX5, APC-konjugiert/ FITC-konjugiert / PE-konjugiert
anti-mouse GM-CSF, PE-konjugiert
anti-mouse IFN γ , FITC-konjugiert
anti-mouse Ly49D, stimulierender AK
anti-mouse Ly49D, FITC-konjugiert
anti-mouse NK1.1, stimulierender AK

anti-mouse NK1.1, APC-konjugiert
anti-mouse NKG2D, stimulierender AK
anti-mouse TNF α , PE-konjugiert

Die folgenden AK wurden von Jackson Immuno Research, Soham, UK bezogen:

goat anti-mouse, IgG
goat anti-rat, IgG
rabbit anti-Syrian hamster, IgG

Enzyme/Zytokine

murines IL-2, IL-15	R&D Systemx, Minneapolis, USA
Taq-DNA-Polymerase 5U/ μ l	Peqlab, Erlangen
Taq-DNA-Polymerase 5U/ μ l	Amersham Biosciences, Pittsburgh, USA
Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Kitsysteme

Wizard SC Genomic DNA Purification System	Promega, Mannheim
BrdU Flow Kits	BD Pharmingen, San Diego
Dneasy: Blood and Tissue Kit	Quiagen, Hilden
pCR2.1-TOPO-Vektor	Invitrogen
Anti-NK Cell (DX5) MicroBeads	Miltenyi Biotec

Verbrauchsmaterialien

Einmalspritzen	Neolab, Heidelberg
Falcon 50ml Röhrchen	Beckton-Dickinson, Heidelberg
Falcon Zellsieb (70 μ M, 100 μ M)	Beckton-Dickinson, Heidelberg
Kryoröhrchen 2ml	Hartenstein, Würzburg
MicroSpin TM G-25 Column	Amersham Biosciences, Pittsburgh, USA
PCR 8-er Röhrchen	Peske GmbH, Dortmund
Pipettenspitzen 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Beckton-Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen gestopft (10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)	Fisher Scientific, Schwerte
Pipettenspitzen ungestopft (10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)	Hartenstein, Würzburg
Zellkulturplatten 15cm ²	TPP, Trasadingen
Zellkulturplatten (96-well, 24-well, 12-well, 6-well)	TPP, Trasadingen
Zellkulturröhrchen 15ml, 50ml	TPP, Trasadingen

Standardgeräte

Agarosegel Elektrophoresekammer	BioRad, München
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
CO ₂ -Inkubator	Nunc GmbH&Co, Wiesbaden
Digitalwaage	Kern&Sohn GmbH, Tübingen
Durchflusszytometer (FACScalibur)	BD, Heidelberg
Entwickler Hyperprocessor	Protec, Oberstenfeld
Geltrockner Modell 583	Bio Rad, München
Heizblock	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Laufkammer SUBCELL® GT	BioRad, München
Lichtmikroskop Axiovert 40C	Zeiss, Jena
Magnetrührgerät	Ika GmbH&Co, Staufen
Nanodrop	Peqlab, Erlangen
Neubauer Zählkammer	Reichert, New York, USA
Phospho Imager	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Phosphor Screen	Amersham Biosciences, Pittsburgh, USA
PCR-Thermocycler	Bio Rad, München
Rollmischer	CAT, Staufen
SDS Elektrophoresekammer	Bio Rad, München
Sterile Werkbank	Holten, Gydevang, Dänemark
Holten Lamin Air1.8	
Spectrophotometer ND-1000	Peqlab, Erlangen
Stromgenerator Powerpack	Bio Rad, München
TaqMan ABI 7700	Applied Biosystems
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Vortex	Scientific Industries, New York, USA
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Wasserbad	Memmert, Schwabach

Verwendete Software

FlowJo Software	Tree Star Inc., Ashland OR
Microsoft Excel	Microsoft, Unterschleißheim

2.2. Methoden

2.2.1 Genotypisierung

Um Bcl10, Malt1 und Card9 im Genom der Mäuse nachzuweisen, wurde aus einem ca. 0,5cm langen Stück Mausschwanz mit Hilfe des Wizard[®] SV Genomic DNA Purification Systems (Promega, Mannheim) entsprechend den Herstellerangaben die DNA extrahiert. Anschließend wurde die murine DNS mittels PCR amplifiziert. Hierzu wurden 2µl aufgereinigte DNS in ein PCR-Röhrchen vorgelegt und 10,25µl aqua ad iniectabilia, 5µl enhancer solution P, 2µl 10x Reaktionspuffer, 2,5µl dNTP-Mix 25mM, 1µl flanking primer, 1µl neo-primer/ 1µl wildtyp primer und 0,25µl Taq-DNS-Polymerase 5u/µl zugegeben. Zur Amplifikation wurde ein Thermozykler verwendet.

Für die Bcl10 PCR und Malt1 PCR wurde die DNS zur initialen Denaturierung für 4min auf 92°C erhitzt. In 35 Zyklen wurde die DNS dann denaturiert, die Primer angelagert und der neue Strang verlängert. Jeweils innerhalb 1min erfolgte die Denaturierungsphase bei einer Temperatur von 92°C, die Anlagerungsphase bei 68°C und die Elongationsphase bei 72°C. Nach dem letzten Zyklus wurden die Proben für 10min auf 72°C aufgeheizt und anschließend bis zur weiteren Verwendung auf 4°C abgekühlt.

Anschließend wurde die so amplifizierte DNA auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und unter Anlegen von 100 Volt Spannung innerhalb von 90min nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Um das Gel zu erhalten, wurden 200ml 1xTAE mit 2g Agarose in der Mikrowelle erhitzt und nach Abkühlen auf weniger als 55°C 15µl Ethidiumbromid hinzugegeben. In das in Form erkaltete Gel wurden je 18µl DNS und 2µl Lastfarbstoff geladen. Bei dem Laufpuffer handelte es sich um 1xTAE.

2.2.2 Gewinnung von NK-Zellen aus der Milz

Zur Gewinnung von Splenozyten wurde die Milz unter der Sterilbank entnommen und zur Herstellung einer Einzellsuspension zunächst durch einen 100µm Zellsieb, dann durch ein 70µm Zellsieb passiert und dieses anschließend mit NK-Zell Medium gespült.

Nach Zentrifugation (1500rpm, 5min, 4°C) wurden die entstandenen Zellpellets vom Überstand getrennt und die Erythrozyten mittels *Red Blood Cells Lysis Buffer* eliminiert.

Anschließend wurden die Zellen in Kultur genommen bzw. mittels „*micro-beads*“ (siehe unten) aufgereinigt.

2.2.3 Aufreinigen von NK-Zellen mittels MACS (*Magnetic Cell Sorting*)

Der Großteil muriner NK-Zellen trägt die typischen Oberflächenmarker NK1.1 (Koo 1984) und DX5 (Ortaldo 1997). Um aus den wie oben beschrieben gewonnenen Milzzellen die NK-Zellen zu isolieren, wurde eine Positiv-Aufreinigung mittels Anti-DX5-Beads (Miltenyi Biotec) entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Hierbei wurden die NK-Zellen auf einer magnetisierten LS-Separationssäule angereichert und in Folge mittels MACS-Puffer herausgewaschen.

Die so gewonnenen Zellen wurden gezählt und in der FACS-Analyse nach Färbung auf DX5, NK1.1 und CD3 auf ihre Reinheit untersucht. NK-Zellen stellen sich in der FACS-Analyse als $DX5^+CD3^-$ bzw. $DX5^+NK1.1^+$ Zellpopulation dar, wie beispielhaft in Abbildung 2.1 dargestellt. Die Reinheit der $DX5^+$ Zellen betrug zwischen 60 und 85%. Für weitere Experimente wurde die Zahl der $DX5^+$ Zellen entsprechend der FACS- Analyse angeglichen.

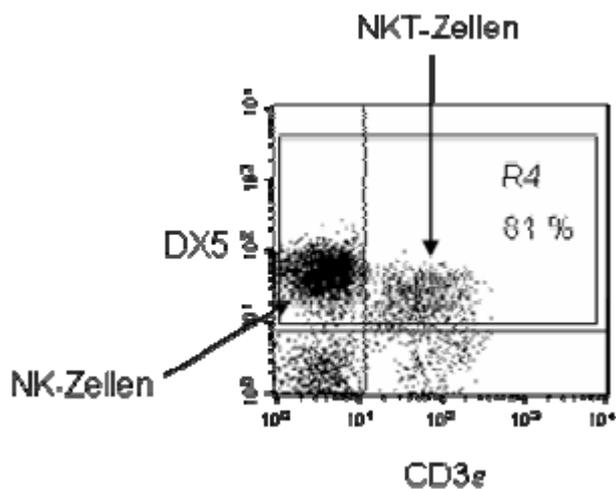


Abb. 6: NK-Zell Population nach Aufreinigung mit MACS. Durchflusszytometrie nach Färbung mit Anti-DX5-PE und Anti-CD3-FITC.

2.2.4 Zellkultur

Grundsätzlich wurden alle Zellkulturarbeiten unter der Sterilbank durchgeführt.

Die aufgereinigten NK-Zellen wurden für zwei Tage in dem entsprechenden Medium mit zusätzlich je 250U/ml IL-2 und IL-15 auf 6-Loch-Platten in Kultur genommen. IL-2 dient v.a. dem *Survival* der Zellen in Kultur, IL-15 bewirkt mittels Stimulation der Proliferation eine deutliche Zunahme der NK-Zellzahl und führt zu einer Voraktivierung, so dass die Zellen später vermehrt Zytokine (v.a. IFN γ und MIP1 α) produzieren. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 90% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO $_2$ -Atmosphäre. Die NK-Zellen konnten in der Durchflusszytometrie anhand ihrer Oberflächenmarker NK1.1, Ly49D und CD49b identifiziert und somit die Reinheit der Zellen bestimmt werden.

2.2.5 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Zellzahl und Vitalität der Zellen wurde mikroskopisch mit einer Neubauer-Zählkammer unter Verwendung von Trypanblau bestimmt. Lebende Zellen mit intakter Membran nehmen keinen Farbstoff auf. Zellen mit permeabilisierter Zellmembran werden durch Trypanblau angefärbt.

2.2.6 NK-Zell-Zytotoxizitäts Assay: ^{51}Cr -Release-Assay

Beim ^{51}Cr -Release-Assay handelt es sich um die Standardmethode zur Bestimmung der NK-Zell Zytotoxizität. Um die NK-Zellen vorzuaktivieren, wurden die Spendermäuse 36h vor Splenektomie mit 5×10^5 plaque forming units (PFU) SG-MCMV in einem Gesamtvolumen von 400 μl intraperitoneal infiziert. Nach Entnahme der Milz wurden die NK-Zellen mit anti-DX5 *microbeads* entsprechend der Gebrauchsanweisung des Herstellers aufgereinigt (siehe oben). Der Anteil der DX5 $^+$ Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie festgestellt und befand sich zwischen 60 und 85%. Diese Schwankungen wurden bei Einstellen der NK-Zell Konzentration berücksichtigt und eine einheitliche Zellkonzentration von je 1×10^6 /ml eingestellt.

Als Zielzellen wurden YAC-1 und CHO Zellen verwendet. YAC-1 exprimieren NKG2D-Liganden aus der Familie der Rae-1 Proteine, CHO Zellen exprimieren Ly49D-Liganden. Dadurch können diese Zellen von aktivierten NK-Zellen erkannt werden. Für den ^{51}Cr -

Release-Assay wurden jeweils 1×10^5 Zielzellen mit ^{51}Cr markiert. Hierfür wurden die Zielzellen abzentrifugiert (1200rpm, 10min, 4°C) und der Überstand bis auf $30\mu\text{l}$ abgesaugt. Unter den entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen wurden je $70\mu\text{l}$ Chromium (1mCi/ml in Medium verdünnt) hinzugefügt, welches die Zellen während einer Inkubationszeit von 2h bei 37°C und 5% CO_2 aufnahmen, dabei wurden sie alle 15min resuspendiert. Nach 3 maligem Waschen mit RPMI (2 x 800rpm, 10min, RT und 1 x 1200rpm, 10min, RT) um nicht aufgenommenes Chrom zu entfernen, wurden die Zielzellen auf eine Konzentration von $5 \times 10^4/\text{ml}$ eingestellt. In einer 96-Loch-Rundbodenplatte wurden die NK-Zellen in Triplikaten, ausgehend von 2×10^5 pro Vertiefung, seriell 1:2 verdünnt. Durch Zugabe von jeweils 5×10^3 Zielzellen pro Vertiefung entstanden unterschiedliche Verhältnisse von Effektorzellen zu Zielzellen. Um die NK-Zellen mit den Zielzellen in Kontakt zu bringen, wurden sie 5min bei 500rpm und RT zentrifugiert. Nach einer 5stündigen Inkubationszeit bei 37°C wurden jeweils $50\mu\text{l}$ Überstand abgenommen und die Menge an freigesetztem Chrom im Gamma-Zähler (Packard Top-Count-NXT C384V00) bestimmt. Die maximale Chromfreisetzung wurde durch Lyse von Zielzellen bei Zugabe von 1%igem NP40 ermittelt. Die Spontanlyse betrug weniger als 15% der Totallyse. Die spezifische Lyse (%) konnte nach folgender Formel berechnet werden:

$$\frac{(\text{experimentell ermittelte Lyse} - \text{Spontanlyse}) \times 100 \%}{(\text{Totallyse} - \text{Spontanlyse})}$$

2.2.7 Stimulation von NK-Zellen zur Zytokinproduktion

Um die NK-Zellen zur Zytokinproduktion anzuregen, wurden 6-Loch-Platten unter der Sterilbank nach dem unten gezeigten Schema mit AK beschichtet.

Nach einer Inkubationszeit des aufgetragenen *Capture-AK* ($800\mu\text{l/Loch}$ mit einer Konzentration von $30\mu\text{g/ml}$) von 4h bei RT wurde der Überstand von der Platte abgesaugt und diese 2 x mit je 2ml PBS gespült. Anschließend wurde der stimulierende AK ($800\mu\text{l/Loch}$ mit einer Konzentration von $30\mu\text{g/ml}$) aufgetragen. Nun folgte eine Inkubationszeit von 10h bei 4°C , der Überstand wurde abgesaugt und 2 x mit je 2ml PBS gespült.

unstimuliert/ Medium	nur Capture AK (goat-anti-mouse IgG)	PMA/Iono (kein Capture AK)
----------------------	--------------------------------------	----------------------------

NK1.1 IgG)	(goat-anti-mouse	Ly49D (goat-anti-rat IgG)	NKG2D (rabbit-anti-hamster IgG)
---------------	------------------	---------------------------	------------------------------------

Auf die so präparierten Platten wurden nun je 8×10^6 NK-Zellen in 2ml PBS gegeben. Zusätzlich wurden NK-Zellen mit Phorbol-12-myristate-13-Acetat (PMA) und Ionomycin (Iono) (1µl PMA, 1µl Iono in 8µl PBS) inkubiert. PMA bewirkt in Kombination mit Iono über Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) eine Stimulation der Zytokinproduktion in T-Zellen. So kann eine Zytokinproduktion unter Umgehung der Rezeptorstimulation bewirkt werden. Unter Annahme, dass NK-Zellen denselben proximalen Signalweg nutzen wie T-Zellen, wurde hier von einer resultierenden Zytokinproduktion ohne vorherige Rezeptorstimulation ausgegangen.

Nach einstündiger Inkubationszeit bei 37°C erfolgte die Zugabe von Monensin (Endkonzentration: 30µM). Monensin führt dazu, dass die Vesikel des Golgi-Apparates nicht mehr mit der Zellmembran verschmelzen können und somit das Ausschütten der durch die Stimulation produzierten Zytokine ausbleibt. Es folgten weitere 4h Inkubation bei 37°C.

Die so für 5 Stunden stimulierten Zellen wurden nun von den 6-Loch-Platten in FACS-Röhrchen übertragen. Um dabei keine Zellen zu verlieren, wurden die Böden der 6-well-Platten mittels Zellschaber und durch mehrmaliges Spülen mit PBS von noch anhaftenden Zellen befreit.

2.2.8 Durchflusszytometrie

Detektion von Oberflächenmarkern

Um die murinen Zellen gegeneinander abgrenzen zu können, wurden spezifische Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie/FACS (*Fluorescence activated cell sorting*) detektiert. Hierzu wurden je zwischen 2×10^5 und 5×10^5 Zellen zunächst mit je 10µl FC-Block (Anti-Maus FcγRIII/CD32-Antikörpern) für 15min inkubiert um ein Binden des FC-Rezeptors an den FC-Teil des FACS-Antikörpers zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen NK1.1, DX5 und CD3 markiert. Die Färbung erfolgte für 20min bei 4°C. Dazu wurden 20µl Zellsuspension in FACS-Puffer mit 0,5µl der

entsprechenden AK gut vermischt. Anschließend wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit FACS- Puffer für 20 min bei 4°C mit PBS 2% PFA fixiert.

Detektion intrazellulärer Zytokine

Die Detektion der produzierten Zytokine nach Stimulation der NK-Zellen erfolgte mittels intrazellulärer FACS-Färbung. Zunächst wurden die stimulierten Zellen einmal mit PBS 2% FCS gewaschen. Dann folgte die wie oben beschriebene Färbung der Oberflächenmarker (jedoch ohne die Zellen zu fixieren) und anschließend die Permeabilisation mit je 1ml Saponin-Puffer. Anschließend wurden die Proben halbiert und alle mit FITC-konjugiertem AK gegen IFN γ und jeweils die Hälfte entweder mit PE-konjugiertem AK gegen TNF α oder GM-CSF während 20min im Dunkeln bei RT „angefärbt“. Zuletzt erfolgte noch je ein Waschgang mit Saponin-Puffer und FACS-Puffer.

2.2.9 Bestimmung der Zytokinproduktion mittels ELISA

Der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ist eine biochemische Methode um spezifisch ein Protein in Lösung nachzuweisen. Das Prinzip besteht in der Verwendung zweier Antikörper. Der erste bindet spezifisch an die zu messende Substanz, der zweite wiederum bindet an die entstandenen Antigen-Antikörper Komplexe. Das Enzym, an welches der zweite Antikörper gebunden ist, spaltet dann ein chromogenes Substrat, wobei ein messbares Signal entsteht.

Für den ELISA wurden die NK-Zellen mit anti-DX5 microbeads aufgereinigt und dann für 7 Tage mit 50ng/ml IL-15 in Kultur genommen. Dies hatte eine praktisch reine NK-Zell Population zur Folge, was mittels Analyse von NK1.1, Ly49D und CD49b in der Durchflusszytometrie kontrolliert wurde. Je 2×10^6 dieser NK-Zellen wurden dann pro *well* auf 96-*well* Platten aufgetragen und für 24h mit anti-NK1.1, anti-Ly49D, anti-Ly49H oder anti-NKG2D Antikörpern (5 μ g/ml in PBS), welche zuvor mittels *Capture* Antikörper an den Plattenboden gebunden wurden, oder 10-100ng/ml PMA und Ionomycin bei 37°C inkubiert. Nach Abschluss der Stimulationsdauer wurden die Überstände abgenommen, 5min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und zellfrei in ein frisches Gefäß überführt. Die Zytokinfreisetzung im Zellüberstand wurde dann mittels ELISA gemessen. Für IFN γ , TNF α und GM-CSF wurden die entsprechenden Reagenzien von BD und für MIP1 β von R&D Systems entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

2.2.10 Western Blot

Um die Rolle von Bcl10 und Malt1 bzgl. der Aktivierung von NF- κ B und den MAP-Kinasen p38, Jnk und ERK zu untersuchen, wurde die Degradation von I κ B α , sowie die phosphorylierte Form der MAP-Kinasen mittels Western Blot bestimmt. Hierzu wurden aufgereinigte, mit IL-15 expandierte NK-Zellen von Wildtyp, Bcl10 und Malt1 defizienten Mäusen mit anti-NK1.1, anti-Ly49D oder PMA/Iono stimuliert. Die AK wurden mittels *capture* AK in einer Konzentration von 5 μ g/ml in PBS während 3h bei 37°C an den Boden von 6-Loch Platten gebunden. Anschließend wurden die NK-Zellen in einer Dichte von 2×10^6 /ml PBS zugegeben und für 20 oder 60 Minuten inkubiert. Die NK-Zell Lysate wurden dann mittels *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) im elektrischen Feld getrennt und die Proteinbanden auf der Membran mit Hilfe spezifischer AK gegen I κ B α , phosphoryliertes (p)ERK (Thr202/Tyr204), pJnk (Thr183/Tyr185) und p38 (Thr180/Tyr182) analysiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden zuvor durch mehrere Waschschrte wieder entfernt. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Die Antikörper wurden von New England Biolabs Inc. bezogen.

2.2.11 Viruslast/NK-Zell Proliferation

Den Tieren ähnlichen Alters wurden $1,25 \times 10^5$ PFU SG-MCMV in 400 μ l PBS intraperitoneal injiziert. An Tag 3 bzw. Tag 6 nach Infektion wurden die Tieren euthanasiert und Milz und Leber entnommen. 3h vor Entnahme der Organe wurden 200 μ l BrdU-Lösung (c = 10mg/ml) intraperitoneal gespritzt.

NK-Zell-Proliferation

Ca. ein Drittel der Splenozyten wurde zur Bestimmung der NK-Zell Proliferation verwendet. Dazu wurde das BrdU Flow Kit (BD Pharmingen, San Diego) entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet. Um die NK-Zellen identifizieren zu können, wurden sie zudem auf NK1.1, DX5 und CD3 angefärbt. In der Durchflusszytometrie konnten dann die BrdU-haltigen NK-Zellen ermittelt werden.

Viruslast

Isolation der viralen DNA aus infiziertem Gewebe

Die restlichen Splenozyten, sowie die Leber der Tiere dienten der Bestimmung der Viruslast an Tag 3 bzw. 6. Hierzu wurden die Organe zunächst mit dem Dneasy[®] Blood & Tissue Reaktionssystem (Quiagen, Hilden, D) entsprechend den Herstellerangaben verdaut, die Gesamt-DNA isoliert und mit H₂O in einer Konzentration von 10ng/μl eingestellt. Um zunächst einmal die virale DNA qualitativ nachzuweisen, wurde eine Standard-PCR mit Amplifizierung einer spezifischen Sequenz des M54-Gens nachgewiesen.

Herstellung des M45-Plasmids zur Quantifizierung der MCMV-Kopien

Um die Viruslast auch quantitativ ermitteln zu können, wurden zunächst M54-Plasmide hergestellt. Dies erfolgte indem das M54-PCR-Produkt in den pCR2.1[®]-TOPO[®]-Vektor entsprechend den Herstellerangaben hineincloniert wurde. Nach Transformation von chemokompetenten TOP10 Zellen wurden die rekombinanten Bakterienkolonien auf LB/Ampicillin Agar angezüchtet. Um die Plasmid-DNA anschließend aus den transformierten *E. coli* zu isolieren, wurde das QIAprep[®]-Plasmidisolationsreaktionssystem (Quiagen, Hilden) verwendet und entsprechend dem Herstellerprotokoll vorgegangen. Mittels Extinktion bei 280nm im Spektrophotometer konnte die Konzentration der gewonnenen DNA bestimmt werden. Für reine Plasmid-DNA sollte das Extinktionsverhältnis A_{250}/A_{280} zwischen 1,8 und 2,0 liegen, wobei mittels Extinktion bei 280nm die Proteinkontamination bestimmt wurde.

Der richtige Klon konnte mittels Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym EcoRI identifiziert werden. Hier sollten zwei DNA Fragmente im Gel erscheinen, einerseits das Insertionsprodukt M54 mit 246bp, andererseits der Vektor mit einer Größe von 3,9kb. Dafür wurden 1μl DNA mit 2μl 10fach EcoRI Puffer, 1μl EcoRI und H₂O zusammen für 2min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 20μl auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und als Marker eine 1kb und eine 100bp DNA-Leiter verwendet.

Der auf diese Weise ermittelte richtige Klon wurde nun in einer 1:1000 Verdünnung in 4ml LB/Ampicillin-Flüssigmedium eingimpft und 14h inkubiert. Der so expandierte Klon wurde anschließend bei -80°C eingefroren. Dazu wurden 600μl der Bakteriensuspension mit 400μl Glycerol 50% vermischt.

Absolute Quantifizierung der Viruslast infizierter Organe mittels qRT-PCR

Die durchschnittliche molare Masse eines doppelsträngigen Basenpaares beträgt 660g/mol, wobei ein mol 6×10^{23} Moleküle enthält.

Um die Kopienzahl einer gegebenen Plasmidkonzentration zu ermitteln, wurde folgendes berechnet:

$$\begin{aligned} \text{Molare Masse des Plasmides (g/mol)} &= \text{Plasmidgröße (bp)} \times 660\text{g/mol} \\ \text{Stoffmenge (mol/}\mu\text{l)} &= \text{Konzentration der Plasmidlösung (g/}\mu\text{l)}/\text{molare} \\ &\quad \text{Masse des Plasmides (g/mol)} \\ \text{Kopienzahl pro } \mu\text{l Plasmidlösung} &= \text{Stoffmenge des Plasmides (mol/}\mu\text{l)} \times 6 \times 10^{23} \end{aligned}$$

Für das M54-Plasmid ergibt sich daher:

$$\begin{aligned} \text{Größe des M54-Plasmides} &= 3900\text{bp (TOPO®-Vektor)} + 246\text{bp (M54-} \\ &\quad \text{Insert)} \\ &= 4146\text{bp} \\ \text{Konzentration der Plasmidlösung} &= 67,18\mu\text{g/ml} = 6,72 \times 10^{-10}\text{g/}\mu\text{l} \\ \text{Molare Masse des M54-Plasmides} &= 4146 \text{ bp} \times 660\text{g/mol} \\ &= 2,73636 \times 10^6\text{g/mol} \\ \text{Stoffmenge der M54-Plasmidlösung} &= 6,72 \times 10^{-10}\text{g/}\mu\text{l} \times (2,73636 \times 10^6\text{g/mol})^{-1} \\ &= 2,46 \times 10^{-14}\text{mol/}\mu\text{l} \\ \text{Kopienzahl/}\mu\text{l} &= 2,46 \times 10^{-14}\text{mol/}\mu\text{l} \times 6 \times 10^{23}\text{mol}^{-1} \\ &= 1,47 \times 10^{10}\text{Moleküle/}\mu\text{l} \end{aligned}$$

Für die qRT-PCR wurden jeweils 50ng Organ-DNA in Duplikaten eingesetzt. Als Quantifizierungsstandard wurde das M54-Plasmid in Triplikaten und Log-Verdünnungsstufen ausgehend von 10^8 Kopien bis 10^1 Kopie eingesetzt. Dabei wurden die Verdünnungen so gewählt, dass die gewünschte Kopienzahl in $5\mu\text{l}$ enthalten war. Der Reaktionsansatz für Proben und Standard betrug $25\mu\text{l}$.

Die qRT-PCR wurde in einem Taqman® ABI PRISM™ 7700 bei einer Annealing-Temperatur von 60°C durchgeführt. Als Negativkontrolle diente eine Wasserprobe ($\text{CT} > 40$). Abb. 9 zeigt das repräsentative Ergebnis der Standardkurve. Bei linearer Auftragung der CT Werte gegen die Verdünnungsstufe ist die Steigung ein Maß für die PCR-Effizienz. Diese berechnet sich nach der Formel: $\text{Effizienz (E)} = 10^{(-1/m)}$, wobei m die Steigung der

Standardkurve ist (Rasmussen 2001). Bei der hier vorliegenden Steigung von -3,45 beträgt die PCR-Effizienz 1,95 (= 97,5%).

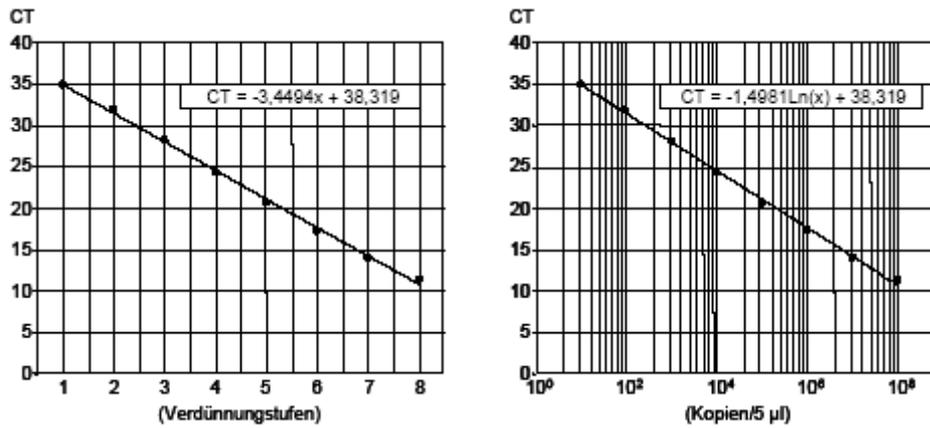


Abb. 7: M54-Plasmidstandardkurve in linearer und logarithmischer Auftragung.

Durch logarithmische Auftragung der CT Werte gegen die Verdünnungsstufe ergibt sich aus der Geradengleichung die Funktion zur Berechnung der Kopienzahl (x):

$$x = -1,4981 \ln(x) + 38,319$$

$$\ln(x) = \frac{CT - 38,319}{-1,4981}$$

$$x = e^{\left[\frac{CT - 38,319}{-1,4981} \right]}$$

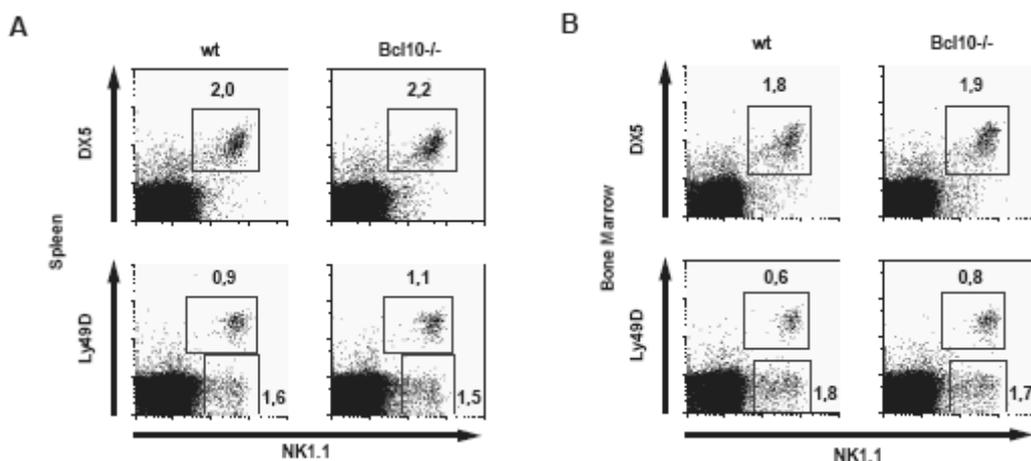
3. Ergebnisse

Mittels Bcl10, Malt1, Card9 und Carma1 defizienter Mäuse wurde die Bedeutung dieser Proteine für die Signaltransduktion in NK-Zellen untersucht. Der jeweilige Status der Mäuse wurde durch DNS-Extraktion aus einer Schwanzbiopsie und anschließender PCR bestimmt.

3.1 Normale Entwicklung und normales Überleben von NK-Zellen in Abwesenheit von Bcl10

Zunächst sollte die Entwicklung von NK-Zellen in Abwesenheit von Bcl10 ermittelt werden. Hierzu wurden Bcl10 defiziente mit Wildtyp NK-Zellen aus Knochenmark, Milz und Leber der Mäuse verglichen. Durch Anfärben der typischen NK-Zell Oberflächenmarkern DX5, Ly49D und NK1.1 konnte in der Durchflusszytometrie der Anteil und die Gesamtzahl von NK-Zellen in den oben genannten Organen der Tiere ermittelt werden.

Zusammenfassend zeigte sich, dass in den Bcl10 defizienten Tieren ein normaler Anteil und eine normale Gesamtzahl von DX5, Ly49D und NK1.1 positiven Zellen existiert. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass Bcl10 keine Bedeutung für die Entwicklung der NK-Zellen hat. Des Weiteren scheint auch das Überleben der NK-Zellen *in vitro* von Bcl10 unabhängig zu sein. So zeigten in Kultur genommene NK-Zellen, unabhängig davon, ob Wildtyp oder Bcl10 defizient, bzgl. Zellzahl und Anteil abgestorbener Zellen keinen Unterschied.



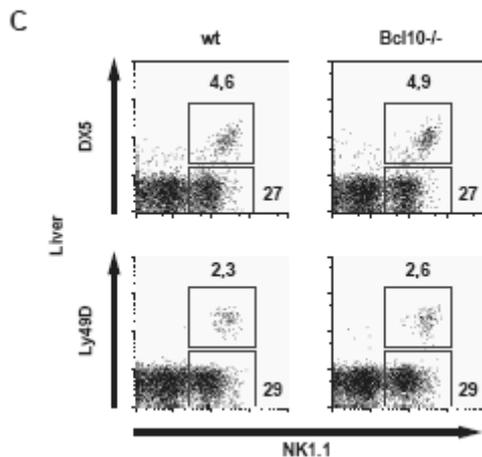


Abb. 8: Das Fehlen von Bcl10 hat keinen Einfluss auf die Entwicklung von NK-Zellen. Zellen aus Milz (A), Knochenmark (B) und Leber(C) wurden mit fluoreszierenden AK gegen die Oberflächenmoleküle DX5, Ly49D und NK1.1 angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hier wurden die NK1.1⁺ Zellen gegen die Ly49D⁺ bzw. DX5⁺ Zellen aufgetragen. Die angegebenen Werte stellen den Prozentsatz der jeweils positiv gemessenen Zellen an der Gesamtzellzahl dar.

3.2 Gestörte Zytokinproduktion in NK-Zellen Bcl10 defizienter Mäuse

Neben ihrer Fähigkeit Zielzellen zu lysieren, stellt vor allem die Produktion von Zytokinen eine essentielle Funktion von NK-Zellen dar. Besonders wichtig sind hierbei IFN γ und TNF α . Um die Bedeutung von Bcl10 in diesem Zusammenhang zu ermitteln, wurden die Bcl10-defizienten Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Tieren auf ihre Zytokinproduktion hin untersucht. Dazu wurden zunächst Zellsuspensionen aus Milzzellen von Wildtyp- und Bcl10 defizienten Mäusen hergestellt und diese Zellen anschließend mit agonistischen Antikörpern stimuliert, welche sich gegen die aktivierenden NK-Zell Rezeptoren NK1.1, Ly49D und NKG2D richten. Die agonistischen AK wurden mittels *capture AK* an den Boden von 6-Loch-Platten gebunden und anschließend die NK-Zellen hinzu pipettiert. Um zu verhindern, dass die NK-Zellen die produzierten Zytokine sezernieren, wurde nach 1h Inkubationszeit Monensin hinzugegeben. Durch diesen sog. *golgi plug* wird das Verschmelzen der Zytokin-haltigen Vesikel mit der Zellmembran verhindert. Nach insgesamt 5stündiger Stimulation wurden der spezifische Oberflächenmarker DX5 und nach Permeabilisierung mit Saponin-Puffer die intrazellulär vorliegenden Zytokine mit den entsprechenden FACS-AK angefärbt. Anschließend wurden in der Durchflusszytometrie IFN γ und TNF α produzierende NK-Zellen detektiert. Es zeigte sich, dass der Anteil zytokinproduzierender NK-Zellen in den Milzen der

Bcl10 defizienten Tiere im Vergleich zu den Wildtyp Tieren stark reduziert ist. Folglich muss Bcl10 ein essentieller Bestandteil dieses Signalweges sein.

Als Negativ-Kontrolle wurden NK-Zellen in Medium ohne stimulierende AK inkubiert. Außerdem wurde eine Kontrollgruppe nur mit *capture* AK inkubiert, um eine spezifische Stimulation der entsprechenden stimulierenden AK sicherzustellen und auszuschließen, dass die NK-Zellen über Bindung des Fc-Teils der *capture* AK an den Fc γ RIII stimuliert worden sind. Die Zytokinproduktion der Kontrollgruppe war entsprechend der Zytokinproduktion der Negativ-Kontrolle (hier nicht mit abgebildet).

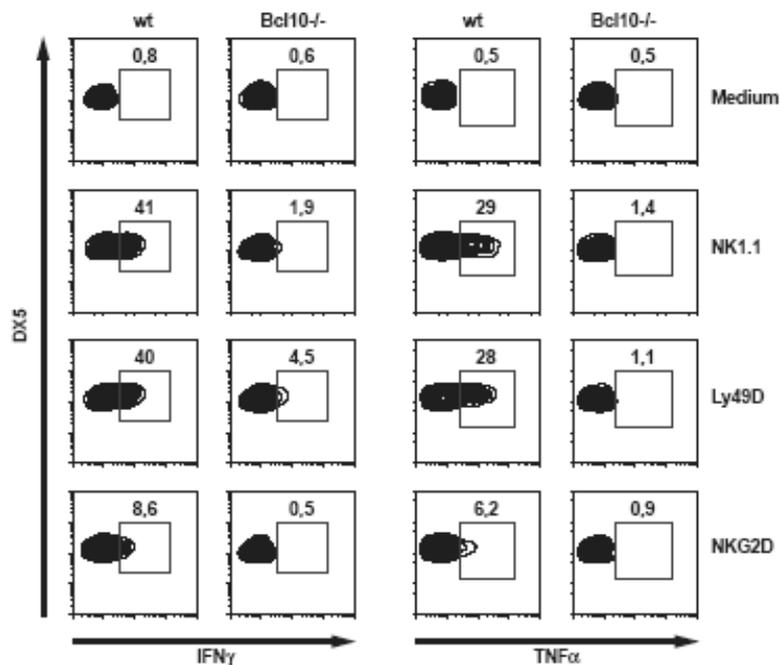


Abb. 9: Gestörte Zytokinproduktion in Abwesenheit von Bcl10. Splenozyten von Wildtyp und Bcl10 defizienten Mäusen wurden mit spezifischen AK gegen NKG2D, Ly49D und NK1.1 sowie PMA/Iono stimuliert. Als Negativkontrolle wurden Zellen nur in Medium inkubiert. Mittels FACS-AK wurde sowohl extrazellulär DX5 als auch intrazellulär die Zytokine IFN γ und TNF α angefärbt und anschließend die Zellen in der Durchflusszytometrie analysiert. Analysefenster auf DX5⁺ Zellen.

3.3 Zytokinproduktion nach Vorstimulation mit IL-15

IL-15 gilt als ein starker Stimulus für NK-Zell-Wachstum und Reifung sowie die Produktion von IFN γ durch NK-Zellen (Biron 1999). Nun stellte sich die Frage, ob eine Vorstimulation der NK-Zellen mit IL-15 die Beeinträchtigung der Zytokinproduktion in Abwesenheit von Bcl10 unter Umständen aufheben könnte. Zu diesem Zweck wurden für dieses Experiment die

aufgereinigten NK-Zellen aus den Milzen von Bcl10, Malt1 defizienten und wt Mäusen vor Stimulation für 7 Tage mit IL-15 in Kultur genommen. Dies führte zu starker NK-Zell Proliferation und folglich zu einer praktisch reinen NK-Zell Kultur. Anschließend wurden die Zellen für 24h mit agonistischen AK gegen NK1.1, Ly49D, Ly49H, NKG2D oder PMA und Iono stimuliert. Als Negativkontrolle wurden NK-Zellen in reinem Medium inkubiert. Der Überstand wurde im ELISA auf die Zytokine IFN γ , TNF α , GM-CSF und MIP1 β untersucht. Es zeigte sich, dass die NK-Zellen der Bcl10 defizienten Tiere auch hier, nach Vorstimulation mit IL-15, eine defekte Zytokinproduktion aufweisen. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass nicht nur die Produktion von IFN γ und TNF α gestört ist, sondern auch ein Defizit für die Produktion der Zytokine GM-CSF und MIP1 β vorliegt. Dementsprechend kann IL-15 den Defekt in der Zytokinproduktion nicht aufheben (siehe Abb.10).

3.4 Auch Malt1 ist für die Zytokinproduktion essentiell

Wie bereits erwähnt, ist von anderen Immunzellen wie Lymphozyten, Dendriten und Makrophagen bekannt, dass Bcl10 mit Malt1 Komplexe bildet um Signale weiterzuleiten. Um die Bedeutung von Malt1 für die Aktivierung von NK-Zellen zu ermitteln, wurden in diesem Experiment neben Bcl10 defizienten auch Malt1 defiziente NK-Zellen mit spezifischen AK gegen die aktivierenden Rezeptoren NK1.1, Ly49D, Ly49H und NKG2D stimuliert. Die Zytokinproduktion wurde im Überstand mittels Elisa bestimmt. Bei den Malt1 defizienten NK-Zellen zeigte sich ein ähnliches Defizit in der Zytokinproduktion wie bei den Bcl10 defizienten Zellen. Dies führt zu der Annahme, dass auch Malt1 an der Aktivierung von NK-Zellen entscheidend beteiligt ist (siehe Abb.10).

3.5 Bcl10 und Malt1 sind in der Signaltransduktion von NK-Zellen PKCs nachgeschaltet

Im gleichen Experiment wurde neben den Antikörpern gegen die stimulierenden NK-Zell Rezeptoren auch PMA (*phorbol myristate acetate*) zusammen mit Ionomycin (*calcium ionophore ionomycin*) als Stimulans eingesetzt. PMA/Iono ist bekannter Stimulator der PKCs in Lymphozyten. Unter der Annahme, dass die Signaltransduktion in NK-Zellen ebenso wie in T- und B-Lymphozyten über PKCs laufen könnte, wäre so eine direkte Aktivierung der Zelle unter Umgehung des rezeptornahen Signalweg möglich.

Während die Zellen der Wildtyp-Mäuse große Mengen von $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, GM-CSF und $\text{MIP1}\beta$ als Antwort auf die Stimulation mit PMA/Iono produzierten, war die Synthese dieser Zytokine in Abwesenheit von Bcl10 und Malt1 deutlich gestört. Dies bestätigt die Annahme, dass auch NK-Zellen PKCs nutzen und dass Bcl10 und Malt1 diesen PKCs nachgeschaltet sind.

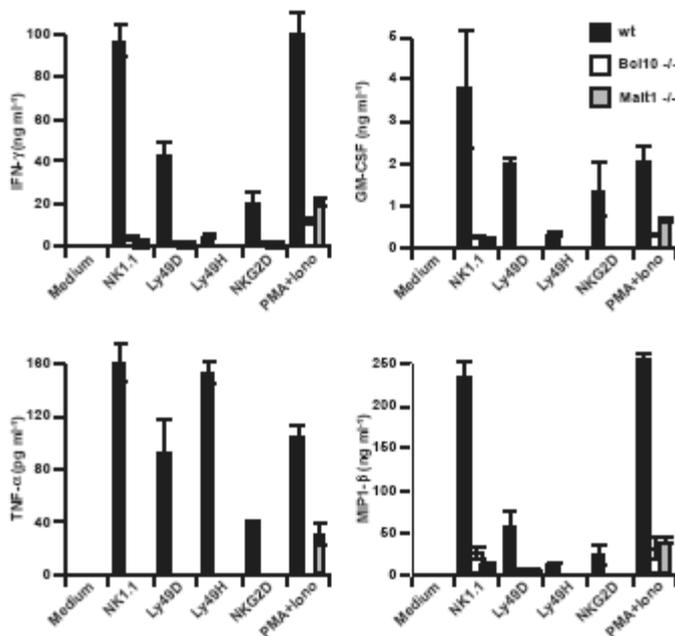


Abb. 10: Ebenfalls deutlich beeinträchtigte Zytokinproduktion in Abwesenheit von Malt1. NK-Zellen aus der Milz von Bcl10 und Malt1 defizienten Mäusen wurden unter Einfluss von IL-15 expandiert und anschließend mit AK gegen verschiedene aktivierende NK-Zell-Rezeptoren und PMA/Iono für 24h stimuliert. Die Zytokinfreisetzung wurde mittels ELISA gemessen.

3.6 Carma1 abhängiges, Card9 unabhängiges Signaling über Bcl10

Bislang konnte gezeigt werden, dass je nach Zelllinie die Immunrezeptoren ihr Signal entweder über Carma1 oder Card9 an Bcl10 weiterleiten (Gross 2006, Hara 2007, Wegener 2007). Um herauszufinden, ob eines der beiden CARD *coiled-coil* Proteine auch in NK-Zellen an der Signalweitergabe beteiligt ist, wurden NK-Zellen von Carma1 und Card9 defizienten Mäusen isoliert. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen *in vitro* mittels agonistischer Antikörper gegen NK1.1, Ly49D und NKG2D. Als Kontrolle diente wieder eine in Medium inkubierte Zellpopulation. Die Produktion der von Bcl10 und Malt1 kontrollierten Zytokine $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, GM-CSF und $\text{MIP1}\beta$ im Zellüberstand wurde mittels ELISA gemessen. Während die Card9 defizienten NK-Zellen normale Mengen dieser Zytokine als

Antwort auf die Aktivierung produzierten, wies die Produktion all dieser Zytokine schwere Beeinträchtigungen in Abwesenheit von *Carma1* auf. Somit scheinen die ITAM-gekoppelten NK-Zell Rezeptoren ihr Aktivierungssignal via *Carma1*, unabhängig von *Card9*, an den *Bcl10/Malt1* Komplex zu vermitteln. Der Defekt in der Zytokinproduktion der *Carma1* defizienten NK-Zellen bei Stimulation mit PMA und Iono zeigt zudem auf, dass auch *Carma1* den PKCs nachgeschaltet ist.

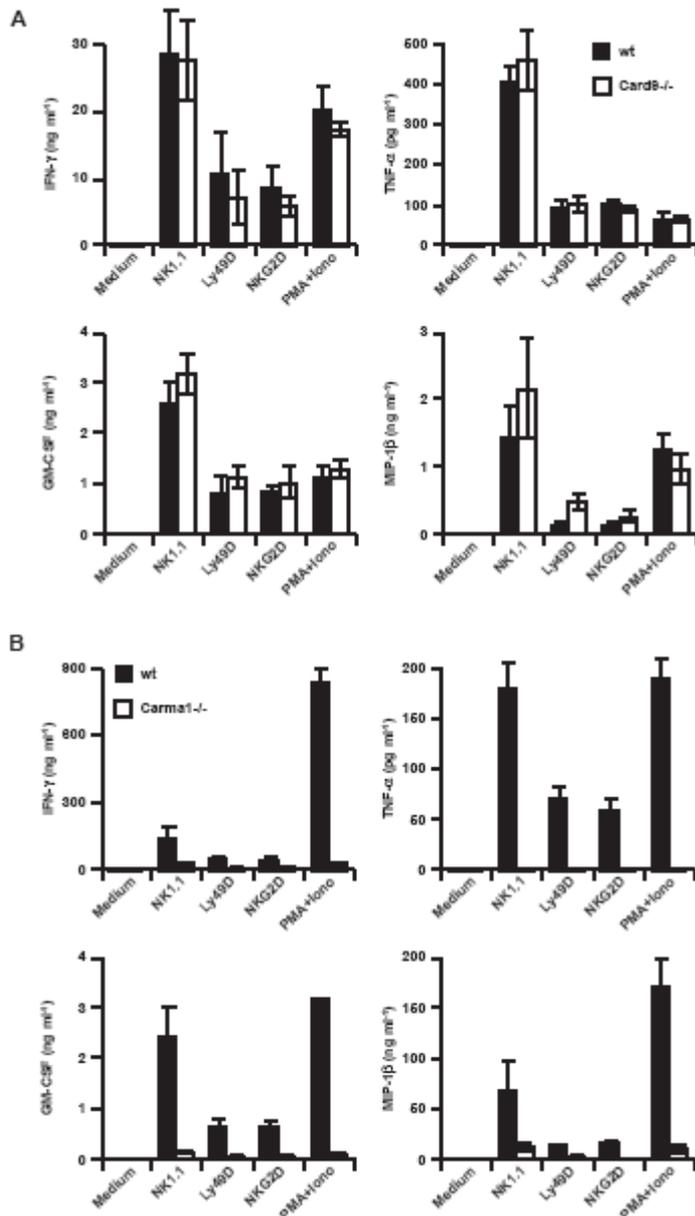


Abb. 11: *Carma1*, nicht aber *Card9* ist für das NK-Zell Signaling von Bedeutung. IL-15 expandierte NK-Zellen von *Card9* (A) und *Carma1* (B) defizienten Mäusen oder Kontroll-Tiere wurden mit AK gegen stimulierende NK-Zell Rezeptoren oder PMA+Ionomycin stimuliert. Die Zytokinproduktion im Zellüberstand wurde mittels ELISA bestimmt.

3.7 ITAM-gekoppelte NK-Zell Rezeptoren aktivieren NF- κ B und MAP-Kinasen über Bcl10/Malt1

Man weiß, dass in vielen Zellen des Immunsystems die Regulation der Produktion von Zytokinen wie TNF α , GM-CSF und IFN γ über Transkriptionsfaktoren der NF- κ B Familie und über Signale, die via MAP-Kinasen vermittelt werden, läuft (Holloway 2003, Ishizuka 1997, Tato 2006). Da in T- und B-Lymphozyten Bcl10 und Malt1 entscheidend an der Aktivierung von NF- κ B und den MAP-Kinasen JNK und p38 beteiligt sind, ist anzunehmen, dass dies bei NK-Zellen ähnlich sein könnte. Um dies zu untersuchen, wurden NK-Zellen von Wildtyp, Bcl10 und Malt1 defizienten Mäusen mit anti-NK1.1, anti-Ly49D oder PMA/Iono stimuliert. Anschließend wurde im Western-Blot die I κ B α Degradation gemessen. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, führt die Degradation von I κ B α durch IKK zur Freisetzung von NF- κ B und somit zum Eindringen von NF- κ B in den Zellkern und zur Aktivierung der Gentranskription.

Während eine Stimulation der aktivierenden NK-Zell Rezeptoren zu einer fortschreitenden Abnahme von I κ B α in Wildtyp-Zellen führte, zeigte sich in Abwesenheit von Bcl10 oder Malt1 eine deutliche Beeinträchtigung der Degradation von I κ B α . Ähnliche Auswirkungen ergaben sich nach einer Stimulation von NK-Zellen mit PMA/Iono, was zu der Annahme führt, dass PKCs Bcl10 und Malt1 benötigen, um das Signal an NF- κ B weiterzuleiten.

Zudem sollte die Rolle von Bcl10 und Malt1 hinsichtlich der Aktivierung der MAP-Kinasen Erk, Jnk und p38 aufgeklärt werden. Dazu wurde nach Stimulation mit PMA/Iono die phosphorylierte, also aktivierte Form der Kinasen, mittels spezifischer AK im Western Blot erfasst. Die Wildtyp NK-Zellen wiesen für alle drei Kinasen eine starke Aktivierung mit einem Maximum nach 20min Stimulation auf. Die Bcl10 und Malt1 defizienten NK-Zellen hingegen zeigten einen starken Defekt in der Aktivierung von Jnk und p38, jedoch eine normale Aktivierung von ERK. Dies demonstriert eine Schlüsselrolle von Bcl10/Malt1 für die Signalweitergabe an die beiden MAP-Kinasen Jnk und p38, ohne von Bedeutung für die Aktivierung von ERK zu sein.

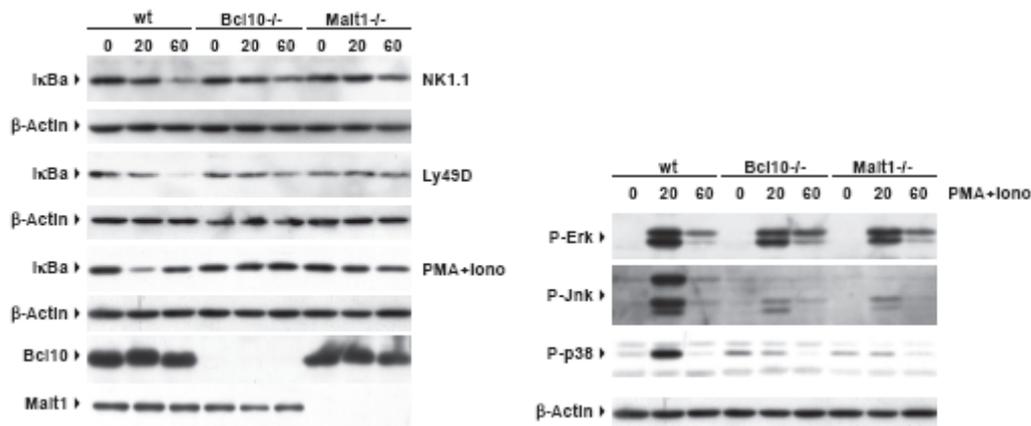


Abb. 12: ITAM-gekoppelte NK-Zell Rezeptoren aktivieren NF-κB und die MAP-Kinasen Jnk und p38 über Bcl10 und Malt1. Stimulation von NK-Zellen mittels NK1.1, anti-Ly49D oder PMA/Iono für 20 und 60min. Gemessen wurde die NF-κB Degradation bzw. die Phosphorylierung von Erk, Jnk und p38 mittels Western blot. Ladekontrolle mittels β-Actin.

3.8 Untersuchung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen in Abhängigkeit von Bcl10

Wie schon erläutert, führt die Aktivierung von NK-Zellen nicht nur zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, sondern auch zum Abtöten von Zielzellen mittels Ausschüttung zytotoxischer Granula. Um herauszufinden, ob die Stimulation der NK-Zell Zytotoxizität über Bcl10 vermittelt wird, wurde eine Standard ⁵¹Cr-Release-Assay durchgeführt. Als Zielzellen dienten YAC-1 Zellen, die NKG2D aktivierende Faktoren tragen und CHO Zellen mit entsprechenden Ly49D Liganden. Dank dieser spezifischen Antigene können beide Zelllinien von aktivierten NK-Zellen erkannt und abgetötet werden. Um die Lyse der Zielzellen später mittels ⁵¹Cr-Freisetzung zu messen, mussten die Zielzellen zunächst mit ⁵¹Cr markiert werden. Dies erfolgte während einer 2stündigen Inkubationszeit, in der die Zielzellen das ⁵¹Cr aufnehmen. Zur Aktivierung der NK-Zellen wurde den Wildtyp und den Bcl10 defizienten Mäusen 36h vor Entnahme der Organe je 5 x 10⁵ PFU MCMV intraperitoneal injiziert. Die so gewonnenen Splenozyten wurden mit anti-DX5 *beads* aufgereinigt und mit den Zielzellen in Kontakt gebracht. Hierfür wurde zunächst auf einer 96-Loch-Platte eine Verdünnungsreihe der NK-Zellen erstellt und dann die mit ⁵¹Cr markierten Zielzellen zugegeben. Nach 5stündiger Inkubation wurde dann der ⁵¹Cr Gehalt im Überstand mittels Gamma-Zähler gemessen. Somit konnte der Anteil der abgetöteten Zielzellen ermittelt werden.

Zusammenfassend zeigte sich kein Unterschied bzgl. der Zytotoxizität von NK-Zellen aus WT oder $Bcl10^{-/-}$ Mäusen. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die Zytotoxizität von NK-Zellen unabhängig von Bcl10 aktiviert wird.

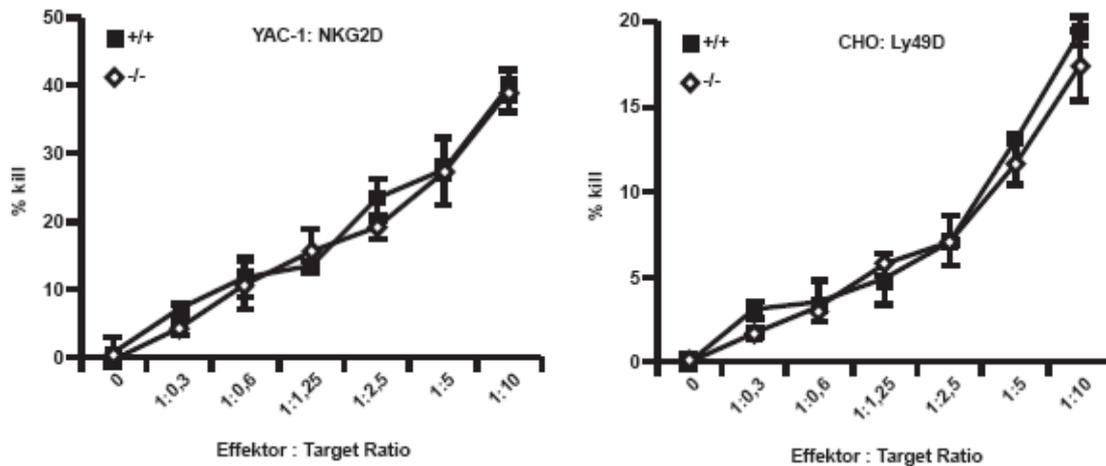


Abb. 13: Die NK-Zell Zytotoxizität wird durch die Abwesenheit von $Bcl10$ nicht beeinflusst. WT und $Bcl10^{-/-}$ Mäuse wurden i.p. mit 5×10^5 PFU MCMV infiziert. Nach 36h wurden die Milzen entnommen und die NK-Zellen mit DX5 beads aufgereinigt. Die NK-Zell Zytotoxizität wurde in einem Standard ^{51}Cr -Release-Assay ermittelt. Zielzellen waren YAC-1 (a) und CHO (b) Zellen. Die Grafik zeigt das Verhältnis von NK- zu Zielzellen aufgetragen gegen die spezifische Lyse.

3.9 Das Fehlen der $Bcl10$ abhängigen Signaltransduktion hat keine Auswirkung auf die Abwehr des murinen Cytomegalievirus *in vivo*

Für die folgenden *in vivo* Experimente wurde das murine Cytomegalievirus (MCMV) verwendet, da schon relativ früh gezeigt werden konnte, dass NK-Zellen an der Abwehr dieses Herpesvirus entscheidend beteiligt sind. So wurde erwiesen, dass NK-Zell depletierte Mäuse besonders anfällig für MCMV Infektionen sind, was sich in hohen Virustitern in der Milz zeigte (Arase 2002, Bukowski 1983). Außerdem weiß man, dass NK-Zellen mit ihrem aktivierenden Rezeptor Ly49H das von MCMV exprimierte Protein m157 gezielt erkennen können (Brown 2001).

Wie die vorherigen Experimente aufzeigen, spielt $Bcl10$ zwar für die Zytokinproduktion, jedoch nicht für die zytotoxische Wirkung der NK-Zellen eine entscheidende Rolle. Also bietet das $Bcl10$ knockout Mausmodell eine gute Möglichkeit, isoliert die Bedeutung der

Zytokinproduktion von NK-Zellen für die frühe Immunabwehr von MCMV zu analysieren. Eine weitere Voraussetzung für diese *in vivo* Untersuchungen ist die Tatsache, dass die Anzahl an NK-Zellen in den Bcl10 defizienten Tieren nicht reduziert ist, dies konnte im ersten Experiment (siehe 3.1) gezeigt werden.

Es wurden Wildtypmäuse und Bcl10^{-/-} Mäuse mit 1,25 x 10⁵ PFU MCMV intraperitoneal infiziert.

In einem ersten Experiment sollte die Bedeutung von Bcl10 für die NK-Zell Proliferation im Rahmen der MCMV-Infektion ermittelt werden. Dazu wurde einer Gruppe von Tieren 3 Tage nach und einer weiteren Versuchsgruppe 6 Tage nach MCMV-Infektion Bromodeoxyuridine (BrdU) intraperitoneal appliziert. Die Versuchsgruppen bestanden jeweils zu gleichen Teilen aus Wildtyp und Bcl10^{-/-} Mäusen. BrdU wird in phosphorylierter Form in den sich teilenden Zellen anstelle des Nucleosids Desoxythymidintriphosphat (dTTP) in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Die nach 3h entnommenen Splenozyten wurden dann mit FACS-Antikörpern gegen NK1.1 und BrdU gefärbt. Somit ließ sich in der FACS-Analyse die Proliferationsrate der NK-Zellen im Zeitraum der BrdU-Exposition bestimmen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der Bcl10 defizienten und der Gruppe der Wildtyp Mäuse sowohl in der frühen (3 Tage nach Infektion) als auch in der späten (6 Tage nach Infektion) Infektionsphase. Dies führt zu dem Schluss, dass die Proliferation der NK-Zellen von Bcl10 unabhängig abläuft.

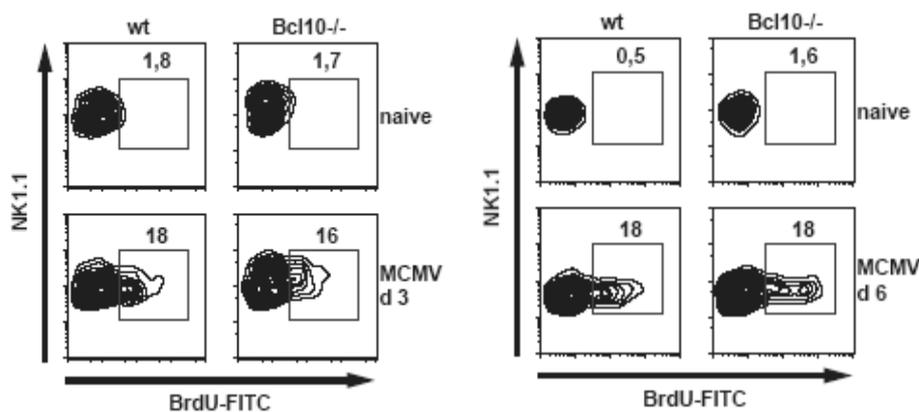


Abb. 14: Das Fehlen von Bcl10 hat keinen Einfluss auf die NK-Zell Proliferation bei MCMV Infektion. An Tag 3 und 6 nach Infektion mit MCMV wurde den Mäusen BrdU i.p. injiziert. Die Abbildung zeigt die Proliferation NK1.1⁺ NK-Zellen mittels BrdU-Färbung.

Um die Auswirkung der Bcl10 Defizienz bzgl. der Immunabwehr des Virus *in vivo* zu analysieren, wurde in einem zweiten Experiment die Viruslast an Tag sechs nach Infektion

anhand der MCMV-Titer in Leber und Milz verglichen. Hierfür wurde aus den Organlysaten der virale DNA-Abschnitt M45 isoliert und mittels eines Plasmides als Vektor in eine Bakterienkolonie übertragen. In einer Real-Time PCR konnte dann schließlich die angereicherte virale DNA quantifiziert werden. Auch hier zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtypmäusen und den Bcl10 defizienten Tieren. Folglich ist Bcl10, und somit auch die Zytokinproduktion von NK-Zellen, nicht entscheidend an der frühen Immunantwort bei viralen Infekten beteiligt.

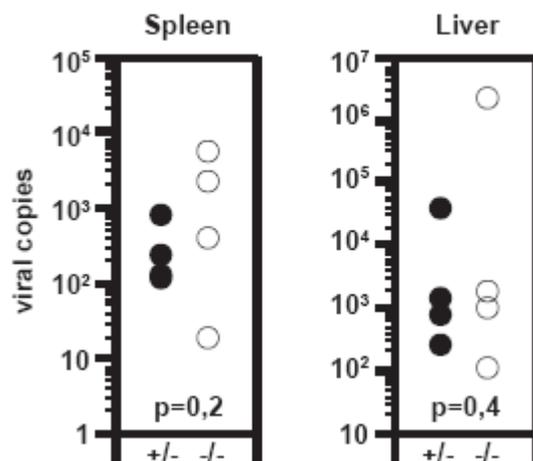


Abb. 15: Kein signifikanter Unterschied der Viruslast in Milz und Leber von Wildtyp und Bcl10-defizienten Tieren. RTPCR an Tag 6 nach MCMV-Infektion.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Signalweg in NK-Zellen, welcher bei Stimulation von aktivierenden ITAM-abhängigen NK-Zell Rezeptoren zu Zytokinproduktion und Zytotoxizität führt, untersucht. Dazu wurden *in vitro* und *in vivo* Experimente mit NK-Zellen von Bcl10, Malt1, Card9 und Carma1 defizienten Mäusen durchgeführt.

4.1 Bedeutung von Bcl10 für die Signalwege ITAM-haltiger bzw. ITAM-gekoppelter Immunrezeptoren

NK-Zellen werden zum angeborenen Immunsystem gezählt und zu ihren Aufgaben gehören vor allem die frühe Abwehr von intrazellulären Krankheitserregern sowie das Bekämpfen von Tumorzellen. Um den Körper also vor pathologisch veränderten Zellen zu schützen, stehen den NK-Zellen die Fähigkeit zu Zytolyse mittels Perforin haltiger Granula (Berke 1994, Kärre 1985, Kirwan 2007) und die Exkretion von Zytokinen zur Verfügung. Von entscheidender Bedeutung sind dabei u.a. $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, GM-CSF sowie $\text{MIP1}\alpha$ und $\text{MIP1}\beta$ (Biron 1997, Bluman 1996, Oliva 1998, Trinchieri 1989). Mit Hilfe dieser Signalmoleküle können die NK-Zellen entweder direkt auf die Zielzelle einwirken oder indirekt über Aktivierung von T-Helferzellen und Dendriten.

Zur Erkennung der veränderten Zellen nutzen NK-Zellen in komplexem Zusammenspiel die aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren auf ihrer Oberfläche (Spits 1998). So können körperfremde Strukturen an der Zelloberfläche, wie z.B. virale Proteine, von den aktivierenden Rezeptoren erkannt werden (Smith 2001). Die inhibierenden Rezeptoren hingegen registrieren das Fehlen von MHC-1 Molekülen, deren Präsentation an der Zelloberfläche im Falle eines Virusbefalls oder bei Tumorzellen gestört sein kann. Dies führt dazu, dass die hemmende Wirkung, welche gesunde Zellen vor Autoaggression schützt, wegfällt (Yokoyama 1995). Zudem werden die NK-Zell Funktionen mit Hilfe von Zytokinen reguliert. So wird z.B. die $\text{IFN}\gamma$ Produktion durch IL12 und IL18 und die Proliferation von NK-Zellen durch IL-15 angeregt (Miettinen 1998).

Wie in NK-Zellen das stimulierende Signal bei Rezeptoraktivierung jedoch weitergegeben wird und schließlich die Effektorfunktionen auslöst, war bislang weitestgehend unbekannt.

Da man aber weiß, dass die aktivierenden NK-Zell Rezeptoren, ebenso wie ein Großteil von Rezeptoren anderer Immunzellen, ihr Signal mit Hilfe von ITAM Proteinen vermitteln, war

anzunehmen, dass der Signalweg in NK-Zellen auch noch weitere Übereinstimmungen mit den Signalwegen dieser Immunzellen aufweist.

So konnte für die Signaltransduktion der ITAM-haltigen B- und T-Zell Rezeptoren erstmals die Bedeutung von Bcl10 und Malt1 hinsichtlich der Aktivierung des kanonischen NF- κ B Signalwegs gezeigt werden (Ruland 2001, Ruland 2003). Es folgten Untersuchungen, die die essentielle Rolle dieser beiden Signalproteine auch für eine Reihe von ITAM Rezeptoren auf myeloischen Zellen nachweisen konnten. Dazu gehören z.B. der Fc ϵ RI auf Mastzellen und der Dectin-1 Rezeptor auf Dendriten (Chen 2007, Gross 2006, Hara 2007, Klemm 2006).

Das rezeptornahe Signal wird dabei über *CARD-coiled-coil* Proteine aus der Gruppe der Carma Proteine, wie Card9 oder Carma1, an Bcl10 übermittelt und führt dann nach Interaktion von Bcl10 mit Malt1 zur Aktivierung von NF- κ B sowie der MAP-Kinasen JNK, ERK und p38 (Hara 2007, Thome 2004, Wegener 2007).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen obige Vermutung und zeigen, dass die aktivierenden NK-Zell Rezeptoren ihr Signal ebenfalls via den Carma1/Bcl10/Malt1 Komplex weiterleiten und mittels Aktivierung von NF- κ B und den MAP-Kinasen JNK und p38 die Produktion von Zytokinen steuern. Und auch die zeitgleich abgelaufene Studie von Malarkannan et al. (2007) konnte im Bcl10^{-/-} Mausmodell, welches unabhängig von dem unseren generiert wurde, die Bedeutung von Bcl10 für die Aktivierung von NK-Zellen nachweisen.

Damit bestätigt sich in einem weiteren Fall die Bedeutung von Bcl10 für ITAM-assoziierte Immunrezeptoren.

4.2 PKCs scheinen ihr Signal Carma1 abhängig zu vermitteln

Vergleicht man die Signalwege der ITAM-haltigen bzw. ITAM-gekoppelten Rezeptoren auf Immunzellen, so fällt auf, dass ein Teil dieser Rezeptoren sein Signal über Card9 weiterleitet, während der andere Teil dafür Carma1 nutzt. Eine Theorie wäre, dass lymphatische Zellen, sprich die Zellen der adaptiven Immunantwort, Carma1 nutzen, während myeloische Zellen, entsprechend also die Zellen des angeborenen Immunsystems, Card9 verwenden.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen noch auf einen anderen Zusammenhang hin. In den Stimulationsexperimenten zeigte sich nicht nur, dass die Stimulation der ITAM-gekoppelten NK-Zell Rezeptoren Bcl10 abhängig verläuft, auch die Verwendung von PMA und Iono zeigte eine Bcl10 abhängige Aktivierung der Zytokinproduktion. Dies bestätigt einerseits, dass das Signaling in NK-Zellen über PKCs läuft, wie es von Lymphozyten bekannt ist

(Matsumoto 2005, Sommer 2005) und zudem, dass diese PKCs dem Bcl10/Malt1 Komplex in der Signalkaskade vorausgeschaltet sind. Damit lässt sich vermuten, dass aufgrund der Struktur von Carma1, welche sich im Unterschied zu Card9 durch eine sog. *Linker-Region* auszeichnet, nur dieses einer Phosphorylierung durch PKCs zur Verfügung steht. Sprich Immunzellen, deren Signaltransduktion über PKCs läuft, benötigen offensichtlich Carma1, um das Aktivierungssignal an den Bcl10/Malt1 Komplex weiterzuleiten.

4.3 Die Zytokinproduktion von NK-Zellen ist nicht entscheidend an der frühen Immunabwehr von Virusinfekten beteiligt

Obwohl sich zeigte, dass die Zytokinproduktion von NK-Zellen Bcl10 abhängig ist, ergab sich im Infektionsmodell mit MCMV für die Bcl10 defizienten Mäuse keine erhöhte Viruslast in Milz und Leber an Tag 3 und 6 nach Infektion gegenüber den Wildtypieren. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die von NK-Zellen ausgeschütteten Zytokine keine wesentliche Bedeutung für die frühe Immunabwehr gegenüber Viren haben. Im Gegensatz dazu ergaben Untersuchungen mit Mäusen, die bei uneingeschränkter Zytokinproduktion einen Defekt in der Perforin-Produktion aufwiesen, eine deutlich reduzierte Abwehrfunktion, was sich in massiv erhöhten Virustitern zeigte. So ist anzunehmen, dass in den ersten Tagen die durch NK-Zellen vermittelte Zytotoxizität entscheidend ist, während die Zytokinproduktion erst im zweiten Schritt, nämlich über Aktivierung anderer Immunzellen wie T-Lymphozyten und Dendriten, ihre Wirkung entfaltet. Um diese Theorie zu bestätigen, wären Betrachtungen in der späten Abwehrphase nötig. Da jedoch Bcl10 auch für andere Immunzellen der späten Abwehrphase wie T-Lymphozyten essentiell ist, lässt sich das hier eingesetzte Mausmodell, bei dem sich der Gendefekt auch auf diese Zellen bezieht, nicht verwenden. Es wäre ein Mausmodell nötig, das eine isolierte Bcl10 Defizienz nur in NK-Zellen aufweist.

4.4 Modell des Signalweges in NK-Zellen

Alle bisherigen Erkenntnisse zusammengenommen, könnte ein möglicher Signalweg, der zur NK-Zell Aktivierung führt, so aussehen:

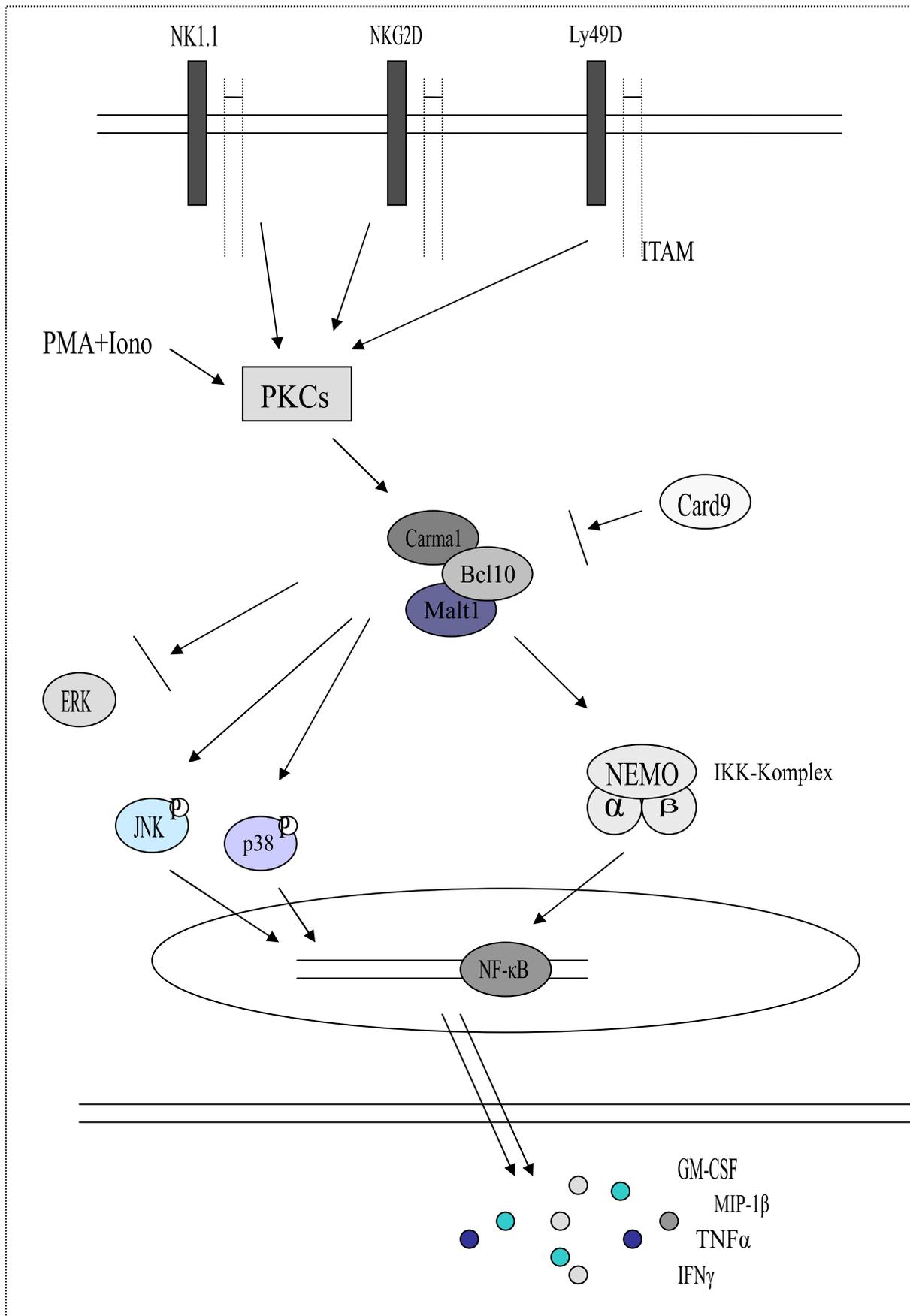


Abb. 16: ITAM-abhängige NK-Zell Rezeptoren aktivieren NF- κ B und die MAP-Kinasen p38 und JNK über den Carma1/Bcl10/Malt1 Komplex.

4.5 Klinische Relevanz der vorliegenden Ergebnisse

Die Bedeutung von NK-Zellen für die medizinische Forschung steht außer Frage. So sind verschiedenste Therapieansätze bzgl. gezielter Tumorbekämpfung bis hin zur Behandlung von Transplantatabstoßungsreaktionen Gegenstand aktueller Studien. Um wiederum die Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse für die medizinische Forschung zu erörtern, muss man sich mit der Frage auseinandersetzen, wie weit sich die Resultate vom Mausmodell auf den Menschen übertragen lassen. Im Lauf der Evolution haben sich die Rezeptoren auf NK-Zellen nämlich gewandelt. So spielen auf murinen NK-Zellen u.a. die Rezeptoren aus der Gruppe der Ly49-Rezeptoren, welche zur C-Typ-Lektin-Familie gehören und multigenetisch kodiert sind, eine entscheidende Rolle (Brown 1997, Ho 1998). Die menschlichen NK-Zellen dagegen besitzen als wesentliche Rezeptoren sog. KIRs (*killer cell immunoglobulin receptors*), die zur Immunglobulin Superfamilie zählen und in den KIR-Genen auf dem Chromosom 19 kodiert sind (Vilches 2002). Trotz dieser grundlegenden Unterschiede stehen sich diese beiden Rezeptorkategorien bzgl. ihrer Funktion jedoch sehr nahe. Mittels Erkennung von klassischen MHC-I Molekülen oder viral exprimierten MHC-ähnlichen Molekülen vermitteln beide Rezeptorklassen Zytokinausschüttung und Zytotoxizität (Kane 2004, Mager 2001). Und auch hinsichtlich der Signaltransduktion zeigten sich bislang wesentliche Übereinstimmungen. So nutzen sowohl die murinen Ly49 Rezeptoren als auch die humanen KIRs ITIMs bzw. ITAMs, um über die Gruppe der Src(*sarcoma*)-Kinasen u.a. die Syk Tyrosin-Kinase und Phospholipase C zu aktivieren, was letztendlich zur Aktivierung der MAPK-Kaskade führt (McVicar 2001). Es ist also davon auszugehen, dass auch weitere Elemente der Zellaktivierung im Laufe der Evolution erhalten geblieben sind. Dementsprechend liegt die Vermutung nahe, dass die vorliegenden Ergebnisse durchaus, zumindest teilweise, auf den Menschen übertragbar sind und somit von klinischer Relevanz. Um sichere Aussagen über die Signaltransduktion in humanen NK-Zellen treffen zu können, wären jedoch entsprechende Untersuchungen *in vitro* nötig. Denkbar wäre z.B. eine humane NK-Zell Population, in der die Transkription bzw. Translation des Bcl10-Gens gezielt gehemmt würde. Vergleichbare Stimulationsexperimente wie in dieser Arbeit könnten dann die Rolle des Carma1/Bcl10/Malt1 Komplexes für die menschliche NK-Zell Aktivierung definitiv klären.

5. Zusammenfassung

NK-Zellen werden zum angeborenen Immunsystem gerechnet und ihre Bedeutung liegt vor allem in der Bekämpfung von intrazellulären Krankheitserregern und Tumorzellen. Zur Erkennung der befallenen bzw. veränderten Zellen nutzen sie ihre multiplen Oberflächenrezeptoren.

Um herauszufinden, über welchen Signalweg die aktivierenden, ITAM-gekoppelten NK-Zell Rezeptoren bei Stimulation Zytokinproduktion und Zytotoxizität vermitteln, wurden in der vorliegenden Arbeit NK-Zellen von Bcl10, Malt1, Carma1 und Card9 defizienten Mäusen mit denen von Wildtypmäusen verglichen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die untersuchten NK-Zell Rezeptoren die Zytokinproduktion ebenso wie B- und T-Zellrezeptoren über den Bcl10/Malt1/Carma1 Komplex steuern.

In weiteren Experimenten zeigte sich, dass Proliferation und Zytotoxizität der NK-Zellen bei MCMV-Infektion jedoch unabhängig von Bcl10 ablaufen. Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Zytokinproduktion getrennt von Zytotoxizität und Zellteilung stimuliert wird.

Da in den durchgeführten Experimenten Viruslast und Überleben der Versuchstiere in den ersten Tagen nach MCMV-Infektion keinen Unterschied zwischen Bcl10 defizienten und Wildtyp Tieren aufwiesen, kann man schließen, dass die Zytokinproduktion nicht essentiell an der primären Bekämpfung von Herpesviren beteiligt ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben somit zur weiteren Aufklärung von Signalmechanismen in NK-Zellen und deren Bedeutung für die Abwehr viraler Infekte im Mausmodell beigetragen.

Literaturverzeichnis

- Arase H., Mocarski E.S., Campbell A.E., Hill A.B., Lanier L.L.** (2002). Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 296, 1323-1326.
- Ashwell J.D.** (2006). The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 532-540.
- Bauer S., Groh V., Wu J., Steinle A., Phillips J.H., Lanier L.L., Spies T.** (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727-729.
- Berke G.** (1994). The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 735-737.
- Beutler B.** (2004). Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* 40, 845-859.
- Biron C.A.** (1997). Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 24-34.
- Biron C.A., Nguyen K.B., Pien G.C., Cousens L.P., Salazar-Mather T.P.** (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 189-220.
- Blonska M., Pappu B.P., Matsumoto R., Li H., Su B., Wang D., Lin X.** (2007). The CARMA1-Bcl10 signaling complex selectively regulates JNK2 kinase in the T cell receptor-signaling pathway. *Immunity* 26, 55-66.
- Bluman E.M., Bartynski K.J., Avalos B.R., Caligiuri M.A.** (1996). Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 α in response to monocyte-derived cytokines. *J. Clin. Invest.* 97, 2722-2727.
- Blumberg P.M.** (1988). Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: sixth Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res.* 48, 1-8.
- Bonizzi G., Karin M.** (2004). The two NK-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 25, 280-288.
- Bosman C., Feldman J.D.** (1970). Cellular events during the expression of immunologic memory. *Clin. Exp. Immunol.* 7, 565-582.
- Brack C., Hirama M., Lenhard-Schuller R., Tonegawa S.** (1978). A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* 15, 1-14.
- Braud V.M., Allan D.S., O'Callaghan C.A., Söderström K., D'Andrea A., Ogg G.S., Lazetic S., Young N.T., Bell J.I., Phillips J.H., Lanier L.L., McMichael A.J.** (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391, 795-799.

- Brown M.G., Fulmek S., Matsumoto K., Cho R., Lyons P.A., Levy E.R., Scalzo A.A., Yokoyama W.M.** (1997). A 2-Mb YAC contig and physical map of the natural killer gene complex on mouse chromosome 6. *Genomics* 42, 16-25.
- Brown M.G., Dokun A.O., Heusel J.W., Smith H.R., Beckman D.L., Blattenberg E.A., Dubbelde C.E., Stone L.R., Scalzo A.A., Yokoyama W.M.** (2001). Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* 292, 934-937.
- Bukowski J.F., Woda B.A., Habu S., Okumura K., Welsh R.M.** (1983). Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo. *J. Immunol* 131, 1531-1538.
- Bukowski J.F., Woda B.A., Welsh R.M.** (1984). Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J. Virol.* 52, 119-128.
- Castagna M., Takai Y., Kaibuchi K., Sano K., Kikkawa U., Nishizuka Y.** (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 257, 7847-7851.
- Cerwenka A., Lanier L.L.** (2001). Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 41-49.
- Chan S.H., Perussia B., Gupta J.W., Kobayashi M., Pospisil M., Young H.A., Wolf S.F., Young D., Clark S.C., Trinchieri G.** (1991). Induction of interferon γ production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J. Exp. Med.* 173, 869-879.
- Chang L., Karin M** (2001). Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* 6824, 37-40.
- Chen Y.R., Tan T.H.** (2000). The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling (review). *Int. J. Oncol.* 16, 651-662.
- Chen Y., Pappu B.P., Zeng H., Xue L., Morris S.W., Lin X., Wen R., Wang D.** (2007). B cell lymphoma 10 is essential for Fc epsilon R-mediated degranulation and IL-6 production in mast cells. *J. Immunol.* 178, 49-57.
- Colucci F., Lanier L.L., Zompi S., Hamerman J.A., Ogasawara K., Schweighoffer E., Tybulewicz V.L.J., Di Santo J.** (2003). NKG2D triggers cytotoxicity in mouse NK cells lacking DAP12 or Syk family kinases. *Nat. Immunol.* 6, 565-572.
- Colucci F., Caligiuri M.A., Di Santo J.P.** (2003). What does it take to make a natural killer? *Nat. Rev. Immunol.* 3, 413-425.
- Cooper M.A., Fehniger T.A., Caligiuri M.A.** (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 22, 633-640.

D'Andrea A., Aste-Amezaga M., Valiante N.M., Ma X., Kubin M., Trinchieri G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon γ -production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.* 178, 1041-1048.

Dempsey P.W., Vaidya S.A., Cheng G. (2003). The art of war: Innate and adaptive immune responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 2604-2621.

Dokun A.O., Kim S., Smith H.R., Kang H.S., Chu D.T., Yokoyama W.M. (2001). Specific and nonspecific activation during virus infection. *Nat. Immunol.* 292, 934-937.

Dunn P.L., North R.J. (1991). Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. *Infect. Immun.* 59, 2892-2900.

Egawa T. Albrecht B., Favier B., Sunshine M.J., Mirchandani K., O'Brien W., Thome M., Littman D.R. (2003). Requirement for CARMA1 in antigen receptor-induced NF-kappaB activation and lymphocyte proliferation. *Curr. Biol.* 13, 1252-1258.

Eliou E.A. (2000). Pheromone response, mating and cell biology. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 573-581.

Ferch U., Büschenfelde C.M., Gewies A., Wegener E., Rauser S., Peschel C., Krappmann D., Ruland J. (2007). MALT1 directs B cell receptor-induced canonical nuclear factor-kappaB signaling selectively to the c-Rel subunit. *Nat. Immunol.* 8, 1581-1584.

French A.R., Sjolín H., Kim S., Koka R., Yang L., Young D.A., Cerboni C., Tomasello E., Ma A., Vivier E., Kärre K., Yokoyama W.M. (2006). DAP12 signaling directly augments proliferative cytokine stimulation of NK cells during viral infections. *J. Immunol.* 177, 4981-4990.

Fugmann S.D., Lee A.I. et al. (2000). The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends and transposition. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 495-527.

Gaide O., Favier B., Legler D.F., Bonnet D., Brissoni B., Valitutti S., Bron C., Tschopp J., Thome M. (2002). CARMA1 is a critical lipid raft-associated regulator of TCR-induced NF-kappa B activation. *Nat. Immunol.* 9, 802-803.

George T.C., Ortaldo J.R., Lemieux S., Kumar V., Bennett M. (1999). Tolerance and alloreactivity of the Ly 49D subset of murine NK cells. *J. Immunol.* 163, 1859-1867.

Gordon S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111, 927-930.

Gross O., Gewies A., Finger K., Schäfer M., Sparwasser T., Peschel C., Förster I., Ruland J. (2006). Card9 controls a non-TLR signaling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature.* 442, 651-656.

Gross O., Grupp C., Steinberg C., Zimmermann S., Strasser D., Hanneschläger N., Reindl W., Jonsson H., Huo H., Littman D.R., Peschel C., Yokoyama W.M., Krug A., Ruland J. (2008). Multiple ITAM-coupled NK-cell receptors engage the Bcl10/Malt1 complex via Carma1 for NK-kappaB and MAPK activation to selectively control cytokine production. *Blood* 112, 2421-2428.

Haller D., Serrant P., Granato D., Schiffrin E.J., Blum S. (2002). Activation of human NK cells by staphylococci and lactobacilli requires cell contact-dependent costimulation by autologous monocytes. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 9, 649-657.

Hara H., Ishihara C., Takeuchi A., Imanishi T., Xue L., Morris S.W., Inui M., Takai T., Shibuya A., Saijo S., Iwakura Y., Ohno N., Koseki H., Yoshida H., Penninger J.M., Saito T. (2007). The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 8, 619-629.

Hara H., Wada T., Bakal C., Koziaradzki I., Suzuki S., Suzuki N., Nghiem M., Griffiths E.K., Krawczyk C., Bauer B., D'Acquisto F., Gosh S., Yeh W.C. Baier G., Rottapel R., Penninger J.M. (2003). The MAGUK family protein CARD11 is essential for lymphocyte activation. *Immunity* 18, 763-775.

Harty J.T., Badovinac V.P. (2008). Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 107-119.

Hayden M.S., Ghosh S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes. Dev.* 18, 2195-2224.

Ho E.L., Heusel J.W., Brown M.G., Matsumoto K., Scalzo A.A., Yokoyama W.M. (1998). Murine Nkg2d and Cd94 are clustered within the natural killer complex and are expressed independently in natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6320-6325.

Ho E.L., Carayannopoulos L.N., Poursine-Laurent J., Kinder J., Plougastel B., Smith H.R.C., Yokoyama W.M. (2002). Costimulation of Multiple NK Cell Activation Receptors by NKG2D. *The Journal of Immunology* 7, 3667-3675.

Hof H., Dörries R. "Medizinische Mikrobiologie", Duale Reihe, Thieme Verlag, Stuttgart, 2005

Holloway A.F., Rao S., Chen X., Shannon M.F. (2003). Changes in chromatin accessibility across the GM-CSF promoter upon T cell activation are dependent on nuclear factor kappaB proteins. *J. Exp. Med.* 197, 413-423.

Huntington N.D., Xu Y., Nutt S.L., Tarlinton D.M. (2006). A requirement for CD45 distinguishes Ly49D-mediated cytokine and chemokine production from killing in primary natural killer cells. *J. Exp. Med.* 201, 1421-1433.

- Ishizuka T., Terada N., Gerwins P., Hamelmann E., Oshiba A., Fanger G.R., Johnson G.L., Gelfand E.W.** (1997). Mast cell tumor necrosis factor alpha production is regulated by MEK kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 94, 6358-6363.
- Janeway C.A.Jr.** (2001). How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98,7461-7468.
- Janeway C.A. and R. Medzhitov** (2002). Innate immune recognition. *Annu. Rev.Immunol.* 20, 197-216
- Kärre Klas** (1985). Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity: a reevaluation and a hypothesis. In: Mechanisms of NK cell mediated cytotoxicity. *Academic Press, Orlando*, 81–91.
- Kärre K., Ljunggren H.G., Piontek G., Kiessling R.** (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defense strategy. *Nature* 319, 675-678.
- Kane K.P., Lavender K.J., Ma B.J.** (2004). Ly-49 receptors and their functions. *Crit. Rev. Immunol.* 24, 321-348.
- Karin M., Delhase M.** (2000). The I κ B kinase (IKK) and NF- κ B: key elements of proinflammatory signaling. *Semin. Immunol.*12, 85-98.
- Karlhofer F.M., Ribaldo R.K., Yokoyama W.M.** (1992). The interaction of Ly-49 with H-2Dd globally inactivates natural killer cell cytolytic activity. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 105, 72-85.
- Katze M.G., He Y., Gale M. Jr.** (2002). Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 675-687.
- Kirschning C.J., Bauer S.** (2001). Toll-like receptors: cellular signal transducers for exogenous molecular patterns causing immune responses. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 251-260.
- Kirwan S.E., Burshtyn D.N.** (2007). Regulation of natural killer cell activity. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 46-54.
- Klemm S., Gutermuth J., Hültner L., Sparwasser T., Behrendt H., Peschel C., Mak T.W., Jakob T., Ruland J.** (2006). The Bcl10-Malt1 complex segregates Fc epsilon RI-mediated nuclear factor kappa B activation and cytokine production from mast cell degranulation. *J. Exp. Med.* 203, 337-347.
- Koo G.C., Peppard J.R.** (1984). Establishment of monoclonal anti-NK1.1. antibody. *Hybridoma* 3, 301-303.

- Kos, F. J.** (1998). Regulation of adaptive immunity by natural killer cells. *Immunol. Res.* 17, 303-312.
- Krug A., Luker G.D., Barchet W., Leib D.A., Akira S., Colonna M.** (2003). Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 103, 1433-1437.
- Kumar H., Kawai T., Akira S.** (2009). Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem. J.* 420, 1-16.
- Lanier L.L.** (1997). Natural killer cells: from no receptors to too many. *Immunity* 6, 371-378.
- Lanier L.L.** (1998). NK cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 359-393.
- Lanier L.L.** (2003). Natural killer cell receptor signaling. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 308-314.
- Lanier L.L.** (2005). NK Cell Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 225-274.
- Li Q., Verma I.M.** (2002). Regulation in the immune system. *Nature Rev. Immunol.*, 725-734.
- Long E.O.** (1999). Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 875-904.
- Mager D.L., McQueen K.L., Wee V., Freeman J.D.** (2001). Evolution of natural killer cell receptors: coexistence of functional Ly49 and KIR genes in baboons. *Curr. Biol.* 11, 626-630.
- Malarkannan S., Regunathan J., Chu H., Kutlesa S., Chen Y., Zeng H., Wen R., Wang D.** (2007). Bcl10 plays a divergent role in NK cell-mediated cytotoxicity and cytokine generation. *J. Immunol.* 179, 3752-3762.
- Martin-Fontecha A., Thomson L.L., Brett S., Gerard C., Lipp M., Lanzavecchia A., Sallusto F.** (2004). Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN γ for T_H1 priming. *Nat. Immunol.* 5, 1260-1265.
- Mason L.H., Willette-Brown J., Mason A.T., McVicar D., Ortaldo J.R.** (2000). Interaction of Ly-49D⁺ NK cells with H-2Dd target cells lead to Dap-12 phosphorylation and IFN- γ secretion. *J. Immunol.* 164, 603-611.
- McVicar D.W., Burshtyn D.N.** (2001). Intracellular signaling by the killer immunoglobulin-like receptors and Ly49. *Sci. STKE* 75, re1.
- Medzhitov R., Janeway C. Jr.** (2000). The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol.* 8, 452-456.
- Medzhitov R., Janeway C.A. Jr.** (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296, 298-300.
- Miettinen M., Matikainen S., Vuopio-Varkila J., Pirhonen J., Varkila K., Kurimoto M., Julkunen I.** (1998). Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18 and

gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect. Immun.* 66, 6058-6062.

Mukhopadhyay S., Herre J., Brown G.D., Gordon S. (2004). The potential for Toll-like receptors to collaborate with other innate immune receptors. *Immunology* 112, 521-530.

Nakamura M.C., Linnemeyer P.A., Niemi E.C., Mason L.H., Ortaldo J.R., Ryan J.C., Seaman W.E. (1999). Mouse Ly-49D recognizes H-2Dd and activates natural killer cell cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 189, 493-500.

Newton K., Dixit V.M. (2003). Mice lacking the CARD of CARMA1 exhibit defective B lymphocyte development and impaired proliferation of their B and T lymphocytes. *Curr. Biol.* 13, 1247-1251.

Ohlen C. et al (1989). Prevention of allogeneic bone marrow graft rejection of H-2 transgene in donor mice. *Science* 246, 666-668.

Oliva A., Kinter A.L., Vaccarezza M., Rubbert A., Catanzaro A., Moir S., Monaco J., Ehler L., Mizell S., Jackson R., Li Y., Romano J.W., Fauci A.S. (1998). Natural killer cells from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-infected individuals are an important source of CC-chemokines and suppress HIV-1 entry and replication in vitro. *J. Clin. Invest.* 102, 223-231.

Orange J.S., Wang B., Terhorst C., Biron C.A. (1995). Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *J. Exp. Med.* 182, 1045-1056.

Orange J.S. (2006). Human natural killer cell deficiencies. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 6, 399-409.

Ortaldo J.R., Mason L.H., Gregorio T.A., Stoll J., Winkler-Pickett R.T. (1997). The Ly-49 family: regulation of cytokine production in murine NK cells. *J. Leukoc. Biol.* 62, 381-388.

Pardoll D. (2003). Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu. Rev. Immunol.* 21, 807-839.

Parham P. (2005). Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors. *Mol. Immunol.* 42, 459-462.

Pearson G., Robinson F., Beers G.T., Xu B.E., Karandikar M., Berman K., Cobb M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22, 153-183.

Perussia B. (1991). Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines. *Curr. Opin. Immunol.* 3, 49-55.

- Raulet D.H., Vance R.E., McMahon C.W.** (2001). Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu. Rev. Immunol* 19, 291-330.
- Raulet D.H.** (2004). Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nature Immunol.* 5, 996-1002.
- Raulet D.H., Vance R.E.** (2006). Self-tolerance of natural killer cells. *Nat. Rev. Immunol* 6, 520-531.
- Renard V., Cambiaggi A., Vély F., Bléry M., Olcese L., Olivero S., Bouchet M., Vivier E.** (1997). Transduction of cytotoxic signals in natural killer cells: a general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes. *Immunol. Rev.* 155, 205-221.
- Robertson M.J., Ritz J.** (1990). Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76, 2421-2438.
- Ruland J., Duncan G.S., Elia A., del Barco Barrantes I., Nguyen L., Plyte S., Millar D.G., Bouchard D., Wakeham A., Ohashi P.S. Mak T.W.** (2001). Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure. *Cell* 104, 33-42.
- Ruland J., Duncan G.S., Wakeham A., Mak T.W.** (2003). Differential requirement for Malt1 in T and B cells antigen receptor signaling. *Immunity* 19, 749-758.
- Ryan J.C., Turck J., Niemi E.C., Yokoyama W.M., Seaman W.E.** (1992). Molecular cloning of the NK1.1 antigen, a member of the NKR-P1 family of natural killer cell activation molecules. *J. Immunol.* 149, 1631-1635.
- Schatz D.G., Oettinger M.A., Schlissel M.S.** (1992). V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 359-383.
- Smith H.R., Heusel J.W., Mehta I.K., Kim S., Dorner B.G., Naidenko O.V., Iiuaka K., Furukawa H., Beckman D.L., Pingel J.T., Scalzo A.A. Fremont D.H., Yokoyama W.M.** (2002). Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 8826-8831.
- Smith H.R., Idris A.H., Yokoyama W.M.** (2001). Murine natural killer cell activation receptors. *Immunol. Rev.* 181, 115-125.
- Snijders A., Hilkens C.M., van der Pouw Kraan T.C., Engel M., Aarden L.A., Kapsenberg M.L.** (1996). Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is determined by the expression of the p35 subunit. *J. Immunol.* 156,1207-1212.
- Snipas S.J., Wildfang E., Nazif T., Christensen L., Boatright K.M., Bogyo M., Stennicke H.R., Salvesen G.S.** (2004). Characteristics of the caspase-like catalytic domain of human paracaspase. *Biol. Chem.* 385, 1093-1098.

- Spits H., Blom B., Jaleco AC., Weijer K., Verschuren MC. et al.** (1998). Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. *Immunol. Rev.* 165, 75-86.
- Steinle A., Waldhauer I., Welte S., Kuttruff S.** (2006). Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction *Nat. Immunol.*
- Su H.C., Orange J.S., Fast L.D., Chan A.T., Simpson S.J., Terhorst C., Biron C.A.** (1994). IL-2-dependent NK cell responses discovered in virus-infected β 2-microglobulin-deficient mice. *J. Immunol.* 153, 5674-5681.
- Takeda K., Kaisho T., Akira S.** (2003). Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335-376.
- Tato C.M., Mason N., Artis D., Shapira S., Caamano J.C., Bream J.H., Liou H.C. Hunter C.A.** (2006). Opposing roles of NK-kappaB family members in the regulation of NK cell production of IFN-gamma. *Int. Immunol.* 18, 505-513.
- Thome M., Tschopp J.** (2003). TCR-induced NF-kappaB activation: a crucial role for Carma1, Bcl10 and MALT1. *Trends Immunol.* 24, 419-424.
- Thome M.** (2004). CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 348-359.
- Tomlinson S.** (1993). Complement defense mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 83-89.
- Trinchieri G.** (1989). Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* 47, 187-376.
- Uren A.G., O'Rourke K., Aravind L.A., Pisabarro M.T., Seshagiri S., Koonin E.V., Dixit V.M.** (2000). Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol. Cell* 6, 961-967.
- Vance R.E., Kraft J.R., Altman J.D., Jensen P.E., Raulet D.H.** (1998). Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b). *J. Exp. Med.* 188, 1841-1848.
- Vankayalapati R., Garg A., Porgador A., Griffith D.E., Klucar P., Safi H., Girard W.M., Cosman D., Spies T., Barnes P.F.** (2005). Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J. Immunol.* 175, 4611-4617.
- Vély F., Vivier E.** (1997). Conservation of structural features reveals the existence of a large family of inhibitory cell surface receptors and noninhibitory/activatory counterparts. *J. Immunol.* 159, 2075-2077.

- Vilches C., Parham P.** (2002). KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol* 20, 217-251.
- Vivier E., Nunes J.A., Vely F.** (2004). Natural killer cell signaling pathways. *Science* 306, 1517-1519.
- Wegener E., Krappmann D.** (2007). CARD-Bcl10-Malt1 signalosomes: missing link to NK-kappaB. *Sci. STKE* 384, 21.
- Welsh R.M., O'Donnell C.L., Shultz L.D.** (1994). Antiviral activity of NK 1.1+ natural killer cells in C57BL/6 scid mice infected with murine cytomegalovirus. *Nat. Immun.* 13, 239-245.
- Willis T.G., Jadayel D.M., Du M.Q., Peng H., Perry A.R., Abdul-Rauf M., Prince H., Karran L., Majekodunmi O., Wlodarska I., Pan L., Crook T., Hamoudi R., Isaacson P.G., Dyer M.J.** (1999). Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell* 96, 35-45.
- Yokoyama W.M., Matsumoto K., Scalzo A.A., Brown M.G.** (1997). Molecular genetics of the natural killer gene complex and innate immunity. *Biochem. Soc. Trans.* 25, 691-695.
- Yokoyama W.M., Scalzo A.A.** (2002). Natural killer cell activation receptors in innate immunity to infection. *Microbes Infect.* 4, 1513-1521.
- Yokoyama W.M., Plougastel B.F.** (2003). Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 304-316.
- Yokoyama W.M., French A.R., Sjölin H., Kim S., Koka R., Yang L., Young D.A., Cerboni C., Tomasello E., Ma A., Vivier E., Kärre K.** (2006). DAP12 Signaling Directly Augments Proliferative Cytokine Stimulation of NK Cell during Viral Infections. *The Journal of Immunology* 7, 4981-4990.
- Yu Y.Y.L., Kumar V., Bennett M.** (1992). Murine natural killer cells and marrow graft rejection. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 189-213.
- Zwirner N.W., Domaica C.** (2010). Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *Biofactors* 36, 247-288.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung der Interaktion zwischen NK- und Zielzelle	15
Abbildung 2	Wirkung von Zytokinen auf die NK-Zell Antwort	16
Abbildung 3	Schematische Darstellung der proximalen Signaltransduktion verschiedener muriner NK-Zell Rezeptoren	17
Abbildung 4	Bcl10-abhängige Aktivierung von NF- κ B bei Stimulation von B- und T-Zell Rezeptor	19
Abbildung 5	Die Proteinstrukturen von Bcl10, Card9 und Carma1	22
Abbildung 6	NK-Zell Population nach Aufreinigung mit MACS	31
Abbildung 7	M54-Plasmidstandardkurve in linearer und logarithmischer Auftragung	39
Abbildung 8	Das Fehlen von Bcl10 hat keinen Einfluss auf die Entwicklung von NK-Zellen	40
Abbildung 9	Gestörte Zytokinproduktion in Abwesenheit von Bcl10	42
Abbildung 10	Ebenfalls deutlich beeinträchtigte Zytokinproduktion in Abwesenheit von Malt1	44
Abbildung 11	Carma1, nicht aber Card9 ist für das NK-Zell Signaling von Bedeutung	45
Abbildung 12	ITAM-gekoppelte NK-Zell Rezeptoren aktivieren NF- κ B und die MAP-Kinasen Jnk und p38 über Bcl10 und Malt1	47
Abbildung 13	Die NK-Zell Zytotoxizität wird durch die Abwesenheit von Bcl10 nicht beeinflusst	48
Abbildung 14	Das Fehlen von Bcl10 hat keinen Einfluss auf die NK-Zell Proliferation bei MCMV Infektion	49
Abbildung 15	Kein signifikanter Unterschied der Viruslast in Milz und Leber von Wildtyp und Bcl10-defizienten Tieren	50
Abbildung 16	ITAM-abhängige NK-Zell Rezeptoren aktivieren NF- κ B und die MAP-Kinasen p38 und JNK über den Carma1/Bcl10/Malt1 Komplex	54

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Christina Stephanie Grupp
Geburtsdatum	10. Januar 1983
Geburtsort	München
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulische Laufbahn

09/1989 – 07/1993	Ludwig-Thoma Volksschule Traunstein
09/1993 – 06/2002	Chiemgau-Gymnasium Traunstein, Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Akademische Laufbahn

10/2002 – 07/2004	Vorklinischer Abschnitt des Studiums der Humanmedizin an der Ludwigs-Maximilians-Universität München
08/2004	Ärztliche Vorprüfung
10/04 – 07/2008	Klinischer Abschnitt des Studiums der Humanmedizin an der Technischen Universität München
08/2007 – 12/2007	1. Tertial des Praktischen Jahres in der Inneren Medizin, Gastroenterologie, Klinikum rechts der Isar, München und Kardiologie, Deutsches Herzzentrum, München
12/2007 – 04/2008	2. Tertial des Praktischen Jahres in der Pädiatrie, Klinikum Schwabing, München
04/2008 – 07/2008	3. Tertial des Praktischen Jahres in der Chirurgie, Viszeralchirurgie, Klinikum rechts der Isar, München und Viszeralchirurgie, Bombay Hospital, Mumbai, Indien
05/2009	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit 01/10	Assistenzärztin in der Abteilung für Hämatologie und internistische Onkologie, Klinikum Schwabing, München

Danksagung

Danken möchte ich vor allem Prof. Dr. Jürgen Ruland, der es mir ermöglichte, diese Dissertation am Institut für Molekulare Immunologie durchzuführen.

Besonderer Dank gilt auch Dr. Olaf Groß, der mich bei den Experimenten und beim Schreiben der Arbeit wesentlich unterstützte.

Sehr wertvoll für das Gelingen der Arbeit war die freundliche Atmosphäre in der Arbeitsgruppe, wofür ich allen Mitarbeitern, vor allem Konstanze Pechloff, danken möchte.

Vielen Dank auch an meine Familie und Freunde für Ihre Unterstützung und Ermunterung.