



Die im Vortrag gezeigten Laborbefunde dienen der  
Verdeutlichung der fachlichen Inhalte.

Wir weisen ausdrücklich darauf hin, dass entsprechende  
Laboranalysen auch von anderen Labors durchgeführt  
werden und dass die Indikationsstellung für Labordiagnostik  
ausschließlich durch den Behandler  
oder das Krankenhaus erfolgt.

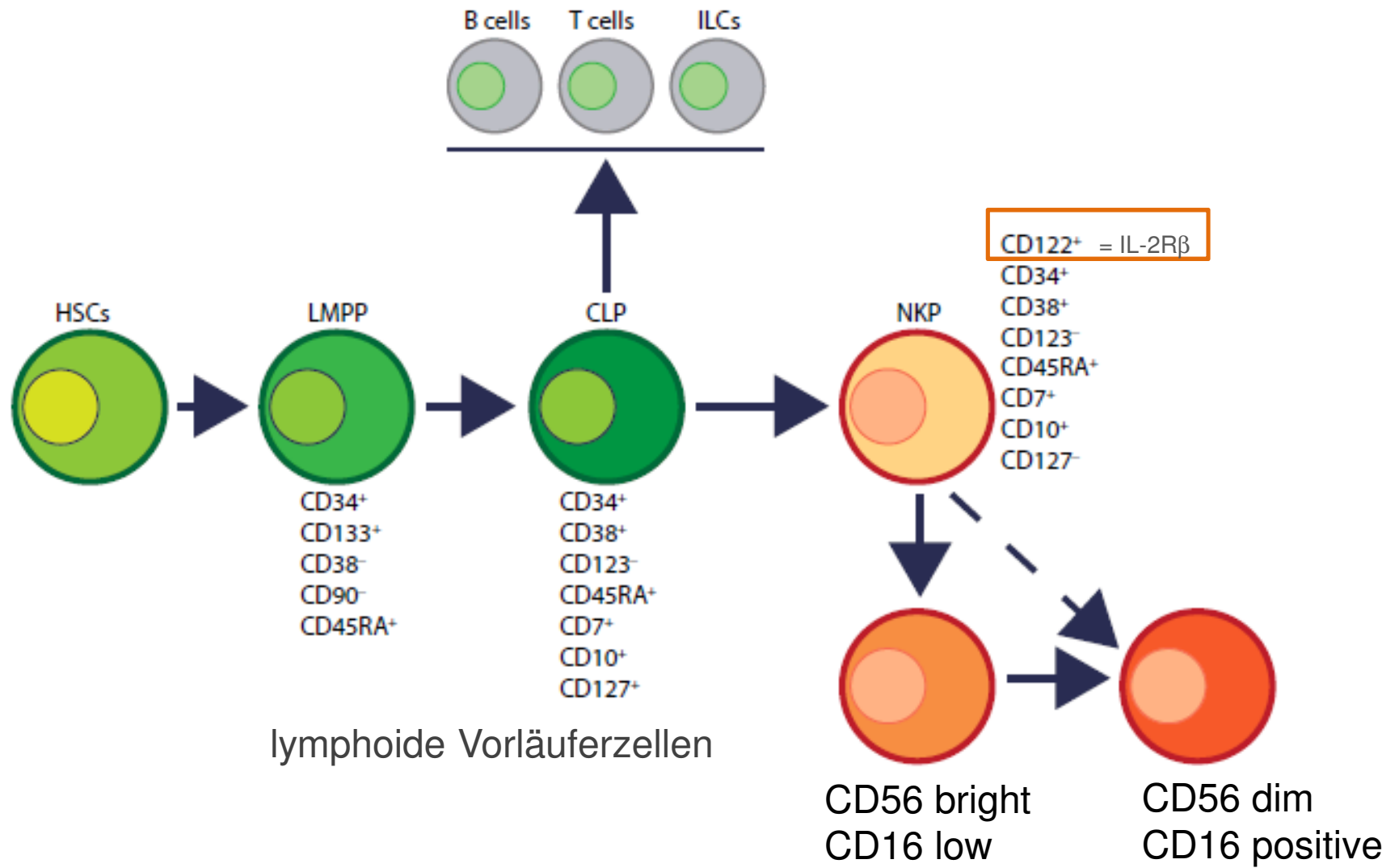


# Natürliche Killerzellen Ihre Rolle in der Immunabwehr

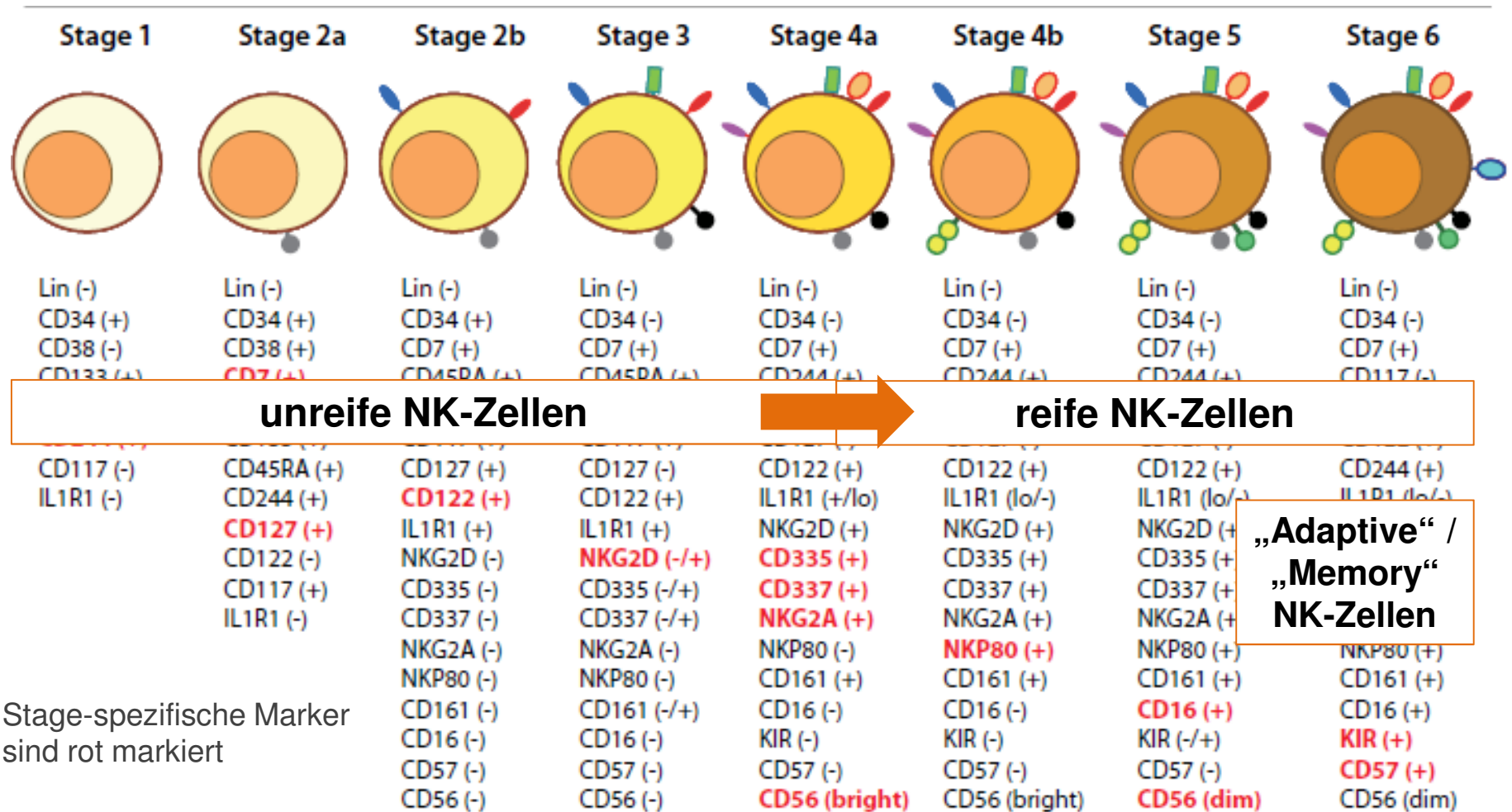
**Dr. rer. nat. Cornelia Doebis**

IMD Berlin MVZ

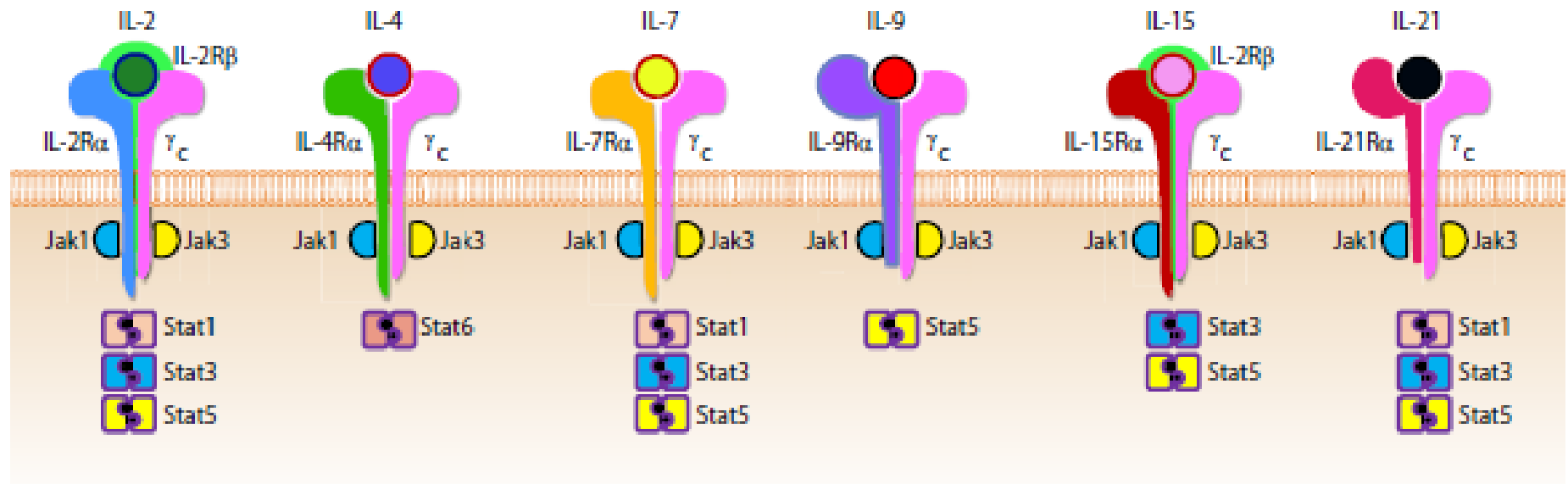
# Entwicklung der NK-Zellen



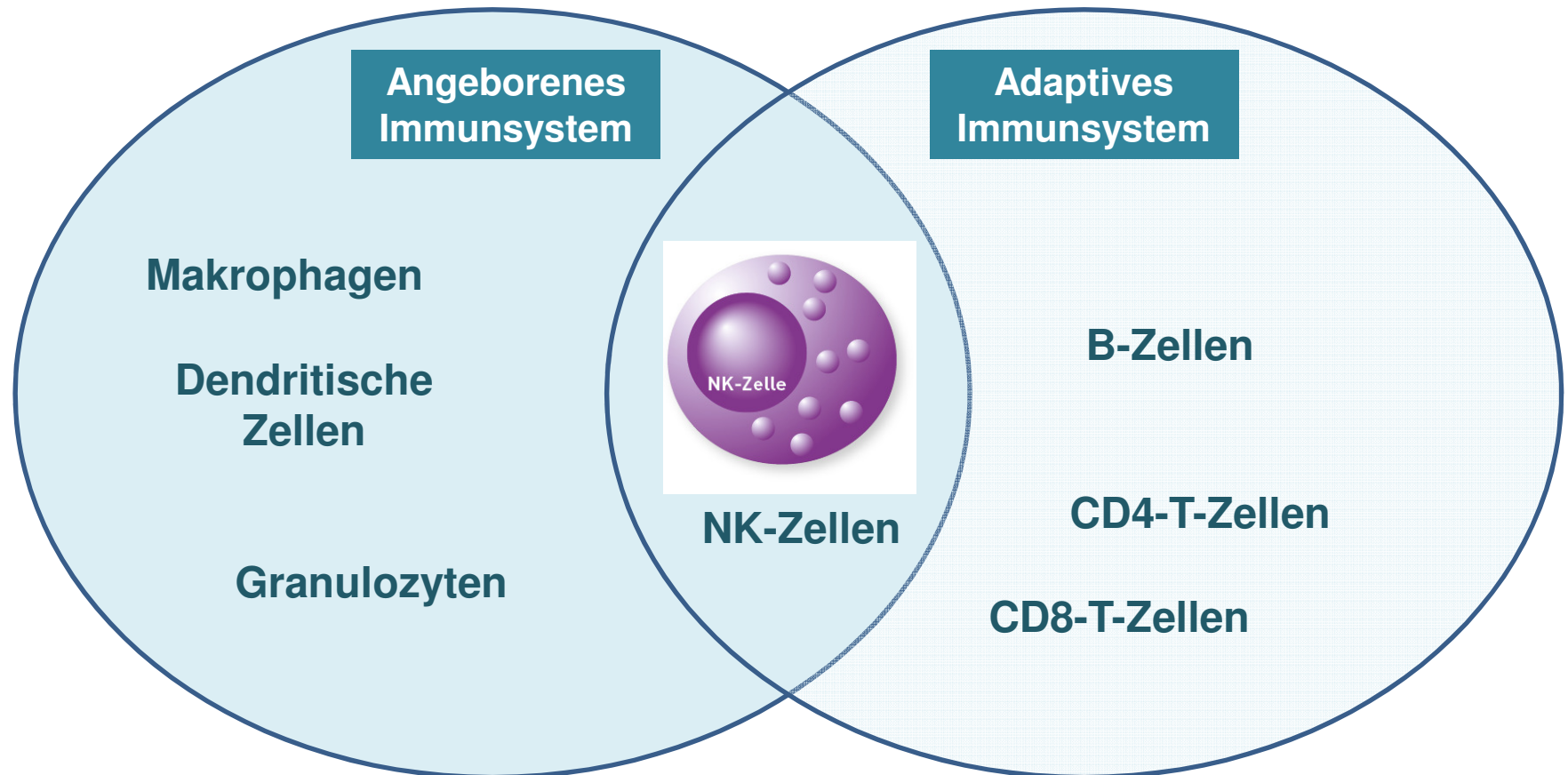
# Entwicklung der NK-Zellen



# Rezeptorexpression auf NK-Zellen – $\gamma_c$ -Kette



# NK-Zellen im Immunsystem



# Funktion der NK-Zellen

- gehören zum angeborenen Immunsystem
  - keine antigen-spezifischen Rezeptoren
  - aber inhibierende und aktivierende Rezeptoren
  - besitzen Pattern Recognition Receptors (PPRs, z.B. CD56)
- erkennen veränderte / entartete Zellen
  - fehlende MHC Klasse I Moleküle auf der Oberfläche
- Erkennen und Abtöten von entarteten Zellen
  - starke Zytotoxizität (zytotox. Granula enthalten Granzyme B, Perforin)
  - produzieren große Mengen an proinflammatorischen Zytokinen (z.B. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) sowie GM-CSF und Chemokine (z.B. RANTES)

# Funktion der NK-Zellen

- Antivirale Immunität
  - intrazelluläre Erreger (z.B. CMV, EBV...) ⇒ Immunprotektion
- Tumor-Immunüberwachung (v.a. maligne hämatologische Erkrankungen)
- Beteiligung an pathologischer Entzündung in Autoimmunerkrankungen
- regulieren auch antiinflammatorische Prozesse, z.B. Gewebereparatur
- Kontrolle bei der fötalen Entwicklung (50-90% der lymphoiden Zellen im Uterus sind NK-Zellen)
  
- Crosstalk mit anderen Immunzellen noch nicht vollends aufgeklärt

# NK-Zellen - inhibierende und aktivierende Rezeptoren

## Inhibierende Rezeptoren

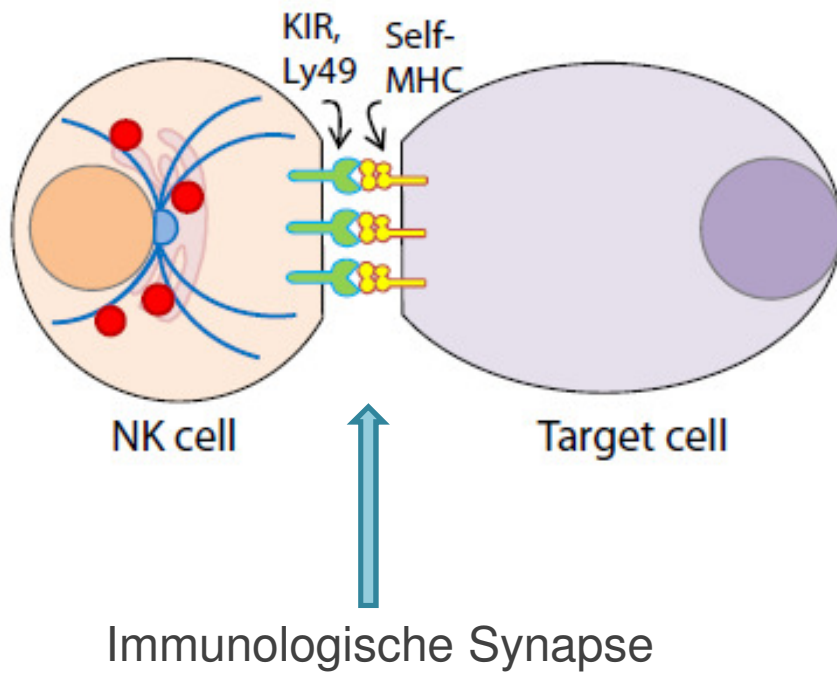
- Killer cell immunoglobulin-like Rezeptoren (KIRs)
- binden an MHC I Moleküle (HLA-A, HLA-B und HLA-C)
- heterogenes Repertoire an KIRs zwischen Individuen

## Aktivierende Rezeptoren (NKR)

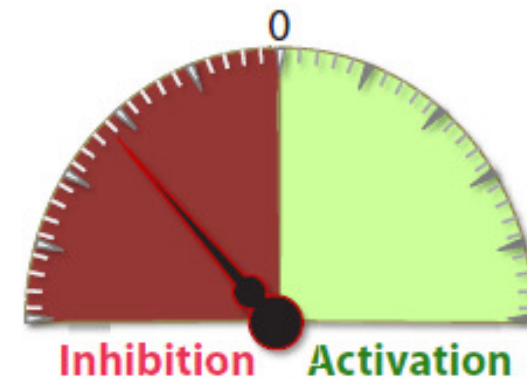
- interagieren mit stress-induzierten Liganden auf Zellen
- NKG2D – konstitutiv auf NK-Zellen exprimiert, erkennt stress-induzierte Liganden, die strukturell mit MHC I verbunden sind
- Aktivierung führt zur Mobilisierung von lytischen Granula sowie zur Zytokinproduktion

# Erkennung der Zielzelle

## A. Immunological-self'

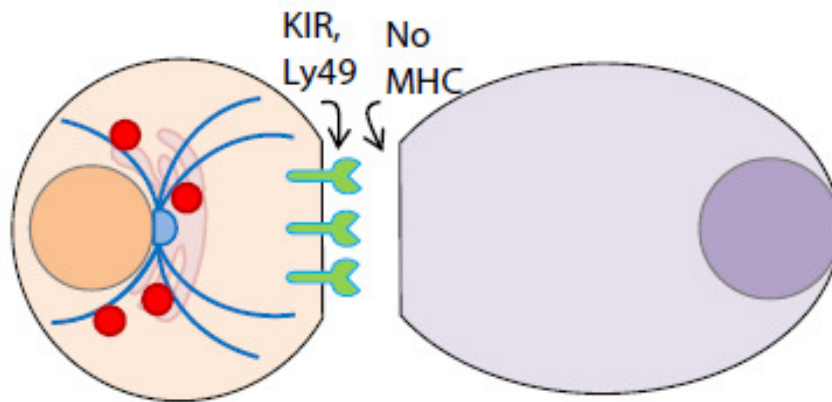


## Predicted activation threshold



# Erkennung der Zielzelle

## B. 'Missing-self'

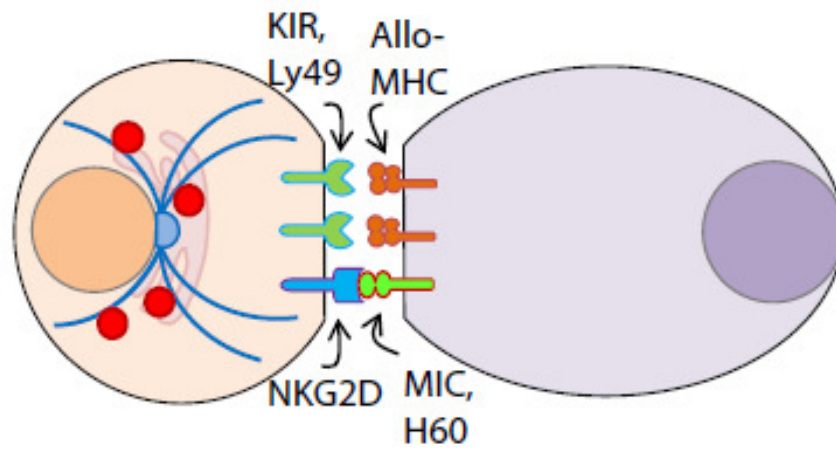


## Predicted activation threshold

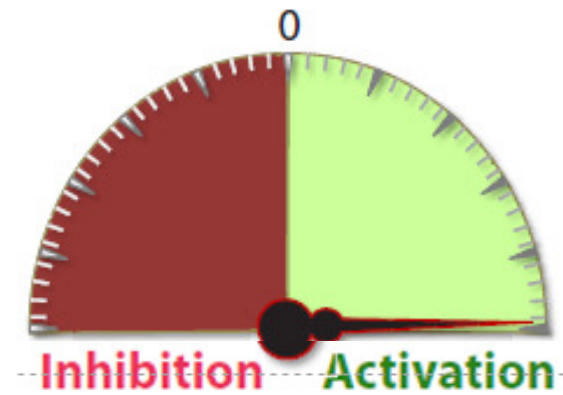


# Erkennung der Zielzelle

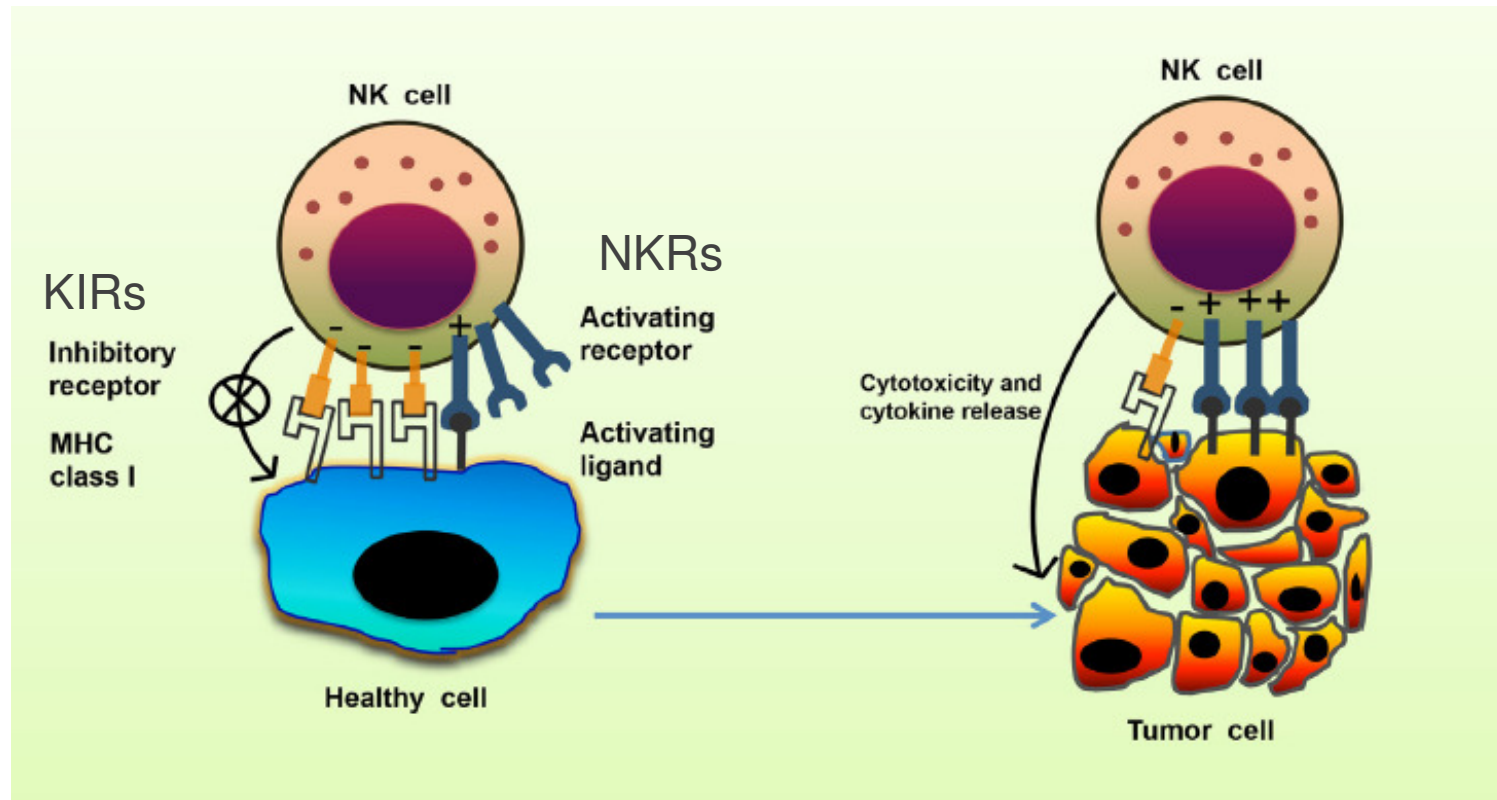
D. 'Non-self'



Predicted activation threshold



# NK-Zellen besitzen inhibierende und aktivierende Rezeptoren

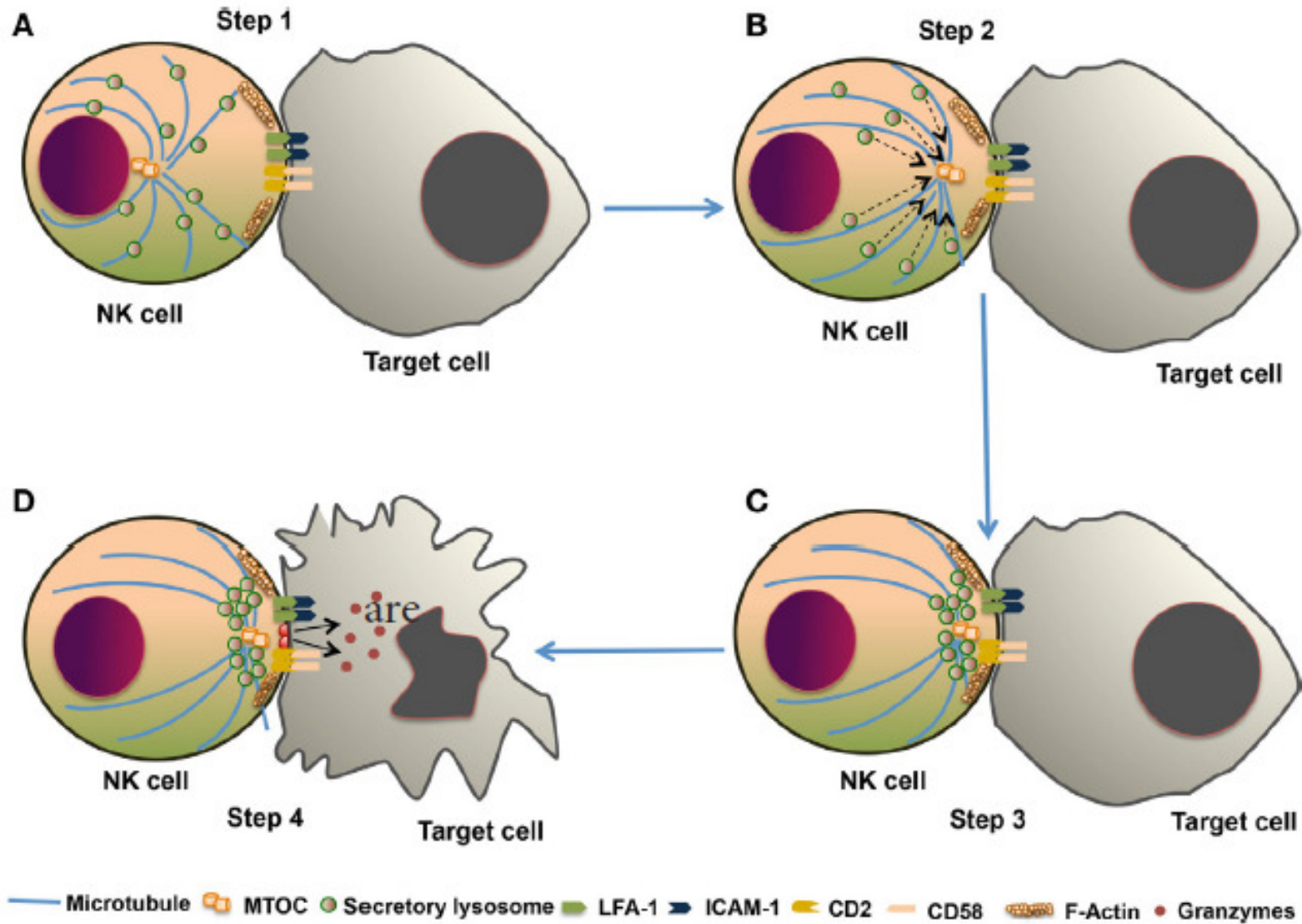


⇒ Fehlen der MHC I Bindung („missing self“) sowie Expression von Liganden, die durch KIRs erkannt werden, führt zur Aktivierung der NK-Zellen

# Mediatoren der NK-Zellen

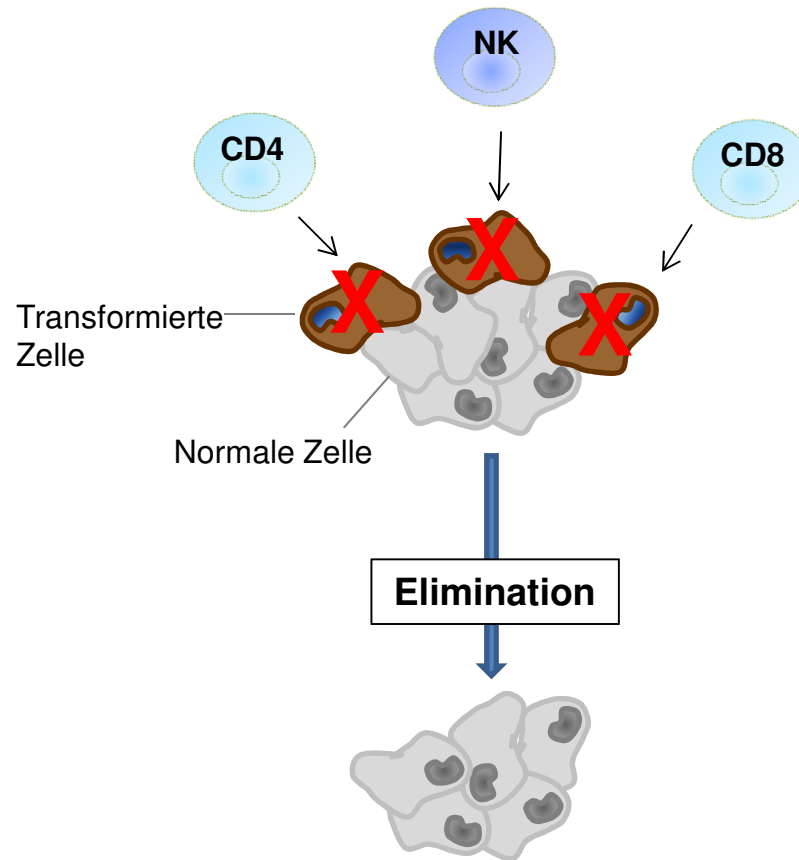
Granzyme B, Perforin, IFN- $\gamma$ , FasL, TNF- $\alpha$	Anti-Tumor-Zytotoxizität
Granzyme B, Perforin, IFN- $\gamma$ , FasL, TNF- $\alpha$	Anti-viral und antibakteriell
GM-CSF, CCL-3, CCL-4, CCL-5 (RANTES)	Hilfe für adaptive Immunantwort
IL-17, IL-22	Epitheliale Regeneration
IL-10	Regulatorische Funktion

# Zytotoxische Wirkung der NK-Zellen

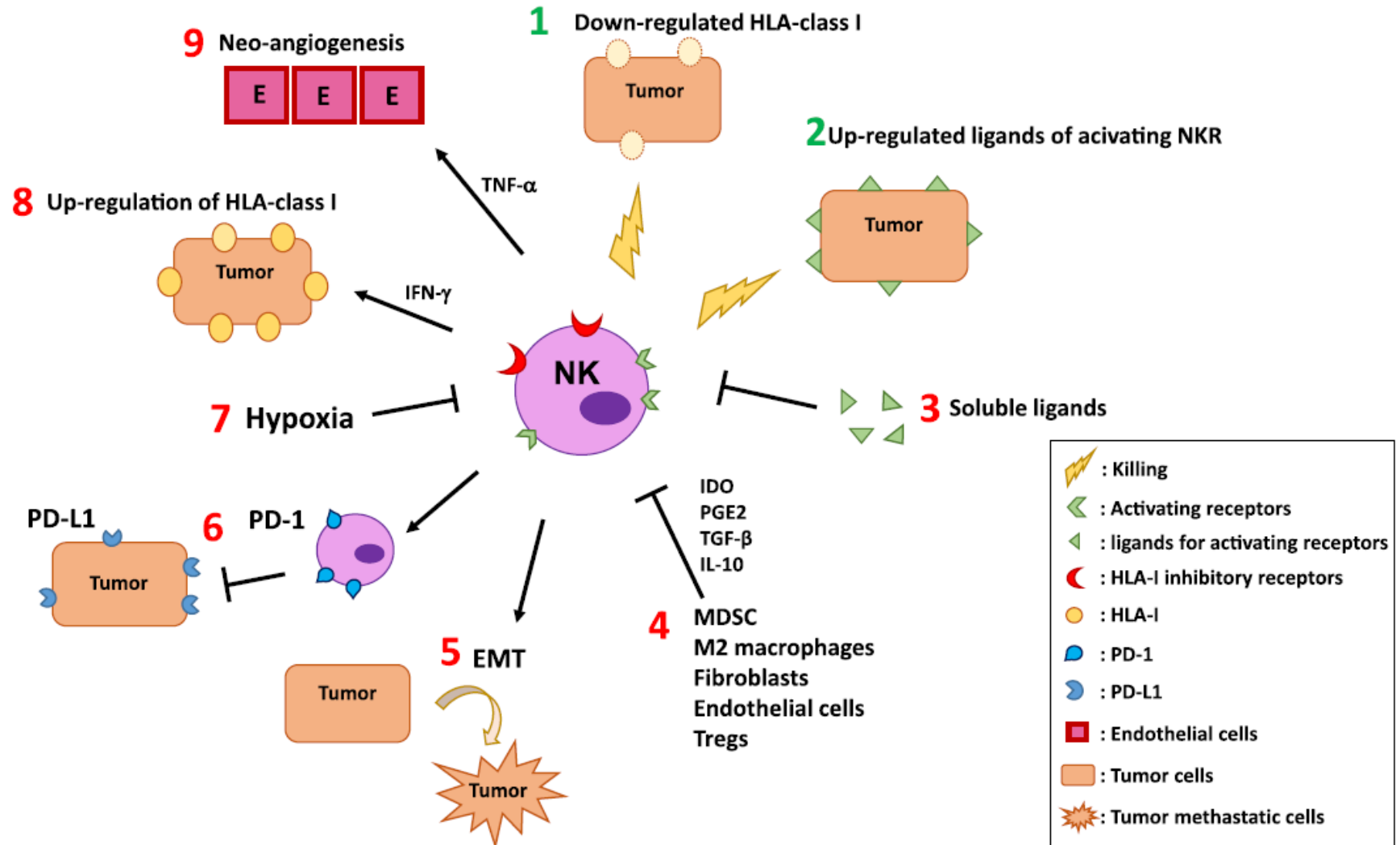




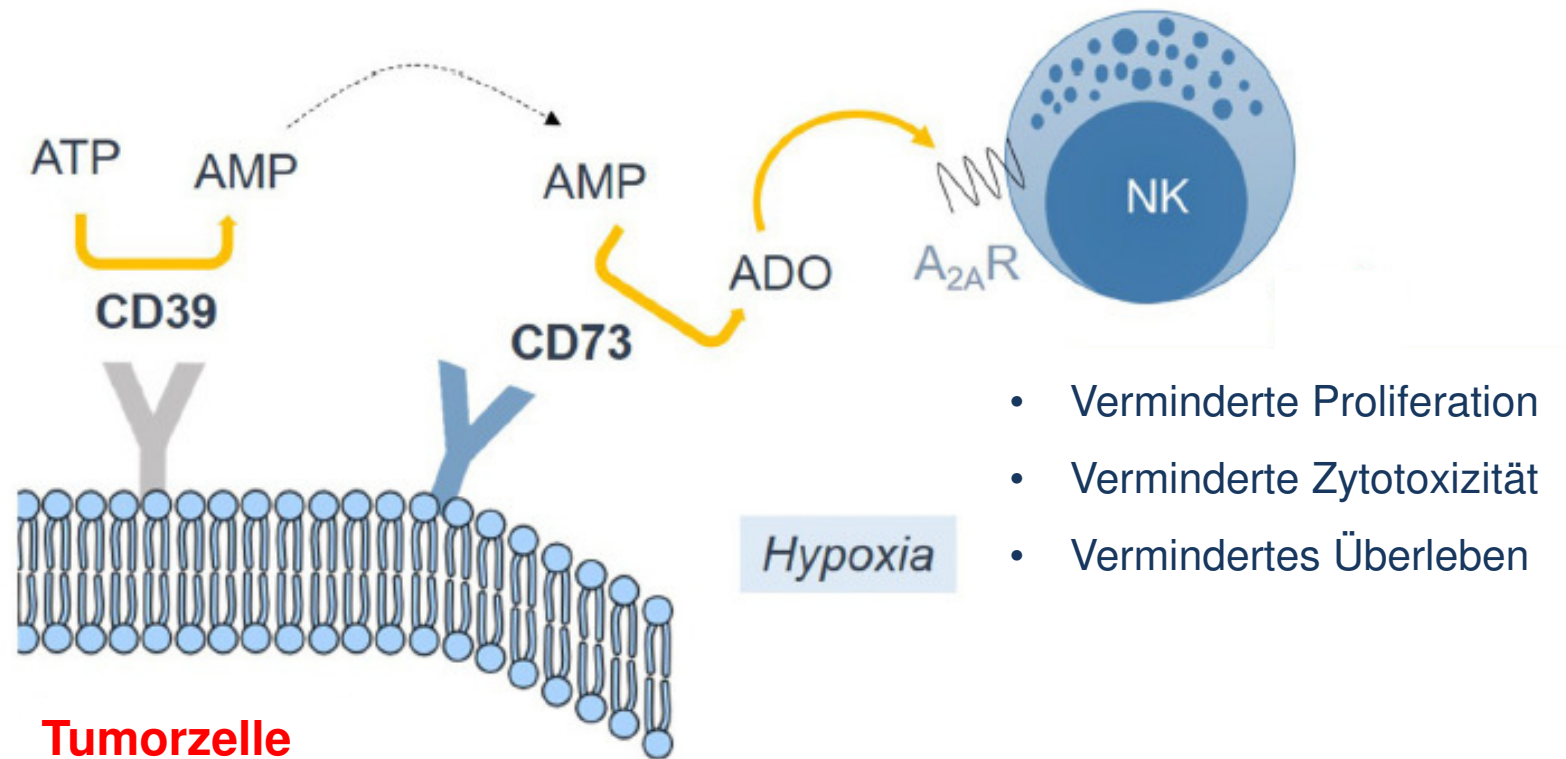
# Immunabwehr gegen Tumorzellen



# Einfluss des Tumors auf die NK-Zell-Funktion



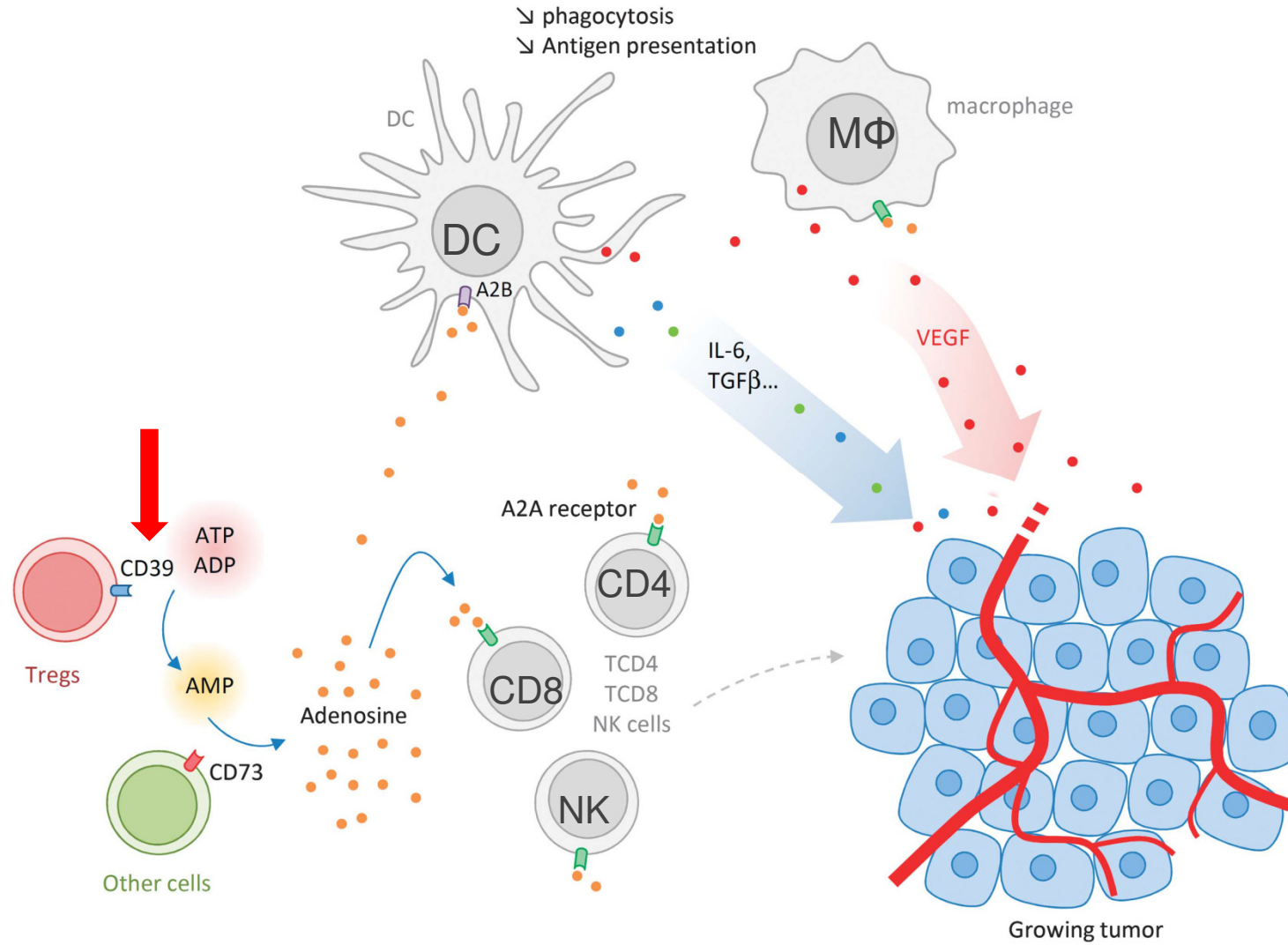
# Einfluss des Tumors auf die NK-Zell-Funktion



## Hypoxie-adenosinerge Suppression

CD39/CD73 = Ectonucleotidasen

# CD39+ Regulatorische T-Zellen



## Diagnostische Methoden

Quantitativer Nachweis der NK-Zellzahl

→ Durchflußzytometrische Analyse im zellulären Immunstatus

Qualitativer Nachweis der NK-Zell-Funktion

→ NK-Zell-Zytotoxizitätstest

→ NK-Modulatorortest

# Quantitativer Nachweis der NK-Zellen

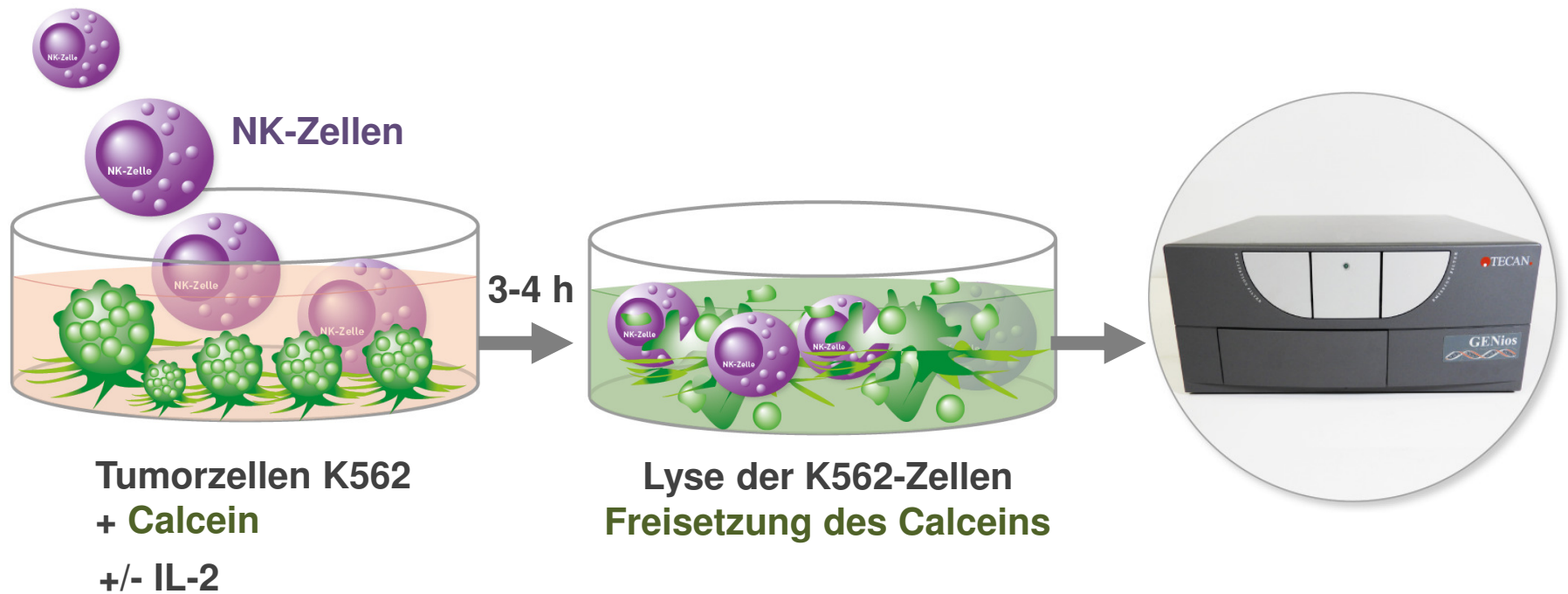
IMD Labor Berlin		Ärztlicher Befundbericht			
		Normwerte		Normwerte	
Leukozyten	7400 / $\mu$ l	3900 - 10200			
Lymphozyten	1110 / $\mu$ l	1100 - 4500		15 %	20 - 44
Monozyten	518 / $\mu$ l	100 - 900		7 %	2 - 9,5
Granulozyten	5772 / $\mu$ l	2400 - 7400		78 %	42 - 75
<b>Immunkompetenz</b>					
T-Zellen	1010 / $\mu$ l	920 - 2580		91 %	61 - 84
B-Zellen	33 / $\mu$ l	120 - 630		3 %	7 - 21
NK-Zellen	56 / $\mu$ l	210 - 740		5 %	10 - 30
CD4+ T-Helferzellen	323 / $\mu$ l	550 - 1460		29 %	32 - 60

⇒ Quantitatives zelluläres Immunprofil (durchflußzytometrisch ermittelt)

⇒ ABER: verminderte NK-Zellzahl im Blut ist wenig aussagekräftig

# NK-Zell-Zytotoxizitätstest → Funktion

## NK-Zell-vermittelte Lyse der Zielzellen



# Entscheidend ist die Funktionalität der NK-Zellen

## Untersuchung

## Ergebnis Einheit Referenzbereich

### NK-Zell-Zytotoxizitätstest

Im Test wird die Rate an K562-Tumorzellen analysiert, die durch die aus Heparinblut des Patienten isolierten Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) abgetötet werden. Die Tumorzell-Apoptoserate kennzeichnet die aktuelle NK-Zellfunktion des Patienten. Der Wert für die Apoptoserate-IL2-stimuliert gibt die zusätzliche Stimulierbarkeit der NK-Zellen an.

Tumorzell-Apoptose-Rate	11.5	%	> 21
Apoptose-Rate-IL2-stimuliert	44.1	%	

Wie ist die aktuelle NK-Zellfunktion ?

Kann man die Funktion der vorhandenen NK-Zellen bei optimaler Aktivierung erhöhen?

# Befundkonstellationen

## Patient A

	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
NK-Zell-Zytotoxizitätstest			
Tumorzell-Apoptose-Rate	<b>11.6</b>	%	> 21
Apoptose-Rate-IL2-stimuliert	11.8	%	
<b>NK-Zellfunktion: schlecht</b>		<b>Prognose für IS: schlecht</b>	

## Patient B

Tumorzell-Apoptose-Rate	<b>11.9</b>	%	> 21
Apoptose-Rate-IL2-stimuliert	32.6	%	
<b>NK-Zellfunktion: schlecht</b>		<b>Prognose für IS: gut</b>	

## Patient C

Tumorzell-Apoptose-Rate	33.1	%	> 21
Apoptose-Rate-IL2-stimuliert	56.7	%	
<b>NK-Zellfunktion: gut</b>		<b>Prognose für IS: gut, wenn gewollt</b>	

## Patient D

Tumorzell-Apoptose-Rate	77.1	%	> 21
Apoptose-Rate-IL2-stimuliert	77.4	%	
<b>NK-Zellfunktion: sehr gut</b>		<b>Prognose für IS: nicht notwendig</b>	

IS = Immunstimulation



# Immunistimulation bei verminderter NK-Zellfunktion

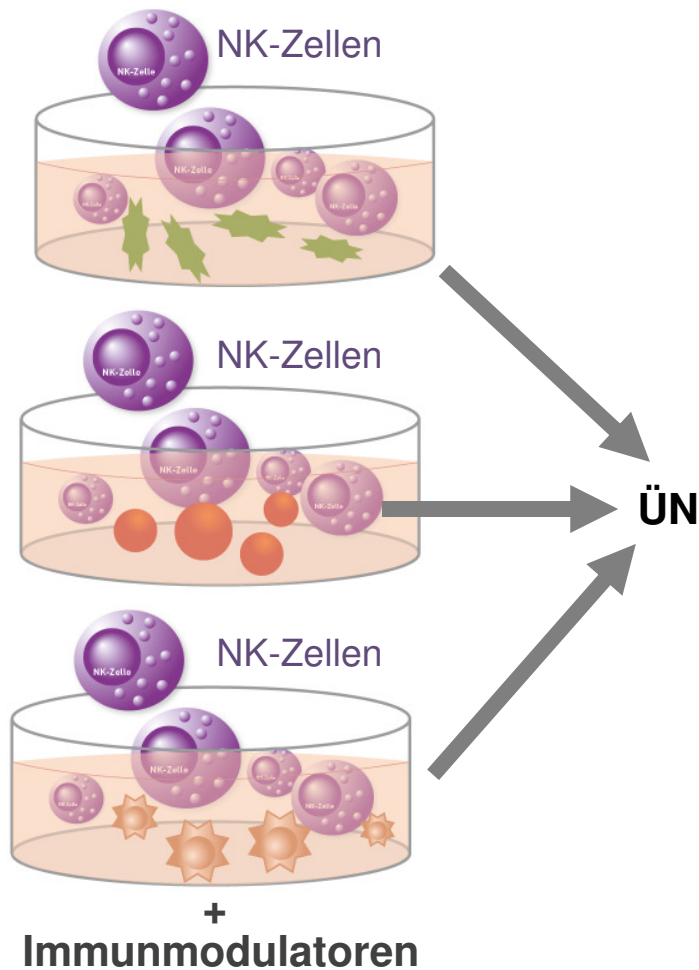
Welcher Immunmodulator ist geeignet?

## Typische (unspezifische) Immunmodulatoren

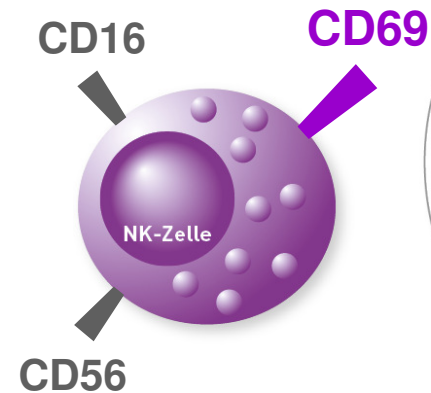
- pflanzliche Immunstimulanzien
- Bakterien-Lysate
- Organpräparate (z.B. Thymus)
- u.a.

# Auswahl eines geeigneten Immunstimulators im NK-Zell-Modulatorortest

**Aktivierung** der NK-Zellen durch Immunmodulatoren



Messung von CD69 auf NK-Zellen



# Auswahl eines geeigneten Immunstimulators im NK-Zell-Modulatorortest

## NK-Zell-Modulatorortest

Es wird die Aktivierbarkeit von NK-Zellen nach Inkubation mit Immunmodulatoren anhand der induzierten Expression des NK-Zell-Aktivierungsmarkers CD69 auf der Zelloberfläche bestimmt.

Basalwert	7.0	%	
Mitogen-Aktivierung	93.2	%	← Positivkontrolle
Modulator 1	35.1	%	→
<u>Biobran 250</u>			
Modulator 2	15.9	%	
<u>Pro Phytobiose</u>			
Modulator 3	28.6	%	
<u>Tinofend</u>			
Modulator 4	36.2	%	→
<u>NK-Cell Aktivator</u>			
Modulator 5	31.2	%	→
<u>Maximum NK-Cells</u>			
Modulator 6	27.4	%	
<u>Blue Green Algae</u>			

# Seneszenz des NK-Zell-Kompartments

- CD56low Population => zytotoxische Aktivität
- CD56high Population => Zytokin-Produktion
- Expansion der CD56low NK-Zellen, wobei die zytotoxische Aktivität abnimmt
- CD56high NK-Zellen nehmen proportional ab und Zytokin/Chemokin-Produktion verringert sich mit dem Alter

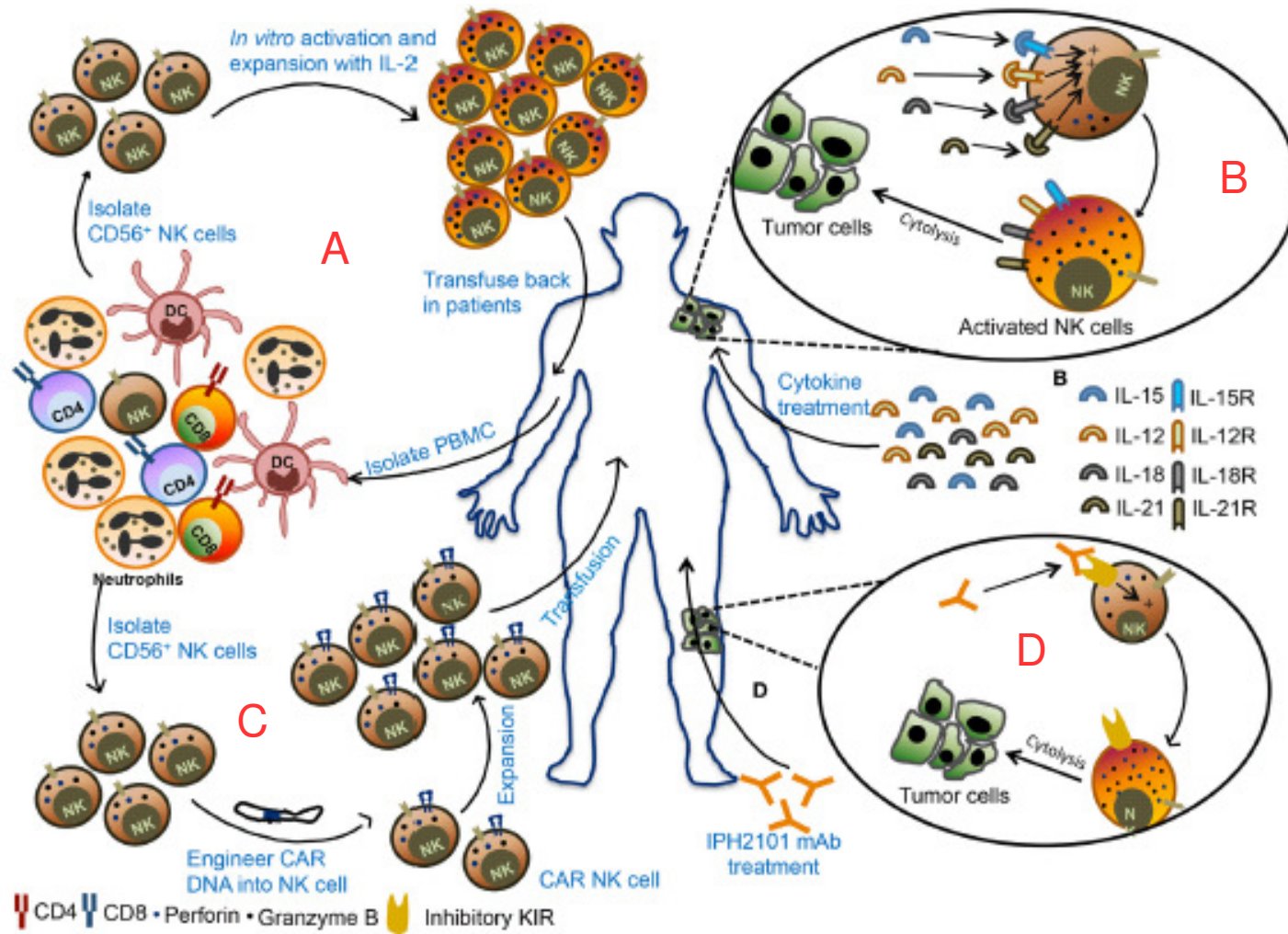
Folgen:

- erhöhte Mortalität durch gehäufte Infekte, erhöhte Tumoranfälligkeit in älteren Patienten

# NK-Zell-basierte Immuntherapie

- a. adoptiver Zell-Transfer
- b. rekombinante Zytokine
- c. Transfer CAR+ NK-Zellen
- d. monoklonale Antikörper

# NK-zellbasierte Immuntherapie



## Zusammenfassung

- NK-Zellen gehören zum angeborenen Immunsystem
- sie erkennen und eliminieren infizierte bzw. entartete Zellen
- sie tragen so zur Immunabwehr gegenüber intrazellulären Erregern bei und unterstützen bei der Tumorummunität
- die Testung der NK-Zell-Funktion ist diagnostisch aussagekräftiger als der quantitative Nachweis im Blut